

**Mikrobiologischer Einfluß auf die Mobilisierung von Arsen in  
Aquiferen des Nadia-Distrikts, West-Bengalen, Indien**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

von der Fakultät für Bauingenieur-, Geo- und Umweltwissenschaften

des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

**M. Sc. Dominik Freikowski**

geboren in Freiburg i. Br.

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2013

Referent: Prof. Dr. rer. nat. habil. J. Winter

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. habil. C. Gallert

Karlsruhe 2013

### Anschrift des Autors

Dominik Freikowski

Institut für Ingenieurbiologie und Biotechnologie des Abwassers

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Am Fasanengarten – Geb. 50.31

76131 Karlsruhe

Email: D.Freikowski@uags.de

### Erklärung des Autors:

Hiermit erkläre ich, diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen verwendet zu haben. Die dargestellten Ergebnisse beruhen auf den eigenständig durchgeführten bzw. betreuten Experimenten während meines Beschäftigungsverhältnisses am Institut für Ingenieurbiologie und Biotechnologie des Abwassers des KIT. Die aktuellen Grundsätze des KIT zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden bei der Erstellung der Dissertation beachtet.

Eine Vervielfältigung dieser Arbeit auf fotomechanischem Weg (z. B. Fotokopie) oder eine auszugsweise Wiedergabe für den eigenen Bedarf ist nur mit korrekter Quellenangabe gestattet.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Freikowski D, Winter J, Gallert C (2010) Hydrogen formation by an arsenate-reducing *Pseudomonas putida*, isolated from arsenic-contaminated groundwater in West Bengal, India. Appl Microbiol Biotechnol 88:1363-1371

Freikowski D, Neidhardt H, Winter J, Berner Z, Gallert C (2013) Effect of carbon sources and of sulfate on microbial arsenic mobilization in sediments of West-Bengal, India. Ecotoxicol Environ Saf 91:139-146

### Zusammenfassung

In der Bengalischen Delta Ebene (BDE) sind mehrere Millionen Menschen und Nutztiere erhöhten Arsengehalten in aus Grundwasser gewonnenem Trinkwasser ausgesetzt. Die Arsenbelastung des Trink- und Brauchwassers in dieser Region ist nicht anthropogen verursacht, sondern stammt aus den natürlich im Flussdelta abgelagerten arsenhaltigen Sedimenten. Die anhaltende Exposition mit As-belastetem Trinkwasser führt zu einer chronischen Arsenvergiftung (Arsenicosis), die mit der Zeit zu verschiedenen Formen von Krebs und zum Tod führen kann. Nach über zwanzigjähriger Forschung gelten die biogeochemische Mobilisierung durch Mikroorganismen, in Kombination mit hydrologischen Parametern, als Ursache für die Freisetzung des Arsens vom Sediment in das Grundwasser. Ziel dieser Studie ist die Aufklärung abiotischer und insbesondere biotischer Ursachen der Arsenmobilisierung am Beispiel von zwei Standorten mit unterschiedlichen hohen As-Gehalten im Grundwasser, aber mit nahezu identischen Gehalten in den Sedimenten.

Die Auswahl der Standorte erfolgte aufgrund einer Beprobungskampagne an mehreren Haushaltsbrunnen. Um anoxisches und frisches Wasser zu erhalten, wurden die Proben jeweils nach zehn-minütigem Pumpen genommen. Ein Satz von Proben wurde auf ihren Eisen-, Arsen- und DOC-Gehalt untersucht, ein zweiter auf die aerobe und anaerobe Gesamtkeimzahl, sowie auf coliforme Keime, bzw. *Escherichia coli*. In den einzelnen Brunnen konnte keine klare Beziehung zwischen dem Eisen-/Arsen-/DOC-Gehalt und den mikrobiologischen Parametern festgestellt werden, allerdings korrelierte ein niedriger Eisen- und Arsengehalt mit hohen DOC-Gehalten und umgekehrt. Alle Proben enthielten  $2,8 - 8,1 \times 10^3$  coliforme Keime/ml und  $0-2,4 \times 10^3$  *E. coli*/ml, was auf eine fäkale Kontamination der Brunnen hindeutete. Deshalb wurden zwei Standorte („Site A“ und „Site B“) rein aufgrund der unterschiedlichen DOC-, Eisen- und vor allem Arsenkonzentrationen ausgewählt. Am Standort „Site A“ betrug der Arsengehalt  $285 \mu\text{g/l}$  und am Standort „Site B“  $2,3 \mu\text{g/l}$  im Grundwasser.

Für einen ersten Nachweis, dass sich Mikroorganismen in den Sedimenten, bzw. Grundwasser befinden, die in der Lage sind, Arsen zu mobilisieren, wurden mit einer Grundwasserprobe aus einem Haushaltsbrunnen der „Site B“ Mikroorganismen angereichert und über mehrere Schritte isoliert. Eine 16S rRNA-Analyse ergab, dass es sich bei einem

## Zusammenfassung

---

Isolat um einen neuen *Pseudomonas putida*-Stamm handelte. *Pseudomonas putida* Stamm WB (West Bengal) wuchs anaerob auf Glucose, Lactat und Acetat nur in Anwesenheit von Arsenat, das zu Arsenit reduziert wurde. *P. putida* WB wuchs auf Glucose aufgrund der nicht-energiekonservierenden Arsenatreduktase *ArsC*, wobei die Energie ausschließlich über Substratkettenphosphorylierung gewonnen wurde. Zwei mol Acetat wurden gebildet und die Reduktionsäquivalente der Glykolyse und Pyruvat-Decarboxylierung wurden für die Arsenatreduktion verwendet oder als H<sub>2</sub> freigesetzt. Das anaerobe Wachstum auf Acetat und Lactat war aufgrund der respiratorischen *arrA*-Reduktase möglich, gekoppelt an respiratorische Elektronentransportketten zur Energiekonservierung. Bei Anwesenheit von Arsenat wurden beide Substrate vollständig zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> oxidiert, wobei ein Teil des H<sub>2</sub> für die respiratorische Arsenatreduktion verwendet wurde, um Energie für das Wachstum zu erhalten. Der Wachstumsertrag für den anaeroben Abbau von Glucose zu Acetat war  $Y_{\text{Glucose}} = 20 \text{ g/mol}$ , was zu einem Energiekoeffizienten  $Y_{\text{ATP}} = 10 \text{ g/mol}$  führte, wenn der Emden-Meyerhof-Parnas-Stoffwechselweg, mit der Bildung von 2 mol ATP/mol Glucose durch Substratkettenphosphorylierung, verwendet wurde. Während des Wachstums auf Lactat und Acetat war keine Substratkettenphosphorylierung möglich. Der Energiegewinn während der Reduktion von Arsenat betrug  $Y_{\text{Arsenat}} = 6,9 \text{ g/mol}$ , was etwas weniger als ein ATP/mol Arsenat wäre.

Zum direkten Nachweis der Arsenmobilisierung in den Sedimenten wurde die (mikrobielle) Freisetzung mittels anaerober Up-Flow Batch-Bed-Säulenexperimente simuliert. Zum Erhalt von unkontaminiertem Sediment wurde an den beiden Untersuchungsstandorten Site A/Site B Schlagbohrungen ohne Einsatz von Bohrflüssigkeit durchgeführt. Die Sedimentproben wurden aus einer Tiefe von 8 – 12 m in zuvor sterilisierte und gasdichte Plastikrohre genommen, die direkt nach der Probenahme mit Stickstoff geflutet und luftdicht verschlossen wurden. Es wurden jeweils 200 g der Sedimentproben für Säulenversuche eingesetzt, die mit einem Mangelmedium ± Kohlenstoffquelle ± Sulfat ± *P. putida* WB über 110 Tage betrieben wurden. Als Kohlenstoffquellen dienten entweder Lactat, Ethanol oder Saccharose, als Kontrolle diente ein steriler Ansatz ohne Kohlenstoffquelle. Mit Lactat oder Ethanol und Sulfat konnte eine schnelle Mobilisierung von Arsen beobachtet werden, mit einer maximalen Konzentration von 160 µg/l im Ausfluss. In den Ansätzen ohne Sulfat wurde eine maximale Konzentration von 120 µg/l As gemessen. In Abwesenheit von Sulfat wurden ~ 15 % des im Sediment enthaltenen Arsens (2,1 mg/kg von Site A und 1,7 mg/kg von Site B)

## Zusammenfassung

---

mobilisiert, während mit Sulfat ~ 30 % As mobilisiert wurden. Saccharose erwies sich als weniger geeignete Kohlenstoffquelle, da erst nach einer Retentionszeit von 30 – 40 Tagen, im Vergleich zu den Ansätzen mit Lactat und Ethanol, Arsen freigesetzt wurde. Auch wurde nur ca. jeweils die Hälfte an Arsen in den Ansätzen ± Sulfat mobilisiert. *P. putida* WB hatte in allen Versuchen keinen positiven Einfluss auf die Mobilisierung. Allerdings konnte in allen Sedimenten nach den Experimenten eine Zunahme der Gesamtkeimzahl (GKZ/g Sediment) von ~  $10^4$  auf  $10^8 - 10^9$  beobachtet werden. In den sterilen Ansätzen betrug die GKZ/g ~  $6 \times 10^2$ . In den Ausläufen von Sedimenten der Site A plus Ethanol konnte keine Korrelation der Arsenmobilisierung mit Eisen und Mangan festgestellt werden, während in den Ansätzen mit Site B-Sedimenten plus Ethanol und ohne Sulfat eine gute Korrelation von 0,47 – 0,66 berechnet werden konnte. Diese Versuche wurden in einem Feldversuch, bei dem 2 bzw. 4 kg Saccharose in zuvor installierte Brunnen injiziert wurden und vergleichbare Ergebnisse erzielt wurden (Neidhardt, 2012), validiert. In diesem Versuch wurde die Saccharose äquivalent zu den entsprechenden Gärprodukten abgebaut unter Freisetzung von bis zu 200  $\mu\text{g/l As}^{3+}$  und 90  $\text{mg/l Fe}^{2+}$ . Die GKZ/ml stieg auf ~  $10^{11}$ , bzw. ~  $10^6$  Coliforme und *E.coli*.

### Abstract

In the Bengal Delta Plain (BDP) several million people and farm animals are exposed to groundwater extracted drinking-water with an increased content of arsenic. In this region the source of arsenic in drinking-water is not anthropogenic, but the arsenic is naturally deposited with sediments in the river delta. The permanent exposure to contaminated drinking-water leads to chronic arsenic poisoning (Arsenicosis) which may lead to several forms of cancer and death after prolonged exposure. After more than twenty years of research, biogeochemical mobilization of As in combination with hydrological parameters is considered as the cause of release of arsenic from sediments into groundwater. The aim of this study was to investigate mobilization of arsenic at two study sites in the Bengal Delta Plain with different As-contents in groundwater but nearly the same As-contents in the sediments.

The selection of the study sites was based on a sampling campaign at several household wells. In order to obtain fresh and anoxic water, samples were taken after ten minutes of pumping. One set of samples were analyzed for its iron, DOC and arsenic content, a second one for its aerobic and anaerobic bioburden, coliforms and *Escherichia coli*, respectively. In the different wells, no clear relation between iron/arsenic/DOC contents and microbial parameters was observed, but a low iron and arsenic content correlated with high DOC levels and vice versa. All samples contained  $2.8 - 8.1 \times 10^3$  coliforms/ml and  $0 - 2.4 \times 10^3$  *E. coli*/ml, indicating a faecal contamination of the wells. Therefore two study sites ("Site A" and "Site B") were selected according to their different DOC, iron and particularly arsenic content. At Site A the arsenic content was 285 µg/l and at Site B it was 2.3 µg/l.

For a first proof that the microorganisms in the sediments and groundwater, respectively, were able to mobilize arsenic, microorganisms were enriched and isolated over several steps from a groundwater sample of a household well at Site B. The 16S rRNA analysis of an isolate showed, that it was a new *Pseudomonas putida* strain, named "WB" (= West Bengal). Anaerobic growth of the strain on glucose was made possible presumably by the non-energy-conserving arsenatereductase *ArsC* with energy derived only from substrate level phosphorylation. Two moles of acetate were generated intermediary and the reducing equivalents of glycolysis and pyruvate decarboxylation served for arsenate reduction or

## Abstract

---

were released as H<sub>2</sub>. Anaerobic growth on acetate and lactate was apparently made possible by the arsenate reductase *arrA* coupled to respiratory electron chain energy conservation. In the presence of arsenate, both substrates were totally oxidized to CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> with a part of the H<sub>2</sub> serving for respiratory arsenate reduction to deliver energy for growth. The growth yield for anaerobic glucose degradation to acetate was  $Y_{\text{Glucose}} = 20$  g/mol, leading to an energy coefficient of  $Y_{\text{ATP}} = 10$  g/mol, if the Emden-Meyerhof-Parnas pathway with generation of 2 mol ATP/mol glucose was used. During growth on lactate and acetate no substrate chain phosphorylation was possible. The energy gain from reduction of arsenate was  $Y_{\text{Arsenate}} = 6.9$  g/mol, which would be enough for little less than one ATP/mol of arsenate.

For a direct verification of arsenic mobilization in sediments, (microbial) As release in anaerobic operated up-flow batch bed sediment columns was investigated. To obtain uncontaminated sediments, drilling cores were carried out by hammering the core catcher without drilling fluids at both sites A and B. The sediment samples taken from a depth of 9 - 12 m were transferred into pre-sterilized gas-tight plastic tubes, which were immediately flushed with pure nitrogen after sampling and sealed air-tight. 200 g of sediment samples were used for column experiments. Columns were operated over a period of 110 days with a mineral medium ± carbon source ± sulfate ± *P. putida* WB. Tested carbon-sources were lactate, ethanol or sucrose, as a control a sterile sediment sample without a carbon source was run. With lactate or ethanol and sulfate, a rapid mobilization of As could be observed, with a maximum concentration of 160 µg/l As in the effluent. In assays without sulfate a maximum concentration of 120 µg/l As was measured. In the absence of sulfate ~ 15 % of the arsenic from the sediments (2.1 mg/kg at Site A and 1.7 mg/kg at Site B) were mobilized, while with sulfate ~ 30 % As were mobilized. Sucrose was a less suitable carbon source, since arsenic was only released after a retention time of 30 – 40 days in comparison to the experiments with lactate or ethanol. Only about 50 % of arsenic was mobilized in assays ± sulfate. *P. putida* WB had no positive influence in all experiments. However, in all experiments the total cell count (cfu/g sediment) increased from ~ 10<sup>4</sup> to ~ 10<sup>8</sup> – 10<sup>9</sup> after the experiments. In sterile attempts cfu/g was ~ 6 x 10<sup>2</sup>. In effluents of sediments from Site A and ethanol no correlation of arsenic mobilization with iron and manganese was found, while in assays with Site B sediments with ethanol and without sulfate a good correlation of 0.47 – 0.66 was calculated. The experiments were validated in a field-research were 2 and 4 kg, respectively, of sucrose were injected into wells which were installed before and



## Abstract

---

comparable findings were achieved (Neidhardt, 2012). In this experiment sucrose was removed equivalently to the appropriate fermentation products with liberation of 200  $\mu\text{g/l}$   $\text{As}^{3+}$  and 90  $\text{mg/l}$   $\text{Fe}^{2+}$ . Cfu/ml rose up to  $\sim 10^{11}$  and  $\sim 10^6$  coliforms and *E. coli*, respectively.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>XI</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>XVI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>I. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1. Hintergrund.....	1
2. Chemie des Arsens.....	4
2.1. Anorganische Arsen-Spezies.....	5
2.1.1. Transformationen von $\text{As}^{3+}$ und $\text{As}^{5+}$ .....	7
2.1.2 Mikrobielle Transformation anorganischen Arsens.....	8
2.2.2 Freisetzung von Arsen durch Reduktion von Eisen.....	11
2.2.3 Einfluss des organischen Materials.....	12
2.2.4 Vergleich von biotischer und abiotischer Mobilisierung von Arsen.....	13
3. Ziel der Studie.....	15

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>II. Materialien und Methoden.....</b>	<b>16</b>
1. Materialien.....	16
1.1 Chemikalien und Biochemikalien.....	16
1.2 Gase.....	16
1.3 Bakterienstämme.....	16
2. Methoden.....	16
2.1 Untersuchungsgebiet.....	16
2.2 Screening von Wasserproben zur Ermittlung der Untersuchungsgebiete.....	17
2.3 Anreicherung und Isolation von Reinkulturen.....	19
2.3.1 Probenahme.....	19
2.3.2 Anreicherung und Isolation.....	20
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	21
2.4.1 Isolierung der DNS.....	21
2.4.2 Identifikation des Isolates.....	23
2.4.3 Identifikation der <i>ArsC</i> - und <i>arrA</i> -Gene.....	25
2.5. Nachweis organischer Substanzen.....	26
2.5.1 DOC.....	26
2.5.2 Glucose.....	27
2.5.3 Lactat.....	27
2.5.5 Saccharose.....	28

## Inhaltsverzeichnis

---

2.5.6 Fettsäuren.....	28
2.6 Nachweis anorganischer Substanzen.....	29
2.6.1 Wasserstoff.....	29
2.6.2 Arsen.....	29
2.6.2.1 Arsenat und Arsenit in Experimenten mit Reinkultur, Sulfat aus Säulenabläufen .....	29
2.6.2.2 Arsen in Ausläufen aus Säulen-Experimenten.....	30
2.6.3 Eisen und Mangan.....	31
2.7 Erhalt von Bohrkernen und Bestimmung diverser Bodenparameter.....	31
2.7.1 Erhalt von Bohrkernen.....	31
2.7.2 Bestimmung von diversen Bodenparametern.....	33
2.8 Säulenexperimente.....	34
2.9 Feldversuch.....	38
<b>III. Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
1. Experimente mit der isolierten Reinkultur aus Grundwasserproben.....	40
1.1 Klassifizierung des Isolates „WB“ als <i>Pseudomonas putida</i> WB.....	40
1.2 Physiologische Parameter.....	41
1.2.1 Anaerobes Wachstum von <i>P. putida</i> WB mit Glucose.....	42
1.2.2 Anaerobes Wachstum von <i>P. putida</i> WB mit Lactat .....	45

## Inhaltsverzeichnis

---

1.2.3 Aerobes Wachstum von <i>P. putida</i> WB mit Glucose.....	46
1.2.4 Nachweis der <i>ArsC</i> - und <i>arrA</i> -Gene.....	48
2. Säulenexperimente.....	49
2.1 Gehalte an Fe, As, DOC und Bakterien in Grundwasserproben aus dem Untersuchungsgebiet.....	49
2.2 Effekt von Lactat, Ethanol, Sulfat und <i>P. putida</i> WB auf die Freisetzung von Arsen.....	51
2.2.1 Säulenexperimente mit Lactat als einziger Kohlenstoffquelle.....	51
2.2.2 Säulenexperimente mit Ethanol als einziger Kohlenstoffquelle.....	53
2.2.3 Säulenexperimente mit Saccharose als einziger Kohlenstoffquelle.....	55
2.2.4 Gesamtkeimzahl in den Sedimenten.....	56
3. Feldversuch.....	57
<b>IV. Diskussion.....</b>	<b>59</b>
<b>V. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>68</b>
<b>VI. Danksagung.....</b>	<b>85</b>
<b>VII. Anhang.....</b>	<b>86</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Weltweite Verteilung von mit Arsen kontaminierten Regionen (Garelick und Jones, 2008). Neben den As-Quellen ist die Anzahl der Menschen, die einer Gefährdung chronischer Arsenexposition ausgesetzt sind, dargestellt. ....	1
Abb. 2: Typisches Eh/pH-Stabilitätsdiagramm für aquatische As-Spezies bei 25 °C und 0,1 MPa (Lu und Zhu, 2011). Die Festphase von Arsen ist grau unterlegt. ....	6
Abb. 3 Speziation von $\text{As}^{5+}$ (a) und $\text{As}^{3+}$ (b) als Funktion von pH bei einer Ionenstärke von 0,01 M (Smedley und Kinniburgh, 2002). ....	7
Abb. 4: Übersicht über unterschiedliche mikrobielle Umsetzungen von Arsen (Páez-Espino, 2009). 1: Aufnahme von Arsenat mittels Phosphattransporter, bzw. Arsenit mittels Aquaglyceroporinen, 2: Reduktion von Arsenat zu Arsenit durch <i>ArsC</i> und Ausschleusung durch den spezifischen Arsenittransporter <i>ArsB</i> , 3: Detoxifikation von Arsenit durch Komplexbildung mit an Cys-reichen Peptiden, 4: Oxidation von Arsenit mittels <i>aso/aox</i> -Enzymen, 5: Respiration von Arsenat mittels <i>arrA</i> , 6: Methylierung von anorganischem Arsen zu organischem und anschließende Ausschleusung. ....	9
Abb. 5: Freisetzung von As durch (mikrobielle) Reduktion von Eisen (Herbel und Fendorf, 2006). $\text{Fe}^{3+}$ und $\text{As}^{5+}$ können mikrobiell reduziert werden, was zur Freisetzung von $\text{Fe}^{2+}$ und $\text{As}^{3+}$ in Grundwasser führt. (Re-) Adsorption und das Ausfallen von sekundären Mineralphasen können einen Einfluss auf die As-Mobilisierung haben. ....	11
Abb. 6: Untersuchungsgebiet. Nach einem Screening von Wasserproben aus Haushaltsbrunnen auf As-, Fe-, DOC-Gehalt, sowie der Untersuchung mikrobiologischer Parameter, wurden aufgrund des Fe- und As-Gehaltes die Brunnen Nr. 125 („Site B“; 2,3 µg/l As) und Nr. 132 („Site A“; 285 µg/l As) als Untersuchungsstandorte ausgewählt. ....	17

## Abbildungsverzeichnis

---

- Abb. 7: Schlagbohrung zum Erhalt von Sedimentproben. Das Bohrgestänge mit den enthaltenen PVC-Röhren wurde mittels eines Gewichts (ca. 50 kg), das auf ein Gegengewicht am oberen Ende des Bohrgestänges geschlagen wurde, bis zu einer Tiefe von 12 m getrieben. .... 32
- Abb. 8: Bohrgestänge mit enthaltener PVC-Röhre. Die PVC-Röhre wurde vor der Probenahme sterilisiert und unmittelbar nach der Entnahme mit N<sub>2</sub> begast, mit Plastikkappen verschlossen und versiegelt. .... 32
- Abb. 9: Schematischer Aufbau des Säulenexperiments. Die Säulen, das Medium-Reservoir, sowie die Leitungen wurden vor Start des Experiments autoklaviert (120 °C, 60 min.) und mit Gummistopfen versiegelt, um das Eindringen von Umgebungsluft zu verhindern. .... 34
- Abb. 10: Schematische Anordnung der Wells A-E und zirkuläres Pumpschemata für die Saccharoseinjektion (Neidhardt, 2012). Das zirkuläre Pumpen wurde jeweils für Well B-E durchgeführt. .... 39
- Abb. 11: Qualitativer Nachweis von Saccharose nach Whitehead und Bradbury (1950). Unter alkalischen Bedingungen wird in Anwesenheit von Saccharose mit Co(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ein Co-Saccharose-Komplex gebildet, der als blauer Niederschlag ausfällt. .... 39
- Abb. 12 a,b,c: Anaerobes Wachstum auf Glucose (Rauten) und Acetat (Quader) (a), sowie Glucose- (b) und Acetat- (c) Metabolismus von *P. putida* WB mit Arsenat. Arsenat wurde zu Arsenit reduziert, während der Oxidation von Glucose zu Acetat, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>. Acetat aus Glucose (b) oder externer Quelle (c) konnte nur in Anwesenheit von Arsenat zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> oxidiert werden. CO<sub>2</sub> wurde nicht quantifiziert. .... 44
- Abb. 13 a,b: Anaerobes Wachstum auf Lactat (a), sowie Lactat-Metabolismus (b) von *P. putida* WB mit Arsenat. Arsenat wurde nach 60 Stunden nachgeimpft. Das L-Lactat wurde stöchiometrisch zu Acetat decarboxyliert. Acetat wurde weiter zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> oxidiert, solange Arsenat als Elektronenakzeptor vorlag. .... 45
- Abb. 14 a,b: Aerobes Wachstum von *P. putida* WB (a) und Glucose-Metabolismus mit Arsenit als Elektronenakzeptor (b). .... 47

## Abbildungsverzeichnis

---

- Abb. 15: Agarose-Gele mit den PCR-Produkten der *ArsC*- und *arrA*-Gene von *P. putida* WB und den Referenzstämmen. Bahn 1: DNA-Marker; 2: steriles deionisiertes Wasser; 3: *D. auripigmenti*; 4: *P. putida* DSM 291; 5: *P. putida* WB ..... 48
- Abb. 16: Typischer Brunnen zur Probenahme. Die erhaltenen Proben wurden auf ihren Eisen-, Arsen und DOC-Gehalt untersucht. Zusätzlich wurden mikrobiologische Parameter bestimmt. .... 49
- Abb. 17 a-d: Kumulative Arsen-Freisetzung und tägliche Arsenkonzentrationen in Elauten aus den Ansätzen mit Sedimenten der Site A (initial 2,1 mg As/kg) und Site B (initial 1,7 mg As/kg; Freikowski et al., 2013). Lactat diente als einzige Kohlenstoffquelle ± Sulfat ± *Pseudomonas putida* WB. .... 52
- Abb. 18 a-h: Kumulative Arsen-Freisetzung und tägliche Arsenkonzentrationen, sowie von Eisen und Mangan in Eluaten aus den Ansätzen mit Sedimenten von Site A und B (Freikowski et al., 2013). Ethanol diente als einzige Kohlenstoffquelle ± Sulfat ± *Pseudomonas putida* WB. .... 54
- Abb. 19 a-d: Kumulative Arsen-Freisetzung und tägliche Arsenkonzentrationen, sowie von Eisen und Mangan in Eluaten aus den Ansätzen mit Sedimenten von Site A und B (Freikowski et al., 2013). Saccharose diente als einzige Kohlenstoffquelle ± Sulfat. .... 55
- Abb. 20 a-d: Saccharose mit gebildeten Gärprodukten (Neidhardt, 2012, verändert). a: Saccharose, b: Acetat, c: Propionat, d: Butyrat. .... 57
- Abb. 21 a-d: Freigesetztes Arsen und Eisen (Neidhardt, 2012, verändert). a: As total, b: As<sup>3+</sup>, c: Fe total, d: Fe<sup>2+</sup>. .... 58
- Abb. 22 a-c: Mikrobielle Parameter (Neidhardt, 2012, verändert). a: Gesamtkeimzahl, b: Coliforme Keime, c: *E. coli*. .... 58
- Abb. 23: Massen- und Energiebilanz für den anaeroben Abbau von Glucose, Lactat und Acetat mit Arsenat als Elektronenakzeptor durch *Pseudomonas putida* WB. Lactat scheint via Pyruvat abgebaut zu werden. .... 62



## Abbildungsverzeichnis

---

Abb. 24: Korrelation in den verschiedenen Wells (A-E) zwischen Arsen und Eisen nach Injektion von Saccharose (Neidhardt, 2012, verändert). In allen Wells konnte keine positive Korrelation von As/Fe festgestellt werden. .... 67

### Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Ausgewählte physikalisch-chemische Eigenschaften von Arsen (Falbe, 1996). Die physikalischen Daten sind auf $\alpha$ -Arsen bezogen, die atomaren Daten auf Arsenatome. ....	5
Tab. 2: Wichtige chemische Gleichgewichtsreaktionen und thermodynamische Konstanten für die Speziesverteilung von $As^{5+}/As^{3+}$ in Böden und Grundwasser (Saqid, 1997; Inskeep et al., 2002). ....	6
Tab. 3: DEV-Nähragar .....	18
Tab. 4: Endo-Agar (Endo, 1904) .....	19
Tab. 5: R2A-Medium (Reasoner und Geldreich, 1985; abgeändert) .....	20
Tab. 6: Mangelmedium zur Untersuchung des As-Umsatzes. Kohlenstoffquellen wurden zusätzlich zugesetzt und variieren in den einzelnen Experimenten. ....	21
Tab. 7: Stammlösungen (steril) zur DNS-Isolation nach Murray und Thompson (1980) .....	22
Tab. 8: 5 x TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE; Peacock und Dingman, 1968).....	23
Tab. 9: PCR-Ansatz zum Amplifizieren der isolierten 16S rRNA .....	25
Tab. 10: PCR-Ansatz zum Amplifizieren des <i>ArsC</i> -Genes .....	25
Tab. 11: Reagenz zum Nachweis von Glucose nach Miller (1959) .....	27
Tab. 12: Mikrowellen-Programm zum Säure-Aufschluss der Sedimentproben .....	34
Tab. 13: Grundmedium (SSC) nach Angle et al. (1991) zur Beschickung der Säulen (verändert). Das Medium entspricht einer typischen Grundwasserzusammensetzung. Kohlenstoffquellen wurden zusätzlich zugesetzt und variieren in den einzelnen Säulenexperimenten. ....	35

## Tabellenverzeichnis

---

Tab. 14: Spurenelementlösung (1000x) nach Rabus und Widdel (1995), verändert. Nach Lösen der Salze wurde der pH-Wert auf 6,5 eingestellt. Auf FeSO <sub>4</sub> sowie EDTA als dessen Chelator wurde verzichtet. ....	36
Tab. 15: Vitaminlösung VL 7 (1000x) nach Pfennig (1978). Die Lösung wurde bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert. ....	36
Tab. 16: Übersicht über die Säulenexperimente. Die Verschiedenen Säulen wurden mit SSC-Medium ± Kohlenstoffquelle und ± Sulfat beschickt. Die Abkürzungen ergeben sich aus dem Untersuchungsgebiet (A = Site A, B = Site B) und der C-Quelle (L = Lactat, E = Ethanol, S = Saccharose). ....	38
Tab. 17: Ergebnis des Abgleich der NCBI-Datenbank mittels BLAST (Altschul et al., 1990) zum Vergleich der 16S rRNA-Sequenz des Isolates <i>Pseudomonas putida</i> WB (Inventar-Nr. FN686776) mit anderen 16S rRNA-Sequenzen verschiedener <i>P. putida</i> -Stämme. ....	41
Tab. 18: Fe-, As-, DOC-Gehalte, sowie mikrobiologische Parameter in 11 Grundwasserproben aus dem Untersuchungsgebiet. Die Proben Nr. 125 und 132 wurden für die Bohrungen zum Erhalt von Sedimentkernen für die Säulenversuche herangezogen. ....	50
Tab. 19: Gesamtkeimzahl (GKZ/g) vor und nach den Säulenexperimenten unter verschiedenen Bedingungen. Die Gesamtkeimzahl stieg in allen Ansätzen, mit Ausnahme der Kontrollen, signifikant. A/B = Site A/B-Sedimente; AL/BL = Ansätze mit Lactat als Kohlenstoffquelle; AE/BE = Ansätze mit Ethanol als Kohlenstoffquelle; BS = Site B-Sedimente mit Saccharose als Kohlenstoffquelle; AEC/BEC = Kontrollansätze ohne Kohlenstoffquelle. ....	56

### Abkürzungsverzeichnis

°C .....	Grad Celcius
$\alpha$ .....	Alpha
$\gamma$ .....	Gamma
$\lambda$ .....	Wellenlänge (Lambda)
$\mu$ .....	micro
Abb. ....	Abbildung
As .....	Arsen
ATP .....	Adenosintriphosphat
BDE .....	Bengalische Delta Ebene
BGS .....	British Geological Survey
BLAST .....	Basic Local Alignment Tool
BMZ .....	Bundesministerium für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
Bp .....	Basenpaare
bzw. ....	beziehungsweise
ca. ....	circa
C-Quelle .....	Kohlenstoffquelle
Cys .....	Cystein
DARP .....	Dissimilatorische Arsenat Respirierende Prokaryoten

## Abkürzungsverzeichnis

---

DFG .....	Deutsche Forschungsgesellschaft
DOC .....	Dissolved Organic Carbon
DNS .....	Desoxyribonukleinsäure
dNTP .....	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPHE .....	Department of Public Health Engineering
DSMZ .....	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
<i>E. coli</i> .....	<i>Escherichia coli</i>
EDTA .....	Ethylendiamintetraessigsäure
Eh .....	Redox-Potential
ELD .....	Elektrodenlose Entladungslampe
et al. ....	und weitere
Fe .....	Eisen
FIAAS .....	Flow Injection Atomic Absorption Spectrometry
FID .....	Flammenionisationsdetektor
g .....	Gramm
<i>g</i> .....	Gravitation
GKZ .....	Gesamtkeimzahl
Glu .....	Glutaminsäure
IC .....	Ion Chromatography
ICP-OES .....	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry

## Abkürzungsverzeichnis

---

J	.....	Joule
l	.....	Liter
M	.....	Molar
mg	.....	Milligramm
min	.....	Minute(n)
ml	.....	Milliliter
Mn	.....	Mangan
mol	.....	Mol
NCBI	.....	National Center for Biotechnology Information
nm	.....	Nanometer
OD <sub>x</sub>	.....	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
OM	.....	Organisches Material
PCR	.....	Polymerase-Kettenreaktion
<i>P. putida</i>	.....	<i>Pseudomonas putida</i>
r	.....	ribosomal
RNA	.....	Ribonukleinsäure
S	.....	Schwefel
SDS	.....	Natrium-Dodecylsulfat
<i>sp.</i>	.....	<i>Species</i>
SSC	.....	Soil Solution Concentration

## Abkürzungsverzeichnis

---

TBE-Puffer .....	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tab. ....	Tabelle
TE-Puffer .....	Tris-EDTA-Puffer
<i>Taq</i> .....	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris .....	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UNICEF .....	United Nations Children's Fund
Vol. ....	Volumen
Y .....	molarer Zellertrag
WB .....	West-Bengal
WHO .....	World Health Organisation
WLD .....	Wärmeleitfähigkeitsdetektor
z.B. ....	zum Beispiel
% (v/v) .....	Volumenprozent

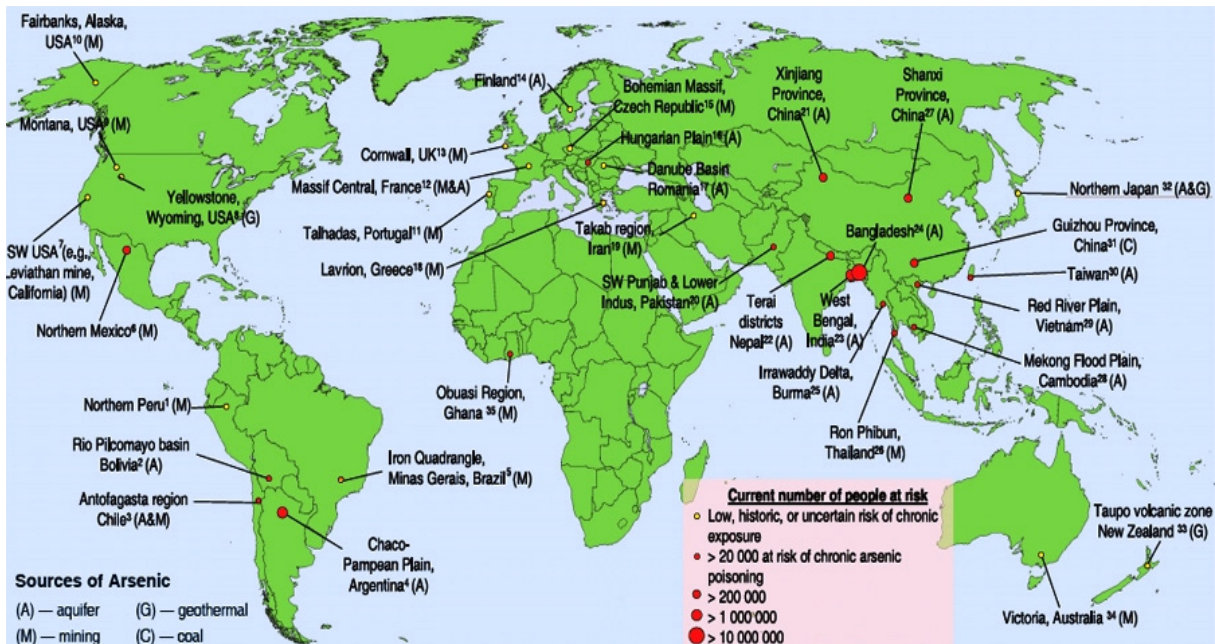




## Einleitung

### 1. Hintergrund

Die Kontamination von Grundwasser mit Arsen (As) ist in vielen Teilen der Welt ein nicht gelöstes Problem, von dem mehrere Zehnmillionen Menschen betroffen sind. So findet man z.B. in Deutschland, den USA, Vietnam und vor allem in Bangladesch und Indien Regionen mit signifikant erhöhten Arsenwerten im Grundwasser (Abb. 1; Garelick und Jones, 2008; Mandal und Suzuki, 2002; Hoang et al., 2010; Banning und Rude, 2010). In der Bengal-Delta Ebene (BDE), die West-Bengalen und Teilgebiete von Indien und Bangladesch umfasst, sind über 30 Millionen Menschen Trinkwasser mit erhöhten As-Gehalten von bis zu 3 mg/l ausgesetzt (Nordstrom, 2002). Die Welt-Gesundheits-Organisation WHO bezeichnet diese Katastrophe gar als „größte Massenvergiftung der Menschheitsgeschichte“ (Smith et al., 2000).



**Abb. 1: Weltweite Verteilung von mit Arsen kontaminierten Regionen (Garelick und Jones, 2008).** Neben den As-Quellen ist die Anzahl der Menschen, die einer Gefährdung chronischer Arsenexposition ausgesetzt sind, dargestellt.

## Einleitung

---

In der Bengal-Delta Ebene wurde traditionell Oberflächenwasser zur Wasserversorgung genutzt. Zunehmende Verunreinigung mit pathogenen Keimen und industriellen Abwässern führte in den 1970er Jahren zu einem u.a. von der UNICEF finanzierten Brunnenbohrprogramm zur Erschließung sauberen Trinkwassers. Die drastische Reduzierung klassischer, durch verseuchtes Trinkwasser hervorgerufener Krankheiten wie z.B. Cholera und Diarrhöe und der damit einhergehende Rückgang der Kindersterblichkeit versprach zunächst einen großen Erfolg des Programms. Allerdings wurde zu dieser Zeit bei Routine-Analysen As als Wasser-Parameter nicht untersucht (Wagner, 2005).

Heute beziehen fast 200 Millionen Menschen in West-Bengalen und Bangladesch Wasser weitgehend aus oberflächennahen Aquiferen. Bis Ende der 1990er Jahre war international nicht bekannt, dass die As-Gehalte in großen Teilen der BDE die von der WHO empfohlenen Grenzwerte von 50 µg/l As für Drittwelt-Länder (IS 10500, 2004) um ein Vielfaches überschreiten. So wurden z.T. bis zu 1000 µg/l As nachgewiesen (Chakraborti et al., 2002). Dadurch hat sich mit der chronischen Arsenvergiftung (Arsenicosis), welche im Volksmund auch „Black-Food-Disease“ genannt wird, eine neue Gesundheitsgefährdung aufgetan (Ahmad et al., 1997). Über mehrere Stadien kann diese Krankheit zu unterschiedlichen Formen von Krebs und letztlich zum Tod führen (Volanis et al., 2010; Guha Mazumder 2008; Smith und Steinmaus, 2009).

Bis heute wurden zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten zu Aufklärung der Ursachen der As-Anreicherung im Grundwasser und um der Gesundheitsgefährdung der Bevölkerung durch As entgegen zu wirken, durchgeführt. Trotz aller Bemühungen zahlreicher nationaler und internationaler wissenschaftlicher Institutionen, der Industrie und der Regierung ist eine flächendeckende Lösung für die Problematik noch immer nicht gefunden. Inzwischen wurden zwar verschiedene Wasserbehandlungstechnologien entwickelt um As auf ein nicht toxisches Niveau aus dem Trinkwasser zu entfernen (World Bank, 2005; Berg et. al., 2006), die eigentliche Problematik liegt allerdings in der Infrastruktur. So fehlt vor allem in ländlichen Gebieten eine zentrale Wasserversorgung um flächendeckende Maßnahmen durchführen zu können (Wagner, 2005).

In der Wissenschaft sind heute geogene Quellen (Akai et al., 2004; Harvey et al., 2005) und die As-Freisetzung aufgrund natürlicher Prozesse als Ursache der hohen As-Gehalte im

## Einleitung

---

Grundwasser der BDE akzeptiert (Biswas et al., 2011; Charlet et al., 2007). Eine agrikulturelle Bearbeitung der Böden kann die Mobilisierung des As allerdings beeinflussen (Farooq et al., 2010).

Unter diesen Gesichtspunkten spielen hydrologische, geochemische, sedimentologische, hydrochemische, sowie auch mikrobielle Aspekte eine entscheidende Rolle, die in den folgenden Kapiteln im Detail besprochen werden.

### 2. Chemie des Arsens

Das Halbmetall Arsen (As) wurde 1250 von Albertus Magnus entdeckt und nach dem griechischen *arsenikos* (männlich) benannt (Vaughan, 2006). Arsen ist in der 15. Gruppe des Periodensystems, zusammen mit Phosphor, Stickstoff und Antimon mit der Ordnungszahl 33 und einem Molekulargewicht von 74,9 g/mol, zu finden. Aufgrund von fünf Valenzelektronen kann Arsen vier Oxidationszustände besitzen:  $\text{As}^{3-}$  (Arsenid),  $\text{As}^0$  (elementares As),  $\text{As}^{3+}$  (Arsenit) und  $\text{As}^{5+}$  (Arsenat).

Als anisotopes Element besteht Arsen in seiner natürlichen Form nur aus einem einzigen stabilen Isotop ( $^{75}\text{As}$ ; De Laeter et al., 2003). Darüber hinaus sind allerdings verschiedene radioaktive Isotope ( $^{67}\text{As}$ - $^{86}\text{As}$ ) mit Halbwertszeiten von 0,9 Sekunden bis 80,3 Tagen bekannt (Falbe, 1996). Von Arsen sind drei verschiedene Allotrope bekannt, das  $\alpha$ -Arsen (Scherbenkobalt), als stabilste Form, welche grau, metallisch und spröde ist und die halbstabilen und nicht-metallischen, raren  $\beta$ - und  $\gamma$ -Formen (Plant et al., 2005).

Die As-Bindung ist ausschließlich kovalent (Hirner et al., 2000) und ist hauptsächlich zu Sauerstoff und Schwefel affin, allerdings auch zu einer Reihe von anderen Liganden, welche einen starken Einfluss auf das chemische Verhalten und die Toxizität haben (O'Day, 2006). Weitere physikalisch-chemische Eigenschaften sind in Tabelle 1 zu finden.

Trotz dessen Toxizität wird Arsen von der Industrie in Pestiziden, Holzschutzmitteln, Farben, Halbleitern und in der Kosmetik verwendet (Nriagu et al., 2007).

## Einleitung

---

**Tab. 1: Ausgewählte physikalisch-chemische Eigenschaften von Arsen (Falbe, 1996).** Die physikalischen Daten sind auf  $\alpha$ -Arsen bezogen, die atomaren Daten auf Arsenatome.

Atomgewicht	74,9216 g/mol
Ordnungszahl	33
Oxidationszahlen	+5,+3, 0,-3
Siedepunkt	613 °C
Spezifische Wärmekapazität	328,5 J/kg
Dichte	5,73 g/cm <sup>3</sup>
Härte (Mohs)	3 – 4
Elektronegativität (Pauling-Skala)	2,18
Atomradius	124,5 pm
Elektronenkonfiguration	[Ar]3d <sup>10</sup> 4s <sup>2</sup> 4p <sup>3</sup>

---

### 2.1 Anorganische Arsen-Spezies

Arsen, mit seinen vier Oxidationsstufen  $\text{As}^{3-}$ ,  $\text{As}^0$ ,  $\text{As}^{3+}$  und  $\text{As}^{5+}$ , ist ein redox-sensitives Element. Elementares Arsen ( $\text{As}^0$ ) kommt nur sehr selten in der Natur vor, das toxische Arsin ( $\text{AsH}_3$ ) kommt in Spuren in Gasen vor, die sich in sehr reduzierenden Milieus gebildet haben.

Den größten Einfluss auf die Verteilung gelöster As-Spezies in aquatischen Systemen nehmen das Redox-Potential (Eh) und der pH-Wert (Abb. 2; Lu und Zhu, 2011). Unter den im natürlichen Grundwasser üblichen Redox-Bedingungen liegt Arsen als  $\text{As}^{3+}$  und  $\text{As}^{5+}$  vor. Beide Spezies bilden Oxyanionen in wässriger Lösung, wobei der Protonierungsgrad vom pH-Wert abhängt (Stollenwerk, 2003). In Tabelle 2 sind einige Gleichgewichtsreaktionen und thermodynamische Konstanten aufgeführt, die für die Verteilung anorganischer As-Spezies im aquatischen Milieu von Bedeutung sind. Abb. 3 zeigt das Dissoziationsverhalten von  $\text{As}^{3+}$  und  $\text{As}^{5+}$  in Abhängigkeit vom pH-Wert (Smedley und Kinniburgh, 2002).

## Einleitung

Tab. 2: Wichtige chemische Gleichgewichtsreaktionen und thermodynamische Konstanten für die Speziesverteilung von  $\text{As}^{5+}/\text{As}^{3+}$  in Böden und Grundwasser (Saqid, 1997; Inskeep et al., 2002).

Beschreibung	Reaktion	Log K
Redoxpaar $\text{As}^{5+}/\text{As}^{3+}$	$\text{H}_3\text{AsO}_3 + \text{H}_2\text{O} = \text{HAsO}_4^{2-} + 4\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	-28,63
Dissoziation von $\text{As}^{3+}$	$\text{H}_3\text{AsO}_3 = \text{H}_2\text{AsO}_4^- + \text{H}^+$	-9,29
Dissoziation von $\text{As}^{5+}$	$\text{H}_3\text{AsO}_4 = \text{H}_2\text{AsO}_4^- + \text{H}^+$	-2,24
	$\text{H}_2\text{AsO}_4^- = \text{HAsO}_4^{2-} + \text{H}^+$	-6,94
	$\text{HAsO}_4^{2-} = \text{AsO}_4^{3-} + \text{H}^+$	-12,19

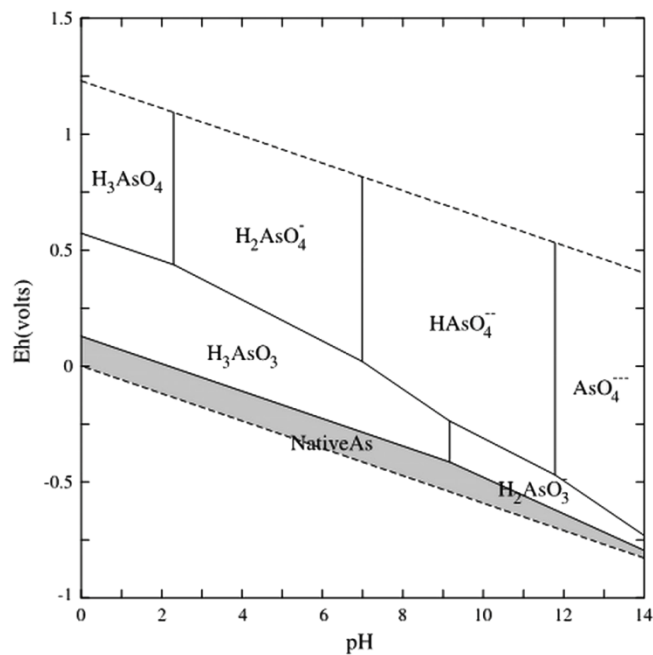


Abb. 2: Typisches Eh/pH-Stabilitätsdiagramm für aquatische As-Spezies bei 25 °C und 0,1 Mpa (Lu und Zhu, 2011). Die Festphase von Arsen ist grau unterlegt.

Das fünfwertige Arsen ist im oxidierenden Milieu stabil und liegt in wässriger Lösung als Arsenat bzw. den Oxyanionen der Arsensäure vor. Bei den im Grundwasser natürlichen vorliegenden pH-Bedingungen dominiert das einfach negativ geladene Oxyanion der

## Einleitung

Arsensäure ( $\text{HAsO}_4^-$ ) bei pH 2,2 bis 6,9 und im alkalischen Milieu (pH 9,9 – 11,5) das zweifach geladene Oxyanion ( $\text{HAsO}_4^{2-}$ ). Das dreiwertige Arsen dagegen ist unter anaeroben Bedingungen stabil ( $E_h > -100$  mV bei pH 8 bzw.  $< +300$  mV bei pH 4) und bildet in gelöster Form Arsenit bzw. arsenige Säure. Zwischen pH 6,9 und 9,2 dominiert die neutrale arsenige Säure ( $\text{H}_3\text{AsO}_3$ ), bei pH 9,2 bis 12 deren Oxyanion ( $\text{H}_2\text{AsO}_3^-$ ; Ferguson und Gavis, 1972). Neuere Studien haben gezeigt, dass auch Thioarsenate ( $\text{HAsO}_3\text{S}^{2-}$ ,  $\text{HASO}_2\text{S}_3^{2-}$ ,  $\text{AsOS}_3^{2-}$ ,  $\text{AsS}_4^{3-}$ ) die vorherrschende Form in natürlichen Wässern sein könnten, insbesondere unter stärker reduzierenden Bedingungen, diese aber nur ab hohen As/S-Verhältnissen von 20:1 als Auripigment ( $\text{As}_4\text{S}_6$ ) ausfallen (Wilkin et al., 2003). Nach einer schnellen Reduktion in saurem Milieu, insbesondere im Bereich von pH 4 - 7, entstehen As-S-Komplexe ( $\text{H}_x\text{As}_3\text{S}_6^{x3-}$ ), welche mehrere Tage stabil vorliegen können, bevor sie zur arsenigen Säure dissoziieren (Rochette et al., 2000).

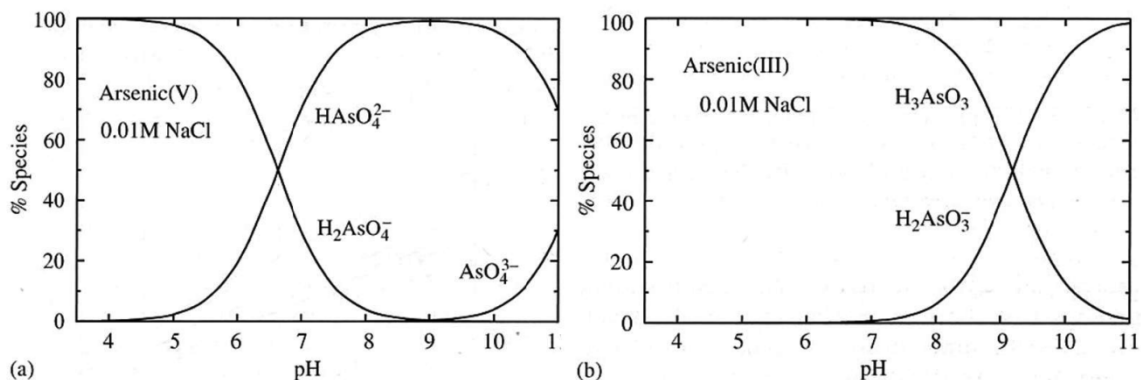


Abb. 3 Speziation von  $\text{As}^{5+}$  (a) und  $\text{As}^{3+}$  (b) als Funktion von pH bei einer Ionenstärke von 0,01 M (Smedley und Kinniburgh, 2002).

