

Verwendung und Grundwassergefährdungspotenzial von Additiven in Wärmeträgerflüssigkeiten für Erdwärmesonden

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Dafina Ilieva
aus Sofia, Bulgarien

Tübingen
2013

Tag der mündlichen Qualifikation:

25.02.2014

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stefan Haderlein

2. Berichterstatter:

Dr. Christine Laskov

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit selbständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25.5.2000) beachtet wurden. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Stefan Haderlein für die Bereitstellung des spannenden Themas und für das in mich gesetzte Vertrauen sowie für die jederzeit gewährte wissenschaftliche und persönliche Betreuung.

Bei Dr. Barbara Morasch bedanke ich mich herzlich für die gute Betreuung und das große Interesse an das Thema sowie für ihre ständige Motivation während der letzten Jahren. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihr intensiv, professionell und warmherzig begleitet. Ihre wegweisenden und kreativen Ideen haben wesentlich zum Erstellen dieser Arbeit beigetragen.

Dr. Christine Laskov danke ich für die Übernahme des Koreferats und die Begutachtung meiner Arbeit.

Mein weiterer Dank geht an Dr. Thomas Wendel und Renate Seelig für die Einführung in die GC-MS-Technik sowie für ihre ständige Hilfsbereitschaft bei analytischen Problemen. Bei Ellen Struve möchte ich mich für die Unterstützung bei der HPLC und bei zahlreichen Hilfestellungen im Labor bedanken. Monika Hertel danke ich für die Unterstützung im Labor.

Bei den Studenten Ulrike Teich, Noah Stern und Yago Haußmann bedanke ich mich für die unterstützende Hilfe bei den zahlreichen Probenahmen der experimentellen Ansätze.

Allen Kollegen aus den Arbeitsgruppen Umweltmineralogie, Geomikrobiologie, Umweltanalytik und Hydrogeochemie danke ich für eine gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Für die Kooperation bei der Probennahme möchte ich mich bei der Burkhardt GmbH & Co.KG und der Richard & Herbert Möck Erdwärmeanlagen GmbH bedanken.

Herrn Udo Pasler und Frau Eva De Haas vom Umweltministerium Baden-Württemberg danke ich für die Kooperation bei der Datenerhebung.

Danksagung

Meiner Familie danke ich herzlich für die stetige und ausdauernde Unterstützung während der ganzen Jahren.

Nicht zuletzt geht mein großer Dank an Vladimir, der auch in schwierigen Situationen immer für mich da ist.

Abstract

Ground based heat exchanger systems need to be evaluated in terms of potential effects on groundwater quality due to the risk of leakage of borehole heat exchanger fluids. The aim of this work was to identify the compounds which are present in additive mixtures and to investigate experimentally their biodegradability and effects on the biodegradation of the major organic component in borehole heat exchanger fluids.

A data survey was carried out in cooperation with the State Ministry of the Environment Baden-Württemberg, Germany to collect detailed information about the identity and application amounts of additives in borehole heat exchanger fluids. The survey revealed that numerous additives of various chemical classes and properties are used as corrosion inhibitors, alkalis, dyes, organic solvents, flavors, defoamers and surfactants. Furthermore, it was shown that glycols are among the most often applied antifreeze agents, the main component of the heat exchanger fluids. Based on the prioritization criteria (i) abundance in the borehole heat exchanger fluids, (ii) persistence, and (iii) mobility in the subsurface, the additives benzotriazole, tolyltriazole, 2-ethylhexanoate, benzoate and decane dicarboxylate were selected for further biodegradation experiments.

The biodegradation experiments were carried out in batch systems with 60- or 70-m-deep sediments (sandstone or marl) as inoculum. The samples were taken during the installation of borehole heat exchanger systems at two different sites. The microcosms were conducted under oxic, denitrifying, iron- and sulfate-reducing as well as fermentative conditions at the presumed aquifer temperature of 12°C.

The major component ethylene glycol was degraded under all conditions studied. The fastest biodegradation occurred under oxic and nitrate-reducing conditions (< 15 days). In all anoxic, nitrate free experiments with marl-sediment fermentation was the predominant process involved in the biodegradation of ethylene glycol. A significant

degradation of the antifreeze agent coupled on sulfate-reduction was observed in experiments with sandstone-sediment.

Benzotriazoles were highly persistent under sulfate- and nitrate-reducing as well as fermentative conditions. Under aerobic and iron-reducing conditions a partial decrease (up to 30 %) in the concentration of benzotriazoles (tolyltriazole was not degraded under aerobic conditions) was observed within 88 and 243 days of incubation respectively. At the same time an unknown transformation product was detected. Aerobic experiments with *Rhodococcus pyridinovorans* showed no cometabolic biodegradation of benzotriazole. Benzotriazoles caused longer lag-phases and slower biodegradation rates of ethylene glycol under nitrate- and sulfate-reducing conditions. Furthermore, an accumulation of acetaldehyde (intermediate in the fermentation of ethylene glycol) was observed in the presence of benzotriazoles.

The experiments with a mixture of benzoate, decane and dodecane dicarboxylates showed a complete biodegradation of the acids under aerobic conditions. Nitrate-reducing bacteria utilized the two dicarboxylates but no benzoate. All three substances were persistent under fermentative, iron- and sulfate-reducing conditions. 2-ethylhexanoate was utilized as the sole organic substrate in microsoms, where nitrate or sulfate was added as the electron acceptor. No decrease in the concentration of 2-ethylhexanoate was observed under iron-reducing conditions. No effect of the carbonates on the biodegradation of ethylene glycol could be observed.

Benzotriazoles present a potential risk for deep groundwater aquifers due to their persistence under different redox conditions. These corrosion inhibitors may not only threaten groundwater quality due to their own recalcitrance but in addition inhibit the biodegradation of other organic compounds. Further, the application of the investigated organic acids (except 2-Ethylhexanoate) should be reconsidered. Because of their persistence under anoxic conditions, a long-term contamination of deep groundwater aquifers can be expected.

Zusammenfassung

Mit steigender Anzahl an installierten Erdwärmesonden erhöht sich das Risiko einer Leckage und eines Eintrags von Wärmeträgerflüssigkeiten (WTF) in den Grundwasserleitern. Einzelne in den WTF enthaltene Zusatzstoffe (Additive) können eine potenzielle Gefahr für die Qualität des Grundwassers darstellen. Nur durch genaue Kenntnis ihrer Identität und ihres Umweltverhaltens kann eingeschätzt werden, ob welche Substanzen hinsichtlich ihres GrundwasserGefährdungspotenzials bedenklich sind.

Ziel dieser Arbeit war es, die Identität der (zum Zeitpunkt der Befragung, September 2009) eingesetzten Additive aufzuklären und ihr Umweltverhalten in Abbau- sowie Hemmexperimenten mit Ethylenglykol eingehend zu untersuchen.

Datenerhebung und Priorisierung

Eine Datenerhebung bei Herstellern und/oder Vertreibern von WTF (in Kooperation mit dem Umweltministerium Baden-Württemberg, Deutschland) ergab acht Frostschutzmittel als Hauptkomponente und eine Reihe weiterer organischer Stoffe, die als Additive in WTF für Erdwärmesonden eingesetzt werden. Unter den Frostschutzmitteln wurden Ethylen- und Propylenglykol am meisten eingesetzt. Gemäß ihrer Funktion gliedern sich die Additive in Korrosionsinhibitoren, Alkalien, Farbstoffe, Lösungsmittel, Duftstoffe, Antischaummittel und Tenside. Anhand der Kriterien Verwendungshäufigkeit, Mobilität, Bioabbaubarkeit und Ökotoxizität wurden prioritäre Additive für weitere experimentelle Untersuchungen identifiziert. Die Korrosionsinhibitoren Benzo- und Tolyltriazol sowie 2-Ethylhexanoat, Benzoat und Decandicarboxylat wurden als prioritär eingestuft. Diese Substanzen wurden experimentell unter umweltrelevanten Bedingungen untersucht, um ein detaillierteres Wissen über ihr Grundwassergefährdungspotenzial zu erlangen.

Experimenteller Teil

In Batch-Experimenten wurde der mikrobielle Abbau der Hauptkomponente Ethylenglykol (EG) und der prioritären Additive unter für tiefe Aquifere typischen Bedingungen untersucht. Begleitend wurde der Einfluss der Additive auf den EG-Abbau untersucht. Als Inokulum wurden 60 (Buntsandstein) oder 70 m (Mergel) tiefe Sedimente aus zwei verschiedenen Aquiferen verwendet. Die Inkubationstemperatur betrug 12°C und war somit repräsentativ für die untersuchte Tiefe. Aerobe und verschiedene anaerobe Abbauprozesse (Nitrat-, Eisen- und Sulfatreduktion sowie Gärung) wurden stimuliert. Zum Einfluss der Temperatur auf den mikrobiellen Abbau von Ethylenglykol wurden parallele Ansätze bei Raumtemperatur (22°C, RT) inkubiert. Außerdem wurde der cometabolische BT-Abbau in Anwesenheit des strukturähnlichen Benzothiazols von der Reinkultur *Rhodococcus pyridinovorans* untersucht.

Die Abbauxperimente unter oxidischen und nitratreduzierenden Bedingungen ergaben einen schnellen Abbau des Frostschutzmittels (< 15 Tagen) ohne die Bildung von organischen Produkten. In Experimenten mit Sediment Buntsandstein und Fe (III) als Elektronenakzeptor (EA), blieb die EG-Konzentration für lange Zeiten (> 140 Tage) konstant. Dabei konnte auch keine eisenreduzierende Aktivität nachgewiesen werden. In Ansätzen mit Sediment Mergel, die ebenfalls Fe (III) im Überschuss enthielten, wurde EG dagegen innerhalb von 50 Tagen von gärenden Mikroorganismen zu Acetat abgebaut. Anschließend konnten eisenreduzierende Mikroorganismen das gebildete Acetat vollständig (vermutlich zu CO₂) abbauen. Somit kann als mögliche Ursache für den fehlenden mikrobiellen Abbau in den Ansätzen mit Buntsandstein, die Abwesenheit von gärenden Mikroorganismen betrachtet werden, die in der Lage waren EG zu vergären und Acetat für die Eisenreduktion zu liefern. In Mikrokosmen mit Sulfat als EA und Sediment Buntsandstein wurde EG nach einer langen lag-Phase (> 80 Tage) gekoppelt an Sulfatreduktion abgebaut. Im Sediment Mergel fehlte meist sulfatreduzierende Aktivität, wobei EG, ähnlich wie in den Ansätzen mit dem EA Fe (III), innerhalb von 50 Tagen zu Acetat vergärt wurde. Das deutete auf eine stärkere Konkurrenzfähigkeit der gärenden gegenüber den sulfatreduzierenden Mikroorganismen im Sediment Mergel hin. Darüber hinaus wurde im Sediment Mergel

der EG-Abbau ohne eine Zugabe von EA (Stimulierung der Gärung) eingehend untersucht. Die Ergebnisse deuteten auf eine Transformation des Frostschutzmittels zu Acetaldehyd und eine anschließende Disproportionierung des Acetaldehyds zu Ethanol und Acetat unter gärenden Bedingungen hin. In weiteren Experimenten, wo der Einfluss der Temperatur auf die Abbaugeschwindigkeit von EG untersucht wurde, wurden keine wesentlichen Unterschiede zwischen den EG-Abbauraten bei 12°C und RT festgestellt. Die Experimente zum Temperatureinfluss zeigten jedoch Hinweise auf eine Änderung in den mikrobiellen Populationen sulfatreduzierender Mikroorganismen.

Die Experimente dieser Studie stellten erste Erkenntnisse über die Bioabbaubarkeit von EG unter oxischen, nitrat- und sulfatreduzierenden Bedingungen in Sedimenten aus tiefen Aquiferen dar. Außerdem bestätigten die Ergebnisse, dass unter bestimmten Bedingungen die Gärung eine bedeutende Rolle für die Eliminierung von EG spielt.

Die Abbauxperimente mit Sedimenten aus beiden Aquiferen zeigten einen geringen bis fehlendem Abbau von Benzo- (BT) und Tolyltriazol (TT). So wurden in Ansätzen mit Sediment Mergel unter oxischen und eisenreduzierenden Bedingungen BT bzw. BT und TT teilweise (bis zu 30 %) umgesetzt. Eine weitere Konzentrationsabnahme wurde bis zum Inkubationsende (oxische Ansätze 88 Tage, Eisen-Ansätze 243 Tage) nicht beobachtet. Begleitend wurde sowohl in den oxischen als auch in den eisenreduzierenden Ansätzen ein potentiell Transformationsprodukt infolge der BT- bzw. BT- oder TT-Umsetzung detektiert. Die Identität beider Abbauprodukte konnte innerhalb dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. In Experimenten mit Fe (III) als EA und Sediment Buntsandstein konnte innerhalb von 350 Tagen keine Abnahme der BT- und TT- Konzentrationen beobachtet werden. In den Sedimenten aus beiden Aquiferen wurde unter nitrat-, sulfatreduzierenden und gärenden Bedingungen keine Bioabbaubarkeit von Benzotriazolen innerhalb der untersuchten Inkubationszeiten festgestellt. Außerdem konnte BT in aeroben Experimenten mit *Rhodococcus pyridinovorans* in Anwesenheit des strukturähnlichen Benzothiazols ebenfalls nicht abgebaut werden. Dabei wurde der Benzothiazolabbau in Anwesenheit von BT nicht gestört.

Die Experimente mit Benzotriazolen lieferten erste Erkenntnisse zur mikrobiellen Abbaubarkeit der Korrosionsinhibitoren in Sedimenten aus tiefen Aquiferen und

bestätigten die hohe Beständigkeit beider Korrosionsinhibitoren unter Umweltbedingungen.

In Hemmexperimenten wurde gezeigt, dass BT und TT Veränderungen im EG-Abbau unter bestimmten Redoxverhältnissen verursachen können. So wurden im Sediment Buntsandstein eine Verlängerung der Anpassungsphase sowie eine Verlangsamung der Abbaurate von EG in Anwesenheit von BT und TT unter nitrat- und sulfatreduzierenden Bedingungen demonstriert. Die beobachteten Effekte konnten im Sediment Mergel unter den gleichen Bedingungen nicht reproduziert werden. Möglicherweise unterschieden sich die Sedimente in ihren Mikrobenpopulationen, die ihrerseits unterschiedlich empfindlich gegenüber Benzotriazolen waren. In Mikrokosmen mit Sediment Mergel war unter gärenden Bedingungen die weitere Umsetzung des potentiell toxischen Zwischenprodukts Acetaldehyd in Anwesenheit von BT und TT gehemmt.

Die organischen Säuren Benzoat, Decan- und Dodecandicarboxylat wurden aerob vollständig (vermutlich zu CO_2) abgebaut. Unter nitratreduzierenden Bedingungen wurden beide Dicarboxylate, aber kein Benzoat verwertet. In Mikrokosmen, wo eisen- und sulfatreduzierende sowie gärende Abbauprozesse stimuliert wurden, wurde keine der untersuchten Säuren mikrobiell abgebaut. 2-Ethylhexanoat konnte dagegen als einziges organisches Substrat unter nitrat- und sulfatreduzierenden Bedingungen vollständig (vermutlich zu CO_2) abgebaut werden. Keine Aussage konnte über den Abbau von 2-Ethylhexanoat unter oxidischen und gärenden Bedingungen getroffen werden, da die Säure in einer Mischung mit den anderen Säuren analytisch nicht erfasst werden konnte. Der EG-Abbau verlief ähnlich in An- sowie Abwesenheit der organischen Säuren und somit konnte keine hemmende Auswirkung der Säuren auf den EG-Abbau festgestellt werden. Die Experimente liefern erste Hinweise auf eine hohe Persistenz der untersuchten Säuren in anoxischen Aquiferen.

Fazit

Wegen ihrer hohen Beständigkeit unter allen untersuchten Bedingungen sind Benzotriazole bedenklich für tiefe Grundwassersysteme. Außerdem können beide

Korrosionsinhibitoren noch in Konzentrationen von wenigen μM Auswirkungen auf den mikrobiellen Abbau im Untergrund haben. Des Weiteren muss der Einsatz der untersuchten organischen Säuren (Ausnahme 2-Ethylhexanoat) in EWS überdacht werden. Da diese Substanzen unter Ausschluss von Sauerstoff mikrobiell nicht abbaubar sind, können sie eine langandauernde Kontamination im Untergrund verursachen.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	iv
Abstract	vi
Zusammenfassung	viii
1 Einleitung	1
1.1 Geothermie	1
1.2 Erdwärmesondenanlage	2
1.3 Zusammensetzung von Wärmeträgerflüssigkeiten	4
1.4 Ausgangssituation zur Identität von Additiven in WTF	5
1.5 Gefährdungspotenzial von Erdwärmesonden	5
1.6 Mikrobielle Abbauprozesse in tiefen Aquiferen	6
1.7 Kenntnisstand zur mikrobiellen Abbaubarkeit von WTF	13
1.8 Ziel der Arbeit	13
1.9 Literatur	15
2 Grundwassergefährdungspotenzial von Additiven in Wärmeträgerflüssigkeiten für Erdwärmesonden	19
2.1 Zusammenfassung	19
2.2 Einleitung	19
2.3 Methoden	22
2.3.1 Datenerhebung	22
2.3.2 Abschätzung der Grundwassergefährdung	23
2.4 Ergebnisse	25
2.4.1 Identität der Hauptkomponente	25
2.4.2 Identität und Funktion der Additive	25
2.4.3 Korrosionsinhibitoren	26
2.4.4 Gefährdungsabschätzung	26
2.4.5 Grundwassergefährdungspotenzial der häufig eingesetzten Additive	32

2.5	Risikobeurteilung.....	33
2.6	Literatur.....	45
3	Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol.....	53
3.1	Zusammenfassung.....	53
3.2	Einleitung.....	54
3.3	Material und Methoden.....	55
3.3.1	Chemikalien.....	55
3.3.2	Probenahme und Probenvorbereitung.....	56
3.3.3	Kulturmedien und verwendete Stammlösungen.....	56
3.3.4	Mikrokosmenexperimente.....	57
3.3.5	Versuchsansätze.....	58
3.3.6	Analyseverfahren.....	59
3.4	Ergebnisse und Diskussion.....	61
3.4.1	Aerober Abbau.....	62
3.4.2	Nitrat als Elektronenakzeptor.....	63
3.4.3	Ferrihydrit als Elektronenakzeptor.....	65
3.4.4	Sulfat als Elektronenakzeptor.....	68
3.4.5	Gärende Bedingungen.....	77
3.4.6	Einfluss der Temperatur auf den Ethylenglykolabbau.....	82
3.4.7	Schlussfolgerungen.....	86
3.5	Literatur.....	88
4	Mikrobieller Abbau von Benzotriazolen.....	92
4.1	Zusammenfassung.....	92
4.2	Einleitung.....	92
4.3	Material und Methoden.....	94
4.3.1	Mikrobieller Abbau von Benzotriazolen in Sedimenten aus tiefen Aquiferen.....	94
4.3.2	Cometabolischer Abbau von Benzotriazol.....	96
4.4	Ergebnisse und Diskussion.....	97
4.4.1	Mikrobieller Abbau von Benzotriazolen.....	97
4.4.2	Experimente zum cometabolischen Abbau von Benzotriazol.....	111
4.5	Schlussfolgerungen.....	112

4.6	Literatur.....	114
5	Einfluss von Benzotriazolen auf den mikrobiellen Ethylenglykolabbau.....	116
5.1	Zusammenfassung.....	116
5.2	Einleitung.....	117
5.3	Material und Methoden.....	118
5.4	Ergebnisse und Diskussion.....	118
5.4.1	Oxische Bedingungen.....	119
5.4.2	Zugabe von Nitrat als Elektronenakzeptor.....	120
5.4.3	Zugabe von Ferrihydrit als Elektronenakzeptor.....	124
5.4.4	Zugabe von Sulfat als Elektronenakzeptor.....	125
5.4.5	Gärende Bedingungen.....	128
5.4.6	Wirkungsbeziehung.....	131
5.4.7	Einfluss der Temperatur.....	133
5.4.8	Diskussion.....	134
5.5	Schlussfolgerungen.....	135
5.6	Literatur.....	137
6	Mikrobieller Abbau von 2-Ethylhexanoat, Benzoat, Decan- und Dodecandicarboxylat. Einfluss auf den Ethylenglykolabbau.....	139
6.1	Zusammenfassung.....	139
6.2	Einleitung.....	140
6.3	Material und Methoden.....	141
6.4	Ergebnisse und Diskussion.....	145
6.4.1	Mikrobieller Abbau.....	145
6.4.2	Einfluss auf den mikrobiellen Ethylenglykolabbau.....	154
6.4.3	Schlussfolgerungen.....	160
6.5	Literatur.....	162
7	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick.....	167
	Anhang.....	174
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	179
	Abkürzungsverzeichnis.....	187

1 Einleitung

1.1 Geothermie

Geothermie (Erdwärme) ist die gespeicherte Wärmeenergie unterhalb der festen Oberfläche der Erde. Der Großteil (50-70 %) der Erdwärme stammt aus dem natürlichen Zerfall radioaktiver Elemente (wie z.B. Uran 238, Uran 235, Thorium 232 oder Kalium 40) in den Gesteinen. Der Rest der geothermischen Energie (30-50 %) ist auf die Restwärme aus der Zeit der Erdentstehung vor 4,7 Mrd. Jahren zurückzuführen. Eine jahreszeitabhängige Einwirkung der Außentemperatur nimmt von der Erdoberfläche mit zunehmender Tiefe ab (Abb. 1-1). Ein Gleichgewichtszustand zwischen Außen- und Innentemperatur der Erde wird in einer Tiefe zwischen 15 und 20 m erreicht. In Mitteleuropa steigt die Temperatur mit zunehmender Tiefe aufgrund des geothermischen Gradienten um etwa 3°C pro 100 m an. Ausgehend von einer Jahresmitteltemperatur von 8,3 °C in Deutschland (Umweltbundesamt, 2013), liegt die Untergrundtemperatur in etwa 100 m Tiefe bei 11-12°C. In Abhängigkeit von der Tiefe, aus der Erdwärme gewonnen wird, wird zwischen oberflächennaher (flacher) (bis 400 m Tiefe) und tiefer Geothermie (ab 400 m Tiefe) unterschieden (Busmann, 2012). Weiter verbreitet und mit enormen Wachstumsraten verbunden, ist die Nutzung flacher Geothermie mittels Erdwärmesonden (GtV-Bundesverband Geothermie, 2013).

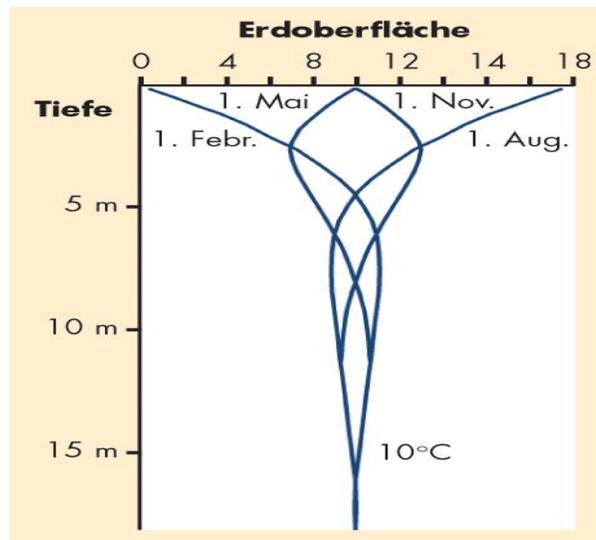


Abbildung 1-1: Jahresgang der Temperatur in verschiedenen Tiefen (BINE Informationsdienst, 2013).

1.2 Erdwärmesondenanlage

Eine Erdwärmesondenanlage besteht aus drei verschiedenen, voneinander getrennten Kreisläufen: 1) Wärmequelle (Erdwärmesonde), 2) Wärmepumpe und 3) Heizkreislauf (Wärmenutzung). Im Folgenden werden die ersten zwei Kreisläufe kurz dargestellt.

Erdwärmesonde

Üblicherweise besteht die Erdwärmesonde (EWS) aus einem U-förmigen Sondenfuß und einem vertikalen Sonderrohr. Weit verbreitet sind die Doppel U-Rohrsonden aus hochdichtem Polyethylen (HDPE). Jedes Rohr hat einen Durchmesser von DN (Nennweite) 20-40 mm. Zur Stabilisierung der Sonde im Bohrloch wird der Hohlraum zwischen den Rohren und der Bohrlochwand mit einer Bentonit-Zement Suspension, die eine gute Wärmeleitung besitzt, gefüllt. Somit wird dadurch eine gute thermische Übertragung aus dem Untergrund zu den Röhren gewährleistet. Die EWS werden meistens in 50 bis 160 m tiefe Bohrlöcher im Aquifer durchgeteuft. Im geschlossenen Kreislauf der Sonde zirkuliert eine Wärmeträgerflüssigkeit, die aufgrund ihrer niedrigeren Temperatur Wärme aus dem umgebenden Untergrund aufnimmt. Die Erdwärme wird an die Oberfläche zur Wärmepumpe transportiert.

Wärmepumpe

Mit Hilfe der Wärmepumpe wird die aus dem Erdreich gewonnene Erdwärme auf das entsprechende Heiztemperatur-Niveau angehoben. Das Funktionsprinzip einer erdgekoppelten Wärmepumpe ist in Abb. 1-2 schematisch dargestellt. Das in der Wärmepumpe enthaltene Kältemittel nimmt in einem Wärmetauscher (Verdampfer) die Wärme der Wärmeträgerflüssigkeit auf und verdampft. Als nächstes wird die Temperatur des gasförmigen Kältemittels in einem Kompressor durch Verdichtung erhöht. Das heiße Kältemittelgas wird in einen weiteren Wärmetauscher, den Verflüssiger, geleitet, wo eine Kondensation des Kältemittels stattfindet. Dabei wird Wärme freigesetzt, die an ein Heizmedium (in der Regel Wasser) abgegeben wird. An einer Entspannungsdrassel wird der Druck des verflüssigten Kältemittels verringert, das schließlich zum Verdampfer zurückgeführt wird. Die dem Heizmedium abgegebene Wärme wird an den Heizkreislauf zur Wärmenutzung weitergeleitet.

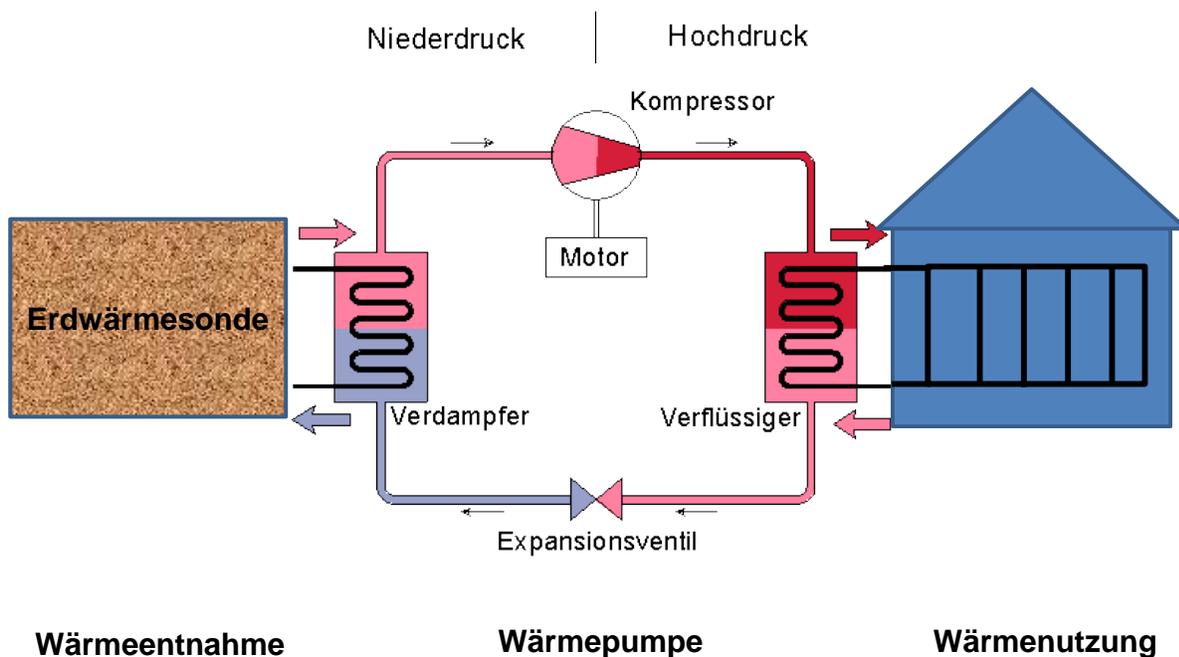


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung einer Erdwärmesondenanlage sowie Funktionsprinzip einer Wärmepumpe (geändert nach GtV-Bundesverband Geothermie, 2013).

1.3 Zusammensetzung von Wärmeträgerflüssigkeiten

Die Wärmeträgerflüssigkeiten (WTF) für EWS enthalten ein Gemisch aus Wasser und Frostschutzmittel. Das Frostschutzmittel führt zur Herabsetzung des Gefrierpunkts des Wassers, was wiederum eine Absenkung der Temperatur der WTF unter 0°C ermöglicht. Die Anlage hat dadurch einen höheren Wirkungsgrad mit höherer Energieausbeute. Außerdem verhindern Frostschutzmittel das Einfrieren der WTF im oberflächennahen Bereich während der kalten Jahreszeit. Die Frostschutzwirkung ist vom verwendeten Stoff und seiner Konzentration abhängig. Gemäß dem „Leitfaden zur Nutzung der Erdwärme mit Erdwärmesonden“ (Umweltministerium Baden-Württemberg, 2005) dürfen außerhalb von Wasserschutzgebieten nur Gemische der Wassergefährdungsklasse 1 (WGK 1) eingesetzt werden. Der Begriff „Wassergefährdungsklasse“ stammt aus der Verwaltungsvorschrift wassergefährdende Stoffe (VwVwS, 1999). Diese Vorschrift bestimmt die Stoffe näher, die eine nachteilige Veränderung der physikalischen, chemischen oder biologischen Beschaffenheit des Wassers verursachen können (wassergefährdende Stoffe). Die wassergefährdenden Stoffe werden entsprechend ihrer Gefährlichkeit in den Wassergefährdungsklassen WGK 1 (schwach wassergefährdend), WGK 2 (wassergefährdend) und WGK 3 (stark wassergefährdend) eingestuft. Üblicherweise werden dem Wasser die Frostschutzmittel Ethylen- oder Propylenglykol zugesetzt. Für sie ist ein maximaler Anteil von 25 % (v/v) im Wasser vorgeschrieben. Beide Glykole sind nach VwVwS (1999) in die WGK 1 eingestuft. Alternativ werden Betain (N,N,N-Trimethylammonioacetat) oder anorganische Salze, wie z.B. Calciumchlorid oder Kaliumcarbonat zum Gefrierschutz verwendet. Beim Einsatz der Salz-Lösungen ist allerdings die Korrosionsanfälligkeit einiger Anlageteile erhöht im Vergleich zu den anderen verwendeten Frostschutzmitteln (Stankowiak, 2012). Innerhalb von Wasserschutzgebieten ist die Verwendung von wassergefährdenden Verbindungen nicht erlaubt.

Neben dem Hauptbestandteil, dem Frostschutzmittel, werden dem Wasser weitere Zusatzstoffe, die so genannten Additive, zugesetzt. Die Additive erfüllen unterschiedliche Funktionen, wie z.B. Korrosionsschutz von anfälligen Bauteilen oder Farb- oder Geruchsstoffe zur Kennzeichnung der verschiedenen Produkte, aber auch

als Stabilisatoren gegen Bioabbau (d.h. Biozide) oder Verminderung von Schaumbildung. Der prozentuale Anteil der Additive variiert in gängigen WTF von 1 bis 6 % (LAWA, 2013). Klare gesetzliche Rahmenbedingungen für die chemische Natur der eingesetzten Additive sowie deren WGK-Zugehörigkeit fehlen.

1.4 Ausgangssituation zur Identität von Additiven in WTF

Die chemische Identität der Additive, die in WTF für EWS zugesetzt werden unterliegt dem Betriebsgeheimnis der Hersteller. Somit fehlten vor Beginn dieser Arbeit jegliche Informationen über die chemische Identität der einzelnen Stoffe, was eine Abschätzung der Wassergefährdung durch die WTF unmöglich machte. Es war allerdings bekannt, dass in gängigen WTF zum Großteil Additive eingesetzt werden, die der WGK 1 zugehören. Daneben enthalten WTF weitere Additive, die der WGK 2 zugeschrieben werden (Stadt Dortmund- Umweltamt, 2009). Der Anteil dieser Stoffe (der WGK 2-Gruppe) kann bis zu 1 % von der Gesamtmenge der zugesetzten Additive ausmachen (Stadt Dortmund- Umweltamt, 2009). Hinweise auf die Identität der Zusatzstoffe konnten aus der bekannten Zusammensetzung glykolbasierter Kältemittel, die zum Enteisen von Flugzeugen verwendet werden, erhalten werden. In solchen Kältemittel-Formulierungen wurden die Korrosionsinhibitoren 1H-Benzotriazol, Tolyltriazol (Cancilla et al., 1997) sowie Nonyl- und Octylphenoethoxylate und Alkoholethoxylate (Corsi et al., 2003) detektiert. Nach weiteren Angaben (Løkke, 1984) werden auch Ethanol, Methanol, Natriumnitrit, Benzoat und Borate eingesetzt.

1.5 Gefährdungspotenzial von Erdwärmesonden

Eine Leckage von Erdwärmesonden kann beim Einbau oder nach langer Betriebszeit der Anlage z.B. aufgrund Materialschwäche oder infolge unsauberer Zusammenschweißens der Anlagenteile auftreten. Das Risiko für eine Leckage des SONDENSYSTEMS wird allerdings aus technischer Hinsicht als gering eingeschätzt. Das wird durch die Leitungsverbindungen (DVS, 2007) und das Heizelementverfahren zum Schweißen des HD-PE-Werkstoffs gesichert (Stadt Dortmund- Umweltamt, 2009). Falls

dennoch eine Leckage eintritt, wird der Druckabfall, verursacht durch die Leckage, vom Niederdruckpressostat detektiert und das Sicherheitssystem schaltet die Anlage ab. Laut Angaben in „Erdwärmetechnik in Dortmund“ (Stadt Dortmund- Umweltamt, 2009) käme es im Falle eines Einfamilienhauses zu einem Austritt von etwa 6 Liter WTF. Trotz des geringen potentiellen Austrittsvolumens der einzelnen Anlagen, erhöht sich mit steigender Anzahl der installierten EWS das Risiko für die tiefen Aquifere erheblich. Sowohl Frostschutzmittel als auch Additive können, im Falle einer Leckage, die tiefen Aquifere erreichen.

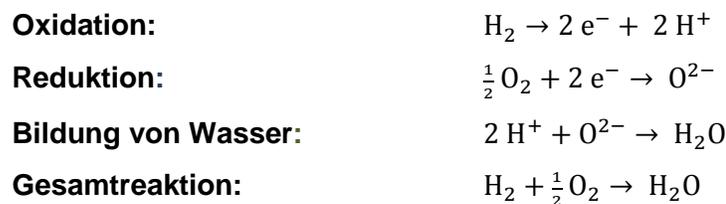
Tiefe Grundwassersysteme stellen ein oligotrophes Ökosystem dar, in dem meist autochthone Mikrobengemeinschaften leben, die in der Lage sind durch aerobe oder anaerobe Stoffwechselprozesse organische Stoffe umzusetzen. Nun ist es relevant zu wissen, ob die Komponenten der WTF, Frostschutzmittel und Additive, von den Mikroorganismen verwertet werden können oder sie über längere Zeiten im Untergrund persistieren und somit Biodiversität und Grundwasserqualität beträchtlich beeinträchtigen können. Das Grundwassergefährdungspotenzial von WTF ist in Kapitel 2 eingehend dargestellt.

1.6 Mikrobielle Abbauprozesse in tiefen Aquifere

Der Begriff „tiefe Aquifere“ in dieser Arbeit bezeichnet die Tiefe, in der typischerweise Erdwärmesonden in Deutschland eingebaut werden (70-100 m Tiefe). Somit dient der Begriff zur Abgrenzung dieser Systeme von den oberflächennah gelegenen Aquifere.

Gelangen organische Substanzen in tiefe Aquifere, spielen mikrobielle Abbauprozesse eine entscheidende Rolle für die Eliminierung dieser Stoffe (Lovley and Chapelle, 1995). Viele Mikroorganismen sind in der Lage sowohl natürliche als auch xenobiotische organische Stoffe als Energie- und Kohlenstoffquelle zu verwerten (Armstrong et al., 1991; Bosma et al., 1985; Chapelle, 1993; Fayolle et al., 2001; Lovley and Chapelle, 1995; Wilson et al., 1986). In Tab. 1-1 sind die relevantesten mikrobiellen Abbauprozesse in Abhängigkeit von den im Untergrund vorliegenden Elektronenakzeptoren und dem herrschenden Redoxpotential dargestellt. Das Redoxpotential E (V) ist ein Maß für die Neigung der Redoxpartner, Elektronen

aufzunehmen oder abzugeben. Der E'_0 - Wert ist das Standard-Redoxpotential unter Standardbedingungen (25°C; Konzentration der oxidierten und reduzierten Formen des Redoxpaares ist jeweils 1 M, Druck 1 bar) und einem pH-Wert von 7 (Madigan et al., 2006). Eine Redoxreaktion besteht aus zwei Teilreaktionen: Oxidation und Reduktion. Bei der Oxidation gibt der Elektronendonator (ED) Elektronen ab, wobei bei der Reduktion der Elektronenakzeptor (EA) Elektronen aufnimmt. Als Beispiel wird unten die **Oxidation** von Wasserstoff (fungiert als ED) gekoppelt an die **Reduktion** von Sauerstoff (fungiert als EA), mit der **Bildung von Wasser** dargestellt. Das Redoxpaar $\frac{1}{2} O_2/H_2O$ hat ein sehr positives Redoxpotential ($E'_0 = +0,81$ V), das die hohe Affinität des Sauerstoffs zur Elektronenaufnahme bestimmt, während das negative Redoxpotential ($E'_0 = -0,41$ V) des Redoxpaares $2 H^+/H_2$ die hohe Neigung des Wasserstoffs zur Elektronenabgabe zeigt (Thauer et al., 1977).



Der Energiegewinn einer Redoxreaktion ist proportional zur Redoxpotentialdifferenz beider Teilreaktionen (Thauer et al., 1977).

$$\Delta G'_0 = -n \cdot F \cdot \Delta E'_0$$

Dabei ist $\Delta G'_0$ die Veränderung der freien Energie unter Standardbedingungen bei einem pH-Wert von 7; $\Delta E'_0$: Differenz der Standardredoxpotentiale der Redoxreaktionen der beteiligten Redoxpaare; n : die Anzahl der übertragenen Elektronen; F : Faraday Konstante ($96,5 \text{ kJ/V}^{-1} \text{ mol}^{-1}$).

Tabelle 1-1: Mikrobielle Abbauprozesse in Abhängigkeit der vorliegenden Elektronenakzeptoren und des Redoxpotentials. Elektronen (e^-) werden bei der Oxidation organischer Substanzen freigesetzt.

	Aerobe Atmung	Nitrat-Reduktion	Mangan-Reduktion	Eisen-Reduktion	Sulfat-Reduktion	Methanogenese	Gärung
Redox-Reaktion	$O_2 + 4e^- \rightarrow 2 H_2O$	$2 NO_3 + 2e^- \rightarrow N_2$	$Mn^{4+} + 2e^- \rightarrow Mn^{2+}$	$Fe^{3+} + e^- \rightarrow Fe^{2+}$	$SO_4^{2-} + 8e^- \rightarrow HS^-$	$CO_2 + 4e^- \rightarrow CH_4$	$CH_2O \rightarrow Acetat + Ethanol/H_2$
Redox-Potential E'_0 [V]:	0,82	0,82	0,61	0,77	-0,22	-0,24	-0,19


 Abnahme des Energiegewinns

Quellen: Lovley and Chapelle (1995), Thauer et al. (1977).

Im Folgenden wird auf die Stoffwechselprozesse eingegangen, die im Rahmen dieser Arbeit relevant sind.

Aerobe Atmung

Der terminale EA bei der aeroben Atmung ist Sauerstoff. Wegen des stark positiven Redoxpotentials des Paares O_2/H_2O ($\Delta E'_0 = +0,82$ V) und des damit verbundenen hohen Energiegewinns der Redoxreaktion ist Sauerstoff unter oxischen Bedingungen der bevorzugte EA für die Oxidation organischer Substanzen. Beim aeroben Abbau von Glucose zu CO_2 wird z.B. 2830 kJ mol^{-1} Energie freigesetzt (Munk and Eikmanns, 2001). Dabei erfolgt der Abbau in vier nacheinander folgenden Reaktionen: 1) Glykolyse (auch Entner-Doudoroff-Weg), 2) Oxidative Decarboxylierung, 3) Citratzyklus und 4) Sauerstoffreduktion in der Atmungskette (Madigan et al., 2006). Die größte Energieausbeute in Form von ATP (Adenosintriphosphat) erfolgt durch Elektronentransportphosphorylierung.

Der Sauerstoff-Gehalt im Untergrund ergibt sich aus der Differenz des Sauerstoff-Transports von der Atmosphäre und den Raten des Sauerstoffverbrauchs im Grundwasser (Chapelle, 1993). Mit zunehmender Tiefe sowie Distanz von der Zone der Grundwasser-Neubildung nimmt die Sauerstoff-Konzentration ab (Chapelle, 1993). In

tiefen Aquiferen wird Sauerstoff nur dort vorliegen, wo kaum mikrobielle Aktivität vorhanden ist (Lovley and Chapelle, 1995).

Nitratreduktion (Denitrifikation)

In Abwesenheit von Sauerstoff (anoxische Bedingungen) stellt Nitrat aus thermodynamischer Sicht einen sehr günstigen Elektronenakzeptor dar (Thauer et al., 1977). Die Reduktion von Nitrat zu molekularem Stickstoff (N_2) wird in der Literatur als Denitrifikation bezeichnet und kann von vielen Bakterien, wie z.B. Pseudomonas-Arten oder Paracoccus denitrificans ausgeführt werden (Cyplik et al., 2013; Stouthamer, 1997;). Bekannt sind auch Mikroorganismen, die Nitrat nur unvollständig zu Nitrit umsetzen können (Drysdale et al. 2001).

Bei der Oxidation von 1 mol Glucose mit Nitrat wird 2670 kJ Energie frei ($\Delta G'_o = 2\ 670\ \text{kJ mol}^{-1}$) (Ottow, 2011), was 94 % des Energiegewinns bei der aeroben Oxidation der Glucose entspricht. Der Prozess umfasst vier nacheinander folgende Reaktionen (Abb. 1-3).

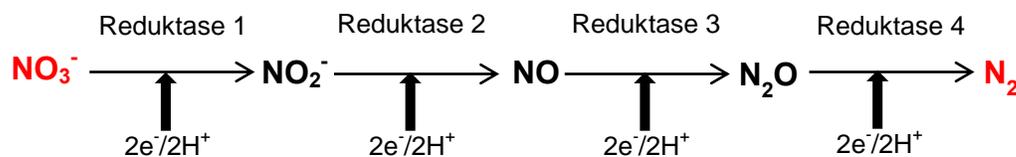


Abbildung 1-3: Dissimilatorische Reduktion von Nitrat (NO_3^-) zu molekularem Stickstoff (N_2) via Nitrit (NO_2^-), Stickstoffmonoxid (NO) und Distickstoffmonoxid (N_2O). Reduktase 1: Nitratreduktase, Reduktase 2: Nitritreduktase, Reduktase 3: Stickstoffmonoxidreduktase, Reduktase 4: Distickstoffmonoxid-Reduktase (Munk and Eikmanns, 2001).

Die Hauptquelle von Nitrat für Grundwassersysteme ist die Landwirtschaft. Mit zunehmender Tiefe kommt der mikrobiellen Nitratreduktion aufgrund der geringen Konzentrationen nur eine untergeordnete Bedeutung zu.

Eisenreduktion

In allen Kompartimenten der Erde (Atmo-, Hydro-, Litho- und Biosphere) ist Eisen in Form von Fe (II)- oder Fe (III)-haltende Mineralen oder als gelöstes Eisen weit verbreitet (Kappler and Straub, 2005). Die mikrobielle Reduktion von Fe (III), das in einer

Konzentration von mehreren 10 mM in Sedimenten vorkommt (Straub et al., 2005), ist einer der dominierenden Redoxprozesse, die im Untergrund stattfinden (Chapelle, 1993; Kappler and Straub, 2005). Eisenreduktion spielt auch eine wichtige Rolle bei der mikrobiellen Oxidation xenobiotischer Stoffen, die durch menschliche Aktivitäten in die Umwelt eingetragen werden (Lovley et al., 1990).

Grundsätzlich beruht die Eisenreduktion auf der extrazellulären Übertragung freigesetzter Elektronen auf amorphe Fe (III)-Oxidhydroxide (Kappler and Straub, 2005; Nevin and Lovley, 2002a). Trotz intensiven systematischen Untersuchungen ist der Elektronentransfer-Mechanismus noch nicht komplett entschlüsselt (Kappler and Straub, 2005; Kappler et al., 2004; Nevin and Lovley, 2002a; Reguera et al., 2005; Roden et al., 2010; Straub et al., 2001). Vorgeschlagen wurden drei Hauptstrategien zur Übertragung der Elektronen auf Fe (III) außerhalb der Zelle (Abb. 1-4) a) Direkter Kontakt des Bakteriums mit der Eisenoberfläche mittels „nanowires“ (demonstriert bei *Geobacter* spp.) (Childers et al., 2002; Reguera et al., 2005), b) Elektronentransfer mittels Elektronen-Shuttle (Kappler et al., 2004; Nevin and Lovley, 2000; Piepenbrock et al., 2013; Roden et al., 2010; Straub and Schink, 2003), c) komplexbildende Liganden erhöhen die Löslichkeit unlöslicher Eisen-Oxidhydroxide und erleichtern somit die mikrobielle Verwertung des Eisens (demonstriert mit *Geothrix* sp.) (Nevin and Lovley, 2002b).

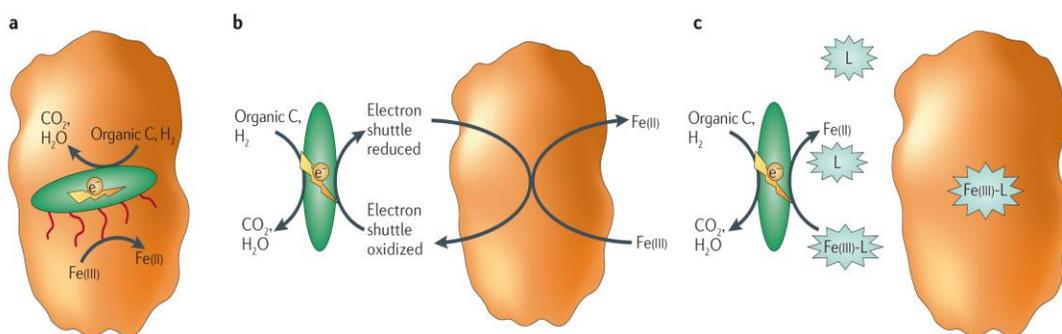


Abbildung 1-4: Mikrobielle Strategien zum Elektronentransfer auf Fe (III)-Oxidhydroxide.
a) Direkter Kontakt mit der Eisenoberfläche durch leitende extrazelluläre Ansätze („nanowires“), b) Elektronentransfer mittels endogen oder exogen produzierter Elektronen-Schuttle, c) Produktion von komplexbildenden Liganden, die die Löslichkeit von Fe (III)-Oxide erhöhen und somit die Zugänglichkeit der Mikroorganismen zur Eisenoberfläche erleichtern. e⁻: Elektronen; L: Ligand (Weber et al., 2006).

Sulfatreduktion

Auch Sulfat kann in Aquiferen als EA fungieren, wo beispielweise kein verwertbares Fe (III) vorliegt und das Redoxpotential sehr negativ ist. Bei diesem Prozess nutzen sulfatreduzierende Mikroorganismen die Reduktion von Sulfat zu Sulfid zur Energiekonservierung über Elektronentransportphosphorylierung (Thauer et al., 1977). Die Sulfatreduktion zu Sulfid läuft über Sulfit. Da das Redoxpotential des Paares Sulfat/Sulfit ($E'_0 = -0,52 \text{ V}$) ein sehr niedriges Redoxpotential besitzt, kann die Reaktion aus thermodynamischen Gründen nicht erfolgen. Die Reaktion wird durch die ATP-abhängige Bildung von Adenosinphosphosulfat energetisch ermöglicht, wobei das Redoxpotential auf $E'_0 = -0,06 \text{ V}$ erhöht wird. Die einzelnen Reduktionsschritte sind in Abb. 1-5 schematisch dargestellt. Häufig dienen Produkte einer Gärung als Elektronendonatoren für die mikrobielle Sulfatreduktion. Sulfatreduzierende Mikroorganismen (SRM) können Wasserstoff sowie viele niedermolekulare organische Verbindungen, wie Fettsäuren, Alkohole, Lactat, Fumarat, Succinat verwerten (Munk and Eikmanns, 2001).

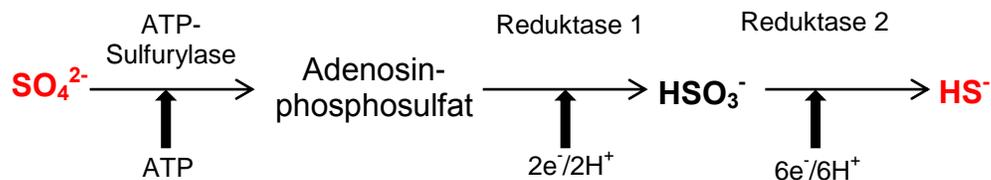


Abbildung 1-5 Dissimilatorische Reduktion von Sulfat (SO_4^{2-}) zu Sulfid (HS^-) via Adenosinphosphosulfat und Sulfit (SO_3^{2-}). Reduktase 1: D-Adenosinphosphosulfat-reduktase, Reduktase 2: Sulfitreduktase (geändert nach Munk and Eikmanns, 2001).

Es wird zwischen SRM unterschieden, die organische Verbindungen vollständig zu CO_2 oxidieren und solchen, die das organische Substrat unvollständig zu Acetat umsetzen (Rabus et al., 2006; Widdel and Pfennig, 1981). Die unvollständige Oxidation der organischen Substrate hat ihre Ursache im fehlenden enzymatischen Mechanismus zur Oxidation von Acetyl-CoA in einigen SRM (Rabus et al., 2006). Da das Redoxpaar Sulfat/Sulfid ein relativ niedriges Redoxpotential besitzt ($-0,2 \text{ V}$), ist der Energiegewinn bei der dissimilatorischen Sulfatreduktion im Vergleich zur aeroben Atmung sehr gering (Thauer et al., 1977; Widdel and Pfennig, 1981). So beträgt z.B. die Änderung der freien

Energie (ΔG°) bei der Oxidation von Acetat zu CO_2 mit Sulfat als EA -48 kJ. Bei der Mineralisierung von Acetat unter oxidischen Bedingungen wird dagegen viel mehr Energie (844 kJ) freigesetzt (Rabus et al., 2006).

Die wichtigste Sulfat-Quelle in tiefen Aquiferen ist die Auflösung von sulfathaltigen Mineralen, wie z.B. das häufig vorkommende Calciumsulfat (Gips, $(\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O})$). In oxidischen Zonen sulfatreicher Aquifere akkumuliert das Sulfat. In Zonen derjenigen Aquifere, wo Sauerstoff komplett verbraucht ist, spielt die mikrobielle Sulfatreduktion hingegen eine wichtige Rolle.

Gärung

In anaeroben Sedimenten, wo Elektronenakzeptoren wie z.B. Nitrat, Fe (III) oder Sulfat nicht vorhanden sind, spielen mikrobielle Gärungsprozesse eine essentielle Rolle für den unvollständigen Abbau von organischen Substanzen. Dabei wird Energie überwiegend über Substratstufenphosphorylierung konserviert (Munk and Eikmanns, 2001; Thauer et al., 1977). Als Substrate für die gärenden Mikroorganismen fungieren Glucose, organische Säuren sowie Aminosäuren. Bei der Vergärung handelt es sich um eine Disproportionierung des organischen Substrats, bei der ein Teil des organischen Substrats oxidiert (Elektronen werden freigesetzt) und der andere Teil reduziert wird (die freigesetzten Elektronen werden aufgenommen) (Eichler and Schink, 1985; Madigan et al., 2006). Charakteristisch für die Gärung ist die Ausscheidung von unvollständig oxidierten (z.B. Acetat) und reduzierten (z.B. primäre Alkohole) Endprodukten. Die verschiedenen Gärungstypen unterscheiden sich in der Art des Endprodukts. Entsprechend ist die Energieausbeute im Vergleich zur vollständigen Oxidation der organischen Substrate relativ gering (Seitz et al., 1990; Thauer et al., 1977). So wird z.B. bei der Vergärung von Glucose zu Acetat, CO_2 und H_2 206 kJ/mol ($\Delta G'_0 = -206 \text{ kJ/mol}$) freigesetzt.

1.7 Kenntnisstand zur mikrobiellen Abbaubarkeit von WTF

Vor dieser Arbeit befasste sich nur die Studie von Klotzbücher et al. (2007) mit dem mikrobiellen Abbau von Komponenten der WTF in Sedimenten aus tiefen Aquiferen. Dabei untersuchten Klotzbücher et al. (2007) den anaeroben Abbau der Frostschutzmittel Ethylen- (EG) und Propylenglykol (PG), die am häufigsten in WTF eingesetzt werden. Aus dieser Studie (Klotzbücher et al., 2007) geht hervor, dass beide Glykole hauptsächlich durch Gärungsprozesse zu den entsprechenden Säuren und Alkoholen abgebaut wurden. Die anaerobe Sulfat- oder Eisenreduktion spielte dabei keine wesentliche Rolle. Mehr Details dieser Untersuchung sind Kapitel 2 zu entnehmen. Vor Beginn der aktuellen Arbeit waren in der Literatur keine Daten über die Bioabbaubarkeit von einzelnen Additiven (aus WTF) unter für tiefe Aquifere typischen Bedingungen vorhanden. Unklar blieb auch die Frage, wie sich diese Stoffe auf den mikrobiellen Abbau der Hauptkomponente in Proben aus tiefen Sedimenten auswirkten.

1.8 Ziel der Arbeit

Im Falle einer Leckage von Erdwärmesonden in tiefen Aquiferen gelangen neben dem Frostschutzmittel auch zahlreiche unbekannte organische Additive ins Grundwasser. Hauptziel dieser Arbeit war es, grundlegende Kenntnisse über das Umweltverhalten von Additiven aus Wärmeträgerflüssigkeiten (WTF) unter Bedingungen zu erlangen, die typisch für tiefe Grundwassersysteme sind. Die einzelnen Arbeitsschritte sind im Folgenden dargestellt:

- 1) Identitätsaufklärung der in WTF eingesetzten Additive durch eine Datenerhebung bei Herstellern und/oder Vertreibern von WTF, unter Mitwirkung des Umweltministeriums Baden-Württemberg.
- 2) Auswahl und Priorisierung von Additiven aufgrund i) ihrer Verwendungshäufigkeit in den deklarierten WTF und ii) ihrem Grundwassergefährdungspotenzial

basierend auf Mobilität im Grundwasser, mikrobieller Abbaubarkeit und aquatischer Toxizität.

3) Experimentelle Untersuchungen:

- a. Bioabbaubarkeit von der Hauptkomponente- das Frostschutzmittel Ethylenglykol
- b. Bioabbaubarkeit von prioritären Additiven- Benzotriazol, Tolyltriazol, 2-Ethylhexanoat, Benzoat sowie Decan- und Dodecandicarboxylat.
- c. Einfluss der Additive auf den mikrobiellen Abbau von Ethylenglykol

1.9 Literatur

- Armstrong, A.Q., Hodson, R.E., Hwang, H.-M., Lewis, D.L., 1991. Environmental factors affecting toluene degradation in ground water at a hazardous-waste site. *Environ. Toxicol. Chem.* 10.
- BINE Informationsdienst, 2013. Im Internet publizierte Daten, Quelle: www.bine.info.
- Bosma, T.N.P., Holzmann, W.L.C., Neerven, A.R.W., Schraa, G., Wende, E., Zehnder, A.J.B., 1985. Biological degradation of xenobiotics in soil and in ground-water. *Antonie Van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 51, 581–581.
- Bussmann, W., 2012. *Geothermie: Energie aus dem Innern der Erde*. Fraunhofer IRB, Stuttgart.
- Cancilla, D.A., Holtkamp, A., Fang, X., Matassa, L., 1997. Isolation and characterization of Microtox-active components from aircraft de-icing/anti-icing fluids. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 430–434.
- Chapelle, F., 1993. *Ground-water microbiology and geochemistry*. Wiley, New York.
- Childers, S.E., Ciuffo, S., Lovley, D.R., 2002. *Geobacter metallireducens* accesses insoluble Fe(III) oxide by chemotaxis. *Nature* 416, 767–769.
- Corsi, S.R., Zitomer, D.H., Field, J.A., Cancilla, D.A., 2003. Nonylphenol Ethoxylates and Other Additives in Aircraft Deicers, Antiicers, and Waters Receiving Airport Runoff. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4031–4037.
- Cyplik, P., Juzwa, W., Marecik, R., Powierska-Czarny, J., Piotrowska-Cyplik, A., Czarny, J., Drożdżyńska, A., Chrzanowski, L., 2013. Denitrification of industrial wastewater: Influence of glycerol addition on metabolic activity and community shifts in a microbial consortium. *Chemosphere* 93, 2823–2831.
- Drysdale, G.D., Kusan, H.C., Bux, F., 2001. Assessment of denitrification by the ordinary heterotrophic organisms in an NDBEPR activated sludge system. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 43, 147–154.

- DVS, 2007. Schweißen von thermoplastischen Kunststoffen - Maschinen und Geräte für das Heizelementschweißen von Rohren, Rohrleitungsteilen und Tafeln. DVS Verband- Richtlinie 2208-1.
- Eichler, B., Schink, B., 1985. Fermentation of primary alcohols and diols and pure culture of syntrophically alcohol-oxidizing anaerobes. *Arch. Microbiol.* 143, 60–66.
- Fayolle, F., Vandecasteele, J.-P., Monot, F., 2001. Microbial degradation and fate in the environment of methyl tert -butyl ether and related fuel oxygenates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 339–349.
- GtV-Bundesverband Geothermie, 2013. Im Internet publizierte Daten, Quelle: www.geothermie.de.
- Kappler, A., Benz, M., Schink, B., Brune, A., 2004. Electron shuttling via humic acids in microbial iron(III) reduction in a freshwater sediment. *Fems Microbiol. Ecol.* 47, 85–92.
- Kappler, A., Straub, K.L., 2005. Geomicrobiological Cycling of Iron. *Rev. Miner. Geochem.* 59, 85–108.
- Klotzbücher, T., Kappler, A., Straub, K.L., Haderlein, S.B., 2007. Biodegradability and groundwater pollutant potential of organic anti-freeze liquids used in borehole heat exchangers. *Geothermics* 36, 348–361.
- LAWA, 2013. Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser. Im Internet publizierte Daten, Quelle: www.lawa.de.
- Løkke, H., 1984. Leaching of ethylene glycol and ethanol in subsoils. *Water. Air. Soil Pollut.* 22, 373–387.
- Lovley, D., Chapelle, F.H., 1995. Deep subsurface microbial processes. *Rev Geophys* 33, 365–381.
- Lovley, D.R., Chapelle, F.H., Phillips, E.J.P., 1990. Fe(III)-reducing bacteria in deeply buried sediments of the Atlantic Coastal Plain. *Geology* 18, 954.

- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Brock, T.D., 2006. Brock Mikrobiologie. Pearson Studium, München [u.a.].
- Munk, K., Eikmanns, M., 2001. Mikrobiologie. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg [u.a.].
- Nevin, K.P., Lovley, D.R., 2000. Lack of production of electron-shuttling compounds or solubilization of Fe(III) during reduction of insoluble Fe(III) oxide by *Geobacter metallireducens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2248–2251.
- Nevin, K.P., Lovley, D.R., 2002a. Mechanisms for Fe(III) Oxide Reduction in Sedimentary Environments. *Geomicrobiol. J.* 19, 141–159.
- Nevin, K.P., Lovley, D.R., 2002b. Mechanisms for Accessing Insoluble Fe(III) Oxide during Dissimilatory Fe(III) Reduction by *Geothrix fermentans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2294–2299.
- Ottow, J.C.G., 2011. Mikrobiologie von Böden Biodiversität, Ökophysiologie und Metagenomik. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Piepenbrock, A., Behrens, S., Kappler, A., 2013. Humic substance- and Fe(III)-reducing microorganisms and the importance of electron shuttling in anoxic aquifers. Submitted.
- Rabus, R., Hansen, T.A., Widdel, F., 2006. Dissimilatory Sulfate- and Sulfur-Reducing Prokaryotes, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer New York, New York, NY, pp. 659–768.
- Reguera, G., McCarthy, K.D., Mehta, T., Nicoll, J.S., Tuominen, M.T., Lovley, D.R., 2005. Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* 435, 1098–1101.
- Roden, E.E., Kappler, A., Bauer, I., Jiang, J., Paul, A., Stoesser, R., Konishi, H., Xu, H., 2010. Extracellular electron transfer through microbial reduction of solid-phase humic substances. *Nat. Geosci.* 3, 417–421.
- Seitz, H.-J., Schink, B., Pfennig, N., Conrad, R., 1990. Energetics of syntrophic ethanol oxidation in defined chemostat cocultures. *Arch. Microbiol.* 155, 82–88.

- Stadt Dortmund- Umweltamt, 2009. Erdwärmetechnik in Dortmund. Stadt Dortmund, Umweltamt.
- Stankowiak, A., 2012. Wärmeträgerflüssigkeiten für oberflächennahe Geothermie. Online-Artik.
- Stouthamer, A.H., 1992. Metabolic pathways in *Paracoccus denitrificans* and closely related bacteria in relation to the phylogeny of prokaryotes. *Antonie Van Leeuwenhoek* 61, 1–33.
- Straub, K.L., Benz, M., Schink, B., 2001. Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH. *Fems Microbiol. Ecol.* 34, 181–186.
- Straub, K.L., Kappler, A., Schink, B., 2005. Enrichment and Isolation of Ferric-Iron- and Humic-Acid-Reducing Bacteria.
- Straub, K.L., Schink, B., 2003. Evaluation of electron-shuttling compounds in microbial ferric iron reduction. *Fems Microbiol. Lett.* 220, 229–233.
- Thauer, R.K., Jungermann, K., Decker, K., 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41, 100–180.
- Umweltbundesamt, 2013. Im Internet publizierte Daten, Quelle: www.umweltbundesamt.de.
- Umweltministerium Baden-Württemberg, 2005. Leitfaden zur Nutzung von Erdwärme mit Erdwärmesonden. Umweltministerium Baden-Württemberg, Stuttgart.
- VwVwS, 1999. Verwaltungsvorschrift wassergefährdender Stoffe. Umweltbundesamt.
- Weber, K.A., Achenbach, L.A., Coates, J.D., 2006. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 752–764.
- Widdel, F., Pfennig, N., 1981. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. *Arch. Microbiol.* 129, 395–400.
- Wilson, J.T., Leach, L.E., Henson, M., Jones, J.N., 1986. In-situ bioremediation as a ground-water remediation technique. *Ground Water Monit. Remediat.* 6, 56–64.

