

Mikrobiologische Abklärung des Bioremediationspotentials von Standorten kontaminiert mit CKW

Sonia Tarnawski, Pierre Rossi und
Christof Holliger

EPFL ENAC IIE LBE & CEL

Per- und Trichloroethen

Sichere Lösungsmittel für die Industrie

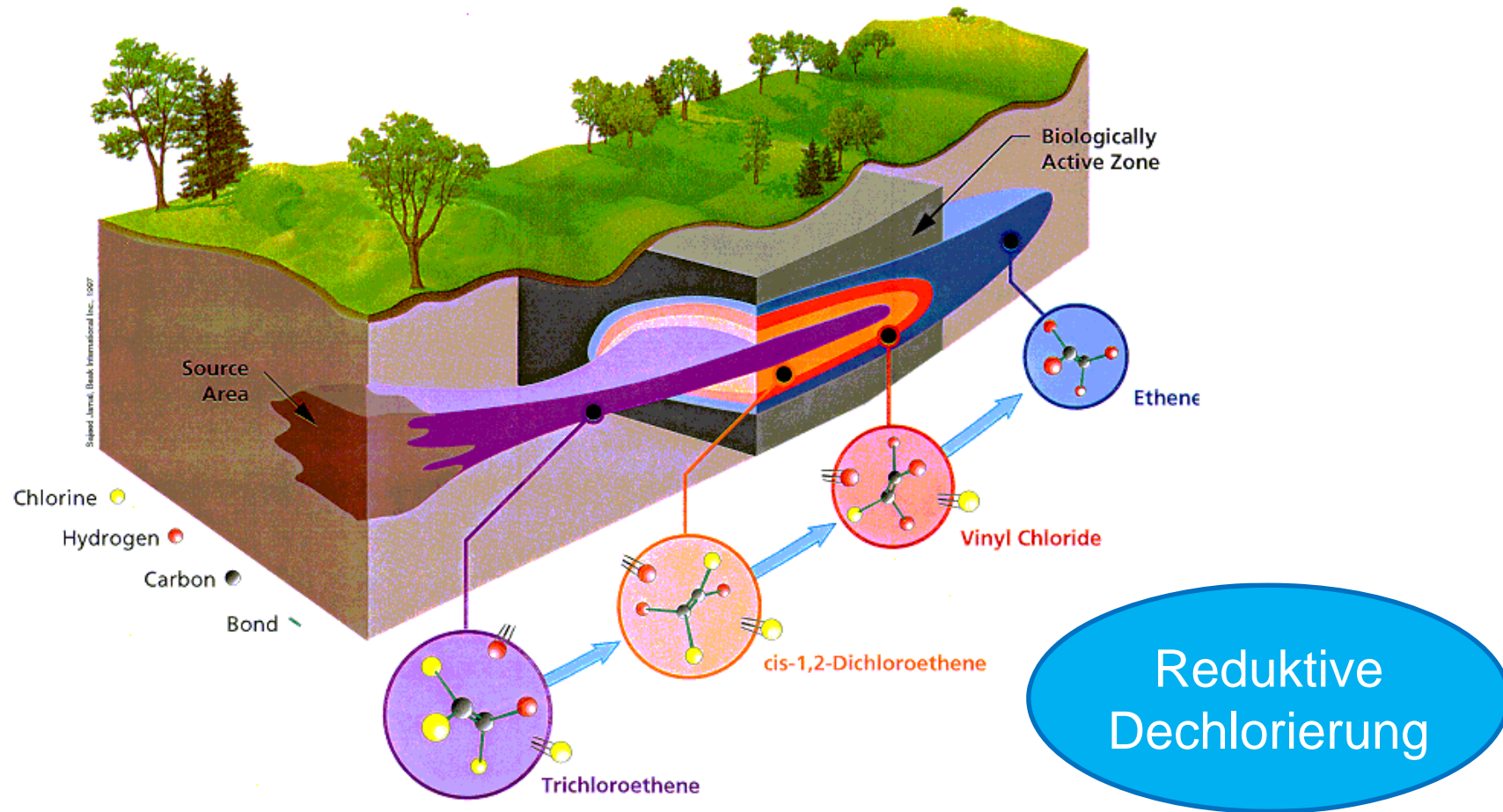
The image shows two chemical structures overlaid on a background of an industrial plant with large storage tanks and piping. The structure on the left is Perchloroethene (PCE), represented as a double bond between two carbon atoms, with each carbon atom bonded to two chlorine (Cl) atoms. The structure on the right is Trichloroethene (TCE), represented as a double bond between two carbon atoms, with one carbon atom bonded to two chlorine (Cl) atoms and the other carbon atom bonded to one chlorine (Cl) atom and one hydrogen (H) atom.

