

Das Projekt BIOSAN – Ergänzende Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau mit Hilfe von Stabilisotopen

Andrea Watzinger, Paul Kinner, Melanie Hager, Thomas Reichenauer

AIT Austrian Institute of Technology GmbH

Aufgabenstellung im Projekt:

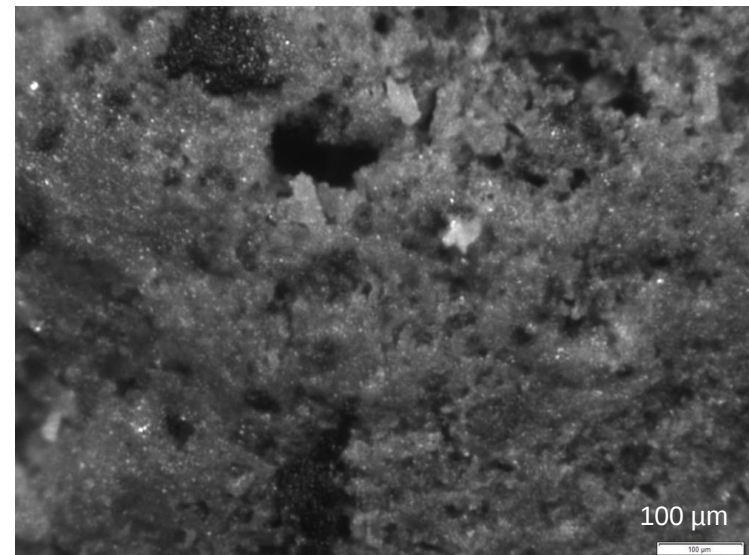
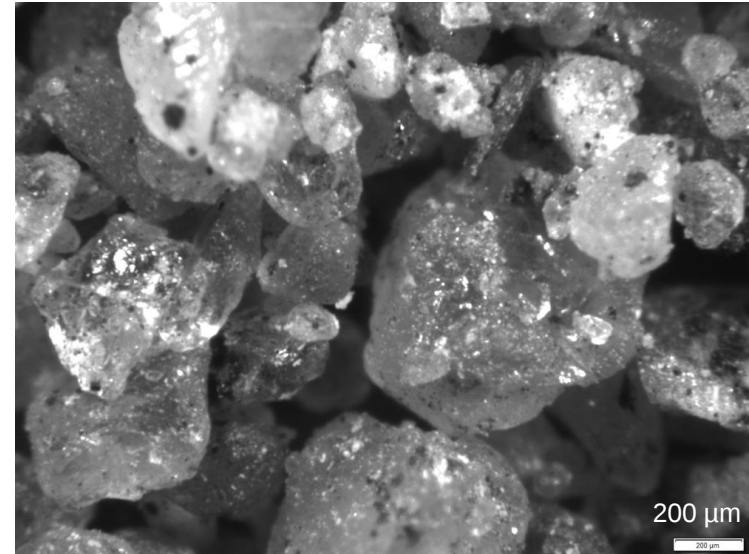
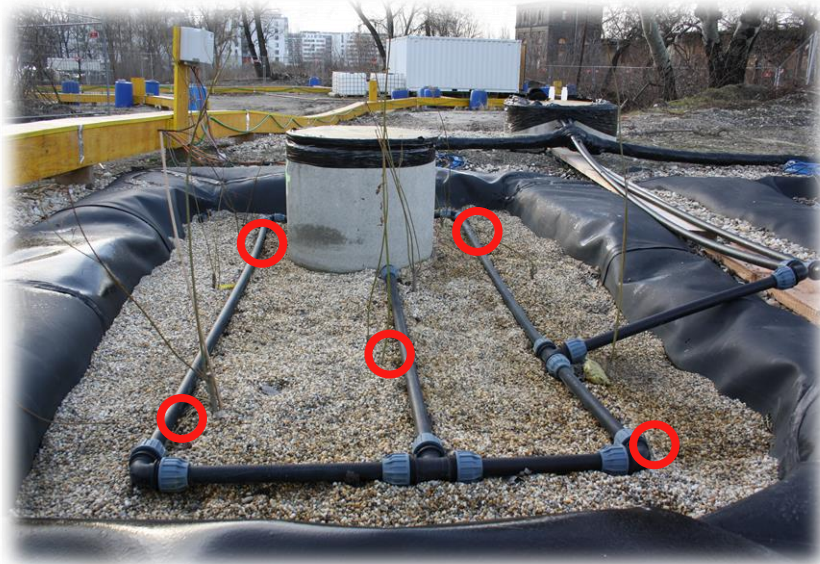
Nachweis und Quantifizierung eines mikrobiellen Abbaus

- ☐ Abbaudynamik und Geschwindigkeit
- ☐ Vollständigkeit des Abbaus (CO_2 und H_2O)
- ☐ Entwicklung einer in-situ Monitoringsmethode

Ansatz:

- ☐ Verwendung einer markiertem KW – Komponenten (C_{16})
- ☐ Messung der Isotopenfraktionierung an einer KW – Komponente (C_{10})

Pflanzenkläranlage - Substrate



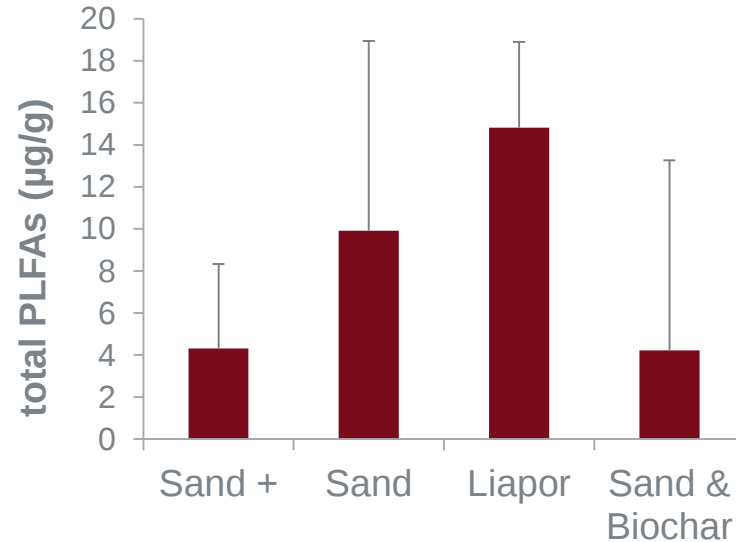
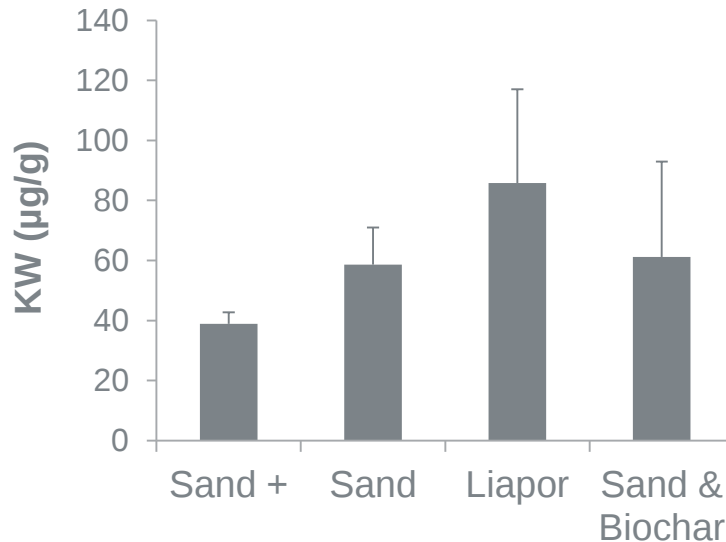
Sand+ (Beet 1)

Sand (Beet 2)

Liapor (Beet 3)

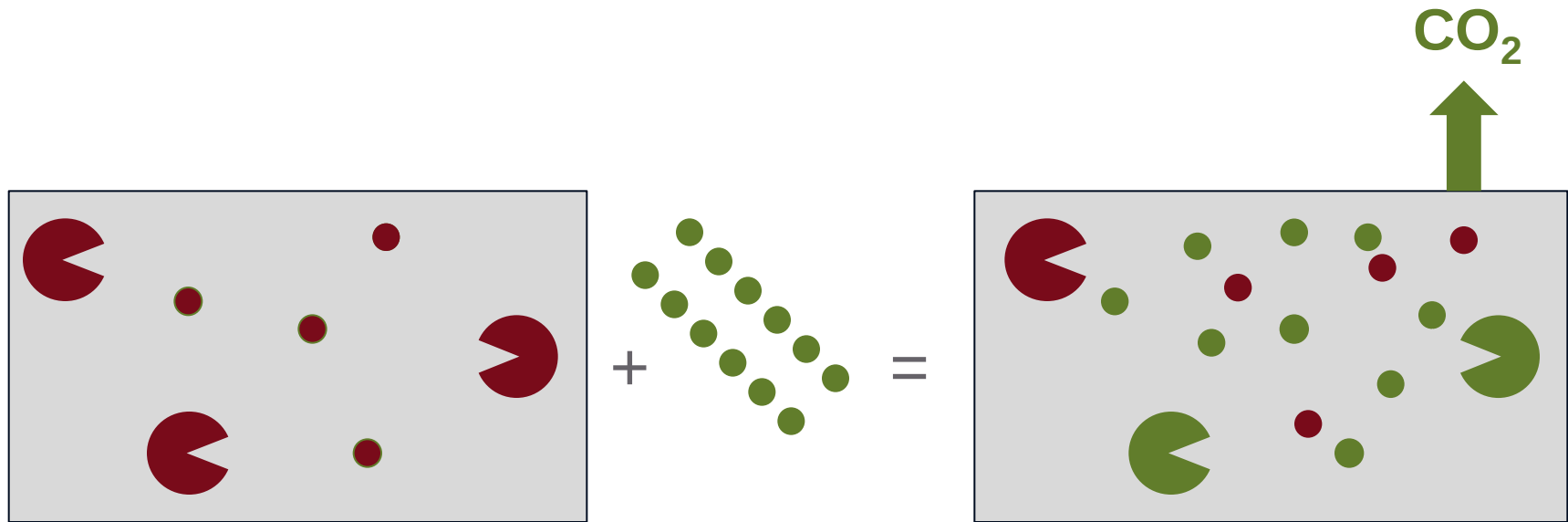
Sand & Biochar (Beet 4)

Pflanzenkläranlage – Status Probenahme Jän. 2014



- Inhomogene Verteilung von KW und Mikroorganismen
 - Mikroorganismen sind vorhanden
 - Korrelation zwischen mikrobieller Biomasse und KW Gehalt
($k = 0.9$ $r^2 = 0.8$)
- ➔ Mikrobieller Abbau findet statt

Abbauversuch: ^{13}C markiertes Hexadekan



- markierter „schwerer“ Kohlenstoff (^{13}C)
- „leichte Kohlenstoffe“ (^{12}C)

