

Diss. ETH Nr. 13232

Factors Affecting Bacterial Transport and Substrate Mass Transfer in Model Aquifers

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by
STEFANO FEDERICO SIMONI
Dipl. Natw. ETH
born on March 31, 1967
from Intragna (TI)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Alexander J. B. Zehnder, examiner
Dr. Tom N. P. Bosma, co-examiner
Prof. Dr. Hauke Harms, co-examiner
Prof. Dr. Herman P. van Leeuwen, co-examiner

Zürich, June 1999

Zusammenfassung

Schwer vorstellbar, wie in jauchegedüngten Äckern versickerndes Regenwasser zu Trinkwasser werden kann! Und doch sprudelt in vielen Haushalten eigentlich nichts anderes aus dem Wasserhahn, nämlich aus der Tiefe gepumptes Grundwasser. Möglich wird der ungetrübte Genuss einerseits durch die Filterwirkung des Untergrundes: Von der Oberfläche verschleppte Bakterien und eingetragene Schadstoffe bleiben an Ton, Sand und Kies haften. Andererseits werden zahlreiche Schadstoffe für die abgelagerten Bakterien zu Nährstoffen, aus deren Abbau sie neue Zellmasse aufbauen und dabei gleichzeitig Energie gewinnen.

Die vorliegende Doktorarbeit greift zwei Aspekte dieses Themenkreises heraus: Die Deposition von Bakterien auf Partikeloberflächen und die Behinderung des Schadstoffabbaus durch langsamen Massentransfer. Zu beiden Aspekten haben wir Experimente in kleinen, mit Sand oder Glaskügelchen gepackten Säulen durchgeführt. Mit Hilfe dieser einfachen Modellsysteme für einen natürlichen Grundwasserleiter haben wir versucht, eine Brücke zu schlagen zwischen grundlegenden physikalisch-chemischen Phänomenen - wie etwa den Fick'schen Gesetzen der Diffusion - und den direkt beobachtbaren makroskopischen Prozessen.

Die ersten zwei Kapitel der Dissertation befassen sich mit der Deposition von Bakterien auf Partikeln. Bei Vorversuchen mit dem Stamm *Pseudomonas* sp. B13 und quarzsandgefüllten Säulen sind wir auf ein interessantes Phänomen gestossen: Für diese Zellen hatten die Gesetze der Kolloidfiltration scheinbar keine Gültigkeit, konnten wir doch keine exponentielle Abnahme der Zelldichte mit der Filterstrecke beobachten. Nur ein Teil der Zellen wurde in der Säule zurückgehalten, während die im Ausfluss erscheinenden Zellen auch eine zweite Säule beinahe vollständig passierten. Als Ausweg bot sich an, das Filtrationsgesetz in einer allgemeineren Form für zwei Subpopulationen mit zwei verschiedenen Filtrationskoeffizienten zu formulieren. Die Depositionseigenschaften der Zellen waren nicht vererblich, und leider sind Versuche, sie auf messbare Unterschiede in deren Oberflächenstruktur zurückzuführen, bis anhin gescheitert.

Für die haftende Subpopulation haben wir eine mechanistische Vorstellung des Depositionsvorganges entwickelt. Dabei wird der Interaktionsenergie zwischen Bakterien und Sandkörnern eine erweiterte DLVO-Theorie der Kolloidstabilität zu Grunde gelegt. Der Anteil der haftenden Zellen lässt sich dann mit der Lage des sekundären Minimums der Energiekurve in Beziehung setzen, während der Filtrationskoeffizient von dessen Tiefe abzuhängen scheint. Da die Interaktionsenergie stark von den elektrostatischen Kräften abhängt, erklärt dies auch, weshalb sich die Deposition sowohl mit der Ionenstärke als auch mit dem Typ der gelösten Kationen verändert. Bei der dauerhaften Verankerung der Zellen auf den Sandkörnern kommt zudem vermutlich den langen Polysaccharidketten auf der Zelloberfläche eine entscheidende Bedeutung zu.

Da sich Stamm B13 dafür nur bedingt als geeignet erwies, haben wir eine allfällige Massentransferlimitation des Schadstoffabbaus am Beispiel der Umsetzung von 4-Nitroanisol durch *Rhodococcus opacus* Stamm AS2 untersucht. Massentransferlimitation stellt sich ein, wenn sich um die aktiven Zellen eine an Nährstoffen verarmte Zone ausbildet, die durch Diffusion aus dem umgebenden Medium nicht rasch genug aufgefüllt werden kann. In der Tat lag die Abbauleistung von in Säulen immobilisierten Bakterien immer erheblich unter den auf Batch-Versuchen beruhenden Vorhersagen. Aus solchen Experimenten haben wir sogenannte Massentransferkoeffizienten abgeleitet, die ein Mass für die Geschwindigkeit des Massentransfers darstellen. Auf eine einzelne Zelle bezogen blieb der Massentransfer bei Veränderung der Zelldichte annähernd unverändert und entsprach in etwa den theoretischen Voraussagen. Entgegen den Erwartungen schienen aber grössere Korndurchmesser den Massentransfer zu steigern. Dies ist vermutlich auf den verkleinerten Einfluss der Heterogenität der Konzentrationsverteilung in den Poren des Säulenmaterials zurückzuführen.

