

Anwendung stabiler Isotope zur  
Beschreibung des mikrobiellen Abbaus  
organischer Schadstoffe in  
kontaminierten Aquiferen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Andrea Vieth

Kiel 2003

Referent: Prof. Dr. Andreas Dahmke  
Korreferent: Dr. habil Hans-Hermann Richnow

Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2003  
Zum Druck genehmigt: 11.06.2003  
Gezeichnet: Prof. Dr. Wulf Depmeier (Dekan)

## Inhaltsverzeichnis

	Abbildungsverzeichnis.....	4
	Tabellenverzeichnis.....	7
	Abkürzungsverzeichnis.....	8
	Anlagenverzeichnis.....	10
	Kurzfassung.....	11
	Abstract.....	13
1	<b>Einleitung</b> .....	15
1.1	Motivation und Ziele der Arbeit.....	15
1.2	Grundwasserschadensfälle.....	17
1.3	Grundlagen der Isotopenfraktionierung.....	18
2	<b>Isotopenfraktionierung durch abiotische Prozesse</b> .....	21
2.1	Fraktionierung durch Verdünnung und Verflüchtigung.....	21
2.2	Isotopeneffekte durch einstufige Sorption.....	22
2.3	Fraktionierung durch mehrstufige Sorption (HPLC-Säule).....	23
2.4	Bedeutung abiotischer Isotopeneffekte für die Situation im Aquifer.....	26
3	<b>Isotopenfraktionierung durch biologische Prozesse</b> .....	30
3.1	Isotopenfraktionierung in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen.....	30
3.2	Isotopenfraktionierung beim Abbau von Mineralölkohlenwasserstoffen.....	31
3.3	Isotopenfraktionierung beim biologischen Abbau chlorierter Kohlenwasserstoffe.....	38
3.4	Schlussfolgerungen zur Beschreibung des mikrobiellen Abbaus organischer Schadstoffe anhand der Änderung ihrer Isotopensignaturen.....	43
3.5	Isotopenfraktionierung während Sulfatreduktion, Methanogenese und Methanoxidation.....	44
4	<b>Feldstudien</b> .....	49
4.1	Anwendung der Isotopensignaturen in Feldstudien - Konzept.....	49
4.2	Kontaminationen mit chlorierten Ethenen.....	50
4.3	Grundwasserkontamination mit PAK.....	54
4.4	Kontaminationen mit BTEX.....	56
5	<b>Beschreibung geochemischer Prozesse im Aquifer durch isotopenchemische Untersuchungen</b> .....	67
6	<b>Beurteilung der Isotopentechniken zur Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus und geochemischer Prozesse im Aquifer</b> .....	73
7	Literaturverzeichnis.....	77
	Danksagung.....	89

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1:	Konzentrationsäquivalente ( $\times$ ) und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (■) für Naphthalin im Verlauf der Elution von einer RP-HPLC-Säule (aus Vieth et al., 2002).....	24
Abbildung 2-2:	UV-Signal (— Benzol; — 2,4-DMP; — o-Xylol) und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (■ Benzol; ▲ 2,4-DMP; ● o-Xylol) der einzelnen Fraktionen bei Elution dieser Substanzen über eine HPLC-Säule, an deren stationäre Phase Huminsäure kovalent gebunden war (nach Voskamp, 2003); die gestrichelten Linien zeigen den $\delta^{13}\text{C}$ -Wert der Ausgangskemikalie.....	25
Abbildung 2-3:	Modellhafte Darstellung des Verlaufs der Konzentrationen der $^{12}\text{C}$ - und $^{13}\text{C}$ -Isotopomere in einer instationären Schadstofffahne entlang der Ausbreitungsrichtung des Grundwassers.....	28
Abbildung 2-4:	Modellhafte Vorstellung einer instationären Schadstofffahne, die aus einer permanenten Quelle gespeist wird; der sorptionsbedingte Isotopeneffekt zeigt sich im Bereich zwischen $x=L$ und $x=L_{10}$ .....	29
Abbildung 3-1:	Enzymatisch katalysierter, anaerober Abbauweg des Toluols (Benzylsuccinat-Synthase-Weg); (aus Heider et al., 1998).....	31
Abbildung 3-2:	Weg des Ethylbenzolabbaus unter denitrifizierenden Bedingungen (aus Heider et al., 1998).....	32
Abbildung 3-3:	Möglicher Abbauweg des Benzols (aus Caldwell und Sufflita, 2000).....	33
Abbildung 3-4:	Mögliche Abbauwege (anaerob und aerob) des Toluols und die damit verbundenen Kohlenstoffisotopenfraktionierungsfaktoren (Daten aus Meckenstock et al., 2002).....	37
Abbildung 3-5:	Reduktive Dechlorierung von PCE über TCE, DCE zu VC und Ethen (aus Nijenhuis, 2002).....	38
Abbildung 3-6:	Mögliche Abbauwege des 1,2-DCA (aus Hunkeler et al., 2002).....	39
Abbildung 4-1:	Konzentrationen (■ Juli 2001; ● Februar 2002) und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (□ Juli 2001; ○ Februar 2002) für PCE (links) und TCE (rechts) in Grundwasserproben des unteren Grundwasserleiters.....	52
Abbildung 4-2:	Darstellung der Konzentrationen und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von PCE im oberen Grundwasserleiter im Mai 2001 (■) und Februar 2002 (▲) entsprechend der Rayleigh-Gleichung als $\ln R_t/R_0$ über $\ln C_t/C_0$ .....	53
Abbildung 4-3:	Konzentrationen und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für Naphthalin, 1-	

	Methylnaphthalin und 2-Methylnaphthalin entlang eines Profils, dargestellt als $\ln R_t/R_0$ über $\ln C_t/C_0$ (Daten aus Griebler et al., 2003).....	54
Abbildung 4-4:	Konzentrationen (■) und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (●) für Naphthalin entlang des Abstromprofils Testfeld Süd; mit Hilfe der Rayleigh-Gleichung wurden der prozentuale biologische Abbau (★) und theoretische Konzentrationen (□) bestimmt (Daten aus Griebler et al., 2003)....	55
Abbildung 4-5:	Konzentrationen von Benzol (Mai 2002) und prozentualer biologischer Abbau des Benzols als Zusammenfassung der Ergebnisse von November 2000, Mai 2001, Mai 2002 und Dezember 2002 (nach Vieth et al., 2001; Vieth et al., 2003b; Anlage B-3).....	58
Abbildung 4-6:	Konzentrationen (■) und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (●) für Benzol in tiefenorientiert genommenen Grundwasserproben der Messstelle SafZz 6/99 im Mai 2002 (links) und Dezember 2002 (rechts); der Balken kennzeichnet die Isotopensignatur der zentralen Fahne (aus Vieth et al., 2003b und Anlage B-3).....	59
Abbildung 4-7:	Konzentrationen (links) und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (rechts) für Toluol entlang des Abstromprofils in den vier Monitoringkampagnen (□ November 2000; ○ Mai 2001; Δ Mai 2002; ★ Dezember 2002).....	61
Abbildung 4-8:	Konzentrationen und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für Toluol (alle Kampagnen) entsprechend der Rayleigh-Gleichung dargestellt als $\ln R_t/R_0$ über $\ln C_t/C_0$ .....	62
Abbildung 4-9:	Abtrag der Toluolkonzentrationen entlang des Monitoringprofils am Standort Zeitz über die Verweilzeit; Konzentrationen berechnet aus $\delta^{13}\text{C}$ -Werten (■) bzw. korrigiert um Verdünnung und Sorption anhand der Benzolkonzentrationen (Δ).....	64
Abbildung 4-10:	Konzentrationen (links) und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (rechts) für Ethylbenzol entlang des Abstromprofils in den vier Monitoringkampagnen (□ November 2000; ○ Mai 2001; Δ Mai 2002; ★ Dezember 2002).....	65
Abbildung 4-11:	Konzentrationen (links) und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (rechts) für m/p-Xylol entlang des Abstromprofils in den vier Monitoringkampagnen (□ November 2000; ○ Mai 2001; Δ Mai 2002; ★ Dezember 2002).....	66
Abbildung 4-12:	Konzentrationen (links) und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (rechts) für o-Xylol entlang des Abstromprofils in den vier Monitoringkampagnen (□ November 2000; ○ Mai 2001; Δ Mai 2002; ★ Dezember 2002).....	66

Abbildung 5-1:	Konzentrationen und $\delta^{34}\text{S}$ -Werte für Sulfat im Grundwasser am Standort Zeitz; der Pfeil zeigt die Lage des Abstromprofils (s. Abbildung 5-2). Die Grafik oben links zeigt die Lage der BTEX-Fahne am Standort.....	68
Abbildung 5-2:	Konzentrationen (■) und $\delta^{34}\text{S}$ -Werte (□) des Sulfats entlang des Monitoringprofils am Standort Zeitz (Mai 2002).....	69
Abbildung 5-3:	Konzentrationen von Methan und die berechneten Anreicherungsfaktoren ( $\epsilon = \delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} - \delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$ ) im Grundwasser am Standort Zeitz (Mai 2002).....	70
Abbildung 5-4:	BTEX-Konzentrationen und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des DIC (Mai 2002) im Grundwasser am Standort Zeitz.....	71
Abbildung 5-5:	Konzentrationen (■) und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Methans (□) sowie Anreicherungsfaktoren ( $\epsilon = \delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} - \delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$ ) (●) entlang eines ausgewählten Profils am Standort Zeitz (Mai 2002).....	72

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1-1:	Relative Häufigkeiten der wichtigsten Isotope ausgewählter Elemente (aus Hoefs, 1997).....	19
Tabelle 2-1:	Mittelwerte, Standardabweichungen und Fraktionierungsfaktoren der einstufigen Sorption von Cyclohexan und Toluol an Roth-Huminsäure (aus Vieth et al., 2002).....	23
Tabelle 3-1:	Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenfraktionierungsfaktoren für den aeroben und anaeroben Abbau verschiedener MKW durch unterschiedliche Misch- und Reinkulturen.....	34
Tabelle 3-2:	Kohlenstoff- und Chlorisotopenfraktionierungsfaktoren der mikrobiellen Dechlorierung von PCE, TCE, DCE, VC, DCM und DCA durch verschiedene Misch- und Reinkulturen.....	39

## Abkürzungsverzeichnis

1,1,2-TCA	1,1,2-Trichlorethan
1,2-DCA	1,2-Dichlorethan
2,4-DMP	2,4-Dimethylphenol
$\alpha'$	Verhältnis der Sorptionskoeffizienten
$\alpha$	Fraktionierungsfaktor
ATP	Adenosintriphosphat
BTEX	Benzol, Toluol, Ethylbenzol, Xylol
C	Konzentration
CKW	Chlorkohlenwasserstoffe
CoA	Coenzym A
$\delta^{13}\text{C}$	Kohlenstoffisotopenverhältnis
DCE	Dichlorethen
DCM	Dichlormethan
DIC	dissolved inorganic carbon (gelöster anorganischer Kohlenstoff)
DNAPL	dense non-aqueous phase liquids (nicht in Wasser lösliche Flüssigkeiten mit einer höheren Dichte als Wasser)
$\varepsilon$	Anreicherungsfaktor
Eth	Ethanol
IRM-GC/MS	isotope ratio monitoring-gas chromatography/mass spectrometry
$K_{oc}$	Sorptionskoeffizient, auf organischen Kohlenstoff normiert
LCKW	leichtflüchtige chlorierte Kohlenwasserstoffe
LNAPL	light non-aqueous phase liquids (nicht in Wasser lösliche Flüssigkeiten mit einer geringeren Dichte als Wasser)
m	Steigung der Regressionsgeraden
Meth	Methanol
MKW	Mineralölkohlenwasserstoffe
NAPL	non-aqueous phase liquids (nicht in Wasser lösliche Flüssigkeiten)
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCE	Tetrachlorethen
R	Isotopenverhältnis
RO	Reaktionsordnung
ROK	Ringoberkante (Höhenbezug für Grundwassermessstellen)
RP-HPLC	reversed-phase high performance liquid chromatography
TCE	Trichlorethen
US-EPA	United States Environmental Protection Agency (US-amerikanische Umweltbehörde)
VC	Vinylchlorid



V-CDT	Vienna Canyon Diabolo Troilite
V-PDB	Vienna PeeDee Belemnite
V-SMOC	Vienna Standard Mean Ocean Chloride
V-SMOW	Vienna Standard Mean Ocean Water

## **Anlagenverzeichnis**

### **A Material und Methoden**

- A-1 Standort Hydrierwerk Zeitz
- A-2 Standort Chemische Reinigung, Leipzig
- A-3 Gaswerkstandort Testfeld Süd
- A-4 Bestimmung substanzspezifischer Isotopenverhältnisse organischer Verbindungen
- A-5 Konzentrationsbestimmungen
- A-6 Untersuchungen zur Isotopenfraktionierung durch Sorption
- A-7 Literaturverzeichnis (Material und Methoden)

### **B Nicht publizierte Ergebnisse**

- B-1 Isotopenfraktionierung durch mehrstufige Sorption (Huminsäuresäule)
- B-2 Probenahmekampagne Standort Chemische Reinigung, Leipzig im Februar 2002
- B-3 Probenahmekampagne am Standort Hydrierwerk Zeitz im Dezember 2002

### **C Veröffentlichungen**

- Charakterisierung des biologischen Abbaus von BTEX im Grundwasser über Isotopenfraktionierung – Feldstudien
- Assessment of bacterial degradation of aromatic hydrocarbons in the environment by analysis of stable carbon isotope fractionation
- Carbon and hydrogen stable isotope fractionation during aerobic bacterial degradation of aromatic hydrocarbons
- Isotope fractionation of toluene: a perspective to characterise microbial in situ degradation
- Isotope fractionation as a tool to document the in-situ biodegradation of organic pollutants in contaminated aquifers
- Strategies for the assessment of anaerobic in situ biodegradation of aromatic hydrocarbons (BTEX and PAH) – I. Determination of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  stable isotope fractionation in laboratory and field studies
- Isotope fractionation processes used to characterise natural attenuation of organic contaminants
- In-situ biodegradation of benzene and toluene in a contaminated aquifer monitored by stable isotope fractionation
- Characterisation of in-situ biodegradation of tetrachloroethene (PCE) and trichloroethene (TCE) in contaminated aquifers monitored by stable isotope fractionation

## Kurzfassung

Die Charakterisierung des mikrobiellen in-situ Abbaus organischer Schadstoffe im Grundwasser stellt eine bedeutende Möglichkeit dar, die natürliche Reduzierung der Schadstofffracht zu erfassen. Da die Konzentration eines Schadstoffs ein Parameter ist, der innerhalb eines kontaminierten Grundwasserleiters durch zahlreiche Faktoren beeinflusst werden kann, sollte zur Beschreibung des natürlichen Rückhalts ein Parameter genutzt werden, der innerhalb dieser Bedingungen im Wesentlichen nur durch den mikrobiellen Abbau beeinflusst wird. Als ein solcher Parameter gilt die Verteilung der stabilen Isotope ( $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ; H/D) innerhalb der Schadstofffraktion. Aus zahlreichen Versuchen ist bekannt, dass mikrobielle Umsetzungen mit einer Anreicherung der schweren Isotope in der residualen Substratfraktion verbunden sind. Die mit dem mikrobiellen Abbau organischer Schadstoffe verbundene Isotopenfraktionierung ist in ihrem Ausmaß abhängig von der initialen biochemischen Reaktion dieser Umsetzung und variiert mit der Größe des Substratmoleküls bzw. der Anzahl der Kohlenstoff- bzw. Wasserstoffatome. Die Fraktionierung der Wasserstoffatome übersteigt die der Kohlenstoffisotope um Größenordnungen, was gerade hinsichtlich der Beschreibung geringfügiger mikrobieller Umsetzungen von Vorteil ist, doch die große Variabilität dieser Faktoren auch bei vermeintlich gleichartigen biochemischen Umsetzungen und Substraten erschwert die Verwendung der Wasserstoffisotopenfraktionierungsfaktoren für quantitative Auswertungen.

Für die Anwendung der Isotopensignaturen organischer Schadstoffe zur Beschreibung ihres mikrobiellen Abbaus in kontaminierten Aquiferen muss als Voraussetzung überprüft werden, ob weitere Rückhalte- und Transportprozesse im Grundwasser einen signifikanten Effekt auf die isotopische Zusammensetzung der Schadstofffraktion ausüben. Das Lösen von Schadstoff aus der Reinphase und die Verdünnung mit dem Grundwasserstrom wurden beschrieben als nicht fraktionierende Prozesse. Einstufige Sorptionsexperimente an Aktivkohle, Graphit und Huminsäure zeigten ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf die Isotopenverhältnisse der getesteten Substanzen. Chromatographische Prozesse, interpretiert als eine Folge von Sorptions- und Desorptionsschritten, führen zu einer Änderung der Isotopensignaturen des eluierenden Schadstoffs im Verlauf eines Peaks. Auch in der Annäherung auf reale Grundwasserverhältnisse, indem als stationäre Phase Huminsäure verwendet und ausschließlich Wasser als Lösungsmittel eingesetzt wurde, wurde ein vergleichbarer Isotopeneffekt für ausgewählte organische Schadstoffe während der Elution aus dieser modifizierten chromatographischen Säule nachgewiesen. Für eine Schadstofffahne innerhalb eines Grundwasserleiters lässt sich schlussfolgern, dass unter instationären Bedingungen, also unter der Annahme einer sich ausbreitenden Schadstofffahne, Isotopeneffekte durch die zahlreichen Sorptions- und Desorptionsprozesse an die organischen Bestandteile der Aquifermatrix in der residualen Schadstofffraktion verursacht werden können. Unter stationären Bedingungen, im Gleichgewichtszustand zwischen Schadstoffausbreitung und -rückhalt, ist

nicht von einer sorptionsbedingten Isotopenfraktionierung auszugehen.

Die qualitative und quantitative Auswertung der gemessenen Anreicherung der schweren Isotope in der residualen Substratfraktion erfolgt, in Korrelation zum Konzentrationsgradienten, mit der Rayleigh-Gleichung. Die Rayleigh-Gleichung, die für geschlossene Systeme Gültigkeit besitzt, kann für die Beschreibung des mikrobiellen Abbaus in Schadstoffbahnen kontaminierter Grundwasserleiter genutzt werden, wenn für den Grundwasserleiter der Austausch zu den umgebenden Kompartimenten als vernachlässigbar eingeschätzt werden kann und wenn bei konstantem Stoffeintrag die Konzentrationsänderung entlang der Fließstrecke durch konstanten Abbau bedingt ist, also von stationären Bedingungen ausgegangen werden kann.

In zahlreichen Feldstudien wurden die Isotopensignaturen der vorhandenen Schadstoffe (BTEX, PAK, chlorierte Ethene) genutzt, um aus der räumlichen (horizontal und vertikal) sowie zeitlichen Verteilung Aussagen über deren potentiellen Abbau treffen zu können. Hier wurde bestätigt, dass ein Rückgang der Schadstoffkonzentration entlang der Grundwasserfließrichtung nicht automatisch mit einer Änderung der Isotopensignaturen verbunden sein muss. Umgekehrt konnte, basierend auf den gemessenen Isotopenverhältnissen einzelner Schadstoffe, auf theoretische Konzentrationen zurückgerechnet werden und somit der mikrobielle Abbau entlang ausgewählter Abstromprofile quantifiziert werden. Weiterhin zeigte sich, dass bei geringen Konzentrationen und einem geringen Ausmaß der Isotopenfraktionierung beim Abbau des entsprechenden Schadstoffs, diese Isotopenmethode an ihre Grenzen stößt. Die zeitliche Variabilität der Verteilung der Isotopensignaturen einzelner Schadstoffe ist vermutlich nicht nur abhängig von den mikrobiellen Prozessen, sondern kann auch durch jahreszeitlich bedingte Grundwasserspiegelschwankungen und damit einhergehende Unterschiede in der Schadstoffquelle im Grundwasserleiter bedingt sein. Hier ist die Auswertung der Isotopendaten vor allem an gute Kenntnisse der jeweiligen Standortverhältnisse gebunden.

Neben den Isotopensignaturen der vorliegenden Schadstoffe können auch die isotopische Zusammensetzung des Methans ( $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ), DIC ( $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ) und Sulfats ( $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$ ) herangezogen werden, um Informationen über die mit dem mikrobiellen Schadstoffabbau verbundenen Redoxprozesse zu erhalten. Sowohl methanbildende als auch -oxidierende und sulfatreduzierende Prozesse sind mit charakteristischen Änderungen in den jeweiligen Isotopenverhältnissen verbunden, die somit mindestens qualitativ als prozessbeschreibende Parameter verwendet werden können.

Im Rahmen der Erkundung von Schadstoffbahnen kann mit Hilfe der Isotopenverhältnisse dieser organischen Schadstoffe sowie der entsprechenden Redoxpartner ein wertvoller Beitrag zur Abschätzung des natürlichen Schadstoffrückhalts geleistet werden.

## **Abstract**

To evaluate natural attenuation processes in contaminated aquifers, the microbial in-situ degradation of the organic contaminants has to be characterised. Because concentrations are influenced by a multitude of processes within an aquifer like sorption, dilution and diffusion, the monitoring of concentration gradients alone is not a good indicator of in-situ microbial degradation. It is therefore necessary to find an indicator of microbial in-situ degradation that is only dependent on these microbiological mediated processes. The carbon and hydrogen isotope ratios of organic contaminants are known to be influenced by biodegradation, leading to an enrichment of the heavier isotope in the residual contaminant fraction. The intensity of isotope fractionation is dependent on the biochemical reaction and the kind of the substrate (number of carbon or hydrogen atoms within the molecule). In general, hydrogen isotope fractionation is by some orders of magnitude higher than carbon isotope fractionation. Therefore hydrogen isotope signatures seem to be more suitable to characterise small amounts of biodegradation, especially, when the change in carbon isotope ratios will not yet be significant. But hydrogen isotope fractionation factors have been proven to be quite variable even when describing similar degradation pathways. This illustrates the difficulties in using hydrogen isotopes to characterise microbial in-situ degradation.

To apply carbon isotope ratios as a parameter for the description of microbial degradation of organic contaminants in contaminated aquifers it has to be assumed that no other processes, relevant within an aquifer, may have significant effects on the carbon isotope ratios. Dissolution of pure organic compounds in water and further dilution with groundwater are known as having no significant effect on the carbon isotope ratios of the tested compounds. One-step sorption of organic contaminants to activated carbon, graphite, and humic acids did not change the isotopic signature of the not-sorbed compounds significantly. Chromatographic processes, as realized within an HPLC-column, led to a severe enrichment of the heavier isotopes in the first part and a depletion of the heavier isotopes within the tailing of the eluted peak. This effect was also observed when the stationary phase of the HPLC-column was covered with humic acids and water served as pure solvent of the organic contaminants. This shows that a sequence of many sorption and desorption processes, as for example realized by the transport of the contaminant within an expanding plume, may lead to a relevant isotope fractionation in the contaminant fraction. When the plume is in steady-state, plume expansion and attenuation will come to an equilibrium where isotope fractionation caused by sorption and desorption processes should not be observable.

Qualitative and quantitative assessments of the microbial in-situ degradation, based on carbon

isotope ratios, will be possible by using the Rayleigh-equation for closed systems. An aquifer is not a closed system by definition, but can be assumed to be one if the exchange to the surrounding compartments is neglectable and if the plume is in steady-state.

Carbon isotope ratios of BTEX, PAH and chlorinated ethenes were determined in groundwater samples from several field sites. From the potential enrichment in the carbon isotope ratios observed in different parts of the plume and over a certain period of time, evaluation of microbial in-situ degradation will be possible. Despite a decrease in concentration no further indication of in-situ biodegradation was given by means of enrichment in carbon isotope ratios of the contaminant in field studies. But several other studies revealed a good correlation between decrease in concentration and enrichment in carbon isotope ratios, leading to a quantification of the natural attenuation processes by calculating theoretical concentrations.

Limitations of this method were presented in field studies when the concentrations of the contaminants and the compound-specific isotope fractionation factor were quite low.

The variation of the carbon isotope ratios of the different compounds in time may not only be caused by microbial processes but also by changes in the hydrological situation and resulting differences in source area. This indicates that proper evaluation of carbon isotope ratios is only possible with detailed knowledge of the hydrological characteristics of the field site.

Besides carbon isotope ratios of the organic contaminants also the isotopic signatures of methane ( $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ), dissolved inorganic carbon ( $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ), and sulphate ( $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$ ) were used to evaluate the redox processes that may be related to the degradation of the contaminants. Methanogenesis as well as methane oxidation and sulphate reduction will lead to characteristic changes in the isotope ratios of the involved compounds. Therefore the investigation of the carbon and sulphur isotope ratios of methane, DIC and sulphate will lead to qualitative estimations about these processes at the field site.

The evaluation of the isotopic composition of the organic contaminants and the potential electron acceptors of microbial degradation processes will give a valuable view into the natural attenuation processes occurring within contaminated aquifers.

# 1 Einleitung

## 1.1 Motivation und Ziele der Arbeit

In der Untersuchung kontaminierter Grundwasserleiter und der Entwicklung geeigneter Sanierungskonzepte stehen zunehmend die natürlichen Selbstreinigungsprozesse, die im Aquifer stattfinden und zu einer Schadstoffreduzierung führen, im Zentrum des Interesses. Aus dem anglo-amerikanischen Raum stammend, ist mittlerweile auch im deutschsprachigen Raum der Begriff „Natural Attenuation“ zur Bezeichnung natürlicher Schadstoffrückhalte und –abbauprozesse üblich geworden. Laut der Definition der US-amerikanischen Umweltbehörde (US-EPA) wird „Natural Attenuation“ wie folgt verstanden (OSWER, 1999):

Der Begriff „Natural Attenuation“ beschreibt die Eigenschaft eines Aquifers, durch Prozesse wie biologischen Abbau, Dispersion, Verdünnung, Sorption, Verflüchtigung und/oder chemischer oder biochemischer Stabilisierung von Schadstoffen die Masse, Toxizität, Mobilität oder das Volumen der Schadstoffe so weit zu reduzieren, dass die menschliche Gesundheit und das Ökosystem nicht gefährdet sind.

Nur der mikrobielle Abbau organischer Schadstoffe führt zu einer nachhaltigen Schadstoffreduzierung, wohingegen durch Prozesse wie z. B. Sorption, Dispersion, Verdünnung und Verflüchtigung ein Konzentrationsrückgang, aber keine Schadstoffreduzierung stattfindet. Deshalb kommt dem biologischen Abbau in der Betrachtung des Natural Attenuation besondere Bedeutung zu.

Zum Nachweis, dass an kontaminierten Standorten natürliche Rückhalteprozesse realisiert werden, sollen die nachfolgend genannten Anforderungen erfüllt werden (OSWER, 1999):

- Historische Standorterkundung, aus der die Stabilität bzw. der Rückgang der Schadstoffkonzentration deutlich wird;
- Bestimmung geochemischer Parameter, die den mikrobiellen Abbau der Schadstoffe anzeigen, sowie der Nachweis von Metaboliten als Indikatoren der Schadstoffumsetzung;
- Mikrokosmen-Studien zum Nachweis des autochthonen mikrobiellen Abbaupotentials für die relevanten Schadstoffe.

Diese Anforderungen gelten als Mindestvorgabe für die Beschreibung und Bewertung der Natural Attenuation-Prozesse, die an einem kontaminierten Standort stattfinden. Weitere geeignete Methoden sind noch zu entwickeln. Mit dieser Intention wurde das Projekt „RETZINA – Referenztestfeld Zeitz zur Implementierung des Natural Attenuation-Ansatzes“ begonnen, in

dessen Rahmen ein großer Teil der im Folgenden dargestellten Arbeiten durchgeführt wurde.

Zur Beschreibung und auch Quantifizierung der Schadstoffreduzierung in kontaminierten Grundwasserleitern kann die mit dem mikrobiellen Abbau organischer Schadstoffe verbundene Änderung der Isotopenverhältnisse in der residualen Schadstofffraktion (Isotopenfraktionierung) genutzt und somit im Rahmen von Natural Attenuation-Konzepten zur Bewertung des autochthonen mikrobiellen Abbaupotentials eingesetzt werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, an kontaminierten Standorten durch Bestimmung der räumlichen und zeitlichen Verteilung der Isotopenverhältnisse organischer Schadstoffe Aussagen über den mikrobiellen Abbau dieser Kontaminanten und damit Prognosen zur zukünftigen Entwicklung des Schadensfalls treffen zu können.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurden die folgenden Aspekte untersucht:

- Die Variabilität der mit dem biologischen Abbau der organischen Schadstoffe verbundenen Isotopenfraktionierung.
- Die Wirkung grundwasserrelevanter, abiotischer Prozesse, wie z. B. Sorption, auf die Isotopenverhältnisse der organischen Schadstoffe.
- Die Aufklärung weiterer biogeochemischer Prozesse (Sulfatreduktion, Methanogenese, Methanoxidation), die mit dem mikrobiellen Schadstoffabbau eng verbunden sind, durch isotochemische Untersuchungen.

Die vorliegende Arbeit beinhaltet eine Zusammenfassung eigener Untersuchungen und Ergebnisse weiterer Arbeitsgruppen mit dem Ziel, die neuartige Methode des Nachweises des mikrobiellen Schadstoffabbaus anhand der Änderung der Verhältnisse stabiler Isotope umfassend in ihren Möglichkeiten und Grenzen darzustellen. Die Arbeit gliedert sich in vier inhaltliche Schwerpunkte, (I) die Betrachtung der Isotopenfraktionierung während grundwasserrelevanter, abiotischer Prozesse sowie (II) die mit dem biologischen Abbau organischer Schadstoffe verbundene Isotopenfraktionierung, (III) die Anwendung der Isotopenfraktionierung organischer Schadstoffe in Feldstudien und weiterhin (IV) die Beschreibung sulfatreduzierender und methanbildender sowie –oxidierender Prozesse anhand der Isotopenverhältnisse dieser Substanzen.

Die Untersuchung der Isotopenfraktionierung durch grundwasserrelevante abiotische Prozesse (Kapitel 2) soll klären helfen, ob die zur Zeit angenommene und in der Literatur postulierte These, dass im Grundwasserleiter ausschließlich biologische Prozesse eine Isotopenfraktionierung der organischen Schadstoffe verursachen, Gültigkeit besitzt. Zusammen mit der Auswertung vorliegender Literaturergebnisse werden Ergebnisse eigener



Untersuchungen, die in enger Zusammenarbeit mit Prof. Dr. F.-D. Kopinke und Dipl.-Chem. M. Voskamp durchgeführt wurden (Voskamp, 2003; Voskamp et al., 2003), dargestellt und diskutiert.

Weiterhin wird die Variabilität der durch den biologischen Abbau der Schadstoffe verursachten Isotopenfraktionierung näher betrachtet (Kapitel 3). Aus der Zusammenfassung der in der Literatur angegebenen Fraktionierungsfaktoren wird die Differenzierung der Fraktionierungsfaktoren in Hinblick auf Substratstruktur und Abbaumechanismus diskutiert.

Die im Kapitel 4 vorgestellten Fallbeispiele kontaminierter Grundwasserleiter sind sowohl der Literatur entnommen als auch selbst untersucht worden. Im Rahmen der Diplomarbeit von J. Müller (Müller, 2001) wurde am Standort einer ehemaligen chemischen Reinigung eine Standorterkundung durchgeführt, die um isotopechemische Untersuchungen der chlorierten Ethene ergänzt wurde. Für den Standort Testfeld Süd konnte aus der Bestimmung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der vorhandenen Schadstoffe eine Abschätzung der in-situ Prozesse vorgenommen werden (Griebler et al., 2003). Der Standort Zeitz stellte den Schwerpunkt aller eigenen Felduntersuchungen dar. Über einen Zeitraum von mehr als 2 Jahren wurden regelmäßig die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Benzol, Toluol, Ethylbenzol und den Xylenen (BTEX) erfasst und ausgewertet. Für diesen Standort wurden auch die Isotopenuntersuchungen des Sulfats, Methans und des gelösten anorganischen Kohlenstoffs (DIC) durchgeführt (Fischer, 2003), die im Kapitel 5 beschrieben und diskutiert werden.

In den Anlagen zu dieser Arbeit finden sich Kurzbeschreibungen zu den untersuchten Feldstandorten (Anlagen A-1 bis A-3), die jeweilige Probenahme und –aufbereitung sowie die angewendeten analytischen Techniken (Anlagen A-4 bis A-6). In der Anlage A-7 sind die Literaturzitate aufgelistet, auf die in den Beschreibungen zu Material und Methoden dieser Arbeit Bezug genommen wurde. Weiterhin finden sich in diesen Anlagen Untersuchungsergebnisse, wie sie in Form von Artikeln der interessierten Öffentlichkeit zugänglich gemacht worden sind (Anlage C). Falls Ergebnisse, die in der Zusammenfassung genannt und diskutiert werden, noch nicht publiziert wurden, finden sich diese Daten in Form von Tabellen ebenfalls im Anlagenteil wieder (Anlage B).

## **1.2 Grundwasserschadensfälle**

Nach einer Studie von Arne et al. zählen die chlorierten Kohlenwasserstoffe zu den am häufigsten vorkommenden organischen Schadstoffen im Grundwasserabstrom von Schadensfällen in Deutschland. Tetrachlorethen (PCE) und Trichlorethen (TCE) konnten in 42 bzw. 38 % der untersuchten Schadensfälle nachgewiesen werden (Arne et al., 1989). Studien aus den USA zeigen, dass auch dort PCE und TCE zu den am häufigsten in

Grundwasserschadensfällen nachgewiesenen Schadstoffen gehören (Doherty, 2000).

PCE und TCE wurden vor allem als Lösungsmittel in großem Umfang in der Textilreinigung und zur Metallentfettung in der metallverarbeitenden Industrie eingesetzt. Ein Abbauprodukt der PCE und TCE, das Vinylchlorid (VC), ist eindeutig karzinogen, während für TCE Karzinogenität vermutet wird.

Kontaminationen von PCE und TCE im Untergrund stellen ein besonderes Gefährdungspotential dar, da diese Stoffe im Grundwasserleiter weiträumig transportiert werden können. Eine statistische Auswertung von 107 beschriebenen Grundwasserkontaminationen ergab für die aliphatischen Chlorkohlenwasserstoffe (CKW) eine mittlere Transportweite von 1543 m (Teutsch et al., 1997). Die leichtflüchtigen chlorierten Kohlenwasserstoffe (LCKW) weisen eine höhere Dichte als Wasser auf und können daher den Untergrund in vertikaler Richtung durchdringen.

In rund 20 % der von Arneth et al. ausgewerteten Schadensfälle konnten Benzol, Toluol, Ethylbenzol und die Xylole (BTEX) nachgewiesen werden (Arneth et al., 1989). Die BTEX werden als Zwischenprodukte bzw. Edukte für unterschiedliche Syntheseverfahren sowie auch als Lösungsmittel in vielfältigen Bereichen eingesetzt. Sie wurden früher aus den Nebenprodukten der Verkokung von Steinkohle gewonnen, seit den 50er Jahren erfolgt die Produktion aus Erdöl. BTEX sind nur in geringen Konzentrationen in Wasser löslich, wobei die Löslichkeit vom Benzol zu den Xylole (o-, m- und p-Xylol) deutlich abnimmt. Benzol wird im Vergleich zu seinen Homologen am besten mit dem Grundwasserfluss transportiert, am wenigsten durch Sorption im Untergrund retardiert und unter anaeroben Bedingungen am schlechtesten mikrobiell abgebaut (Wiedemeier et al., 1999). Die Auswertung von 96 beschriebenen Grundwasserschadensfällen durch BTEX ergab eine mittlere Transportweite im Grundwasser von 209 m (Teutsch et al., 1997).

Benzol wirkt karzinogen und kann zu Leukämie führen. Toluol, Ethylbenzol und die Xylole haben keine blutschädigenden Wirkungen. Als Einzelstoffe, ohne Verunreinigung mit Benzol, wirken sie nach bisherigen Erkenntnissen nicht karzinogen (Geller et al., 1991).

### **1.3 Grundlagen der Isotopenfraktionierung**

Als Isotope bezeichnet man Atome, die zu einem Element gehören, sich jedoch in der Anzahl der Neutronen und damit in ihrer Masse unterscheiden. Das Wort „Isotop“ stammt aus dem griechischen und bedeutet „gleicher Ort“ (isos = gleich, topos = Ort), womit die Position im Periodensystem gemeint ist. Grundsätzlich teilt man die Isotope in instabile (radioaktive) und stabile Isotope ein. Die meisten Elemente besitzen mindestens zwei Isotope, von denen eines dominierend ist und die weiteren nur in sehr geringen Häufigkeiten vorkommen (Tabelle 1-1).

**Tabelle 1-1**

Relative Häufigkeiten der wichtigsten Isotope ausgewählter Elemente (aus Hoefs, 1997)

Element	Isotop	relative Häufigkeit (%)	Isotop	relative Häufigkeit (%)	Standard
Wasserstoff	<sup>1</sup> H	99,98	<sup>2</sup> H	0,02	V-SMOW
Kohlenstoff	<sup>12</sup> C	98,89	<sup>13</sup> C	1,11	V-PDB
Stickstoff	<sup>14</sup> N	99,64	<sup>15</sup> N	0,36	Luft
Sauerstoff	<sup>16</sup> O	99,76	<sup>18</sup> O	0,02	V-SMOW
Schwefel	<sup>32</sup> S	95,02	<sup>34</sup> S	4,21	V-CDT
Chlor	<sup>35</sup> Cl	75,53	<sup>37</sup> Cl	24,47	V-SMOC

Die isotopische Zusammensetzung einer Substanz kann massenspektrometrisch bestimmt werden. Es wird jedoch nicht die absolute Konzentration der verschiedenen Isotope in einer Probe analysiert, sondern die relative Konzentration der Isotope. Dieses Isotopenverhältnis wird als Abweichung zum Isotopenverhältnis eines definierten internationalen Standards angegeben (Tabelle 1-1). Als definierter Standard für die Kohlenstoffisotopenmessungen gilt der PeeDee Belemnit (V-PDB) (Hoefs, 1997). Die Isotopenverhältnisse des Wasserstoffs und Sauerstoffs werden im Vergleich zu einer hypothetischen Wasserprobe angegeben, die in ihrer isotopischen Zusammensetzung dem durchschnittlichen Wasser der Ozeane entspricht (standard mean ocean water (V-SMOW) (Hagemann et al., 1970; Baertschi, 1976). Schwefelisotopenverhältnisse beziehen sich auf Troilite (FeS) des Canyon Diablo Meteoriten (V-CDT) (Clark und Fritz, 1997). Die Messungen der Stickstoffisotope erfolgen relativ zum Standard Luft (Junk und Svec, 1958) und für die Chlorisotopenverhältnisbestimmung in Relation zum Vienna-Standard Mean Ocean Chloride (V-SMOC) (Hoefs, 1997). Der Unterschied der Isotopenverhältnisse von Probe und Standard wird in Promille angegeben (Gleichung 1-1). Diese Gleichung ist hier beispielhaft für das <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C-Verhältnis formuliert.