Inkubationsversuch – ^{13}C Hexadekan



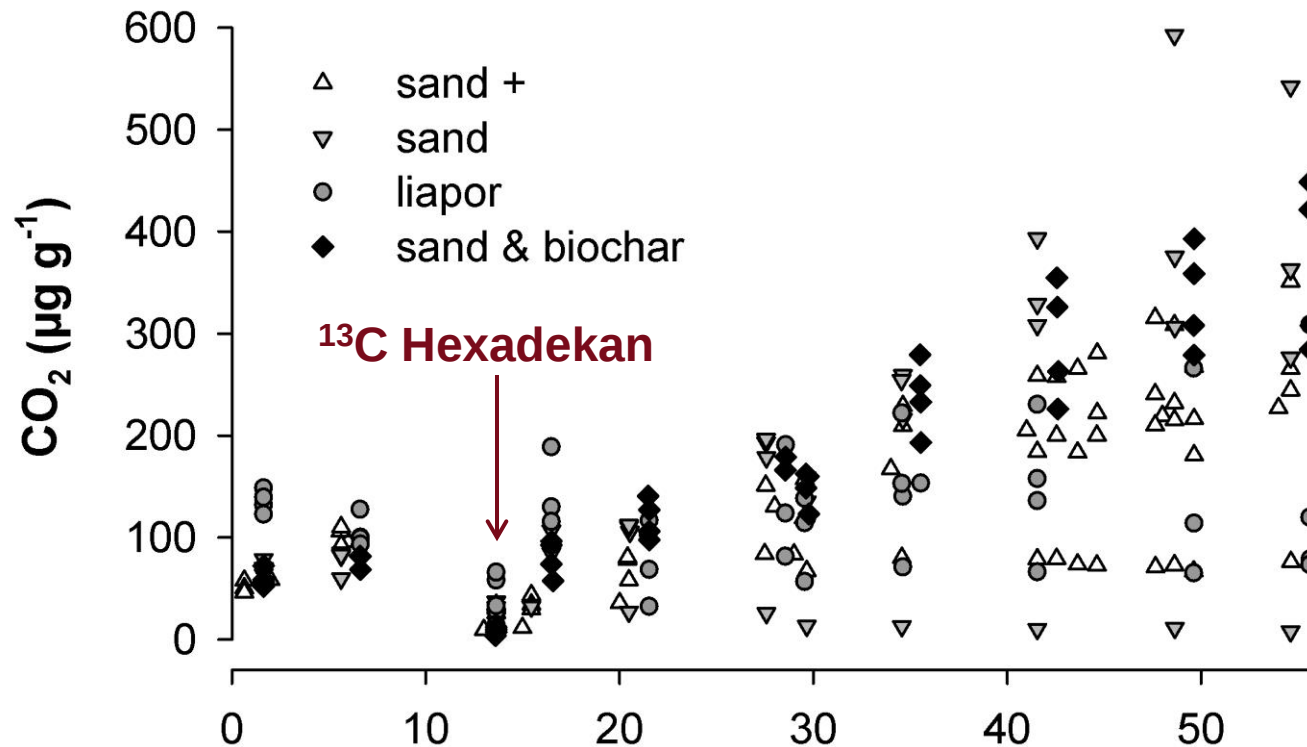
Sand+

Sand

Liapor

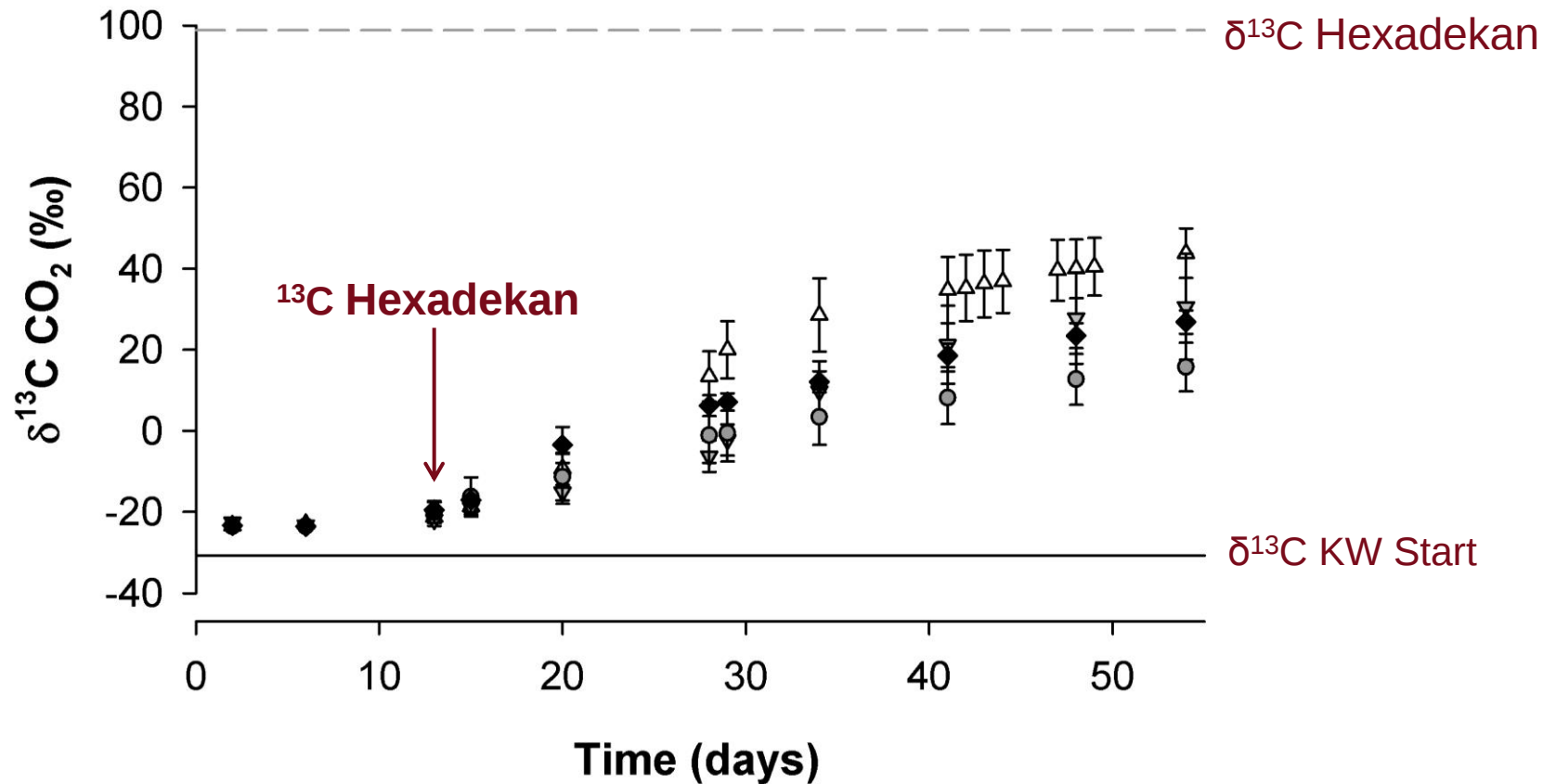
Sand & Biochar

Mineralisierung – CO₂ Konzentration



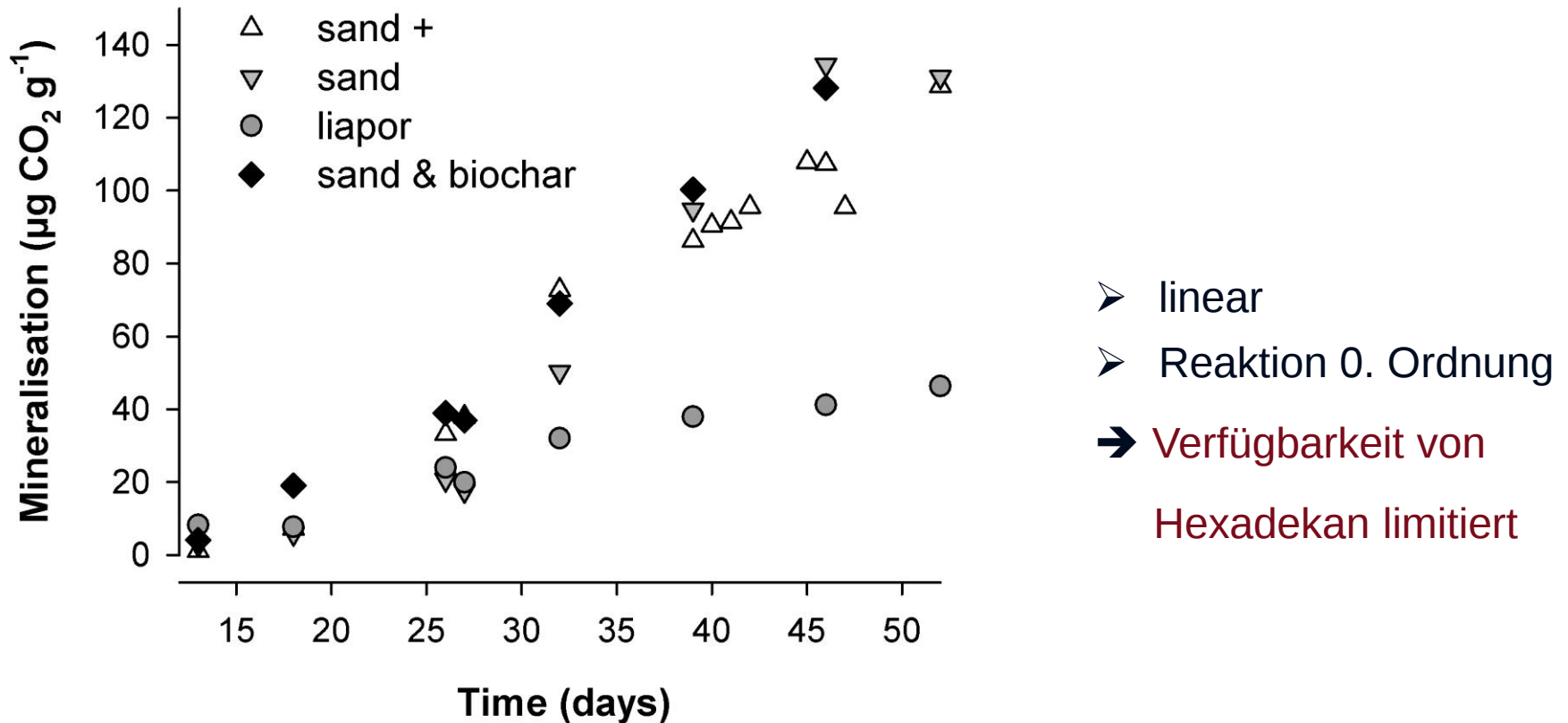
➤ Mineralisierung startet sehr schnell

Mineralisierung von ^{13}C Hexadekan



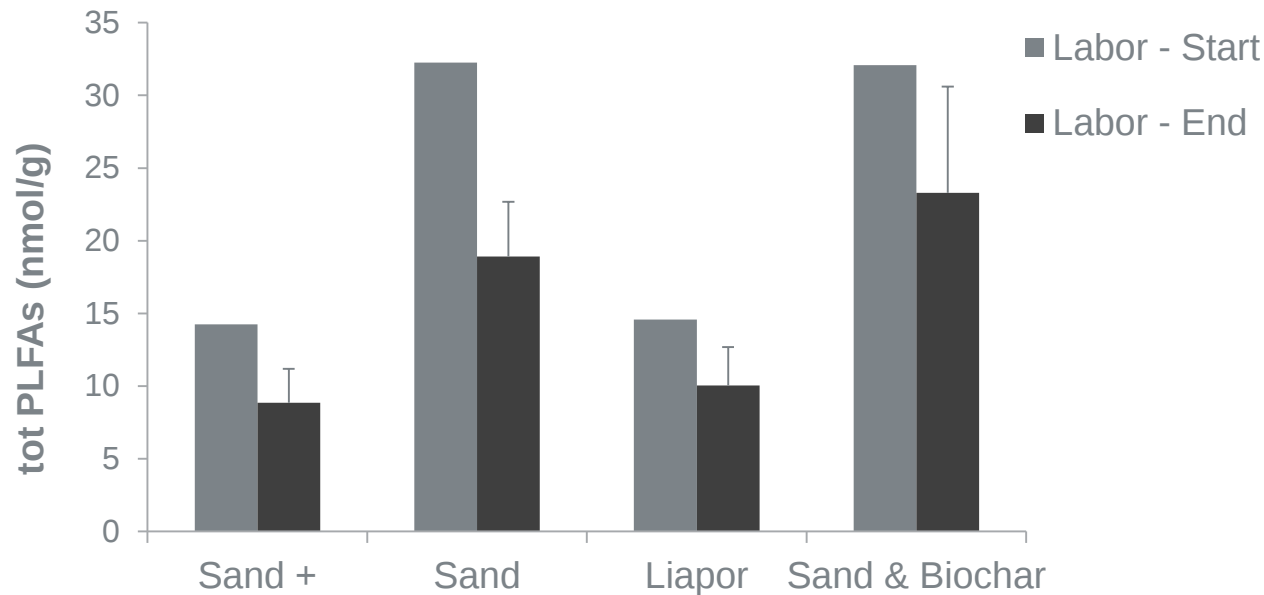
➤ Hexadecan wird mineralisiert

Mineralisierung von ^{13}C Hexadekan



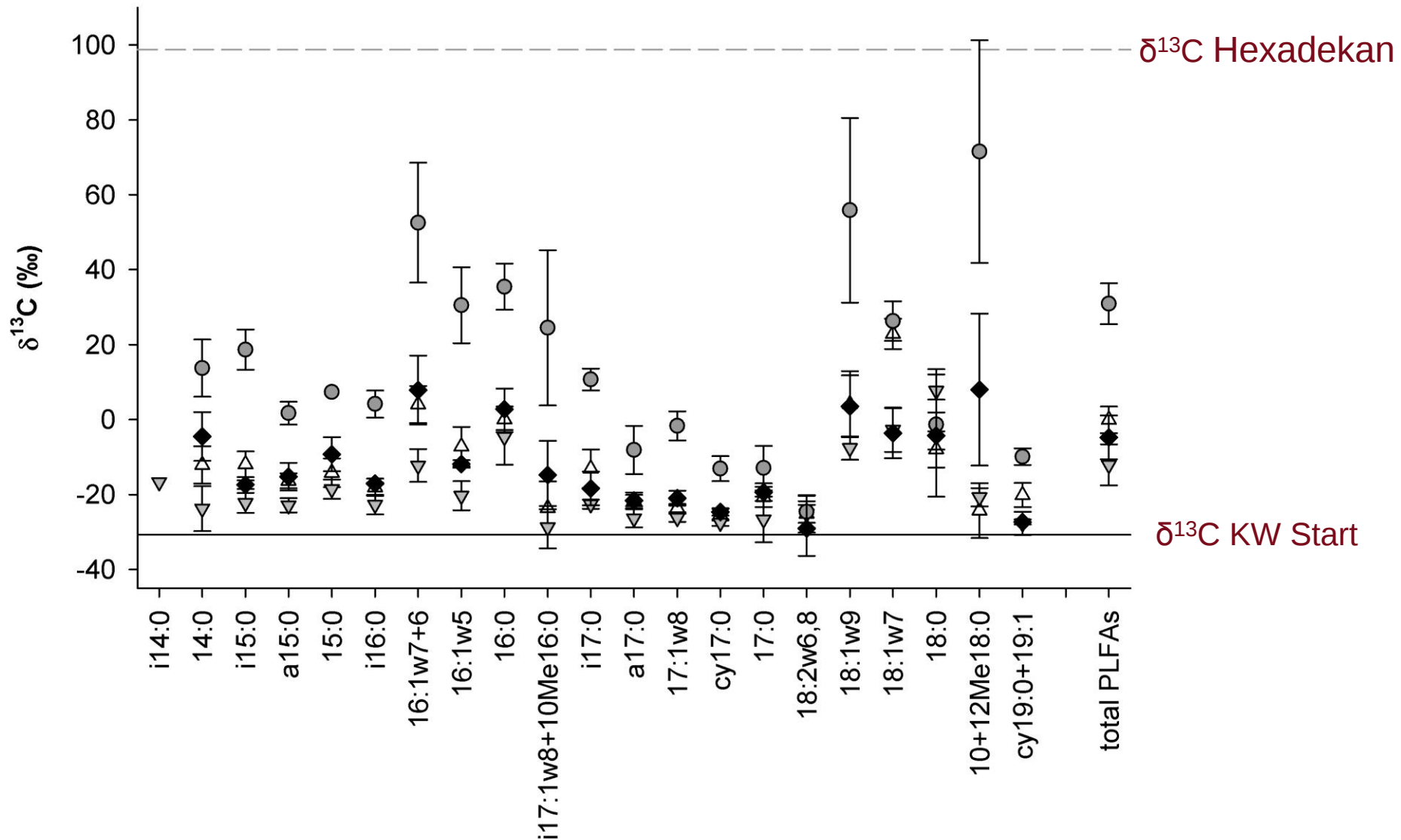
- ✓ Sand: $3 \mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1} \triangleq 15 \mu\text{g Hexadekan g}^{-1} \text{ d}^{-1}$