### 2.1.1. Transformationen von $\text{As}^{3+}$ und $\text{As}^{5+}$

Anorganische As-Spezies können sowohl durch Redoxprozesse, als auch durch mikrobielle Aktivität transformiert werden. Thermodynamische Kalkulationen prognostizieren, dass  $\text{As}^{5+}$  die dominante Spezies in allen, außer stark reduzierenden, Grundwässern sein sollte. In der Realität jedoch schwankt das Verhältnis von  $\text{As}^{5+}$  und  $\text{As}^{3+}$  beträchtlich, aufgrund der Fülle von redox-aktiven Materialien, organischem Kohlenstoff, mikrobieller Aktivität, sowie auch

der Konvektion und Diffusion von gelöstem Sauerstoff (Korte und Fernando 1991; Smedley und Kinniburgh 2002). In Bangladesch zum Beispiel kann die  $As^{3+}/As^{tot}$ -Ratio von 0,1 bis 0,9 variieren (BGS und DPHE, 2001).

Kinetische Gesichtspunkte spielen ebenso eine Rolle bei der Speziation von As. So sollte unter aeroben Bedingungen kein  $As^{3+}$  vorkommen, allerdings läuft die Oxidation von  $As^{3+}$  mit gelöstem Sauerstoff als einziges Oxidationsmittel eher langsam ab (Eary und Schramke 1990). Mangan und Eisen beschleunigen diese Prozesse rapide (Oscarson et al., 1983). Aufgrund dessen Fähigkeit, Oxidations-, als auch Reduktions-Reaktionen zu katalysieren, hoben Redman et al. (2002) den Einfluss von natürlichem organischen Material auf die As-Speziation hervor.

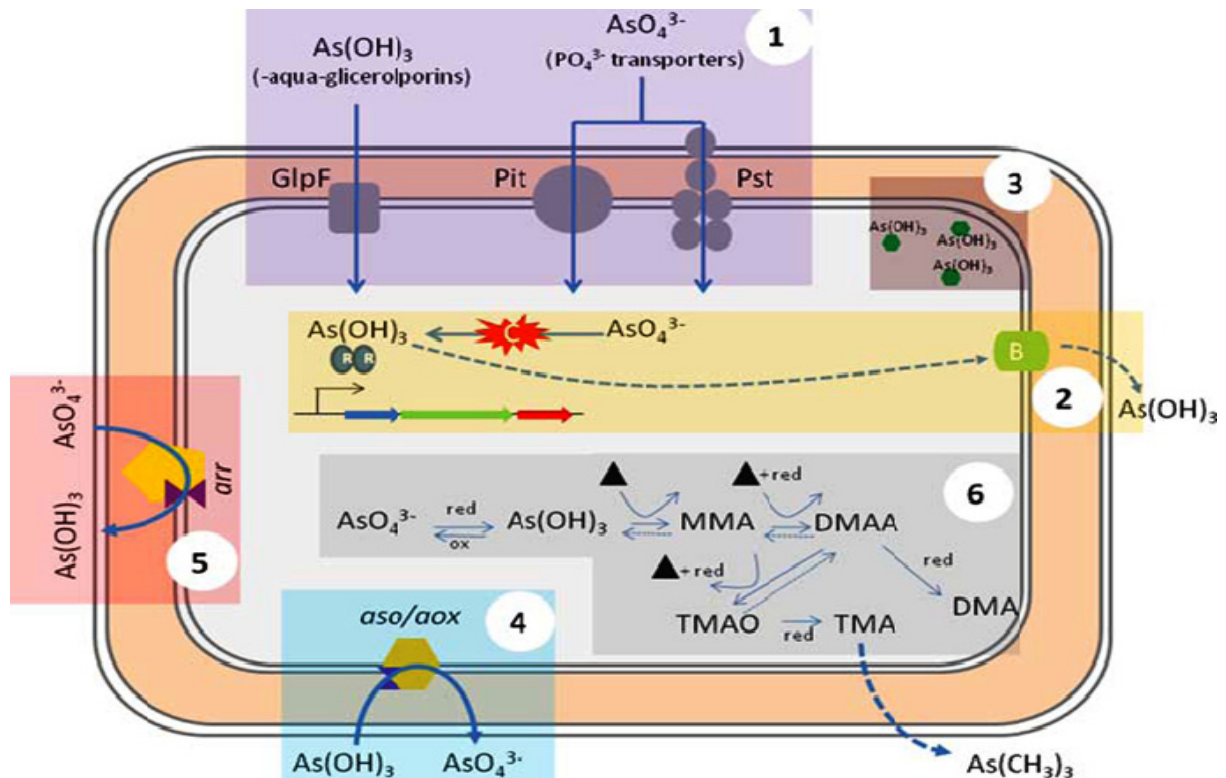
Die Transformation von Arsen in Festphasen ist unter moderat reduzierenden Bedingungen möglich (Masscheleyn et al. 1991), die genauen Mechanismen wurden bis dato noch nicht vollkommen verstanden. Allerdings spielen hier Mikroorganismen eine entscheidende Rolle bei der Transformation.

### **2.1.2 Mikrobielle Transformation anorganischen Arsens**

Arsen wirkt auf Lebewesen toxisch, in dem es, durch seine chemische Ähnlichkeit mit Phosphat, dieses in vielen biochemischen Reaktionen ersetzt (Hughes, 2002; Thomas, 2001). Deshalb haben Mikroorganismen dynamische Mechanismen entwickelt, dieser Gefahr entgegenzuwirken. Neben verschiedenen Resistenzmechanismen (Rosen, 2002), sind einige Arten in der Lage, Arsen für ihren Energiestoffwechsel zu nutzen (Abb. 4; Paéz-Espino et al., 2009). Dies kann respiratorisch geschehen (z.B. Macey et al. 1996; Silver und Phung, 2005; Freikowski et al., 2010) oder Arsen wird als Elektronendonator verwendet (z.B. Santini et al., 2000; Gihring und Banfield, 2001). Einige Bakterien sind auch in der Lage Arsen zu methylieren (Qin et al., 2006) oder zu demethylieren (Cullen und Reimer, 1989; Silver und Mistra, 1984).



## Einleitung



**Abb. 4: Übersicht über unterschiedliche mikrobielle Umsetzungen von Arsen (Páez-Espino et al., 2009).**  
 1: Aufnahme von Arsenat mittels Phosphattransporter, bzw. Arsenit mittels Aquaglyceroporinen, 2: Reduktion von Arsenat zu Arsenit durch *ArsC* und Ausschleusung durch den spezifischen Arsenittransporter *ArsB*, 3: Detoxifikation von Arsenit durch Komplexbildung mit an Cys-reichen Peptiden, 4: Oxidation von Arsenit mittels *aso/aox*-Enzymen, 5: Respiration von Arsenat mittels *arrA*, 6: Methylierung von anorganischem Arsen zu organischem und anschließende Ausschleusung.

Um Arsen intrazellulär umsetzen zu können, muss Arsenat bzw. Arsenit in das Zytoplasma geschleust werden (Abb. 4-1). Da Arsen an sich allerdings keine primäre Rolle im Stoffwechsel spielt, entwickelte sich im Laufe der Evolution kein spezifischer Arsentransporter. Als Oxyanion, wie z.B. Phosphat, wird Arsenat über ubiquitär verbreitete, membranständige Phosphattransporter aufgenommen (Rosen, 2002). Arsenit liegt unter physiologischen Bedingungen als ungeladenes  $\text{As(OH)}_3$  vor, weshalb es nicht über spezifische Phosphattransporter in die Zelle geschleust werden kann. Aufgrund dessen wird Arsenit über Aquaglyceroporine in die Zelle geschleust (Bhattacharjee et al., 2008).

Das aufgenommene Arsenat kann über zwei verschiedenen Mechanismen detoxifiziert werden. Ein Mechanismus ist die Detoxifikation welche auf dem *ars*-Operon basiert, das auf

## Einleitung

---

dem Chromosom oder Plasmiden encodiert wird (Xu et al., 1998). Zur Detoxifikation muss  $\text{As}^{5+}$  zu  $\text{As}^{3+}$  mittels einer Reduktase (ArsC) reduziert werden, um anschließend mit einer spezifischen Membranpumpe (ArsB) chemoosmotisch aus der Zelle geschleust zu werden (Abb. 4-2; Páez-Espino et al., 2009).

Ein aus der Botanik bekannter Mechanismus zur Detoxifikation ist die Fähigkeit As an thiolreiche Phytochelatine, die aus  $\gamma$ -Glu-Cys-Dipeptiden bestehen, zu binden (Schmoger et al., 2000). Diese Chelate wurden erfolgreich in *Escherichia coli* exprimiert, mit dem Ziel, As und andere Schwermetalle effizient aus der Umwelt und Industrieabfällen zu entfernen (Sauge-Merle et al., 2003).

Ein anderer, weitverbreiteter intrazellulärer Prozess stellt die Methylierung von As dar, besonders in eukaryotischen Zellen (Challenger, 1951), aber teilweise auch in prokaryotischen Zellen (Qin et al., 2006). Dies kann unter aeroben, sowie auch unter anaeroben Bedingungen geschehen (Bentley und Chasteen, 2002). Dabei wird über mehrere Schritte  $\text{As}^{5+}$  reduziert und oxidativ eine Methylgruppe angehängt (Dombrowski et al., 2005). Das so entstandene Trimethylarsin (TMA; Abb. 4-6) wird über die Zellmembran ausgeschieden.

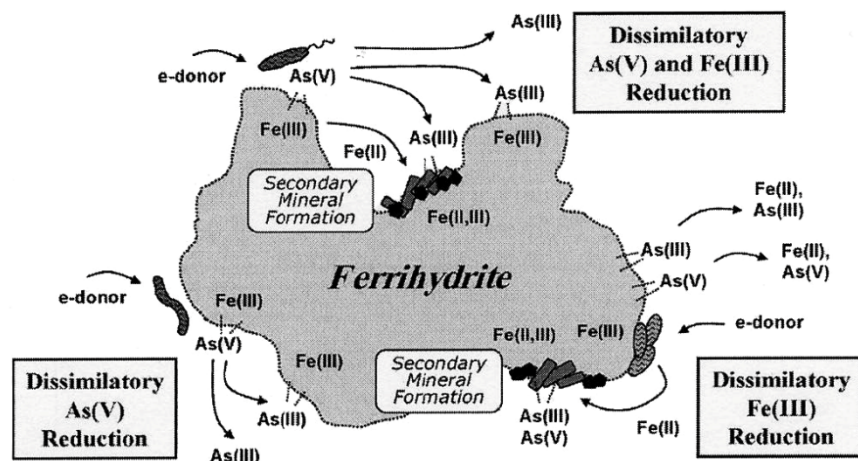
Neben den Entgiftungsmechanismen kann Arsen auch eine direkte Rolle im Stoffwechsel spielen.  $\text{As}^{3+}$  kann in chemolithoautotrophen Bakterien als Elektronendonator dienen (Santini et al., 2000), in dem es über eine membranständige Arsenitoxidase (aox) zu  $\text{As}^{5+}$  oxidiert wird (Abb. 4-4). Die Oxidation von  $\text{As}^{3+}$  kann in der Entfernung des As aus der Umwelt aufgrund der geringeren Löslichkeit von  $\text{As}^{5+}$  technisch eine Rolle spielen (Leist et al., 2000).

Weitaus verbreiteter ist die Reduktion von  $\text{As}^{5+}$  durch dissimilatorische, Arsenat respirierende Prokaryoten (DARP), bei welchen als Teil der Elektronentransportkette eine membran-gebundene Arsenat-Reduktase *arrA* (Malasarn et al., 2004) kennzeichnend ist (Abb. 4-5). Allerdings stellt die Fähigkeit, Arsenat respiratorisch zu reduzieren keinen essentiellen Metabolismus dar, da viele Stämme das *arrA*-Gen aufweisen, die Energie aber im Normalfall über andere Stoffwechselwege gewinnen, wie z.B. durch Sulfatreduktion (Newman et al., 1997ab; Kocar et al., 2010) oder der Reduktion von Eisen (Islam et al., 2004).

## 2.2.2 Freisetzung von Arsen durch Reduktion von Eisen

Unter den meisten Umweltbedingungen findet die Reduktion von  $\text{As}^{5+}$  zu  $\text{As}^{3+}$  mit einem ähnlichen Redoxpotential wie die Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  statt (Kocar und Fendorf, 2009). So liegt im Grundwasser des BDE  $\text{As}^{3+}$  als dominierende As-Spezies zusammen mit  $\text{Fe}^{2+}$  vor, weshalb es höchstwahrscheinlich mit der Reduktion von  $\text{As}^{5+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  in enger Verbindung steht (Lloyd und Oremland, 2006). Die Hypothese, dass die Reduktion von As-haltigen Fe-(oxyhydro)oxiden für die hohen As-Gehalte im Grundwasser des BDE verantwortlich ist, wurde in verschiedenen Feldstudien (z. B. Nickson et al., 2000; McArthur et al., 2001; Stüben et al., 2003; Wagner, 2005) und Laborstudien mit Säulen- oder Mikrokosmos-Experimenten (z.B. Van Geen et al., 2004; Radloff et al., 2007; Farooq et al., 2011; Freikowski et al., 2013) diskutiert und gilt heutzutage als Hauptmechanismus der Freisetzung von As in Asien (Fendorf et al., 2010).

Die direkte mikrobielle Reduktion von Fe-(oxyhydro)oxiden (Abb. 5) kann aufgrund der passiven Freisetzung von adsorbierten oder inkorporierten Spurenelementen, inklusive As (Lovely 1995; 1997) zu erhöhten As-Gehalten im Grundwasser führen (Islam et al., 2004).



**Abb. 5: Freisetzung von As durch (mikrobielle) Reduktion von Eisen (Herbel und Fendorf, 2006).**  $\text{Fe}^{3+}$  und  $\text{As}^{5+}$  können mikrobiell reduziert werden, was zur Freisetzung von  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{As}^{3+}$  in Grundwasser führt. (Re-) Adsorption und das Ausfallen von sekundären Mineralphasen können einen Einfluss auf die As-Mobilisierung haben.

Amorphe und schwach kristalline Fe-Phasen, wie Ferrihydrit ( $\text{Fe}_5\text{HO}_8 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ ) stellen in entsprechenden Ökosystemen die am besten verfügbaren Elektronenakzeptoren dar (Herbel und Fendorf, 2006), allerdings können auch Minerale wie Goethit ( $\alpha\text{-FeOOH}$ ) oder Magnetit ( $\alpha\text{-Fe}_3\text{O}_4$ ) als Eisenlieferanten fungieren (Lovely und Philips, 1986). In Ökosystemen findet die Reduktion von Eisen und die Freisetzung von Arsen immer in mikrobiellen Gemeinschaften statt, die der entsprechenden Umwelt angepasst sind (Cozzarelli und Weiss, 2007; Konhauser, 2007). In der Regel handelt es sich um heterotrophe dissimilatorische  $\text{Fe}^{3+}$ -reduzierende Bakterien, welche Fermentationsprodukte, wie Ethanol oder Fettsäuren, von synergistischen Bakterien zur Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  oxidieren (Lovely et al., 2004; Konhauser et al., 2011). Die Reduktion von Eisen findet auch statt, wenn andere thermodynamische Reaktionen im Ökosystem günstiger sind (Roden, 2003). Eine vollständige Reduktion des Eisen-Pools ist allerdings unwahrscheinlich, da die vorhandene Menge verfügbaren Eisens die des organischen Materials überwiegt (Borch et al., 2010). Neben anaeroben Bedingungen im Ökosystem spielt auch der pH-Wert eine Rolle, da sich bei neutralem pH  $\text{Fe}^{3+}$ -haltige Minerale nur schwer lösen. Um dies zu umgehen, haben die meisten eisenreduzierenden Bakterien Mechanismen entwickelt um niedermolekulare organische Substanzen auszuschleiden, die als  $\text{Fe}^{3+}$ -Elektronen-Shuttle fungieren (Page und Huyer, 1984; Wolf et al., 2009) oder sie nehmen das  $\text{Fe}^{3+}$  direkt via Pili auf (Wolf et al., 2009).

Ähnliche Prozesse finden bei der Reduktion von Manganoxiden statt, die ebenfalls Arsen in großen Mengen adsorbieren oder inkorporieren (Lovely et al., 1993; Stüben et al., 2003).

### 2.2.3 Einfluss des organischen Materials

Zur mikrobiellen Reduktion anorganischer Spezies in Ökosystemen ist das Vorhandensein von abbaubarem organischem Material (OM) als Elektronendonor essentiell (Charlet und Polya, 2006). Verschiedene Studien zeigten, dass der Abbau des OM aufgrund erhöhter mikrobieller Aktivität zu erhöhter As-Freisetzung führen kann (Gault et al., 2005; Rowland et al., 2007; Freikowski et al., 2013), weshalb die Verfügbarkeit, Konzentration und Reaktivität des OM die Kontrollfaktoren für die As-Freisetzung darstellen (Hartog et al., 2004; Gault et al., 2005; Postma et al., 2007).

Es steht zur Diskussion, ob das OM direkt mit hohen As-Konzentrationen im Grundwasser korreliert oder nicht, da auch organische Komponenten As binden können (Anawar et al., 2002). Allerdings spricht dagegen, dass die Konzentration von As in OM zu gering ist für einen signifikanten Einfluss auf die Konzentration von As im Grundwasser (Dowling et al., 2002).

Darüber hinaus stellen reduzierende Huminstoffe wichtige Elektronen-Shuttles dar und fungieren als wichtigste DOC-Quelle in Aquiferen, in denen  $\text{Fe}^{3+}$  reduziert wird (Lovely et al., 1996, Kappler et al., 2004). Jedes Huminstoff-Molekül kann mehrmals oxidiert und reduziert werden, was einen Grund für hohe Eisen- und Arsengehalte in Aquiferen darstellt, auch wenn der DOC an sich niedrig ist (Lovely et al., 2001; Rowland et al., 2007).

Über die Jahre wurden verschiedene Quellen für organisches Material diskutiert. Neben natürlichen Quellen, wie Torf- und Schlammschichten (Stüben et al., 2003) oder Kohlenwasserstoffen (Rowland et al., 2006), stellen anthropogene Quellen, wie offene Latrinen, künstliche Bewässerungsseen und die Landwirtschaft (Nath et al., 2008ab; Poliozotto et al., 2008) die wichtigsten Lieferanten für organisches Material dar. Besonders während des Monsuns findet eine Verschiebung und Anreicherung von organischem Material statt (Kocar et al., 2008), sowie auch durch intensive Bewässerung (McArthur et al., 2001; Harvey et al., 2002; 2006).

### **2.2.4 Vergleich von biotischer und abiotischer Mobilisierung von Arsen**

Neben der Betrachtung der mikrobiologisch verursachten Freisetzung von As, ist es unabdingbar auch die abiotischen Faktoren für die entsprechenden Reaktionen mit einzubeziehen. Der Abbau von organischem Material und die Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  kann neben As beträchtliche Mengen an  $\text{PO}_4^{3-}$  freisetzen, was sich auf die Adsorption von As auswirken kann (Appelo et al., 2002; Dixit und Hering, 2003; Goh und Lim, 2004). Auf der anderen Seite kann eine hohe Konzentration von  $\text{Fe}^{2+}$  zur chemischen Reduktion von  $\text{As}^{5+}$  führen, das an Oberflächen adsorbiert ist (Itai et al., 2010). Darüber hinaus ist  $\text{Fe}^{2+}$  in der Lage thermodynamisch weniger stabile Eisen-Mineralphasen (z.B. Ferrihydrit) in stabilere Formen wie Magnetit zu transformieren (Islam et al., 2005; Yanina und Rosso, 2008; O'Loughlin et

## Einleitung

---

al., 2010), wobei die neu gebildeten Eisen-Phasen wiederum die Retention des gelösten Arsens fördert, was zur Entkopplung der As-Mobilisierung von der reduktiven Lösung von Fe-(oxihydro)oxiden führt (Tufano und Fendorf, 2008). Folglich findet ein komplexes Zusammenspiel zwischen biotischen und abiotischen Prozessen während der Reduktion von  $\text{Fe}^{3+}$  statt, welches konkurrierend die Freisetzung und Rückhaltung von Arsen induziert (Pedersen et al., 2006; Kocar et al., 2006; Coker et al., 2006).

Ähnliche konkurrierende Vorgänge sind bei der Reduktion von Sulfat zu finden, bei der arsenfixierende Sulfide gebildet werden. Das während der Reduktion gebildete  $\text{H}_2\text{S}$  reagiert mit gelöstem  $\text{Fe}^{2+}$  zu z.B. Pyrit ( $\text{FeS}_2$ ), das bei höherem Redox-Potential ausfallen kann und bei der Bildung Arsen inkorporieren kann (Kirk et al., 2010). Allerdings können auch sulfatreduzierende Mikroorganismen wie z.B. *Desulfotomaculum auripigmentum* (Newman et al., 1997a) simultan  $\text{As}^{5+}$  reduzieren und in ihren Zellen  $\text{As}^{3+}$  zusammen mit  $\text{S}^{6+}$  als Arsentrisulfid ( $\text{As}_2\text{S}_3$ ) binden (Newman et al., 1997b). Héry et al. (2010) diskutierten die Möglichkeit, leicht abbaubare Kohlenstoffquellen in  $\text{SO}_4^{2-}$  reduzierende Aquifere mit niedriger  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration einzubringen um Arsen aus dem Grundwasser zu binden.

### 3. Ziel der Studie

Diese Studie wurde im Rahmen des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) und des Bundesministeriums für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (BMZ) geförderten Projektes „The role of microbiogeochemical processes in releasing As from aquifer sediments in the Bengal Delta Plain (BDP): An experimental approach“ (Az Wi 524/20-1) durchgeführt, mit dem Ziel, die mikrobielle Mobilisierung von Arsen in regional gewonnenen Sedimenten aufzuklären. Als Arbeitsgrundlage dieser Untersuchung dient die Hypothese, dass in eng begrenzten regionalen Arsen-Hotspots (Wagner, 2005) die Freisetzung des Arsens durch den mikrobiellen Abbau organischen Materials (OM) unter dort vorliegenden Redoxbedingungen gleichzeitig mit abiotischen hydrologischen und geochemischen Prozessen stattfindet.

Zwar wurde schon eine Vielzahl von Studien zur mikrobiellen Arsen-Mobilisierung (z.B. Héry et al., 2010; Dhar et al., 2011) durchgeführt, allerdings ohne die Einbeziehung der regionalen Unterschiede durch die für West-Bengalen charakteristischen Arsen-Hotspots, weshalb in der vorliegenden Studie Versuche mit Sedimenten aus einem Bereich mit niedrigem/erhöhtem As-Gehalt im Grundwasser, bei einem durchschnittlichem As-Gehalt im Sediment, durchgeführt, mit dem Ziel einen Einfluss der Mikrobiologie zu zeigen.

Der mögliche mikrobiologische Einfluss auf die Freisetzung soll durch Experimente mit einer isolierten Reinkultur dadurch gezeigt werden, dass in dem Untersuchungsgebiet arsentolerante/-reduzierende Bakterienstämme vorhanden sind, sowie durch die direkte Freisetzung von Arsen aus den Sedimenten mittels Säulenexperimenten. Dies hat zum Ziel einen mikrobiologischen Einfluss auf die Freisetzung des Arsens im Nadia-Distrikt, West Bengalen, Indien zu zeigen. Zur Validierung der Ergebnisse soll im Rahmen des Projektes, welches in Kooperation mit dem Institut für Mineralogie und Geochemie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) und dem Departement of Chemistry, der Universität von Kalyani, Indien, stattfand, durch die Injektion einer Kohlenstoffquelle in gebohrte Brunnen im Untersuchungsgebiet, der Einfluss der Mikrobiologie direkt vor Ort gezeigt werden.

## II. Materialien und Methoden

### 1. Materialien

#### 1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in der größtmöglichen Reinheit von den Firmen Applichem (Darmstadt, Deutschland), Fluka (Taufkirchen, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

#### 1.2 Gase

Stickstoff (99,99 %), technische Luft (21 % O<sub>2</sub>, 79 % N<sub>2</sub>), Wasserstoff und Argon (99,99 %) wurden von der Linde AG (Stuttgart, Deutschland) bezogen.

#### 1.3 Bakterienstämme

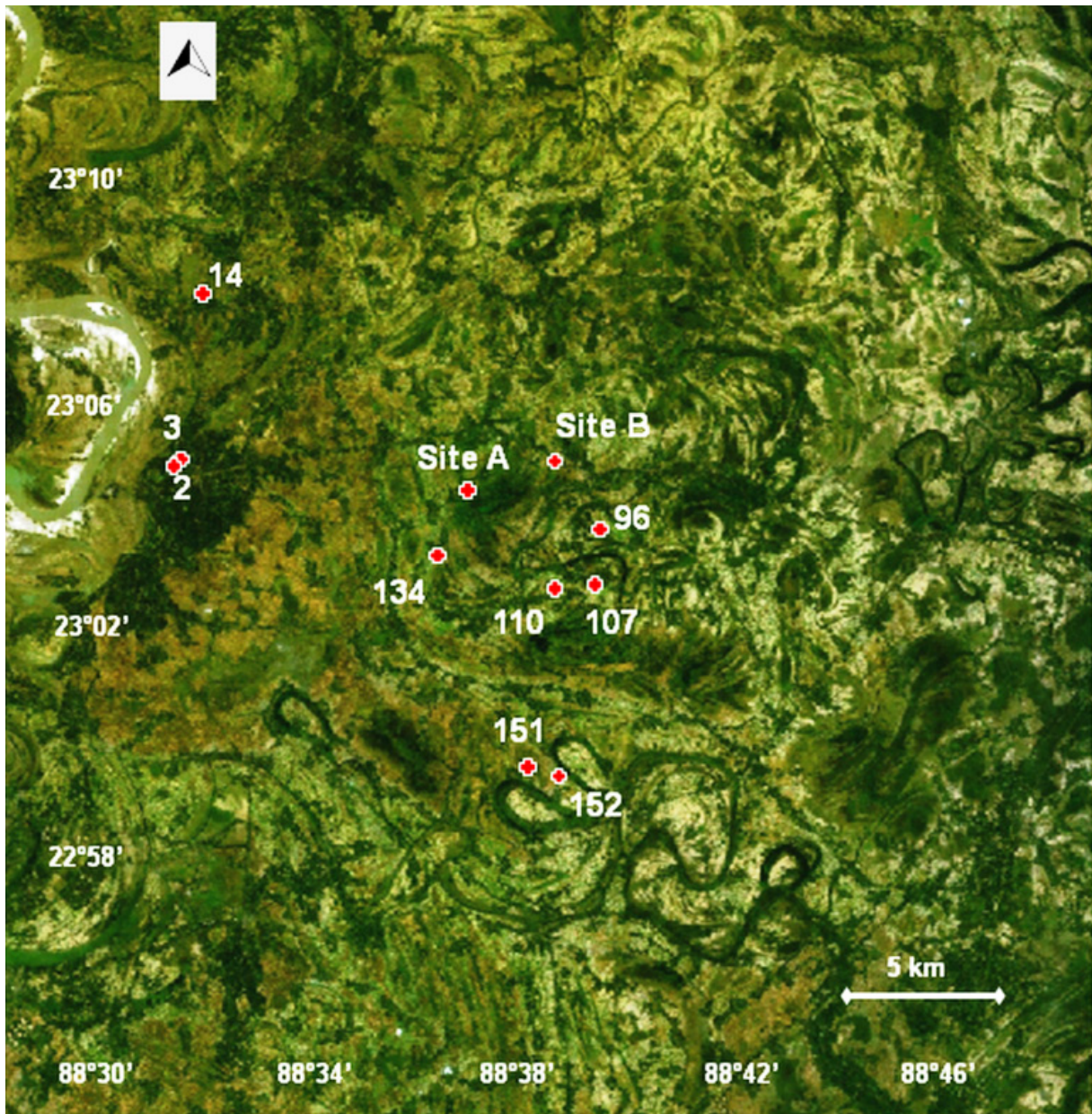
Alle verwendeten Typstämme wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen.

## 2. Methoden

### 2.1 Untersuchungsgebiet

Das Untersuchungsgebiet befindet sich im östlichen Teil des Nadia-Distrikts in West Bengalen, Indien. In diesem Gebiet wurden zwei Untersuchungsgebiete aufgrund ihres Arsengehaltes im Grundwasser nach einem Screening von elf Wasserproben aus Haushaltsbrunnen festgelegt. Die sogenannte „Site A“ lag auf dem Breitengrad N23°04′14.5“ und dem Längengrad E88°36′33.5“. Die sogenannte „Site B“ hatte die Koordinaten N23°04′58.2“ und E88°38′13.1“. Das Gebiet liegt nahe der Grenze zu Bangladesch, wo der Fluss Hoogly von Nord nach Süd fließt (Abb. 6).





**Abb. 6: Untersuchungsgebiet.** Nach einem Screening von Wasserproben aus Haushaltsbrunnen auf As-, Fe-, DOC-Gehalt, sowie der Untersuchung mikrobiologischer Parameter, wurden aufgrund des Fe- und As-Gehaltes die Brunnen Nr. 125 („Site B“; 2,3 µg/l As) und Nr. 132 („Site A“; 285 µg/l As) als Untersuchungsstandorte ausgewählt. Die Karte wurde mit NASA World Wind (Vers. 1.4) erstellt.

### 2.2 Screening von Wasserproben zur Ermittlung der Untersuchungsgebiete

Im Dezember 2007 wurden elf Grundwasserproben aus privaten Brunnen gesammelt (Tab. 18). Um möglichst frisches, aber auch anoxisches Wasser zu erhalten, wurde vor der Probenahme 10 Minuten gepumpt und das Wasser verworfen. Jede Probe wurde durch

## Materialien und Methoden

---

sterile 0,45 µm Cellulose-Acetat-Filter (Sartorius, Göttingen, Deutschland) in mit 100 % Ethanol sterilisierte Plastikgefäße gefiltert und sofort mit 1 % (v/v) HNO<sub>3</sub> (Suprapur-Grad), zur (bio-) chemischen Stabilisierung während des Transports nach Deutschland angesäuert, bis zur späteren Analyse von Eisen, Arsen und gelöstem organischen Kohlenstoff (Dissolved Organic Carbon; DOC).

Zusätzlich wurde ein weiterer Satz unbehandelter Proben für die Bestimmung der aeroben und anaeroben Gesamtkeimzahl, sowie coliformer Keime und von *Escherichia coli* in zuvor mit 100% Ethanol sterilisierte gasdichte Plastikgefäße unter den gleichen Bedingungen gefüllt. Bis zur Untersuchung wurden die Proben gekühlt transportiert und bei 4 °C zwischengelagert. Die Proben wurden nach DIN 38411-6 (1991) untersucht. Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl (GKZ) wurden 100 µl der unverdünnten Probe, sowie je 100 µl von drei Verdünnungsstufen (10<sup>-1</sup>; 10<sup>-2</sup>; 10<sup>-3</sup>) auf DEV-Nähragar-Platten (Tab. 3) ausgestrichen und 24 Stunden bei 27° C aerob bzw. anaerob (99,99 % N<sub>2</sub>) inkubiert.

**Tab. 3: Zusammensetzung von DEV-Nähragar**

Pepton aus Fleisch	10,0 g/l
Fleischextrakt	10,0 g/l
NaCl	5,0 g/l
Agar-Agar	18,0 g/l

Coliforme Keime und *E. coli* wurden mit Endo-Agar (Tab. 4; Endo, 1904) nachgewiesen, bei dem die *E.coli*-Kolonien, aufgrund des beim Lactose-Abbau entstehenden Acetaldehyds, welches mit dem Fuchsin-Sulfit-Komplex reagiert, bei saurem pH-Wert einen Metallglanz aufweisen. Auch hier wurden jeweils 100 µl der Probe, sowie in den gleichen Verdünnungsstufen ausgestrichen und unter den gleichen Bedingungen inkubiert.

## Materialien und Methoden

---

Tab. 4: Zusammensetzung von Endo-Agar (Endo, 1904)

Pepton aus Fleisch	13,0 g/l
Lactose	10,0 g/l
K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	3,5 g/l
Fuchsin	0,3 g/l
Natriumsulfit	2,5 g/l
Agar-Agar	10,0 g/l

---

Die Gesamtkeimzahl, bzw. die Anzahl von coliformen Keimen und von *E. coli*, wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{GKZ}}{\text{ml}} = \frac{\sum \text{aller gezählten Kolonien}}{n1 + n2 \times 0,1 + n3 \times 0,01} \times \frac{1}{dV}$$

Dabei ist *n1* die niedrigste Verdünnungsstufe, *n2* und *n3* die jeweils 10-fach höheren. *V* repräsentiert das Probenvolumen (100 µl).

Der im Grundwasser unterschiedliche Arsengehalt in Zusammenhang mit DOC und der Gesamtkeimzahl wurden anschließend zur Auswahl der Site A und Site B-Untersuchungsgebiete herangezogen.

### 2.3 Anreicherung und Isolierung von Reinkulturen

#### 2.3.1 Probenahme

Es wurden 100 ml einer Wasserprobe aus dem Untersuchungsgebiet Sahispur (Site B) in West-Bengalen, Indien (N 23°04'15.5", E 88°36'33.5") aus einem 6 m tiefen Brunnen nach 10 Minuten Pumpen in mit 100 % Ethanol sterilisierte gasdichte Plastikgefäße gesammelt. Die Gesamtkeimzahl wurde mikroskopisch (Axioskop, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) nach 10-

## Materialien und Methoden

---

facher Konzentrierung durch fünf Minuten Zentrifugieren mit 12000 *g* (Modell 543, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit einer Methode nach Taylor et al. (2002) bestimmt.

### 2.3.2 Anreicherung und Isolation

Zur Anreicherung anaerober Kulturen wurde 1 ml der Wasserprobe in 20 ml R2A-Medium (Reasoner und Geldreich, 1985), das 0,695 g/l Arsenat enthielt (Tab. 5; pH 7,2) in 100 ml Serumflaschen, die mit einem Gummistopfen verschlossen und anaerobisiert wurden (99,99 % N<sub>2</sub>, 10 Zyklen mit je 1 bar Unter- bzw. Überdruck), inokuliert. Die Proben wurden schließlich 48 Stunden bei 27° C unter Schütteln (160 U/min) inkubiert. Bei einer optischen Dichte ( $\lambda = 578 \text{ nm}$ ) von 1,2 wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  auf Agarplatten, die dasselbe Medium, mit zusätzlich 15 g/l Agar-Agar (Roth, Karlsruhe), enthielten, ausgestrichen. Diese wurden anaerob bei 27 °C für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden einzelne Kolonien gepickt und auf Agarplatten mit derselben Zusammensetzung vereinzelt und unter den gleichen Bedingungen, wie zuvor beschrieben, inkubiert. Dieser Schritt wurde dreimal durchgeführt.

Tab. 5: Zusammensetzung von R2A-Medium (Reasoner und Geldreich, 1985; abgeändert)

Hefeextrakt	0,50 g/l
Proteosepepton	0,50 g/l
Caseinhydrolysat	0,50 g/l
Glucose	0,50 g/l
Stärke	0,50 g/l
Natriumpyruvat	0,30 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,30 g/l
MgSO <sub>4</sub>	0,024 g/l
Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,695 g/l

In einem weiteren Schritt wurden einzelne Kolonien in das zuvor beschriebene R2A-Medium (Tab. 5) überführt und unter den denselben Bedingungen inkubiert. Bei einer OD<sub>578</sub> von 1,2 wurden 1 ml der Kultur in 20 ml eines Mangelmediums (Tab. 6) überführt, welches mit 1 g/l Glucose als einziger Kohlenstoffquelle versetzt wurde. Alternativ wurden 0,2 ml einer 1,5

## Materialien und Methoden

---

molaren Acetat-Stammlösung oder 0,2 ml einer 1 molaren Na-L-Lactat-Stammlösung hinzugeben. Anschließend wurde das Medium anaerobisiert (99,99 % N<sub>2</sub>) oder mit technischer Luft (21 % Sauerstoff, 79 % Stickstoff) begast. Die aeroben Medien wurden mit 0,695 g/l NaAsO<sub>2</sub> anstelle von Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O versetzt. Als Kontrolle wurden die beschriebenen Ansätze ohne Arsenat bzw. Arsenit inkubiert.

Zusätzlich wurde das Trockengewicht der in dem Mangelmedium gewachsenen Zellen bestimmt, in dem 1,5 ml bei einer OD<sub>578</sub> von 1,2 in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt, zentrifugiert (12 000 g/5 min) und nach Abnahme des Überstands das Pellet bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurde. Anschließend wurde das Gewicht mit einer Feinwaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland) abzüglich des Gewichtes des Reaktionsgefäßes bestimmt.

**Tab. 6: Mangelmedium zur Untersuchung des As-Umsatzes.** Kohlenstoffquellen wurden zusätzlich zugesetzt und variieren in den einzelnen Experimenten.

---

Hefeextrakt	0,25 g/l
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,30 g/l
Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O oder NaAsO <sub>2</sub>	0,695 g/l

---

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Isolierung der DNS

Die Isolierung der chromosomalen DNS erfolgte nach der Methode von Murray und Thompson (1980). Dazu wurden nach dem Zentrifugieren mit 10000 g/5 min und Verwerfen des Überstandes, 10-50 mg Zellen (Feuchtmasse) in 1,5 ml Reaktionsgefäße eingewogen und in 570 µl TE-Puffer resuspendiert und mit 10 % SDS-Lösung und 3 µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml) gemischt. Nach einer Stunde Inkubation bei 50 °C wurden 100 µl 5 M NaCl-Lösung und 80 µl CTAB/NaCl-Lösung, welche zuvor im Wasserbad auf 65 °C vorgewärmt wurde

## Materialien und Methoden

---

(Tab. 7), zugegeben und nach dem Mischen für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Zur anschließenden Extraktion wurden 700 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben. Nach dem Zentrifugieren (12000 g/5 min) wurde der Überstand in ein neues Extraktionsgefäß überführt und die Extraktion zweimal wiederholt. Nach erneuter Überführung der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß wurde die DNS mit 460 µl Isopropanol und 40 µl Glycogen gefällt. Nach erneutem Zentrifugieren (14000 g/10 min) wurde der Überstand vollständig abgenommen und verworfen. In einem weiteren Schritt wurden 800 µl Ethanol (70 %) zugegeben, gemischt und erneut zentrifugiert (14000 g/2 min). Nach vollständiger Abnahme des Überstands wurde die DNS in 50 µl 5 M TRIS/HCl-Puffer (pH 8,5) resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

**Tab. 7: Stammlösungen (steril) zur DNS-Isolation nach Murray und Thompson (1980)**

---

70 % (v/v) Ethanol

5 M NaCl-Lösung

10 % (w/v) Sodiumdodecylsulfat-Lösung

10 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid/0,7 M NaCl-Lösung

TE-Puffer (10 mM TRIS/HCl (pH 8,0) + 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA)

24:1 (v/v) CH<sub>3</sub>Cl/Isoamylalkohol-Lösung

5 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,5)

20 mg/ml (w/v) Proteinase K-Lösung

2,5 mg/ml (w/v) Glycogen-Lösung

---

Zur Kontrolle wurden 7 µl DNS-Extrakt mit 7 µl 6 x Ladepuffer (Merck, Darmstadt) in eine 0,8 % Agarose-Gelelektrophorese mit einer Spannung von 110 Volt eingesetzt. Als Laufmittel diente 5 x TBE-Puffer (Tab. 8; Peacock und Dingman, 1968). Zur Kontrolle wurde ein 1 kB DNS-Marker (Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Gemisch aus 7 µl H<sub>2</sub>O (dest.) mit 7 µl 6x Ladepuffer.

## Materialien und Methoden

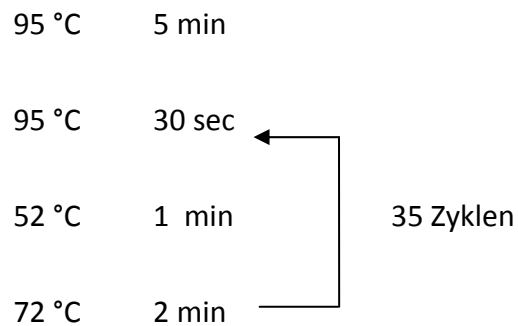
---

Tab. 8: 5 x TRIS-Borat-EDTA-Puffer (TBE; Peacock and Dingman, 1968)

TRIS	54,0 g/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	27,5 g/l
Na <sub>2</sub> -EDTA	7,5 g/l

### 2.4.2 Identifikation des Isolates

Zur Identifikation des Stammes wurden die universellen eubakteriellen 16S rRNA-Primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') und 1492R (5'-GGTTTACCTTGTTACGACTT-3'; Lane, 1991) verwendet. Die PCR wurde mit isolierter chromosomaler DNS in einem 25 µl-Ansatz (Tab. 9) mittels eines Thermozyklers (Thermocycler T Gradient, Biometra, Göttingen, Deutschland) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:



## Materialien und Methoden

---

Tab. 9: PCR-Ansatz zum Amplifizieren der isolierten 16S rRNA

10 x PCR-Puffer	2,5 µl
dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM)	0,25 µl
Primer 27F	10 pmol
Primer 1492R	10 pmol
Template	1 µl
Taq-Polymerase	1,25 U
MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
H <sub>2</sub> O (dest.)	ad. 25 µl

---

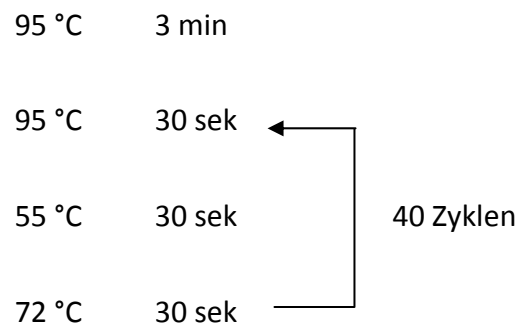
Die amplifizierte 16S rRNA-Sequenz (2 µl + 5 µl 6x Ladepuffer) wurde in einer 1 % Agarose-Gelelektrophorese mit 5 x TBE-Puffer (Tab. 8) als Laufmittel bei einer Spannung von 110 Volt aufgetrennt und von der Firma MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Datenbank des National Centers for Biotechnology Information (NCBI; Bethesda, Maryland, USA), mit Hilfe des Basic Local Alignment Search Tools (BLAST; Altschul et al. 1990), abgeglichen. Alle weiteren Versuche zum Arsenumsatz mit Reinkulturen wurden mit dem isolierten Bakterienstamm, der aufgrund seiner 16S rRNA-Sequenz als *Pseudomonas putida* WB (WB = „West Bengal“) identifiziert wurde, durchgeführt. Die Gensequenz wurde beim Europäischen Molekularbiologischen Labor (EMBL; Heidelberg, Deutschland) unter der Inventarnummer FN6886776 und der Stamm bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) unter der Inventarnummer DSM 23849 hinterlegt.

Um die Klassifikation als *P. putida* zu validieren, wurde der Stamm mikroskopisch und mit Gram-Färbung untersucht, sowie auf Katalase-Oxidase-Aktivität getestet. Zusätzlich wurde die Biomasse-Produktion, wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, während des Wachstums gemessen.



### 2.4.3 Identifikation der *ArsC*- und *arrA*-Gene

Zum Nachweis der genetischen Fähigkeit des Stammes zur Detoxifikation und/oder Respiration von Arsenat durch Arsenat-Reduktasen, wurden *ArsC*- und *arrA*-Gene isoliert. Das *ArsC*-Gen von *P. putida* WB wurde mit den Primern *amlt-42-f* (3'-TCGCGTAATACGCTGGAGAT-5') und *amlt-376-r* (3'-ACTTTCTCGCCGTCTTCCTT-5'); Sun et al. 2004) in einem 25 µl PCR-Ansatz (Tab. 10) unter folgenden Bedingungen amplifiziert:



Tab. 10: PCR-Ansatz zum Amplifizieren des *ArsC*-Genes

---

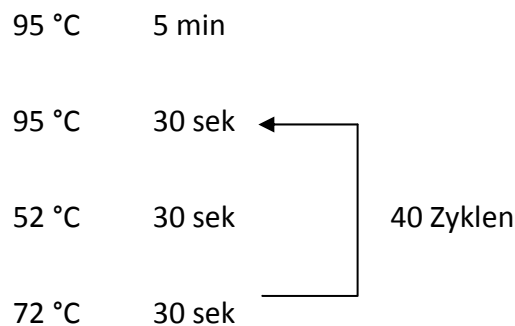
10 x PCR-Puffer	2,5 µl
dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM)	0,25 µl
Primer <i>amlt-42-f</i>	10 pmol
Primer <i>amlt-376-r</i>	10 pmol
Template	2 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	1,25 U
MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
H <sub>2</sub> O (dest.)	ad. 25 µl

---

## Materialien und Methoden

---

Zum Amplifizieren des respiratorischen *arrA*-Gens dienten die Primer *arrAfor* (3'-TTATTCCAGGGAAGATG-5') und *arrArev* (3'-TCTTTAAGCGGGGAATTC-5'; Malasarn et al. 2004). Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes entsprach, mit Ausnahme der unterschiedlichen Primer, der des Ansatzes für das *ArsC*-Gen (Tab. 10). Folgende Bedingungen wurden gewählt:



Die amplifizierte DNS (2 µl + 5 µl 6x Ladebuffer) wurde in einer 1 % Agarose-Gelelektrophorese mit 5 x TBE-Puffer (Tab. 8) als Laufmittel bei einer Spannung von 110 Volt aufgetrennt. Als Referenz dienten die *arrA*- bzw. *ArsC*-Gene aus *Pseudomonas putida* DSM 291 und *Desulfosporosinus auripigmenti* DSM 13351.

## 2.5 Nachweis organischer Substanzen

### 2.5.1 DOC

Der Gehalt an gelöstem organischem Kohlenstoff (DOC) wurde mit einem Kohlenstoff/Stickstoff-Analysator (highTOC, Elementar, Hanau, Deutschland) bestimmt. Die ungefilterten Proben (50 ml) wurden mit 1 ml 0,8 %iger Salzsäure versetzt und fünf Minuten mit reinem Sauerstoff begast um sämtliches CO<sub>2</sub> auszublasen und somit einen Fehler, aufgrund des anorganischen gelösten Kohlenstoffs, zu vermeiden. Die Verbrennung erfolgte bei 1050 °C mit Sauerstoff (600 ml/min) als Trägergas. Die Detektion erfolgte mittels eines

Infrarot-Spektrometers. Die Kalibration erfolgte mit einem Gemisch aus 1260,7 mg/l TRIS und 4412,2 mg/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in einem Bereich von 0,5 – 500 mg/l. Die Auswertung erfolgte automatisch mit einer Software (WinhighTOC®, Elementar).

### 2.5.2 Glucose

Der Nachweis von Glucose beruht auf einer kolorimetrischen Methode nach Miller (1959). Dazu wurden 250 µl des Überstandes der zuvor zentrifugierten Probe (12 000 g/3 min) mit 250 µl H<sub>2</sub>O (dest.) gemischt und 1,5 ml des in Tab. 11 beschriebenen Reagenz zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei 100 °C und dem Abkühlen des Gemisches wurden 3 ml H<sub>2</sub>O (dest.) hinzugegeben und die Extinktion bei 550 nm mit einem Spektrometer (Ultrospec II 4050, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) bestimmt. Die Konzentration wurde über eine zuvor erstellte Eichkurve mit Glucose (0-1000 mg/l) bestimmt.

Tab. 11: Reagenz zum Nachweis von Glucose nach Miller (1959)

Dinitrosalycilsäure	10,0 g/l
Na-K-Tatrat	200,0 g/l
Phenol	2,0 g/l
NaOH	10,0 g/l
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	0,5 g/l

### 2.5.3 Lactat

Die Bestimmung des D- und L-Lactats erfolgte mittels eines Test-Kits (Boehringer, Mannheim, Deutschland), mit dem Prinzip, dass D- bzw. L-Lactat enzymatisch mit D-Lactat-Dehydrogenase oder L-LDH zu Pyruvat oxidiert wurde, während NAD<sup>+</sup> zu NADH reduziert wurde. Die zum jeweiligen Lactatisomer äquivalente Konzentration von NADH wurde bei 340 nm spektrometrisch gemessen.

### 2.5.4 Saccharose

Die Bestimmung der Saccharose erfolgte mittels eines Test-Kits (Boehringer, Mannheim), mit dem Prinzip, dass die Saccharose mittels einer  $\beta$ -Fructosidase (Invertase) zu D-Glucose und D-Fructose hydrolysiert wird. Zur Bestimmung der Konzentration wird zuvor die Gesamtkonzentration von D-Glucose bestimmt, in dem diese enzymatisch zu D-Gluconat-6-phosphat oxidiert wird und äquivalent NADP<sup>+</sup> zu NADPH reduziert wird, welches bei 340 nm spektrometrisch bestimmt wird. Aus der Differenz der D-Glucose-Konzentration vor und nach enzymatischer Inversion wird der Saccharose-Gehalt bestimmt.

### 2.5.5 Fettsäuren

Fettsäuren (Acetat, Propinat und Butyrat) wurden mit einem Gaschromatograph (Model 437, Chrompack, Frankfurt, Deutschland) mit einer Methode nach Gallert und Winter (1997) bestimmt, der mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) ausgestattet war. Die Verbrennung erfolgte mit einem Wasserstoff-/Sauerstoff-Gemisch mit einer Flussrate von 30 ml/min/250 ml/min. Die Auftrennung der Proben fand in einer 2 m x 1,5 mm Teflon-Säule, gepackt mit Chromosorb 101 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) statt. Als Trägergas diente Stickstoff mit einer Flussrate von 30 ml/min. Zur Analyse wurden die Proben zentrifugiert (12 000 g/5 min), der Überstand 1:2 (v/v) mit 4 %iger Phosphorsäure angesäuert und davon 1  $\mu$ l mit einer Mikro-Injektionsspritze (TM#701, Hamilton, Höchst, Deutschland) auf die Säule aufgetragen. Die Temperatur des Injektors und Detektors betrug 210 °C, die Temperatur des Verbrennungsofens 180 °C. Die Konzentration wurde mit einem zuvor gemessenen 5 mmol/l-Standard über Peak-Flächenvergleich bestimmt.

### 2.6 Nachweis anorganischer Substanzen

#### 2.6.1 Wasserstoff

Die Wasserstoffproduktion wurde ebenfalls mit einem Gaschromatographen (CP 9001, Chrompack) gemessen. Dieser war mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD) ausgerüstet. Als Trennsäule diente eine 1,8 m x 1,5 mm Teflon-Säule (CarboPlot®P7 WLD FS, Chrompack), die mit Poropak N (Sigma-Aldrich) gefüllt war. Als Trägergas diente Stickstoff mit einer Flussrate von 30 ml/min und einem Druck im Gerät von 160 kPa. Die Säulentemperatur betrug 110 °C, die Temperatur des Injektors 250 °C und die des Detektors 220 °C. Die Filamenttemperatur des WLD lag 100 °C über der Temperatur des Detektor-Blocks. Die Probe (100 µl) wurde mit einer gasdichten Injektionspritze (Pressure-Lok®, VICI Precision Sampling, Schenk, Schweiz) injiziert. Die Auswertung erfolgte automatisch mit einer Software (MAESTRO® Chromatography Data System, Gerstel, Müllheim a.d. Ruhr, Deutschland). Als Referenz dienten Standards mit 0 - 100 % Wasserstoff.

#### 2.6.2 Arsen

##### 2.6.2.1 Arsenat und Arsenit in Experimenten mit Reinkultur, Sulfat aus Säulenabläufen

Die Konzentration von Arsenat und Arsenit aus den Experimenten mit der Reinkultur, sowie Sulfat aus Säulenabläufen wurde mittels Ionen-Chromatographie (Dionex ICS-90, Thermo-Fisher Softron, Germering, Deutschland) über eine AS9-HC 4 x 250 mm-Trennsäule (IonPac®, Thermo-Fisher Softron) bestimmt. Als Eluent diente 9 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> mit einer Flussrate von 1 ml/min und 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> als Regenerent. Die Detektion erfolgte mit niedrig gehaltener Leitfähigkeit (AutoSuppression Recycle Mode), mit einer Anfangsleitfähigkeit von 170-177 µS. Zur Analyse wurden alle Proben mit 0,45 µm Zellulose-Acetat-Filter (Whatman, Dassel, Deutschland) gefiltert. Das Probenvolumen zur Analyse betrug 1 ml. Da ICS-90 nur in der Lage war Arsenat zu detektieren, wurden arsenithaltige Proben mit 1 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu Arsenat oxidiert. Die Differenz zur zuvor gemessenen, nicht oxidierten Probe, stellte die Arsenit-Konzentration der Probe dar. Als Referenz und zur Kalibration diente eine

Standardkurve (0-1000 mg/l). Die Auswertung erfolgte automatisch mit einer Software (Dionex Chromeleon® Chromatography Data System Vers. 6.8, Thermo-Fisher).