**Gleichung 1-1**

$$\delta^{13}\text{C}[\text{‰}] = \left( \frac{{}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{Probe}} - {}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{Standard}}}{{}^{13}\text{C}/{}^{12}\text{C}_{\text{Standard}}} \right) \times 1000$$

Aufgrund des Massenunterschiedes unterscheiden sich die verschiedenen Isotope eines Elements geringfügig in ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften und Reaktionsraten. Dies wird als kinetischer Isotopeneffekt bezeichnet (Hoefs, 1997). Die Ursache für den Isotopeneffekt liegt im Energieunterschied der Nullpunktsschwingungen. Die Energie des Grundzustandes für eine Bindung mit einem schweren Isotop ist geringer als die für die entsprechende Bindung mit dem leichten Isotop, während im Übergangszustand beide Bindungen die gleiche Energie

besitzen. Damit ist die Energiedifferenz zwischen Grund- und Übergangszustand für eine Bindung mit schwerem Isotop höher als für eine Bindung mit leichtem Isotop (Bisswanger, 2000). Für die Spaltung einer Bindung mit dem schweren Isotop ist folglich eine höhere Aktivierungsenergie notwendig. Moleküle mit leichten Isotopen sind reaktiver als angereicherte Moleküle (Krumbiegel, 1970). Im Verlauf einer Reaktion kommt es zur relativen Anreicherung der Moleküle mit einem schweren Isotop im Edukt, wohingegen es in der Produktphase zu einer relativen Anreicherung von Molekülen mit leichten Isotopen kommt. Diese Änderung in der Verteilung der Isotope wird als kinetische Isotopenfraktionierung bezeichnet (Hoefs, 1997).

Eine starke kinetische Isotopenfraktionierung tritt auf, wenn die Umsetzung des Moleküls direkt an der Bindung mit dem schweren Isotop erfolgt und zur Spaltung der Bindung führt (primärer Isotopeneffekt). Auch wenn es zu keiner Bindungsspaltung kommt, kann ein Isotopeneffekt auftreten (sekundärer Isotopeneffekt). Eine Ursache für diesen Effekt ist beispielsweise eine Änderung in der Hybridisierung der Atome, wo das Vorhandensein eines schweren Isotops nur einen mittelbaren Effekt ausübt.

Prozesse, bei denen ein kinetischer Isotopenfraktionierungseffekt nachgewiesen wurde, sind z. B. die Destillation und Kondensation organischer Verbindungen, aber auch biochemische Reaktionen wie z. B. die Kohlendioxidfixierung in der Photosynthese (O'Leary, 1981) und auch der mikrobielle Abbau von Schadstoffen wie BTEX und CKW (s. Kapitel 3.2 und 3.3).

Zur Beschreibung der kinetischen Isotopenfraktionierung wird häufig die Rayleigh-Gleichung (Rayleigh, 1896; Hoefs, 1997) herangezogen (Gleichung 1-2), die die zeitliche Änderung der Konzentration der umgesetzten Substanz ( $C_t/C_0$ ) mit der in dieser Reaktionszeit gemessenen Änderung der Isotopenverhältnisse ( $R_t/R_0$ ) über den dimensionslosen Fraktionierungsfaktor  $\alpha$  in Beziehung setzt.

**Gleichung 1-2**

$$\frac{R_t}{R_0} = \left( \frac{C_t}{C_0} \right)^{\left( \frac{1}{\alpha} - 1 \right)}$$

Der Fraktionierungsfaktor  $\alpha$  ergibt sich aus der Steigung (m) der linearen Regressionsfunktion ( $y = m \cdot x + b$ ), wenn die natürlichen Logarithmen von  $R_t/R_0$  über die natürlichen Logarithmen von  $C_t/C_0$  abgetragen werden als  $\alpha = 1/(m+1)$ .

Für Umsetzungen mit relativ geringer Fraktionierung und  $\delta$ -Werten, die sich nur wenig vom Referenzstandard unterscheiden, kann die Isotopenfraktionierung auch als Anreicherungsfaktor  $\varepsilon$  [‰] angegeben werden (Clark und Fritz, 1997). Der Zusammenhang zwischen diesen beiden Faktoren ergibt sich aus Gleichung 1-3.

**Gleichung 1-3**

$$\varepsilon = (\alpha - 1) \times 1000$$

## 2 Isotopenfraktionierung durch abiotische Prozesse

### 2.1 Fraktionierung durch Verdünnung und Verflüchtigung

Um Isotopenverhältnisse organischer Schadstoffe zur Beschreibung ihres mikrobiellen Abbaus nutzen zu können, muss der Isotopeneffekt, der durch abiotische Prozesse wie z. B. Sorption, Lösen, Verdampfen oder abiotischen Abbau verursacht werden kann, bekannt sein. In Hinblick auf die Untersuchung eines kontaminierten Grundwasserleiters wird die Betrachtung auf die hier relevanten Prozesse fokussiert.

In den verschiedenen Szenarien, die es zur Ausbreitung von Schadstoffen und damit zur Bildung von Schadstofffahnen im Grundwasser gibt, ist das Lösen von organischem Schadstoff aus einer reinen Schadstoffphase (non-aqueous phase liquids; NAPL) in das vorbeiströmende Grundwasser von zentraler Bedeutung (Wiedemeier et al., 1999). Der Kohlenstoffisotopeneffekt, der mit dem Lösen von Toluol und TCE in Wasser verbunden war, lag im Bereich des Messfehlers (0,5 ‰) der angewandten Analyseverfahren (Slater et al., 1999). Die Unterschiede der Isotopenverhältnisse von BTEX in reiner Phase und den n-Pentanextrakten von wässrigen Lösungen der BTEX lagen ebenfalls unterhalb der Fehlergrenze von 0,5 ‰ der Analyseverfahren (Dempster et al., 1997). Dieses Resultat war unabhängig von der Ausgangskonzentration der wässrigen Lösung und der erzielten Extraktionsausbeute. Durch das Lösen der Schadstoffphase in das vorbeiströmende Grundwasser wird keine signifikante Änderung der Kohlenstoffisotopenverhältnisse verursacht.

Auch der Übergang von der Flüssig- zur Gasphase, der im Aquifer an der Grenzfläche zwischen gesättigter und ungesättigter Zone stattfindet, wurde hinsichtlich seines Isotopeneffekts untersucht. Aus Untersuchungen zum Verdampfen von Wasser ist bekannt, dass sich die leichteren Isotope in der Gasphase sammeln während sich schwerere Isotope in der Flüssigphase anreichern (O'Neil, 1986). In mehreren Arbeiten, in denen die Tauglichkeit der Headspace-Analytik für die Isotopenmessungen nachgewiesen wurde, lag der Isotopeneffekt, der durch diesen Phasenübergang hervorgerufen wurde, im Bereich der Messungengenauigkeit von 0,5 ‰ (Slater et al., 1999; Hunkeler et al., 2001a) bzw. bei der Bestimmung der Wasserstoffisotopenverhältnisse im Messfehlerbereich von 5 ‰ (Ward et al., 2000).

Für Benzol, Toluol, Ethylbenzol, Dichlormethan (DCM) und TCE wurde beim Phasenübergang flüssig-gasförmig eine Anreicherung der <sup>13</sup>C-Isotopomere in der Gasphase beobachtet, was als inverser Isotopeneffekt bezeichnet wird (Slater et al., 1999; Poulson und Drever, 1999; Huang et al., 1999; Harrington et al., 1999). Für Benzol, Toluol und Ethylbenzol ergab sich aus den Experimenten ein Kohlenstoffisotopenfraktionierungsfaktor  $\alpha = 0,9998$  für den Übergang von der reinen Substanzphase in die umgebende Luft. Im Verlauf der Evaporation von TCE und DCM zeigte sich eine Kohlenstoffisotopenfraktionierung, die mit Fraktionierungsfaktoren von  $\alpha =$

0,9997 bzw.  $\alpha = 0,9993$  beschrieben wurde (Huang et al., 1999). Der Fraktionierungsfaktor für die Verdampfung von TCE wurde in anderen Untersuchungen bestätigt (Poulson und Drever, 1999). Auch bei der fortschreitenden Verflüchtigung von Heptan, Oktan und Nonan in Reinphase konnte eine relative Zunahme der  $^1\text{H}$ -Isotopomere in der residualen Flüssigphase um bis zu 14 ‰ (bei 96 % Verflüchtigung) festgestellt werden (Wang und Huang, 2001). Die Daten konnten durch die Rayleigh-Gleichung beschrieben werden und ergaben Fraktionierungsfaktoren von  $\alpha = 0,9956$  bzw.  $\alpha = 0,9957$  bzw.  $\alpha = 0,9960$  für Heptan, Oktan und Nonan (Wang und Huang, 2001).

Der Übergang einer organischen Substanz aus einer wässrigen Lösung in die Gasform ist mit einer Isotopenfraktionierung verbunden, die kleiner als der Messfehler der Analysenmethode ist. Erfolgt der Übergang aus der Reinphase in den Gasraum, so ist dies, in Abhängigkeit vom Ausmaß der Verflüchtigung, mit einer messbaren Isotopenfraktionierung verbunden. Dieser Effekt ist für grundwasserrelevante Schadstoffe dem Isotopeneffekt durch biologischen Abbau entgegen gerichtet und in seinem Ausmaß um mindestens eine Größenordnung kleiner als die für den biologischen Abbau beschriebenen Isotopeneffekte.

## 2.2 Isotopeneffekte durch einstufige Sorption

Für das Ausbreitungsverhalten von organischen Schadstoffen im Aquifer spielt die Sorption an die organische Substanz eine wichtige Rolle. Die Wechselwirkungen der unpolaren Schadstoffe mit Bestandteilen der anorganischen Matrix (z. B. Tonminerale) sind erst bei sehr geringen Gehalten an organischer Substanz von quantitativer Bedeutung (Schwarzenbach et al., 1993). Der Fluss einer toluolhaltigen wässrigen Lösung durch eine Glassäule (Länge: 45 cm), die mit Aquifermaterial gefüllt war, verursachte keine wesentliche Änderung des  $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes des Toluols (Meckenstock et al., 1999). In Batchversuchen konnte für die einstufige Sorption von PCE, TCE, Benzol und Toluol an Aktivkohle und Graphit bei einem Sorptionsgrad bis 90 % keine signifikante Änderung der Isotopenverhältnisse der nicht sorbierten Fraktion bei einem Fehlerbereich von  $\pm 0,5$  ‰ gemessen werden (Slater et al., 2000). Die einstufige Sorption von Cyclohexan und Toluol an Roth-Huminsäure zeigte bei einem Sorptionsgrad von 97 % für Cyclohexan und von 80 % für Toluol eine Änderung der Isotopenverhältnisse der Reinsubstanz im Vergleich zur nicht sorbierten Residualfraktion, die im Bereich der Standardabweichung der Messungen lag (Tabelle 2-1) (Vieth et al., 2002). Aus der Anwendung der Rayleigh-Gleichung, in der die Isotopensignatur des Cyclohexans bzw. Toluols in der wässrigen Lösung dem  $R_0$  und die Isotopensignatur des nicht sorbierten Cyclohexans bzw. Toluols in der Huminsäure-Suspension dem  $R_t$  entspricht, konnten für einen Sorptionsgrad von 97 % (Cyclohexan) bzw. 80 % (Toluol) Fraktionierungsfaktoren von  $\alpha = 1,00006$  und  $\alpha = 1,0002$  für Cyclohexan und Toluol bestimmt werden. Somit wurde durch diesen einstufigen Sorptionsschritt eine

Isotopenfraktionierung verursacht, die um den Faktor 28 bzw. 8 kleiner ist als die Isotopenfraktionierung, die z. B. für den biologischen Abbau des Toluols (Meckenstock et al., 1999) bekannt ist.

**Tabelle 2-1** Mittelwerte, Standardabweichungen und Fraktionierungsfaktoren der einstufigen Sorption von Cyclohexan und Toluol an Roth-Huminsäure (aus Vieth et al., 2002)

Substanz	$\delta^{13}\text{C}_{\text{Wasser}}$ (Standardabweichung)	$\delta^{13}\text{C}_{\text{Huminsäure-Suspension}}$ (Standardabweichung)	$\alpha$
Cyclohexan	-30,3 ‰ (0,5)	-30,1 ‰ (0,5)	1,00006
Toluol	-28,0 ‰ (0,3)	-27,7 ‰ (0,2)	1,0002

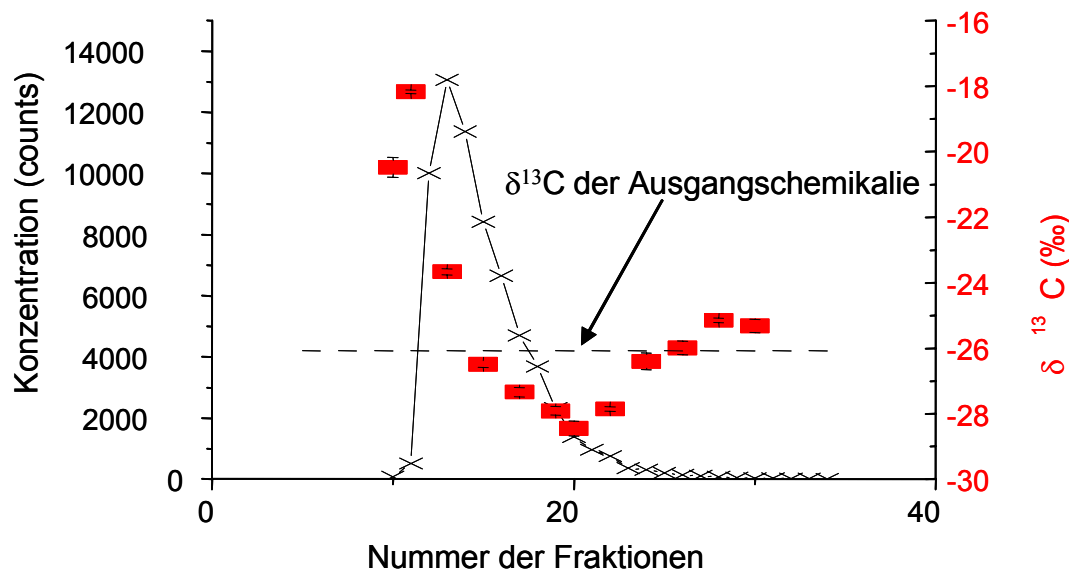
Somit wurde auch durch eigene Untersuchungen bestätigt, dass die einstufige Sorption einen nur sehr geringfügigen, im Bereich des analytischen Fehlers der Messmethode liegenden Isotopeneffekt verursacht.

### 2.3 Fraktionierung durch mehrstufige Sorption (HPLC-Säule)

Als Modell für einen mehrstufigen Sorptions-/Desorptionsprozess, durch den das Ausmaß der Isotopenfraktionierung verstärkt werden soll, wurde die Elution von organischen Substanzen über eine reversed-phase (RP)-Hochleistungsflüssigchromatographie-Säule (HPLC-Säule) untersucht. Die chromatographischen Wechselwirkungen von Hexadecansäuremethylester (Caimi und Brenna, 1997) und Naphthalin (Vieth et al., 2002) über eine RP-HPLC-Säule führten zu signifikanten Änderungen im Isotopenverhältnis der Eluenten in den verschiedenen Fraktionen des jeweiligen Peaks. Aufgrund der geringeren Wechselwirkungen mit der unpolaren stationären Phase der RP-HPLC-Säule reicherten sich in den schneller eluierenden Fraktionen die  $^{13}\text{C}$ -Isotopomere an (Abbildung 2-1). Dieses Phänomen wird erklärt mit den geringeren Van-der-Waals-Wechselwirkungen der schwereren Isotopomere mit der unpolaren stationären Phase der RP-HPLC-Säule (Caimi und Brenna, 1997). Der im Naphthalin-Peak gemessene Anstieg der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte im Peaktailing ist durch geringe Volumina nicht ideal-chromatographierter Naphthalinlösung im Eluat zu erklären (Voskamp, 2003).

Für die beiden Extremwerte der  $\delta^{13}\text{C}$ -Messungen konnte eine Isotopenfraktionierung von  $\alpha = 1,0017$  für das Maximum bzw. von  $\alpha = 0,9991$  für das Minimum berechnet werden. Für diese Berechnung wurde die Rayleigh-Gleichung angewendet (s. Kapitel 1.3), wobei der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert der nicht chromatographierten Reinsubstanz als  $R_0$  und der gemessene Extremwert als  $R_t$  eingesetzt wurden. Als relative Konzentrationsangaben wurden die Signalintensitäten des

Massendetektors ( $m/z = 128$ ) verwendet. Die Summe der Signalintensitäten aller Fraktionen ergab den  $C_0$ -Wert. Als  $C_t$  wurde die Summe der Signalintensitäten bis zu der entsprechenden Fraktion, ausgehend vom Peakbeginn (Maximum) bzw. Peakende (Minimum), eingesetzt. Um einen Bezug zu dem einstufigen Sorptionsexperiment herstellen zu können, wurde für das Naphthalin - unter der Annahme einer Trennleistung der RP-HPLC-Säule von rund 1700 Trennstufen - ein Fraktionierungsfaktor  $\alpha = 1,0000015$  pro Trennstufe (Vieth et al., 2002) berechnet.



**Abbildung 2-1** Konzentrationsäquivalente ( $\times$ ) und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte ( $\blacksquare$ ) für Naphthalin im Verlauf der Elution von einer RP-HPLC-Säule (aus Vieth et al., 2002)

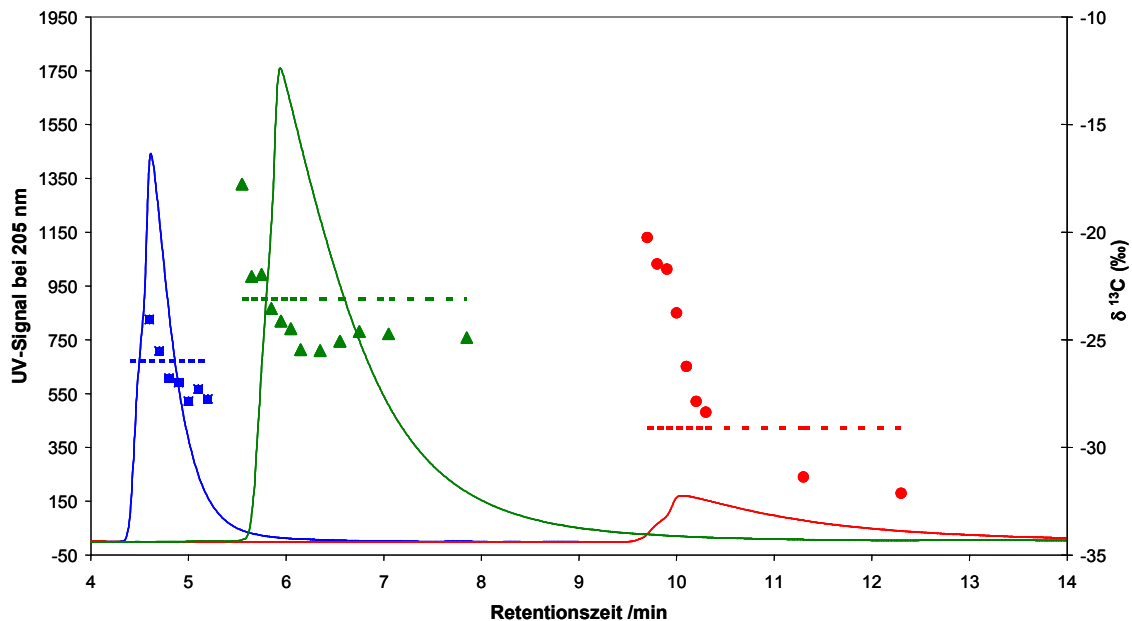
Die Zahl der theoretischen Trennstufen einer chromatographischen Säule errechnet sich aus der Bruttoretentionszeit des Peakmaximums ( $t_{\max}$ ) und der Peakbreite bei halber Peakhöhe ( $b_{0,5}$ ) nach (Gleichung 2-1):

**Gleichung 2-1** 
$$N = 5,54 \cdot \left( \frac{t_{\max}}{b_{0,5}} \right)^2$$

Um eine größere Vergleichbarkeit mit tatsächlichen Grundwasserverhältnissen zu erreichen, wurde in einem weiteren Experiment anstelle der RP-HPLC-Säule, die eine stationäre Phase aus n-Octadecyl-Gruppen besitzt, eine Säule mit einer stationären Phase verwendet, an die Huminsäure kovalent gebunden war. Weiterhin diente Wasser - anstelle des Gemisches aus Acetonitril und Wasser (50:50 Vol/Vol) - als Eluent. Zur Herstellung dieser „Huminsäuresäule“ wurde an Nucleosil<sup>®</sup> ( $\text{SiO}_2$ ), dessen Oberfläche mit 3-Aminopropyl-dimethyl-ethoxysilan modifiziert wurde, die protonierte Form der Roth-Huminsäure kovalent gebunden (Voskamp, 2003). Roth-Huminsäure wird aus Braunkohle gewonnen und wird als hochmolekular und aromatenreich charakterisiert. Wässrige Lösungen von Benzol, 2,4-Dimethylphenol (2,4-DMP)



und o-Xylol eluierten über die Huminsäuresäule (Anlage B-1). Für die ausgewählten Substanzen zeigten sich Änderungen der Isotopensignaturen ( $\Delta \delta^{13}\text{C}$ ) im Verlauf der einzelnen Peakfraktionen von 3,7 bzw. 7,1 bzw. 11,9 ‰ für Benzol, 2,4-DMP und o-Xylol. (Abbildung 2-2).



**Abbildung 2-2** UV-Signal (— Benzol; — 2,4-DMP; — o-Xylol) und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (■ Benzol; ▲ 2,4-DMP; ● o-Xylol) der einzelnen Fraktionen bei Elution dieser Substanzen über eine HPLC-Säule, an deren stationäre Phase Huminsäure kovalent gebunden war (nach Voskamp, 2003); die gestrichelten Linien zeigen den  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert der Ausgangsschemikalie.

Die Auswertung erfolgte in Analogie zum Naphthalin-Experiment mit der Bestimmung von Fraktionierungsfaktoren für die Extrema der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte. Aus dem Peakverlauf für die drei genannten Substanzen konnte die Trennleistung der Huminsäuresäule mit 1022 bzw. 285 bzw. 318 theoretischen Trennstufen für Benzol, 2,4-DMP und o-Xylol (Voskamp, 2003) bestimmt werden (s. Gleichung 2-1). Für Benzol, 2,4-DMP und o-Xylol konnten Fraktionierungsfaktoren von  $\alpha = 1,0000017$ ;  $\alpha = 1,000011$  bzw.  $\alpha = 1,000013$  pro theoretischer Trennstufe berechnet werden. Im Vergleich zur Isotopenfraktionierung des Naphthalins in der RP-HPLC-Säule liegt der Fraktionierungsfaktor für die Wechselwirkung des Benzols in der Huminsäuresäule in der gleichen Größenordnung, die Faktoren für die Isotopenfraktionierung des 2,4-DMP und des o-Xylols in der Huminsäuresäule sind um eine Größenordnung höher. Die Fraktionierungsfaktoren, die für den anaeroben biologischen Abbau dieser Verbindungen bekannt sind, liegen jedoch nochmals um fast zwei Größenordnungen höher als diese Fraktionierungsfaktoren für Sorptions- und Desorptionsprozesse. Für den anaeroben Abbau von Naphthalin und o-Xylol wurden Fraktionierungsfaktoren  $\alpha = 1,0009$  (Griebler et al., 2003) bzw.  $\alpha = 1,0013$  (Morasch, mündl. Mitteilung) bestimmt.

## 2.4 Bedeutung abiotischer Isotopeneffekte für die Situation im Aquifer

Sowohl der Lösungsvorgang eines organischen Schadstoffs in Wasser als auch der Übergang dieses Schadstoffs von der wässrigen in die gasförmige Phase sind nur mit einer geringfügigen Isotopenfraktionierung verbunden, die im Bereich der Messungenauigkeit des angewandten Messverfahrens liegt. Daraus ist zu schließen, dass die Entstehung einer Schadstofffahne durch das Lösen organischer Substanzen aus einer nicht-wässrigen Phase nicht mit einem relevanten Isotopeneffekt verbunden ist. Weiterhin kann im Übergangsbereich von ungesättigter zu gesättigter Zone der Übergang von einem im Wasser gelösten Schadstoff in die ungesättigte Zone keinen signifikanten Isotopeneffekt hervorrufen. Das Ausgasen organischer Schadstoffe aus einer reinen Schadstoffphase ist mit einem Isotopeneffekt verbunden, der dem des mikrobiellen Abbaus entgegen gerichtet und in seinem Ausmaß um mindestens eine Größenordnung kleiner ist (Poulson und Drever, 1999; Harrington et al., 1999; Huang et al., 1999). Somit käme es, wenn beide Prozesse die Isotopensignatur des Schadstoffs beeinflussen, zu einer Unterschätzung des mikrobiellen Abbaus. Das tatsächliche Ausmaß dieser Unterschätzung des biologischen Abbaus wäre weiterhin von den Intensitäten der beiden relevanten Prozesse abhängig.

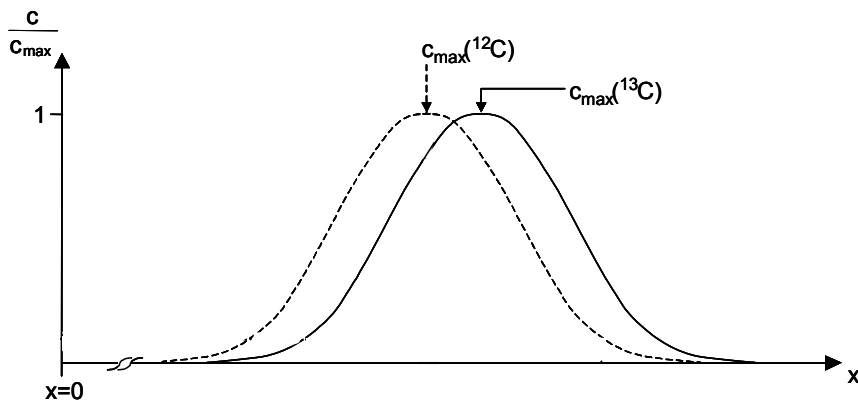
In einem Grundwasserleiter ist die Ausgasung aus der reinen Schadstoffphase nur relevant für die Bereiche der Fahne, die in direktem Kontakt zur ungesättigten Zone stehen. Somit sollte dieser Isotopeneffekt für Phasen, die sich vollständig in der gesättigten Zone (z. B. dense non-aqueous phase liquids (DNAPL) und NAPL-Blobs) befinden, zu vernachlässigen sein. Für reine Schadstoffphasen mit einer geringeren Dichte als Wasser (LNAPL), die sich an der Grenzfläche zwischen gesättigter und ungesättigter Zone befinden, kann das Ausgasen in freie Poren relevant, jedoch mengenmäßig zu vernachlässigen sein, da die Schadstoffverlagerung im wesentlichen über diffusive Prozesse zu erwarten wäre. Somit wäre auch keine signifikante Änderung der Isotopenverhältnisse des Schadstoffs durch diesen Ausgasungsprozess zu erwarten.

Die einstufige Sorption von unpolaren Schadstoffen an Huminsäure, Aktivkohle oder Graphit hatte keinen signifikanten Effekt auf das Isotopenverhältnis der nicht sorbierten Fraktion (Slater et al., 2000; Vieth et al., 2002). Wird die Anzahl der Sorptions-/Desorptionsschritte entscheidend erhöht, zeigt sich ein ausgeprägter Isotopeneffekt im Verlauf der eluierenden Substratfraktion. Auch die mehrfache Sorption/Desorption an Roth-Huminsäure hat einen ähnlich großen Isotopeneffekt zur Folge. In allen Experimenten mit einer RP-HPLC-Säule zeigte sich die Elution der leichteren  $^{12}\text{C}$ -Isotopomere im Vergleich zu den  $^{13}\text{C}$ -Isotopomeren zeitlich verzögert. Der durch Sorption verursachte Isotopeneffekt wäre somit dem durch biologischen Abbau verursachten Isotopeneffekt gleichgerichtet. Zur Abschätzung der durch Sorption

verursachten Isotopenfraktionierung innerhalb einer Schadstofffahne in einem Grundwasserleiter wurden, basierend auf den Ergebnissen der Experimente mit der RP-HPLC-Säule und der Huminsäuresäule, ein modellhafter Ansatz entwickelt und verschiedene Szenarien betrachtet (Voskamp et al., 2003).

Als Voraussetzung wurde angenommen, dass die Verteilung der  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Isotopomere im Verlauf des chromatographierten Substanzpeaks durch zwei Gaußfunktionen beschrieben werden kann. Die gemessenen  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der Substanz in den verschiedenen Peakfraktionen wurden durch eine lineare Regressionsgerade beschrieben, die sich aus den gemessenen  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten des Peakmaximums und den  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten der beiden benachbarten Fraktionen ergab. Aus dieser Regressionsgerade wurden die idealisierten gaußförmigen Konzentrationsverläufe der  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Isotopomere des chromatographierten Peaks berechnet (Voskamp, 2003). Aus der Verschiebung der Peakmaxima der Gaußfunktionen für die  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Isotopomere wurde das Verhältnis der Sorptionskoeffizienten ( $\alpha'$ ) bestimmt (Voskamp, 2003). Die ermittelten Werte für  $\alpha'$  liegen im Bereich von 1,00017 (Benzol) bis 1,00092 (o-Xylol), der Wert für 2,4-DMP liegt bei  $\alpha' = 1,00035$  (Voskamp, 2003). Dieser sorptionsbedingte Fraktionierungsfaktor für Benzol ist um mindestens eine Größenordnung kleiner als bisher publizierte Fraktionierungsfaktoren für den biologischen Abbau von Benzol unter anaeroben Bedingungen (Mancini et al., 2003). Für das o-Xylol liegen sorptions- und abbaubedingte Fraktionierungsfaktoren jedoch in der gleichen Größenordnung.

Unter der Annahme eines kurzfristigen Schadstoffeintrags in den Grundwasserleiter und eines Transports des Schadstoffs mit dem Grundwasser kann von der Ausbildung einer instationären Schadstofffahne ausgegangen werden, die einen peakförmigen Verlauf aufweist (Abbildung 2-3). Innerhalb dieser Schadstofffahne kommt es zu einer sorptionsbedingten Verschiebung der Peakmaxima für die  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Isotopomere. In Folge dessen zeigt sich in der Front des Peaks eine Anreicherung der  $^{13}\text{C}$ -Isotopomere und im Peaktailing eine Anreicherung der  $^{12}\text{C}$ -Isotopomere, wie es in den entsprechenden Laborversuchen mit einer RP-HPLC-Säule sowie mit der Huminsäuresäule nachgewiesen werden konnte.



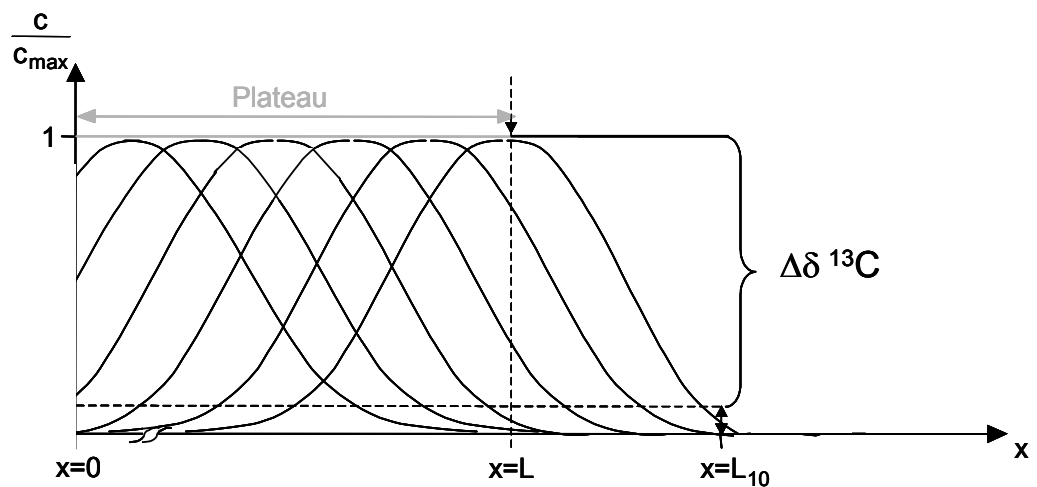
**Abbildung 2-3** Modellhafte Darstellung des Verlaufs der Konzentrationen der  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Isotopomere in einer instationären Schadstofffahne entlang der Ausbreitungsrichtung des Grundwassers

Für den Fall einer instationären Fahne, die aus einer permanenten Quelle mit homogener Isotopensignatur gespeist wird und sich im Grundwasserleiter in Fließrichtung ausbreitet, ergibt sich eine Modellvorstellung von unendlich vielen, sich überlagernden peakförmigen Schadstofffahnen (Abbildung 2-4). Aus der Überlagerung unendlich vieler Peaks ergibt sich ein Plateaubereich, in dem sowohl die Konzentration als auch der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Schadstoffs der Konzentration und dem  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert in der Quelle entsprechen. Im Fall dieser instationären Schadstofffahne kann, in Abwesenheit biologischen Abbaus, eine sorptionsbedingte Isotopenfraktionierung nur in der Front des Schadstoffpeaks festgestellt werden.

Zur Abschätzung dieser sorptionsbedingten Isotopenfraktionierung in der Front einer instationären Schadstofffahne wurde die Retardation der  $^{12}\text{C}$ - und  $^{13}\text{C}$ -Isotopomere unter der Annahme bestimmt, dass die Retardation im Grundwasserleiter abhängig ist vom Gehalt an organischem Kohlenstoff (Anzahl möglicher Sorptionspartner), der Zahl der theoretischen Böden pro Meter (Trenneigenschaft des Aquifers) sowie der Fahnenlänge (Voskamp et al., 2003).

Der sorptionsbedingte Isotopeneffekt wurde modellhaft ermittelt für eine instationäre Schadstofffahne in einem Grundwasserleiter mit einer Abstandsgeschwindigkeit des Grundwassers von  $1 \text{ m d}^{-1}$ , einem Anteil an organischem Kohlenstoff von 0,05 % und einer theoretischen Trennleistung des Aquifers von  $2,5 \text{ m}^{-1}$  (Schüth, mündl. Mitteilung). Das Plateau der Schadstofffahne ist 100 m lang. Bei einem Konzentrationsrückgang in der Front der Schadstofffahne auf 10 % der Ausgangskonzentration konnte - ausgehend von den beobachteten Änderungen der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte während der Elution durch die Huminsäuresäule - für Benzol, o-Xylol und 2,4-DMP eine Änderung des  $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes um 0,5, 14,1 bzw. 3,8 % berechnet werden (Voskamp, 2003). Für Benzol liegt die gemessene sorptionsbedingte Änderung des  $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes im Bereich des Fehlers der Analyseverfahren, womit gezeigt werden kann, dass für Benzol die sorptionsbedingte Änderung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte während der

Ausbreitung in dieser instationären Modellschadstofffahne zu vernachlässigen ist. Die Änderung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für o-Xylol und 2,4-DMP geht weit über den Bereich des Analysefehlers hinaus und verdeutlicht, dass für o-Xylol und 2,4-DMP in einer instationären Schadstofffahne sorptionsbedingte Isotopeneffekte berücksichtigt werden müssen.



**Abbildung 2-4** Modellhafte Vorstellung einer instationären Schadstofffahne, die aus einer permanenten Quelle gespeist wird; der sorptionsbedingte Isotopeneffekt zeigt sich im Bereich zwischen  $x=L$  und  $x=L_{10}$ .

Aus der Variabilität der sorptionsbedingten Isotopenfraktionierung für die untersuchten Substanzen wird deutlich, dass weitere Untersuchungen zur Wirkung unterschiedlicher Molekülstrukturen auf die Intensität des fraktionierenden Prozesses zukünftig notwendig sind.

Für die praktische Anwendung ist vor allem die Übertragung dieser Modellvorstellung auf eine stationäre Schadstofffahne relevant. Eine stationäre Fahne zeichnet sich aus durch eine Gleichgewichtssituation zwischen der Schadstoffnachlieferung und dem mikrobiellen Abbau, der zu einer Schadstoffreduzierung führt. Weiterhin sind in einer stationären Fahne auch die Sorptions-/Desorptionsprozesse in einem Gleichgewicht, d. h. die in gelöster und sorbierter Form vorliegenden Schadstoffanteile sind konstant, und es sollte demzufolge zu keinem weiteren sorptionsbedingten Isotopeneffekt kommen.

Durch Feldstudien kann empirisch belegt werden, dass der Transport organischer Schadstoffe in einem Grundwasserleiter nicht mit einer Änderung der Isotopenverhältnisse verbunden ist. Entlang eines rund 700 m langen Abstromprofils zeigte sich für Indan und Inden, bei einem Rückgang der Konzentrationen auf 8 bzw. 1 % der Ausgangskonzentration, keine Änderung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (Richnow et al., 2003a). Gleiches gilt für eine rund 200 m lange Fließstrecke für Benzol am Standort Zeitz, wo ein Rückgang auf 20 % der Ausgangskonzentration mit keiner Änderung der Isotopensignatur des Benzols verbunden war (Vieth et al., 2003b). Auch PCE zeigte während des Transports entlang eines Abstromprofils von 315 m Länge keine Änderung der Isotopensignatur (Vieth et al., 2003c). Aus diesen Feldbeispielen wird deutlich, dass in einer

stationären Schadstofffahne kein signifikanter sorptionsbedingter Isotopeneffekt festgestellt werden konnte, und dass eine innerhalb einer Fahne gemessene Änderung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Schadstoffs auf biologischem Abbau basieren kann.

### 3 Isotopenfraktionierung durch biologische Prozesse

#### 3.1 Isotopenfraktionierung in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen

Der mikrobielle Abbau organischer Schadstoffe ist oft mit einer relativen Anreicherung des Anteils an schweren Isotopen ( $^{13}\text{C}$ , D,  $^{37}\text{Cl}$ ) gegenüber den leichten Isotopen ( $^{12}\text{C}$ , H,  $^{35}\text{Cl}$ ) in der residualen Schadstofffraktion verbunden. Neben der Aufklärung des fraktionierenden Schritts innerhalb der Umsetzung wurde auch untersucht, welchen Einfluss die weiteren Reaktionsbedingungen auf die Isotopenfraktionierung ausüben.