- ✓ Liapor: $1 \mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1} \triangleq 5 \mu\text{g Hexadekan g}^{-1} \text{ d}^{-1}$

Veränderung der mikrobiellen Biomasse



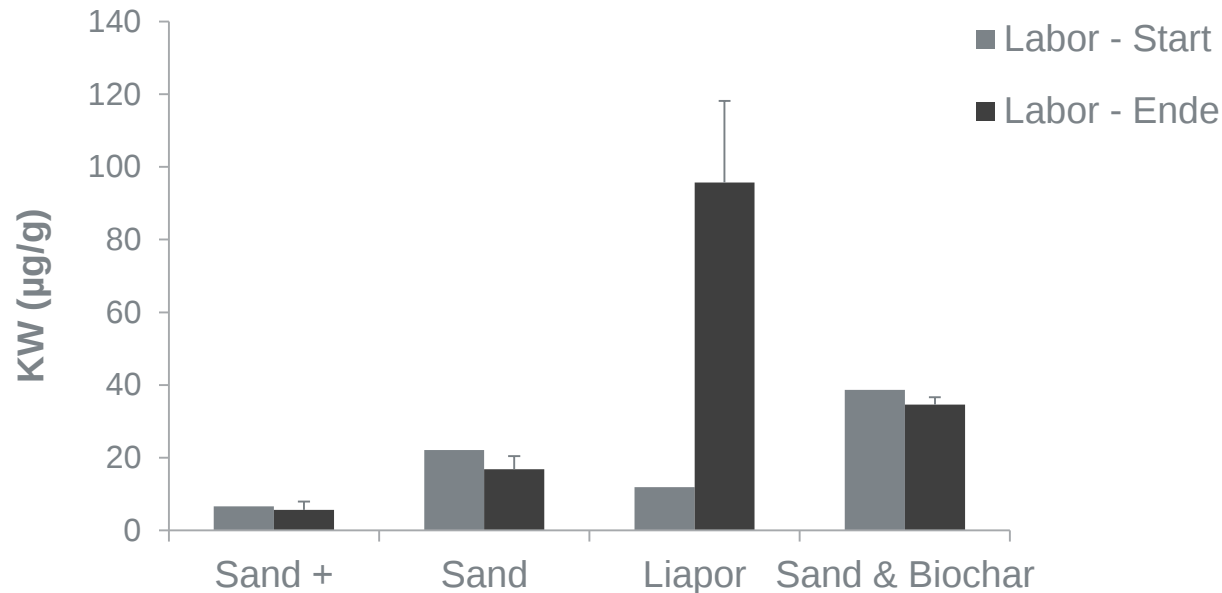
- Mikrobielle Biomasse nimmt geringfügig ab
- ➔ Verfügbarkeit von Hexadekan ist limitierend

Aufnahme von Hexadekan in mikrobielle Gruppen – Tag 43



Ursprünglicher Petroleum-KW - Veränderung

Zugabe von $770 \mu\text{g g}^{-1} \text{ }^{13}\text{C}$ Hexadekan nicht inkludiert



- Keine Veränderung der Gesamt-KW
- Erhöhte Extraktion von KW bei Liapor nach der Inkubation mit Hexadekan

Kohlenstoffmassenbilanz - Hexadekan

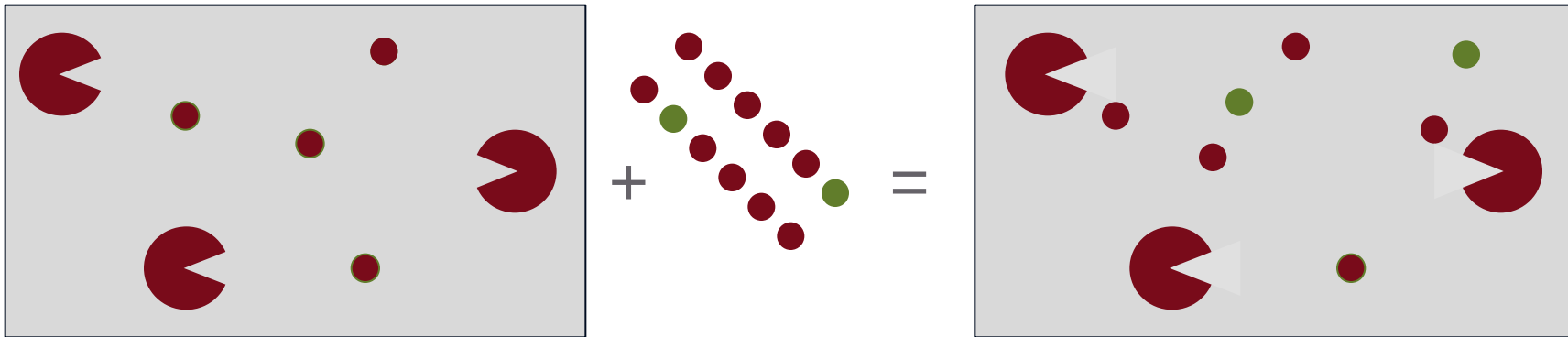
43 Tage Inkubation: 770 µg Hexadekan / g Substrat