### 2.6.2.2 Arsen in Ausläufen aus Säulen- und Feld-Experimenten

Da die Detektion von Arsen per Ionen-Chromatographie nur in einem Bereich über 1 mg/l möglich war, wurden Eluate aus Säulenexperimenten mittels Flow Injection Atom Absorption Spectrometry bestimmt, das ein Atomic Absorption Spectrometer (AAS 200, Perkin-Elmer, Rodgau, Deutschland) mit einem Fluss-Injektions-System verbindet (FIAS 400 flow injection system, Perkin-Elmer). Das Messprinzip nach Heinrichs (2000) beruht auf der katalytischen Reduktion von Arsen-Spezies in saurem Milieu, wobei flüchtiges Arsin-Gas ( $\text{AsH}_3$ ) entsteht. Als Reduktionsmittel diente eine Natrium-Borhydrit-Lösung (1 %  $\text{NaBH}_4$  in 0,1 M NaOH). Um eine störungsfreie Messung zu garantieren, wurden die gefilterten Proben (0,45  $\mu\text{m}$  Zellulose-Acetat, Sartorius) zuvor mit einer Lösung aus 10 % Kaliumiodid und 10 % Ascorbinsäure versetzt. Anschließend wurde dem Gemisch 2,4 M HCl zugesetzt. Diese Prozedur diente dazu, sämtliches fünfwertiges Arsen zu dreiwertigem zu reduzieren, da nur dieses zu gasförmigem Arsin reduziert werden kann. 500  $\mu\text{l}$  der so vorbehandelten Proben wurden mit 1,2 M HCl als Trägermaterial durch einen Injektions-Loop in den Reaktionsraum des Fluss-Injektions-Systems gegeben, in welchem die Reduktion zu  $\text{AsH}_3$  mit  $\text{NaBH}_4$  stattfand. Das entstandene  $\text{AsH}_3$  wurde anschließend automatisch in ein Gas-/Flüssigkeits-Separator und von dort, mit Argon als Trägergas, in das AAS überführt und bei 900 °C atomisiert. Die Detektion fand spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 193,7 nm statt. Als Lichtquelle diente eine elektrodenlose Entladungslampe (ELD), als Detektor ein Halbleiterdetektor. Als Referenz und zur Kalibration diente eine Arsen-Standardkurve (0,1 - 20  $\mu\text{g/l}$ ), die mit einer vorgefertigten Arsen-Standard-Lösung (Bernd Kraft, Duisburg, Deutschland), mit einer Konzentration von 1 g/l, hergestellt wurde. Die untere, störungsfreie Detektionsgrenze lag bei  $\sim 0,3 \mu\text{g/l}$ . Die Auswertung erfolgte automatisch mit einer Software (WinLab32® for AAS, Perkin-Elmer).

### 2.6.3 Eisen und Mangan

Die Bestimmung von Eisen und Mangan wurde durch optische Emissionsspektrometrie nach Anregung im induktiv gekoppelten Plasma (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES, Modell 715-es, Varian, Palo Alto, USA) nach DIN ISO EN 11885 (2009) durchgeführt. Das Messprinzip beruht auf der Zerstäubung der Probe zu einem Aerosol, das in ein Hochfrequenzplasma (Trägergas Argon mit einer Flussrate von 1,5 l/min) eingebracht wird, dort atomisiert, die spezifischen Wellenlängen eines Stoffes polychromatisch zerlegt und radial detektiert wird. Die Wellenlänge für Eisen betrug 238,204 nm und für Mangan 285,213 nm, respektive. Für die Analyse wurden die gefilterten Proben (0,45 µm, Zellulose-Acetat, Sartorius) mit 100 µl konzentrierter Salpetersäure (Suprapur-Grad) angesäuert. Als Referenz und zur Kalibration diente eine Standardkurve (0,1 -20 mg/l), die mit einer vorgefertigten Mehrelemente-Standard-Lösung (Bernd Kraft) hergestellt wurde. Die untere, störungsfreie Detektionsgrenze lag bei 0,9 µg/l für Eisen, bzw. 0,15 µg/l für Mangan. Die Auswertung erfolgte automatisch mit einer Software (ICP Expert® II, Varian).

## 2.7 Erhalt von Bohrkernen und Bestimmung diverser Bodenparameter

### 2.7.1 Erhalt von Bohrkernen

Im Mai 2008 wurde in den ausgewählten Untersuchungsbielen Sedimentkerne mittels Schlagbohrung gewonnen (Abb. 7). Um unkontaminierte Bohrkernkerne zu erhalten, wurden in das Bohrgestänge gasdichte PVC-Röhren mit einer Länge von jeweils 0,65 m, welche zuvor mit einer Desinfektionsflüssigkeit (Sterillium®, Bode-Chemie, Hamburg, Deutschland) desinfiziert wurden, gegeben. Diese wurden unmittelbar nach der Entnahme mit Stickstoff (99,99 % N<sub>2</sub>) durch 0,45 µm Sterilfilter (Sartorius) begast, mit gasdichten Plastikkappen verschlossen und mit wasserdichtem Klebeband (tesa® Aluminium Tape, Tesa, Hamburg, Deutschland) versiegelt (Abb. 8). Die Probenahme der so behandelten Bohrkernkerne erfolgte in einer Tiefe von 9,8 – 12 m, um unter der Grundwassergrenze zu bleiben, die mittels eines Lichtlots bestimmt wurde. Auf Site A betrug die Grenze 3,35 m und auf Site B 2,9 m.



**Abb. 7: Schlagbohrung zum Erhalt von Sedimentproben.** Das Bohrgestänge mit den enthaltenen PVC-Röhren wurde mittels eines Gewichts (ca. 50 kg), das auf ein Gegengewicht am oberen Ende des Bohrgestänges geschlagen wurde, bis zu einer Tiefe von 12 m getrieben.



**Abb. 8: Bohrgestänge mit enthaltener PVC-Röhre.** Die PVC-Röhre wurde vor der Probenahme sterilisiert und unmittelbar nach der Entnahme mit  $N_2$  begast, mit Plastikkappen verschlossen und versiegelt.



### 2.7.2 Bestimmung von diversen Bodenparametern

Zur Analyse der Korngröße und des Arsengehalts wurden 100 g der erhaltenen Sedimentproben bei 105 °C für 48 Stunden getrocknet. Die Korngröße wurde mit Hilfe von Edelstahlsieben (Retsch, Haan, Deutschland) bestimmt. Zur Bestimmung des Arsengehalts wurden 250 mg des Sediments mit 3 ml H<sub>2</sub>O (dest.), 5 ml konzentrierter Salpetersäure (65 %), 1 ml Wasserstoffperoxid (30 %) und 0,5 ml Flusssäure (40 %) versetzt. Nach Erhitzung in einer Labor-Mikrowelle (MW System Start 1500, MLS, Leutkirch, Deutschland) mit einem Programm, das in Tabelle 12 beschrieben ist, wurden die Proben in Teflon-Gefäße überführt und zum Abrauchen der verbliebenen Flusssäure bei 200 °C weiter erhitzt. Nachdem die Lösung bis zu einem kleinen Tropfen evaporiert war, wurden 2 ml 1 %ige HNO<sub>3</sub> zugegeben. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurde die Lösung zur Analyse des Arsengehalts per FIAAS, wie in Abschnitt 2.6.2.2 beschrieben, mit 25 ml 1 %iger HNO<sub>3</sub> (Suprapur) aufgefüllt. Der Arsengehalt betrug 2,1 mg/kg auf Site A und 1,7 mg/kg auf Site B.

Die Bestimmung der Porosität erfolgte nach DIN 18125-1 (1997). Dazu wurde zuerst die Dichte des zuvor bei 105 °C bis zu Gewichtskonstanz getrockneten Sediments mit einem Pyknometer bestimmt. Die Dichte lag bei ca. 2,8 g/cm<sup>3</sup>. Die Porosität wurde aus der Differenz des über die Dichte des Sediments berechneten Volumen und des Schüttvolumens von Sediment mit einer bekannten Trockenmasse in einem Messzylinder berechnet und betrug ca. 50 % ( $\Phi = 0,5$ ). Die Bestimmung der Sedimentfarbe erfolgte mittels des Munsell-Farbsystems direkt nach der Bohrung, um einen Einfluss aufgrund der Oxidation der Sedimente zu vermeiden. Auf Site A (10YR 4/1) und Site B (2,5Y 4/0) war die Farbe jeweils dunkelgrau, aufgrund der reduzierenden Verhältnisse.

Zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl wurde 1 g des feuchten Sediments in 100 ml physiologischer Kochsalzlösung (0,9 %) gegeben und geschüttelt. Davon wurden drei Verdünnungsschritte gemacht (je 1:10 (v/v)). Die weitere Bestimmung erfolgte wie in Abschnitt 2.2 beschrieben, in dem jeweils 100 µl jeder Verdünnung auf DEV-Nähragar (Tab. 3) oder Endo-Agar (Tab. 4) ausgestrichen, inkubiert und die Kolonien ausgezählt wurden.

## Materialien und Methoden

Tab. 12: Mikrowellen-Programm zum Säure-Auflschluss der Sedimentproben

700 Watt	3 min	75 °C
650 Watt	8 min	130 °C
1000 Watt	10 min	200 °C
1000 Watt	12 min	200 °C

### 2.8 Säulenexperimente

Um die mikrobielle Mobilisierung von Arsen in den Untersuchungsgebieten zu studieren, wurden Glas-Säulen (Länge 18 cm, Durchmesser 5 cm) mit  $200 \pm 5$  g des homogenisierten Sediments (12 cm Füllhöhe), getrennt nach Site A und B, befüllt. Die Säulen wurden nach dem Prinzip eines Up-Flow Batch-Bed-Systems betrieben (Abb. 9). Die hydraulische Retentionszeit betrug 1,5 Tage, was einem Ausfluss von 67 ml pro 100 ml Porenvolumen (50 % Porosität) oder 12 cm Wasserfluss pro Tag entspricht, bzw. 43 m Grundwasserfluss pro Jahr.

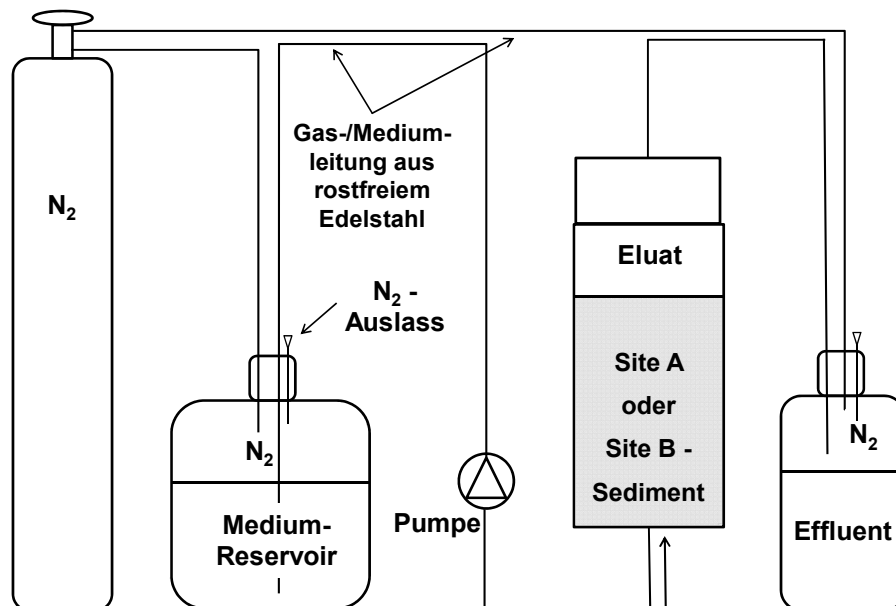


Abb. 9: Schematischer Aufbau des Säulenexperiments. Die Säulen, das Medium-Reservoir, sowie die Leitungen wurden vor Start des Experiments autoklaviert (120 °C, 60 min.) und mit Gummistopfen versiegelt, um das Eindringen von Umgebungsluft zu verhindern.

## Materialien und Methoden

---

Zur mikrobiellen Anregung wurden alle Säulen mit einem veränderten Medium nach Angle et al. (1991), das einer typischen Grundwasserzusammensetzung nachempfunden ist (Tab. 13), beschickt. In dem Medium wurden auf sämtliche sulfat- und nitrathaltigen Verbindungen durch entsprechende Chloride ersetzt, um eine Reaktion mit dem im Sediment enthaltenen Eisen und Arsen zu vermeiden. Im weiteren Verlauf wird das Medium mit SSC-Medium (Soil Solution Concentration) bezeichnet. Das Medium wurde zuvor anaerobisiert (99 % N<sub>2</sub>) und autoklaviert (120 °C, 60 min.) und der pH-Wert auf 6,8 eingestellt.

**Tab. 13: Grundmedium (SSC) nach Angle et al. (1991) zur Beschickung der Säulen (verändert).** Das Medium entspricht einer typischen Grundwasserzusammensetzung. Kohlenstoffquellen wurden zusätzlich zugesetzt und variieren in den einzelnen Säulenexperimenten.

---

NH <sub>4</sub> Cl	0,20 g/l
KCl	0,19 g/l
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,53 g/l
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,41 g/l

---

Das Medium wurde mit jeweils 1 ml/l steril gefilterter (0,45 µm Zellulose-Nitrat, Sartorius), anaerober Spurenelementlösung (1000x) nach Rabus und Widdel (1995; Tab. 14) und 1 ml/l einer anaeroben Vitaminlösung VL 7 (1000x) nach Pfennig (1978; Tab. 15) vervollständigt. Die Spurenelementlösung wurde leicht abgeändert, indem auf den hohen FeSO<sub>4</sub>-Gehalt (2,1 g/l) verzichtet wurde, um eine ungewollte Interaktion mit dem in den Sedimenten enthaltenen Arsen und Eisen zu vermeiden. Die Säulenabläufe wurden täglich in sterilisierten und mit Stickstoff begasten Glasgefäßen gesammelt (Abb. 4).

## Materialien und Methoden

---

**Tab. 14: Spurenelementlösung (1000x) nach Rabus und Widdel (1995), verändert.** Nach Lösen der Salze wurde der pH-Wert auf 6,5 eingestellt. Auf FeSO<sub>4</sub> sowie EDTA als dessen Chelator wurde verzichtet.

---

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,03 g/l
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,10 g/l
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,19 g/l
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,024 g/l
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,029 g/l
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,144 g/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,036 g/l

---

**Tab. 15: Vitaminlösung VL 7 (1000x) nach Pfennig (1978).** Die Lösung wurde bei 4 °C unter Lichtausschluss gelagert.

---

Cyanocobalamin	0,10 g/l
Pyridoxinhydrochlorid	0,30 g/l
Thiamindichlorid	0,20 g/l
Ca-D(+)-Pantothenat	0,10 g/l
Nikotinsäure	0,20 g/l
4-Aminobenzoessäure	0,08 g/l
D(+)-Biotin	0,02 g/l

---

## Materialien und Methoden

---

Die Säulen mit dem jeweiligen Sediment aus Site A oder B wurden unter unterschiedlichen Bedingungen betrieben. Das erste Set wurde als „in Situ“-Kontrolle ausschließlich mit dem SSC-Medium (Tab. 13) betrieben, um die Mobilisierung von Arsen unter natürlichen Bedingungen zu simulieren. Ein zweites Set wurde mit 10 ml ( $OD_{578} = 1,2$ ) des isolierten *P. putida* WB beimpft und ebenfalls mit dem SSC-Medium ohne zusätzliche Kohlenstoffquelle betrieben. Dem dritten Set wurden 0,45 g/l L-Lactat zur Anregung der autochthonen Mikrobiologie in den Sedimenten zugegeben. In einem weiteren Set wurden dem Grundmedium neben 0,45 g/l L-Lactat zusätzlich 0,71 g/l Sulfat zugegeben, um eine stärkere Anregung von arsenatreduzierenden Bakterien zu erreichen, aufgrund des bekannten Mechanismus, dass viele Sulfatreduzierer in der Lage sind Arsenat simultan zu Sulfat zu reduzieren (z.B. Newmann et al. 1997a; Sorokin et al. 2012). Zusätzlich wurden zwei weitere Sets unter den gleichen Bedingungen (L-Lactat  $\pm$  Sulfat) mit *P. putida* WB beimpft. Zur Inokulation der Säulen mit *P. putida* WB wurden 10 ml der Zell-Suspension in 50 ml des SSC-Mediums gemixt, in die Säulen gepumpt und ein Tag ruhen gelassen, damit die Kultur in den Sedimenten anwachsen konnte. Als Kontrolle dienten autoklavierte Säulen (120 °C, 60 min.), die mit dem SSC-Medium ohne eine Kohlenstoffquelle beschickt wurden.

Nach dem die Arsen-Mobilisierung nach 110 Tagen stagnierte, wurden den Kontrollen ohne Kohlenstoffquelle 0,23 g/l Ethanol zugegeben, um die Mobilisierung unter naturnahen Bedingungen zu simulieren, da in Ökosystemen Zucker in der Regel zu Ethanol reduziert werden. Um den Einfluss von Saccharose auf die Arsen-Mobilisierung zu testen, wurde zusätzlich ein neues Experiment mit 1,71 g/l Saccharose  $\pm$  *P. putida* WB in den Site B-Sedimenten durchgeführt (Tab. 16).

Alle benötigten Komponenten für die Säulenexperimente wurden zuvor autoklaviert (120 °C, 60 min.) und bei Gebrauch steril behandelt.

## Materialien und Methoden

---

**Tab. 16: Übersicht über die Säulenexperimente.** Die verschiedenen Säulen wurden mit SSC-Medium  $\pm$  Kohlenstoffquelle  $\pm$  Sulfat beschickt. Die Abkürzungen ergeben sich aus dem Untersuchungsgebiet (A = Site A, B = Site B) und der C-Quelle (L = Lactat, E = Ethanol, S = Saccharose).

---

SSC	A1/B1
SSC, sterile Kontrolle	AC/BC
SSC, <i>P. putida</i> WB	AL2/BL2
SSC, Lactat	AL3/BL3
SSC, Lactat, <i>P. putida</i> WB	AL4/BL4
SSC, Lactat, Sulfat	AL5/BL5
SSC, Lactat, Sulfat, <i>P. putida</i> WB	AL6/BL6
SSC, Ethanol	AE1/BE1
SSC, Ethanol, <i>P. Putida</i> WB	AE2/BE2
SSC, Ethanol, Sulfat	AE3/BE3
SSC, Ethanol, Sulfat, <i>P. putida</i> WB	AE4/BE4
SSC, Saccharose	BS1
SSC, Saccharose, Sulfat	BS2

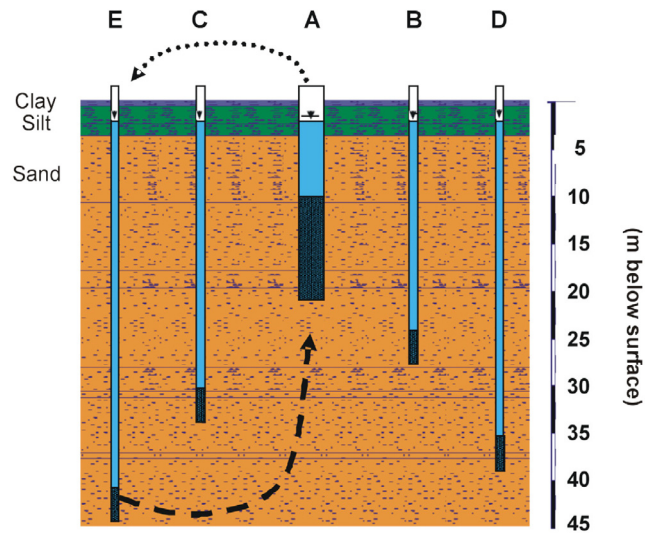
---

### 2.9 Feldversuch

Zur Validierung der Laborergebnisse zur Freisetzung des Arsens in Sedimenten aus dem Untersuchungsgebiet wurde im Rahmen des Projektes ein Feldversuch durchgeführt, der in der Dissertation von H. Neidhardt (2012) veröffentlicht wurde. Dabei wurden um das Bohrloch („Well A“) der Site B rautenförmig Piezometer verschiedener Tiefe angelegt („Well B-E“; Abb. 18; Neidhardt, 2012) und Saccharose als einfach abbaubare, nicht reduzierende Kohlenstoffquelle (Pérez, 1995) in jeweils 30 l des zuvor gewonnen Grundwassers gelöst und nach und nach in die Wells B-E injiziert. Jeweils 4 kg gelöste Saccharose wurden in Well B und E injiziert und in Well C und D jeweils 2 kg. Zur Durchmischung wurde das Grundwasser zirkulär mit 70 l/min gepumpt (Abb. 18; Neidhardt, 2012) und mit einer kolorimetrischen Methode nach Whitehead und Bradbury (1950) das Vorhandensein von Saccharose überprüft (Abb. 19). Nach dem zirkulären Pumpen von insgesamt 1200 l Grundwasser, wurden im Zeitraum von 14 Tagen alle zwei Tage Proben zur späteren Untersuchung

## Materialien und Methoden

genommen. Die anschließende Messung aller organischen Parameter (Saccharose, Fettsäuren, Mikrobiologie) fand im Institut für Ingenieurbiologie und Biotechnologie des Abwassers am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), statt, Arsen und Eisen wurden am Institut für Mineralogie und Geochemie des KIT bestimmt.



**Abb. 10: Schematische Anordnung der Wells A-E und zirkuläres Pumpschemata für die Saccharoseinjektion (Neidhardt, 2012).** Das zirkuläre Pumpen wurde jeweils für Well B-E durchgeführt.



**Abb. 11: Qualitativer Nachweis von Saccharose nach Whitehead und Bradbury (1950).** Unter alkalischen Bedingungen wird in Anwesenheit von Saccharose mit  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$  ein Co-Saccharose-Komplex gebildet, der als blauer Niederschlag ausfällt.

### III. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse aus den unterschiedlichen Experimenten präsentiert. Im ersten Teil werden die Untersuchungen zum Umsatz von Arsen mit der isolierten Reinkultur aufgeführt, im zweiten Teil die Versuche zur Freisetzung des Arsens aus den Sedimentproben mittels Säulenexperimenten und in einem dritten Teil ein Feldversuch zur Validierung.

#### 1. Experimente mit der isolierten Reinkultur aus Grundwasserproben

Reinkulturen von Bakterien aus Grundwasserproben des Untersuchungsgebietes wurden mit klassischen Anreicherungs- und Ausstrichmethoden erhalten. Die Gattungs- und Artzugehörigkeit wurde an Hand der Sequenz des 16S rRNA-Genes der Isolate analysiert (Kapitel 1.1). In physiologischen Versuchen wurde das aerobe und anaerobe Wachstum des ausgewählten Isolates, *Pseudomonas putida* WB und der Stoffwechsel mit verschiedenen Substraten mit Arsenverbindungen als Elektronenmediatoren analysiert (Kapitel 1.2.1 bis 1.2.4).

##### 1.1 Klassifizierung des ausgewählten Isolates „WB“ als *Pseudomonas putida* WB

Die 16S rRNA-Sequenz des isolierten Stammes „WB“ wurde mit den universellen Primern 27F und 1492R (Lane, 1991) mittels PCR analysiert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der Datenbank des National Centers for Biotechnology Information (NCBI; Bethesda, Maryland, USA), mit Hilfe des Basic Local Alignment Search Tools (BLAST; Altschul et al. 1990), abgeglichen. Die Sequenz war zu 100 % identisch mit *P. putida* KT2440 und zu 99 % identisch mit verschiedenen anderen *P. putida*-Stämmen (Tab. 17). Aufgrund dessen wurde das Isolat „WB“ als *Pseudomonas putida* WB beschrieben.



## Ergebnisse

Tab. 17: Ergebnis des Abgleichs der NCBI-Datenbank mittels BLAST (Altschul et al., 1990) zum Vergleich der 16S rRNA-Sequenz des Isolates *Pseudomonas putida* WB (Inventar-Nr. FN686776) mit anderen 16S rRNA-Sequenzen verschiedener *P. putida*-Stämme.

Organismus	Inventar-Nr.	Identität
<i>P. putida</i> KT2440, komplettes Genom	AE015451.1	100 %
<i>P. putida</i> WAB1869, partielle 16S rRNA-Sequenz	AM184211.1	99 %
<i>P. putida</i> CUG LPA11, partielle 16S rRNA-Sequenz	EU443615.1	99 %
<i>P. putida</i> KNUC292, partielle 16S rRNA-Sequenz	EU239202.1	99 %
<i>P. putida</i> D1, partielle 16S rRNA-Sequenz	EU878238.1	99 %
<i>P. putida</i> BF-S5, partielle 16S rRNA-Sequenz	EU857418.1	99 %
<i>Pseudomonas</i> sp. benan-1, partielle 16S rRNA-Sequenz	EU313808.1	99 %

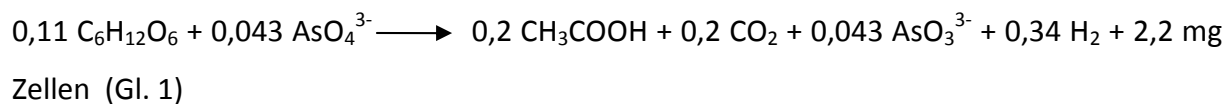
### 1.2 Physiologische Parameter von *Pseudomonas putida* WB

Zur Validierung des Ergebnisses der Analyse der 16S rRNA-Sequenz wurden verschiedene physiologische Parameter bestimmt. Dabei erfüllte *P. putida* WB alle typischen Parameter des Genus *Pseudomonas*: Die 1-1,5 x 2-3 µm großen, stäbchenförmigen Zellen waren Gram-negativ, beweglich und bildete keine Sporen. In den Katalase- und Oxidase-Tests reagierten sie positiv. Bei einer idealen Wachstumstemperatur von 27 °C wies *P. putida* WB mit Glucose als Substrat eine Verdopplungszeit von 25 Stunden auf. In anaeroben 20 ml-Flüssigkulturen erhielt man 2,2 mg Zellen (Trockengewicht) pro 20 ml Medium bei einer optischen Dichte  $OD_{578} = 1,2$ .

### 1.2.1 Anaerobes Wachstum von *P. putida* WB mit Glucose

Das Wachstum von *P. putida* WB unter anaeroben Bedingungen mit 1 g/l Glucose als Substrat und 0,695 g/l Arsenat als Elektronenakzeptor verlief exponentiell. Dabei wurden 2 mol Acetat pro mol Glucose gebildet. Parallel wurde Arsenat zu Arsenit reduziert und geringfügige Mengen an Wasserstoff gebildet (Abb. 12 a-c). Ohne Arsenat fand kein Wachstum statt. Während des anaeroben Wachstums auf Glucose wurden pro 20 ml-Ansatz 0,11 mmol Glucose und 0,043 mmol Arsenat, bei einer End-OD<sub>578</sub> von 1,2, nach 100 Stunden metabolisiert. Mit 2,2 mg Zelltrochgewicht pro 20 ml-Kultur (siehe oben) errechnet sich ein molarer Substratertragskoeffizient von 20 g Zellen pro mol Glucose, ein typischer Wert für anaerobes Wachstum. Durchschnittlich wurden 0,2 mmol Acetat pro 0,11 mmol Glucose gebildet. Arsenat wurde unter Bildung von ± 0,3 mmol Wasserstoff komplett zu Arsenit reduziert.

Mit diesen Ergebnissen ergab sich die in Gleichung 1 angegebene Stöchiometrie für den anaeroben Glucoseumsatz in Gegenwart von Arsenat, bei der angenommen wurde, dass 1 mol Acetat aus der Pyruvat-Decarboxylierung 1 mol CO<sub>2</sub> ergeben.

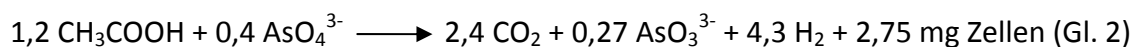


Nach der vollständigen Oxidation der Glucose und der vollständigen Reduktion des Arsenats nach 70 – 100 Stunden, konnte nach erneuter Zugabe von Arsenat das Wachstum von *P. putida* WB auf dem vorher gebildeten Acetat stimuliert werden (Abb. 12 b, ab 100 Stunden). Als Kontrolle wurden nach der vollständigen Oxidation des aus der Glucose gebildeten Acetats erneut 0,3 mmol Acetat und 0,043 mmol Arsenat hinzugegeben (Abb. 12 b, nach 140 Stunden), da das zuvor zugegebene Arsenat vollständig zu Arsenit reduziert wurde. Während der Acetat-Oxidation wurde zusätzlich 0,5 mmol Wasserstoff gebildet. Stöchiometrisch ergibt sich somit ein Defizit, was auf Ausgasen von Wasserstoff durch den Gummistopfen des Kulturgefäßes zurückzuführen war. Um ein Ausgasen zu vermeiden, wurde ein neuer Ansatz über Kopf inkubiert. Acetat wurde dreimal nach 60, 120 und 180 Stunden neu hinzugefügt, Arsenat nach 60 und 120 Stunden. Die summierten, gemessenen Konzentrationen von Acetat, Arsenat, Arsenit und Wasserstoff wurden zum Herleiten der stöchiometrischen Gleichung (Gl. 2) genommen. Dabei wurde angenommen, dass aus 1 mol Acetat bei der

## Ergebnisse

---

vollständigen Oxidation 2 mol CO<sub>2</sub> entstanden und der im Medium enthaltene Hefeextrakt zur Bildung der Biomasse verwendet wurde.

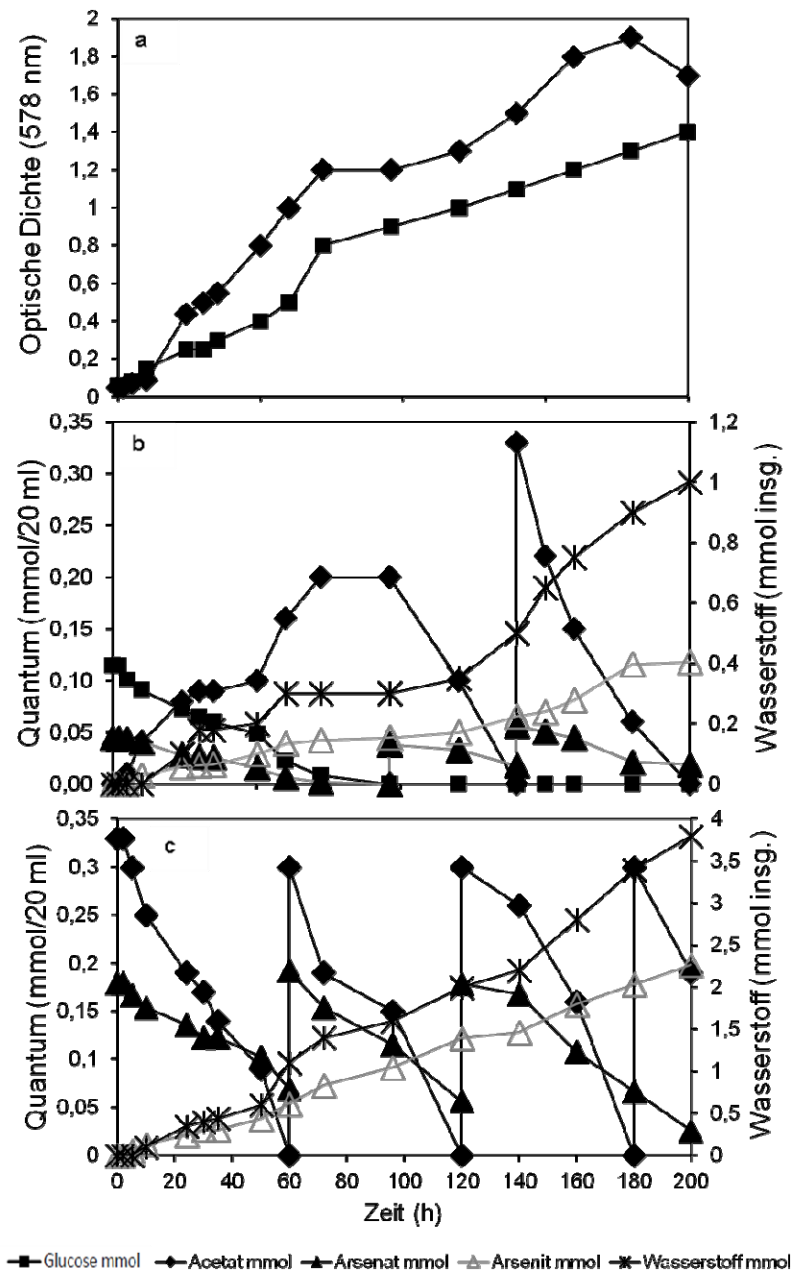


Die Wasserstoffbildung wurde offensichtlich nicht durch das Ansteigen der Wasserstoffkonzentration in der Gasphase beeinträchtigt. Dies lässt darauf schließen, dass der H<sub>2</sub>-Partialdruck keinen Einfluss auf die Wasserstoffproduktion hatte. So wurde nach 240 Stunden aus insgesamt 1,2 mmol Acetat 4,3 mmol Wasserstoff gebildet und 0,4 mmol Arsenat wurden zu 0,27 mmol Arsenit umgesetzt (Abb. 12 c). Die Differenz in der Reduktion des Arsenats ist auf eine unvollständige Oxidation während der Analyse zurückzuführen. Nimmt man an, dass 1,2 mmol Acetat anaerob zu 2,4 mmol CO<sub>2</sub> und theoretisch zu 4,8 mmol H<sub>2</sub> oxidiert wurden, müssen aus der Reduktion von 0,4 mmol Arsenat zu 0,4 mmol Arsenit 4,4 mmol Wasserstoff entstanden sein. Dieser Wert deckt sich gut mit dem gemessenen Wert von 4,3 mmol Wasserstoff.

Nach 200 Stunden wurde eine optische Dichte von 1,5 erreicht (Abb. 12 a), was einer Trockenmasse von 2,75 mg Zellen pro 20 ml-Ansatz entsprach. Nimmt man einen molaren Energiekoeffizienten von  $Y_{\text{ATP}} = 10 \text{ g/mol ATP}$ , entsprechen 2,75 mg Zellen 0,275 mmol ATP, welches aus der Reduktion von Arsenat zu Arsenit mit der respiratorischen Arsenat-Reduktase *arrA* gebildet werden musste. Daraus würde sich ein molarer Energieertragskoeffizient von  $Y_{\text{Arsenat}} = 6,9 \text{ g Zellen/mol Arsenat}$  ergeben.

Um die erhaltenen Daten zu validieren, wurde ein Kontrollexperiment mit *P. putida* DSM 291 unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Aufgrund identischer Ergebnisse sind die Daten hier nicht aufgeführt.

## Ergebnisse

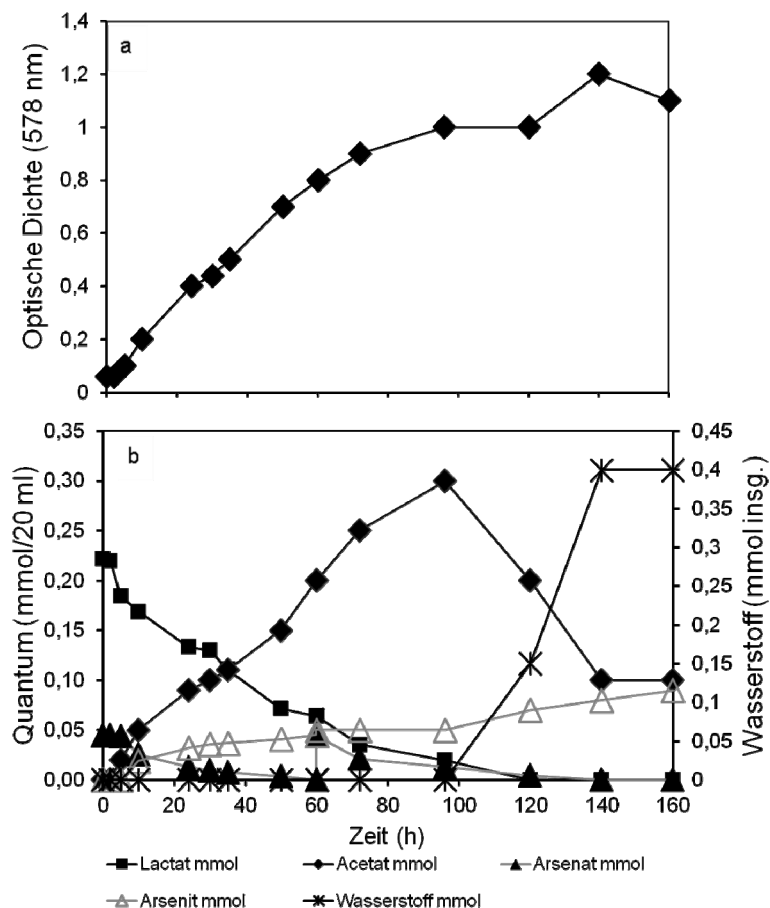


**Abb. 12 a,b,c:** Anaerobes Wachstum auf Glucose (Rauten) und Acetat (Quader) (a), sowie Glucose- (b) und Acetat- (c) Metabolismus von *P. putida* WB mit Arsenat. Arsenat wurde zu Arsenit reduziert, während Glucose zu Acetat, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> oxidiert wurde. Acetat aus Glucose (b) oder externer Quelle (c) konnte nur in Anwesenheit von Arsenat zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> oxidiert werden. CO<sub>2</sub> wurde nicht quantifiziert.

## Ergebnisse

### 1.2.2 Anaerobes Wachstum von *P. putida* WB mit Lactat

Um das Wachstum von *P. putida* WB auf einem anderen Substrat als Glucose oder Acetat zu testen, wurde 0,2 mmol Lactat als einzige Kohlenstoffquelle eingesetzt. Als Elektronenakzeptor diente, wie schon in den Experimenten mit Glucose, 0,043 mmol Arsenat. Nach dessen vollständiger Reduktion nach 60 Stunden, wurde die gleiche Konzentration an Arsenat nachgeimpft. *P. putida* wuchs auch hier exponentiell bis zu einer optischen Dichte von 1,2, während das Lactat stöchiometrisch zu Acetat decarboxyliert wurde (Abb. 13 a,b).

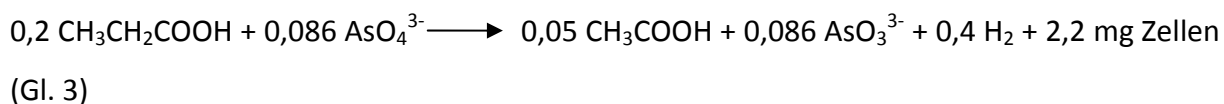


**Abb. 13 a,b:** Anaerobes Wachstum von *P. putida* WB mit Arsenat auf Lactat (a), sowie Lactat-Metabolismus (b). Arsenat wurde nach 60 Stunden nachgeimpft. Das L-Lactat wurde stöchiometrisch zu Acetat decarboxyliert. Acetat wurde weiter zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> oxidiert, solange Arsenat als Elektronenakzeptor vorlag.

## Ergebnisse

---

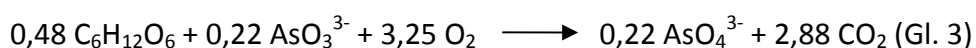
Nach 140 Stunden war das Lactat komplett zu Acetat oxidiert und 0,086 mmol Arsenat zu Arsenit reduziert. Auch in diesem Experiment fand auf Acetat (nach 100 Stunden) weiter Wachstum statt, nachdem Lactat so gut wie verbraucht war. Nach der vollständigen Reduktion des Arsenats fand kein Wachstum mehr statt (Abb. 13 a,b). Aufgrund der vorliegenden Messergebnisse konnte folgende stöchiometrische Gleichung hergeleitet werden (Gl. 3):



Zur Validierung der erhaltenen Daten wurde ein Kontrollexperiment mit *P. putida* DSM 291 unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Aufgrund identischer Ergebnisse wurden die Messergebnisse hier nicht aufgeführt.

### 1.2.3 Aerobes Wachstum von *P. putida* WB mit Glucose

Um den Einfluss von Arsenit auf das aerobe Wachstum von *P. putida* WB zu überprüfen, wurden dem Medium 0,079 mmol Na<sub>2</sub>-Arsenit zugesetzt. Nach 96 Stunden exponentiellem Wachstum wurde eine optische Dichte von 1,6 erreicht, was einer Trockenmasse von 3,3 mg Zellen pro 20 ml-Ansatz entsprach. Insgesamt wurden 0,48 mmol Glucose mit 3,25 mmol Sauerstoff respiratorisch abgebaut (Abb. 14 a,b), während 0,22 mmol Arsenit stöchiometrisch zu Arsenat oxidiert wurde (Gl. 3). Die jeweils benötigte Menge an Sauerstoff wurde anhand der Glucose-Respiration und Arsenitoxidation kalkuliert. In einem Kontrollexperiment ohne Glucose wurde lediglich 0,03 mmol Arsenit oxidiert.



Zur Validierung der erhaltenen Daten wurde ein Kontrollexperiment mit *P. putida* DSM 291 unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Aufgrund identischer Ergebnisse sind die Daten nicht aufgeführt.

## Ergebnisse

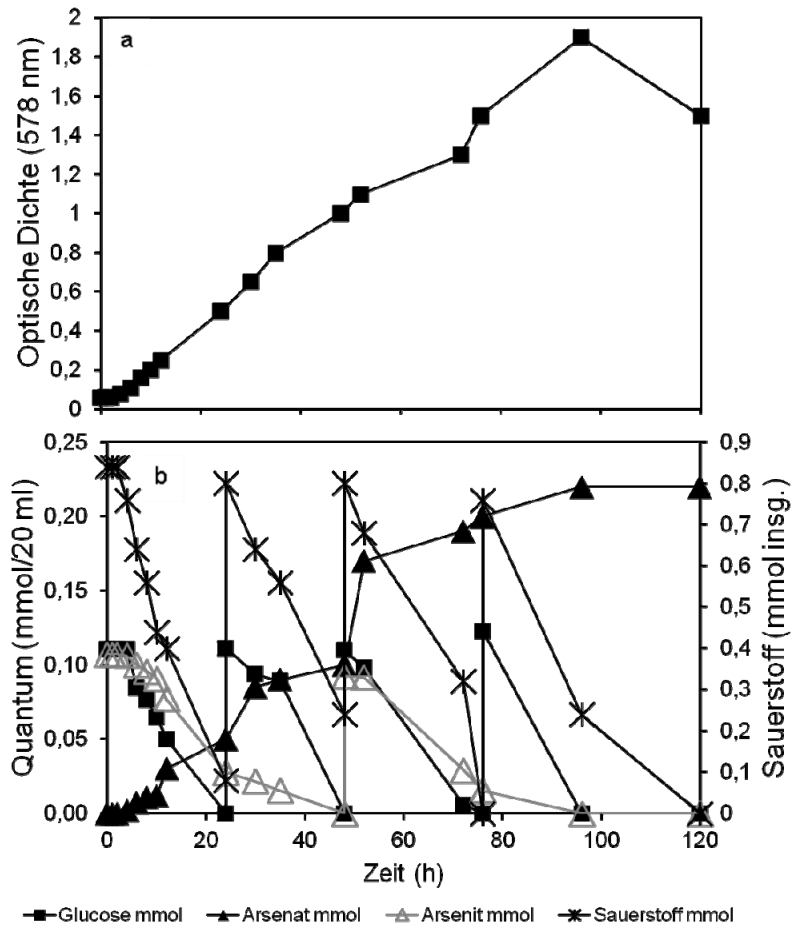
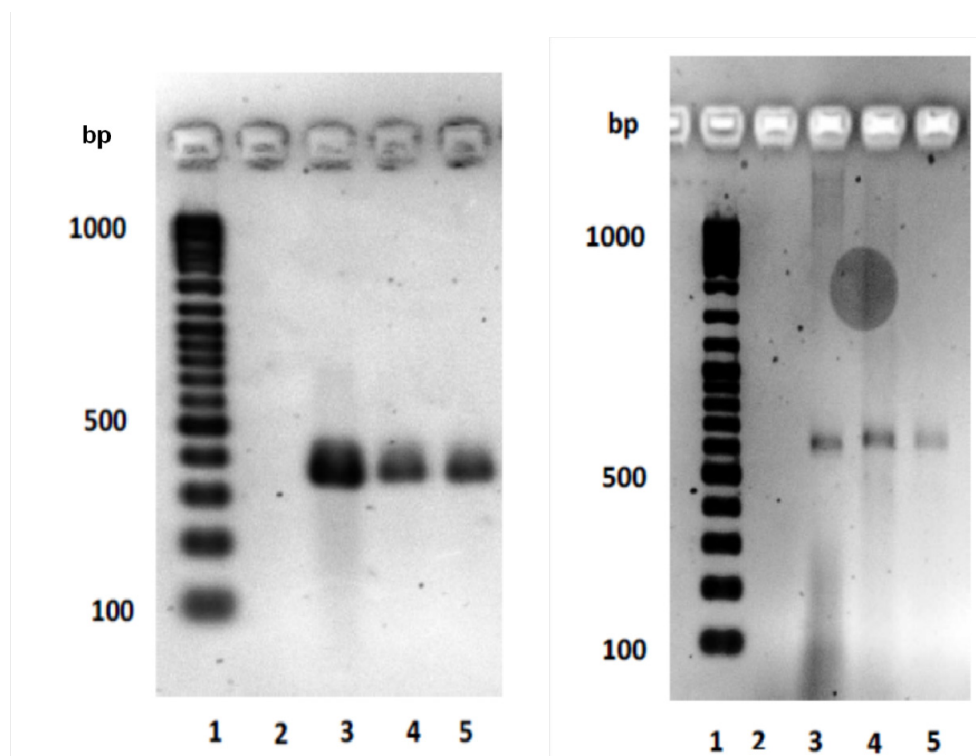


Abb. 14 a,b: Aerobes Wachstum von *P. putida* WB (a) und Glucose-Metabolismus in Gegenwart von Arsenit als Elektronenakzeptor (b).

## Ergebnisse

### 1.2.4 Nachweis der *ArsC*- und *arrA*-Gene

Um die genetische Ausstattung von *P. putida* WB zur Detoxifikation und/oder Respiration von Arsenat nachzuweisen, wurden dessen *ArsC*- und *arrA*-Gene identifiziert. Als Positiv-Kontrollen dienten *Desulfotomaculum auripigmenti*, ein sulfatreduzierendes Bakterium, das in der Lage ist Arsenat zu reduzieren (Newman et al., 1997a) sowie *P. putida* DSM 291. Beide Kontrollstämme, sowie *P. putida* WB zeigten Banden für das *ArsC*- (350 bp), sowie das *arrA*-Gen (620 bp) (Abb. 15).



**Abb. 15:** Agarose-Gele mit den PCR-Produkten der *ArsC*- und *arrA*-Gene von *P. putida* WB und den beiden Referenzstämmen. Bahn 1: DNA-Marker; 2: steriles deionisiertes Wasser; 3: *D. auripigmenti*; 4: *P. putida* DSM 291; 5: *P. putida* WB



### 2. Säulenexperimente

#### 2.1 Gehalte an Fe, As, DOC und Bakterien in Grundwasserproben aus dem Untersuchungsgebiet

Grundwasserproben von 11 Brunnen (Abb. 16) wurden auf deren Eisen-, Arsen- und DOC-Gehalt untersucht. Zusätzlich wurden die Proben auf coliforme Keime, *E. coli* und deren aerobe und anaerobe Gesamtkeimzahl untersucht (Tab. 18). Dabei konnte kein klares Verhältnis zwischen dem Eisen/Arsen/DOC-Gehalt und den mikrobiologischen Parametern festgestellt werden, allerdings korrelierte ein niedriger Eisen- und Arsengehalt mit hohen DOC-Gehalten und umgekehrt. Alle Proben enthielten  $2,8 - 8,1 \times 10^3$  coliforme Keime/ml und  $0 - 2,4 \times 10^3$  *E. coli*/ml, was auf eine fäkale Kontamination der Brunnen hindeutete.



**Abb. 16: Typischer Brunnen zur Probenahme.** Die erhaltenen Proben wurden auf ihren Eisen-, Arsen und DOC-Gehalt untersucht. Zusätzlich wurden mikrobiologische Parameter bestimmt.

## Ergebnisse

Da kein wesentlicher Unterschied bei den mikrobiologischen Parametern zwischen Brunnen mit hohem Arsen und Eisengehalt festgestellt werden konnte, wurden ausschließlich die unterschiedlichen DOC-, Eisen-, und vor allem Arsenkonzentrationen zur Auswahl der Standorte für die Bohrungen herangezogen. Aufgrund dessen wurden die Brunnen Nr. 125 (Site B) und 132 (Site A) ausgewählt (Tab. 18).

**Tab. 18: Fe-, As-, DOC-Gehalte, sowie mikrobiologische Parameter in 11 Grundwasserproben aus dem Untersuchungsgebiet.** Die Proben Nr. 125 und 132 wurden für die Bohrungen zum Erhalt von Sedimentkernen für die Säulenversuche herangezogen.

Nr.	Fe (µg/l)	As (µg/l)	DOC (µg/l)	Coliforme (GKZ/ml)	<i>E. coli</i> (GKZ/ml)	Aerobe Bakterien (GKZ/ml)	Anaerobe Bakterien (GKZ/ml)
2	9720	333	570	$2,76 \times 10^3$	0	$3,76 \times 10^5$	$6,89 \times 10^3$
3	7370	217	2510	$2,77 \times 10^3$	$1,19 \times 10^2$	$4,14 \times 10^5$	$6,70 \times 10^4$
14	2400	13,8	1370	$5,93 \times 10^3$	0	$2,31 \times 10^5$	$4,49 \times 10^5$
96	2500	6,10	2240	$4,28 \times 10^3$	$7,00 \times 10^1$	$6,27 \times 10^5$	$4,74 \times 10^5$
107	7730	19,9	3180	$8,10 \times 10^3$	$2,39 \times 10^3$	$3,15 \times 10^5$	$1,90 \times 10^5$
110	3570	171	2390	$5,22 \times 10^3$	$3,80 \times 10^2$	$4,98 \times 10^5$	$2,76 \times 10^5$
<b>125</b>	<b>48,0</b>	<b>2,30</b>	<b>1070</b>	---	---	---	---
<b>132</b>	<b>3300</b>	<b>285</b>	<b>1470</b>	<b><math>5,48 \times 10^3</math></b>	<b><math>8,00 \times 10^1</math></b>	<b><math>5,00 \times 10^5</math></b>	<b><math>1,64 \times 10^5</math></b>
134	1170	9,70	2810	$4,70 \times 10^3$	$6,00 \times 10^1$	$4,35 \times 10^5$	$1,45 \times 10^5$
151	6080	18,3	640	$2,87 \times 10^3$	$1,00 \times 10^2$	$4,29 \times 10^5$	$5,24 \times 10^4$
152	4550	290	3040	$6,10 \times 10^3$	$2,00 \times 10^2$	$4,88 \times 10^5$	$2,23 \times 10^5$

Leider gingen die Proben für die Bestimmung der mikrobiologischen Parameter von Brunnen Nr. 125 während des Transports nach Deutschland verloren. Da aber Brunnen Nr. 96 (Abb. 6) in der Nähe lag, wurden dessen mikrobiologische Daten zum Vergleich herangezogen. In den Brunnen Nr. 132 und 125 wurden bei niedrigem DOC-Gehalt keine, bzw. nur sehr wenige coliforme Keime und *E. coli* identifiziert, was darauf schließen ließ, dass der erhöhte DOC-Gehalt in anderen Brunnen, mit einer größeren Anzahl von Fäkalkeimen, aufgrund fäkaler Verunreinigung zustande kam. Ein Zusammenhang der aeroben und anaeroben Gesamtkeimzahlen mit niedrigen/hohen DOC-Werten konnte nicht festgestellt werden.