Allgemein ist zu erwarten, dass die Größe des Isotopeneffektes der absoluten Temperatur umgekehrt proportional ist (Krumbiegel, 1970). Hinsichtlich der Temperaturabhängigkeit zeigte sich für den anaeroben Toluolabbau durch zwei verschiedene Reinkulturen keine Abhängigkeit der Fraktionierung von der Temperatur in einem Temperaturbereich von  $10^\circ\text{C}$  bis  $35^\circ\text{C}$  (Morasch et al., 2001). Im Gegensatz dazu ergab sich beim aeroben Abbau des Toluols durch *Pseudomonas putida* mt-2 sowohl für Kohlenstoff als auch für Wasserstoff eine Variabilität des Fraktionierungsfaktors mit der Reaktionstemperatur (Morasch et al., 2001). Der Isotopenfraktionierungsfaktor für den aeroben Abbau von 1,2-Dichlorethan (1,2-DCA) durch die Reinkultur *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 zeigte keine Änderung in Abhängigkeit von der Reaktionstemperatur ( $10$  bzw.  $23^\circ\text{C}$ ) (Hunkeler und Aravena, 2000b). Aus diesen Ergebnissen lässt sich für die vergleichsweise isothermen Bedingungen eines Grundwasserleiters schlussfolgern, dass die Isotopenfraktionierung nicht durch zusätzliche Temperatureffekte beeinflusst wird.

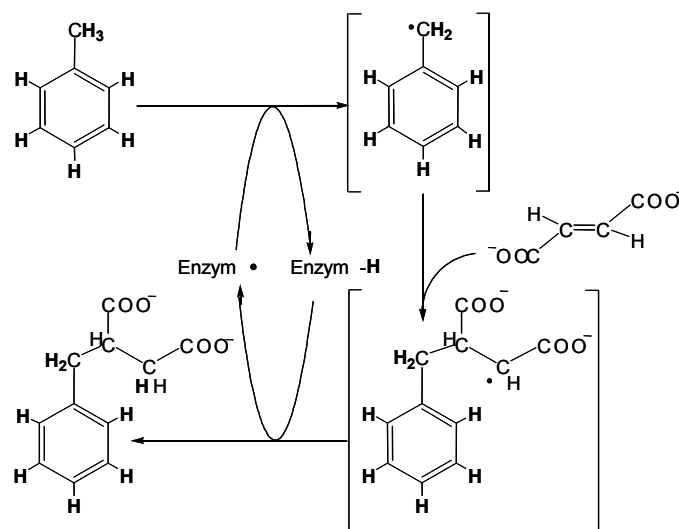
Eine Abhängigkeit der Fraktionierungsfaktoren von der Ausgangskonzentration ergab sich beim aeroben Abbau von 1,2-DCA nicht, in den Versuchen wurden bei initialen Konzentrationen von  $74,1$  bzw.  $148,2 \text{ mg l}^{-1}$  ( $60$  bzw.  $120 \text{ ppm}$ ) vergleichbare Fraktionierungsfaktoren bestimmt (Hunkeler und Aravena, 2000b). Auch zeigte sich keine Abhängigkeit des Fraktionierungsfaktors von der Zelldichte der verwendeten Kulturen, wie es beispielhaft für den cometabolischen aeroben Abbau von TCE untersucht wurde (Barth et al., 2002). Darüber hinaus haben die Zelldichte und die Umsetzungsrate keinen Effekt auf die Wasserstoff- und Kohlenstoffisotopenfraktionierung während des Abbaus von Benzol unter methanogenen Bedingungen (Mancini et al., 2003) sowie die Kohlenstoffisotopenfraktionierung des Toluolabbaus (Morasch et al., 2001).

### 3.2 Isotopenfraktionierung beim Abbau von Mineralölkohlenwasserstoffen

Mineralölkohlenwasserstoffe (MKW) sind Raffinationsprodukte von Rohölen, die aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe enthalten. Im Folgenden wird vor allem auf die Gruppe der BTEX-Aromaten eingegangen, da diese Gruppe, wie in Kapitel 1.2 bereits geschildert, hinsichtlich ihres Vorkommens in Grundwasserkontaminationen von herausragender Bedeutung ist.

Für das Ausmaß der Isotopenfraktionierung in der residualen Substratfraktion ist der erste geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt des jeweiligen Abbauwegs von zentraler Bedeutung, auf den in den folgenden Ausführungen besonders eingegangen wird. Bezüglich der Mechanismen, die zur vollständigen Mineralisierung der BTEX führen, sei auf einige zusammenfassende Arbeiten hingewiesen (Heider et al., 1998; Harwood et al., 1998; Spormann und Widdel, 2000).

Lange Zeit galt eine anaerobe Umsetzung der BTEX, die aufgrund des aromatischen Systems eine sehr stabile Struktur aufweisen, als nicht wahrscheinlich. Vermeintlich nur durch aerobe Umsetzungen könnte ein für die Mikroorganismen ausreichender Energiegewinn erzielt werden. Doch auch die mikrobiellen Umsetzungen der BTEX unter nitrat- und sulfatreduzierenden Bedingungen oder Methanogenese stellen einen exergonischen Prozess dar (Spormann und Widdel, 2000).



**Abbildung 3-1** Enzymatisch katalysierter, anaerober Abbauweg des Toluols (Benzylsuccinat-Synthase-Weg); (aus Heider et al., 1998)

Für die Gruppe der BTEX wurde der anaerobe Abbau des Toluols am intensivsten untersucht. Die Umsetzung des Toluols verläuft über eine Addition von Fumarat an die Methylgruppe und der weiteren, enzymabhängigen Oxidation dieses Benzylsuccinats zu Benzoyl-Coenzym A (Benzoyl-CoA). Dies gilt als zentraler Metabolit des anaeroben Abbaus vieler aromatischer Verbindungen (Heider und Fuchs, 1997; Harwood et al., 1998). Das Benzoyl-CoA wird nach der

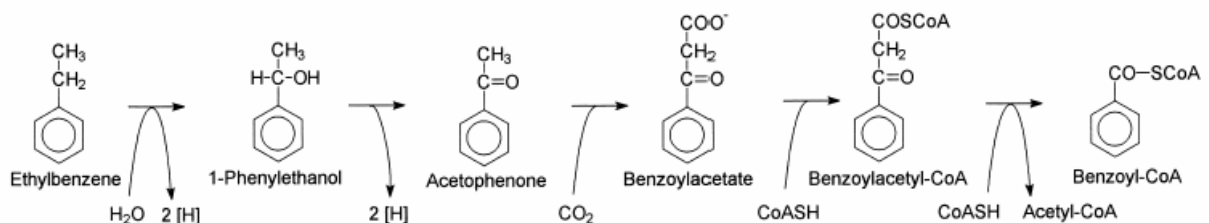
Reduktion des aromatischen Rings, Ringspaltung und weiteren oxidativen Schritten vollständig mineralisiert (Harwood et al., 1998).

Der initiale Abbauschritt, der für die Intensität der gemessenen Isotopenfraktionierung von Bedeutung ist, wird durch die Benzylsuccinat-Synthase katalysiert. Die Modellvorstellung beinhaltet die Abspaltung eines Wasserstoff-Radikals von der Methylgruppe des Toluols, dieses Radikal wird von der Benzylsuccinat-Synthase aufgenommen (Abbildung 3-1) (Spormann und Widdel, 2000).

Die Addition von Fumarat und Toluol-Radikal führt zur Entstehung einer neuen C-C-Bindung. An das nun vorliegende Benzylsuccinyl-Radikal wird das anfänglich abgespaltene Wasserstoffradikal übertragen (Beller und Spormann, 1998; Heider et al., 1998). Benzylsuccinat, ein eindeutiger Metabolit des anaeroben Abbaus von methylierten Benzolen, ist das Produkt dieser Umsetzung. Dieser Abbauweg wurde nicht nur für Toluol, sondern auch für den anaeroben Abbau von m-Xylol (Krieger et al., 1999), o-Xylol und p-Xylol (Beller und Spormann, 1999) nachgewiesen. Die Addition von Fumarat wurde weiterhin beschrieben als initialer Schritt des anaeroben Abbaus von 2-Methylnaphthalin (Annweiler et al., 2000), n-Dodekan (Kropp et al., 2000), n-Hexan (Rabus et al., 2001) sowie m-Kresol (Muller et al., 1999) und p-Kresol (Muller et al., 2001).

Für den anaeroben Abbau des Toluols über den Benzylsuccinat-Synthase-Weg konnte eine reproduzierbare Isotopenfraktionierung unter einer Vielzahl von Reaktionsbedingungen beobachtet werden (Morasch et al., 2001; Meckenstock et al., 2002). Daher lässt sich vermuten, dass auch die anaerobe Umsetzung anderer Substanzen, die über den Benzylsuccinat-Synthase-Weg verläuft, mit einer Isotopenfraktionierung verbunden ist.

Verschiedene Reinkulturen wurden isoliert, die unter denitrifizierenden Bedingungen Ethylbenzol mineralisieren können (Rabus und Widdel, 1995; Ball et al., 1996). Ein Intermediat des Ethylbenzolabbaus ist wiederum das Benzoyl-CoA (Ball et al., 1996), doch verläuft der Abbauweg bis zum Benzoyl-CoA nicht über den Benzylsuccinat-Synthase-Weg. Ethylbenzol wird dehydriert zum 1-Phenylethanol und 1-Phenylethanon und dann carboxyliert zum Benzoyl-CoA (Heider et al., 1998) (Abbildung 3-2).



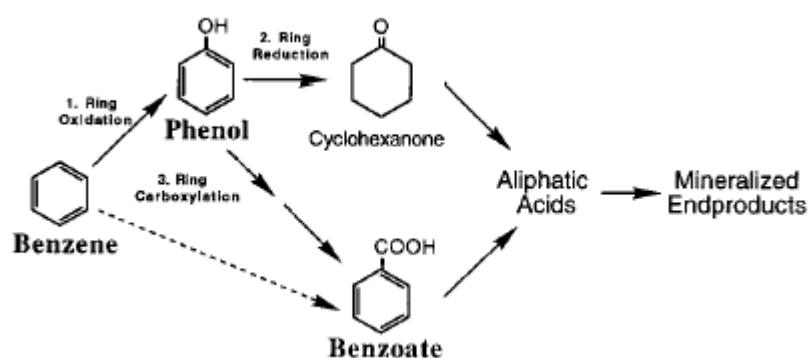
**Abbildung 3-2** Weg des Ethylbenzolabbaus unter denitrifizierenden Bedingungen (aus Heider et al., 1998)



Im initialen Reaktionsschritt des Abbaus von Ethylbenzol unter denitrifizierenden Bedingungen wird eine C-H-Bindung gespalten und eine Hydroxylgruppe, die aus dem umgebenden Wasser stammt, an die Ethylgruppe gebunden (Ball et al., 1996).

Es gibt erste Hinweise, dass sich der Abbau von Ethylbenzol unter sulfatreduzierenden Bedingungen deutlich vom Abbau unter denitrifizierenden Bedingungen unterscheidet (Widdel und Rabus, 2001). In einer sulfatreduzierenden Anreicherungskultur konnten 1-Phenylethanol und 1-Phenylethanon, die zentralen Metabolite des Ethylbenzolabbaus unter denitrifizierenden Bedingungen, nicht nachgewiesen werden (Elshahed et al., 2001). Jedoch lassen die unter sulfatreduzierenden Bedingungen während des Abbaus von Ethylbenzol nachgewiesenen Metabolite die Schlussfolgerung zu, dass die initiale Reaktion über die Benzylsuccinat-Synthese verläuft (Elshahed et al., 2001; Widdel und Rabus, 2001).

Die erste Reinkultur, die Benzol abbaut und dabei Nitrat als Elektronenakzeptor verwendet, wurde von Coates und Mitarbeitern isoliert (Coates et al., 2001). Metabolite des Benzolabbaus wurden in dieser Studie nicht beschrieben. Mögliche Abbauewege sind, auf der Grundlage von Literaturangaben, im Folgenden zusammengefasst. In verschiedenen Anreicherungskulturen wurden, unter sulfatreduzierenden, eisen-III-reduzierenden und methanogenen Bedingungen, Phenol und Benzoat als Zwischenprodukte des Benzolabbaus nachgewiesen (Caldwell und Sufliita, 2000). Dieser Abbaueweg beinhaltet die Hydroxylierung des Benzols zu Phenol und die anschließende Carboxylierung zur Benzoesäure (Abbildung 3-3). In anderen Untersuchungen wurde kein Phenol als Intermediat nachgewiesen (Phelps et al., 2001) und der anfängliche Abbauschritt des Benzols als direkte Carboxylierung zur Benzoesäure bzw. zum Benzoat beschrieben (Phelps et al., 2001).



**Abbildung 3-3** Möglicher Abbaueweg des Benzols (aus Caldwell und Sufliita, 2000)

Die direkte Carboxylierung des aromatischen Ringsystems wird ebenfalls für Naphthalin, einen Vertreter der Stoffklasse der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK), beschrieben (Meckenstock et al., 2000). Durch Zugabe von  $^{13}\text{C}$ -markiertem Bicarbonat im Medium wurde nachgewiesen, dass die Carboxylgruppe der 2-Naphthalinsäure aus dem

Medium stammt (Zhang und Young, 1997; Meckenstock et al., 2000).

Für viele der beschriebenen Abbaureaktionen konnten substanzspezifische Isotopenfraktionierungsfaktoren bestimmt werden, die zusammenfassend in Tabelle 3-1 aufgelistet sind.

**Tabelle 3-1** Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenfraktionierungsfaktoren für den aeroben und anaeroben Abbau verschiedener MKW durch unterschiedliche Misch- und Reinkulturen

Substrat	Kultur	Isotope	Milieu	$\alpha$	initiale Abbaureaktion	Referenz
Benzol	<i>Acinetobacter</i>	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	aerob	1,0015	Ringmono- oder -dioxygenase	Hunkeler et al., 2001a
Benzol	<i>Burkholderia</i>	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	aerob	1,0035	Ringmono- oder -dioxygenase	Hunkeler et al., 2001a
Benzol	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	aerob	1,0008		Stehmeier et al., 1999
Benzol	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	nitrat-reduzierend	1,0023		Mancini et al., 2003
Benzol	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	sulfat-reduzierend	1,0036		Mancini et al., 2003
Benzol	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	methano-gen	1,0020		Mancini et al., 2003
Benzol	<i>Acinetobacter</i>	H/D	aerob	1,0130	Ringmono- oder -dioxygenase	Hunkeler et al., 2001a
Benzol	<i>Burkholderia</i>	H/D	aerob	1,0113	Ringmono- oder -dioxygenase	Hunkeler et al., 2001a
Benzol	Mischkultur	H/D	nitrat-reduzierend	1,0352		Mancini et al., 2003
Benzol	Mischkultur	H/D	sulfat-reduzierend	1,0858		Mancini et al., 2003
Benzol	Mischkultur	H/D	methano-gen	1,0638		Mancini et al., 2003
Toluol	<i>Pseudomonas putida</i> mt2	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	aerob	1,0033	Methyl-Monooxygenase	Morasch et al., 2002
Toluol	<i>Pseudomonas putida</i> mt2	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	aerob	1,0026	Methyl-Monooxygenase	Meckenstock et al., 1999
Toluol	<i>Ralstonia pickettii</i> PKO1	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	aerob	1,0011	Ring-monooxygenase	Morasch et al., 2002
Toluol	<i>Pseudomonas putida</i> F1	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	aerob	1,0004	Ringdioxygenase	Morasch et al., 2002

Toluol	<i>Geobacter metallireducens</i>	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	eisen-III-reduzierend	1,0018	Benzylsuccinat-Synthase	Meckenstock et al., 1999
Toluol	<i>Thauera aromatica</i>	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	nitrat-reduzierend	1,0017	Benzylsuccinat-Synthase	Meckenstock et al., 1999
Toluol	TRM 1	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	sulfat-reduzierend	1,0017	Benzylsuccinat-Synthase	Meckenstock et al., 1999
Toluol	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	sulfat-reduzierend	1,0015		Meckenstock et al., 1999
Toluol	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	sulfat-reduzierend	1,0008		Ahad et al., 2000
Toluol	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	methanogen	1,0005		Ahad et al., 2000
Toluol	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,0020		Kelley et al., 1997
Toluol	<i>Desulfobacterium cetonicum</i>	H/D	sulfat-reduzierend	1,2469	Benzylsuccinat-Synthase	Morasch et al., 2001
Toluol	TRM1	H/D	sulfat-reduzierend	3,6765	Benzylsuccinat-Synthase	Morasch et al., 2001
Ethylbenzol	EBN1	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	nitrat-reduzierend	1,0022	Dehydrierung zum Phenylethanol	Griebler et al., 2003
o-Xylol	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	sulfat-reduzierend	1,0013	Benzylsuccinat-Synthase	Morasch et al., mündliche Mitteilung
m-Xylol	<i>Pseudomonas putida</i> mt2	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	aerob	1,0017	Methylmonooxygenase	Morasch et al., 2002
m-Xylol	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	sulfat-reduzierend	1,0015		Morasch mündl. Mitteilung
p-Xylol	<i>Pseudomonas putida</i> mt2	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	aerob	1,0023	Methylmonooxygenase	Morasch et al., 2002
m-Kresol	<i>Desulfobacterium cetonicum</i>	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	sulfat-reduzierend	1,0043	Benzylsuccinat-Synthase	Morasch, mündl. Mitteilung
p-Kresol	<i>Desulfobacterium cetonicum</i>	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	sulfat-reduzierend	1,0016	Benzylsuccinat-Synthase	Morasch, mündl. Mitteilung
Naphthalin	<i>Pseudomonas putida</i> NCIB 9816	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	aerob	1,0001	Ringdioxygenase	Morasch et al., 2002
Naphthalin	Mischkultur N47	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	sulfat-reduzierend	1,0009	Carboxylierung	Griebler et al., 2003
2methyl-naphthalin	Mischkultur N47	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	sulfat-reduzierend	1,0009	Benzylsuccinat-Synthase	Griebler et al., 2003

Aus dieser Auflistung von Fraktionierungsfaktoren wird ersichtlich, dass die

Fraktionierungsfaktoren für die Wasserstoffisotope grundsätzlich höher ausfallen als die Faktoren für die Kohlenstoffisotopeneffekte. Der Unterschied der Faktoren unterliegt aber scheinbar keiner Systematik, wie das Beispiel für den Toluolabbau unter sulfatreduzierenden Bedingungen zeigt. Die Fraktionierungsfaktoren für Kohlenstoff liegen bei dieser Reaktion in einem Bereich um  $\alpha = 1,0017$ , wohingegen die Faktoren der Wasserstoffisotopenfraktionierung sich um den Faktor 3 unterscheiden (Tabelle 3-1).

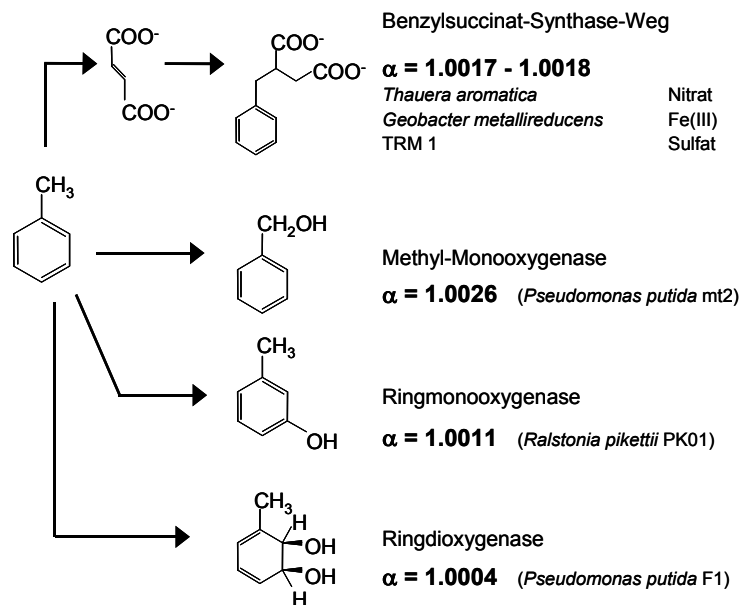
Der anaerobe Abbau von Toluol wurde hinsichtlich der Isotopenfraktionierung in einer Vielzahl von Abbaustudien untersucht (Meckenstock et al., 1999; Morasch et al., 2001). Für Toluol, das unter Verwendung unterschiedlicher Elektronenakzeptoren durch verschiedene Reinkulturen anaerob mineralisiert werden kann, wurde ein einheitlicher Kohlenstofffraktionierungsfaktor von  $\alpha = 1,0017$  bestimmt (Tabelle 3-1). In Mischkulturen wurden für den anaeroben Toluolabbau vergleichbare (Meckenstock et al., 1999) oder geringere Fraktionierungsfaktoren gemessen (Ahad et al., 2000). Die Ähnlichkeit der Faktoren liegt darin begründet, dass Toluol von den Reinkulturen auf die gleiche Weise über den Benzylsuccinat-Synthase-Weg abgebaut wird (Meckenstock et al., 2002). Folglich sollten der anaerobe Abbau der Xylole, der Kresole und des Methylnaphthalins, die ebenfalls über den initialen Benzylsuccinat-Synthase-Weg verlaufen, mit vergleichbar geringen Kohlenstofffraktionierungsfaktoren verbunden sein.

Der initiale Schritt des Abbauweges, der für das Ausmaß der Isotopenfraktionierung entscheidend ist, setzt an der Methylgruppe an. Es ist also nur ein C-Atom des gesamten Moleküls an dem für die Isotopenfraktionierung relevanten Prozess beteiligt. Da sich mit steigender Anzahl an C-Atomen in einem Molekül der Isotopeneffekt, der nur durch ein C-Atom hervorgerufen wird, auf eine größere Anzahl von Atomen verteilt, dürfte der Isotopenfraktionierungsfaktor für größere Verbindungen geringer ausfallen. Dies trifft für die Fraktionierungsfaktoren der Xylole und des Methylnaphthalins zu, die Faktoren werden mit steigender Anzahl an C-Atomen im Molekül geringer. Der anaerobe Abbau des p-Kresols ist gekennzeichnet durch einen Fraktionierungsfaktor von  $\alpha = 1,0016$ , der nahezu dem Faktor des Toluolabbaus entspricht. Bei den Isomeren der Kresole (m- und p-Kresol) fällt der große Unterschied zwischen den Fraktionierungsfaktoren auf, der andererseits bei den Xyloisomeren (o- und m-Xylol) nicht so deutlich ausgeprägt ist.

Die chemische Struktur eines Moleküls, z. B. das Vorhandensein unterschiedlicher Substituenten an einem aromatischen Ringsystem, könnte Einfluß auf die biochemische Reaktion am Enzymsystem haben und somit auch das Ausmaß der Isotopenfraktionierung beeinflussen. Darüber hinaus könnte auch die Aufnahme des organischen Schadstoffs in Hinblick auf passive Diffusion durch die Membran oder aktive Aufnahme in die Zelle, Einfluss auf das Ausmaß der Isotopenfraktionierung ausüben. Die möglichen Isotopeneffekte, die aus der Aufnahme von organischen Schadstoffen in die mikrobiologische Zelle resultieren oder abhängig sind von der Struktur des Moleküls und den vorhandenen Substituenten sind zur Zeit

noch nicht systematisch untersucht worden.

Verschiedene Reinkulturen, die Toluol aerob abbauen, sind mit unterschiedlichen Enzymsystemen ausgestattet (Abbildung 3-4). Der Kohlenstofffraktionierungsfaktor für den Abbau von Toluol durch den aeroben Stamm *Pseudomonas putida* mt-2 liegt nur geringfügig höher als der Faktor für den anaeroben Abbau (Tabelle 3-1). Der Toluolabbau mit einer Methylmonooxygenase führt ebenso wie die Umsetzung durch die Benzylsuccinat-Synthase zur Spaltung einer C-H-Bindung in der Methylgruppe des Toluols, was die Ähnlichkeit der Fraktionierungsfaktoren erklären könnte. Andere initiale Abbaureaktionen, wie z. B. der Toluolabbau durch eine Ringmono- oder -dioxygenase, greifen am  $\pi$ -Elektronensystem des aromatischen Ringes an. Bei dieser Reaktion kommt es zu keiner kovalenten Spaltung einer C-H-Bindung (Morasch et al., 2002). Es liegt vermutlich nur ein sekundärer Isotopeneffekt vor, der sich in geringeren Isotopenfraktionierungsfaktoren widerspiegelt.

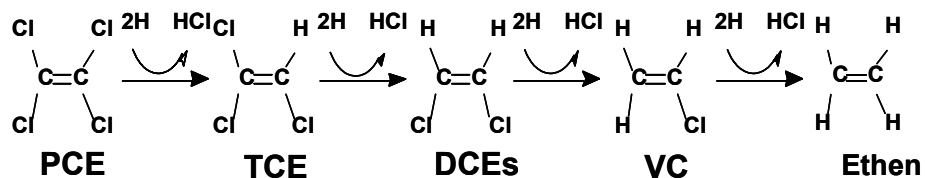


**Abbildung 3-4** Mögliche Abbaupfade (anaerob und aerob) des Toluols und die damit verbundenen Kohlenstoffisotopenfraktionierungsfaktoren (Daten aus Meckenstock et al., 2002)

Aus der Kenntnis der initialen Reaktion des mikrobiellen Abbaus eines organischen Schadstoffs kann möglicherweise auf das Ausmaß der Isotopenfraktionierung geschlossen werden. Somit wäre einerseits die Möglichkeit vorhanden, aus vorhandenen Fraktionierungsfaktoren auf bestimmte Reaktionsschritte zu schließen, und andererseits für verschiedene Schadstoffe, die mit der gleichen initialen Reaktion abgebaut werden, die Fraktionierungsfaktoren theoretisch herzuleiten.

### 3.3 Isotopenfraktionierung beim biologischen Abbau chlorierter Kohlenwasserstoffe

Der mikrobielle Abbau der chlorierten Ethene erfolgt anaerob als reduktive Dechlorierung. Es kommt zur Abspaltung eines Chloratoms, das durch ein Wasserstoffatom ersetzt wird. Die Dechlorierung erfolgt schrittweise, ausgehend vom PCE über TCE, den Dichlorethenen (DCE) zu Vinylchlorid (VC) und Ethen (Abbildung 3-5). Als Elektronendonatoren können neben dem Wasserstoff z. B. auch Pyruvat, Lactat und Format dienen (Nijenhuis, 2002). Die chlorierten Ethene fungieren in dieser Umsetzung als Elektronenakzeptoren. Die mikrobielle reduktive Dechlorierung wird als Halorespiration bezeichnet, da die Mikroorganismen aus der Umsetzung der chlorierten Ethene Energie gewinnen können (Synthese von Adenosintriphosphat (ATP)). Aus Anreicherungskulturen von kontaminierten Standorten wurden Reinkulturen isoliert, die PCE und TCE reduktiv zu cis-DCE dechlorieren können (Neumann et al., 1994; Holliger und Schumacher, 1994). Eine Kultur, die PCE vollständig zu Ethen dechloriert, wenn Wasserstoff als Elektronendonator zur Verfügung steht, wurde von Maymo-Gatell und Mitarbeitern isoliert (Maymo-Gatell et al., 1997). Untersuchungen des an der reduktiven Dechlorierung beteiligten Enzymsystems verschiedener Reinkulturen (Wohlfarth und Diekert, 1997; Holliger et al., 1998) zeigten strukturelle Ähnlichkeiten auf, doch konnte aus diesen enzymatischen Betrachtungen der unterschiedlich starke Dechlorierungsfortschritt der Reinkulturen nicht erklärt werden (Neumann et al., 2002).

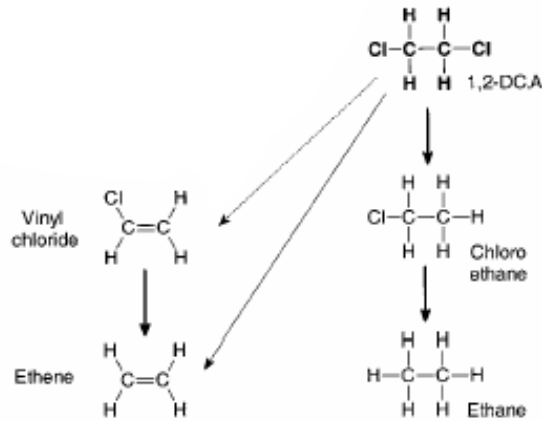


**Abbildung 3-5** Reduktive Dechlorierung von PCE über TCE, DCE zu VC und Ethen (aus Nijenhuis, 2002)

Unter aeroben Bedingungen können die chlorierten Ethene cometabolisch abgebaut werden (Ryoo et al., 2000; s. Referenzen in Barth et al., 2002). Beobachtet wurde diese Umsetzung bei verschiedenen Reinkulturen, die als Kohlenstoff- und Energiequelle Toluol nutzen. PCE und TCE können aerob verwertet werden in Anwesenheit einer Toluol-o-Xylol Monooxygenase, die in den Reinkulturen durch die Anwesenheit von beispielsweise Toluol exprimiert wurde (Ryoo et al., 2000).

Der aerobe und denitrifizierende Abbau von Dichlormethan (DCM) ist hinsichtlich der initialen Abbaureaktion für die Reinkultur *Hyphomicrobium* sp. DM2 untersucht und aufgeklärt worden

(Kohler-Staub und Leisinger, 1985). DCM und reduziertem Glutathion werden unter Abspaltung von HCl enzymatisch zu einem S-Chlormethyl-Glutathion-Konjugat umgesetzt (Leisinger et al., 1994). Der erste Reaktionsschritt wird von einer DCM-Dehalogenase katalysiert, die auch in anderen Reinkulturen nachgewiesen werden konnte, die DCM verwerten (Kohler-Staub et al., 1986; Leisinger et al., 1994).



**Abbildung 3-6** Mögliche Abbauewege des 1,2-DCA (aus Hunkeler et al., 2002)

Der aerobe Abbau von 1,2-DCA durch *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 beginnt mit einer hydrolytischen Dehalogenierung zu 2-Chlorethanol (Janssen et al., 1985), unter anaeroben Bedingungen kann der Abbau des 1,2-DCA entweder als eine reduktive Dechlorierung mit den Metaboliten Chlorethan und Ethan erfolgen (Holliger et al., 1990), oder als Dichloreliminierung zu Ethen (Egli et al., 1987), oder als Dehydrochlorierung zu Vinylchlorid (Hunkeler et al., 2002) (Abbildung 3-6).

Die zur Zeit verfügbaren Kohlenstoff- und Chlorisotopenfraktionierungsfaktoren der mikrobiellen Dechlorierung der chlorierten Ethene sowie der aeroben und anaeroben Umsetzung von Dichlormethan und Dichlorethan sind in Tabelle 3-2 wiedergegeben.

**Tabelle 3-2** Kohlenstoff- und Chlorisotopenfraktionierungsfaktoren der mikrobiellen Dechlorierung von PCE, TCE, DCE, VC, DCM und DCA durch verschiedene Misch- und Reinkulturen

Substrat	Kultur	Isotope	Milieu	$\alpha$	Anmerkungen	Referenz
DCM	MC8b	<sup>12</sup> C/ <sup>13</sup> C	aerob	1,042		Heraty et al., 1999
DCM	Hyphomicrobium sp. DSM1869	<sup>12</sup> C/ <sup>13</sup> C	aerob	1,066		Ziller, 2002

DCM	<i>Hyphomicrobium sp.</i> HDM3	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	aerob	1,071		Ziller, 2002
DCM	<i>Hyphomicrobium sp.</i> HDM5	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	aerob	1,067		Ziller, 2002
DCM	<i>Hyphomicrobium sp.</i> DM2	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	aerob	1,067	DCM- Dehalogenase	Ziller, 2002
DCM	<i>Methylobacterium</i> <i>dichloromethanicum</i>	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	aerob	1,062		Ziller, 2002
DCM	<i>Methylophila</i> <i>helvetica</i>	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	aerob	1,066		Ziller, 2002
DCM	<i>Hyphomicrobium sp.</i> HDM3	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	nitratre- duzierend	1,065		Ziller, 2002
DCM	<i>Hyphomicrobium sp.</i> HDM5	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	nitratre- duzierend	1,063		Ziller, 2002
DCM	<i>Hyphomicrobium sp.</i> DM2	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	nitratre- duzierend	1,062	DCM- Dehalogenase	Ziller, 2002
VC	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,026	Methanol	Hunkeler et al., 1999
VC	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,022	Methanol	Bloom et al., 2000
VC	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,027	Methanol	Bloom et al., 2000
VC	Mischkultur (KB-1)	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,023	Methanol	Slater et al., 2001
VC	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,031	Meth, Eth, Lactat, Acetat	Hunkeler et al., 2002
cis-DCE	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,012	Methanol	Hunkeler et al., 1999
cis-DCE	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,016	Methanol	Bloom et al., 2000
cis-DCE	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,014	Methanol	Bloom et al., 2000
cis-DCE	Mischkultur (KB-1)	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,021	Methanol	Slater et al., 2001
cis-DCE	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,020	Meth, Eth, Acetat, Lactat,	Hunkeler et al., 2002
trans- DCE	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,031	Meth, Eth, Lactat, Acetat	Hunkeler et al., 2002
1,1-DCE	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,0073	Meth, Eth, Lactat, Acetat	Hunkeler et al., 2002
1,2-DCA	<i>Xanthobacter</i> <i>autotrophicus</i> GJ10	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	aerob	1,028 – 1,033	Hydrolytische Dehalogenierung	Hunkeler und Aravena, 2000b
1,2-DCA	<i>Xanthobacter</i> <i>autotrophicus</i> GJ10	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	aerob	1,031	Hydrolytische Dehalogenierung	Ziller, 2002
1,2-DCA	<i>Xanthobacter</i> <i>autotrophicus</i> DE2	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	aerob	1,032		Ziller, 2002
1,2-DCA	<i>Arthrobacter</i> DE3	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	aerob	1,033		Ziller, 2002



1,2-DCA	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,0321	Meth, Eth, Lactat, Acetat	Hunkeler et al., 2002
TCE	<i>Burkholderia cepacia</i> G4	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	aerob	1,019	Cometabolisch, mit Toluol	Barth et al., 2002
TCE	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,0072	Lactat	Lollar et al., 1999
TCE	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,0040	Methanol	Hunkeler et al., 1999
TCE	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,0066	Methanol	Bloom et al., 2000
TCE	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,0025	Methanol	Bloom et al., 2000
TCE	Mischkultur (KB-1)	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,014	Methanol	Slater et al., 2001
TCE	Mischkultur	$^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$	anaerob	1,0056		Numata et al., 2002
1,1,2-TCA	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,0020	Meth, Eth, Lactat, Acetat	Hunkeler et al., 2002
PCE	Mischkultur (TP-butyric acid)	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,0055	Buttersäure	Slater et al., 2001
PCE	Mischkultur	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,0020	Methanol	Hunkeler et al., 1999
PCE	Mischkultur (enthält <i>Dehalococcoides</i> <i>ethenogenes</i> 195)	$^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$	anaerob	1,0066		Nijenhuis, persönl. Mitteilung
PCE	Mischkultur	$^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$	anaerob	1,0101		Numata et al., 2002

Innerhalb der reduktiven Dechlorierung der chlorierten Ethene ist zu erkennen, dass die Fraktionierungsfaktoren von PCE zu den niedriger chlorierten Verbindungen größer werden (Hunkeler et al., 1999). Auch wenn VC durch verschiedene Mischkulturen, die aus Proben unterschiedlicher Standorte angereichert wurden, dechloriert wurde, stimmen die Fraktionierungsfaktoren sehr gut überein, so dass sich für die quantitative Abschätzung der reduktiven Dechlorierung des VC ein verlässlicher Fraktionierungsfaktor anbietet. Eine ähnlich gute Übereinstimmung gibt es bei den Fraktionierungsfaktoren der reduktiven Dechlorierung von cis-DCE. Für das trans-DCE-Isomer liegt zurzeit nur ein einzelner Fraktionierungsfaktor vor, der wesentlich höher ist als der durchschnittliche Faktor für das cis-DCE. Wie schon für die Kresolisomere (s. Kapitel 3.2) scheint sich auch hier die Stellung des Substituenten auf die mit dem mikrobiellen Abbau einhergehende Isotopenfraktionierung auszuwirken. Der Fraktionierungsfaktor der reduktiven Dechlorierung des 1,1-DCE liegt im Bereich der Fraktionierungsfaktoren von TCE und PCE und unterscheidet sich stark von den Fraktionierungsfaktoren der weiteren DCE. Die geringeren Fraktionierungsfaktoren traten bei den Substraten auf, die zwei Chlorsubstituenten an einem Kohlenstoffatom aufweisen, wohingegen im cis- und trans-DCE an jedem Kohlenstoffatom nur ein Chlor gebunden ist und die mikrobielle Umsetzung mit einer stärkeren Isotopenfraktionierung verbunden ist (Hunkeler et

al., 2002). Die Vermutung liegt nahe, dass sich die reduktive Dechlorierung der DCE von der Dechlorierung der PCE und TCE in geringer Weise mechanistisch oder enzymatisch unterscheidet und damit die unterschiedlichen Isotopeneffekte zu begründen sind. Eine stichhaltige Begründung kann mit der bisherigen Kenntnis der zur reduktiven Dechlorierung fähigen Mikroorganismen und den beteiligten Enzymsystemen nicht geliefert werden.

Die mikrobielle Dechlorierung des TCE ist mit einer sehr großen Spannweite möglicher Fraktionierungsfaktoren verbunden. Die Intensität des Isotopeneffekts variiert um den Faktor 5 und liefert Fraktionierungsfaktoren zwischen  $\alpha = 1,0140$  und  $\alpha = 1,0025$ . Besonders auffällig ist die Varianz der TCE-Faktoren, die während der Dechlorierung durch die gleiche Mischkultur bestimmt worden sind (Bloom et al., 2000) und nach Ansicht dieser Autoren durch Unterschiede in der mikrobiellen Aktivität zu erklären sind. In anderen Laborexperimenten konnte eine derartig hohe Spannweite der Fraktionierungsfaktoren für parallele Mikrokosmen und Kulturversuche nicht beobachtet werden (Slater et al., 2001; Hunkeler et al., 2001a; Ziller, 2002; Mancini et al., 2003). Weiterhin wurde in anderen Untersuchungen trotz stark unterschiedlicher mikrobieller Aktivität eine vergleichbare Isotopenfraktionierung im Verlauf der Umsetzung eines Substrats gemessen (Barth et al., 2002). Die Abhängigkeit des Fraktionierungsfaktors von der mikrobiellen Aktivität wäre überraschend. Der Fraktionierungsfaktor für die mikrobielle Umsetzung eines bestimmten Substrats sollte von der biochemischen Reaktion bestimmt werden.

Die bislang bekannten Fraktionierungsfaktoren der reduktiven Dechlorierung von PCE zeigen eine gewisse Schwankungsbreite, jedoch ergab sich bei zwei von drei verschiedenen Mischkulturen eine gute Übereinstimmung der  $\alpha$ -Werte (Slater et al., 2001; Nijenhuis, persönl. Mitteilung). Der wesentlich niedrigere Fraktionierungsfaktor, der von Hunkeler und Kollegen in einer anaeroben Mischkultur bestimmt wurde (Hunkeler et al., 1999), basiert auf nur zwei Datenpunkten, so dass dieser Faktor nicht berücksichtigt werden sollte.