Substrat	Mineralisierung	Mikrobielle Biomasse	Rest
Sand +	79	1.8	19
Sand	87	2.3	11
Liapor	19	2.8	78
Sand & Biochar	88	3.8	8

Zusammenfassung - Markierungsversuch

- Mineralisierung startet sehr **schnell** → Mikrobielle Gemeinschaft im Pflanzenkläranlagensubstrat ist adaptiert
- **Vollständige** Mineralisierung (CO_2 und H_2O)
- **Mineralisierungsrate**: 5 - 15 μg Hexadekan $\text{g}^{-1} \text{d}^{-1}$
1 m Filterdicke: 10 - 30 μg Hexadekan $\text{g}^{-1} \text{d}^{-1}$ → **ausreichend**
- Mineralisierung in Laborversuch limitiert durch die **Verfügbarkeit** von Hexadekan → stoßweise Beschickung
- Liapor: Mineralisierung verlangsamt + verstärkte KW Extraktion → Sorptionsvermögen von Liapor ?
 - ✓ **Nachweis** eines mikrobiellen Abbaus
 - ✓ Einblick in das mikrobielle **Abbauverhalten**
 - ✓ **Konservative** Schätzung der Reinigungsleistung im Labor

Abbauversuch: Isotopenfraktionierung – ^2H Dekan

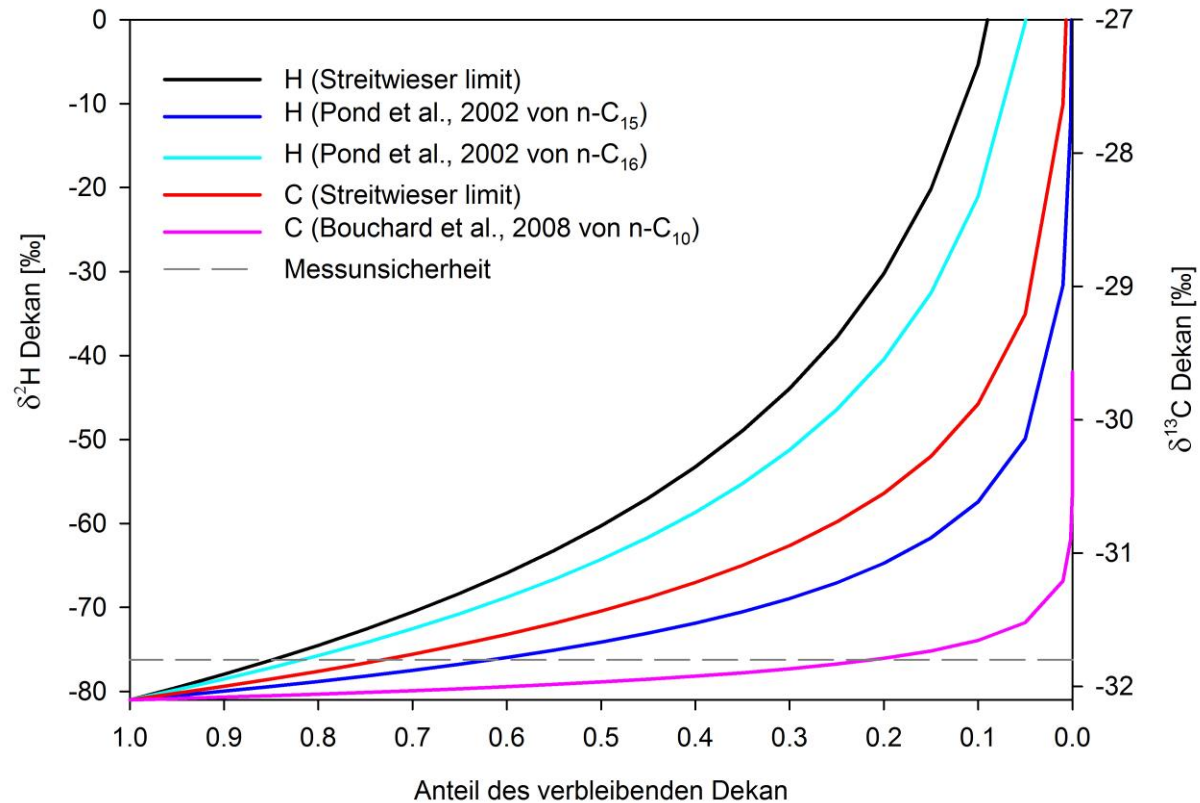


● „schwerer“ Wasserstoff (^2H)

● „leichter“ Wasserstoff (^1H)

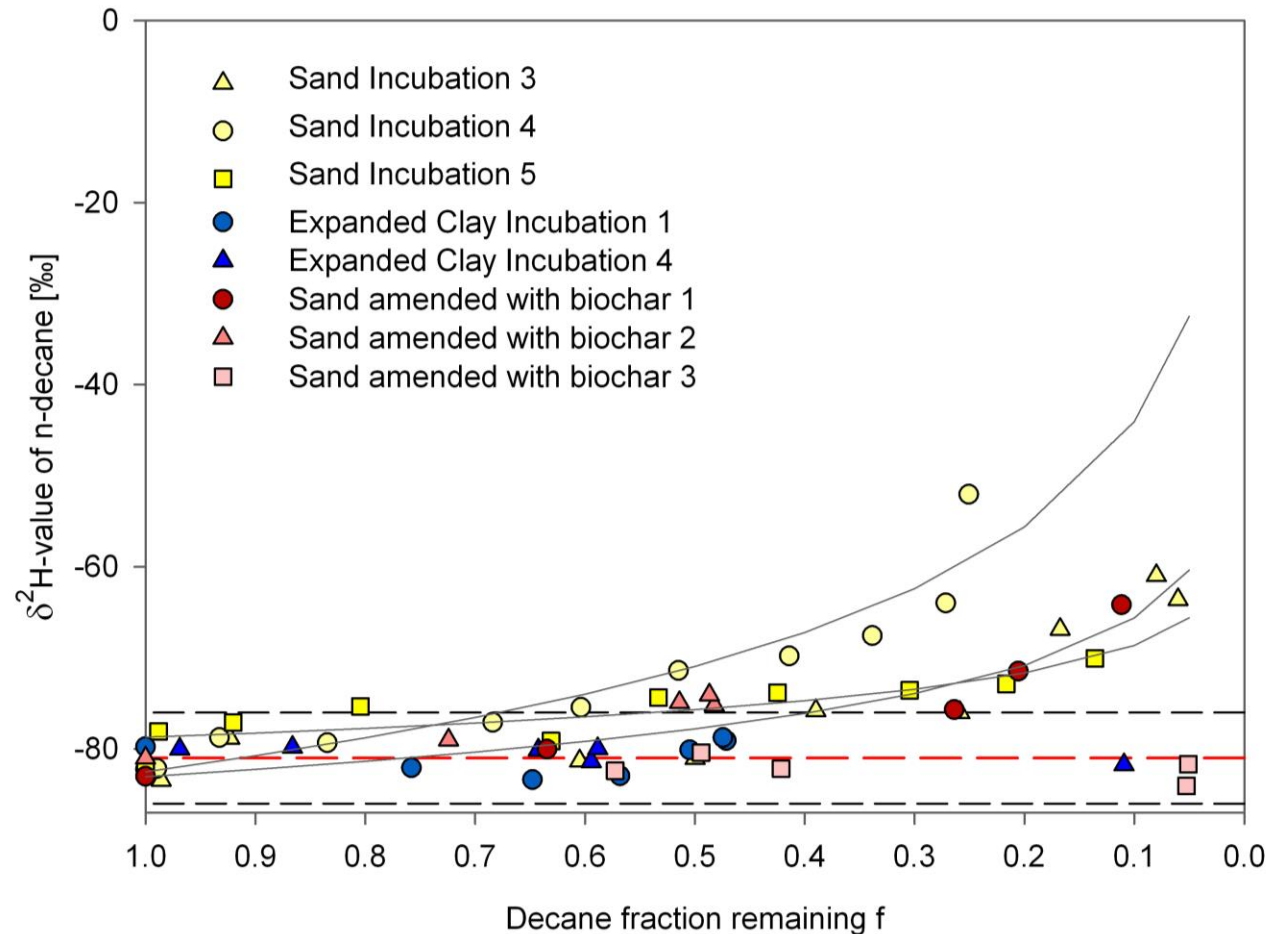
- ☺ Eignung für in-situ Anwendung
- ☹ Molekülgröße (Verdünnung des Isotopeneffekts)
- ☹ Messbarkeit der KW Komponente (Gas Chromatograph) → Dekan

Wasserstoff- und Kohlenstoffisotopenfraktionierung von Dekan



➔ Wasserstoffisotopie

Wassersisotopenfraktionierung von Dekan



- Sand & Biochar und Liapor: kaum bzw. keine Isotopenfraktionierung
- Sand: geringe Isotopenfraktionierung

Zusammenfassung - Fraktionierungsversuch

- Wasserstoffisotopenfraktionierung wurde festgestellt
 - Geringe Fraktionierung → mikrobieller Abbau war nicht der ratenbestimmende Schritt
 - Bioverfügbarkeit von Dekan eingeschränkt – Absorption
- Diese Methode noch nicht reif für das in-situ Monitoring eines KW Abbaus

Weitere Fragestellungen:

Löslichkeit, Transport und Sorptionsverhalten der KW

→ Bioverfügbarkeit

Danke für Ihre Aufmerksamkeit!

Kontakt: Andrea Watzinger

Environmental Resources and Technologies, Energy Department,
AIT Austrian Institute of Technology GmbH

Konrad-Lorenz-Strasse 24, 3430 Tulln, Austria; andrea.watzinger@ait.ac.at,
Tel: +43 (0) 50550-4656; Fax: +43 (0) 50550-3452

Arbeiten wurden durchgeführt im Rahmen des Projektes: **BIOSAN -**
Biostimulation und bepflanzte Bodenfilter zum Abbau von
Mineralölkohlenwasserstoffen in Boden und Grundwasser

Finanziert vom **Ministerium für ein lebenswertes Österreich (BMLFUW)** und den
Österreichischen Bundesbahnen (ÖBB)



MINISTERIUM
FÜR EIN
LEBENSWERTES
ÖSTERREICH



Removal of diesel hydrocarbons by constructed wetlands – ^{13}C labelling experiment to reveal degradation

Watzinger A., Kinner P. and Reichenauer T.G.