PCE
Perchloroethen

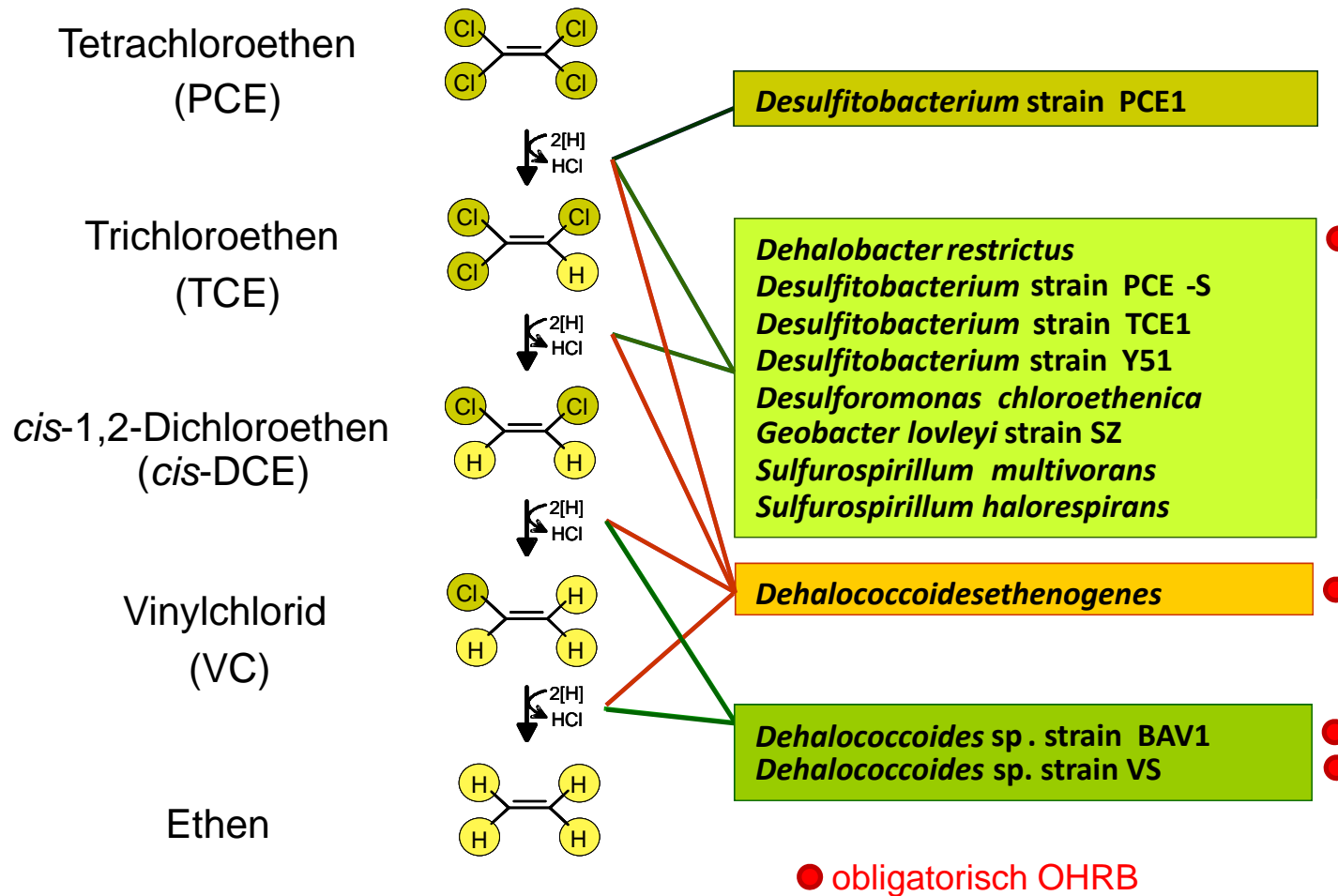
TCE
Trichloroethen

aber resistent gegen oxidative Attacken

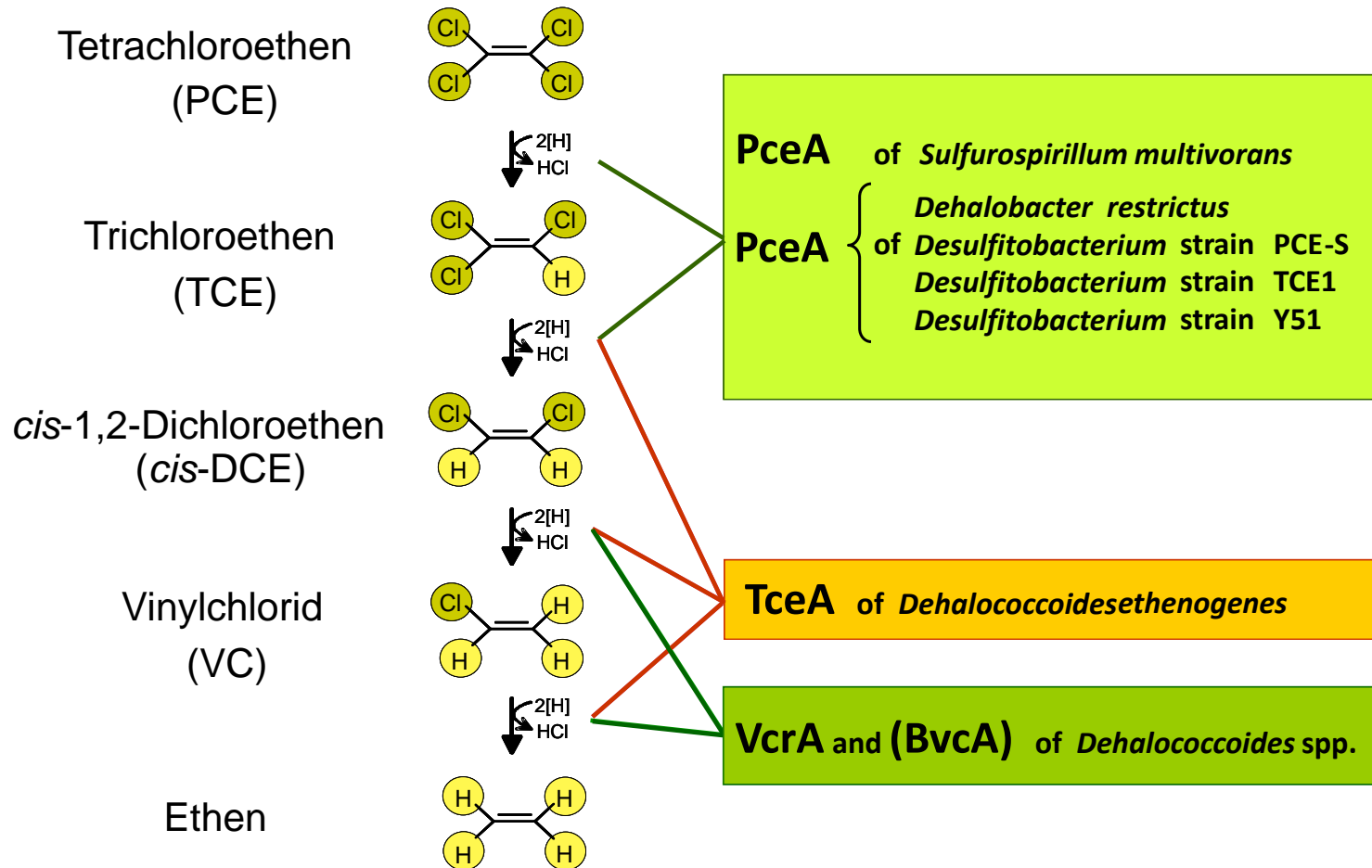
Ihre Transformation in Grundwasserleitern



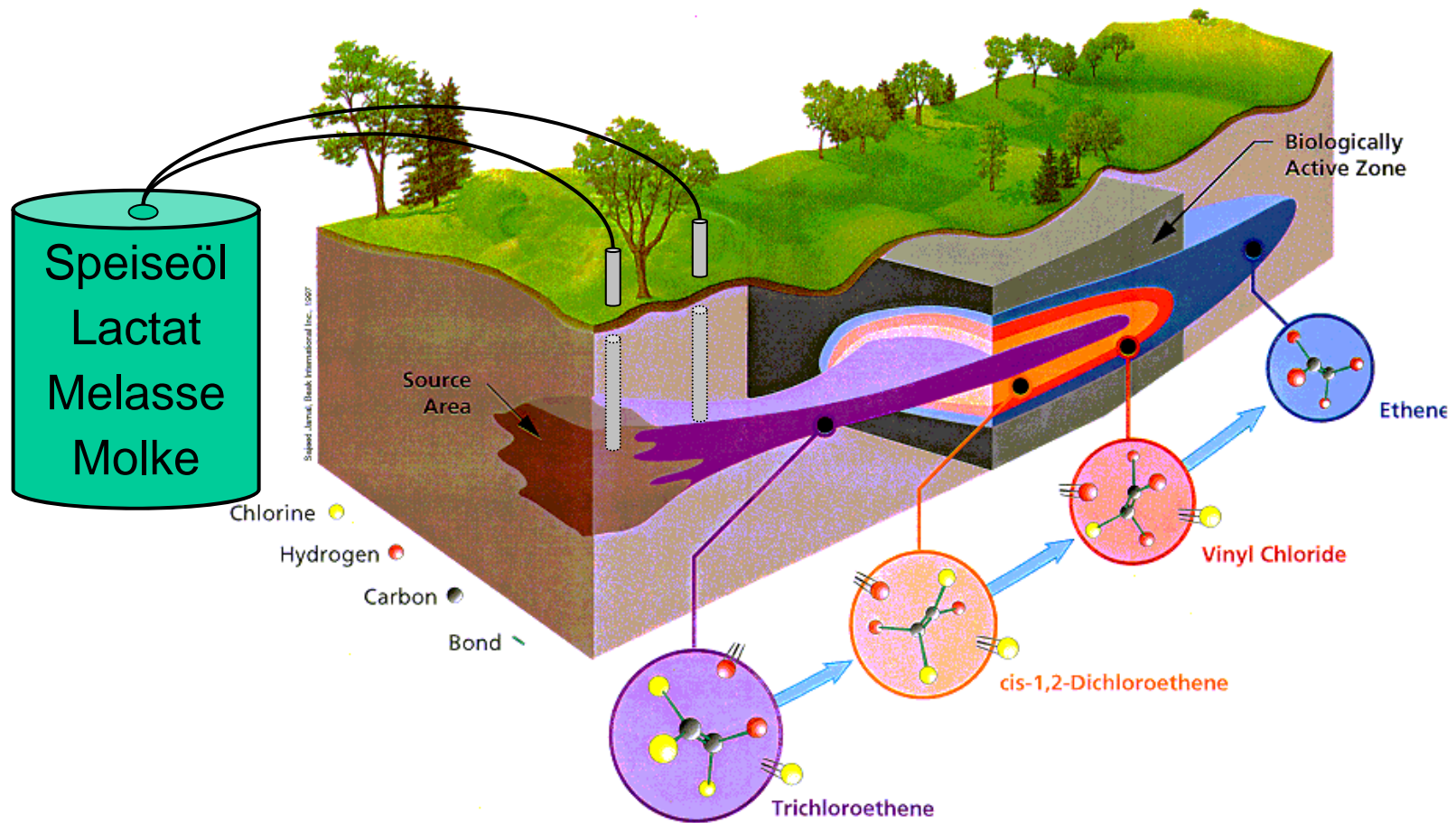
Anaerobe Bakterien, die mit Chlorethenen atmen (OHRB)



Reduktive Dehalogenasen für Chlorethene



«Monitored» und «Enhanced» Natural Attenuation



Unsere Methode zur Bestimmung des Bioremediationspotentials

Zwei Etappen:

- 1) Anwesenheit des biochemischen Potentials
 - Molekulare Analysen zur Bestimmung der An- und Abwesenheit der spezifischen Bakterien und Enzyme, die in der reduktiven Dechlorierung involviert sind
 - Anreicherung der Dechlorierungsaktivität in sogenannten Mikrokosmen