2 Grundwassergefährdungspotenzial von Additiven in Wärmeträgerflüssigkeiten für Erdwärmesonden

2.1 Zusammenfassung

Mit der steigenden Anzahl installierter Erdwärmesonden erhöht sich das Risiko einer Leckage, bei welcher Wärmeträgerflüssigkeiten ins Grundwasser gelangen und eine lokale Verschmutzung verursachen können. In dieser Studie wurde das Grundwassergefährdungspotenzial von Additiven abgeschätzt, die in den Wärmeträgerflüssigkeiten enthalten sind. Um dies zu erreichen war gesichertes Wissen über die chemische Identität der Additive sowie ihre Einsatzhäufigkeit und -konzentration notwendig. Eine Datenerhebung bei Herstellern und Vertreibern ergab, dass 35 verschiedene Additive verwendet werden, die sich gemäß ihrer Funktion in Korrosionsinhibitoren, Alkalien, Farbstoffe, Lösungsmittel, Duftstoffe, Antischaummittel und Tenside gliedern. Das Grundwassergefährdungspotenzial der Additive wurde basierend auf ihrer Einsatzhäufigkeit und ihrem Umweltverhalten (Mobilität, Abbaubarkeit und aquatische Toxizität) abgeschätzt. Als potentiell problematisch für Grundwassersysteme müssen die Korrosionsinhibitoren Benzotriazol, Tolyltriazol, 2-Ethylhexanoat, Benzoat und Decandicarboxylat angesehen werden. Es wird empfohlen, diese Substanzen unter umweltrelevanten Bedingungen experimentell eingehend zu untersuchen, um ein detaillierteres Wissen über ihr Grundwassergefährdungspotenzial zu erlangen.

2.2 Einleitung

Zur Nutzung der oberflächennahen Erdwärme für Gebäudewärmung und –kühlung werden Erdwärmesonden (EWS) installiert, die in der Regel bis zu 100 m in den Untergrund reichen (Bundesverband Geothermie). Die Gesamtzahl der EWS-Anlagen steigt kontinuierlich an und liegt in der EU inzwischen bei über einer Million. So sind im

Jahr 2010 EU-weit mehr als 100.000 EWS installiert worden, 25.000 davon allein in Deutschland (EUROSERVER, 2011). In den EWS, die üblicherweise aus zwei vertikalen Sonderrohren bestehen, zirkulieren typisch 54 Liter Wärmeträgerflüssigkeit (WTF) - ein Gemisch aus Wasser und Frostschutzmittel. Als Frostschutzmittel in WTF sind nur Substanzen der Wassergefährdungsklasse 1 (WGK 1) zulässig. Am häufigsten werden dem Wasser bis zu 30 % Ethylen- oder Propylenglykol beigemischt. Neben den Frostschutzmitteln werden zur Gewährleistung einer optimalen Funktion und langer Lebensdauer der Anlagen weitere Zusatz- und Hilfsstoffe, die so genannte Additive, eingesetzt. Die Identität der einzelnen Additive unterliegt dem Betriebsgeheimnis der Hersteller. Im Falle eines Sondenbruchs können zahlreiche Stoffe mit unbekanntem Eigenschaften freigesetzt werden, die die Grundwasserqualität erheblich beeinträchtigen.

Zurzeit fokussiert sich die Umweltverträglichkeitsbetrachtung der EWS auf den Temperaturänderungen des Grundwassers, die durch Wärmezufuhr und -entnahme verursacht werden (Hähnlein et al., 2010). Die Temperaturänderungen ihrerseits verändern die Dichte und Viskosität des Wassers (Stumm, 1996), beeinflussen Carbonatausfällungen (Griffioen and Appelo, 1993) und die Löslichkeit von Mineralien (Arning et al., 2006). Ebenfalls untersucht wurde eine mögliche temperaturbedingte Veränderung der Mikrobengemeinschaft und Fauna in tieferen Sedimenten. Aus den Studien ging hervor, dass bei anthropogen bedingten Temperaturänderungen zwischen 5-10°K keine gravierende Folgen für das Ökosystem zu befürchten sind (Brielmann et al., 2011; Schippers and Reichling, 2006).

Ein Aspekt, der bislang in der Umweltverträglichkeitsbetrachtung weniger Beachtung gefunden hat, ist die Beeinträchtigung, insbesondere der tiefen Aquifere durch den unbeabsichtigten Austritt von WTF. Sowohl direkt bei Einbau und Inbetriebnahme als auch nach anhaltendem Betrieb der EWS besteht das Risiko einer Leckage. Gelangen organische Schadstoffe in die Umwelt, spielen Mikroorganismen eine zentrale Rolle bei ihrer Entfernung. Jedoch herrschen in Tiefen von bis zu 100 m bei Temperaturen zwischen 10 und 14°C und durchschnittlich geringen Mikroorganismenkonzentrationen von 10^6 Zellen/cm³ nur geringe mikrobiellen Aktivitäten (Whitman et al., 1998). Folglich werden in tiefen Aquiferen niedrige Abbauraten für organische Schadstoffe erwartet.

In einer vorhergehenden Studie wurde das Risiko einer dauerhaften Gefährdung der Grundwasserqualität durch Frostschutzmittel als gering eingestuft (Klotzbücher et al., 2007). Der mikrobielle Abbau der gebräuchlichsten Frostschutzmittel Ethylen- und Propylenglykol wurde unter oxidischen Bedingungen sowohl mit Reinkulturen (Kerstens and De Ley, 1963; Willetts, 1981) als auch mit verschiedenen Umweltproben (Kaplan et al., 1982; Klecka et al., 1993; Mcgahey and Bower, 1992) eingehend untersucht. Zudem gibt es Belege für eine gute Abbaubarkeit von Ethylen- und Propylenglykol durch autochthone Grundwassermikroorganismen (Flathman et al., 1989; Sorensen et al., 2000). Im Zuge des Abbaus des Frostschutzmittels kommt es im Aquifer zur Sauerstofflimitation und möglicherweise zu einer lokalen Anoxie des Grundwassers. Anaerobe glykolabbauende Bakterien wurden aus verschiedenen Umweltproben isoliert (Eichler and Schink, 1985; Ouattara et al., 1992; Schink and Stieb, 1983). Deshalb wird vermutet, dass sich der mikrobielle Abbau der Hauptkomponente im Aquifer auch in Abwesenheit von Sauerstoff fortsetzt. Selbst mit Bakterienisolaten aus tiefem Sandstein (600-1600 m) konnte ein mikrobieller Abbau beider Glykole nach Zugabe verschiedener Elektronenakzeptoren nachgewiesen werden (Sass and Cypionka, 2004). In Abwesenheit von Elektronenakzeptoren werden Ethylen- und Propylenglykol fermentativ zu Acetat und Ethanol bzw. zu Propionat und Propanol abgebaut (Dwyer and Tiedje, 1983; Obradors et al., 1988; Klotzbücher et al., 2007). Das Frostschutzmittel Betain (N,N,N-Trimethylammonioacetat), das alternativ zu den Glykolen in den WTF eingesetzt wird, ist ebenso aerob und anaerob abbaubar (Möller et al., 1984; Müller et al., 1981; Sass et al., 2004). Allerdings wird die Bildung der wassergefährdenden (WGK 2) Substanz Trimethylamin als Produkt des anaeroben Betainabbaus als problematisch angesehen. Zudem kann Betain durch seine Tendenz zur Komplexbildung mit Metallionen zu einer Mobilisierung von toxischen Metallen im Grundwasser führen. Aus diesem Grund wurde Betain nicht zum Einsatz in WTF für EWS empfohlen (Klotzbücher et al., 2007).

Wenig ist bekannt über die Identität der Additive in WTF und ihr Umweltverhalten. Die mit dem Abbau der Hauptkomponente einhergehende Limitierung des Sauerstoffs verlangsamt und erschwert auch die Abbaubarkeit der einzelnen Additive. Dies kann dazu führen, dass insbesondere Additive mit chemisch komplexeren Strukturen nicht

mikrobiell entfernt werden können. Erschwerend kommt hinzu, dass eine Reihe von xenobiotischen Substanzen die Aktivität von Grundwassermikroorganismen hemmen kann. Folge wäre ein eingeschränkter Abbau der Hauptkomponente und eine weitreichendere Ausbreitung der Schadstofffahne im Grundwasserleiter. Eine signifikante Verlangsamung des anaeroben Abbaus von Propylenglykol durch eine kommerziell erhältliche Additivformulierung wurde in Batchexperimenten mit Aquifersediment bestätigt (Klotzbücher et al., 2007). Zur Gefährdungsabschätzung ist es notwendig, die chemische Identität der verwendeten Additive und ihre Konzentrationsbereiche in WTF zu kennen. Aus verwandten Verwendungszwecken (z.B. Flugzeugenteisung) (Cancilla et al., 1997) kann geschlossen werden, dass auch in Erdwärmesonden Benzotriazole zirkulieren. In Studien zur aquatischen Toxizität von Flugzeugenteisungsmitteln wurde nachgewiesen, dass Benzotriazol und Tolyltriazol die Inhaltsstoffe mit der größten Hemmwirkung gegenüber Bakterien waren (Cancilla et al., 1997).

Ziel der vorliegenden Studie war es, mittels einer Datenerhebung die Identität von Additiven zu ermitteln, die in gebräuchlichen WTF für EWS eingesetzt werden. Für die deklarierten Substanzen wurde basierend auf den Kriterien Verwendungshäufigkeit und Umweltverhalten im Grundwasser ihr Grundwassergefährdungspotenzial abgeschätzt.

2.3 Methoden

2.3.1 Datenerhebung

Unter Mitwirkung des Umweltministeriums Baden-Württemberg wurde im September 2009 eine Datenerhebung bei Herstellern und/oder Vertreibern von WTF durchgeführt. Das Formblatt enthielt die folgenden Anfragen: 1) Produktname der WTF, 2) Hersteller/Vertreiber der WTF, 3) chemische Identität und Massenanteile der Frostschutzmittel, 4) chemische Identität, Massenanteile und Funktion der Additive. Dieser Erhebungsbogen wurde an 11 Herstellern/Vertreibern von WTF in Deutschland versandt.

2.3.2 Abschätzung der Grundwassergefährdung

Für die deklarierten Additive wurde eine Gefährdungsabschätzung durchgeführt. Der Fokus lag auf der Evaluation organischer Additive. Anorganische Stoffe wurden nicht berücksichtigt. Die beiden Hauptkriterien, die zur Ermittlung des Grundwassergefährdungspotenzials der Additive herangezogen wurden, waren (I) Verwendungshäufigkeit und (II) Umweltverhalten im Grundwasser (GW).

I. Verwendungshäufigkeit

Für die Gefährdungsabschätzung wurde zuerst die Verwendungshäufigkeit betrachtet. Wurde ein Additiv in ≥ 2 WTF deklariert, galt die Verwendungshäufigkeit als „hoch“ und die Substanz wurde auf ihr Umweltverhalten untersucht. Bei Deklaration in nur einer einzigen WTF wurde das GW-Gefährdungspotenzial der Substanz als gering eingestuft und sie wurde nicht weiter untersucht.

II. Umweltverhalten

Für alle mehrfach verwendeten Additive wurde das Umweltverhalten basierend auf Mobilität im GW, mikrobieller Abbaubarkeit und aquatischer Toxizität beurteilt. Die Substanzen wurden anhand ihres GW-Gefährdungspotenzials klassifiziert. Ein hohes GW-Gefährdungspotenzial besitzen Substanzen, die eine hohe Mobilität im GW aufweisen und mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllen: i) eingeschränkte Bioabbaubarkeit oder ii) potentielle Toxizität gegenüber aquatischen Organismen.

Die *Mobilität* eines Additivs im GW wurde basierend auf den physikalisch-chemischen Eigenschaften Wasserlöslichkeit und Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizient ($\log K_{OW}$) jeweils für die bei neutralem pH vorherrschenden Spezies abgeschätzt. Die Stoffeigenschaften wurden der Online Datenbank PHYSPROP, den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern oder wissenschaftlichen Publikationen entnommen. Bei ungenügender Datenlage wurden die entsprechenden Werte mit dem Programm EPI Suite™ v4.10 prognostiziert.

Die *Bioabbaubarkeit* eines Additivs wurde auf Basis einer intensiven Literaturrecherche und publizierter Daten beurteilt. Die Substanzen wurden als persistent, potentiell persistent oder nicht persistent (d.h. keine Anhaltspunkte für Persistenz) kategorisiert.

Als persistent wurden Substanzen zugeordnet, die unter oxidischen und anoxischen Bedingungen nicht oder nur eingeschränkt abbaubar waren. Substanzen mit widersprüchlichen Daten über ihre Bioabbaubarkeit wurden als potentiell persistent klassifiziert. Als nicht persistent wurden Additive kategorisiert, deren Abbau unter oxidischen und anoxischen Bedingungen demonstriert wurde. War eine Substanz bewiesenermaßen aerob abbaubar, fehlten jedoch Daten zur anaeroben Abbaubarkeit, konnte keine eindeutige Aussage über die Persistenz dieser Substanz getroffen werden. Auch die potentielle Freisetzung von Transformationsprodukten in die Umwelt wurde unter diesem Punkt berücksichtigt.

Des Weiteren wurde untersucht, ob beim unbeabsichtigten Austritt von WTF ins GW im Nahbereich der EWS eine *ökotoxische Wirkung* der Additive befürchtet werden muss. Die Abschätzung stützte sich auf publizierten experimentellen Wirkkonzentrationen der einzelnen Substanzen gegenüber aquatischen Organismen. Für die drei trophischen Stufen Fisch, Daphnien und Bakterien wurden die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) sowie die Konzentration, die zum Tode von 50 % der Versuchsorganismen führen (LC_{50}) berücksichtigt. Bei fehlender Datenlage wurden akute Wirkkonzentrationen der Additive für Fisch und Daphnien mit dem Programm EPI Suite™ v4.10 prognostiziert. Bei der Berechnung der erwarteten Additivkonzentrationen im GW wurden die folgenden Annahmen getroffen: i) Austritt des ganzen Inhalts eines typischen Sonderohrs (Länge 100 m, Durchmesser 32 mm, Wanddicke 2,9 mm) zuzüglich der Solevorlage im Ausdehnungsgefäß für ein Einfamilienhaus, insgesamt 60 L (Stadt Dortmund- Umweltamt, 2009) und ii) Verdünnung der WTF im Nahbereich der Sonde mit einem Faktor von 160. Für die Berechnung dieses Verdünnungsfaktors wurde angenommen, dass sich der ganze Inhalt der EWS (60 L) in einem Halbzylinder mit 10 m Radius (r) und 0,2 m Höhe (h) verdünnt. Das GW-volumen V_{GW} im Halbzylinder wurde folgendermaßen berechnet:

$$V_{GW} = \left(\frac{1}{2}\right)\pi \times r^2 \times h \times n$$

Dabei ist n die typische Porosität von Sandstein (0,3). Durch Dividieren des GW-Volumens durch den Inhalt der EWS ergab sich der Verdünnungsfaktor 160. Die berechnete Konzentration im GW wurde mit einem Sicherheitsfaktor von 10 multipliziert.

Im Folgenden ist ein Beispiel für die Berechnung der erwarteten Konzentration von Tolyltriazol im GW dargestellt:

$$\frac{\text{Maximalkonzentration(EWS)}}{\text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Sicherheitsfaktor}} = \frac{3,5 \times 10^3 \text{ mg / L}}{160 \times 10} = 218 \text{ mg / L}$$

Überstieg die berechnete Additiv-Konzentration im GW (inklusive Sicherheitsfaktor) die niedrigste Wirkkonzentration, wurde die Substanz als potentiell problematisch für aquatische Organismen eingestuft.

2.4 Ergebnisse

2.4.1 Identität der Hauptkomponente

An der Befragung beteiligten sich sieben Firmen. Damit lag die Rücklaufquote bei 63 %. Insgesamt wurden 23 WTF (im Folgenden auch als Produkte bezeichnet) deklariert. Die Datenerhebung ergab, dass acht organische und anorganische Substanzen einzeln oder in Kombination als Frostschutzmittel eingesetzt werden. Dabei handelte es sich um die Alkohole Ethylen- und Propylenglykol, Betain sowie die Salze Kaliumacetat, Kaliumformiat, Natriumpropionat, Calciumchlorid und Kaliumcarbonat. Je nach erwünschter Frostschutztemperatur betrug der Anteil des Frostschutzmittels in den zirkulierenden WTF bis zu 40 %.

2.4.2 Identität und Funktion der Additive

In fast allen untersuchten WTF wurden laut Angaben der entsprechenden Firmen Additive eingesetzt. Diese sollen eine lange Lebensdauer der Anlagen und eine gute Funktionsweise gewährleisten. Zwei der Produkte enthielten keine Additive. Es wurden insgesamt 35 verschiedene Zusatzstoffe offengelegt. In Tab. 2-1 wurden neben dem chemischen Namen der einzelnen Stoffe auch ihre Verwendungshäufigkeit in den deklarierten WTF sowie ihre Endkonzentrationen in den EWS-Anlagen eingetragen. Die Substanzen wurden nach Herstellerangaben in Korrosionsinhibitoren und sonstige Zusatzstoffe gruppiert. Die letzteren konnten im Rahmen dieser Studie als Alkalien,

Farbstoffe, Antischaummittel, Tenside und Duftstoffe zugeordnet werden. Keine Biozide wurden deklariert.

2.4.3 Korrosionsinhibitoren

In allen WTF, die Additive enthielten, waren Korrosionsinhibitoren vertreten. Daher ist diese Funktionsgruppe aufgrund ihrer Verwendungshäufigkeit besonders relevant. Sie beinhaltete Vertreter aus sechs verschiedenen Stoffklassen (Benzotriazole, Carbonsäuren, Phosphonate, Borate, Silikate und Nitrate). Unter den organischen Korrosionsinhibitoren wurden am häufigsten Carbonsäuren (fünf Substanzen) und Benzotriazole (1H-Benzotriazol und Tolyltriazol) verwendet. Mit Ausnahme von 2-Ethylhexanoat, welches in einer Reihe von WTF auch als einziges Korrosionsschutzmittel verwendet wurde, wurden Carbonsäuren ausschließlich als Mischungen eingesetzt. Benzotriazole wurden in der Regel ebenfalls mit weiteren Korrosionsinhibitoren kombiniert. Eine Ausnahme war Tolyltriazol, das in einem der Produkte als die einzige Chemikalie zum Korrosionsschutz verwendet wurde. Auch anorganische Verbindungen werden in EWS-Anlagen zum Korrosionsschutz benutzt. Elf bzw. neun WTF enthielten Silikate und Borate einzeln oder in Kombination mit organischen Korrosionsinhibitoren. In fünf der WTF wurden zusätzlich Nitrate eingesetzt.

2.4.4 Gefährdungsabschätzung

Die Gefährdungsabschätzung der Additive basierte auf den Kriterien i) Verwendungshäufigkeit (in den deklarierten WTF, s. Tab. 2-1 und ii) Umweltverhalten.

Verwendungshäufigkeit

Bei der Datenerhebung wurden vier anorganische Additive identifiziert, die dem Korrosionsschutz dienten oder als Alkalien fungierten. Obwohl ihre Verwendungshäufigkeit hoch war, wurden diese Additive nicht weiter berücksichtigt, da für die beigemischten Konzentrationen (s. Tab. 2-1) keine GW-Gefährdung durch diese Substanzen zu erwarten war. Das GW-Gefährdungspotenzial einer Reihe von

organischen Additiven wurde aufgrund ihrer seltenen Verwendung als statistisch gering eingestuft und nicht weiter untersucht. Dabei handelte es sich um Substanzen, die jeweils in nur einer WTF eingesetzt wurden. Dazu gehören alle Duft- und Farbstoffe, die Korrosionsinhibitoren EDTA und Kaliumgluconat sowie das Tensid Sorbitol.

Basierend auf den drei Aspekten Mobilität, Bioabbaubarkeit und aquatische Toxizität wurde das Umweltverhalten der verbleibenden 13 mehrfach verwendeten Additive (1H-Benzotriazol, Tolyltriazol, 2-Ethylhexanoat, Benzoat, Decandicarboxylat, Propylencarbonat, Methanol, Oleylalkohol, Tripropylenglykolphosphonäther, EO/PO block copolymer, Natriumpolycarbonat, Natrium(trihydroxysilylpropyl)methylphosphonat und Natriummethylmethylphosphonat) eingehend beurteilt.

Mobilität im Grundwasser

Die Abschätzung der *Mobilität* im GW basierte auf den physikochemischen Eigenschaften der Additive (Tab. 2-2). Fast alle dieser Substanzen sind moderat bis sehr gut - d.h. im g/L-Bereich - wasserlöslich. Die mittelstarken Säuren 2-Ethylhexansäure, Decandicarbonsäure und Benzoesäure (pKs-Werte zwischen 4,2 bis 5,5) liegen unter Umweltbedingungen überwiegend deprotoniert ($R-COO^-$) vor und weisen eine entsprechend höhere Löslichkeit im GW auf. Einzig Oleylalkohol ist mit 7×10^{-5} g/L schlecht löslich im wässrigen Milieu. Substanzen mit $\log K_{OW}$ -Werten < 2 wurden in ihrer Tendenz, in die organische Phase überzugehen, als moderat eingestuft. Sie zeigen nur eine geringe Sorptionsneigung an organischen Kohlenstoff im Sediment und sind dadurch meist mobil. Für 2-Ethylhexansäure und Decandicarbonsäure in neutraler Form ist die Affinität für die organische Phase höher ($\log K_{OW}$ -Werte von 2,19 und 2,64), jedoch wird bei den anionischen Spezies von einer geringeren Sorptionsneigung ausgegangen. Im Gegensatz zu den anderen Additiven hat Oleylalkohol ($\log K_{OW} = 7,5$) eine sehr starke Tendenz in die organische Phase überzugehen. Folglich wurden aufgrund ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften 12 der Additive als mobil (+) und Oleylalkohol als nicht mobil (-) im GW eingestuft (Tab. 1-2).

Bioabbaubarkeit

Anhand von Literaturdaten wurde die Bioabbaubarkeit der Additive evaluiert. Details über die entsprechenden Abbauntersuchungen sowie deren Referenzen sind Tab. 2-3 zu entnehmen.

In einer Reihe von Studien zeigten Benzotriazole unter oxidischen und anoxischen Bedingungen in Mikrokosmen mit Klärschlamm, industriellen Abwässern und Boden sowie in Durchfluss-Systemen ein persistentes Verhalten (Rollinson & Calley, 1986; Hem et al., 2000, Jia et al., 2006; Leerdam et al., 2009; Weiss & Reemtsma, 2005). Einige aktuelle Untersuchungen weisen allerdings auf eine prinzipielle jedoch eingeschränkte Abbaubarkeit von Benzotriazolen in Anwesenheit von Sauerstoff hin (Heesel, 2010; Liu et al., 2011; Mishra, 2011; Spahr, 2012). Zusammenfassend ergab sich aus mehr als zehn analysierten Abbaustudien, dass Benzotriazole unter den meisten untersuchten Bedingungen sehr persistent (++) waren.

Mehrere Abbautests mit Klärschlamm ergaben, dass 2-Ethylhexanoat (2-EtH) unter oxidischen Bedingungen gut abbaubar ist. Einer der aeroben Abbautests zeigte dagegen eine eingeschränkte Abbaubarkeit (39% innerhalb von 28 Tagen) der Substanz (HPVIS, 2012). Darüber hinaus wurde 2-EtH in verschiedenen Umweltproben nachgewiesen (Barnabe et al., 2008; Horn et al., 2004). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass es sich in der Umwelt bei dieser Substanz hauptsächlich um ein persistentes mikrobielles Abbauprodukt verschiedener Weichmacher (Bis(2-ethylhexyl)phthalat, Bis(2-ethylhexyl)terephthalat, Bis(2-ethylhexyl)adipat) handelt. Systematische Untersuchungen des anaeroben Abbaus von 2-EtH liegen in der Literatur kaum vor. In einer Studie wurde den mikrobiellen Abbau von 2-EtH in Bodenproben unter Ausschluss von Sauerstoff deklariert (Chua et al., 2001). In Experimenten mit Reinkultur (*Rhodococcus rhodochrous*) unter gärenden Bedingungen wurde dagegen die Persistenz von 2-EtH demonstriert (Nalli et al., 2002). Somit lagen für 2-EtH in der Literatur widersprüchliche Daten über ihren mikrobiellen Abbau und die Säure wurde als potentiell persistent (+) eingestuft.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist nur eine experimentelle Untersuchung zum Bioabbau von Decandicarboxylat unter oxidischen Bedingungen bekannt, die den mikrobiellen

Abbau dieser Substanz mittels β -Oxidation demonstrierte (Chapman and Duggleby, 1967). Aus einer weiteren Studie geht hervor, dass Decandicarboxylat unter anoxischen Bedingungen über Propionat zu Methan abgebaut werden kann (Matthies and Schink, 1993). Weiter wurde in der Studie von Schink and Pfennig (1982) über den Abbau von strukturverwandten Dicarbonsäuren (Succinat) unter gärenden Bedingungen berichtet. Aufgrund der vorhandenen Abbaudaten liegen keine Anhaltspunkte für die Persistenz dieser Substanz in der Umwelt vor und sie wurde als nicht persistent kategorisiert (-).

Benzoat ist aerob und anaerob gut abbaubar (s. Referenzen in Tab. 1-2). Zahlreiche Abbautests mit Umweltproben belegten den vollständigen aeroben Abbau von Benzoat mit Halbwertszeiten von einem Tag (TOXNET, 2012). Unter anoxischen Bedingungen wurde die Mineralisierung von Benzoat mit verschiedenen Bakterienisolaten sowie in Proben aus Klärschlamm, Boden, aquatischen Sedimenten sowie oligotrophen Aquiferen gezeigt (Gibson and Sulfito, 1986; Williams and Evans, 1975; Kazumi, 1995; weitere Referenzen können Kapitel 6 entnommen werden). Aufgrund der vorliegenden Daten zum mikrobiellen Abbau von Benzoat, wurde die Substanz als nicht persistent (-) eingestuft.

Ein aerober sowie anaerober Bioabbau von Methanol wurde mehrfach nachgewiesen (s. Referenzen in Tab. 1-2). Der Alkohol war in aeroben Abbautests mit Klärschlamm gut biologisch abbaubar. Weitere Untersuchungen mit Umweltproben belegten den mikrobiellen Abbau von Methanol in Abwesenheit von Sauerstoff. Infolge seiner mikrobiellen Abbaubarkeit unter oxischen und anoxischen Bedingungen wurde Methanol als nicht persistent (-) eingestuft.

Oleylalkohol war in zwei Untersuchungen mit Bodenisolaten oder Umweltproben unter oxischen Bedingungen mikrobiell abbaubar (Wind et al., 2006; HPVIS, 2012). Bis dato ist nur eine Studie bekannt, wo der anaerobe Abbau von Oleylalkohol (mit Klärschlamm) untersucht und demonstriert wurde (Nuck and Federle, 1996: zitiert in Fisk et al., 2009). Anaerobe Abbauxperimente mit dem strukturähnlichen Hexadecanol geben jedoch weitere Hinweise auf die potentielle Abbaubarkeit dieser Substanz unter anoxischen Bedingungen. Zusammenfassend lieferten die Daten aus der

Literaturrecherche keine Anhaltspunkte über die Persistenz dieser Substanz in der Umwelt und Oleylalkohol wurde als nicht persistent (-) zugeordnet.

In Experimenten mit Klärschlamm wurde ein aerober Abbau von Propylencarbonat (HPVIS, 2012) und Tripropylenglykolmethylether nachgewiesen (Matsue, 2000; Wu et al, 1996). Da keine Daten über ihre Abbaubarkeit unter anoxischen Bedingungen sowie keine relevante Information bezüglich des mikrobiellen Abbaus strukturverwandter Verbindungen vorliegen, konnten keine abschließenden Aussagen über ihre Persistenz in der Umwelt getroffen werden.

Experimentelle Abbauuntersuchungen mit den beiden Estern der Phosphonsäure, Natriummethylmethylphosphonat (NaMP) und Natrium(trihydroxysilylpropyl)-methylphosphonat (NaTHSMP) liegen in der Literatur zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht vor. Als erster Schritt des Abbaus beider Substanzen ist, ausgehend von ihrer chemischen Struktur, eine mikrobiell katalysierte Spaltung der Esterbindung durch Hydrolyse sehr wahrscheinlich. Als Produkte der Hydrolyse von NaMP und NaTHSMP entstehen Methylphosphonsäure und Methanol bzw. Silanetriol, (3-hydroxypropyl). In mehreren Studien wurde die Abbaubarkeit von Methylphosphonat unter oxischen und anoxischen Bedingungen mit Reinkulturen aus verschiedenen Umweltproben nachgewiesen (Matys et al., 2001; Quinn et al., 1989; Schowanek and Verstraete, 1990). Als Abbauprodukte wurden Methan und anorganisches Phosphat dokumentiert (Daughton, 1979; Murata et al., 1988; Ternan et al., 2000). Daten über den Abbau von Silanetriol, (3-hydroxypropyl), das bei der Hydrolyse von NaTHSMP entsteht, sind in der Literatur bisher nicht vorhanden. Jedoch wurde ein aerober Abbau strukturverwandter Silanole experimentell belegt (Lehmann et al., 1998; Sabourin et al., 1996). Ein Abbau unter anoxischen Bedingungen konnte dagegen nicht bestätigt werden (Sabourin et al., 1996). Aufgrund der Datenlage zum Bioabbau verschiedener Phosphonate ist wahrscheinlich, dass die beiden untersuchten Korrosionsinhibitoren NaMP und NaTHSMP in der Umwelt mikrobiell eliminiert werden können. Allerdings ist die Bildung potenziell persistenter Produkte unter bestimmten Redoxbedingungen nicht ausgeschlossen. Zusammenfassend liegen aus der Literatur gute Hinweise, dass Phosphonate in der Umwelt nicht lange persistieren (-).

Über die Persistenz der deklarierten Polymerverbindungen sind in der Literatur keine Daten vorhanden. Aufgrund von fehlenden experimentellen Untersuchungen mit den beiden spezifischen Polymeren EO/PO Block Co-Polymer und Natriumpolycarbonat ist eine eindeutige Aussage über die Langlebigkeit dieser Substanzen in Aquiferen nicht möglich.

Aquatische Toxizität

Zur umfassenden Charakterisierung des Umweltverhaltens der mehrfach verwendeten Additive wurde der Aspekt der *aquatischen Toxizität* für die trophischen Stufen Fisch, Daphnien und Bakterien hinzugezogen. Basierend auf dem Szenario einer Leckage, das den vollständigen Austritt der WTF in den Aquifer zur Folge hat, wurden für den Nahbereich der EWS Grundwasserkonzentrationen für die einzelnen Additive abgeschätzt. Eine Substanz wird als problematisch klassifiziert, wenn die errechneten Konzentrationen die Effektkonzentrationen für aquatische Organismen übersteigen (Tab. 2-4).

Die errechneten GW-Konzentrationen von Tolyltriazol, 2-Ethylhexanoat, Benzoat und Decandicarboxylat liegen mindestens über einem der ermittelten EC_{50} - und LC_{50} -Werte für aquatische Organismen. Die EC_{50} - und LC_{50} -Werte für Benzotriazol der drei trophischen Stufen sind zwar oberhalb der erwarteten Konzentration von 19 mg/L im Nahbereich der Erdwärmesonden, jedoch wurde eine Hemmung der Nitrifikation bereits in Anwesenheit von je 10 mg/L Benzotriazol und Tolyltriazol postuliert (Callender and Davis, 2002; Puttanna et al., 1999). Außerdem gibt es Hinweise auf eine hormonartige Wirkung von Benzotriazol auf Hefezellen in deutlich niedrigeren Konzentrationen (< 1 mg/L) (Harris et al., 2007). Zusätzlich hemmte Benzotriazol den Abbau anderer organischen Substanzen, darunter auch das Frostschutzmittel Propylenglykol (Cornell et al., 2000; Heesel, 2010; Jia et al., 2006; Mishra, 2011).

Errechnete GW-Konzentrationen von Methanol und Propylencarbonat lagen unterhalb der experimentellen und vorhergesagten Effektkonzentrationen für aquatische Organismen und die beiden Additive können als nicht problematisch („-“) eingestuft werden (Tab. 2-4). Für alle anderen Substanzen konnte aufgrund fehlender Daten über

die ökotoxische Auswirkung auf Bakterien keine abschließende Aussage getroffen werden.

2.4.5 Grundwassergefährdungspotenzial der häufig eingesetzten Additive

Durch die Synthese der Daten zu Mobilität, biologischer Abbaubarkeit und aquatischer Toxizität der häufig verwendeten Additive wurde das GW-Gefährdungspotenzial dieser Substanzen im Falle der Leckage einer Erdwärmesonde abgeschätzt (Tab. 2-5). Substanzen mit ungenügender Datenlage in mindestens einem der genannten Aspekte konnten nicht abschließend klassifiziert werden.

Benzotriazol, Tolyltriazol und 2-Ethylhexanoat verhalten sich im GW mobil und gelten als persistent. Zudem können diese Substanzen in relevanten Konzentrationen aquatische Organismen hemmen. Den Additiven wurde ein hohes GW-Gefährdungspotenzial attestiert. Benzoat und Decandicarboxylat sind im GW mobil und gelten als mikrobiell abbaubar. Jedoch werden sie in WTF in Konzentrationen eingesetzt, die im Falle einer Leckage in direkter Nähe eines Schadensfalls auf aquatische Organismen toxisch wirken können. Folglich wurden Benzoat und Decandicarboxylat als Korrosionsinhibitoren mit hohem GW-Gefährdungspotenzial kategorisiert. Substanzen, die eine hohe Mobilität haben, aber zügig biologisch unter oxidischen und anoxischen Bedingungen eliminiert werden können und für welche kein Hinweis auf toxische Effekte gegenüber aquatischen Organismen vorliegt, stellen keine Gefährdung der GW-Qualität dar und wurden als Substanzen mit geringem GW-Gefährdungspotenzial klassifiziert. In diese Kategorie gehören Propylencarbonat und Methanol. Oleylalkohol wurde als nicht GW-gefährdend klassifiziert, da es im Untergrund nahezu immobil ist und zudem ein effizienter mikrobieller Abbau zu erwarten ist. Für alle anderen Substanzen war eine Klassifizierung bezüglich ihres GW-Gefährdungspotenzials aufgrund fehlender Daten zu mindestens einem der Aspekte nicht möglich.

Zusammenfassend wurden durch das zweistufige Priorisierungsverfahren aus Verwendungshäufigkeit und Umweltverhalten fünf der 35 deklarierten

Additivsubstanzen als prioritär (d.h. problematisch) bezüglich ihres GW-Gefährdungspotenzials eingestuft. Diese Substanzen sollten unbedingt experimentell unter umweltrelevanten Bedingungen untersucht werden. Nur so wird es möglich sein, ausreichende Sicherheit über ihr Grundwassergefährdungspotenzial zu erlangen.

2.5 Risikobeurteilung

Die Erdwärme gewinnt als Alternative zu den herkömmlichen fossilen Energieträgern (Steinkohle, Braunkohle, Erdöl und Erdgas) zunehmend an Bedeutung. Da zur Nutzung dieser Energie EWS in tiefen Aquiferen platziert werden, ist es entscheidend, dass dieses Ökosystem und wichtige Trinkwasserressource keinen Schaden nimmt. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann das bestehende Risiko einer Grundwasserverschmutzung durch Additive, die in WTF zugesetzt werden, nicht abschließend beurteilt werden. In der nachfolgenden Risikobeurteilung wurden die Faktoren (I) Eintrittshäufigkeit und (II) Schadensausmaß berücksichtigt.

(I) Eintrittshäufigkeit

Zur Eintrittshäufigkeit des Schadensereignisses bestehen keine gesicherten Daten. Die gemeldeten Fälle defekter Erdwärmesonden (Druckabfall im System, möglicher Austritt von WTF) liegen gemäß Schätzungen bei 2-5 % der eingerichteten Systeme (Mündliche Auskunft Prof. Walker-Hertkorn, Hochschule Deggendorf, Februar 2011). Auf momentan 25 000 neuinstallierten Erdwärmesonden pro Jahr in Deutschland (EUROSERVER, 2011) kämen somit statistisch 50 bis 125 Schadensfälle. Wobei es nur bei einem Teil der Defekte zum Austritt von WTF in tiefe Aquifere kommt. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt sind nur einzelne Fälle einer Leckage mit Flüssigkeitsaustritt ins tiefe Grundwasser dokumentiert (Bassetti et al., 2006). Denkbar ist, dass eine Beschädigung der Sonden direkt bei der Installation erfolgt oder dass die Sonden über die Jahre undicht werden. Aufgrund des beschränkten Anwendungszeitraums der flachen Geothermie ist noch unklar, ob sich das Risiko einer Leckage mit der Betriebszeit der Systeme erhöht. Ebenso ist die maximale Lebensdauer der Systeme schwer abzuschätzen.

(II) Schadensausmaß

Auch bezüglich des Schadensausmaßes müssen verschiedene Annahmen getroffen werden. Bei einer Leckage gelangen unter Umständen mehrere Liter biologisch gut abbaubares Frostschutzmittel in den Aquifer. Als Folge sinkt lokal das Redoxpotential temporär ab. Änderungen in der Grundwasserchemie können vorübergehende Veränderungen der mikrobiellen Gemeinschaft bewirken.

Im Fokus dieser Arbeit standen eine Reihe organischer Additive in WTF, die bei einem Schadensfall ins Grundwasser gelangen. Die Priorisierung dieser Substanzen anhand der Kriterien Verwendungshäufigkeit und Umweltverhalten (Mobilität, Bioabbaubarkeit und aquatische Toxizität) hat ergeben, dass Benzo- und Tolyltriazol, 2-Ethylhexanoat Benzoat und Decandicarboxylat potentiell problematisch sind. Benzotriazole in Konzentrationen, wie sie in WTF eingesetzt werden, stellen ein ernstzunehmendes Risiko dar. Gelangen sie in tiefe Aquifere, ist dort von einer anhaltenden Beeinträchtigung der Grundwasserqualität auszugehen. Daher wird empfohlen, zukünftig vom Einsatz dieser Substanzklasse in Erdwärmesonden abzusehen. Es sollte geprüft werden, wie die Benzotriazole durch weniger problematische Korrosionsinhibitoren ersetzt werden können, ohne dass diese potentiell toxische Konzentrationsbereiche erreichen. Im Sinne der Risikominimierung ist es zudem ratsam, das Spektrum der anwendbaren Substanzen weiter einzuschränken und die Notwendigkeit von Additiven anderer Funktionsgruppen (Duftstoffe, Entschäumer, Farbstoffe, Biozide) generell in Frage zu stellen.

Experimentelle Untersuchungen unter verschiedenen relevanten Umweltbedingungen mit den potentiell grundwassergefährdenden Additiven sowie weiteren Substanzen, deren Verwendung als Zusatzstoffe in Erwägung gezogen wird, können gezielt dazu beitragen, das Umweltverhalten der Substanzen zu verstehen und das Risiko der Grundwasserverschmutzung zu vermeiden.

Tabelle 2-1: Identität, Verwendungshäufigkeit und Konzentration der Additive in den deklarierten Wärmeträgerflüssigkeiten.

Substanz	CAS Nr.	Vorkommen in Anzahl WTF*	Konzentration** min-max [mg/L]
Korrosionsinhibitoren			
Tolyltriazol/-Na-Salz	29385-43-1/ 64665-57-2	9	0,7-3,5x10 ³
2-Ethylhexanoat	19766-89-3/ 3164-85-0	7	3x10 ³ -17,5x10 ³
Decandicarbonsäure/ Decandicarboxylat	111-20-6 / 14047-57	6	1,2x10 ³ -12,8x10 ³
Benzoessäure/ Benzoat	65-85-0/ 532-32-1	4	6,3x10 ³ -9,5x10 ³
1H-Benzotriazol	95-14-7	2	300
Natriummethylmethylphosphonat	73750-69-3	2	9-10
Natrium(trihydroxysilylpropyl)methylphosphonat	84962-98-1	2	60-70
Dodecandisäure	693-23-2	1	7x10 ³
EDTA, Tetranatriumsalz	64-02-8	1	100
Gluconat	299-27-4	1	3,7x10 ³
Dinatriumtetraborat/-x5H ₂ O/ - x10H ₂ O	1330-43-4/ 11130-12-4/ 1303-96-4	9	0,9-7,9x10 ³
Natrium-/ Kaliumsilikat	6834-92-0/ 1312-76-1	11	30-20x10 ³
Natrium-/ Kaliumnitrat	7631-99-4/ 7757-79-1	4	300-900
Alkalien			
Natrium-/ Kaliumhydroxid	1310-73-2/ 518-47-8	7	600-20,3x10 ³
Farbstoffe			
Fluorescein-Natrium	518-47-8	1	0,5
1-Methoxy-2-Propanol	107-98-2	1	3-3,5x10 ³
Tartrazin gelb	1934-21-0	1	1
Antischaummittel			
EO/PO-Blockcopolymer	9003-11-6	2	6-10
Poly alkaline Glykol	(k.A.)	1	3,5x10 ³
Tenside			

Kapitel 2 Grundwassergefährdungspotenzial von Additiven

Natriumpolycarbonat	52286-11-0	2	200
Propylencarbonat	108-32-7	2	10
Oleylalkohol	143-28-2	2	6-10
Tripropylenglykoldimethylether	25498-49-1	2	20
Sorbitol	50-70-4	1	3,7x10 ³
Lösungsmittel			
Methanol	67-56-1	2	7-10
Duftstoffe			
n-Amylacetat	628-63-7	1	28
Benzylalkohol	100-51-6	1	4
Citronellylisobutyrat	97-89-2	1	8
Essigsäure	64-19-7	1	8
Ethylacetat	141-78-6	1	45
Ethyl-2-methylbutyrat	7452-79-1	1	28
Hexylacetat	142-92-7	1	12
Menthylacetat	89-48-5	1	8
Nerolidol	7212-44-4	1	28
Trans-2-hexenal	6728-26-3	1	4

WTF: Wärmeträgerflüssigkeiten. *Insgesamt wurden 23 WTF deklariert, **Endkonzentration in den fertig gemischten WTF.

Tabelle 2-2: Mobilität der mehrfach verwendeten Additive im Grundwasser. Basierend auf ihren physikochemischen Eigenschaften wurden die Substanzen als mobil (+) und nicht mobil (-) in der Umwelt klassifiziert.

Substanz	MG [g/mol]	Wasserlöslichkeit [g/l]	log K _{ow}	pKs	Mobilität
Benzotriazol	119	19,8 ^{a)}	1,4 ^{a)}	8,4 ^{a)}	+
Tolyltriazol	133	3,1 ^{a)}	1,7 ^{a)}	8,8 ^{b)}	+
2-Ethylhexansäure	144	8,8 ^{c)}	2,6 ^{a)}	4,9 ^{c)}	+
Decandicarbon-säure	202	1 ^{d)}	2,1 ^{d)}	pKs ₁ / pKs ₂ 4,5 ^{e)} / 5,2 ^{e)}	+
Benzoessäure	122	3,4 ^{a)}	1,8 ^{a)}	4,2 ^{a)}	+
Propylencarbonat	102	175 ^{a)}	-0,4 ^{a)}	k.D.	+
Tripropylenglykol-methylether	206	1000 ^{a)}	0,3 ^{a)}	k.D.	+
Oleylalkohol	254	7x10 ^{-5a)}	7,5 ^{a)}	k.D.	-
Methanol	32	1000 ^{a)}	-0,8 ^{a)}	15,3 ^{a)}	+
EO/PO Copolymer	>528	1000 [*]	-1,6 [*]	k.D.	+
Natrium-polycarbonat	150	1000 [*]	-3 [*]	k.D.	+
Natrium(trihydroxysylpropyl)methylphosphonat	238	1000 [*]	-6 [*]	k.D.	+
Natriummethylmethylphosphonat	132	1000 [*]	-3,8 [*]	k.D.	+

*prognostizierte Werte mit Estimation Programs Interface (EPI) Suite TM; MG: Molekulargewicht; k.D.: keine Daten; k.A.: keine Aussage. a) PHYSPROP (2012) b) Gruden et al. (2001); c) Staples (2001), d) SDB Decandicarbon-säure, 2013; e) Fieser and Fieser (1972).

Tabelle 2-3: Daten zur Bioabbaubarkeit der mehrfach verwendeten Additive sowie Klassifizierung hinsichtlich ihrer potentiellen Persistenz in der Umwelt als sehr persistent (++) , potentiell persistent (+) und nicht persistent (-).

Substanz	Bioabbaubarkeit	Persistenz
Benzotriazole	<p>Aerob</p> <ul style="list-style-type: none"> • kein Abbau von 0,39 mg/L Benzotriazol (BT) in einem kontinuierlich betriebenen Bioreaktor bei 15-17°C (Hem et al., 2000) • kein Abbau von 20 mM BT in Batchexperimenten mit Boden / Belebtschlamm aus industriellen Kläranlagen / mikrobiell kontaminierten BT-enthaltenden Abwässer / mikrobiell kontaminiertem BT-enthaltendem Abkühlwasser (Rollinson and Calley, 1986) • kein Abbau von 25-400 mg/L BT innerhalb von 18 Monaten Inkubation in Batchexperimenten mit Oberboden bei 15 °C (Jia et al., 2006) • Halbwertszeiten von 114 und 14 Tagen für 1 mg/L je BT und 5-Methylbenzotriazol (5-MBT) in Batchexperimenten mit 10 % Belebtschlamm bei 25°C (Liu et al., 2011) • 4-MBT ist stabiler als (5-MBT) in konventionellen Kläranlagen (Leerdam et al., 2009; Weiss and Reemtsma, 2005) • Abbau von 44 mg/L BT innerhalb von 40 Tagen in Batchexperimenten mit Klärschlamm bei 28°C (Heesel, 2010) • Abbau von 20 µM BT innerhalb von 13 Tagen in Batchexperimenten mit Klärschlamm bei 20°C (Spahr, 2012) • Abbau von 20 mg/L BT innerhalb von 34 Tagen Inkubation in Batchexperimenten mit Anreicherungskulturen aus Klärschlamm bei 28°C; kein Abbau von 5-MBT wurde unter den gleichen experimentellen Bedingungen beobachtet (Mishra, 2011) <p>Anaerob</p> <ul style="list-style-type: none"> • kein Abbau von 20 mg/L BT innerhalb von 25 Tagen Inkubation in Batchexperimenten unter gärenden Bedingungen mit Klärschlamm aus industrieller Kläranlage bei 20°C (Hem et al., 2000) • kein Abbau von 0,32 mg/L BT in einem kontinuierlich betriebenen Bioreaktor unter denitrifizierenden Bedingungen bei 15-17°C (Hem et al., 2000) • kein Abbau von 310 mg/L BT innerhalb von 29 Tagen Inkubation in Batchexperimenten unter methanogenen und sulfatreduzierenden Bedingungen mit Klärschlamm aus industrieller Kläranlage bei 30°C (Hollingsworth et al., 2005) • kein Abbau von 100-1000 mg/L BT innerhalb von 18 Monaten Inkubation in Batchexperimenten mit Klärschlamm bei 37°C (Gruden et al., 2001) • Halbwertszeiten von 315 und 96 Tagen für 1 mg/L BT unter sulfatreduzierenden Bedingungen und für 1 mg/L 5-MBT unter nitratreduzierenden Bedingungen in Batchexperimenten mit Klärschlamm (Liu et al., 2011) 	++

<p>2-Ethylhexanoat</p>	<p>Aerob¹⁾</p> <ul style="list-style-type: none"> • Abbautests mit Klärschlamm <ul style="list-style-type: none"> ○ 60 % ThSB in 5 Tagen (getestete Konzentration: 3, 7 und 10 mg/L) ○ 100 % Gesamt-SB in 3 Tagen (Konzentration nicht angegeben) ○ >95 % CSB in 5 Tagen (Konzentration nicht angegeben) ○ 39 % Abbau in 28 Tagen (Konzentration nicht angegeben) • Anaerob • Akkumulation von 2-Ethylhexanoat (2-EtH) als Produkt des mikrobiellen Abbaus von verschiedenen Weichmachern in Batchexperimenten mit <i>Rhodococcus rhodochrous</i> unter gärenden Bedingungen (Nalli et al., 2002) • >85% Abbau von 16 mM 2-EtH innerhalb von 180 Stunden Inkubation in Batchexperimenten mit Flusssediment; Bildung von Ethan- und Butansäuren als Zwischenprodukte des 2-EtH-Abbaus (Chua et al., 2001) • Vorkommen von 2-EtH in verschiedenen Umweltproben <ul style="list-style-type: none"> ○ 14,8 µg/l im Abfluss einer Kläranlage in Montreal (Barnabé et al., 2008) ○ 3,2 µg/l und 110 µg/kg im Wasser und Sediment vom St. Lawrence-Fluss in Kanada (Horn et al., 2004) ○ 6,7 µg/l im Schnee, 0,050 µg/l im Leitungswasser (Horn et al., 2004) 	<p>+</p>
<p>Decandicarboxylat</p>	<p>Aerob*</p> <ul style="list-style-type: none"> • 60-65 % Abbau von 15 mg/l Dodecandicarboxylat innerhalb von 240 Minuten Inkubation mit Raten von 110-140 µl O₂/St./mg Zellen (Trockengewicht) mittels β-Oxidation (Chapman & Duggleby, 1967) <p>Anaerob</p> <ul style="list-style-type: none"> • Abbau von 12 mM Decandicarboxylat zu Methan und Propionat in Batchexperimenten mit Anreicherungskulturen aus Umweltproben (Matthies & Schink, 1993) • Abbau von 20 mM Succinat* innerhalb von vier Wochen Inkubation in Batchexperimenten unter gärenden Bedingungen bei 28°C mit Bakterienisolat aus Umweltproben (Schink and Pfennig, 1982) 	<p>-</p>

<p style="text-align: center;">Benzoat</p>	<p>Aerob²⁾</p> <ul style="list-style-type: none"> • 84 % TSB in 10 Tagen im Batchexperiment mit nicht akklimatisiertem Klärschlamm • 99 % CSB in 5 Tagen im Batchexperiment mit akklimatisiertem Klärschlamm • 81-71 % Mineralisierung innerhalb von 12 Wochen in Batchexperimenten mit saurem/neutralen Lehmboden • 63 % Abbau innerhalb von 10 Wochen in Batchexperimenten I mit Parabraunboden • >98 % Abbau von 59 ng/l Benzoat innerhalb von 7 Tagen in Batchexperimenten mit oligotrophem / eutrophem Süßwasserproben • 0,85 Tage Halbwertszeit für 15-18 mg/L Benzoat in Batchexperimenten mit Süßwasserproben <p>Anaerob</p> <ul style="list-style-type: none"> • Bodenisolat <i>Moraxela</i> sp., Vollständiger Abbau von 5 mM Benzoat mit Nitrat als EA, innerhalb von 9 Stunden bei 30°C. (Williams and Evans, 1975) • 91 % Abbau zu CH₄ und CO₂ innerhalb von 18 Tagen in Batchexperimenten mit akklimatisierter Mischkultur²⁾ • Vollständiger Abbau von 0,3-0,5 mM Benzoat innerhalb von 3 Monaten von Methanogenen in Proben aus Klärschlamm, aquatischem Sediment und einem GW-Aquifer sowie sulfatreduzierenden Bakterien in Proben aus einem GW-Aquifer. Inkubationstemperatur war 37°C (Klärschlamm) und 37°C für alle anderen Proben (Gibson and Sufflita, 1986) • Vollständiger Abbau von 1 mM Benzoat unter eisenreduzierenden Bedingungen in Proben aus aquatischem Sediment bei 30°C. Der Abbau dauerte weniger als 30 Tage (Kazumi et al., 1995) • Weitere Referenzen s. Kapitel 6 	-
<p style="text-align: center;">Propylen-carbonat</p>	<p>Aerob²⁾ Abbautest mit Klärschlamm 88 % ges.CO₂ beim Abbau von 21 mg C/l innerhalb von 29 Tagen bei 25 °C 80 % Abbau innerhalb von 10 Tagen</p> <p>Anaerob k.D.</p>	k.A.
<p style="text-align: center;">Oleyalkohol</p>	<p>Aerob</p> <ul style="list-style-type: none"> • Abbau von 58 ng/L in 28 Tagen im Abbautest mit Klärschlamm (Wind et al., 2006) • Vollständiger Abbau als einzige Kohlenstoff-Quelle innerhalb von 10 Tagen im Batchexperiment mit <i>Pseudomonas</i>-Kultur bei 30°C (1) <p>Anaerob</p> <ul style="list-style-type: none"> • 88 % Abbau von 50 mg/L innerhalb von 84 Tagen im Batchexperiment mit Klärschlamm eingesetzt bei 35°C (Steber et al., 1995) • >80 % Abbau von Hexadecanol innerhalb von 4-8 Wochen in Batchexperimenten mit Klärschlamm (Nuck & Federle, 1996: zitiert in Fisk et al., 2009) 	-

<p style="text-align: center;">Methanol</p>	<p>Aerob²⁾</p> <ul style="list-style-type: none"> • 48 % ThSB^{d)} beim Abbau von 0,05 mg/L Methanol innerhalb von 5 Tagen im Batchexperiment mit Klärschlamm • 93 % und ThSB^{d)} innerhalb von 2 Tagen im Batchexperiment mit Belebtschlamm • 92 % TSB** beim Abbau von 30 mg/L Methanol innerhalb von 2 Wochen im Batchexperiment mit Belebtschlamm • Halbwertszeiten zwischen 1 und 3 Tagen im Batchexperiment mit sandigem Lehmboden <p>Anaerob</p> <ul style="list-style-type: none"> • 83-91 % Abbau innerhalb von 3 Tagen in Marines Sediment-Mikrokosmen²⁾ • 46 % Abbau innerhalb von 5 Tagen in Boden-und Sedimentproben²⁾ • 70 % Abbau von 20 mM Methanol zu CO₂ innerhalb von 76 Tagen Inkubation in Batchexperimenten mit sulfatreduzierendem Bakterium aus Klärschlamm (Braun and Stolp, 1985) 	-
<p style="text-align: center;">TPM</p>	<p>Aerob</p> <ul style="list-style-type: none"> • > 60 % Abbau innerhalb von 28 Tagen im Batchexperiment mit akklimatisiertem Klärschlamm (Matsue, 2000) • leicht biologisch abbaubar (Wu et al., 1996; OECD, 2003) <p>Anaerob: k.D.</p>	k.A.
<p style="text-align: center;">EO/PO Copolymer</p>	k.D.	k.A.
<p style="text-align: center;">Natrium-poly-carbonat</p>	k.D.	k.A.

Phosphonate*	<p>Aerob</p> <ul style="list-style-type: none"> • Abbau von 14 verschiedenen Phosphonaten, darunter Methylphosphonat (je 0,5 mM) einer maximalen spezifischen Wachstumsrate (h^{-1}) von 114 Stunden in Batchexperimenten mit acht Bakterienisolaten aus Bodenproben (Quinn et al., 1989) • 54-100 % Abbau von natürlich vorkommenden und umweltrelevanten xenobiotischen Phosphonaten (je 300 µg-Atome P/l) zu Methan und Phosphat innerhalb von sieben Tagen in Batchexperimenten mit Laborstämmen und Anreicherungskulturen aus verschiedenen Umweltproben (Boden, oligotrophe Süßwasserproben, Klärschlamm, Krankenhaus- und Wäschereiabwasser) (Schowanek and Verstraete, 1990) • 30 % Abbau von Methylphosphonat zu Methan innerhalb von sieben Stunden nach 72 Stunden Verzögerungsphase in Batchexperimenten mit verschiedenen <i>E. coli</i>-Stämmen (Matys et al., 2001) <p>Anaerob</p> <ul style="list-style-type: none"> • Abbau von 2-Aminoethylphosphonat, Phenylphosphonat; und Methylphosphonat (je 300 µg-Atome P/l) zu Methan und Phosphat in Batchexperimenten mit <i>Rhodobacter capsulatus</i>; keine Angaben von Abbauratenraten (Schowanek and Verstraete, 1989) • anaerober Abbau nachgewiesen in Batchexperimenten mit <i>E. coli</i>, Testbedingungen: siehe oben (Matys et al., 2001) 	-
--------------	--	---

TPM: Tripropylenglykoldimethylether, BSB: Biologischer Sauerstoffbedarf, CSB: Chemischer Sauerstoffbedarf, EA: Elektronenakzeptor, ges.CO₂: Gesamtkohlendioxid, GW: Grundwasser, k.A.: keine Aussage, k.D.: keine Daten, ThSB: Theoretischer Sauerstoffbedarf. *Daten beziehen sich auf potentielle Abbauprodukte von den untersuchten Phosphonaten. ¹HPVIS (2012), ²TOXNET (2012).

Tabelle 2-4: Akute aquatische Toxizität der mehrfach verwendeten Additive sowie Kategorisierung der Substanzen als potentiell problematisch (+) und nicht problematisch (-) für aquatische Organismen.

Substanz	Fisch	Daphnia	Bacteria	Wirkkonzentration überschritten *
	LC ₅₀ [mg/L]	LC ₅₀ bzw. EC ₅₀ [mg/L]	EC ₅₀ [mg/L]	
1H-Benzotriazol	65 ^{a)} (96 h)	100 ^{a)} (48 h)	41 ^{b)} 10 ^{**}	+
Tolyltriazol	38 ^{a)} (96 h)	100 ^{a)} (48 h)	7 ^{a)} (15 min)	+
2-Ethylhexansäure	150 ^{c)}	120 ^{c)}	43 ^{c)}	+
Decandicarbonsäure	1x10 ³ (96 h) ^{***}	600 (48 h) ^{***}	k.D.	+
Benzoessäure	240 (24 h) ^{d)} 260 (48 h) ^{d)} 180 (96 h) ^{d)}	500 (24 h) ^{d)}	9 (14 Tage) ^{d)}	+
Propylencarbonat	500 ^{e)}	>1x10 ³ (48h) ^{e)}	>10 ⁴ (17 h) ^{f)}	-
Tripropylenglykolmethylether	12x10 ^{3g)}	>10x10 ^{3g)}	k.D.	k.A.
Methanol	19x10 ³ (24h) ^{d)} 15x10 ³ (96h) ^{d)}	>10x10 ³ (24h) ^{d)}	8x10 ³ (4h) ^{d)}	-
Oleylalkohol	k.p.E. ¹⁾	k.p.E. ¹⁾	k.D.	k.A.
Natrium(trihydroxysilylpropyl)-methylphosphonat	k.p.E. ²⁾	k.p.E. ²⁾	k.D.	k.A.
Natriummethyl-Methylphosphonat	k.p.E. ²⁾	k.p.E. ²⁾	k.D.	k.A.
EO/PO Copolymer	k.p.E. ²⁾	k.p.E. ²⁾	k.D.	k.A.
Natriumpolycarbonat	k.p.E. ²⁾	k.p.E. ²⁾	k.D.	k.A.

k.D.: keine Daten, k.A.: keine Aussage, k.p.E.: keine prognostizierbare Effekte i) wegen geringer Wasserlöslichkeit der untersuchten Substanz oder ii) die prognostizierte Werte überschreiten 10x die entsprechende Wasserlöslichkeit. *Die berechnete Grundwasser-Konzentration je Substanz im Nahbereich der Erdwärmesonde im Falle einer Leckage ist höher als eine der jeweiligen Wirkkonzentrationen für aquatische Toxizität, **Hemmung der Nitrifikation (Puttanna et al., 1999); ***prognostizierte Wirkkonzentrationen mit EPI SuiteTM v4.10. a) Pillard et al. (2001), b) Hem et al. (2000), c) Horn et al. (2004), d) TOXNET (2012) e) HPVIS (2012), f) SDB Propylene carbonate, 2011, g) OECD (2003).

Tabelle 2-5: Vorläufige Klassifizierung der Additive aufgrund der Datenlage zur Mobilität, Persistenz und aquatischer Toxizität als Substanzen mit hohem und geringem Grundwassergefährdungspotenzial.

Substanz	Mobilität	Persistenz	Toxizität	Grundwasser-Gefährdungspotenzial
1H-Benzotriazol	+	+	+	hoch
Tolyltriazol	+	+	+	hoch
2-Ethylhexansäure	+	+	+	hoch
Decandicarbon-säure	+	-	+	hoch
Benzoessäure	+	-	+	hoch
Propylencarbonat	+	k.A.	-	k.A.
Tripopylenglykol-methylether	+	k.A.	k.A.	k.A.
Methanol	+	-	-	gering
Oleylalkohol	-	-	k.A.	gering
Natrium (trihydroxysylilpropyl) methylphosphonat	+	-	k.A.	k.A.
Natriummethyl-methylphosphonat	+	-	k.A.	k.A.
EO/PO Copolymer	+	k.A.	k.A.	k.A.
Natrium-polycarbonat	+	k.A.	k.A.	k.A.

+/- (Mobilität): mobil/nicht mobil; +/- (Persistenz): persistent/nicht persistent; +/- (Toxizität): problematisch/nicht problematisch für aquatische Organismen; k.A.: keine Aussage.

2.6 Literatur

- Arning, E., Kölling, M., Schulz, H.D., Panteleit, B., Reichling, J., 2006. Einfluss oberflächennaher Wärmegewinnung auf geochemische Prozesse im Grundwasserleiter. *Grundwasser* 11, 27–39.
- Barnabé, S., Beauchesne, I., Cooper, D.G., Nicell, J.A., 2008. Plasticizers and their degradation products in the process streams of a large urban physicochemical sewage treatment plant. *Water Res.* 42, 153–162.
- Bassetti, S., Rohner, E., Signorelli, S., 2006. Dokumentation von Schadensfällen bei Erdwärmesonden. Geowatt AG. Schlussbericht, 65 S.
- Braun, M., Stolp, H., 1985. Degradation of methanol by a sulfate reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* 142, 77–80.
- Brielmann, H., Lueders, T., Schreglmann, K., Ferraro, F., Avramov, M., Hammerl, V., Blum, P., Bayer, P., Griebler, C., 2011. Oberflächennahe Geothermie und ihre potenziellen Auswirkungen auf Grundwasserökosysteme. *Grundwasser* 16, 77–91.
- Callender, T., Davis, L.C., 2002. Nitrification inhibition using benzotriazoles. *JHSR* 4, (2) 1–(2) 16.
- Cancilla, D.A., Holtkamp, A., Fang, X., Matassa, L., 1997. Isolation and characterization of Microtox-active components from aircraft de-icing/anti-icing fluids. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 430–434.
- Chapman, P.J., Duggleby, R.G., 1967. Dicarboxylic acid catabolism by bacteria. *Biochem J.* 103, 7c–9c.
- Chua, H., Yu, P.H.F., Lo, W., Sin, S.N., 2001. The degradation of xenobiotic branched carboxylic acids in anaerobic sediment of the Pearl River in Southern China. *Sci. Total Environ.* 266, 221–228.
- Cornell, J.S., Pillard, D.A., Hernandez, M.T., 2000. Comparative measures of the toxicity of component chemicals in aircraft deicing fluid. *Environ. Toxicol. Chem.* 19.