*Environmental Resources and Technologies, Health and Environment Department AIT
Austrian Institute of Technology GmbH, Konrad-Lorenz-Strasse 24, 3430 Tulln, Austria;
andrea.watzinger@ait.ac.at, phone: +43 (0) 50550-4656; fax: +43 (0) 50550-3452*

Task

In-situ remediation of a hydrocarbon (diesel) contaminated site in Vienna (Austria) – unsaturated and saturated zone were affected

Introduction

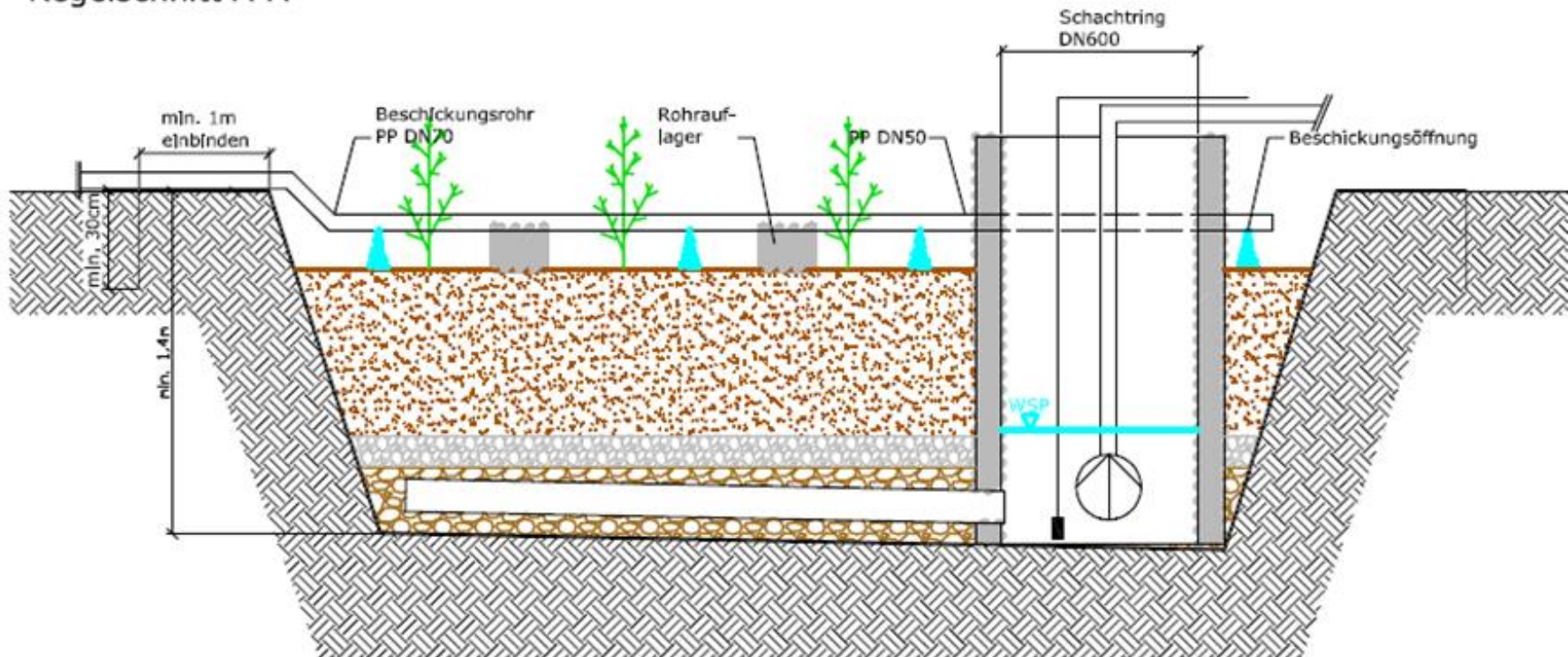
Hydrocarbons can easily be degraded by microorganisms

→ biological remediation strategy was proposed

- Remediation of the unsaturated zone by bioventing (addition of nutrients was tested)
- **Remediation of groundwater by constructed wetlands**

Construction of the four wetlands on-site

Regelschnitt A-A



vertical flow and intermittent loading

Construction of the wetlands – August 2012



Planting: *Salix viminalis*

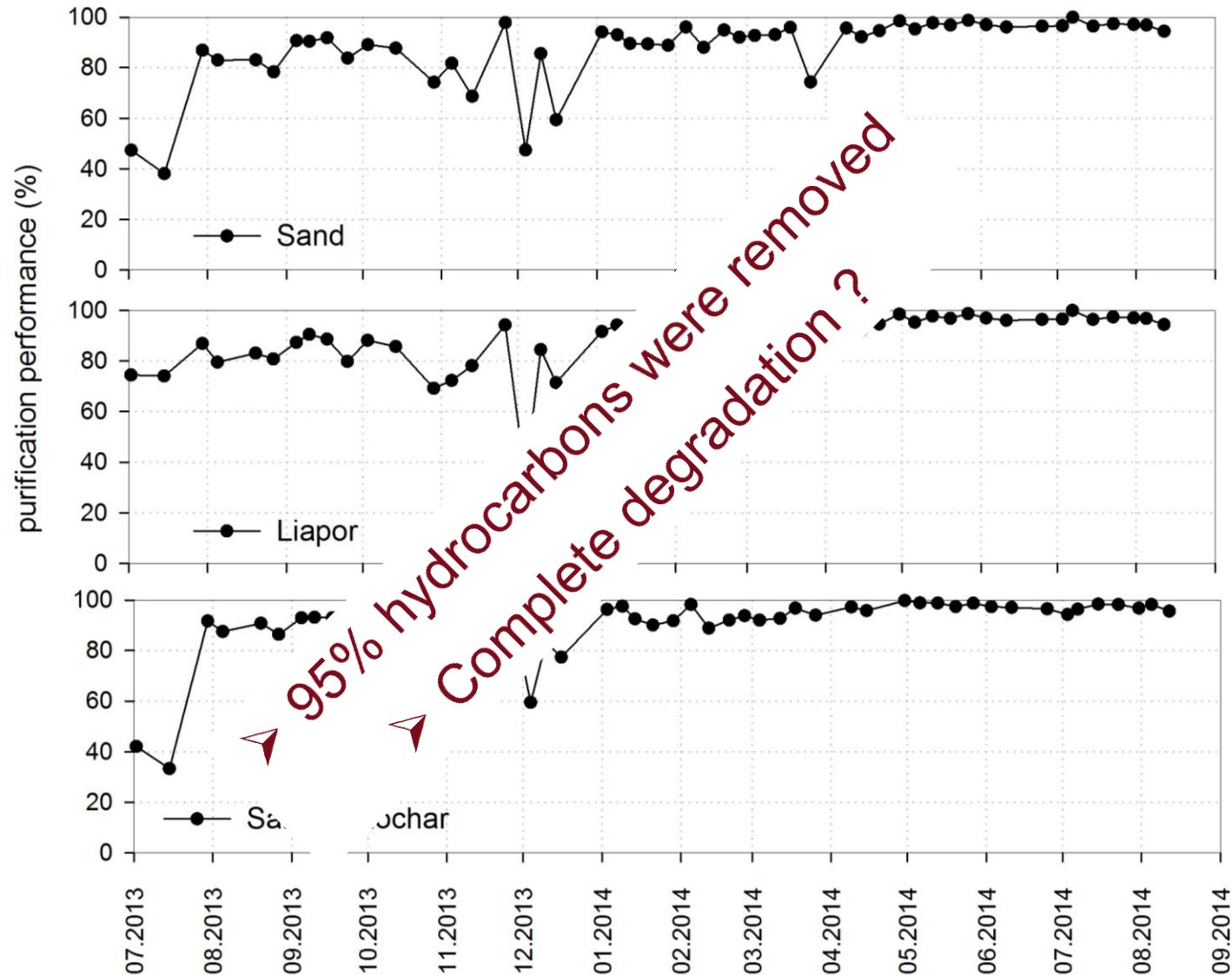
4 constructed wetlands:

- Sand + (0-4 mm)
- Sand (0-4 mm)
- Liapor
- Biochar (3w/w%) & Sand

During operation – September 2013



Constructed wetlands – hydrocarbon removal efficiency



Degradation of ^{13}C labelled hexadecane

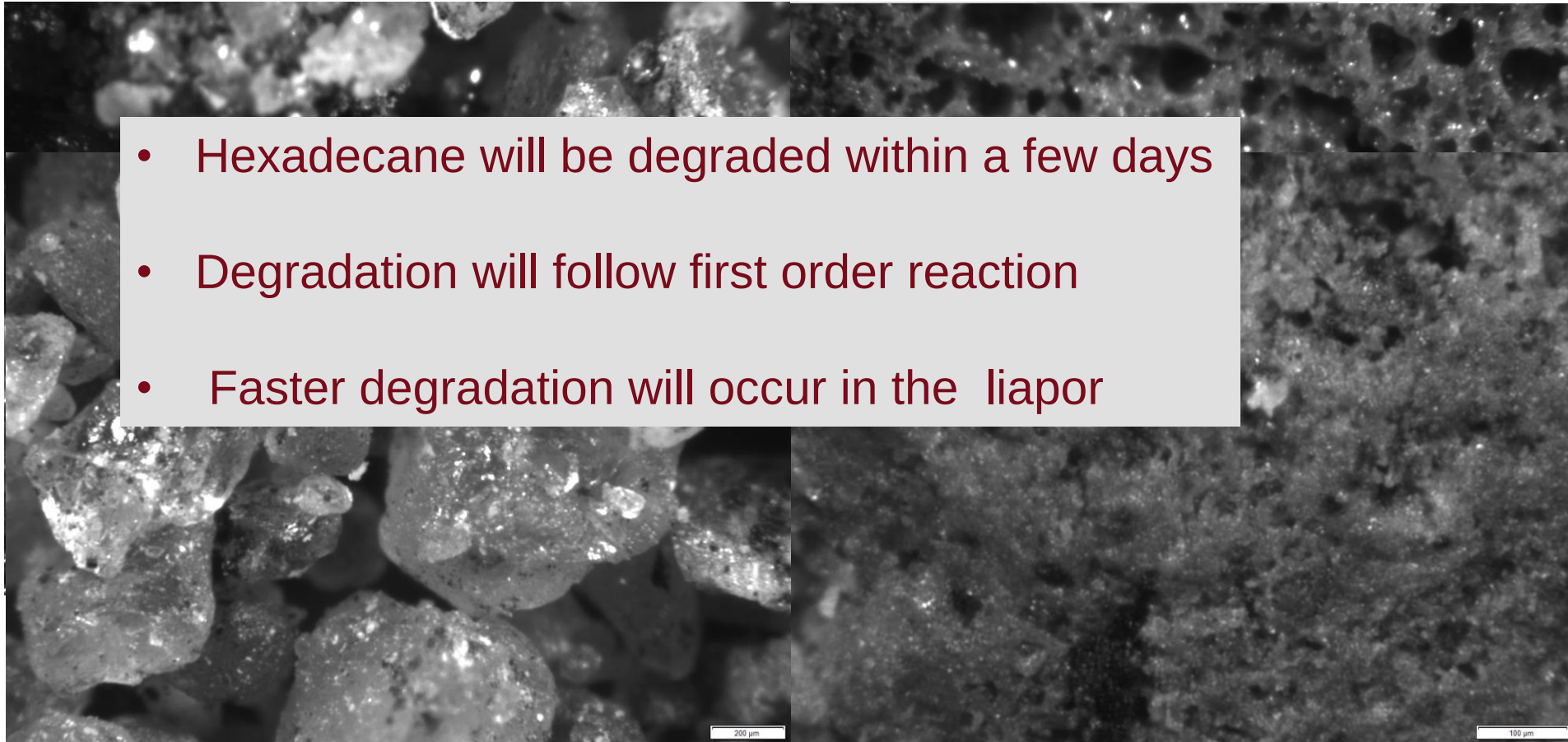
Microcosms experiment – Material and Methods