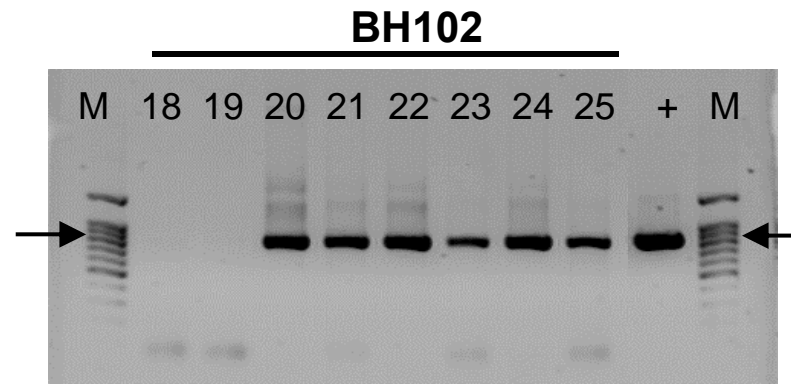
- 2) Analyse der mikrobiellen Ökologie des Grundwasserleiters
 - Molekulare Analysen der mikrobiellen Gemeinschaften
 - Physikalisch-chemische Analysen des Grundwassers
 - Entwicklung eines konzeptuellen Modells des Ökosystems basiert auf multivariate statistische Analysen

Molekulare Analysen des biochemischen Potentials

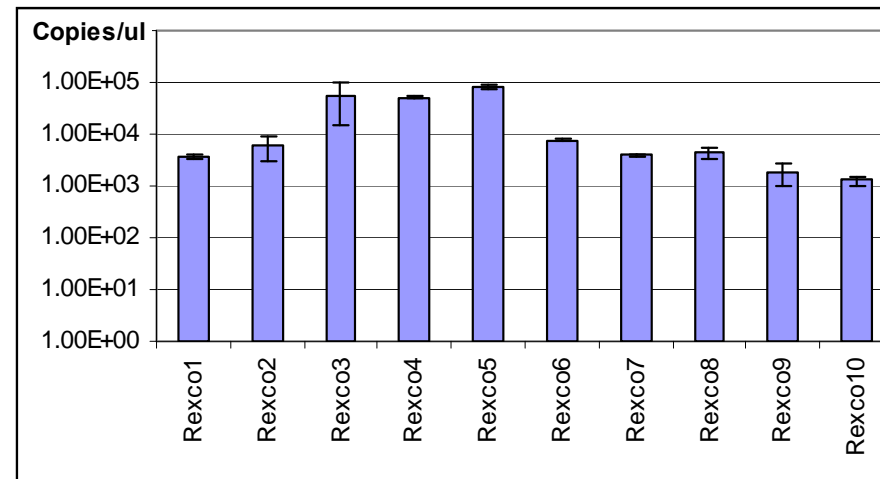
- Qualitative und quantitative PCR spezifisch für
 - Die Gene der 16S ribosomalen RNA der OHRB, die mit Chlorethenen atmen
 - Der Gene der reduktiven Dehalogenasen PceA, TceA, VcrA und BvcA
- Etappen der molekularen Analysen
 - Extraktion der DNA von Wasser- und Bodenproben
 - Amplifizierung der Zielgene mittels PCR
 - Visualisierung der PCR-Produkte oder Berechnung der Anzahl Genkopien in der Probe

Resultate der PCR-Analysen

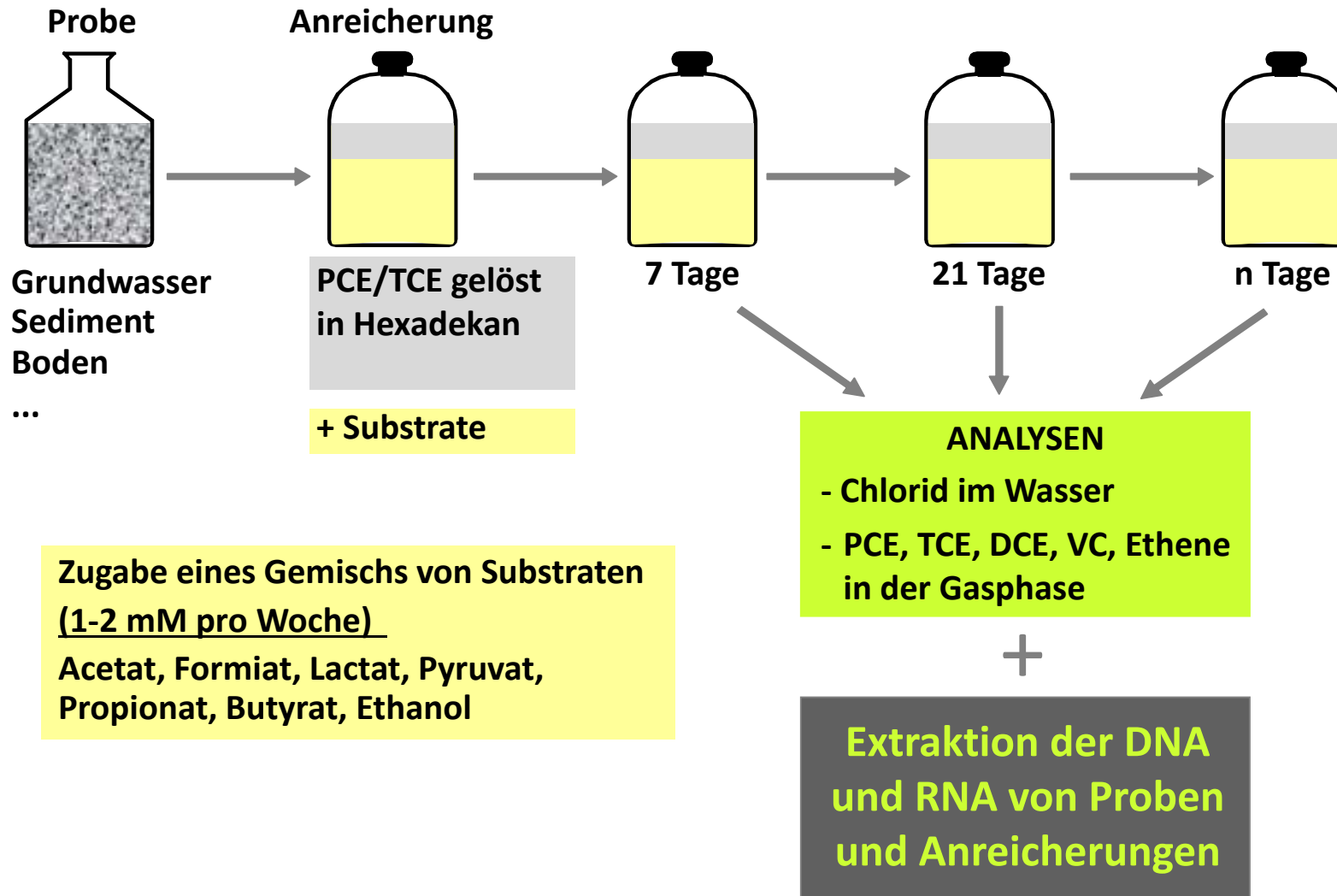
Qualitative An- /
Abwesenheits-
bestimmung
($<$ Detektionslimite)