- Daughton, C., 1979. Biodegradation of phosphonate toxicants yields methane or ethane on cleavage of the CP bond. *Fems Microbiol. Lett.* 5, 91–93.
- Dwyer, D.F., Tiedje, J.M., 1983. Degradation of ethylene glycol and polyethylene glycols by methanogenic consortia.
- Eichler, B., Schink, B., 1985. Fermentation of primary alcohols and diols and pure culture of syntrophically alcohol-oxidizing anaerobes. *Arch. Microbiol.* 143, 60–66.
- EPI Suite™ v4.10. Estimation Programs Interface (EPI) Suite™. Environmental Protection Agency (EPA), USA.
- EUROSERVER, 2011. Heat Pump Barometer. *Systèmes Solaires* 205, 82-101.
- Fieser, L.F., Fieser, M., 1972. *Organische Chemie: mit 114 Tab.* Verl. Chemie, Weinheim / Bergstr.
- Fisk, P.R., Wildey, R.J., Girling, A.E., Sanderson, H., Belanger, S.E., Veenstra, G., Nielsen, A., Kasai, Y., Willing, A., Dyer, S.D., Stanton, K., 2009. Environmental properties of long chain alcohols. Part 1: Physicochemical, environmental fate and acute aquatic toxicity properties. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 980–995.
- Flathman, P.E., Jerger, D.E., Bottomley, L.S., 1989. Remediation of Contaminated Ground Water Using Biological Techniques. *Ground Water Monit. Remediat.* 9, 105–119.
- Gibson, S.A., Suflita, J.M., 1986. Extrapolation of biodegradation results to ground water aquifers: reductive dehalogenation of aromatic compounds.
- Griffioen, J., Appelo, C., 1993. Nature and extent of carbonate precipitation during aquifer thermal energy storage. *Appl. Geochem.* 8, 161–176.
- Gruden, C.L., Dow, S.M., Hernandez, M.T., 2001. Fate and toxicity of aircraft deicing fluid additives through anaerobic digestion. *Water Environ. Res. Res. Publ. Water Environ. Fed.* 73, 72–79.
- Hähnlein, S., Molina-Giraldo, N., Blum, P., Bayer, P., Grathwohl, P., 2010. Ausbreitung von Kältefahnen im Grundwasser bei Erdwärmesonden. *Grundwasser* 15, 123–133.

- Harris, C.A., Routledge, E.J., Schaffner, C., Brian, J.V., Giger, W., Sumpter, J.P., 2007. Benzotriazole is antiestrogenic in vitro but not in vivo. *Environ. Toxicol. Chem.* 26.
- Heesel, V., 2010. Biodegradation of Benzotriazoles (Masterthesis). Eberhard Karls Universität, Tübingen.
- Hem, L.J., Weideborg, M., Schram, E., 2000. Degradation and toxicity of additives to aircraft de-icing fluids; The effect of discharge of such fluids to municipal wastewater treatment plants. *Proc. Water Environ. Fed.* 2000, 419–433.
- HPVIS, 2012. High Production Volume Chemicals Information System. Environmental Protection Agency (EPA), USA. Im Internet publizierte Daten, Quelle: <http://www.epa.gov/hpvis/>.
- Hollingsworth, J., Sierra-Alvarez, R., Zhou, M., Ogden, K.L., Field, J.A., 2005. Anaerobic biodegradability and methanogenic toxicity of key constituents in copper chemical mechanical planarization effluents of the semiconductor industry. *Chemosphere* 59, 1219–1228.
- Horn, O., Nalli, S., Cooper, D., Nicell, J., 2004. Plasticizer metabolites in the environment. *Water Res.* 38, 3693–3698.
- Jia, Y., Bakken, L.R., Breedveld, G.D., Aagaard, P., Frostegård, Å., 2006. Organic compounds that reach subsoil may threaten groundwater quality; effect of benzotriazole on degradation kinetics and microbial community composition. *Soil Biol. Biochem.* 38, 2543–2556.
- Kaplan, D.L., Walsh, J.T., Kaplan, A.M., 1982. Gas chromatographic analysis of glycols to determine biodegradability. *Environ. Sci. Technol.* 16, 723–725.
- Kazumi, J., Haggblom, M.M., Young, Y., 1995. Degradation of Monochlorinated and Nonchlorinated Aromatic Compounds under Iron-Reducing Conditions.
- Kerstens, K., De Ley, J., 1963. The oxidation of glycols by acetic acid bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 71, 311–331.
- Klecka, G.M.C., Carpenter, C.L., Landenberger, B.D., 1993. Biodegradation of aircraft deicing fluids in soil at low temperatures. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 25, 280–295.

- Klotzbücher, T., Kappler, A., Straub, K.L., Haderlein, S.B., 2007. Biodegradability and groundwater pollutant potential of organic anti-freeze liquids used in borehole heat exchangers. *Geothermics* 36, 348–361.
- Leerdam, J.A. van, Hogenboom, A.C., Kooi, M.M.E. van der, Voogt, P. de, 2009. Determination of polar 1H-benzotriazoles and benzothiazoles in water by solid-phase extraction and liquid chromatography LTQ FT Orbitrap mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* 282, 99–107.
- Lehmann, R.G., Miller, J.R., Collins, H.P., 1998. Microbial Degradation of Dimethylsilanediol in Soil. *Water. Air. Soil Pollut.* 106, 111–122.
- Liu, Y.-S., Ying, G.-G., Shareef, A., Kookana, R.S., 2011. Biodegradation of three selected benzotriazoles under aerobic and anaerobic conditions. *Water Res.* 45, 5005–5014.
- Matsue, H., 2000. Ready Biodegradability Study of DPMA.
- Matthies, C., Schink, B., 1993. Anaerobic degradation of long-chain dicarboxylic acids by methanogenic enrichment cultures. *Fems Microbiol. Lett.* 111, 177–182.
- Matys, S.V., Laurinavichius, K.S., Krupyanko, V.I., Nesmeyanova, M.A., 2001. Optimization of degradation of methylphosphonate — analogue of toxic pollutants with direct C–P bond by *Escherichia coli*. *Process Biochem.* 36, 821–827.
- Mcgahey, C., Bouwer, E.J., 1992. Biodegradation of ethylene glycol in simulated subsurface environments.
- Mishra, S., 2011. Aerobic biodegradation of benzotriazoles and analysis of metabolites (Masterthesis). Eberhard Karls Universität, Tübingen.
- Möller, B., Oßmer, R., Howard, B.H., Gottschalk, G., Hippe, H., 1984. *Sporomusa*, a new genus of gram-negative anaerobic bacteria including *Sporomusa sphaeroides* spec. nov. and *Sporomusa ovata* spec. nov. *Arch. Microbiol.* 139, 388–396.
- Müller, E., Fahlbusch, K., Walther, R., Gottschalk, G., 1981. Formation of N,N-dimethylglycine, acetic acid, and butyric acid from betaine by *Eubacterium limosum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 439–445.

- Murata, K., Higaki, N., Kimura, A., 1988. Detection of carbon-phosphorus lyase activity in cell free extracts of enterobacter aerogenes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 190–195.
- Nalli, S., Cooper, D.G., Nicell, J.A., 2002. Biodegradation of plasticizers by *Rhodococcus rhodochrous*. *Biodegradation* 13, 343–352.
- Nuck, B.A., Federle, T.W., 1996. Batch Test for Assessing the Mineralization of 14 C-Radiolabeled Compounds under Realistic Anaerobic Conditions. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3597–3603.
- Obradors, N., Badia, J., Baldoma, L., Aguilar, J., 1988. Anaerobic Metabolism of the L-Rhamnose Fermentation Product 1,2-Propanediol in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 170, 2159–2162.
- OECD, 2003. SIDS Initial Assessment Report for 17th SIAM. Organization for Economic Cooperation and Development, USA.
- Ouattara, A.S., Cuzin, N., Traore, A.S., Garcia, J.L., 1992. Anaerobic degradation of 1,2-propanediol by a new *Desulfovibrio* strain and *D. alcoholovorans*. *Arch. Microbiol.* 158, 218–225.
- PHYSPROP, 2013. Physical Properties Database. Im Internet publizierte Daten, Quelle: <http://www.syrres.com>.
- Pillard, D.A., Cornell, J.S., DuFresne, D.L., Hernandez, M.T., 2001. Toxicity of Benzotriazole and Benzotriazole Derivatives to Three Aquatic Species. *Water Res.* 35, 557–560.
- Puttanna, K., Gowda, N.M.N., Rao, E.V.S.P., 1999. Effect of concentration, temperature, moisture, liming and organic matter on the efficacy of the nitrification inhibitors benzotriazole, o-nitrophenol, m-nitroaniline and dicyandiamide. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* 54, 251–257.
- Quinn, J.P., Peden, J.M.M., Dick, R.E., 1989. Carbon-phosphorus bond cleavage by Gram-positive and Gram-negative soil bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, 283–287.

- Rollinson, G., Callely, A.G., 1986. No evidence for the biodegradation of benzotriazole by elective culture or continuous enrichment. *Biotechnol. Lett.* 8, 303–304.
- Sabourin, C.L., Carpenter, J.C., Leib, T.K., Spivack, L., 1996. Biodegradation of Dimethylsilanediol in Soils.
- Sass, H., Cypionka, H., 2004. Isolation of sulfate-reducing bacteria from the terrestrial deep subsurface and description of *Desulfovibrio cavernae* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 541–548.
- Sass, H., Overmann, J., Rütters, H., Babenzien, H.-D., Cypionka, H., 2004. *Desulfosporomusa polytropha* gen. nov., sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium from sediments of an oligotrophic lake. *Arch. Microbiol.* 182, 204–211.
- Schink, B., Pfennig, N., 1982. *Propionigenium modestum* gen. nov. sp. nov. a new strictly anaerobic, nonsporing bacterium growing on succinate. *Arch. Microbiol.* 133, 209–216.
- Schink, B., Stieb, M., 1983. Fermentative degradation of polyethylene glycol by a strictly anaerobic, gram-negative, nonsporeforming bacterium, *Pelobacter venetianus* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1905–1913.
- Schippers, A., Reichling, J., 2006. Laboruntersuchungen zum Einfluss von Temperaturveränderungen auf die Mikrobiologie des Untergrundes. *Grundwasser* 11, 40–45.
- Schowaneck, D., Verstraete, W., 1990. Phosphonate utilization by bacterial cultures and enrichments from environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 895–903.
- SDB Propylene carbonate, 2011. Sicherheitsdatenblatt gemäß Verordnung (EG) Nr. 1272/2008. Acros Organics.
- SDB Sebacinsäure, 2013. Sicherheitsdatenblatt gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006. Merck.
- Sorensen, J.A., Gallagher, J.R., Hawthorne, S.B., Aulich, T.R., 2000. Final report (2000-EERC-10-04) for the Gas Industry Groundwater Research Program.

- Spahr, S., 2012. Specific Carbon and Nitrogen Isotope Analysis of Benzotriazoles (Masterthesis). Eberhard Karls Universität, Tübingen.
- Stadt Dortmund- Umweltamt, 2009. Erdwärmetechnik in Dortmund. Stadt Dortmund, Umweltamt.
- Staples, C.A., 2001. A review of the environmental fate and aquatic effects of a series of C4 and C8 oxoprocess chemicals. *Chemosphere* 45, 339–346.
- Stumm, W., 1996. Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters, 3rd ed. ed, Environmental science and technology. Wiley, New York.
- Ternan, N.G., Hamilton, J.T.G., Quinn, J.P., 2000. Initial in vitro characterisation of phosphonopyruvate hydrolase, a novel phosphate starvation-independent, carbon-phosphorus bond cleavage enzyme in *Burkholderia cepacia* Pal6. *Arch. Microbiol.* 173, 35–41.
- TOXNET, 2012. Toxicology Data Network. Im Internet publizierte Daten, Quelle: toxnet.nlm.nih.gov.
- Weiss, S., Reemtsma, T., 2005. Determination of Benzotriazole Corrosion Inhibitors from Aqueous Environmental Samples by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 77, 7415–7420.
- Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., 1998. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 6578–6583.
- Willetts, A., 1981. Bacterial metabolism of ethylene glycol. *Biochim. Biophys. Acta* 677, 194–199.
- Williams, R.J., Evans, W.C., 1975. The metabolism of benzoate by *Moraxella* species through anaerobic nitrate respiration. Evidence for a reductive pathway. *Biochem. J.* 148, 1–10.
- Wind, T., Stephenson, R.J., Eadsforth, C.V., Sherren, A., Toy, R., 2006. Determination of the fate of alcohol ethoxylate homologues in a laboratory continuous activated-sludge unit study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 42–60.

Wu, H., Crapo, K.C., Doi, J.D., 1996. Ultimate biochemical oxygen demand (BODU) test: PM; PM Acetate; PNP; DPNP; DPM Acetate; TPM.

3 Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol

3.1 Zusammenfassung

Der aerobe und anaerobe Abbau von Ethylenglykol (EG) wurde in Sedimenten aus zwei tiefen Aquiferen (Buntsandstein und Mergel) untersucht. Unter oxischen und nitratreduzierenden Bedingungen wurde EG innerhalb von 20 Tagen vollständig (vermutlich zu CO_2) abgebaut. In Versuchsansätzen mit Sediment Mergel und Fe (III) als Elektronenakzeptor, wurde EG innerhalb von 50 Tagen von gärenden Mikroorganismen zu Acetat umgesetzt. Anschließend konnten eisenreduzierende Mikroorganismen das gebildete Acetat vollständig (vermutlich zu CO_2) abbauen. Im Sediment Buntsandstein und Fe (III) als Elektronenakzeptor wurde dagegen mehr als 140 Tagen kein EG-Abbau beobachtet. In Ansätzen, denen Sulfat zugegeben wurde, spielte die mikrobielle Sulfatreduktion nur im Sediment Buntsandstein eine bedeutende Rolle für den EG-Abbau. Im Sediment Mergel fehlte meist sulfatreduzierende Aktivität, wobei EG, ähnlich wie in den Ansätzen mit Fe (III) zu Acetat vergärt wurde. In Versuchsansätzen ohne Zugabe von Elektronenakzeptoren wurde das Frostschutzmittel von gärenden Mikroorganismen via Acetaldehyd zu Acetat abgebaut. Ethanol fungierte als Zwischenprodukt und wurde weiter in Acetat transformiert. Des Weiteren zeigten Experimente bei Raumtemperatur, dass eine Temperaturerhöhung von 10°C keinen messbaren Einfluss auf den Abbau von Ethylenglykol hatte. Diese Experimente lieferten jedoch Hinweise auf eine Änderung der Stoffwechselaktivität von sulfatreduzierenden Mikroorganismen bei höheren Temperaturen.

Die Ergebnisse dieser Studie lieferten erste Erkenntnisse über den mikrobiellen Abbau von Ethylenglykol unter oxischen, nitrat- und sulfatreduzierenden Bedingungen in Sedimenten aus tiefen Aquiferen. Außerdem bestätigten die Ergebnisse die bedeutende Rolle der gärenden Abbauprozesse für die Eliminierung von EG unter bestimmten Bedingungen.

3.2 Einleitung

Ethylenglykol (EG) ist das am häufigsten eingesetzte Frostschutzmittel in Wärmeträgerflüssigkeiten für Erdwärmesonden (EWS). Leckagen der EWS können zum Austritt von EG in tiefe Grundwasseraquifere führen. Da sich das Frostschutzmittel aufgrund seiner hohen Wasserlöslichkeit und seines geringen Sorptionsvermögens schnell im Untergrund verbreiten kann, bestimmen zum Großteil mikrobielle Transformationen das Umweltverhalten von EG.

EG gilt unter oxischen und anoxischen Bedingungen als mikrobiell abbaubar. Aerobe Abbauuntersuchungen mit Reinkulturen zeigten, dass EG vollständig- ohne die Bildung und Akkumulation persistenter organischer Abbauprodukte- zu Kohlenstoffdioxid oxidiert werden kann (Child and Willetts, 1978; Kersters and De Ley, 1963; Willetts, 1981). Als Zwischenprodukte des aeroben EG-Abbaus wurden Glyoxalat, Glycolat und Pyruvat detektiert (Child and Willetts, 1978). Mehrere Studien bestätigten den aeroben Abbau des Frostschutzmittels auch in verschiedenen Umweltproben (Klärschlamm, Boden, Grundwasser; (Kaplan et al., 1982; Klecka et al., 1993; Mcgahey and Bower, 1992). Bis dato fehlen in der Literatur Erkenntnisse über die Bioabbaubarkeit von EG unter oxischen Bedingungen in tiefen Grundwasseraquiferen.

Unter Ausschluss von Sauerstoff wurde ebenfalls einen mikrobiellen Abbau von EG dokumentiert. Dabei wurde am häufigsten über einen Abbau durch Gärung sowohl mit Reinkulturen (Eichler and Schink, 1985; Gaston and Standtman, 1963; Toraya et al., 1979) als auch mit Anreicherungsmischkulturen aus Klärschlamm und Boden (Dwyer and Tiedje, 1983; Jaesche et al., 2006; Kaplan et al., 1982) berichtet. Als Abbauprodukte in diesen Experimenten wurden Acetat und Ethanol detektiert. Ein Abbau durch anaerobe Respiration wurde hauptsächlich unter Verwendung von Sulfat als Elektronenakzeptor schwerpunktmäßig untersucht (Ouattara et al., 1992; Qatibi et al., 1991), wobei ein großer Teil der untersuchten Mikroorganismen theoretisch auch Nitrat, Eisen (III) und Mangan (IV) als Elektronenakzeptor verwenden können (Sass and Cypionka, 2004; Sass et al., 2004). Weniger ist bekannt über den mikrobiellen Abbau von EG in anoxischen, tiefen Aquiferen, wo charakteristischerweise sehr oligotrophe

Bedingungen und Temperaturen zwischen 10 und 12°C herrschen. In ersten Abbauxperimenten mit Sedimentproben aus 80 m Tiefe wurde gezeigt, dass EG anaerob ohne die Freisetzung toxischer Abbauprodukte hauptsächlich zu Acetat umgesetzt werden konnte (Klotzbücher et al., 2007). Dabei wurde in geringen Mengen Ethanol als Abbauprodukt detektiert. Selbst in Versuchsansätzen, in welchen eine anaerobe mikrobielle Atmung durch die Zugabe von Ferrihydrit oder Sulfat als Elektronenakzeptor stimuliert werden sollte, spielte die Gärung beim Abbau von EG die dominierende Rolle.

In diesem Arbeitspaket wurden Mikrokosmenexperimente mit zwei verschiedenen Sedimenten aus 60 bzw. 70 m Tiefe unter oxischen sowie anoxischen Bedingungen durchgeführt. Zur Stimulation verschiedener mikrobieller Abbauprozesse unter anoxischen Bedingungen wurden Nitrat, Ferrihydrit oder Sulfat als Elektronenakzeptoren zugegeben. Parallele Experimente ohne Zugabe von Elektronenakzeptoren sollten zeigen, welche Rolle die Gärung beim anaeroben Abbau von EG spielt. Die Experimente wurden bei einer Temperatur von 12°C durchgeführt, die typisch für tiefe Grundwasseraquifere ist. Ferner wurde der Einfluss der Temperatur auf den EG-Abbau in Inkubationen bei Raumtemperatur (RT, 22°C) untersucht.

Die Experimente sollten wichtige Erkenntnisse liefern, welcher der untersuchten Abbauprozesse unter den definierten Bedingungen eine dominierende Rolle beim EG-Abbau spielt. Außerdem konnte aufgrund der großen Zahl systematischer Mikrokosmenexperimente in dieser Arbeit die Allgemeingültigkeit der vorab beschriebenen Prozesse (Klotzbücher et al., 2007) für tiefe Grundwasseraquifere überprüft werden.

3.3 Material und Methoden

3.3.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind im Anhang in Tab. A-1 aufgeführt.

3.3.2 Probenahme und Probenvorbereitung

Die Sedimentproben für die Abbauxperimente stammten aus einem Buntsandstein- (60 m Tiefe) und einem Mergel-Aquifer (70 m Tiefe) in Baden-Württemberg, Deutschland. Die Probenahmen wurden am 09.04.2010 in Karlsruhe-Durlach (Buntsandstein-Aquifer) und am 11.01.2012 in Wannweil, Landkreis Reutlingen (Mergel-Aquifer) während Bohrungen zur Installation von Erdwärmesonden durchgeführt. Beide Sedimente bestanden überwiegend aus Quarzsandstein und hatten eine rötliche Färbung, die durch Eisenoxide hervorgerufen wurde. Der pH-Wert des suspendierten Bodens lag bei 8. Der organische Kohlenstoffgehalt wurde mittels TOC-Analytik (Details siehe S. 60) gemessen und lag unter der Nachweisgrenze von 0,1 Gew. %. Das Bohrmaterial wurde mit Druckluft und Wasser (Buntsandstein) bzw. nur mit Druckluft (Mergel) aus dem Bohrloch über einen Schlauch in einen Container gespült. Das Sedimentmaterial wurde mit Hilfe eines sterilen Gefäßes am Ende des Schlauches aufgefangen. Die Feinfraktion wurde anschließend in sterile Glasgefäße überfüllt, luftdicht verschlossen und gekühlt transportiert. Im Labor wurde nach Absetzen der Partikel (über Nacht bei 4°C) der Wasserüberstand abgeschüttet und die Proben bis zum Ansetzen der Mikrokosmenexperimente unter Luftabschluss bei 4°C aufbewahrt.

3.3.3 Kulturmedien und verwendete Stammlösungen

Medium für aerobe Mikroorganismen

Die Zusammensetzung des Mediums (M9) und der Spurenelementlösung können den Tabellen A-2 bis A-4 im Anhang entnommen werden. Nach dem Autoklavieren (121°C für 20 Min bei 2 Bar Druck) und Abkühlen des Mediums wurden pro Liter Medium 10 ml Spurenelementlösung (SL4) zugegeben. Der pH-Wert wurde vor dem Autoklavieren mit konzentrierter NaOH auf 7,2-7,4 eingestellt.

Medium für anaerobe Mikroorganismen

Die Zusammensetzung des Basismediums für anaerobe Mikroorganismen ist in Tab. A-5 aufgeführt (s. Anhang). Zur Stimulierung von nitrat- oder sulfatreduzierenden Bedingungen wurden zusätzlich 0,8 oder 1,02 g/l Natriumnitrat (Endkonzentration des Nitrats 10 oder 12 mM) oder 2,46 g/l Magnesiumsulfat-Heptahydrat (Endkonzentration des Sulfats 10 mM) zugegeben. Das anoxische Medium wurde nach (Widdel, 1980) hergestellt. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen der Basislösung wurden unter N₂/CO₂-Atmosphäre (90:10, v/v) 30 ml einer 1 M NaHCO₃-Lösung (Endkonzentration im Medium 30 mM) sowie 1 ml 7-Vitamin-, 1 ml Selenit/Wolframat und 1 ml Spurenelementlösungen zugegeben. Die Zusammensetzungen aller verwendeten Lösungen sind den Tabellen A-6 bis A-8 im Anhand zu entnehmen. Die Medien für alle anaerobe Abbauexperimente (Ausnahme: Versuchsansätze mit Nitrat) mit Sediment Buntsandstein wurden mit 0,5 M Natriumsulfid-Lösung (Endkonzentration 1 mM) reduziert. In den Versuchsansätzen mit Sediment Mergel wurde 1 M Fe(II)-Chlorid-Lösung (Endkonzentration 2 mM) als Reduktionsmittel des Mediums für eisenreduzierende Mikroorganismen eingesetzt. Der pH-Wert wurde mit steriler 1 M HCl-Lösung auf 7,2 eingestellt.

Stammlösungen

Die 1 M Ferrihydrit-, 1 M EG-, 0,5 mM Natriumsulfid- und 1 M Fe(II)-Chlorid- Lösungen wurden anoxisch hergestellt und sterilisiert.

3.3.4 Mikrokosmenexperimente

Alle anaeroben Abbauexperimente wurden in 100 ml Serumflaschen angesetzt. Zuerst wurden jeweils 6 g Sedimentprobe in einem sterilen Glove-Bag (Aldrich® AtmosBag, 50 L, Sigma-Aldrich, Steinbach, Deutschland) anoxisch unter N₂/CO₂-Atmosphäre abgewogen, in sterile Serumflaschen überführt und gasdicht mit sterilen Butylgummistopfen verschlossen. In einem weiteren Schritt wurden jeweils 60 ml-Aliquote des anoxischen Mediums nach der Widdel-Technik in die Serumflaschen überführt. In den Versuchsansätzen zum mikrobiellen EG-Abbau wurden danach 0,3 ml

1 M EG-Lösung (Endkonzentration 5 mM) aseptisch und anoxisch zugegeben. Zur Stimulierung eisenreduzierender Bedingungen wurde 1 M Fe (III)-Lösung zu einer Endkonzentration von 10 mM (Buntsandstein-Ansätze) und 50 mM (Mergel-Ansätze) aseptisch und anoxisch zugegeben. Nach Zugabe der Lösungen wurde der Gasraum der Serumflaschen mit steril filtrierter N₂/CO₂-Gas Mischung (90:10 vol/vol) ausgetauscht. Alle Serumflaschen wurden gasdicht verschlossen und bei 12°C oder Raumtemperatur (RT, 22°C) inkubiert.

Die aeroben Abbauxperimente wurden in 100 ml Erlenmeyerkolben durchgeführt. Alle Versuchsvorbereitungen fanden unter Luftatmosphäre statt. Das sterile oxische Medium (60 ml) wurde in die Kolben mit vorgelegtem Sediment (6 g) überführt. Jeweils 0,3 ml 1 M EG-Lösung (Endkonzentration 5 mM) wurden aseptisch zugegeben. Die Glaskolben wurden mit sterilen Stopfen aus Baumwolle verschlossen und bei 12°C inkubiert. Bis zur ersten Probenahme (≈ 20 Stunden nach dem Ansetzen der Experimente) wurden die Versuchsansätze bei 4°C aufbewahrt.

3.3.5 Versuchsansätze

Die Experimente wurden unter Bedingungen durchgeführt, wie sie für tiefere Aquifere repräsentativ sind. Alle Versuchsansätze sind in Tab. 3-1 dargestellt. Für jede Redoxbedingung wurden zudem eine sterile Kontrolle und eine Parallele ohne Zugabe organischer Substrate vorbereitet. Die Sterilisierung erfolgte durch Autoklavieren des jeweiligen Ansatzes bei 121°C für 20 Min bei 2 Bar Druck.

Tabelle 3-1: Überblick zu den Versuchsansätzen zum mikrobiellen Abbau von 5 mM Ethylenglykol unter verschiedenen Redoxbedingungen sowie Experimente zum Einfluss der Temperatur auf den Ethylenglykolabbau.

Versuchsansätze zum mikrobiellen Abbau bei 12°C	
Sediment Buntsandstein (jeweils drei Parallelen)	Zugabe von 10 mM Nitrat oder Zugabe von 10 mM Ferrihydrit oder Zugabe von 10 mM Sulfat
Sediment Mergel (jeweils drei Parallelen)	Oxische Bedingungen Zugabe von 12 mM Nitrat oder Zugabe von 50 mM Ferrihydrit oder Zugabe von 10 mM Sulfat oder Keine Zugabe von EA (Stimulierung gärender Abbauprozesse)
Versuchsansätze zum Einfluss der Temperatur	
Sediment Buntsandstein*	Zugabe von 10 mM Nitrat: Inkubationstemperatur 12°C oder 22°C (jeweils Doppelansätze) Zugabe von 10 mM Sulfat: Inkubationstemperatur 12°C oder 22°C (jeweils drei parallele Ansätze)

EA: Elektronenakzeptor. *Inokulum war durch jeweils einen Vorexperiment an den untersuchten Bedingungen adaptiert.

3.3.6 Analyseverfahren

Hochleistungsflüssigchromatographie

EG, Ethanol, Acetaldehyd und Acetat wurden mit einem Hochleistungsflüssigchromatographen (HPLC, Shimadzu LC 10A-series, Kyoto, Japan) analysiert. EG, Ethanol und Acetaldehyd wurden mittels eines Brechungsindexdetektors (RI-Detektor) und Acetat mit einem UV-Detektor bestimmt. Die Auftrennung erfolgte über eine Aminex HPX-87 H-Säule (Bio-Rad; Länge: 300 mm; Durchmesser: 7,8 mm, Partikelgröße: 9 µM) bei einer konstanten Temperatur von 40°C. Die Elution erfolgte isokratisch mit 5 mM Schwefelsäure-Lösung (pH < 2). Dabei war die Flussrate 0,6 ml/Min. Die Bestimmungsgrenze für alle Substanzen betrug 0,25 mM. Zuvor wurden die Proben bei 14000 rpm für 10 Min zentrifugiert (Eppendorf 5417c Zentrifuge), um feste Partikeln und Mikroorganismen abzutrennen. Anschließend wurden je 0,5 ml klarer Überstand mit einer Transferpipette in 2 ml-HPLC-Gläschen überführt und mit einem Schraubdeckel mit Teflon-Septum verschlossen. Die Proben wurden am Tag der Probenahme gemessen oder bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt. Jede Probe wurde zweimal analysiert.

Ionenchromatographie

Die Bestimmung der Anionen Sulfat, Nitrat und Nitrit wurde mit einem Ionenchromatographen mit chemischer Suppression der Firma Metrohm (883 Basic IC plus, Filderstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Trennung erfolgte mit der Säule MetrosepA-Supp-4 (Länge: 250 mm, Durchmesser: 4 mm) bei Raumtemperatur. Als mobile Phase diente eine Pufferlösung aus 1 mM Na₂CO₃ und 4 mM NaHCO₃ (pH ≈ 7,5). Die Bestimmungsgrenzen betragen für Sulfat 0,1 mg/l und für Nitrat und Nitrit 0,05 mg/l. Vor der Analyse wurden die Proben zentrifugiert (siehe „Hochleistungsflüssigchromatographie“) und je 0,1 ml (Doppelbestimmung) des Überstandes in IC-Vials mit vorgelegtem Millipore-Wasser 20-fach verdünnt. Die Proben wurden bis zur Messung, die spätestens einen Tag nach Probenahme erfolgte, bei 4°C aufbewahrt.

Bestimmung von Fe (II) und Gesamteisen (Ferrozintest)

Fe (II) wurde quantitativ mit einer modifizierten Methode nach Stookey (1970) bestimmt. Die Messung beruht auf der photometrischen Bestimmung von Fe (II)-Ionen mittels Ferrozin (Dinatrium-4-[3-pyridin-2-yl-6-(4-sulfonatophenyl)-1, 2, 4-triazin-5-yl]benzoesulfonat). Der Farbstoff reagiert mit Fe (II) und führt zur Bildung eines lilafarbenen Komplexes. Zur Probenahme wurde 0,1 ml der Sedimentsuspension in ein mit 0,9 ml 1 M HCl-Lösung Eppendorf-Tube überführt. Nach einer einstündigen Inkubation der angesäuerten Proben zur Stabilisierung der Fe (II)-Ionen und vollständigen Auflösung der Fe (III)-Mineralien, wurde die Bestimmung des Fe (II)- und Gesamteisen-Gehaltes durchgeführt. Zwanzig Mikroliter der Lösung wurden in einer Mikrotiterplatte entweder mit vorgelegtem 80 µl 1 M HCl zum Quantifizieren der Fe (II)-Ionen oder 80 µl des Reduktionsmittels Hydroxylaminhydrochlorid (50 % w/v in 1 M HCl) zur Bestimmung des Gesamteisens versetzt. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Hundert Mikroliter der Ferrozin-Lösung wurden direkt (Bestimmung von Fe (II)) oder nach einer 30-minütigen Inkubation (Bestimmung von Gesamteisen) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Extinktion bei 562 nm mit einem FlashScan 550

Plattenleser (Jena Analytics, Jena, Deutschland) gemessen. Die Zusammensetzungen der Arbeitslösungen für den Ferrozintest sind in Tabelle A-9 aufgeführt.

Bestimmung von Methan mittels Gaschromatographie

Die Methan-Analyse erfolgte mittels eines Varian 3800-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor (FID). Der Gaschromatograph verfügte über eine Alltech-13939-Säule (Länge: 30 m, Innendurchmesser: 500 µm). Für die Analyse wurde das folgende Temperaturprogramm verwendet: 60°C für 3 min, Anstieg von 60 auf 200°C mit einem Gradienten von 75°C/min, abschließend 75°C für 3 min. Die Injektorstemperatur war 200°C. Der Säulenfluss (Stickstoff) betrug 5 ml/min.

TOC-Analytik: Bestimmung des organischen Kohlenstoffgehalts

Der TOC (total organic carbon)-Gehalt wurde mittels einem TOC-Gerät (Elementar Analysator vario EL, elementar Analysensysteme GmbH, Hanau, Deutschland), ausgestattet mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor, gemessen. Die Verbrennungstemperatur lag bei 950°C. Es wurden zwei parallele Proben (je 1 g) analysiert. Im ersten Schritt wurde der anorganische Kohlenstoff aus der Probe durch die Befeuchtung (mit 1 ml Millipore-Wasser) sowie die Entkalkung der Probe durch die Zugabe von 16%iger Salzsäure entfernt. Im zweiten Schritt wurde die Probe durch Abdekantieren des Überstandes und wiederholtem Spülen mit Millipore-Wasser neutralisiert. Nachdem ein pH-Wert von 5 erreicht wurde, wurde der Überstand vollständig abpipettiert und die Probe wurde im Trockenschrank (60°C) getrocknet. Nachdem die Probe vollständig getrocknet wurde, wurde der TOC-Gehalt mittels der Verbrennungsmethode gemessen.

3.4 Ergebnisse und Diskussion

In einer Reihe verschiedener Versuchsansätze wurde die Bioabbaubarkeit von 5 mM Ethylenglykol (EG) durch aerobe und anaerobe sowie gärende Abbauprozesse in zwei verschiedenen Sedimenten aus 60 (Buntsandstein) und 70 m Tiefe (Mergel) untersucht. Die anaerobe Atmung wurde durch die Zugabe von Nitrat, Ferrihydrit oder Sulfat als

Elektronenakzeptoren (EA) stimuliert. Zur Förderung der Aktivität gärender Mikroorganismen wurden Experimente ohne Zugabe von EA angesetzt. Begleitend für jedes Sediment und jede Redoxbedingung wurden eine Steril-Kontrolle und ein Experiment ohne Zugabe von organischen Substanzen (Blank-Kontrolle) angesetzt.

3.4.1 Aerober Abbau

Der aerobe Abbau von EG wurde mit Sediment Mergel untersucht. EG wurde innerhalb von 20 Tagen Inkubationszeit komplett abgebaut (Abb. 3-1). Mittels HPLC wurden keine organischen Abbauprodukte detektiert. Demzufolge wurde angenommen, dass EG vollständig zu CO_2 oxidiert wurde. Eine Änderung der EG-Konzentration wurde in der sterilen Kontrolle nicht beobachtet.

In dieser Studie wurde zum ersten Mal der aerobe Abbau von EG unter typisch für tiefe Aquifere Bedingungen demonstriert.

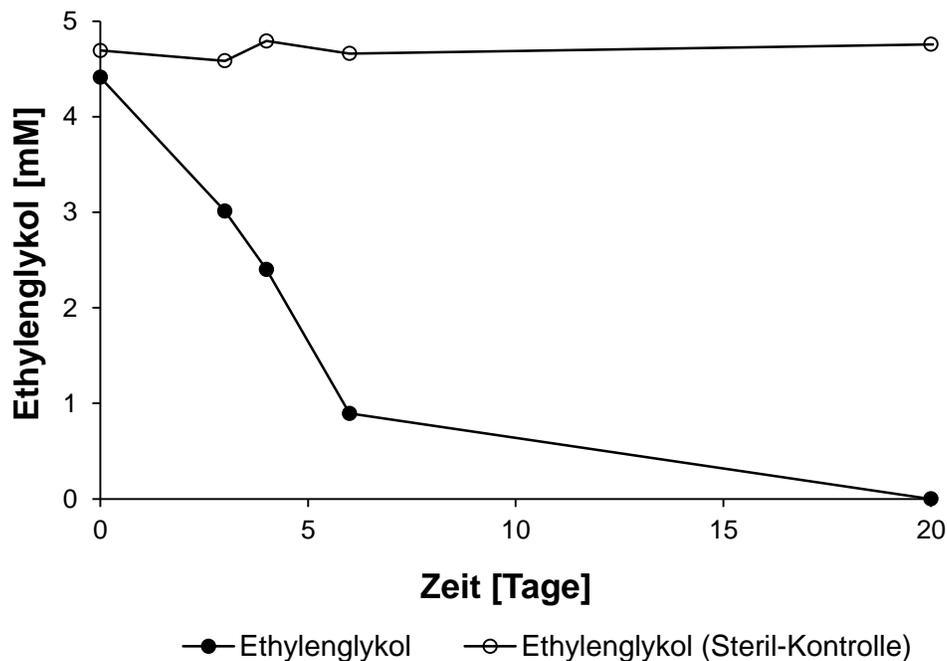


Abbildung 3-1: Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol unter oxidischen Bedingungen. Die Daten sind repräsentativ für drei parallele Ansätze.

3.4.2 Nitrat als Elektronenakzeptor

Der EG-Abbau mit Nitrat als EA wurde in den Sedimenten Buntsandstein oder Mergel untersucht. Die EG-Konzentration im sterilen Experiment änderte sich im Laufe der Inkubation nicht. Die Nitratkonzentration im Blank-Experiment blieb im Laufe der Inkubationszeit ebenfalls stabil, was eine Oxidation undefinierter organischer Substanz mit Nitrat als EA ausschloss. In den Versuchsansätzen mit Sediment Buntsandstein wurde EG innerhalb von 15 Tagen Inkubation komplett abgebaut (Daten nicht gezeigt). Keine organische Abbauprodukte wurden mittels HPLC detektiert, was auf eine vollständige Oxidation des Frostschutzmittels zu CO₂ hindeutete. Gleichzeitig nahm die Nitratkonzentration ab. Nitrit wurde innerhalb der Inkubationszeit (15 Tage) nicht detektiert. Die Stöchiometrie des EG-Abbaus (Tab. 3-2) wies auf eine vollständige EG-Oxidation gekoppelt an die Reduktion von Nitrat zu Stickstoff (N₂) hin, bei der 2 mM Nitrat für die Oxidation von 1 mM EG erforderlich sind:

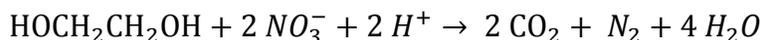


Tabelle 3-2: Stöchiometrie des Ethylenglykolabbaus gekoppelt an Nitratreduktion in Ansätzen mit Sediment Buntsandstein.

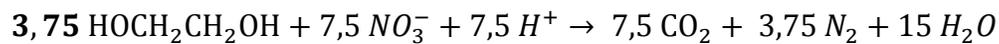
Ansätze	Nitrat (verbraucht) [mM]	Ethylenglykol (verbraucht) [mM]	Molares Verhältnis*
1	9,0	4,9	1,8
2	10,0	5,5	1,8
3	8,5	4,6	1,8

1-3: parallele Ansätze. *zeigt die molare Konzentration von Nitrat, die bei der Oxidation von 1 mM Ethylenglykol reduziert wurde.

Daten aus einem der Ansätze mit Sediment Mergel sind in Abb. 3-2 dargestellt. Nach einer Anpassungsphase von 5 Tagen wurde EG innerhalb von 12 Tagen Inkubation vollständig abgebaut. Gleichzeitig nahm die Nitratkonzentration ab. Zum Inkubationsende lagen zwischen 2 und 3 mM Nitrit vor.

Die Elektronenbilanz des EG-Abbaus gekoppelt an Nitratreduktion in den Ansätzen mit Sediment Mergel ist in Tab. 3-3 aufgeführt. Der Großteil des verwerteten Nitrats (6-7,5 mM) wurde vollständig (vermutlich zu N₂) reduziert. Da für die Mineralisierung von 1 mM EG zu CO₂ die Reduktion von 2 mM Nitrat zu N₂ erforderlich ist, reicht die vollständig

reduzierte Menge an Nitrat aus, um den größten Teil des zugesetzten EG (3-4 mM) zu CO₂ zu oxidieren:



Die Anwesenheit von Nitrit in den Proben zeigte, dass ein Teil des Nitrats (2 bis 3 mM) unvollständig (zu Nitrit) reduziert wurde. Für die Oxidation von 1 mM EG zu CO₂ sind stöchiometrisch 5 mM Nitrat zu Nitrit erforderlich. Ausgehend von diesem stöchiometrischen Verhältnis, wurde berechnet, dass die Reduktion von 3 mM Nitrat zu 3 mM Nitrit (die maximal gemessene Konzentration zum Inkubationsende) ausreichen würde, um 0,6 mM des zugesetzten EG zu CO₂ zu oxidieren.



Insgesamt wurde daher mehr als 85 % des zugesetzten EG gekoppelt an Nitratreduktion abgebaut.

Analog zu den Experimenten unter oxischen Bedingungen, wurde mit diesen Versuchsansätzen zum ersten Mal den mikrobiellen Abbau von EG unter nitratreduzierenden Bedingungen in Sedimenten aus tiefen oligotrophen Aquiferen dokumentiert.

Tabelle 3-3: Elektronenbilanz des Ethylenglykolabbaus gekoppelt an Nitratreduktion in Ansätzen mit Sediment Mergel.

Ansätze	1	2	3
(a) Nitrat (verbraucht) [mM]	9,8	9,6	9,6
(b) Nitrit (gebildet) [mM]	3,1	2,1	2,5
(c) Vollständig (zu N ₂) reduziertes Nitrat [mM]: (a)-(b)	6,7	7,5	7,1
(d) EG (verbraucht) [mM]	4,7	5,0	4,8
(e) Oxidiertes EG [mM] mit der Reduktion von Nitrat zu N ₂ : (c)/2*	3,4	3,8	3,6
(f) Oxidiertes EG [mM] mit der Reduktion von Nitrat zu Nitrit: (b)/5**	0,6	0,4	0,5
Oxidiertes EG (Gesamtmenge) [mM]: (e)+(f) (% des zugesetzten EG)	4,0 (85%)	4,2 (85%)	4,1 (88%)

EG: Ethylenglykol. *die stöchiometrische Menge an Nitrat (bei einer Nitratreduktion zu N₂) erforderlich für die Oxidation von 1 mM EG zu CO₂, **die stöchiometrische Menge an Nitrat (bei einer Nitratreduktion zu Nitrit) erforderlich für die Oxidation von 1 mM EG zu CO₂.

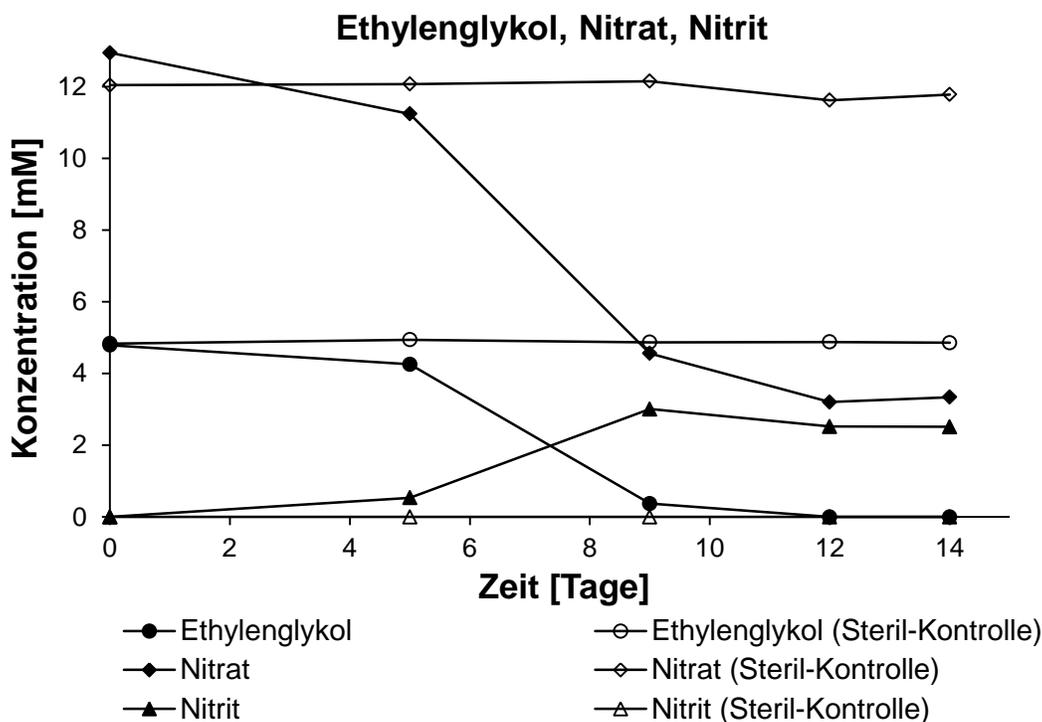
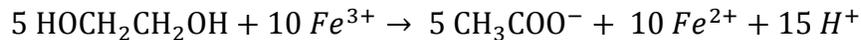


Abbildung 3-2: Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol gekoppelt an Nitratreduktion im Experiment mit Nitrat und Sediment Mergel. Die Daten sind repräsentativ für drei parallele Ansätze.

3.4.3 Ferrihydrit als Elektronenakzeptor

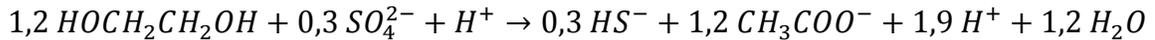
Der EG-Abbau wurde unter Zugabe von 10 (Buntsandstein-Ansätze) und 50 mM (Mergel-Ansätze) Ferrihydrit (Fe (III)) als EA untersucht. Keine Abnahme der EG-Konzentration wurde im sterilen Experiment beobachtet.

In den Ansätzen mit Sediment Buntsandstein fand innerhalb von 142 Tagen Inkubationszeit keine Abnahme der EG-Konzentration statt. Im Gegensatz dazu wurde in den Experimenten mit Sediment Mergel ein EG-Abbau beobachtet. Die Abnahme der EG-Konzentration wurde in allen parallelen Versuchsansätzen von einer Acetatbildung begleitet. Das Frostschutzmittel wurde innerhalb von 39 Tagen Inkubationszeit zu Acetat (3,5-4,2 mM) transformiert (Abb. 3-3 a). Die Acetatkonzentration entsprach einer Wiederfindung von 74-85 % des EG-Kohlenstoffs. Zum Ende des EG-Abbaus (Tag 39) wurden maximal 3 mM Fe (II) gebildet, was signifikant unter der theoretischen Menge Fe (II) (10 mM) lag, die bei der Oxidation von 5 mM EG zu Acetat entsteht:



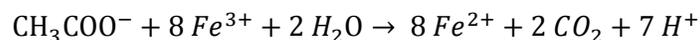
In der zweiten Phase des Experiments (Tag 39 bis 243) schloss ein kompletter Abbau des Acetats mit Fe (III) als EA an. Deshalb ist möglich, dass diese vergleichsweise kleinen Mengen an Fe (II) nicht bei der Oxidation von EG zu Acetat entstanden sind, sondern bei der anschließenden Oxidation des Acetats.

Aufgrund der Elektronenbilanz wurde deutlich, dass noch weitere Stoffwechselformen am EG-Abbau beteiligt waren. Am Anfang des Experiments war Sulfat in kleinen Mengen (0,3 mM) in der wässrigen Phase detektiert, das aus dem Sediment stammte und ebenfalls als potentieller EA für die Oxidation eines Teils des EG (1,2 mM) zu Acetat dienen könnte:



Andere Experimente dieser Studie, denen Sulfat zugegeben wurde, wiesen jedoch im Sediment Mergel eine konstante Sulfatkonzentration über den ganzen Inkubationsverlauf auf und legten nahe, dass Gärung der vorherrschende Prozess beim mikrobiellen EG-Abbau war. Demzufolge wäre auch in Gegenwart von Fe (III) eine Oxidation des EG zu Acetat durch die Aktivität gärender Mikroorganismen denkbar. Analog zu den Gärexperimenten bildete sich möglicherweise Ethanol als das reduzierte Produkt der Gärung, das direkt weiter abgebaut wurde. Mögliche Abbauewege von Ethanol sind im Unterkapitel 3.4.5 eingehend diskutiert.

Wie in Abb. 3-3 b zu sehen ist, fand ein weiterer Abbau des Acetats gekoppelt an die Reduktion von Fe (III) zu Fe (II) statt. Die Stöchiometrie des Acetatabbaus in den Experimenten mit Sediment Mergel zeigte (Tab. 3-4), dass bei der vollständigen Oxidation von 1 mM Acetat 8 mM Fe (II) gebildet wurden. Das entspricht der theoretischen Menge an Fe (II), die bei der Oxidation von 1 mM Acetat zu CO_2 entsteht:



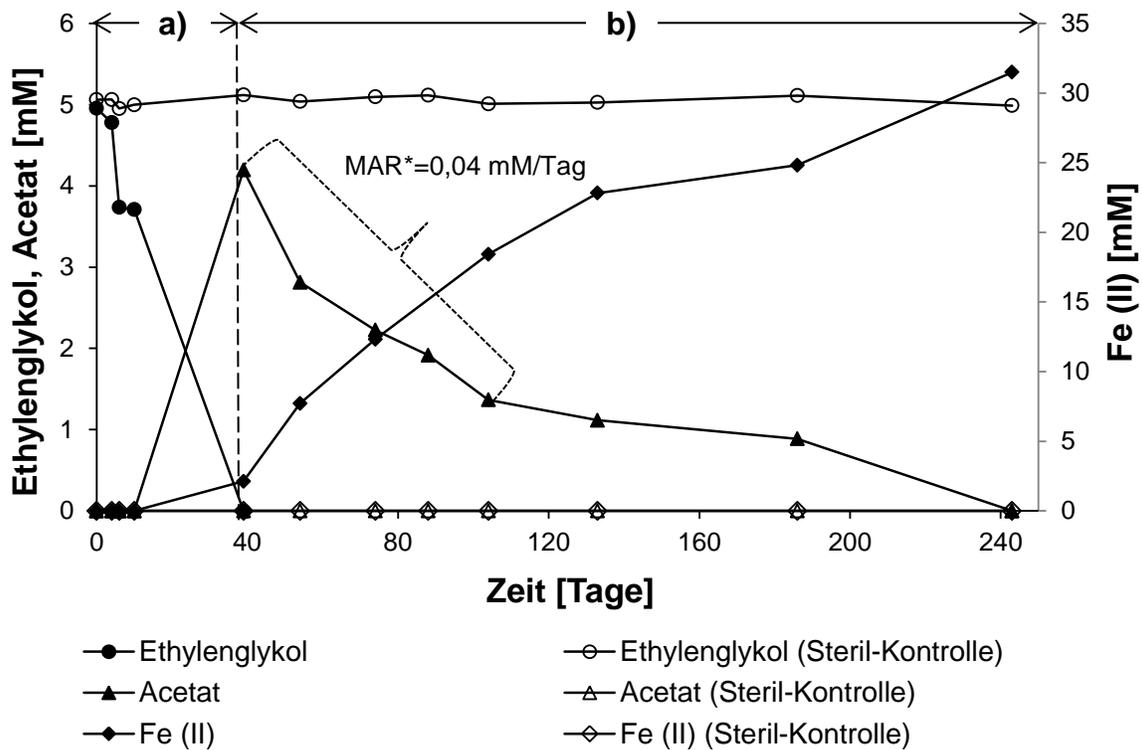


Abbildung 3-3: a) Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol zu Acetat im Experiment mit Fe (III), b) anschließende Oxidation des gebildeten Acetats bei gleichzeitiger Bildung von reduziertem Fe (II). Die Daten sind repräsentativ für drei parallele Ansätze. Die Strichlinie bei Tag 40 kennzeichnet den Übergang zwischen zwei unterschiedlichen Stoffwechseltypen, die am Ethylenglykol- bzw. Acetatabbau beteiligt waren. *Maximale Abbaurrate für Acetat (die Steigung des markierten Bereichs der Acetatkurve).

Tabelle 3-4: Stöchiometrie des mikrobiellen Abbau von Acetat zu CO₂ gekoppelt an die Reduktion von Fe (III) zu Fe (II).

Ansätze	Fe (II) [mM]	Acetat* [mM]	Molares Verhältnis** (Fe (II)/Acetat)
1	26	3,5	7,5
2	33	4,2	8,2
3	31	4,2	7,5

1-3: parallele Ansätze. *Die angegebene Acetatkonzentration wurde nach 39 Tagen Inkubation detektiert, **zeigt die molare Konzentration von Fe (II), die bei der Oxidation von 1 mM Acetat entstanden ist.

Die Elektronenbilanzen ergaben, dass trotz überschüssiger Mengen an Fe (III) im Medium, die Eisenreduktion keine- bzw. nur eine untergeordnete Rolle im ersten Schritt des anaeroben EG-Abbaus spielte. Die Ergebnisse stimmen diesbezüglich mit ähnlichen Experimenten von Klotzbücher et al. (2007) überein. Diese Arbeitsgruppe

(Klotzbücher et al., 2007) untersuchte den Abbau von 20 mM EG in Anwesenheit von 10 mM Fe (III) mit Sedimentproben aus 80 und 100 m Tiefe. EG war nach 70 Tagen Inkubation zu mehr als 80 % abgebaut, wobei < 3 mM reduziertes Fe (II) gebildet wurde. Als Hauptprodukt des EG-Abbaus bildete sich Acetat, wobei in einzelnen Versuchsansätzen in kleinen Mengen auch Propionat (< 3 mM) detektiert wurde. Die Autoren beobachteten keinen weiteren Abbau von Acetat durch Eisenreduktion, was nach ihrer Ansicht an der Abwesenheit eisenreduzierender Mikroorganismen in den untersuchten Sedimenten lag (Klotzbücher et al., 2007). Im Gegensatz dazu belegen die Ergebnisse dieser Studie, dass im untersuchten Sediment eisenreduzierende Mikroorganismen anwesend und aktiv waren, die das Fermentationsprodukt Acetat vollständig zu CO₂ abbauten. Da Acetat ein zentrales Intermediat des mikrobiellen Abbaus organischer Substanzen in vielen Sedimenten ist (Coates et al.; Lovley and Phillips, 1988), spielen acetatoxidierende eisenreduzierende Mikroorganismen (in eisenreichen Habitaten) eine wesentliche Rolle für die vollständige Mineralisierung organischer Substanzen (Coates et al., 1996; Lovley and Phillips, 1988; Lovley, 1991; Lovley et al., 1995). Zum ersten Mal wurde in der Studie von Lovley and Phillips (1988) eine vollständige Oxidation von Acetat zu CO₂ gekoppelt an Eisenreduktion demonstriert. Dabei wurden Bakterienisolaten aus einem aquatischen Sediment untersucht. In einer weiteren Studie beschrieben Lovley et al. (1990) eisenreduzierende Bakterien aus 20 bis 250 m tiefen Aquiferen, die in der Lage waren Acetat gekoppelt an Eisenreduktion zu mineralisieren.

Die Ergebnisse der aktuellen Studie demonstrierten zum ersten Mal den vollständigen Abbau des Frostschutzmittels (vermutlich zu CO₂) in Proben aus einem tiefen Sediment durch die gemeinsame Aktivität von zwei verschiedenen Stoffwechseltypen, gärende und eisenreduzierenden Mikroorganismen.

3.4.4 Sulfat als Elektronenakzeptor

Der mikrobielle Abbau von EG unter Zugabe von 10 mM Sulfat als EA wurde in Ansätzen mit Sedimenten Buntsandstein oder Mergel untersucht.

Das verwendete Inokulum des Sediments Buntsandstein war bereits durch ein Vorexperiment an den EG-Abbau unter den entsprechenden Bedingungen adaptiert. In

zwei der drei parallel angesetzten Mikrokosmen wurde mehr als 89 % des zugesetzten EG innerhalb von 195 Tagen abgebaut (Abb. 3-4 a). In den ersten 90 Tagen der Inkubation nahm die EG-Konzentration in diesen Ansätzen um 0,9 (17 %) und 1,5 mM (30 %) ab. Während der folgenden 106 Tage fand eine steile Abnahme der Konzentration des Frostschutzmittels statt. Danach kam der EG-Abbau zum Stillstand, wobei bis zum Inkubationsende (bei Tage 227) kein weiteres EG mehr abgebaut wurde. Im Gegensatz dazu erfolgte der EG-Abbau im dritten Mikrokosmos ohne lange Anpassungsphase (< 8 Tage), wobei 73 % des Frostschutzmittels nach 227 Tagen Inkubation abgebaut waren.

Der EG-Abbau erfolgte in allen Ansätzen gekoppelt an Sulfatreduktion. Pro Mol EG, das oxidiert wurde, wurden in allen Mikrokosmen 1,1 mM Sulfat reduziert (s. Tab. 3-5), was der stöchiometrischen Menge an Sulfat entsprach, die für die Mineralisierung von 1 mM EG erforderlich ist.

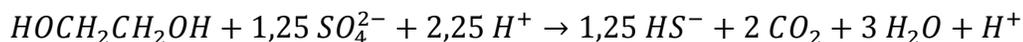


Tabelle 3-5: Stöchiometrie des Ethylenglykolabbaus gekoppelt an Sulfatreduktion in Ansätzen mit Sediment Buntsandstein.

Ansätze	Sulfat [mM]		Ethylenglykol [mM]		Molares Verhältnis** (Sulfat/Ethylenglykol)
	t ₀ *	Verbraucht	t ₀ *	verbraucht	
1	7,3	4,8	5,0	4,6	1,1
2	7,5	3,9	5,0	3,6	1,1
3	7,7	4,9	5,1	4,5	1,1

1-3: parallele Ansätze. *gemessene Konzentration am Inkubationsbeginn, **zeigt die molare Konzentration von Sulfat, die bei der Oxidation von 1 mM Ethylenglykol reduziert wurde.

Bisher wurde nur ein unvollständiger Abbau von EG unter sulfatreduzierenden Bedingungen beschrieben (Ouattara et al., 1992; Qatibi et al., 1991; Sass and Cypionka, 2004; Sass et al., 2004). Typischerweise war Acetat das Endprodukt des EG-Abbaus (Ouattara et al., 1992; Qatibi et al., 1991), wobei in einem Fall Glykolaldehyd als Endprodukt detektiert wurde (Ouattara et al., 1992). Interessanterweise wurde in der aktuellen Studie im Laufe der Inkubation die Bildung eines bisher unbekanntes Zwischenproduktes des EG-Abbaus in Form eines entstehenden Peaks mittels HPLC detektiert (Abb. 3-4 b). Die Retentionszeit dieses Peaks lag bei 12,4 min und war mit den Retentionszeiten der potentiellen Produkte, die mit dem EG-Abbau im Zusammenhang stehen, nicht identisch (Tab. 3-6).

Tabelle 3-6: Retentionszeiten bereits in der Literatur beschriebener Zwischen- und Endprodukte des Ethylenglykolabbaus unter gärenden oder sulfatreduzierenden Bedingungen.

Stoff	RT* [Min]	Literatur
Acetat ^{1,2}	16,0	(Eichler and Schink, 1984; Ouattara et al., 1992; Qatibi et al., 1991)
Ethanol ¹	21,7	(Dwyer and Tiedje, 1983; Toraya et al., 1979)
Acetaldehyd ¹	18,1	(Dwyer and Tiedje, 1983; Eichler and Schink, 1985)
Glykolaldehyd ²	12,2	(Ouattara et al., 1992)
Propionat ¹	9,0	Eichler and Schink, 1985; Schink, 1984a

¹gärende Bedingungen, ²sulfatreduzierende Bedingungen. *Die Auftrennung der Substanzen erfolgte über eine Aminex HPX-87 H-Säule bei konstanter Flussrate des Eluenten von 0,6 ml/min (5 mM Schwefelsäure-Lösung). Die Analyse der Substanzen erfolgte mittels Brechungsindexdetektor (s. Details in „Materialien und Methoden“).

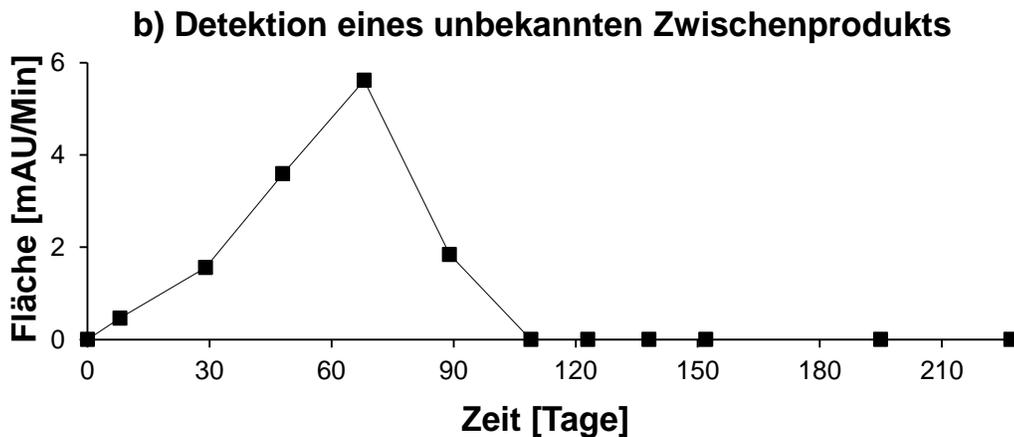
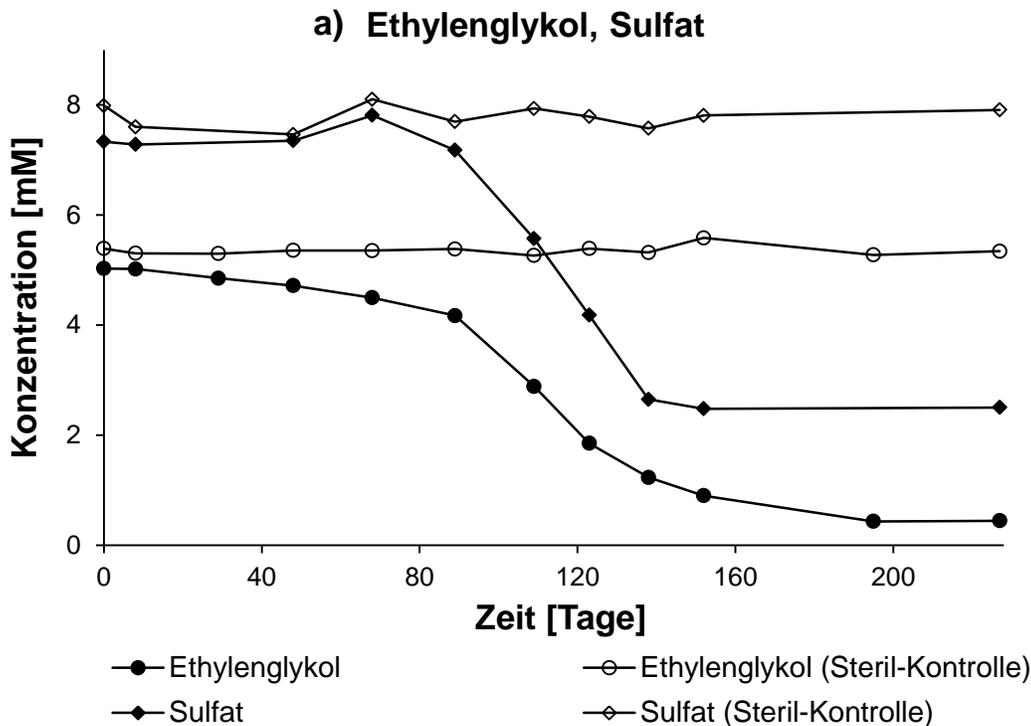


Abbildung 3-4: a) Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol gekoppelt an Sulfatreduktion im Experiment mit Sulfat und Sediment Buntsandstein, b) Bildung und Zunahme eines unbekanntes Zwischenprodukts zwischen Tag 29 und 109 der Inkubation. Die Kurven sind repräsentativ für zwei von drei parallelen Ansätzen.