Grundsätzlich zeigt sich hinsichtlich der Abschätzung der Isotopenfraktionierung im Verlauf der reduktiven Dechlorierung der chlorierten Ethene die Notwendigkeit, die vorhandenen Reinkulturen mit ihren unterschiedlichen Enzymsystemen und möglichen Unterschieden im initialen Reaktionsschritt hinsichtlich der Isotopenfraktionierung näher zu untersuchen und für die jeweiligen Kulturen Fraktionierungsfaktoren zu bestimmen.

Der aerobe Abbau von DCM durch verschiedene Reinkulturen zeigte geringfügige, jedoch statistisch signifikante Unterschiede in den Fraktionierungsfaktoren (Ziller, 2002). Der aerobe Abbau des DCM durch die Kultur MC8b, die eng mit den Gattungen *Methylobacterium* oder *Ochrobactrum* verwandt ist, zeigte einen wesentlich geringeren Isotopenfraktionierungsfaktor (Heraty et al., 1999). Die Kohlenstofffraktionierungsfaktoren, die während des Abbaus von DCM unter nitratreduzierenden Bedingungen bestimmt wurden, sind für die jeweilige Kultur um 0,004

bis 0,006 kleiner als die Faktoren des aeroben Abbaus (Ziller, 2002). Die Ähnlichkeit dieser Fraktionierungsfaktoren legt die Vermutung nahe, dass sich die initiale Abbaureaktion in den unterschiedlichen Kulturen nicht unterscheidet (DCM Dehalogenase), wohingegen der Fraktionierungsfaktor des aeroben Abbaus des DCM durch die Kultur MC8b auf das Vorhandensein eines anderen Abbaumechanismus hindeutet.

Für *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 ist der Mechanismus des aeroben Abbaus von DCA gut untersucht, die initiale Reaktion beinhaltet die hydrolytische Dehalogenierung zum 2-Chlorethanol (Hunkeler und Aravena, 2000b). Die übereinstimmenden Fraktionierungsfaktoren zeigen, dass sich die untersuchten Kulturen in der initialen Reaktion des DCA-Abbaus nicht unterscheiden.

### **3.4 Schlussfolgerungen zur Beschreibung des mikrobiellen Abbaus organischer Schadstoffe anhand der Änderung ihrer Isotopensignaturen**

Für eine Reihe von weit verbreiteten Grundwasserschadstoffen sind in zahlreichen Laborversuchen unter den unterschiedlichsten Bedingungen Fraktionierungsfaktoren bestimmt worden.

Neben den genannten Fraktionierungsfaktoren (Kapitel 3.2 und 3.3) wurden auch für den aeroben und anaeroben Abbau des Benzinadditivs MTBE (Kolhatkar et al., 2002; Gray et al., 2002; Hunkeler et al., 2001b) sowie den mikrobiellen Abbau von Alkylbenzolen und Alkanen in unterschiedlichen Rohölen (Wilkes et al., 2000; Pond et al., 2002) eine Anreicherung der schwereren <sup>13</sup>C-Isotopomere in der residualen Substratfraktion festgestellt. Damit ist eine hinreichende Anzahl von Fraktionierungsfaktoren vorhanden, die gezielt eingesetzt werden können, den biologischen Abbau von Schadstoffen im Grundwasser anhand der Änderung der Isotopenverhältnisse zu beschreiben. Problematisch bleibt jedoch die Bestimmung eines adäquaten Fraktionierungsfaktors für den konkreten Anwendungsfall, v. a. bei Schadensfällen mit chlorierten Ethenen, da hier mögliche Variabilitäten der Isotopenfraktionierung in Abhängigkeit von den beteiligten Enzymsystemen noch nicht aufgeklärt wurden. Aus der Gruppe der BTEX zeigte sich für Benzol und Ethylbenzol beim Abbau unter anaeroben Bedingungen eine Beziehung zwischen den vorherrschenden Redoxbedingungen und dem Isotopenfraktionierungsfaktor. Aus der genauen Kenntnis der relevanten Redoxprozesse am Standort kann die Auswahl eines adäquaten Faktors erfolgen. Eine allgemein gültige Theorie, welcher mikrobiologische Prozess mit welcher Isotopenfraktionierung verbunden ist und wie groß der resultierende Fraktionierungsfaktor ist, kann noch nicht aufgezeigt werden und bleibt das Ziel weiterer Untersuchungen.

Aus den beschriebenen Ergebnissen ist ersichtlich, dass die Kohlenstofffraktionierungsfaktoren,

die für den BTEX-Abbau ermittelt wurden, wesentlich kleiner sind als die für die reduktive Dechlorierung der PCE und TCE. In Hinblick auf die Anwendung der Isotopensignaturen zur Beschreibung des mikrobiellen Schadstoffabbaus in kontaminierten Aquiferen kann festgestellt werden, dass für den isotopisch gesicherten Nachweis des BTEX-Abbaus schon wesentlich höhere Umsetzungen erfolgt sein müssen als für PCE und TCE. Perspektivisch bieten sich zum Nachweis des mikrobiellen in-situ BTEX-Abbaus die Wasserstoffisotopensignaturen an, da die Fraktionierungsfaktoren für Wasserstoff bis zu drei Größenordnungen höher sind als die der Kohlenstoffisotope (Coleman und Risatti, 1981; Morasch et al., 2001) und damit bereits geringfügiger BTEX-Abbau isotopisch nachgewiesen werden kann. Andererseits ist die Bestimmung der Wasserstoffisotopenverhältnisse mit einem größeren Fehler (bis zu 5 ‰) (Ward et al., 2000) versehen und ist die Variabilität der Fraktionierungsfaktoren für Wasserstoff wesentlich größer als für Kohlenstoff, so dass der genannte Vorteil nicht optimal genutzt werden kann.

### **3.5 Isotopenfraktionierung während Sulfatreduktion, Methanogenese und Methanoxidation**

Im anaeroben Bereich der Gewässer und Sedimente kann die dissimilatorische Sulfatreduktion stattfinden, bei der Sulfat als Elektronenakzeptor für die anaerobe Veratmung von organischen Substraten fungiert. In kontaminierten Grundwasserleitern spielt die Sulfatreduktion als elektronenaufnehmender Prozess eine wichtige Rolle. Die mikrobielle Sulfatreduktion ist mit einer Isotopenfraktionierung verbunden (Clark und Fritz, 1997). Dabei werden die Sulfatmoleküle mit dem leichteren  $^{32}\text{S}$ -Isotop bevorzugt genutzt, und es kommt zu einer Anreicherung von Molekülen mit dem schweren  $^{34}\text{S}$ -Isotop in der residualen Sulfatfraktion.

In Laborversuchen wurde für 32 verschiedene Kulturen sulfatreduzierender Bakterien, die unter optimalen Wachstumsbedingungen lebten, die Schwefelisotopenfraktionierung der Sulfatreduktion bestimmt. Die Auswahl der sulfatreduzierenden Bakterien deckte ein weites Spektrum der bisher bekannten phylogenetischen und physiologischen Diversität ab. Die Fraktionierungsfaktoren der Sulfatreduktion lagen zwischen  $\alpha = 1,002$  und  $\alpha = 1,042$  (Detmers et al., 2001). Ein Zusammenhang zwischen der Intensität der Schwefelisotopenfraktionierung und der Salinität ( $0 - 100 \text{ g l}^{-1}$ ), der Temperatur ( $9 - 80 \text{ }^\circ\text{C}$ ) und dem pH-Wert (6,7 bis 9,6) der unterschiedlichen Kulturen war nicht nachzuweisen (Detmers et al., 2001). Auch zeigte sich aus der phylogenetischen Stellung der sulfatreduzierenden Bakterien keine Systematik, um die Varianz der Schwefelisotopenfraktionierung zu erklären. Die Hypothese, dass die Isotopenfraktionierung umgekehrt proportional mit der spezifischen Sulfatreduktionsrate korreliert (Kaplan und Rittenberg, 1964; Chambers et al., 1975) konnte nicht bestätigt werden (Detmers et al., 2001).

In zahlreichen Grundwasserstudien an natürlichen und kontaminierten Standorten wurden zum qualitativen Nachweis der Sulfatreduktion die  $\delta^{34}\text{S}$ -Werte des Sulfats herangezogen. Die in diesen Feldstudien ermittelten Fraktionierungsfaktoren liegen zwischen  $\alpha = 1,0094$  und  $\alpha = 1,060$  (Strebel et al., 1989; Bottrell et al., 1991; Bottrell et al., 1995; Asmussen und Strauch, 1998; Bottrell et al., 2000; Bolliger et al., 2001; Schroth et al., 2001; Spence et al., 2001). Die Feldfraktionierungsfaktoren der Sulfatreduktion in kontaminierten Grundwässern scheinen tendenziell geringer zu sein als in nicht kontaminierten Aquiferen. In einem MKW-kontaminierten Grundwasserleiter konnte in mehreren Push- und Pull-Tests, bei denen Sulfat und Bromid als Tracer zugegeben wurden, die dissimilatorische Sulfatreduktion mit Fraktionierungsfaktoren von  $\alpha_f = 1,020$  bis  $\alpha_f = 1,023$  bestimmt werden (Schroth et al., 2001). Weitere Fraktionierungsfaktoren der Sulfatreduktion, ermittelt aus Grundwasserproben am Standort einer Mülldeponie sowie aus Oberflächenwasserproben eines unmittelbar benachbarten Sees lagen bei  $\alpha_f = 1,0083$  und  $\alpha_f = 1,021$  (Asmussen und Strauch, 1998). Die Sulfatreduktion an einem Phenol-kontaminierten Grundwasserleiter konnte mit einem Fraktionierungsfaktor  $\alpha_f = 1,0094$  beschrieben werden (Spence et al., 2001).

Aus diesen Studien kann geschlussfolgert werden, dass die Änderung der Sulfatisotopenverhältnisse z. B. in einem kontaminierten Grundwasserleiter genutzt werden kann, um qualitative Aussagen zu treffen, ob und in welchen Zonen einer Kontamination Sulfatreduktion stattfindet. Aufgrund der großen Variabilität der Isotopenfraktionierungsfaktoren in Laborversuchen und der (noch) nicht erkennbaren Systematik der Faktoren scheint es nicht möglich zu sein, die Sulfatreduktion basierend auf der Änderung der Schwefelisotopensignaturen quantitativ zu bewerten.

Im Allgemeinen findet die Bildung von Methan als letzter Reaktionsschritt des mikrobiellen Abbaus organischer Substanzen statt, wenn andere Elektronenakzeptoren in geringen Konzentrationen vorhanden sind (Zengler et al., 1999; Lovley, 2001). Methanogene Bakterien, die zu den Archaeobakterien gehören, können unter obligat anaeroben Bedingungen, mit einem Redoxpotential  $< -200$  mV und bei nur geringen Sulfatkonzentrationen  $\text{C}_1$ - und  $\text{C}_2$ -Verbindungen zu Methan reduzieren. Im Allgemeinen sind bei der Methanogenese zwei verschiedene Abbauege zu unterscheiden: die Methanbildung aus Kohlendioxid (Gleichung 3-1) bzw. die Methanbildung aus niederen organischen Substraten, die eine Methylgruppe aufweisen (z. B. Acetat, Methanol, Propionat, Butyrat, Methylamine, Methylsulfide) (Gleichung 3-2).



Biogenes Methan unterscheidet sich in seiner Isotopensignatur von geogenen Methanquellen. Für biogenes Methan gelten  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von  $-110$  bis  $-55$  ‰ als repräsentativ (Whiticar, 1999), im Aquifer von durch Deponiewässern beeinflussten Standorten wurde biogenes Methan mit  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten zwischen  $-56$  und  $-38$  ‰ bestimmt (Barker und Fritz, 1981b).

Aus den Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopendaten des Methans sowie des  $\text{CO}_2$  und der Wasserstoffisotopensignatur des umgebenden Wassers kann hergeleitet werden, welcher der möglichen Methanbildungswege zur Entstehung des untersuchten Methans geführt hat. Die Wasserstoff- und Kohlenstoffisotopensignatur des gebildeten Methans sind abhängig von den jeweiligen Isotopenverhältnissen des Edukts ( $\text{CO}_2$ , Acetat) sowie von dem mit der entsprechenden mikrobiellen Umsetzung verbundenen Isotopeneffekt. Als Isotopensignatur des Edukts kann im Allgemeinen der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des gelösten  $\text{CO}_2$  angenommen werden.  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für Acetat oder andere methylierte Verbindungen, die als Edukt der Methanogenese dienen können, sind kaum vorhanden. Daher wird vereinfachend angenommen, dass die Isotopensignaturen einzelner Verbindungen dem  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Summenparameters entsprechen (Whiticar, 1999). Die Änderung der Isotopensignaturen von Edukt und Produkt einer Reaktion wird angegeben als Anreicherungsfaktor ( $\epsilon$ ), der sich folgendermaßen ergibt (Gleichung 3-3) (Whiticar, 1999):

**Gleichung 3-3**  $\epsilon = (\alpha - 1) \times 1000 \approx \delta^{13}\text{C}_{\text{Edukt}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{Produkt}}$

Der Anreicherungsfaktor für Methan, das aus der  $\text{CO}_2$ -Reduktion entstanden ist, ist größer als der für Methan als Produkt der Acetatgärung (Whiticar et al., 1986; Whiticar, 1999; Waldron et al., 1998).

Für die Isotopenfraktionierung der  $\text{CO}_2$ -Reduktion gibt es eine Fülle verschiedener Anreicherungsfaktoren. Von Botz und Kollegen (Betz et al., 1996) werden als Zusammenfassung verschiedener Kulturexperimente Anreicherungsfaktoren von  $\epsilon = 25$  ‰ bis  $\epsilon = 61$  ‰ genannt. Arbeiten dieser Gruppe zeigten eine Temperaturabhängigkeit der  $\text{CO}_2$ -Reduktion, die sich in Anreicherungsfaktoren von  $\epsilon = 48$  ‰ bis  $\epsilon = 79$  ‰ bei einem Temperaturbereich von  $35 - 85^\circ\text{C}$  ausdrückte. Für *Methanococcus thermolithotrophicus* zeigte sich im Bereich von  $45 - 65^\circ\text{C}$  ein Rückgang der Anreicherungsfaktoren von  $\epsilon = 62$  ‰ auf  $\epsilon = 57$  ‰ (Betz et al., 1996), was den Erwartungen entspricht, dass mit steigender Temperatur geringere Isotopeneffekte auftreten (Krumbiegel, 1970).

Der Anreicherungsfaktor für Methan aus der  $\text{CO}_2$ -Reduktion lag bei rund  $46$  ‰, wohingegen der Anreicherungsfaktor ( $\epsilon_{\text{Acetat} - \text{Methan}}$ ) für Methan aus der Acetatgärung nur  $21$  ‰ betrug (Krzycki et

al., 1987). In einem Inokulum von einer Mülldeponie wurde Methanogenese nachgewiesen und Anreicherungsfaktoren für die CO<sub>2</sub>-Reduktion von  $\epsilon < 54 \text{ ‰}$  bestimmt. Für die Acetatgärung ergab sich eine Anreicherung von  $\epsilon_{\text{Acetat} - \text{Methan}} = 25 \text{ ‰}$  (Waldron et al., 1998). Zusammenfassend stellt Whiticar fest, dass die Differenz der Kohlenstoffisotopenverhältnisse von CO<sub>2</sub> und Methan für die Acetatgärung ( $\epsilon = 25$  bis  $35 \text{ ‰}$ ) deutlich geringer ist als die Differenz der Kohlenstoffisotopenverhältnisse bei der CO<sub>2</sub>-Reduktion ( $\epsilon > 55 \text{ ‰}$ ) (Whiticar, 1999). Folglich hat das Methan der Acetatgärung einen relativ größeren  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert verglichen mit dem Methan aus der CO<sub>2</sub>-Reduktion (Whiticar et al., 1986; Krzycki et al., 1987; Burke, 1993).

Bei der Methanentstehung durch CO<sub>2</sub>-Reduktion stammt aller Wasserstoff des Methans aus dem umgebenden Wasser (Waldron et al., 1998). Das Methan, welches aus Acetat gebildet wurde, enthält drei Wasserstoffatome aus der Methylgruppe des Substrats, lediglich ein Wasserstoffatom stammt aus dem umgebenden Wasser (Whiticar et al., 1986). Daher scheint sich das Wasserstoffisotopenverhältnis des Methans als ein wichtiger Parameter zur Prozessunterscheidung der Methanogenese anzubieten. Die  $\delta \text{D}$ -Werte des Methans aus der Acetatgärung liegen im Bereich von  $-250$  bis  $-400 \text{ ‰}$ , wohingegen das Methan aus der CO<sub>2</sub>-Reduktion relativ angereicherte  $\delta \text{D}$ -Werte zwischen  $-150$  und  $-250 \text{ ‰}$  aufweist (Whiticar et al., 1986). Da aber die genauen Prozesse, die zur Bildung des Acetats bzw. der weiteren Methylsubstrate führen, nicht bekannt sind und damit die Herkunft des Wasserstoffs in der Methylgruppe nicht geklärt ist, scheint die genannte Unterscheidung der methanogenen Prozesse anhand der Wasserstoffisotopensignatur des Methans fraglich (Waldron et al., 1998).

Feldstudien legen nahe, dass in marinen und salinen Systemen das Methan vor allem über die CO<sub>2</sub>-Reduktion entsteht (Whiticar, 1999). Es wurden Anreicherungsfaktoren von  $\epsilon = 49 \text{ ‰}$  bis  $\epsilon = 100 \text{ ‰}$  bestimmt, von denen die meisten Faktoren im Bereich zwischen  $\epsilon = 65 \text{ ‰}$  und  $\epsilon = 75 \text{ ‰}$  lagen. Aus diesen hohen Anreicherungsfaktoren wird auf eine Dominanz der CO<sub>2</sub>-Reduktion als Prozess der Methanogenese geschlossen, was durch den hohen Anteil sulfatreduzierender Bakterien, die bevorzugt methylierte Verbindungen nutzen, begründet wird. In limnischen Systemen, mit einer wesentlich schwächer ausgeprägten Sulfatreduktion, können bis zu 70 % des gebildeten Methans aus der Acetatfermentation stammen (Whiticar et al., 1986). Aus Isotopenuntersuchungen des im Grundwasser gelösten Methans wurde deutlich, dass in den konkreten Feldstudien die Methanbildung aus der CO<sub>2</sub>-Reduktion wahrscheinlich ist (Hansen et al., 2001; Grossman und Coffman, 1989). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Methan im Grundwasser wahrscheinlich sowohl durch Acetatgärung als auch durch CO<sub>2</sub>-Reduktion entstehen kann. Beide Prozesse beeinflussen die Isotopensignaturen des Methans. Eine absolute Trennung der beiden Prozesse anhand der Methanisotopenverhältnisse ist

gegenwärtig schwierig. Die Anreicherungsfaktoren können jedoch verwendet werden, um qualitative Unterschiede zwischen den beiden Methanbildungsprozessen aufzuzeigen.

Die mikrobielle aerobe und auch anaerobe Umsetzung von Methan als Elektronendonator wird als Methanoxidation bezeichnet. Die aerobe Oxidation von Methan wurde nachgewiesen im Grenz- und Übergangsbereich vom methanogenen zum aeroben Milieu wie z. B. in der obersten Schicht von limnischen Sedimenten (Whiticar, 1999) und im Grundwasser (Barker und Fritz, 1981b). Die Methanoxidation unter anaeroben Bedingungen wurde in marinen und salinen Systemen beschrieben (Michaelis et al., 2002). Konsortien von Archaeobakterien und sulfatreduzierenden Bakterien sind, in Systemen mit ausreichender Methan- und Sulfatkonzentration, zur anaeroben Methanoxidation mit Sulfat als terminalem Elektronenakzeptor fähig (Valentine, 2002).

In den anaeroben Bereichen von Sickerwasserfahnen am Standort zweier Mülldeponien konnte der Konzentrationsrückgang des Methans auf eine anaerobe Oxidation zurückgeführt werden (Bjerg et al., 1995; Grossman et al., 2002). Der Nachweis der aeroben wie auch anaeroben Methanoxidation ergibt sich aus einer Anreicherung der  $\delta^{13}\text{C}$ - und  $\delta\text{D}$ -Werte der residualen Methanfraktion (Barker und Fritz, 1981a; Coleman und Risatti, 1981). Für die Schadstofffahne im Abstrom einer Mülldeponie wurde aus den  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten des Methans und den Methankonzentrationen ein Fraktionierungsfaktor  $\alpha = 1,0136$  für die anaerobe Methanoxidation bestimmt. Die Methankonzentrationen waren dabei hinsichtlich der Verdünnung korrigiert worden (Grossman et al., 2002). Die aerobe Methanoxidation wurde in verschiedenen Laborstudien mit Kohlenstofffraktionierungsfaktoren von  $\alpha = 1,005$  bis  $\alpha = 1,031$  beschrieben (Barker und Fritz, 1981a; Coleman und Risatti, 1981; Whiticar, 1999). Die Fraktionierungsfaktoren für die Wasserstoffisotopenverhältnisse beim aeroben Methanabbau sind um den Faktor 8 bis 14 höher (Coleman und Risatti, 1981).

Aus den Untersuchungen zur biologischen Methanbildung wird deutlich, dass sich anhand der Isotopensignaturen des Methans aussagen lässt, ob es biogenen oder geogenen Ursprungs ist. Die Bestimmung von Anreicherungsfaktoren zwischen  $\text{CO}_2$  und Methan erlaubt die tendenzielle Abschätzung, welcher Prozess der Methanogenese in dem konkreten Umweltkompartiment dominiert. Sind die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Methans schwerer, als sie es für biogenes Methan sein sollten, kann dies möglicherweise auf Methanoxidation hindeuten, da dieser Prozess zu einer Anreicherung der schweren Isotope in der residualen Methanfraktion führt. Aus den vorhandenen Kenntnissen hinsichtlich Methanogenese und Methanoxidation können aus den Isotopensignaturen des Methans und des DIC Quellen und Senken des Methans in einem kontaminierten Grundwasserleiter aufgezeigt werden.



## 4 Feldstudien

### 4.1 Anwendung der Isotopensignaturen in Feldstudien – Konzept

Der biologische Abbau typischer organischer Grundwasserkontaminanten führt zu einer Isotopenfraktionierung in der residualen Schadstofffraktion (s. Kapitel 3). Mathematisch lässt sich die Änderung der Isotopensignatur im Verlauf des mikrobiellen Abbaus mit der Rayleigh-Gleichung (Hoefs, 1997) beschreiben (Gleichung 4-1; s. Kapitel 1.3).

**Gleichung 4-1**

$$\frac{R_t}{R_0} = \left( \frac{C_t}{C_0} \right)^{\left( \frac{1}{\alpha} - 1 \right)}$$

Da Prozesse wie Verdünnung, Sorption oder auch Verflüchtigung das Kohlenstoffisotopenverhältnis einer Kontaminante nicht signifikant verändern (s. Kapitel 2), sind Isotopeneffekte im Grundwasserleiter im Wesentlichen auf den mikrobiellen Abbau zurückzuführen. Dies eröffnet die Möglichkeit, anhand der Isotopensignaturen organischer Schadstoffe und mit Hilfe der Rayleigh-Beziehung den biologischen Abbau von Schadstoffen in einem kontaminierten Grundwasserleiter zu ermitteln (Sturchio et al., 1998; Richnow und Meckenstock, 1999; Stehmeier et al., 1999; Hunkeler et al., 1999; Vieth et al., 2001; Lollar et al., 2001; Mancini et al., 2002; Meckenstock et al., 2002; Richnow et al., 2002; Richnow et al., 2003b; Richnow et al., 2003a), oder die Wirkung von in-situ Sanierungsmaßnahmen zu beobachten (Song et al., 2002).

Der prozentuale biologische Abbau (Gleichung 4-2) (Vieth et al., 2001) ergibt sich aus den gemessenen Isotopenwerten und dem entsprechenden Fraktionierungsfaktor  $\alpha$ .  $R_0$  wird der Messstelle mit der leichtesten Isotopensignatur zugewiesen.

**Gleichung 4-2**

$$B[\%] = \left[ 1 - \left( \frac{R_t}{R_0} \right)^{\left( \frac{1}{\alpha} - 1 \right)} \right] \times 100$$

Der so berechnete prozentuale Abbau gilt als Maß für den biologischen Abbau, der notwendig ist, um die gemessene Änderung der Isotopenverhältnisse zu erzeugen (Vieth et al., 2001). Die Angaben sind nicht quantitativ, weil die Konzentration einer Kontaminante ( $C_0$  oder  $C_t$ ) nicht in die Gleichung eingeht. Da die Änderung der Isotopenverhältnisse ausschließlich vom biologischen Abbau abhängt, ist der Index „prozentualer biologischer Abbau“ unabhängig von Verdünnung und Sorption. Mit ihm können relative Aussagen zum mikrobiellen Abbau in den verschiedenen Zonen der Schadstofffahne getroffen werden (Lollar et al., 2001).

Wenn eine repräsentative Ausgangskonzentration ( $C_0$ ) eines Schadstoffes für eine Fließstrecke in der Fahne ermittelt werden kann, kann der Konzentrationsgradient im Abstrom berechnet und somit der in-situ Abbau quantifiziert werden (Gleichung 4-3) (Vieth et al., 2001).

**Gleichung 4-3**

$$C_t = C_0 \times \left( \frac{R_t}{R_0} \right)^{\left( \frac{1}{\alpha-1} \right)}$$

Um den mikrobiellen Abbau mit der Rayleigh-Gleichung beschreiben zu können, muss vorausgesetzt werden, dass die Kontamination aus einer isotopisch homogenen Quelle gespeist wurde. Bei einer Mischung von Schadstofffahnen mit verschiedenen Isotopensignaturen ergibt sich kein repräsentatives Isotopenverhältnis für die Quelle ( $R_0$ ), und somit kann die Rayleigh-Gleichung nicht für weitere Berechnungen angewendet werden (Vieth et al., 2001). Eine Quantifizierung des biologischen Abbaus ist weiterhin nur möglich, wenn die gesamte Schadstofffraktion für die mikrobielle Biozönose zur Verfügung steht, und wenn entlang des ausgewählten Abstromprofils die Konzentrationen und die Isotopenverhältnisse des Schadstoffs nur durch den biologischen Abbau beeinflusst werden (Richnow et al., 2003a).

#### **4.2 Kontaminationen mit chlorierten Ethenen**

Der mikrobielle in-situ Abbau chlorierter Ethene im Grundwasser wurde in mehreren Feldstudien unter Verwendung der Kohlenstoffisotopenverhältnisse beschrieben (Hunkeler et al., 1999; Lollar et al., 2001; Song et al., 2002; Vieth et al., 2003c). Neben der rein qualitativen Auswertung, in dem aus der Anreicherung der Isotopenverhältnisse des Schadstoffs und einem Konzentrationsrückgang in abstromig gelegenen Messstellen auf einen mikrobiellen Abbau geschlossen wurde, wurden auch quantitative Aussagen zum mikrobiellen in-situ Abbau hergeleitet (Lollar et al., 2001; Vieth et al., 2003c) und der Erfolg einer in-situ Sanierungsmaßnahme (Zugabe von Lactat) anhand der Isotopenverhältnisse der chlorierten Ethene beschrieben (Song et al., 2002).

Beispielhaft wurde am Standort einer ehemaligen chemischen Reinigung die dortige PCE- und TCE-Kontamination des Grundwassers hinsichtlich der isotopischen Zusammensetzung des PCE und TCE untersucht und hieraus Aussagen zum mikrobiellen Schadstoffrückhalt getroffen (Vieth et al., 2003c). Der Standort zeichnet sich aus durch Schadstofffahnen sowohl im quartären als auch tertiären Grundwasserleiter (Müller, 2001). Entlang eines Abstromprofils, bestehend aus je 4 Messstellen pro Grundwasserleiter, konnte, trotz starkem Konzentrationsrückgang in beiden Grundwasserleitern, nur für den quartären Aquifer anhand

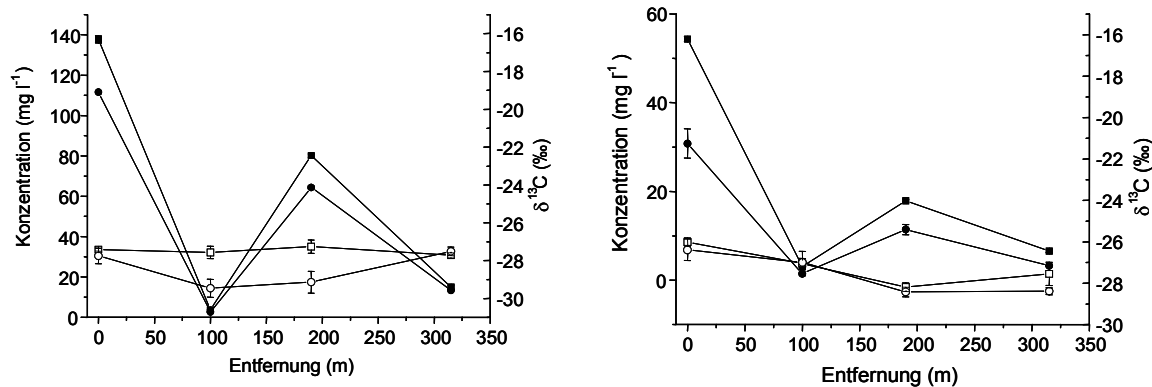
der Anreicherung der PCE-Isotopensignatur auf biologischen Abbau des PCE geschlossen werden (Vieth et al., 2003c). Die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des PCE und TCE in Proben des tertiären Grundwasserleiters zeigten keine Änderung im Verlauf des Abstromprofils, die auf mikrobiellen Abbau der Schadstoffe hinweist (Vieth et al., 2003c). Die Isotopendaten des TCE aus Proben des oberen Grundwasserleiters lassen eine eindeutige Auswertung nicht zu, da die gemessenen Isotopenverhältnisse sowohl Resultat des biologischen Abbaus des TCE als auch der Dechlorierung des PCE sein können. Wenn das TCE das Produkt der PCE-Dechlorierung ist, werden im TCE anfänglich leichtere  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte im Vergleich zum PCE zu erwarten sein (Hunkeler et al., 1999), die sich dann mit zunehmendem Abbaugrad des PCE dem  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert des Edukts annähern. Liegt TCE im Grundwasserleiter vor und wird es mikrobiell dechloriert, dann verbleibt mit zunehmender Umsetzung relativ mehr  $^{13}\text{C}$  in der residualen TCE-Fraktion. Die Rayleigh-Gleichung kann für TCE nicht angewendet werden, wenn es sowohl Edukt als auch Produkt verschiedener Umsetzungen sein kann (Hunkeler et al., 2002).

Die Auswertung der Felddaten nach der Rayleigh-Gleichung stellt ein geeignetes Mittel dar, den Zusammenhang zwischen Konzentrations- und Isotopenverhältnisänderung für das Edukt der Schadstofffahne zu überprüfen. Das Bestimmtheitsmaß der linearen Regressionsfunktion von  $\ln R_t/R_0$  über  $\ln C_t/C_0$  kennzeichnet die Verbindung von Feldkonzentrations- und –isotopendaten. Bei einem ausreichend hohen Bestimmtheitsmaß ist anzunehmen, dass der Konzentrationsrückgang zwischen den verschiedenen Messstellen am Feldstandort durch einen einheitlichen Prozess, den mikrobiellen in-situ Abbau, verursacht wurde (Lollar et al., 2001). Der direkt aus der linearen Regression berechnete Feldfraktionierungsfaktor ist nicht den Faktoren, die aus Laborversuchen bekannt sind, vergleichbar, da im Feld die Schadstoffkonzentration nicht ausschließlich durch mikrobiellen Abbau, sondern auch durch Verdünnung und Sorption beeinflusst werden kann (Sturchio et al., 1998; Vieth et al., 2003c). Der Konzentrationsrückgang kann daher stärker sein, als dies allein aus dem mikrobiellen Abbau zu erwarten gewesen wäre und wie es aus der Änderung der Isotopenverhältnisse deutlich wird.

Die Überprüfung der im Feld erhobenen Daten mit der Rayleigh-Gleichung ist ein probates Mittel, um eine Indikation über den mikrobiellen in-situ Abbau zu erhalten und zu überprüfen, inwieweit die Änderung der gegeneinander abgetragenen Parameter ( $\ln C_t/C_0$ ,  $\ln R_t/R_0$ ) durch einen einheitlichen Prozess hervorgerufen wurde. Diese Auswertungsmöglichkeit besteht nicht nur für die Felddaten von Messstellen entlang eines ausgewählten Abstromprofils, sondern auch für alle Messstellen der Schadstofffahne unter der Voraussetzung, dass innerhalb der Schadstofffahne Konzentrations- und Isotopendaten einem einheitlichen Abbauprozess unterliegen. Der aus den Felddaten bestimmte Feldfraktionierungsfaktor  $\alpha_f$  ist jedoch für die Quantifizierung des mikrobiellen Abbaus nicht verwendbar, da er auf einem zu starken Konzentrationsrückgang beruhen kann, der nicht nur den biologischen Abbau charakterisiert.

Unter Anwendung der Rayleigh-Gleichung wurde für den Standort der chemischen Reinigung aus den Konzentrations- und Kohlenstoffisotopendaten ein Feldfraktionierungsfaktor  $\alpha_f = 1,0017$  bestimmt (Vieth et al., 2003c). Der aus der Steigung der linearen Regression zu berechnende Fraktionierungsfaktor zeigt für die Daten der Feldstudie eine Intensität der Isotopenfraktionierung an, die um den Faktor 3 kleiner ist als die Isotopenfraktionierung, die in einem Laborversuch mit einer PCE-dechlorierenden Mischkultur bestimmt wurde (Lollar et al., 2001). Dies verdeutlicht, dass auch im oberen Grundwasserleiter z. B. Verdünnungsprozesse die Schadstoffkonzentration beeinflussen.

An einem weiteren Industriestandort, wo TCE-Konzentrationen bis zu  $180 \text{ mg l}^{-1}$  in einem aeroben Grundwasserleiter bestimmt wurden, konnte aus den Chlorisotopenverhältnissen und den Konzentrationen des TCE ein Feldfraktionierungsfaktor  $\alpha_f = 1,00053$  bestimmt werden (Sturchio et al., 1998). Ein direkter Vergleich mit Chlorisotopenfraktionierungsfaktoren für den aeroben Abbau des TCE - und damit eine Aussage, ob andere konzentrationsmindernde Prozesse am Standort relevant sind - ist nicht möglich, da keine entsprechenden Laborfraktionierungsfaktoren bekannt sind. Der mikrobielle in-situ Abbau der chlorierten Ethene wurde durch die Berechnung des prozentualen biologischen Abbaus für TCE (Lollar et al., 2001) und PCE bewertet (Vieth et al., 2003c). Mit der Festlegung einer repräsentativen Ausgangskonzentration ( $C_0$ ) konnten theoretische Konzentrationen von PCE entlang eines Abstromprofils berechnet werden (Vieth et al., 2003c).

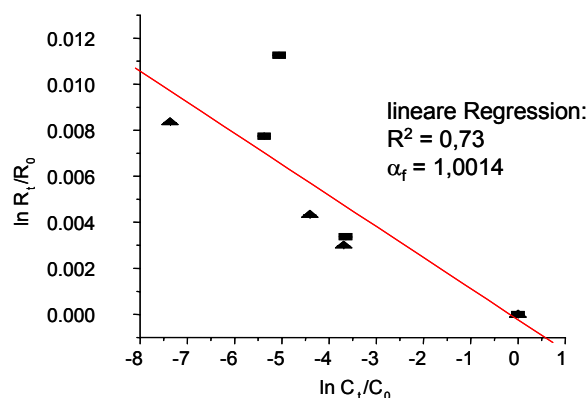


**Abbildung 4-1** Konzentrationen (■ Juli 2001; ● Februar 2002) und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (□ Juli 2001; ○ Februar 2002) für PCE (links) und TCE (rechts) in Grundwasserproben des unteren Grundwasserleiters

In bisherigen Studien PCE- und TCE-kontaminierter Standorte wurden Ergebnisse einer einzelnen Messkampagne betrachtet und damit die räumliche Differenzierung innerhalb der Schadstofffahnen gut charakterisiert. Die zeitliche Variabilität der Isotopendaten wurde dabei jedoch nicht näher untersucht. Zur Beurteilung eines nachhaltigen mikrobiellen Abbaus von Schadstoffen ist es zwingend erforderlich, die Kontamination über einen längeren Beobachtungszeitraum zu untersuchen. Die zeitliche Konstanz der Isotopendaten zeigt eine

kontinuierliche Entwicklung der Schadstofffahne auf, und die Aussagekraft einer Abbauprognose wird erhöht durch die Präzisierung der zeitlichen Entwicklung.

Am Standort der ehemaligen chemischen Reinigung wurden im Februar 2002, also 7 bzw. 9 Monate nach der ersten Monitoringkampagne, die ausgewählten Messstellen erneut beprobt (Anlage B-2). Für den tertiären Grundwasserleiter wurde durch die zweite Beprobung bestätigt, dass PCE und TCE nicht mikrobiell abgebaut werden (Abbildung 4-1). Die Konzentrationen für PCE und TCE im tertiären Aquifer waren in der zweiten Kampagne durchgängig geringer als in der ersten Beprobung, doch zeigten sich in den Isotopensignaturen keine Änderungen, die auf mikrobiellen Abbau als Ursache des Konzentrationsrückganges schließen lassen. An den beiden ersten Messstellen des ausgewählten Profils gehören die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des TCE einer Grundgesamtheit an ( $P > 0,05$ ), an den anderen Messstellen unterscheiden sich die Werte signifikant. Für PCE entstammen nur die Isotopenwerte, die im Grundwasser der letzten Profil-Messstelle in den beiden Kampagnen bestimmt wurden, einer Grundgesamtheit. Analog zu der Auswertung der ersten Kampagne (Vieth et al., 2003c) wurden die Konzentrationen und Isotopenverhältnisse für PCE im Grundwasser des quartären Aquifers aus beiden Beprobungen gemäß der Rayleigh-Gleichung als  $\ln R_t/R_0$  über  $\ln C_t/C_0$  dargestellt (Abbildung 4-2). Für diese Auswertung wurden für beide Kampagnen jeweils die höchste Konzentration und der leichteste  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert als  $C_0$  bzw.  $R_0$  festgelegt. Die höchste Konzentration und der leichteste  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert repräsentieren den am wenigsten durch mikrobiellen Abbau beeinflussten Teil des Abstromprofils. Das Bestimmtheitsmaß der resultierenden linearen Regression verdeutlicht den Zusammenhang zwischen dem Konzentrationsgradienten und der Änderung der Isotopenverhältnisse des PCE. Für beide Kampagnen wurde ein Feldfraktionierungsfaktor  $\alpha_f = 1,0014$  berechnet. In beiden Monitoringkampagnen zeigte sich damit ein einheitlicher mikrobieller Abbau.