### **2.2 Effekt von Lactat, Ethanol, Sulfat und *P. putida* WB auf die Freisetzung von Arsen**

#### **2.2.1 Säulenexperimente mit Lactat als einziger Kohlenstoffquelle**

Um eine Freisetzung von Arsen aus Sedimenten der Site A und B zu simulieren, wurden jeweils 200 g der jeweiligen Sedimente in Glas-Säulen gepackt und mit einem definierten Medium  $\pm$  verschiedener Zusätze injiziert (Abb. 9). Dabei handelte sich um Variationen der DOC-Quellen, der Zugabe von Sulfat und von *P. putida* WB zur Erhöhung der As-adaptierten Mikroorganismen.

Die Gesamtmenge an freigesetztem Arsen und die Arsenkonzentration mit Lactat als Kohlenstoffquelle innerhalb von 110 Tagen wurden in Abbildung 17 verglichen. Aus den Sedimenten der Site A konnten mit Lactat als Elektronendonator und Sulfat als Elektronenakzeptor insgesamt 30 % der löslichen Arsenfraktion freigesetzt werden. Ohne Sulfat wurden nur ca. 15 % gelöst. *P. putida* WB hatte keinen positiven Einfluss auf die Freisetzung.

Aus den Sedimenten der Site B wurde weniger Arsen freigesetzt, mit Ausnahme des Ansatzes, der ausschließlich mit Lactat betrieben wurde (Abb. 17 b). In den Eluaten der Site A konnte die maximale As-Freisetzung nach 40 – 65 Tagen (Abb. 17 c) und in den Eluaten der Ansätze mit Site B-Sedimenten nach 50 – 75 Tagen (Abb. 17 d) gemessen werden. Die Zugabe von *P. putida* WB hatte offenbar einen Einfluss auf das Redox-Potential und

## Ergebnisse

erniedrigte deshalb die Freisetzung von Arsen in allen Säulen. Mit einer Ausnahme war die Arsen-Freisetzung ohne den Zusatz von Sulfat und  $\pm P. putida$  WB sehr viel niedriger als in denen mit Sulfat (Abb. 17).

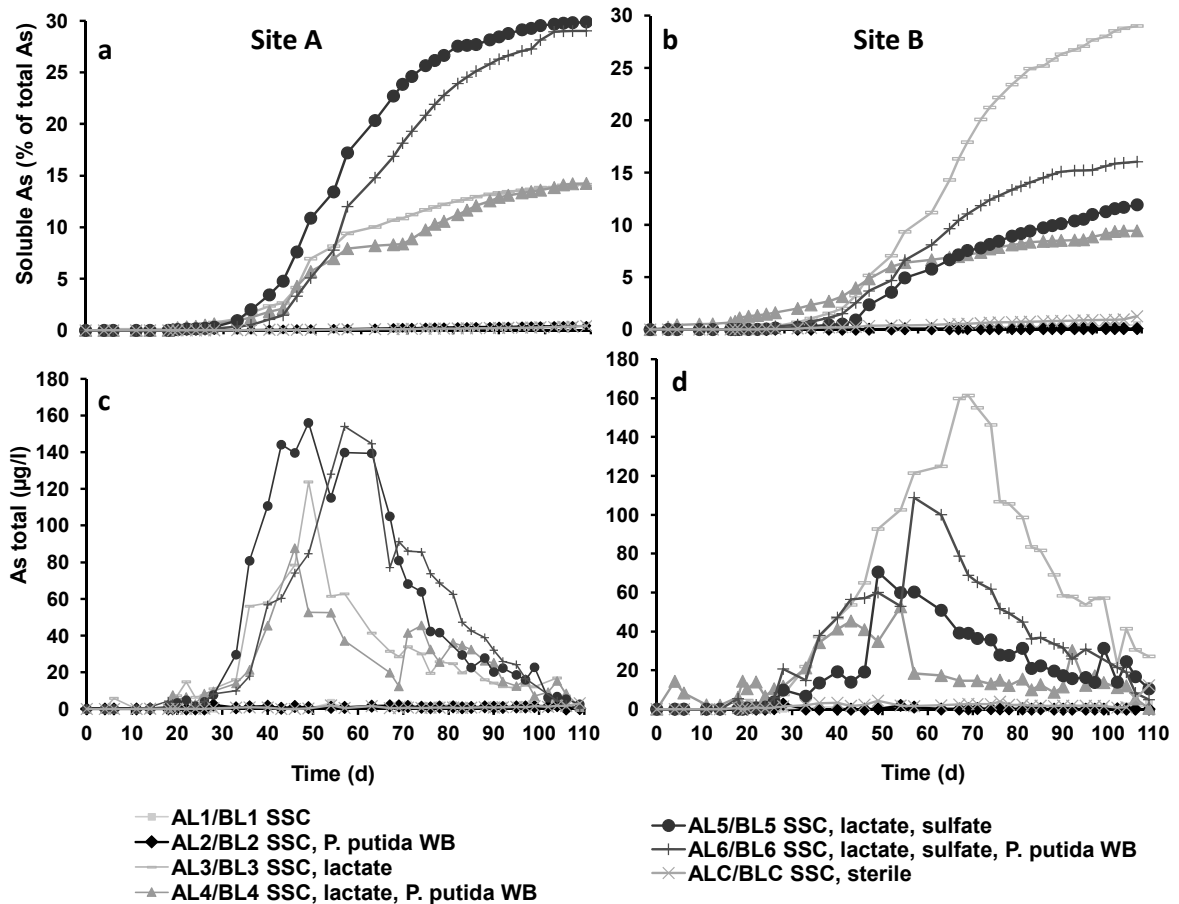


Abb. 17 a-d: Kumulative Arsen-Freisetzung und tägliche Arsenkonzentrationen in Eluaten aus den Ansätzen mit Sedimenten der Site A (anfangs 2,1 mg As/kg) und Site B (anfangs 1,7 mg As/kg; Freikowski et al., 2013). Lactat diente als einzige Kohlenstoffquelle  $\pm$  Sulfat  $\pm Pseudomonas putida$  WB.

### 2.2.2 Säulenexperimente mit Ethanol als einziger Kohlenstoffquelle

In einer zweiten Serie von Experimenten wurde Ethanol als einzige Kohlenstoffquelle verwendet. Unter diesen Bedingungen wurde in den Sedimenten beider Untersuchungsgebiete maximal 14 % Arsen ohne zusätzliches Sulfat freigesetzt (Abb. 18 a,b). Mit Sulfat wurden aus den Site A-Sedimenten 25 % Arsen eluiert (Ansatz AE3). Auch hier führte der Zusatz von *P. putida* WB (Ansatz AE4) zu niedrigerer Freisetzung von Arsen (Abb. 18 a). In den Ansätzen mit Sedimenten der Site B hatte *P. putida* WB keinen Einfluss auf die Freisetzung des Arsens (Abb. 18 b). Im Vergleich zu Site B-Sedimenten (nach 20 – 30 Tagen) startete die As-Freisetzung in den Site A-Sedimenten früher (nach 15 Tagen). Eine maximale Freisetzung konnte in den Site A-Sedimenten nach 40 – 45 Tagen (Abb. 18 c) beobachtet werden, in den Site B-Sedimenten nach 70 – 80 Tagen (Abb. 18 d).

Eisen- und Manganoxide besitzen oft Einschlüsse von Arsen und wirken so als Elektronenakzeptoren, die von arsenreduzierenden Bakterien verwendet werden (z.B. Islam et al., 2004). Mit Ethanol als Elektronendonator wurden in den Site A-Sedimenten nach 90 Tagen 15 mg/l Eisen und 6 mg/l Mangan freigesetzt (Abb. 18 e,g). Eine Korrelation der Freisetzung von Eisen und Mangan mit der Arsen-Freisetzung konnte weder in den Säulen mit Ethanol und der natürlichen Flora (Korrelationsfaktor 0,04 für Eisen/Arsen und 0,009 für Mangan/Arsen), noch in den Säulen mit *P. putida* WB (Korrelationsfaktoren 0,19 und 0,03) festgestellt werden.

In den Site B-Sedimenten wurde mehr als doppelt so viel Eisen (41 mg/l), aber die gleiche Konzentration an Mangan freigesetzt (Abb. 18 e-h). Die Freisetzung von Eisen mit Arsen in den Säulen mit Ethanol und der natürlichen Flora (Korrelationsfaktor 0,47), sowie in den Säulen mit Ethanol und *P. putida* WB (0,66) korrelierte gut. Allerdings konnte, wie schon in den Site A-Sedimenten, keine Korrelation von Mangan und Arsen festgestellt werden (0,12 und 0,02).

## Ergebnisse

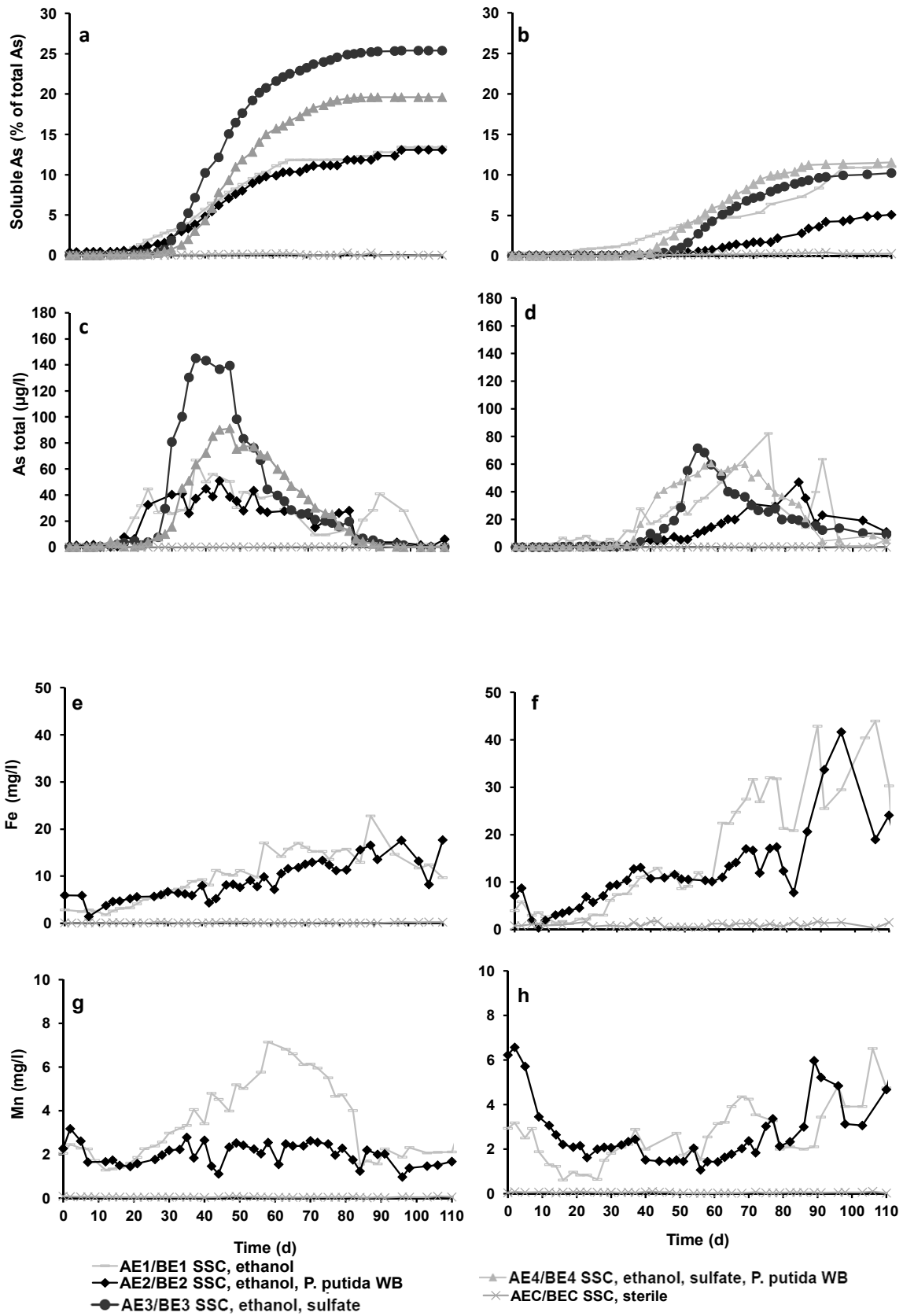


Abb. 18 a-h: Kumulative Arsen-Freisetzung und tägliche Arsenkonzentrationen, sowie von Eisen und Mangan in Eluaten aus den Ansätzen mit Sedimenten von Site A und B (Freikowski et al., 2013). Ethanol diente als einzige Kohlenstoffquelle ± Sulfat ± *Pseudomonas putida* WB.

## Ergebnisse

### 2.2.3 Säulenexperimente mit Saccharose als einziger Kohlenstoffquelle

Im Vergleich zu den Experimenten mit Lactat (Abb. 17 a-d) und Ethanol (Abb. 18 e-h), konnten mit Saccharose im Medium erst nach 80 Tagen signifikante Konzentrationen an gelöstem Arsen gemessen werden (Abb. 19 ab), was auf eine erheblich verzögerte Reaktion schließen lässt. Die höchsten Konzentrationen an Arsen in allen Eluaten konnten nach 100 Tagen in dem Ansatz ohne Sulfat gemessen werden (Abb. 19 b). Maximal wurden in diesem Ansatz 16 % Arsen freigesetzt. In einem Ansatz mit Sulfat wurden 8 % freigesetzt (Abb. 19 a). Aufgrund identischer Ergebnisse in Ansätzen mit *P. putida* WB ± Sulfat, wurden diese nicht gesondert dargestellt.

Eisen und Mangan wurden in einem Bereich um 15 mg/l (Abb. 19 c), bzw. um 1 mg/l (Abb. 19 d) freigesetzt. Wie schon in den Experimenten mit Ethanol als Kohlenstoffquelle, gab es eine signifikante Korrelation von Eisen und Arsen (0,69), aber wiederum keine für Mangan und Arsen (0,04).

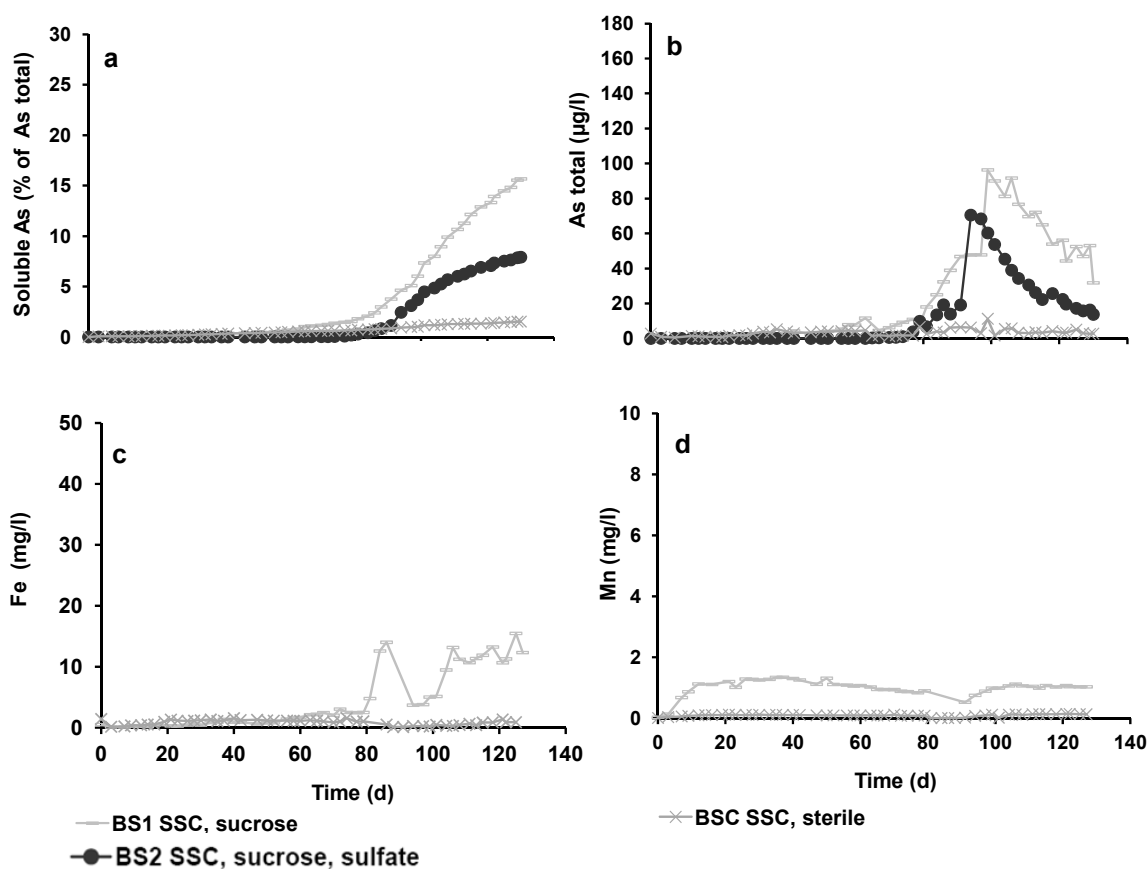


Abb. 19 a-d: Kumulative Arsen-Freisetzung und tägliche Arsenkonzentrationen, sowie von Eisen und Mangan in Eluaten aus den Ansätzen mit Sedimenten von Site A und B (Freikowski et al., 2013). Saccharose diente als einziger Kohlenstoffquelle ± Sulfat.

## Ergebnisse

### 2.2.4 Gesamtkeimzahl in den Sedimenten

Um eine zunehmende mikrobielle Aktivität während der Säulenexperimente zu zeigen, wurden vor Beginn und nach dem Ende aller Versuche mit den Site A- und B-Sedimenten, die unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurden, die Gesamtkeimzahlen in den Sedimenten bestimmt (Tab. 19). In den Versuchen ohne Kohlenstoffquelle und Elektronenakzeptor stieg die GKZ von fast  $10^5/g$  um weniger als den Faktor 10, mit Lactat, Ethanol oder Saccharose  $\pm P. putida$  WB stieg die GKZ/g am Ende der Experimente auf  $10^8 - 10^9$ . In den Ansätzen mit Sulfat  $\pm P. putida$  WB stieg die GKZ auf  $10^9 - 10^{10}$  Zellen/g.

**Tab. 19: Gesamtkeimzahl (GKZ/g) vor und nach den Säulenexperimenten unter verschiedenen Bedingungen.**

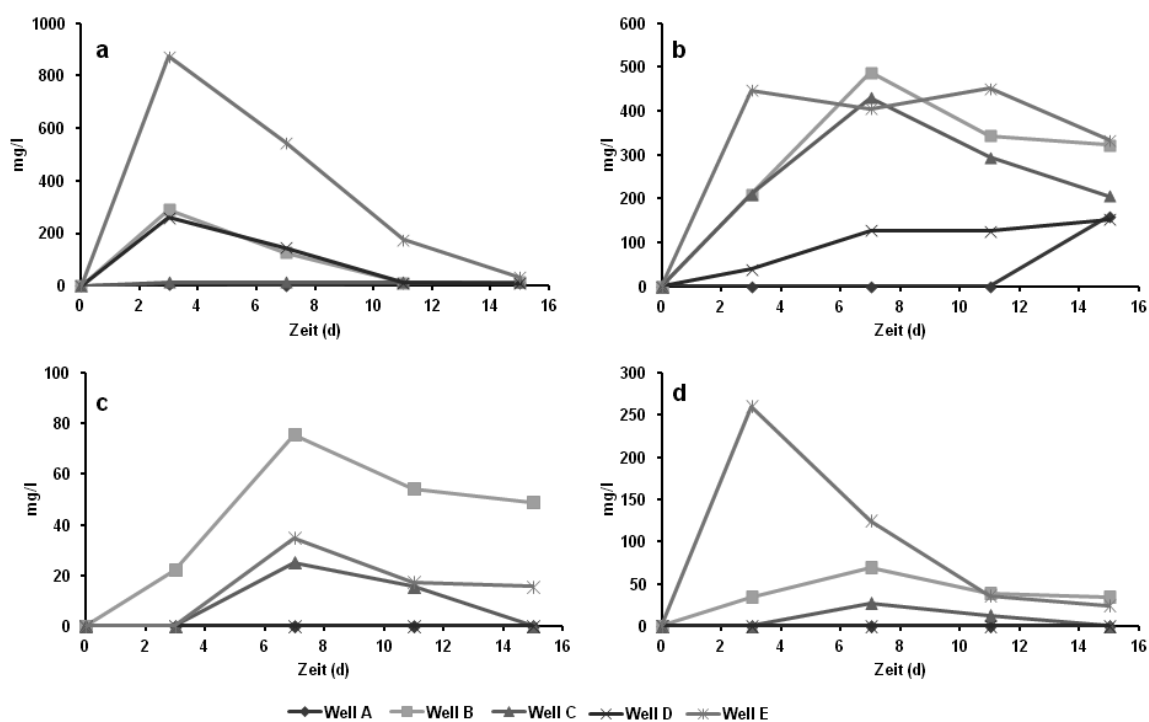
Die Gesamtkeimzahl stieg in allen Ansätzen, mit Ausnahme der Kontrollen, signifikant. A/B = Site A/B-Sedimente; AL/BL = Ansätze mit Lactat als Kohlenstoffquelle; AE/BE = Ansätze mit Ethanol als Kohlenstoffquelle; BS = Site B-Sedimente mit Saccharose als Kohlenstoffquelle; AEC/BEC = Kontrollansätze ohne Kohlenstoffquelle.

Ansatz	Site A (GKZ/g)	Site B (GKZ/g)
Sedimente vor Beginn der Experimente	$7,2 \times 10^4$	$9,7 \times 10^4$
AL1/BL1, SSC	$1,7 \times 10^5$	$7,7 \times 10^5$
AL2/BL2, SSC, <i>P.putida</i> WB	$2,3 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$
AL3/BL3, SSC, Lactat	$7,2 \times 10^9$	$8,3 \times 10^9$
AL4/BL4, SSC, Lactat, <i>P. putida</i> WB	$6,4 \times 10^9$	$2,5 \times 10^{10}$
AL5/BL5, SSC, Lactat, Sulfat	$1,8 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^9$
AL6/BL6, SSC, Lactat, Sulfat, <i>P. putida</i> WB	$1,7 \times 10^{10}$	$1,4 \times 10^6$
AE1/BE1, SSC, Ethanol	$1,2 \times 10^8$	$9,5 \times 10^7$
AE2/BE2, SSC, Ethanol, <i>P. putida</i> WB	$6,4 \times 10^9$	$5,9 \times 10^8$
AE3/BE3, SSC, Ethanol, Sulfat	$9,7 \times 10^9$	$3,2 \times 10^9$
AE4/BE4, SSC, Ethanol, Sulfat, <i>P. putida</i> WB	$5,9 \times 10^9$	$2,5 \times 10^6$
BS1, SSC, Saccharose	n.d.	$8,2 \times 10^5$
BS2, SSC, Saccharose, Sulfat	n.d.	$5,6 \times 10^4$
AEC/BEC, SSC, sterile Kontrolle	$6,2 \times 10^2$	$5,8 \times 10^2$



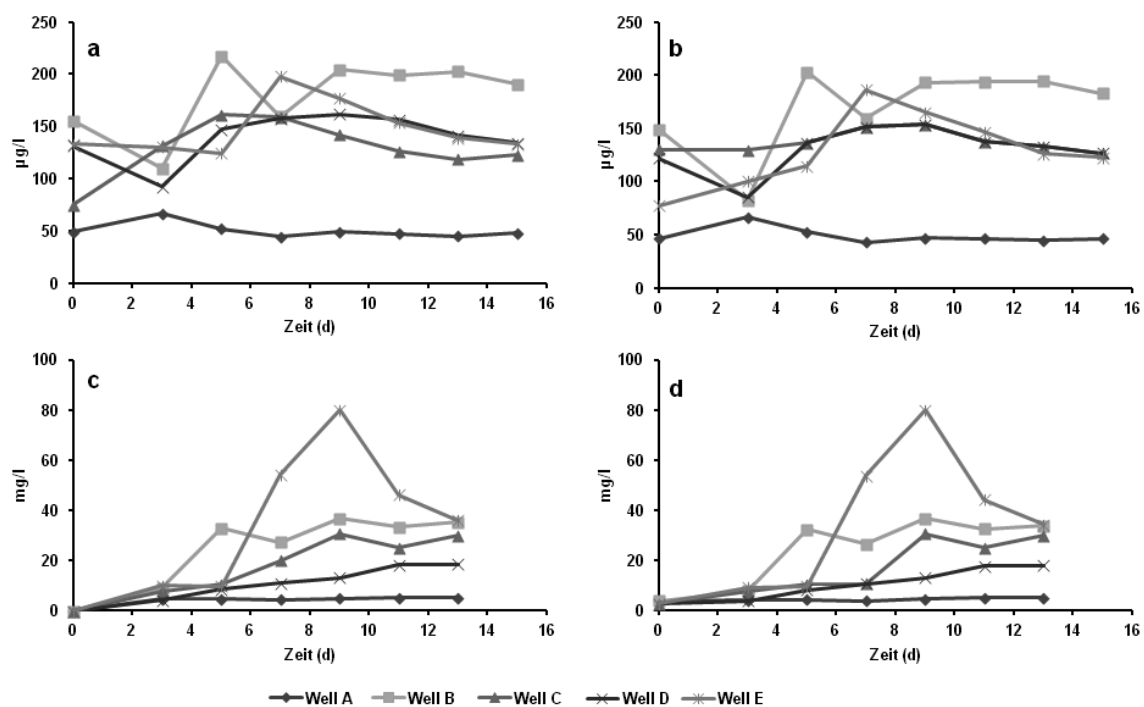
## 3. Feldversuch

Um die Ergebnisse der im Labor durchgeführten Säulenexperimenten mit Sedimenten aus den Untersuchungsgebieten unter natürlichen Bedingungen zu validieren, wurde im Rahmen des Projektes auf Site B ein Feldversuch durchgeführt, bei dem in fünf Piezometern (Well B-E), die um das Hauptbohrloch (Well A) rautenförmig angeordnet waren, in Grundwasser gelöste Saccharose injiziert wurde, diese durch zirkuläres Pumpen durchmischt und anschließend Proben zur späteren Analyse diverser Parameter genommen wurden (Neidhardt, 2012). Es konnte in allen Piezometern, aber vor allem in Well E, ein deutlicher Abbau der Saccharose unter äquivalenter Bildung von Gärprodukten (Acetat, Propionat und Butyrat) gezeigt werden (Abb. 20 a-d; Neidhardt, 2012, verändert), unter Freisetzung von bis zu 200  $\mu\text{g/l}$   $\text{As}^{3+}$  und 90  $\text{mg/l}$   $\text{Fe}^{2+}$  (Abb. 21 a-d; Neidhardt, 2012, verändert). Ebenso konnte ein rascher Anstieg der autochthonen Gesamtkeimzahl, bzw. der coliformen Keime und *E. coli* aufgrund der Stimulation durch die künstlich zugefügte Kohlenstoffquelle um bis zu sechs logarithmische Stufen gezeigt werden (Abb. 22 a-c; Neidhardt, 2012, verändert).

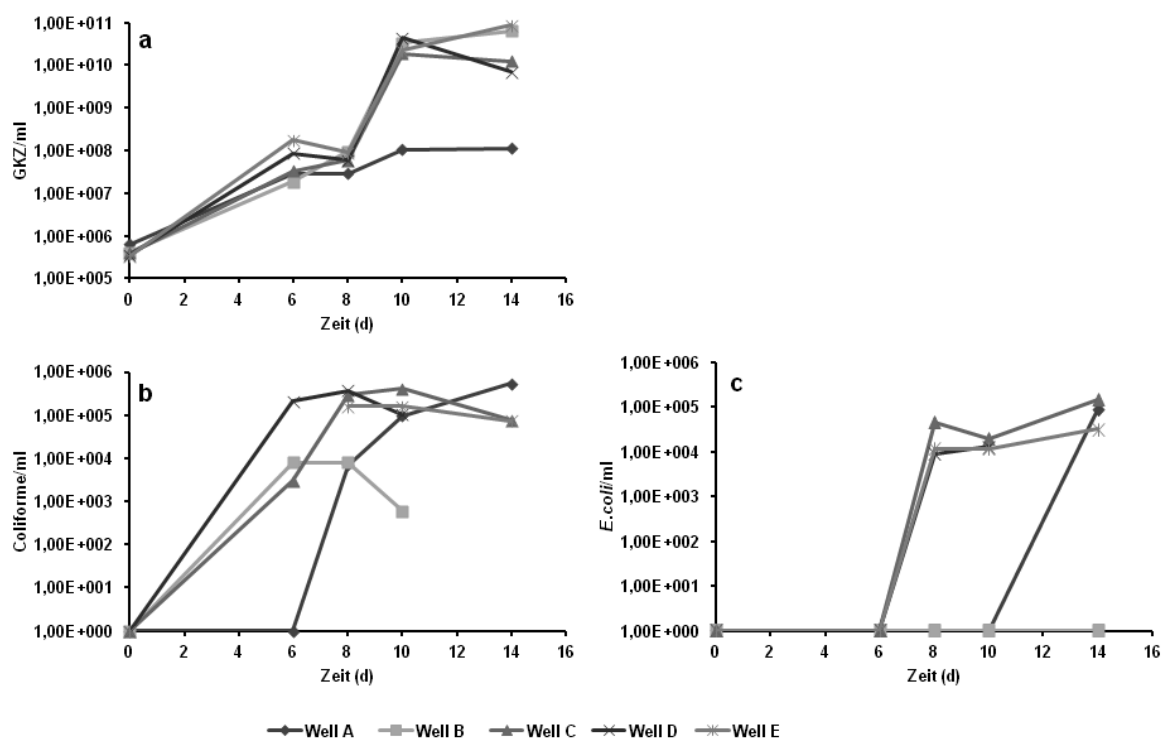


**Abb. 20 a-d: Saccharose mit gebildeten Gärprodukten (Neidhardt, 2012, verändert).** a: Saccharose, b: Acetat, c: Propionat, d: Butyrat.

## Ergebnisse



**Abb. 21 a-d:** Freigesetztes Arsen und Eisen (Neidhardt, 2012, verändert). a: As total, b: As<sup>3+</sup>, c: Fe total, d: Fe<sup>2+</sup>.



**Abb. 22 a-c:** Mikrobielle Parameter (Neidhardt, 2012, verändert). a: Gesamtkeimzahl, b: Coliforme Keime, c: *E. coli*.

### IV. Diskussion

Arsen kommt ubiquitär in der gesamten Erdkruste in einer durchschnittlichen Konzentration von 2 mg/kg vor. In West-Bengalen, Indien, wurden allerdings Konzentrationen von bis zu 3 mg/l gelöstem Arsen im Grundwasser gemessen (Nordstrom, 2002). In den Untersuchungsgebieten, in welchen Grundwasserproben für die vorliegende Studie genommen wurden, wurden bei Site A 285 µg/l und bei Site B nur ca. 2 µg/l Arsen gemessen, was auch unter Beachtung des Reports der BGS/DPHE (2001) plausibel erscheint, in dem bis 9 mg/l As im Grundwasser beschrieben wurden, obwohl nur 1 mg/kg As im Sediment gemessen wurde. Das Grundwasser der Site A enthielt eine hohe Konzentration an Eisen, während in Grundwasserproben der Site B nur geringe Mengen an Eisen gefunden wurden. In den Proben beider Untersuchungsgebiete wurde jedoch eine hohe Konzentration an Keimen gefunden (Tab. 18).

Da bis zum heutigen Tage noch nicht alle Mechanismen verstanden sind, weshalb bei einer eigentlich durchschnittlichen Konzentration an Arsen in den Sedimenten des Brames-Pramaputra-Ganges-Delta von 2,1 mg/kg Sediment auf der Site A, bzw. 1,7 mg/kg auf der Site B (Freikowski et al., 2013), im Grundwasser solch gravierende Unterschiede in der As-Konzentration gefunden wurden, es aber bekannt ist, dass Arsen nicht nur geochemisch sondern auch mikrobiologisch aus Sediment gelöst werden kann (z.B. Nickson et. al., 2000, Héry et al., 2010), wurden in der vorliegenden Studie arsenatreduzierende Bakterien angereichert und ein arsenatreduzierender Bakterienstamm, *Pseudomonas putida* WB isoliert und taxonomisch sowie mikrobiologisch beschrieben. Dieser aus den Proben des Untersuchungsgebietes isolierte Stamm wurde für den mikrobiologischen Nachweis der bakteriellen Reduktion von Arsen im Untergrund des Untersuchungsgebietes verwendet. Dazu wurde in einem zweiten Teil mit Sedimenten aus Bohrkernen aus den beiden Untersuchungsgebieten die Kinetik der Arsen-Freisetzung aus den Sedimenten in das Grundwasser mit Langzeit-Eluat-Versuchen untersucht, der in einem dritten Teil durch einen Feldversuch (Neidhardt, 2012) validiert wurde.

## Diskussion

---

In der Literatur findet man mehrere Studien über arsenreduzierende, sowie auch arsenoxidierende Bakterienstämme. Eine neue arsenresistente bakterielle Spezies, die aus einem Aquifer in West-Benaglen isoliert wurde, *Deinococcus indicus*, wuchs anaerob auf verschiedenen Kohlenstoffquellen, wie z.B. Lactose und Arabinose in Anwesenheit von 10 mmol/l Arsenat (Suresh et al., 2004). Jedoch wurde in dieser Studie der exakte Umsatz der Kohlenstoffquellen mit Arsenat als Elektronenakzeptor nicht beschrieben. Newman et al. (1997a) beschrieben ein sulfatreduzierendes Bakterium, *Desulfotomaculum auripigmentum*, das in der Lage war 5 mmol/l Arsenat in 144 Stunden zu reduzieren, das aber nicht auf Acetat als Kohlenstoffquelle wuchs. In unseren Versuchsansätzen reduzierte *Pseudomonas putida* WB aus der autochthonen Grundwasser-Flora 4,5 mmol Arsenat pro Liter beim Umsatz von 8,5 mmol/l Lactat in 120 Stunden. Im Gegensatz zu Newmans Studien (Newman et al. 1997a,b) wurden zweimal jeweils 2,25 mmol/l (0,045 mmol/20 ml) Arsenat nachgeimpft und umgesetzt. Srivastava et al. (2009) isolierten einen *Pseudomans sp.* DRBSI-Stamm, der eng mit *Pseudomans stutzeri* verwandt war. Dieser Stamm war in der Lage in NB-Medium bis zu 100 mmol/l Arsenat unter aeroben Bedingungen zu reduzieren. Wie für eine aerobe Reaktion zu erwarten war, wurde kein Wasserstoff produziert. Ein weiterer Unterschied war, dass *P. putida* WB unter aeroben Bedingungen kein Arsenat reduzierte. Ein strikt anaerober *Bacillus*-artiger Stamm JMM-4 wurde von Santini et al. (2002) aus mit Arsen kontaminierten Schlick aus einer Goldmine in Australien isoliert, der anaerob mit 5 mmol/l Lactat als Kohlenstoffquelle 5 mmol/l Arsenat vollständig zu Arsenit reduzierte. Allerdings konnte, im Vergleich zur vorliegenden Studie, obwohl das Bakterium auch auf Acetat wuchs, keine Wasserstoffproduktion festgestellt werden. Ein bekannter arsenreduzierender Stamm, *Chryogenis arsenatis* reduzierte in einer Untersuchung von Macy et al. (1996) 3,9 mmol/l Arsenat unter Verbrauch von 1 mmol/l Acetat, wiederum ohne Bildung von Wasserstoff. Der Arsenat-Umsatz durch *Clostridium intestinales*, einem Arsenat-reduzierenden Bakterium, das aus agrarwirtschaftlich bearbeitetem Boden mit einer Arsenkonzentration von 840 µmol/kg isoliert wurde (Jones et al., 2000), wurde unter anaeroben Bedingungen in 50 ml-Ansätzen bei 25 °C unter Schütteln untersucht. Als Kohlenstoffquelle diente 5 mmol/l <sup>14</sup>C-markierte Glucose und als Elektronenakzeptoren wurden zwischen 0,6 und 5 mmol/l Arsenat zugesetzt. Während der vollständigen Oxidation der Glucose wurde äquimolar zu Kohlendioxid Wasserstoff freigesetzt. Butyrat war das Hauptprodukt der Fermentation, weshalb die Autoren zu dem Schluss kamen, dass *C. instetinales* den Butyrat-

## Diskussion

---

Stoffwechselweg verwendet und dabei pro mol Glucose 1 mol Butyrat, 2 mol CO<sub>2</sub> und 2 mol H<sub>2</sub> gebildet hatte. Andere Gärprodukte wie z.B. Essigsäure, Ameisensäure, Butanol und Sec-Butyl-Butyrat wurden nur in Spuren gefunden. Die Wasserstoffproduktion in diesen Experimenten schien aber nicht von der Arsenat-Reduktion abhängig zu sein. Deshalb konnte das Wachstum von *C. intestinales* auch nicht auf Arsenat-Respiration zurückgeführt werden.

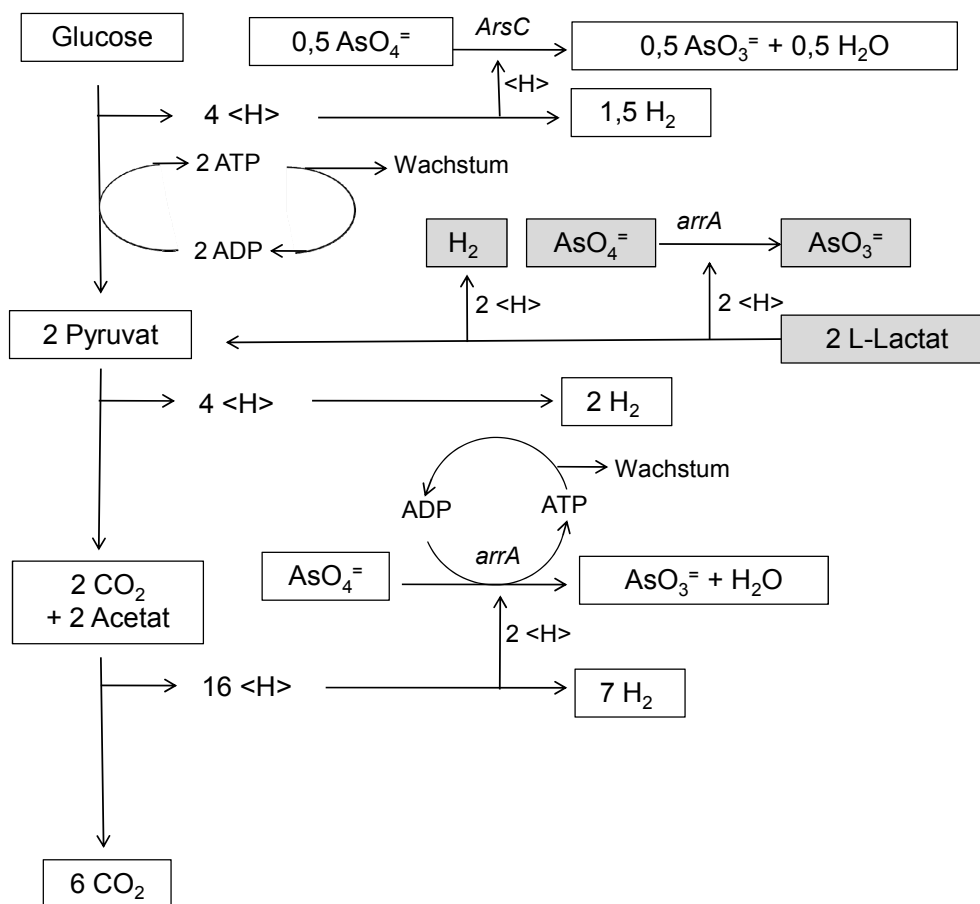
Im Gegensatz dazu hatte *P. putida* WB ein essentielles Bedürfnis für Arsenat, um anaerob auf allen getesteten Kohlenstoffquellen zu wachsen. Offensichtlich wurden zwei Arsenat-Reduktasen exprimiert (Abb. 15), die nicht-respiratorische *ArsC*-Reduktase, welche zur Detoxifikation dient (Rosen 2002) und die respiratorische *arrA*-Reduktase (Malasarn et al., 2004). Der anaerobe Abbau von Glucose zu Acetat benötigt keine Energie durch die Reduktion von Arsenat, da 2 mol ATP pro mol Glucose von der Substratkettenphosphorylierung während der Glykolyse mittels des Emden-Meyerhof-Parnas Stoffwechselwegs verfügbar sind. Dies war der Fall, da 2,2 mg Zellen aus 1,1 mmol Glucose gebildet wurden, was einem molaren ökonomischen Koeffizienten von  $Y_{\text{Glucose}} = 20$  g/mol entsprach. Dies entspricht dem Durchschnittswert für anaeroben Stoffwechsel (Lengeler et al., 1999). Mit einem molaren Energieertragskoeffizienten von  $Y_{\text{ATP}} = 10$  g/mol würde dies einem spezifischen Energieertrag von 2 mol ATP entsprechen. Die von *P. putida* WB bei der Glykolyse gebildeten Reduktionsäquivalente wurden teilweise zur Arsenat-Reduktion verwendet und teilweise als molekularer Wasserstoff freigesetzt. In Abwesenheit von Arsenat fand kein Wachstum von *P. putida* WB auf Glucose statt.

Aus 1 mol Glucose wurden zwei mol Acetat gebildet und nicht weiterverwertet, nachdem das Arsenat verbraucht war. Nach erneuter Zugabe von Arsenat konnte weiteres Wachstum angeregt werden. Dabei wurde Acetat unter Bildung von Arsenit und Wasserstoff oxidiert. Die Energie für das Wachstum auf Acetat musste aus der respiratorischen Arsenatreduktion kommen, da Acetatoxidation per se keine Energieerhaltung zulässt. Würde 1 mol ATP aus der Reduktion von 1 mol Arsenat gebildet werden, wäre der Energieertragskoeffizient der Arsenat-Atmung  $Y_{\text{ATP}} = 6,9$  g/mol.

Eine Massenbilanz des Stoffwechsels wurde an Hand der Stöchiometrie der quantifizierten Reaktionen vorgenommen und daraus ein neuer Stoffwechselweg vorgeschlagen (Abb. 23).

## Diskussion

Dieser Stoffwechselweg lässt die drei untersuchten C-Substrate zu und erklärt auch das beobachtete Wachstum, wenn man *ArsC*- und *arrA*-Gene bzw. -Enzyme berücksichtigt. Unter anaeroben Bedingungen wurde Glucose nur zu Acetat mit einem Energiegewinn aus der Substratkettenphosphorylierung in Anwesenheit von Arsenat oxidiert. Dabei musste zumindest ein Teil der Reduktionsäquivalente/des Wasserstoffs von dem nicht respiratorischen *ArsC*-Genprodukt für die Arsenat-Reduktion verwendet werden. Die anaerobe Acetatoxidation hingegen war an die respiratorische Arsenat-Reduktase gekoppelt und verlief nur vollständig, wenn ausreichend Arsenat vorhanden war. Lactat wurde über Pyruvat zu Acetat decarboxyliert/oxidiert. Dies war mit einem Wachstum von *P. putida* WB verknüpft. Die Oxidation des Lactats zu Pyruvat und die anschließende Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetat, verknüpft mit Wachstum von *P. putida* WB scheint, ähnlich wie das Wachstum mit Acetat unter Arsenat-Reduktion, an die Expression vom *arrA* gebunden zu sein, die Wachstum über Arsenat-Respiration ermöglicht.



**Abb. 23: Massen- und Energiebilanz für den anaeroben Abbau von Glucose, Lactat und Acetat mit Arsenat als Elektronenakzeptor durch *Pseudomonas putida* WB.** Lactat scheint via Pyruvat abgebaut zu werden.

## Diskussion

---

Nachdem Bakterien aus dem Grundwasser des Untersuchungsgebietes isoliert wurden, die in der Lage waren Arsenat zu reduzieren, wurden mit durch Schlagbohrung gewonnenen Sedimenten Säulenversuche durchgeführt zum direkten mikrobiologischen Nachweis der Freisetzung von Arsenverbindungen aus den entsprechenden Sedimenten. Dazu wurden Säulen unter verschiedenen Bedingungen mit künstlichem Grundwasser, das unterschiedliche Kohlenstoffquellen und  $\pm$  Sulfat enthielt, anaerob beschickt. Zusätzlich wurden Säulen mit dem isolierten *P. putida* WB-Stamm beimpft. Als Kontrollen wurden für alle Versuche Sediment-Säulen mit autoklaviertem Sediment installiert.

In der Literatur liegen einige Studien über synergistische mikrobiologisch/geochemische Arsen-Mobilisierung im Ganges-Bramaputra-Delta vor, in denen die As-Mobilisierung in Mikrokosmos-, Batch- und Säulen-Experimenten untersucht wurden. So untersuchten Akai et al. (2004) die Arsen-Mobilisierung in schlammhaltigen Sedimenten aus Bangladesch aus einer Tiefe von 3 – 9 m. Die Sedimente enthielten eine durchschnittliche Arsen-Konzentration von  $\sim 3$  mg/kg. Die Untersuchungen wurden in Säulen mittels eines anoxischen, zirkulierenden Durchlaufsystems mit einem Medium, das 1 g/l Polypepton und  $\pm$  1 g/l Glucose enthielt, durchgeführt. Nach 12 Tagen wurden insgesamt 800  $\mu\text{g/l}$  Arsen mobilisiert, mit der größten Zunahme von 250  $\mu\text{g/l}$  nach vier Tagen. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie, wurde der mikrobiologische Einfluss bzw. Beitrag nicht nachgewiesen, da es versäumt wurde eine sterile Kontrolle mitzuführen. Auch wurde die Mobilisierung des Arsens durch den Grundwasserfluss nicht untersucht. Eine andere Studie aus dem fast gleichen Untersuchungsgebiet in Bangladesch wurde mit dem gleichen künstlichen Grundwasser wie in der oben erwähnten Studie durchgeführt. Als Kohlenstoffquelle wurde Lactat verwendet. Die anaeroben Batch-Experimente zeigten, dass nach 30 Tagen 7% (12 mg/l) Arsen freigesetzt wurde, während eine „nicht-biotische Kontrolle“ (das Antibiotikum Kanamycin wurde als Hemmstoff für Bakterien eingesetzt) keine Arsenmobilisierung aufzeigte (Jung et al., 2012). In dieser Untersuchung wurde Arsen mit Eisen als passiver As-Transporter mobilisiert, während in unserer Studie Arsen offenbar entkoppelt von Eisen freigesetzt wurde. Dhar et al. (2011) inkubierten Feinsand-Sedimente aus einem tiefen Aquifer in Bangladesch mit künstlichem Grundwasser, 20 mmol/l Lactat und *Shewanella sp.* ANA-3, als eine bekannte Arsen-reduzierende Spezies unter anaeroben Bedingungen. Hier konnte nach 90 Tagen nur 17  $\mu\text{g/l}$  im Überstand gefunden werden, aber es wurde ein Mechanismus der Arsen-Freisetzung, der von Eisen entkoppelt war, nachgewiesen.

## Diskussion

---

Allerdings war dies für *Shewanella* als As-Reduzierer, der unabhängig von Eisen wächst, zu erwarten. Eine andere Gruppe gewann ebenfalls durch Bohrungen im Nadia-Distrikt Sedimentproben aus einer Tiefe von 8 m (Rowland et al., 2009). Hier wurden 15 g des feuchten Feinsand-Sediments mit künstlichem Grundwasser bei 20 °C anaerob inkubiert. Nach 30 Tagen wurde 20 nmol/l  $\text{As}^{3+}$  im Überstand gemessen. Simultan wurden 30 mmol/l  $\text{Fe}^{2+}$  freigesetzt. In der vorliegenden Studie wurden  $\sim 30$  mg/l Eisen freigesetzt, aber nur in den Experimenten mit Low-As-Sedimenten wurde eine Korrelation zwischen der Arsen- und Eisenmobilisierung beobachtet. Héry et al. (2010) untersuchten die biogeochemische Arsenmobilisierung in Bohrkernen aus 16 m Tiefe in der Nähe zu unserer Site A. In dieser Studie wurden, im Gegensatz zur vorliegenden, 10 mM Acetat als Kohlenstoffquelle in künstlichem Grundwasser in Mikrokosmos-Experimenten eingesetzt. In allen nicht-sterilen Ansätzen wurde jeweils insgesamt 25  $\mu\text{g/l}$  Arsen im Überstand gefunden. Die Kohlenstoffquelle schien keinen Einfluss auf die As-Freisetzung zu haben, aber die Mobilisierung des Arsens war ebenfalls von Eisen entkoppelt und schien an die Freisetzung von Sulfat gekoppelt sein. Dies bestätigt auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, bei der Sulfat die Arsenmobilisierung signifikant erhöhte (z.B. Abb. 17 a,b). Gault et al. (2005) fanden in ihren Mikrokosmos-Experimenten mit Feinsand-Sedimenten aus 8 m Tiefe (aus der Nähe unseres Untersuchungsgebietes) 100 nM Arsen im Überstand. Die Versuche wurden mit künstlichem Grundwasser und Acetat als Kohlenstoffquelle durchgeführt. Im Gegensatz zur vorliegenden Studie konnte nur ein Bruchteil an Arsen freigesetzt werden. Allerdings war der Mechanismus an Eisen gekoppelt, während kein Mangan gefunden wurde. Eine zur vorliegenden Arbeit ähnliche Studie, mit Sedimenten aus „High“- und „Low-As-Gebieten“ nahe unserer untersuchten Gebiete in West-Bengalen, wurde von Nath et al. (2008b) durchgeführt. Aerobe und anoxische Experimente zur Mobilisation mit Trinkwasser aus häuslichen Brunnen zeigten keine Korrelation von Arsen, Eisen und Mangan. Obwohl in dieser Studie angenommen wurde, dass das Redoxpotential die treibende Kraft der Arsenmobilisation darstellte, konnte, aufgrund fehlender steriler Kontrollen, kein Beweis für einen mikrobiologischen Einfluss erbracht werden.