Interessanterweise wurde eine Akkumulierung der unbekanntes Substanz in Mikrokosmen beobachtet, die bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Ergebnisse sind im Unterkapitel 3.4.5 präsentiert und eingehend diskutiert. Die Identität des unbekanntes Intermediats konnte durch einen Vergleich der Retentionszeiten nicht

aufgeklärt werden. Jedoch konnten einige aus der Literatur bekannte Produkte des EG-Abbaus (s. Tab. 3-6), die im Rahmen dieser Studie analysiert wurden, mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden.

Anders verlief der EG-Abbau im Sediment Mergel. In einem der drei Parallelen wurde EG innerhalb von 64 Tagen Inkubationszeit zu 2 mM Acetat transformiert (Abb. 3-5). Die Acetat-Konzentration entsprach einer 40%igen Wiederfindung des zugeführten EG-Kohlenstoffs. Begleitend wurde eine Sulfatabnahme (um 3 mM) beobachtet. Die EG- und Sulfat-Konzentrationen blieben im sterilen Experiment konstant. Die Ergebnisse sind auf S. 72 eingehend diskutiert.

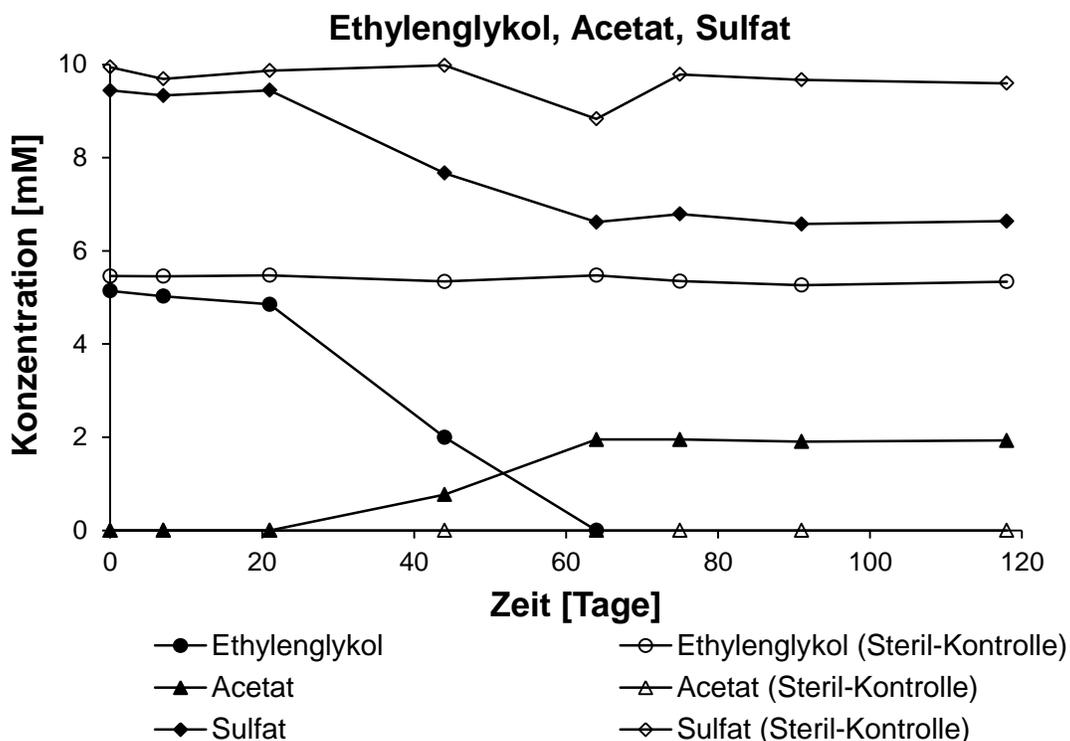


Abbildung 3-5: Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol zu Acetat sowie Sulfatabnahme in einem von drei parallelen Ansätzen mit Sediment Mergel und Sulfat.

Zwei der drei parallel angesetzten Mikrokosmen verhielten sich abweichend von oben beschriebenem Ansatz. Die Daten über den EG-Abbau in einem dieser zwei Mikrokosmen sind stellvertretend in Abb. 3-6 dargestellt. Das Frostschutzmittel wurde innerhalb von 44 Tagen Inkubationszeit komplett abgebaut. Ähnlich wie in den Mikrokosmen, denen kein EA zugegeben wurde, entstand ausschließlich Acetat als

Endprodukt der EG-Oxidation. Die Acetat-Konzentration stellte 87 bis 91 % des zugeführten EG-Kohlenstoffs dar (Tab. 3-7). Parallel zu Acetat bildete sich das Intermediat Ethanol. Spurenkonzentrationen von Acetaldehyd als Zwischenprodukt wurden in einem der zwei abweichenden Mikrokosmen detektiert. Im weiteren Verlauf der Inkubation verlief die Ethanolabnahme parallel zur Acetatbildung, was ein guter Hinweis auf eine mikrobielle Ethanoloxidation zu Acetat ist. Mögliche Abbauewege von Ethanol sind im Unterkapitel 3.4.5 detailliert diskutiert. Eine wesentliche Sulfatabnahme wurde in beiden Mikrokosmen (> 10 %) nicht registriert (Abb. 3-6). Die Ergebnisse deuteten auf eine Vergärung des Frostschutzmittels hin. Kein Acetatabbau wurde bis zum Inkubationsende (bei Tag 118) beobachtet. Als mögliche Erklärung dafür kommt eine Hemmung der Sulfatreduktion durch Sulfid in Betracht. Es wurden bereits acetatoxidierende sulfatreduzierende Bakterien beschrieben, die eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Sulfid besitzen (Maillacheruvu K.Y. and Parkin, 1996; Sass et al., 2004). So, konnten Sass et al. (2004) kein bakterielles Wachstum in Anwesenheit von > 3 mM Sulfid im Medium beobachten. In unserem Experiment ist anhand der reduzierten Menge an Sulfat eine Bildung von 3 mM Sulfid zu erwarten. Das Medium enthielt bereits 1 mM Sulfid als Reduktionsmittel. Es wurde jedoch erwartet, dass ein Großteil des Sulfids als Fe(II)S neutralisiert wurde (Bildung von schwarzen Ausfällungen in den Mikrokosmen, s. Bild 2). Deshalb ist sehr unwahrscheinlich, dass freies Sulfid im Medium blieb, das sich toxisch auf die sulfatreduzierende Mikroorganismen auswirkte.

Tabelle 3-7: Bilanzierung des Ethylenglykolabbaus in Ansätzen mit Sediment Mergel und Sulfat.

Ansätze	Sulfat* [mM]	Ethylenglykol* [mM]	Acetat** [mM]	C-Wiederfindung [%]
1	2,8	5,1	1,9	37
2	0	5,0	4,6	92
3	0,2	4,7	4,1	87

1-3: parallele Ansätze. *Verbraucht; **gebildet.

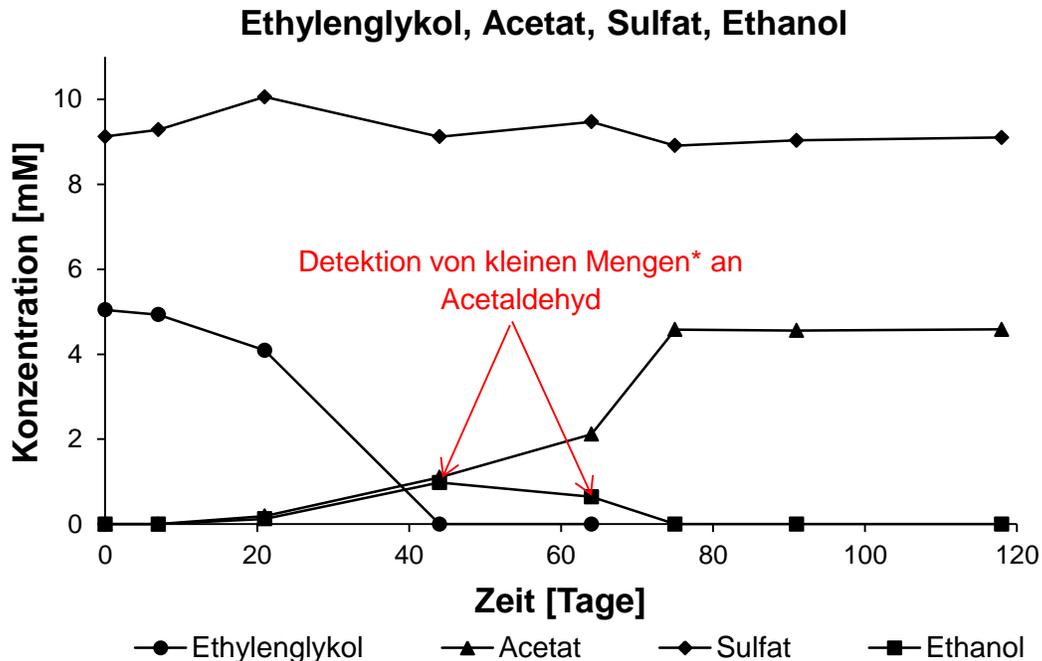
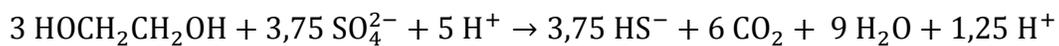


Abbildung 3-6: Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol zu Acetat im Experiment mit Sulfat und Sediment Mergel. Detektion von Ethanol und Acetaldehyd als Intermediate. Die Daten sind repräsentativ für zwei von drei parallelen Ansätzen. *Die Acetaldehyd-Konzentrationen liegen unter der Bestimmungsgrenze von 0,25 mM.

Im Folgenden wurden einige Erklärungsansätze über den EG-Abbau im einzigen Mikrokosmos mit der Sulfatabnahme diskutiert:

1) *Oxidation eines Teils des EG zu CO₂ gekoppelt an Sulfatreduktion*

Die Differenz aus der eingesetzten EG-Konzentration und dem am Inkubationsende vorliegenden Acetat wies auf einen vollständigen Abbau (vermutlich zu CO₂) von 3 mM EG hin. In diesem Fall musste angenommen werden, dass gärende und sulfatreduzierende Mikroorganismen für EG als Substrat konkurrierten, wobei etwa 2 mM des Frostschutzmittels zu Acetat vergärt wurden. Die Mineralisierung von 3 mM EG erfordert theoretisch die Reduktion von 3,8 mM Sulfat zu Sulfid (s. Gleichung unten). Im Mikrokosmos wurden jedoch 2,8 mM Sulfat verwertet. Ausgehend von der theoretischen Stöchiometrie könnten dann mehr als 2 mM EG (> 70 %) mit 2,8 mM Sulfat oxidiert werden.



Somit müssten andere potentielle EA im Sediment für die restlichen 30 % der EG-Oxidation verantwortlich sein. Sauerstoff kann aufgrund des reduzierten Mediums als potentieller EA ausgeschlossen werden. Die rötliche Färbung des Sediments am Anfang der Inkubation war ein Hinweis auf die Anwesenheit von Eisenoxiden. Eine EG-Oxidation mit Fe (III) als EA gilt allerdings als sehr unwahrscheinlich, da EG in weiteren Versuchsansätzen dieser Studie, denen Fe (III) zugegeben wurde, hauptsächlich vergärt wurde. Infolgedessen konnten etwa 30 % des EG-Abbaus mit dieser Hypothese nicht erklärt werden. Außerdem blieb die Frage offen, warum EG nicht komplett von sulfatreduzierenden Mikroorganismen abgebaut wurde.

Da in den zwei weiteren parallelen Ansätzen einen EG-Abbau durch Gärung stattfand, ist sehr wahrscheinlich, dass auch in diesem einzelnen Mikrokosmos Gärung der dominierende Prozess für die Transformation von EG war. Generell verläuft die EG-Vergärung via Acetaldehyd, das anschließend zu Acetat und Ethanol in äquimolaren Mengen transformiert wurde (Details auf S. 74). Basierend auf den Ergebnissen dieser beiden Ansätze wurde angenommen, dass auch im Ansatz mit der Sulfatreduktion, Ethanol das reduzierte Produkt der Gärung war. Daraus ergab sich die zweite Hypothese:

- 2) *Der erste Schritt des Abbaus von EG (5 mM) erfolgt fermentativ zu etwa 2,5 mM Acetat und etwa 2,5 mM Ethanol, zweiter Schritt ist der Abbau des Fermentationsprodukts Ethanol mit Sulfat*

Das potentiell gebildete Ethanol (2,5 mM) wurde möglicherweise durch Sulfatreduktion weiter abgebaut. Theoretisch ist für die vollständige Oxidation von Ethanol zu CO₂ die Reduktion von 1,5 mM Sulfat zu Sulfid erforderlich.



D.h. 1,9 mM oder 75 % des potentiell gebildeten Ethanols könnten theoretisch durch Sulfatreduktion (2,8 mM) im untersuchten Mikrokosmos erklärt werden.

Analog zu den zwei anderen parallelen Ansätzen müssten noch weitere Stoffwechselformen an der potentiellen Oxidation der restlichen 25 % des Ethanols beteiligt gewesen sein. Im Unterkapitel 3.4.5 folgt dazu eine eingehende Diskussion.

Dabei wurden ein fermentativer Ethanol-Abbau zu Acetat und Wasserstoff sowie eine anschließende Wasserstoff-Oxidation durch methanogenen Mikroorganismen in Betracht gezogen. Die Methan-Analyse zeigte Methan-Werte $< 2 \mu\text{M}$ (s. Tab. 3-8), was die Anwesenheit methanogener Mikroorganismen ausschließen kann. Eine Acetogenese wurde aufgrund der Acetatkonzentration zum Inkubationsende (weniger als 100 % des zugesetzten EG-Kohlenstoffs) nicht berücksichtigt. Weiterhin belegte die Schwarzfärbung des Sediments im Laufe der Inkubationszeit, dass Eisenreduktion stattgefunden hat. In Abb. 3-7 a und Abb. 3-7 b ist repräsentativ einer der Versuchsansätze zum Inkubationsbeginn bzw. nach 62 Tagen Inkubation dargestellt. Eine Schwarzfärbung des Sediments ist deutlich zu erkennen. Keine Schwarzfärbung des Sediments wurde in der Steril- (Abb. 3-7 c) sowie in der Blank-Kontrolle (kein Bild vorhanden) innerhalb einer Inkubationszeit von 63 Tagen beobachtet.

Tabelle 3-8: Methankonzentrationen nach Inkubationsende in Ansätzen mit Sediment Mergel und Sulfat.

Experiment	Methan [μM] am Inkubationsende*
1	< 2
2	< 2
3	< 2
Steril-Kontrolle	< 2
Blank-Kontrolle**	< 2

1-3: parallele Ansätze. *Tag 118, **Experiment ohne Zugabe von organischen Substraten.

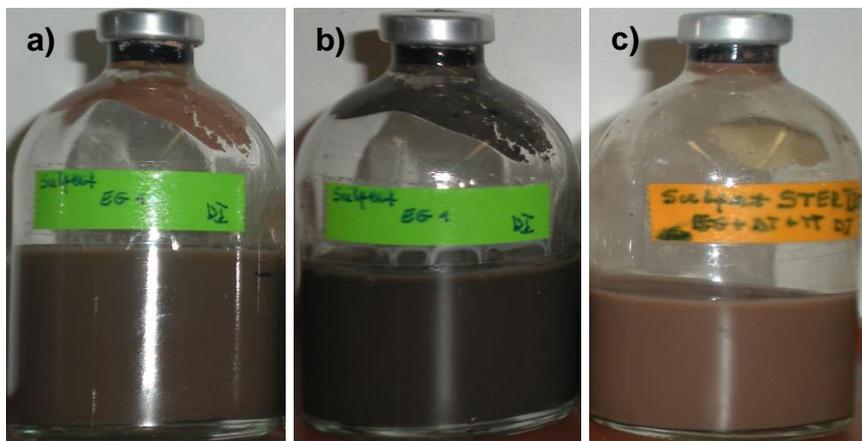


Abbildung 3-7: Versuchsansatz mit Sulfat als Elektronenakzeptor. a) Inkubationsbeginn, b) Tag 63 der Inkubation, c) keine Verdunklung des Sediments in der Steril-Kontrolle nach 63 Tagen Inkubationszeit.

Auffällig ist, dass in gleich behandelten parallelen Mikrokosmen die Sulfatreduktion unterschiedlich stark ausgeprägt war. Typischerweise herrschen in tiefen Grundwassersystemen oligotrophe Bedingungen. Trotz einer Zugabe von EG in relativ hohen Mengen, wie es in diesen Experimenten der Fall war, war die Aktivität sulfatreduzierender Mikroorganismen (SRM) schwach ausgeprägt oder gar nicht vorhanden. Vermutlich zeigten einige Vertreter der SRM unter den gewählten Bedingungen längere Anpassungszeiten als andere bevor sie aktiv werden. Die Unterschiede könnten in einer heterogenen Verteilung verschiedener Mikroorganismengruppen in den parallel angesetzten Mikrokosmen begründet sein. Allerdings handelte es sich beim Inokulum um eine sehr dickflüssige Sedimentsuspension.

Zusammenfassend konnte in beiden Sedimenten eine sulfatreduzierende Aktivität nachgewiesen werden. Im Sediment Mergel spielte die Sulfatreduktion nur eine untergeordnete Rolle, wobei am EG-Abbau hauptsächlich gärende Abbauprozesse beteiligt waren. Im Sediment Buntsandstein, wo ursprünglich keine gärende Mikroorganismen aktiv waren, war dagegen die Sulfatreduktion relevant für den EG-Abbau. Außerdem liegen in den Ansätzen mit Sediment Buntsandstein gute Hinweise auf eine Mineralisierung des EG gekoppelt an Sulfatreduktion vor. In der Literatur liegt derzeit noch keine Dokumentation eines vollständigen Abbaus von EG mit Sulfat als EA vor.

3.4.5 Gärende Bedingungen

Der fermentative EG-Abbau wurde in Versuchsansätzen mit Sediment Mergel ohne Zugabe von EA untersucht. In der sterilen Kontrolle blieb die EG-Konzentration im Laufe der Inkubationszeit (118 Tage) unverändert. Das zugesetzte EG wurde innerhalb von 42 Tagen Inkubationszeit zu Acetat transformiert (Abb. 3-7). Ethanol wurde einmalig (am Tag 20 der Inkubation) detektiert und bis zum Inkubationsende (118 Tage) nicht mehr beobachtet. Die mittlere molare Acetat-Konzentration (aus drei Parallelen), das am Ende der Inkubation gemessen wurde, entsprach 89 bis 95 % des ursprünglich zugeführten EG-Kohlenstoffs (Tab. 3-9).

Tabelle 3-9: Stöchiometrie des fermentativen Ethylenglykolabbaus in Ansätzen mit Sediment Mergel.

Ansätze	Ethylenglykol [mM] (t_0^*)	Acetat (gebildet) [mM]	Kohlenstoff-Wiederfindung [%]
1	5,1	4,8	95
2	5,1	4,6	91
3	5,2	4,6	89

1-3: parallele Ansätze. *Anfangskonzentration.

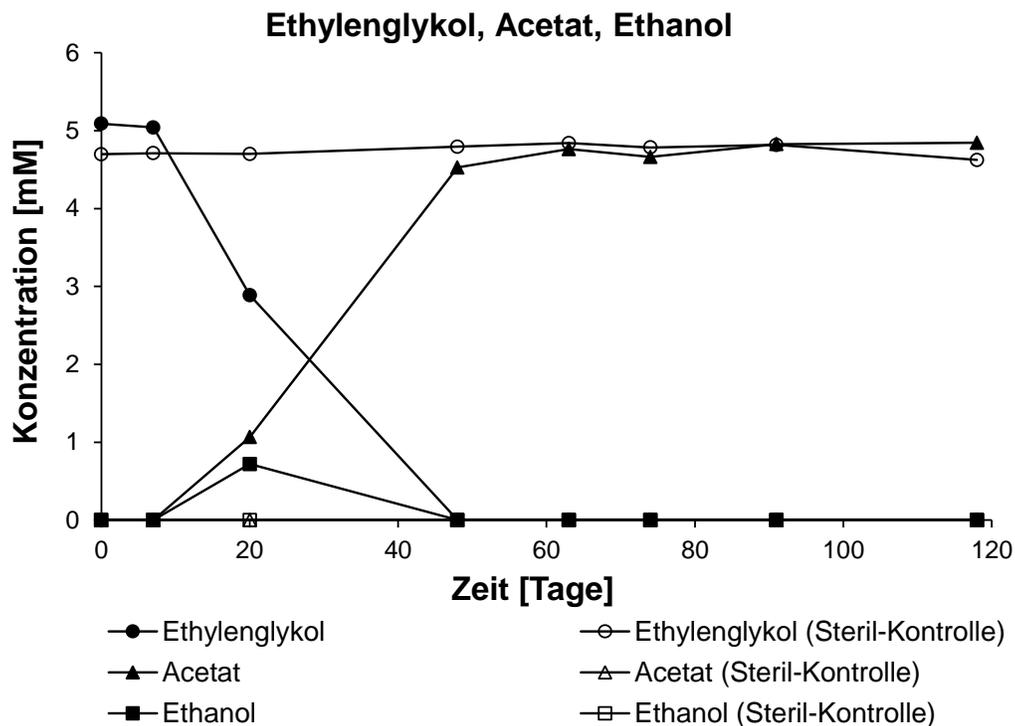


Abbildung 3-8: Fermentativer Ethylenglykolabbau zu Acetat sowie Bildung von Ethanol als Intermediat. Die Daten sind repräsentativ für drei parallele Ansätze.

In der Literatur ist der EG-Abbau durch Gärung (Fermentation) gut dokumentiert. Generell verläuft der fermentative EG-Abbau wie in Abb. 3-8 schematisch dargestellt via Acetaldehyd zu Acetat und Ethanol in äquimolaren Mengen als das oxidierte bzw. das reduzierte Produkt der Gärung (Abeles and Lee, 1961; Dwyer and Tiedje, 1983; Eichler and Schink, 1985; Gaston and Standtman, 1963; Toraya et al., 1979).

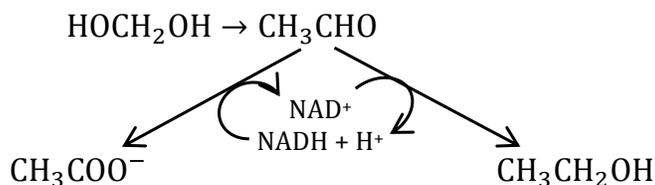


Abbildung 3-9: Schematische Darstellung des fermentativen Ethylenglykolabbaus via Acetaldehyd mit anschließender Disproportionierung des Acetaldehyds zu Acetat und Ethanol.

Zuerst erfolgt eine Transformation des EG-Moleküls zu Acetaldehyd. Danach folgt eine Disproportionierung des Moleküls von Acetaldehyd, bei der die Hälfte der Moleküle zu Acetat oxidiert wird (Elektronen werden freigesetzt) und die andere Hälfte als Akzeptor der freigesetzten Elektronen fungiert (Reduktion unter der Bildung von Ethanol). In einzelnen Studien wurde ausschließlich Acetat als Abbauprodukt detektiert (Balch et al., 1977; Eichler and Schink, 1984). Dabei werden die bei der Oxidation von Acetaldehyd freigesetzten Elektronen auf Protonen übertragen und molekularer Wasserstoff entsteht als reduziertes Produkt. Seltener wurden Acetat und Propionat als Produkte der EG-Vergärung beobachtet (Eichler and Schink, 1985; Schink, 1984).

Da in dieser Studie Ethanol parallel zu Acetat detektiert wurde, wird von einer Disproportionierung des Acetaldehyd-Moleküls ausgegangen. Das gebildete Ethanol wurde unmittelbar weiter abgebaut. Die mittlere C-Wiederfindung von 92% in Acetat (s. Tab. 3-9) legt eine Oxidation des entstandenen Ethanols zu Acetat nahe. Wie aus Tab. 3-10 zu entnehmen ist, war am Anfang des Experiments in der wässrigen Phase in kleinen Mengen Sulfat (0,3 mM) enthalten, das aus dem Sediment stammte. Eine geringe Sulfatabnahme wurde in allen Versuchsansätzen beobachtet. Die verfügbare Menge an Sulfat kann jedoch nur die Oxidation von 0,6 mM des theoretisch gebildeten Ethanols (2,5 mM) erklären. Für die Oxidation von 2,5 mM Ethanol zu Acetat sind stöchiometrisch 1,25 mM Sulfat erforderlich.

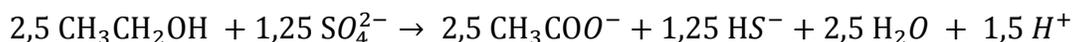
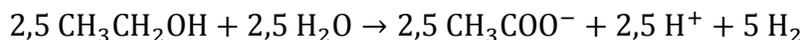


Tabelle 3-10: Sulfatkonzentration am Inkubationsanfang und -ende sowie Methankonzentration am Inkubationsende in Ansätzen ohne Zugabe von Elektronenakzeptoren.

Ansätze	Sulfat [mM]		Methan [μ M]
	t_0^*	t_e^{**}	t_e^*
1	0,3	0,05	< 2
2	0,3	0,05	< 2
3	0,3	0,05	< 2
Steril	0,3	0,3	< 2
Blank***	0,3	0,3	< 2

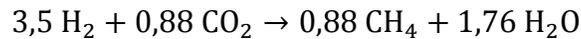
1-3: parallele Ansätze. t_0^* =Tag 0, t_e^{**} = Tag 118; ***Experiment ohne Zugabe von organischen Substraten.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass Ethanol syntroph von fermentierenden und wasserstoffzehrenden Mikroorganismen abgebaut wurde. Eine syntrophe Vergesellschaftung mit wasserstoffzehrenden Mikroorganismen ist notwendig, da die Wasserstoffbildung (infolge des Ethanolabbaus) aufgrund des tiefen Redoxpotentials des Redoxpaares H^+/H_2 (-0,418 V) unter Standardbedingungen endergonisch ist (Energie muss zugeführt werden). Gemäß Stöchiometrie werden bei der Oxidation von 2,5 mM Ethanol 5 mM H_2 gebildet:

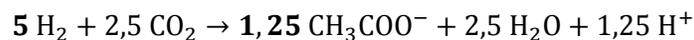
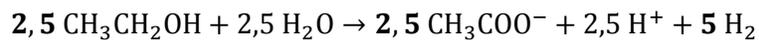
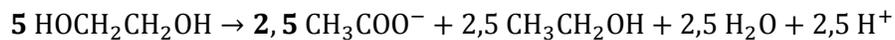


Wasserstoffoxidierende Mikroorganismen halten den Wasserstoffpartialdruck in der Umgebung gering und ermöglichen thermodynamisch die Oxidation von Ethanol zu Acetat (Bryant et al., 1967; Fuchs and Schlegel, 2007; Schink, 1984; Thauer et al., 1977). Die syntrophe Oxidation von Wasserstoff könnte von Sulfatreduzieren oder Methanogenen durchgeführt worden sein (Munk, 2009; Seitz et al., 1990) Die kleine Menge an Sulfat (ca. 0,3 mM), die ursprünglich im Mikrokosmos vorlag (s. Tab. 3-10), würde ausreichen 1,5 mM des bei der Vergärung von Ethanol gebildeten Wasserstoffs durch Sulfatreduktion zu oxidieren. Eine Nachlösung von Sulfat aus dem Sediment in die Lösung wäre theoretisch möglich, gilt jedoch als eher unwahrscheinlich, da in der Steril- sowie der Blank-Kontrolle keine messbare Erhöhung der Sulfatkonzentration festgestellt wurde. Da in der Lösung nicht genügend Sulfat vorlag, um die Oxidation von 5 mM H_2 zu erklären, müssen noch weitere Stoffwechseltypen an der Wasserstoffoxidation beteiligt gewesen sein. Eine Oxidation des restlichen H_2 (3,5 mM)

durch die Aktivität methanogener Mikroorganismen kann ausgeschlossen werden, da dies zu einer Bildung von 0,88 mM Methan geführt hätte:



Am Ende der Inkubation wurde Methan nur im Spurenbereich beobachtet (gemessene Methankonzentrationen in allen Versuchsansätzen, inkl. der sterilen Kontrolle lagen bei < 2 µM) (Tab. 3-10). Eine Reduktion von Kohlenstoffdioxid mit anschließender Bildung von Acetat (Acetogenese) kann auch ausgeschlossen werden, da am Inkubationsende weniger Acetat beobachtet wurde als die stöchiometrisch erwartete Gesamtmenge an Acetat, die aus den folgenden drei Oxidationsreaktionen entstehen würde (6,25 mM):



Diese Erkenntnisse wiesen darauf hin, dass im Sediment weitere potenzielle EA für die Mikroorganismen verfügbar waren. Das rotbraun gefärbte Sediment am Anfang der Inkubation ist ein Indiz dafür, dass ursprünglich Eisenoxide vorhanden waren. Die zunehmend dunklere Färbung des Sediments im Laufe der Inkubationszeit (Abb. 3 a und Abb. 3 b) wies auf die Bildung von Fe (II) hin (Bildung eines wasserunlöslichen schwarzen Präzipitats mit Sulfid (FeS)). Eine Schwarzfärbung des Sediments wurde in der Steril- sowie in der Blank-Kontrolle nach einer Inkubationszeit von 62 Tagen nicht beobachtet (Abb. 3-10 c). Vielleicht waren eisenreduzierende Mikroorganismen im Sediment vorhanden, die H₂ oxidierten (Coates et al., 1996; Lovley, 1991; Lovley et al., 1995). Eine direkte Oxidation des Ethanols durch eisenreduzierende Aktivität muss ebenfalls berücksichtigt werden (Lovley and Phillips, 1988; Lovley et al., 1995). Offen bleibt allerdings, warum Acetat nicht weiter gekoppelt an Eisenreduktion abgebaut wurde. Möglicherweise war nicht genügend Fe (III) verfügbar, um das gebildete Acetat weiter zu oxidieren.



Abbildung 3-10: Versuchsansatz ohne Zugabe von Elektronenakzeptoren. a) Inkubationsbeginn b) Tag 62 der Inkubation c) keine Verdunklung des Sediments in der Steril-Kontrolle sowie in der Blank-Kontrolle nach 62 Tagen Inkubationszeit.

Auch wenn im Rahmen dieser Studie nicht alle Fragen restlos geklärt werden konnten, bestätigten die Experimente dieses Unterkapitels, dass gärende Mikroorganismen eine wichtige Rolle für die Umsetzung des organischen Frostschutzmittels in Proben aus tiefen Aquifersedimenten spielten. Außerdem bestehen Hinweise darauf, dass im Inokulum ein gewisser Reichtum an verschiedenen metabolischen Typen vorhanden war, die sich am Abbau der Fermentationsprodukte Ethanol und/oder H_2 beteiligten.

3.4.6 Einfluss der Temperatur auf den Ethylenglykolabbau

Der Einfluss der Inkubationstemperatur auf den EG-Abbau wurde unter nitrat- und sulfatreduzierenden Bedingungen mit Sediment Buntsandstein untersucht. Es wurden Experimente bei 12°C sowie Raumtemperatur (RT, 22°C) inkubiert. Das verwendete Inokulum war bereits durch ein Vorexperiment an den EG-Abbau unter den entsprechenden Bedingungen bei 12°C adaptiert.

Sowohl unter sulfat- als auch unter nitratreduzierenden Bedingungen verlief der EG-Abbau bei 12°C und RT mit ähnlichen Abbauraten. In Ansätzen mit Nitrat als EA ergab sich eine maximale Abbaurate von durchschnittlich 1 mM EG/Tag und 1,2 mM EG/Tag bei 12°C bzw. RT. In Abb. A-1 (s. Anhang) ist der EG-Abbau im jeweils einen der zwei Parallelen bei 12°C und RT dargestellt. In allen Versuchsansätzen verlief der EG-Abbau nach der Stöchiometrie der vollständigen EG-Oxidation zu CO_2 gekoppelt an

Nitratreduktion zu N_2 . Die EG- sowie die Nitratkonzentrationen blieben in der sterilen Kontrolle innerhalb der Inkubationszeit unverändert.

In den Experimenten unter Zugabe von Sulfat als EA wurde EG sowohl bei 12°C als auch bei RT mit einer maximalen Rate von 0,05 mM EG/Tag (Mittelwert aus drei parallelen Ansätzen) abgebaut. Repräsentative Daten aus einem der Ansätze bei 12°C und RT sind in Abb. A-2 (s. Anhang), dargestellt. Wie schon im Unterkapitel 3.4.4 beschrieben, bildete sich bei 12°C ein Zwischenprodukt des EG-Abbaus, das im Rahmen der Studie nicht identifiziert werden konnte. Interessanterweise wurde EG im Gegensatz zu den 12°C-Inkubationen, in allen RT-Ansätzen nur unvollständig oxidiert. Das Abbauprodukt war mit dem unbekanntem Intermediat in den 12°C-Inkubationen identisch. Der Konzentrationsverlauf (gemessen an der Peakfläche) des Metabolits in den 12°C- und RT-Ansätzen ist in Abb. 3-9 a bzw. Abb. 3-9 b dargestellt. Die Konzentration des Abbauprodukts (gemessen an der Peakfläche) bei RT erhöhte sich kontinuierlich im Zuge des EG-Abbaus und akkumulierte bis zum Inkubationsende. Die Stöchiometrie des EG-Abbaus bei 12°C und RT unter sulfatreduzierenden Bedingungen ist in Tab. 3-11 gegenübergestellt. In den RT-Ansätzen wurde weniger Sulfat verbraucht als in den Inkubationen bei 12°C. Pro Mol oxidiertes EG wurde bei RT 0,6 mM Sulfat reduziert, was der Hälfte der stöchiometrischen Menge entsprach, die für die Oxidation von EG zu CO_2 erforderlich wäre. Keine Änderung der EG- sowie der Sulfatkonzentrationen innerhalb der Inkubationszeit wurde in der Steril-Kontrolle beobachtet. Im Blank-Experiment wurde ebenfalls keine Abnahme der Sulfatkonzentration beobachtet.

Tabelle 3-11: Stöchiometrie des Ethylenglykolabbaus unter sulfatreduzierenden Bedingungen bei 12°C und Raumtemperatur (RT).

Ansätze	Sulfat [mM] (verbraucht)		Ethylenglykol [mM] (verbraucht)		Molares Verhältnis (Sulfat/Ethylenglykol)	
	12°C	RT	12°C	RT	12°C	RT
1	4,8	3,2	4,6	5,0*	1	0,6
2	3,9	4,1	3,6	5,0*	1,1	0,8
3	4,9	2,9	4,5	5,1	1,1	0,6
Steril	<i>k.V.</i>	<i>k.V.</i>	<i>k.V.</i>	<i>k.V.</i>	<i>k.V.</i>	<i>k.V.</i>
Blank	<i>k.V.</i>	<i>k.V.</i>	-**	-**	-*	-**

1-3: parallele Ansätze. *k.V.*: kein Verbrauch. *Entspricht der zugesetzten Menge an Ethylenglykol zum Inkubationsbeginn, ** keine Zugabe von Ethylenglykol.

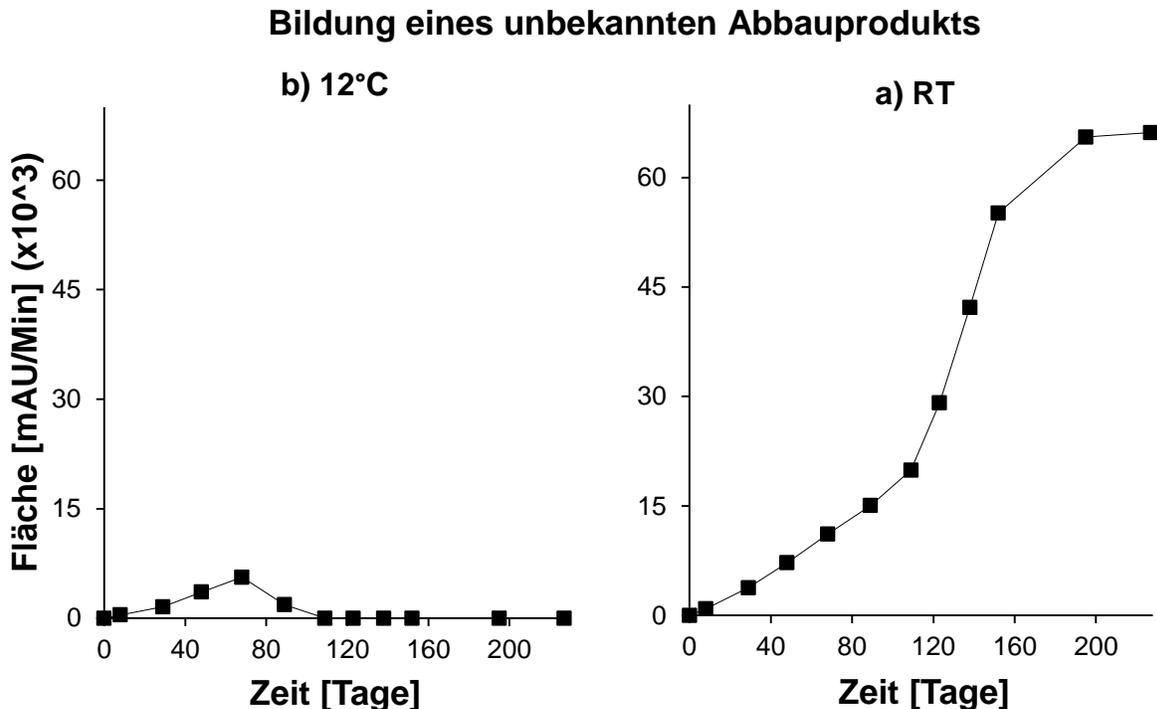


Abbildung 3-11: a) Bildung und weiterer Abbau eines unbekannten Zwischenprodukts des Ethylenglykolabbaus bei 12°C, b) Bildung und Akkumulierung desselben Intermediats bei Raumtemperatur (RT).

Mit steigender Temperatur erhöht sich generell die Geschwindigkeit aller enzymatischen Reaktionen in der Zelle, was zu einer schnelleren Umsetzung organischer Substrate bis zu einer für jeden Organismus typischen Optimumstemperatur führt (Madigan et al., 2006). Die Experimente dieser Studie ergaben jedoch, dass die erhöhte Inkubationstemperatur die mikrobielle Abbaurate unter den untersuchten Bedingungen nicht wesentlich beeinflusste. Es muss berücksichtigt werden, dass das verwendete Inokulum im jeweiligen Vorexperiment bei einer Temperatur von 12°C vorinkubiert wurde. Die Abbauraten unter sulfatreduzierenden Bedingungen mit dem adaptierten Inokulum waren vergleichbar zu den Abbauraten der ersten Vorläuferkultur (für Nitrat konnten keine Abbauraten der ersten Vorläuferkultur berechnet werden). Eine interessante Beobachtung aus diesen Experimenten ist, dass bei höheren Temperaturen eine Akkumulierung des unbekannten Peaks beobachtet wurde. Die Retentionszeit des unbekannten Peaks (12,4 min) lag bei den gleichen Messbedingungen sehr nah an der Retentionszeit von

Glykolaldehyd (12,2 min) (s. Paragraph 3.4.4). Glykolaldehyd wurde als Produkt des anaeroben EG-Abbaus unter sulfatreduzierenden Bedingungen in der Studie von Ouattara et al. (1992) dokumentiert. Angenommen beide Substanzen haben eine verwandte Struktur, so könnte näherungsweise die Fläche von 1 mM des unbekanntes Peaks mit der Fläche von 1 mM Glykolaldehyd grob abgeschätzt werden. So berechnet betrug die Konzentration des unbekanntes Abbauprodukts in den RT-Ansätzen zum Inkubationsende zwischen 3,8 und 4,2 mM. Angenommen die unbekanntes Substanz enthält zwei C-Atome, entspricht die berechnete Konzentration 75 bis 83 % des zugesetzten EG. Ausgehend davon ergibt sich aus der Analyse der Elektronenbilanz eine weitere interessante Erkenntnis. Für die Oxidation von 1 mM EG zum unbekanntes Abbauprodukt wurde 0,6 mM Sulfat verwendet, d.h. dass bei der Reaktion mehr als doppelt so viele Elektronen freigesetzt worden sind, als für die Oxidation von EG zu Acetat notwendig gewesen wären (0,25 mM Sulfat). So könnte der oben genannte Befund ein Hinweis darauf sein, dass dieses Abbauprodukt in einem oxidierteren Zustand vorlag als Acetat. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass ein Teil des EG vollständig zu CO₂ oxidiert wurde, was die höhere Anzahl an potentiell freigesetzten Elektronen erklären könnte. Dabei wäre der andere Teil des Frostschutzmittels nur teilweise zum unbekanntes Produkt abgebaut worden. Zur Aufklärung der Identität des unbekanntes Abbauprodukts bestünde allerdings ein Bedarf an weiteren Untersuchungen.

Bei Temperaturen von 10-12°C, die typisch für Grundwasseraquifere sind, wird das Wachstum von psychrophilen und psychrotoleranten Mikroorganismen stimuliert. Bei höheren Temperaturen (15-20°C) wird dagegen die Aktivität mesophiler Arten induziert (Briellmann et al., 2011) (Abb. 3-10). Überträgt man dieses Konzept auf die durchgeführten Mikrokosmenexperimente, würde eine Veränderung der Temperatur eine Änderung in der Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften bewirken. Hinweise darauf sind in einer Reihe von Studien zu finden (Arning et al., 2006; Noll et al., 2010). Im Falle der gegenwärtigen Studie waren möglicherweise bei 12°C und RT verschiedene Typen von Mikroorganismen am EG-Abbau beteiligt, deren Aktivität temperaturabhängig war. Demnach wäre EG also von unterschiedlichen Mikroorganismen abgebaut worden, was auch erklären könnte, dass im niedrigeren

Temperaturbereich EG mit Sulfat vollständig zu CO₂ oxidiert wurde, wohingegen bei höheren Temperaturen das Frostschutzmittel unvollständig umgesetzt wurde. Diese Hypothese zu belegen, fordert detaillierte Untersuchungen der mikrobiellen Gemeinschaften bei verschiedenen Temperaturen.

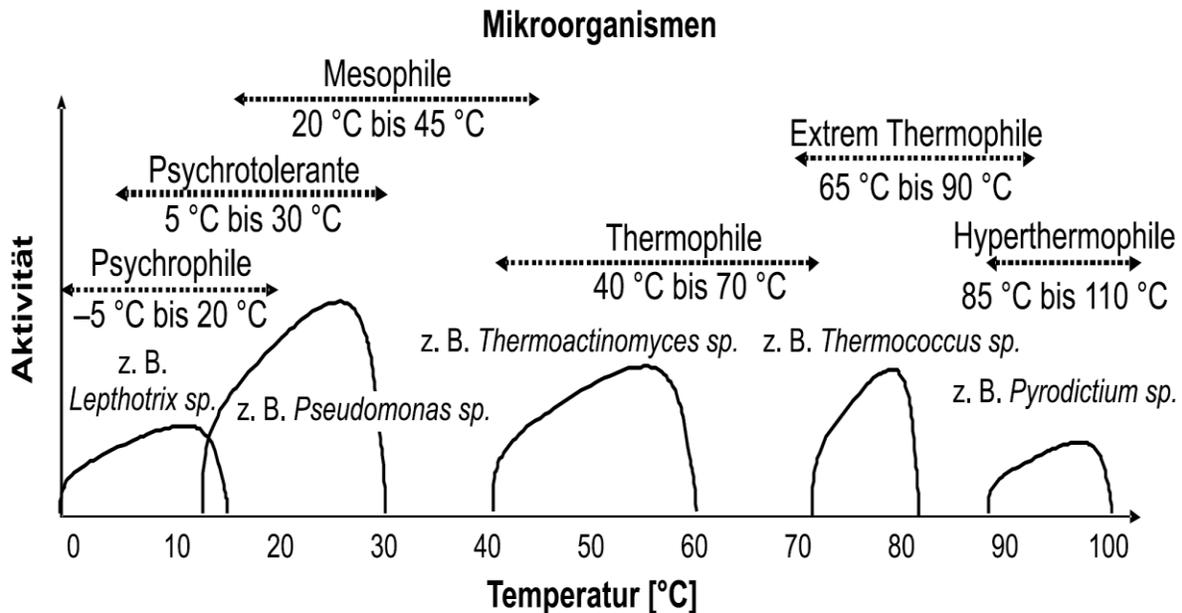


Abbildung 3-12: Anpassung unterschiedlicher Typen von Mikroorganismen an verschiedenen Temperaturbereichen (Brielmann et al., 2011).

3.4.7 Schlussfolgerungen

Aus den Ergebnissen konnten folgende Schlussfolgerungen bezogen auf tiefe Aquifere getroffen werden:

- 1) Eine Akkumulation von EG und organischen Abbauprodukten des EG-Abbaus wird in tiefen Aquiferen, wo aerobe oder nitratreduzierende Abbauprozesse vorliegen, nicht erwartet.
- 2) Sulfatreduzierende Abbauprozesse spielen eine zentrale Rolle für die Eliminierung des Frostschutzmittels unter anoxischen nitratfreien Bedingungen, wo gärende Mikroorganismen nicht vorhanden oder inaktiv sind.

- 3) In Anwesenheit von gärenden Mikroorganismen ist Gärung der dominierende Abbauprozess für die mikrobielle Umsetzung von EG- auch unter Bedingungen, wo alternative EA wie Sulfat oder Fe (III) im Überschuss vorliegen.
- 4) Infolge der Gärung bilden sich Acetaldehyd und Ethanol als Zwischenprodukte, die bei ungestörter mikrobieller Aktivität schnell weiter zu Acetat umgesetzt wurden.
- 5) Das Gärungsprodukt Acetat wird im reduzierten Milieu, wo Sulfat als EA fungiert, sehr wahrscheinlich über längere Zeiten im Untergrund persistieren.
- 6) Eisenreduzierende Mikroorganismen spielen eine zentrale Rolle für die Mineralisierung des Acetats.
- 7) Temperaturerhöhungen um etwa 10°C werden möglicherweise eine Änderung in der Stoffwechselaktivität sulfatreduzierender Populationen verursachen. Das wiederum könnte zur Akkumulierung organischer Zwischenprodukte des EG-Abbaus führen.
- 8) Die unterschiedlich ausgeprägten Stoffwechselformen in beiden Sedimenten widerspiegeln die Vielfalt der mikrobiellen Abbauprozesse in Abhängigkeit von den geologischen, hydrologischen oder geochemischen Spezifikationen des jeweiligen Standorts.

Die Ergebnisse dieser Studie bestätigten, wie wichtig mikrobielle Abbauprozesse für die Eliminierung des Frostschutzmittels aus tiefen Aquiferen sind. In den meisten Frostschutzformulierungen werden jedoch neben der Hauptkomponente weitere Zusatzstoffe eingesetzt. Da es sich zum Teil um umweltbedenkliche Chemikalien handelt, sind Kenntnisse über die Wirkung dieser Substanzen auf den EG-Abbau aus großer Wichtigkeit. In den nächsten zwei Kapiteln wurden der mikrobielle Abbau sowie der Einfluss ausgewählter Additive auf den EG-Abbau eingehend untersucht.

3.5 Literatur

- Abeles, R.H., Lee, H.A., Jr, 1961. An intramolecular oxidation-reduction requiring a cobamide coenzyme. *J. Biol. Chem.* 236, 2347–2350.
- Arning, E., Kölling, M., Schulz, H.D., Panteleit, B., Reichling, J., 2006. Einfluss oberflächennaher Wärmegewinnung auf geochemische Prozesse im Grundwasserleiter. *Grundwasser* 11, 27–39.
- Balch, W.E., Schoberth, S., Tanner, R., S., Wolfe, R.S., 1977. *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *Int J Syst Bacteriol* 27, 355–361.
- Brielmann, H., Lueders, T., Schreglmann, K., Ferraro, F., Avramov, M., Hammerl, V., Blum, P., Bayer, P., Griebler, C., 2011. Oberflächennahe Geothermie und ihre potenziellen Auswirkungen auf Grundwasserökosysteme. *Grundwasser* 16, 77–91.
- Bryant, M.P., Wolin, E.A., Wolin, M.J., Wolfe, R.S., 1967. *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. *Arch. Für Mikrobiol.* 59, 20–31.
- Child, J., Willetts, A., 1978. Microbial metabolism of aliphatic glycols. Bacterial metabolism of ethylene glycol. *Biochim. Biophys. Acta* 538, 316–327.
- Coates, J.D., Phillips, E.J., Lonergan, D.J., Jenter, H., Lovley, D.R., 1996. Isolation of *Geobacter* species from diverse sedimentary environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1531–1536.
- Dwyer, D.F., Tiedje, J.M., 1983. Degradation of ethylene glycol and polyethylene glycols by methanogenic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 46(1), 185–90.
- Eichler, B., Schink, B., 1984. Oxidation of primary aliphatic alcohols by *Acetobacterium carbinolicum* sp. nov., a homoacetogenic anaerobe. *Arch. Microbiol.* 140, 147–152.

- Eichler, B., Schink, B., 1985. Fermentation of primary alcohols and diols and pure culture of syntrophically alcohol-oxidizing anaerobes. *Arch. Microbiol.* 143, 60–66.
- Fuchs, G., Schlegel, H.G., 2007. *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme.
- Gaston, L.W., Standtman, E.R., 1963. Fermentation of ethylene glycol by *Clostridium glycolicum*, sp. n. *J. Bacteriol.* 85, 356–362.
- Jaesche, P., Totsche, K.U., Kögel-Knabner, I., 2006. Transport and anaerobic biodegradation of propylene glycol in gravel-rich soil materials. *J. Contam. Hydrol.* 85, 271–286.
- Kaplan, D.L., Walsh, J.T., Kaplan, A.M., 1982. Gas chromatographic analysis of glycols to determine biodegradability. *Environ. Sci. Technol.* 16, 723–725.
- Kerstens, K., De Ley, J., 1963. The oxidation of glycols by acetic acid bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 71, 311–331.
- Klecka, G.M.C., Carpenter, C.L., Landenberger, B.D., 1993. Biodegradation of aircraft deicing fluids in soil at low temperatures. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 25, 280–295.
- Klotzbücher, T., Kappler, A., Straub, K.L., Haderlein, S.B., 2007. Biodegradability and groundwater pollutant potential of organic anti-freeze liquids used in borehole heat exchangers. *Geothermics* 36, 348–361.
- Lovley, D.R., 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Microbiol. Rev.* 55, 259–287.
- Lovley, D.R., Chapelle, F.H., Phillips, E.J.P., 1990. Fe(III)-reducing bacteria in deeply buried sediments of the Atlantic Coastal Plain. *Geology* 18, 954.
- Lovley, D.R., Phillips, E.J., 1986. Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 683–689.
- Lovley, D.R., Phillips, E.J., 1988. Novel mode of microbial energy metabolism: organic carbon oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 1472–1480.

- Lovley, D.R., Phillips, E.J., Lonergan, D.J., Widman, P.K., 1995. Fe(III) and SO₄ reduction by *Pelobacter carbinolicus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2132–2138.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Brock, T.D., 2006. *Brock Mikrobiologie*. Pearson Studium, München [u.a.].
- Maillacheruvu K.Y., Parkin, G.F., 1996. Kinetics of Growth, Substrate Utilization and Sulfide Toxicity for Propionate, Acetate, and Hydrogen Utilizers in Anaerobic Systems. *Water Environ. Res.* 68, 1099–1106.
- Mcgahey, C., Bouwer, E.J., 1992. Biodegradation of ethylene glycol in simulated subsurface environments.
- Munk, K., 2009. *Zoologie*. Thieme, Stuttgart.
- Noll, M., Klose, M., Conrad, R., 2010. Effect of temperature change on the composition of the bacterial and archaeal community potentially involved in the turnover of acetate and propionate in methanogenic rice field soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 215–225.
- Ouattara, A.S., Cuzin, N., Traore, A.S., Garcia, J.L., 1992. Anaerobic degradation of 1,2-propanediol by a new *Desulfovibrio* strain and *D. alcoholovorans*. *Arch. Microbiol.* 158, 218–225.
- Qatibi, A.I., Nivière, V., Garcia, J.L., 1991. *Desulfovibrio alcoholovorans* sp. nov., a sulfate-reducing bacterium able to grow on glycerol, 1,2- and 1,3-propanediol. *Arch. Microbiol.* 155, 143–148.
- Sass, H., Cypionka, H., 2004. Isolation of sulfate-reducing bacteria from the terrestrial deep subsurface and description of *Desulfovibrio cavernae* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 27, 541–548.
- Sass, H., Overmann, J., Rütters, H., Babenzien, H.-D., Cypionka, H., 2004. *Desulfosporomusa polytropha* gen. nov., sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium from sediments of an oligotrophic lake. *Arch. Microbiol.* 182, 204–211.

- Schink, B., 1984. Fermentation of 2,3-butanediol by *Pelobacter carbinolicus* sp. nov. and *Pelobacter propionicus* sp. nov., and evidence for propionate formation from C2 compounds. *Arch. Microbiol.* 137, 33–41.
- Seitz, H.-J., Schink, B., Pfennig, N., Conrad, R., 1990. Energetics of syntrophic ethanol oxidation in defined chemostat cocultures. *Arch. Microbiol.* 155, 82–88.
- Stookey, L.L., 1970. Ferrozine—a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.* 42, 779–781.
- Thauer, R.K., Jungermann, K., Decker, K., 1977. Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria.
- Toraya, T., Honda, S., Fukui, S., 1979. Fermentation of 1,2-propanediol with 1,2-ethanediol by some genera of Enterobacteriaceae, involving coenzyme B12-dependent diol dehydratase. *J. Bacteriol.* 139, 39–47.
- Weber, K.A., Achenbach, L.A., Coates, J.D., 2006. Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 752–764.
- Widdel, F., 1980. Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten sulfat-reduzierender Bakterien. PhD thesis, University Göttingen, FRG.
- Willets, A., 1981. Bacterial metabolism of ethylene glycol. *Biochim. Biophys. Acta* 677, 194–199.

4 Mikrobieller Abbau von Benzotriazolen

4.1 Zusammenfassung

Der aerobe und anaerobe Abbau von Benzo- und Tolyltriazol (jeweils 50 µM) wurde mit 60 und 70 m tiefen Sedimenten (Buntsandstein und Mergel) aus zwei verschiedenen Grundwasseraquiferen bei 12°C untersucht. In Experimenten mit Sediment Buntsandstein persistierten beide Korrosionsinhibitoren unter nitrat-, sulfat- und eisenreduzierenden Bedingungen mehr als 300 Tage. Ein mikrobieller Abbau unter Zugabe von Nitrat und Sulfat als Elektronenakzeptor im Sediment Mergel wurde ebenfalls nicht festgestellt. Versuchsansätze mit Sediment Mergel ergaben jedoch eine teilweise Umsetzung von Benzo- bzw. von Benzo- und Tolyltriazol unter oxidischen und eisenreduzierenden Bedingungen. Die Transformationsraten waren gering und lagen bei etwa 30 % der Anfangskonzentration je Korrosionsinhibitor. Sowohl unter oxidischen als auch unter eisenreduzierenden Bedingungen wurde ein potentiell Transformationsprodukt der Benzotriazole detektiert. Ihre Identität konnte innerhalb dieser Studie nicht aufgeklärt werden. Des Weiteren zeigten Experimente mit der Reinkultur *Rhodococcus pyridinovorans*, dass BT in Anwesenheit des strukturähnlichen Korrosionsinhibitors Benzothiazol cometabolisch nicht abgebaut werden konnte.

Mit diesen Experimenten wurde das persistente Verhalten der Benzotriazole in Sedimenten aus zwei tiefen Aquiferen unter fünf verschiedenen Redoxbedingungen demonstriert und somit ihre Gefahr für Grundwassersysteme unterstrichen. Die Ergebnisse bestätigten außerdem die allgemeine Beständigkeit der Benzotriazole gegenüber mikrobiellem Abbau in Umweltproben.

4.2 Einleitung

In Wärmeträgerflüssigkeiten (WTF) für Erdwärmesonden werden sehr häufig die Korrosionsinhibitoren 1H-Benzotriazol (BT) und Tolyltriazol (TT) eingesetzt. Aufgrund

ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften wurden die zwei Chemikalien als potentiell problematisch für Grundwassersysteme eingestuft (Kapitel 2). Bei einer Leckage von Erdwärmesonden können Benzotriazole die tiefen Aquifere erreichen und die Grundwasserqualität erheblich beeinträchtigen. Es ist wichtig diese Substanzen experimentell unter umweltrelevanten Bedingungen eingehend zu untersuchen, um ein gründliches Wissen über ihr Grundwassergefährdungspotenzial zu erlangen.

Benzotriazole sind breit verbreitete Chemikalien, die hauptsächlich als Korrosionsinhibitoren in WTF, Kühlflüssigkeiten und Flugzeugenteisungsmitteln eingesetzt werden. BT findet ebenfalls Anwendung in Haushalten, wo es als Silberschutz in Geschirrspülmitteln enthalten ist, und in der Industrie in Schmiermitteln. Sie gelten als biologisch und chemisch (Hydrolyse) schwer abbaubar. Aufgrund ihres geringen Sorptionsvermögens an Bodenmaterial (Jia et al., 2007; Teich, 2011) ist eine hohe Mobilität und daher eine schnelle Verbreitung dieser Chemikalien im Grundwasser zu erwarten. Bekanntermaßen hemmen Benzotriazole die mikrobielle Aktivität und somit unter Umständen den biologischen Abbau anderer Schadstoffe (Gruden et al., 2001; Jia et al., 2006).

Die Bioabbaubarkeit der Benzotriazole wurde sowohl unter oxidischen als auch unter anoxischen Bedingungen untersucht. Verschiedene Studien mit Klärschlamm-, Boden- oder Wasserproben kamen mehrheitlich zum Schluss, dass Benzotriazole mikrobiell nicht abbaubar seien (Rollinson & Callely, 1986; Hem et al., 2000, Jia et al., 2006; Leerdam et al., 2009; Weiss and Reemtsma, 2005). Aktuelle Untersuchungen demonstrierten allerdings eine grundsätzliche jedoch eingeschränkte Abbaubarkeit der Benzotriazole (Heesel, 2010; Leerdam et al., 2009; Liu et al., 2011; Mishra, 2011; Spahr, 2012). Bei diesen Experimenten handelte sich ausschließlich um Inkubationen mit Mikroorganismen aus nährstoffreichen Klärschlamm-Proben. Über das Umweltverhalten der Benzotriazole in tiefen Grundwasseraquiferen unter verschiedenen Redoxbedingungen liegen bisher keine Daten vor.

In der vorliegenden Studie wurde der mikrobielle Abbau der ausgewählten Korrosionsinhibitoren in Sedimentinkubationen unter Bedingungen untersucht, die typisch für tiefe Grundwasseraquifere sind. Außerdem wurden einfache

Laborexperimente mit einer Reinkultur durchgeführt, um eine potentielle cometabolische Abbaubarkeit von BT in Anwesenheit des strukturähnlichen Korrosionsinhibitors Benzothiazol zu untersuchen.

4.3 Material und Methoden

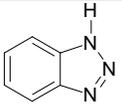
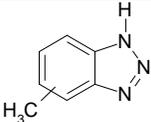
4.3.1 Mikrobieller Abbau von Benzotriazolen in Sedimenten aus tiefen Aquiferen

Informationen zu „Probenahme und Probenvorbereitung“, „Kulturmedien“, „Mikrokosmenexperimente“ sowie Methoden zur Bestimmung von Ethylenglykol, anorganischen Ionen (Sulfat, Nitrat, Nitrit) sowie Eisen sind Kapitel 3 (Unterkapitel 3.2) zu entnehmen. Die verwendeten Chemikalien, Stammlösungen, Versuchsansätze sowie die analytische Methode zur Bestimmung von Benzotriazolen sind im Folgenden dargestellt.

Chemikalien

1H-Benzotriazol (Reinheitsgrad 98 %) und Tolyltriazol (Reinheitsgrad > 99 %) wurden bei Sigma-Aldrich bzw. TCI Europe N.V. erworben. Alle anderen verwendeten Chemikalien sind in Tab. A-1 im Anhang aufgeführt. In Tab. 4-1 sind die physikochemischen Eigenschaften beider Benzotriazole dargestellt.

Tabelle 4-1: Physikochemische Eigenschaften sowie Strukturen von Benzotriazol und Tolyltriazol.

Substanz (CAS Nr.)	Struktur	MG [g/mol]	WL [g/l]	log Kow	pKs
1H-Benzotriazol (95-14-7)		119	20 ^{a)}	1,4 ^{a)}	1,6 ^{b)} 8,4 ^{a)}
Tolyltriazol (29385-43-1)		133	3 ^{a)}	1,7 ^{a)}	8,8 ^{c)}

MG: Molekulargewicht; WL: Wasserlöslichkeit. Quellen: a) PHYSPROP (2012), b) Bi et al. (2007), c) Gruden et al. (2001).

Stammlösungen

Außer den im Kapitel 3 beschriebenen (Unterkapitel 3.2) Stammlösungen wurden für die Experimente zusätzlich wässrige Lösungen von 10 mM BT oder TT verwendet. Alle Stammlösungen wurden anoxisch hergestellt und autoklaviert.

Versuchsansätze

Die jeweilige Versuchsanordnung ist dem entsprechenden Ergebnis-Teil im Unterkapitel 4.3 zu entnehmen.

Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

BT und TT wurden durch Umkehrphasenchromatographie analysiert. Das verwendete Analysegerät war ein Hochleistungsflüssigchromatograph (HPLC; SIL-20ACHT) der Firma Shimadzu. Bei der Umkehrphasenchromatographie- im Gegensatz zu Normalphasenchromatographie- ist die mobile Phase (Eluent) polarer als die stationäre Phase (Säule). Als Eluent wurde 60 % Methanol im gepufferten Wasser (20 mM Phosphatpuffer) verwendet. Die Stoffe wurden über eine Prontosil-SIL-20ACHT-Säule (Länge: 150 mm; Durchmesser: 3 mm; Partikelgröße: 3 μM) der Firma Bischoff aufgetrennt. Die Elution erfolgte isokratisch bei einer Flussrate von 0,3 ml/min. Die Substanzen wurden mittels eines Diodenarray-Detektors detektiert. Die Quantifizierung von BT und TT erfolgte bei Wellenlängen von 259 bzw. 263 nm. Die Bestimmungsgrenze für jede Substanz betrug 5 μM . Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Zuvor wurden die Proben bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert (Eppendorf 5417c Zentrifuge), um feste Partikeln und Mikroorganismen abzutrennen. Je 0,25 ml klarer Überstand wurde mit einer Transferpipette in 1,5 ml-HPLC-Gläschen mit vorgelegtem 0,25 ml Methanol überführt und mit einem Schraubdeckel mit Teflon-Septum verschlossen. Die Proben wurden am Tag der Probenahme analysiert oder bei 4°C aufbewahrt. Die Quantifizierung der analysierten Stoffe erfolgte mittels externen Standardlösungen. An jedem Messtag wurde eine separate Eichkurve erstellt, die fünf verschiedene Standard-Konzentrationen (0-100 μM) umfasste. BT- und TT-Standards wurden in 50% Methanol bei 20°C konserviert.

4.3.2 Cometabolischer Abbau von Benzotriazol

Benzothiazol (Bth) (Reinheitsgrad > 90 %) wurde bei Fluka bestellt. Bth eignete sich für die Cometabolismus-Experimente mit BT, weil i) Bth strukturelle Ähnlichkeit zu BT besitzt (s. Abb. 4-1) und ii) die Abbaumechanismen von Bth gut aufgeklärt und dokumentiert sind (Gaja and Knapp, 1997; Haroune et al., 2004; Wever et al., 1998). Außerdem werden Bth und BT oft zusammen in Kläranlagen detektiert (Weiss and Reemtsma, 2005). In diesem Kontext sind Erkenntnisse über eine potentielle Auswirkung von BT auf den Bth-Abbau sinnvoll. Die Experimente wurden in 30 ml Reaktionsgläsern durchgeführt. Als Inokulum wurde eine Reinkultur von *Rhodococcus pyridinovorans* verwendet, die von Frau Pascale Besse-Hoggan (Clermont Univesity, Clermont-Ferrand, Frankreich) zur Verfügung gestellt wurde. Die Zusammensetzung des verwendeten Mediums für aerobe Mikroorganismen ist in Tab. A-10 (s. Anhang) aufgeführt. Jeweils 15 ml des autoklavierten Mediums wurden aseptisch in die Reaktionsgläser pipettiert. Danach wurden 1,5 ml Inokulum hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 0,3 ml einer 10 mM Bth- und/oder 0,08 ml einer 10 mM BT-Lösung, beide steril. Die Reaktionsgläser wurden mit Alukappen bedeckt und bei 28°C inkubiert. Die chromatographische Analyse von Bth erfolgte mittels der oben beschriebenen HPLC-Methode für Benzotriazole. Die Versuchsanordnung zum cometabolischen Abbau von BT ist in Tab. 4-2 dargestellt. Begleitend wurde eine sterile Kontrolle mit BT und Bth durchgeführt.

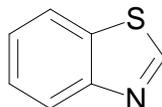


Abbildung 4-1: Strukturformel von Benzothiazol.

Tabelle 4-2: Versuchsansätze zum cometabolischen Abbau von Benzotriazol.

Inokulum	Versuchsansätze
Rhodococcus pyridinovorans*	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µM BT (drei Replikate) • 300 µM Bth (drei Replikate) • 50 µM BT +300 µM Bth (drei Replikate)

BT: Benzotriazol, Bth: Benzothiazol. *10% Stammlösung.

4.4 Ergebnisse und Diskussion

4.4.1 Mikrobieller Abbau von Benzotriazolen

Die Bioabbaubarkeit von Benzotriazol (BT) und Tolyltriazol (TT) wurde in Sedimenten (Buntsandstein und Mergel) aus zwei verschiedenen Grundwasseraquiferen untersucht. Die Mikrokosmenexperimente wurden unter oxischen und anoxischen Bedingungen durchgeführt. Zur Stimulierung von verschiedenen Redoxbedingungen, die typisch für anoxische Grundwasseraquifere sind, wurden Nitrat, Sulfat oder Fe (III) als Elektronenakzeptoren (EA) zugegeben. Mikrokosmen, denen keine EA zugegeben wurden, repräsentierten gärende Bedingungen. In Experimenten mit Sediment Mergel wurde der mikrobielle Abbau beider Korrosionsinhibitoren in Anwesenheit von Ethylenglykol (EG) untersucht, da gleichzeitig der Einfluss der Benzotriazole auf den EG-Abbau untersucht wurde (s. Kapitel 5). Für jedes Sediment und jede Redoxbedingung wurden eine Steril- und eine Blank-Kontrolle (ohne Zugabe von organischen Substanzen) durchgeführt. Die Versuchsansätze wurden bei 12°C inkubiert (repräsentative Temperatur in Sedimenten der untersuchten Tiefe von 60 und 70 m).

Oxische Bedingungen

Die Versuchsanordnung unter oxischen Bedingungen ist in Tab. 4-3 dargestellt.

Tabelle 4-3: Versuchsanordnung zum aeroben Abbau von Benzotriazolen.

Inokulum	Versuchsansätze
10 % Sediment Mergel	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µM BT + 50 µM TT + 5 mM EG (drei Replikate) • Kontroll-Experiment: 5 mM EG (drei Replikate)

BT: Benzotriazol, TT: Tolyltriazol, EG: Ethylenglykol.

EG wurde in allen Mikrokosmen (außer der Steril-Kontrolle) innerhalb von 20 Tagen vollständig abgebaut (die Daten sind in Kapitel 5 dargestellt).

Die TT-Konzentration änderte sich innerhalb einer Inkubationszeit von 88 Tagen nicht (Abb. 4-2). Die BT-Konzentration dagegen nahm in den ersten 20 Tagen der Inkubation zwischen 12 und 30 % (Abb. 4-2) ab. Zwischen Tag 20 und 88 (Inkubationsende) fand keine weitere BT-Abnahme statt. In der Steril-Kontrolle blieben die BT- und TT-

Konzentrationen innerhalb der Inkubationszeit unverändert, wodurch eine unspezifische abiotische BT-Abnahme z.B. aufgrund von Sorption ausgeschlossen werden konnte. Im Versuchsansatz mit der größten BT-Abnahme (30 %) wurde ab Tag 20 bis zum Ende der Inkubation ein unbekannter HPLC-Peak (Retentionszeit 3,7 min) detektiert. Im Kontroll-Experiment wurde dieser Peak nicht beobachtet. Das war ein Hinweis darauf, dass es sich bei der entsprechenden Substanz nicht um ein Produkt des EG-Abbaus handelte, sondern um ein Transformationsprodukt von BT. Um die Konzentration der unbekannt Substanz annähernd abschätzen zu können, wurde die Fläche des Peaks mit der Kalibrierungsmethode für BT quantifiziert. Die Konzentration des unbekannt Metabolits ist in Abb. 4-2 dargestellt. Offen bleibt allerdings die Frage, ob weitere Transformationsprodukte von BT entstanden sind, die mit der verwendeten HPLC-Methode (60% Methanol in Wasser, Analysezeit 6 min und UV Detektion) nicht erfasst wurden. Es ist denkbar, dass der Großteil des umgesetzten BT zu CO₂ abgebaut wurde, womit es sich in der aktuellen Studie um die erstmalige Dokumentation einer vollständigen Oxidation von BT zu CO₂ handeln könnte.

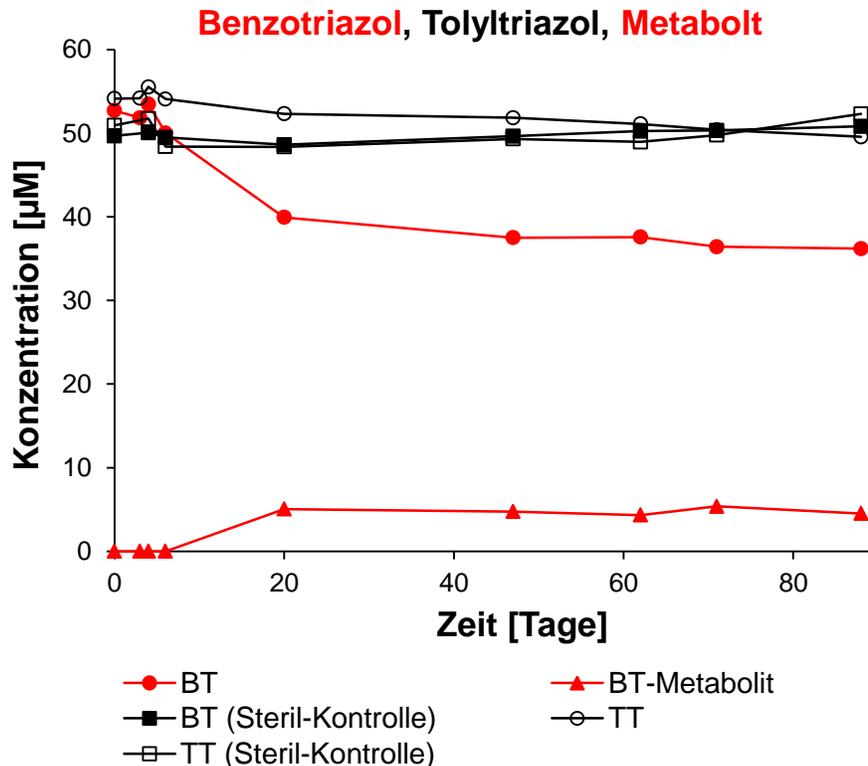


Abbildung 4-2: Konzentrationsverlauf von Benzotriazol (BT), Tolyltriazol (TT) und einem nicht identifizierten Metabolit des BT-Abbaus unter oxischen Bedingungen. Die TT-Kurve ist repräsentativ für drei parallele Ansätze. Die BT-Kurve stellt der Verlauf der BT-Konzentration im Ansatz mit der größten BT-Abnahme dar, wo der unbekannte Metabolit detektiert wurde.

Eine mögliche Erklärung dafür, dass BT nicht weiter abgebaut wurde, könnte eine hemmende Wirkung des vermeintlichen BT-Metabolits auf den mikrobiellen BT-Abbau sein. Um diese Hypothese zu verifizieren, wären allerdings weitere Kenntnisse über die Identität der Substanz sowie Abbauxperimente mit dieser Substanz erforderlich.

Heesel (2010) beobachtete bei 28°C in einer angereicherten Mischkultur einen Abbau von 0,4 mM BT innerhalb von 40 Tagen. Bei 12°C (Heesel, 2010) wurde im Gegensatz dazu im selben Zeitraum keine Änderung der BT-Konzentration beobachtet. In der Folgearbeit von Mishra (2011) wurde der aerobe mikrobielle Abbau von BT bei 28°C bestätigt. Dabei wurden 0,2 mM BT innerhalb von 20 Tagen Inkubationszeit abgebaut. In beiden Studien (Heesel, 2010; Mishra, 2011) wurde der BT-Abbau von einem Anstieg in der mikrobiellen Zellzahl (Erhöhung der optischen Dichte) begleitet. Des Weiteren wurde in der Studie von Mishra (2011) gezeigt, dass methyliertes BT (5-MBT) von den

BT-abbauenden Mikroorganismen nicht umgesetzt werden konnte. Liu et al. (2011) demonstrierten ebenfalls einen aeroben Abbau von BT. Dabei wurden 46 % des zugesetzten BT (8 μM) innerhalb von 91 Tagen bei 25°C abgebaut. Als Inokulum wurde 10 % Klärschlamm verwendet. 5-MBT (8 μM) wurde unter den gleichen Bedingungen komplett abgebaut (Liu et al., 2011).

In der aktuellen Studie wurde keine Abnahme der TT-Konzentration (eine Mischung aus 4- und 5-MBT) unter den untersuchten Bedingungen beobachtet. Das deutete darauf hin, dass die Mikrobengemeinschaft im untersuchten Sediment kein Abbaupotential für methylierte Formen für BT aufwies. Bisher wurden Untersuchungen überwiegend mit 5-MBT durchgeführt. Aus Studien zur Eliminierung von Benzotriazolen in einer Kläranlage ging hervor, dass 4-MBT persistenter gegenüber einem mikrobiellen Abbau als 5-MBT war (Weiss and Reemtsma, 2005). Wie oben erwähnt, liegen gegensätzliche Befunde über den mikrobiellen Abbau von 5-MBT vor, die von kompletter Umsetzung (Liu et al. 2011) bis zu völliger Persistenz reichen (Mishra, 2011). Es muss dabei berücksichtigt werden, dass Liu et al. (2011) 10 % Klärschlamm verwendeten, der eine wesentlich höhere metabolische Diversität gegenüber der angereicherten Mischkultur von Mishra (2011) besaß. Zusätzlich war die untersuchte 5-MBT-Konzentration (0,2 mM) in der Studie von Mishra (2011) um das 20-fache höher als (8 μM 5-MBT) in den Experimenten von Liu et al. (2011). Mishra (2011) hielt eine toxische Auswirkung von 5-MBT auf die BT-abbauende Kultur für eine mögliche Ursache für die fehlende mikrobielle Aktivität. In der aktuellen Studie konnte mangels chromatographischer Auftrennung der beiden MBT-Isomere keine Aussage über eine präferentielle Umsetzung von 5-MBT gegenüber 4-MBT im verwendeten Sediment gemacht werden. Um im Falle einer Leckage von WTF in tiefen Aquiferen ein besseres Verständnis für das Verhalten der Benzotriazole zu erlangen, sind individuelle Abbauxperimente mit BT, 5-MBT und 4-MBT erforderlich.

In allen Ansätzen fand die BT-Abnahme parallel zum EG-Abbau statt und endete als das Frostschutzmittel abgebaut war (am Tag 20 der Inkubation) (s. Kapitel 5). Dies war ein Indiz für die Anwesenheit von Mikroorganismen im untersuchten Sediment, die in der Lage waren, BT cometabolisch mit EG als Hauptsubstrat umzusetzen. Unter Cometabolismus wird die Transformation von (Fremd-)Stoffen durch Enzyme

bezeichnet, die von den Mikroorganismen für den Abbau ihrer eigentlichen Substrate synthetisiert wurden. Die beteiligten Mikroorganismen gewinnen keine Energie aus der Reaktion (Fritsche, 1998). Mehrere Studien thematisierten die Relevanz cometabolischer Prozesse für den mikrobiellen Schadstoffabbau (Alexander, 1981; Gröning et al., 2007; Novick and Alexander, 1985). Die tatsächliche Bedeutung cometabolischer Prozesse für die Eliminierung von Schadstoffen aus der Umwelt ist bislang aber noch umstritten. In der Literatur liegen bis dato keine Hinweise auf einen cometabolischen Abbau von BT in Anwesenheit von EG vor. Ein abschließender Beweis dieser Hypothese konnte im Rahmen dieser Studie nicht erbracht werden.

Wie oben beschrieben, wurde in der aktuellen Studie die Bildung und Akkumulierung eines Transformationsprodukts von BT beobachtet. Der Peak der Substanz wurde mittels der für die Analyse beider Benzotriazole verwendeten Umkehrphasenchromatographie nachgewiesen. Bei dieser Art von Chromatographie ist die mobile Phase (in der aktuellen Studie: 60 % Methanol im gepufferten Wasser) polarer als die stationäre Phase (modifiziertes Kieselgel). Basierend auf der Regel „Ähnliches wird von Ähnlichem gelöst“, verkürzt sich die Retentionszeit (Ret) mit zunehmender Polarität einer Substanz. Ausgehend von der Ret war das unbekannte Produkt (Ret 3,7 min) polarer als die Ausgangssubstanz BT (Ret 4,2 min). Bisher diskutierten nur wenige Studien mögliche Transformationsprodukte von BT. In den Experimenten von Mishra (2011) wurde OH-Triazol als Haupttransformationsprodukt des BT-Abbaus identifiziert (B. Morasch, persönliche Mitteilung). Um festzustellen, ob sich in der aktuellen Studie um das Transformationsprodukt OH-Triazol handelte, wurden die Absorptionsspektren sowie die Retentionszeiten beider Substanzen (unter den gleichen chromatographischen Bedingungen) verglichen. In Abb. 4-3 a und Abb. 4-3 b ist das Absorptionsspektrum von OH-Triazol bzw. dem unbekanntem Metabolit dargestellt. Der Unterschied zwischen den beiden Spektren ist deutlich zu erkennen. Auch die Ret beider Peaks waren nicht identisch. OH-Triazol eluierte bei 2,7 min, der unbekannte Peak bei 3,7 min.

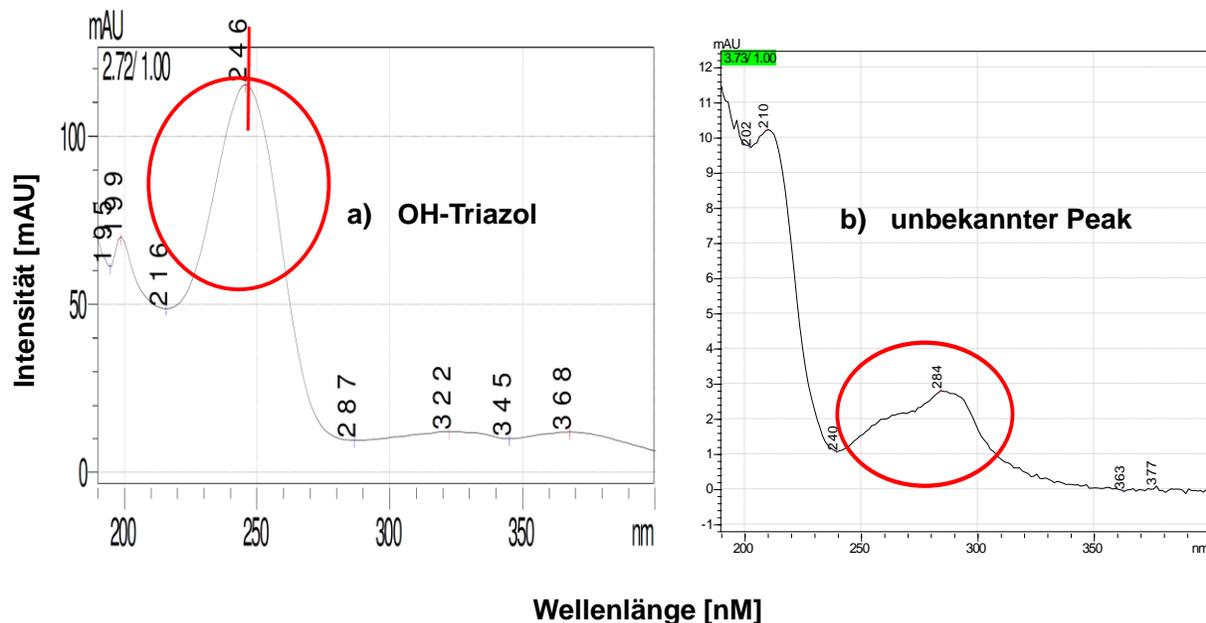


Abbildung 4-3: Absorptionsspektren von a) OH-Triazol (entnommen aus Mishra 2011) und b) unbekanntem Transformationsprodukt des Benzotriazols aus der aktuellen Studie. Die entsprechenden Spektren sind mit rotem Kreis bezeichnet.

In der Masterarbeit von Heesel (2010) wurde N-Methylanilin als potentieller Metabolit des BT-Abbaus (in einer erst wenig angereicherten Kultur) identifiziert. Um die Polarität von N-Methylanilin mit der von BT zu vergleichen, wurden die log Kow-Werte beider Substanzen betrachtet (Tab. 4-3). N-Methylanilin (log Kow-Wert 1,66) hat eine geringere Polarität als BT (log Kow-Wert 1,44) und als die unbekannte Substanz. Beim unbekanntem Produkt konnte es sich also nicht um N-Methylanilin handeln.

Liu et al. (2011) berichteten in ihren aeroben Abbauprodukten von fünf vermeintlichen Transformationsprodukten von BT: 5 und 4-Methoxy-1H-Benzotriazol (5 oder 4-MOBT), 1-Methyl-Benzotriazol (1-MBT), Phthalat (Pht) und Phenol. Analog zu N-Methylanilin wurden die log Kow-Werte (s. Tab. 4-4) dieser Stoffe mit BT (log Kow-Wert 1,44) verglichen. 5-MOBT, 1-MBT und Pht (log Kow-Werte 1,25; 1,13 bzw. 0,73) besitzen ähnlich wie das unbekannte Abbauprodukt (aktuelle Studie) eine höhere Polarität als BT. Es muss jedoch erwähnt werden, dass es sich bei den Experimenten von Liu et al. (2011) um 10 % Klärschlamm handelte, der neben BT auch weitere Substanzen und potentielle organische Substrate für die Mikroorganismen enthielt, die eine potentielle Quelle für die beobachteten Transformationsprodukte darstellten.

Außerdem ist bekannt, dass bei Metabolitenanalysen häufig Pht gefunden wird, das als Weichmacher im Laborverbrauchsmaterialien aus Plastik (wie z.B. Eppendorf Reaktionsgefäße und Pipette Tips) vorkommt. Demzufolge ist nicht zwingend, dass es sich beim identifizierten Pht um ein Metabolit des BT-Abbaus handelte. 5-MOBT und 1-MBT müssen aufgrund ihrer Log-Kow-Werte in Betracht gezogen werden. Für 4-MOBT liegen keine Daten über den Log-Kow-Wert vor, könnte aber ähnlich sein wie 5-MOBT.

Tabelle 4-4: Log-Kow-Werte von potentiellen Transformationsprodukten von Benzotriazol unter oxischen Bedingungen.

Substanz (CAS Nr.)	Log Kow
1H-Benzotriazol (95-14-7)	1,44*
N-Methylanilin (100-61-8)	1,66*
5-Methoxy-1H-Benzotriazol (27799-91-3)	1,25**
4-Methoxy-1H-Benzotriazol (27799-90-2)	k.D.
1-Methylbenzotriazol (13351-73-0)	1,13*
Phenol (108-95-2)	1,46*
Phthalsäure (88-99-3)	0,73*

k.D.: keine Daten. *PHYSPROP (2012), **vorhergesagt mit EPI Suite™ v4.10.

Aufgrund von Polarität konnten einige vermeintliche Transformationsprodukte der Benzotriazole als das unbekanntes Produkt aus der aktuellen Studie ausgeschlossen werden. Zur Substanzaufklärung könnten massenspektrometrische Analysen (mittels hochauflösendem LC-MS/MS) durchgeführt werden.

Die Ergebnisse der aktuellen Studie zeigten, dass BT und TT im Sediment aus tiefen Grundwasseraquiferen unter den untersuchten Bedingungen aerob sehr schlecht (BT) oder gar nicht (TT) abbaubar sind. Dabei wirkte sich die Anwesenheit von EG positiv aus. Hierbei könnte es sich um cometabolischen BT-Abbau gehandelt haben.

Zugabe von Nitrat als Elektronenakzeptor

In Tab. 4-5 sind die Versuchsansätze unter nitratreduzierenden Bedingungen dargestellt.

Tabelle 4-5: Versuchsanordnung zum mikrobiellen Abbau von Benzotriazolen mit 10 mM Nitrat als Elektronenakzeptor.

Inokulum	Versuchsansätze
10% Sediment Buntsandstein	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µM BT (drei Replikate) • 50 µM TT (drei Replikate) • Kontroll-Experiment: 5 mM EG (drei Replikate)
10% Sediment Mergel	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µM BT + 50 µM TT + 5 mM EG (drei Replikate) • Kontroll-Experiment: 5 mM EG (drei Replikate)

BT: Benzotriazol, TT: Tolyltriazol, EG: Ethylenglykol.

Die BT- und TT-Konzentrationen änderten sich in den Ansätzen mit Sediment Buntsandstein innerhalb von 380 Tagen Inkubationszeit nicht (Abb. 4-4). Im Sediment Mergel wurde innerhalb von 15 Tagen Inkubationszeit ebenfalls kein mikrobieller BT- und TT-Abbau beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Konzentrationen beider Korrosionsinhibitoren in den zugehörigen Steril-Kontrollen blieben ebenfalls konstant.

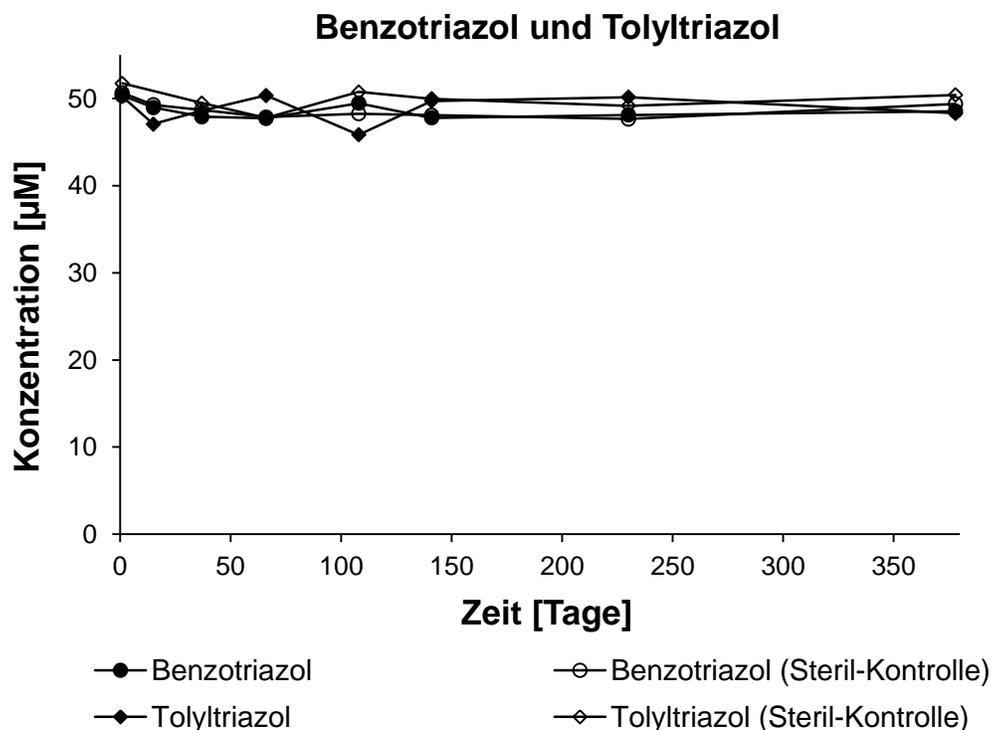


Abbildung 4-4: Konzentrationsverlauf von Benzotriazol und Tolyltriazol im Experiment mit Nitrat und Sediment Buntsandstein. Die Daten sind repräsentativ für drei parallele Ansätze.

Bis dato ist nur eine Studie (Liu et al., 2011) publiziert, in der der Abbau von Benzotriazolen unter nitratreduzierenden Bedingungen untersucht wurde. Dabei wurde

als Inokulum 10 % Klärschlamm verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 25°C. Die Ergebnisse von Liu et al. (2011) zeigten eine Abnahme von 25 und 35 % der BT- bzw. der TT-Konzentration innerhalb von 91 Tagen Inkubationszeit. Beide Korrosionsinhibitoren wurden in einer fünffach kleineren Konzentration (8 µM) als die untersuchte BT-Konzentration in der aktuellen Studie (50 µM) untersucht.

Die Ergebnisse von Liu et al. in Kombination mit den hier präsentierten Daten unterstreichen die hohe Persistenz von BT und TT gegenüber einem mikrobiellen Abbau.

Ferrihydrit als Elektronenakzeptor

In Tab. 4-6 sind die Versuchsansätze zum mikrobiellen Abbau von BT und TT mit Fe (III) als EA aufgeführt.

Tabelle 4-6: Versuchsanordnung zum mikrobiellen Abbau von Benzotriazolen mit Fe (III) als Elektronenakzeptor.

Sediment	Versuchsansätze
10% Sediment Buntsandstein	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µM BT + 10 mM Ferrihydrit (drei Replikate) • 50 µM TT + 10 mM Ferrihydrit (drei Replikate) • Kontroll-Experiment: 5 mM EG + 10 mM Ferrihydrit (drei Replikate)
10% Sediment Mergel	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µM BT + 50 µM TT + 5 mM EG + 50 mM Ferrihydrit (drei Replikate) • Kontroll-Experiment: 5 mM EG + 50 mM Ferrihydrit (drei Replikate)

BT: Benzotriazol, TT: Tolytriazol, EG: Ethylenglykol.

Im Sediment Buntsandstein wurde der Konzentrationsverlauf beider Korrosionsinhibitoren über einen Zeitraum von 380 Tagen beobachtet. Trotz Schwankungen in den gemessenen BT-Konzentrationen von +/- 20 % war kein eindeutiger Abnahme-Trend innerhalb der Inkubationszeit ersichtlich. Die TT-Konzentration blieb innerhalb der Inkubationszeit konstant. Es muss jedoch erwähnt werden, dass auch im Kontroll-Experiment kein mikrobieller EG-Abbau beobachtet wurde (s. Kapitel 3), während in Ansätzen mit Sediment Mergel EG innerhalb von 39 Tagen komplett zu Acetat umgesetzt wurde (s. Kapitel 3). Als potentielle Ursache für die fehlende mikrobielle Aktivität muss die Abwesenheit der entsprechenden Mikroorganismen in Betracht gezogen werden. Der Verlauf der BT- und TT-Konzentration mit Sediment Mergel ist in Abb. 4-5 dargestellt. In den ersten 39 Tagen

der Inkubation blieben die BT- und TT-Konzentrationen konstant. Zwischen Tag 39 und 104 fand eine BT- bzw. TT-Abnahme mit 32-34 % und 22-27 % statt. Bis zum Inkubationsende (bei Tag 243) wurde keine weitere Abnahme der Konzentrationen beobachtet. In der Steril-Kontrolle blieben die BT- sowie die TT-Konzentration innerhalb der Inkubationszeit konstant. Damit ist eine abiotische, unspezifische BT- und TT-Abnahme (z.B. aufgrund von Sorption) auszuschließen. In jedem der drei Mikrokosmen wurde eine Änderung des Absorptionsspektrums sowie eine leichte Vergrößerung der Fläche des Injektionspeaks (Ret 2,9 min) gegenüber der Steril-Kontrolle beobachtet. (Abb. 4-6). Der Injektionspeak änderte sich in der Steril-Kontrolle im Laufe der Inkubation nicht. Dies wies auf die Bildung eines Transformationsprodukts hin. In den Kontroll-Mikrokosmen, denen EG als einziges organisches Substrat zugegeben wurde, war keine Veränderung im Absorptionsspektrum zu beobachten. Somit konnte ein Metabolit des EG-Abbaus als Ursache ausgeschlossen werden. Eine quantitative Auswertung der Fläche des Peaks war jedoch aufgrund der Co-Elution mit dem Injektionspeak nicht möglich.

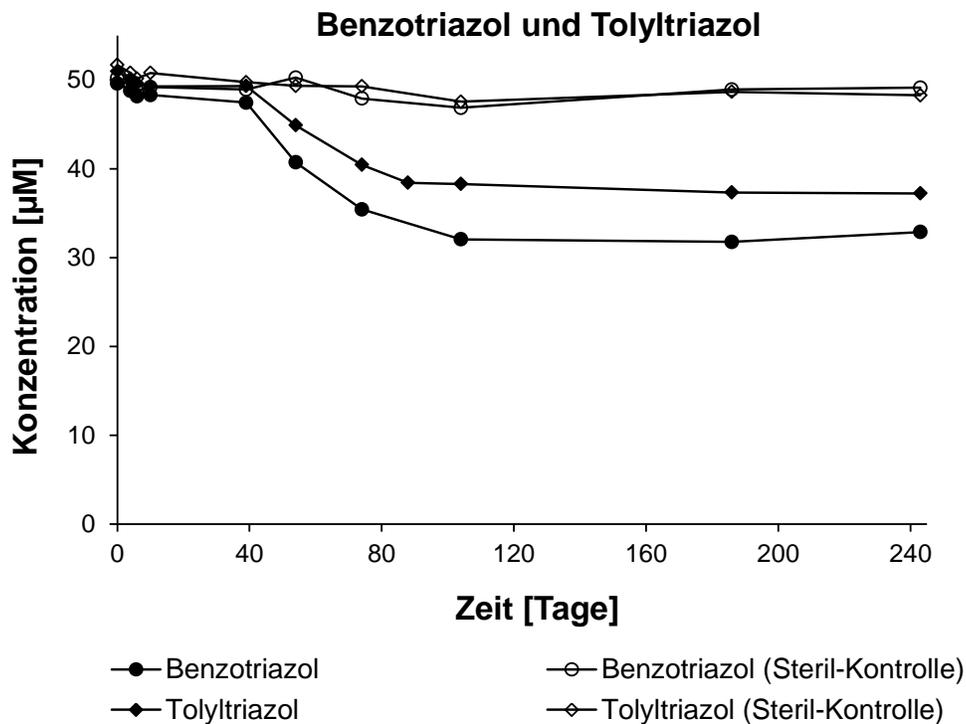


Abbildung 4-5: Konzentrationsverlauf von Benzotriazol und Tolyltriazol im Experiment mit Fe (III) und Sediment Mergel. Die Daten sind repräsentativ für drei parallele Ansätze.

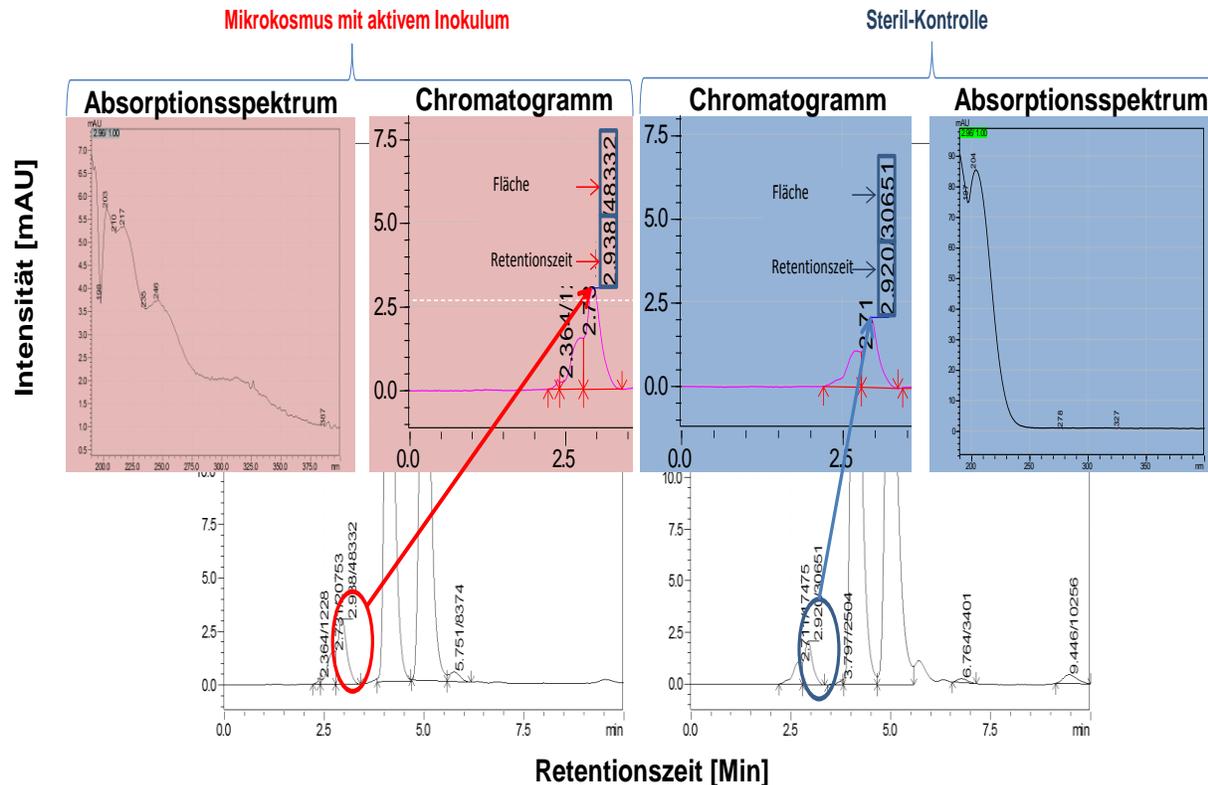


Abbildung 4-6: Bildung eines unbekannten Metabolits des BT-Abbaus im Experiment mit Fe (III) und Sediment Mergel. Beobachtet wurden Veränderungen im Absorptionsspektrum sowie eine Zunahme der Fläche des Injektionspeaks (Retentionszeit 2,9 min) am Tag 54 der Inkubation gegenüber der Steril-Kontrolle. Die Chromatogramme wurden bei einer Wellenlänge von 256 nm aufgenommen und sind repräsentativ für drei parallele Ansätze.

In allen Ansätzen (ausgenommen die Steril- und Blank-Kontrolle) wurde reduziertes Eisen (Fe (II)) gebildet. Die Konzentration von Fe (II) in Anwesenheit von Benzotriazolen war zum Inkubationsende (Tag 243) vergleichbar mit der Fe (II)-Konzentration in den Kontroll-Mikrokosmen (gemessen am Tag 243), die EG aber kein BT oder TT enthielten (s. Tab. 4-7). Eine Bilanzierung des BT- bzw. TT-Abbaus mit Fe (III) als EA konnte aus zwei Gründen nicht durchgeführt werden: 1) die Fe (II)-Ionen aus dem EG/Acetatabbau maskierten eine potentielle Eisenreduktion im Zuge der Oxidation von BT und TT; 2) Identität und Menge des BT-Transformationsprodukts konnten nicht bestimmt werden.

Tabelle 4-7: Bildung von Fe (II) in Mikrokosmen mit 5 mM Ethylenglykol in An- und Abwesenheit von Benzo- und Tolyltriazol nach einer Inkubationszeit von 243 Tagen.

Experiment	ohne BT und TT			mit BT und TT		
Ansätze	EG1	EG2	EG3	Mix1	Mix2	Mix3
Fe (II)* [mM]	26	34	32	32	33	32

EG1-EG3: drei parallele Ansätze mit Ethylenglykol (EG); Mix1-Mix3: drei parallele Ansätze mit EG in Anwesenheit von Benzo- (BT) und Tolyltriazol (TT). *Subtrahiert wurden jeweils 2 mM Fe (II), das als Reduktionsmittel zugegeben wurde und zum Inkubationsbeginn im Medium vorlag.

Angenommen der Großteil der umgesetzten Menge an BT und TT wurde vollständig mit Fe (III) als EA zu CO_2 und NH_4^+ nach den unten beschriebenen Gleichungen abgebaut, wären theoretisch weniger als 1 mM Fe (II) gebildet worden. Diese Konzentrationsänderung ist mit der verwendeten Analyse-Methode bei Fe (III)-Konzentrationen von über 30 mM in der Probe schwer zu erfassen (5 % Messfehler).



Die Abnahme der BT- sowie der TT-Konzentration startete parallel zur Abnahme von Acetat. Das ist ein Indiz dafür, dass dieselben Mikroorganismen, die für den Acetat-Abbau verantwortlich waren, sich auch an der Umsetzung von BT und TT beteiligten. Allerdings kam die BT- sowie die TT-Abnahme nach 109 Tagen zum Stillstand, wohingegen der Acetatabbau unter eisenreduzierenden Bedingungen bis zum letzten Tag der Inkubation (Tag 243) in allen drei parallelen Mikrokosmen andauerte. Möglicherweise wurde der Abbau von BT und TT gezielt gehemmt, was zum beobachteten Abbruch des BT- und TT-Abbaus geführt haben könnte.

Kürzlich wurde den Abbau von BT und 5-MBT (jeweils 8 μ M) mit 10% Klärschlamm als Inokulum unter eisenreduzierenden Bedingungen bei 25°C untersucht (Liu et al., 2011). Innerhalb von 91 Tagen Inkubationszeit wurde eine 31%tige BT-Abnahme beobachtet, die vergleichbar mit der BT-Abnahme der aktuellen Studie war. 5-MBT konnte dagegen innerhalb der gleichen Inkubationszeit mehr als 70% abgebaut werden. In dieser Studie (Liu et al., 2011) wurden außer Phenol und 1-MBT noch Dimethylbenzylamin und Carbazol als vermeintliche Transformationsprodukte von BT detektiert. Als TT-Abbauprodukte wurden BT, 2-Methylphenol und 2-Methylbenzenamin identifiziert. Fast alle von Liu et al. (2011) vorgeschlagene Produkte des BT- und TT-Abbaus (außer 1-

MBT) besitzen eine geringere Polarität (s. log-Kow-Werte in Tab. 4-4 und Tab. 4-8) gegenüber BT. Aufgrund der kurzen Retentionszeit (2,9 min) des unbekannt Peaks kam keine dieser Substanzen als das unbekannte Abbauprodukt aus der aktuellen Studie in Frage. 1-MBT wäre aufgrund seiner höheren Polarität (log Kow-Wert 1,13) gegenüber BT ein mögliches Transformationsprodukt. Das Absorptionsspektrum der unbekannt Substanz entsprach nicht dem des BT-Transformationsprodukts (OH-Triazol) der aeroben Anreicherungskultur von Mishra (2011).

Tabelle 4-8: Log-Kow-Werte potentieller Transformationsprodukten von Benzo- und Tolyltriazol unter eisenreduzierenden Bedingungen.

Substanz (CAS Nr.)	Log Kow*
Dimethylbenzylamin	1,98**
Carbazol	3,72**
2-Methylphenol	1,95**
2-Methylbenzenamin	1,62**

*Log-Kow-Werte für Phenol und 1-MBT sind Tab. 4-4 zu entnehmen, **PHYSROP (2012).

Mit den Experimenten der aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass unter den untersuchten Bedingungen Benzotriazole eine geringe Bioabbaubarkeit besitzen. Im Falle einer Leckage von Erdwärmesonden in tiefen Aquiferen, wo häufig die mikrobielle Eisenreduktion eine dominierende Rolle spielt, ist eine Akkumulierung von Benzotriazolen zu erwarten.

Zugabe von Sulfat als Elektronenakzeptor

Die Versuchsansätze zum mikrobiellen Abbau von Benzotriazolen mit Sulfat als EA sind in Tab. 4-9 aufgeführt.

Tabelle 4-9: Versuchsanordnung zum mikrobiellen Abbau von Benzotriazolen mit 10 mM Sulfat als Elektronenakzeptor.

Sediment	Versuchsansätze
10 % Sediment Buntsandstein	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µM BT (drei Replikate) • 50 µM TT (drei Replikate)
10 % Sediment Mergel	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µM BT + 50 µM TT + 5 mM EG (drei Replikate)

BT: Benzotriazol, TT: Tolyltriazol, EG: Ethylenglykol.

Die Konzentration beider Korrosionsinhibitoren änderte sich in keinem der Versuchsansätze innerhalb von 382 (Buntsandstein) und 118 Tagen (Mergel)

Inkubationszeit. Daten aus einem der Mikrokosmen mit Sediment Buntsandstein sind exemplarisch in Abb. 4-7 dargestellt.

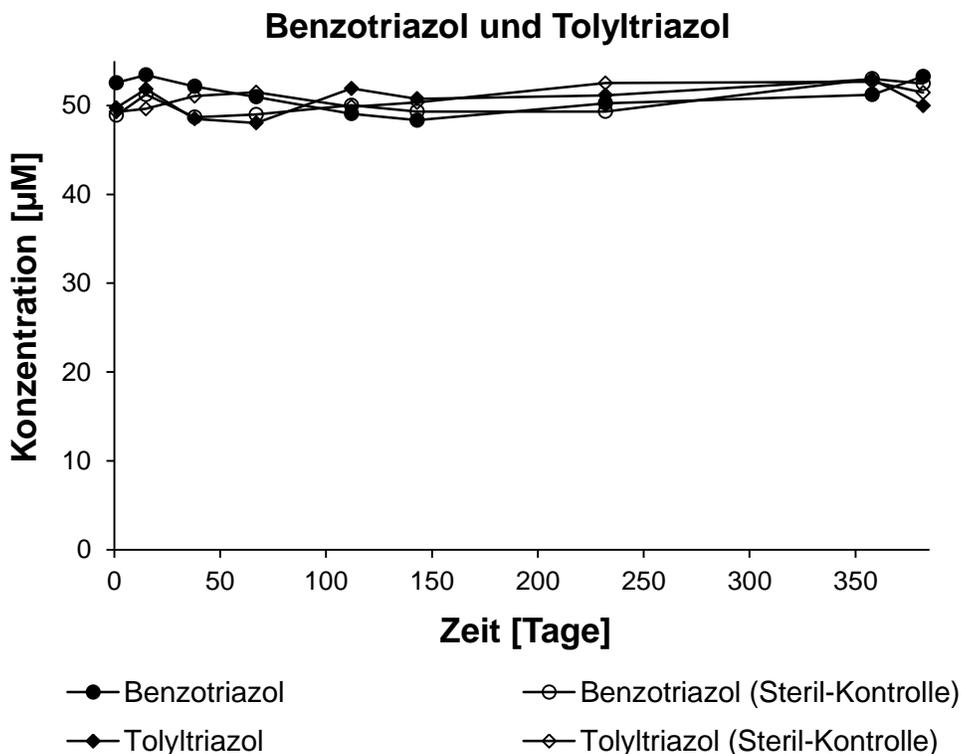


Abbildung 4-7: Konzentrationsverlauf von Benzotriazol und Tolyltriazol im Experiment mit Sulfat und Sediment Buntsandstein. Die Daten sind repräsentativ für drei parallele Ansätze.

Die Studie von Liu et al. (2011) beschrieb bislang als einzige, dass Benzotriazole mit Sulfat als EA teilweise abgebaut werden konnten, wobei Klärschlamm als Inokulum gewählt wurde und die Inkubationstemperatur 25°C betrug. Die Abnahmen der BT- sowie der 5-MBT-Konzentration innerhalb von 91 Tagen lagen bei 18 bzw. 47 %.

Die Langzeitexperimente der aktuellen Studie mit zwei tiefen Aquifersedimenten bei Temperaturen von 12°C zeigten keinen mikrobiellen Abbau von Benzotriazolen.

Gärende Bedingungen

In Tab. 4-10 sind die entsprechenden Versuchsansätze unter gärenden Bedingungen aufgeführt. Zur Stimulierung gärender Abbauprozesse wurden keine EA zugegeben.

Tabelle 4-10: Versuchsanordnung zum mikrobiellen Abbau von Benzotriazolen unter gärenden Bedingungen.

Inokulum	Versuchsansätze
10 % Sediment Mergel	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µM BT + 50 µM TT + 5 mM EG (drei Replikate) • Kontroll-Experiment: 5 mM EG (drei Replikate)

BT: Benzotriazol, TT: Tolyltriazol, EG: Ethylenglykol.

Innerhalb von 118 Tagen Inkubation wurde keine Abnahme der BT- sowie der TT-Konzentration beobachtet (Daten nicht gezeigt). Auch die Konzentrationen der Korrosionsinhibitoren in der Steril-Kontrolle blieben unverändert.

Bisher liegen neben der aktuellen Arbeit keine weiteren Studien zum mikrobiellen Abbau von Benzotriazolen unter gärenden Bedingungen vor. Die Versuchsansätze unterstreichen die hohe Persistenz der Korrosionsinhibitoren gegenüber einem mikrobiellen Abbau.

Einfluss der Temperatur

Zusätzliche Versuchsansätze unter nitratreduzierenden Bedingungen mit Sediment Buntsandstein wurden bei Raumtemperatur (22°C) durchgeführt. Die entsprechenden Versuchsanordnungen sind Kapitel 5 (Paragraph 5.3.7) zu entnehmen. Unabhängig von der Anfangskonzentration (5, 50 und 500 µM BT) wurde unter nitratreduzierenden Bedingungen innerhalb von 227 Tagen Inkubationszeit kein Abbau beobachtet. Die BT- und die TT-Konzentration in den entsprechenden Steril-Kontrollen änderte sich innerhalb der jeweiligen Inkubationszeiten nicht.

4.4.2 Experimente zum cometabolischen Abbau von Benzotriazol

Die Experimente zum cometabolischen BT-Abbau mit Benzothiazol (Bth) als Wachstumssubstrat wurden mit der Reinkultur *Rhodococcus pyridinovorans* bei 28°C durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten keine Änderung der BT-Konzentration in Anwesenheit von Bth innerhalb von 20 Tagen Inkubationszeit (Abb. 4-8). In Abwesenheit von Bth erfolgte innerhalb des gleichen Zeitraums ebenfalls kein mikrobieller BT-Abbau (Daten nicht

abgebildet). Bth wurde innerhalb von vier Tagen komplett abgebaut (Abb. 4-8). Ein Produkt des Bth-Abbaus wurde detektiert, das im weiteren Verlauf der Inkubation abgebaut wurde. Der Ablauf der Bth-Konzentration in Abwesenheit von BT (Daten nicht abgebildet) entsprach dem Experiment in Anwesenheit von BT.

Somit wurde kein cometabolischer Abbau von BT von *Rhodococcus pyridinovorans* in Anwesenheit von Bth demonstriert. Es wurde außerdem gezeigt, dass unter den untersuchten Bedingungen BT keinen Einfluss auf den mikrobiellen Abbau von Bth hatte.

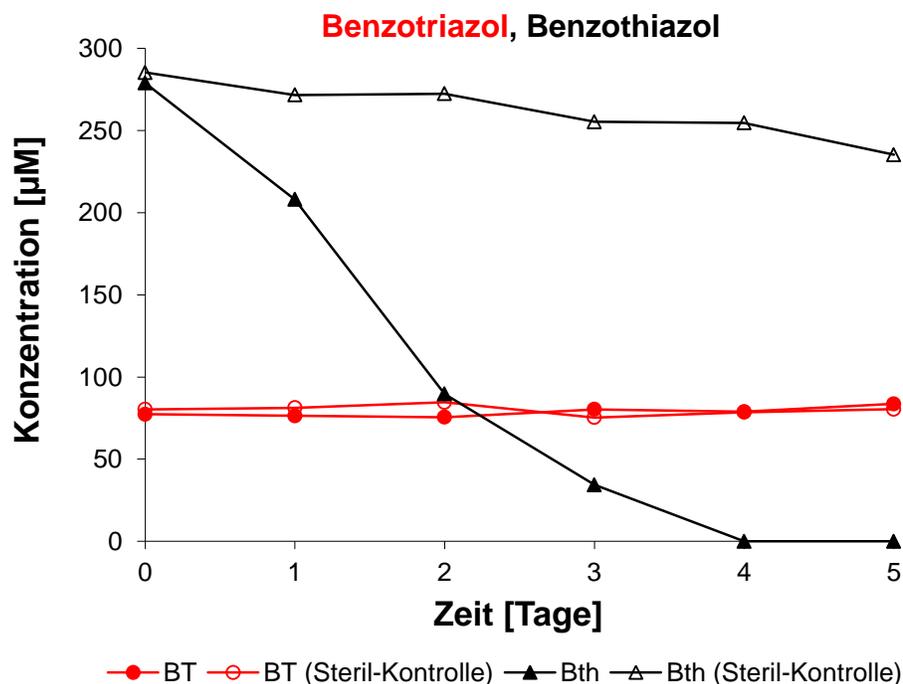


Abbildung 4-8: Cometabolischer Abbau von Benzotriazol (BT) in Anwesenheit von Benzothiazol (Bth) unter oxischen Bedingungen.

4.5 Schlussfolgerungen

Aufgrund der Ergebnisse kann Folgendes geschlossen werden:

- 1) Aufgrund des eingeschränkten Abbauvermögens für Benzotriazole unter oxischen und eisenreduzierenden Bedingungen ist mit langen Halbwertszeiten für

diese Substanzen im Untergrund zu rechnen, wo Sauerstoff oder Fe (III) die dominierenden EA sind.

- 2) Eine Freisetzung potentiell toxischer Abbauprodukte infolge der teilweisen Umsetzung der Benzotriazole unter oxidischen und eisenreduzierenden Bedingungen kann nicht ausgeschlossen werden.
- 3) In anoxischen sulfathaltigen Grundwasserleitern sowie in Aquiferen, wo gärende Abbauprozesse vorherrschen, ist ebenfalls eine dauerhafte Verschmutzung mit den Korrosionsinhibitoren zu rechnen.
- 4) Eine cometabolische Eliminierung des BT in Anwesenheit von weiteren strukturähnlichen Chemikalien ist nicht wahrscheinlich.

Es zeigte sich, dass Benzotriazole unter Bedingungen und Redoxverhältnissen typisch für tiefe Grundwasseraquifere kaum durch mikrobielle Abbauprozesse eliminiert werden können. Bei einem potentiellen Austritt von Wärmeträgerflüssigkeiten in tiefen Grundwassersystemen ist daher eine Gefährdung des Grundwassers durch Benzotriazole zu bedenken.

4.6 Literatur

- Alexander, M., 1981. Biodegradation of Chemicals of Environmental Concern. *Science* 211, 132–138.
- Bi, E., Schmidt, T.C., Haderlein, S.B., 2007. Environmental Factors Influencing Sorption of Heterocyclic Aromatic Compounds to Soil. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3172–3178.
- Fritsche, W., 1998. *Umwelt-Mikrobiologie: Grundlagen und Anwendungen*. Fischer, Jena [etc.].
- Gaja, M.A., Knapp, J.S., 1997. The microbial degradation of benzothiazoles. *J. Appl. Microbiol.* 83, 327–334.
- Gröning, J., Held, C., Garten, C., Claußnitzer, U., Kaschabek, S.R., Schlömann, M., 2007. Transformation of diclofenac by the indigenous microflora of river sediments and identification of a major intermediate. *Chemosphere* 69, 509–516.
- Gruden, C.L., Dow, S.M., Hernandez, M.T., 2001. Fate and toxicity of aircraft deicing fluid additives through anaerobic digestion. *Water Environ. Res. Res. Publ. Water Environ. Fed.* 73, 72–79.
- Haroune, N., Combourieu, B., Besse, P., Sancelme, M., Kloepfer, A., Reemtsma, T., Wever, H.D., Delort, A.-M., 2004. Metabolism of 2Mercaptobenzothiazole by *Rhodococcus rhodochrous*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6315–6319.
- Heesel, V., 2010. *Biodegradation of Benzotriazoles (Masterthesis)*. Eberhard Karls Universität, Tübingen.
- Jia, Y., Bakken, L.R., Breedveld, G.D., Aagaard, P., Frostegård, Å., 2006. Organic compounds that reach subsoil may threaten groundwater quality; effect of benzotriazole on degradation kinetics and microbial community composition. *Soil Biol. Biochem.* 38, 2543–2556.
- Jia, Y., Molstad, L., Frostegård, Å., Aagaard, P., Breedveld, G.D., Bakken, L.R., 2007. Kinetics of microbial growth and degradation of organic substrates in subsoil as

- affected by an inhibitor, benzotriazole: Model based analyses of experimental results. *Soil Biol. Biochem.* 39, 1597–1608.
- Leerdam, J.A. van, Hogenboom, A.C., Kooi, M.M.E. van der, Voogt, P. de, 2009. Determination of polar 1H-benzotriazoles and benzothiazoles in water by solid-phase extraction and liquid chromatography LTQ FT Orbitrap mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* 282, 99–107.
- Liu, Y.-S., Ying, G.-G., Shareef, A., Kookana, R.S., 2011. Biodegradation of three selected benzotriazoles under aerobic and anaerobic conditions. *Water Res.* 45, 5005–5014.
- Mishra, S., 2011. Aerobic biodegradation of benzotriazoles and analysis of metabolites (Masterthesis). Eberhard Karls Universität, Tübingen.
- Novick, N.J., Alexander, M., 1985. Cometabolism of low concentrations of propachlor, alachlor, and cycloate in sewage and lake water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 737–743.
- PHYSPROP, 2013. Physical Properties Database. Im Internet publizierte Daten, Quelle: www.syrres.com.
- Spahr, S., 2012. Specific Carbon and Nitrogen Isotope Analysis of Benzotriazoles (Masterthesis). Eberhard Karls Universität, Tübingen.
- Teich, U., 2011. Das Sorptionsverhalten von 1H- Benzotriazol (Masterthesis). Eberhard Karls Universität, Tübingen.
- Weiss, S., Reemtsma, T., 2005. Determination of Benzotriazole Corrosion Inhibitors from Aqueous Environmental Samples by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 77, 7415–7420.
- Wever, H.D., Vereecken, K., Verachtert, H., Stolz, A., 1998. Initial transformations in the biodegradation of benzothiazoles by *Rhodococcus* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3270–3274.

5 Einfluss von Benzotriazolen auf den mikrobiellen Ethylenglykolabbau

5.1 Zusammenfassung

In der folgenden Studie wurde der Einfluss von Benzo- und Tolyltriazol (je 50 μM) auf den mikrobiellen EG-Abbau unter oxidischen und anoxischen Bedingungen in Sedimenten (Buntsandstein und Mergel) aus zwei tiefen Grundwasseraquiferen untersucht. In Ansätzen unter Zugabe von Nitrat als Elektronenakzeptor und Sediment Buntsandstein wurde eine Verlängerung der Lag-Phase um 8 und 4 Tage in Anwesenheit von Benzo- bzw. Tolyltriazol gegenüber dem Kontrollexperiment (Lag-Phase < 2 Tage) beobachtet. Zudem waren die Abbauraten von Ethylenglykol in den Experimenten mit Benzo- oder Tolyltriazol (0,7 mM/Tag) geringer als in Abwesenheit der Korrosionsinhibitoren (1 mM/Tag). Auch unter sulfatreduzierenden Bedingungen im Sediment Buntsandstein wurden längere Lag-Phasen in Anwesenheit von Benzotriazolen beobachtet. Dabei begann der EG-Abbau in Anwesenheit von Benzo- und Tolyltriazol 49 bzw. 63 Tage später als im Kontrollexperiment. In weiteren Experimenten zur Wirkungsbeziehung verschiedener Benzo- und Tolyltriazol-Konzentrationen konnten die beobachteten Hemmeffekte unter nitratreduzierenden Bedingungen sowohl bei 12°C als auch bei Raumtemperatur nicht reproduziert werden. In Versuchsansätzen mit Sediment Mergel wurde unter fast allen Redoxbedingungen kein Hemmeffekt der Benzotriazole beobachtet. Ausnahme davon waren Ansätze unter gärenden Bedingungen, wo die Ergebnisse eine hemmende Wirkung der Benzotriazole auf die weitere Umsetzung von Acetaldehyd (Zwischenprodukt des Ethylenglykolabbaus) hindeuteten.

Aus den Mikrokosmenexperimenten ging klar hervor, dass in tiefen Aquiferen Mikroorganismen vorhanden waren, deren Aktivität unter bestimmten Redoxbedingungen stark durch Benzotriazole beeinträchtigt werden konnte.

5.2 Einleitung

In Wärmeträgerflüssigkeiten für Erdwärmesonden werden neben der Hauptkomponente (Frostschutzmittel) zahlreiche Zusatzstoffe (Additive), darunter die Korrosionsinhibitoren Benzotriazol (BT) und Tolyltriazol (TT) eingesetzt. In vorläufigen Abbauxperimenten der aktuellen Arbeit zeigten sich BT und TT in Sedimenten aus Grundwasseraquiferen als persistent gegenüber mikrobiellem Abbau unter verschiedenen Redoxbedingungen (Details s. Kapitel 4). Aufgrund ihrer Persistenz können Benzotriazole, im Falle einer Leckage von Erdwärmesonden, sich schnell in Grundwasseraquiferen verbreiten und die Qualität des Grundwassers beeinträchtigen. Außerdem sind Benzotriazole toxisch für aquatische Organismen (Pillard et al., 2001). In Studien zur Ökotoxizität von Flugzeugenteisungsmitteln wurde nachgewiesen, dass BT und TT die Inhaltsstoffe mit der größten Hemmwirkung gegenüber Bakterien waren (Cancilla et al., 1997). Zudem wurde eine Hemmung der Nitrifikation bereits in Anwesenheit von 10 mg/l BT und TT deklariert (Callender and Davis, 2002; Puttanna et al., 1999). In weiteren Untersuchungen wurde der Hemmeffekt der Benzotriazole auf den Abbau des Frostschutzmittels Propylenglykol demonstriert (Cornell et al., 2000; Gruden et al., 2001; Jia et al., 2006; Klotzbücher et al., 2007). In der Studie von Klotzbücher et al. (2007) wurde eine Beeinträchtigung des Abbaus von mikrobiellen Gemeinschaften aus tiefen Grundwasseraquiferen in Anwesenheit von Additiven dokumentiert. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Verlangsamung des anaeroben Abbaus von Propylenglykol in einer kommerziell erhältlichen Wärmeträgerflüssigkeit (Pekasol L, Pro Kühlsole GmbH, Alsdorf, Deutschland) verglichen mit der Reinsubstanz (Klotzbücher et al., 2007). Ähnliche Hemmeffekte müssen also auch für die mikrobiellen Gemeinschaften in Grundwasseraquiferen erwartet werden. Mitunter ist es problematisch aus Experimenten mit kommerziellen Mischungen Rückschlüsse auf die Wirksamkeit einzelner Inhaltsstoffe zu ziehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Sedimentmikrokosmen verwendet, um den potentiellen Einfluss von BT und/oder TT auf den mikrobiellen Abbau der Hauptkomponente Ethylenglykol unter typisch für tiefe Aquifere Bedingungen zu untersuchen.

5.3 Material und Methoden

Details zu „Probenahme und Probenvorbereitung“, „Kulturmedien“, „Mikrokosmenexperimente“, „Versuchsansätze“ sowie Analyseverfahren sind Kapitel 3 zu entnehmen.

Chemikalien

1H-Benzotriazol (Reinheitsgrad 98 %) und Tolyltriazol (Reinheitsgrad > 99 %) wurden bei Sigma-Aldrich bzw. TCI Europe N.V. bestellt. Alle anderen verwendeten Chemikalien sind in Tab. A-1 im Anhang aufgeführt

Stammlösungen

Die verwendeten Stammlösungen sind dem Unterkapitel 4.2.3 im Kapitel 4 zu entnehmen.

Versuchsansätze

Die jeweiligen Versuchsansätze sind im folgenden Unterkapitel entsprechend dargestellt.

5.4 Ergebnisse und Diskussion

Der Einfluss von Benzotriazol (BT) und Tolyltriazol (TT) auf den mikrobiellen Abbau von Ethylenglykol (EG) wurde in Mikrokosmenexperimenten unter oxischen und anoxischen Bedingungen untersucht. Die als Inokulum verwendeten Sedimente, Buntsandstein und Mergel, stammten aus 60 bzw. 70 m Tiefe zwei verschiedener Grundwasseraquifere. In Abwesenheit von Sauerstoff wurden zur Stimulierung verschiedener Redoxbedingungen Nitrat, Sulfat oder Ferrihydrit als alternative Elektronenakzeptoren (EA) zugegeben. In Versuchsansätzen, denen keine EA zugegeben wurden, wurde die Aktivität gärender Mikroorganismen untersucht. Begleitend zu jeder Redoxbedingung

wurden eine Steril- und eine Blank-Kontrolle (ohne organische Substrate) angesetzt. Alle Versuchsansätze wurden bei 12°C inkubiert.

5.4.1 Oxische Bedingungen

Die Versuchsanordnung zum Einfluss von BT und TT auf den aeroben EG-Abbau ist in Tab. 5-1 dargestellt.