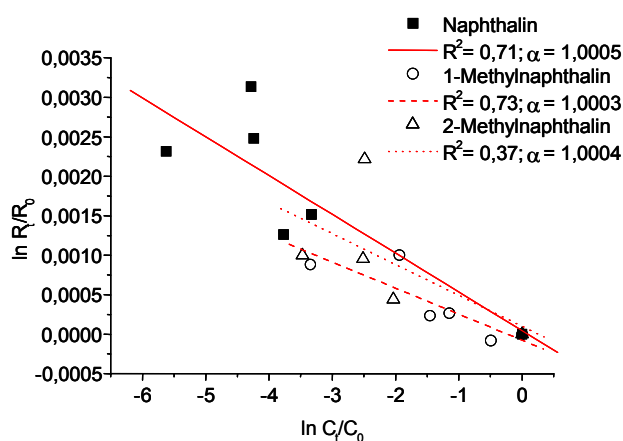
**Abbildung 4-2**

Darstellung der Konzentrationen und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von PCE in Grundwasserproben des oberen Grundwasserleiters im Mai 2001 (■) und Februar 2002 (▲) entsprechend der Rayleigh-Gleichung als  $\ln R_t/R_0$  über  $\ln C_t/C_0$

### 4.3 Grundwasserkontamination mit PAK

Grundwasser an ehemaligen Gaswerksstandorten ist typischerweise mit einer Vielzahl organischer Schadstoffe kontaminiert, v. a. finden sich PAK, BTEX und Phenole (Herfort et al., 1998). Am Standort Testfeld Süd wurden Konzentrationen und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von Naphthalin, 1-Methylnaphthalin und 2-Methylnaphthalin in ausgewählten Messstellen im Abstrom zweier Schadstoffphasen beprobt (Griebler et al., 2003) und die Messergebnisse unter Anwendung der Rayleigh-Gleichung ausgewertet (Abbildung 4-3).

Für 1-Methylnaphthalin zeigte sich eine Korrelation zwischen Konzentrationsrückgang und Anreicherung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte, das Bestimmtheitsmaß der resultierenden Regressionsgerade ist  $R^2 = 0,73$ , und aus den Felddaten kann ein Feldfraktionierungsfaktor  $\alpha_f = 1,0003$  bestimmt werden. Da es für das 1-Methylnaphthalin zurzeit keinen Laborfraktionierungsfaktor gibt, ist eine weitere Abschätzung des mikrobiellen Abbaus dieser Substanz anhand der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte nicht möglich. Fraktionierungsfaktoren sind vorhanden, die den mikrobiellen anaeroben Abbau von Naphthalin und 2-Methylnaphthalin durch eine Anreicherungskultur vom Testfeld Süd beschreiben (Griebler et al., 2003). Für das 2-Methylnaphthalin zeigte sich aus den Felddaten entlang des ausgewählten Abstromprofils jedoch keine Korrelation zwischen der Konzentrationsänderung und den gemessenen  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten (Abbildung 4-3). Entlang des Profils könnte aus der Änderung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte auf einen mikrobiellen Abbau des 2-Methylnaphthalins geschlossen werden, der sich jedoch nicht in den Konzentrationsdaten widerspiegelt. Die Konzentrationen für 2-Methylnaphthalin liegen, mit Ausnahme der Ausgangsmessstelle des Abstromprofils (B14;  $48 \mu\text{g l}^{-1}$ ), relativ einheitlich zwischen  $2$  und  $6 \mu\text{g l}^{-1}$  (Griebler et al., 2003).

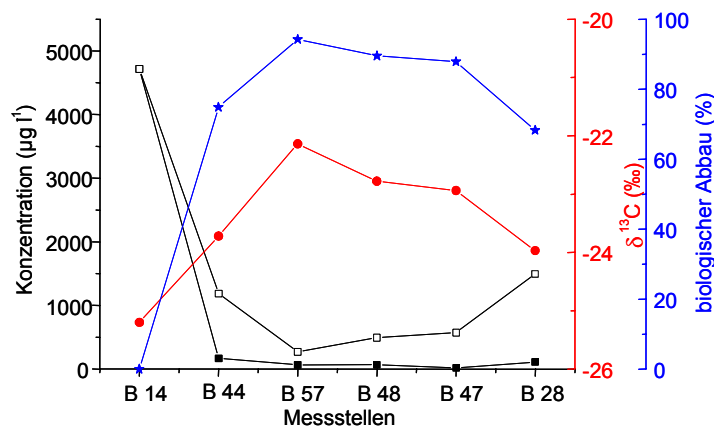


**Abbildung 4-3**

Konzentrationen und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für Naphthalin (■), 1-Methylnaphthalin (○) und 2-Methylnaphthalin (△) in Grundwasserproben entlang eines Abstromprofils, dargestellt als  $\ln R_t/R_0$  über  $\ln C_t/C_0$  (Daten aus Griebler et al., 2003)

Die Darstellung der Naphthalin-Daten entsprechend der Rayleigh-Gleichung resultiert in einem

Bestimmtheitsmaß der linearen Regression von  $R^2 = 0,71$  und einem Feldfraktionierungsfaktor  $\alpha_f = 1,0005$ . Dieser Faktor liegt geringfügig unterhalb des Laborfraktionierungsfaktors von  $\alpha = 1,0011$  (Griebler et al., 2003). Mit diesem Laborfaktor konnte der prozentuale biologische Abbau berechnet werden und weiterhin mit der Festlegung eines  $C_0$  der mikrobielle Abbau des Naphthalins quantifiziert werden (Abbildung 4-4) (Griebler et al., 2003).



**Abbildung 4-4** Konzentrationen (■) und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (●) für Naphthalin entlang des Abstromprofils Testfeld Süd; mit Hilfe der Rayleigh-Gleichung wurden der prozentuale biologische Abbau (★) und theoretische Konzentrationen (□) bestimmt (Daten aus Griebler et al., 2003)

Für die untersuchten Vertreter der PAK zeigte sich, dass einerseits aufgrund des kleinen Isotopeneffekts, mit dem der mikrobielle Abbau dieser Substanzen verbunden ist, und andererseits auch durch die am Standort gemessenen niedrigen Konzentrationen, die nur geringfügig oberhalb der Nachweisgrenze der IRM-GC/MS liegen, die Methode zur Beschreibung des mikrobiellen in-situ Abbaus anhand der Isotopensignaturen auf ihre Grenzen trifft.

Um bei geringen Fraktionierungsfaktoren eine signifikante Anreicherung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zu erhalten, muss ein hoher Anteil des Schadstoffs bereits verwertet worden sein. Beispielsweise deutet eine Anreicherung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte um 1 ‰, was der zweifachen Standardabweichung der Analysenmethode entspricht, bei einem Fraktionierungsfaktor von 1,0010 bereits auf einen prozentualen Abbau von 64 % hin. Je kleiner die Fraktionierungsfaktoren sind, desto größer ist der berechnete prozentuale Abbau bei einer Änderung des  $\delta^{13}\text{C}$ -Werts um 1 ‰. Da die Kohlenstoffisotopenfraktionierungsfaktoren auch in Abhängigkeit von der Anzahl der C-Atome des Schadstoffs mit zunehmender Größe des Moleküls kleiner werden (s. Kapitel 3.2) zeigt sich auch hier für das Naphthalin und die Methylnaphthaline eine Limitierung in der Anwendung der Isotopensignaturen zur Beschreibung des mikrobiellen in-situ Abbaus.

Bei den geringen Konzentrationen, die am Standort gemessen wurden, ist hier möglicherweise die Nachweisgrenze der IRM-GC/MS-Methode erreicht. Zusätzlich kann bei geringen Konzentrationen die Bestimmung des Isotopenverhältnisses mit einer größeren

Standardabweichung der Parallelmessungen verbunden sein als bei hohen Konzentrationen.

#### 4.4 Kontaminationen mit BTEX

Neben dem Nachweis der Isotopenfraktionierung durch mikrobiellen Abbau der BTEX in Laborversuchen (Lollar et al., 1999; Stehmeier et al., 1999; Meckenstock et al., 1999; Ahad et al., 2000; Ward et al., 2000; Hunkeler et al., 2001a; Mancini et al., 2003), wurde durch Untersuchungen an kontaminierten Feldstandorten der Nachweis des mikrobiellen BTEX-Abbaus anhand der Änderung der Isotopenverhältnisse erbracht (Mancini et al., 2002; Richnow et al., 2003b; Richnow et al., 2003a). Für den biologischen Abbau der BTEX wurden geringere Fraktionierungsfaktoren bestimmt als z. B. für die reduktive Dechlorierung der chlorierten Ethene. Dies hat zur Folge, dass ein größerer Umsatz notwendig ist, bis der biologische Abbau aus der Änderung der Kohlenstoffisotopenverhältnisse definitiv bestimmt werden kann. Im direkten Vergleich ergibt eine Anreicherung des  $\delta^{13}\text{C}$ -Wertes um 1 ‰, was der zweifachen Standardabweichung der Analysenmethode entspricht, einen prozentualen biologischen Abbau für Toluol ( $\alpha = 1,0017$ ; Meckenstock et al., 1999) von rund 45 %, wohingegen diese Anreicherung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für PCE ( $\alpha = 1,0055$ ; Lollar et al., 2001) einen prozentualen biologischen Abbau von 17 % anzeigen würde.

Für Benzol, das unter anaeroben Bedingungen als schwer abbaubare BTEX-Komponente gilt, konnte in einigen Feldstudien der mikrobielle Abbau anhand der Isotopensignaturen nachgewiesen werden (Meckenstock et al., 2002; Mancini et al., 2002; Griebler et al., 2003). Mit den Fraktionierungsfaktoren für den anaeroben (nitratreduzierend, sulfatreduzierend, methanogen) Abbau von Benzol (Mancini et al., 2003) ist die weitere qualitative und quantitative Auswertung der Isotopendaten hinsichtlich einer Abschätzung des natürlichen Rückhalts im Grundwasserleiter möglich. Mancini und Kollegen konnten für ihr Untersuchungsgebiet, einen ehemaligen Industriestandort, der mit bis zu 243 mg l<sup>-1</sup> Benzol und 56 mg l<sup>-1</sup> Ethylbenzol kontaminiert ist, anhand der Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopendaten auf den prozentualen biologischen Abbau des Benzols schließen (Mancini et al., 2002). Mit dieser Arbeit sollte die grundsätzliche Übereinstimmung der Ergebnisse für Wasserstoff- und Kohlenstoffisotope nachgewiesen werden, was jedoch nicht überzeugend gelang. Der direkte Vergleich des prozentualen Abbaus, der aus den gemessenen Kohlenstoff- bzw. Wasserstoffisotopenverhältnissen und den entsprechenden Fraktionierungsfaktoren berechnet wurde, zeigte keine gute Übereinstimmung der Ergebnisse.

Am Standort Zeitz, der sich durch eine massive Benzolkontamination auszeichnet – Toluol, Ethylbenzol und Xylole machen nur ca. 10 % der Gesamtkontamination aus – wurde für das



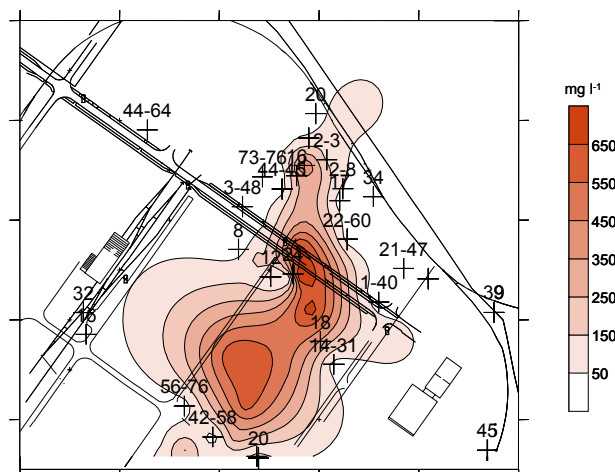
Zentrum der Schadstofffahne mit Konzentrationen von bis zu  $850 \text{ mg l}^{-1}$  in mehreren Beprobungskampagnen eine vergleichsweise homogene Verteilung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Benzols festgestellt (Vieth et al., 2001; Vieth et al., 2002; Vieth et al., 2003a; Vieth et al., 2003b). Die Bereiche der Benzolfahne mit hohen Konzentrationen ( $> 30 \text{ mg l}^{-1}$ ) wiesen in den drei Monitoringkampagnen sehr einheitliche Isotopendaten auf. Der Vergleich der drei Kampagnen zeigt eine geringfügige Änderung der Isotopensignaturen des Benzols von Werten um  $-30 \text{ ‰}$  (November 2000, Vieth et al., 2001) zu Werten um  $-29 \text{ ‰}$  (Mai 2001, Vieth et al., 2002) bzw. Werten um  $-28 \text{ ‰}$  (Mai 2002, Vieth et al., 2003b). Erste Ergebnisse einer vierten Monitoringkampagne (Dezember 2002) zeigen für diesen hochkontaminierten Bereich der Benzolfahne relativ einheitliche  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte um  $-28,5 \text{ ‰}$  (Anlage B-3). Da diese Abweichungen in den  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten des Benzols auch in Proben zentraler, hochkontaminierter Messstellen auftreten, und der zeitliche Trend zwischen den verschiedenen Kampagnen sich nicht stetig zu schwereren Isotopenwerten entwickelt, können möglicherweise jahreszeitliche Schwankungen des Grundwasserspiegels zur Lösung verschiedener Benzolphasen und –blobs führen und somit die Unterschiede in den Isotopenverhältnissen bedingen. Daher wurden quantitative Aussagen zum mikrobiellen Abbau der BTEX für jede Kampagne separat getroffen und erst die Resultate der verschiedenen Kampagnen miteinander verglichen. Die Bestimmung eines einheitlichen, zeitlich unabhängigen  $C_0$  bzw.  $R_0$  für diesen heterogenen Standort scheint nicht möglich.

In den Randbereichen bei Benzolkonzentrationen kleiner  $30 \text{ mg l}^{-1}$  (Vieth et al., 2003b) bzw. kleiner  $10 \text{ mg l}^{-1}$  (Vieth et al., 2001) wurde eine Anreicherung der Isotopensignaturen nachgewiesen, die auf biologischen Abbau des Benzols hinweist. Es zeigt sich, dass extrem hohe Gehalte an Benzol, wie sie am Standort Zeitz gemessen wurden, von den Mikroorganismen nicht verwertet werden können. Bestätigt wird diese These durch verschiedene Laborversuche, in denen maximale Konzentrationen von  $58 \text{ mg l}^{-1}$  Benzol zugegeben wurden (Mancini et al., 2003; Phelps et al., 1996; Coates et al., 2001; Edwards und Grbic-Galic, 1992; Lovley et al., 1995). Somit zeigt sich, dass für die Beurteilung von Konzentrationsgradienten der relevanten Schadstoffe in Feldstudien auch deren möglichen toxischen Wirkungen berücksichtigt werden müssen. Bei Schadstoffkonzentrationen oberhalb definierter toxischer Grenzwerte kann ein im Feld nachgewiesener Konzentrationsgradient nicht zweifelsfrei auf mikrobiellen Abbau hindeuten.

Für den Standort Zeitz zeigt sich weiterhin, dass der Transport des Benzols im Grundwasser keinen Effekt auf das Isotopenverhältnis ausübt, denn entlang einer Fließstrecke von rund 200 m ergibt sich keine signifikante Änderung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Benzols (Vieth et al., 2001).

Die Anreicherung der Isotopensignaturen des Benzols im Randbereich der Schadstofffahne

kann zur Berechnung des prozentualen Abbaus genutzt werden. In Abhängigkeit von dem  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert, der in der jeweiligen Monitoringkampagne als repräsentativ für das Zentrum der Benzolfahne ausgewählt wurde, sowie dem Isotopenfraktionierungsfaktor wurde der prozentuale biologische Abbau bestimmt. Zur Bestimmung dieses  $R_0$  wurden für jede Kampagne die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der hochkontaminierten Messstellen zusammengefasst und der oberste Grenzwert dieses Wertebereichs als  $R_0$  gesetzt. In dieser konservativen Abschätzung, mit Auswahl eines möglicherweise bereits durch mikrobiellen Abbau geringfügig angereicherten  $\delta^{13}\text{C}$ -Werts als  $R_0$  (Lollar et al., 2001), ergibt sich für Mai 2002 ein mikrobieller Abbau des Benzols bis zu 70 % (Vieth et al., 2003b). Vergleichbare Ergebnisse lieferte die Auswertung der Benzolisotopensignaturen von November 2000, Mai 2001 und Dezember 2002 (Abbildung 4-5). Die Wertebereiche, die in Abbildung 4-5 angegeben sind, kennzeichnen die Spannweite des prozentualen biologischen Abbaus, der über einen Beobachtungszeitraum von mehr als zwei Jahren aus den  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten des Benzols für einzelne Messstellen berechnet werden konnte.

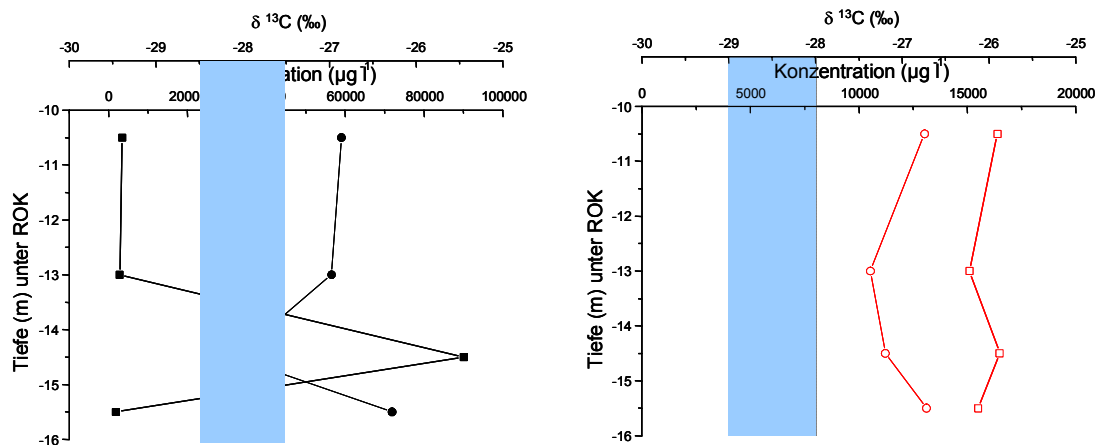


**Abbildung 4-5** Konzentrationen von Benzol (Mai 2002) und prozentualer biologischer Abbau des Benzols als Zusammenfassung der Ergebnisse von November 2000, Mai 2001, Mai 2002 und Dezember 2002 (nach Vieth et al., 2001; Vieth et al., 2003b; Anlage B-3)

Neben der integrierten Grundwasserprobenahme, bei der zusammenfassend für die gesamte Filterstrecke innerhalb der ausgebauten Messstelle eine Probe gewonnen wird, werden verstärkt auch tiefenorientiert Grundwasserproben gewonnen, um vertikale Gradienten innerhalb der Schadstofffahne differenzierter betrachten zu können (Lerner und Teutsch, 1995). Am Standort Zeitz waren einige Messstellen mit Multilevel-Packer-Systemen ausgebaut und ermöglichten eine tiefenorientierte Grundwasserprobenahme in der Monitoringkampagne Mai 2002. In zwei Messstellen, die sich im Zentrum der Benzolfahne befinden, konnte innerhalb der beprobten Tiefenintervalle, bei annähernd gleichen Konzentrationen, keine Änderung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Benzols festgestellt werden (Vieth et al., 2003b). Für diese und für weitere, im Bereich des Zentrums der Benzolfahne befindliche Messstellen wurde in einer späteren

Monitoringkampagne (Dezember 2002) diese Situation bestätigt (Anlage B-3). In diesen zentralen Messstellen, mit einem Konzentrationsbereich von 50 bis 1160 mg l<sup>-1</sup> Benzol in den beprobten Tiefen, wurden  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Benzols im Bereich zwischen -28,0 und -29,0 ‰ bestimmt. Diese Isotopenverhältnisse stimmen mit den Werten überein, die in integriert genommenen Proben zentraler Messstellen für Benzol gemessen wurden. Durch die tiefenorientierte Beprobung zentraler Messstellen innerhalb der Benzolfahne wird die relative Homogenität der Fahne hinsichtlich der Isotopenverhältnisse deutlich. Horizontal und vertikal ausgeprägte Konzentrationsgradienten scheinen in diesem Fahnenbereich nicht durch mikrobiellen Abbau des Benzols verursacht worden zu sein.

In der Messstelle SafZz 6/99, die sich im östlichen Randbereich der Benzolfahne befindet, konnte im Mai 2002 anhand der Konzentrationsangaben der verschiedenen Tiefenintervalle eine vertikale Struktur beschrieben werden, die sich ebenfalls in den Isotopenwerten des Benzols widerspiegelt (Abbildung 4-6) (Vieth et al., 2003b).



**Abbildung 4-6** Konzentrationen (■ Mai 2002; □ Dezember 2002) und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (● Mai 2002; ○ Dezember 2002) für Benzol in tiefenorientiert genommenen Grundwasserproben der Messstelle SafZz 6/99 im Mai 2002 (links) und Dezember 2002 (rechts); der Balken kennzeichnet die Isotopensignatur der zentralen Fahne (aus Vieth et al., 2003b und Anlage B-3)

Der Zusammenhang zwischen Konzentrationen und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten konnte gut mit der Rayleigh-Gleichung beschrieben werden, das Bestimmtheitsmaß der linearen Regression von  $\ln R_t/R_0$  über  $\ln C_t/C_0$  betrug 0,92 (Vieth et al., 2003b). Die vertikale Differenzierung, der starke Konzentrationsrückgang im oberen und unteren Randbereich verbunden mit einer höheren Benzolkonzentration in der Fahnenmitte, wie sie im Tiefenprofil der Messstelle SafZz 6/99 beobachtet wurde, kann auf biologischen Abbau des Benzols zurückgeführt werden. Dieser vertikale Gradient zeigte sich in der darauf folgenden Beprobung nicht mehr, denn im Dezember 2002 wurden in den vier verschiedenen Tiefen vergleichsweise einheitliche Benzolkonzentrationen zwischen 15,1 und 16,5 mg l<sup>-1</sup> bestimmt, die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Benzols

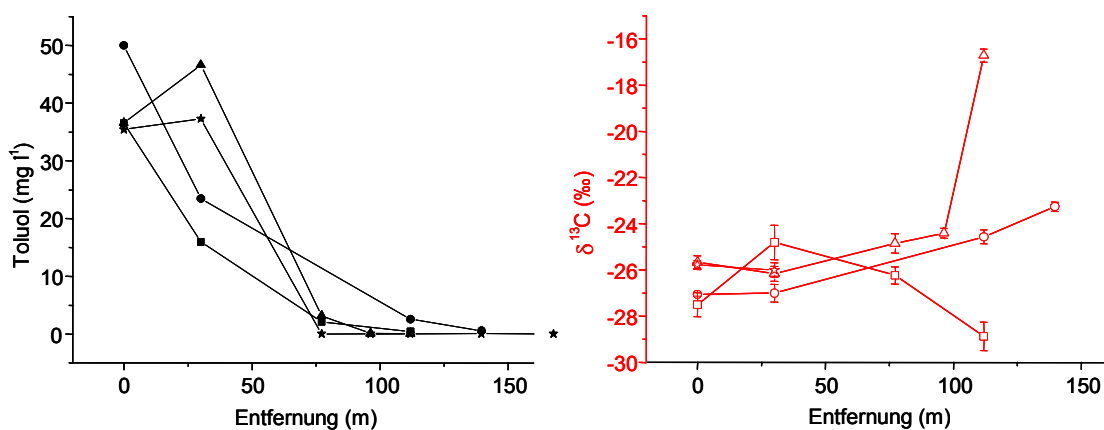
lagen einheitlich um  $-27,0 \text{ ‰}$  ( $-26,7$  bis  $-27,2 \text{ ‰}$ ) (Abbildung 4-6). Es zeigt sich, dass die vertikale Struktur in den Fahnenrandbereichen nicht zeitlich konstant ausgeprägt sein muss und es sich um dynamische Entwicklungen handelt, die von einer Vielzahl möglicher Einflussfaktoren bestimmt werden, wie z. B. dem hydrologischen Fließregime am Standort.

Durch die tiefenorientierte Beprobung war es möglich, vertikale Konzentrations- und Abbaugradienten innerhalb der Schadstofffahne aufzuzeigen. Andererseits waren die Grundwasserproben dieser Messstellen nicht mehr direkt vergleichbar mit den über den gesamten Filterbereich integrierend genommenen Grundwasserproben früherer Kampagnen. Die Isotopensignatur in einer Mischprobe wird hauptsächlich durch den Grundwasseranteil mit der höchsten Konzentration (und dem geringsten Abbaugrad) bestimmt, wohingegen tiefenorientiert genommene Proben nur die Isotopensignatur der entsprechenden Grundwasserschicht widerspiegeln. Zusätzlich werden in der integrierten Probe größere Bereiche des Aquifers und auch Grundwasser außerhalb der Schadstofffahne erfasst, was zu einer starken Verdünnung der Schadstoffkonzentration innerhalb der Probe führen kann. Somit kann die integriert genommene Probe durch zu geringe Konzentrationen und relativ zu leichte Isotopenverhältnisse des Schadstoffs gekennzeichnet sein. Wenn tiefenorientiert Proben genommen werden, erfolgt dies mit einer sehr geringen Förderleistung, und somit wird nur ein geringmächtiger Teilbereich des Grundwasserleiters angesprochen. Die Verdünnungseffekte durch einen Grundwasserzustrom aus nicht kontaminierten Bereichen des Aquifers sind in der tiefenorientierten Beprobung wesentlich geringer.

Der mikrobielle Abbau von Toluol, Ethylbenzol und den Xylenen wurde in verschiedenen Feldstudien anhand der Änderung der Isotopensignaturen nachgewiesen (Mancini et al., 2002; Meckenstock et al., 2002; Richnow et al., 2002; Richnow et al., 2003b; Richnow et al., 2003a). Wenn in den Felduntersuchungen eine Anreicherung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für den jeweiligen Schadstoff bestimmt wurde und ein Isotopenfraktionierungsfaktor vorliegt, kann eine weitere Auswertung erfolgen. Unter der Annahme einer isotopisch homogenen Quelle, die die Festlegung eines initialen Isotopenverhältnisses ( $R_0$ ) erlaubt, kann der prozentuale biologische Abbau berechnet werden. Für die Messstellen innerhalb der ausgewählten Abstromprofile konnten theoretische Konzentrationen errechnet werden mit der zusätzlichen Annahme, dass die Konzentration in der Quelle bzw. am Beginn des Abstromprofils die Ausgangskonzentration ( $C_0$ ) darstellt (Meckenstock et al., 2002; Vieth et al., 2001; Richnow et al., 2003b; Richnow et al., 2003a; Richnow et al., 2002).

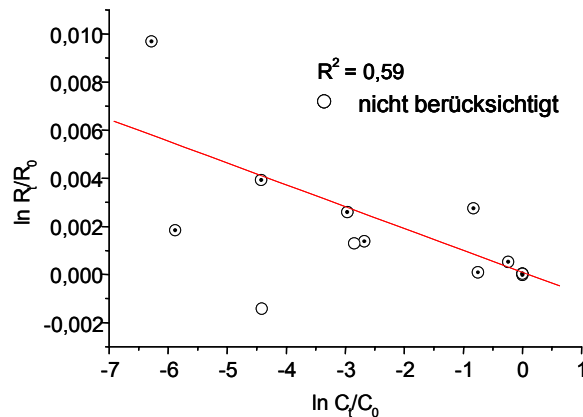
Toluol gilt als sehr gut anaerob mikrobiell abbaubar, was durch die zahlreichen Feldstudien, in denen der Abbau des Toluols anhand der Isotopensignaturen beschrieben wurde, bestätigt wird

(Richnow et al., 2002). Im Gegensatz zu einer stationären Fahne, in der über einen längeren Beobachtungszeitraum vergleichbare Konzentrationen und Isotopenverhältnisse des jeweiligen Schadstoffs zu beobachten sind, zeichnet sich eine schrumpfende Schadstofffahne durch den Rückgang der Schadstoffkonzentration in abstromigen Messstellen über den Beobachtungszeitraum aus. Dieser Konzentrationsrückgang sollte sich in einer Anreicherung der korrespondierenden  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte widerspiegeln. Beide Kriterien werden am Standort Zeit für Toluol erfüllt. Es zeigte sich im Verlauf der verschiedenen Monitoringkampagnen ein Rückgang der Toluolkonzentrationen in den weiter abstromigen Messstellen (Abbildung 4-7). Der Rückgang der Toluolkonzentration ist verbunden mit einer Anreicherung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Toluols innerhalb dieser abstromigen Messstellen im zeitlichen Vergleich über den zweijährigen Beobachtungszeitraum (Abbildung 4-7). Somit wird aus den Isotopenverhältnissen des Toluols das anhand der Konzentrationen bereits vermutete Schrumpfen der Toluolfahne bestätigt.



**Abbildung 4-7** Konzentrationen (links) und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (rechts) für Toluol entlang des Abstromprofils in den vier Monitoringkampagnen ( $\square$  November 2000;  $\circ$  Mai 2001;  $\Delta$  Mai 2002;  $\star$  Dezember 2002)

Zum Nachweis, dass der Konzentrationsrückgang entlang des Abstromprofils durch biologischen Abbau des Toluols bedingt sein kann, wurden die Konzentrationen und die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für Toluol entsprechend der Rayleigh-Gleichung gegeneinander aufgetragen (Abbildung 4-8). Unter Berücksichtigung aller Messstellen des ausgewählten Abstromprofils und der Ergebnisse von vier Monitoringkampagnen ergibt sich für die lineare Regressionsgerade von  $\ln R_t/R_0$  über  $\ln C_t/C_0$  ein Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,35$ . Wenn die durch die späteren Kampagnen nicht bestätigten  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Toluols an den Messstellen SafZz 8/99 sowie SafZz 18/00 vom November 2000 nicht berücksichtigt werden (Abbildung 4-8), erhöht sich das Bestimmtheitsmaß auf  $R^2 = 0,59$ . Der Feldfraktionierungsfaktor ( $\alpha_f$ ), der nun für Toluol bestimmt werden kann, liegt bei  $\alpha_f = 1,0009$ .



**Abbildung 4-8** Konzentrationen und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für Toluol (alle Kampagnen) entsprechend der Rayleigh-Gleichung dargestellt als  $\ln R/R_0$  über  $\ln C_t/C_0$

Für eine Quantifizierung des biologischen Abbaus müssen verlässliche Konzentrationsangaben vorhanden sein. Da Schadstoffkonzentrationen in einem Grundwasserleiter nicht ausschließlich durch den biologischen Abbau, sondern wesentlich auch durch physikalisch-chemische Prozesse wie Verdünnung und Sorption geprägt sind, ist die direkte Anwendung der im Feld gemessenen Konzentrationen zur Quantifizierung des mikrobiellen in-situ Abbaus problematisch. Zur Korrektur der Konzentrationsangaben kann ein konservativer Tracer herangezogen werden, der sich in seinen physikalisch-chemischen Eigenschaften nur unwesentlich von dem betreffenden Schadstoff unterscheidet, im Gegensatz zu diesem aber keinem biologischen Abbau unterliegt (Wiedemeier et al., 1996). Somit kann aus der Änderung der Konzentration des konservativen Tracers der Effekt von Sorption und Verdünnung abgeschätzt werden und die Konzentration des Schadstoffs hinsichtlich dieser Prozesse bereinigt werden. Für die Korrektur der Konzentrationsangaben unter Verwendung eines konservativen Tracers kann die folgende Gleichung angewendet werden (Wiedemeier et al., 1996), wobei  $C_b$  der gemessenen Konzentration am Punkt B und  $T_a$  bzw.  $T_b$  den Konzentrationen des Tracers an den Punkten A bzw. B entsprechen.

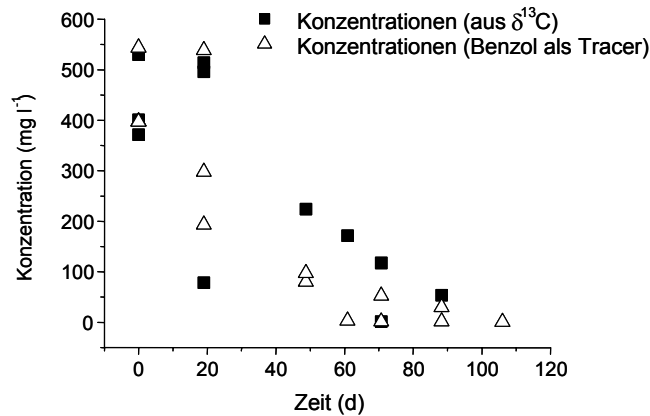
**Gleichung 4-4** 
$$C_{b,korr} = C_b \cdot \frac{T_a}{T_b}$$

Für den Standort Zeitz wurden in der ersten Monitoringkampagne verschiedene mögliche konservative Tracer (Alkylbenzole, Naphthalin, Chlorbenzole, Brombenzole, Chlortoluole) in den Grundwasserproben analysiert, von denen angenommen wurde, dass sie am Standort nicht abgebaut werden. Die Konzentrationen dieser Tracer lagen in einer Vielzahl der Messstellen unterhalb der Nachweisgrenze und ansonsten nur geringfügig oberhalb der Nachweisgrenze (Wachter, persönl. Mitteilung), so dass ihre Verwendung als konservative Tracer aufgrund der

problematischen Datenlage ausgeschlossen wurde. Für die Abschätzung des mikrobiellen Abbaus des Toluols können hingegen die Konzentrationen des Benzols als konservativer Tracer herangezogen werden, unter der Annahme, dass Benzol in den Bereichen des Grundwasserleiters, in denen Toluol nachgewiesen wird, nur in sehr geringem Umfang mikrobiell verwertet wird. Eine weitere Möglichkeit Konzentrationsangaben zu erhalten, die hinsichtlich Verdünnung und Sorption korrigiert wurden, ist die Bestimmung theoretischer Konzentrationen auf der Basis der schadstoffspezifischen Isotopenverhältnisse und dem substanzspezifischen Fraktionierungsfaktor unter Anwendung der Rayleigh-Gleichung (Vieth et al., 2003b).

Für das ausgewählte Abstromprofil wurden diese beiden Herangehensweisen zur Quantifizierung des mikrobiellen Toluolabbaus getestet. Unter der Annahme einer Abstandsgeschwindigkeit von  $1,9 \text{ m d}^{-1}$  (Gödeke, persönliche Mitteilung) sowie einem Retardationsfaktor des Toluols von 1,2 (Devlin et al., 2002) wurden für Toluol Konzentrationen entlang dieses Profils berechnet. Als Ausgangskonzentration wurde in beiden Verfahren die Konzentration der Messstelle SafZz 9/00 verwendet. Die Reaktionskonstante des Toluolabbaus sollte integrierend für drei Monitoringkampagnen (November 2000, Mai 2001 und Mai 2002) berechnet werden. Die Daten der Kampagne vom Dezember 2002 wurden nicht in dieser Berechnung berücksichtigt, da hier lediglich in den Messstellen SafZz 9/00 und SafZz 2/99 Toluol in ausreichenden Konzentrationen nachweisbar war, um  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte bestimmen zu können. Der Konzentrationsgradient kann für diese Kampagne nicht mit Isotopendaten abgesichert werden.

Unter der Annahme des mikrobiellen Abbaus als Reaktion nullter Ordnung wurden die korrigierten Konzentrationen gegen die Verweilzeit des Toluols aufgetragen (Abbildung 4-9). Aus den Regressionsgeraden ergab sich eine Abbaukonstante  $k = 4,8 \text{ } \mu\text{M d}^{-1}$  (Isotopenmethode) bzw.  $k = 5,0 \text{ } \mu\text{M d}^{-1}$  (konservativer Tracer). Die gute Übereinstimmung der beiden, mit unterschiedlichen Herangehensweisen ermittelten Abbaukonstanten zeigt die prinzipielle Eignung der Isotopenmethode zur Abschätzung des mikrobiellen Abbaus in kontaminierten Grundwasserleitern. Die berechneten Konstanten einer Reaktion nullter Ordnung liegen in der gleichen Größenordnung wie Abbaukonstanten ( $\text{RO} = 0$ ), die in anderen Feldstudien für den mikrobiellen Toluolabbau bestimmt wurden (Reinhard et al., 1997; Suarez und Rifai, 1999). Die Reaktionskonstanten, die anhand von Säulenversuchen (Zheng et al., 2002) für den mikrobiellen Abbau von Toluol bestimmt wurden, lagen Größenordnungen höher und würden in der Anwendung auf einen Feldstandort zu unrealistischen Abschätzungen des mikrobiellen Abbaus führen.



**Abbildung 4-9** Abtrag der Toluolkonzentrationen entlang des Monitoringprofils am Standort Zeitz über die Verweilzeit; Konzentrationen berechnet aus  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten (■) bzw. korrigiert um Verdünnung und Sorption anhand der Benzolkonzentrationen ( $\Delta$ )

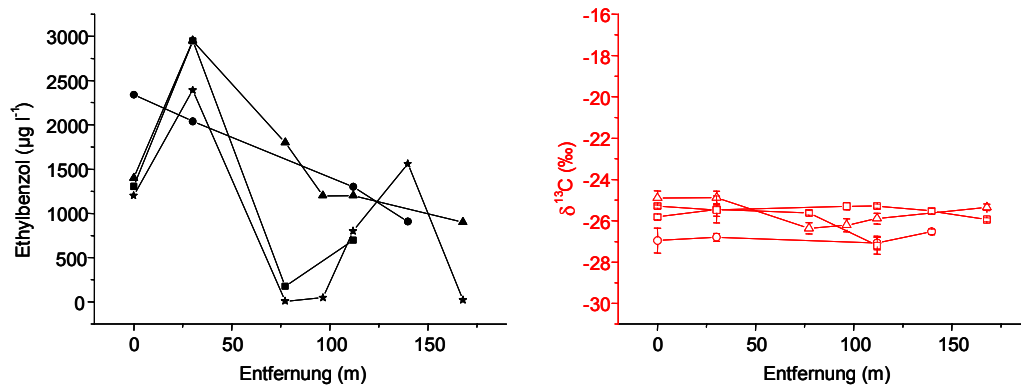
Neben den beiden geschilderten Verfahren zur Korrektur der Schadstoffkonzentrationen im Grundwasser hinsichtlich Verdünnung können gegebenenfalls auch die am Standort gemessenen Chloridkonzentrationen als konservativer Tracer verwendet werden (Richnow et al., 2003b). Chlorid unterliegt ebenso wie der Schadstoff der Verdünnung im Grundwasserleiter, wird jedoch konservativ transportiert, also nicht sorbiert, und ist mikrobiell nicht verwertbar. Voraussetzungen für die Anwendung von Chlorid als konservativem Tracer sind ein konstanter Input des Chlorids im Zentrum der Schadstofffahne und eine homogene Verteilung des Chlorids in nicht kontaminierten Bereichen des Aquifers. Die Chloridgehalte im Zeitzer Grundwasser zeigten keine homogene Verteilung in den Bereichen ohne BTEX-Kontamination, im Bereich der Schadstofffahne spiegeln die Chloridkonzentrationen nicht den Verlauf der Fahne wider. Eine sehr gute Übereinstimmung dieser Korrektur der Konzentrationsangaben anhand der Chloridgehalte sowie der Isotopendaten zeigten Richnow et al. für den Standort der Deponie Vejen (Richnow et al., 2003b). Es wurde ein Fraktionierungsfaktor aus den chlorid-korrigierten Konzentrationsdaten sowie den gemessenen  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten für Ethylbenzol bestimmt ( $\alpha = 1,0021$ ), der dem Fraktionierungsfaktor der Laborversuche entspricht (Richnow et al., 2003b; Griebler et al., 2003) (Kapitel 3-2). Damit wird deutlich, dass die Korrektur der Konzentrationsangaben anhand der Chloridgehalte zu Konzentrationsangaben führt, die den mikrobiellen Abbau nachzeichnen.