Aus den vorgestellten Befunden ergeben sich für die Praxis zwei Folgerungen: (i) Wenn nach einer bestimmten Filtrationsstrecke nur noch der Anteil der praktisch nicht haftenden Bakterien weiter transportiert wird, so darf der scheinbare Filtrationskoeffizient einer Bakterienpopulation nicht als Konstante betrachtet werden. Dies erschwert eine Voraussage der Transportdistanzen beträchtlich. (ii) Wie ein Vergleich mit anderen Kombinationen von Bakterien und Nährstoffen zeigt, ist Massentransferlimitierung zudem vermutlich recht weit verbreitet. Sie könnte deshalb die Ursache dafür sein, dass in Grundwasserleitern oft eine Abbaukinetik erster Ordnung bezüglich der Substratkonzentration beobachtet wird, bei der im Gegensatz zum *Michaelis-Menten* Ansatz bei höheren Konzentrationen keine Sättigung eintritt.

Summary

It is hard to understand how rainwater infiltrating into manure-amended fields may end up as drinking water! And yet that is exactly what many households consume when they fill their glasses with sparkling water from the tap. The beneficial fact that groundwater is a convenient source for drinking water is due to natural filtering in the subsurface, where entrained bacteria and pollutants stick to clays, sand, and gravel. Furthermore, many pollutants even serve as nutrients for attached bacteria, which degrade them to obtain building blocks and to produce energy at the same time.

This thesis concentrates on two aspects of this issue: The deposition of bacteria on particle surfaces and the limitation of pollutant degradation by slow mass transfer. To study the two topics, we used small-scale columns filled with quartz sand or glass beads. This simple model for a groundwater aquifer should enable us to relate macroscopic observations to basic physico-chemical phenomena like Ficks laws of diffusion for example.

The first two chapters of the thesis deal with the deposition of bacteria on particles. Preliminary experiments with *Pseudomonas* sp. strain B13 and columns filled with quartz sand revealed an interesting feature: The cell density did not decrease exponentially with the length of the filtration path, thus violating basic principles of colloid filtration theory. Only a fraction of the cells was retained in the columns, whereas the cells appearing in the column-outlet easily passed a second column. We found a way out by formulating the filtration law in a more general way where different filtration coefficients could be ascribed to two subpopulations. The different adhesion behavior of the cells was not found to be inheritable, and attempts to relate them to distinctly measurable surface properties have not been successful to date.

As far as the well-adhering subpopulation is concerned, we developed a mechanistic concept of the adhesion process. It relies on estimates of the interaction energy between a cell and the grain surface which are derived from an extended DLVO-theory of colloid stability. According to our concept, the fraction of well adhering cells depends on the position of the secondary minimum in the energy interaction curve while the filtration coefficient varies with its depth. This would explain why deposition was more efficient with increasing ionic strength and depended on the cation type in solution. The durable anchoring of the cells on the sand grains seems to be possible only with the help of the long polysaccharide chains on the cell surface.

Strain B13 proved to be difficult to investigate a tentative mass transfer limitation to biodegradation, and thus we decided to use *Rhodococcus opacus* strain AS2 degrading 4-nitroanisole instead. Mass transfer limitation occurs if a depleted zone forms around active cells because diffusion from the bulk medium is too slow to compensate for substrate consumption. As a matter of fact, we always found degradation rates by cells immobilized in a column to remain substantially below the predictions based on batch ex-

periments. From these experiments, we derived so-called mass transfer coefficients, which serve as a measure for the velocity of the mass transfer process. We found mass transfer to a single cell to remain almost constant upon variation of the cell density. Furthermore, experimental values agreed quite well with theoretical predictions. In contrast to expectations, however, bigger beads seemed to enhance mass transfer, a finding which is most likely due to the reduced influence of pore-scale heterogeneity in substrate concentrations.

From the findings presented, we may draw two conclusions of practical relevance: (i) If only cells which adhere very poorly remain suspended after a certain flow path, the filtration coefficient for a population may not be assumed to remain constant over time. This obviously makes predictions about the transport distances to be expected very difficult. (ii) There is increasing evidence from different bacteria/substrate combinations that mass transfer limitation is quite widely-spread. This might explain why degradation kinetics in the field often are first order in substrate concentration and hardly show the saturation expected from the *Michaelis-Menten* approach.