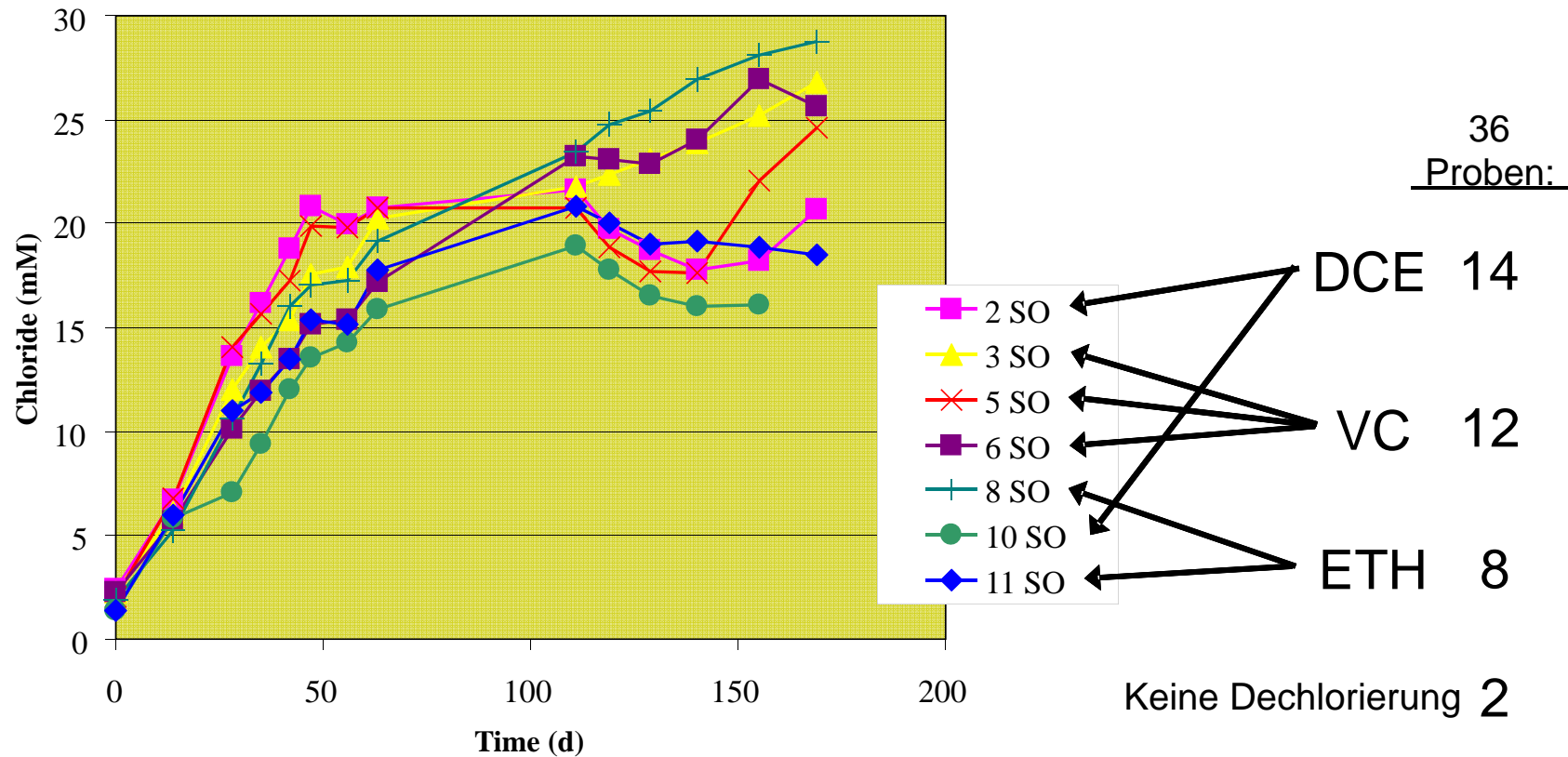
Quantifizierung der
Anzahl Kopien eines
spezifischen Gens



Experimenteller Set-up der Mikrokosmen



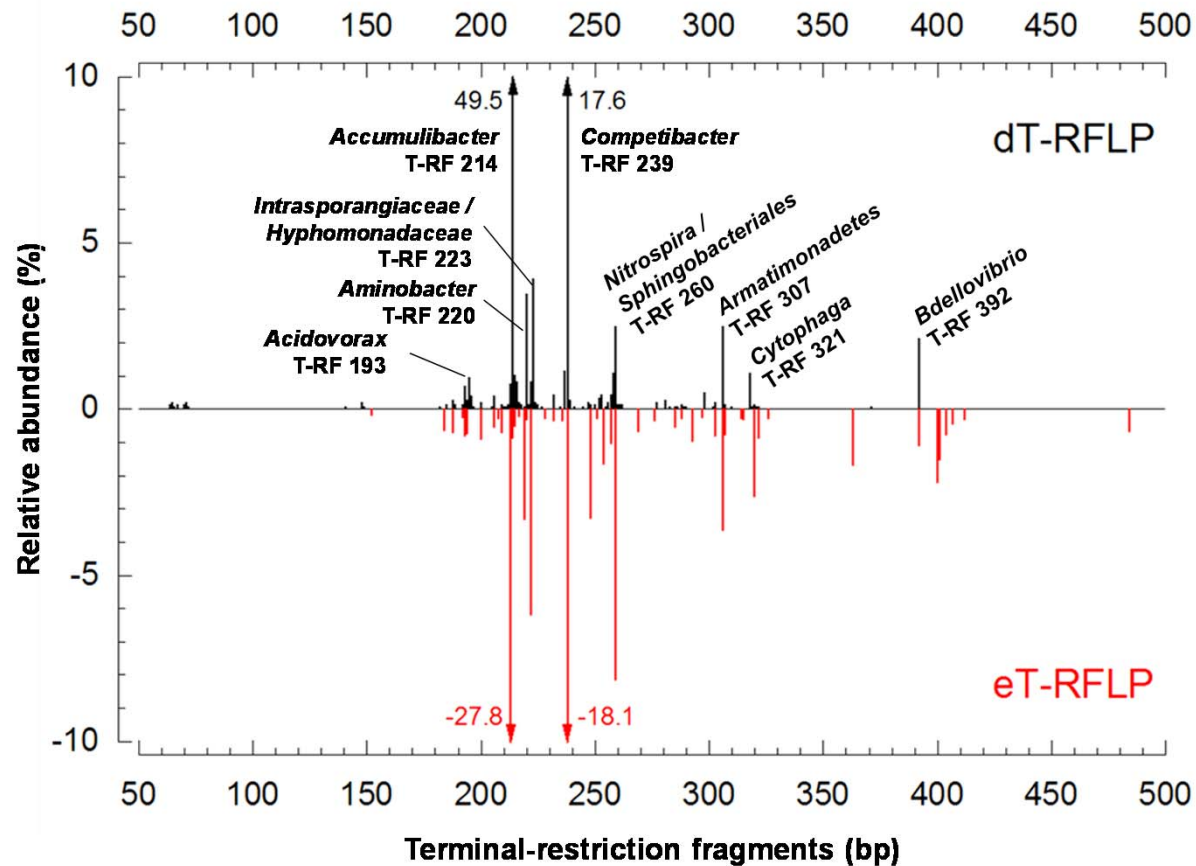
Dechlorierung in den Mikrokosmen



Analyse der mikrobiellen Ökologie des Grundwasserleiters

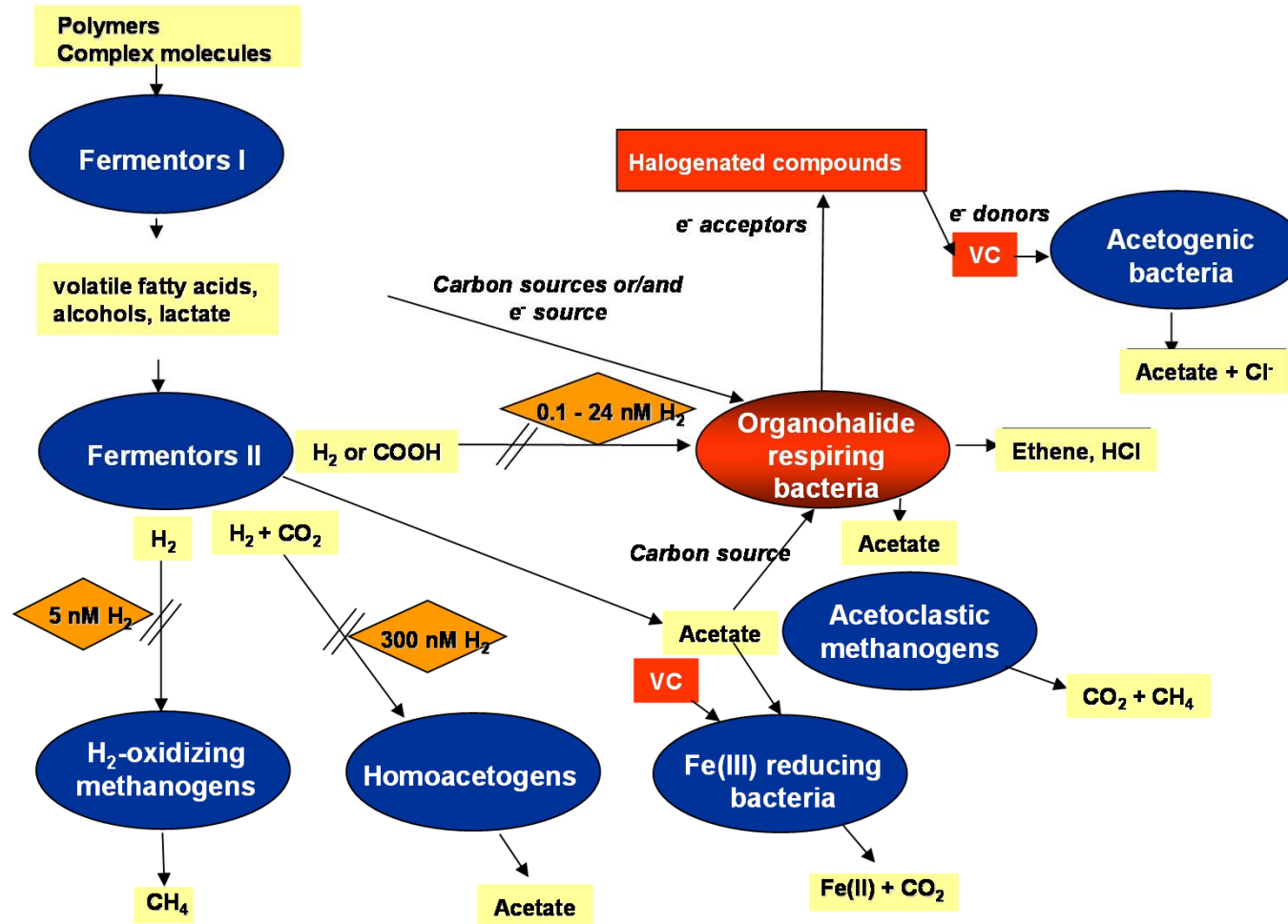
- Molekulare Analysen der mikrobiellen Gemeinschaften (MG) im Grundwasser
 - Kombination von T-RFLP («Fingerabdruck» der GM) und massives Sequenzieren mittels PyroTRF-ID
- Physikalisch-chemische Analysen des Grundwassers
 - Die Kontaminanten und deren Abbauprodukte
 - Klassische und weniger klassische Kationen und Anionen
 - Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , NO_3^- , SO_4^{2-} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , S^{2-}
- Multivariate statistische Analysen
- Entwicklung eines konzeptuellen Modells des Ökosystems