- ✓ Substrate sampling from the constructed wetlands in January 2014
- ✓ 50 g of substrate from the constructed wetland ($\delta^{13}\text{C} = -30.7 \text{ ‰}$)
- ✓ 50 μl of ^{13}C labelled hexadecane (**$\delta^{13}\text{C} = +98.8 \text{ ‰}$**)
- ✓ 4 replicates + 2 sterile controls per substrate
- Measurements of ^{13}C CO_2 during incubation
- Measurement of ^{13}C PLFAs (microbial biomass) after 40 days

Degradation of ^{13}C labelled hexadecane

Microcosms experiment – Material and Methods

- Hexadecane will be degraded within a few days
- Degradation will follow first order reaction
- Faster degradation will occur in the liapor



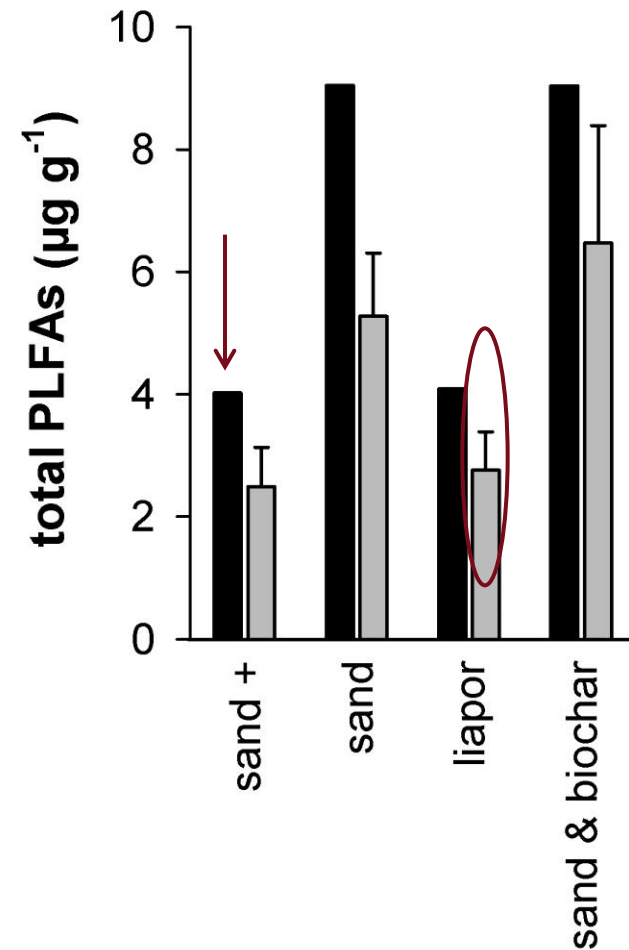
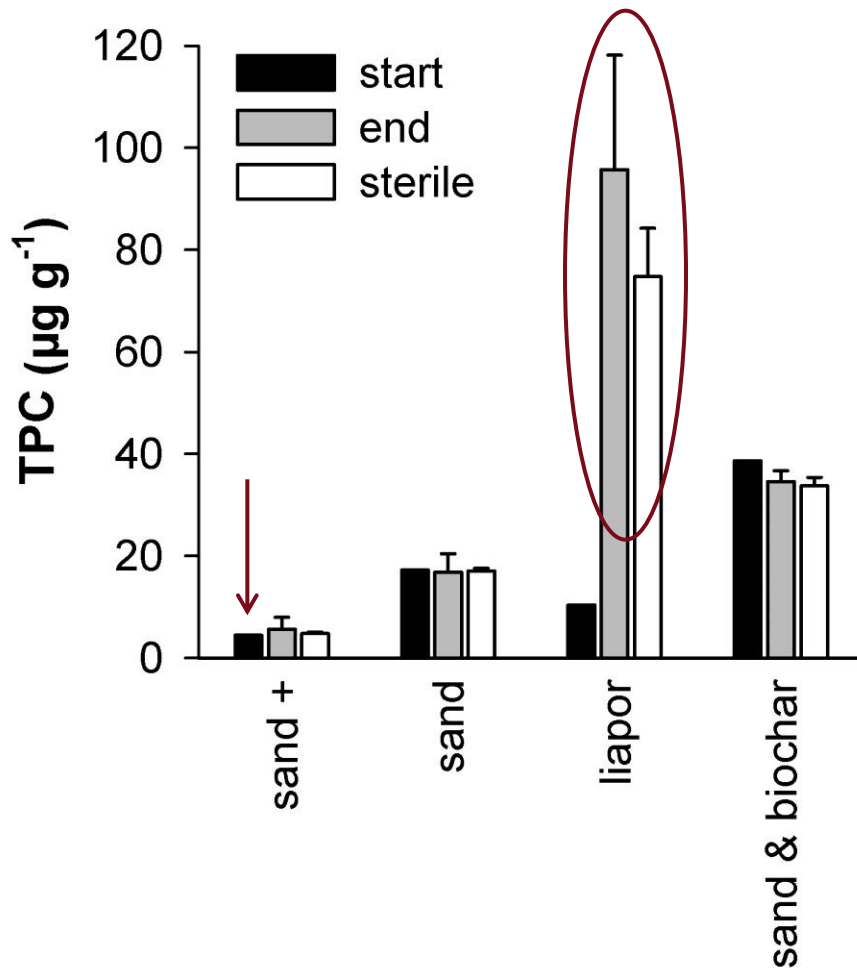
sand+