Die vorliegende Studie zeigt einen möglichen Einfluss von Bakterien in Durchfluss-Experimenten auf die Mobilisierung von Arsen aus Sedimenten der Untersuchungsgebiete im Nadia-Distrikt, West-Bengalen, Indien über 110 Tage, wenn geeignete Kohlenstoffquellen und/oder Elektronenakzeptoren vorhanden waren. Kein Arsen wurde in den sterilen



## Diskussion

---

Kontrollen  $\pm$  verschiedener Kohlenstoffquellen mobilisiert. Ebenso stieg die Gesamtkeimzahl, als Indikator für mikrobielle Aktivität, in diesen Experimenten nicht signifikant, was zeigte, dass es keine relevante Kontamination während des Säulenexperiments auftrat (Tab. 19). In nicht-sterilen Sedimentproben hingegen wurde in den Proben mit Lactat, Ethanol oder Saccharose Arsen beträchtlich mobilisiert und die Gesamtkeimzahl im „Grundwasser“ nahm zu, während die Kohlenstoffquellen vollständig konsumiert wurden ohne eine messbare Änderung des pH-Werts (nicht gezeigt). Die höchste Arsenmobilisierung von 30 % des gesamten Arsengehaltes der Sedimente wurde in den Ansätzen mit Sulfat als Elektronenakzeptor gefunden. Man könnte nun annehmen, dass der höhere Wert von Arsen aufgrund abiotischer Mechanismen durch das Sulfat zustande kam, da Sulfat das Redoxpotential ändern könnte, was zu einer möglichen As-Freisetzung führen könnte (vgl. Héry et al., 2010), aber die Tatsache, dass in einem Ansatz mit Site B-Sediment ohne Sulfat die Mobilisierung doppel so hoch war (30 %), als in einem mit Sulfat, widerlegt diese Annahme. Auch dasselbe Niveau der Arsenmobilisierung in allen anderen Ansätzen mit Site B-Sediment mit Lactat und ohne Sulfat (~15 %) zeigt den möglichen mikrobiellen Einfluss auf die Mobilisierung. Dies wird auch durch die gleiche (hohe) Gesamtkeimzahl in Ansätzen, in denen ausschließlich Lactat zugegeben wurde (Tab. 19), untermauert. Der bekannte mikrobielle Mechanismus, dass sulfatreduzierende Bakterien häufig auch simultan Arsenat reduzieren können (z.B. Newman et al., 1997a; Kocar et al., 2010; Sorokin et al., 2012), unterstützt diese Erkenntnisse. *Pseudomonas putida* WB hatte keinen positiven Effekt auf die Arsenmobilisierung, da nicht mehr Arsen im Vergleich zu den Ansätzen mit autochthoner Flora freigesetzt wurde (z.B. Abb. 17 a und 18 a). Es scheint, dass die autochthone mikrobielle Flora für die Arsenmobilisierung alleine ausreicht. Zumindest ist eine eindeutige Steigerung der Arsenfreisetzung aus den verwendeten Sedimenten nicht ersichtlich.

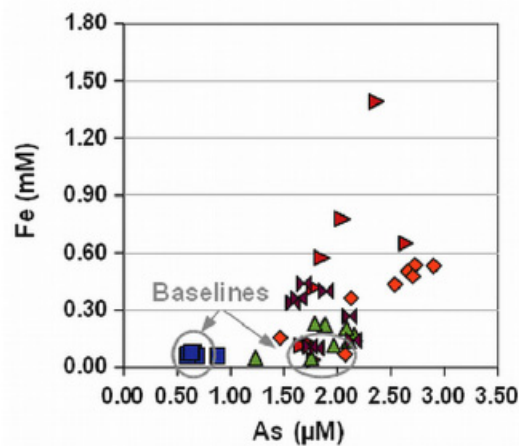
In den Ansätzen mit Ethanol und Saccharose als Kohlenstoffquelle, wurde gelöstes Eisen und Mangan gemessen, um herauszufinden ob Arsen passiv via Fe- und Mn-(hydro)oxiden, aus den Sedimenten mobilisiert wurde. Jedoch gab es in den Sedimenten aus Site A keine Korrelation von Eisen und Mangan mit der Arsenmobilisierung, weshalb hier Arsen durch mikrobielle Aktivität freigesetzt worden sein könnte. Dies unterstützen auch die Erkenntnisse von Nath et al. (2008b) mit Sedimentproben aus dem gleichen Untersuchungsgebiet und sterile Kontrollen, in denen weder Fe, Mn oder As gefunden wurden (Abb. 17 und 18). Man könnte annehmen, dass in den sterilen Kontrollen aufgrund

## Diskussion

---

der durch die Hitze während des Autoklavierens entstandenen Eisenoxide (Radloff et al., 2008) As re-adsorbiert wurde, aber in diesem Fall sollte man Fe trotzdem in den Eluaten finden, da autoklavieren kein Einfluss auf die Eigenschaften von Fe in Sedimenten hat (Radloff et al., 2008). Auf der anderen Seite lag in den Sedimenten von Site B eine gute Korrelation von Eisen und Arsen vor ( $\sim 0,7$ ), wobei die gleichen Werte an Arsen in den Eluaten wie bei Site A gemessen wurden. Das Ausfallen von Fe-Sulfiden, was auch zu passivem Ausfallen von As führen könnte, da As in Fe-Mineralen absorbiert werden kann (Kirk et al., 2010), wurde in allen Säulenexperimenten nicht beobachtet, was auf die anaeroben Bedingungen zurückzuführen ist.

Vergleichbare Ergebnisse (Abb. 20 – 22) wurden in einem Feldversuch erzielt, welcher im Rahmen des Projektes an dem Untersuchungsgebiet Site B durchgeführt und von Neidhardt (2012) veröffentlicht wurde und zur Validierung der Ergebnisse der Säulenexperimente herangezogen werden kann. In dieser Studie wurde Saccharose in fünf um das Hauptbohrloch gelegene Piezometer eingebracht und durch zirkuläres Pumpen durchmischt. Dies hatte auch den Effekt, das System anaerob zu halten. In der Literatur sind in West-Bengalen nur wenige solcher Experimente durchgeführt worden. Harvey et al. (2002) injizierten Molasse mit  $8,5 \mu\text{M}$  As in 31 Tiefbrunnen und erreichten eine stärkere Freisetzung von As aufgrund eisenreduzierender Bakterien, welche aber bald aufgrund der Sulfidpräzipitation wieder abnahm. Saunders et al. (2008) injizierten ebenfalls Molasse in ein oberflächennahen Brunnen und nach 127 Tagen  $\text{MgSO}_4$  zur Stimulation sulfatreduzierender Bakterien, mit dem Ziel gelöstes As via Sulfidbildung zu binden. Dies konnte insofern gezeigt werden, dass Arsen in den 127 Tagen ohne Sulfat im Grundwasser anstieg, aber nach Zugabe des  $\text{MgSO}_4$  wieder abnahm. In der Feldstudie von Neidhardt (2012) wurde im Gegensatz dazu mit Saccharose eine einzige und direkt nachweisbare Kohlenstoffquelle verwendet, die zu den entsprechenden Gärprodukten abgebaut wurde, unter Freisetzung von Arsen und Eisen. Dabei konnte keine Korrelation zwischen der As/Fe-Freisetzung festgestellt werden (Abb. 24, Neidhardt, 2012, verändert), was auf einen von Eisen entkoppelten Mechanismus der As-Freisetzung hindeutete (Neidhardt, 2012) und die Ergebnisse von z. B. Pedersen (2006) oder Herbel und Fendorf (2006) bestätigte, allerdings konnte in den Säulenversuchen mit Saccharose als einzige Kohlenstoffquelle eine Korrelation von 0,69 festgestellt werden, was vermutlich auf die definierten Bedingungen im Labor zurückzuführen ist.



Well (screen position, m bls): ■ A (12-21m) ◆ B (24-27m) ✕ C (30-33m) ▲ D (36-39m) ► E (42-45m)

**Abb. 24:** Korrelation in den verschiedenen Wells (A-E) zwischen Arsen und Eisen nach Injektion von Saccharose (Neidhardt, 2012, verändert). In allen Wells konnte keine positive Korrelation von As/Fe festgestellt werden.

Neben der erhöhten Freisetzung von Arsen und Eisen konnte auch eine signifikant erhöhte Gesamtkeimzahl, sowie auch ein entsprechender Anstieg von Fäkalkeimen um sechs logarithmische Stufen beobachtet werden (Abb. 22), was, wie auch in den Säulenexperimenten beobachtet, zeigte, dass die autochtone Flora angeregt wurde und zur Freisetzung beitrug. Vermutlich handelte es sich auch in diesem Fall hauptsächlich um eisenreduzierende Bakterien, aufgrund der entkoppelten und erhöhten Freisetzung von Eisen. Die Stimulation erfolgte rein aufgrund der injizierten Kohlenstoffquelle, da nach deren vollständigen Abbau nach 14 Tagen, die Freisetzung von Eisen/Arsen, sowie auch der Anstieg der Keimzahl stoppte (Abb. 20 – 23).

### V. Literaturverzeichnis

Ahmad SA, Bandaranayake D, Khan AW, Hadi, SA, Uddin G, Abdul M (1997) Arsenic contamination in ground water and arsenicosis in Bangladesh. *Int J Environ Health Res* 7:271-276

Akai J, Ilzumi K, Fukuhura H, Masuda H, Nakano S, Yoshimura T, Ohfuji H, Anawar HM, Akai K (2004) Mineralogical and geomicrobiological investigation on groundwater arsenic enrichment in Bangladesh. *Appl Geochem* 19: 215-230

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipmann DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410

Anawar HM, Komaki K, Akai J, Takada J, Ishizuka T, Takahashi T, Yoshioka Y, Kato K (2002) Digenetic control on arsenic partitioning in sediments of the Meghna River delta, Bangladesh. *Environ Geol* 41:816-825

Angle JS, McGrath SP, Chaney RL (1991) New culture medium containing ionic concentrations of nutrients similar to concentrations found in the soil solution. *Appl Environ Microbiol* 57(12):3674-3676

Appelo CAJ, Van der Weiden MJJ, Turnassat C, Charlet L (2002) Surface Complexation of Ferrous Iron and Carbonate on Ferrihydrite and the Mobilization of Arsenic. *Environ Sci Technol* 36:3096-3103

Banning A, Rude TR (2010) Enrichment processes of arsenic in oxidic sedimentary rocks - From geochemical and genetic characterization to potential mobility. *Water Res* 44(19): 5512-5531

Bentley R, Chasteen TG (2002) Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony and bismuth. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:250-271

## Literaturverzeichnis

---

Berg M, Luzi S, Trang PTK, Viet PH, Giger W, Stüben D (2006) Arsenic Removal from groundwater by Household Sand Filters: Comparative Field Study, Model Calculations and health benefits. *Environ Sci Technol* 40:5567-5573

BGS, DPHE (2001) Arsenic contamination of groundwater in Bangladesh. In: Kinniburgh DG, Smedley, PL (Eds.), Vol. 2, Final Report, BGS Technical Report WC/00/19. British Geological Survey, Keyworth, UK

Bhattacharjee H, Mhukhopadhyay R, Thiyagarajan S, Rosen BP (2008) Aquaglyceroporins: ancient channels for metalloids. *J Biol* 7(9):33

Biswas A, Majumder S, Neidhardt H, Halder D, Bhowmicka S, Mukherjee-Goswami A, Kundua A, Saha D, Berner Z, Chatterjee D (2011) Groundwater chemistry and redox processes: Depth dependent arsenic release mechanism. *Appl Geochem* 26:516-525

Borch T, Kretzschmar R, Kappler A, Cappelen PV, Ginder-Vogel M, Voegelin A, Campbell K (2010) Biogeochemical redox processes and their impact on contaminant dynamics. *Environ Sci Technol* 44:15-23

Chakraborti D, Rahman MM, Paul K, Chowdhury UK, Sengupta MK, Lodh D, Chanda CR, Saha KC, Mukherjee SC (2002) Arsenic calamity in the Indian subcontinent: What lessons have been learnt? *Talanta* 58:3-22

Challenger F (1951) Biological methylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* 12:429-491

Charlet L, Chakraborty S, Appelo CAJ, Roman-Ross G, Nath B, Ansari AA, Lanson M, Chatterjee D, Basu-Mallik S (2007) Chemodynamics of an arsenic “hotspot” in a West Bengal aquifer: A field and reactive transport modeling study. *Appl. Geochem* 22:1273-1292

Charlet L, Polya D (2006) Arsenic in Shallow, Reducing Groundwaters in Southern Asia: An Environmental Health Disaster. *Elements* 2:91-96

## Literaturverzeichnis

---

Coker VS, Gault AG, Pearce CI, Van der Laan G, Telling ND, Charnok JM, Polya DA, Lloyd JR (2006) XAS and XMCD evidence for species-dependent partitioning of arsenic during microbial reduction of ferrihydrite to magnetite. *Environ Sci Technol* 40:7745-7750

Cozzarelli IM, Weiss JV (2007) Biogeochemistry of aquifer systems. In: Hurst CJ, Crawford RL, Garland JL, Lipson DA, Mills AL, Stetzenbach LD (eds.) (2007) *Manual of Environmental Microbiology*, 3rd edition, ASM Press, Washington 843-859

Cullen WR, Reimer KJ (1989) Arsenic speciation in the environment. *Chem Rev* 89:713-764

De Laeter JR, Böhlke JK, De Bièvre P, Hidaka H, Taylor PDP (2003) Atomic weights of the elements: Review 2000 (IUPAC Technical Report). *Pure App Chem* 75:683-800

Dhar RK, Zheng Y, Saltikov CW, Radloff KA, Mailloux BJ, Ahmed KM, Van Geen A (2011) Microbes Enhance Mobility of Arsenic in Pleistocene Aquifer Sand from Bangladesh. *Environ Sci Technol* 45:2648-2654

DIN 38411-6 (1991) Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K); Nachweis von *Escherichia coli* und coliformen Keimen (K 6). Beuth, Berlin

DIN 18125-1 (1997) Baugrund, Untersuchung von Bodenproben – Bestimmung der Dichte des Bodens – Teil 1: Laborversuche. Beuth, Berlin

DIN EN ISO 11855 (2009) Wasserbeschaffenheit - Bestimmung von ausgewählten Elementen durch induktiv gekoppelte Plasma-Atom-Emissionsspektrometrie (ICP-OES). Beuth, Berlin

Dixit S, Hering JG (2003) Comparison of arsenic(V) and arsenic(III) sorption onto iron oxides: Implications for arsenic mobility. *Environ Sci Technol* 37:4182-4189

Dombrowski PM, Long W, Farley KJ, Mahony JD, Capitani JF, Di Toro DM (2005) Thermodynamic analysis of arsenic methylation. *Environ Sci Technol* 39:2169-2176

## Literaturverzeichnis

---

Dowling CB, Poreda RJ, Basu AR, Peters SL, Aggarwal PK (2002) Geochemical study of arsenic release mechanisms in the Bengal Basin groundwater. *Water Resour Res* 38:1173

Eary LE, Schramke JA (1990) Rates of inorganic oxidation reactions involving dissolved oxygen. In: Melchior DC, Bassett RL (eds.). *Chemical modeling in aqueous systems II*. Vol. Am. Chem. Soc. Symp. Series 416:379-396

Endo S (1904) Über ein Verfahren zum Nachweis der Typhusbacillen. *Centralbl Bakt I Orig* 35:109–110

Falbe JH (1996) *Römpp-Lexikon Chemie*. Thieme, Stuttgart-New York

Farooq SH, Chandrasekharam D, Berner Z, Norra S, Stüben D (2010) Influence of traditional agricultural practices on mobilization of arsenic from sediments to groundwater in Bengal delta. *Water Res* 44:5575-5588

Farooq SH, Chandrasekharam D, Norra S, Berner Z, Eiche E, Thambidurai P, Stüben D (2011) Temporal variations in arsenic concentration in the groundwater of Murshidabad District, West Bengal, India. *Environ Earth Sci* 62(2):223-232

Fendorf S, Michael HA, van Geen A (2010) Spatial and temporal Variations of Groundwater Arsenic in South and Southeast Asia. *Science* 328:1123-1127

Ferguson JF, Gavis J (1972) A review of the arsenic cycle in natural water. *Water Res.* 6: 1259-1274

Freikowski D, Winter J, Gallert C (2010) Hydrogen formation by an arsenate-reducing *Pseudomonas putida*, isolated from arsenic-contaminated groundwater in West Bengal, India. *Appl Microbiol Biotechnol* 88:1363-1371

## Literaturverzeichnis

---

Freikowski D, Neidhardt H, Winter J, Berner Z, Gallert C (2013) Effect of carbon sources and of sulfate on microbial arsenic mobilization in sediments of West-Bengal, India. *Ecotoxicol Environ Saf* 91:139-146

Gallert C, Winter J (1997) Mesophilic and thermophilic anaerobic digestions of source-sorted organic waste: effect of ammonia on glucose degradation and methane production. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:405-410

Garelick H, Jones H (2008) Mitigating Arsenic Pollution: Bridging the Gap Between Knowledge and Practice. *Chem Int* 30(4):7-12

Gault AG, Islam FS, Polya DA, Charnock JM, Boothman C, Chatterjee D, Lloyd JR (2005) Microcosm depth profiles of arsenic release in a shallow aquifer, West Bengal. *Mineral Mag* 69(5):855-863

Gihring TM, Banfield JF (2001) Arsenite oxidation and arsenate respiration by a new *Thermus* isolate. *FEMS Microbiol Lett* 204:335-340

Goh KH, Lim TT (2004) Geochemistry of inorganic arsenic and selenium in a tropical soil: effect of reaction time, pH, and competitive anions on arsenic and selenium adsorption. *Chemosphere* 55:849-859

Guha Mazumder DN (2008) Chronic arsenic toxicity and human health. *Indian J Med Res* 128(4):436-447

Hartog N, Van Bergen PF, De Leeuw JW, Griffioen J (2004) Reactivity of organic matter in aquifer sediment: geological and geochemical controls. *Geochim Cosmochim Acta* 68:1281-1292

Harvey CF, Ashfaq KN, Yu W, Badruzzaman ABM, Ali MA, Oates PM, Michal HA, Neumann RB, Beckie R, Islam S, Ahmed MF (2006) Groundwater dynamics and arsenic contamination in Bangladesh. *Chem Geol* 228:112-136



## Literaturverzeichnis

---

Harvey CF, Swartz CH, Badruzzamn ABM, Keon-Blute N, Yu W, Ali MA, Jay J, Beckie R, Niedan V, Brabander D, Oates PM, Ashfaque KN, Islam S, Hemond HF, Ahmed MF (2002) Arsenic Mobility and Groundwater Extraction in Bangladesh. *Science* 298:1602-1606

Harvey CF, Swartz CH, Badruzzaman ABM, Keon-Blute N, Yu W, Ali MA, Jay J, Beckie R, Niedan V, Brabander D, Oates PM, Ashfaque KN, Islam S, Hemond HF, Ahmed MF (2005) Groundwater arsenic contamination on the Ganges Delta: biogeochemistry, hydrology, human perturbations, and human suffering on a large scale. *Geosci* 337:285-296

Heinrichs H (2000) Atomabsorptionsspektrometrie (AAS), in: Pavicevic, M.K., Amthauer, G. (Eds.), *Physikalisch-chemische Untersuchungsmethoden in den Geowissenschaften, Band 1: Mikroskopische, analytische und massenspektrometrische Methoden*. Schweizerbart, Stuttgart 97-108

Herbel MJ, Fendorf S (2006) Biogeochemical processes controlling the speciation and transport of arsenic within iron coated sands. *Chem Geol* 228:16-32

Héry M, Van Dongen BE, Gill F, Mondal D, Vaughan DJ, Pancost RD, Polya DA, Lloyd JR (2010) Arsenic release and attenuation in low organic carbon aquifers from West Bengal. *Geobiol* 8:155-168

Hirner AV, Rehage H, Sulkowsk, M (2000) *Umweltgeochemie. Herkunft, Mobilität und Analyse von Schadstoffen in der Pedosphäre*. Steinkopf, Darmstadt

Hoang TH, Bang S, Kim KW, Nguyen MH, Dang DM (2010) Arsenic in groundwater and sediment in the Mekong River delta, Vietnam. *Environ Pollut* 158(8):2648-2658

Hughes MF (2002) Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett* 133(1):1-16

## Literaturverzeichnis

---

Inskeep WP, McDermott TR, Fendorf S (2002) Arsenic (V)/(III) Cycling in Soils and Natural Waters: Chemical and Microbiological Processes. In: Frankenberger WT (ed.) (2002) Environmental Chemistry of Arsenic. Dekker, New York – Basel 183-216

IS 10500 (2004) Indian Standard Drinking Water – Specifications, 2<sup>nd</sup> revision. Bureau of Indian Standards, New Dehli

Islam FS, Gault AG, Boothman C, Polya DA, Charnock JM, Chatterjee D, Lloyd JR (2004) Role of metal-reducing bacteria in As release from Bengal Delta sediments. Nature 430:68-71

Islam FS, Pederick RL, Gault AG, Polya DA (2005) Interactions between the Fe(III)-reducing bacterium *Geobacter sulfurreducens* and arsenate, and capture of the metalloid by biogenic Fe(II). Appl Environ Microbiol 71:8642-8648

Itai T, Takahashi Y, Seddique AA, Marouka T, Mitamura M (2010) Variations in the redox state of As and Fe measured by X-ray absorption spectroscopy in aquifers of Bangladesh and their effect on As adsorption. Appl Geochem 25:34-47

Jones CA, Langner HW, Anderson K, McDermott TR, Inskeep WP (2000) Rates of Microbially Arsenate Reduction and Solubilization. Soil Sci Soc Am J 64:600-608

Jung HB, Bostick BC, Zheng Y (2012) Field, Experimental, and Modeling Study of Arsenic Partitioning across Redox Transition in a Bangladesh Aquifer. Environ Sci Technol 46:1388-1395

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

Kocar BD, Herbel MJ, Tufano KJ, Fendorf S (2006) Contrasting effects of dissimilatory iron(III) and arsenic(V) reduction on arsenic retention and transport. Environ Sci Technol 40:6715-6721

## Literaturverzeichnis

---

Kocar BD, Poliozotto ML, Bebber SG, Ying SC, Ung M, Ouch K, Samreth S, Suy B, Phan K, Sampsons M, Fendorf S (2008) Integrated biogeochemical and hydrological processes driving arsenic release from shallow sediments to groundwaters of the Mekong delta. *Appl Geochem* 23:9059-9071

Kocar BD, Fendorf S (2009) Thermodynamic Constrains on Reductive Reactions Influencing the Biochemistry of Arsenic in Soils and Sediments. *Environ Sci Technol* 43:4871-4877

Kocar BD, Borch T, Fendorf S (2010) Arsenic repartitioning during biogenic sulfidization and transformation of ferrihydrite. *Geochim Cosmochim Acta* 74(3):980-994

Konhauser KO (2007) *Introduction to Geomicrobiology*. Blackwell Science Ltd., Oxford

Konhauser KO, Kappler A, Roden EE (2011) Iron in microbial metabolims. *Elements* 7:89-93

Korte NE, Fernando Q (1991) A Review of Arsenic (III) in Groundwater. *Crit Rev Environ Cont* 21(1):1-39

Kirk MF, Roden EE, Crossey LJ, Brealy AJ, Splide MN (2010) Experimental analysis of arsenic precipitation during microbial sulfate and iron reduction in model aquifer sediment reactors. *Geochim Cosmochim Acta* 74:2538-2555

Lane, DJ (1991) *16S/23S rRNA sequencing*. Wiley, Chichester

Leist M, Casey RJ, Caridi D (2000) The management of arsenic wastes: problems and prospects. *J Hazard Mater* 76:125-138

Lengeler JW, Drews G, Schlegel HG (1999) *Biology of the Prokaryotes*. Thieme, Stuttgart-New York.

Lloyd JR, Oremland RS (2006) Microbial Transformations of Arsenic in the Environment: From Soda Lakes to Aquifers. *Elements* 2:85-90

## Literaturverzeichnis

---

Lovely DR, Phillips EJP (1986) Organic matter mineralization with reduction of ferric iron in anaerobic sediments. *Appl Environ Microbiol* 51:683-689

Lovely DR (1993) Dissimilatory Metal Reduction. *Annu Rev Microbiol* 47:263-290

Lovely DR (1995) Microbial reduction of iron, manganese and other metals. *Adv Agron* 54:175-231

Lovely DR, Coates JD, Blunt-Harris EL, Phillips EJP, Woodward JC (1996) Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* 382:445-448

Lovely DR (1997) Microbial Fe(III) reduction in subsurface environments. *FEMS Microbiol Rev* 20:305-315

Lovley DR (2001) Reduction of iron and humics in subsurface environments. In: Frederickson JK, Fletcher M (eds.) *Subsurface microbiology and biogeochemistry*. Wiley & Sons, New York

Lovely DR, Holmes DE, Nevin KP (2004) Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. *Adv Microbiol Physiol* 49:219-286

Lu P, Zhu C (2011) Arsenic Eh-pH diagrams at 25 °C and 1 bar. *Environ Earth Sci* 62:1673-1683

Macy JM, Nunan K, Hagen KD, Dixon DR, Harbour PJ, Cahill M, Sly LI (1996) *Chrysiogenes arsenatis* gen. nov., sp. nov., a New Arsenate-Respiring Bacterium Isolated from Gold Mine Wastewater. *Int J Syst Bacteriol* 46 (4):1153-1157

Malasarn D, Saltikov CW, Campbell KM, Santini JM, Hering JG, Newman DK (2004) *arrA* Is a Reliable Marker for As(V) Respiration. *Science* 306:455

Mandal BK, Suzuki KT (2002) Arsenic round the world: a review. *Talanta* 58:201-235

## Literaturverzeichnis

---

Masscheleyn PH, DeLaune RD, Patrick WH (1991) Effect of redox potential and pH on arsenic speciation and solubility in a contaminated soil. *Environ Sci Technol* 25:1414-1419

McArthur JM, Ravenscroft P, Safiullah S, Thirlwall MF (2001) Arsenic in groundwater: testing pollution mechanism for sedimentary aquifers in Bangladesh. *Water Resour Res* 31:109-117

Miller GL (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem* 31 (3):426-428

Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8 (19):4321-4325

Nath B, Stüben D, Mallik SB, Chatterjee D, Charlet L (2008a) Mobility of arsenic in West Bengal aquifers conducting low and high groundwater arsenic. Part I: Comparative hydrochemical and hydrogeological characteristics. *Appl Geochem* 23:977-995

Nath B, Berner Z, Chatterjee D, Malik SB, Stüben D (2008b) Mobility of arsenic in West Bengal aquifers conducting low and high groundwater arsenic. Part II: Comparative geochemical profile and leaching study. *Appl Geochem* 23:996-1011

Neidhardt H (2012) Impact of groundwater abstraction and of the organic matter on release and distribution of arsenic in aquifers of the Bengal Delta Plain, India. Dissertation. Schriftenreihe des Instituts für Mineralogie und Geochemie, Band 39. Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Scientific Publishing, Karlsruhe

Newman DK, Kennedy EK, Coates JD, Ahmann D, Ellis DJ, Lovely DR, Morel FMM (1997a) Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. nov.. *Arch Microbiol* 168:380-388

Newman DK, Beveridge TJ, Morel FMM (1997b) Precipitation of Arsenic Trisulfide by *Desulfotomaculum auripigmentum*. *Appl Environ Microbiol* 63(5):2022-2028

## Literaturverzeichnis

---

Nickson RT, McArthur JM, Ravenscroft P, Burgess WG, Ahmed KM (2000) Mechanism of arsenic release to groundwater, Bangladesh and West Bengal. *Appl Geochem* 15:403-413

Nordstrom DK (2002) Worldwide occurrence of arsenic in groundwater. *Science* 296(5576):2143-2145

Nriagu JO, Bhattacharya P, Mukherjee AB, Bundschuh J, Zevenhoven R, Loeppert RH (2007) Arsenic in soil and groundwater: an overview. In: Bhattacharya P, Mukherjee AB, Bundschuh J, Zevenhoven R, Loeppert RH (eds.) (2007) *Arsenic in soil and groundwater environment: Biogeochemical Interactions, Health Effects and Remediation (Trace Metals and Other Contaminants in the Environment)*. Elsevier, Amsterdam 3-63

O'Day PA (2006) Chemistry and Mineralogy of Arsenic. *Elements* 2:77-83

O'Loughlin EJ, Gorski CA, Scherer MM, Boyanov MI, Kemner KM (2010) Effects of oxyanions, natural organic matter and bacterial cell numbers on the bioreduction of lepidocrocite ( $\gamma$ -FeOOH) and the formation of secondary mineralization products. *Environ Sci Technol* 44:4570-4576

Oscarson DW, Huang PM, Liaw WK, Hammer UT (1983) Kinetics of Oxidation of Arsenite by Various Manganese Dioxides. *Soil Sci Soc Am J* 47(4):644-648

Páez-Espino D, Tamames J, de Lorenzo V, Cánovas D (2009) Microbial responses to environmental arsenic. *Biometals* 22:117-130

Page WJ, Huyer M (1984) Depression of the *Azotovacter vinelandii* siderophore system, using iron-containing minerals to limit iron repletion. *J Bacteriol* 158:496-502

Peacock AC, Dingman CW (1968) Molecular weight estimation and separation of ribonucleic acid by electrophoresis in Agarose-Acrylamide composite gels. *Biochemistry* 7:668-674

## Literaturverzeichnis

---

Pedersen HD, Postma D, Jakobsen R (2006) Release of arsenic associated with the reduction and transformation of iron oxides. *Geochim Cosmochim Acta* 70:4116-4129

Pérez S (1995) The structure of sucrose in the crystal and in solution. In: Mathlouthi M, Reiser P (Eds.) (1995) *Sucrose: Properties and applications*. Chapman & Hall, Suffolk 11-32

Pfennig N (1978) *Rhodocyclus purpureus* gen. nov. and sp. nov., a ring shaped, vitamin B12-requiring member of the family *Rhodospirillaceae*. *Int J Bacteriol* 28:238-288

Plant JA, Kinniburgh DG, Smedley PL, Fordyce FM, Klinck BA (2005) Arsenic and Selenium. In: Lollar BS (2005) *Treatise on Geochemistry*. Volume 9 – Environmental Geochemistry. Elsevier Amsterdam-Heidelberg 17-66

Poliozotto ML, Kocar BD, Benner SG, Sampson M, Fendorf S (2008) Near-surface wetland sediments as a source of arsenic release to groundwater in Asia. *Nature* 454:505-508

Postma D, Larsen F, Hue NTM, Duc MT, Viet PH, Nhan PQ, Jessen S (2007) Arsenic in groundwater of the Red River floodplain, Vietnam: Controlling geochemical Processes and reactive transport modeling. *Geochim Cosmochim Acta* 71:5054-5071

Qin J, Rosen BP, Zhang Y, Wang G, Franke S, Rensing C (2006) Arsenic detoxification and evolution of trimethylarsine gas by a microbial arsenite S-adenosylmethionine methyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2075-2080

Rabus R, Widdel F (1995) Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch Microbiol* 163(2):96-103

Radloff KA, Cheng Z, Rahman MW, Ahmed KM, Mailloux BJ, Juhl AR (2007) Mobilization of arsenic during one-year incubations of grey aquifer sands from Araihasar, Bangladesh. *Environ Sci Technol* 41:3639-3645

## Literaturverzeichnis

---

Radloff KA, Manning RA, Mailloux B, Zheng Y, Rahman MM, Huq MR, Ahmed KM, Van Geen A (2008) Considerations for conducting incubations to study the mechanisms of As release in reducing groundwater aquifers. *Appl Geochem* 23:3224-3235

Reasoner DJ, Geldreich EE (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* 49:1-7

Redman AD, Macalady DL, Ahmann D (2002) Natural organic matter affects arsenic speciation and sorption onto hematite. *Environ Sci Technol* 36:2889-2896

Rochette EA, Bostick BC, Li GC, Fendorf S (2000) Kinetics of arsenate reduction by dissolved sulphide. *Environ Sci Technol* 34:4714-4720

Roden EE (2003) Fe(III) oxide reactivity toward biological versus chemical reduction. *Environ Sci Technol* 37:1319-1324

Rosen BP (2002) Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Letters* 529:86-92

Rowland HAL, Polya DA, Lloyd JR, Pancost RD (2006) Characterization of organic matter in a shallow, reducing, arsenic-rich aquifer, West-Bengal. *Org Geochem* 37:1101-1114

Rowland HAL, Pederick RL, Polya DA, Pancost RD, Von Dongen BE, Gault AG, Vaughan DJ, Bryant C, Anderson B, Lloyd JR (2007) The control of organic matter on microbially mediated iron reduction and arsenic release in shallow alluvial aquifers, Cambodia. *Geobiol* 5:281-292

Rowland HAL, Boothman C, Pancost R, Gault AG, Polya DA, Lloyd JR (2009) The role of indigenous microorganisms in the biodegradation of naturally occurring petroleum, the reduction of iron, and the mobilization of arsenite from West Bengal aquifer sediments. *J Environ Qual* 38(4):1598-1607

Sadiq M (1997) Arsenic Chemistry in Soils: an Overview of Thermodynamic Predictions and Field Observations. *Water Air Soil Poll* 93(1-4):117-136



## Literaturverzeichnis

---

Santini JM, Sly LI, Schnagl RD, Macey JM (2000) A new chemolithoautotrophic arsenite-oxidizing bacterium isolated from a gold mine: phylogenetic, physiological, and preliminary biochemical studies. *Appl Environ Microbiol* 66:92-97

Santini JM, Stolz JF, Macy JM (2002) Isolation of a new Arsenate-Respiring Bacterium - Physiological and Phylogenetic Studies. *Geomicrobiol J* 19:41-52

Sauge-Merle S, Cuine S, Carrier P, Lecomte-Pradines C, Luu DT, Peltier G (2003) Enhanced toxic metal accumulation in engineered bacterial cells expressing *Arabidopsis thaliana* phytochelatin synthase. *Appl Environ Microbiol* 69:92-97

Saunders JA, Lee MK, Shamsudduha M, Dhakal P, Uddin A, Chowdhury MT, Ahmed KM (2008) Geochemistry and mineralogy of arsenic in (natural) anaerobic groundwaters. *Appl Geochem* 23:3205-3214

Schmoger ME, Oven M, Grill E (2000) Detoxification of arsenic by phytochelatin in plants. *Plant Physiol* 122:793-801

Silver S, Mistra TK (1984) Bacterial transformations of and resistances to heavy metals. *Basic Life Sci* 28:23-46

Silver S, Phung LT (2005) Genes and enzymes involved in bacterial oxidation and reduction of inorganic arsenic. *Appl Environ Microbiol* 71:599-608

Smedley P, Kinniburgh DG (2002) A review of the source, behavior and distribution of As in natural waters. *Appl Geochem* 17:517-568

Smith AH, Lingas EO, Rahmann M (2000) Contamination of drinking-water by Arsenic in Bangladesh: a public health emergency. *Bulletin of the World Health Organization* 78:1093-1103

## Literaturverzeichnis

---

Smith AH, Steinmaus CM (2009) Health effects of arsenic and chromium in drinking water: recent human findings. *Annual Rev Public Health* 30:107-122

Sorokin DY, Tourova TP, Sukhaceva MV, Muyzer G (2012) *Desulfuribacillus alkaliarsenatis* gen. nov. sp. nov., a deep-branching, obligate anaerobic, dissimilatory sulfur and arsenate-reducing haloalkaliphilic representative of the order Bacillales from soda lakes. *Extremophiles* 16(4):597-605

Srivastava D, Madamwar D, Subramanian RB (2010) Pentavalent Arsenate Reductase Activity in Cytosolic Fractions of *Pseudomonas* sp., Isolated from Arsenic-Contaminated Sites of Tezpur, Assam. *Appl Biochem Biotechnol* 162(3):766-779

Stollenwerk KG (2003) Geochemical processes controlling transport of arsenic in groundwater: A review of adsorption. In: Welch AH, Stollenwerk KG (eds.) (2003) *Arsenic in groundwater- geochemistry and occurrence*. Kluwer, Dordrecht 67-100

Stüben D, Berner Z, Chandrasekharam D, Karmakar J (2003) Arsenic enrichment in groundwater of West Bengal, India: geochemical evidence for mobilization under reducing conditions. *Appl Geochem* 18:1417-1434

Sun Y, Polishuk EA, Radoja U, Cullen WR (2004) Identification and quantification of *ArsC* genes in environmental samples by using real-time PCR. *J Microbiol Meth* 58:335-349

Suresh K, Reddy GSN, Sengupta S, Shivaji S (2004) *Deinococcus indicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium from an aquifer in West Bengal, India. *Int J Sys Evol Microbiol* 54:547-461

Taylor JP, Wilson B, Mills MS, Burns RG (2002) Comparison of microbial numbers and enzymatic activities in surface soils subsoils using various techniques. *Soil Biol Biochem* 34:387-401

## Literaturverzeichnis

---

Thomas DJ, Styblo M, Lin S (2001) The cellular metabolism and systemic toxicity of arsenic. *Toxicol Appl Pharmacol* 176(2):127-144

Tufano KJ, Fendorf S (2008) Confounding impacts of iron reduction on arsenic retention. *Environ Sci Technol* 42:4777-4783

Van Geen A, Rose J, Thorai S, Garnier JM, Zheng Y, Bottero JY (2004) Decoupling of As and Fe release to Bangladesh groundwater under reducing conditions. Part II: Evidence from sediment incubations. *Geochim Cosmochim Acta* 68:3475-3486

Vaughan DJ (2006) Arsenic. *Elements* 2:71-75

Volanis D, Kadiyska T, Galanis A, Delakas D, Logotheti S, Zoumpourlis V (2010) Environmental factors and genetic susceptibility promote urinary bladder cancer. *Toxicol Lett* 193(2):131-137

Wagner F (2005) Prozessverständnis einer Naturkatastrophe: eine geo- und hydrochemische Untersuchung der regionalen Arsen-Anreicherung im Grundwasser West Bengalens (Indien). *Karlsruher Mineralogische und Geochemische Hefte. Schriftenreihe des Instituts für Mineralogie und Geochemie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Band 29, Karlsruher Institut für Technologie (KIT) Scientific Publishing, Karlsruhe*

Whitehead TH, Bradbury WC (1950) Qualitative Scheme of Analysis for the Common Sugars. *Anal Chem* 22:651-653

Wilkin RT, Wallschläger D, Ford RG (2003) Speciation of Arsenic in Sulfidic Waters. *Geochem Trans* 4:1-7

Wolf M, Kappler A, Jiang J, Meckenstock RU (2009) Effects of humic substances and quinines at low concentrations on ferrihydrite reduction by *Geobacter metallireducens*. *Environ Sci Technol* 43:5679-5685

## Literaturverzeichnis

---

Worldbank (2005) Report No.31303. Towards a more effective operational response – Arsenic contamination of groundwater in South and East Asian countries. Volume II Technical Report

Xu C, Zhou TQ, Kuroda M, Rosen BP (1998) Metalloid resistance mechanisms in prokaryotes. J Biochem 123:16-23

Yanina SV, Rosso KM (2008) Linked reactivity at mineral-water interfaces through bulk crystal conduction. Science 320:218-222

### VI. Danksagung

Ich möchte mich recht herzlich bei allen Menschen bedanken, die mich während meiner Doktorandenzeit begleitet haben.

Bei Herrn Prof. Dr. J. Winter und Frau Prof. Dr. C. Gallert möchte ich mich herzlich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Betreuung bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Dr. Harald Neidhardt, Dr. Martina Adamek und Dr. Daniel Jost für ihre Freundschaft und nie nachlassende große Hilfsbereitschaft.

Ebenso möchte ich mich bei unseren indischen Projektpartnern Prof. Dr. D. Chatterjee, A. Biswas und S. Majumder für die Organisation bei den beiden Probenahmen vor Ort bedanken.

Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bedanke ich mich herzlich für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Atmosphäre unter den Kollegen, insbesondere bei Rita Seith, Renate Anschütz, Daniel Bonefas, Dr. Susan Schmidt und Dr. Mini Bajaj.

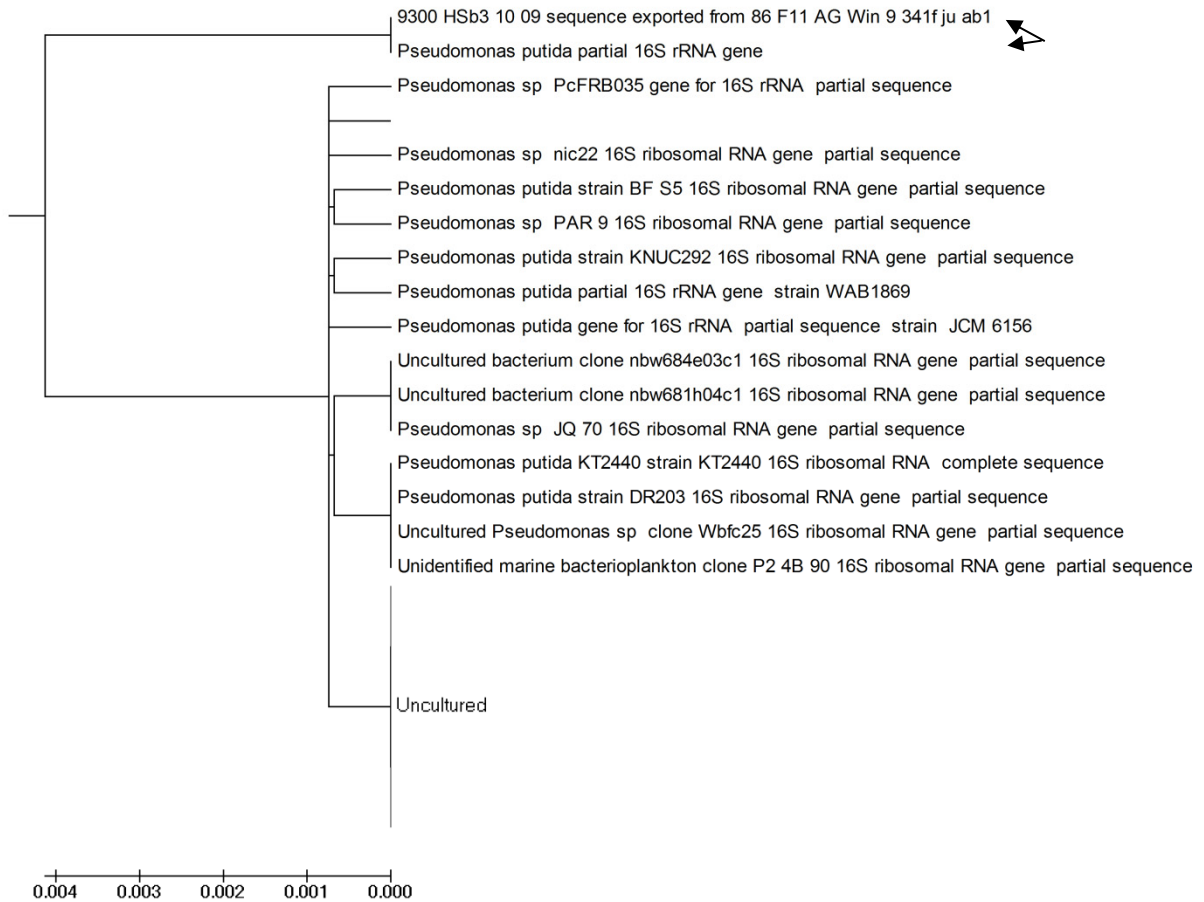
Meinen Eltern danke ich herzlich für ihre nie nachlassende Unterstützung.

## VII. Anhang

### 1. 16 sRNA-Sequenz von *Pseudomonas putida* WB

>9300\_HSb3\_10.09 sequence exported from 86\_F11\_AG Win\_9\_341f\_ju.ab1  
CCGCGTGTGTGAAGAAGGCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTA  
AGTTAATACCTTGCTGCTTTGTCNTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCA  
GCAGCCGNGGNAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGC  
GTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAA  
AACTGGCAAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCG  
TAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACACTGAG  
GTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTATACGAT  
GTCAACTAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACC  
GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC  
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGACATGCA  
GAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCTGACACAGGTGCTGCATGGCT  
GTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTC  
TTAGTTACCAGCACGTAATG

2. Phylogenetischer Baum für *Pseudomonas putida* WB



# Hydrogen formation by an arsenate-reducing *Pseudomonas putida*, isolated from arsenic-contaminated groundwater in West Bengal, India

Dominik Freikowski · Josef Winter · Claudia Gallert

Received: 16 April 2010 / Revised: 18 August 2010 / Accepted: 18 August 2010 / Published online: 7 September 2010  
© Springer-Verlag 2010

**Abstract** Anaerobic growth of a newly isolated *Pseudomonas putida* strain WB from an arsenic-contaminated soil in West Bengal, India on glucose, L-lactate, and acetate required the presence of arsenate, which was reduced to arsenite. During aerobic growth in the presence of arsenite arsenate was formed. Anaerobic growth of *P. putida* WB on glucose was made possible presumably by the non-energy-conserving arsenate reductase ArsC with energy derived only from substrate level phosphorylation. Two moles of acetate were generated intermediately and the reducing equivalents of glycolysis and pyruvate decarboxylation served for arsenate reduction or were released as H<sub>2</sub>. Anaerobic growth on acetate and lactate was apparently made possible by arsenate reductase *ArrA* coupled to respiratory electron chain energy conservation. In the presence of arsenate, both substrates were totally oxidized to CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> with part of the H<sub>2</sub> serving for respiratory arsenate reduction to deliver energy for growth. The growth yield for anaerobic glucose degradation to acetate was  $Y_{\text{Glucose}}=20$  g/mol, leading to an energy coefficient of  $Y_{\text{ATP}}=10$  g/mol adenosine-5'-triphosphate (ATP), if the Emden–Meyerhof–Parnas pathway with generation of 2 mol ATP/mol glucose was used. During growth on lactate

and acetate no substrate chain phosphorylation was possible. The energy gain by reduction of arsenate was  $Y_{\text{Arsenate}}=6.9$  g/mol, which would be little less than one ATP/mol of arsenate.

**Keywords** *Pseudomonas putida* · Arsenate · Hydrogen · Glucose · Acetate · Lactate

## Introduction

Arsenic is a widespread metalloid compound on earth at an average concentration of 2 mg/kg soil. In some areas of the world, higher concentrations of arsenic in soil and sediments are found, for instance in Bangladesh and West Bengal, India, leading to groundwater concentrations of up to 1 mg/l (Chakraborti et al. 2002). Historically, weathering of arsenic-rich minerals in the Himalaya, transport of the particulate matter by the river Ganges and deposition of the arsenic-containing suspended material were considered to be responsible for the arsenic content of soil and sediments in the alluvial delta of West Bengal. Non-soluble arsenic compounds in soil may be mobilized and transferred as dissolved arsenic compounds into the aquifers (Harvey et al. 2005). Mobilization of arsenic, leading to the observed concentrations in groundwater, might be due to geochemical reactions, but also to microbial metabolism. A large number of bacteria (e.g. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) have developed resistance-mechanisms to withstand toxicity of high concentrations of arsenic, but arsenic compounds in potable water are highly toxic for most prokaryotic and all eukaryotic organisms as well and lead to arsenicosis (Chakraborti et al. 2002). Arsenic-resistant bacteria characteristically express *arsC*-genes which reduce pentavalent arsenate to water-soluble trivalent

D. Freikowski · J. Winter · C. Gallert  
Institut für Ingenieurbiologie und Biotechnologie des Abwassers,  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT),  
Am Fasanengarten,  
76131 Karlsruhe, Germany

J. Winter (✉)  
Institut für Ingenieurbiologie und Biotechnologie des Abwassers,  
Karlsruher Institut für Technologie (KIT),  
Am Fasanengarten,  
76128 Karlsruhe, Germany  
e-mail: Josef.Winter@kit.edu



arsenite, apparently without energy conservation (Rosen 1999). The arsenite is then exported by the microorganisms via an arsenite-specific transporter *Arsb*, which is located in the cytoplasmic membrane (Mukhopadhyay et al. 2002). On the other hand, there are also a number of bacteria, which are using arsenate for respiration (Oremland and Stolz 2005). These genera are characterized by dissimilatory respiratory arsenate reductase genes (*arrA*) and comprise a diverse phylogenetic group, including, e.g., *Bacillus*, *Shewanella*, and *Sulfurospirillum* species.

*Pseudomonas putida* is a Gram-negative, rod-shaped organism that is able to grow on a wide variety of organic substrates under aerobic or anoxic conditions. It is also known that *P. putida* has a wide spectrum of heavy metal and metalloid resistance genes, e.g., for copper, zinc, and nickel. Two open reading frames for arsenic resistance are encoded in *P. putida* KT2440 including the *arsC*-gene (Cánovas et al. 2003). In this study, a *P. putida* strain was isolated from arsenic-containing groundwater of West Bengal, India, and its arsenic metabolism during aerobic and anaerobic growth on several carbon sources was analyzed. This report shows for the first time the growth of *P. putida* under anaerobic conditions with arsenate as the only electron acceptor and the formation of hydrogen during complete mineralization of the carbon sources.

## Materials and methods

### Isolation of bacteria from arsenic-contaminated groundwater

Groundwater was pumped from a 19 ft deep household well in Sahispur (N 23° 04'15.5", E 88°36'33.5"), district of Nadia and 100 ml of a representative sample was collected from the water stream in a sterilized plastic bottle after several minutes of pumping. The sample contained 285 µg/l total arsenic and a DOC of 1.5 mg/l. The bacterial population was  $5 \times 10^5$ /ml as determined by microscopical counting after ten-fold enrichment by centrifugation. For enrichment of anaerobic, arsenate-resistant bacteria, 1 ml of the water was inoculated into 20 ml R2A-medium (Reasoner and Geldreich 1985) in 100 ml serum bottles that contained 5 mmol/l arsenate. Serum bottles were closed with a rubber stopper that was fixed by an aluminum cap. The air atmosphere was exchanged for nitrogen. The bottles were incubated for 48 h at 27°C on a shaker at 160 rpm. After growth, 100 µl of the enrichment culture were streaked on R2A-agar plates that contained 5 mmol/l arsenate. The agar plates were transferred into an anaerobic jar and incubated at 27°C under a nitrogen atmosphere for 48 h. Several colonies were picked and re-streaked on R2A-agar plates which were subjected to the

above mentioned incubation procedure for growth. After the second re-streaking single colonies were picked from the Petri dishes and transferred into serum bottles with 20 ml of R2A medium+5 mmol/l arsenate. After growth in liquid medium under the same conditions as above, cells from the best growing culture were either harvested for DNA extraction or 1 ml was inoculated into serum bottles with 20 ml of test medium that contained 1 g/l glucose, 0.25 g/l yeast extract, 0.3 g/l  $K_2HPO_4 \pm 0.695$  g/l arsenate under a nitrogen atmosphere. Alternatively, glucose was omitted and 0.2 ml of a 1.5 M stock solution of sodium acetate or a 1 M stock solution of sodium L-lactate was added to 20 ml as the main carbon source to the media. No growth occurred in media without arsenate. For aerobic growth of the isolated culture the test medium was prepared in serum bottles, but instead of sodium-arsenate 0.695 g/l sodium arsenite was supplemented. For an OD of  $E_{578} = 1.2$ , the cell dry weight was 2.2 mg/20 ml medium. The gas phase for aerobic cultures was synthetic air, which contained 21% oxygen, 79% nitrogen.

### Identification of the bacterial isolate WB as a strain of *P. putida*

From the culture that grew best with arsenate as an electron acceptor in the absence of oxygen genomic DNA was isolated by the method of Murray and Thompson (1980). For identification of the strain universal eubacterial 16S rDNA sequencing primers 27F (5'-AGAGTTT GATCCTGGCT-CAG-3') and 1492R (5'-GGTTACCTTGT TACGACTT-3') (Lane 1991) were used. DNA amplification was performed in a total volume of 25 µl, containing 1 µl dissolved genomic DNA, 1.25 U *Taq*-polymerase, 10 pmol of each primer, 0.25 µl dNTP-mixture (2.5 mM each), 2.5 µl 10× polymerase chain reaction (PCR) buffer and 1.5 µl  $MgCl_2$ . 16S rDNA was amplified in a Biometra Thermocycler T Gradient using following conditions: 95°C for 5 min., followed by 35 cycles with 95°C for 30 s, 52°C for 1 min., 72°C for 2 min. and a final extension of 72°C for 5 min. Amplified DNA was isolated by gel-electrophoresis of aliquots of PCR mixtures (2 µl with 5 µl 6× loading-dye) using 1% agarose in 5×TBE-buffer and was sequenced by MWG Biotech (Ebersberg, Germany). Sequences were compared with those in the NCBI database using the BLAST search program to find the most closely related strains. All further experiments were done with this isolate, identified below as *P. putida* WB (WB derived from "West Bengal") by its 16S rRNA gene (EMBL accession No. FN6886776).