Tabelle 5-1: Versuchsanordnung zum Einfluss von Benzotriazolen auf den aeroben Ethylenglykolabbau.

Inokulum	Versuchsansätze
10 % Sediment Mergel	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µM BT + 50 µM TT + 5 mM EG (drei Replikate) • Kontroll-Experiment: 5 mM EG (drei Replikate)

BT: Benzotriazol, TT: Tolyltriazol, EG: Ethylenglykol.

Eine geringe Abnahme (zwischen 12 und 30 %) der BT- Konzentration wurde in allen drei Replikaten beobachtet. Die TT-Konzentration blieb innerhalb der Inkubationszeit von 20 Tagen konstant (Details sind Kapitel 4 zu entnehmen).

EG wurde sowohl in An- als auch in Abwesenheit (Abb. 5-1) von Benzotriazolen innerhalb von 20 Tagen Inkubationszeit komplett abgebaut. Mittels HPLC wurden keine organischen Abbauprodukte detektiert, was auf den vollständigen Abbau von EG zu CO₂ hindeutete. Die EG-Konzentration in der Steril-Kontrolle änderte sich innerhalb der Inkubationszeit nicht. Aus den Ergebnissen ging hervor, dass unter den untersuchten Bedingungen die beiden Benzotriazole keinen Einfluss auf den mikrobiellen EG-Abbau hatten.

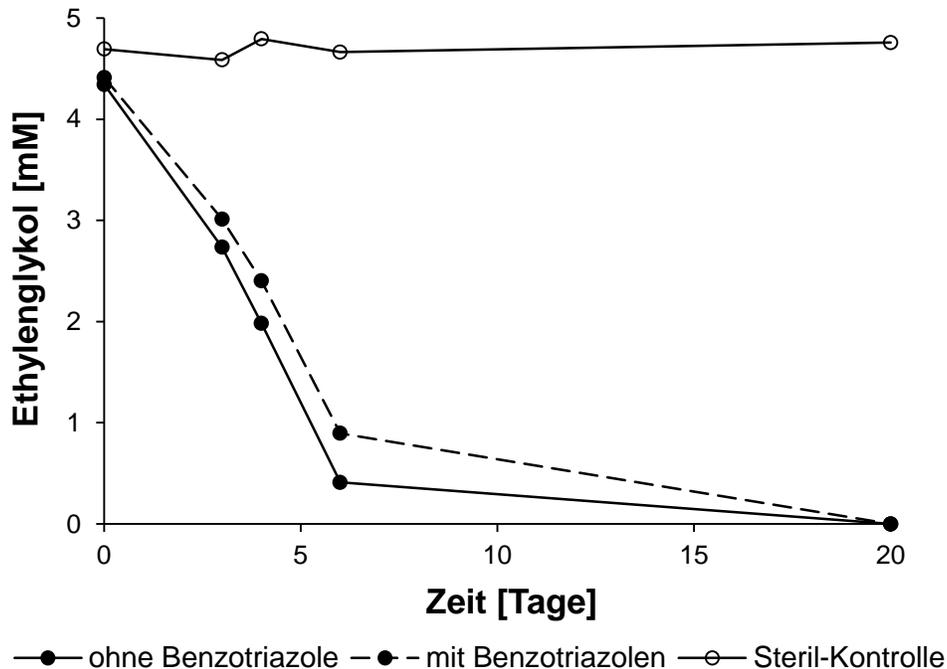


Abbildung 5-1: Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol in Ab- und Anwesenheit von Benzotriazolen unter oxischen Bedingungen. Die Daten sind repräsentativ für jeweils drei parallele Ansätze.

5.4.2 Zugabe von Nitrat als Elektronenakzeptor

Die Versuchsansätze unter Zugabe von 10 mM Nitrat sind in Tab. 5-2 dargestellt.

Tabelle 5-2: Versuchsansätze zum Einfluss von Benzotriazolen auf den mikrobiellen Abbau von Ethylenglykol in Ansätzen mit Nitrat.

Inokulum	Versuchsansätze
10 % Sediment* Buntsandstein	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µM BT + 5 mM EG (zwei Replikate) • 50 µM TT + 5 mM EG (zwei Replikate) • Kontroll-Experiment: 5 mM EG (zwei Replikate)
10 % Sediment Mergel	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µM BT + 50 µM TT + 5 mM EG (drei Replikate) • Kontroll-Experiment: 5 mM EG (drei Replikate)

BT: Benzotriazol, TT: Tolyltriazol, EG: Ethylenglykol. *Das verwendete Inokulum war bereits durch ein Vorexperiment an den Abbau von EG unter nitratreduzierenden Bedingungen adaptiert.

Die BT- und TT-Konzentrationen änderten sich in keinem der Ansätze innerhalb von 15 Tagen Inkubationszeit (Details sind Kapitel 4 zu entnehmen).

Wie in Abb. 5-2 a zu erkennen ist, verlief der EG-Abbau in den Ansätzen mit BT sowie TT langsamer als in den Versuchsansätzen ohne Zugabe von Korrosionsinhibitoren (Kontroll-Experiment). Im Kontroll-Experiment wurde EG nach einer lag-Phase von

weniger als zwei Tagen innerhalb von acht Tagen Inkubationszeit komplett abgebaut. Dabei betrug die maximale Abbaurate 1 mM EG/Tag (Durchschnittswert aus zwei parallelen Ansätzen). In Anwesenheit von TT setzte der EG-Abbau dagegen vier Tage nach dem Inkubationsbeginn ein. Acht Tage und somit am längsten dauerte die lag-Phase des EG-Abbaus in Anwesenheit von BT. In Anwesenheit von BT oder TT dauerte der EG-Abbau fast doppelt so lang (15 Tage) verglichen mit dem Kontroll-Experiment. Dazu war die maximale EG-Abbaurrate in Anwesenheit von BT oder TT niedriger (jeweils 0,7 mM EG/Tag; Durchschnittswert jeweils aus zwei Replikaten) als im Kontroll-Experiment (1 mM). In keinem der Ansätze wurden bei der HPLC-Analyse organische Abbauprodukte detektiert, was auf einen vollständigen Abbau des Frostschutzmittels zu CO₂ hindeutete. Eine Abnahme der Nitratkonzentration in Anwesenheit von BT und TT setzte acht bzw. vier Tagen nach dem Inkubationsbeginn ein (Abb. 5-2 b). Pro Mol oxidiertes EG wurden in allen Ansätzen zwischen 1,4 und 1,6 mM Nitrat reduziert. Nitrit wurde innerhalb der Inkubationszeit (15 Tage) nicht detektiert. Die Stöchiometrie des EG-Abbaus (s. Tab. 5-3) in den Experimenten entsprach annähernd dem vollständigen EG-Abbau zu CO₂ unter Reduktion von Nitrat zu N₂:

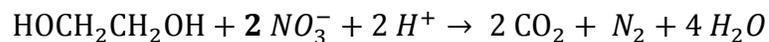


Tabelle 5-3: Stöchiometrie des Ethylenglykolabbaus in Ab- und Anwesenheit von Benzotriazol oder Tolyltriazol in Ansätzen mit Nitrat und Sediment Buntsandstein.

Experiment (Replikat Nr.)	Nitrat (verbraucht) [mM]	Ethylenglykol (verbraucht) [mM]	Molares Verhältnis**
Kontrolle* (1)	7,8	4,9	1,6
Kontrolle* (2)	8,2	5,0	1,6
+TT (1)	7,1	5,0	1,4
+TT (2)	7,2	5,1	1,4
+BT (1)	7,9	5,3	1,5
+BT (2)	7,8	5,5	1,4

BT: Benzotriazol, TT: Tolyltriazol. *Experiment ohne Zugabe von Korrosionsinhibitoren, **zeigt die molare Konzentration von Nitrat, die bei der Oxidation von 1 mM Ethylenglykol reduziert wurde.

Aus der Bilanzierung geht hervor, dass 70 bis 80 % der Elektronen aus dem EG-Abbau in die Nitratreduktion geflossen sind. Da das Medium vorher nicht reduziert wurde und die Anwesenheit von Sauerstoff im Sediment zum Inkubationsbeginn nicht komplett ausgeschlossen werden konnte, ist möglich, dass die fehlenden 20 bis 30 % der Elektronen an Sauerstoff als EA abgegeben wurden.

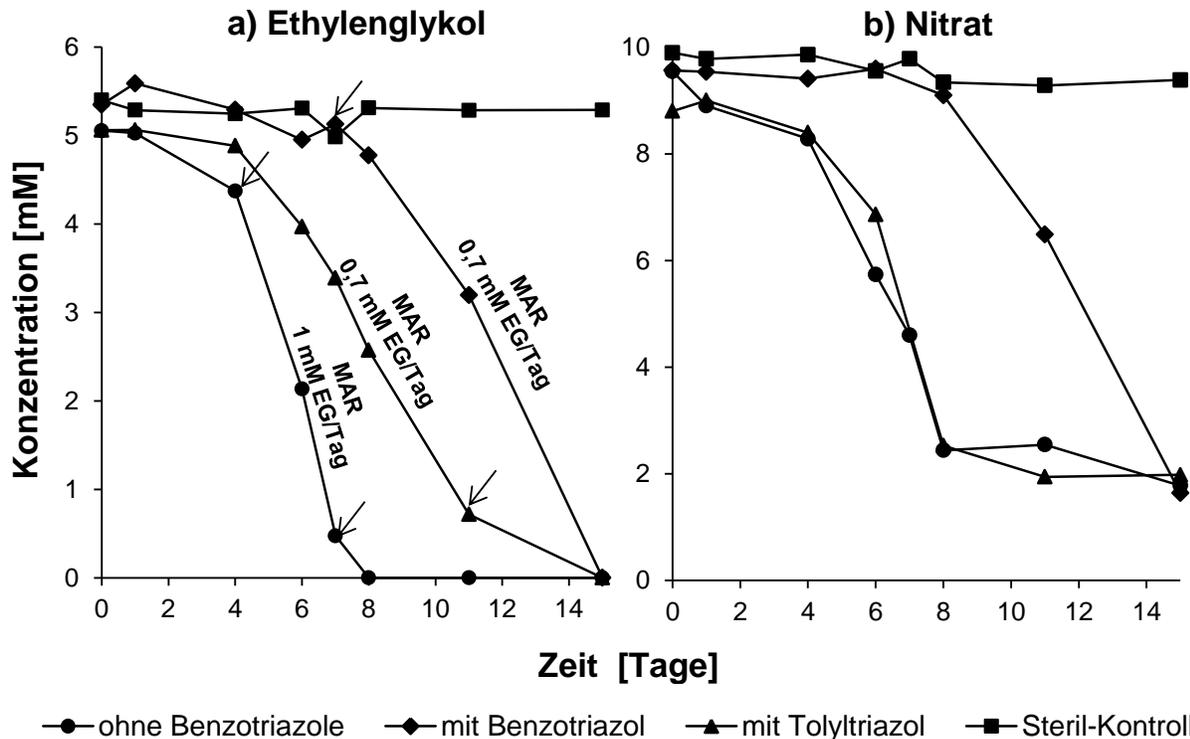


Abbildung 5-2: a) Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol in Ab- und Anwesenheit von Benzo- oder Tolyltriazol, b) gleichzeitige Abnahme der Nitratkonzentration. Als Inokulum wurde Sediment Buntsandstein verwendet. Eine verlängerte lag-Phase ist in Anwesenheit von Benzo- sowie von Tolyltriazol erkennbar. MAR: Maximale Abbaurates von Ethylenglykol (ermittelt für die Steigung (mit Pfeilen markierter Bereiche) der jeweiligen EG-Kurven). Die Daten sind repräsentativ für jeweils zwei parallele Ansätze.

Des Weiteren wurde der Einfluss von BT und TT auf den EG-Abbau in Ansätzen mit Sediment Mergel untersucht. Sowohl in Ab- (Abb. 5-3 a) als auch in Anwesenheit (Abb. 5-3 b) von Benzotriazolen setzte der EG-Abbau fünf Tage nach dem Inkubationsbeginn ein. Dabei wurde das Frostschutzmittel innerhalb von acht bis zwölf Tagen Inkubationszeit komplett abgebaut. Für die Oxidation von 1 mM EG wurden in allen Ansätzen durchschnittlich 1,7 mM Nitrat reduziert. Am Inkubationsende wurde in allen Ansätzen Nitrit in geringer Konzentration (bis 3 mM) detektiert. Eine Bilanzierung des EG-Abbaus mit Nitrat als EA in den Ansätzen mit Sediment Mergel wurde im Kapitel 3 (s. Tab. 3-3) eingehend diskutiert. Daraus ging hervor, dass mehr als 85 % der Elektronen aus dem EG-Abbau an Nitrat abgegeben wurden.

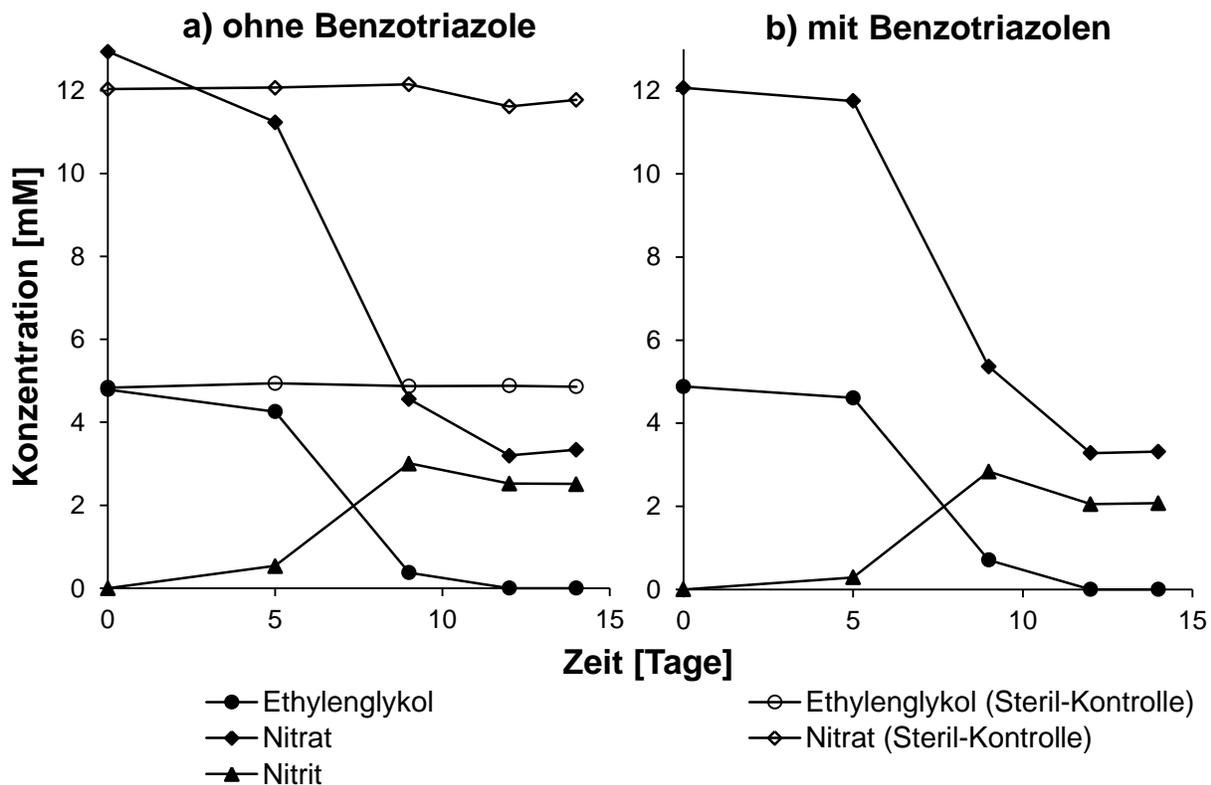


Abbildung 5-3: Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol gekoppelt an Nitratreduktion in a) Ab- und b) Anwesenheit von Benzotriazolen im Experiment mit Nitrat und Sediment Mergel. Die Daten sind repräsentativ für jeweils drei parallele Ansätze.

Die Ergebnisse mit Sediment Buntsandstein wiesen darauf hin, dass in diesem Aquifer Mikroorganismen anwesend waren, die empfindlich gegenüber den untersuchten Benzotriazolen waren. Die Verzögerung in der Nitratreduktion in Anwesenheit von BT und TT könnte ein Indiz für die hemmende Wirkung beider Benzotriazole auf die Denitrifikation sein. Bisher sind aus der Literatur keine Studien bekannt, die sich mit dem Einfluss von Benzotriazolen auf die Denitrifikation beschäftigten.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen mit Sediment Buntsandstein, zeigten die Ansätze mit Sediment Mergel keinen Einfluss der Benzotriazole auf die Lag-Phase und die EG-Abbauraten. Die unterschiedlichen Befunde könnten in der Anwesenheit verschiedener mikrobieller Populationen an beiden Standorten begründet sein, deren Toleranz gegenüber Benzotriazolen unterschiedlich stark ausgeprägt war.

5.4.3 Zugabe von Ferrihydrit als Elektronenakzeptor

Die Versuchsanordnung bei Zugabe von 50 mM Ferrihydrit (Fe (III)) ist in Tab. 5-4 dargestellt.

Tabelle 5-4: Versuchsanordnung zum Einfluss der Benzotriazole auf den Ethylenglykolabbau in Ansätzen mit 50 mM Ferrihydrit.

Inokulum	Versuchsansätze
10 % Sediment Mergel	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µM BT + 50 µM TT + 5 mM EG (drei Replikate) • Kontroll-Experiment: 5 mM EG (drei Replikate)

BT: Benzotriazol, TT: Tolyltriazol, EG: Ethylenglykol.

Das Frostschutzmittel wurde in allen untersuchten Ansätzen innerhalb von 39 Tagen Inkubationszeit zu Acetat umgesetzt (Abb. 5-4 a und Abb. 5-4 b). Die prozentuelle Wiederfindung des EG-Kohlenstoffs in Form von Acetat lag am Tag 39 der Inkubation zwischen 75 und 85 %. Sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von BT und TT wurde in den ersten 39 Tagen der Inkubation nur eine geringfügige Bildung von Fe (II) (zwischen 2 und 4 mM) registriert. Die Ergebnisse zum mikrobiellen EG-Abbau ohne Korrosionsinhibitoren bei Zugabe von Fe (III) sind im Kapitel 3 eingehend diskutiert. Es wurde gezeigt, dass EG fermentativ abgebaut wurde (Kapitel 3).

Acetat wurde in allen Ansätzen innerhalb von 200 Tagen Inkubationszeit gekoppelt an Eisenreduktion weiter abgebaut. Sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Benzotriazolen wurden pro Mol oxidiertes Acetat durchschnittlich aus drei parallelen Ansätzen 8 mM (\pm 0,8 mM) Fe (II) gebildet, was der Stöchiometrie des vollständigen Abbaus von Acetat zu CO₂ mit der Reduktion von Fe (III) zu Fe (II) entsprach. Acetat wurde mit einer maximalen Rate von 0,04 mM/Tag (Mittelwert aus drei Parallelen) sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von Benzotriazolen abgebaut.

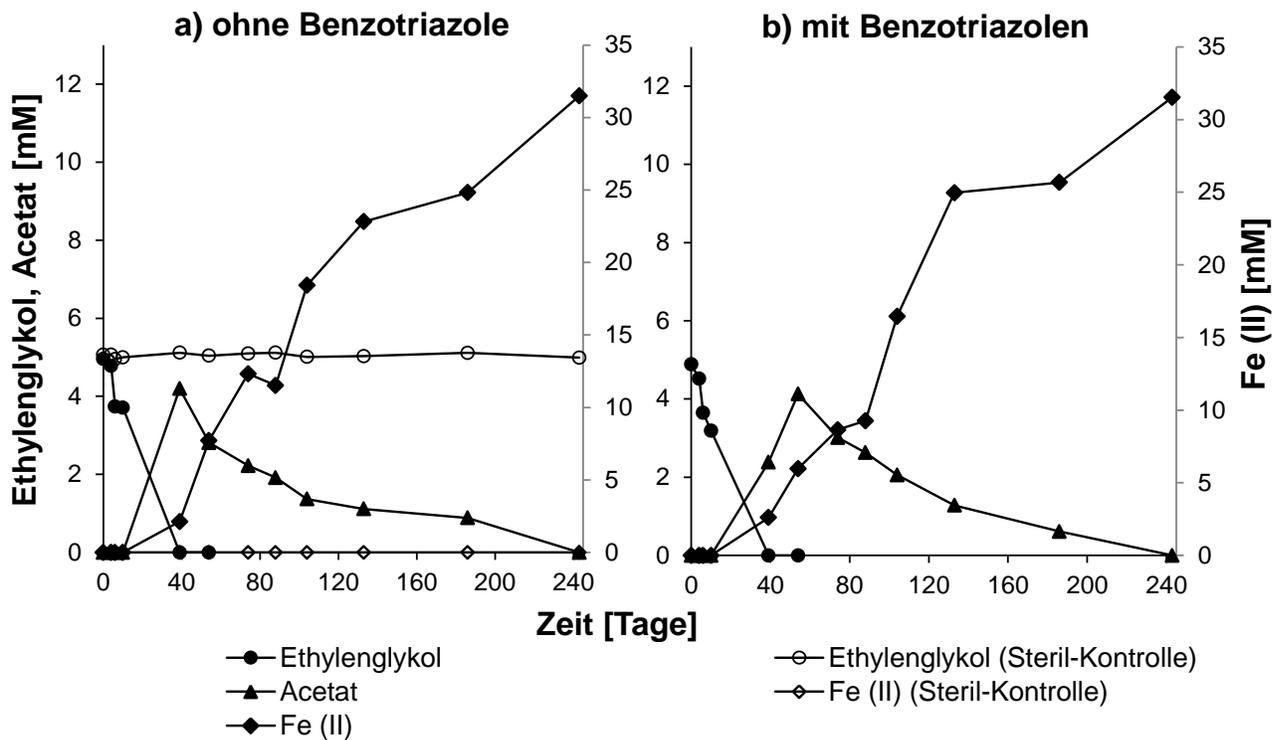


Abbildung 5-4: Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol in a) Ab- und b) Anwesenheit von Benzotriazolen im Experiment mit Fe (III). Die Daten sind repräsentativ für drei parallele Ansätze.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass beide Benzotriazole (je 50 µM) keine Veränderung im EG- sowie im Acetat-Abbau unter den untersuchten Bedingungen bewirkten.

5.4.4 Zugabe von Sulfat als Elektronenakzeptor

Die Versuchsansätze, denen 10 mM Sulfat als EA zugegeben wurde, sind in Tab. 5-5 dargestellt.

Tabelle 5-5: Versuchsordnung zum Einfluss von Benzo- und Tolyltriazol auf den Ethylenglykolabbau in Ansätzen mit 10 mM Sulfat.

Inokulum	Versuchsansätze
10 % Sediment* Buntsandstein	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µM BT + 5 mM EG (drei Replikate) • 50 µM TT + 5 mM EG (drei Replikate) • Kontroll-Experiment: 5 mM EG (drei Replikate)
10 % Sediment Mergel	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µM BT + 50 µM TT + 5 mM EG (drei Replikate) • Kontroll-Experiment: 5 mM EG (drei Replikate)

BT: Benzotriazol, TT: Tolyltriazol, EG: Ethylenglykol. *das verwendete Inokulum war bereits durch ein Vorexperiment an den EG-Abbau mit Sulfat als Elektronenakzeptor adaptiert.

Die Daten in Abb. 5-5 a repräsentieren den EG-Abbau in zwei der drei parallelen Ansätze mit Sediment Buntsandstein. Zu erkennen ist eine längere lag-Phase des EG-Abbaus in Anwesenheit von BT (138 Tage) und TT (152 Tage) im Gegensatz zum Kontroll-Experiment (89 Tage). Danach folgte in allen Ansätzen eine rasche Abnahme der EG-Konzentration. Nach insgesamt 227 Tagen Inkubationszeit wurden in Ab- sowie in Anwesenheit von BT oder TT entsprechend 91, 79 und 73 % des zugesetzten EG abgebaut. In allen Ansätzen nahm die Sulfatkonzentration über den Versuchszeitraum ab (Abb. 5-5 b). Pro Mol oxidiertes EG wurden in den Ansätzen ohne und mit Benzotriazolen 1,1 mM Sulfat (Mittelwert aus jeweils zwei parallelen Ansätzen) reduziert, was der stöchiometrischen Menge an Sulfat entsprach, die für die Mineralisierung von 1 mM EG erforderlich war.

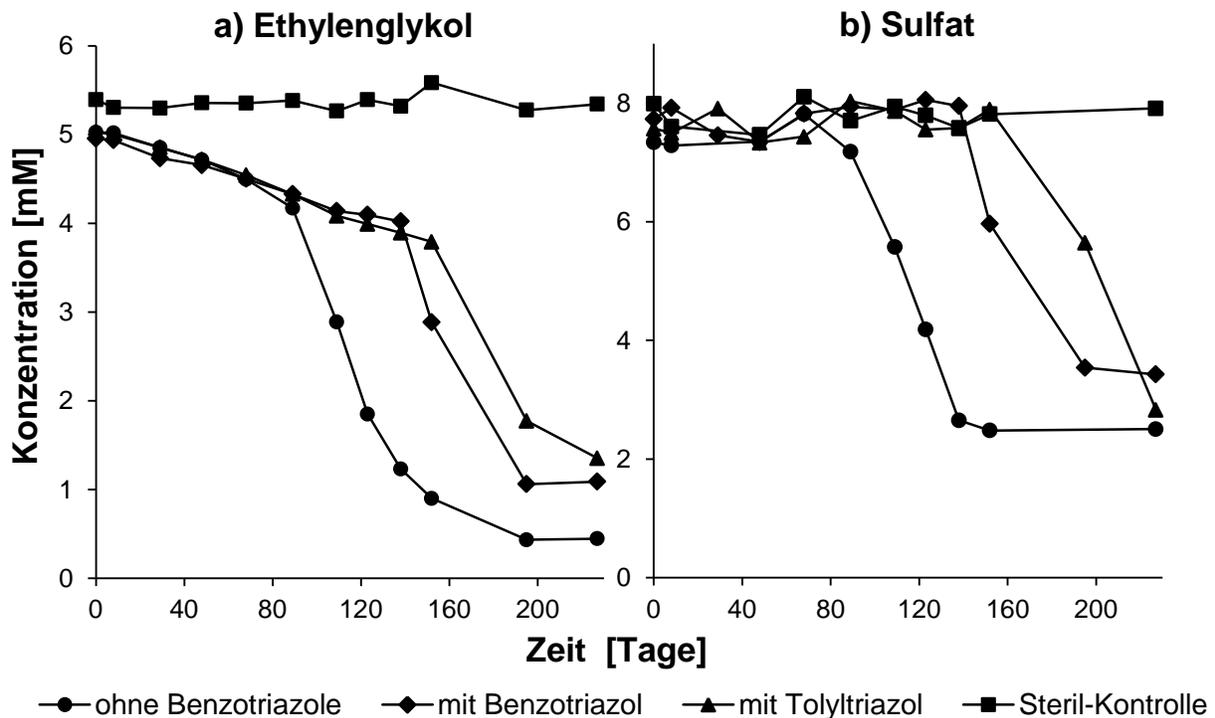


Abbildung 5-5: a) Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol in Ab- und Anwesenheit von Benzo- oder Tolyltriazol, b) Abnahme der Sulfatkonzentration im Zuge des Abbaus von Ethylenglykol. Als Inokulum wurde Sediment Buntsandstein verwendet. Die Daten sind repräsentativ für zwei von jeweils drei parallelen Ansätzen.

Wie oben erwähnt, verhielt sich der EG-Abbau in jeweils einem der drei parallelen Mikrokosmen anders. In Abwesenheit von BT und TT war die Anlaufphase im abweichenden Mikrokosmos signifikant kürzer (8 Tage) als in den anderen zwei

parallelen Mikrokosmen (89 Tage). Nach insgesamt 123 Tagen Inkubationszeit wurden im einzelnen Mikrokosmos 72 % des Frostschutzmittels abgebaut. Bis zum Inkubationsende (bei Tag 227) wurde keine weitere Abnahme der EG-Konzentration beobachtet. Sehr ähnlich zu diesem Mikrokosmos verlief der EG-Abbau in einem der Ansätze mit TT. In diesem Ansatz wurde eine sehr kurze lag-Phase (8 Tage) im Gegensatz zu den zwei weiteren parallelen Mikrokosmen mit TT (135 Tage) beobachtet. Nach der Anpassungsphase wurden im abweichenden Ansatz 73 % des zugesetzten Ethylenglykols innerhalb von 115 Tagen Inkubationszeit abgebaut. Bis zum Inkubationsende wurde kein weiterer EG-Abbau beobachtet. In Anwesenheit von BT wurde in einem der Ansätze zum Inkubationsende (bei Tag 227) weniger als 1,7 mM EG abgebaut, was etwa 33 % der zugesetzten EG-Konzentration ausmachte.

Auffällig bei diesen Mikrokosmenexperimenten war, dass sich die parallelen Ansätze nicht einheitlich verhielten. Wie schon im Kapitel 3 diskutiert, zeigen vermutlich einige Vertreter der SRB unter den gewählten Bedingungen längere Anpassungszeiten als andere. Die Unterschiede könnten in heterogenen Mikroorganismenpopulationen in den parallel angesetzten Mikrokosmen begründet sein. Allerdings handelte es sich beim Inokulum um eine sehr dickflüssige Sedimentsuspension. Jedoch war die Anlaufphase in zwei der Ansätze mit TT fast 70 Tage länger als in den Kontroll-Mikrokosmen. Das ist ein Indiz darauf, dass in den Mikrokosmen mit TT auch Mikroorganismen mit einer höheren Empfindlichkeit zum TT vorhanden waren. In Anwesenheit von BT wurden dagegen in allen Ansätzen längere Anlaufphasen im Vergleich zu den drei Versuchsansätzen ohne Benzotriazole beobachtet, was eine hemmende Wirkung von BT auf den EG-Abbau belegte.

In Abb. 5-6 a und Abb. 5-6 b sind Versuchsansätze mit Sediment Mergel dargestellt. EG wurde in allen Ansätzen innerhalb von 44 Tagen Inkubationszeit komplett zu Acetat abgebaut. Am Inkubationsende lag die Kohlenstoffwiederfindung als Acetat zwischen 85 und 100 % des zugesetzten EG. Ethanol bildete sich in allen Ansätzen als Intermediat des EG-Abbaus. Mehrheitlich wurde keine Sulfatabnahme beobachtet. Die Interpretation der Ergebnisse ist in Kapitel 3 zu finden.

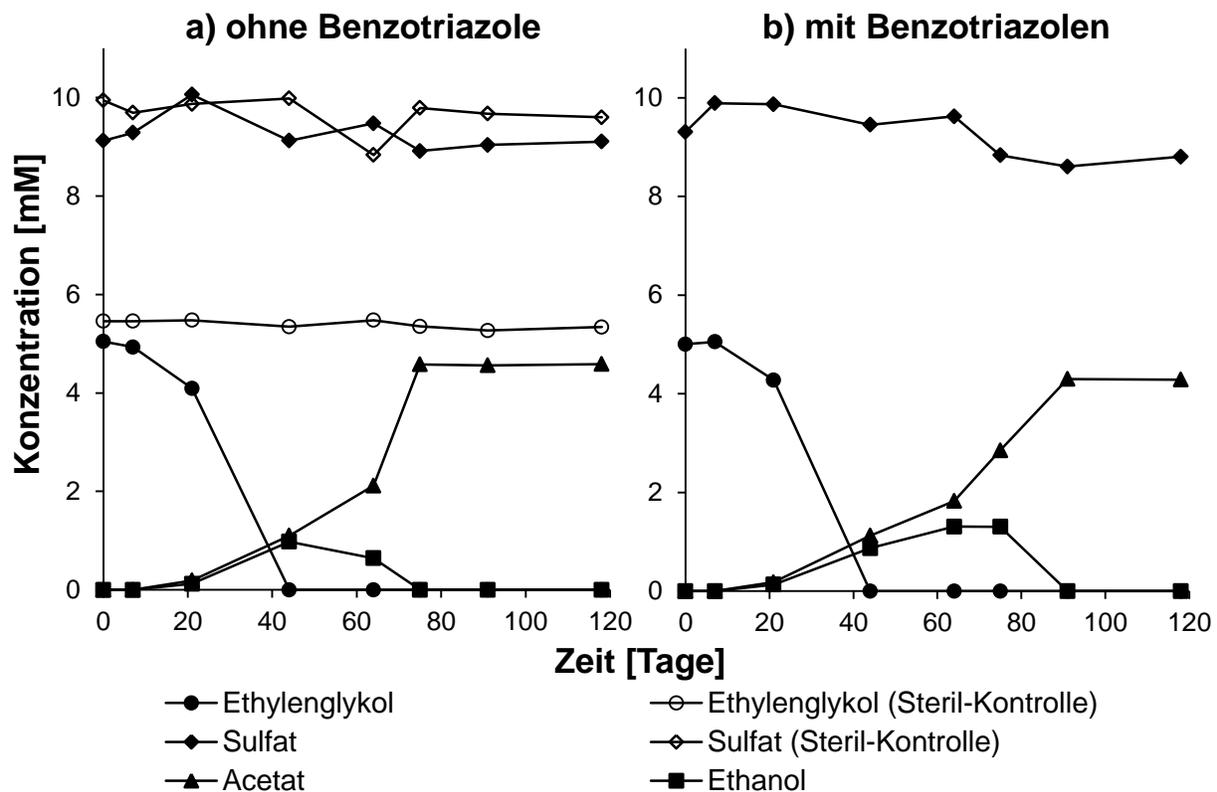


Abbildung 5-6: Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol in a) Ab- und b) Anwesenheit von Benzotriazolen im Experiment mit Sulfat und Sediment Mergel. Die Daten sind repräsentativ für jeweils drei parallele Ansätze.

Der Hemmeffekt der Benzotriazole wurde in Abbaueversuchen mit Sediment Mergel nicht reproduziert. Wie schon im Kapitel 3 diskutiert, spielte die Sulfatreduktion in diesem Sediment nur eine untergeordnete Rolle, wobei am EG-Abbau hauptsächlich gärende Mikroorganismen beteiligt waren. Im Sediment Buntsandstein war der EG-Abbau dagegen an Sulfatreduktion gekoppelt. Diese Befunde sind ein weiterer Hinweis auf standortspezifische mikrobielle Gemeinschaften, die sich einerseits in ihrer metabolischen Kapazität und andererseits in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Benzotriazolen unterschieden.

5.4.5 Gärende Bedingungen

Die Versuchsanordnung zum Einfluss von BT und TT auf den EG-Abbau unter gärenden Bedingungen ist in Tab. 5-6 dargestellt.

Tabelle 5-6: Versuchsanordnung zum Einfluss der Benzotriazole auf den Ethylenglykolabbau unter gärenden Bedingungen.

Inokulum	Versuchsansätze
10 % Sediment Mergel	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µM BT + 50 µM TT + 5 mM EG (drei Replikate) • Kontroll-Experiment: 5 mM EG (drei Replikate)

BT: Benzotriazol, TT: Tolyltriazol, EG: Ethylenglykol.

In Abwesenheit von Benzotriazolen wurde EG innerhalb von 48 Tagen Inkubationszeit komplett abgebaut (Abb. 5-7 a). Dabei wurden 95 % des umgesetzten EG-Kohlenstoffs (5 mM) in Acetat wiedergefunden. Ethanol wurde einmalig als Zwischenprodukt detektiert (Details s. Kapitel 3).

Abweichend verlief der EG-Abbau in zwei der Ansätze mit Benzotriazolen. Wie in Abb. 5-7 b zu sehen ist, setzte der EG-Abbau 13 Tage später als im Kontroll-Experiment (ohne Benzotriazole) ein. Zwischen Tag 20 und 63 der Inkubation nahm die EG-Konzentration in beiden Mikrokosmen um 43 % und 86 % ab. Dabei lag zum Inkubationsende (118 Tage) im Gegensatz zum Kontroll-Experiment noch restliches Frostschutzmittel (0,2 bis 1 mM) vor. In Anwesenheit von Benzotriazolen akkumulierte Acetaldehyd (Abb. 5-7 b). Zum Inkubationsende (bei Tag 118) wurden Acetaldehyd-Konzentrationen von bis zu 2,4 mM gemessen. Acetat und Ethanol wurden in kleinen Mengen (< 0,6 mM) detektiert.

In einem einzelnen Ansatz wurde keine Akkumulierung von Acetaldehyd beobachtet, stattdessen wurde EG innerhalb von 48 Tagen komplett zu Acetat abgebaut (Wiederfindung von 91% des EG-Kohlenstoffs in Acetat, Daten nicht gezeigt).

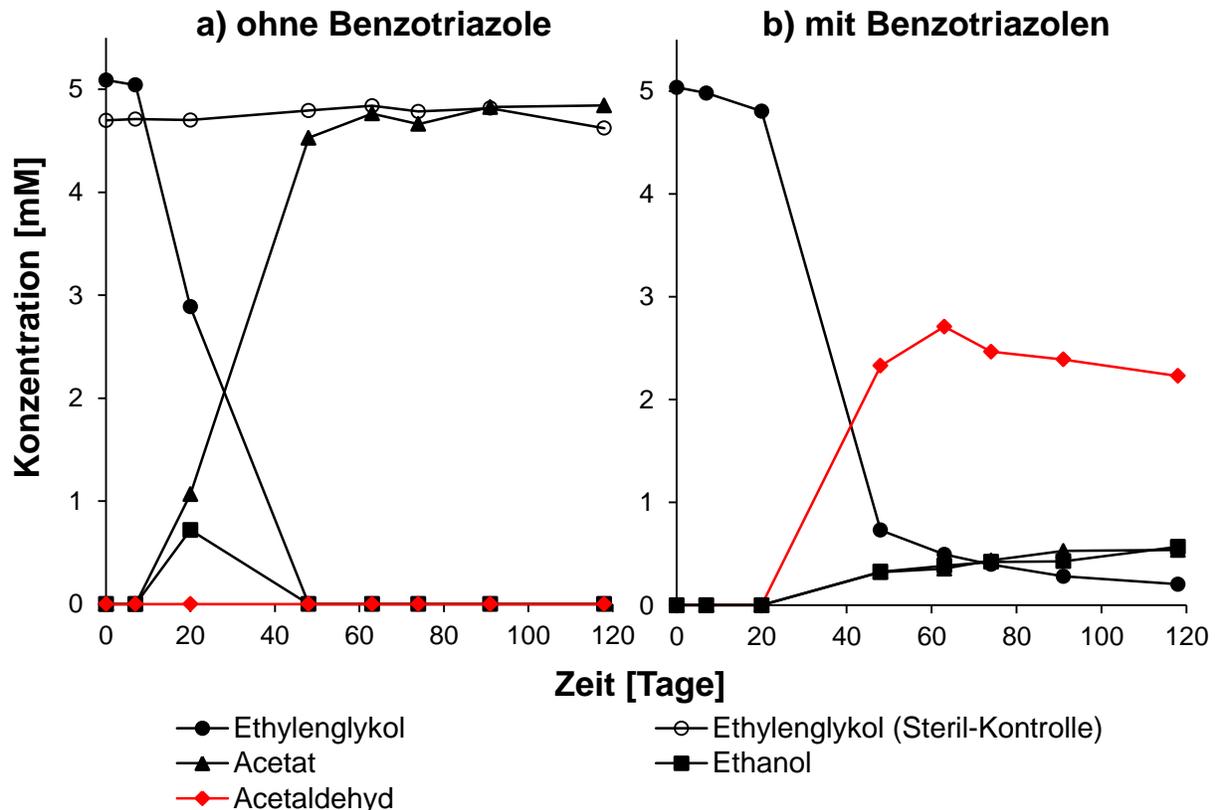


Abbildung 5-7 Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol unter gärenden Bedingungen in a) Ab- und b) Anwesenheit von Benzotriazolen sowie Akkumulierung von Acetaldehyd in Anwesenheit von Benzotriazolen. Die Kurven in Ab- und Anwesenheit von Benzotriazolen sind repräsentativ für drei bzw. zwei der drei parallelen Ansätze.

Acetaldehyd entsteht typischerweise als Intermediat des fermentativen EG-Abbaus (infolge einer Dehydratisierung von EG). Anschließend wird durch Disproportionierung die eine Hälfte des Acetaldehyds zu Acetat oxidiert (Elektronen werden freigesetzt) und die andere zu Ethanol reduziert (Elektronen werden aufgenommen) (Dwyer and Tiedje, 1983; Schink and Stieb, 1983; Toraya et al., 1979). Die Oxidation von Acetaldehyd umfasst die folgenden drei Reaktionen (Toraya et al., 1979): 1) Oxidation von Acetaldehyd zu Acetyl-CoA, katalysiert durch das Enzym CoA-abhängige Aldehyddehydrogenase 2) Transacetylierung (Übertragung der Acetylgruppe) auf anorganische Phosphate mit der Bildung von Acetylphosphate, katalysiert durch eine Phosphotransacetylase und 3) Hydrolisierung der Acetylphosphate zu Acetat (unter Bildung von ATP), katalysiert durch die Acetatkinase. In vorhergehenden Studien wurde eine Akkumulierung von Acetaldehyd beobachtet, wenn die Co-Faktoren NAD^+ oder

CoA (oxidativer Teil der Reaktion) aus dem Reaktionssystem ausgelassen wurden (Toraya et al., 1979). In Abwesenheit von $MgCl_2$ (Katalysator der Reaktion Acetylphosphat \rightarrow Acetat) akkumulierte Acetaldehyd nur teilweise, wobei in kleinen Mengen Acetat und Ethanol detektiert wurden (Toraya et al., 1979). In der aktuellen Studie wurde in Anwesenheit von Benzotriazolen ebenfalls eine teilweise Akkumulierung von Acetaldehyd beobachtet. In allen Versuchsansätzen der aktuellen Studie war allerdings $MgCl_2$ (0,3 mg/l) als Bestandteil im Mineralmedium vorhanden. Da allgemein Benzotriazole die Fähigkeit haben zweiwertige Metall-Ionen zu komplexieren, besteht die Möglichkeit einer Hemmung spezifischer Enzymreaktionen durch Benzotriazole. Um den Grund für die Akkumulierung des toxischen Intermediats Acetaldehyd abschließend aufzuklären, sind eingehende Untersuchungen zum biochemischen Wirkungsmechanismus der Benzotriazole erforderlich.

Aus den Mikrokosmenexperimenten ging klar hervor, dass in tiefen Aquiferen gärende Mikroorganismen vorhanden waren, deren Aktivität stark durch Benzotriazole beeinträchtigt werden konnte.

5.4.6 Wirkungsbeziehung

In vorherigen Experimenten unter nitratreduzierenden Bedingungen wurde eine Verzögerung des EG-Abbaus in Anwesenheit von 50 μM BT oder TT gezeigt. Um die Wirkungsbeziehung zwischen Benzotriazolen und dem EG-Abbau zu untersuchen, wurden Experimente mit drei verschiedenen BT- und TT-Konzentrationen unter nitratreduzierenden Bedingungen durchgeführt. Die Versuchsansätze sind in Tab. 5-7 aufgeführt.

Tabelle 5-7: Versuchsanordnung zur Wirkungsbeziehung zwischen verschiedenen BT- und TT-Konzentrationen und dem Ethylenglykolabbau unter nitratreduzierenden Bedingungen.

Inokulum	Versuchsansätze (jeweils zwei Replikate)
10 % Sediment* Buntsandstein	<ul style="list-style-type: none"> • 5 μM BT oder TT+5 mM EG • 50 μM BT oder TT + 5 mM EG • 500 μM BT oder TT + 5 mM EG • Kontroll-Experiment: 5 mM EG

BT: Benzotriazol, TT: Tolyltriazol, EG: Ethylenglykol. *das Inokulum wurde durch zwei vorangehende Experimente an den EG-Abbau unter nitratreduzierenden Bedingungen adaptiert.

Alle BT- und TT-Konzentrationen blieben bis zum Inkubationsende (am Tag 45) konstant. Die EG-Konzentration änderte sich in der Steril-Kontrolle innerhalb von 45 Tagen Inkubationszeit nicht.

Das Frostschutzmittel wurde sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von BT oder TT (alle Konzentrationen) innerhalb von 45 Tagen Inkubationszeit komplett abgebaut (Abb. 5-8). Die Abbaurate (die Steigung der Kurven, $R^2 > 0,95$) war sehr gering und lag bei durchschnittlich 0,1 mM/Tag (Mittelwert aus jeweils zwei parallelen Ansätzen). Das zugesetzte Nitrat (10 mM) wurde in allen Ansätzen komplett verbraucht. Nitrit wurde in keinem der Ansätze detektiert, was auf eine vollständige Reduktion von Nitrat zu molekularem Stickstoff (N_2) hindeutete. Daraus ging laut Stöchiometrie hervor, dass pro Mol oxidiertes EG 2 mM Nitrat zu N_2 reduziert wurden. Der EG-Abbau dauerte in allen Ansätzen ungefähr gleich lang wie ohne Korrosionsinhibitoren. Jedoch war der EG-Abbau in Abwesenheit von BT oder TT generell langsamer als in vorhergehenden Experimenten (Unterkapitel 5.3.2). Eine mögliche Ursache dafür könnte eine veränderte Zusammensetzung der mikrobiellen Populationen im verwendeten Inokulum sein (10 % Sedimentsuspension aus dem vorlaufenden Hemmexperiment).

Aufgrund dieser Ergebnisse konnte unter den definierten Bedingungen keine eindeutige Beziehung zwischen den untersuchten BT/TT-Konzentrationen und deren Auswirkung auf den EG-Abbau hergestellt werden.

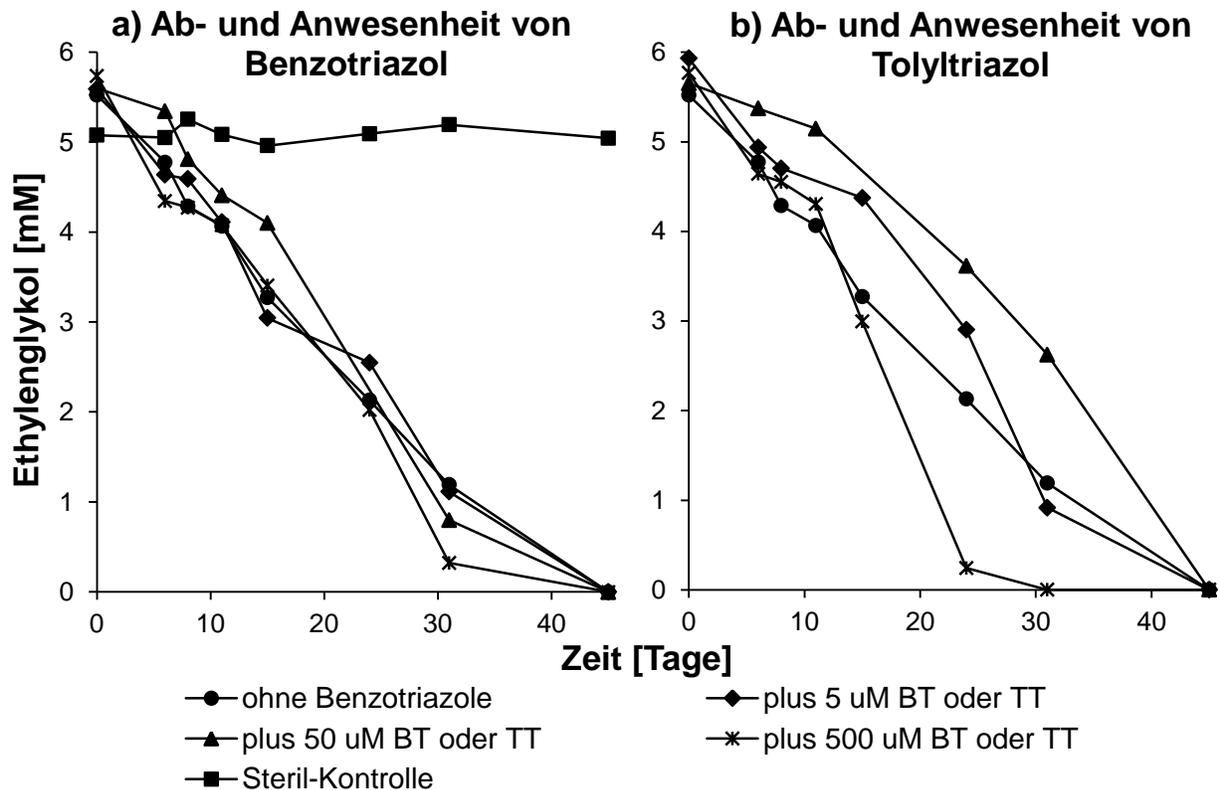


Abbildung 5-8 Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol in a) Ab- und b) Anwesenheit von jeweils drei verschiedenen Konzentrationen von Benzo (BT)- und Tolyltriazol (TT) unter nitratreduzierenden Bedingungen. Die Daten sind repräsentativ für jeweils zwei parallele Ansätze.

5.4.7 Einfluss der Temperatur

Wie zuvor gezeigt, liegen unter nitrat- und sulfatreduzierenden Bedingungen deutliche Hinweise auf eine hemmende Wirkung der Benzotriazole auf den EG-Abbau bei 12°C vor. Im Folgenden wurde der Einfluss der Temperatur auf den EG-Abbau in Anwesenheit von BT und TT bei Raumtemperatur (RT) unter nitrat- und sulfatreduzierenden Bedingungen untersucht. Die entsprechenden Versuchsansätze sind Tab. 5-8 zu entnehmen. Das Inokulum (10 % Sediment Buntsandstein) war durch zwei Vorexperimente an den EG-Abbau unter nitrat- oder sulfatreduzierenden Bedingungen bei 12°C adaptiert. Als Kontroll-Experiment für den EG-Abbau dienten die entsprechenden Versuchsansätze bei 12°C (s. Unterkapitel 5.3.6 und 5.3.4).

Tabelle 5-8: Versuchsordnung zum mikrobiellen Abbau von Ethylenglykol bei Raumtemperatur (22°C) in Anwesenheit von drei verschiedenen BT-Konzentrationen.

Elektronenakzeptor	Versuchsansätze
10 mM Nitrat	Jeweils zwei Replikate: <ul style="list-style-type: none"> • 5 µM BT 5 mM EG • 50 µM BT + 5 mM EG • 500 µM BT + 5 mM EG • Kontroll-Experiment: 5 mM EG
10 mM Sulfat	Jeweils drei Replikate: <ul style="list-style-type: none"> • 50 µM BT + 5 mM EG • 50 µM TT + 5 mM EG • Kontroll-Experiment: 5 mM EG

BT: Benzotriazol, EG: Ethylenglykol.

Der EG-Abbau bei Zugabe von Nitrat als EA verlief in allen Versuchsansätzen mit BT ähnlich wie in Abwesenheit des Korrosionsinhibitors (ohne feststellbare lag-Phase). In allen Ansätzen wurde EG innerhalb von 24 Tagen komplett abgebaut. Somit war der EG-Abbau bei RT fast zweimal so schnell wie bei 12°C (s. Unterkapitel 5.3.6). Hier muss erwähnt werden, dass der EG-Abbau bei 12°C allgemein langsamer war als im Vorexperiment. Der EG-Abbau in allen Inkubationen entsprach der Stöchiometrie der vollständigen EG-Oxidation zu CO₂ mit der Reduktion von Nitrat zu N₂. Bei Zugabe von Sulfat verhielt sich der EG-Abbau in Anwesenheit von BT und TT ebenfalls ähnlich wie im entsprechenden Experiment ohne Benzotriazole. Der EG-Abbau ist in Kapitel 3 (Unterkapitel 3.3.6) eingehend dargestellt.

Die Ergebnisse der RT-Inkubationen zeigten keine Hinweise auf eine Hemmung des EG-Abbaus in Anwesenheit von BT und TT. Somit konnte der Hemmeffekt der Benzotriazole bei 12°C, bei höheren Temperaturen nicht demonstriert werden.

5.4.8 Diskussion

Bis dato liegen keine Publikationen zum Einfluss der Benzotriazole auf den mikrobiellen Abbau von EG vor. Allerdings wurde in zwei Studien die Wirkung von Benzotriazolen auf den mikrobiellen Abbau von Propylenglykol (PG) untersucht (Gruden et al., 2001; Jia et al., 2006; Pillard et al., 2001). Gruden et al. (2001) beobachteten in Abbauexperimenten mit PG unter anoxischen Bedingungen eine bis zum die Hälfte verringerte Methanproduktion (in Klärschlamm) in Anwesenheit von TT-Konzentrationen

zwischen 4 und 7 mM. In einer weiteren Studie mit Bodenproben als Inokulum untersuchten Jia et al. (2006) den aeroben PG-Abbau in Anwesenheit von 0,2-3 mM BT. Es zeigte sich, dass BT in Konzentrationen von mehr als 1,6 mM eine Verzögerung der CO₂-Bildung im Zuge des mikrobiellen PG-Abbaus bewirkte. Dabei war der PG-Abbau in Anwesenheit der höchst angesetzten BT-Konzentration (3 mM) fast dreimal langsamer als im Experiment ohne BT. In zwei weiteren Arbeiten wurde der aerobe mikrobielle Abbau von 31 verschiedenen organischen Substraten in Anwesenheit von 0,2 und 1,6 mM (Heesel, 2010) sowie 0,7 und 7 mM (Mishra, 2011) BT untersucht. Als Inokulum wurde in beiden Studien eine aerobe Mischkultur verwendet, die aus Klärschlamm angereicht worden war. Die Auswertung der Substratverwertung erfolgte mittels BIOLOG-Platten nach 120 Stunden Inkubation. Es zeigte sich eine langsamere Verwertung der zugesetzten Substrate in Anwesenheit von 1,6 (Heesel, 2010) und 7 mM (Mishra, 2011) BT als in Abwesenheit des Korrosionsinhibitors. Außerdem konnten in beiden Studien in Anwesenheit von BT weniger der untersuchten Substrate verwertet werden als ohne BT. Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie wurde die Hypothese aufgestellt, dass BT die mikrobielle Aktivität auf enzymatische Ebene hemmt (B. Morasch, persönliche Mitteilung).

Die Ergebnisse der aktuellen Studie zeigten, dass unter bestimmten Bedingungen Benzotriazole in Konzentrationen von 50 µM eine Verzögerung des EG-Abbaus bewirkten. Demnach waren in den untersuchten Sedimenten Mikroorganismen anwesend, die viel empfindlicher gegenüber Benzotriazolen waren als die Mikroorganismen aus den oben genannten Studien. Außerdem war die Akkumulierung von Acetaldehyd in den Ansätzen mit Benzotriazolen ein Hinweis darauf, dass die für die Disproportionierung von Acetaldehyd verantwortlichen Enzyme gehemmt wurden. Der Wirkungsmechanismus der Benzotriazole auf den EG-Abbau konnte im Rahmen dieser Studie nicht abschließend aufgeklärt werden.

5.5 Schlussfolgerungen

Aus den Ergebnissen zum Einfluss von Benzotriazolen auf den mikrobiellen EG-Abbau in tiefen Aquiferen kann Folgendes geschlossen werden:

- 1) Benzotriazole beeinflussen in Konzentrationen unter 50 μM nicht den aeroben Abbau von EG.
- 2) Unter bestimmten Redoxbedingungen in Abwesenheit von Sauerstoff sind Benzotriazole in der Lage eine Hemmung des EG-Abbaus zu verursachen.
- 3) Eine Hemmung des EG-Abbaus kann zur Akkumulierung von EG in tiefen Aquiferen führen.
- 4) Eine Akkumulierung von toxischen Zwischenprodukten des EG-Abbaus wie Acetaldehyd kann unter bestimmten Bedingungen in Anwesenheit von Benzotriazolen auftreten.
- 5) Standortspezifische Unterschiede in den Mikrobengemeinschaften bestimmen möglicherweise die Ausprägung der Empfindlichkeit gegenüber Benzotriazolen.

Obwohl nicht unter allen untersuchten Bedingungen ein hemmender Einfluss der Korrosionsschutzmittel BT und TT beobachtet wurde und keine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung dokumentiert werden konnte, muss beim Austritt von Wärmeträgerflüssigkeiten in tiefen Grundwasseraquiferen mit einem Einfluss der Additive auf den Abbau des Frostschutzmittels gerechnet werden.

5.6 Literatur

- Callender, T., Davis, L.C., 2002. Nitrification inhibition using benzotriazoles. *JHSR* 4, (2) 1–(2) 16.
- Cancilla, D.A., Holtkamp, A., Fang, X., Matassa, L., 1997. Isolation and characterization of Microtoxreg_{sign}-active components from aircraft de-icing/anti-icing fluids. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 430–434.
- Cornell, J.S., Pillard, D.A., Hernandez, M.T., 2000. Comparative measures of the toxicity of component chemicals in aircraft deicing fluid. *Environ. Toxicol. Chem.* 19.
- Dwyer, D.F., Tiedje, J.M., 1983. Degradation of ethylene glycol and polyethylene glycols by methanogenic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 46(1), 185–90.
- Gruden, C.L., Dow, S.M., Hernandez, M.T., 2001. Fate and toxicity of aircraft deicing fluid additives through anaerobic digestion. *Water Environ. Res. Res. Publ. Water Environ. Fed.* 73, 72–79.
- Heesel, V., 2010. Biodegradation of Benzotriazoles (Masterthesis). Eberhard Karls Universität, Tübingen.
- Jia, Y., Bakken, L.R., Breedveld, G.D., Aagaard, P., Frostegård, Å., 2006. Organic compounds that reach subsoil may threaten groundwater quality; effect of benzotriazole on degradation kinetics and microbial community composition. *Soil Biol. Biochem.* 38, 2543–2556.
- Klotzbücher, T., Kappler, A., Straub, K.L., Haderlein, S.B., 2007. Biodegradability and groundwater pollutant potential of organic anti-freeze liquids used in borehole heat exchangers. *Geothermics* 36, 348–361.
- Mishra, S., 2011. Aerobic biodegradation of benzotriazoles and analysis of metabolites (Masterthesis). Eberhard Karls Universität, Tübingen.

- Pillard, D.A., Cornell, J.S., DuFresne, D.L., Hernandez, M.T., 2001. Toxicity of Benzotriazole and Benzotriazole Derivatives to Three Aquatic Species. *Water Res.* 35, 557–560.
- Puttanna, K., Gowda, N.M.N., Rao, E.V.S.P., 1999. Effect of concentration, temperature, moisture, liming and organic matter on the efficacy of the nitrification inhibitors benzotriazole, o-nitrophenol, m-nitroaniline and dicyandiamide. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* 54, 251–257.
- Schink, B., Stieb, M., 1983. Fermentative degradation of polyethylene glycol by a strictly anaerobic, gram-negative, nonsporeforming bacterium, *Pelobacter venetianus* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1905–1913.
- Toraya, T., Honda, S., Fukui, S., 1979. Fermentation of 1,2-propanediol with 1,2-ethanediol by some genera of Enterobacteriaceae, involving coenzyme B12-dependent diol dehydratase. *J. Bacteriol.* 139, 39–47.

6 Mikrobieller Abbau von 2-Ethylhexanoat, Benzoat, Decan- und Dodecandicarboxylat. Einfluss auf den Ethylenglykolabbau

6.1 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Studie wurde die Bioabbaubarkeit von 2-Ethylhexanoat, Benzoat, Decan- und Dodecandicarboxylat untersucht. Als Inokulum wurden Sedimente aus zwei tiefen Grundwasseraquiferen (Buntsandstein und Mergel) verwendet. Der mikrobielle Abbau von 50 μM 2-Ethylhexanoat wurde im Sediment Buntsandstein unter drei verschiedenen Redoxbedingungen untersucht. In Ansätzen, die Nitrat oder Sulfat als Elektronenakzeptoren enthielten, wurde die Säure innerhalb von 65 bzw. 38 Tagen abgebaut. Unter Zugabe von Fe (III) als Elektronenakzeptor wurden weder eine eisenreduzierende Aktivität noch ein Abbau der Säure nachgewiesen. Im Sediment Mergel wurde der mikrobielle Abbau von Benzoat, Decan- und Dodecandicarboxylat (50 μM je Substanz) untersucht. Die Experimente zeigten einen aeroben Abbau von Benzoat (Abbauzeit < 15 Tage) und beide Dicarboxylate (Abbauzeit < 8 Tage). Die Dicarboxylate waren im Gegensatz zu Benzoat auch unter nitratreduzierenden Bedingungen schnell abbaubar (< 15 Tage). In anoxischen Versuchsansätzen, wo eisen-, sulfatreduzierenden oder gärenden Bedingungen stimuliert wurden, wurden Benzoat, Decan- und Dodecandicarboxylat innerhalb von 52 Tagen Inkubationszeit nicht abgebaut. Begleitend wurde der Einfluss der Säuren auf den Ethylenglykolabbau untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Säuren in den untersuchten Konzentrationen keine Hemmung des EG-Abbaus verursachten.

Mit dieser Studie wurde zum ersten Mal die Bioabbaubarkeit von 2-Ethylhexanoat, Benzoat, Decan- und Dodecandicarboxylat unter Bedingungen typisch für tiefe Aquifere untersucht. Die Ergebnisse deuteten auf die hohe Persistenz von Benzoat und beiden

Dicarboxylaten unter anoxischen Bedingungen und somit auf ihre potentielle Gefährlichkeit für Grundwassersysteme hin.

6.2 Einleitung

Neben der Gruppe der Benzotriazole werden verschiedene organische Säuren als Korrosionsinhibitoren in Wärmeträgerflüssigkeiten (WTF) für Erdwärmesonden eingesetzt. Charakteristisch für diese Säuren ist, dass sie unter umweltrelevanten Bedingungen sehr mobil sind und sich schnell in Grundwasserleitern verbreiten können (s. Kapitel 2).

2-Ethylhexanoat wurde mehrmals in der Umwelt als Abbauprodukt verschiedener Weichmacher detektiert und deshalb ist von einer hohen Stabilität dieser Substanz unter Umweltbedingungen auszugehen (Barnabé et al., 2008; Horn et al., 2004; Nalli et al., 2006, 2002). Außerdem ist die Säure ab einer Konzentration von 23 mg/L toxisch für aquatische Organismen (Horn et al., 2004).

Benzoat gelangt hauptsächlich durch die Landwirtschaft sowie industrielle Abflusswässer der Papierherstellung und des Bergbaus in die Umwelt (Lee and Chen, 2009). Die aerobe und anaerobe Bioabbaubarkeit des Benzoats gilt als gut untersucht (Altenschmidt et al., 1993; Chapelle, 1993; Gall et al., 2013; Kung et al., 2013; Matthies and Schink, 1993; Oberender et al., 2012).

Die Abbauxperimente wurden mit Laborkulturen sowie angereicherten Mischkulturen aus Klärschlamm und eutrophem Sediment untersucht. Des Weiteren wurde der Abbau von Benzoat in Proben aus oberflächennahen Aquifer-Sedimenten unter oxidischen (Brusseau et al., 1999), sulfat- (Townsend et al., 1997) sowie eisenreduzierenden (Lovley et al., 1989) und methanogenen Bedingungen (Kazumi et al., 1997) beschrieben. Es fehlen jedoch Kenntnisse über den mikrobiellen Abbau von Benzoat in tiefen Grundwasseraquiferen. Außerdem kann Benzoat in geringen Konzentration negative Auswirkungen bei Bakterien hervorrufen (EC50: 9 mg/l) (TOXNET, 2012).