Kombination von T-RFLP und massives Sequenzieren mittels PyroTRF-ID

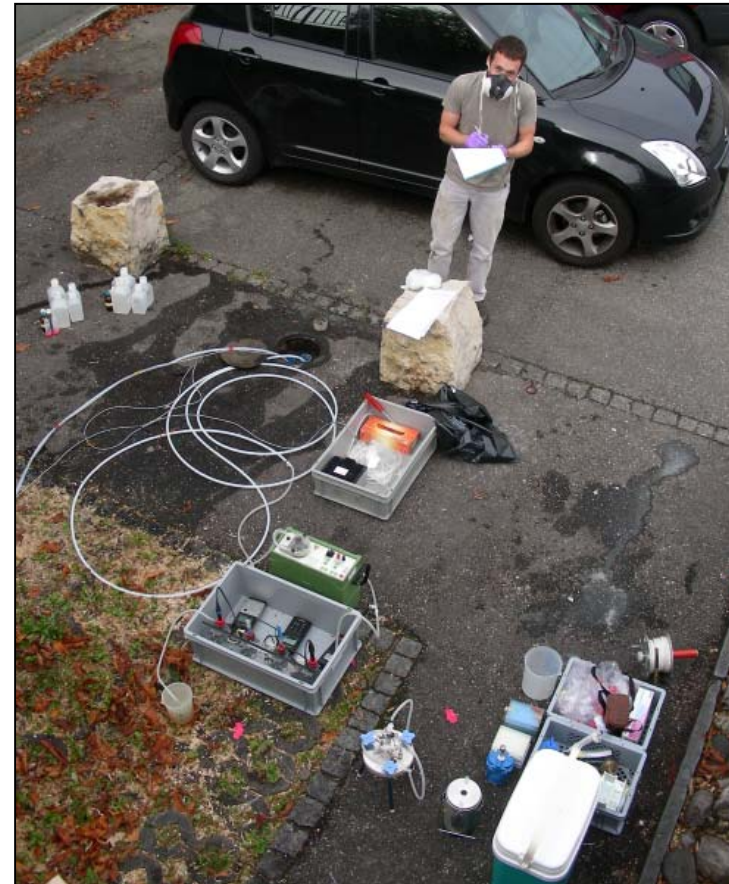
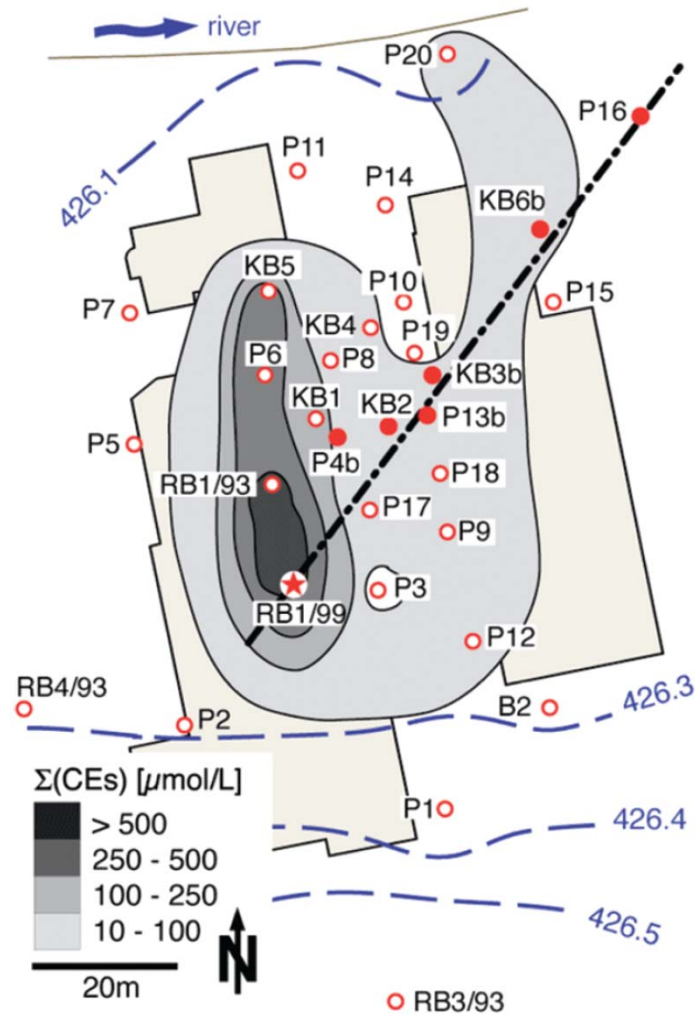