To validate the classification as *P. putida* by the 16S rRNA gene strain WB was further characterized by microscopy, Gram staining and by testing for catalase and

oxidase. Biomass production during growth in the presence of arsenate and doubling times were also determined. The strain was deposited at DSMZ Braunschweig (DSM 23849).

#### Detection of the *arsC*- and *arrA*-gene

The *arsC*-gene of *P. putida* WB was analysed by PCR using primers *amlt-42-f* (3'-TCGCGTAATACGCTGGAGAT-5') and *amltf-376-r* (3'-ACTTTCTCGCCGTCTTCCTT-5') (Sun et al. 2004). Amplification reactions were performed in a total volume of 25 µl containing 2 µl dissolved genomic DNA, 1.25 U *Taq*-polymerase, 10 pmol of each primer, 0.25 µl dNTP-mixture (2.5 mM each), 2.5 µl 10× PCR-buffer and 1.5 µl MgCl<sub>2</sub>. PCR conditions were as follows: 95°C for 3 min, followed by 40 cycles with 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 30 s. The *arrA*-gene was also detected by PCR using primers *arrA for* (3'-TTATTCCAGG GAAGATG-5') and *arrArev* (3'-TCTTTAAGCGGG GAATTC-5') (Malasarn et al. 2004). PCR conditions for amplification were as follows: 95°C for 5 min, followed by 40 cycles with 95°C for 30 s, 52°C for 30 s, and 72°C for 30 s. Amplified DNA was verified by gel-electrophoresis of aliquots of PCR-mixtures (2 µl with 5 µl 6× loading-dye) using 1% agarose in 5× TBE-buffer. As references strains *P. putida* DSM 291 and *Desulfosporosinus auripigmenti* DSM 13351 (obtained from Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) were used.

Determination of glucose, acetate, lactate, arsenate, arsenite, hydrogen and cell mass

Glucose was determined by the colorimetric method of Miller (1959) D- and L-lactic acid were determined with the respective test kits of Boheringer (Mannheim). Acetate was determined by gas-chromatography (Model 437, Chrompack, equipped with a FID; Gallert and Winter 1997). Hydrogen and oxygen were also determined by gas-chromatography (Model CP9001, Chrompack, equipped with a TCD) according to Gallert and Winter (1997). Arsenate was determined by ion-exchange-chromatography (ICS90, Dionex) with a 4×250 mm IonPac A89-HC column (Dionex Austin, Texas USA). Arsenite in arsenate containing mixtures was also determined by ion-exchange-chromatography by subtracting the arsenate amount after complete oxidation of arsenite with 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the amount of arsenate before arsenite oxidation. Moles of hydrogen or oxygen in headspace gases were calculated with the ideal gas law. Cells from 20 ml cultures were pelleted by

centrifugation and the pellet was washed twice with tap water before it was dried to constant weight at 105°C.

#### Results

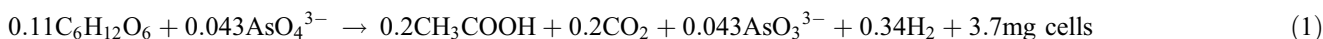
Classification of isolate WB as *P. putida* WB by its 16S rRNA gene sequence and by other features

The 16S rRNA gene sequence of the DNA of isolate WB from groundwater taken in the district Nadia/West Bengal/India was detected with the universal primers 27F and 1492R (Lane 1991) of *Pseudomonas putida* KT2440 (Tumler and Fraser 2002) using the BLAST search program (Altschul et al. 1990). It was 100% identical with *P. putida* KT2440. The identity with several other *P. putida* strains from the NCBI data base was 99% (Table 1). Thus, isolate WB was a *P. putida* strain and is designated *P. putida* WB.

As expected, *P. putida* WB shared the main features of the genus *Pseudomonas*. It was a Gram-negative, motile, non-spore-forming rod-shaped bacterium, with a size of 1–1.5×2–3 µm that reacted positive in oxidase- and catalase-tests. The ideal growth temperature was 27°C. It had a doubling time of 25 h with glucose as a substrate for aerobic growth. In anaerobic 20-ml cultures an optical density of  $E_{578}=1.2$  represented 2.2 mg dry weight of *P. putida* WB cells.

Arsenate reduction and hydrogen production during anaerobic growth of *P. putida* WB and *P. putida* DSM 291 on glucose and acetate

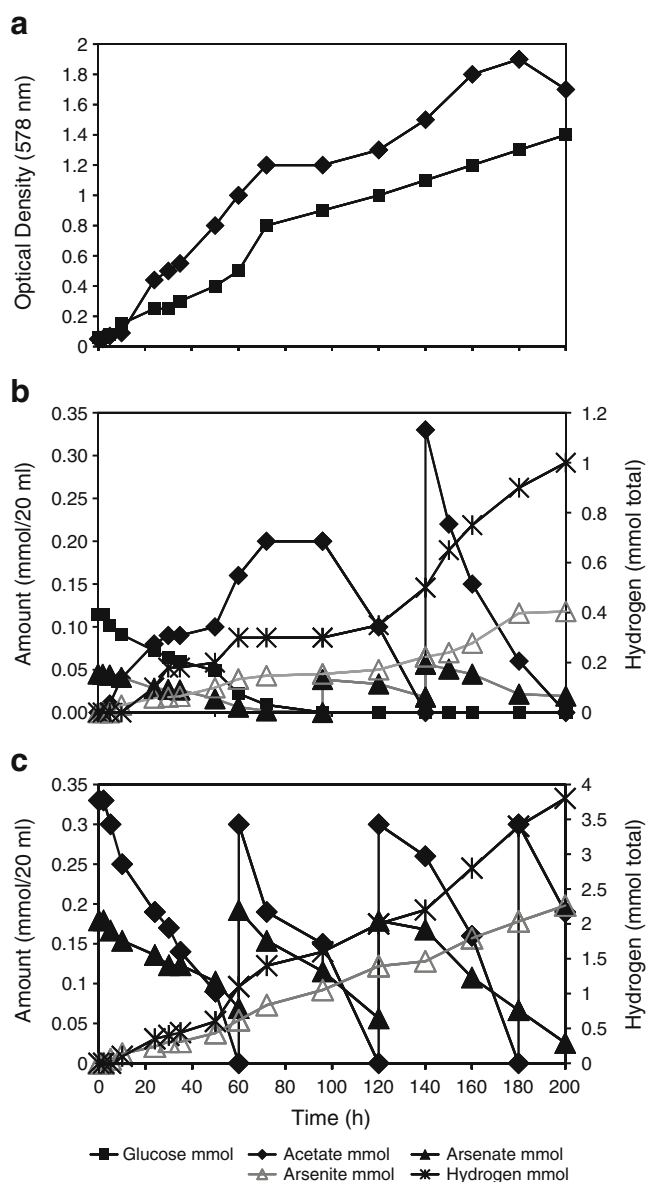
*P. putida* WB grew exponentially on glucose under anaerobic conditions and formed almost 2 mol acetate per mol glucose, but only when arsenate was provided as an electron acceptor (Fig. 1a, b). Without arsenate *P. putida* WB did not grow at all. During glucose metabolism arsenate was reduced to arsenite and some hydrogen was released. During anaerobic growth to an optical density of  $E_{578\text{ nm}}=1.2$  (Fig. 1a at 100 h), 0.11 mmol glucose and 0.043 mmol arsenate (total amounts per 20-ml assay) were metabolized. An average of 0.2 mmol acetate was generated from 0.11 mmol glucose. All arsenate was reduced to arsenite and about 0.3 mmol hydrogen were liberated. The bacterial dry mass was 2.2 mg/0.11 mmol Glucose, equivalent to 20 g dry mass/mol glucose metabolized anaerobically in the presence of arsenate. The stoichiometry of glucose conversion to acetate in the presence of arsenate (Fig. 1b at 100 h) is given in Eq. 1. It is assumed that release of 1 mmol acetate from pyruvate decarboxylation gives 1 mmol CO<sub>2</sub>. Biomass formation may have consumed about 10% of the substrate.



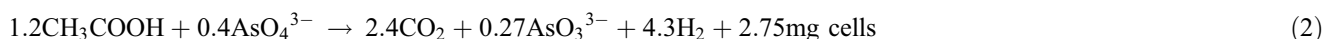
**Table 1** BLAST search for comparison of the *Pseudomonas putida* strain WB (accession No. FN686776) with other *P. putida* strains from NCBI gene bank

Relatedness of <i>P. putida</i> WB (accession no. FN686776) to	NCBI gene bank accession no.	Identity
<i>P. putida</i> KT2440 complete genome	AE015451.1	100%
<i>P. putida</i> partial 16S rRNA gene, strain WAB1869	AM184211.1	99%
<i>P. putida</i> strain CUG LPA11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	EU443615.1	99%
<i>P. putida</i> strain KNUC292 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	EU239202.1	99%
<i>P. putida</i> strain D1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	EU878238.1	99%
<i>P. putida</i> strain BF-S5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	EU857418.1	99%
<i>Pseudomonas</i> sp. benan-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	EU313808.1	99%

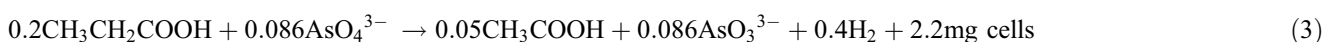
**Fig. 1 a, b, c** Anaerobic growth on glucose (filled diamonds) and acetate (filled squares) (a), as well as glucose (b) and acetate metabolism (c) of *Pseudomonas putida* WB in the presence of arsenate. Arsenate was oxidized to arsenite during glucose conversion to acetate, CO<sub>2</sub>, and H<sub>2</sub>. Acetate from glucose (b) or from external sources (c) could only be oxidized to CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> when arsenate was present as an electron acceptor. CO<sub>2</sub> was not quantified. In the experiment of (c), acetate and arsenate were added at time zero and after 60 and 120 h, acetate once again after 180 h



After complete oxidation of glucose to acetate and reduction of all arsenate to arsenite growth of *P. putida* WB stopped. No growth at the expense of acetate occurred in the absence of arsenate (Fig. 1a, 70–100 h). However, growth continued with the acetate as carbon source if arsenate was replenished (Fig. 1a, 100 h onwards). During anaerobic metabolism of the acetate that was released during glucose degradation or was supplemented from an external source (Fig. 1b at 140 h) to CO<sub>2</sub> and reducing equivalents, the hydrogen served either for arsenate reduction or was released as H<sub>2</sub>. The replenished 0.3 mol acetate at 140 h (Fig. 1b) were completely oxidized with the formation of 0.043 arsenite from arsenate and additionally 0.5 mmol H<sub>2</sub> were generated. Stoichiometrically there was a hydrogen deficiency from acetate oxidation and arsenate reduction, presumably caused by losses through the rubber



The hydrogen production rate apparently was not affected by accumulating hydrogen in the gas phase, indicating no influence of the H<sub>2</sub>-partial pressure on hydrogen generation. After 240 h, 4.3 mmol of hydrogen were generated from a total of 1.2 mmol acetate while 0.4 mmol arsenate were apparently reduced to 0.27 mmol arsenite (the difference to arsenate may be due to incomplete oxidation during analysis). Thus, if 1.2 mmol acetate were anaerobically oxidized to 2.4 mmol CO<sub>2</sub> and theoretically 4.8 mmol H<sub>2</sub>, and 0.4 mmol H<sub>2</sub> were required for reduction of 0.4 mmol arsenate to arsenite, 4.4 mmol H<sub>2</sub> should be generated. This was in good agreement with 4.3 mmol H<sub>2</sub> that were actually detected. Growth to a final OD of 1.5 was equivalent to 2.75 mg cells per 20 ml assay. Assuming a molar energy coefficient of  $Y_{\text{ATP}}=10$  g/mol ATP, the 2.75 mg cell dry weight would be equivalent to 0.275 mmol ATP, that must have been generated from reduction of 0.4 mmol arsenate (arsenate added minus used) by arsenate reductase ArrA. Thus the energy conservation from reduction of 0.4 mmol arsenate to arsenite was  $Y_{\text{Arsenate}}=6.9$  g cells per mol arsenate that was respired.



In a control experiment *P. putida* DSM 291 was supplied with 0.2 mmol lactate and 0.86 mmol arsenate. The organisms grew exponentially and oxidized the lactate to

stopper. Thus, the stoichiometry for anaerobic acetate oxidation by *P. putida* WB in the presence of arsenate was derived from a separate assay. Acetate was the sole growth substrate and much higher arsenate concentrations for hydrogen consumption were supplied. In addition, serum bottles were incubated bottom-up to avoid hydrogen losses (Fig. 1a, c). Acetate (0.3 mmol) was replenished three times after 60, 120, and 180 h, and arsenate was replenished two times after 60 and 120 h incubation time. Growth, acetate and arsenate reduction as well as arsenite and hydrogen formation were measured during the experiment. Concentrations were summed up and stoichiometries calculated for the whole experiment (Eq. 2; numbers are mmol total; 1 mmol acetate was assumed to give 2 mmol CO<sub>2</sub> since yeast extract could be used for biomass formation):

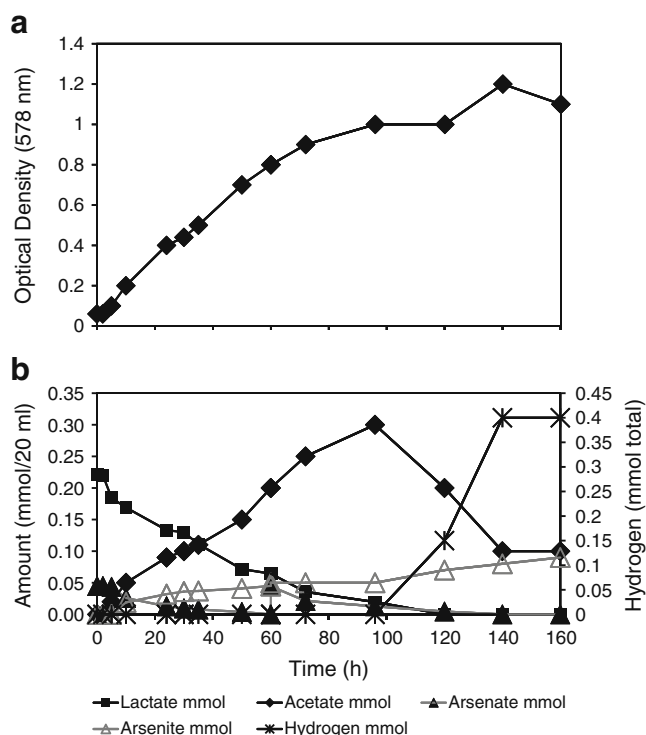
The same experiments with glucose and acetate as growth substrates were performed with the reference strain *P. putida* DSM 291 and similar stoichiometries were obtained (data not shown).

#### Respiration of arsenate with lactate as carbon source

To test anaerobic growth of *P. putida* WB with other carbon sources than glucose or acetate, 0.2 mmol of lactate was supplied as the main carbon source in the test medium together with 0.043 mmol of arsenate, which was replenished after 60 h (Fig. 2a, b). *P. putida* WB grew exponentially to an optical density of 1.2 (Fig. 2a) while the lactate was decarboxylated stoichiometrically to acetate. After 140 h lactate was completely oxidized and totally 0.086 mmol arsenate were reduced to arsenite (Fig. 2b). Acetate utilization apparently started already when little lactate was still left, but growth and acetate utilization stopped after 140 h when arsenate was used up (Fig. 2b). At that time 0.4 mmol hydrogen were produced. The stoichiometry for lactate utilization and arsenate reduction from Fig. 2b can be formulated as follows (Eq. 3):

intermediarily 0.3 mmol acetate which disappeared after lactate depletion. Overall, 0.045 mmol arsenite and 0.4 mmol hydrogen were formed (data not shown).

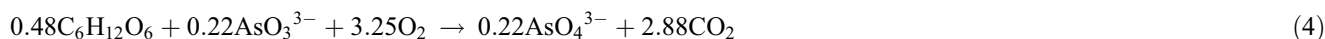
**Fig. 2 a, b** Growth (a) and L-lactate metabolism of *Pseudomonas putida* WB (b) during anaerobic arsenate respiration. Arsenate was replenished after 60 h. The L-lactate was stoichiometrically decarboxylated to acetate, and then the acetate oxidized under hydrogen formation, as long as arsenate was available



Aerobic growth with glucose as the only carbon source in the presence of arsenite

To test the influence of arsenite on aerobic growth of *P. putida* WB 0.079 mmol sodium arsenite was added to the medium. There was an exponential growth for 96 h to a final optical density of 1.6, which was equivalent to 3.3 mg cells in the 20 ml assay (Fig. 3a). Totally, 0.48 mmol of glucose was

respired with 3.25 mmol oxygen and 0.22 mmol arsenite were oxidized to 0.22 mmol arsenate (Fig. 3b). The oxygen supply for each portion was calculated for glucose respiration and arsenite oxidation. In a control experiment without glucose, only 0.03 mmol arsenite were oxidized after 96 h, excluding a rapid chemical oxidation. With the data of Fig. 3b the following stoichiometry could be derived ( $\text{CO}_2$  estimated from glucose respiration; Eq. 4).



*P. putida* DSM 291 reacted similarly (data not shown). As in the experiment with the *P. putida* WB, arsenite was completely oxidized to arsenate after 96 h. For complete oxidation of 0.48 mmol glucose and 0.22 mmol arsenite theoretically 3 mmol oxygen were required.

#### Identification of the *arsC*- and the *arrA*-gene

To demonstrate the genetic capacity of *P. putida* WB for detoxification and/or respiration of arsenate by arsenate reductases *arsC*- and *arrA*-genes were isolated. Both genes were detected in *P. putida* WB. *arcC* contained 350 bp and *arrA* 620 bp. As positive controls *D. auripigmenti*, a sulfur-

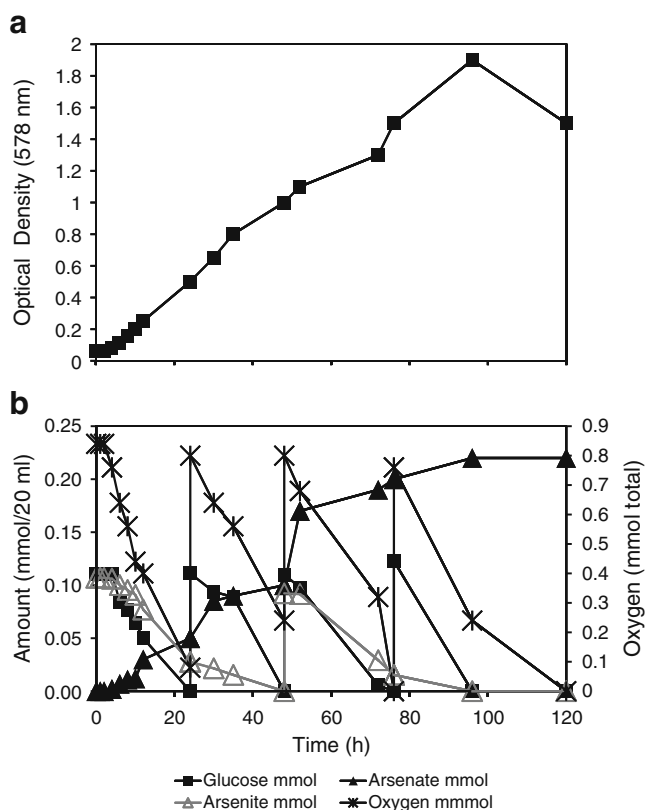
reducing bacterium that is known to be able to reduce arsenate and *P. putida* DSM 291 were used. Both control strains and the isolated *P. putida* strain WB showed the bands for the *arsC*- and *arrA*-genes (Fig. 4).

#### Discussion

This study reports the isolation of a *P. putida*, strain WB from arsenic-contaminated groundwater in West Bengal and its ability to generate hydrogen during anaerobic mineralization of different carbon sources with arsenate as an electron acceptor. The arsenic concentration in West

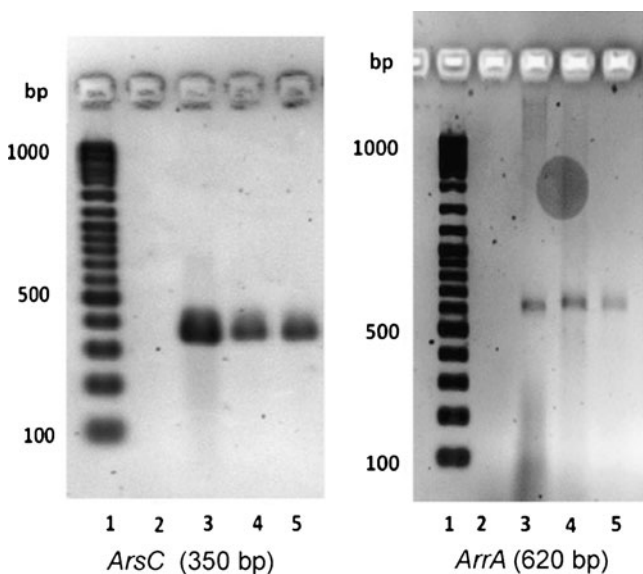


**Fig. 3 a, b** Aerobic growth (a) and glucose metabolism of *Pseudomonas putida* WB in the presence of arsenite (a)

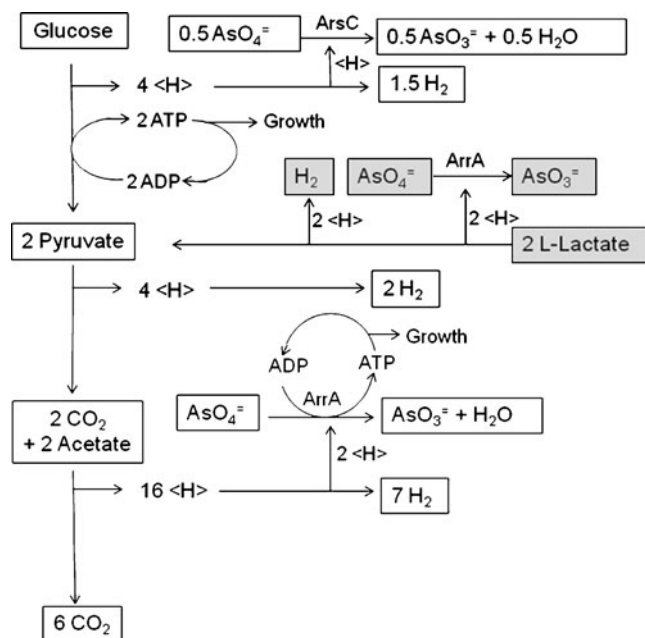


Bengal can be as high as 1 mg/l (Chakraborti et al. 2002), whereas in the location, where the groundwater samples were taken, about 300 µg/l arsenic was found. A number of studies in this area on geochemical and microbial mobilization of arsenic in soil, contaminating the ground-

water are available in the literature (e.g. Nickson et al. 2000; Héry et al. 2010). A new bacterial species that was isolated from an aquifer in West Bengal, *Deinococcus indicus*, was resistant against arsenic and was able to grow



**Fig. 4** Agarose gels of the PCR products of *arsC*- and *arrA*-genes of *Pseudomonas putida* WB and reference strains. Lane 1, DNA standard; lane 2, sterile deionized water; lane 3, *Desulfosporinus auripigmenti*; lane 4, *P. putida* DSM291; lane 5, *P. putida* WB



**Fig. 5** Scheme of anaerobic respiration of glucose, acetate or lactate by *Pseudomonas putida* WB in the presence of arsenate. Lactate seems to be fed in via pyruvate

aerobically on different carbon sources such as lactose or arabinose in the presence of 10 mmol/l arsenate (Suresh et al. 2004). However, no accurate turnover of carbon sources and arsenic was determined. There are a number of other studies describing isolates from different arsenic-containing environments that were able to respire arsenate (Huber et al. 2000; Lear et al. 2007; Bachate et al. 2009; Zhou et al. 2010). Newamn et al. (1997) described a sulfur-reducing bacterium, *D. auripigmenti* that reduced 5 mmol/l of arsenate in 144 h completely to arsenite while growing on 5 mmol/l of lactate, but no growth on acetate or only acetate oxidation was observed. In our study *P. putida* WB reduced 4.5 mmol/l of arsenate during anaerobic growth on 8.5 mmol/l lactate. In contrast to Newman's study we added arsenate twice, 2.25 mmol/l each (0.045 mmol total/20 ml assay). The arsenate was reduced completely in 120 h. Srivastava et al. (2009) isolated a *Pseudomonas* sp. DRBSI that was closely related to *Pseudomonas stutzeri* which was able to reduce up to 100 mmol/l of arsenate under aerobic conditions in NB-medium. No hydrogen formation was observed, as expected for aerobic conditions. In contrast *P. putida* WB from our study does not reduce arsenate under aerobic conditions, but it oxidizes arsenite to arsenate. Santini et al. (2002) isolated a strictly anaerobic *Bacillus*-like strain JMM-4 from arsenic-contaminated mud from a gold-mine in Australia that was able to grow anaerobically on arsenate with lactate as the sole carbon source. This bacterium reduced 5 mmol/l of arsenate completely to arsenite in parallel to the oxidation of 5 mmol/l of lactate. The formation of hydrogen was not investigated. In contrast to *D. auripigmenti* (Newman et al. 1997) the JMM-4 *Bacillus*-like strain could use acetate as a sole carbon source. Another well-known arsenate-reducing bacterium, *Chrysiogenes arsenatis* was also able to grow on acetate as electron donor with arsenate as the terminal electron acceptor. This species reduced 3.9 mmol/l of arsenate while oxidizing 1 mmol/l of acetate (Macy et al. 1996). The formation of hydrogen was again not investigated. Jones et al. (2000) enriched a strain of *Clostridium intestinales*, an arsenate-reducer from an agricultural soil that contained naturally elevated concentrations of arsenic (840  $\mu\text{mol/kg}$ ) and investigated the reduction of arsenate under anaerobic conditions in serum bottles with 50 ml nutrient solution at 25°C and under shaking. As a carbon-source  $^{14}\text{C}$ -spiked glucose was used (5 mmol/l) and 0.6–5 mmol/l of As(V) was the sole electron acceptor. Hydrogen production after complete consumption of glucose was equimolar to the released carbon dioxide. Since butyrate was the main fermentation product the authors concluded that their strain was using the butyric acid pathway, generating

1 mol of butyrate, 2 mol of  $\text{CO}_2$  and 2 mol of  $\text{H}_2$  per mol glucose. Traces of acetic acid, formic acid, butanol and sec-butyl butyrate were also detected. The formation of hydrogen in these experiments seemed not to be dependent on arsenate reduction, thus *C. intestinales* did not grow by arsenate respiration.

*P. putida* WB in contrast had an essential requirement for arsenate to be able to grow at all on glucose, lactate or acetate in the absence of oxygen. Two arsenate reductases were apparently expressed by *P. putida* WB (Fig. 4), the non-respirative ArsC for detoxification (Rosen 2002) and ArrA for respirative arsenate reduction (Malasarn et al. 2004). Anaerobic glucose degradation to acetate did not require energy from arsenate reduction since 2 mol of ATP were available per mol glucose by substrate level phosphorylation during glycolysis via the EMP-pathway. This was apparently the case since 2.2 mg of cell mass (derived from the OD measurement) was formed from 1.1 mmol of glucose, resulting in  $Y_{\text{Glucose}}=20$  g/mol. With a  $Y_{\text{ATP}}=10$  g/mol this would indicate a specific energy gain of 2 mol ATP. The reducing equivalents generated by glycolysis were partially used for arsenate reduction and partially released as hydrogen. No glucose utilization was possible in the absence of arsenate.

Two moles acetate were generated from 1 mol glucose and remained in the medium when arsenate was used up, and growth stopped. Only when arsenate was replenished (Fig. 1b at 90 h), growth continued and acetate was oxidized under formation of arsenite and hydrogen. The energy for growth on acetate must have come from respiratory arsenate reduction, since acetate oxidation per se would not allow energy conservation. If 1 mol ATP could be generated by reduction of 1 mol arsenate, then the  $Y_{\text{ATP}}$  was 6.9 g/mol. In Fig. 5 the reactions during anaerobic growth of *P. putida* WB on glucose, acetate and lactate are summarized. Based on the obtained reaction stoichiometries with the respective substrates and on the growth response, the involvement of ArsC and ArrA was included. Under anaerobic conditions in the absence of oxygen glucose could be converted to acetate with an energy gain from substrate level phosphorylation during glycolysis only in the presence of arsenate when at least some of the hydrogen was removed by non-respiratory ArsC for arsenate reduction. Anaerobic acetate oxidation was coupled to respiratory arsenate reduction and proceeded to completion only if enough arsenate was present. Lactate was sequentially oxidized via pyruvate and acetate and was associated with growth of *P. putida*. Lactate oxidation to pyruvate and the subsequent decarboxylation of pyruvate to acetate as well as the anaerobic oxidation of acetate both seemed to allow growth by arsenate respiration with ArrA.

**Acknowledgement** This research was supported by a grant of the German Research Foundation and the German Federal Ministry of Economic Cooperation and Development (DFG, AZ Wi 524/20-1). We thank the Indian cooperation partners for perfect organization and for their help to take samples on site.

## References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipmann DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
- Bachate SP, Cavalca L, Andreoni V (2009) Arsenic-resistant bacteria isolated from agricultural soils of Bangladesh and characterization of arsenate-reducing strains. *J Appl Microbiol* 107:145–156
- Cánovas D, Cases I, de Lorenzo V (2003) Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis. *Environ Microbiol* 5(12):1242–1256
- Chakraborti D, Rahman MM, Paul K, Chowdhury UK, Sengupta MK, Lodh D, Chanda CR, Saha KC, Mukherjee SC (2002) Arsenic calamity in the Indian subcontinent: What lessons have been learnt? *Talanta* 58:3–22
- Gallert C, Winter J (1997) Mesophilic and thermophilic anaerobic digestions of source-sorted organic waste: effect of ammonia on glucose degradation and methane production. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:405–410
- Harvey CF, Swartz CH, Badruzzaman ABM, Keon-Blute N, Yu W, Ali MA, Jay J, Beckie R, Niedan V, Brabander D, Oates PM, Ashfaq KN, Islam S, Hemond HF, Ahmed MF (2005) Groundwater arsenic contamination on the Ganges Delta: biogeochemistry, hydrology, human perturbations, and human suffering on a large scale. *Geosci* 337:285–296
- Héry M, Van Dongen BE, Gill F, Mondal D, Vaughan DJ, Pancost RD, Polya DA, Lloyd JR (2010) Arsenic release and attenuation in low organic carbon aquifers from West Bengal. *Geobiol* 8:155–168
- Huber R, Sacher M, Vollmann A, Huber H, Rose D (2000) Respiration of arsenate and selenate by hyperthermophilic *Archea*. *Syst Appl Microbiol* 23:305–314
- Jones CA, Langner HW, Anderson K, McDermott TR, Inskip WP (2000) Rates of microbially arsenate reduction and solubilization. *Soil Sci Soc Am J* 64:600–608
- Lane DJ (1991) 16 S/23 S rRNA sequencing. Wiley, Chichester, UK
- Lear G, Song B, Gault AG, Polya DA, Lloyd JR (2007) Molecular analysis of arsenate-reducing bacteria within Cambodian sediments following amendment with acetate. *Appl Environ Microbiol* 73(4):1041–1048
- Macy JM, Nunan K, Hagen KD, Dixon DR, Harbour PJ, Cahill M, Sly LI (1996) *Chrysiogenes arsenatis* gen. nov., sp. nov., a new arsenate-respiring bacterium isolated from gold mine wastewater. *Int J Syst Bacteriol* 46(4):1153–1157
- Malasam D, Saltikov CW, Campbell KM, Santini JM, Hering JG, Newman DK (2004) *arrA* is a reliable marker for As(V) respiration. *Science* 306:455
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31(3):426–428
- Mukhopadhyay R, Rosen BP, Phung LT, Silver S (2002) Microbial arsenic: from geocycles to genes and enzymes. *FEMS Microbiol Rev* 26:311–325
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8(19):4321–4325
- Newman DK, Kennedy EK, Coates JD, Ahmann D, Ellis DJ, Lovley DR, Morel FMM (1997) Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. nov. *Arch Microbiol* 168:380–388
- Nickson RT, McArthur JM, Ravencroft P, Burgess WG, Ahmed KM (2000) Mechanism of arsenic release to groundwater, Bangladesh and West Bengal. *Appl Geochem* 15:403–413
- Oremland RS, Stolz JF (2005) Arsenic, microbes and contaminated aquifers. *Trends Microbiol* 13(2):45–49
- Reasoner DJ, Geldreich EE (1985) A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl Environ Microbiol* 49:1–7
- Rosen BP (1999) Families of arsenic transporters. *Trends Microbiol* 7(5):207–212
- Rosen BP (2002) Biochemistry of arsenic detoxification. *FEBS Lett* 529:86–92
- Santini JM, Stolz JF, Macy JM (2002) Isolation of a new arsenate-respiring bacterium—physiological and phylogenetic studies. *Geomicrobiol J* 19:41–52
- Srivastava D, Madamwar D, Subramanian RB (2009) Pentavalent arsenate reductase activity in cytosolic fractions of *Pseudomonas* sp., isolated from arsenic-contaminated sites of Tezpur, Assam. *Appl Biochem Biotechnol*. doi:10.1007/s1201000988520
- Sun Y, Polishuk EA, Radoja U, Cullen WR (2004) Identification and quantification of *arsC* genes in environmental samples by using real-time PCR. *J Microbiol Meth* 58:335–349
- Suresh K, Reddy GSN, Sengupta S, Shivaji S (2004) *Deinococcus indicus* sp. nov., an arsenic-resistant bacterium from an aquifer in West Bengal, India. *Int J Syst Evol Microbiol* 54:457–461
- Tumler B, Fraser CM (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 4(12):799–808
- Zhou Y, Yao J, He M, Choi MMF, Feng L, Chen H, Wang F, Chen K, Zhuang R, Maskow T, Wang G, Zaray G (2010) Reduction in toxicity of arsenic(III) to *Halobacillus* sp. Y35 by kaolin and their related adsorption studies. *J Hazard Mater* 176:487–494





ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

# Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ecoenv](http://www.elsevier.com/locate/ecoenv)

## Effect of carbon sources and of sulfate on microbial arsenic mobilization in sediments of West Bengal, India

Dominik Freikowski<sup>a,1</sup>, Harald Neidhardt<sup>b</sup>, Josef Winter<sup>a</sup>, Zsolt Berner<sup>b</sup>, Claudia Gallert<sup>a,2,\*</sup>

<sup>a</sup> Institut für Ingenieurbiologie und Biotechnologie des Abwassers, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Am Fasanengarten, D-76131 Karlsruhe, Germany

<sup>b</sup> Institut für Mineralogie und Geochemie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Forschungszentrum Umwelt, Adenauerring 20b, D-76131 Karlsruhe, Germany

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 August 2012

Received in revised form

17 January 2013

Accepted 21 January 2013

Available online 28 February 2013

#### Keywords:

Arsenic

Sulfate

Iron

Manganese

Indigenous flora

Sediment

### ABSTRACT

Arsenic (As) dissolution from sediments into groundwater in the Bengal Delta/West India was investigated. Two experimental sites were chosen with contrasting As concentrations in shallow groundwater. Apparently patches of high-As and low-As sediments occurred in close neighbourhood. A fast As mobilization with lactate or ethanol as carbon sources and sulfate as an electron acceptor and a possible influence of indigenous flora because of higher As amounts and an increasing total cell count was observed over a period of 110 days. Sucrose was a less suitable carbon source. Inoculation of an arsenate-reducing *Pseudomonas putida* WB, that was isolated from the sediments did not improve arsenic mobilization. Maximal arsenic concentrations up to 160 µg/l were leached out from sediment columns with lactate or ethanol + sulfate in the water at natural groundwater flow, but the majority of the As remained in the sandy sediments. Some correlation of arsenic with Fe, but not with Mn dissolution seems to exist.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Toxic arsenic compounds in groundwater are present in many regions of the world, e.g. in Germany, the USA, Argentina, Vietnam and in particular in Bangladesh and India (Nordstrom, 2002; Mandal and Suzuki, 2002; Hoang et al., 2010). More than 30 million people in the Bengal Delta Plain of West Bengal in India and Bangladesh have only access to drinking water that contains more than 50 µg/l As, which is above the Indian standard specifications for drinking water (IS 10500, 2004) and representing the world's awkward arsenic calamity (Chakraborti et al., 2002; Chatterjee et al., 1995; Das et al., 1995). A permanent ingestion of arsenic with potable water well above the boundary concentration for health safety over several years can lead to arsenicosis and different forms of cancer (Guha Mazumder, 2008; Brinkel et al., 2009; Volanis et al., 2010; Smith and Steinmaus, 2009).

In groundwater, mostly oxianions of arsenic are found, either trivalent arsenite or pentavalent arsenate, where arsenite is considered to be more mobile and toxic (Tsai et al., 2009). Both oxyanions could serve as potential electron acceptors or electron

donors for a number of bacteria. Weathering of arsenic-rich minerals in the Himalaya, followed by transport of As within the particulate matter fraction by the river Ganges and finally deposition of the arsenic-containing suspended material in the Bengal Delta Plain (BDP) over decades seems to be responsible for the arsenic content of soil and sediments (Bhattacharya et al., 1997, 2003; Harvey et al., 2005). In several studies with groundwater from the BDP the mechanisms of mobilization of As from sediments was investigated (McArthur et al., 2004; Nath et al., 2008a; Farooq et al., 2011 and references therein). Different theories have been discussed to explain mobilization of arsenic such as competitive exchange with fertilizer phosphate (Acharyya et al., 1999), oxidation of pyrite (Roychowdhury, 2008; Banning and Ruede, 2010) or Fe-reductive dissolution (Nickson et al., 2000; McArthur et al., 2001; Pedersen et al., 2006). At present, the Fe-reduction mechanism is the most accepted hypothesis for the high As-levels in groundwater (Fendorf et al., 2010), due to the very high affinity of arsenic to Fe-oxides/Fe-hydroxides (Lowers et al., 2007). Besides geochemical mobilization, microbial driven reduction of iron (Islam et al., 2004), sulfate (Kocar et al., 2010) or arsenate reduction of solid phase-associated As by bacteria in the aquifer could result in a significant mobilization of As and thus increase soluble arsenic concentrations (Jones et al., 2000; Harvey et al., 2002; Freikowski et al., 2010; Radloff et al., 2011; Legg et al., 2012). This report describes the possible influence of microorganisms on mobilization of arsenic in

\* Corresponding author. Fax: +49 4921 807 1593.

E-mail address: [Claudia.Gallert@hs-empden-leer.de](mailto:Claudia.Gallert@hs-empden-leer.de) (C. Gallert).

<sup>1</sup> Present address: UAGS, Hansjakobstr. 3, D-79194 Gundelfingen, Germany.

<sup>2</sup> Present address: Hochschule Emden/Leer, Fachbereich Mikrobiologie/ Biotechnologie Constantiaplatz 4, D-26723 Emden, Germany.

sediments from the Nadia District of West Bengal with different arsenic-concentrations in the aquifer.

## 2. Sampling and analytical methods

### 2.1. Study area

The two study sites are located in the Eastern part of the Nadia district of West Bengal, India. “Site A” was located at a latitude of N23°04'14.5" and a longitude of E88°36'33.5" and “site B” at a latitude of N23°04'58.2" and a longitude of E88°38'13.1". The study area is located close to the boarder of Bangladesh in the east and within the central floodplain area, where the river Hoogly flows from north to south (Fig. 1).

### 2.2. Screening of groundwater wells, sediment sample collection and analyses

In December 2007, eleven groundwater samples from private wells in the study area were collected after 10 min of water pumping at each well (Fig. 1). One set of water samples was filtered through sterile 0.45 µm cellulose acetate filters (Sartorius, Göttingen, Germany) and the filtered water was acidified immediately with 1 %v/v suprapur HNO<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, Germany) for analysis of major and trace elements by means of HR-ICP-MS (AXIOM, VG Elemental, Waltham, USA), and of dissolved organic carbon (DOC) with a DOC-analyzer (highTOC, Elementar, Hanau, Germany). Another set of water samples was taken directly from the flowing water for tests of aerobic and anaerobic total cell counts, coliforms and *E. coli* (according to DIN 38411-6, 1991) after transport to Germany in cooled gas-proof vessels. The arsenic data in conjunction with DOC and microorganisms served to select two study sites with highly contrasting As concentrations in the groundwater.

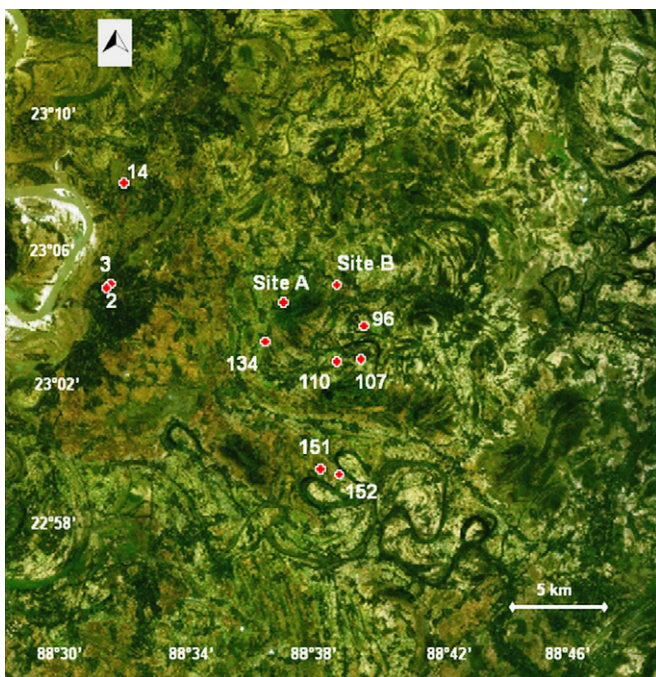
In May 2008 two drillings at the selected sites A and B were carried out using common practice (Lapham et al., 1997). Sediment samples from different depths were taken with a split-spoon core

barrel that was lined in gas-proof PVC tubes and used as a core catcher. The equipment was regularly sterilized with a disinfecting agent (Sterillium<sup>®</sup>, Bode Chemie, Hamburg, Germany) before sampling. To avoid contamination with fluids, drilling-cores were obtained by hammering the core catcher to a depth of 9.8–11 m, to stand under the water table which was 3.35 m below land surface at site A and 2.90 m at site B, measured with a light plummet. Sediment color was determined with Munsell soil color charts directly in the field during sampling in order to avoid alteration effects in sediment color caused by oxidation. The color of sediments in the drilling depth was dark grey at site A (10YR 4/1) and B (2.5Y 4/0). After sampling, PVC tubes were immediately sealed with a gas-proof plug and water-proof aluminum tape (Tesa, Hamburg, Germany) after flushing with pure Nitrogen through sterile 0.45 µm cellulose acetate filters (Sartorius). Tubes were cooled at 4 °C until use for column experiments. Sediment samples consisted of silty fine sand with a porosity of about 50%. Sediment extracts for analyses of the arsenic content were obtained by microwave-assisted acid digestion. The arsenic content was determined by FIAAS according to Heinrichs (2000).

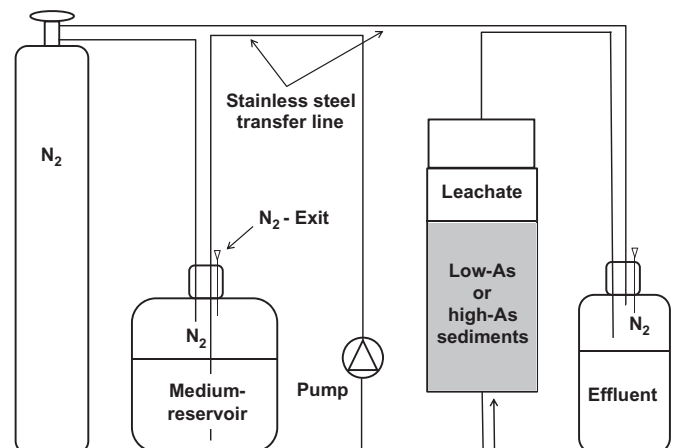
### 2.3. Column experiments

Mobilization of arsenic was studied at 25 ± 3 °C, using glass columns (length 18 cm, diameter 5 cm) under anoxic conditions in an upflow batch-bed system (Fig. 2), filled with 200 ± 5 g of homogenously mixed sediment fractions (12 cm filling height). The hydraulic retention time in the glass columns was 1.5 d (67 ml effluent water per 100 ml pore volume per day or 12 cm water flow/d, equivalent to 43 m groundwater flow per year). All columns were supplied with a SSC-medium that contained 2.5 mM NH<sub>4</sub>Cl, 2.5 mM KCl, 4 mM CaCl<sub>2</sub> × 2H<sub>2</sub>O and 2 mM MgCl<sub>2</sub> × 6H<sub>2</sub>O (Angle et al., 1991, modified). The pH was adjusted with NaOH to 6.8 before autoclaving at 120 °C for 60 minutes and exchanging the air against nitrogen. The medium was supplemented with 1 ml trace element solution (Rabus and Widdel, 1995) and 1 ml vitamin-solution VL7 per liter (Pfennig, 1978). The solutions were made anaerobic at a gas exchange device by multiple evacuation and re-gassing with nitrogen and then filter-sterilized with 0.45 µm cellulose acetate filters (Sartorius). The effluent water of the sediment columns was collected daily in sterilized, nitrogen-flushed serum bottles (Fig. 2).

The first double set of columns with sediments either from site A (A) or site B (B), respectively, was operated without any additions as “in-situ” controls, while the second set of columns



**Fig. 1.** Satellite image (Landsat 7) of the study area in Nadia, West-Bengal, India including sampled wells (see Table 1). “Site A” (Well No. 132) and “site B” (Well No. 125) were selected as drilling places. Image created with NASA World Wind (version 1.4).



**Fig. 2.** Experimental scheme of column experiments. Medium reservoir, soil columns and transfer lines were autoclaved at 120 °C for 60 min (one cycle) and sealed with rubber stoppers to avoid air intrusion into the system.

was inoculated with 10 ml of pregrown *Pseudomonas putida* WB (OD<sub>578</sub>=1.0) that was previously isolated from ground water samples of the study site (Freikowski et al., 2010). The third set of sediment columns was fed with 5 mM L-lactate, the fourth set of columns was supplemented with 5 mM L-lactate plus 10 ml *P. putida* WB, the fifth set of columns with 5 mM L-lactate + 5 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and the sixth set of columns with 5 mM L-lactate, 5 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 10 ml *P. putida* WB. As a sterile control allowing only geochemical reactions two columns were filled with either sediments from both sites (AC/BC), autoclaved immediately (120 °C, 60 min) and supplied continuously with sterile medium, which lacked any added C-source (e.g. lactate) or vitamins. For inoculation of columns with *P. putida* the cell suspension was mixed into 50 ml medium, pumped into the columns and then allowed to interact with sediment particles for attachment/retainment for at least one day, before continuous pumping of sterile medium was started. All required components for operation of the columns were sterilized before use and handled under sterile conditions.

When the mobilization of arsenic stagnated 110 days after the start in the first column experiments, the controls without carbon source were supplemented with 5 mM ethanol to test mobilization of As in the presence of ethanol.

In another set of columns the influence of 5 mM sucrose ± 5 mM sulfate with site B sediments only were tested.

#### 2.4. Water sampling and chemical analyses

Water samples from lab experiments were stored at 4 °C until analysis, at most for 48 h. Arsenic was determined by flow injection atomic absorption spectrometry (FIAAS, model AAS 200, Perkin-Elmer, Rodgau, Germany). Samples were measured after acidification with 100 µl of suprapure concentrated HNO<sub>3</sub> and filtration through a 0.45 µm cellulose acetate filter. Total iron and manganese concentrations were measured by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES, model 715-ES, Varian, Hanau, Germany) after preparation of the samples the same way as for FIAAS. Sulfate was determined by ion-exchange chromatography (ICS 90, Dionex, Germering, Germany).

#### 2.5. Determination of total cell counts

To demonstrate microbial growth, total cell counts in sediments before and after the column experiments were determined. One gram of sediment was suspended in 100 ml of a 0.95% NaCl-solution and then diluted three-fold. One hundred microlitter of diluted culture was streaked on DEV-Nutrient-Agar (DIN 38 411) containing (in g/l): peptone from meat (10.0), meat extract (10.0), NaCl (5.0) and Agar-Agar (18.0). Petri dishes were incubated at 27 °C for 24 h and then colonies were counted. Total cell counts

(colony forming units, cfu) were calculated using the formula:

$$\text{cfu/ml} = \left( \sum \text{all counted colonies}/n_1 + (n_2 \times 0.1) + (n_3 \times 0.01) \right) \times 1/dV$$

with  $n_1$  being the lowest dilution,  $n_2$  and  $n_3$  the next higher ten-fold dilutions.  $V$  represents the volume of the sample (100 µl).

### 3. Results

#### 3.1. Content of As, Fe, dissolved organic carbon and of bacteria in groundwater samples of the eastern district of Nadia/India

Groundwater samples from eleven domestic groundwater wells in Nadia were investigated for their Fe, As and DOC content, as well as for their coliform, *E. coli*, aerobic and anaerobic bacterial counts (Table 1). There was no distinct proportion regarding the iron:arsenic:dissolved organic matter (Fe:As:DOC)-ratio and the bacterial population density in the water. Low As/Fe concentrations correlated with high DOC-values and vice versa. All samples contained 2.8–8.1 × 10<sup>3</sup> coliforms/ml and 0 (2 samples) – 2.4 × 10<sup>3</sup> (1 sample) *E. coli*/ml, indicating fecal contamination of the wells. The population range for aerobic bacteria was 2.3–6.3 × 10<sup>5</sup>/ml and for anaerobic bacteria 6.9 × 10<sup>3</sup>–4.7 × 10<sup>5</sup>/ml. Fe, As and DOC concentrations, were used to select two suitable drilling-sites for further investigations regarding arsenic mobilization from sediments. So, two new wells were drilled next to private wells No. 125 (site B) and No. 132 (site A) that were expected to deliver groundwater with contrasting As-concentrations (Fig. 1). The soil from site A contained 2.1 mg As/kg, whereas the soil of site B contained 1.7 mg As/kg. The As content was not as different as expected from the previous groundwater examinations (285 µg/l As at site A and 2 µg/l at site B, Table 1). Furthermore, well No. 125 was the only well with a low Fe, As and DOC concentration in the water. The high As and Fe concentrations in combination with the microbial data led to select well No. 132 (Table 1). Unfortunately the water samples of this well for microbial analyses got lost during transport. However, since microbial analyses were scattering only little between wells with different As-content and well No. 125 was located close to well No. 96, microbial data of well 96 may represent those of well No. 125.

#### 3.2. Total cell counts in sediments

To show an increasing cell density, which could be an indicator for a higher microbial activity, in all assays total cell counts were determined at the start and at the end of the experiments. Quantification of the population increase (Table 2) revealed that in all sediments total cell counts increased by one

**Table 1**

Chemical and microbial parameters of groundwater from private wells in the Nadia district/India. Wells No. 132 (site A) and 125 (site B) were selected as drilling places.