Auch für Ethylbenzol und die isomeren Xylole konnte der mikrobielle Abbau anhand der Isotopensignaturen nachgewiesen werden (Mancini et al., 2002; Meckenstock et al., 2002; Griebler et al., 2003; Richnow et al., 2003a; Richnow et al., 2003b).

Am Standort Zeitz zeigen die Isotopensignaturen des Ethylbenzols im Verlauf des Untersuchungszeitraumes kein einheitliches Bild. Während sich entlang des ausgewählten Abstromprofils im November 2000 und im Mai 2001 (Vieth et al., 2002) kein Anzeichen eines

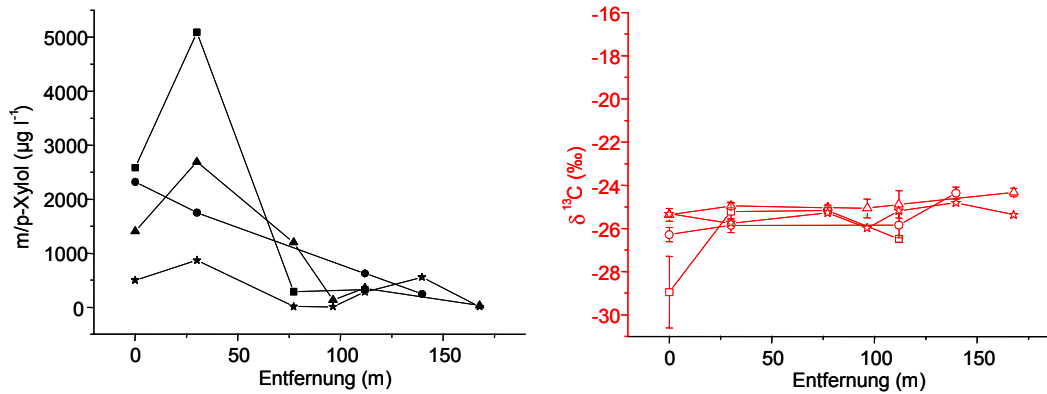


mikrobiellen Abbaus aus den  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten ergab, zeichnete sich ein Jahr später der Beginn des ausgewählten Abstromprofils an den Messstellen SafZz 9/00 und SafZz 2/99 durch angereicherte  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für Ethylbenzol aus, die sich im Verlauf des Abstromprofils jedoch nicht bestätigten (Vieth et al., 2003a) (Abbildung 4-10). Im Dezember 2002 lagen die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Ethylbenzols in den Grundwasserproben dieser ausgewählten Messstellen zwischen -25,3 und -25,9 ‰, was erneut bestätigt, dass Ethylbenzol in diesem Bereich des Abstroms nicht mikrobiell verwertet wird.



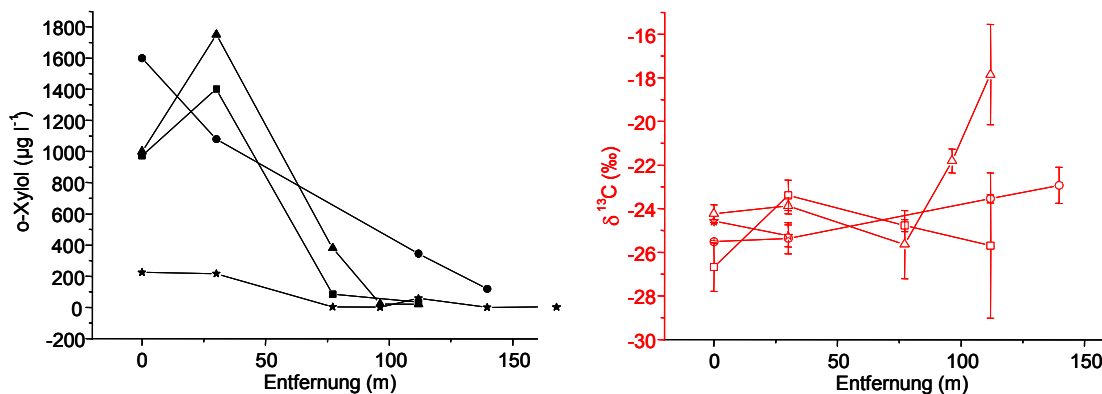
**Abbildung 4-10** Konzentrationen (links) und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (rechts) für Ethylbenzol entlang des Abstromprofils in den vier Monitoringkampagnen ( $\square$  November 2000;  $\circ$  Mai 2001;  $\Delta$  Mai 2002;  $\star$  Dezember 2002)

Die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des m/p-Xylols aus den drei Monitoringkampagnen lagen im Bereich der Standardabweichungen, allerdings mit Ausnahme der Messstelle SafZz 9/00 der ersten Kampagne (November 2000) (Abbildung 4-11). Die gute Übereinstimmung der Isotopendaten war für diese beiden Xylol-Isomere nicht zu erwarten. Aufgrund fehlender chromatographischer Trennung der Substanzen stellt der gemessene  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert einen Durchschnittswert für die beiden Isomere dar. Somit wäre, bei schwankenden Konzentrationsanteilen der beiden Isomere und unterschiedlichen  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten entlang des Abstromprofils, kein relativ einheitlicher durchschnittlicher Isotopenwert zu erwarten gewesen (Vieth et al., 2003a). Für diesen Bereich der Kontamination könnte, ausgehend von der guten Übereinstimmung der Isotopendaten des Xylols, die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die beiden Xylolisomere relativ ähnliche Isotopensignaturen aufweisen, die auch entlang des Abstromprofils keiner Änderung durch mikrobiellen Abbau unterliegen.



**Abbildung 4-11** Konzentrationen (links) und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (rechts) für m/p-Xylol entlang des Abstromprofils in den vier Monitoringkampagnen (□ November 2000; ○ Mai 2001; △ Mai 2002; ★ Dezember 2002)

Aus Laborversuchen wird angenommen, dass o-Xylol das am besten abbaubare Xylolisomer darstellt (Wiedemeier et al., 1999), in einigen Feldstudien wurde dies bestätigt (Griebler et al., 2003; Meckenstock et al., 2002; Richnow et al., 2003a). Aus den Ergebnissen der ersten Monitoringkampagne am Standort Zeitz konnte aufgrund hoher Standardabweichungen der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des o-Xylols keine Aussage über einen möglichen mikrobiellen Abbau des o-Xylols getroffen werden.



**Abbildung 4-12** Konzentrationen (links) und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (rechts) für o-Xylol entlang des Abstromprofils in den vier Monitoringkampagnen (□ November 2000; ○ Mai 2001; △ Mai 2002; ★ Dezember 2002)

In der folgenden Beprobung konnten die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für das o-Xylol exakter bestimmt werden, und es zeigte sich anhand der isotopischen Anreicherung des o-Xylols ein prozentualer Abbau von bis zu 87 % (Vieth et al., 2002). Dies wurde durch die Ergebnisse der dritten Monitoringkampagne bestätigt, bei der einerseits die o-Xylol-Konzentrationen in den weiter im Abstrom gelegenen Messstellen geringer waren (Abbildung 4-12), und andererseits die Änderung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte innerhalb des Abstromprofils auf bis zu 99 % mikrobiellen Abbau

hinwiesen. Im Dezember 2002 konnten entlang des Profils nur sehr geringe o-Xylol-Konzentrationen nachgewiesen werden, die für eine Bestimmung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des o-Xylols nicht ausreichten. Aus der zeitlichen Entwicklung der o-Xylol-Konzentrationen kann auch hier auf eine schrumpfende Schadstofffahne geschlossen werden.

Anhand der Isotopensignaturen und deren Änderung sowohl entlang eines Abstromprofils als auch über einen Zeitraum von 25 Monaten konnten für die BTEX Aussagen bezüglich des mikrobiellen Abbaus am Standort getroffen werden. Für Benzol konnte gezeigt werden, dass es in zentralen Bereichen bei Konzentrationen  $> 30 \text{ mg l}^{-1}$  nicht abgebaut wird, und dass der Konzentrationsrückgang auf andere Prozesse zurückgeführt werden muss. Dies zeigte sich nicht nur in integriert, also über den gesamten Filterbereich gemischt genommenen Grundwasserproben, sondern auch in tiefenorientiert gewonnenen Proben in diesen zentralen Bereichen der Benzolfahne. Eine tiefenabhängige Differenzierung zeigte sich für die Benzolkonzentrationen, die Kohlenstoffisotopensignaturen weisen jedoch auf eine homogene, im Sinne von nicht mikrobiell beeinflusster Benzolfahne hin.

In randlichen Bereichen der Benzolfahne konnte der mikrobielle Abbau in drei Monitoringkampagnen übereinstimmend nachgewiesen werden. Für Benzol konnte weiterhin durch tiefenorientierte Beprobungen in diesen randlichen Fahnenbereichen eine Vertikalstruktur der Schadstofffahne gezeigt und mikrobieller Abbau in den oberen und unteren Randbereichen der Benzolfahne nachgewiesen werden. Diese vertikale Differenzierung innerhalb der Schadstofffahne hätte durch eine integrierend genommene Grundwasserprobe nicht aufgezeigt werden können, da bei der Mischung von unterschiedlich stark belasteten Wässern die Isotopensignatur in der Mischprobe vor allem durch die Teilprobe mit der höchsten Konzentration bestimmt wird.

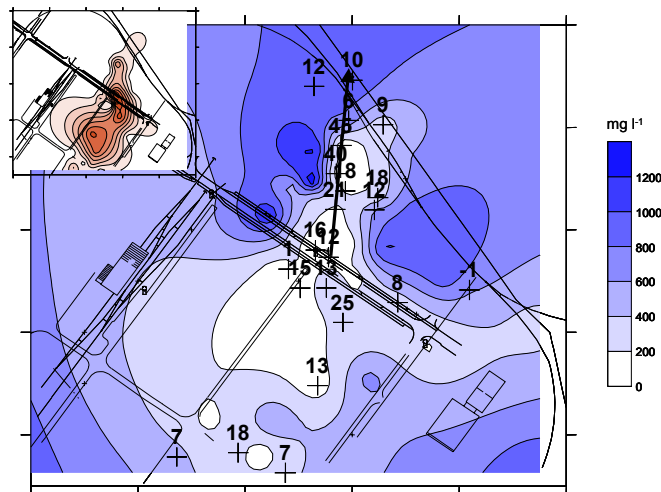
Für Ethylbenzol und m/p-Xylol konnten anhand der Isotopensignaturen keine quantitativen Aussagen über den mikrobiellen Abbaugrad getroffen werden, dies wurde über einen Beobachtungszeitraum von 25 Monaten bestätigt. Toluol und o-Xylol werden nachweislich degradiert, eine Abbaukonstante für Toluol konnte berechnet werden. Bei verschiedenen Herangehensweisen (konservativer Tracer, Isotopenmethode) wurden übereinstimmende Abbauraten für Toluol bestimmt, wodurch die Vergleichbarkeit der Methodiken verdeutlicht und die Bedeutung der neuen Isotopenmethode erhöht wird.

## **5 Beschreibung geochemischer Prozesse im Aquifer durch isotopenchemische Untersuchungen**

In kontaminierten Grundwasserleitern spielt die Sulfatreduktion als elektronenaufnehmender Prozess eine wichtige Rolle. Zur qualitativen Beschreibung der Sulfatreduktion können die  $\delta$

$^{34}\text{S}$ -Werte herangezogen werden, da bei der Sulfatreduktion die Schwefelisotope des Sulfats diskriminiert werden und es zu einer Anreicherung von Molekülen mit dem schweren  $^{34}\text{S}$ -Isotop in der residualen Sulfatfraktion kommt (Clark und Fritz, 1997).

In den nicht kontaminierten Bereichen des Zeitzer Grundwasserleiters lag Sulfat in Konzentrationen über  $1 \text{ g l}^{-1}$  vor, mit  $\delta^{34}\text{S}$ -Werten zwischen  $-1$  und  $7 \text{ ‰}$  (Abbildung 5-1). Im Bereich der BTEX-Kontamination zeigen die stark reduzierten Sulfatkonzentrationen, dass Sulfat als terminaler Elektronenakzeptor für den mikrobiellen Abbau der BTEX genutzt wird. Der Rückgang der Sulfatkonzentrationen korreliert mit einem Anstieg der  $\delta^{34}\text{S}$ -Werte des Sulfats.

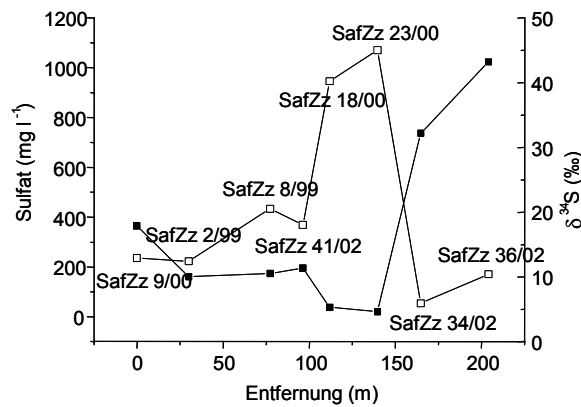


**Abbildung 5-1** Konzentrationen und  $\delta^{34}\text{S}$ -Werte für Sulfat im Grundwasser am Standort Zeit; der Pfeil zeigt die Lage des Abstromprofils (s. Abbildung 5-2). Die Grafik oben links zeigt die Lage der BTEX-Fahne am Standort.

Im Verlauf des in Abbildung 5-2 dargestellten Abstromprofils reicherten sich die  $\delta^{34}\text{S}$ -Werte des Sulfats von  $12,9 \text{ ‰}$  bis  $45,0 \text{ ‰}$  an, wobei der stärkste Anstieg zwischen den Messstellen SafZz 41/02 und SafZz 18/00 beobachtet wurde (Abbildung 5-2). Die Sulfatkonzentrationen nahmen zwischen den Meßstellen SafZz 9/00 und SafZz 18/00 von  $363,3$  auf  $20,2 \text{ mg l}^{-1}$  ab. Unter der Annahme, dass der gemessene Rückgang der Sulfatkonzentration durch dissimilatorische Sulfatreduktion verursacht wurde und die Änderungen der Konzentrationen und der  $\delta^{34}\text{S}$ -Werte mit der Rayleigh-Gleichung beschrieben werden können, kann für diesen Teil des Profils, innerhalb der BTEX-Fahne ein Feldfraktionierungsfaktor  $\alpha_f = 1,012$  für die Sulfatreduktion bestimmt werden ( $R^2 = 0,93$ ). Da die verwendeten Felddaten die Rayleigh-Funktion überzeugend erfüllen, kann geschlussfolgert werden, dass der Rückgang der Sulfatkonzentrationen entlang des ausgewählten Profils durch mikrobielle Sulfatreduktion verursacht wird.

Die beschriebene Anreicherung der  $\delta^{34}\text{S}$ -Werte v. a. im Bereich der Messstellen SafZz 41/02 und SafZz 18/00 korreliert hervorragend mit den Ergebnissen zum mikrobiellen Abbau von Toluol, da auch hier die stärkste Anreicherung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Toluols im Bereich dieser

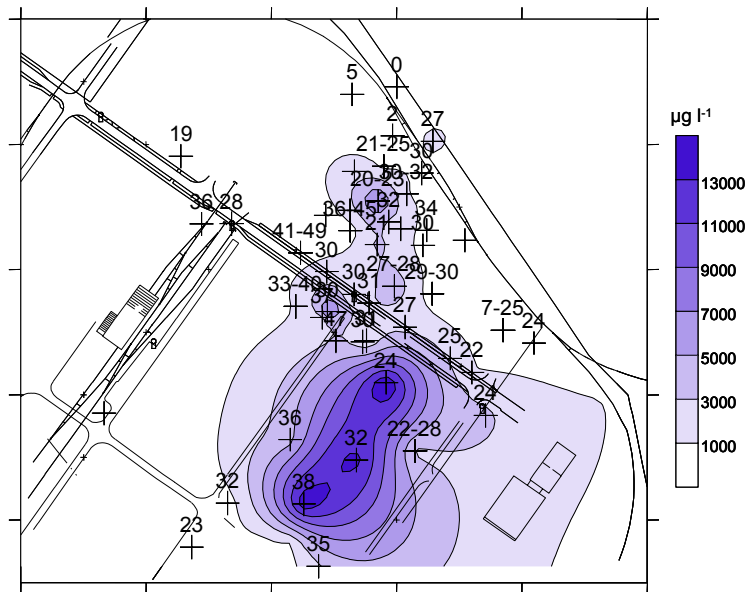
Messstellen gemessen wurde (Vieth et al., 2003a). Dies deutet darauf hin, dass der Toluolabbau an sulfatreduzierende Prozesse gebunden ist. Mikrobielle Umsetzungen, bei denen Sulfat als terminaler Elektronenakzeptor dient, sind zahlreich beschrieben worden (Lovley et al., 1995; Fuchs et al., 1994; Schink et al., 1992; Bolliger et al., 2001).



**Abbildung 5-2** Konzentrationen (■) und  $\delta^{34}\text{S}$ -Werte (□) des Sulfats entlang des Monitoringprofils am Standort Zeit (Mai 2002)

In zwei weiteren Messstellen (SafZz 34/02; SafZz 36/02), die sich in direkter Nachbarschaft zum ausgewählten Abstromprofil befinden, jedoch außerhalb der BTEX-Fahne liegen, konnten Konzentrationen und  $\delta^{34}\text{S}$ -Werte des Sulfats bestimmt werden, die charakteristisch sind für das Grundwasser in nicht kontaminierten Bereichen des Standorts. Die Konzentrationen und  $\delta^{34}\text{S}$ -Werte des Sulfats scheinen in diesem Bereich nicht durch die BTEX-Fahne beeinflusst zu sein. Aus dieser Feldstudie wird deutlich, dass die  $\delta^{34}\text{S}$ -Werte des Sulfats, zusammen mit den Sulfatkonzentrationen, hervorragend eingesetzt werden können, um die Sulfatreduktion im Grundwasser qualitativ zu beschreiben. Es bietet sich die Möglichkeit, mit diesen Aussagen und Abschätzungen die Plausibilität eines prognostizierten mikrobiellen Schadstoffabbaus unter sulfatreduzierenden Bedingungen zu prüfen und die qualitative Bedeutung der Sulfatreduktion aufzuklären.

Als weiterer Indikator für mikrobielle Aktivität in einem kontaminierten Grundwasserleiter gilt der Nachweis von Methan. Am Standort Zeit konnte Methan in Konzentrationen von bis zu 15,3 mg l<sup>-1</sup> (GWM 507/97) bestimmt werden (Abbildung 5-3). Die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für Methan lagen zwischen -69 ‰ und -22 ‰. Die leichteren  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte deuten auf biogenes Methan hin, da im Allgemeinen  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zwischen -110 und -50 ‰ als charakteristisch für Methan biologischen Ursprungs angesehen werden (Whiticar, 1999). Die schweren  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte (-27 bis -24 ‰) können auf anaerobe Methanoxidation hinweisen, da dieser Prozess zu einer Anreicherung in den  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten des Methans führt (Barker und Fritz, 1981a; Grossman et al., 2002).



**Abbildung 5-3** Konzentrationen von Methan und die berechneten Anreicherungs-faktoren ( $\epsilon = \delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} - \delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$ ) im Grundwasser am Standort Zeitz (Mai 2002)

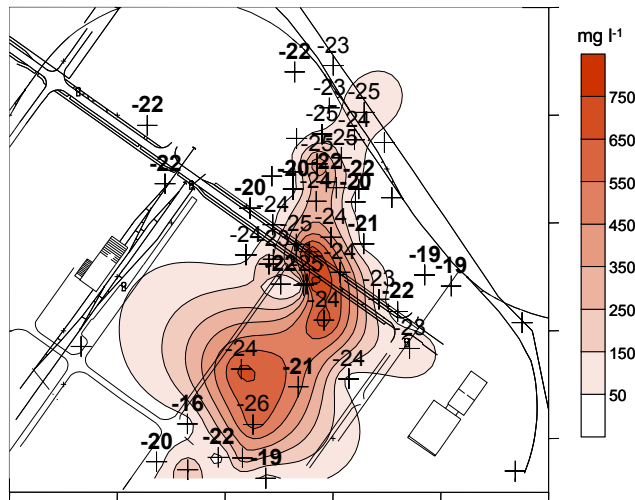
Um Aussagen über mögliche Bildungswege des Methans treffen zu können, ist die Bestimmung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des gelösten anorganischen Kohlenstoffs notwendig. Die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des DIC am Standort Zeitz liegen zwischen  $-25,8$  und  $-15,8$  ‰ (Abbildung 5-4) und sind somit geringfügig leichter als die normalerweise für einen Grundwasserleiter zu erwartenden Kohlenstoffisotopenverhältnisse (Clark und Fritz, 1997). Dies deutet darauf hin, dass der DIC durch den Abbau der isotopisch leichten BTEX geprägt ist. Vor allem in Grundwasserproben aus dem Bereich der BTEX-Fahne finden sich die leichteren  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des DIC, während im Anstrom und in randlichen Bereichen der BTEX-Kontamination  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des DIC zwischen  $-19$  und  $-22$  ‰ dominieren.

Um die methanbildenden Prozesse weiter zu charakterisieren, wurden die Anreicherungs-faktoren zwischen dem DIC, als Repräsentant des Edukts der Methanogenese, und dem Methan nach Gleichung 5-1 berechnet (s. Kapitel 3.4).

**Gleichung 5-1** 
$$\epsilon = \delta^{13}\text{C}_{\text{Edukt}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{Produkt}}$$

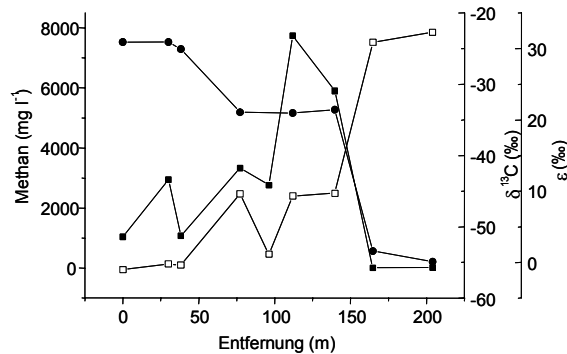
Die Anreicherungs-faktoren liegen im Bereich von  $0,1$  ‰ (SafZz 36/02) und  $48,7$  ‰ (SafZz 14/00) (Abbildung 5-3). Für die Mehrheit der untersuchten Proben ergaben sich Anreicherungs-faktoren zwischen  $20$  und  $40$  ‰, was als Anzeichen für Methanogenese aus Acetatgärung gesehen werden kann (Whiticar, 1999; Waldron et al., 1998). Nur in einigen Messstellen, die sich im westlichen Randbereich der BTEX-Fahne befinden, wurden

Anreicherungsfaktoren bestimmt, die höher als 40 ‰ sind und damit tendenziell den Einfluss der CO<sub>2</sub>-Reduktion auf die Methanbildung widerspiegeln. Sehr geringe Anreicherungsfaktoren (0 bis 5 ‰) ergaben sich für drei Messstellen im nördlichen Abstrombereich der BTEX-Fahne, für die bereits anhand der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Methans auf den Einfluss der Methanoxidation geschlossen werden konnte. Diese Hypothese kann somit durch die berechneten Anreicherungsfaktoren bestätigt werden.



**Abbildung 5-4** BTEX-Konzentrationen und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des DIC (Mai 2002) im Grundwasser am Standort Zeitz

Entlang des bekannten Abstromprofils (SafZz 9/00, SafZz 2/99, SafZz 8/99, SafZz 41/02, SafZz 18/00, SafZz 23/00) wurden für das Methan, das in Konzentrationen von 1044 bis 7741  $\mu\text{g l}^{-1}$  nachgewiesen wurde,  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von  $-56,0$  bis  $-45,3$  ‰ bestimmt (Abbildung 5-5), die den biologischen Ursprung des Methans anzeigen. In zwei weiteren Messstellen (SafZz 34/02, SafZz 36/02), die sich nördlich an dieses Profil anschließen, aber nicht auf dem vorherrschenden Fließweg des Grundwassers liegen, konnten nur noch Spuren von Methan (12 bzw. 16  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) mit  $\delta^{13}\text{C}$ -Werten von  $-24,1$  bzw.  $-22,7$  ‰ gemessen werden. Diese beiden Messstellen befinden sich hinsichtlich der BTEX-Konzentrationen außerhalb der Schadstofffahne, das Grundwasser wird scheinbar durch die Kontamination beeinflusst und stellt eine Senke für das biogene Methan dar. Methan wird im Vergleich zu den organischen Schadstoffen im Grundwasser nur sehr eingeschränkt retardiert und kann daher auch in gewisser Entfernung von der eigentlichen Methanquelle nachgewiesen werden. Die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des DIC liegen entlang des Abstromprofils im Bereich der BTEX-Fahne zwischen  $-25,5$  und  $-23,8$  ‰, außerhalb der BTEX-Fahne finden sich geringfügig schwerere  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte um  $-22,6$  ‰.



**Abbildung 5-5** Konzentrationen (■) und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Methans (□) sowie Anreicherungsfaktoren ( $\epsilon = \delta^{13}\text{C}_{\text{CO}_2} - \delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$ ) (●) entlang eines ausgewählten Profils am Standort Zeitz (Mai 2002)

Die Anreicherungsfaktoren, die für die Messstellen entlang des ausgewählten Profils berechnet wurden, deuten auf Methanogenese aus Acetatgärung hin, da sich innerhalb der BTEX-Fahne Anreicherungsfaktoren zwischen 21 und 31 ‰ finden (Abbildung 5-5). Auch hinsichtlich der Anreicherungsfaktoren bestätigt sich für die beiden außerhalb der BTEX-Kontamination befindlichen Messstellen (SafZz 34/02, SafZz 36/02), dass die Isotopensignaturen des Methans durch Methanoxidation geprägt sind.

Entlang des ausgewählten Profils, wo bereits anhand der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Toluols mikrobieller Abbau dieser Kontaminante in den weiter abstromig gelegenen Messstellen nachgewiesen werden konnte, belegen die hohen Methankonzentrationen und die leichten  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Methans eine erhebliche Methanogenese. Weiterhin stimmt diese Zone des anaeroben Toluolabbaus und der Methanogenese mit dem Bereich überein, in dem Sulfatreduktion nachgewiesen werden konnte. Somit ergibt sich ein Hinweis, dass Sulfatreduktion und Methanogenese im Grundwasserleiter, nicht räumlich getrennt, sondern in Übergangsbereichen auch parallel ablaufen können (Christensen et al., 2001).

Aus den Isotopensignaturen und den Konzentrationen des Methans sowie des DIC können Aussagen über methanbildende und –zehrende Prozesse getroffen werden. Am Standort Zeitz konnte für den Einflussbereich der BTEX-Kontamination Methanbildung beobachtet werden, die vermutlich durch acetatfermentierende Prozesse bedingt könnte. Ein möglicher Einfluss des  $\text{CO}_2$  auf die Methanbildung ( $\text{CO}_2$ -Reduktion) zeigte sich nur in einigen Messstellen am westlichen Fahnenrand. Aus der zusammenfassenden Auswertung der Isotopensignaturen der BTEX, des Sulfats und des Methans zeigte sich, dass entlang des Abstromprofils Sulfatreduktion und Methanbildung parallel stattfinden und keine deutliche räumliche Differenzierung zwischen diesen beiden Redoxprozessen vorhanden ist. Auch stimmen die durch Sulfatreduktion sowie Methanogenese geprägten Bereiche sehr gut mit der durch Toluolabbau charakterisierten Zone überein. In Messstellen des nördlichen Abstroms, die



außerhalb der BTEX-Fahne liegen, konnte relativ stark  $^{13}\text{C}$ -angereichertes Methan noch in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Im Fahnenrandbereich kann Methanzehrung ein relevanter Prozess sein, der hier zu einem nicht zu vernachlässigbarem Verbrauch terminaler Elektronenakzeptoren (Sauerstoff, Nitrat, Sulfat) führt und als Konkurrenzreaktion zum mikrobiellen Schadstoffabbau zu betrachten ist.

Aus der Auswertung der Schwefelisotopie des Sulfats sowie der Kohlenstoffisotopenverhältnisse des Methans und DIC an einem kontaminierten Standort zeigte sich die grundsätzliche Eignung dieser Parameter zur qualitativen Abschätzung von Sulfatreduktion und Methanogenese. Diese Umsetzungen, die mit dem Abbau organischer Schadstoffe verbunden sein können, konnten auch in zentralen Bereichen der Schadstofffahne nachgewiesen werden. In den Fahnenzentren ist der direkte Nachweis des mikrobiellen Schadstoffabbaus durch die Anreicherung in den substanzspezifischen Isotopenverhältnissen oft eingeschränkt, da gerade im Nachweis geringer mikrobieller Umsetzungen die Isotopenmethode nicht ausreichend empfindlich ist. Somit besteht die Möglichkeit, auch in Bereichen einer Kontamination, in denen anhand der substanzspezifischen Isotopenverhältnisse der vorhandenen Schadstoffe (noch) nicht auf den mikrobiellen Abbau geschlossen werden kann, aus der Auswertung der Schwefelisotopenverhältnisse des Sulfats und der Kohlenstoffisotopenverhältnisse des Methans und DIC die mikrobielle Aktivität nachzuweisen.

## **6 Beurteilung der Isotopentechniken zur Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus und geochemischer Prozesse im Aquifer**

Um in einem kontaminierten Grundwasserleiter anhand der Isotopensignaturen der vorhandenen Schadstoffe Aussagen bezüglich des mikrobiellen Abbaus am Standort treffen zu können, müssen eine Reihe von Voraussetzungen gegeben und Bedingungen erfüllt sein. Grundsätzlich muss für den jeweiligen Schadstoff der mikrobielle Abbau mit einer reproduzierbaren Isotopenfraktionierung verbunden sein, die ausreichend hoch ist, um auch bereits bei prozentual geringem Abbau eine Anreicherung in den Isotopenverhältnissen messen zu können, die größer ist als die analytische Unsicherheit der Messmethode (Lollar et al., 1999). Hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Isotopenfraktionierungsfaktoren liegen für den mikrobiellen Abbau der BTEX, des 1,2-DCA und des DCM ermutigende Ergebnisse aus Laboruntersuchungen vor (Meckenstock et al., 1999; Morasch et al., 2002; Morasch et al., 2001; Hunkeler und Aravena, 2000a; Ziller, 2002). Bezüglich der Fraktionierungsfaktoren, die die reduktive Dechlorierung der chlorierten Ethene beschreiben, ist das Erkennen einer intrinsischen Systematik erschwert, da die vorliegenden Untersuchungen mit Mischkulturen durchgeführt wurden und es kaum Kenntnisse des exakten Abbauweges und der beteiligten

Enzymsysteme in diesen Mischkulturen gibt. Hier sollte es das Ziel zukünftiger Arbeiten sein, die Substratstruktur-Reaktionsmechanismus-Beziehungen, die die Höhe der Isotopenfraktionierung beeinflussen, zu erkennen und zu beschreiben. Gerade der mikrobielle Abbau der BTEX und PAK ist, sofern Untersuchungen bekannt sind, mit nur geringen Kohlenstofffraktionierungen verbunden. Somit ist bereits ein erhebliches Maß an mikrobiellem Abbau notwendig, bevor eine signifikante Änderung der Isotopensignatur bestimmt werden kann. Da die Fraktionierung der Wasserstoffisotope für die genannten Reaktionen wesentlich höher ist und die substanzspezifische Bestimmung der Wasserstoffisotopenverhältnisse mittlerweile gut möglich ist, könnte sich hier eine Alternative zu den Kohlenstoffisotopen aufzeigen. Die hohe Empfindlichkeit der Wasserstoffisotopenfraktionierung ist verbunden mit einer größeren Variabilität und geringeren Reproduzierbarkeit der Faktoren für verschiedene Redox- und Temperaturbedingungen (Morasch et al., 2001; Ward et al., 2000).

Für die Anwendung der beschriebenen isotoopenchemischen Methode in einem Grundwasserleiter muss vorausgesetzt werden können, dass nur der mikrobielle Abbau einen Isotopeneffekt in der residualen Schadstofffraktion verursacht, und sonstige Prozesse im Aquifer lediglich die Konzentration des Schadstoffs, jedoch nicht das Isotopenverhältnis des Schadstoffs wesentlich beeinflussen. Zahlreiche Untersuchungen zu abiotischen Ursachen von Isotopeneffekten wurden durchgeführt, die für einstufige Sorptionsexperimente (Slater et al., 2000; Harrington et al., 1999) und den Übergang von der Flüssig- in die Gasphase (Slater et al., 1999; Ward et al., 2000; Hunkeler et al., 2001a) keinen signifikanten Isotopeneffekt nachweisen konnten. Auch empirisch wurde nachgewiesen, dass der Transport des Schadstoffs mit dem Grundwasser keine Änderung der Isotopensignatur bedingt (Richnow et al., 2003a; Vieth et al., 2003b). Die modellhafte Übertragung der Isotopeneffekte, die durch chromatographische Prozesse in einer HPLC-Säule (Caimi und Brenna, 1997; Voskamp, 2003) sowie in einer sogenannten Huminsäuresäule (Voskamp et al., 2003) beobachtet wurden, zeigt für eine instationäre, sich ausweitende Schadstofffahne einen sorptionsbedingten Isotopeneffekt, der – substanzabhängig - in der gleichen Größenordnung sein kann wie der abbaubedingte Isotopeneffekt und ebenfalls zu einer Anreicherung der <sup>13</sup>C-Isotopomere in der residualen, nicht sorbierten Fraktion führt (Voskamp et al., 2003).

Für die quantitative Auswertung der Änderung der Isotopenverhältnisse einer Substanz im Verlauf einer Reaktion wird die Rayleigh-Gleichung angewendet. Gültigkeit besitzt diese Gleichung für Prozesse, die in geschlossenen Systemen stattfinden. Somit kann die Gleichung zur Beschreibung der Abbaubersuche im Labor eingesetzt werden. Die Rayleigh-Gleichung kann zur Beschreibung des mikrobiellen Abbaus anhand der Isotopensignaturen in Säulenexperimenten verwendet werden, wenn sich bei konstantem Stoffeintrag ein konstanter Konzentrationsgradient innerhalb der Säule eingestellt hat. In diesem Fall wird nicht die

Konzentrationsänderung im Versuchszeitraum betrachtet, sondern der Konzentrationsgradient im Verlauf der Fließstrecke ausgewertet (Vieth et al., 2001). Ein Grundwasserleiter ist sicherlich ein komplexeres System als eine Bodensäule, dennoch kann in Näherung ein Grundwasserleiter als ein geschlossenes System betrachtet werden, sofern der Austausch mit den umgebenden Kompartimenten zu vernachlässigen ist, und wenn bei konstantem Stoffeintrag die Konzentrationsänderung entlang der Fließstrecke durch konstanten Abbau bedingt ist, also von einer stationären Schadstofffahne ausgegangen werden kann. Weiterhin sollte der Schadstoffeintrag aus einer isotopisch homogenen Schadstoffquelle erfolgen, damit für die Auswertung auf ein einheitliches  $R_0$  Bezug genommen werden kann. Allein aus den im Feld gemessenen Isotopendaten lässt sich nicht zwischen verschiedenen möglichen Ursachen der Anreicherung differenzieren. Zur Festlegung der Schadstoffquelle kann neben dem Kohlenstoff- auch das Wasserstoffisotopenverhältnis berücksichtigt werden (Mancini et al., 2002; Hunkeler et al., 2001a) und aus der integralen Bewertung der Daten auf unterschiedliche Schadstoffquellen geschlossen werden.

Mit der Anwendung der Rayleigh-Gleichung kann der Zusammenhang zwischen den Konzentrationsangaben sowie den Isotopenverhältnissen einer Substanz geprüft werden, wie es in zahlreichen Feldstudien durchgeführt wurde. Der Abtrag der natürlichen Logarithmen der Gradienten der Konzentrationen und der Isotopensignaturen verdeutlicht den Zusammenhang zwischen Änderung der Konzentration und Änderung der Isotopensignaturen innerhalb eines Feldstandortes, wenn die Datenpunkte durch eine lineare Regression beschrieben werden können. Trifft diese Bedingung für alle Messpunkte eines Feldstandortes zu, dann kann von einem gleichförmigen Abbauprozess innerhalb der Schadstofffahne ausgegangen werden. Die Konzentrationen und Isotopensignaturen von ausgewählten Messstellen, die als entlang eines Fließwegs liegend betrachtet werden, sollten die Rayleigh-Gleichung erfüllen. Der für die Felddaten aus der Rayleigh-Gleichung bestimmbare Fraktionierungsfaktor  $\alpha_f$  muss nicht dem im Labor bestimmten Faktor entsprechen, da im Feld nicht ausschließlich davon ausgegangen werden kann, dass die Konzentrationen nur durch biologischen Abbau beeinflusst werden. Stimmen Feld- und Laborfraktionierungsfaktor überein, wie dies für Ethylbenzol und o-Xylol am Standort der Deponie Vejen beobachtet werden konnte (Richnow et al., 2003b), repräsentieren die im Feld gemessenen Konzentrationen den biologischen Abbauprozess. In dem genannten Beispiel wurden als Konzentrationsangaben Werte berücksichtigt, die zuvor um Verdünnungseffekte korrigiert wurden, was die grundsätzliche Eignung des Isotopenkonzeptes bestätigt. Entsprechen die Felddaten nicht den Anforderungen der Rayleigh-Gleichung, kann der mikrobielle Abbau nicht quantifiziert werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit zu einer qualitativen Betrachtung des mikrobiellen Abbaus, in dem aus der Änderung der Isotopensignaturen, in Verbindung mit einem Fraktionierungsfaktor, ein theoretischer Wert für

den Konzentrationsgradienten und somit der prozentuale biologische Abbau berechnet wird. Dieser Wert kennzeichnet den biologischen Abbau, der theoretisch notwendig ist, um die gemessene Anreicherung der Isotopensignaturen – bei einem konstanten Fraktionierungsfaktor – zu verursachen.