Decan (C₁₀)- Dicarboxylat wird neben seiner Funktion als Korrosionsinhibitor auch in verschiedenen Weichmachern, Kühlschmiermitteln sowie Kosmetikprodukten

eingesetzt. Trotz seiner vielfältigen Anwendungen befassten sich nur wenige Studien mit der mikrobiellen Abbaubarkeit von C₁₀-Dicarboxylat in Umweltproben (Chapman & Duggleby, 1967; Matthies & Schink, 1993). In der aktuellen Studie wurde noch ein weiteres Dicarboxylat- Dodecandicarboxylat (C₁₂) untersucht. C₁₂-Dicarboxylat wurde ursprünglich wegen seiner geringen Einsatzhäufigkeit in den deklarierten WTF nicht als prioritär eingestuft (s. Kapitel 2). Aus neueren Informationen (persönliche Mitteilung Prof. Walker-Hertkorn, Hochschule Deggendorf, Juni 2011) ging allerdings hervor, dass diese Substanz in den zehn am häufigsten verwendeten WTF (für Erdwärmesonden) in Deutschland eingesetzt wird. Bis dato liegen keine wissenschaftliche Studien über den mikrobiellen Abbau von C₁₂-Dicarboxylats vor.

Bei der Leckage einer Erdwärmesonde können diese organischen Säuren die tiefen Grundwasseraquifere erreichen und lokale Verschmutzungen des Grundwassers verursachen. Ein Ziel der vorliegenden Studie war es, den mikrobiellen Abbau von den ausgewählten Säuren sowie ihren Einfluss auf den mikrobiellen Abbau des Frostschutzmittels Ethylenglykol in oligotrophen Systemen wie Sedimente aus tiefen Grundwasseraquiferen zu untersuchen.

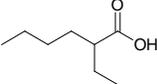
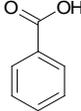
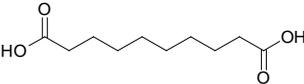
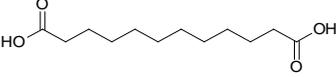
6.3 Material und Methoden

Informationen zu „Probenahme und Probenvorbereitung“, „Kulturmedien“, und „Mikrokosmenexperimente“ sowie die Methoden für die Analyse von EG, anorganischen Ionen (Sulfat, Nitrat, Nitrit) und Eisen sind Kapitel 3 (Unterkapitel 3.2) zu entnehmen. Im Folgenden sind die Chemikalien und Stammlösungen, die Versuchsansätze sowie die gaschromatographische Methoden für die Analyse der untersuchten organischen Säuren dargestellt.

Chemikalien

In Tab. 6-1 sind die physikochemischen Eigenschaften sowie die chemischen Strukturen von 2-Ethylhexansäure (2-EtH), Benzoesäure (Bz), Decan (C₁₀)- und Dodecan (C₁₂)-Dicarbonsäuren dargestellt. Alle anderen verwendeten Chemikalien sind in Tab. A-1 und Tab. A-11 im Anhang aufgeführt.

Tabelle 6-1: Physikochemische Eigenschaften sowie Strukturen von 2-Ethylhexansäure, Benzoesäure, Decan- und Dodecandicarbonsäure.

Substanz (CAS Nr.)	Strukturformel	MG [g/mol]	WL [g/l]	log Kow	pKs
2-Ethylhexansäure (149-57-5)		144	2*	2,6*	4,9***
Benzoat (65-85-0)		122	3,4*	1,9*	4,2*
Decandicarbonsäure (111-20-6)		202	1*	2,2*	pKs ₁ /pKs ₂ 4,5/5,2**
Dodecandicarbonsäure (693-23-2)		230	0,04*	3,2*	k.D.

MG: Molekulargewicht, WL: Wasserlöslichkeit, BT: Benzotriazol, TT: Tolyltriazol, EG: Ethylenglykol.
 *PHYSPROP (2012), **Fieser and Fieser (1972), ***Staples (2001).

Stammlösungen

Außer den im Kapitel 3 dargestellten (Unterkapitel 3.2.3) Stammlösungen wurden für die Experimente der aktuellen Studie zusätzlich eine wässrige Lösung aus jeweils 10 mM 2-EtH und Bz sowie 5 und 0,2 mM C₁₀- bzw. C₁₂-Dicarboxylat verwendet.

Versuchsansätze

Die Versuchsansätze zum mikrobiellen Abbau von 2-EtH sind in Tab. 6-2 dargestellt. Als Inokulum wurde Sediment Buntsandstein verwendet. Der mikrobielle Abbau von 2-EtH, Bz, C₁₀- und C₁₂-Dicarboxylat wurde in Versuchsansätzen (Tab. 6-3) mit Sediment Mergel untersucht. Begleitend wurde der Einfluss der vier Säuren auf den mikrobiellen Abbau von Ethylenglykol (EG) untersucht. Die Inkubation der Ansätze erfolgte bei 12°C. Als Kontroll-Experiment dienten drei parallele Ansätze mit EG, denen keine Säuren zugegeben wurden. Dazu wurden eine Steril- und eine Blank-Kontrolle (keine Zugabe von organischen Substraten) angesetzt.

Tabelle 6-2: Versuchsanordnung zum mikrobiellen Abbau von 2-Ethylhexanoat in Ansätzen mit Sediment Buntsandstein unter verschiedenen Redoxbedingungen.

Elektronenakzeptor	Versuchsansätze
10 mM Nitrat oder 10 mM Ferrihydrit oder 10 mM Sulfat	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µM 2-EtH (jeweils drei Replikate) • Kontroll-Experiment: 5 mM EG (jeweils drei Replikate)

2-EtH: 2-Ethylhexanoat, EG: Ethylenglykol.

Tabelle 6-3: Versuchsansätze zum mikrobiellen Abbau von Benzoat, Decan- und Dodecan-Dicarboxylate sowie deren Einfluss auf den Ethylenglykolabbau in Ansätzen mit Sediment Mergel.

Elektronenakzeptor	Versuchsansätze
Sauerstoff oder 10 mM Nitrat oder 70 mM Ferrihydrit oder 10 mM Sulfat oder keine Zugabe von EA	<ul style="list-style-type: none"> • 50 µM je 2-EtH, Bz, C₁₀-und C₁₂-Dicarboxylat + 5 mM EG (jeweils drei Replikate) • Kontroll-Experiment: 5 mM EG (jeweils drei Replikate)

2-EtH: 2-Ethylhexanoat, Bz: Benzoat, EG: Ethylenglykol, C₁₀: Decan, C₁₂: Dodecan.

Gaschromatographie

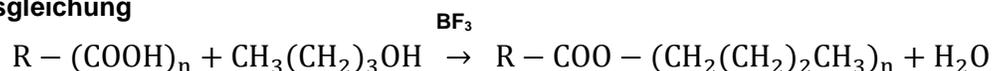
2-Ethylhexanoat

2-EtH wurde mittels einem Hewlett Packard (HP) 5890 Series II Gaschromatographen gekoppelt an HP 5972 Series Massenspektrometer analysiert. Die Auftrennung erfolgte über eine DB-5MS-Säule (Länge: 30 m; Innendurchmesser: 0,25 mm; Filmdicke: 0,25 µm) der Firma J & W Scientific. Für die Analyse wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet: 80°C für 4 min, Anstieg von 80 auf 150°C mit einem Gradienten von 10°C/min, Anstieg von 150 auf 310°C mit einem Gradienten von 20°C/min, abschließend 310°C für 5 min. Die Substanz wurde im SIM (**S**ingle **I**on **M**onitoring) Mode quantifiziert (m/z: 88; 73). Jede Probe (0,5 ml) wurde vor der Analyse mit einem Tropfen 1 M HCl angesäuert. Die Extraktion erfolgte mit 0,9 ml Chloroform. Die Proben wurden für 2 min am Vortex gerührt und anschließend bei 3500 rpm für 10 min zentrifugiert (Eppendorf Hermle Z320 Zentrifuge). Danach wurden 100 µl der organischen Phase in ein GC-Vial mit einem Glaseinsatz pipettiert. Die Analyse erfolgte direkt nach der Extraktion. Alternativ wurden die Proben für maximal drei Tage bei 4°C bis zur nächsten Analyse gelagert. Jede Probe wurde in Triplikaten vorbereitet und jeweils einmal analysiert.

Benzoat, C10- und C12-Dicarboxylate

Bz und die beiden Dicarbonsäuren konnten nicht mit der GC-Methode für 2-EtH analysiert werden. Um diese Substanzen gaschromatographisch erfassen zu können, war deren Derivatisierung notwendig. Allgemein werden bei der Derivatisierung stark polare Gruppen in weniger polaren Gruppen umgewandelt. Dabei besitzen die gebildeten Derivate eine erhöhte Flüchtigkeit sowie größere thermische Stabilität (Knapp, 1979). Als Derivatisierungsmittel wurde BF₃-Butanol, 10 % w/w (10 % Bortrifluorid in Butanol) der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Dabei wurde das Wasserstoffatom der polaren OH-Gruppen durch jeweils eine Butylgruppe ersetzt:

Reaktionsgleichung



Dabei ist *R* der Alkylrest und *n* ist die Anzahl der Carboxyl- oder Butylgruppen. Die entsprechenden Butyl-Derivate der Säuren und ihr Molekulargewicht (MW) sind in Tab. 6-4 aufgeführt.

Tabelle 6-4: Butyl-Derivate der (1) Benzoesäure, (2) Decan - und (3) Dodecandicarbonsäure und deren Molekulargewichte.

Butyl-Derivate	MW [g/mol]
(1) CH ₃ -(CH ₂) ₂ - CH - O - OC - C ₆ H ₆	178
(2) CH ₃ -(CH ₂) ₂ - CH - O - OC-(CH ₂) ₈ - C(O) - O-(CH ₂) ₂ CH ₃	314
(3) CH ₃ -(CH ₂) ₂ - CH - O - OC-(CH ₂) ₁₀ - C(O) - O-(CH ₂) ₂ CH ₃	342

MW: Molekulargewicht.

Das Protokoll für die Derivatisierungsmethode ist im Anhang dargestellt. Zur Analyse des Benzoats und der zwei Dicarbonsäuren wurden das oben beschriebene Gerät sowie die gleiche Säule verwendet. Das Temperaturprogramm wurde wie folgt eingestellt: 70°C für 5 min, Anstieg von 70 auf 160°C mit einem Gradienten von 5°C/min, Anstieg von 160 auf 280°C mit einem Gradienten von 10°C/min, Anstieg von 280 auf 310°C mit einem Gradienten von 20°C/min. Die Analyten wurden im SIM Mode quantifiziert. Die Proben wurden direkt nach der Derivatisierung analysiert. Es wurden jeweils drei parallele Proben vorbereitet und analysiert. Die Retentionszeiten der Säuren sowie die für die Quantifizierung verwendeten Bruchstücke (m/z) sind in Tab. 6-5 aufgeführt. 2-EtH-Butyl-Derivat konnte mit dieser Methode nur in den Standard-Proben, bei welchen

die Substanz einzeln zugegeben wurde, quantifiziert werden. In gemischten Standards sowie in den Proben aus den Versuchsansätzen konnte diese Substanz nicht quantifiziert werden. Der Grund dafür war die hohe Intensität des Benzoat-Butyl-Derivats, die eine Erhöhung der Basislinie verursachte und somit die plausible Quantifizierung des 2-EtH-Peaks störte. Jeweils vier verschiedene Standard-Konzentrationen wurden gemessen. Die entsprechenden Eichkurven sind in Abb. A-3 (s. Anhang) dargestellt.

Tabelle 6-5: Retentionszeiten der Butyl-Derivate sowie die für die Quantifizierung verwendeten Bruchstücke.

Substanz	Retentionszeit [min]	m/z
Butyl-2-Ethylhexanoat	14,37	57, 145, 88
Butylbenzoat	16,67	105, 123, 77
Decandicarbonsäure, dibutylester	30,16	185, 241
Dodecandicarbonsäure, dibutylester	31,96	213, 56

6.4 Ergebnisse und Diskussion

Im Folgenden sind die Ergebnisse zum Bioabbau von 2-Ethylhexanoat (2-EtH), Benzoat (Bz), C₁₀- und C₁₂-Dixacboxylat sowie deren Einfluss auf den Abbau von Ethylenglykol (EG) bei verschiedenen Redoxbedingungen dargestellt. Die Experimente wurden mit Sedimenten aus zwei verschiedenen Grundwasseraquiferen bei 12°C durchgeführt. 2-EtH (50 µM) wurde als einziges organisches Substrat mit Sediment Buntsandstein untersucht. Mit Sediment Mergel wurde eine Mischung aus 2-EtH, Bz, C₁₀-, und C₁₂-Dixacboxylat (je 50 µM) in Anwesenheit von 5 mM EG untersucht. Begleitend wurden für jedes Sediment und jede untersuchte Redoxbedingung eine Steril- und eine Blank-Kontrolle (ohne Zugabe von organischen Substanzen) angesetzt.

6.4.1 Mikrobieller Abbau

2-Ethylhexanoat

Die Bioabbaubarkeit von 2-EtH wurde in Mikrokosmenexperimenten unter Zugabe von Nitrat, Ferrihydrit oder Sulfat als alternativem EA untersucht. Der 2-EtH-Abbau unter allen untersuchten Redoxbedingungen ist in Abb. 6-1 dargestellt.

In den drei Versuchsansätzen mit *Nitrat* lag die 2-EtH-Konzentration nach 65 Tagen Inkubationszeit unterhalb der Detektionsgrenze von 5 μM . Mittels GC-MS wurden keine organischen Produkte des 2-EtH-Abbaus detektiert, was auf eine vollständige Oxidation der Säure zu CO_2 hindeutete. Die Nitratkonzentration wurde zum Inkubationsbeginn (t_0) und –ende mittels IC gemessen (t_e) (s. Tab. 6-6). Es wurde keine Abnahme der Nitratkonzentration beobachtet. Die stöchiometrische Menge an Nitrat (0,2 mM), die im Laufe der vollständigen Oxidation von **0,05** mM 2-EtH zu CO_2 reduziert geworden wäre (s. Gleichung unten) lag im Bereich der Messungenauigkeit der IC-Analyse (< 5 %). In zwei der drei parallelen Ansätze wurde am Tag 65 der Inkubation Spuren von Nitrit detektiert, was auf eine Nitratreduktion hindeutete. Die Nitrit-Konzentration lag unter der Bestimmungsgrenze von 0,05 mM. Kein Nitrit wurde in der Steril- sowie in der Blank-Kontrolle (ohne Zugabe von organischen Substanzen) detektiert.

Die Mikrokosmenexperimente, denen Fe (III) als alternativer EA zugegeben wurde, zeigten keine Abnahme der 2-EtH-Konzentration innerhalb von 142 Tagen Inkubationszeit. Es muss allerdings erwähnt werden, dass das Kontrollsubstrat- EG innerhalb der Inkubationszeit von 142 Tagen ebenfalls nicht abgebaut wurde. Im Kapitel 3 (Unterkapitel 3.3.3) wurden sowohl die Abwesenheit der entsprechenden Mikroorganismen als auch ungünstige Bedingungen in den Mikrokosmen als potentielle Ursache für die fehlende mikrobielle Aktivität diskutiert. Somit sollten aufgrund dieser Ergebnisse keine generellen Schlussfolgerungen über den mikrobiellen Abbau des 2-EtH unter eisenreduzierenden Bedingungen gezogen werden.

Bei Zugabe von *Sulfat* wurde 2-EtH innerhalb von 38 Tagen Inkubationszeit komplett abgebaut. In diesen Mikrokosmen wurden ebenfalls keine organischen Abbauprodukte detektiert, was ein Hinweis auf die Mineralisierung von 2-EtH war. Analog zu Nitrat ist in Tab. 6-6 die Sulfatkonzentration zum Zeitpunkt t_0 und t_e aufgeführt. Eine eindeutige Abnahme der Sulfatkonzentration konnte mit der verwendeten IC-Methode ebenfalls nicht gezeigt werden. Für die vollständige Oxidation von 2-EtH zu CO_2 wären 3 % (0,3

mM) der zugesetzten Konzentration von Sulfat (10 mM) benötigt worden (s. die Gleichung unten), was ebenfalls im Bereich der Messungenauigkeit der Analyseemethode lag.

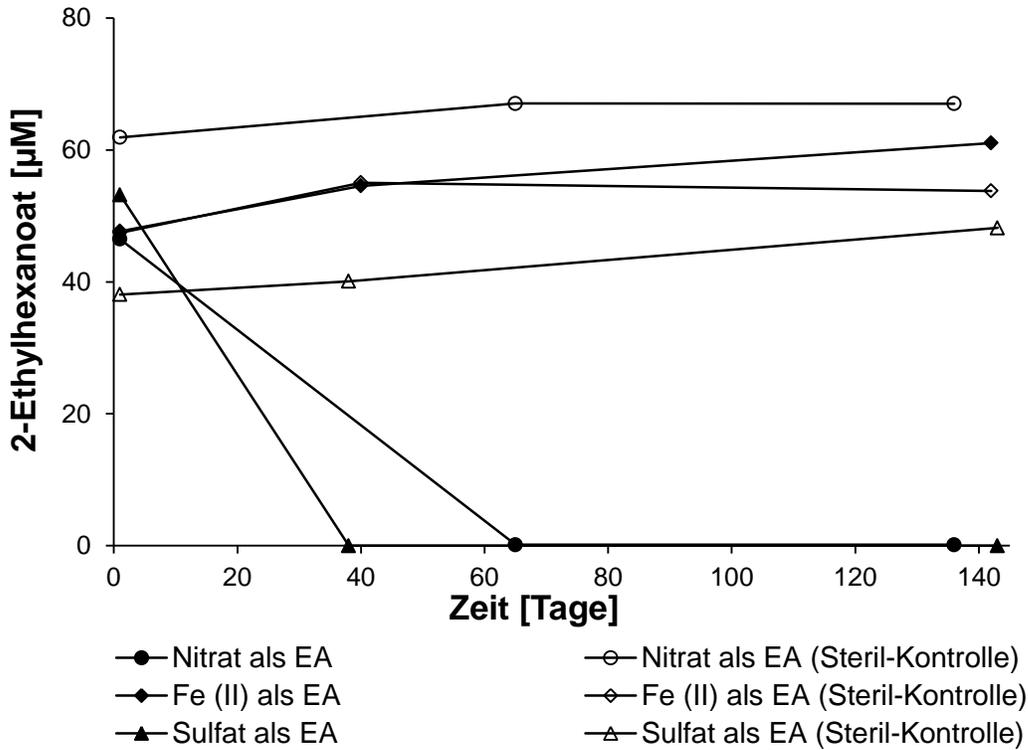
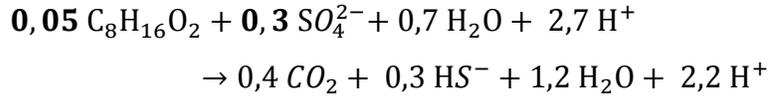


Abbildung 6-1: Mikrobieller Abbau von 2-Ethylhexanoat in den Experimenten mit Nitrat, Ferrihydrit oder Sulfat. Die Daten sind repräsentativ für jeweils drei Replikate.

Tabelle 6-6: Nitrat- sowie Sulfatkonzentrationen zum Inkubationsbeginn und –ende.

Zeitpunkt	Nitrat [mM]	Nitrat [mM] (Steril-Kontrolle)	Sulfat [mM]	Sulfat [mM] (Steril-Kontrolle)
t_0	10,1*	10,2	11,0* ($\pm 0,6$)	10,6
t_e	9,9* ($\pm 0,8$)	10,5	11,5*	10,5

t_0 : Inkubationsbeginn, t_e : Inkubationsende (Tag 65 für Nitrat und 38 für Sulfat als Elektronenakzeptor), *Mittelwert aus drei parallelen Ansätzen.

Bisher ist aus der Literatur nur eine systematische Untersuchung zur Bioabbaubarkeit von 2-EtH unter umweltrelevanten Bedingungen bekannt. In der Studie von (Chua et al., 2001) wurde der mikrobielle Abbau von 16 mM 2-EtH unter anoxischen Bedingungen

untersucht. Als Inokulum wurde eine syntrophe Anreicherungskultur aus Flusssedimenten verwendet. Mehr als 80 % der Säure wurde innerhalb von 180 Stunden abgebaut. Die Autoren deuteten auf eine oxidative Spaltung des 2-EtH zu zwei Molekülen Butansäure mit anschließender β -Oxidation der Butansäure zu Acetat hin. Im weiteren Verlauf wurde Acetat durch Methanogene zu Methan und CO_2 umgesetzt.

Mit den Ergebnissen der aktuellen Studie wurde der mikrobielle Abbau von 2-EtH mit Sulfat oder Nitrat als EA demonstriert. Somit wird eine Kontamination tiefer Grundwasseraquifere, wo sulfat- oder nitratreduzierende Abbauprozesse vorherrschend sind, nicht erwartet. Eine Akkumulierung von organischen Abbauprodukten wird als unwahrscheinlich eingeschätzt. Eine Akkumulierung von 2-EtH in eisenreichen Sedimenten konnte aufgrund fehlender mikrobieller Aktivität in den Versuchsansätzen mit Fe (III) als EA nicht ausgeschlossen werden.

Benzoat

Die Bioabbaubarkeit von Bz wurde unter oxischen und anoxischen Bedingungen untersucht. Innerhalb von 15 Tagen Inkubationszeit wurde Bz unter oxischen Bedingungen komplett abgebaut (Abb. 6-2). Mittels GC-MS wurden keine organischen Abbauprodukte detektiert. Deshalb wird von einer vollständigen Mineralisierung des Bz zu CO_2 ausgegangen. Keine Änderung der Bz-Konzentration wurde in der Steril-Kontrolle innerhalb der Inkubationszeit beobachtet.

Der Verlauf der Bz-Konzentration bei Zugabe von Nitrat, Fe (III) oder Sulfat als EA sowie unter gärenden Bedingungen ist in Abb. 6-2 dargestellt. Die aromatische Säure wurde unter keiner der untersuchten Redoxbedingungen abgebaut. In allen Mikrokosmen blieb die Bz-Konzentration innerhalb der Inkubationszeit von 52 Tagen konstant. Dazu passend wurde in den Versuchsansätzen mit Nitrat, Sulfat oder Fe (III) als EA keine Abnahme der Nitrat- und der Sulfat-Konzentration bzw. keine Bildung von Fe (II) beobachtet (s. Unterkapitel 6.3.2). Somit konnte keine nitrat-, sulfat- oder eisenreduzierende Aktivität nachgewiesen werden.

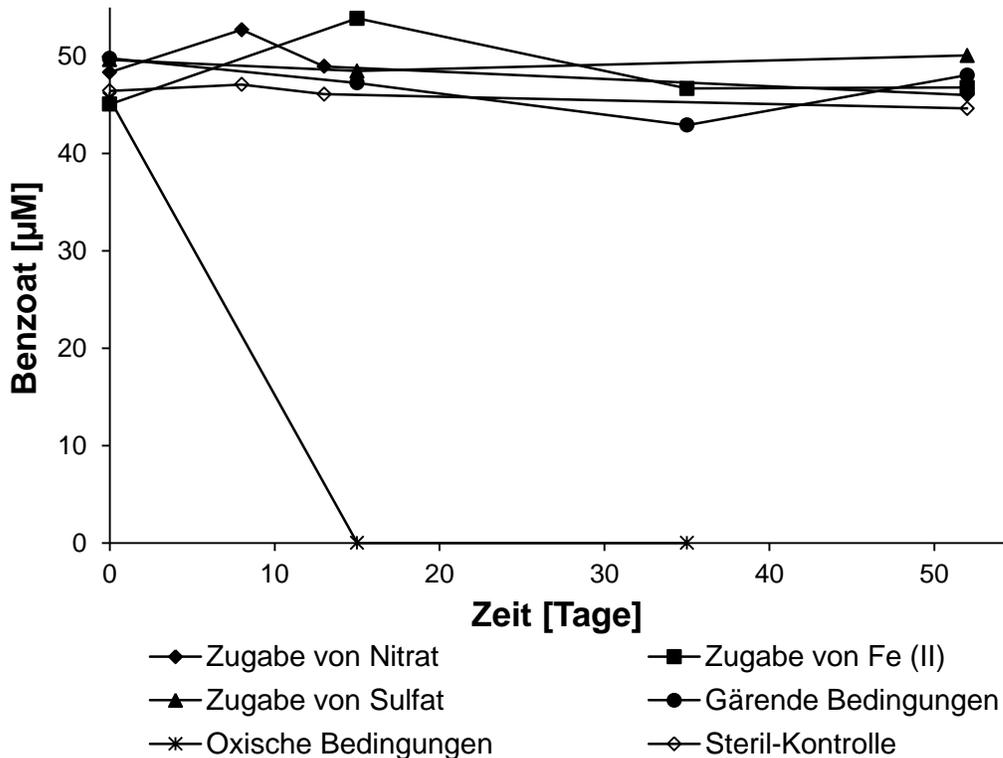


Abbildung 6-2: Mikrobieller Abbau von Benzoat unter oxischen und anoxischen Bedingungen. Die Daten sind repräsentativ für jeweils drei Replikate. Dargestellt ist die Steril-Kontrolle im Experiment mit Nitrat und repräsentiert der Verlauf der Benzoat-Konzentrationen in den sterilen Ansätzen aller untersuchten Redoxbedingungen.

Der aerobe Abbaumechanismus für Bz ist in der Literatur eingehend dokumentiert (s. Review von Fuchs et al., 2011). Die zentralen Intermediate des aeroben Bz-Abbaus sind Catechol (1,2-Dihydroxybenzen) und Protocatechuat (3,4-Dihydroxybenzoat) (Altenschmidt et al., 1993; Gall et al., 2013). Die aromatischen Ringe der Intermediate werden anschließend durch Oxygenasen in Ortho- oder Meta- Position gespalten (Ding et al., 2007; Patrauchan et al., 2005). Die daraus resultierenden kettenförmigen organischen Säuren werden durch β -Oxidation vollständig zu CO_2 oxidiert (Patrauchan et al., 2005). Die Ergebnisse unter anoxischen Bedingungen im untersuchten Sediment (aktuelle Studie) sind mit Studien aus der Literatur nicht konsistent, wo der Bz-Abbau unter nitrat- (Berry et al., 1986; Chen et al., 2011; Fuchs, 2008; Koch et al., 1993; Ziegler et al., 1987), sulfat- (Habe et al., 2009; Kazumi et al., 1997; Townsend et al., 1997, Wöhlbrand et al., 2013) und eisenreduzierenden Bedingungen (Holmes et al., 2011; Kazumi et al., 1995; Lovley et al., 1989) mehrfach nachgewiesen wurde. Es ist

gut bekannt, dass sich die aeroben (oxidativen) und anaeroben (reduktiven) Abbaumechanismen von Bz grundsätzlich voneinander unterscheiden (Oberender et al., 2012; Williams and Evans, 1975). Williams und Evans (1975) stellten die einzelnen Schritte des Bz-Abbaus mit Nitrat als EA auf. Dabei erfolgt der Bz-Abbau via Reduktion zu Cyclohexancarboxylat und eine anschließende Oxidation (mehrere Schritte) zu Adipat (1,4-Butandicarbonat). Adipat kann via β -Oxidation vollständig zu CO_2 oxidiert werden. Des Weiteren wurde der fermentative Bz-Abbau durch syntrophe mikrobielle Konsortien demonstriert. Durch Syntrophie konnte Bz komplett zu Methan und CO_2 abgebaut werden (Kamagata et al., 1992; Kung et al., 2013; Mountfort and Bryant, 1982; Qiao et al., 2013). Der anaerobe Bz-Abbau wurde allerdings bevorzugt mit Labor- (Koch et al., 1993; Oberender et al., 2012; Ziegler et al., 1987) oder Anreicherungskulturen (Reinkultur oder gemischte Populationen) aus Klärschlamm (Bakker, 1977; Ferry and Wolfe, 1976; Kamagata et al., 1992) sowie Boden und Aquifer-Sedimenten (Lahme et al., 2012; Kazumi et al., 1995; Wöhlbrand et al., 2013) untersucht. Die untersuchten Benzoat-Konzentrationen lagen in allen Studien im mM-Bereich. Die gewählten Inkubationstemperaturen lagen häufig bei 30°C und somit deutlich über der Inkubationstemperatur der aktuellen Studie (12°C).

Eine mögliche Erklärung für die fehlende mikrobielle Aktivität in den anaeroben Ansätzen der aktuellen Studie ist die Abwesenheit von Mikroorganismen im untersuchten Sediment, die in der Lage waren Benzoat als Substrat zu verwerten. Des Weiteren muss die niedrigere Inkubationstemperatur (12°C) der aktuellen Untersuchung in Betracht gezogen werden. Bis dato sind keine Daten über den mikrobiellen Benzoat-Abbau von psychrophilen Mikroorganismen (Temperaturoptimum zwischen 12 und 15°C) aus der Literatur bekannt. Es könnte sein, dass bei tieferen Temperaturen die Lag-Phase des mikrobiellen Abbaus sehr lange dauert. Eine Beeinträchtigung des Abbaus durch die Anwesenheit von drei weiteren organischen Substraten in den Versuchsansätzen: 2-EtH, die zwei Dicarbonsäuren sowie EG muss ebenfalls in Betracht gezogen werden.

Decan- und Dodecandicarboxylat

Der mikrobielle Abbau der beiden Dicarboxylate unter fünf verschiedenen Redoxbedingungen ist in Abb. 6-3 dargestellt. In den aeroben Mikrokosmen wurden beide Dicarbonsäuren innerhalb von acht Tagen komplett abgebaut. Mittels GC-MS wurden keine organischen Abbauprodukte detektiert. Die entsprechenden Konzentrationen in der Steril-Kontrolle blieben innerhalb der Inkubationszeit konstant.

In den Versuchsansätzen mit Nitrat als EA wurden die C₁₀- und C₁₂-Dicarbonsäuren innerhalb der ersten acht Tage der Inkubation abgebaut. Dabei wurden keine organischen Abbauprodukte detektiert. Die Konzentrationen beider Dicarbonsäuren in der Steril-Kontrolle änderten sich innerhalb der Inkubationszeit nicht. Eine nitratreduzierende Aktivität in den ersten acht Tagen der Inkubation wurde durch die Abnahme der Nitratkonzentration sowie die gleichzeitige Bildung von Nitrit demonstriert. Die Nitrat- sowie die Nitrit-Konzentrationen in den Zeitpunkten t₀ und t₈ sind in Tab. 6-7 aufgeführt. Am Tag 8 der Inkubation war die Nitrat-Konzentration um 2,4 mM niedriger als die Anfangskonzentration. Ein großer Teil (1,8 mM oder 75 %) des verwerteten Nitrats wurde als Nitrit wiedergefunden. Die restlichen 25 % (0,6 mM) des Nitrats wurden sehr wahrscheinlich zu molekularem Stickstoff (N₂) reduziert. Begleitend wurde in den ersten acht Tagen der Inkubation eine EG-Abnahme um 0,3 mM beobachtet. Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass leicht oxidierbares 2-EtH ebenfalls in den Mikrokosmen vorhanden war. Diese Substanz war ebenfalls in vorläufigen Experimenten mit Sediment Buntsandstein mit Nitrat mikrobiell abbaubar. Die Stöchiometrie der Mineralisierung von jeweils 0,05 mM C₁₀-, C₁₂-Dicarbonsäuren, 2-EtH sowie 0,3 mM EG gekoppelt an Nitratreduktion ist in Tab. 6-8 (Nitratreduktion zu N₂) bzw. Tab. 6-9 (Nitratreduktion zu Nitrit) aufgeführt.

Tabelle 6-7: Nitrat- sowie Nitrit-Konzentrationen zum Inkubationsbeginn und am Tag 8 der Inkubation.

Zeitpunkt	Nitrat [mM]	Nitrit [mM]
t ₀	14*	0*
t ₈	11*	2*

t₀: Inkubationsbeginn (Tag 0); t₈: Tag 8 der Inkubation. *Mittelwert aus drei parallelen Ansätzen.

Tabelle 6-8: Theoretische Stöchiometrie des mikrobiellen Abbaus von 2-EtH, C₁₀- und C₁₂-Dicarboxylate sowie von Ethylenglykol gekoppelt an die Reduktion von Nitrat zu N₂.

Substanz	Reduktion von Nitrat zu N ₂
C ₁₀	$0,05 \text{ C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_4 + 0,25 \text{ NO}_3^- + 0,8 \text{ H}_2\text{O} + 1,5 \text{ H}^+$ $\rightarrow 0,5 \text{ CO}_2 + 0,125 \text{ N}_2 + 0,75 \text{ H}_2\text{O} + 2,5 \text{ H}^+ + 1,25 \text{ e}^-$
C ₁₂	$0,05 \text{ C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_4 + 0,3 \text{ NO}_3^- + 1,8 \text{ H}^+ + \text{H}_2\text{O}$ $\rightarrow 0,6 \text{ CO}_2 + 0,15 \text{ N}_2 + 0,9 \text{ H}_2\text{O} + 3,1 \text{ H}^+ + 1,6 \text{ e}^-$
2-EtH	$0,05 \text{ C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2 + 0,1 \text{ NO}_3^- + 0,7 \text{ H}_2\text{O} + 0,6 \text{ H}^+$ $\rightarrow 0,4 \text{ CO}_2 + 0,05 \text{ N}_2 + 0,3 \text{ H}_2\text{O} + 2,2 \text{ H}^+ + 1,7 \text{ e}^-$
EG	$0,3 \text{ C}_2\text{H}_6\text{O}_2 + 0,6 \text{ NO}_3^- + 0,6 \text{ H}_2\text{O} + 3,6 \text{ H}^+$ $\rightarrow 0,6 \text{ CO}_2 + 0,3 \text{ N}_2 + 1,8 \text{ H}_2\text{O} + 4 \text{ H}^+ + 1 \text{ e}^-$

C₁₀: Decandicarboxylat; C₁₂: Dodecandicarboxylat; 2-EtH: 2-Ethylhexanoat; EG: Ethylenglykol.

Tabelle 6-9: Theoretische Stöchiometrie des mikrobiellen Abbaus von 2-EtH, C₁₀- und C₁₂-Dicarboxylate sowie von Ethylenglykol gekoppelt an die Reduktion von Nitrat zu Nitrit.

Substanz	Reduktion von Nitrat zu Nitrit
C ₁₀	$0,05 \text{ C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_4 + 1,25 \text{ NO}_3^- + 0,8 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 0,5 \text{ CO}_2 + 1,25 \text{ NO}_2^- + 1,25 \text{ H}_2\text{O}$
C ₁₂	$0,05 \text{ C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_4 + 1,55 \text{ NO}_3^- + \text{H}_2\text{O} + 3,1 \text{ H}^+ + 1 \text{ e}^-$ $\rightarrow 0,6 \text{ CO}_2 + 1,55 \text{ NO}_2^- + 1,55 \text{ H}_2\text{O} + 2,1 \text{ H}^+$
2-EtH	$0,05 \text{ C}_8\text{H}_{16}\text{O}_2 + 0,5 \text{ NO}_3^- + \text{H}^+ + 0,7 \text{ H}_2\text{O}$ $\rightarrow 0,4 \text{ CO}_2 + 0,5 \text{ NO}_2^- + 2,2 \text{ H}^+ + 0,5 \text{ H}_2\text{O} + 1,2 \text{ e}^-$
EG	$0,3 \text{ C}_2\text{H}_6\text{O}_2 + 1,5 \text{ NO}_3^- + 3 \text{ H}^+ + 0,6 \text{ H}_2\text{O} \rightarrow 0,6 \text{ CO}_2 + 1,5 \text{ NO}_2^- + 1,5 \text{ H}_2\text{O} + 3 \text{ H}^+$

C₁₀: Decandicarboxylat; C₁₂: Dodecandicarboxylat; 2-EtH: 2-Ethylhexanoat; EG: Ethylenglykol.

Für die Mineralisierung von 0,05 mM C₁₀- und C₁₂-Dicarboxylsäuren sowie 2-EtH würden 0,25; 0,3 bzw. 0,1 mM Nitrat zu N₂ reduziert. Bei der Oxidation von 0,3 mM EG werden stöchiometrisch 0,6 mM Nitrat zu N₂ reduziert. Diese Werte zeigen, dass rechnerisch eine vollständige Reduktion von 0,6 mM Nitrat gekoppelt an die Mineralisierung der drei Säuren (je 0,05 mM) oder gekoppelt an 0,3 mM des zugesetzten EG hätte stattfinden können. Bei der unvollständigen Oxidation von jeweils 0,05 mM C₁₀- und C₁₂-Disäuren sowie 2-EtH zu CO₂ wären theoretisch 1,25; 1,55 bzw. 0,5 mM Nitrat zu Nitrit reduziert. Für die Mineralisierung von 0,3 mM EG wären 1,5 mM Nitrat unvollständig zu Nitrit reduziert gewesen. Eine unvollständige Reduktion von 1,8 mM Nitrat könnte somit die Oxidation von jeweils einer der zugesetzten Säuren oder von 0,3 mM EG erklären. Somit zeigten die Ergebnisse, dass in den ersten acht Tagen der Inkubation die Mineralisierung der drei Säuren sowie von 0,3 mM des EG gekoppelt an Nitratreduktion möglich war. Um eine präzise Bilanzierung des mikrobiellen Abbaus der Einzelsubstanzen zu erzielen, wären separate Mikrokosmenexperimente für jedes organische Substrat erforderlich.

Beide Dicarbonsäuren wurden in den Versuchsansätzen unter *Zugabe von Fe (III) oder Sulfat* sowie unter gärenden Bedingungen innerhalb von 52 Tagen Inkubationszeit nicht abgebaut. Während die Konzentrationen beider Substanzen in den Mikrokosmen mit Sulfat oder Ferrihydrit bis zum Inkubationsende konstant blieben, nahmen die C₁₀- sowie C₁₂-Konzentration unter gärenden Bedingungen zwischen 18 und 20 % gegenüber den entsprechenden Anfangskonzentrationen ab. Die Konzentrationen in der Steril-Kontrolle änderten sich innerhalb der Inkubationszeit nicht.

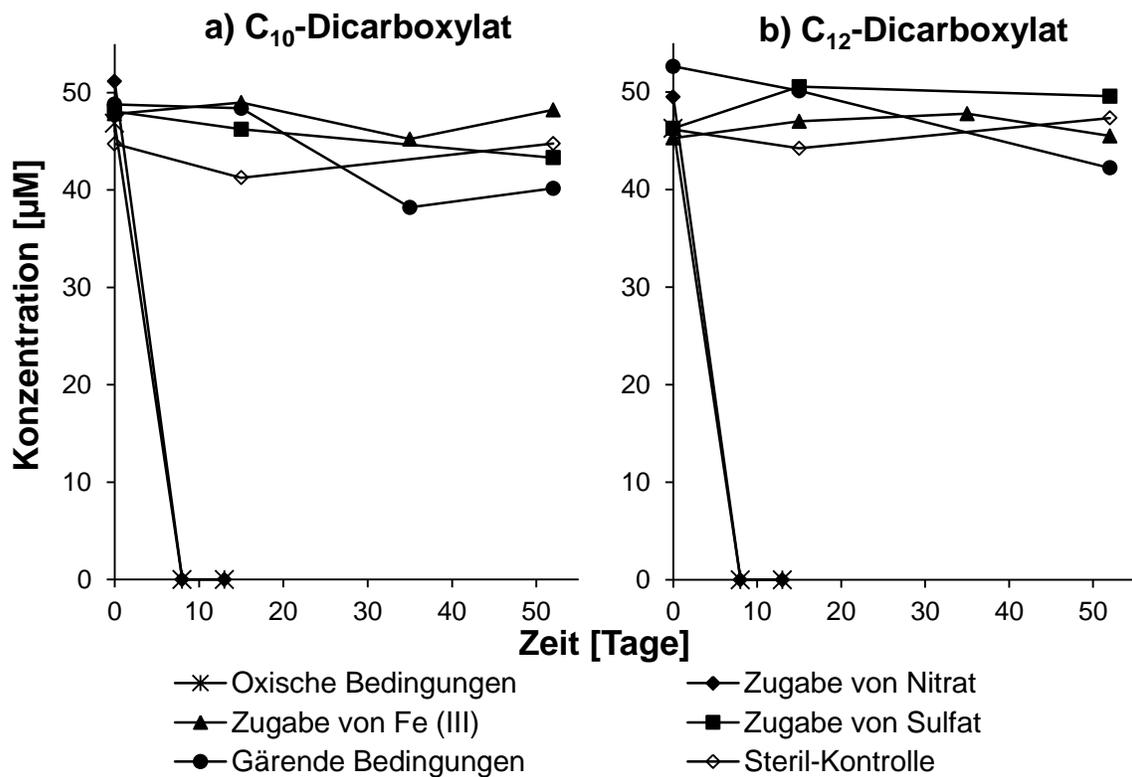


Abbildung 6-3: Mikrobieller Abbau von a) Decan (C₁₀)- und b) Doedecan (C₁₂)-Dicarboxylate unter verschiedenen Redoxbedingungen. Die Kurven „oxische Bedingungen“ und „Zugabe von Nitrat“ überlagern sich. Die Daten sind repräsentativ für jeweils drei parallele Ansätze. Dargestellt ist die Steril-Kontrolle mit Fe (III), die Steril-Kontrollen aller untersuchen Bedingungen repräsentiert.

In der Literatur ist bisher nur sehr wenig über den mikrobiellen Abbau der zwei Dicarbonsäuren dokumentiert. Chapman and Duggleby, (1967) untersuchten den aeroben Abbau von 15 mg/l C₁₀-Dicarboxylat durch zwei verschiedene Laborkulturen (*Moraxella wolfii* oder *Pseudomonas aeruginosa* 8602) bei 30°C. Gemäß ihren

Ergebnissen wurden innerhalb von 240 Minuten 60-65 % der theoretisch notwendigen Menge an Sauerstoff für die Mineralisierung der Substanz verbraucht. Die Autoren schlugen die β -Oxidation als der Abbaumechanismus für C₁₀-Dicarboxylat vor. In der Studie von Matthies und Schink (1993) wurde der mikrobielle Abbau des C₁₀-Dicarboxylats (12 mM) unter gärenden Bedingungen untersucht. Als Inokulum wurden zwei methanogene Anreicherungskulturen aus Süßwasser- und Meerwasser-Schlamm verwendet. Ein mikrobieller Abbau von C₁₀-Dicarboxylat wurde nur bei jenem Konsortium beobachtet, das aus Meer-Schlamm angereicht wurde. Die Substanz wurde innerhalb von 12-15 Tagen komplett abgebaut, wobei sich Acetat und Methan als Abbauprodukte bildeten. In dieser Studie wurde ebenfalls die β -Oxidation als erster Schritt des mikrobiellen Abbaus postuliert.

Die Ergebnisse der aktuellen Untersuchung deuteten darauf hin, dass unter vorwiegend gärenden Bedingungen im untersuchten Sediment keinen Bioabbau von Benzoat und die Dicarbonsäuren bestand. Dabei könnte auch die niedrige Inkubationstemperatur (12°C) und die Anwesenheit anderer organischen Substraten eine Rolle gespielt haben

6.4.2 Einfluss auf den mikrobiellen Ethylenglykolabbau

Weiterhin wurde der Einfluss von 2-EtH, Bz sowie von C₁₀- und C₁₂-Dicarboxylate auf den mikrobiellen EG-Abbau unter denselben Bedingungen untersucht.

Oxische Bedingungen

In Abb. 6-4 ist der Verlauf der EG-Konzentration in Ab- und Anwesenheit von organischen Säuren (OS) dargestellt. In allen Experimenten setzte der EG-Abbau nach einer zweitägigen Anpassungsphase an. Zwischen Tag 2 und 8 der Inkubation wurde überall eine steile Abnahme der EG-Konzentration beobachtet, bei der mehr als 92 % des EG abgebaut wurden. Bis zum Inkubationsende (bei Tag 13) wurde der Rest des Frostschutzmittels in allen Mikrokosmen komplett abgebaut. Mittel HPLC wurden keine organischen Produkte des EG-Abbaus detektiert. Alle vier organischen Säuren wurden innerhalb von 13 Tagen Inkubationszeit komplett abgebaut (s. Unterkapitel 6.3.2). Die EG-Konzentration in der Steril-Kontrolle blieb innerhalb der Inkubationszeit konstant.

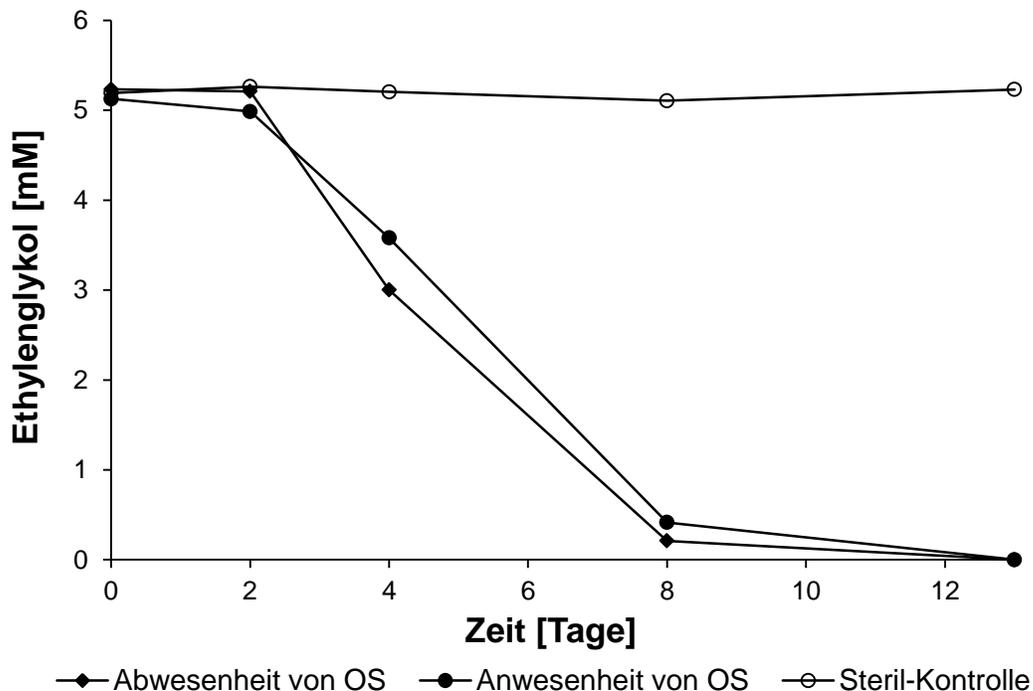


Abbildung 6-4: Aerober mikrobieller Abbau von Ethylenglykol in Ab- und Anwesenheit der ausgewählten organischen Säuren. Die Daten sind repräsentativ für jeweils drei parallele Ansätze.

Zugabe von Nitrat als Elektronenakzeptor

Wie in Abb. 6-5 a deutlich zu erkennen ist, verlief der EG-Abbau bei Zugabe von Nitrat in den Ansätzen mit OS ähnlich zum EG-Abbau im Kontroll-Experiment. Innerhalb von 33 Tagen Inkubationszeit wurde EG komplett abgebaut. In beiden Versuchsreihen wurden keine organischen Abbauprodukte detektiert, was auf eine vollständige Oxidation des Ethylenglykols zu CO_2 hindeutete. Eine Abnahme der Nitratkonzentration wurde beobachtet (Abb. 6-5 b). Im Zuge der Nitrat-Abnahme wurde die Bildung von Nitrit (maximal 2 mM) in allen Mikrokosmen detektiert. Die Stöchiometrie des Abbaus (Tab. 6-10) zeigte, dass die EG-Oxidation gekoppelt an Nitratreduktion erfolgte.

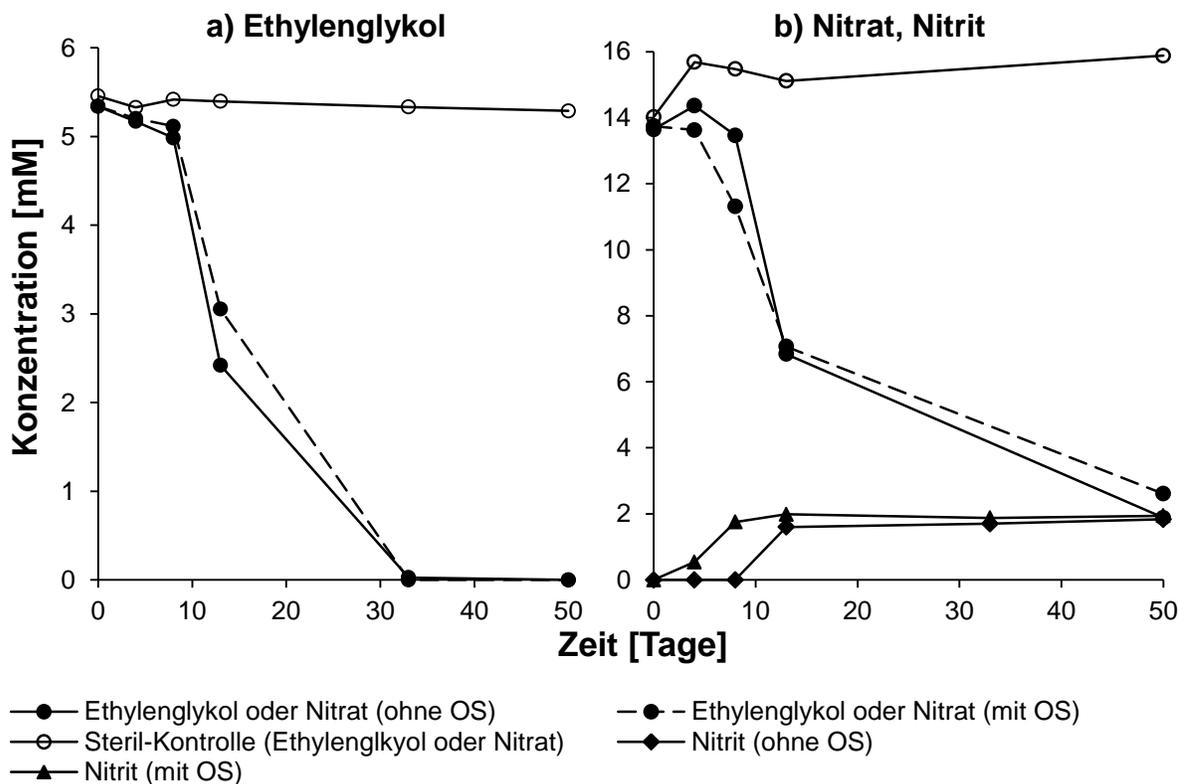


Abbildung 6-5: a) Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol in Ab- und Anwesenheit der organischen Säuren im Experiment mit Nitrat, b) Abnahme der Nitratkonzentration. Die Daten sind repräsentativ für jeweils drei parallele Ansätze.

Tabelle 6-10: Elektronenbilanz des Ethylenglykolabbaus bei Zugabe von Nitrat als Elektronenakzeptor in Ab- sowie in Anwesenheit der organischen Säuren.

Experiment	Abwesenheit von OS	Anwesenheit von OS
(a) Nitrat (verbraucht) [mM]	11,8	11,1
(b) Nitrit (gebildet) [mM]	1,8	2
(c) Nitratreduktion zu N ₂ [mM]: (a)-(b)	10	9,1
(d) EG (verbraucht) [mM]	5,3	5,3
(e) EG-Oxidation [mM] mit der Reduktion von Nitrat zu Nitrit: (b)/5*	0,36	0,4
(f) EG-Oxidation [mM] mit der Reduktion von Nitrat zu N ₂ : (c)/2**	5	4,2***
EG-Oxidation (Gesamt) [mM]: (e)+(f) (% des zugesetzten Ethylenglykols)	5,3 (100)	4,6*** (91)

OS: Organische Säuren; EG: Ethylenglykol, *die stöchiometrische Menge an Nitrat (Reduktion zu Nitrit), erforderlich für die Oxidation von 1 mM Ethylenglykol zu CO₂, **die stöchiometrische Menge an Nitrat (Reduktion zu N₂), erforderlich für die Oxidation von 1 mM Ethylenglykol zu CO₂, ***Zzgl. der Nitratreduktion erforderlich für die Oxidation der aliphatischen Säuren. Die Werte sind Mittelwerte aus jeweils drei parallelen Experimenten.

Zugabe von Ferrihydrit als Elektronenakzeptor

Der EG-Abbau bei Zugabe von Ferrihydrit verhielt sich ähnlich zwischen den Versuchsansätzen mit und ohne Zugabe von OS. Dabei wurde das Frostschutzmittel innerhalb von 35 Tagen Inkubationszeit komplett zu Acetat transformiert (Abb. 6-6). Zum Inkubationsende wurden durchschnittlich 98 % des zugesetzten Kohlenstoffs in Acetat wiedergefunden. Eine Bildung von Fe (II) wurde während der Inkubation nicht beobachtet. Der EG-Abbau verlief wie in vorherigen Experimenten mit Sediment aus der gleichen Charge mit Fe (III) als EA (s. Kapitel 3). Dabei wurde gezeigt, dass EG fermentativ abgebaut wurde. Somit kann auch bei diesen Versuchsansätzen geschlossen werden, dass Gärung der dominierende Abbauprozess war.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass unter den untersuchten Bedingungen die zugesetzten organischen Säuren in Konzentration von je 50 μ M den mikrobiellen Abbau von EG nicht beeinflussten.

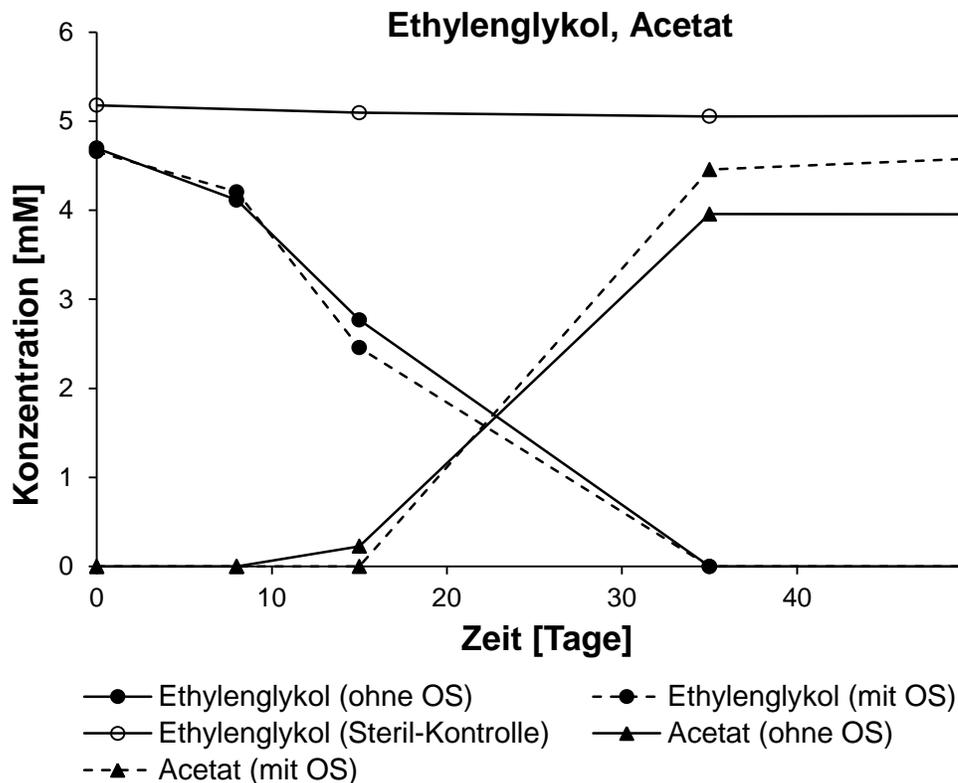


Abbildung 6-6: Mikrobieller Ethylenglykolabbau zu Acetat in Ab- und Anwesenheit von organischen Säuren im Experiment mit Fe (III). Die Daten sind repräsentativ für jeweils drei parallele Ansätze.

Zugabe von Sulfat als Elektronenakzeptor

Der EG-Abbau bei Zugabe von Sulfat ist in Abb. 6-7 a dargestellt. Nach einer lag-Phase von 15 Tagen wurde das Frostschutzmittel sowohl in An- als auch in Abwesenheit von OS innerhalb von 20 Tagen Inkubationszeit komplett abgebaut. Acetat bildete sich als Produkt des EG-Abbaus. Die Acetat-Konzentration lag zum Inkubationsende bei 5,5 mM. Ethanol wurde als Intermediat des EG-Abbaus in allen Ansätzen (beider Versuchsreihen) detektiert. Eine Abnahme der Sulfatkonzentration wurde in keinem der Ansätze innerhalb der Inkubationszeit beobachtet (Abb. 6-7 b). Ähnlich wie in vorherigen Experimenten mit gleichem Sediment, deuteten die Ergebnisse dieser Studie auf eine Vergärung des Ethylenglykols zu Acetat und Ethanol hin, wobei Ethanol weiter abgebaut wurde (Details s. Kapitel 3).

Unter den untersuchten Bedingungen wurde kein Unterschied zwischen dem EG-Abbau in Ab- und Anwesenheit von OS festgestellt. Somit wurde keine Auswirkung der vier OS auf den mikrobiellen Abbau von EG beobachtet.

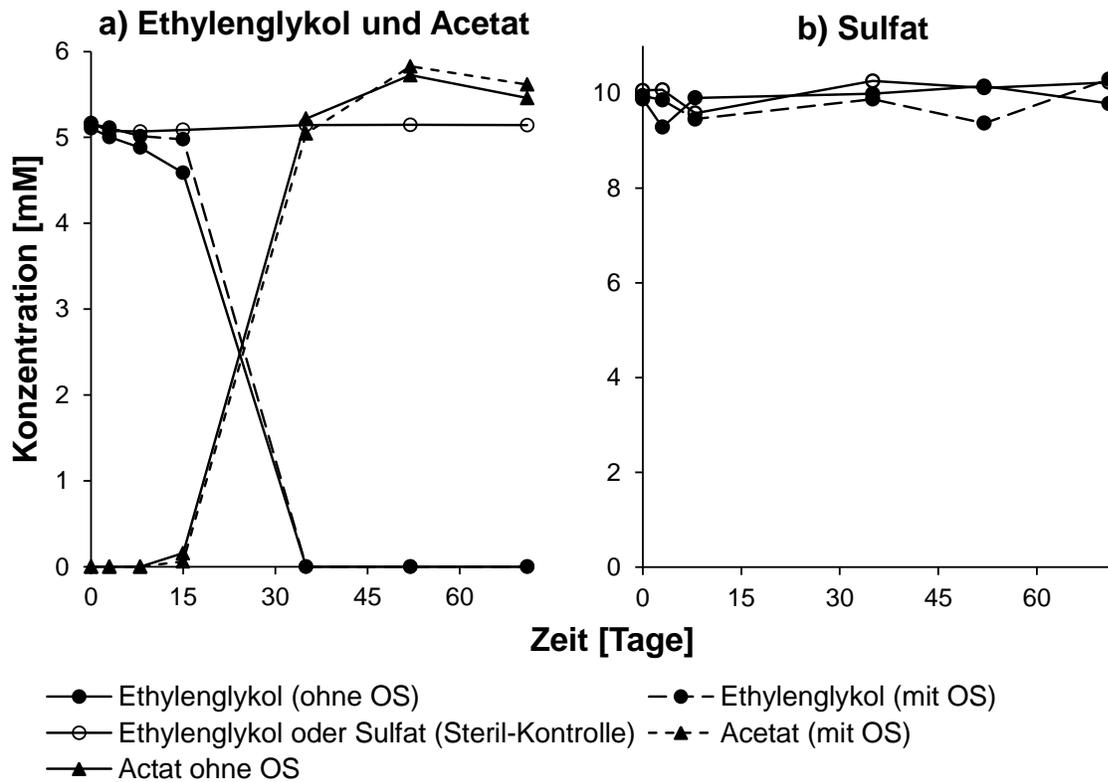


Abbildung 6-7 a) Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol in Ab- und Anwesenheit der organischen Säuren im Experiment mit Sulfat, b) Konzentrationsverlauf von Sulfat. Die Daten sind repräsentativ für jeweils drei parallele Ansätze.

Gärende Bedingungen

In allen Ansätzen, denen keine EA zugegeben wurden, verlief der EG-Abbau ähnlich dem EG-Abbau in den Ansätzen mit Sulfat. Der EG-Verlauf in An- und Abwesenheit von OS unter gärenden Bedingungen ist in Abb. 6-8 dargestellt. Zum Inkubationsende lagen sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit der OS durchschnittlich 5,5 mM Acetat vor (Mittelwert aus jeweils drei parallelen Ansätzen), was 105 % der Anfangskonzentration von EG (Mittelwert aus jeweils drei parallelen Ansätzen) entsprach. Ethanol war ein Intermediat des EG-Abbaus, dessen Konzentration in den Ansätzen beider

Versuchsreihen im Bereich zwischen 0,1 (Wert liegt unter der Bestimmungsgrenze) und 0,8 mM lag.

Ähnlich wie in allen anderen Versuchsansätzen dieser Studie, wurde auch in den Ansätzen ohne Zugabe von EA keine signifikante Auswirkung der vier OS auf den mikrobiellen Abbau von EG beobachtet.

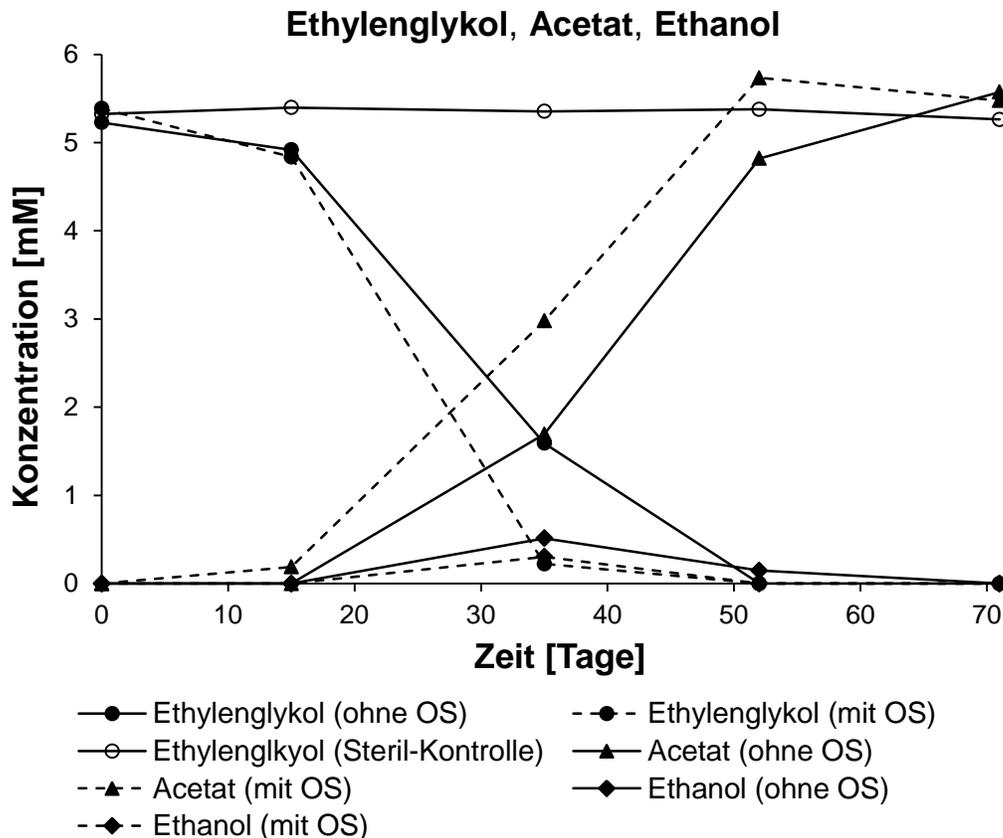


Abbildung 6-8: Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol zu Acetat in Ab- und Anwesenheit der organischen Säuren unter gärenden Bedingungen. Ethanol wurde als Intermediat detektiert. Die Daten sind repräsentativ für drei parallele Ansätze.