Well No.	Iron [µg/l]	Arsenic [µg/l]	DOC [µg/l]	Coliforms [cfu/ml]	<i>E.coli</i> [cfu/ml]	Aerobic bacteria [cfu/ml]	Anaerobic bacteria [cfu/ml]
2	9720	333	570	2.76 × 10 <sup>3</sup>	0	3.76 × 10 <sup>5</sup>	6.89 × 10 <sup>3</sup>
3	7370	217	2510	2.77 × 10 <sup>3</sup>	1.19 × 10 <sup>2</sup>	4.14 × 10 <sup>5</sup>	6.70 × 10 <sup>4</sup>
14	2400	13.8	1370	5.93 × 10 <sup>3</sup>	0	2.31 × 10 <sup>5</sup>	4.49 × 10 <sup>5</sup>
96	2500	6.10	2240	4.28 × 10 <sup>3</sup>	7.00 × 10 <sup>1</sup>	6.27 × 10 <sup>5</sup>	4.74 × 10 <sup>5</sup>
107	7730	19.9	3180	8.10 × 10 <sup>3</sup>	2.39 × 10 <sup>3</sup>	3.15 × 10 <sup>5</sup>	1.90 × 10 <sup>5</sup>
110	3570	171	2390	5.22 × 10 <sup>3</sup>	3.80 × 10 <sup>2</sup>	4.98 × 10 <sup>5</sup>	2.76 × 10 <sup>5</sup>
125 <sup>a</sup>	48.0	2.30	1070	—	—	—	—
132 <sup>a</sup>	3300	285	1470	5.48 × 10 <sup>3</sup>	8.00 × 10 <sup>1</sup>	5.00 × 10 <sup>5</sup>	1.64 × 10 <sup>5</sup>
134	1170	9.70	2810	4.70 × 10 <sup>3</sup>	6.00 × 10 <sup>1</sup>	4.35 × 10 <sup>5</sup>	1.45 × 10 <sup>5</sup>
151	6080	18.3	640	2.87 × 10 <sup>3</sup>	1.00 × 10 <sup>2</sup>	4.29 × 10 <sup>5</sup>	5.24 × 10 <sup>4</sup>
152	4550	290	3040	6.10 × 10 <sup>3</sup>	2.00 × 10 <sup>2</sup>	4.88 × 10 <sup>5</sup>	2.23 × 10 <sup>5</sup>

<sup>a</sup> Locations of well numbers 125 (site B) and 132 (site A) were selected as drilling places.



log power if no carbon source and electron acceptors were added. In the presence of lactate, ethanol or sucrose  $\pm P. putida$  WB, respectively, cell densities at the end of the experiment reached  $10^8$ – $10^9$  cfu/ml and in the presence of lactate + sulfate  $\pm P. putida$  WB, the population increased even more up to  $> 10^{10}$  cfu/ml.

**Table 2**

Total cell-count in assays with sediments from sites A and B. Total cell counts increased in all column experiments significantly by addition of lactate, ethanol or sucrose as carbon sources, except for the sterile control and the control without a carbon source.

Assay designation	cfu/g Site A	cfu/g Site B
Sediments, no additions <sup>a</sup>	$7.2 \times 10^4$	$9.7 \times 10^4$
AL1/BL1, SSC	$1.7 \times 10^5$	$7.7 \times 10^5$
AL2/BL2, SSC, <i>P. putida</i> WB	$2.3 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5$
AL3/BL3, SSC, lactate	$7.2 \times 10^9$	$8.3 \times 10^9$
AL4/BL4, SSC, lactate, <i>P. putida</i> WB	$6.4 \times 10^9$	$2.5 \times 10^{10}$
AL5/BL5, SSC, lactate, $\text{SO}_4^{2-}$	$1.8 \times 10^{10}$	$1.2 \times 10^9$
AL6/BL6, SSC, lactate, $\text{SO}_4^{2-}$ , <i>P. putida</i> WB	$1.7 \times 10^{10}$	$1.4 \times 10^6$
AE1/BE1, SSC, ethanol	$1.2 \times 10^8$	$9.5 \times 10^7$
AE2/BE2, SSC, ethanol, <i>P. putida</i> WB	$6.4 \times 10^9$	$5.9 \times 10^8$
AE3/BE3, SSC, ethanol, $\text{SO}_4^{2-}$	$9.7 \times 10^9$	$3.2 \times 10^9$
AE4/BE4, SSC, ethanol, $\text{SO}_4^{2-}$ , <i>P. putida</i> WB	$5.9 \times 10^9$	$2.5 \times 10^6$
BS1, SSC, sucrose	n.d.	$8.2 \times 10^5$
BS2, SSC, sucrose, $\text{SO}_4^{2-}$	n.d.	$5.6 \times 10^4$
AC/BC, SSC, sterile control	$6.2 \times 10^2$	$5.8 \times 10^2$

AL/BL=site A/B with lactate, AE/BE=A/B with ethanol, BS=B with sucrose, AC/BC=controls, SSC=saline sodium citrate,  $\text{SO}_4^{2-}$ =sulfate, cfu=colony forming units, n.d.=not determined.

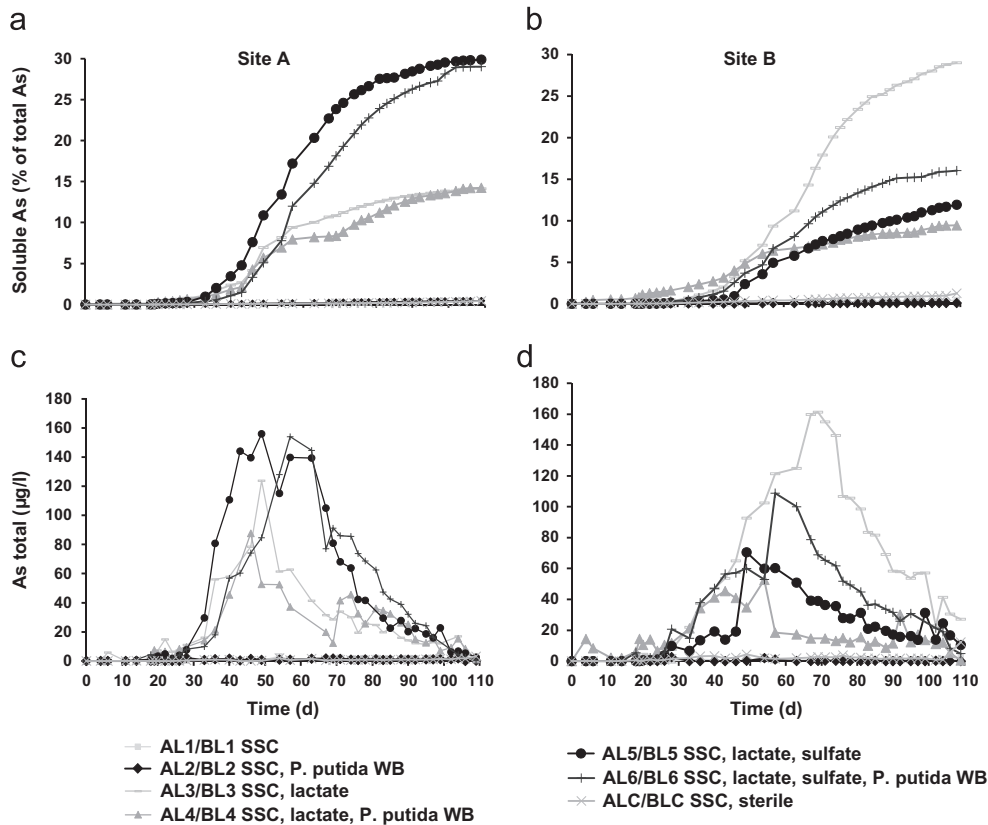
<sup>a</sup> cfu of samples after shipping. Cfu's of all other assays were determined after incubation for 110 days, except for the assays with sucrose, which were incubated for 130 days.

### 3.3. Effect of lactate, ethanol, sulfate and *Pseudomonas putida* WB on arsenic release into percolating water and correlation of arsenic with iron and manganese mobilization

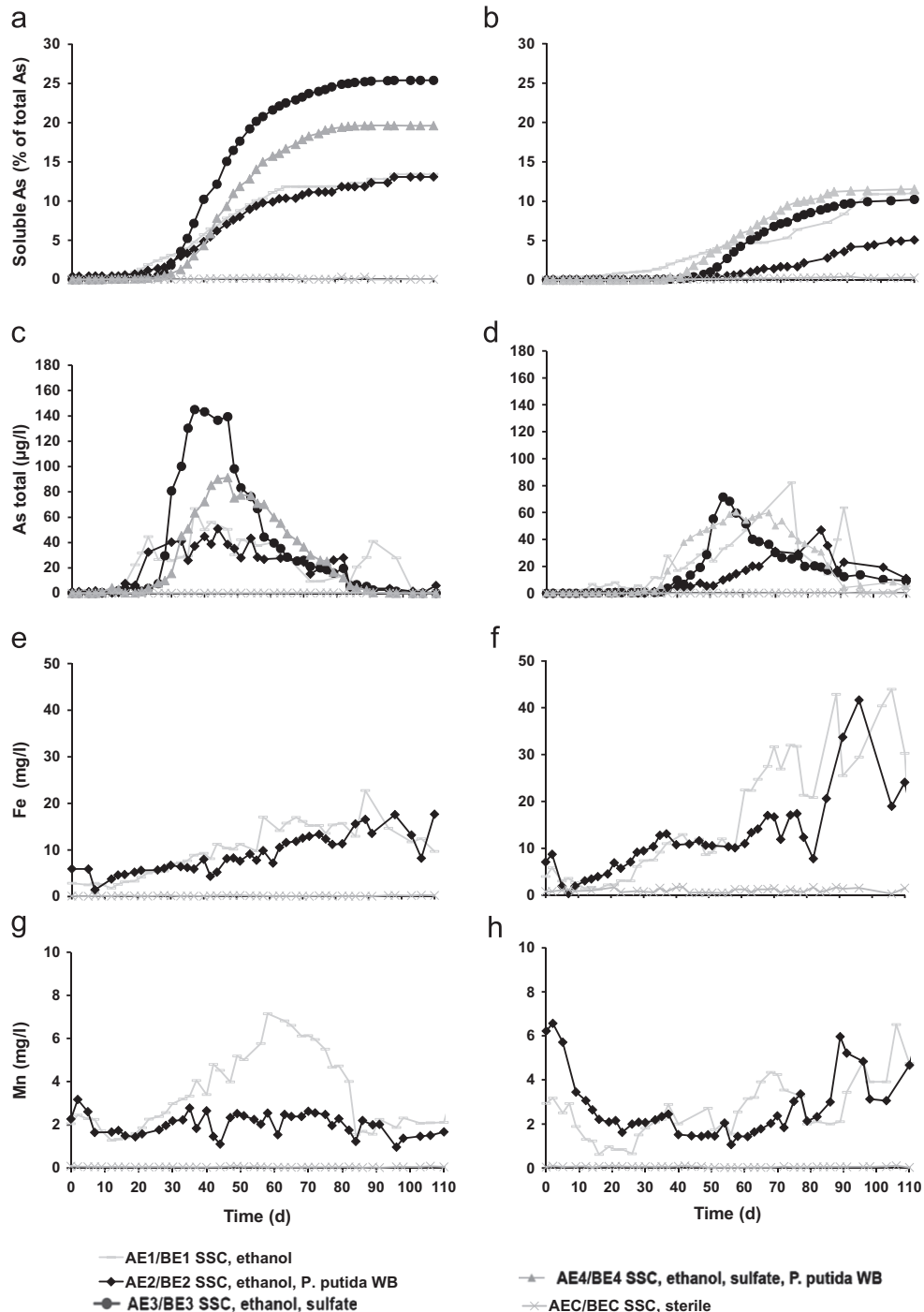
In Fig. 3, total As release and maximum arsenic concentrations in the leachate within 110 d incubation time, until no more As was released, were compared. From the sediments of site A 30% of its initial total As content could be extracted in the presence of lactate as an electron donor and sulfate as an electron acceptor within 110 d incubation, whereas only about 15% were extracted in the absence of sulfate in the same time (Fig. 3a). *Pseudomonas putida* WB apparently slowed down As extraction in both assays.

Ten to fifteen percent As was leached out from soil of site B, except for the assay BL3 with lactate alone (30%; Fig. 3b). In the leachate of sediment columns of site A maximal concentrations of 130–160  $\mu\text{g/l}$  As were obtained after 40–65 days (Fig. 3c), whereas in the columns with sediments of site B maximal concentrations of 80–120  $\mu\text{g/l}$  As in the leachate (160  $\mu\text{g/l}$  in assay BL3) were obtained only later after 50–75 days (Fig. 3d). With one exception the release of arsenic was much lower in assays with lactate alone (no sulfate added)  $\pm P. putida$  WB than in the presence of sulfate.

With ethanol as a carbon source in the absence of sulfate maximally 14% As were released (Fig. 4a and b). An increased As dissolution of 25% was observed in the presence of sulfate in site A sediments (assay AE3), but addition of sulfate and of *P. putida* WB (assay AE4) led to less As mobilization ( $\sim 20\%$ ; Fig. 4a). In site B sediments addition of *P. putida* WB had almost no effect on As release (Fig. 4b). Release of As started earlier in the site A sediments (day 15, Fig. 4c) as compared to the site B sediments (day 20–30, Fig. 3d). Maximum As concentrations of 50–150  $\mu\text{g/l}$



**Fig. 3.** (a)–(d) Cumulative arsenic release and daily concentrations of arsenic in the effluent of assays with sediments from site A ((a) and (c); initially 2.1 mg As/kg) or site B ((b) and (d); initially 1.7 mg As/kg) under different conditions with lactate as the carbon source.

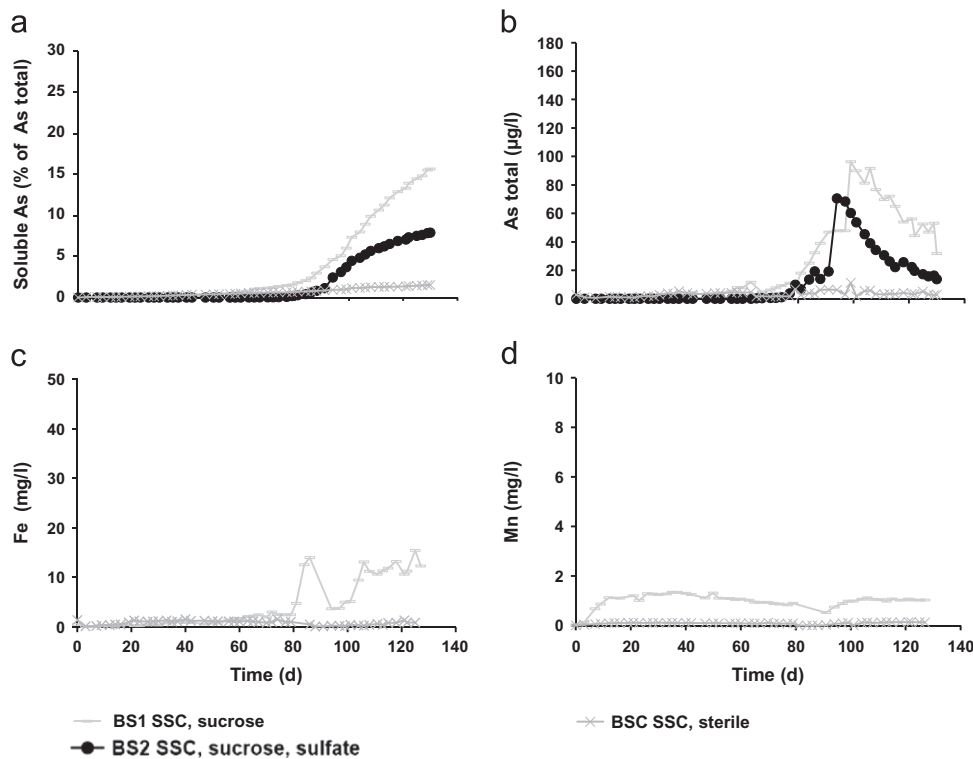


**Fig. 4.** (a)–(h) Cumulative arsenic release, daily concentrations of arsenic as well as daily concentrations of iron and manganese in the effluent of columns with sediments from site A ((a), (c), (e), (g), respectively) and from site B ((b), (d), (f), (h), respectively). Ethanol was the carbon source  $\pm$  sulfate,  $\pm$  *P. putida* WB.

were obtained after 40–45 days in the effluent of site A sediments (Fig. 4c) and after 70–80 days in the effluent of the site B sediments (50–90 µg/l; Fig. 4d) with ethanol as a carbon source at simulated natural groundwater flow.

Iron and manganese oxides are able to adsorb As. The reduction of these oxides by bacteria might bring As into solution (e.g. Islam et al., 2004). With ethanol as a carbon source and electron donor, from site A sediments about 15 mg/l iron and 6 mg/l of manganese were released after 60 days, while from site B sediments twice as much iron and about the same amount of manganese were released (Fig. 4e–h). In all experiments, a precipitation of Fe/Mn (–sulphides) was not observed, due to

anaerobic conditions. No sulfate could be detected in the effluents (data not shown). Release of iron did not correlate with arsenic in site A sediment columns with the indigenous flora and ethanol as a carbon source (correlation factor 0.04) and in the columns with amended *P. putida* WB and ethanol as a carbon source (correlation factor 0.19; data not shown). Correlation factors in these assays for manganese were only 0.009 and 0.03, respectively (data not shown). In the leachate of site B sediments, the correlation of iron with arsenic was 0.47 in the presence of ethanol alone and 0.66 in the presence of ethanol + *P. putida*, while the correlation of manganese with arsenic was only 0.12 and 0.02, respectively, similarly as in site A sediments. The



**Fig. 5.** (a)–(d) Cumulative arsenic release (a) and daily released concentrations of arsenic (b), iron (c) and manganese (d) in the effluent of assays with sediments from site B. Sucrose was the carbon source  $\pm$  sulfate.

analysis of the correlations were carried out with outlier corrected data.

#### 3.4. Arsenic mobilization from sediments with sucrose

When sucrose was supplied with the medium into the sediment columns of site B, significantly elevated amounts of arsenic in the leachate appeared only after 80 days (Fig. 5a and b), as compared to 30–40 days after the first lactate (Fig. 3a–d) or ethanol addition (Fig. 4a–d), indicating at least a significantly delayed reaction. Highest concentrations of As in the effluent were obtained 100 days after the start of sucrose addition in the assay without sulfate (Fig. 5b). The maximal total As release was 16% in the absence of sulfate and 8% in the presence of sulfate, respectively. In all experiments no significant differences between the columns with or without *P. putida* WB were detected (data not shown).

In the assays with sucrose as carbon-source, Fe and Mn were released in the range of 15 mg/l (Fig. 5c) and 1 mg/l (Fig. 5d), respectively, with a significant correlation for iron and arsenic (0.69) and again no correlation with iron and manganese (0.04). Furthermore, a precipitation was not observed.

## 4. Discussion

This study reports a possible microbial mobilization of arsenic in sediments from two sample-sites in Nadia-District, West Bengal, India. The arsenic concentration in West Bengal can be as high as 3 mg/l (Nordstrom, 2002), whereas in the location, where the groundwater samples were taken (Fig. 1), at the so-called site A 285 µg/l and at the “site B” only about 2 µg/l arsenic were found in groundwater in conjunction with nearly the same concentration of solid phase associated As ( $\sim$ 2 mg/kg) and a high concentration of colony forming bacteria (Table 1). The

groundwater of site A contained high amounts of Fe and As whereas the groundwater of site B contained only little Fe and less As, supporting the assumption that As is released by Fe(III) reduction. It is also shown, that high amounts of As in groundwater is not linked to solid phase As, which is supported by the BGH/DPHE (2001) report from Bangladesh, where up to 9000 µg/l As from 1 mg/kg As in sediment were released into groundwater.

In the literature, a number of studies in the Ganges–Bramaputra delta about geochemical and microbial mobilization of arsenic in soil are available from microcosm-, batch- and continuous column-experiments. Akai et al. (2004) tested arsenic-mobilization in muddy sediments from Bangladesh (3–9 m depth, and  $\sim$ 3 mg/kg soluble As) with 1 g/l polypeptone+1 g/l glucose in an anoxic, circulating flow-through column-system. After 12 days a total of 800 µg/l As was observed with a peak of 250 µg/l after 4 days. In contrast to our study, As mobilization under groundwater flow conditions was not investigated. Furthermore, the influence of microbes on arsenic mobilization was not unequivocally shown because of the lack of a sterile control. Another study with sediments from nearly the same area in Bangladesh using the same artificial groundwater as in the mentioned study and also lactate as a carbon-source in anaerobic batch-experiments, showed that 7% (12 mg/l) of P-extractable arsenic was mobilized after 30 days, while in a non-biotic attempt with kanamycin no As was released (Jung et al., 2012). In that study, arsenic was mobilized together with iron, which served as an arsenic-carrier, while in our study the As mobilization apparently was decoupled from iron. Dhar et al. (2011) incubated fine-sand sediments from a deep aquifer in Bangladesh with artificial groundwater, 20 mmol/l lactate and *Shewanella* sp. ANA-3 as a well-known As-reducing species in the absence of oxygen. They found only 17 µg/l As in the supernatant after 90 days, but proved an iron-decoupled mechanism, which was expected with *Shewanella* as an iron-independent As-reducer. Another group performed drillings also in the Nadia district until

a depth of 8 m (Rowland et al., 2009). Here, 15 g of wet fine-sand sediment was mixed with artificial groundwater and incubated anaerobically at 20 °C. After 30 days 20 nmol/l As(III) in the supernatant were detected. In contrast to our study, 30 mmol/l Fe(II) were released simultaneously by the indigenous flora, while no manganese was measured. On the other hand in our study 30 mg/l Fe was released almost simultaneously by the indigenous flora at the site B, while at site A no correlation between As release and Fe release could be observed. Héry et al. (2010) analyzed biogeochemical As mobilization in drilling-cores close to the sampling area of our site A. In contrast to the present report they used artificial groundwater with 10 mM acetate as a carbon-source for microcosm experiments with sediments from 16 m depth. In all non-sterile assays a total of 25 µg/l As was found in the supernatant. No influence of the carbon-source was investigated, but iron was also released decoupled from As mobilization. Arsenic mobilization seemed to be coupled to the reduction of sulfate. In the present study, sulfate influenced arsenic mobilization significantly, as judged from the much higher amount of arsenic in leachates with sulfate in the media (e.g. Fig. 3). Gault et al. (2005) investigated arsenic mobilization in microcosm experiments and found a total mobilization of arsenic in the supernatant of 100 nM from fine-sand sediments taken at 8 m depth in the neighborhood of our sample area. The aquifer contained 300 µg/l arsenic. In contrast to our study, only a fractional amount of arsenic could be mobilized with artificial groundwater and acetate as the only carbon-source in that study. Interestingly, arsenic-mobilization was coupled to iron-reduction while manganese was not detected. A similar study with sediments from high and low arsenic sites near to our location was made by Nath et al. (2008b). Aerobic and anoxic leaching experiments with tap water revealed a lack of correlation between As, Fe and Mn. Even if the redox potential was the main driving force for mobilization of As, microbial participation could not be excluded, but unfortunately no respective controls have been made.

Our study shows a possible influence of bacteria on the mobilization of arsenic in flow-through experiments with sediments of the sample sites in Nadia-District, West-Bengal, India, over 110 days, if artificial groundwater with suitable carbon sources and/or electron acceptors were present. No arsenic was leached in sterile columns ± different carbon sources from both sample sites. In such experiments, the total cell counts as indicators for microbial activity did not significantly increase, indicating that no relevant contamination occurred during the experiment (Table 2). On the other hand, in column experiments with lactate, ethanol or sucrose, arsenic was mobilized considerably and the total cell counts increased, while the carbon-sources were consumed completely during different incubation time without a measurable pH-change. The pH in all experiments remained stable at the initial value of 6.8 (data not shown). Assays with sulfate as an electron acceptor showed the highest arsenic mobilization in the order of 30%. It might be assumed that the higher amount of arsenic was dissolved by abiotic mechanisms, because sulfate might change the redox-potential of the system, which could lead to a possible As release (cf. Héry et al., 2010), but the fact, that in sediments from site B in assay BL3 mobilization was twice as high (30%) as in assay BL6 with sulfate (Fig. 3b), disproves this assumption. Also, the same level of arsenic mobilization in all other assays with lactate and without sulfate (~15%) indicates the influence of microbial arsenic mobilization. This is corroborated by the same total cell counts as in assays with only lactate addition (Table 2). The known microbial mechanism, that sulfate-reducing bacteria are often able to reduce arsenate simultaneously (e.g. Newman et al., 1997; Kocar et al., 2010; Sorokin et al., 2012) supports these findings.

*Pseudomonas putida* WB had no positive influence on arsenic mobilization. No or not more arsenic was mobilized (e.g. Figs. 3 and 4a) and the same total cell counts like with the indigenous flora were obtained. So it can be assumed that the indigenous flora alone is jointly responsible for As mobilization.

In assays with ethanol and sucrose as carbon-sources, dissolved total Fe and Mn were measured to find out if a passive transport via Fe- and Mn-(hydr)oxides was the main driving force in these cases. However, there was no correlation of iron and manganese with arsenic mobilization in sediments of site A. Thus, the indigenous flora could have an influence on As release, which is supporting by the findings of Nath et al. (2008b) with soil samples of the same area and also by the sterile controls, where neither Fe, Mn and As was found in the leachate (Figs. 4 and 5). It could be assumed that in the sterile controls As was re-adsorbed, because of a heat induced crystallization of Fe oxides due to autoclaving (Radloff et al., 2008), but in that case, Fe should be found in the leachate anyway, because autoclaving has no effect on sediment Fe properties (Radloff et al., 2008). On the other hand, in site B sediments a good correlation with iron (~0.7) at the same amount of arsenic as in the experiments with site A sediments was observed. Precipitation of Fe-sulphides, which could also lead to a passive precipitation of As, because of absorption of As in Fe-minerals (Kirk et al., 2010) was also not observed in all column experiments, due to the anaerobic conditions.

## Acknowledgment

This research was supported by a grant of the German Research Foundation DFG (AZ Wi 524/20–1) and the German Federal Ministry of Economic Cooperation and Development. We thank our Indian cooperation partners D. Chatterjee, A. Biswas and S. Majumder for organization and for their help to take samples on site.

## References

- Acharyya, S.K., Chakraborty, P., Lahiri, S., Rymahashay, B.C., Guha, S., Bhowmik, A., 1999. As poisoning in the Ganges Delta. *Nature* 401, 545.
- Akai, J., Ilzumi, K., Fukuhara, H., Masuda, H., Nakano, S., Yoshimura, T., Ohfuji, H., Anwar, H.M., Akai, K., 2004. Mineralogical and geomicrobiological investigation on groundwater arsenic enrichment in Bangladesh. *Appl. Geochem.* 19, 215–230.
- Angle, J.S., McGrath, S.P., Chaney, R.L., 1991. New culture medium containing ionic concentrations of nutrients similar to concentrations found in the soil solution. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (12), 3674–3676.
- Banning, A., Ruede, T.R., 2010. Enrichment processes of arsenic in oxidic sedimentary rocks—from geochemical and genetic characterization to potential mobility. *Water Res.* 44 (19), 5512–5531.
- B.G.S., DPHE, 2001. Arsenic Contamination of Groundwater in Bangladesh. In: Kinniburgh, D.S., Smedley, P.L. (Eds.), *British Geological Survey Technical Report WC/00/19*. British Geological Survey, Keyworth.
- Bhattacharya, P., Chatterjee, D., Jacks, G., 1997. Occurrence of As contaminated groundwater in alluvial aquifers from Delta plains, eastern India: options for safe drinking water supply. *J. Water Res. Dev.* 13, 79–92.
- Bhattacharya, P., Jana, J., Nath, B., Sahu, S.J., Chatterjee, D., 2003. Groundwater As mobilization in the Bengal Delta plain, the use of ferralite as a possible remedial measure—a case study. *Appl. Geochem.* 18, 1435–1451.
- Brinkel, J., Khan, M.H., Kraemer, A., 2009. A systematic review of arsenic exposure and its social and mental health effects with special reference to Bangladesh. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 6 (5), 1609–1619.
- Chakraborti, D., Rahman, M.M., Paul, K., Chowdhury, U.K., Sengupta, M.K., Lodh, D., Chanda, C.R., Saha, K.C., Mukherjee, S.C., 2002. Arsenic calamity in the Indian subcontinent: what lessons have been learnt? *Talanta* 58, 3–22.
- Chatterjee, A., Das, D., Mandal, B.K., Roy Chowdhury, T., Samanta, G., Chakraborti, D., 1995. Arsenic in groundwater in six districts of West Bengal, India, the biggest arsenic calamity in the world. Part 1. Arsenic species in drinking water and urine of affected people. *Analyst* 120, 643–650.
- Das, D., Chatterjee, A., Mandal, B.K., Samanta, G., Chakraborty, D., Chanda, B., 1995. As in groundwater in six districts of West Bengal, India: the biggest As calamity in the world. Part 2. As concentration in drinking water, hair, nails,

- urine, skin-scale and liver tissue (biopsy) of the affected people. *Analyst* 120, 917–924.
- Dhar, R.K., Zheng, Y., Saltikov, C.W., Radloff, K.A., Mailloux, B.J., Ahmed, K.M., Van Geen, A., 2011. Microbes enhance mobility of arsenic in pleistocene aquifer sand from Bangladesh. *Env. Sci. Technol.* 45, 2648–2654.
- DIN 38411-6, 1991. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung; Mikrobiologische Verfahren (Gruppe K); Nachweis von *Escherichia coli* und coliformen Keimen (K 6). Beuth, Berlin.
- Farooq, S.H., Chandrasekharan, D., Norra, S., Berner, Z., Eiche, E., Thambidurai, P., Stueben, D., 2011. Temporal variations in arsenic concentration in the groundwater of Murshidabad District, West Bengal, India. *Environ. Earth. Sci.* 62 (2), 223–232.
- Fendorf, S., Michael, H.A., van Geen, A., 2010. Spatial and temporal variations of groundwater arsenic in South and Southeast Asia. *Science* 328 (5982), 1123–1127.
- Freikowski, D., Winter, J., Gallert, C., 2010. Hydrogen formation by an arsenate-reducing *Pseudomonas putida*, isolated from arsenic-contaminated groundwater in West Bengal, India. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 1363–1371.
- Gault, A.G., Islam, F.S., Polya, D.A., Charnock, J.M., Boothman, C., Chatterjee, D., Lloyd, J.R., 2005. Microcosm depth profiles of arsenic release in a shallow aquifer, West Bengal. *Mineral. Mag.* 69 (5), 855–863.
- Guha Mazumder, D.N., 2008. Chronic arsenic toxicity and human health. *Indian J. Med. Res.* 128 (4), 436–447.
- Harvey, C.F., Swartz, C.H., Badruzzaman, A.B.M., Keon-Blute, N., Yu, W., Ali, M.A., Jay, J., Beckie, R., Niedan, V., Brabander, D., Oates, P.M., Ashfaq, K.N., Islam, S., Hemond, H.F., Ahmed, M.F., 2005. Groundwater arsenic contamination on the Ganges Delta: biogeochemistry, hydrology, human perturbations, and human suffering on a large scale. *Geoscience* 337, 285–296.
- Harvey, C.F., Swartz, C.H., Badruzzaman, A.B.M., Keon-Blute, N., Yu, W., Ali, M.A., Jay, J., Beckie, R., Niedan, V., Brabander, D., Oates, P.M., Ashfaq, K.N., Islam, S., Hemond, H.F., Ahmed, M.F., 2002. Arsenic Mobility and Groundwater Extraction in Bangladesh. *Science* 298, 1602–1606.
- Heinrichs H., 2000. Atomabsorptionsspektrometrie (AAS), in: Pavicevic, M.K., Amthauer, G. (Eds.), *Physikalisch-chemische Untersuchungsmethoden in den Geowissenschaften, Band 1: Mikroskopische, analytische und massenspektrometrische Methoden*. Schweizerbart, Stuttgart, pp. 97–108.
- Héry, M., Van Dongen, B.E., Gill, F., Mondal, D., Vaughan, D.J., Pancost, R.D., Polya, D.A., Lloyd, J.R., 2010. Arsenic release and attenuation in low organic carbon aquifers from West Bengal. *Geobiol.* 8, 155–168.
- Hoang, T.H., Bang, S., Kim, K.W., Nguyen, M.H., Dang, D.M., 2010. Arsenic in groundwater and sediment in the Mekong River delta, Vietnam. *Environ. Pollut.* 158 (8), 2648–2658.
- Islam, F.S., Gault, A.G., Boothman, C., Polya, D.A., Charnock, J.M., Chatterjee, D., Lloyd, J.R., 2004. Role of metal-reducing bacteria in As release from Bengal Delta sediments. *Nature* 430, 68–71.
- IS 10500, 2004. Indian Standard Drinking Water—Specifications, 2nd revision. Bureau of Indian Standards, New Delhi.
- Jones, C.A., Langner, H.W., Anderson, K., McDermott, T.R., Inskeep, W.P., 2000. Rates of microbially arsenate reduction and solubilization. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 64, 600–608.
- Jung, H.B., Bostick, B.C., Zheng, Y., 2012. Field, experimental, and modeling study of arsenic partitioning across redox transition in a Bangladesh aquifer. *Env. Sci. Technol.* 46, 1388–1395.
- Kirk, M.F., Roden, E.E., Crossey, L.J., Brealy, A.J., Splide, M.N., 2010. Experimental analysis of arsenic precipitation during microbial sulfate and iron reduction in model aquifer sediment reactors. *Geochim. Cosmochim. Acta* 74, 2538–2555.
- Kocar, B.D., Borch, T., Fendorf, S., 2010. Arsenic repartitioning during biogenic sulfidization and transformation of ferrihydrite. *Geochim. Cosmochim. Acta* 74 (3), 980–994.
- Lapham, W.W., Wilde, F.D., Koterba, M.T., 1997. Guidelines and standard procedures for studies of ground-water quality: selection and installation of wells and supporting documentation. In: U.S. Geological Survey Water Resources Investigation Report 96-4233. U.S. Geological Survey, Reston.
- Legg, T.M., Zheng, Y., Simone, B., Radloff, K.A., Mladenov, N., González, A., Knights, D., Siu, H.C., Rahman, M.M., Ahmed, K.M., McKnight, D.M., Nemerger, D.R., 2012. Carbon, metals, and grain size correlate with bacterial community structure in sediments of a high arsenic aquifer. *Front. Microbiol.* 3, 1–13.
- Lowers, H.A., Breit, G.N., Foster, A.L., Whitney, J., Yount, J., Uddin, M.N., Muneem, A.D., 2007. Arsenic incorporation into authigenic pyrite, Bengal Basin Sediment, Bangladesh. *Geochim. Cosmochim. Acta* 71 (11), 2699–2717.
- Mandal, B.K., Suzuki, K.T., 2002. Arsenic around the world: a review. *Talanta* 58, 201–235.
- McArthur, J.M., Banerjee, D.M., Hudson-Edwards, K.A., Mishra, R., Purohit, R., Ravenscroft, P., Cronin, A., Howarth, R.J., Chatterjee, A., Talumder, T., Lowry, D., Houghton, S., Chadha, D.K., 2004. Natural organic matter in sedimentary basins and its relation to As in anoxic ground water: the example of West Bengal and its worldwide implications. *Appl. Geochem.* 19, 1255–1293.
- McArthur, J.M., Ravenscroft, P., Safiulla, S., Thirlwall, M.F., 2001. Arsenic in groundwater: testing pollution mechanism for sedimentary aquifers in Bangladesh. *Water Resour. Res.* 31, 109–117.
- Nath, B., Stueben, D., Mallik, S.B., Chatterjee, D., Charlet, L., 2008a. Mobility of arsenic in West Bengal aquifers conducting low and high groundwater arsenic. Part I: Comparative hydrochemical and hydrogeological characteristics. *Appl. Geochem.* 23, 977–995.
- Nath, B., Berner, Z., Chatterjee, D., Malik, S.B., Stueben, D., 2008b. Mobility of arsenic in West Bengal aquifers conducting low and high groundwater arsenic. Part II: Comparative geochemical profile and leaching study. *Appl. Geochem.* 23, 996–1011.
- Newman, D.K., Kennedy, E.K., Coates, J.D., Ahmann, D., Ellis, D.J., Lovely, D.R., Morel, F.M.M., 1997. Dissimilatory arsenate and sulfate reduction in *Desulfotomaculum auripigmentum* sp. nov. *Arch. Microbiol.* 168, 380–388.
- Nickson, R.T., McArthur, J.M., Ravenscroft, P., Burgess, W.G., Ahmed, K.M., 2000. Mechanism of arsenic release to groundwater, Bangladesh and West Bengal. *Appl. Geochem.* 15, 403–413.
- Nordstrom, D.K., 2002. Worldwide occurrence of arsenic in groundwater. *Science* 296 (5576), 2143–2145.
- Pedersen, H.D., Postma, D., Jakobson, R., 2006. Release of arsenic associated with the reduction and transformation of iron oxides. *Geochim. Cosmochim. Acta* 70 (16), 4116–4129.
- Pfennig, N., 1978. *Rhodocyclus purpureus* gen. nov. and sp. nov., a ring shaped, vitamin B12-requiring member of the family *Rhodospirillaceae*. *Int. J. Bacteriol.* 28, 238–288.
- Rabus, R., Widdel, F., 1995. Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 163 (2), 96–103.
- Radloff, K.A., Manning, R.A., Mailloux, B., Zheng, Y., Rahman, M.M., Huq, M.R., Ahmed, K.M., van Geen, A., 2008. Considerations for conducting incubations to study the mechanisms of As release in reducing groundwater aquifers. *Appl. Geochem.* 23, 3224–3235.
- Radloff, K.A., Zheng, Y., Michael, H.A., Stute, M., Bostick, B.C., Mihajlov, I., Bounds, M., Huq, M.R., Choudhury, I., Rahman, M.W., Schlosser, P., Ahmed, K.M., Van Geen, A., 2011. Arsenic migration to deep groundwater in Bangladesh influenced by adsorption and water demand. *Nat. Geosci.* 4, 793–798.
- Rowland, H.A., Boothman, C., Pancost, R., Gault, A.G., Polya, D.A., Lloyd, J.R., 2009. The role of indigenous microorganisms in the biodegradation of naturally occurring petroleum, the reduction of iron, and the mobilization of arsenite from West Bengal aquifer sediments. *J. Environ. Qual.* 38 (4), 1598–1607.
- Roychowdhury, T., 2008. Impact of sedimentary arsenic through irrigated groundwater on soil, plant, crops and human continuum from Bengal delta: special reference to raw and cooked rice. *Food Chem. Toxicol.* 46 (8), 2856–2864.
- Smith, A.H., Steinmaus, C.M., 2009. Health effects of arsenic and chromium in drinking water: recent human findings. *Annual Rev. Public Health* 30, 107–122.
- Sorokin, D.Y., Tourova, T.P., Sukhacheva, M.V., Muyzer, G., 2012. *Desulfuribacillus alkaliarsenatis* gen. nov. sp. nov., a deep-lineage, obligatory anaerobic, dissimilatory sulfur and arsenate-reducing haloalkaliphilic representative of the order Bacillales from soda lakes. *Extremophiles* 16 (4), 597–605.
- Tsai, S.L., Singh, S., Chen, W., 2009. Arsenic metabolism by microbes in nature and the impact on arsenic remediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 20, 659–667.
- Volanis, D., Kadiyska, T., Galanis, A., Delakis, D., Logotheti, S., Zoumpourlis, V., 2010. Environmental factors and genetic susceptibility promote urinary bladder cancer. *Toxicol. Lett.* 193 (2), 131–137.





Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

## Journal of Hazardous Materials

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jhazmat](http://www.elsevier.com/locate/jhazmat)



# Influences of groundwater extraction on the distribution of dissolved As in shallow aquifers of West Bengal, India

Harald Neidhardt<sup>a,\*</sup>, Zsolt Berner<sup>a</sup>, Dominik Freikowski<sup>b</sup>, Ashis Biswas<sup>c</sup>, Josef Winter<sup>b</sup>, Debashis Chatterjee<sup>d</sup>, Stefan Norra<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Institute of Mineralogy and Geochemistry, Karlsruhe Institute of Technology, Adenauerring 20b, D-76133 Karlsruhe, Germany

<sup>b</sup> Institute of Biology for Engineers and Biotechnology of Waste Water Treatment, Karlsruhe Institute of Technology, Am Fasanengarten, D-76133 Karlsruhe, Germany

<sup>c</sup> Department of Land and Water Resource Engineering, Royal Institute of Technology, Teknikringen 76, SE-100 44 Stockholm, Sweden

<sup>d</sup> Department of Chemistry, University of Kalyani, Nadia 741235, West Bengal, India

<sup>e</sup> Institute of Geography and Geoecology, Karlsruhe Institute of Technology, Reinhard-Baumeister-Platz 1, D-76133 Karlsruhe, Germany

### HIGHLIGHTS

- ▶ Spatiotemporal trends occur in arsenic contents of shallow groundwater in West Bengal.
- ▶ We simulate pumping to record changes in the distribution of dissolved arsenic.
- ▶ Pumping induces enduring effects on hydrochemically stratified water columns.
- ▶ Arsenic-safe water resources are vulnerable toward anthropogenic disturbances.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 7 December 2011

Received in revised form

29 December 2012

Accepted 21 January 2013

Available online xxx

#### Keywords:

Arsenic

Groundwater

Bengal Delta Plain

Spatiotemporal trends

Monitoring

Pumping

### ABSTRACT

Here we report temporal changes of As concentrations in shallow groundwater of the Bengal Delta Plain (BDP). Observed fluctuations are primarily induced by seasonally occurring groundwater movement, but can also be connected to anthropogenic groundwater extraction. Between December 2009 and July 2010, pronounced variations in the groundwater hydrochemistry were recorded in groundwater samples of a shallow monitoring well tapping the aquifer in 22–25 m depth, where  $As_{tot}$  concentrations increased within weeks from 100 to 315  $\mu\text{g L}^{-1}$ . These trends are attributed to a vertically shift of the hydrochemically stratified water column at the beginning of the monsoon season. This naturally occurring effect can be additionally superimposed by groundwater extraction, as demonstrated on a local scale by an in situ experiment simulating extensive groundwater withdrawal during the dry post-monsoon season. Results of this experiment suggest that groundwater extraction promoted an enduring change within the distribution of dissolved As in the local aquifer. Presented outcomes contribute to the discussion of anthropogenic pumping influences that endanger the limited and yet arsenic-free groundwater resources of the BDP.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The BDP is known as one of the worst affected areas worldwide by the occurrence of enriched As contents in shallow groundwater,

which is the principal drinking water resource for millions of people [1]. The release of As from sediments is in this area driven by microbial activity in anoxic sections of the shallow aquifers, which depends in turn on the quality and quantity of available organic matter, local geomorphologic characteristics and superimposing anthropogenic effects [2,3]. Resulting spatial distribution patterns of As in shallow groundwaters are extremely heterogeneous [4,5]. Depth profiles of groundwater As contents generally peak in young Holocene sediments at 20–40 m bls, whereas Pleistocene aquifers are considered as primarily arsenic-free [6,7]. After mobilization, the fate of As is determined by the local hydrogeology, which directs the transport of arsenic-enriched groundwater within the aquifers. At a regional scale, the hydraulic conductivity

*Abbreviations:* m bls, meters below land surface; BDP, Bengal Delta Plain; TEA, terminal electron acceptor; FeRB, iron-reducing bacteria; DARPs, dissimilative arsenate respiring prokaryotes;  $As_{tot}$ , total As concentration;  $K$ , coefficient of hydraulic conductivity; TA, total alkalinity; DOC, dissolved organic carbon; TOC, total organic carbon; GMWL, global meteoric water line;  $r$ , Pearson correlation coefficient; LMWL, local meteoric water line.

\* Corresponding author. Tel.: +49 72160844878; fax: +49 72160847247.

E-mail address: [haraldneid@googlemail.com](mailto:haraldneid@googlemail.com) (H. Neidhardt).

in the Bengal Basin is considered anisotropic, with a higher conductivity in horizontal than in vertical direction [8]. Extreme low flow velocities resulting from the flat topography of the BDP provoke a high vulnerability toward anthropogenic pumping, which can cause severe disturbances on the naturally established hydrochemical conditions and As distributions [9]. Groundwater extraction for irrigation purposes has been propagated in time of India's green revolution to overcome the annual dry season (approximately between October and April) and to increase the agricultural productivity. During the past four decades, about 10 million irrigation and tap water wells had been installed in the Bengal Basin, which provide groundwater to more than 100 million people and affect the hydrology at a regional scale [3,10]. Since sediments of the BDP behave as one huge hydraulically interconnected aquifer system, extensive groundwater extraction can further provoke drawdown of arsenic-enriched shallow groundwater into deeper aquifer sections, if not prevented by local aquitard layers or buried palaeosols [8,9,11]. This could be observed in case of a newly installed governmental well in the eastern part of Chakdah City, located in the floodplain area of West Bengal, adjacent to the River Hooghly. Massive extraction of groundwater had created a local depression cone in the surface near shallow aquifer, causing subsequent attraction of a nearby As plume and drawdown of arsenic-rich groundwater in direction of the deep pumping well [2]. A similar situation appeared after installation of a new pumping field near Hanoi, Vietnam [12]. Monitoring of arsenic-enriched wells in the Matlab area (BDP, southeastern Bangladesh) revealed temporal and seasonal variations in groundwater As concentrations that partly decreased during the monsoon and post-monsoon season [13]. Long-term hydrochemical observations in West Bengal from 2001 to 2009 revealed similar results [14]. Here, diverse temporal changes in As concentrations (varying from decreasing over peaking to increasing trends) were attributed to excessive water abstraction, which has strongly altered local groundwater flow directions. In addition, increased As contents in deep aquifers have been reported from several locations in the Bengal Basin, suggesting a vulnerability of arsenic-free groundwater to deep pumping [6,15–18].

Redirections of local groundwater flow additionally enable connections of diverse redox zones within an aquifer. These zones result from anaerobic microbial decomposition of organic matter basing on a successive depletion of available TEA like  $\text{NO}_3^-$ , Mn(IV), Fe(III) or  $\text{SO}_4^{2-}$  [19,20]. Relocation of dissolved TEA, DOC and reactive microbial metabolic products (e.g.  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ) may trigger subsequent biotic and abiotic reactions. Infiltration of organic-rich water into reducing and carbon-limited aquifer sections will likely cause additional As release, when either FeRB or DARPs are stimulated in this way [21–23]. Despite, increasing contents of  $\text{Fe}^{2+}$  may additionally induce transformation processes of poorly ordered Fe-minerals, thereby reducing available As adsorption sites [24,25]. Microbial released  $\text{H}_2\text{S}$  can react with dissolved As, allowing As-sulfides to precipitate in absence of  $\text{Fe}^{2+}$  [26]. Considering this wide range of potential processes, a complex environment of concurrent As release and adsorption may arise in local aquifers sections.

Despite the few long-term hydrochemical monitoring studies [13,14], only very few systematic field experiments have been carried out in the BDP to determine short- and mid-termed spatiotemporal effects on As distributions in groundwater related to extensive pumping [21]. The aim of the present study was to investigate the influences of groundwater extraction within an arsenic-affected shallow aquifer located in the Indian part of the BDP. We therefore investigated hydrochemical effects related to pumping in five nested monitoring wells with a high spatiotemporal resolution. Hydrochemical analyses are complemented by a detailed characterization of present

aquifer sediments, since water–rock interactions determine the fate of mobilized As in various ways within this particular environment.

## 2. Experimental

### 2.1. Installation of nested monitoring wells and coring

A pumping well and four nested piezometric wells with well screens positioned in different depth intervals (A: 12–21; B: 22–25; C: 26–29; D: 30–33; E: 34–37 m bls) were installed according to common practice [27] next to a typical farming village (at  $23^\circ 04' 15.50''\text{N}$ ;  $088^\circ 36' 33.50''\text{E}$ ). The study site is located in the Nadia District of West Bengal, about 8.2 km east of Chakdah City and the Hooghly River [28]. In this area, groundwater is extensively used as drinking water source and for irrigation purposes [29]. In the near surrounding of the study site, no irrigation wells were present that could have interfered with the experimental. The piezometric wells were installed close around the central pumping well in distances of 2.50 and 4.75 m. During drilling of the deepest piezometric well E, sediment cores were concomitantly recovered in 0.65 m intervals down to 39.2 m bls using a split spoon coring device [30]. Subsamples from sediment cores were immediately transferred into  $\text{N}_2$  purged HDPE bags, sealed twice and stored in tightly closed barrels under  $\text{N}_2$  atmosphere. In December 2008, a long-term hydrochemical monitoring was started with sampling in two-week intervals [28].

### 2.2. Sediment analyses

Grain size analyses were conducted to complete the lithological characterization that was done during recovery of the sediment cores. The Beyer formula was used to estimate hydraulic conductivities ( $K$  value) of the sediments basing on the grain size distribution, which was determined by sieving [31].

After drying and homogenization, sample material was analyzed for major and trace elements by energy dispersive X-ray fluorescence spectroscopy (EDXRF; Epsilon5, PANanalytical). Two certified reference standards (SCo-1 and GXR-2 [32]) were used to assure the quality of the EDXRF measuring (As recovery rate for SCo-1:  $104 \pm 2.4\%$ ,  $n: 7$ ; for GXR-2:  $100 \pm 3.1\%$ ,  $n: 11$ ).

Total organic carbon (TOC) contents were determined after decarbonization with a carbon/sulfur-analyzer (CSA; CS 2000 MultiLine F/SET-3, Eltra). Representative samples were selected from depths corresponding to the well screens positions for supplementary geochemical and mineralogical characterizations. From this subset of samples, principal mineral phases were identified by X-ray diffraction (XRD; D500 Kristalloflex, Siemens). Arsenic-bearing mineral phases were additionally determined applying an appropriate sequential extraction method [33]. In addition to this, microwave-assisted (MW system Start 1500, MLS GmbH) acid digestion of total samples was done (for details see Supplementary data). All digestions and extractions were stored at  $4^\circ\text{C}$  until elemental analysis with a high resolution inductively coupled plasma mass spectrometer (HR-ICP-MS; AXIOM, VG Elemental), and all chemicals used were of analytical or suprapure grade.

### 2.3. Groundwater extraction experiment

Groundwater was collected from the five wells before the extraction experiment in order to record the initial state of the aquifer. The extraction experiment was conducted using a submersible electrical pump, which is typically used by local farmers for irrigation purposes. This pump was installed at a depth of 15 m inside the pumping well A (well screen covering 12–21 m bls), a common depth for most of the local private tube wells. Simulation

of discontinuous irrigation pumping was conducted in four pump and rest cycles. Each cycle included 48 h of continuously pumping followed by a rest cycle of 24 h, which allows the water-sediment system to partly equilibrate. Accompanying sampling was done after each rest cycle to include potential ion-exchange reactions, which may subsequently affect the mobility of As. For comparison, one sampling was done immediately after the third pumping interval before the rest cycle. The delivery rate applied was  $9 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ , and discharged water (in total about  $1700 \text{ m}^3$ ) was distributed among surrounding ponds and fields at a minimum distance of 150 m to the pumping site. Sampling was continued bi-weekly for the following seven months to monitor potential middle-term effects related to As concentrations.