In vier Monitoringkampagnen, die einen Zeitraum von 25 Monaten umfassten, konnte für Toluol entlang eines ausgewählten Abstromprofils der Trend zu nahezu vollständigem biologischen Abbau bestätigt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für eine Quantifizierung des biologischen Abbaus verschiedene Ansätze verfolgt, die zu vergleichbaren Ergebnissen führten. Sowohl die Bestimmung theoretischer Toluolkonzentrationen auf der Basis der Isotopensignaturen als auch die Korrektur der Konzentrationsangaben in Bezug auf einen konservativen Tracer (Benzol) ergaben unter der Annahme des biologischen Abbaus als einer Reaktion nullter Ordnung Reaktionskonstanten von  $k = 4,8 \mu\text{M d}^{-1}$  bzw.  $k = 5,0 \mu\text{M d}^{-1}$ , die in der gleichen Größenordnung liegen wie in der Literatur beschriebene Abbaukonstanten des Toluols für verschiedene Feldstandorte. Auch aus der Übereinstimmung der Abbaukonstanten, die auf unterschiedlichen Daten und Auswertungsansätzen beruhen, zeigt sich, dass mit Hilfe der Isotopensignaturen der mikrobielle Abbau organischer Schadstoffe an kontaminierten Standorten beschrieben werden kann.

Die Bestimmung der Isotopenverhältnisse des Sulfats in kontaminierten Grundwasserleitern ermöglicht eine qualitative Auswertung, um Zonen der Sulfatreduktion in der Schadstofffahne zu kartieren. Die  $\delta^{34}\text{S}$ -Werte des Sulfats werden nur durch den Prozess der dissimilatorischen Sulfatreduktion beeinflusst. Somit liefern die Isotopensignaturen des Sulfats zusätzlich zu der Auswertung von Schadstoff- und Sulfatkonzentrationen einen weiteren Parameter, um die dissimilatorische Sulfatreduktion, mit der der anaerobe Schadstoffabbau verbunden sein kann, zu beurteilen.

Aus der Bestimmung der Isotopenverhältnisse des Methans und des gelösten anorganischen Kohlenstoffs können qualitative Rückschlüsse auf die am Standort ablaufenden methanbildenden Prozesse gezogen werden. Weiterhin kann durch die Isotopenverhältnisse des Methans auch differenziert werden, ob geringe Methankonzentrationen das Resultat geringer Methanbildung oder forcierter Methanoxidation sind. Diese Aussage wäre allein aus der Auswertung der gemessenen Methankonzentrationen nicht zu treffen.

Somit stellen die Isotopenverhältnisse sowohl des Sulfats als auch des Methans, in Verbindung mit dem DIC, geeignete Parameter zur Aufklärung der mit dem anaeroben mikrobiellen Schadstoffabbau häufig verbundenen geochemischen Prozesse dar. Die integrale Auswertung der Konzentrationen und Isotopenverhältnisse sowohl der organischen Schadstoffe als auch der geochemischen Parameter bietet die Möglichkeit zu sehr differenzierten Aussagen und Prognosen hinsichtlich des mikrobiellen Abbaus der Schadstoffe am Standort. Perspektivisch bietet sich für die Abschätzung und Prognose des mikrobiellen Abbaus, z. B. in Hinblick auf die

Anwendung des Natural-Attenuation-Ansatzes für den jeweiligen Standort, die Kombination dieser isotochenchemischen Methode mit einem Strömungs- und Transportmodell an.

## 7 Literaturverzeichnis

- Ahad, J.M.E., Lollar, B.S., Edwards, E.A., Slater, G.F. und Sleep, B.E., (2000). Carbon isotope fractionation during anaerobic biodegradation of toluene: Implications for intrinsic bioremediation. *Environmental Science & Technology*, 34(5): 892-896.
- Anweiler, E., Materna, A., Safinowski, M., Kappler, A., Richnow, H.H., Michaelis, W. und Meckenstock, R.U., (2000). Anaerobic degradation of 2-methylnaphthalene by a sulfate-reducing enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12): 5329-5333.
- Arnth, J.D., Milde, G., Kerndorff, H. und Schleyer, R., (1989). Waste deposit influences on groundwater quality as a tool for waste type and site selection for final storage quality. In: P. Baccini (Editor), *The Landfill - Lecture Notes in Earth Sciences*. Springer, Berlin.
- Asmussen, G. und Strauch, G., (1998). Sulfate reduction in a lake and the groundwater of a former lignite mining area studied by stable sulfur and carbon isotopes. *Water, Air, and Soil Pollution*, 108: 271-284.
- Baertschi, P., (1976). Absolute  $^{18}\text{O}$  content of standard mean ocean water. *Earth Planet Science Letters*, 31: 341-344.
- Ball, H.A., Johnson, H.A., Reinhard, M. und Spormann, A.M., (1996). Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. *Journal of Bacteriology*, 178(19): 5755-5761.
- Barker, J.F. und Fritz, P., (1981a). Carbon isotope fractionation during microbial methane oxidation. *Nature*, 293: 289-291.
- Barker, J.F. und Fritz, P., (1981b). The occurrence and origin of methane in some groundwater flow systems. *Canadian Journal of Earth Sciences*, 18: 1802-1816.
- Barth, J.A.C., Slater, G., Schuth, C., Bill, M., Downey, A., Larkin, M. und Kalin, R.M., (2002). Carbon isotope fractionation during aerobic biodegradation of trichloroethene by *Burkholderia cepacia* G4: a tool to map degradation mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4): 1728-1734.
- Beller, H.R. und Spormann, A.M., (1998). Analysis of the novel benzylsuccinate synthase reaction for anaerobic toluene activation based on structural studies of the product. *Journal of Bacteriology*, 180(20): 5454-5457.
- Beller, H.R. und Spormann, A.M., (1999). Substrate range of benzylsuccinate synthase from *Azoarcus* sp strain T. *FEMS Microbiology Letters*, 178(1): 147-153.
- Bisswanger, H., (2000). *Enzymkinetik: Theorie und Methoden*. Wiley-VCH, Weinheim, 268 S..
- Bjerg, P.L., Rügge, K., Pedersen, J.K. und Christensen, T.H., (1995). Distribution of redox-

- sensitive groundwater quality parameters downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark). *Environmental Science & Technology*, 29: 1387-1394.
- Bloom, Y., Aravena, R., Hunkeler, D., Edwards, E. und Frape, S.K., (2000). Carbon isotope fractionation during microbial dechlorination of trichloroethene, cis-1,2-dichloroethene, and vinyl chloride: Implications for assessment of natural attenuation. *Environmental Science & Technology*, 34(13): 2768-2772.
- Bolliger, C., Schroth, M.H., Bernasconi, S.M., Kleikemper, J. und Zeyer, J., (2001). Sulfur isotope fractionation during microbial sulfate reduction by toluene-degrading bacteria. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 65(19): 3289-3298.
- Bottrell, S.H., Hayes, P.J., Bannon, M. und Williams, G.M., (1995). Bacterial sulfate reduction and pyrite formation in a polluted sand aquifer. *Geomicrobiology Journal*, 12: 75-90.
- Bottrell, S.H., Moncaster, S.M., Tellam, J.H., Lloyd, J.W., Fisher, Q.J. und Newton, R.J., (2000). Controls on bacterial sulphate reduction in a dual porosity aquifer system: the Lincoln Limestone aquifer, England. *Chemical Geology*, 169: 461-470.
- Bottrell, S.H., Smart, P.I., Whitaker, F. und Raiswell, R., (1991). Geochemistry and isotope systematic of sulfur in the mixing zone of Bahamian blue holes. *Applied Geochemistry*, 6: 97-103.
- Botz, R., Pokojski, H.D., Schmitt, M. und Thomm, M., (1996). Carbon isotope fractionation during bacterial methanogenesis by CO<sub>2</sub> reduction. *Organic Geochemistry*, 25(3-4): 255-262.
- Burke, R.A., (1993). Possible influence of hydrogen concentration on microbial methane stable hydrogen isotopic composition. *Chemosphere*, 26(1-4): 55-67.
- Caimi, R.J. und Brenna, J.T., (1997). Quantitative evaluation of carbon isotopic fractionation during reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 757(1-2): 307-310.
- Caldwell, M.E. und Sufflita, J.M., (2000). Detection of phenol and benzoate as intermediates of anaerobic benzene biodegradation under different terminal electron- accepting conditions. *Environmental Science & Technology*, 34(7): 1216-1220.
- Chambers, L.A., Trudinger, P.A., Smith, J.W. und Burns, M.S., (1975). Fractionation of sulfur isotopes by continuous cultures of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 21: 1602-1607.
- Christensen, T.H., Kjeldsen, P., Bjerg, P.L., Jensen, D.L., Christensen, J.B., Baun, A., Albrechtsen, H.J. und Heron, C., (2001). Biogeochemistry of landfill leachate plumes. *Applied Geochemistry*, 16(7-8): 659-718.
- Clark, I.D. und Fritz, P., (1997). *Environmental isotopes in hydrogeology*. Lewis Publishers, Boca Raton, 328 S..
- Coates, J.D., Chakraborty, R., Lack, J.G., O'Connor, S.M., Cole, K.A., Bender, K.S. und

- Achenbach, L.A., (2001). Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. *Nature*, 411(6841): 1039-1043.
- Coleman, D.D. und Risatti, J.B., (1981). Fractionation of carbon and hydrogen isotopes by methane-oxidizing bacteria. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 45: 1033-1037.
- Dempster, H.S., Lollar, B.S. und Feenstra, S., (1997). Tracing organic contaminants in groundwater: A new methodology using compound-specific isotopic analysis. *Environmental Science & Technology*, 31(11): 3193-3197.
- Detmers, J., Bruchert, V., Habicht, K.S. und Kuever, J., (2001). Diversity of sulfur isotope fractionations by sulfate-reducing prokaryotes. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2): 888-894.
- Devlin, J.F., McMaster, M. und Barker, J.F., (2002). Hydrogeologic assessment of in situ natural attenuation in a controlled field experiment. *Water Resources Research*, 38(1): 10.1029/2000WR000148.
- Doherty, R.E., (2000). A history of the production and use of carbon tetrachloride, tetrachloroethylene, trichloroethylene and 1,1,1-trichloroethane in the United States: Part 1 - Historical background; Carbon tetrachloride and tetrachloroethylene. *Environmental Forensics*, 1(2): 69-81.
- Edwards, E.A. und Grbic-Galic, D., (1992). Complete mineralization of benzene by aquifer microorganisms under strictly anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(8): 2663-2666.
- Egli, C., Scholtz, R., Cook, A.M. und Leisinger, T., (1987). Anaerobic dechlorination of tetrachloromethane and 1,2-dichloroethane to degradable products by pure cultures of *Desulfobacterium* sp. and *Methanobacterium* sp. *FEMS Microbiology Letters*, 43: 257-261.
- Elshahed, M.S., Gieg, L.M., McInerney, M.J. und Suflita, J.M., (2001). Signature metabolites attesting to the in situ attenuation of alkylbenzenes in anaerobic environments. *Environmental Science & Technology*, 35(4): 682-689.
- Fischer, A., (2003). Charakterisierung der Quellen und Senken des Methans durch Isotopenanalyse in einem BTEX-kontaminierten Grundwasserleiter. Diplomarbeit, TU Bergakademie Freiberg, Freiberg.
- Fuchs, G., Mohamed, M.E.S., Altenschmidt, U., Koch, J., Lack, A., Brackmann, R., Lochmeyer, C. und Oswald, B., (1994). Biochemistry of anaerobic degradation of aromatic compounds. In: C. Ratledge (Editor), *Biochemistry of microbial degradation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, S. 513-553.
- Geller, Brauch und Werner, (1991). *Handbuch Mikrobiologische Bodenreinigung*, Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe.
- Gray, J.R., Lacrampe-Couloume, G., Gandhi, D., Scow, K.M., Wilson, R.D., Mackay, D.M. und

- Lollar, B.S., (2002). Carbon and hydrogen isotopic fractionation during biodegradation of methyl tert-butyl ether. *Environmental Science & Technology*, 36(9): 1931-1938.
- Griebler, C., Vieth, A., Richnow, H.H. und Meckenstock, R.U., (2003). Strategies for the assessment of anaerobic in situ biodegradation of aromatic hydrocarbons (BTEX and PAH) - I. Determination of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  stable isotope fractionation in laboratory and field studies. *Environmental Science & Technology*, eingereicht.
- Grossman, E.L., Cifuentes, L.A. und Cozzarelli, I.M., (2002). Anaerobic methane oxidation in a landfill-leachate plume. *Environmental Science & Technology*, 36(11): 2436-2442.
- Grossman, E.L. und Coffman, B.K., (1989). Bacterial production of methane and its influence on groundwater chemistry in east-central Texas aquifers. *Geology*, 17: 495-499.
- Hagemann, R., Nief, G. und Roth, E., (1970). Absolute isotopic scale for deuterium analysis of natural waters. Absolute D/H ratio for SMOW. *Tellus*, 22: 712-715.
- Hansen, L.K., Jakobsen, R. und Postma, D., (2001). Methanogenesis in a shallow sandy aquifer, Romo, Denmark. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 65(17): 2925-2935.
- Harrington, R.R., Poulson, S.R., Drever, J.I., Colberg, P.J.S. und Kelly, E.F., (1999). Carbon isotope systematics of monoaromatic hydrocarbons: vaporization and adsorption experiments. *Organic Geochemistry*, 30(8A): 765-775.
- Harwood, C.S., Burchhardt, G., Herrmann, H. und Fuchs, G., (1998). Anaerobic metabolism of aromatic compounds via the benzoyl-CoA pathway. *FEMS Microbiology Reviews*, 22(5): 439-458.
- Heider, J. und Fuchs, G., (1997). Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *European Journal of Biochemistry*, 243(3): 577-596.
- Heider, J., Spormann, A.M., Beller, H.R. und Widdel, F., (1998). Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews*, 22(5): 459-473.
- Heraty, L.J., Fuller, M.E., Huang, L., Abrajano, T. und Sturchio, N.C., (1999). Isotopic fractionation of carbon and chlorine by microbial degradation of dichloromethane. *Organic Geochemistry*, 30(8A): 793-799.
- Herfort, M., Ptak, T., Hümmer, O., Teutsch, G. und Dahmke, A., (1998). Testfeld Süd: Einrichtung der Testfeldinfrastruktur und Erkundung hydraulisch-hydrogeochemischer Parameter des Grundwasserleiters. *Grundwasser*, 3(4): 159-166.
- Hoefs, J., (1997). *Stable isotope geochemistry*. Springer-Verlag, Berlin, 201 S..
- Holliger, C., Schraa, G., Stams, A.J.M. und Zehnder, A.J.B., (1990). Reductive dechlorination of 1,2-dichloroethane and chloroethane by cell suspensions of methanogenic bacteria. *Biodegradation*, 1: 253-261.
- Holliger, C. und Schumacher, W., (1994). Reductive dehalogenation as a respiratory process. *Antonie van Leeuwenhoek*, 66: 239-246.
- Holliger, C., Wohlfarth, G. und Diekert, G., (1998). Reductive dechlorination in the energy



- metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 22(5): 383-398.
- Huang, L., Sturchio, N.C., Abrajano, T., Heraty, L.J. und Holt, B.D., (1999). Carbon and chlorine isotope fractionation of chlorinated aliphatic hydrocarbons by evaporation. *Organic Geochemistry*, 30(8A): 777-785.
- Hunkeler, D., Anderson, N., Aravena, R., Bernasconi, S.M. und Butler, B.J., (2001a). Hydrogen and carbon isotope fractionation during aerobic biodegradation of benzene. *Environmental Science & Technology*, 35(17): 3462-3467.
- Hunkeler, D. und Aravena, R., (2000a). Determination of compound-specific carbon isotope ratios of chlorinated methanes, ethanes, and ethenes in aqueous samples. *Environmental Science & Technology*, 34(13): 2839-2844.
- Hunkeler, D. und Aravena, R., (2000b). Evidence of substantial carbon isotope fractionation among substrate, inorganic carbon, and biomass during aerobic mineralization of 1,2-dichloroethane by *Xanthobacter autotrophicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(11): 4870-4876.
- Hunkeler, D., Aravena, R. und Butler, B.J., (1999). Monitoring microbial dechlorination of tetrachloroethene (PCE) in groundwater using compound-specific stable carbon isotope ratios: Microcosm and field studies. *Environmental Science & Technology*, 33(16): 2733-2738.
- Hunkeler, D., Aravena, R. und Cox, E., (2002). Carbon isotopes as a tool to evaluate the origin and fate of vinyl chloride: Laboratory experiments and modeling of isotope evolution. *Environmental Science & Technology*, 36(15): 3378-3384.
- Hunkeler, D., Butler, B.J., Aravena, R. und Barker, J.F., (2001b). Monitoring biodegradation of methyl tert-butyl ether (MTBE) using compound-specific carbon isotope analysis. *Environmental Science & Technology*, 35(4): 676-681.
- Janssen, D.B., Scheper, A., Dijkhuizen, L. und Witholt, B., (1985). Degradation of halogenated aliphatic compounds by *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *Applied and Environmental Microbiology*, 49: 673-677.
- Junk, G. und Svec, H., (1958). The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 14: 234-243.
- Kaplan, I.R. und Rittenberg, S.C., (1964). Microbiological fractionation of sulphur isotopes. *Journal of General Microbiology*, 34: 195-212.
- Kelley, C.A., Hammer, B.T. und Coffin, R.B., (1997). Concentrations and stable isotope values of BTEX in gasoline- contaminated groundwater. *Environmental Science & Technology*, 31(9): 2469-2472.
- Kohler-Staub, D., Hartmans, S., Gälli, R., Suter, F. und Leisinger, T., (1986). Evidence for identical dichloromethane dehalogenases in different methylotrophic bacteria. *Journal of*

- General Microbiology, 132: 2837-2843.
- Kohler-Staub, D. und Leisinger, T., (1985). Dichloromethane dehalogenase of *Hyphomicrobium* sp. Strain DM2. *Journal of Bacteriology*, 162(2): 676-681.
- Kolhatkar, R., Kuder, T., Philp, P., Allen, J. und Wilson, J.T., (2002). Use of compound-specific stable carbon isotope analyses to demonstrate anaerobic biodegradation of MTBE in groundwater at a gasoline release site. *Environmental Science & Technology*, 36(23): 5139-5146.
- Krieger, C.J., Beller, H.R., Reinhard, M. und Spormann, A.M., (1999). Initial reactions in anaerobic oxidation of m-xylene by the denitrifying bacterium *Azoarcus* sp strain T. *Journal of Bacteriology*, 181(20): 6403-6410.
- Kropp, K.G., Davidova, I.A. und Suflita, J.M., (2000). Anaerobic oxidation of n-dodecane by an addition reaction in a sulfate-reducing bacterial enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12): 5393-5398.
- Krumbiegel, P., (1970). Isotopieeffekte. *Wissenschaftliche Taschenbücher*, 77. Akademie-Verlag, Berlin, 192 S..
- Krzycki, J.A., Kenealy, W.R., DeNiro, M.J. und Zeikus, J.G., (1987). Stable carbon isotope fractionation by methanosarcina barkeri during methanogenesis from acetate, methanol or carbon dioxide-hydrogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(10): 2597-2599.
- Leisinger, T., Bader, R., Hermann, R., Schmid-Appert, M. und Vuilleumier, S., (1994). Microbes, enzymes and genes involved in dichloromethane utilization. *Biodegradation*, 5: 237-248.
- Lerner, D.N. und Teutsch, G., (1995). Recommendations for level-determined sampling in wells. *Journal of Hydrology*, 171: 355-377.
- Lollar, B.S., Slater, G.F., Ahad, J., Sleep, B., Spivack, J., Brennan, M. und MacKenzie, P., (1999). Contrasting carbon isotope fractionation during biodegradation of trichloroethylene and toluene: Implications for intrinsic bioremediation. *Organic Geochemistry*, 30(8A): 813-820.
- Lollar, B.S., Slater, G.F., Sleep, B., Witt, M., Klecka, G.M., Harkness, M. und Spivack, J., (2001). Stable carbon isotope evidence for intrinsic bioremediation of tetrachloroethene and trichloroethene at area 6, Dover Air Force Base. *Environmental Science & Technology*, 35(2): 261-269.
- Lovley, D.R., (2001). Bioremediation - anaerobes to the rescue. *Science*, 293(5534): 1444-1446.
- Lovley, D.R., Coates, J.D., Woodward, J.C. und Phillips, E.J.P., (1995). Benzene oxidation coupled to sulfate reduction. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3): 953-958.
- Mancini, S.A., Lacrampe-Couloume, G., Jonker, H., Van Breukelen, B.M., Groen, J., Volkering, F. und Lollar, B.S., (2002). Hydrogen isotopic enrichment: An indicator of biodegradation at a petroleum hydrocarbon contaminated field site. *Environmental Science & Technology*,

36(11): 2464-2470.

- Mancini, S.A., Ulrich, A.C., Lacrampe-Couloume, G., Sleep, B., Edwards, E.A. und Sherwood Lollar, B., (2003). Carbon and hydrogen isotopic fractionation during anaerobic biodegradation of benzene. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 191-198.
- Maymo-Gatell, X., Chien, Y.T., Gossett, J.M. und Zinder, S.H., (1997). Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science*, 276(5318): 1568-1571.
- Meckenstock, R.U., Annweiler, E., Michaelis, W., Richnow, H.H. und Schink, B., (2000). Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7): 2743-2747.
- Meckenstock, R.U., Morasch, B., Kästner, M., Vieth, A. und Richnow, H.H., (2002). Assessment of bacterial degradation of aromatic hydrocarbons in the environment by analysis of stable carbon isotope fractionation. *Water, Air, and Soil Pollution: Focus*, 2(3): 141-152.
- Meckenstock, R.U., Morasch, B., Warthmann, R., Schink, B., Annweiler, E., Michaelis, W. und Richnow, H.H., (1999). C-13/C-12 isotope fractionation of aromatic hydrocarbons during microbial degradation. *Environmental Microbiology*, 1(5): 409-414.
- Michaelis, W. et al., (2002). Microbial reefs in the black sea fueled by anaerobic oxidation of methane. *Science*, 297: 1013-1015.
- Morasch, B., Richnow, H.H., Schink, B. und Meckenstock, R.U., (2001). Stable hydrogen and carbon isotope fractionation during microbial toluene degradation: Mechanistic and environmental aspects. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10): 4842-4849.
- Morasch, B., Richnow, H.H., Schink, B., Vieth, A. und Meckenstock, R.U., (2002). Carbon and hydrogen stable isotope fractionation during aerobic bacterial degradation of aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10): 5191-5194.
- Müller, J., (2001). Hydrogeologische, hydro- und isotopenchemische Untersuchungen im kontaminierten Grundwasserbereich des Auensees, Stadtgebiet Leipzig. Diplomarbeit, TU Dresden, Dresden, 125 S..
- Muller, J.A., Galushko, A.S., Kappler, A. und Schink, B., (1999). Anaerobic degradation of m-cresol by *Desulfobacterium cetonicum* is initiated by formation of 3-hydroxybenzylsuccinate. *Archives of Microbiology*, 172(5): 287-294.
- Muller, J.A., Galushko, A.S., Kappler, A. und Schink, B., (2001). Initiation of anaerobic degradation of p-cresol by formation of 4-hydroxybenzylsuccinate in *Desulfobacterium cetonicum*. *Journal of Bacteriology*, 183(2): 752-757.
- Neumann, A., Scholz-Muramatsu, H. und Diekert, G., (1994). Tetrachloroethene metabolism of *Dehalospirillum multivorans*. *Archives of Microbiology*, 162: 295-301.
- Neumann, A., Seibert, A., Trescher, T., Reinhardt, S., Wohlfarth, G. und Diekert, G., (2002). Tetrachloroethene reductive dehalogenase of *Dehalospirillum multivorans*: substrate

- specificity of the native enzyme and its corrinoid cofactor. *Archives of Microbiology*, 177(5): 420-426.
- Nijenhuis, I., (2002). Dehalorespiration by *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195 and relatives. PhD Thesis, Cornell University, Ithaca, 119 S..
- Numata, M., Nakamura, N., Koshikawa, H. und Terashima, Y., (2002). Chlorine isotope fractionation during reductive dechlorination of chlorinated ethenes by anaerobic bacteria. *Environmental Science & Technology*, 36(20): 4389-4394.
- O'Leary, M.H., (1981). Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry*, 20: 553-567.
- O'Neil, J.R., (1986). Theoretical and experimental aspects of isotopic fractionation. *Reviews in Mineralogy*, 16: 1-40.
- OSWER, (1999). Use of monitored natural attenuation at superfund, RCRA corrective action, and underground storage tank sites. 9200.4-17P, United States Environmental Protection Agency, Washington.
- Phelps, C.D., Kazumi, J. und Young, L.Y., (1996). Anaerobic degradation of benzene in BTX mixtures dependent on sulfate reduction. *FEMS Microbiology Letters*, 145(3): 433-437.
- Phelps, C.D., Zhang, Z.M. und Young, L.Y., (2001). Use of stable isotopes to identify benzoate as a metabolite of benzene degradation in a sulphidogenic consortium. *Environmental Microbiology*, 3(9): 600-603.
- Pond, K.L., Huang, Y.S., Wang, Y. und Kulpa, C.F., (2002). Hydrogen isotopic composition of individual n-alkanes as an intrinsic tracer for bioremediation and source identification of petroleum contamination. *Environmental Science & Technology*, 36(4): 724-728.
- Poulson, S.R. und Drever, J.I., (1999). Stable isotope (C, Cl, and H) fractionation during vaporization of trichloroethylene. *Environmental Science & Technology*, 33(20): 3689-3694.
- Rabus, R. und Widdel, F., (1995). Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology*, 163(2): 96-103.
- Rabus, R., Wilkes, H., Behrends, A., Armstroff, A., Fischer, T., Pierik, A.J. und Widdel, F., (2001). Anaerobic initial reaction of n-alkanes in a denitrifying bacterium: Evidence for (1-methylpentyl)succinate as initial product and for involvement of an organic radical in n-hexane metabolism. *Journal of Bacteriology*, 183(5): 1707-1715.
- Rayleigh, J.W.S., (1896). Theoretical considerations respecting the separation of gases by diffusion and similar processes. *Philos Mag*, 42: 493.
- Reinhard, M., Shang, S., Kitanidis, P.K., Orwin, E., Hopkins, G.D. und Lebron, C.A., (1997). In situ BTEX biotransformation under enhanced nitrate- and sulfate-reducing conditions. *Environmental Science & Technology*, 31(1): 28-36.
- Richnow, H.H., Annweiler, E., Michaelis, W. und Meckenstock, R.U., (2003a). Microbial in situ degradation of aromatic hydrocarbons in a contaminated aquifer monitored by carbon

- isotope fractionation. *Journal of Contaminant Hydrology*, angenommen.
- Richnow, H.H. und Meckenstock, R., (1999). Isotopen-geochemisches Konzept zur In-situ Erfassung des biologischen Abbaus in kontaminiertem Grundwasser. *TerraTech*, 8(5): 38-41.
- Richnow, H.H., Meckenstock, R.U., Ask, L., Baun, A., Leding, A. und Christensen, T.H., (2003b). In situ biodegradation determined by carbon isotope fractionation of aromatic hydrocarbons in an anaerobic landfill leachate plume (Vejen, Denmark). *Journal of Contaminant Hydrology*, angenommen.
- Richnow, H.H., Vieth, A., Kästner, M., Gehre, M. und Meckenstock, R.U., (2002). Isotope fractionation of toluene: a perspective to characterise microbial in situ degradation. *The Scientific World Journal*, 2: 1227-1234.
- Ryoo, D., Shim, H., Canada, K., Barbieri, P. und Wood, T.K., (2000). Aerobic degradation of tetrachloroethylene by toluene-o-xylene monooxygenase of *Pseudomonas stutzeri* OX1. *Nature Biotechnology*, 18: 775-778.
- Schink, B., Brune, A. und Schnell, S., (1992). Anaerobic degradation of aromatic compounds. In: G. Winkelmann (Editor), *Microbial Degradation of Natural Products*. VCH, S. 219-242.
- Schroth, M.H., Kleikemper, J., Bolliger, C., Bernasconi, S.M. und Zeyer, J., (2001). In situ assessment of microbial sulfate reduction in a petroleum-contaminated aquifer using push-pull tests and stable sulfur isotope analyses. *Journal of Contaminant Hydrology*, 51(3-4): 179-195.
- Schwarzenbach, R.P., Gschwend, P.M. und Imboden, D.M., (1993). *Environmental organic chemistry*. John Wiley & Sons, New York.
- Slater, G.F., Ahad, J.M.E., Lollar, B.S., Allen-King, R. und Sleep, B., (2000). Carbon isotope effects resulting from equilibrium sorption of dissolved VOCs. *Analytical Chemistry*, 72(22): 5669-5672.
- Slater, G.F., Dempster, H.S., Lollar, B.S. und Ahad, J., (1999). Headspace analysis: A new application for isotopic characterization of dissolved organic contaminants. *Environmental Science & Technology*, 33(1): 190-194.
- Slater, G.F., Lollar, B.S., Sleep, B.E. und Edwards, E.A., (2001). Variability in carbon isotopic fractionation during biodegradation of chlorinated ethenes: Implications for field applications. *Environmental Science & Technology*, 35(5): 901-907.
- Song, D.L., Conrad, M.E., Sorenson, K.S. und Alvarez-Cohen, L., (2002). Stable carbon isotope fractionation during enhanced in situ bioremediation of trichloroethene. *Environmental Science & Technology*, 36(10): 2262-2268.
- Spence, M.J., Bottrell, S.H., Thornton, S.F. und Lerner, D.N., (2001). Isotopic modeling of the significance of bacterial sulphate reduction for phenol attenuation in a contaminated aquifer. *Journal of Contaminant Hydrology*, 53: 285-304.

- Spormann, A.M. und Widdel, F., (2000). Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation*, 11(2-3): 85-105.
- Stehmeier, L.G., Francis, M.M., Jack, T.R., Diegor, E., Winsor, L. und Abrajano, T.A., (1999). Field and in vitro evidence for in-situ bioremediation using compound-specific C-13/C-12 ratio monitoring. *Organic Geochemistry*, 30(8A): 821-833.
- Strebel, O., Böttcher, J. und Fritz, P., (1989). Use of isotope fractionation of sulfate-sulfur and sulfate-oxygen to assess bacterial desulfurication in a sandy aquifer. *Journal of Hydrology*, 121: 155-172.
- Sturchio, N.C., Clausen, J.L., Heraty, L.J., Huang, L., Holt, B.D. und Abrajano, T.A., (1998). Chlorine isotope investigation of natural attenuation of trichloroethene in an aerobic aquifer. *Environmental Science & Technology*, 32(20): 3037-3042.
- Suarez, M.P. und Rifai, H.S., (1999). Biodegradation rates for fuel hydrocarbons and chlorinated solvents in groundwater. *Bioremediation Journal*, 3: 337-362.
- Teutsch, G., Grathwohl, P. und Schiedek, T., (1997). Literaturstudie zum natürlichen Rückhalt/Abbau von Schadstoffen im Grundwasser. Nr. 35/97, Landesamt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe.
- Valentine, D.L., (2002). Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81: 271-282.
- Vieth, A., Fischer, A., Kästner, M., Gehre, M., Knoeller, K., Wachter, T., Dahmke, A. und Richnow, H.H., (2003a). Isotope fractionation processes used to characterise natural attenuation of organic contaminants, ConSoil 2003, Gent, Belgium.
- Vieth, A., Kästner, M., Morasch, B., Meckenstock, R.U. und Richnow, H.H., (2001). Charakterisierung des biologischen Abbaus von BTEX im Grundwasser über Isotopenfraktionierung - Feldstudien. *TerraTech*, 10(5): 37-41.
- Vieth, A., Kästner, M., Schirmer, M., Weiss, H., Gödeke, S., Meckenstock, R.U. und Richnow, H.H., (2003b). In-situ biodegradation of benzene and toluene in a contaminated aquifer monitored by stable isotope fractionation. *Environmental Science & Technology*, eingereicht.
- Vieth, A., Müller, J., Strauch, G., Kästner, M., Gehre, M., Meckenstock, R.U. und Richnow, H.H., (2003c). Characterisation of in-situ biodegradation of tetrachloroethene (PCE) and trichloroethene (TCE) in contaminated aquifers monitored by stable isotope fractionation. *Isotopes in Environmental Health Studies*, 39(2): 113-124.
- Vieth, A., Voskamp, M., Kopinke, F.D., Meckenstock, R.U. und Richnow, H.H., (2002). Isotope fractionation as a tool to document the in-situ biodegradation of organic pollutants in contaminated aquifers. In: G.H. Schmitz (Editor), Third International Conference on Water Resources and Environment Research. Schriftenreihe des Institutes für Abfallwirtschaft und Altlasten, Technische Universität Dresden. Eigenverlag des Forums für

- Abfallwirtschaft und Altlasten e.V., Dresden, Germany, S. 198-202.
- Voskamp, M., (2003). Doktorarbeit, Universität Leipzig, Leipzig.
- Voskamp, M., Vieth, A., Kopinke, F.D., Georgi, A. und Richnow, H.H., (2003). Isotope fractionation of hydrophobic contaminants during sorption - implications for natural attenuation studies. *Environmental Science & Technology*, in Vorbereitung.
- Waldron, S., Watson-Craik, I.A., Hall, A.J. und Fallick, A.E., (1998). The carbon and hydrogen stable isotope composition of bacteriogenic methane: a laboratory study using a landfill inoculum. *Geomicrobiology*, 15: 157-169.
- Wang, Y. und Huang, Y.S., (2001). Hydrogen isotope fractionation of low molecular weight n-alkanes during progressive vaporization. *Organic Geochemistry*, 32(8): 991-998.
- Ward, J.A.M., Ahad, J.M.E., Lacrampe-Couloume, G., Slater, G.F., Edwards, E.A. und Lollar, B.S., (2000). Hydrogen isotope fractionation during methanogenic degradation of toluene: Potential for direct verification of bioremediation. *Environmental Science & Technology*, 34(21): 4577-4581.
- Whiticar, M.J., (1999). Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chemical Geology*, 161(1-3): 291-314.
- Whiticar, M.J., Faber, E. und Schoell, M., (1986). Biogenic methane formation in marine and freshwater environments: CO<sub>2</sub> reduction vs. acetate fermentation - isotope evidence. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, 50: 693-709.
- Widdel, F. und Rabus, R., (2001). Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(3): 259-276.
- Wiedemeier, T.H., Rifai, H.S., Newell, C.J. und Wilson, J.T., (1999). Natural attenuation of fuels and chlorinated solvents in the subsurface. John Wiley & Sons, INC., New York.
- Wiedemeier, T.H., Swanson, M.A., Wilson, J.T., Kampbell, D.H., Miller, R.N. und Hansen, J.E., (1996). Approximation of biodegradation rate constants for monoaromatic hydrocarbons (BTEX) in ground water. *Ground Water Monitoring and Remediation*, 16(3): 186-194.
- Wilkes, H., Boreham, C., Harms, G., Zengler, K. und Rabus, R., (2000). Anaerobic degradation and carbon isotopic fractionation of alkylbenzenes in crude oil by sulphate-reducing bacteria. *Organic Geochemistry*, 31(1): 101-115.
- Wohlfarth, G. und Diekert, G., (1997). Anaerobic dehalogenases. *Current Opinion in Biotechnology*, 8(3): 290-295.
- Zengler, K., Richnow, H.H., Rossello-Mora, R., Michaelis, W. und Widdel, F., (1999). Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature*, 401(6750): 266-269.
- Zhang, X.M. und Young, L.Y., (1997). Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12): 4759-4764.

- Zheng, Z., Aagaard, P. und Breedveld, G.D., (2002). Sorption and anaerobic biodegradation of soluble aromatic compounds during groundwater transport. 1. Laboratory column experiments. *Environmental Geology*, 41: 922-932.
- Ziller, K., (2002). Kohlenstoffisotopenfraktionierung beim bakteriellen Abbau von Dichlormethan und Dichlorethan mit verschiedenen Bakterienstämmen. Diplomarbeit, TU Bergakademie Freiberg, Freiberg, 131 S..



## Danksagung

Vor allem und an erster Stelle möchte ich mich bei Dr. habil. Hans-Hermann Richnow bedanken, ohne den ich diese Arbeit nicht in dieser kurzen Zeit geschrieben hätte und der mir immer, auch am Wochenende, im Urlaub oder während seiner Dienstreisen, mit Rat und Tat zur Seite stand und zu jedem Problem eine gute Lösung kannte.

Ein herzliches Dankeschön an Prof. Dr. Andreas Dahmke für die Annahme als Promotionsstudentin am Lehrstuhl für Angewandte Geologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel und für die Begutachtung der Arbeit.

Vielen Dank an Anko Fischer, Katja Ziller und Jörg Müller, die mit ihren Diplomarbeiten einen sehr wertvollen Beitrag zu dieser Arbeit leisteten.

Herzlichen Dank an Matthias Gehre und Ursula Günther, die dafür sorgten, dass unsere „Isotopenmaschinen“ so wunderbar viele Ergebnisse lieferten.

Ohne Dr. habil. Rainer Meckenstock, Barbara Morasch und Dr. Christian Griebler hätte es sehr viele Versuche zur Isotopenfraktionierung beim mikrobiellen Abbau organischer Schadstoffe nicht gegeben, und vor allem bei Rainer möchte ich mich für die Korrekturen der Manuskripte und seine konstruktiven Vorschläge bedanken.

Für die sehr aufwändigen Versuche zur Bestimmung der Isotopenfraktionierung durch Sorption sowie die Ableitung der entsprechenden Modellvorstellung möchte ich mich bei Michael Voskamp und Prof. Dr. Frank-Dieter Kopinke sehr herzlich bedanken.

Dr. Ivonne Nijenhuis gebührt großer Dank für die Korrektur der englischsprachigen Manuskripte und des Abstracts dieser Arbeit sowie die allzeitige Diskussionsbereitschaft.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Matthias Kästner und seiner Arbeitsgruppe sowie den weiteren Kolleginnen und Kollegen der Sektion Sanierungsforschung und des Projektbereiches Industrie- und Bergbaufolgelandschaften für die gute Zusammenarbeit und die allseitige Unterstützung meiner Arbeit.

Für die Überlassung wichtiger hydrogeochemischer Daten und die ständige Diskussionsbereitschaft möchte ich Thorsten Wachter und Frank Dethlefsen danken.

Dr. Kay Knöller brachte Licht in die Auswertung der Sulfatisotopendaten.

Für die Initiative, am Standort Auensee isotopenchemische Untersuchungen durchzuführen, möchte ich mich bei Dr. Gerhard Strauch bedanken.

Björn Reineking, der Unmengen von Daten in das rechte Licht rückte und ansonsten ein offenes Ohr für alle Sorgen und Nöte hatte, sei ganz herzlich gedankt.

Ein riesiges Dankeschön an meine Familie und v. a. an meine Schwester Kerstin, die, wenn auch wegen der großen Entfernung zum schönen Emsland bzw. nach Köln meist nur telefonisch, aber stets mit motivierenden Worten und als Seelentröster zur Verfügung standen und unermüdlich nach dem Fortschritt der Arbeit fragten.