sand

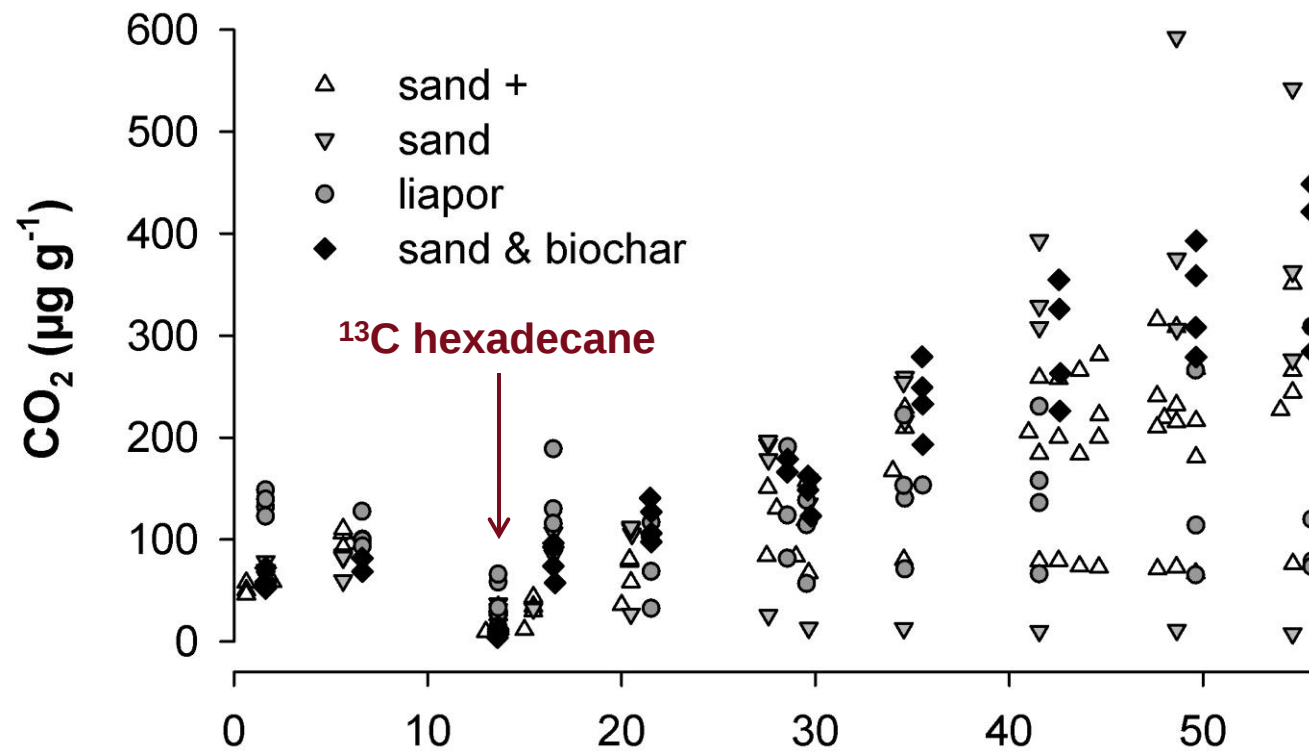
liapor

biochar & sand

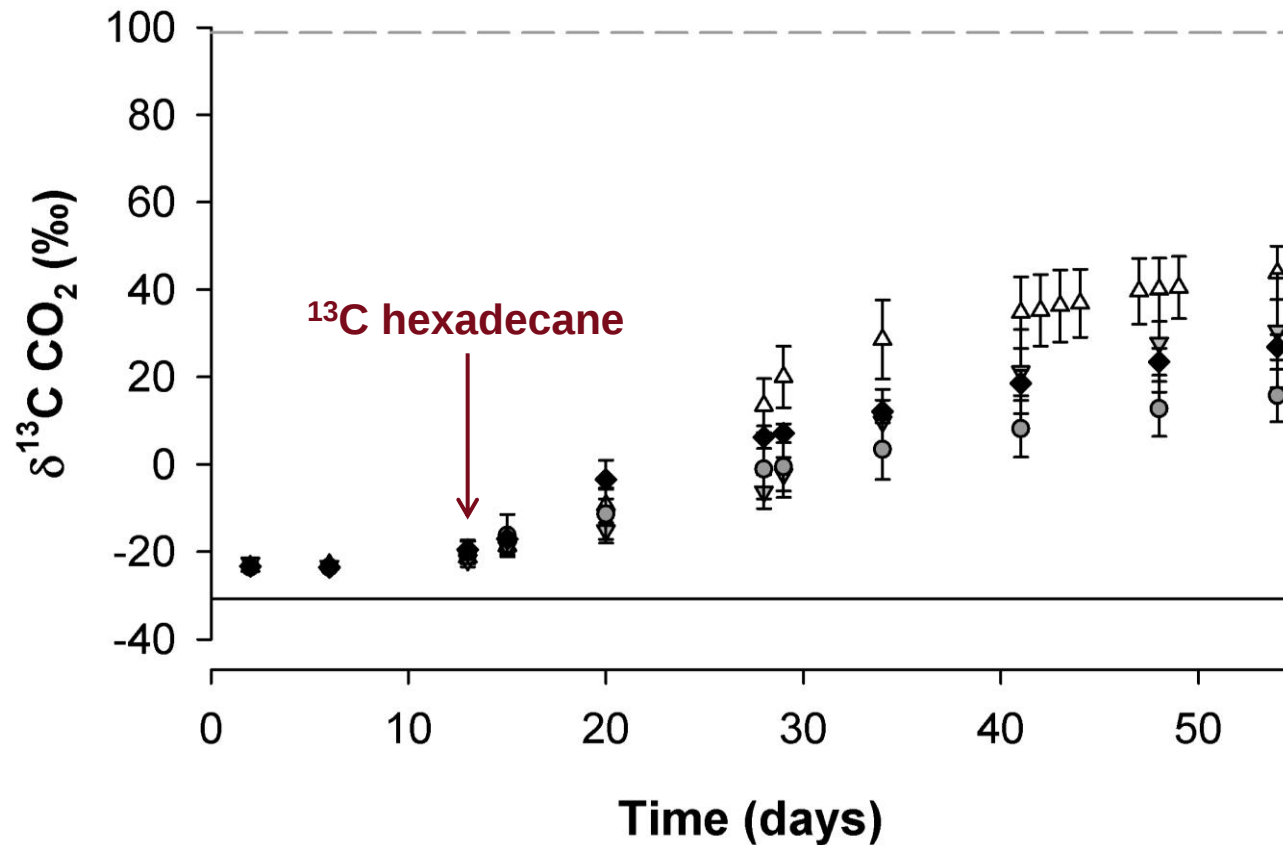
Total petroleum hydrocarbon (labelled hexadecane excluded) and total microbial PLFAs