Weissbrodt and Shani, et al. (2012) *BMC Microbiol.* 12:306

Die Bakteriengilden, die in die reduktive Dechlorierung involviert sind



Fallstudie no.1: Zuchwil



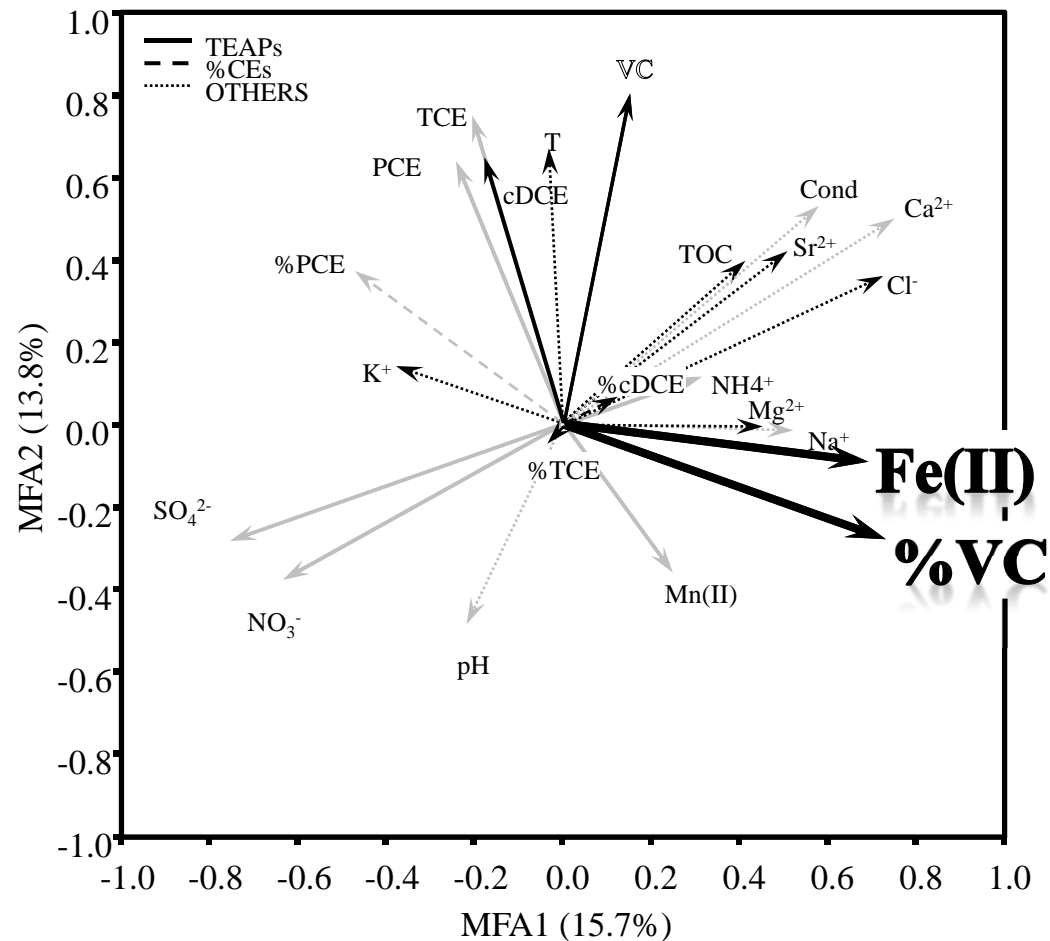
Noam Shani bei der Feldarbeit

Zuchwil: Das biochemische Potential ist anwesend

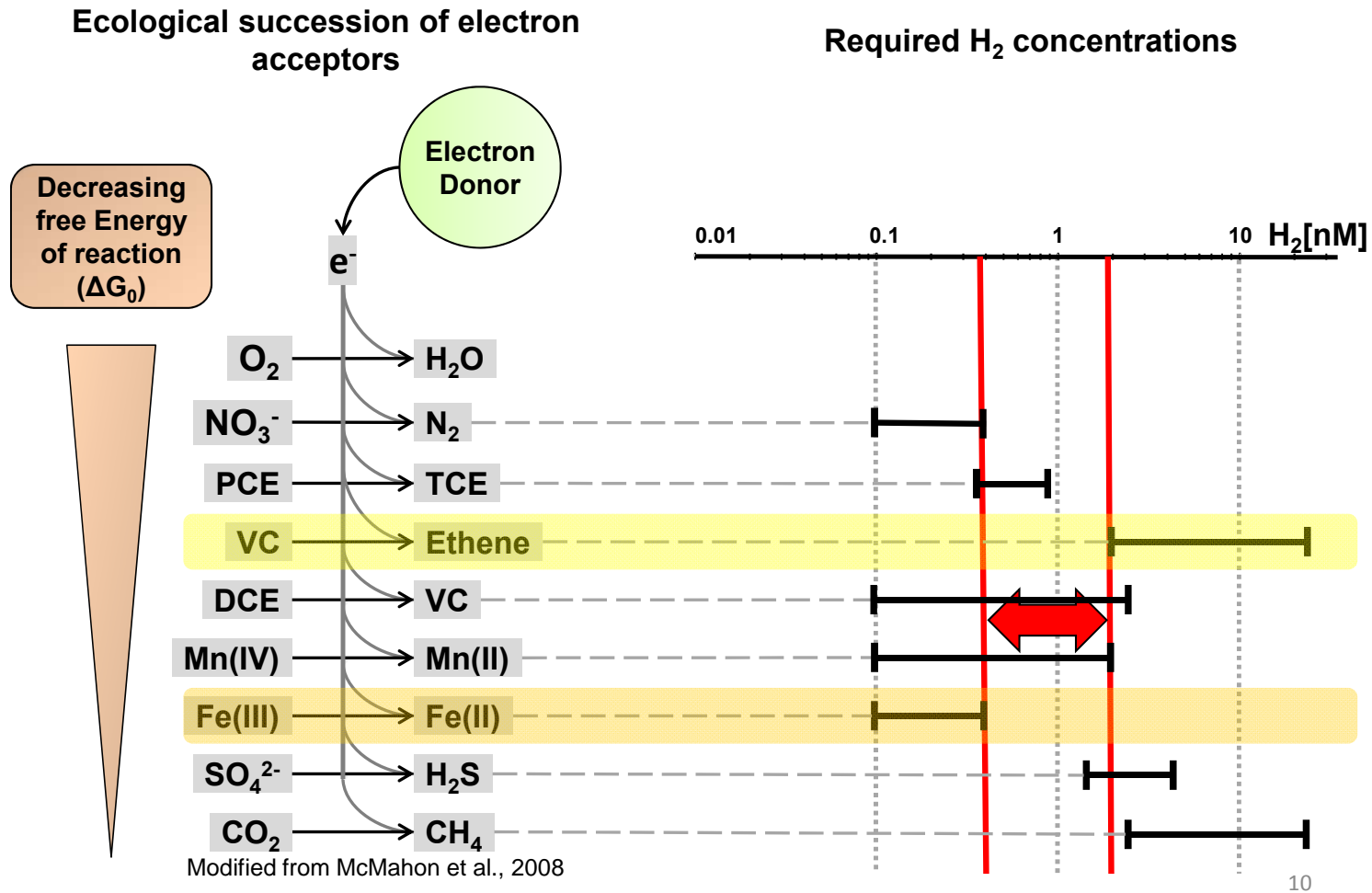
	B2	P20	KB1	KB2	KB3a	KB3b	KB4a	KB4b	KB5a	KB5b	KB6a	KB6b	KB7a	KB7b	RB1/93	RB1/99	RB3/93
<i>Dehalococcoides</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>Dehalobacter</i>	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
<i>Sulfurospirillum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Desulfuromonas</i>	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
<i>Desulfitobacterium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>vcrA</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
<i>bvcA</i>	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-

Zuchwil:

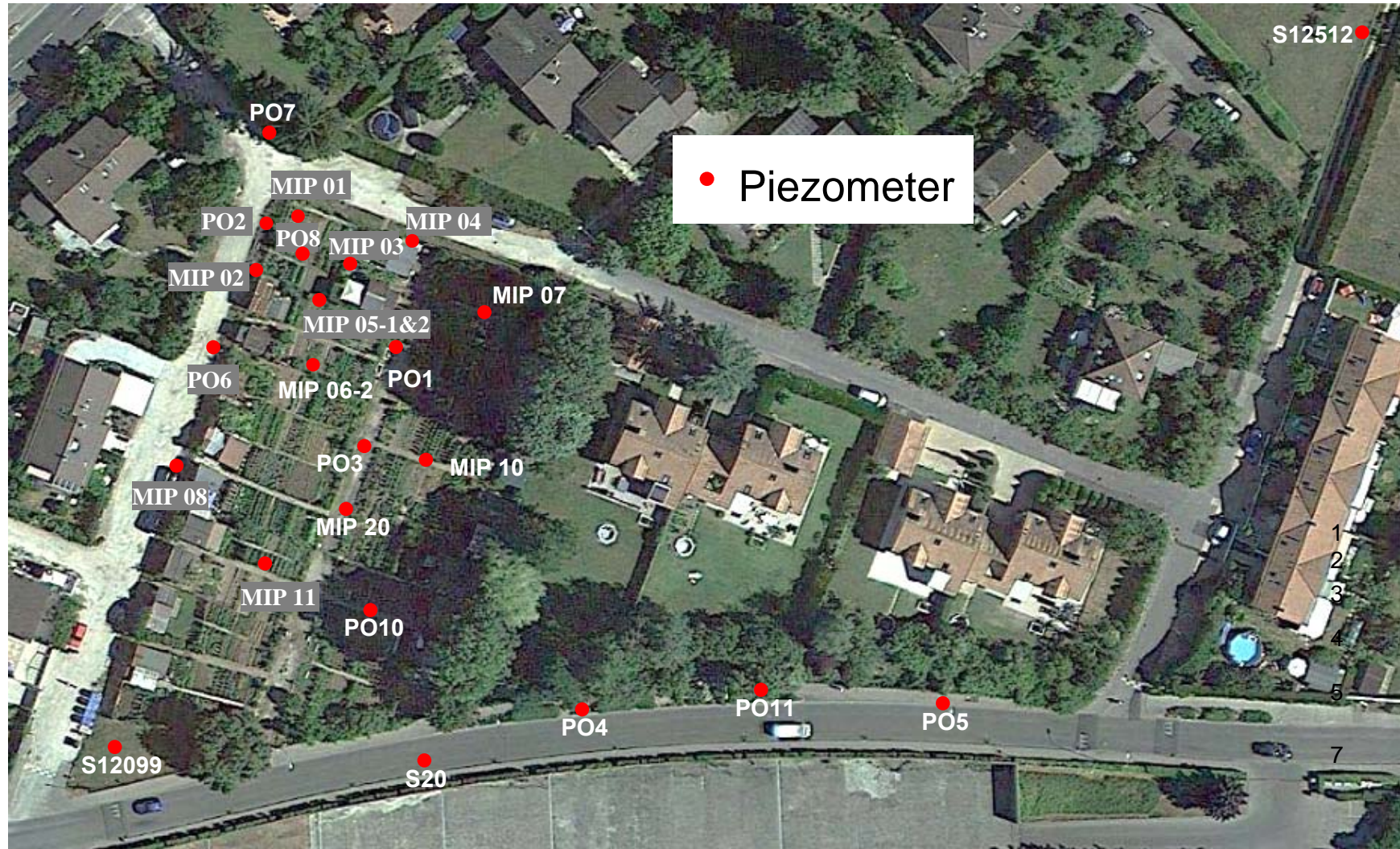
Kompetition zwischen Eisen-reduzierenden Bakterien und OHRB, die mit Vinylchlorid atmen