#### 2.4. Hydrochemical analyses

During sampling, field parameters (electrical conductivity, pH, water temperature) were measured on-site with a multi meter (MultiLine F/SET-3, WTW), whereby oxygen concentrations were determined separately in a glassy flow cell. For each well, the piezometric head was measured prior to sampling with a light plummet. Groundwater sampling was done after field parameters stabilized, while TA was determined on-site using a titrimetric test kit (alkalinity test 1.11109.0001, Merck). Iron concentration was measured spectrophotometrically (Lambda 20 UV-VIS spectrophotometer, Perkin Elmer) within 5 h after sampling from untreated but sealed samples. Anion concentrations were determined by ion chromatography (IC; ICS 1000, DIONEX) from filtered sample aliquots. For the determination of major and trace elements including total  $\text{As}_{\text{tot}}$  and P (to calculate  $\text{PO}_4^{3-}$ ) by HR-ICP-MS, samples were filtered ( $0.45 \mu\text{m}$  cellulose acetate filter, Sartorius) and acidified to 1% v/v nitric acid (Suprapure, Merck) in the field. Samples were measured in triplicates, yielding average precisions of 1.71% for As. Samples for As(III) speciation were additionally percolated through an As(V) restraining cartridge (MetalSoft Centre, NJ, USA). Dissolved organic carbon was determined from samples acidified to 1% (v/v) hydrochloric acid (Suprapure, Merck), which were taken before and after the extraction experiment with a TOC analyzer (Elementar, Hanau). The  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^2\text{H}$  signatures of filtered samples were measured against the VSMOW reference standard by isotope-ratio mass spectrometry (IRMS; Delta V Advance, Thermo Scientific) in CF mode (equilibration temperature:  $32^\circ\text{C}$ ; time of equilibration: 20 h for  $\delta^{18}\text{O}$ , 40 min for  $\delta^2\text{H}$ ; column temperature:  $70^\circ\text{C}$ ) [34]. Precision levels were checked by repeated measurements of reference standards during analysis of samples from the abstraction experiment and the following monitoring (VSMOW:  $\delta^{18}\text{O}$ :  $\pm 0.03\%$ ,  $\delta^2\text{H}$ :  $\pm 0.55\%$ ,  $n$ : 9). Saturation indices and predominating element species were computed with PHREEQC (V. 2.16, wateq4 database) [35]. Certified reference materials were used for quality assurance (for details see Supplementary data).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Aquifer architecture and characterization of sedimentary arsenic

Grain size distribution and mineralogy have decisive influences on the local hydrogeological and hydrochemical properties, wherefore aquifer sediments can either retain or release As. Hence, it is important to assess the local aquifer properties in detail and to determine present reactive compounds in the sediments that could influence the mobility of As. The well screens are located in sandy aquifer sediments, which are formed of fine to medium grained sand. A clayey and silty aquitard of approximately 3.35 m confines

the aquifer toward the surface, which is interpreted as widespread fluvial overbank deposit of the nearby Hooghly River (Fig. 1) [20]. During monitoring, pronounced fluctuations in the piezometric heads appeared. For example, the piezometric surface in central well A shifted from 2.17 m bls in December 2009 (post-monsoon season) to 5.25 m bls in April 2010 (end of the dry pre-monsoon season). Black and reddish mottles of Mn- and Fe-(oxyhydr)oxides appear between 2.05 and 4.65 m bls, which are accompanied by comparatively high contents of trace elements like Zn, Ni, Cu and As (up to  $122 \text{ mg As kg}^{-1}$ , Fig. 1). This enrichment of heavy metals and As in the primarily fine grained, surface near sediments suggests a precipitation of secondary Mn- and Fe-(oxyhydr)oxides that form when anoxic groundwater enriched in  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  and As rises into the aerobic vadose zone. This section is therefore considered as highly dynamic and acts as an effective sink for As rather than a source, as previously reported from Meghna riverbank sediments in Bangladesh [36].

From 2.05 to 5.95 m bls, an intersection in the sediment color occurs from brown over olive gray to dark gray, indicating a shift toward permanently reducing conditions. Down to a depth of 32.0 m bls, aquifer sediments are dominated by medium and fine sands. Between 32.0 and 39.2 m bls, several thin layers of poorly sorted sediments appear (ranging from gravel to clay), which are accompanied by increased contents of TOC as well as most elements including Fe and As. This relatively thin section is further underlain by a clay layer, wherefore drilling and coring were stopped. This clay layer has likely favored the development of a swamp dominated environment in the past, alluding to an enrichment of TOC in the sediments above.

Constituent minerals within the sandy aquifer sediments are quartz, followed by feldspars, carbonates (calcite and dolomite), mica (muscovite, phlogopite) and chlorite. Detected As contents in bulk samples are characteristically low, ranging from 2.27 to  $7.30 \text{ mg kg}^{-1}$  (median: 3.43;  $n$ : 55). Sequential extraction results indicate that most of the solid phase As is phosphate-extractable, representing the strongly adsorbed fraction (50–64%). Remaining As is distributed in co-precipitated form among (i) acid volatile sulfides, carbonates, Mn- and very amorphous Fe-(oxyhydr)oxides (4–9%); (ii) amorphous Fe-(oxyhydr)oxides (5–16%); (iii) crystalline Fe-(oxyhydr)oxides (9–14%) and (iv) As-sulfides, organic matter and remaining recalcitrant As-minerals (10–18%) (details presented in Table S1, Supplementary data). Total As contents in aquifer sediments (ranging from 3.35 to 39.2 m bls) significantly correlate ( $r > 0.72$ ) with TOC, Fe and Fe-associated trace elements (Ni, Cu, Zn, and Ti) (Fig. 1). These results emphasize the well-known role of Fe-mineral phases as preferential hosts for adsorbed and incorporated As.

#### 3.2. Hydrochemical baseline

##### 3.2.1. Hydrochemical stratification

Directly before the field experiment was performed, all wells were sampled to record the initial hydrochemistry at different depth intervals. The monsoon season had ended two months before, and the groundwater body was semi-confined as concluded from piezometric data collected during pumping (Table S2 and Fig. S1, Supplementary data). The anoxic groundwater ( $\text{O}_2$  content  $< 0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) is of Ca-Mg- $\text{HCO}_3^-$ -type and was characterized by a circum-neutral pH. Salinity and stable isotopic signatures witnessed a compositionally stratified water body with a distinctive vertical boundary located in between the well screens of piezometers B and C in about 25–26 m bls. Well screens of pumping well A and piezometer B were located above this boundary as indicated by higher contents of principal ions (e.g.  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ , and  $\text{K}^+$ ) and enriched  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^2\text{H}$  signatures (Table 1). Stable isotopic compositions of groundwater samples generally plot below the

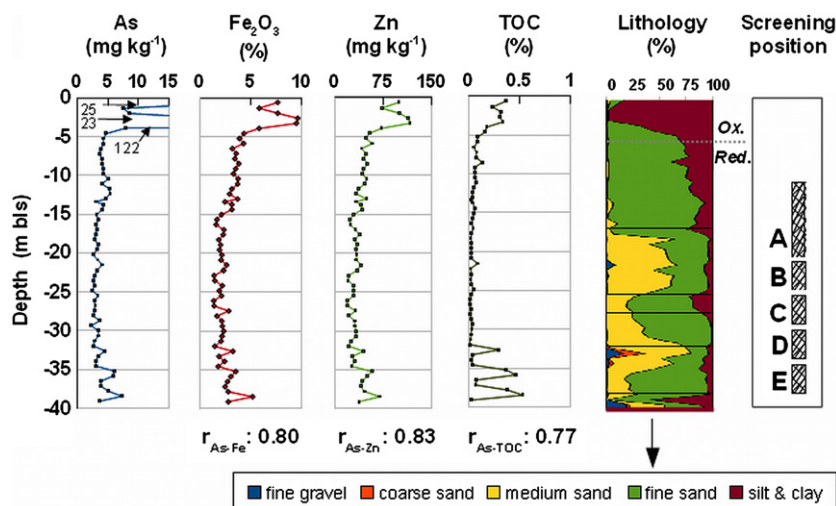


Fig. 1. Aquifer geochemistry and lithology at the monitoring site, including positions of the well screens.

**Table 1**  
Hydrochemical baseline recorded in the monitoring wells before the extraction experiment was conducted.

Well <sup>a</sup> (m bls)	Mn ( $\mu\text{M}$ )	$\text{NO}_3^-$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{Fe}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{SO}_4^{2-}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{Na}^+$ (mM)	$\text{Cl}^-$ (mM)	$\text{Ca}^{2+}$ (mM)	$\text{Mg}^{2+}$ (mM)
A (12–21)	16.7	<14	139	125	1.28	1.40	3.35	1.17
B (22–25)	13.6	<14	161	172	1.21	1.86	3.50	1.14
C (26–29)	15.6	<14	19.6	<14	0.80	0.52	2.34	0.96
D (30–33)	6.82	16.0	85.2	<14	0.87	0.55	2.72	1.02
E (34–37)	8.62	<14	86.0	<14	0.61	0.57	2.30	0.93
Ratio aqueous/solid phase <sup>b</sup>	0.69 to $12.9 \times 10^{-3}$	–	$0.73$ to $8.67 \times 10^{-1}$	–	$1.60$ to $2.96 \times 10^{-3}$	–	$0.23$ to $1.40 \times 10^{-2}$	$1.34$ to $6.14 \times 10^{-3}$
Well (m bls)	$\text{K}^+$ (mM)	$\text{Ba}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{As}_{\text{tot}}^c$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{PO}_4^{3-}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\text{Mo}^{2+}$ (nM)	DOC (mM)	$\delta^{18}\text{O}$ (‰)	$\delta^2\text{H}$ (‰)
A (12–21)	0.25	24.0	1.31	26.7	12.6	0.25	–2.95	–23.3
B (22–25)	0.25	31.0	1.34	30.6	8.96	0.38	–3.07	–23.6
C (26–29)	0.07	12.7	3.94	25.8	20.5	0.21	–3.92	–28.3
D (30–33)	0.07	18.9	3.49	31.4	12.8	0.13	–4.17	–30.9
E (34–37)	0.07	16.5	2.11	29.0	16.4	0.11	–3.81	–27.7
Ratio aqueous/solid phase <sup>b</sup>	$1.09$ to $7.01 \times 10^{-4}$	–	$0.75$ to $1.21 \times 10^{-1}$	$1.33$ to $4.2 \times 10^{-3}$	–	–	–	–

<sup>a</sup> Ion balance (%): A (–1.6), B (–4.8), C (–6.3), D (–1.6), E (15.3).

<sup>b</sup> Calculated by dividing the respective groundwater concentrations by the respective solid phase contents (determined by acid microwave digestions).

<sup>c</sup> Average As(III) content in groundwater samples: 94.7% (n: 5).

LMWL (Fig. 2). The regression line intersects the LMWL close to the annual volume-weighted rainfall average, indicating influences of evaporation in the recharge water [37,38]. Groundwater samples extracted from the three piezometers located below this boundary were less affected by evaporation than water from the two wells

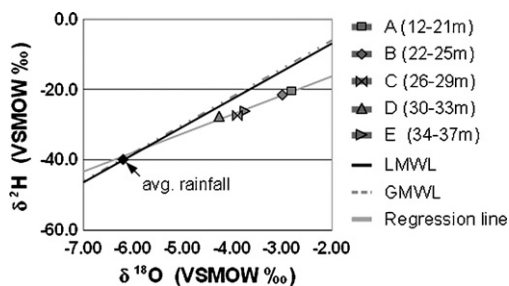


Fig. 2. Stable isotopic signatures of samples taken at 03/12/09 compared to the GMWL, the LMWL, and the volume-weighted average isotopic composition of rainfall (2004/05), which was determined by Sengupta and Sarka [37] for an area situated about 60 km south of the monitoring site.

above, as suggested by a decreased salinity and lower  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\delta^2\text{H}$  signatures.

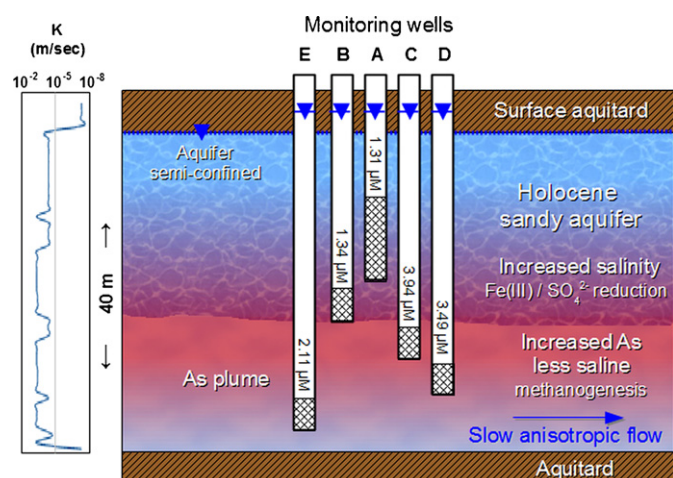
### 3.2.2. Redox zoning

Different layered redox zones are present in groundwater as indicated by the vertical distribution patterns of dissolved  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{As}_{\text{tot}}$ , and  $\text{Mo}^{2+}$  (Table 1), reflecting a strong influence of microbial controlled processes on the water composition (Fig. 3) [39]. According to the hydrochemical composition of groundwater from wells A and B, Fe(III)- and  $\text{SO}_4^{2-}$ -reduction were reached, while methanogenesis has likely occurred in the deeper sections of wells C, D and E as indicated by an absence of  $\text{SO}_4^{2-}$  [40]. Additionally, the  $\text{Fe}^{2+}$  concentration in range of well C was conspicuously lower than in the other wells, suggesting prior precipitation of Fe-sulfides during  $\text{SO}_4^{2-}$ -reduction.

### 3.2.3. Arsenic

Groundwater  $\text{As}_{\text{tot}}$  contents drastically increased below the significant boundary that was met between 25 and 26 m bls with a maximum in range of well C (well screen covering 26–29 m bls). Compared to other elements,  $\text{As}_{\text{tot}}$  shows a preferential enrichment





**Fig. 3.** Schematic sketch describing the hydrochemically stratified shallow aquifer. Included are  $As_{tot}$  results determined immediately before the experiment was conducted (03/12/09).

in groundwater as indicated by respective aqueous to solid phase ratios (Table 1). The fate of As in present sediments appears as closely linked to the biogeochemical cycling of Fe-(oxyhydr)oxides, which represent the dominating As hosts. Present groundwater composition indicates prior Fe(III)-reduction, which has likely caused dissolution of Fe-(oxyhydr)oxides and thereby a release of adsorbed and incorporated As. The predominance of As(III) in the dissolved phase further implicates a potential influence of DARPs. It was recently demonstrated that microbial processes like Fe(III)- or As(V)-reduction (both capable of mobilizing As) can still be active processes in the BDP, even if available organic matter supplies in matured aquifers are strongly degraded and comparatively low [41]. Once released, subsequent enrichment of As in groundwater required hydrochemical conditions that prevented immobilization via re-adsorption or precipitation reactions, whereas high contents of  $Fe^{2+}$ ,  $PO_4^{3-}$ ,  $Ca^{2+}$  and  $HCO_3^-$  may have interfered with As sorption [42,43]. Hence, the present distribution of As in local groundwater was strongly influenced by complex mobilization and counteracting immobilization processes, whereby prevailing hydrological conditions apparently fostered a subsequent accumulation of As in the aqueous phase.

### 3.3. Direct hydrochemical effects of groundwater extraction

#### 3.3.1. Mixing effects

Extraction of groundwater in intervals of 48 h was accompanied by a continuous decrease of the local piezometric surface. The created depression cone was strongly limited by the high hydraulic conductivity of the sandy aquifer, which allowed a maximum decline of 0.50 m inside the pumping well (Table S3, Supplementary data). Pumping caused mixing of vertically and laterally abstracted groundwater of different hydrochemical composition, which could be in particular observed in groundwater samples of pumping well A and piezometric well B (Fig. 4). Here, initially differing parameters and solute concentrations exhibited partly pronounced increases ( $As_{tot}$ ,  $PO_4^{3-}$ ), respective decreases (e.g.  $K^+$ ,  $Fe^{2+}$ , and  $\delta^{18}O$ ), reflecting an increasing portion of water originating from below the hydrochemical boundary (located in about 25–26 m bls). At a first glance, visible effects in samples from well C appeared as comparatively weak, especially regarding trace elements with deviant concentrations (e.g.  $As_{tot}$ ,  $Fe^{2+}$ ). The only parameter that clearly witnessed here influences of pumping was  $PO_4^{3-}$ . Within the deepest wells D and E, most major and trace elements remained unaffected or showed only slight concentration changes. Important

exceptions were  $PO_4^{3-}$  and DOC, which strongly increased in samples from all five wells (Table 2). In addition, the odor of sampled groundwater changed from odorless toward sulfidic, with an intensity ranging from weak (in C and D) over medium (A and E) to strong (B). Hence, pumping obviously affected the groundwater composition in range of all monitored wells. According to initial vertical distributions, one would expect decreasing  $As_{tot}$  concentrations in wells C and D as well as increasing  $Fe^{2+}$  concentrations in well E (less  $As_{tot}$  and high  $Fe^{2+}$  concentrations, see Fig. 4). However, such changes did not occur, which indicates a predominantly lateral inflow of groundwater with an indifferent hydrochemical composition in range of these deeper wells (increases in  $PO_4^{3-}$  and DOC are discussed in the following). In contrast, both upper wells A and B were obviously influenced by mixing with vertically drawn water. The sulphidic smell noticed during sampling further supports the assumption that  $SO_4^{2-}$ -reduction has influenced the local groundwater composition.

#### 3.3.2. Water–rock interactions

In general, most groundwater constituents acted predominantly conservative during the extraction experiment, which is attributed to the relatively short contact time (24 h rest between two pumping cycles). Despite, observed trends in  $PO_4^{3-}$  and  $Mo^{2+}$  exceed pure physical mixing. The sample taken immediately after continuously pumping from pumping well A revealed that  $PO_4^{3-}$  and  $Mo^{2+}$  contents were much higher than after the 24 h interception (14/12/09, Fig. 4). In addition,  $PO_4^{3-}$  contents exponentially increased as only parameter in groundwater samples of all monitored wells immediately after the first pumping interval. These short-termed trends can be best explained with surface adsorption and desorption. Strong artificial groundwater flow induced by pumping has likely entrained loosely bound autochthonous  $PO_4^{3-}$  (thermodynamically prevailing species:  $H_2PO_4^-$ ) from the sandy sediments, which is known to occur in streams during flood events [44,45]. Although high contents of dissolved  $PO_4^{3-}$  are capable of displacing As from surface binding sites [46],  $As_{tot}$  contents did not follow these pronounced increases. This can be explained either by the short contact times, or that present  $PO_4^{3-}$  concentrations were not sufficient to cause As replacement. In addition, DOC contents had increased in all five wells after the experiment, especially in the deeper wells (Table 2). Similarities of the net increase in DOC to  $PO_4^{3-}$  suggest that poorly adsorbed organic matter has desorbed from the local aquifer sediments as well. However, further characterization of DOC and sedimentary organic matter is required to prove this assumption [21,22,47].

#### 3.3.3. Behavior of arsenic

During the experiment, pronounced changes in the  $As_{tot}$  concentrations of pumping well A and the upper piezometric well B developed, while concentrations in well C slightly increased and nearly no changes occurred in wells D and E (Fig. 4, Table 2). The reduced form As(III) constantly remained the dominating As species ( $\emptyset$  96.2%,  $\pm 3.9$ ;  $n$ : 29). In samples from pumping well A and piezometric well B, evolving  $As_{tot}$  concentrations were negatively correlated to conservative tracers like  $Cl^-$  and  $\delta^{18}O$ . These changes in the hydrochemical groundwater composition indicate an increasing influence of water from below the hydrochemical boundary located in about 25–26 m bls. Samples taken before and after the rest cycle suggest that neither As adsorption nor desorption appeared within the five wells. Hence, resulting concentration changes are considered to primarily originate from mixing and not from additional As release via biotic (reductive dissolution of arsenic-hosting Fe-minerals, DARPs), respective abiotic processes (competitive anion exchange). In case of the two deeper wells D and

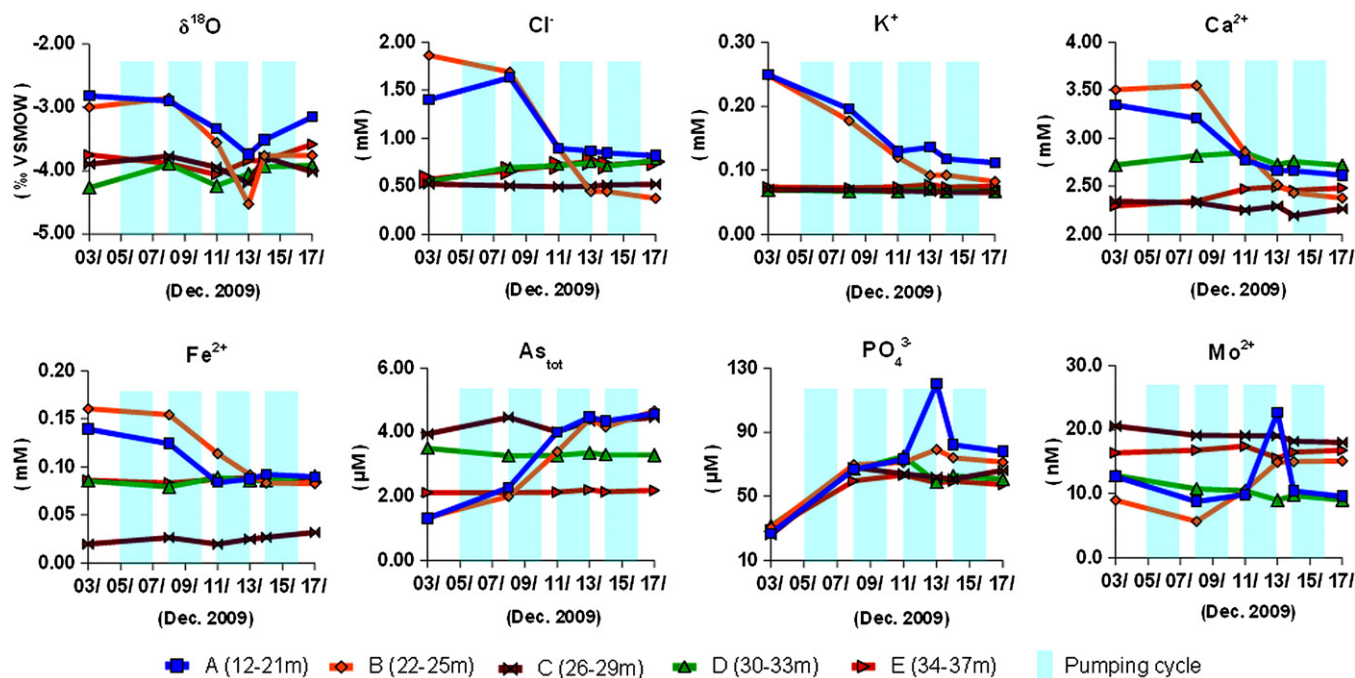


Fig. 4. Changes in the local hydrochemistry induced by the extraction experiment.

E,  $As_{tot}$  contents constantly remained stable during the experiment. Despite, absolute contents in samples from wells A, B and C had increased to concentrations exceeding the initial  $As_{tot}$  maximum of 3.95 mM. The conservative-like behavior of  $As_{tot}$  points at the presence of a maximum of about 4.66 mM (measured in well B at the end of the experiment), which was initially hidden between the well screens of wells C and D before pumping induced a vertical abstraction of groundwater from this section. This assumption is further supported by monitoring results from the following months.

### 3.4. Middle-term effects following groundwater extraction

Outcomes of the extraction experiment are the key to understand spatiotemporal trends of hydrochemical parameters that have occurred in the following pre-monsoon season and monsoon season (summarized in Fig. 5).

#### 3.4.1. Pre-monsoon season (January–April)

During the following dry pre-monsoon period in 2010, the hydrochemical composition of groundwater samples obtained from wells A and B subsequently changed toward compositions

that were similar to the initial situation before the extraction experiment was conducted (indicated by trends of  $\delta^{18}O$  and  $K^+$ , Fig. 6A). As a result,  $As_{tot}$  contents met the initial baselines between two (central pumping well A) and six weeks (piezometric well B). This is attributed to a slow lateral inflow of unperturbed groundwater and a vertical shift of the hydrochemical layers as suggested by a gradually declining piezometric surface. Hydrochemical compositions of groundwater samples from wells D and E remained stable, except for the previously increased  $PO_4^{3-}$  contents, which rapidly declined and stabilized at higher levels compared to the respective baselines. Again, no additional release of As occurred during the presumed re-adsorption of  $PO_4^{3-}$ . To the end of the dry pre-monsoon season in April 2010, the piezometric heads had strongly declined in all wells, reaching down to 5.25 m bls in case of well B. This is clearly below the base of the surface aquitard (in about 3.35 m bls), suggesting that local hydrological conditions had changed from semi-confined to unconfined. However, this assumption must be considered with care, since no piezometric data is available for the clayey aquitard layer that covers the sandy aquifer.

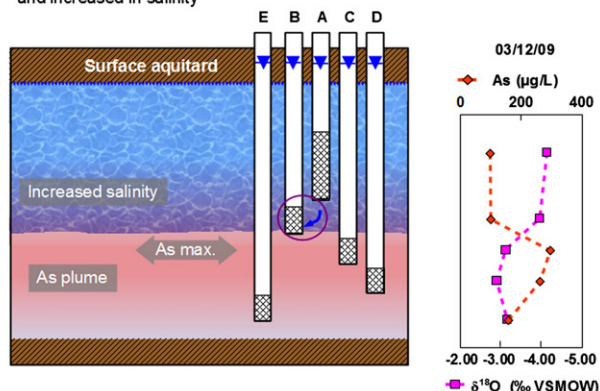
To this time, a temporary redox-anomaly occurred in samples from well C and  $Fe^{2+}$  contents as well as the  $As(III)$

**Table 2**  
Summary of parameters that showed increases after the experiment that exceeded the initial baselines.

Well (m bls)	Date	$PO_4^{3-}$ ( $\mu M$ )	DOC (mM)	$As_{tot}$ ( $\mu M$ )
A (12–21)	03/12	26.7	0.25	1.31
	17/12	77.9	0.69	4.58
	Net change (%)	+192	+175	+250
B (22–25)	03/12	30.6	0.38	1.34
	17/12	71.3	0.56	4.66
	Net change (%)	+133	+47.7	+249
C (26–29)	03/12	25.8	0.21	3.95
	17/12	66.1	0.47	4.46
	Net change (%)	+156	+120	+13.0
D (30–33)	03/12	31.4	0.13	3.49
	17/12	60.6	0.51	3.29
	Net change (%)	+93.0	+303	-5.98
E (34–37)	03/12	29.0	0.11	2.11
	17/12	57.3	0.50	2.18
	Net change (%)	+97.3	+359	+3.29

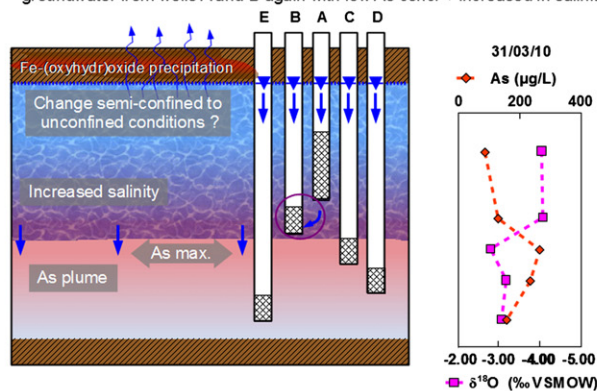
**A) Initial situation during post-monsoon season:**

→ Aquifer is semi-confined, groundwater from wells A and B is low in As and increased in salinity



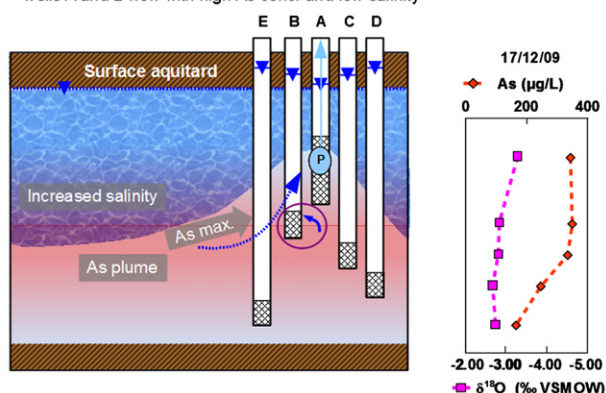
**C) Pre-monsoon dry season: return to initial situation:**

→ Piezometric surfaces decline, accompanied by a return to the initial situation, groundwater from wells A and B again with low As conc. + increased in salinity



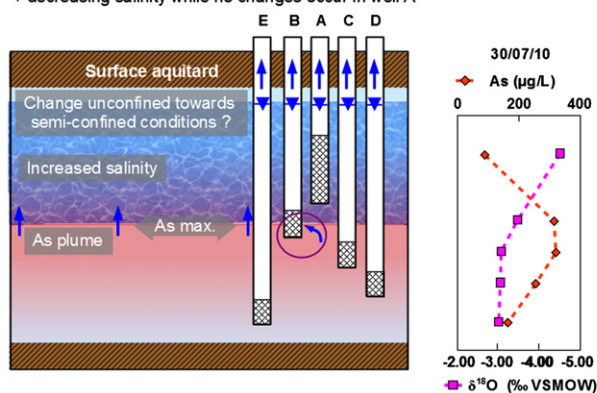
**B) Extraction experiment:**

→ Pumping causes an uplift of the As plume and the less saline layer, wells A and B now with high As conc. and low salinity



**D) Monsoon season:**

→ Piezometric surfaces rise, groundwater from well B now with increasing As conc. + decreasing salinity while no changes occur in well A



**Fig. 5.** Conceptual model illustrating changes in the local hydrochemical composition of groundwater during different seasons before and after extraction the experiment. The estimated position of the upper evaporation influenced layer is indicated by  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\text{As}_{\text{tot}}$  contents in the respective depth profiles.

portions strongly declined. The reason therefore remains obscure, but results underline the spatiotemporal variability of local redox properties that are characteristic for aquifers of the BDP [5,48].

**3.4.2. Monsoon season (May–July)**

At the beginning of the monsoon rains in May 2010,  $\text{As}_{\text{tot}}$  contents in samples from well B suddenly increased parallel to the rising piezometric head (Fig. 6A). Compared to the lowest level at the end of the dry pre-monsoon season in April, the piezometric head in this well rose by 1.55 m until July, while all characteristic hydrochemical parameters gradually adapted to the groundwater composition observed in the deeper wells D and E. Respective trends almost identically traced those of the extraction experiment (Fig. 6B). Significant correlations of the changing parameters (negative:  $\delta^{18}\text{O}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ , positive:  $\text{As}_{\text{tot}}$  and  $\text{Mo}^{2+}$ ) with the rising piezometric head implicate that these concentration changes were primary related to a vertical movement of the hydrochemical boundary, which shifted gradually through the well screen of well B (indicated in Fig. 5). As in the case of the extraction experiment, the non-deviant behavior of  $\text{As}_{\text{tot}}$  and  $\text{As}(\text{III})$  from trends of conservative parameters like  $\delta^{18}\text{O}$  and  $\text{K}^+$  implies that no mobilization of As from aquifer sediments appeared during this period.

In well C, only  $\text{As}_{\text{tot}}$  and  $\text{As}(\text{III})$  concentrations developed similar temporal trends between April and June. Here,  $\text{As}_{\text{tot}}$  and  $\text{As}(\text{III})$  concentrations subsequently rose parallel to the piezometric head until reaching a maximum of  $4.29 \mu\text{M}$  that was similar to the

highest concentration that appeared at the end of the extraction experiment ( $4.66 \mu\text{M}$ ). This supports the assumption that the  $\text{As}_{\text{tot}}$  maximum was initially concealed between the well screens of wells C and D in about 29–30 m bls. During the monsoon season, it slowly shifted upwards and caused pronounced increases in groundwater monitoring samples of well C.

In the floodplain area, recharge occurs wherever sandy gaps in the predominantly silty and clayey overbank deposit allow infiltration of surface water [48]. This locally prevents an establishment of reducing conditions in underlying aquifer parts due to mixing with infiltrating oxygen-rich water. Although piezometric heads rose during the monsoon rains, no mixing with fresh surface water was noticeable in the five monitored wells as indicated by steady  $\delta^{18}\text{O}$  signatures in respective samples (except in case of well B, but changes here were related to vertical movement of the hydrochemical boundary as previously discussed). Since the local aquifer is capped by a clayey and silty aquitard, rainwater is supposed to have infiltrated in nearby sandy gaps, without directly affecting groundwater in range of the monitored wells. Instead, adjacent surface recharge caused local displacement of groundwater, inducing the effects described above.

To identify potential middle-term effects of the extraction experiment on the local As distribution in groundwater, monitoring results from the monsoon season 2010 were compared to results of 2009 (Fig. S2, Supplementary data). Pronounced changes in hydrochemical parameters (including As) that developed in well B during the monsoon season in 2010 did not occur during 2009. This is considered an indication that the extraction



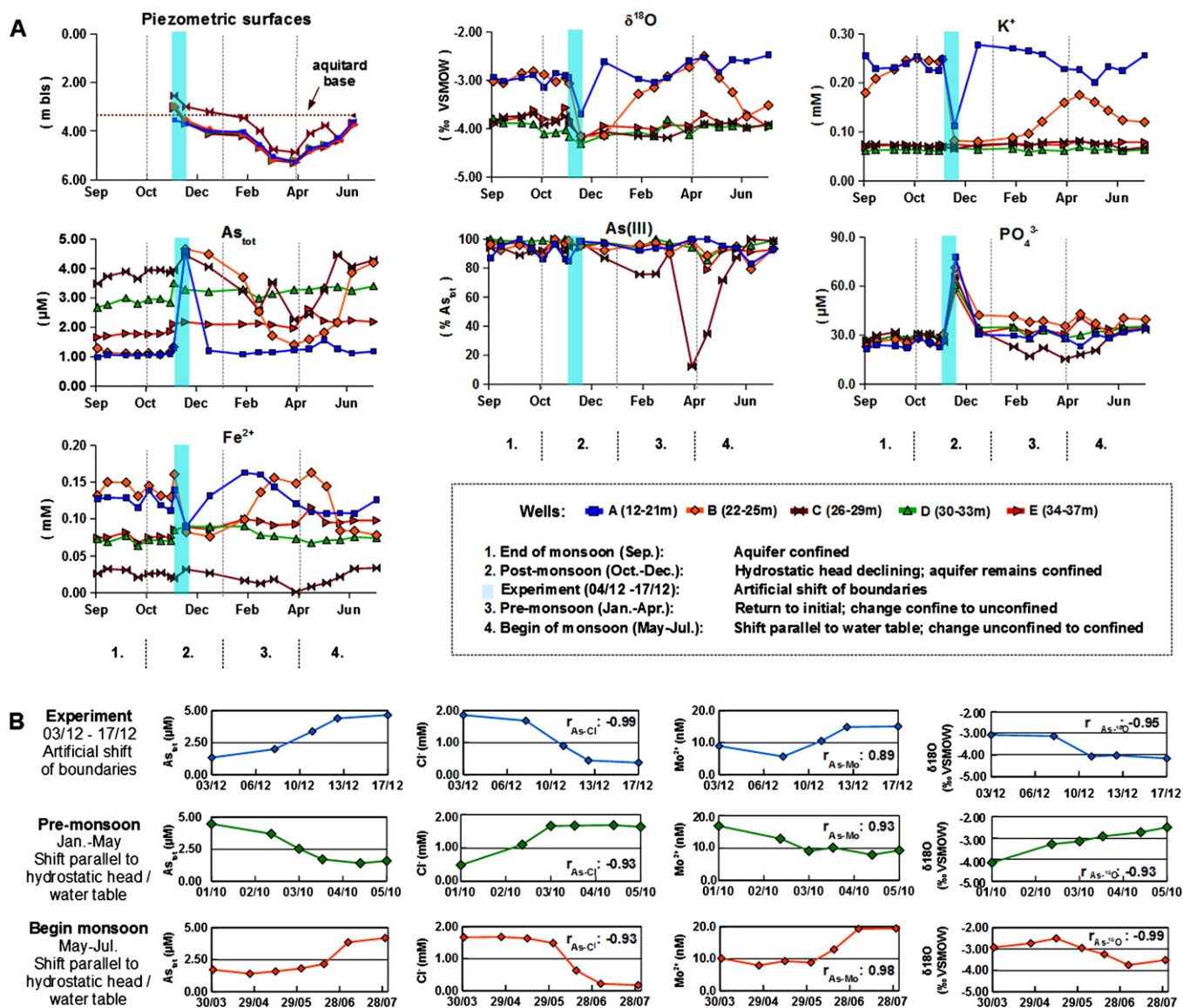


Fig. 6. Monitoring results from September 2009 to July 2010, displaying hydrochemical trends in samples from respective wells in dependence of seasonal variations in the piezometric surfaces before and after the extraction experiment.

experiment caused longer-termed changes regarding the distribution of As in local groundwater. Pumping has likely caused a slight upward shift of the vertical hydrochemical boundary (initially located between well B and C, see Section 3.2.1). As a result, the screening of well B was relocated into the less saline but As-enriched layer during the monsoon season 2010 (indicated in Fig. 5).

3.5. Implications for future studies

Present results suggest that the fate of As in local groundwater of the BDP was and still is controlled by multiple and superimposed processes that create and retain distinctive distribution patterns of As in groundwater. Temporal trends of As and principal ion contents were previously reported from monitoring wells located about 40 km south, where groundwater was found to be strongly affected by pumping [14,49]. Temporal trends in As concentrations as described for piezometric well B may occur all over the BDP (as well as in other Asian delta regions), wherever well screens are coincidentally located close to a transition zone of contrasting As concentrations in local groundwater. Such temporal variations can be

induced either by anthropogenic pumping or by climatic controlled vertical groundwater movement, but this needs to be assessed in further. As a consequence, allegedly safe tube wells might temporarily hold significantly As concentrations, and the identification of arsenic-safe wells via screening campaigns is further complicated. Additionally, the extraction experiment demonstrated the vulnerability of low-arsenic shallow groundwater toward perturbation effects as it was previously postulated for deep aquifers [50,51]. Since tapping of low-arsenic aquifer sections in the BDP, more attention needs urgently to be paid on this process, before perturbation endangers the remaining arsenic-free groundwater resources of the BDP.

Acknowledgments

The present study was funded by the German Research Foundation and the German Federal Ministry for Economic Cooperation and Development (Project No. Stu 169/37-1). We thank Mr. Atul Mandal for providing access to his estate, where the experiment was conducted. We further thank the anonymous reviewers for



their constructive and valuable comments that allowed us to further improve our manuscript.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.044>.

## References

- [1] L. Charlet, D. Polya, Arsenic in shallow, reducing groundwaters in Southern Asia: an environmental health disaster, *Elements* 2 (2006) 91–96.
- [2] L. Charlet, S. Chakraborty, C.A.J. Appelo, G. Roman-Ross, B. Nath, A.A. Ansari, M. Larson, D. Chatterjee, S. Basu-Mallik, Chemodynamics of an arsenic “hotspot” in a West Bengal aquifer: a field and reactive transport modelling study, *Appl. Geochem.* 22 (2007) 1273–1292.
- [3] C.F. Harvey, C.H. Swartz, A.B.M. Badruzzaman, N. Keon-Blute, W. Yu, M.A. Ali, J. Jay, R. Beckie, V. Niedan, D. Brabander, P. Oates, K.N. Ashfaq, S. Islam, H.F. Hemond, M.F. Ahmed, Groundwater arsenic contamination on the Ganges Delta: biogeochemistry, hydrology, human perturbations, and human suffering on a large scale, *C.R. Geosci.* 337 (2005) 285–296.
- [4] D.G. Kinniburgh, P.L. Smedley, Arsenic contamination of groundwater in Bangladesh, Vol 1: Summary, Bangladesh Department for Public Health Engineering and British Geological Survey, Keyworth, UK, 2001, Available from: <http://www.bgs.ac.uk/arsenic/bphase2/Reports/Vol1Summary.pdf>
- [5] A. van Geen, Y. Zheng, Z. Cheng, Z. Aziz, A. Horneman, R.K. Dhar, B. Mailloux, M. Stute, B. Weinman, S. Goodbred, A.A. Seddique, M.A. Hoque, K.M. Ahmed, A transect of groundwater and sediment properties in Araihazar, Bangladesh: further evidence of decoupling between As and Fe mobilization, *Chem. Geol.* 228 (2006) 85–96.
- [6] W.G. Burgess, M.A. Hoque, M. Michael, C.I. Voss, G.N. Breit, K.M. Ahmed, Vulnerability of deep groundwater in the Bengal Aquifer System to contamination by arsenic, *Nat. Geosci.* 3 (2010) 83–87.
- [7] C.F. Harvey, K.N. Ashfaq, W. Yu, A.B.M. Badruzzaman, M.A. Ali, P.M. Oates, H.A. Michael, R.B. Neumann, R. Beckie, S. Islam, M.F. Ahmed, Groundwater dynamics and arsenic contamination in Bangladesh, *Chem. Geol.* 228 (2006) 112–136.
- [8] H.A. Michael, C.I. Voss, Estimation of regional-scale groundwater flow properties in the Bengal Basin of India and Bangladesh, *Hydrogeol. J.* 17 (2009) 1329–1346.
- [9] H.A. Michael, C.I. Voss, Controls on groundwater flow in the Bengal Basin of India and Bangladesh: regional modelling analysis, *Hydrogeol. J.* 17 (2009) 1561–1577.
- [10] P. Bhattacharya, A.H. Welch, K.M. Ahmed, G. Jacks, R. Naidu, Arsenic in groundwater of sedimentary aquifers, *Appl. Geochem.* 19 (2004) 163–167.
- [11] J.M. Mc Arthur, B. Nath, D.M. Banerjee, R. Purohit, N. Grassineau, Palaeosol control on groundwater flow and pollutant distribution: the example of arsenic, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 1376–1383.
- [12] J. Norrman, C.J. Sparrenbom, M. Berg, D.D. Nhan, P.Q. Nhan, H. Rosqvist, G. Jacks, E. Sigvardsson, D. Baric, J. Moreskog, P. Harms-Ringdahl, N. van Hoan, Arsenic mobilisation in a new well field for drinking water production along the Red River, NamDu, Hanoi, *Appl. Geochem.* 23 (2008) 3127–3142.
- [13] P. Bhattacharya, M. Hossain, S.N. Rahman, C. Robinson, B. Nath, M. Rahman, M.M. Islam, M. Von Brömssen, K.M. Ahmed, G. Jacks, D. Chowdhury, M. Rahman, M. Jakariya, L.A. Persson, M. Vahter, Temporal and seasonal variability of arsenic in drinking water wells in Matlab, southeastern Bangladesh: A preliminary evaluation on the basis of a 4 year study, *J. Environ. Sci. Health, Part A: Environ. Sci. Eng.* 46 (2011) 1177–1184.
- [14] J.M. Mc Arthur, D.M. Banerjee, S. Sengupta, P. Ravenscroft, S. Klumps, A. Sarkar, D. Bisch, R. Kipfer, Migration of As, and  $^3\text{H}/^3\text{He}$  ages in groundwater from West Bengal: implications for monitoring, *Water Res.* 44 (2010) 4171–4185.
- [15] S. Fendorf, H.A. Michael, A. van Geen, Spatial and temporal variations of groundwater arsenic in south and Southeast Asia, *Science* 328 (2010) 1123–1127.
- [16] A. Mukherjee, A.E. Fryar, B.R. Scanlon, P. Bhattacharya, A. Bhattacharya, Elevated arsenic in deeper groundwater of the western Bengal basin, India: extent and controls from regional to local scale, *Appl. Geochem.* 26 (2011) 600–613.
- [17] L. van Geen, Arsenic meets dense populations, *Nat. Geosci.* 1 (2008) 494–496.
- [18] L.H.E. Winkel, P.T.K. Trang, V.M. Lan, C. Stengel, M. Amini, N.T. Ha, P.H. Viet, M. Berg, Arsenic pollution of groundwater in Vietnam exacerbated by deep aquifer exploitation for more than a century, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (2011) 1246–1251.
- [19] T. Borch, R. Kretzschmar, A. Kappler, P.V. Cappellen, M. Ginder-Vogel, A. Voegelin, K. Campbell, Biogeochemical redox processes and their impact on contaminant dynamics, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 15–23.
- [20] J.M. Mc Arthur, D.M. Banerjee, K.A. Hudson-Edwards, R. Mishra, R. Purohit, P. Ravenscroft, A. Cronin, J.R. Howarth, A. Chatterjee, T. Talukder, D. Lowry, S. Houghton, D.K. Chadha, Natural organic matter in sedimentary basins and its relation to arsenic in anoxic ground water: the example of West Bengal and its worldwide implications, *Appl. Geochem.* 19 (2004) 1255–1293.
- [21] C.F. Harvey, C.H. Swartz, A.B. Badruzzaman, N. Keon-Blute, W. Yu, M.A. Ali, Arsenic mobility and groundwater extraction in Bangladesh, *Science* 298 (2002) 1602–1606.
- [22] R.B. Neumann, K.N. Ashfaq, A.B.M. Badruzzaman, J.K. Shoemaker, C.H. Harvey, Anthropogenic influences on groundwater arsenic concentrations in Bangladesh, *Nat. Geosci.* 3 (2009) 46–52.
- [23] N.B. Sutton, G.M. van der Kraan, M.C. van Loosdrecht, G. Muyzer, J. Bruining, R.J. Schotting, Characterisation of geochemical constituents and bacterial populations associated with As mobilization in deep and shallow tube wells in Bangladesh, *Water Res.* 43 (2009) 1720–1730.
- [24] B.D. Kocar, M.J. Herbel, K. Tufano, Contrasting effects of dissimilatory iron(III) and arsenic(V) reduction on arsenic retention and transport, *Environ. Sci. Technol.* 40 (2006) 6715–6721.
- [25] K.J. Tufano, S. Fendorf, Confounding impacts of iron reduction on arsenic retention, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 4777–4783.
- [26] P.A. O'day, D. Vlassopoulos, R. Root, N. Rivera, The influence of sulfur and iron on dissolved arsenic concentrations in the shallow subsurface under changing redox conditions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 13703–13708.
- [27] W.W. Lapham, F.D. Wilde, M.T. Koterba (Eds.), Guidelines and standard procedures for studies of ground-water quality: selection and installation of wells, and supporting documentation, U.S. Geological Survey Water Resources Investigation Report, U.S. Geological Survey: Reston, Virginia, 1997, Available from: <http://water.usgs.gov/owq/pubs/wri/wri964233/wri964233.pdf>
- [28] A. Biswas, S. Majumder, H. Neidhardt, D. Halder, S. Bhowmick, A. Mukherjee-Goswami, A. Kundu, D. Saha, Z. Berner, D. Chatterjee, Groundwater chemistry and redox processes: depth dependent arsenic release mechanism, *Appl. Geochem.* 26 (2011) 516–525.
- [29] B. Nath, D. Stüben, S. Basu-Mallik, D. Chatterjee, R. Charlet, Mobility of arsenic in West Bengal aquifers conducting low and high groundwater arsenic. Part I: comparative hydrochemical and hydrogeological characteristics, *Appl. Geochem.* 23 (2008) 977–995.
- [30] T.L. Kieft, T.J. Phelps, J.K. Fredrickson, Drilling, coring and sampling subsurface environments, in: C.J. Hurst, R.L. Crawford, J.L. Garland, D.A. Lipson, A.L. Mills, L.D. Stetzenbach (Eds.), *Manual of Environmental Microbiology*, 3rd edition, ASM, Press, Washington, DC, 2009, pp. 799–817.
- [31] W. Beyer, Hydrogeologische Untersuchungen bei der Ablagerung von Wasser-schadstoffen, *Z. Angew. Geol.* 12 (1966) 599–606.
- [32] K. Govindaraju, Compilation of working values and sample description for 383 geochemical standards, *Geostandards Newslett.* 18 (1994) 1–158.
- [33] E. Eiche, T. Neumann, M. Berg, B. Weinman, A. van Geen, S. Norra, Z. Berner, P.T.K. Trang, P.H. Viet, D. Stüben, Geochemical processes underlying a sharp contrast in groundwater arsenic concentrations in a village on the Red River delta, Vietnam, *Appl. Geochem.* 23 (2008) 3143–3154.
- [34] S. Epstein, T. Mayeda, Variation of O 18 content of waters from natural sources, *Geochim. Cosmochim. Acta* 4 (1953) 213–224.
- [35] D.L. Parkhurst, C.A.J. Appelo, User's guide to PHREEQC (version 2) – a computer program for speciation, reaction-path, one-dimensional transport, and inverse geochemical calculations, U.S. Geological Survey: Reston, Virginia, 1999, Available from: <ftp://brrftp.cr.usgs.gov/pub/dlpark/geochem/unix/phreeqc/manual.pdf>
- [36] S. Dattaa, B. Mailloux, H.-B. Jung, M.A. Hoque, M. Stute, K.M. Ahmed, Y. Zheng, Redox trapping of arsenic during groundwater discharge in sediments from the Meghna riverbank in Bangladesh, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 160 (2009) 16930–16935.
- [37] S. Sengupta, A. Sarkar, Stable isotope evidence of dual (Arabian Sea and Bay of Bengal) vapour sources in monsoonal precipitation over north India, *Earth Planet. Sci. Lett.* 250 (2006) 511–521.
- [38] J.R. Gat, Oxygen and hydrogen isotopes in the hydrologic cycle, *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 24 (1996) 225–262.
- [39] J.M. Mc Arthur, P. Ravenscroft, D.M. Banerjee, J. Milson, K.A. Hudson-Edwards, S. Sengupta, C. Bristow, A. Sarkar, S. Tonkin, R. Purohit, How paleosols influence groundwater flow and arsenic pollution: a model from the Bengal Basin and its worldwide implication, *Water Resour. Res.* 44 (2008) W11411.
- [40] B.C. Jurgens, P.B. McMahon, F.H. Chapelle, S.M. Eberts, An Excel® workbook for identifying redox processes in ground water, Open-File Report 2009-1004, U.S. Geological Survey: Reston, Virginia, 2009, Available from: [http://pubs.usgs.gov/of/2009/1004/ofr\\_2009-1004.pdf](http://pubs.usgs.gov/of/2009/1004/ofr_2009-1004.pdf)
- [41] H.A.L. Rowland, A.G. Gault, J.M. Charnock, D.A. Polya, Preservation of XANES determination of the oxidation state of solid-phase arsenic in shallow sedimentary aquifers in Bengal and Cambodia, *Mine. Mag.* 69 (2005) 825–839.
- [42] C.A.J. Appelo, M.J. van der Weiden, C. Torunassat, L. Charlet, Surface complexation of ferrous iron and carbonate on ferrihydrite and the mobilization of arsenic, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 3096–3103.
- [43] S.L. Saalfeld, B.B. Bostick, Synergistic effect of calcium and bicarbonate in enhancing arsenate release from ferrihydrite, *Geochim. Cosmochim. Acta* 74 (2010) 5171–5186.
- [44] J.M. Dorioz, E. Pillebone, A. Ferhi, Phosphorous dynamics in watersheds: role of trapping process in sediments, *Water Res.* 23 (1989) 147–158.
- [45] K.R. Reddy, R.H. Kadlec, E. Flaig, P.M. Gale, Phosphorous retention in streams and wetlands: a review, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 29 (1999) 83–146.
- [46] S. Dixit, J.G. Hering, Comparison of arsenic(V) and arsenic(III) sorption onto iron oxides: implications for arsenic mobility, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 4182–4189.
- [47] S.H. Farooq, D. Chandrasekharan, Z. Berner, S. Norra, D. Stüben, Influence of traditional agricultural practices on mobilization of arsenic from sediments to groundwater in Bengal delta, *Water Res.* 44 (2010) 5575–5588.

- [48] J. Métral, L. Charlet, S. Bureau, S.B. Mallik, S. Chakraborty, K.M. Ahmed, M.W. Rahman, Z. Cheng, A. van Geen, Comparison of dissolved and particulate arsenic distributions in shallow aquifers of Chakdaha, India, and Araihasar, Bangladesh, *Geochem. Trans.* 9 (2008).
- [49] R.K. Dhar, Y. Zhang, M. Stute, A. van Geen, Z. Cheng, M. Shanewaz, M. Shamsudduha, M.A. Hoque, M.W. Rahman, K.M. Ahmed, Temporal variability of groundwater chemistry in shallow and deep aquifers of Araihasar, Bangladesh, *J. Contam. Hydrol.* 99 (2008) 97–111.
- [50] A. Mukherjee, A.E. Fryar, W.A. Thomas, Geologic, geomorphic and hydrologic framework and evolution of the Bengal basin, India and Bangladesh, *J. Asian Earth Sci.* 34 (2009) 227–244.
- [51] D.A. Polya, L. Charlet, Rising arsenic risk? *Nat. Geosci.* 2 (2009) 383–384.