6.4.3 Schlussfolgerungen

Aus den Ergebnissen zum Bioabbau von 2-Ethylhexanoat (2-EtH), Benzoat (Bz), C₁₀- und C₁₂-Dicarboxylat sowie deren Einfluss auf den EG-Abbau kann Folgendes geschlossen werden:

- 1) Bz sowie C₁₀-und C₁₂-Dicarboxylate sind aerob gut abbaubar und können schnell durch aerobe mikrobielle Oxidation aus tiefen Grundwassersystemen eliminiert werden.
- 2) In anoxischen Aquiferen, wo Nitrat als EA vorliegt, ist mit einer kompletten Verwertung der beiden Dicarboxylate zu rechnen.
- 3) Wegen der hohen Beständigkeit von Benzoat unter Ausschluss von Sauerstoff, ist diese Substanz bedenklich für tiefe anoxische Aquifere.
- 4) In anoxischen Aquiferen, wo Sulfat oder Nitrat als EA vorliegen, sind keine langen Verweilzeiten für 2-EtH zu erwarten.
- 5) Eine Hemmung des EG-Abbaus in Anwesenheit der untersuchten Konzentrationen der Säuren ist in Sedimenten tiefer Aquifere nicht zu erwarten.

Bei Schadensfall von Erdwärmesonden wird eine langandauernde Kontamination tiefer anoxischer Aquifere mit den untersuchten organischen Säuren erwartet. Die hohe Affinität zur wässrigen Phase ermöglicht dieser Substanzen eine schnelle Verbreitung in den Grundwassersystemen. So können die Säuren wichtige Trinkwasserquellen erreichen und die Trinkwasserqualität erheblich beeinträchtigen.

6.5 Literatur

- Altenschmidt, U., Oswald, B., Steiner, E., Herrmann, H., Fuchs, G., 1993. New aerobic benzoate oxidation pathway via benzoyl-coenzyme A and 3-hydroxybenzoyl-coenzyme A in a denitrifying *Pseudomonas* sp. *J. Bacteriol.* 175, 4851–4858.
- Bakker, G., 1977. Anaerobic degradation of aromatic compounds in the presence of nitrate. *Fems Microbiol. Lett.* 1, 103–107.
- Barnabé, S., Beauchesne, I., Cooper, D.G., Nicell, J.A., 2008. Plasticizers and their degradation products in the process streams of a large urban physicochemical sewage treatment plant. *Water Res.* 42, 153–162.
- Beauchamp, E.G., Trevors, J.T., Paul, J.W., 1989. Carbon Sources for Bacterial Denitrification, in: Stewart, B.A. (Ed.), *Advances in Soil Science*. Springer New York, New York, NY, pp. 113–142.
- Berry, D.F., Francis, A.J., Bollag, J.M., 1986. Microbial metabolism of aromatic compounds under anaerobic conditions.
- Brusseau, M.L., Hu, M.Q., Wang, J.-M., Maier, R.M., 1999. Biodegradation during contaminant transport in porous media. 2. The influence of physicochemical factors. *Environ. Sci. Technol.* 33, 96–103.
- Chapelle, F., 1993. *Ground-water microbiology and geochemistry*. Wiley, New York.
- Chapman, P.J., Duggleby, R.G., 1967. Dicarboxylic acid catabolism by bacteria. *Biochem J.* 103, 7c–9c.
- Chen, M., Yan, Y., Zhang, W., Lu, W., Wang, J., Ping, S., Lin, M., 2011. Complete Genome Sequence of the Type Strain *Pseudomonas stutzeri* CGMCC 1.1803. *J. Bacteriol.* 193, 6095–6095.
- Chua, H., Yu, P.H.F., Lo, W., Sin, S.N., 2001. The degradation of xenobiotic branched carboxylic acids in anaerobic sediment of the Pearl River in Southern China. *Sci. Total Environ.* 266, 221–228.

- Ding, B., Schmeling, S., Fuchs, G., 2007. Anaerobic Metabolism of Catechol by the Denitrifying Bacterium *Thauera aromatica*--a Result of Promiscuous Enzymes and Regulators? *J. Bacteriol.* 190, 1620–1630.
- Gall, D.L., Ralph, J., Donohue, T.J., Noguera, D.R., 2013. Benzoyl Coenzyme A Pathway-Mediated Metabolism of meta-Hydroxy-Aromatic Acids in *Rhodospseudomonas palustris*. *J. Bacteriol.* 195, 4112–4120.
- Ferry, J.G., Wolfe, R.S., 1976. Anaerobic degradation of benzoate to methane by a microbial consortium. *Arch. Microbiol.* 107, 33–40.
- Fieser, L.F., Fieser, M., 1972. *Organische Chemie: mit 114 Tab.* Verl. Chemie, Weinheim / Bergstr.
- Fuchs, G., 2008. Anaerobic Metabolism of Aromatic Compounds. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1125, 82–99.
- Fuchs, G., Boll, M., Heider, J., 2011. Microbial degradation of aromatic compounds — from one strategy to four. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 803–816.
- Habe, H., Kobuna, A., Hosoda, A., Kosaka, T., Endoh, T., Tamura, H., Yamane, H., Nojiri, H., Omori, T., Watanabe, K., 2009. Identification of the electron transfer flavoprotein as an upregulated enzyme in the benzoate utilization of *Desulfotignum balticum*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73, 1647–1652.
- Holmes, D.E., Risso, C., Smith, J.A., Lovley, D.R., 2011. Anaerobic Oxidation of Benzene by the Hyperthermophilic Archaeon *Ferroglobus placidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5926–5933.
- Horn, O., Nalli, S., Cooper, D., Nicell, J., 2004. Plasticizer metabolites in the environment. *Water Res.* 38, 3693–3698.
- Kamagata, Y., Kitagawa, N., Tasaki, M., Nakamura, K., Mikami, E., 1992. Degradation of benzoate by an anaerobic consortium and some properties of a hydrogenotrophic methanogen and sulfate-reducing bacterium in the consortium. *J. Ferment. Bioeng.* 73, 213–218.

- Kazumi, J., Caldwell, M.E., Suflita, J.M., Lovley, D.R., Young, L.Y., 1997. Anaerobic Degradation of Benzene in Diverse Anoxic Environments. *Environ. Sci. Technol.* 31, 813–818.
- Kazumi, J., Haggblom, M.M., Young, Y., 1995. Degradation of Monochlorinated and Nonchlorinated Aromatic Compounds under Iron-Reducing Conditions.
- Knapp, D.R., 1979. *Handbook of analytical derivatization reactions*. Wiley, New York.
- Koch, J., Eisenreich, W., Bacher, A., Fuchs, G., 1993. Products of enzymatic reduction of benzoyl-CoA, a key reaction in anaerobic aromatic metabolism. *Eur. J. Biochem.* 211, 649–661.
- Kung, J.W., Seifert J., von Bergen, M., Boll, M., 2013. Cyclohexanecarboxyl-Coenzyme A (CoA) and Cyclohex-1-ene-1-Carboxyl-CoA Dehydrogenases, Two Enzymes Involved in the Fermentation of Benzoate and Crotonate in *Syntrophus aciditrophicus*. *J. Bacteriol.* 195, 3193-3200.
- Lahme, S., Harder, J., Rabus, R., 2012. Anaerobic degradation of 4-methylbenzoate by a newly isolated denitrifying bacterium, strain pMbN1. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1606–1610.
- Lee, P.Y., Chen, C.Y., 2009. Toxicity and quantitative structure–activity relationships of benzoic acids to *Pseudokirchneriella subcapitata*. *J. Hazard. Mater.* 165, 156–161.
- Lovley, D.R., Baedeker, M.J., Lonergan, D.J., Cozzarelli, I.M., Phillips, E.J.P., Siegel, D.I., 1989. Oxidation of aromatic contaminants coupled to microbial iron reduction. *Nature* 339, 297–300.
- Matthies, C., Schink, B., 1993. Anaerobic degradation of long-chain dicarboxylic acids by methanogenic enrichment cultures. *Fems Microbiol. Lett.* 111, 177–182.
- Mountfort, D.O., Bryant, M.P., 1982. Isolation and characterization of an anaerobic syntrophic benzoate-degrading bacterium from sewage sludge. *Arch. Microbiol.* 133, 249–256.

- Nalli, S., Cooper, D.G., Nicell, J.A., 2002. Biodegradation of plasticizers by *Rhodococcus rhodochrous*. *Biodegradation* 13, 343–352.
- Nalli, S., Cooper, D.G., Nicell, J.A., 2006. Metabolites from the biodegradation of di-ester plasticizers by *Rhodococcus rhodochrous*. *Sci. Total Environ.* 366, 286–294.
- Oberender, J., Kung, J.W., Seifert, J., von Bergen, M., Boll, M., 2012. Identification and Characterization of a Succinyl-Coenzyme A (CoA):Benzoate CoA Transferase in *Geobacter metallireducens*. *J. Bacteriol.* 194, 2501–2508.
- Patrauchan, M.A., Florizone, C., Dosanjh, M., Mohn, W.W., Davies, J., Eltis, L.D., 2005. Catabolism of Benzoate and Phthalate in *Rhodococcus* sp. Strain RHA1: Redundancies and Convergence. *J. Bacteriol.* 187, 4050–4063.
- PHYSPROP, 2013. Physical Properties Database. Im Internet publizierte Daten, Quelle: www.syrres.com.
- Qiao, J.-T., Qiu, Y.-L., Yuan, X.-Z., Shi, X.-S., Xu, X.-H., Guo, R.-B., 2013. Molecular characterization of bacterial and archaeal communities in a full-scale anaerobic reactor treating corn straw. *Bioresour. Technol.* 143, 512–518
- Staples, C.A., 2001. A review of the environmental fate and aquatic effects of a series of C4 and C8 oxoprocess chemicals. *Chemosphere* 45, 339–346.
- TOXNET, 2012. Toxicology Data Network. Im Internet publizierte Daten, Quelle: toxnet.nlm.nih.gov.
- Townsend, G.T., Ramanand, K., Suflita, J.M., 1997. Reductive Dehalogenation and Mineralization of 3-Chlorobenzoate in the Presence of Sulfate by Microorganisms from a Methanogenic Aquifer.
- Widdel, F., Pfennig, N., 1982. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids II. Incomplete oxidation of propionate by *Desulfobulbus propionicus* gen. nov., sp. nov. *Arch. Microbiol.* 131, 360–365.

- Williams, R.J., Evans, W.C., 1975. The metabolism of benzoate by *Moraxella* species through anaerobic nitrate respiration. Evidence for a reductive pathway. *Biochem. J.* 148, 1–10.
- Wöhlbrand, L., Jacob, J.H., Kube, M., Mussmann, M., Jarling, R., Beck, A., Amann, R., Wilkes, H., Reinhardt, R., Rabus, R., 2013. Complete genome, catabolic sub-proteomes and key-metabolites of *Desulfobacula toluolica* Tol2, a marine, aromatic compound-degrading, sulfate-reducing bacterium: Genome, proteome and key-metabolites of *D. toluolica* Tol2. *Environ. Microbiol.* 15, 1334–1355.
- Ziegler, K., Braun, K., Bickler, A., Fuchs, G., 1987. Studies on the anaerobic degradation of benzoic acid and 2-aminobenzoic acid by a denitrifying *Pseudomonas* strain. *Arch. Microbiol.* 149, 62–69.

7 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Identität von Additiven ermittelt, die in Deutschland gebräuchlichen Wärmeträgerflüssigkeiten (WTF) für Erdwärmesonden eingesetzt werden. Des Weiteren wurde das Umweltverhalten der Hauptkomponente Ethylenglykol und ausgewählter organischer Additive untersucht. Im Rahmen des aktuellen Kapitels wurden wichtige Punkte dieser Arbeit diskutiert und relevante Erkenntnisse im Hinblick auf die Umwelt dargestellt.

Datenerhebung bei Herstellern/Vertreibern von WTF

Die Identitätsaufklärung von Additiven basierte auf den Angaben von sieben der insgesamt elf befragten Hersteller oder Vertreter von WTF, deren Produkte zum Zeitpunkt der Datenerhebung (September 2009) auf dem deutschen Markt gängig waren. Die Anfrage über das Funktionsspektrum der eingesetzten Additive war möglichst umfassend und schloss Korrosionsschutzmitteln, Stabilisatoren (Biozide), Antischaummittel, Farb- und Geruchsstoffe sowie Stoffe mit sonstiger Funktion ein. Die Datenerhebung ergab den Einsatz aller oben erwähnten Funktionsgruppen, außer Biozide. Biozide verhindern in der Regel die Bildung von Biofilmen und gewährleiten auf dieser Weise eine normale Funktion der Anlagen. Solche (antimikrobielle) Eigenschaften besitzt z.B. die WTF Glysofor L (s. die Online-Produktinformationen unter <http://www.glysofor.de/glysofor-l.html>, aufgerufen am 03.10.13), die in Deutschland oft zum Einsatz kommt (LAWA, 2013). Interessant zu wissen dabei ist, dass die Firma Wittig Umweltchemie GmbH, die Glysofor L in Deutschland vertreibt, sich unter den befragten Firmen befand, die an der Datenerhebung nicht teilnahmen. Dieses Beispiel zeigt, dass Biozide, die aus Sicht des Umweltschutzes eine wichtige Funktionsgruppe der Additive darstellt, im Rahmen dieser Befragung nicht erfasst werden konnte.

Priorisierung von Additiven

Die Priorisierung der Additive erfolgte anhand ihrer Verwendungshäufigkeit in den deklarierten WTF sowie Daten über ihr Umweltverhalten (Mobilität, Bioabbaubarkeit und aquatische Toxizität). Anhand dieser Kriterien wurden fünf (Benzotriazol, Tolyltriazol, 2-Ethylhexanoat, Benzoat und Decandicarboxylat) von 35 deklarierten Additiven als potentiell problematisch für tiefe Grundwasseraquifere klassifiziert. Die Mehrheit der deklarierten Substanzen (22) wurde aufgrund des Kriteriums Verwendungshäufigkeit als nicht prioritär klassifiziert. Da dieses Kriterium ausschließlich auf dem Einsatz der Additive in den deklarierten WTF basierte, wurden möglicherweise Stoffe unterschätzt, die eventuell in anderen WTF (z.B. der Firmen, die an der Studie nicht teilnahmen) vorkamen. Des Weiteren konnte das GW-Gefährdungspotenzial von sieben der 13 mehrfachverwendeten Substanzen aufgrund fehlender oder nicht ausreichender Daten über ihre Bioabbaubarkeit und/oder ihre aquatische Toxizität nicht zuverlässig eingeschätzt werden. Diese Substanzen wurden in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt. Für diese Additive besteht noch der Bedarf an weiteren Experimenten, wo sie eingehend untersucht werden sollen.

Auswahl der experimentell untersuchten Konzentrationen

Die Auswahl der Konzentration basierte auf der Annahme, dass im Falle einer Leckage die WTF über längere Zeiträume kontinuierlich in den Aquifer gelangen. In Anlehnung an einen dokumentierten Schadensfall (Bassetti et al., 2006) wurde zur Konzentrationsabschätzung im Grundwasser eine niedrige Austrittsrate von 7 ml/Stunde gewählt. In den Mikrokosmosexperimenten wurden folglich Konzentrationen der Additive eingestellt, die bei 1/500 bis 1/1000 der Durchschnittskonzentration (Median) der entsprechenden Substanz in WTF lagen. Die Austrittsraten können allerdings in Abhängigkeit vom Umgebungsdruck und der Porosität der Sedimente, welche wiederum von der Tiefe und den geologischen Gegebenheiten geprägt werden, stark variieren und somit die erwartenden Konzentrationen im Untergrund beeinflussen.

Probenahme

Aufgrund der Art der Bohrung (mittels Druckluft) ist wahrscheinlich, dass Sauerstoff in den Proben gelangte, das sich toxisch auf obligat anaerobe Mikroorganismen auswirken könnte. Die Anwesenheit von sulfatreduzierenden Mikroorganismen in einigen Mikrokosmen zeigte jedoch, dass bestimmte Vertreter obligat anaerober Mikroorganismen tolerant gegenüber der Exposition von Sauerstoff waren.

Umweltverhalten von Ethylenglykol und den ausgewählten Additiven. Bedeutung mikrobieller Abbauprozesse für tiefe Aquifere.

Die Experimente zum mikrobiellen Abbau umfassten ein möglichst breites Spektrum an Redoxverhältnissen, die im tiefen Untergrund vorkommen können. Die Ergebnisse zeigten, dass aerobe und nitratreduzierende Abbauprozesse relevant für die Mineralisierung der Hauptkomponente Ethylenglykol sowie der Zusatzstoffe 2-Ethylhexanoat und beider Dicarboxylaten waren. Somit ist eine schnelle Eliminierung dieser Substanzen aus tiefen Aquiferen zu erwarten. Unter anoxischen Bedingungen, wo kein Nitrat vorhanden war, spielten sulfatreduzierende oder gärende Abbauprozesse eine entscheidende Rolle für den Abbau der Hauptkomponente. Unter diesen Bedingungen waren dagegen die untersuchten Additive (außer 2-Ethylhexanoat) persistent gegenüber mikrobiellem Abbau. Doch *welche Bedeutung haben diese Abbauprozesse in tiefen Aquiferen?* Eine präzise Antwort darauf kann aufgrund der hohen Komplexität und Diversität der Grundwassersysteme nicht gegeben werden. Anhand der typischen Verteilung der Elektronenakzeptoren im Untergrund kann allerdings eine grobe Einschätzung des Ausmaßes dieser Prozesse gemacht werden. Sauerstoff und Nitrat werden hauptsächlich mit neu gebildetem Grundwasser bzw. durch Versickerung ins Grundwassersystem eingetragen. Mit der Tiefe nehmen in der Regel die Sauerstoff- und Nitratkonzentrationen aufgrund mikrobieller Abbauprozesse (aerobe Atmung oder Denitrifikation) kontinuierlich ab. Nur in seltenen Fällen, z.B. in tiefen Aquiferen mit fehlender mikrobieller Aktivität (z.B. aufgrund von Mangel an organischen Substraten), können Sauerstoff (Lovley and Chapelle, 1995) oder Nitrat (Singleton et al., 2010) vorhanden sein. Somit stehen die für den mikrobiellen Abbau

relevante Elektronenakzeptoren in tiefen Aquiferen nur selten zur Verfügung. Das hat zur Folge, dass im tiefen Untergrund typischerweise anoxische nitratfreie Verhältnisse vorliegen. In solchem Milieu treten je nach Geologie der Grundwassersedimente eisen- oder sulfatreduzierende, aber auch gärende Mikroorganismen auf. Ausgehend von diesen Überlegungen, ist im Falle einer Leckage von Erdwärmesonden in tiefen Aquiferen, wo typische Redoxbedingungen vorliegen, eine Akkumulierung der untersuchten Additive zu vermuten. Die Frage „*Welche Auswirkungen hat die Akkumulierung von Additiven in tiefen Aquiferen zur Folge?*“ wird im Folgenden diskutiert.

Aufgrund der Persistenz beider Benzotriazole und deren geringen Sorption im Untergrund (Teich, 2011) ist eine geringe Retardation und eine weitverbreitete langandauernde Kontamination des Grundwassers zu erwarten. Die höchsten Benzotriazol- und Tolyltriazol-Konzentrationen, die (beim Schadensfall) im Grundwasser erwartet werden (Konzentrationsberechnung s. Kapitel 2) liegen bei ca. 20 bzw. 200 mg/l. Basierend auf experimentellen Ergebnissen zur akuten Ökotoxizität können diese Benzotriazol- und Tolyltriazol-Konzentrationen toxisch für aquatische Organismen sein (s. Tab. 2-4, Kapitel 2). Des Weiteren verlangsamen Benzo- und Tolyltriazol schon in Konzentrationen von einigen μM den mikrobiellen Abbau von Ethylenglykol unter bestimmten Redoxbedingungen. Das könnte wiederum zu einer Akkumulierung von Ethylenglykol oder toxischer Abbauprodukte des Ethylenglykol-Abbaus im Grundwasser führen. Das ist beunruhigend, weil die maximale EG-Konzentration (230 g/l), die im Falle einer Leckage im GW auftreten kann, weit über dem toxischen Grenzwert für Menschen (LD_{50} -Werte in Ratten 4-10 g/kg, WHO, 2002) liegt.

Benzoat, Decan- und Dodecandicarboxylat, die in der aktuellen Studie unter bestimmten Bedingungen persistent waren, könnten in Konzentrationen von maximal ca. 600 mg/l (Benzoat) und 500 mg/l (Decan- oder Dodecandicarboxylat) im GW auftreten. Ähnlich zu Benzotriazolen kann sich auch Benzoat in dieser Konzentration toxisch auf aquatische Organismen auswirken ($\text{LC}_{50}/\text{EC}_{50}$ -Werte s. Kapitel 2). Die

akuten Ökotoxizitätswerte für C₁₀-Dicarboxylat (s. Tab. 2-4) und C₁₂-Dicarboxylat¹ liegen über den maximal zu erwartenden Konzentrationen im Grundwasser. Es fehlen jedoch Daten über ihre akute Toxizität für Mikroorganismen, was die Einschätzung ihrer Gefährlichkeit für das tiefe Grundwasser-Ökosystem erschwert. In der aktuellen Studie wurde gezeigt, dass diese Substanzen in Konzentrationen von 50 µM keine Veränderungen im EG-Abbau verursachen. Um eine fundierte Einschätzung der Gefährlichkeit dieser Substanzen in Bezug auf den EG-Abbau zu ermöglichen, sind allerdings Experimente zur Wirkungsbeziehung verschiedener Konzentrationen der Säuren nötig.

Fazit und Ausblick

In der Regel stellen Aquifere ein System dar, das von komplexen hydrologischen, bio- und geochemischen Parametern sowie deren vielseitigen Wechselwirkungen geprägt ist. Eine genaue Nachahmung dieser Prozesse ist im einfachen Batch-Experiment sehr schwierig. Aus diesem Grund beziehen sich die Ergebnisse und die daraus gewonnenen Erkenntnissen auf die vereinfachten Batch-Systeme. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern erste Kenntnisse über die Identität und die Bioabbaubarkeit von den in WTF häufig eingesetzten Additiven sowie über ihren Einfluss auf den mikrobiellen Abbau des Ethylenglykols bei Bedingungen charakteristisch für tiefe Grundwassersysteme. Um ein besseres Verständnis der beobachteten Hemmeffekte von Benzotriazolen zu erlangen, sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig. Aufgrund der experimentellen Ergebnisse sowie der Einschätzung des Grundwassergefährdungspotenzials ist der Einsatz von Benzotriazolen, Benzoat sowie Decan- und Dodecan-Dicarboxylaten in WTF für Erdwärmesonden als kritisch zu betrachten. Es sollte geprüft werden, wie diese Additive durch andere Carboxylate (2-EtH) oder andere unbedenkliche Korrosionsschutzmittel ersetzt werden können ohne die aktuell maximal deklarierten Konzentrationen zu übersteigen. Im Sinne der Risikominimierung ist zudem wünschenswert das Spektrum der anwendbaren Substanzen weiter einzuschränken und die Notwendigkeit von Additiven anderer Funktionsgruppen (Duftstoffe, Entschäumer, Farbstoffe, Biozide) generell in Frage zu

¹ LC₅₀ (96 h) in Fisch und LC₅₀ (48 h) in Daphnia >1000 mg/l (prognostiziert mit EPI Suite™ v4.10).

stellen. In letzter Zeit wird zunehmend nach einer Alternative zu den herkömmlichen Korrosionsinhibitoren gesucht (Raja and Sethuraman, 2008). In neueren Studien wird z.B. das Potential von umweltfreundlichen Substanzen wie Aminosäuren (Amin et al., 2010; Gece and Bilgiç, 2010; Helal and Badawy, 2011) und pflanzlichen Extrakten (Abiola and James, 2010; Dong et al., 2011; Raja and Sethuraman, 2008; Raja et al., 2011; Singh et al., 2011) als alternative Korrosionsinhibitoren untersucht.

Literatur

- Abiola, O.K., James, A.O., 2010. The effects of Aloe vera extract on corrosion and kinetics of corrosion process of zinc in HCl solution. *Corros. Sci.* 52, 661–664.
- Amin, M.A., Khaled, K.F., Mohsen, Q., Arida, H.A., 2010. A study of the inhibition of iron corrosion in HCl solutions by some amino acids. *Corros. Sci.* 52, 1684–1695.
- Bassetti, S., Rohner, E., Signorelli, S., 2006. Dokumentation von Schadensfällen bei Erdwärmesonden. Geowatt AG. Schlussbericht, 65 S.
- Dong, L., Yuanhua, L., Yigang, D., Dezhi, Z., 2011. Corrosion inhibition of carbon steel in hydrochloric acid solution by rice bran extracts. *Anti-Corros. Methods Mater.* 58, 205–210.
- Gece, G., Bilgiç, S., 2010. A theoretical study on the inhibition efficiencies of some amino acids as corrosion inhibitors of nickel. *Corros. Sci.* 52, 3435–3443.
- Gibson, S.A., Suflita, J.M., 1986. Extrapolation of biodegradation results to ground water aquifers: reductive dehalogenation of aromatic compounds.
- Helal, N.H., Badawy, W.A., 2011. Environmentally safe corrosion inhibition of Mg–Al–Zn alloy in chloride free neutral solutions by amino acids. *Electrochimica Acta* 56, 6581–6587.
- Kazumi, J., Haggblom, M.M., Young, Y., 1995. Degradation of Monochlorinated and Nonchlorinated Aromatic Compounds under Iron-Reducing Conditions.
- LAWA, 2013. Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser. Im Internet publizierte Daten, Quelle: www.lawa.de.

- Lovley, D., Chapelle, F.H., 1995. Deep subsurface microbial processes. *Rev Geophys* 33, 365–381.
- Raja, P.B., Rahim, A.A., Osman, H., Awang, K., 2011. Inhibitive effect of *Xylopi* ferruginea extract on the corrosion of mild steel in 1M HCl medium. *Int. J. Miner. Met. Mater.* 18, 413–418.
- Raja, P.B., Sethuraman, M.G., 2008. Natural products as corrosion inhibitor for metals in corrosive media — A review. *Mater. Lett.* 62, 113–116.
- Singh, A., Ahamad, I., Singh, V.K., Quraishi, M.A., 2011. Inhibition effect of environmentally benign Karanj (*Pongamia pinnata*) seed extract on corrosion of mild steel in hydrochloric acid solution. *J. Solid State Electrochem.* 15, 1087–1097.
- Singleton, M.J., Moran, J.E., Esser, B.K., Roberts, S.K., Hillegonds, D.J., 2010. California GAMA Special Study: An isotopic and dissolved gas investigation of nitrate source and transport to a public supply well in California's Central Valley.
- Teich, U., 2011. Das Sorptionsverhalten von 1H- Benzotriazol (Masterthesis). Eberhard Karls Universität, Tübingen.
- WHO, 2002. Ethylene Glycol-Human Health Aspects. Concise International Chemical Assessment Document 45.
- Williams, R.J., Evans, W.C., 1975. The metabolism of benzoate by *Moraxella* species through anaerobic nitrate respiration. Evidence for a reductive pathway. *Biochem. J.* 148, 1–10.

Anhang

Tabelle A-1: Verwendete Chemikalien.

Name	Firma
Acetaldehyd, 99,5 %	Acros
Eisen(II)chlorid-Tetrahydrat, p.a.	Merck
Ethanol, p.a.	Merck
Ethylenglykol, 99,5 %	Fluka
Magnesiumsulfat-Heptahydrat, p.a.	Merck
Natriumacetat, 99,0 %	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid, 50 %, p.a.	Merck
Natriumhydroxid, Plätzchen, p.a.	Merck
Natriumnitrat, p.a.	Fluka
Natriumsulfid-Nonahydrat, 98,0 %.	Sigma-Aldrich
Salzsäure, 25 %, p.a.	Merck
Fe(NO ₃)*9H ₂ O (Ferrihydritsynthese*)	Merck
Kaliumhydroxid (Ferrihydritsynthese*)	Merck
Substanzen für Mineralmedien	Im Folgenden einzeln aufgeführt
Substanzen für Ferrozintest	Im Folgenden einzeln aufgeführt

*2-line Ferrihydrit wurde anhand pH-kontrollierter Technik hergestellt.

Zusammensetzung der verwendeten Mineralmedien

Tabelle A-2: M9-Medium (Sambrook et al., 1989).

Substanz	Menge [g/l]
Na ₂ HPO ₄	2,44
KH ₂ PO ₄	1,52
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,2
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,05

Tabelle A-3: Spurenelementlösung SL4 (Pfennig, 1974).

Substanz	Menge [g/l]
EDTA	0,5 g
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	0,2 g
Spurenelementlösung SL6	100 ml

Tabelle A-4: Spurenelementlösung SL6, 10-fach konzentriert (Pfennig, 1974).

Substanz	Menge [g/l]
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	0,1
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	0,03
H ₃ PO ₃	0,3
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0,2
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	0,01
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	0,188
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	0,3

Tabelle A-5: Mineralsalzmedium für anaerobe Mikroorganismen.

Substanz	Menge [g/l]
KH ₂ PO ₄	0,48
NH ₄ Cl	0,24
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,02
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	0,32
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	0,08
NaHCO ₃	2,5

Tabelle A-6: Selenit/Wolframat-Lösung, 1000-fach konzentriert (Widdel and Bak, 1992).

Substanz	Menge [mg/l]
NaOH	400
Na ₂ SeO ₃ *5 H ₂ O	6
Na ₂ WO ₄ *2 H ₂ O	8

Tabelle A-7: Spurenelementlösung SL10, 1000-fach konzentriert, modifiziert nach Widdel & Bak, (1992).

Substanz	Menge pro Liter
25% HCl	10 ml
FeCl ₂ * 4 H ₂ O	1,5 g
H ₃ BO ₃	30 mg
MnCl ₂ * 4 H ₂ O	100 mg
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	190 mg
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	24 mg
CuCl ₂ * 2 H ₂ O	2 mg
ZnCl ₂	70 mg
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	36 mg

Tabelle A-8: 7-Vitamine-Lösung, 1000-fach konzentriert (Widdel and Pfennig, 1982).

Substanz	Menge [mg/l]
4 Aminobenzoic acid	50 mg
D (+) biotin	10 mg
Nicotinic acid	100 mg
Ca-D(+) pantothenate	25 mg
Pyridoxamine (Vit B6) dihydrochloride	250 mg
Thiaminium (Vit. B1) dihydrochloride	50 mg
Cyanocobalamin	50 mg

Tabelle A-9 Arbeitslösungen für Ferrozintest.

Stammlösung	Bestandteile
10 % Hydroxylaminhydrochlorid	10 g Hydroxylaminhydrochlorid in 1 M HCl
Ferrozin-Lösung	50 % (w/v) Amoniumacetat im Wasser 0,1 % Ferrozin (Pulver)

Tabelle A-10: Mineralmedium zum cometabolischen Abbau von Benzotriazol nach Gaja & Knapp, 1997.

Substance	Concentration [g/l]
KH_2PO_4	1
K_2HPO_4	1
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,004
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,04

Methode für die Derivatizierung von 2-Ethylhexansäure, Benzoat, Decan- und Dodecandisäuren**Tabelle A-11: Verwendete Chemikalien für die Derivatisierungsmethode.**

Name	Firma
10 % BF_3 in Butanol	Sigma-Aldrich
Isohexan	Merck
NaCl	Fluka
Na_2SO_4	Merck

Material und Methoden

- Pasteurpipetten
- 0,5 ml Glaspipetten
- N_2 -Station zum Verdampfen
- Trockenschrank (70°C)
- Vortex

Vorgehensweise

- Probenvolumen: 0,5 ml in 1,5 ml Reagenzgläser
- Verdampfen des Methanols unter Stickstoff
- Zusetzen von Na_2SO_4
- Zusetzen von 30 μl der Reagenzlösung (10% BF_3 in Butanol)
- Zudecken mit Crimper
- Vermischen auf Vortex
- Inkubation der Proben im Trockenschrank bei 70°C für 5 Stunden

- Abkühlen der Proben für wenige Minuten zu Raumtemperatur
- Zugabe von 0,2 ml wässrige NaCl-Lösung zum Neutralisieren des Überschusses von Butanol
- Kurzes Vermischen am Vortex
- Stehen lassen für ca. 5 Minuten
- Abdecken
- Zugabe von 0,5 ml Isohexan mit Glaspipette zur Extaktion der Butylester
- Zudecken
- Schütteln der Proben für 3 Minuten am Vortex
- Abtrennen der organischen Schicht mit Pasteurpipette und Überführen ins Reagenzglas mit vorgelegtem Na_2SO_4 zum Trocknen
- Leichtes Schütteln der Lösung (das Salz soll rieseln)
- Entnehmen von ca. 20 μl der Lösung und überführen ins Glaseinsatz
- Zudecken
- Messen auf GC-MS

Abbildungen

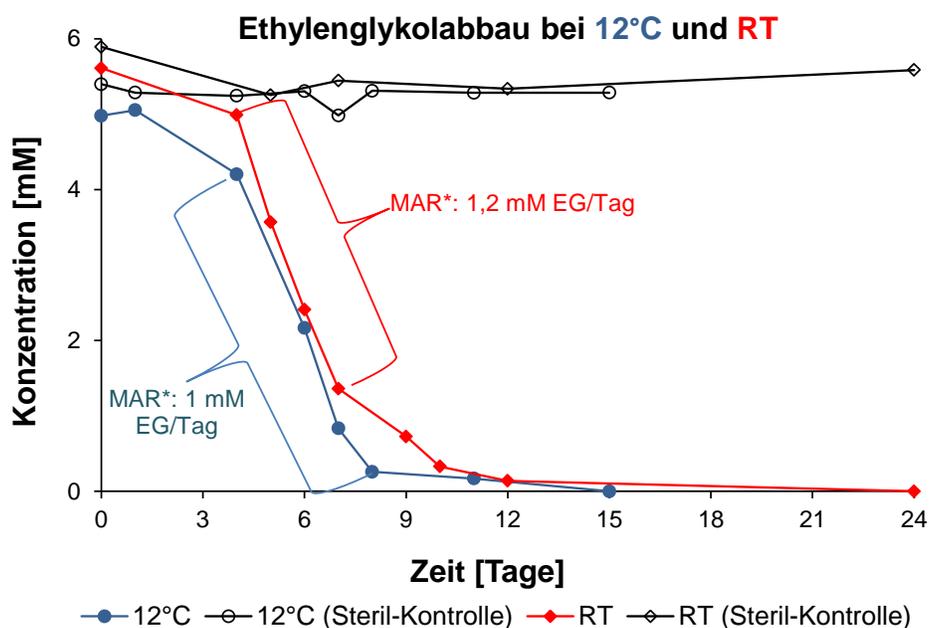


Abbildung A-1: Ethylenglykolabbau sowie Abbauraten unter nitratreduzierenden Bedingungen bei 12°C und RT. Die Abnahmekurven sind repräsentativ für zwei parallele Ansätze; *maximale Abbaurate für Ethylenglykol (die Steigung des markierten Bereichs der Acetatkurve).

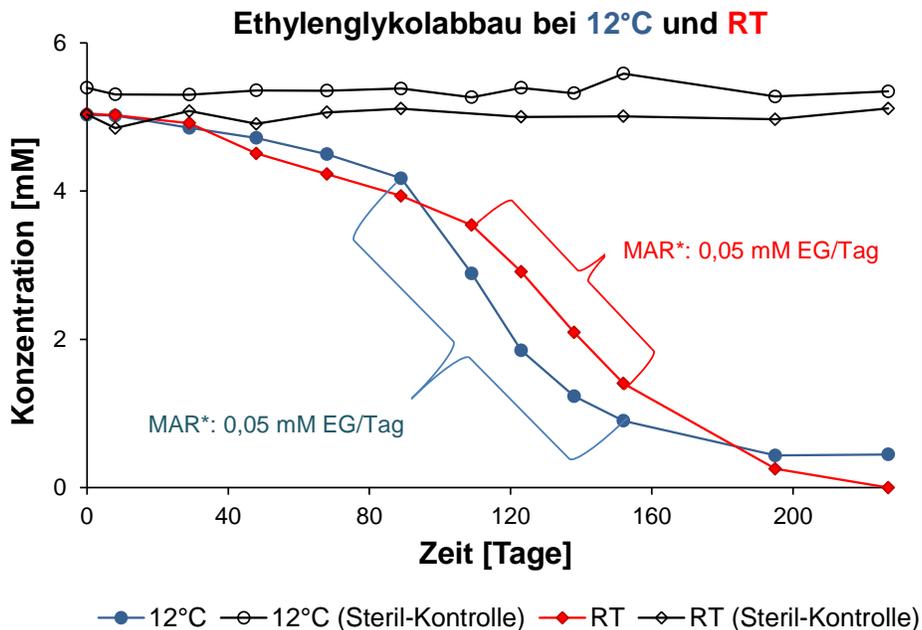


Abbildung A-2 Ethylenglykolabbau sowie Abbauraten unter sulfatreduzierenden Bedingungen bei 12°C und RT. Die Abnahmekurven sind repräsentativ für drei parallele Ansätze; *maximale Abbauraten für Ethylenglykol (die Steigung des markierten Bereichs der Acetatkurve).

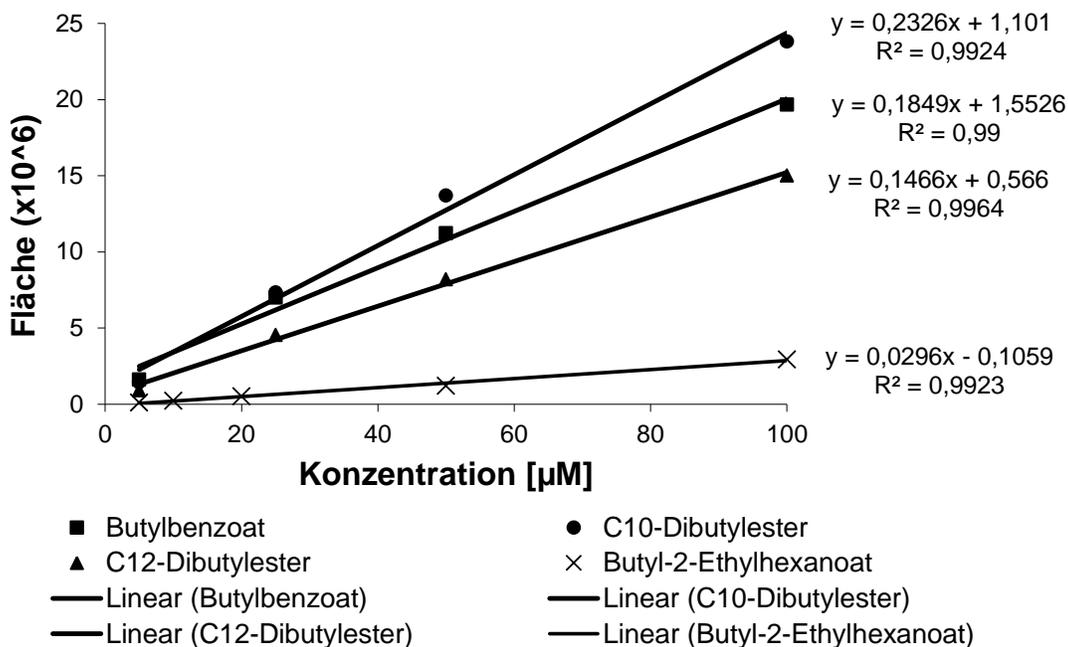


Abbildung A-3: Eichkurven von Butyl-2-Ethylhexanoat, Butylbenzoat, C₁₂- und C₁₀-Dibutylester.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1-1: Jahresgang der Temperatur in verschiedenen Tiefen (BINE Informationsdienst, 2013). ... 2	2
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung einer Erdwärmesondenanlage sowie Funktionsprinzip einer Wärmepumpe (geändert nach GtV-Bundesverband Geothermie, 2013). 3	3
Abbildung 1-3: Dissimilatorische Reduktion von Nitrat (NO_3^-) zu molekularem Stickstoff (N_2) via Nitrit (NO_2^-), Stickstoffmonoxid (NO) und Distickstoffmonoxid (N_2O). Reduktase 1: Nitratreduktase, Reduktase 2: Nitritreduktase, Reduktase 3: Stickstoffmonoxidreduktase, Reduktase 4: Distickstoffmonoxidreduktase (Munk and Eikmanns, 2001). 9	9
Abbildung 1-4: Mikrobielle Strategien zum Elektronentransfer auf Fe (III)-Oxidhydroxide. a) Direkter Kontakt mit der Eisenoberfläche durch leitende extrazelluläre Ansätze („nanowires“), b) Elektronentransfer mittels endogen oder exogen produzierter Elektronen-Schuttle, c) Produktion von komplexbildenden Liganden, die die Löslichkeit von Fe (III)-Oxide erhöhen und somit die Zugänglichkeit der Mikroorganismen zur Eisenoberfläche erleichtern. e^- : Elektronen; L: Ligand (Weber et al., 2006). 10	10
Abbildung 1-5: Dissimilatorische Reduktion von Sulfat (SO_4^{2-}) zu Sulfid (HS^-) via Adenosinphosphosulfat und Sulfit (SO_3^{2-}). Reduktase 1: D-Adenosinphosphosulfat-reduktase, Reduktase 2: Sulfitreduktase (geändert nach Munk and Eikmanns, 2001). 11	11
Abbildung 3-1: Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol unter oxischen Bedingungen. Die Daten sind repräsentativ für drei parallele Ansätze..... 62	62
Abbildung 3-2: Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol gekoppelt an Nitratreduktion im Experiment mit Nitrat und Sediment Mergel. Die Daten sind repräsentativ für drei parallele Ansätze. 65	65
Abbildung 3-3: a) Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol zu Acetat im Experiment mit Fe (III), b) anschließende Oxidation des gebildeten Acetats bei gleichzeitiger Bildung von reduziertem Fe (II). Die Daten sind repräsentativ für drei parallele Ansätze. Die Strichlinie bei Tag 40 kennzeichnet den Übergang zwischen zwei unterschiedlichen Stoffwechselformen, die am Ethylenglykol- bzw. Acetatabbau beteiligt waren. *Maximale Abbauraten für Acetat (die Steigung des markierten Bereichs der Acetatkurve). 67	67
Abbildung 3-4: a) Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol gekoppelt an Sulfatreduktion im Experiment mit Sulfat und Sediment Buntsandstein, b) Bildung und Zunahme eines unbekanntes Zwischenprodukts zwischen Tag 29 und 109 der Inkubation. Die Kurven sind repräsentativ für zwei von drei parallelen Ansätzen. 71	71
Abbildung 3-5: Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol zu Acetat sowie Sulfatabnahme in einem von drei parallelen Ansätzen mit Sediment Mergel und Sulfat. 72	72

Abbildung 3-6: Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol zu Acetat im Experiment mit Sulfat und Sediment Mergel. Detektion von Ethanol und Acetaldehyd als Intermediate. Die Daten sind repräsentativ für zwei von drei parallelen Ansätzen. *Die Acetaldehyd-Konzentrationen liegen unter der Bestimmungsgrenze von 0,25 mM.	74
Abbildung 3-7: Versuchsansatz mit Sulfat als Elektronenakzeptor. a) Inkubationsbeginn, b) Tag 63 der Inkubation, c) keine Verdunklung des Sediments in der Steril-Kontrolle nach 63 Tagen Inkubationszeit. 76	76
Abbildung 3-8: Fermentativer Ethylenglykolabbau zu Acetat sowie Bildung von Ethanol als Intermediat. Die Daten sind repräsentativ für drei parallele Ansätze.....	78
Abbildung 3-9: Schematische Darstellung des fermentativen Ethylenglykolabbaus via Acetaldehyd mit anschließender Disproportionierung des Acetaldehyds zu Acetat und Ethanol.	79
Abbildung 3-10: Versuchsansatz ohne Zugabe von Elektronenakzeptoren. a) Inkubationsbeginn b) Tag 62 der Inkubation c) keine Verdunklung des Sediments in der Steril-Kontrolle sowie in der Blank-Kontrolle nach 62 Tagen Inkubationszeit.	82
Abbildung 3-11: a) Bildung und weiterer Abbau eines unbekanntes Zwischenprodukts des Ethylenglykolabbaus bei 12°C, b) Bildung und Akkumulierung desselben Intermediats bei Raumtemperatur (RT).	84
Abbildung 3-12: Anpassung unterschiedlicher Typen von Mikroorganismen an verschiedenen Temperaturbereichen (Brielmann et al., 2011).	86
Abbildung 4-1: Strukturformel von Benzothiazol.....	96
Abbildung 4-2: Konzentrationsverlauf von Benzotriazol (BT), Tolyltriazol (TT) und einem nicht identifizierten Metabolit des BT-Abbaus unter oxidischen Bedingungen. Die TT-Kurve ist repräsentativ für drei parallele Ansätze. Die BT-Kurve stellt der Verlauf der BT-Konzentration im Ansatz mit der größten BT-Abnahme dar, wo der unbekanntes Metabolit detektiert wurde.	99
Abbildung 4-3: Absorptionsspektren von a) OH-Triazol (entnommen aus Mishra 2011) und b) unbekanntes Transformationsprodukt des Benzotriazols aus der aktuellen Studie. Die entsprechenden Spektren sind mit rotem Kreis bezeichnet.	102
Abbildung 4-4: Konzentrationsverlauf von Benzotriazol und Tolyltriazol im Experiment mit Nitrat und Sediment Buntsandstein. Die Daten sind repräsentativ für drei parallele Ansätze.	104
Abbildung 4-5: Konzentrationsverlauf von Benzotriazol und Tolyltriazol im Experiment mit Fe (III) und Sediment Mergel. Die Daten sind repräsentativ für drei parallele Ansätze.	106
Abbildung 4-6: Bildung eines unbekanntes Metabolits des BT-Abbaus im Experiment mit Fe (III) und Sediment Mergel. Beobachtet wurden Veränderungen im Absorptionsspektrum sowie eine Zunahme der Fläche des Injektionspeaks (Retentionszeit 2,9 min) am Tag 54 der Inkubation gegenüber der Steril-	

Kontrolle. Die Chromatogramme wurden bei einer Wellenlänge von 256 nm aufgenommen und sind repräsentativ für drei parallele Ansätze. 107

Abbildung 4-7: Konzentrationsverlauf von Benzotriazol und Tolyltriazol im Experiment mit Sulfat und Sediment Buntsandstein. Die Daten sind repräsentativ für drei parallele Ansätze. 110

Abbildung 4-8: Cometabolischer Abbau von Benzotriazol (BT) in Anwesenheit von Benzothiazol (Bth) unter oxischen Bedingungen. 112

Abbildung 5-1: Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol in Ab- und Anwesenheit von Benzotriazolen unter oxischen Bedingungen. Die Daten sind repräsentativ für jeweils drei parallele Ansätze. 120

Abbildung 5-2: a) Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol in Ab- und Anwesenheit von Benzo- oder Tolyltriazol, b) gleichzeitige Abnahme der Nitratkonzentration. Als Inokulum wurde Sediment Buntsandstein verwendet. Eine verlängerte lag-Phase ist in Anwesenheit von Benzo- sowie von Tolyltriazol erkennbar. *MAR: Maximale Abbaurate von Ethylenglykol (ermittelt für die Steigung (mit Pfeilen markierter Bereiche) der jeweiligen EG-Kurven). Die Daten sind repräsentativ für jeweils zwei parallele Ansätze..... 122

Abbildung 5-3: Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol gekoppelt an Nitratreduktion in a) Ab- und b) Anwesenheit von Benzotriazolen im Experiment mit Nitrat und Sediment Mergel. Die Daten sind repräsentativ für jeweils drei parallele Ansätze..... 123

Abbildung 5-4: Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol in a) Ab- und b) Anwesenheit von Benzotriazolen im Experiment mit Fe (III). Die Daten sind repräsentativ für drei parallele Ansätze. 125

Abbildung 5-5: a) Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol in Ab- und Anwesenheit von Benzo- oder Tolyltriazol, b) Abnahme der Sulfatkonzentration im Zuge des Abbaus von Ethylenglykol. Als Inokulum wurde Sediment Buntsandstein verwendet. Die Daten sind repräsentativ für zwei von jeweils drei parallelen Ansätzen..... 126

Abbildung 5-6: Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol in a) Ab- und b) Anwesenheit von Benzotriazolen im Experiment mit Sulfat und Sediment Mergel. Die Daten sind repräsentativ für jeweils drei parallele Ansätze. 128

Abbildung 5-7: Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol unter gärenden Bedingungen in a) Ab- und b) Anwesenheit von Benzotriazolen sowie Akkumulierung von Acetaldehyd in Anwesenheit von Benzotriazolen. Die Kurven in Ab- und Anwesenheit von Benzotriazolen sind repräsentativ für drei bzw. zwei der drei parallelen Ansätze. 130

Abbildung 5-8: Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol in a) Ab- und b) Anwesenheit von jeweils drei verschiedenen Konzentrationen von Benzo (BT)- und Tolyltriazol (TT) unter nitratreduzierenden Bedingungen. Die Daten sind repräsentativ für jeweils zwei parallele Ansätze. 133

Abbildung 6-1: Mikrobieller Abbau von 2-Ethylhexanoat in den Experimenten mit Nitrat, Ferrihydrit oder Sulfat. Die Daten sind repräsentativ für jeweils drei Replikate.	147
Abbildung 6-2: Mikrobieller Abbau von Benzoat unter oxidischen und anoxischen Bedingungen. Die Daten sind repräsentativ für jeweils drei Replikate. Dargestellt ist die Steril-Kontrolle im Experiment mit Nitrat und repräsentiert der Verlauf der Benzoat-Konzentrationen in den sterilen Ansätzen aller untersuchten Redoxbedingungen.	149
Abbildung 6-3: Mikrobieller Abbau von a) Decan (C_{10})- und b) Doedecan (C_{12})- Dicarboxylate unter verschiedenen Redoxbedingungen. Die Kurven „oxidische Bedingungen“ und „Zugabe von Nitrat“ überlagern sich. Die Daten sind repräsentativ für jeweils drei parallele Ansätze. Dargestellt ist die Steril-Kontrolle mit Fe (III), die Steril-Kontrollen aller untersuchen Bedingungen repräsentiert.	153
Abbildung 6-4: Aerober mikrobieller Abbau von Ethylenglykol in Ab- und Anwesenheit der ausgewählten organischen Säuren. Die Daten sind repräsentativ für jeweils drei parallele Ansätze.	155
Abbildung 6-5: a) Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol in Ab- und Anwesenheit der organischen Säuren im Experiment mit Nitrat, b) Abnahme der Nitratkonzentration. Die Daten sind repräsentativ für jeweils drei parallele Ansätze.	156
Abbildung 6-6: Mikrobieller Ethylenglykolabbau zu Acetat in Ab- und Anwesenheit von organischen Säuren im Experiment mit Fe (III). Die Daten sind repräsentativ für jeweils drei parallele Ansätze.	158
Abbildung 6-7: a) Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol in Ab- und Anwesenheit der organischen Säuren im Experiment mit Sulfat, b) Konzentrationsverlauf von Sulfat. Die Daten sind repräsentativ für jeweils drei parallele Ansätze.	159
Abbildung 6-8: Mikrobieller Abbau von Ethylenglykol zu Acetat in Ab- und Anwesenheit der organischen Säuren unter gärenden Bedingungen. Ethanol wurde als Intermediat detektiert. Die Daten sind repräsentativ für drei parallele Ansätze.	160
Abbildung A-1: Ethylenglykolabbau sowie Abbauraten unter nitratreduzierenden Bedingungen bei 12°C und RT. Die Abnahmekurven sind repräsentativ für zwei parallele Ansätze; *maximale Abbaurate für Ethylenglykol (die Steigung des markierten Bereichs der Acetatkurve).	177
Abbildung A-2: Ethylenglykolabbau sowie Abbauraten unter sulfatreduzierenden Bedingungen bei 12°C und RT. Die Abnahmekurven sind repräsentativ für drei parallele Ansätze; *maximale Abbaurate für Ethylenglykol (die Steigung des markierten Bereichs der Acetatkurve).	178
Abbildung A-3: Eichkurven von Butyl-2-Ethylhexanoat, Butylbenzoat, C_{12} - und C_{10} -Dibutylester.	178
Tabelle 1-1: Mikrobielle Abbauprozesse in Abhängigkeit der vorliegenden Elektronenakzeptoren und des Redoxpotentials. Elektronen (e^-) werden bei der Oxidation organischer Substanzen freigesetzt.	8

Tabelle 2-1: Identität, Verwendungshäufigkeit und Konzentration der Additive in den deklarierten Wärmeträgerflüssigkeiten.	35
Tabelle 2-2: Mobilität der mehrfach verwendeten Additive im Grundwasser. Basierend auf ihren physikochemischen Eigenschaften wurden die Substanzen als mobil (+) und nicht mobil (-) in der Umwelt klassifiziert.....	37
Tabelle 2-3: Daten zur Bioabbaubarkeit der mehrfach verwendeten Additive sowie Klassifizierung hinsichtlich ihrer potentiellen Persistenz in der Umwelt als sehr persistent (++) , potentiell persistent (+) und nicht persistent (-).	38
Tabelle 2-4: Akute aquatische Toxizität der mehrfach verwendeten Additive sowie Kategorisierung der Substanzen als potentiell problematisch (+) und nicht problematisch (-) für aquatische Organismen.....	43
Tabelle 2-5: Vorläufige Klassifizierung der Additive aufgrund der Datenlage zur Mobilität, Persistenz und aquatischer Toxizität als Substanzen mit hohem (+) und geringem (-) Grundwassergefährdungspotenzial.	44
Tabelle 3-1: Überblick zu den Versuchsansätzen zum mikrobiellen Abbau von 5 mM Ethylenglykol unter verschiedenen Redoxbedingungen sowie Experimente zum Einfluss der Temperatur auf den Ethylenglykolabbau.	59
Tabelle 3-2: Stöchiometrie des Ethylenglykolabbaus gekoppelt an Nitratreduktion in Ansätzen mit Sediment Buntsandstein.	63
Tabelle 3-3: Elektronenbilanz des Ethylenglykolabbaus gekoppelt an Nitratreduktion in Ansätzen mit Sediment Mergel.	64
Tabelle 3-4: Stöchiometrie des mikrobiellen Abbau von Acetat zu CO ₂ gekoppelt an die Reduktion von Fe (III) zu Fe (II).	67
Tabelle 3-5: Stöchiometrie des Ethylenglykolabbaus gekoppelt an Sulfatreduktion in Ansätzen mit Sediment Buntsandstein.	69
Tabelle 3-6: Retentionszeiten bereits in der Literatur beschriebener Zwischen- und Endprodukte des Ethylenglykolabbaus unter gärenden oder sulfatreduzierenden Bedingungen.	70
Tabelle 3-7: Bilanzierung des Ethylenglykolabbaus in Ansätzen mit Sediment Mergel und Sulfat.	73
Tabelle 3-8: Methankonzentrationen nach Inkubationsende in Ansätzen mit Sediment Mergel und Sulfat.	76
Tabelle 3-9: Stöchiometrie des fermentativen Ethylenglykolabbaus in Ansätzen mit Sediment Mergel. ...	78
Tabelle 3-10: Sulfatkonzentration am Inkubationsanfang und -ende sowie Methankonzentration am Inkubationsende in Ansätzen ohne Zugabe von Elektronenakzeptoren.	80

Tabelle 3-11: Stöchiometrie des Ethylenglykolabbaus unter sulfatreduzierenden Bedingungen bei 12°C und Raumtemperatur (RT).....	83
Tabelle 4-1: Physikochemische Eigenschaften sowie Strukturen von Benzotriazol und Tolyltriazol.....	94
Tabelle 4-2: Versuchsansätze zum cometabolischen Abbau von Benzotriazol.	96
Tabelle 4-3: Versuchsanordnung zum aeroben Abbau von Benzotriazolen.....	97
Tabelle 4-4: Log-Kow-Werte von potentiellen Transformationsprodukten von Benzotriazol unter oxidischen Bedingungen.	103
Tabelle 4-5: Versuchsanordnung zum mikrobiellen Abbau von Benzotriazolen mit 10 mM Nitrat als Elektronenakzeptor.	104
Tabelle 4-6: Versuchsanordnung zum mikrobiellen Abbau von Benzotriazolen mit Fe (III) als Elektronenakzeptor.	105
Tabelle 4-7: Bildung von Fe (II) in Mikrokosmen mit 5 mM Ethylenglykol in An- und Abwesenheit von Benzo- und Tolyltriazol nach einer Inkubationszeit von 243 Tagen.	108
Tabelle 4-8: Log-Kow-Werte potentieller Transformationsprodukten von Benzo- und Tolyltriazol unter eisenreduzierenden Bedingungen.	109
Tabelle 4-9: Versuchsanordnung zum mikrobiellen Abbau von Benzotriazolen mit 10 mM Sulfat als Elektronenakzeptor.	109
Tabelle 4-10: Versuchsanordnung zum mikrobiellen Abbau von Benzotriazolen unter gärenden Bedingungen.	111
Tabelle 5-1: Versuchsanordnung zum Einfluss von Benzotriazolen auf den aeroben Ethylenglykolabbau.	119
Tabelle 5-2: Versuchsansätze zum Einfluss von Benzotriazolen auf den mikrobiellen Abbau von Ethylenglykol in Ansätzen mit Nitrat.....	120
Tabelle 5-3: Stöchiometrie des Ethylenglykolabbaus in Ab- und Anwesenheit von Benzotriazol oder Tolyltriazol in Ansätzen mit Nitrat und Sediment Buntsandstein.	121
Tabelle 5-4: Versuchsanordnung zum Einfluss der Benzotriazole auf den Ethylenglykolabbau in Ansätzen mit 50 mM Ferrihydrit.	124
Tabelle 5-5: Versuchsanordnung zum Einfluss von Benzo- und Tolyltriazol auf den Ethylenglykolabbau in Ansätzen mit 10 mM Sulfat.	125
Tabelle 5-6: Versuchsanordnung zum Einfluss der Benzotriazole auf den Ethylenglykolabbau unter gärenden Bedingungen.....	129

Tabelle 5-7: Versuchsanordnung zur Wirkungsbeziehung zwischen verschiedenen BT- und TT-Konzentrationen und dem Ethylenglykolabbau unter nitratreduzierenden Bedingungen.....	131
Tabelle 5-8: Versuchsanordnung zum mikrobiellen Abbau von Ethylenglykol bei Raumtemperatur (22°C) in Anwesenheit von drei verschiedenen BT-Konzentrationen.	134
Tabelle 6-1: Physikochemische Eigenschaften sowie Strukturen von 2-Ethylhexansäure, Benzoesäure, Decan- und Dodecandicarbonsäure.	142
Tabelle 6-2: Versuchsanordnung zum mikrobiellen Abbau von 2-Ethylhexanoat in Ansätzen mit Sediment Buntsandstein unter verschiedenen Redoxbedingungen.	143
Tabelle 6-3: Versuchsansätze zum mikrobiellen Abbau von Benzoat, Decan- und Dodecan-Dicarboxylate sowie deren Einfluss auf den Ethylenglykolabbau in Ansätzen mit Sediment Mergel.....	143
Tabelle 6-4: Butyl-Derivate der (1) Benzoesäure, (2) Decan - und (3) Dodecandicarbonsäure und deren Molekulargewichte.	144
Tabelle 6-5: Retentionszeiten der Butyl-Derivate sowie die für die Quantifizierung verwendeten Bruchstücke.	145
Tabelle 6-6: Nitrat- sowie Sulfatkonzentrationen zum Inkubationsbeginn und –ende.....	147
Tabelle 6-7: Nitrat- sowie Nitrit-Konzentrationen zum Inkubationsbeginn und am Tag 8 der Inkubation.	151
Tabelle 6-8: Theoretische Stöchiometrie des mikrobiellen Abbaus von 2-EtH, C ₁₀ - und C ₁₂ -Dicarboxylate sowie von Ethylenglykol gekoppelt an die Reduktion von Nitrat zu N ₂	152
Tabelle 6-9: Theoretische Stöchiometrie des mikrobiellen Abbaus von 2-EtH, C ₁₀ - und C ₁₂ -Dicarboxylate sowie von Ethylenglykol gekoppelt an die Reduktion von Nitrat zu Nitrit.	152
Tabelle 6-10: Elektronenbilanz des Ethylenglykolabbaus bei Zugabe von Nitrat als Elektronenakzeptor in Ab- sowie in Anwesenheit der organischen Säuren.	156
Tabelle A-1: Verwendete Chemikalien.	174
Tabelle A-2: M9-Medium (Sambrook et al., 1989).....	174
Tabelle A-3: Spurenelementlösung SL4 (Pfennig, 1974).	174
Tabelle A-4: Spurenelementlösung SL6, 10-fach konzentriert (Pfennig, 1974).	175
Tabelle A-5: Mineralsalzmedium für anaerobe Mikroorganismen.	175
Tabelle A-6: Selenit/Wolframat-Lösung, 1000-fach konzentriert (Widdel and Bak, 1992).	175
Tabelle A-7: Spurenelementlösung SL10, 1000-fach konzentriert, modifiziert nach Widdel & Bak, (1992).	175

Tabelle A-8: 7-Vitamine-Lösung, 1000-fach konzentriert (Widdel and Pfennig, 1982)..... 175

Tabelle A-9: Arbeitslösungen für Ferrozintest..... 176

Tabelle A-10: Mineralmedium zum cometabolischen Abbau von Benzotriazol nach Gaja & Knapp, 1997.
..... 176

Tabelle A-11: Verwendete Chemikalien für die Derivatisierungsmethode. 176

Abkürzungsverzeichnis

2-EtH	2-Ethylhexanoat
BT	Benzotriazol
Bz	Benzoat
C ₁₀ -Dicarboxylat	Decandicarboxylat
C ₁₂ -Dicarboxylat	Dodecandicarboxylat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
EA	Elektronenakzeptor
EG	Ethylenglykol
EWS	Erdwärmesonde
Fe (II)	Reduzierte Form von Fe (III)
Fe (III)	Ferrihydrit
GC	Gaschromatographie
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
N ₂	Molekularer Stickstoff
RT	Raumtemperatur
TOC	Total organic carbon
TT	Tolyltriazol
VwVwS	Verwaltungsvorschrift wassergefährdende Stoffe
WGK	Wassergefährdungsklasse
WTF	Wärmeträgerflüssigkeit