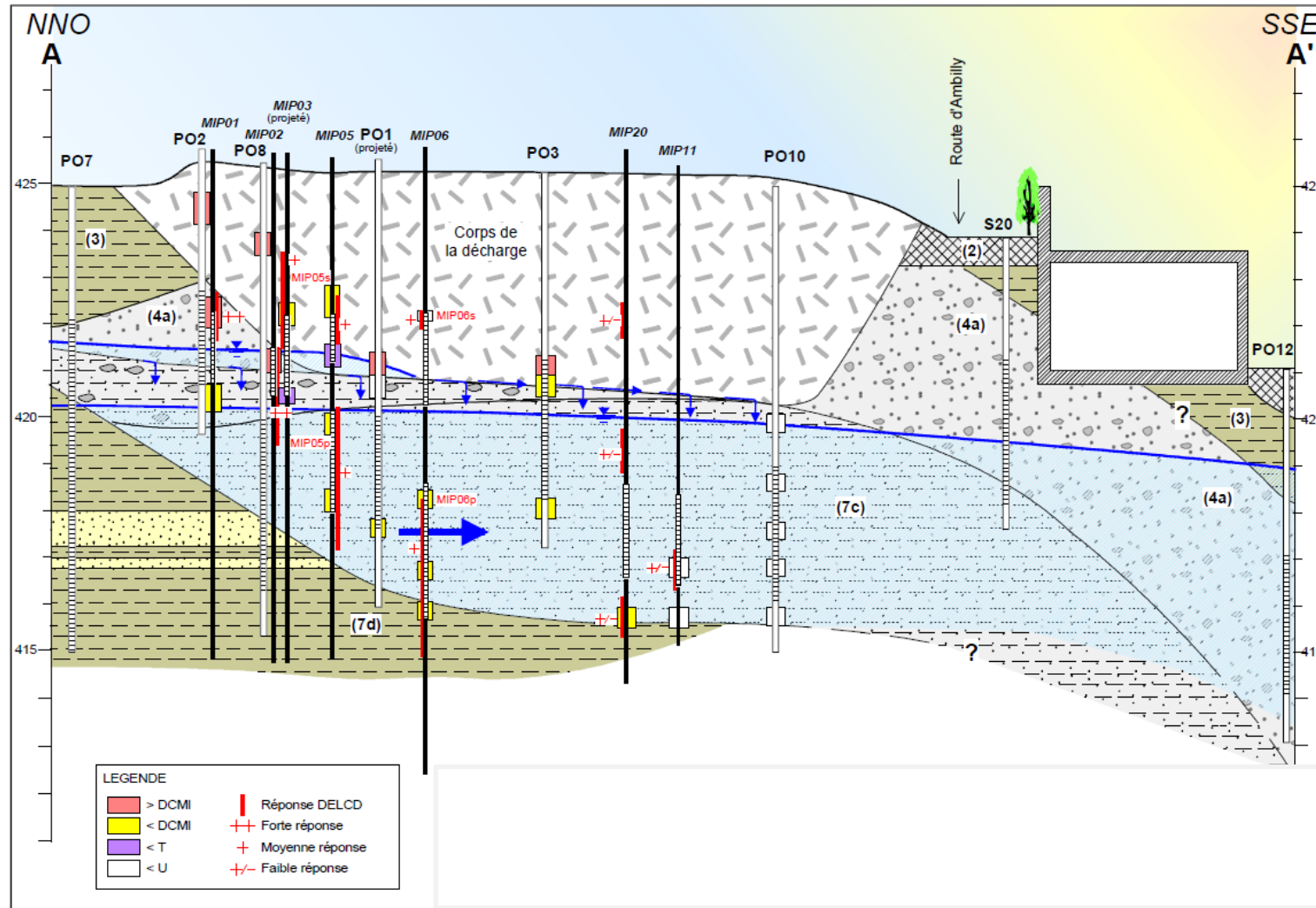
Zuchwil: Die Affinität für Wasserstoff erklärt den Mechanismus der Konkurrenz



Fallstudie no.2: Ehemalige Deponie in der Nähe von Genf (1)



Fallstudie no.2: Ehemalige Deponie in der Nähe von Genf (2)



Fallstudie no.2: Ehemalige Deponie in der Nähe von Genf (3)



Ehemalige Deponie in der Nähe von Genf : Das biochemische Potential ist anwesend, aber ...

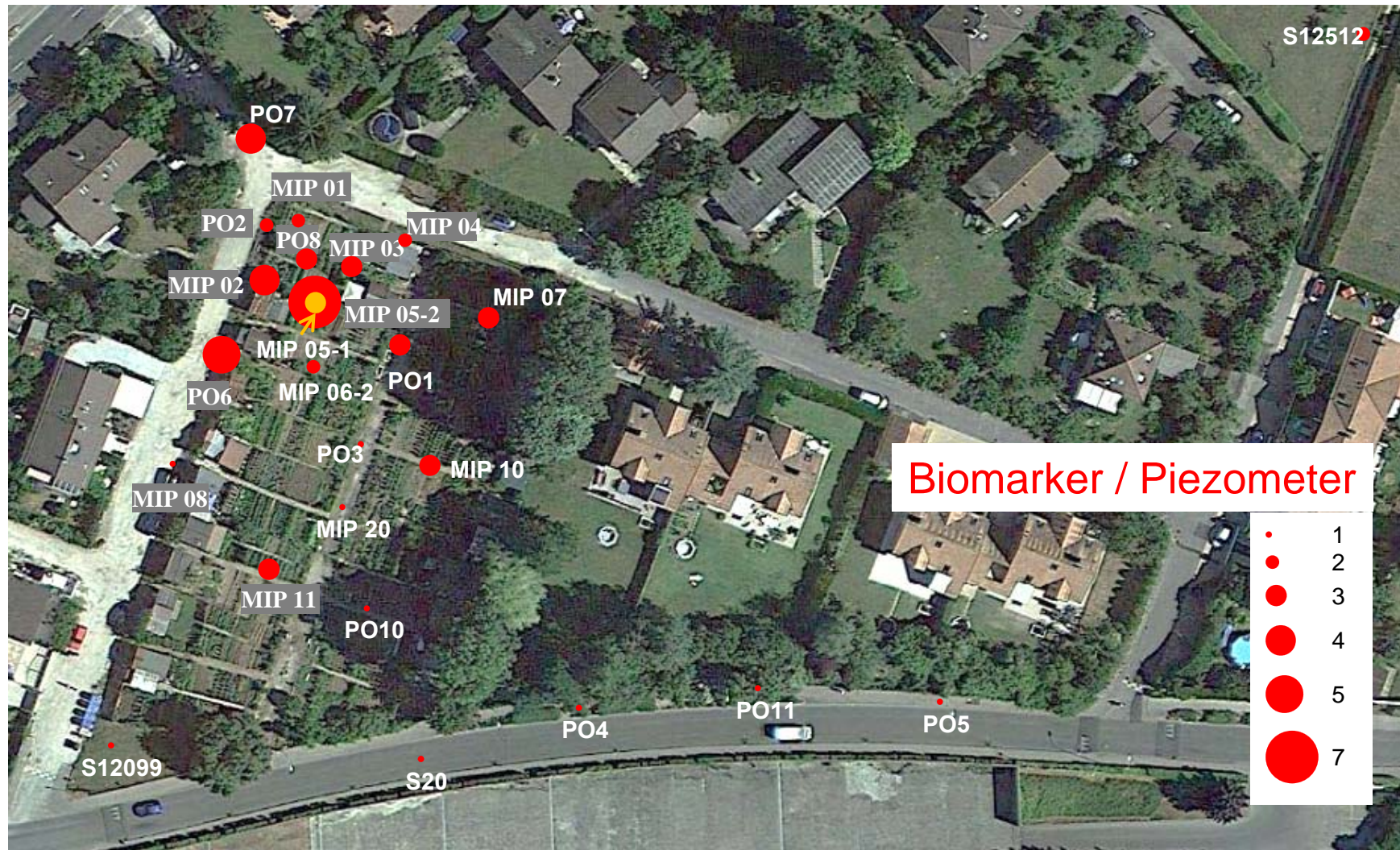
Angewandte Methode:

- Filtrierung von max. 1 L Wasser/Piezometer
- Extraktion der DNA
- Qualitative PCR spezifisch für die Gene *rdhA* und 16S rRNA der OHRB (Biomarker)

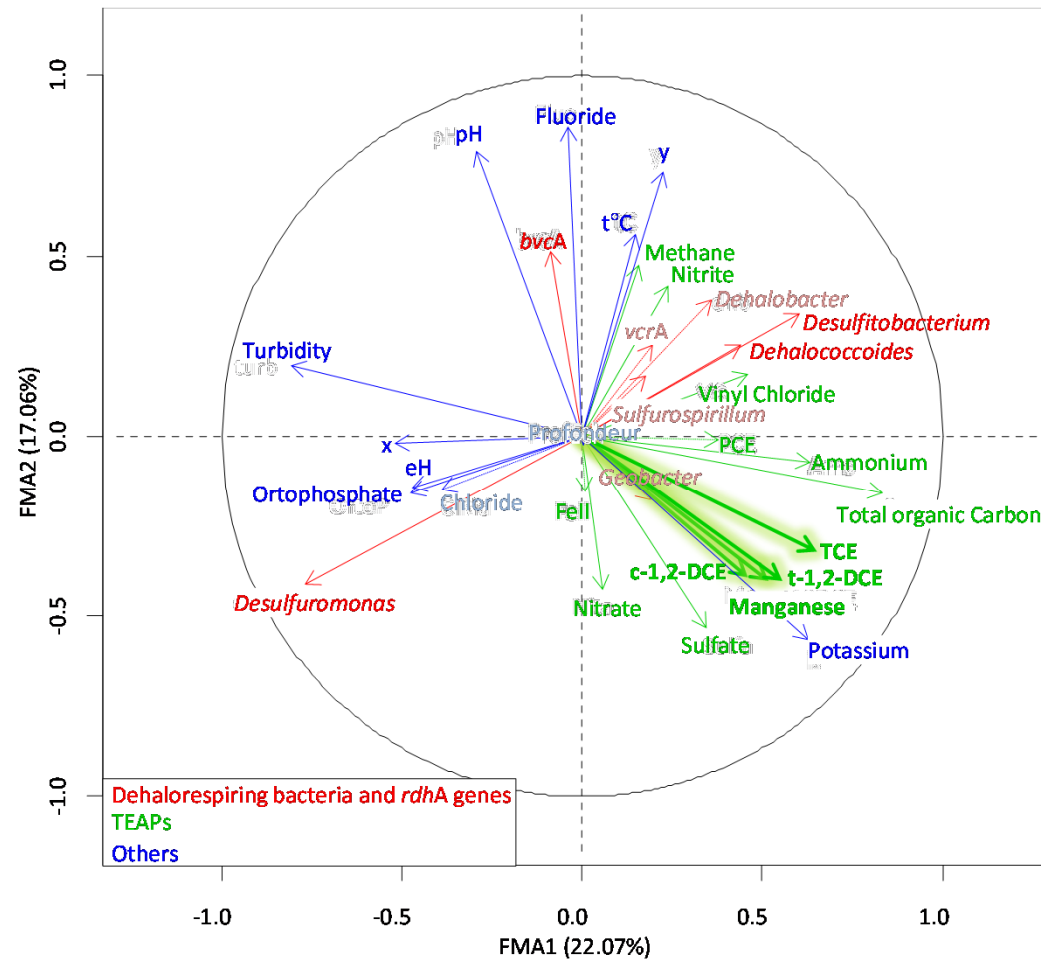
Bacteria/target genes	Primers	Primer sequences (5'-3')
<i>Dehalococcoides</i> sp.	DHC587f	GGACTAGAGTACAGCAGGAGAAAAC
	DHC1212r	GGATTAGCTCCAGTTCACACTG
<i>Dehalobacter</i> sp.	Dre441f	GTTAGGGAAGAACGGCATCTGT
	Dre645r	CCTCTCCTGTCCTCAAGCCATA
<i>Sulfurospirillum</i> sp.	DHSPM576f	GCTCTCGAAACTGGTTACCTA
	DHSPM1210r	GTATCGCGTCTCTTTGTCCTA
<i>Desulfuromonas</i> sp.	Desulfo494f	AGGAAGCACCGGCTAACTCC
	Desulfo1050r	CGATCCAGCCGAACTGACC
<i>Desulfitobacterium</i> sp.	Dsb406f	GTACGACGAAGGCCTTCGGGT
	De2r	CCTAGGTTTTACACCAGACTT
<i>vcrA</i>	vcrA880f	CCCTCCAGATGCTCCCTTTA
	vcrA1018r	ATCCCCTCTCCCGTGAACC
<i>bvcA</i>	bvcA227f	TGGGGACCTGTACCTGAAAA
	bvcA523r	CAAGACGCATTGTGGACATC

	<i>Dehalococcoides</i>	<i>Dehalobacter</i>	<i>Sulfurospirillum</i>	<i>Desulfuromonas</i>	<i>Desulfitobacterium</i>	<i>Geobacter</i>	<i>bvcA</i>	<i>vcrA</i>
MIP 01	-	-	-	+	+	-	-	-
MIP 02	+	-	+	+	+	-	-	-
MIP 03	-	-	-	+	+	+	-	-
MIP 04	-	-	-	+	-	-	+	-
MIP 05-1 (up)	+	+	-	-	+	-	-	-
MIP 05-2 (low)	+	+	-	+	+	+	+	+
MIP 06-2	-	-	-	+	+	-	-	-
MIP 07	-	-	-	+	+	+	-	-
MIP 08	-	-	-	+	-	-	-	-
MIP 10	-	-	-	+	+	+	-	-
MIP 11	-	-	-	+	+	-	-	+
MIP 20	-	-	-	-	+	-	-	-
PO1	-	-	-	+	+	-	-	+
PO2	-	-	-	+	+	-	-	-
PO3	-	-	-	-	+	-	-	-
PO4	-	-	-	+	-	-	-	-
PO5	-	-	-	+	-	-	-	-
PO6	+	-	+	+	+	-	-	+
PO7	-	-	-	+	+	-	+	+
PO8	-	+	-	+	+	-	-	-
PO10	-	-	-	+	-	-	-	-
PO11	-	-	-	+	-	-	-	-
S12099	-	-	-	+	-	-	-	-
S12512	-	-	-	+	+	-	-	-
S20	-	-	-	+	-	-	-	-

Ehemalige Deponie in der Nähe von Genf : Detektionsfrequenz der Biomarker



Ehemalige Deponie in der Nähe von Genf : Kompetition zwischen Mangan-reduzierenden Bakterien und OHRB, die Dichloroethen und Vinylchlorid dechlorieren ?



Schlussfolgerungen

- Die molekularen Analysen und Anreicherungskulturen in Mikrokosmen ermöglichen es, die Anwesenheit des biochemischen Potentials zu bestimmen.
- Die Analysen der mikrobiellen Ökologie des Grundwasserleiters ermöglichen es, die Funktionsweise des Ökosystems zu verstehen und die möglichen Ursachen einer inkompletten Dechlorierung zu identifizieren
- Die hier vorgeschlagene Methode, die auf einer detaillierten mikrobiologischen Studie des Grundwasserleiters basiert, ist ein vielversprechendes Werkzeug für die Formulierung einer Strategie für die Bioremediation von Chlorethenen

Dank

Zusammenarbeit:

- Noam Shani, Ex-Doktorand des LBE
- François Gillet, Université de Franche-Comté
- Simon Pinzelli, BG Consulting Engineers, Lausanne

Finanzierung:

- SNF
- BAFU
- Technology Agency, Czech Republic