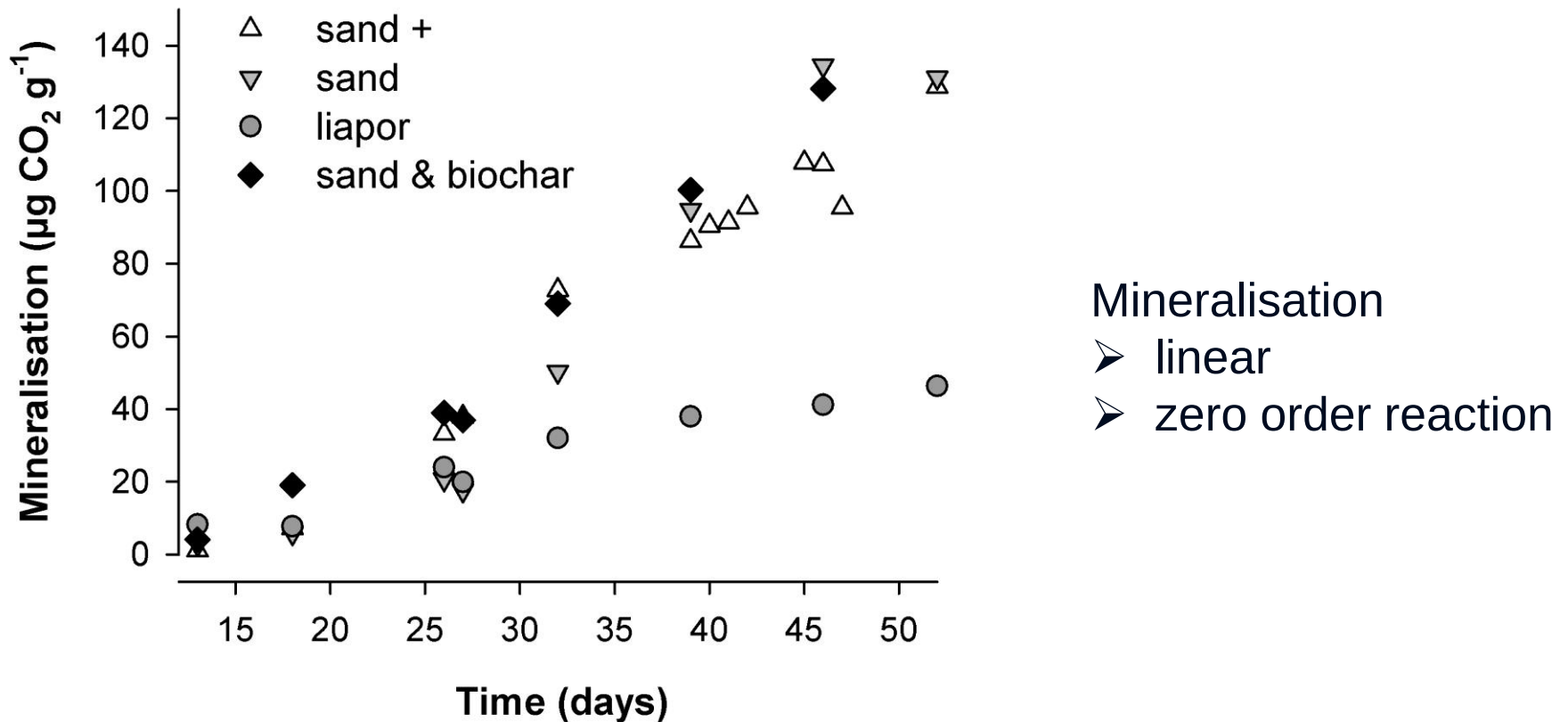
Mineralization – CO₂ concentrations



Mineralization of ^{13}C hexadecane – $\delta^{13}\text{C}$ CO_2 values



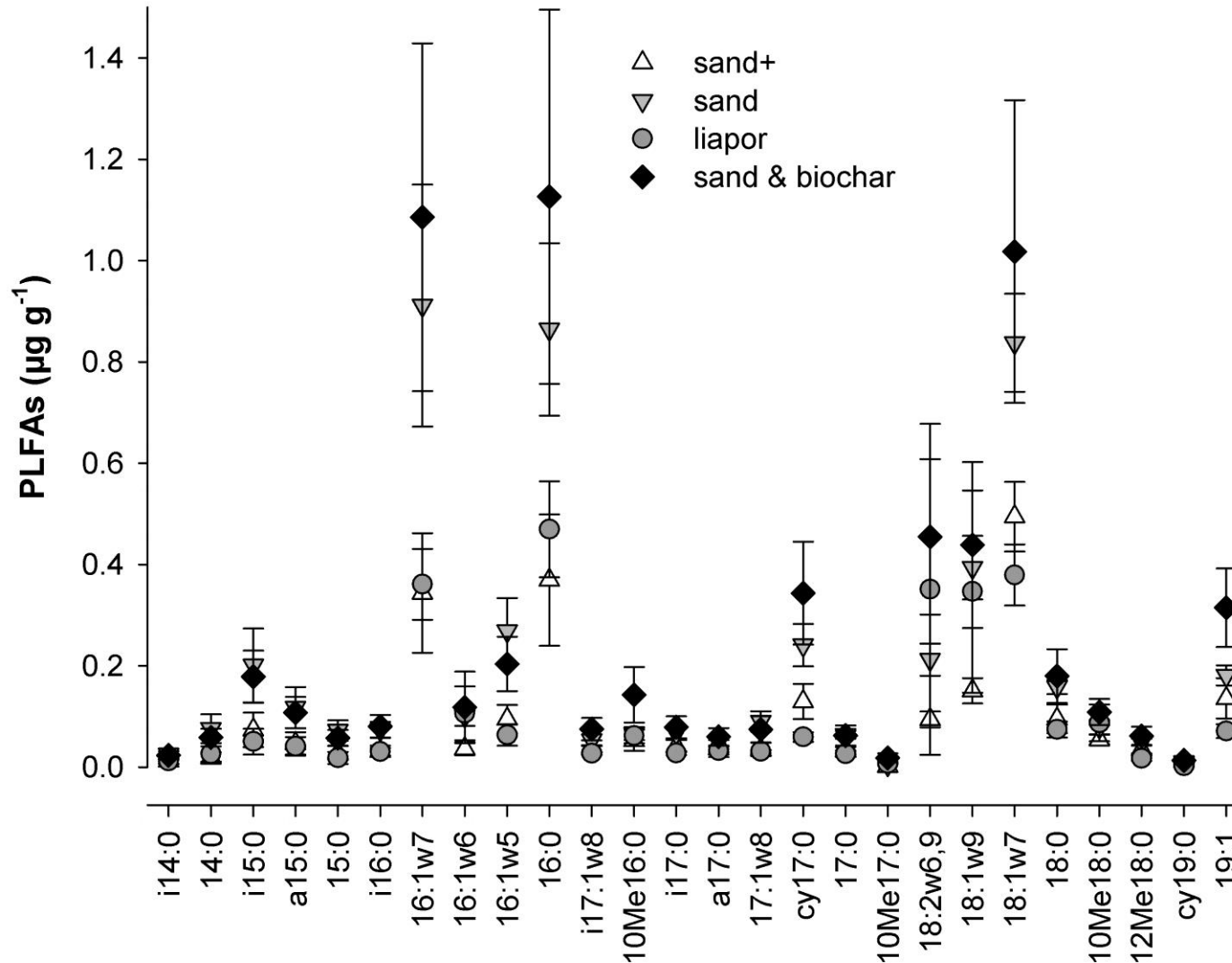
Mineralization of ^{13}C hexadecane



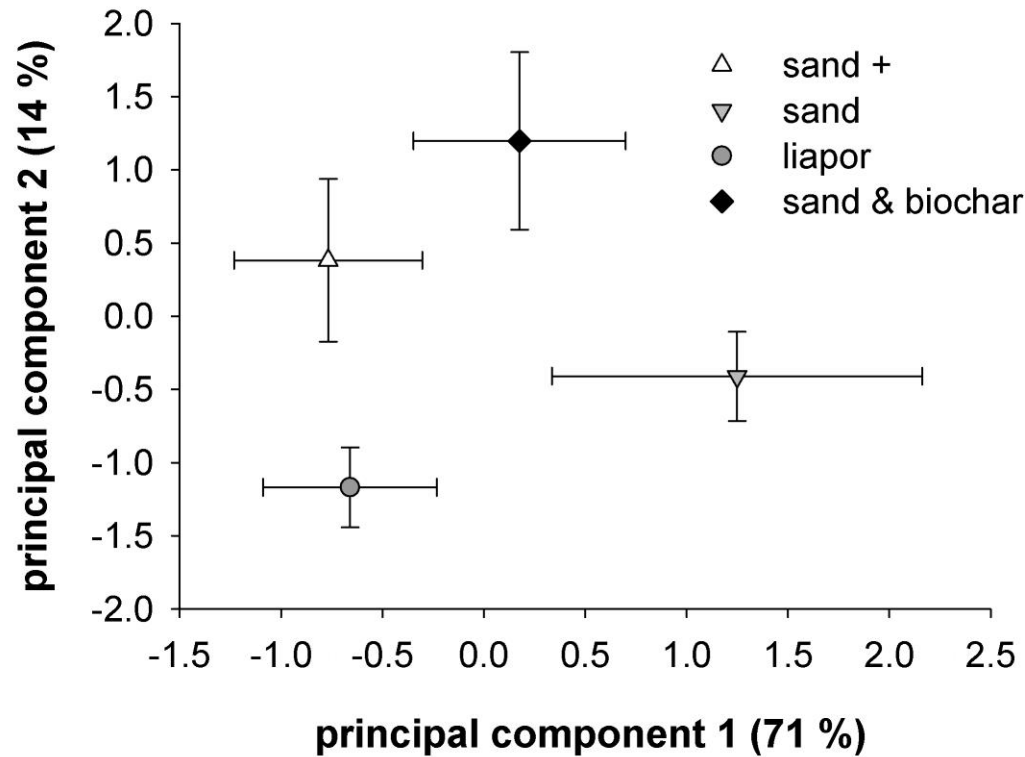
✓ Sandy substrate: $3 \mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$

✓ Liapor: $1 \mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$

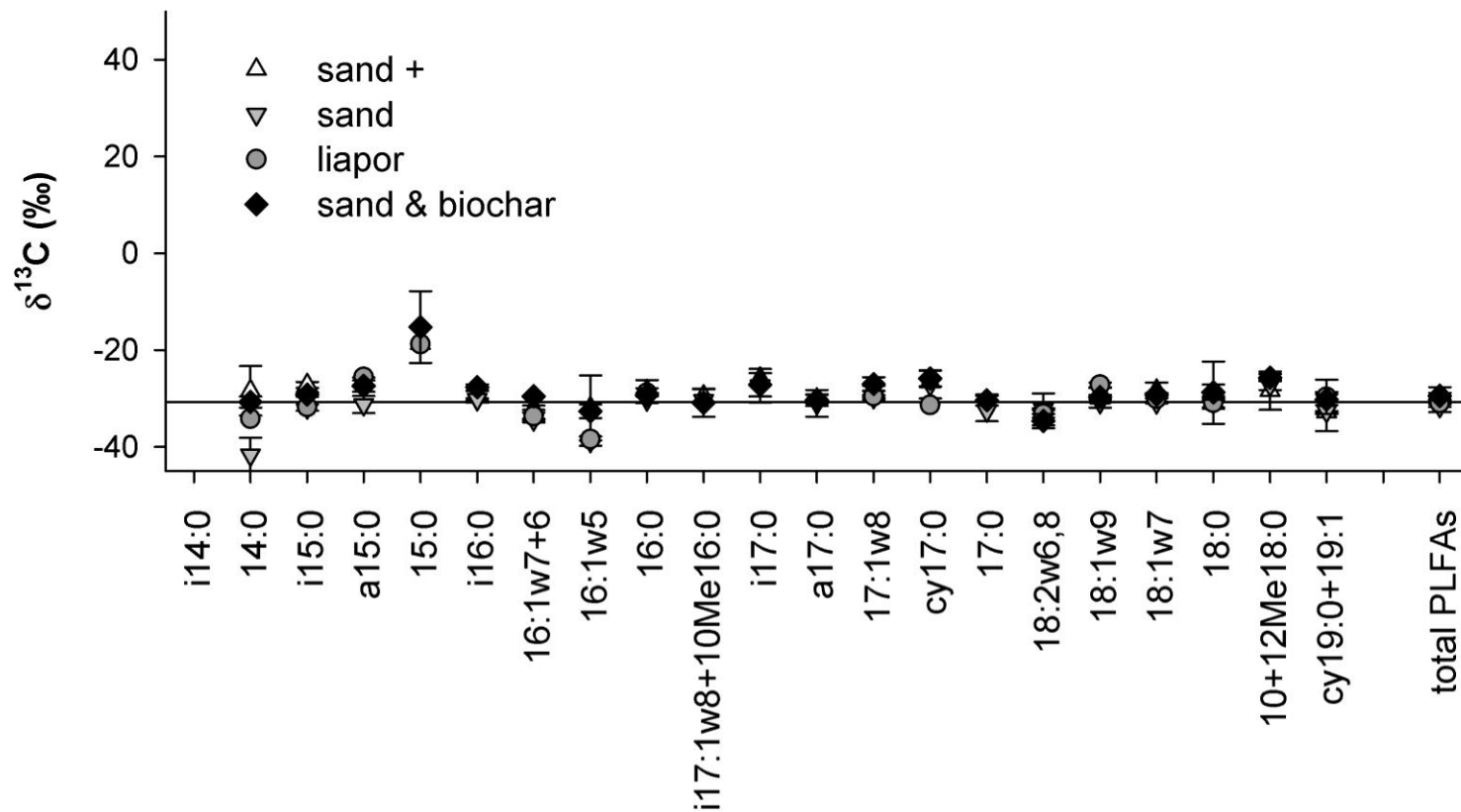
Microbial PLFAs in the constructed wetlands



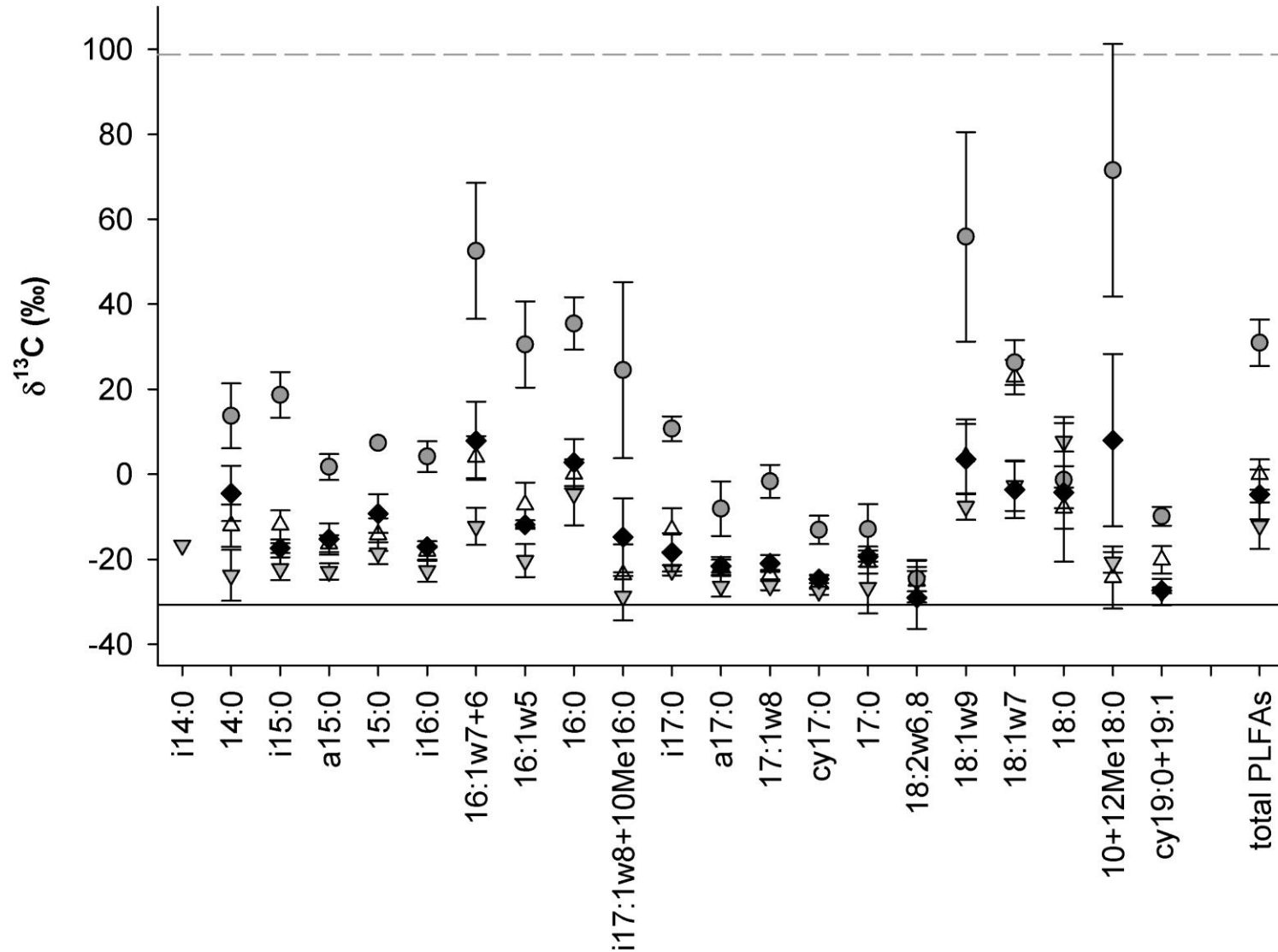
Microbial community of different CW substrates



Uptake of hexadecane into microbial PLFAs – sterile controls



Uptake of hexadecane into microbial PLFAs



Where did the added hexadecane go?

40 days after labelling 50 g substrate with 50 μ L hexadecane

substrate	mineralisation	microbial biomass	remaining
sand +	79	1.8	19
sand	87	2.3	11
liapor	19	2.8	78
biochar & sand	88	3.8	8

Conclusion

- Diesel hydrocarbon removal from groundwater by constructed wetlands is very efficient (95 % removal)
- Mineralization of ^{13}C hexadecane in the lab was around 80-90 % for sandy substrates but only 20 % for liapor.
- Retarded degradation of hexadecane in liapor was likely responsible for the (2.5 times) higher ^{13}C labelling of microbial PLFAs.

→ still degradation was high enough to support the first hypothesis that diesel was mineralized to CO_2