Last but not least sei Dr. Petra Jaeckel für die technische und menschliche Unterstützung in den letzten Jahren und natürlich Solveig Arff und Uta Wemhöner sowie Dr. Hermann-Josef Heipieper und Dr. Dirk Schäfer für das Korrekturlesen der Arbeit ganz herzlich gedankt.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit über die „Anwendung stabiler Isotope zur Beschreibung des mikrobiellen Abbaus organischer Schadstoffe in kontaminierten Aquiferen“ von mir selbständig angefertigt wurde, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer und unter Anwendung der entsprechend gekennzeichneten Hilfsmittel und Literaturangaben.

Leipzig, den 04.04.03

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Andrea Vieth
Geburtsdatum	09.04.1974
Geburtsort	Emsbüren, Niedersachsen
Familienstand	ledig

## Schulbildung

1980 – 1984	Grundschule Salzbergen
1984 – 1993	Städtisches Emsland-Gymnasium Rheine; Abschluss Abitur

## Studium

WS 1994/95 – SS 1999	Studium der Diplom-Geoökologie an der Universität Potsdam; Vertiefungsrichtung: Chemie
10/1996	Vordiplom; Note „sehr gut“
WS 1998/99 – SS 1999	Diplomarbeit am UFZ Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Hydrogeologie
06/1999	Diplom; Note „mit Auszeichnung“ (1,1)

## Praktische Tätigkeiten

09/1993 – 08/1994	Freiwilliges Ökologisches Jahr (FÖJ) bei der Stadt Lingen (Ems)
02/1997 – 03/1997	Umweltamt der Stadt Lingen (Ems), Abteilung Naturschutz
08/1997	Zentrum für Agrarlandschafts- und Landnutzungsforschung (ZALF), Institut für Hydrologie, Müncheberg
06/1999 – 09/1999	Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwater- behandeling (RIZA), Lelystad, NL
10/1999 – 09/2000	Universität Trier, wissenschaftliche Mitarbeiterin im SFB 522 „Umwelt und Region“, Teilprojekt „Umweltgerechte Bodennutzung“
seit 10/2000	UFZ Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Doktorandin in der Sektion Sanierungsforschung

Leipzig, den 04.04.03

Anwendung stabiler Isotope zur  
Beschreibung des mikrobiellen Abbaus  
organischer Schadstoffe in  
kontaminierten Aquiferen

Anlagen zur Dissertation

vorgelegt von  
Andrea Vieth

Kiel 2003

## Anlagenverzeichnis

### **A Material und Methoden**

- A-1 Standort Hydrierwerk Zeitz
- A-2 Standort Chemische Reinigung, Leipzig
- A-3 Gaswerkstandort Testfeld Süd
- A-4 Bestimmung substanzspezifischer Isotopenverhältnisse organischer Verbindungen
- A-5 Konzentrationsbestimmungen
- A-6 Untersuchungen zur Isotopenfraktionierung durch Sorption
- A-7 Literaturverzeichnis (Material und Methoden)

### **B Nicht publizierte Ergebnisse**

- B-1 Isotopenfraktionierung durch mehrstufige Sorption (Huminsäuresäule)
- B-2 Probenahmekampagne Standort Chemische Reinigung, Leipzig im Februar 2002
- B-3 Probenahmekampagne am Standort Hydrierwerk Zeitz im Dezember 2002

### **C Veröffentlichungen**

Vieth, A., M. Kästner, B. Morasch, R.U. Meckenstock, H.H. Richnow (2001). **Charakterisierung des biologischen Abbaus von BTEX im Grundwasser über Isotopenfraktionierung - Feldstudien.** TerraTech 10 (5): 37-41.

*[Datenerhebung und –auswertung (Standort Zeitz); Anfertigung des Manuskripts]*

Meckenstock, R. U., B. Morasch, M. Kästner, A. Vieth, H.H. Richnow (2002). **Assessment of bacterial degradation of aromatic hydrocarbons in the environment by analysis of stable carbon isotope fractionation.** Water, Air, and Soil Pollution: Focus 2(3): 141-152.

*[Mitarbeit bei der Anfertigung des Manuskripts]*

Morasch, B., H. H. Richnow, B. Schink, A. Vieth, R.U. Meckenstock (2002). **Carbon and hydrogen stable isotope fractionation during aerobic bacterial degradation of aromatic hydrocarbons.** Applied and Environmental Microbiology 68 (10): 5191-5194.

*[Bestimmung der Fraktionierungsfaktoren sowie Mitarbeit am Manuskript]*

Richnow, H. H., A. Vieth, M. Kästner, M. Gehre, R.U. Meckenstock (2002). **Isotope fractionation of toluene: a perspective to characterise microbial in situ degradation.** The

Scientific World Journal 2: 1227-1234.

*[Datenerhebung und –auswertung (Standort Zeit); Anfertigung des Manuskripts]*

Vieth, A., M. Voskamp, F.-D. Kopinke, R.U. Meckenstock, H.H. Richnow (2002). **Isotope fractionation as a tool to document the in-situ biodegradation of organic pollutants in contaminated aquifers.** Third International Conference on Water Resources and Environment Research, Dresden, Germany, Eigenverlag des Forums für Abfallwirtschaft und Altlasten e.V.; Volume II, S. 198-202.

*[Datenerhebung und –auswertung (Felddaten Zeit), Bestimmung der Faktoren für sorptionsbedingte Isotopeneffekte; Anfertigung des Manuskripts]*

Griebler, C., A. Vieth, H.H. Richnow, R.U. Meckenstock (2003). **Strategies for the assessment of anaerobic in situ biodegradation of aromatic hydrocarbons (BTEX and PAH) - I. determination of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  stable isotope fractionation in laboratory and field studies.** Environmental Science & Technology, eingereicht.

*[Mitarbeit bei der Anfertigung des Manuskripts]*

Vieth, A., A. Fischer, M. Kästner, K. Knoeller, T. Wachter, A. Dahmke, H.H. Richnow (2003a). **Isotope fractionation processes used to characterise natural attenuation of organic contaminants.** ConSoil 2003, Gent, Belgium.

*[Datenerhebung und –auswertung (BTEX); Anfertigung des Manuskripts]*

Vieth, A., M. Kästner, M. Schirmer, H. Weiß, S. Gödeke, R.U. Meckenstock, H.H. Richnow (2003b). **In-situ biodegradation of benzene and toluene in a contaminated aquifer monitored by stable isotope fractionation.** Environmental Science & Technology, eingereicht.

*[Datenerhebung und –auswertung; Anfertigung des Manuskripts]*

Vieth, A., J. Müller, G. Strauch, M. Kästner, M. Gehre, R.U. Meckenstock, H.H. Richnow (2003c). **In-situ biodegradation of tetrachloroethene (PCE) and trichloroethene (TCE) in contaminated aquifers monitored by stable isotope fractionation.** Isotopes in Environmental Health Studies 39 (2): 113-124.

*[Datenerhebung und –auswertung; Anfertigung des Manuskripts]*

## **A Material und Methoden**

### **A-1 Standort Hydrierwerk Zeitz**

#### **1 Hydrogeologische Verhältnisse am Standort Zeitz**

Der Grundwasserschadensfall liegt im Randbereich des Weißelsterbeckens und zeichnet sich hydrogeologisch durch zwei Hauptgrundwasserleiter aus. Der obere Grundwasserleiter umfasst sowohl Sande und Kiese der altpleistozänen Elsterterrasse als auch fluviatile Kiese und Sande des jüngeren Tertiärs, die aufgrund fehlender hydraulischer Trennung als ein Grundwasserleiter angesprochen werden (Ruske et al., 2001). Im Untersuchungsgebiet beträgt die Mächtigkeit dieses oberen Grundwasserleiters 2 bis 10 m, der Grundwasserspiegel befindet sich zwischen 8 und 10 m unter der Geländeoberfläche. Der Grundwasserstauer besteht aus tertiären Schluffen und Tonen und ist mit Resten eines tertiären Braunkohleflözes durchsetzt. Seine Mächtigkeit ist variabel, in Teilbereichen des Untersuchungsgebietes besteht eine hydraulische Verbindung zwischen dem oberen und dem unteren Grundwasserleiter. Der untere Grundwasserleiter, bestehend aus fluviatil abgelagerten Kiesen und Sanden des Tertiärs, ist 5 bis 19 m mächtig (Vieth et al., 2001). Die Grundwasserverhältnisse im unteren Aquifer sind gespannt. Die Fließrichtung des Grundwassers ist generell nach Norden zum Vorfluter, der Weißen Elster, ausgerichtet.

Die Geländeoberfläche des Referenztestfeldes ist nahezu eben und liegt bei einer Höhe von 149,0 bis 149,5 m HN (Ruske et al., 2001). Das Grundwassergefälle beträgt in der Umgebung des Standortes 0,5 ‰, weist jedoch in Abhängigkeit von den ortsspezifischen Lagerungsverhältnissen und der Wechselwirkung zwischen den verschiedenen grundwasserleitenden Schichten teilweise erhebliche Differenzierungen auf.

#### **2 Geschichte des Hydrierwerks Zeitz**

In Zeitz wurden seit 1939 in großtechnischen Verfahren Treibstoffe, Schmieröle, Benzol und Paraffine auf der Basis der Braunkohlehydrierung produziert. Seit 1974 wurde die Produktion auf den Rohstoff Erdöl ausgeweitet. Die im Rahmen des RETZINA-Projektes untersuchte BTEX-Schadstofffahne befindet sich im Abstrom der Benzolanlage, in der von 1963 bis 1990 rund 777.000 t Benzol gewonnen wurden (Ruske et al., 2001). Die Rohstoffe für die Benzolgewinnung waren Leicht- und Kondensatöle, die nach dem IG-TTH-Verfahren (Tief-Temperatur-Hydrierung) aus Braunkohlenschwelteeren am Wolframsulfid/Nickelsulfid-Katalysator gewonnen wurden. Aufgrund des hohen Gehalts des Leichtöls an Schwefel-, Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen war eine vorherige Abtrennung dieser Heteroatome notwendig (HTM-Verfahren). Die Benzolgewinnung erfolgte durch wiederholte Destillation und Kondensation in Destillierkolonnen. Bedingt durch Havarien im Produktionsprozess, Leckagen an Produktionseinrichtungen sowie auf Grund von Schäden durch Bombeneinwirkungen während des zweiten Weltkrieges (v.a. 1944/45) wurde in verschiedenen Bereichen des Betriebsgeländes der Untergrund kontaminiert. Untersuchungen am Standort zeigten sowohl im oberen als auch im unteren Grundwasserleiter großflächige Kontaminationen des Grundwassers und das Vorhandensein von

Schadstoffphasen. Im oberen Grundwasserleiter wurden maximale BTEX-Gehalte bis  $1 \text{ g l}^{-1}$  nachgewiesen (Anhang B-3), im tertiären Grundwasserleiter wurden noch bis zu  $100 \text{ mg l}^{-1}$  BTEX gemessen (Vieth et al., 2003b). In beiden Grundwasserleitern konnten nur geringe Sauerstoffgehalte ( $< 1 \text{ mg l}^{-1}$ ) gemessen werden. Innerhalb der BTEX-Fahne des oberen Grundwasserleiters wurden Methankonzentrationen bis zu  $15 \text{ mg l}^{-1}$  gemessen (Fischer, 2003). Die Sulfatgehalte im unbelasteten Grundwasser betragen bis zu  $1 \text{ g l}^{-1}$ , in stark BTEX-kontaminierten Zonen wurden nur noch wenige  $\text{mg l}^{-1}$  Sulfat bestimmt (Vieth et al., 2003a). Nitrat und Eisen konnten, unabhängig von der BTEX-Konzentration der Messstellen, nur in geringen Konzentrationen im Grundwasser nachgewiesen werden.

### **3 Grundwassermessstellen am Standort Zeitz**

Die am Standort vorhandenen Messstellen wurden zwischen 1980 und 2002 errichtet, wobei der Großteil der Ausbauten nach 1999 erfolgte. Die Messstellen des oberen Grundwasserleiters wurden mit HDPE-Vollrohr ( $\varnothing 150 \text{ mm}$ ) ausgebaut. Im Bereich des Grundwasserleiters sind quer geschlitzte Filterrohre vorhanden. Zwischen Messstellenaussenkante und HDPE-Vollrohr bzw. Filterrohr wurde in grundwasserstauenden Schichten Ton und in grundwasserleitenden Bereichen Filterkies verfüllt. In Messstellen, die später mit Multilevelpackersystemen ausgerüstet wurden, sind innerhalb der grundwasserführenden Schicht weitere Tonringe in den Filterkies eingelassen. Die Multilevelpackersysteme (MLPS) ermöglichen eine tiefenorientierte Grundwasserprobenahme (Ptak et al., 2000). Das MLPS ist ein nicht elastischer, doppelwandiger Packer, der in die Messstelle eingebracht und mit Wasser oder Luft gefüllt werden kann. Der Packer nimmt das gesamte Innere des Pegelrohrs ein, wodurch Vertikalströmungen und Belüftungseffekte in der Messstelle vermieden werden. Die MLPS werden mit Überdruck an die Filterinnenwand gepresst und sind durch Membranen rundum abgedichtet. Die äußere Packermembran besteht aus chemisch inerter PE-Folie und die innere Membran aus gewebeverstärktem Kunststoffmaterial. Die Probenahmesysteme, wie Pumpen und Schläuche, sind zwischen den beiden Packermembranen angebracht, wobei die Probenahmeports nach außen reichen.

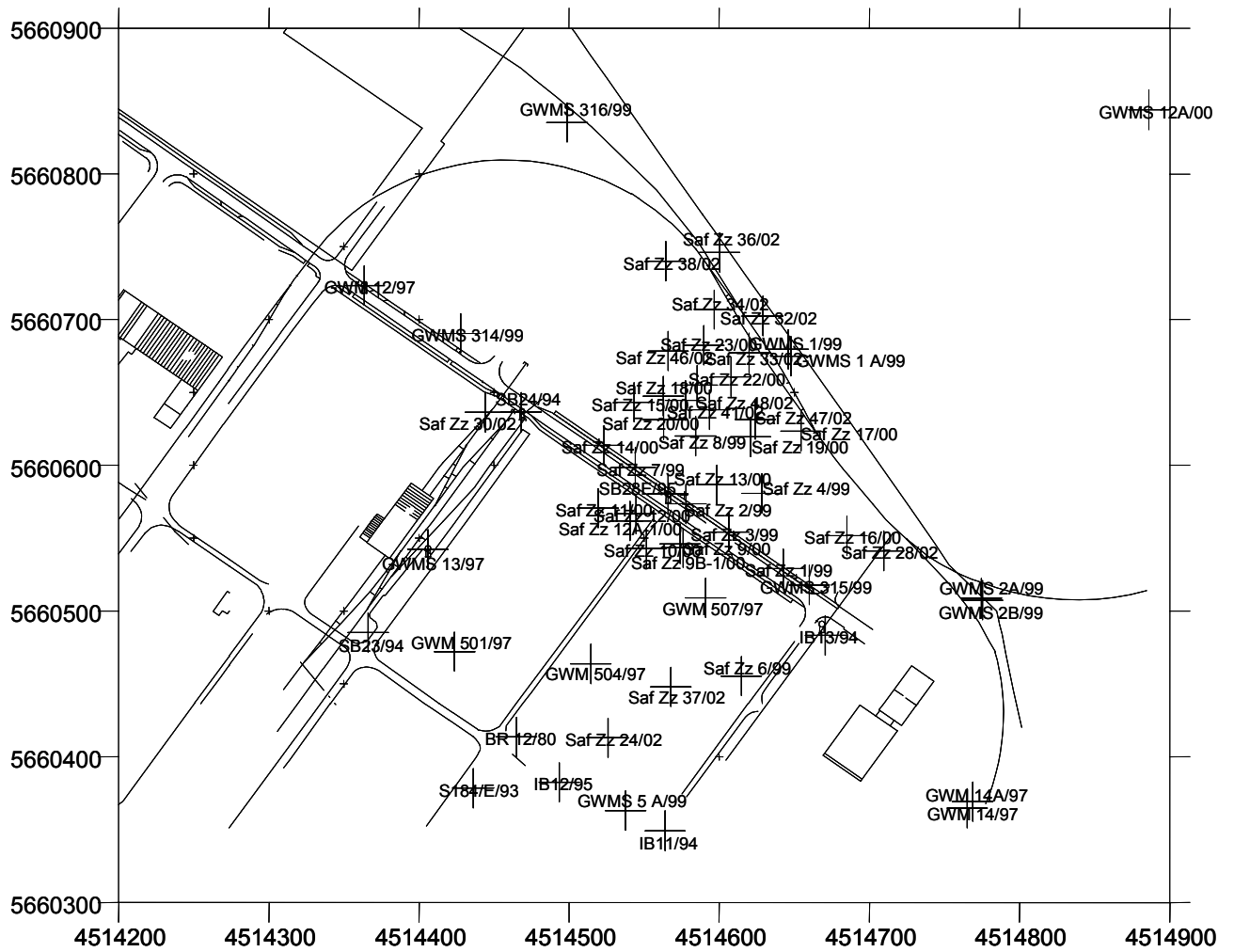
### **4 Probenahme am Standort Zeitz**

Die Förderung des Grundwassers erfolgte mit einer elektrischen Tauchpumpe (Grundfos MP1, Bjerringbro, Dänemark), die jeweils in den verfilterten Bereich der Grundwassermessstelle eingehängt wurde. Vor der Probenahme war mindestens das zweifache Messstellenvolumen an Wasser gepumpt worden. Konzentrationen an gelöstem Sauerstoff, Temperatur, pH-Wert, Redoxpotential und Leitfähigkeit wurden während der Probenahme mit geeigneten Elektroden (Oxi 325, LF 325, pH 330, pH 196T; WTW, Germany) erfasst.

Die Probenahme in den MLPS-Messstellen erfolgte mit Doppelventil-Gasverdrängungspumpen, die elektropneumatisch gesteuert wurden. Die Druckeinstellung bzw. Takt- und Pausenzeit für die Druckbeaufschlagung waren so reguliert, dass eine gleichmäßige und blasenfreie Grundwasserförderung gewährleistet war. Die Druckluftpumpen arbeiteten mit einer Förderleistung



von 7 bis 20 ml min<sup>-1</sup>. Die Lage der Messstellen, die im oberen Grundwasserleiter verfiltriert sind und während verschiedener Kampagnen beprobt wurden, ergibt sich aus der Abbildung A-1.



**Abbildung A-1** Lage und Bezeichnung der Messstellen, die im oberen Grundwasserleiter verfiltriert sind, am Standort Zeitz

## **A-2 Standort Chemische Reinigung, Leipzig**

### **1 Hydrogeologische Verhältnisse und Kontaminationssituation**

Der Standort liegt am Rand der Weißen Elster–Luppe-Aue im Nordwesten der Stadt Leipzig. In ca. 400 m Entfernung in Grundwasserfließrichtung befindet sich der Auensee. Der Standort zeichnet sich aus durch zwei Grundwasserleiter. Der obere, quartäre Grundwasserleiter ist im Untersuchungsgebiet 1 bis 7 m mächtig und besteht aus fluviatilen Sanden und Kiesen der Saale- und Weichsel-Vereisungen (Vieth et al., 2003c). Im oberen Grundwasserleiter wurden hydraulische Leitfähigkeiten von  $8 \times 10^{-4}$  bis  $3 \times 10^{-3} \text{ m s}^{-1}$  bestimmt (Müller, 2001). Der untere Grundwasserleiter besteht aus sandigen Ablagerungen des Oligozäns mit einer Mächtigkeit zwischen 4 und 18 m und einer hydraulischen Leitfähigkeit von  $5 \times 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$  (Müller, 2001). Die Grundwasserfließrichtung ist nach SW. Der Grundwasserstauer besteht aus Ton und ist teilweise mit Braunkohle durchsetzt. In den Bereichen, in denen Tonhorizonte nicht ausgeprägt sind, ist mit einer direkten hydraulischen Verbindung zwischen den beiden Grundwasserleitern zu rechnen. Mit zunehmender Annäherung an den Auensee keilen die grundwasserstauenden Schichten aus, im Bereich östlich des Auensees sind die beiden Grundwasserleiter hydraulisch kurzgeschlossen. Das Gelände der Chemischen Reinigung fällt von ca. 108 m ü.NN leicht aber stetig auf ca. 105 m ü.NN ab.

Am Standort wurde von 1892 bis 1991 eine chemische Reinigung betrieben. Durch den Produktionsprozess, Havarien und unsachgemäße Deponierung von Reinigungsschlämmen kam es zu einer starken Kontamination beider Grundwasserleiter. Im oberen Grundwasserleiter konnte PCE und TCE in Konzentrationen bis 168 bzw. 45  $\text{mg l}^{-1}$  nachgewiesen werden (Vieth et al., 2003c). Im unteren Grundwasserleiter wurden PCE- und TCE-Konzentrationen bis zu 138 bzw. 54  $\text{mg l}^{-1}$  detektiert. Die Konzentrationen des VC wurden in den Grundwasserproben nicht bestimmt.

### **2 Grundwassermessstellen und Probenahme am Standort Chemische Reinigung**

Am Standort wurden 8 Messstellen, 4 Messstellen in jedem Grundwasserleiter, für die Beprobung ausgewählt. Sie liegen entlang der Grundwasserfließrichtung, ausgehend vom Betriebsgelände der chemischen Reinigung bis in 300 m Entfernung (Vieth et al., 2003c). Hinsichtlich des Ausbaus unterscheiden sich die Messstellen, doch sind sie jeweils nur in einem der beiden Grundwasserleiter verfiltert.

Die Probenahme erfolgte mit Hilfe einer elektrischen Tauchpumpe (MP1, Grundfos, Deutschland) nachdem bereits das doppelte Volumen der Grundwassermessstelle an Wasser abgepumpt worden war. Während der Probenahme wurden Temperatur, Leitfähigkeit, pH-Wert, Redoxpotential und Sauerstoffgehalt des Grundwassers mit entsprechenden Elektroden (MultiLine P4, WTW, Deutschland) bestimmt.

## **A-3 Gaswerkstandort Testfeld Süd**

### **1 Hydrogeologische Standortverhältnisse und Kontaminationssituation**

Der Standort befindet sich in der quartären Talaue des Neckars, im nordöstlichen Stadtgebiet von Stuttgart. Der Grundwasserleiter ist hauptsächlich aus Mittelkies mit einem räumlich wechselnden Anteil feinerkörnigen Materials aufgebaut und von Auelehmen und/oder einer anthropogenen Auffüllung überlagert. Der unterliegende Grundwasserstauer besteht aus Ton- und Mergelsteinen des unteren und mittleren Gipskeupers. Im Liegenden folgen weiter der Lettenkeuper mit einer Mächtigkeit von ca. 20 m und schließlich Karbonate des oberen Muschelkalkes (Herfort et al., 1998). Lokal begrenzt ist mit dem Einstrom hochmineralisierten Wassers aus dem oberen Muschelkalk zu rechnen. Insgesamt zeichnet sich der Standort durch einen sehr heterogenen Untergrund aus. Der Grundwasserflurabstand beträgt im Mittel rund 4 m (Herfort et al., 1998).

Die Kontamination des oberen Grundwasserleiters umfasst alle gaswerkstypischen Schadstoffe wie BTEX, PAK, Phenole und Cyanide. Am Standort sind mehrere Kontaminationsherde (reine Schadstoffphasen) und eine Schadstofffahne, mit einer derzeitig bekannten Länge von rund 300 m kartiert worden (Herfort et al., 1998). Im Schadensherd liegt eine in ihrer Zusammensetzung sehr komplexe, heterogen verteilte residuale Teerphase vor. Es handelt sich um ein Gemisch von organischen Schadstoffen. Aufgrund der Alterung der residualen Phasenkörper im Schadensherd sind heute für die Grundwasserkontamination im Abstrom vor allem persistente Schadstoffe von Interesse, die noch in erheblichen Mengen im Schadensherd durch Lösung ins Grundwasser freigesetzt, aber in geringem Maße abgebaut werden (z.B. Acenaphthen) (Zamfirescu und Grathwohl, 1998).

Im Bereich der Kontamination ist von anaeroben Redoxbedingungen auszugehen, die Konzentrationen des gelösten Sauerstoffs liegen im Bereich der Nachweisgrenze ( $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ ), Nitrat wurde nur in randlichen Bereichen der Schadstofffahne nachgewiesen, die Sulfatgehalte sinken innerhalb der Kontamination von  $900 \text{ mg l}^{-1}$  (Anstrom) auf  $30 \text{ mg l}^{-1}$  im Bereich der Kontaminationsherde. Mit zunehmender Entfernung zur Schadstoffquelle steigen die Sulfatgehalte des Grundwasser wieder an (Griebler et al., 2003).

### **2 Ausbau der Grundwassermessstellen und Probenahme am Testfeld Süd**

Für die Monitoringkampagne wurden 15 Messstellen ausgesucht, die vollständig im oberen Grundwasserleiter verfiltert sind und sich im Bereich zweier Schadstoffphasen und der abstromig vorhandenen Kontaminationsfahne befinden (Griebler et al., 2003). Grundwasser wurde mit Hilfe einer elektrischen Tauchpumpe (MP1, Grundfos, Bjerringbro, Denmark) gefördert, die Probenahme begann nachdem ein Grundwasservolumen, das mindestens dem Messstellenvolumen entspricht, gefördert worden war. Grundwasser für die Bestimmung der Kohlenstoffisotopenverhältnisse der BTEX und PAK wurde in 500 ml Braunglasflaschen gefüllt und ohne Gasraum mit Schraubkappen verschlossen, in denen teflonbeschichtete Septen eingelegt waren. Proben wurden bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.

## **A-4 Bestimmung substanzspezifischer Isotopenverhältnisse organischer Verbindungen**

### **1 Probenaufbereitung**

Für die Bestimmung substanzspezifischer Isotopenverhältnisse organischer Schadstoffe wurde Grundwasser in 1000 ml Schott-Duran-Flaschen gefüllt, welche mit Schraubkappen inklusive teflonbeschichtetem Septum verschlossen wurden. Die Grundwasserprobe wurde mit 2 – 3 Plätzchen NaOH versetzt, um einen pH-Wert im Bereich zwischen 10 und 12 zu erreichen (Hemmung der mikrobiellen Aktivität), und bei 4°C gelagert. In Abhängigkeit von der Schadstoffkonzentration innerhalb der Probe wurden für die Extraktion der organischen Substanzen 2 bis 10 ml n-Pentan zugegeben. Die Extraktion organischer Schadstoffe mit Pentan hat nachweislich keinen signifikanten Effekt auf die Isotopenverhältnisse der Analyten (Dempster et al., 1997). Die Proben wurden für mindestens 2 Stunden auf einen Horizontalschüttler gelegt, bevor die Pentanphase abgenommen wurde.

Für die Bestimmung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Methans und  $\text{CO}_2$  wurde Grundwasser in 100 bzw. 200 ml Glasflaschen gefüllt, ein Gasraum von ca. 20 ml wurde in den Flaschen belassen. Die Flaschen wurden mit Butylgummistopfen und Aluminium-Crimpkappen verschlossen. Zur Erhöhung der Gleichgewichtskonzentration in der Gasphase waren rund 10 g NaCl vor der Probenahme in die Glasflaschen gefüllt worden.

### **2 Bestimmung der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte**

Mit der IRM-GC/MS (isotope ratio monitoring-gas chromatography-mass spectrometry) können die Isotopenverhältnisse einzelner Substanzen in komplexen Mischungen erfasst werden. Für die Bestimmung der  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von BTEX, PCE, TCE, Naphthalin, Methylnaphthalin, Methan und  $\text{CO}_2$  wurde ein FinniganMAT 252 (ThermoFinnigan, Deutschland) verwendet. Die zu analysierende Probe (Pentanextrakt bzw. Gasprobe) wurde in den Gaschromatographen (GC) (Agilent 6890 series, Agilent Technologies, USA) injiziert. Die komponentenspezifischen Einstellungen am GC und Angaben zur ausgewählten GC-Säule sowie dem jeweiligen Temperaturprogramm finden sich in Tabelle 1. Der GC war verbunden mit einer Verbrennungseinheit (GC-III, ThermoFinnigan, Deutschland), in der die organischen Substanzen an einem CuO/Ni/Pt-Katalysator bei 940°C bzw. 980°C (chlorierte Verbindungen) zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  oxidiert wurden. Das im Gasstrom befindliche Wasser wird in einer modifizierten Wasserfalle (Nafion<sup>®</sup> Membran, 50 cm lang, T = 0°C) aus dem Gasstrom entfernt. Nach der Wasserfalle folgt das Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (FinniganMAT 252, ThermoFinnigan, Deutschland) in dem die Intensitäten von  $^{44}\text{CO}_2$ ,  $^{45}\text{CO}_2$  und  $^{46}\text{CO}_2$  bestimmt werden. Aus den Verhältnissen von  $^{44}\text{CO}_2$ ,  $^{45}\text{CO}_2$  und  $^{46}\text{CO}_2$  im Vergleich zu einem kalibrierten Referenzgas ( $\text{CO}_2$ ) wird der  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert berechnet. Die Messungen erfolgten mit mindestens 5 Wiederholungen, die Standardabweichung war im Allgemeinen <0,5 ‰, für chlorierte Verbindungen <1 ‰.

**Tabelle 1** Übersicht der verwendeten GC-Säulen und Temperaturprogramme

	<b>BTEX</b>	<b>Chlorierte Ethene</b>	<b>Methan/CO<sub>2</sub></b>
<b>Säulenname</b>	ZB1	ZB1	CP-PoraPLOT
<b>Maße</b>	60 m x 0,32 mm ID x 1 µm FD	60 m x 0,32 mm ID x 1 µm FD	27,5 m x 0,32 mm ID x 10 µm FD
<b>Hersteller</b>	Phenomenex Inc., USA	Phenomenex Inc., USA	Chrompack, NL
<b>Temperaturprogramm</b>	40°C (3 min) 4°C min <sup>-1</sup> 100°C (5 min) 4°C min <sup>-1</sup> - 120°C 20°C min <sup>-1</sup> - 200°C	40°C (6 min) 6°C min <sup>-1</sup> - 200°C	40°C - isotherm

### 3 Bestimmung der $\delta^{34}\text{S}$ -Werte

Für die Bestimmung der Isotopenverhältnisse des Sulfat-Schwefels wurden 500 ml PE-Flaschen mit Grundwasser befüllt. 2 ml Chloroform wurden zugegeben, um die mikrobielle Aktivität zu hemmen. Zur Fällung des vorhandenen Sulfids wurden 0,5 g Zinkacetat zugegeben. Das gelöste Sulfat wurde durch die Zugabe von gesättigter Bariumhydroxidlösung gefällt. Der Niederschlag wurde über einen Blaubandfilter vollständig von der wässrigen Phase getrennt, gewaschen und bei 105°C getrocknet. Die Bestimmung des Sulfatisotopenverhältnisses erfolgte an einem IRM-System (DeltaS, ThermoFinnigan, Deutschland) im Continuous-Flow-Modus. Die Standardabweichung der beschriebenen Analyseverfahren liegt bei 0,3 ‰.

## **A-5 Konzentrationsbestimmungen**

### **1 Bestimmung der BTEX-Konzentrationen**

Grundwasser wurde in 250 ml-Braunglasflaschen gefüllt, die ohne Luftblase mit Schliffstopfen verschlossen wurden. Die Proben wurden bei 4°C gelagert und die BTEX-Konzentrationen innerhalb von 24 Stunden bestimmt. Für die Analytik wurde ein GC-FID (HP 5890 series II, Agilent Technologie, USA) mit Headspace-Autosampler (HP 19395A, Agilent Technologie, USA) verwendet. Die Proben wurden für 40 Minuten bei 80°C temperiert und in den auf 220°C temperierten split/splitless-Injektor eingespritzt. Für die chromatographische Trennung wurde eine HP1-Säule (50 m x 0,32 mm ID x 1µm FD; Agilent Technologies, USA) verwendet. Das Temperaturprogramm startete bei 50°C (1 Min), mit einer Rate von 5°C min<sup>-1</sup> wurde bis auf 120°C geheizt. Nach 8 Minuten bei 120°C wurde mit einer Rate von 10°C min<sup>-1</sup> die Ofentemperatur bis auf 250°C erhöht.

### **2 Bestimmung der Konzentrationen der chlorierten Ethene**

Grundwasser wurde in 250 ml-Braunglasflaschen gefüllt, die ohne Luftblase mit Schliffstopfen verschlossen wurden. Die Proben wurden bei 4°C gelagert. Die Bestimmung der Konzentrationen von PCE, TCE und den DCE erfolgte mit einem GC-FID (Star 3400 CX, Varian, Deutschland). 10 ml Grundwasser wurden in 15 ml-Vials abgefüllt. Die Probenanreicherung erfolgte an einer Festphase (Solid-phase microextraction (SPME); Faser mit 85µm Polyacrylat-Beschichtung), die 25 Minuten in den Gasraum des Probenvials gehalten wurde. Die Desorption von der Faser erfolgte im split/splitless-Injektor (1078 Universal Capillary Injector, Varian, Deutschland) des GC-FID, der auf 250°C temperiert war. Die chromatographische Trennung der Komponenten erfolgte mit einer DB5-Säule (30 m x 0.32mm ID x 1µm FD, J & W Scientific, USA) und dem folgenden Temperaturprogramm: 40°C (5 min) – 10°C min<sup>-1</sup> – 190°C (5 min).

### **3 Bestimmung der Konzentrationen des Methans**

5 ml Grundwasser wurden in 20 ml Headspace-Vials abgefüllt, die mit gasdichten Teflonsepten und Aluminiumkappen verschlossen wurden. Die Bestimmung der Methankonzentration erfolgte an einem GC-FID-System (HP 6890 Plus, Agilent Technologies, USA) mit Headspace-Autosampler (HP 7694, Agilent Technologies, USA). Die Proben wurden 30 Minuten bei 80°C equilibriert. Die Injektortemperatur des GC-FID war 230°C. Die chromatographische Trennung erfolgte über eine AT-Q 13939-Säule (30m x 0,53 mm; Alltech Associates, USA) mit dem folgenden Temperaturprogramm: 35°C (4 min) - 40°C min<sup>-1</sup> - 220°C (5 min). Als Trägergas diente Helium, die Nachweisgrenze des Methans lag bei 10 µg l<sup>-1</sup>.

### **4 Bestimmung der Sulfatgehalte**

Grundwasser wurde durch einen Cellulose-Acetat-Filter (0,45 µm) filtriert, in 20 ml PE-Flaschen abgefüllt und bei 4°C gelagert. Die Konzentrationen wurden ionenchromatographisch bestimmt (Dx-500, Dionex, Deutschland). Dieses System besteht aus einem AS40-Autosampler, einer

GB40-Gradientenpumpe, einem LC10-Chromatographiemodul und einem CD20-Leitfähigkeitsdetektor. Die chromatographische Trennung erfolgte über eine IonPac AS14 Analytische Trennsäule. Als Eluent wurde ein Gemisch aus 3,5 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 1mM NaHCO<sub>3</sub> genutzt, mit einer Flussrate von 1,2 ml min<sup>-1</sup>. Die Nachweisgrenze des Ionenchromatographie-systems liegt für Sulfat bei 1 mg l<sup>-1</sup>.

## **A-6 Untersuchungen zur Isotopenfraktionierung durch Sorption**

### **1 Einstufiger Sorptionsversuch (Batchexperiment)**

Zu einer Suspension aus 60 g Roth-Huminsäure in 600 ml Millipore-Wasser und einer rein wässrigen Lösung wurde eine methanolische Stammlösung von Cyclohexan und Toluol gegeben. Der Wasseransatz wurde in dreifacher Weise, der Huminsäureansatz in doppelter Weise ausgeführt (Voskamp, 2003). Nach Schütteln der Proben über einen Zeitraum von 24 h wurden die Konzentrationen des nicht sorbierten Cyclohexans und Toluols mit einem GC-MS bestimmt (QP-5000, Shimadzu). Die chromatographische Trennung erfolgte über eine DB1-Säule (30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm FD, J&W Scientific, USA) bei 40°C (isotherm). Des Weiteren wurden die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Cyclohexans und Toluols bestimmt (siehe Anhang A-4). Die chromatographische Trennung erfolgte über eine DB1-Säule (60 m x 0,32 mm ID, 0,5 µm FD, J&W Scientific, USA). Das Temperaturprogramm war wie folgt: 40 °C (4 min) – 6 °C min<sup>-1</sup> - 150°C – 15 °C min<sup>-1</sup> - 200°C.

### **2 Isotopenfraktionierungsexperimente mit einer RP-HPLC-Säule**

Der Peak von Naphthalin wurde nach Elution über eine RP-HPLC-Säule in Fraktionen getrennt und die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Naphthalins in den einzelnen Fraktionen bestimmt. 200 µl einer 5 g l<sup>-1</sup> Naphthalin enthaltenden Lösung wurden in ein HPLC-System (Series 1100, Hewlett Packard) mit Diodenarraydetektor (DAD) injiziert. Die Flussrate des Eluenten aus Acetonitril/ Wasser (50:50 Vol/ Vol) betrug 1 ml min<sup>-1</sup> (Voskamp, 2003). Als Säule wurde eine RP-HPLC-Säule mit oberflächlich gebundenen C<sub>18</sub>-Gruppen verwendet (Alltech Adsorbosphere XL C18 5U; 250 mm x 4,6 mm). Die eluierende Probe wurde nach der Passage durch den DAD aufgefangen und in gleichen Intervallen manuell in 40 Fraktionen aufgetrennt. Eine Fraktion bestand aus 10 Tropfen. Die so erhaltenen Fraktionen wurden mit je 100 µl n-Hexan extrahiert (Voskamp, 2003). Der Gehalt an Naphthalin in den Fraktionen wurde durch GC-MS-Analyse (QP 5000, Shimadzu) über eine DB1-Säule (30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm FD, J&W Scientific, USA) bei 120°C (isotherm) bestimmt. Die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Naphthalins in den Hexanextrakten der einzelnen Fraktionen wurde mit IRM-GC/MS (siehe Anhang A-4) bestimmt. Die chromatographische Trennung erfolgte über eine DB1-Säule (60 m x 0,32 mm ID, 0,5 µm FD, J&W SCIENTIFIC, USA) mit dem folgenden Temperaturprogramm 70°C (2 min) – 8°C min<sup>-1</sup> – 250°C (1 min).

### **3 Isotopenfraktionierungsexperiments mit der Huminsäuresäule**

#### **3.1 Präparation der Huminsäuresäule**

Zur Präparation eines Säulenfüllmaterials, an das die Huminsäure kovalent gebunden ist, wurde eine Beschreibung aus der Literatur genutzt (Yang und Koopal, 1999). Die Oberfläche von 10 g Nucleosil 50-10 (10 µm Korngröße, Macherey-Nagel) wurde gereinigt und im Vakuum bei 120°C 4 Stunden lang getrocknet. Das getrocknete SiO<sub>2</sub> wurde zu einer 2%igen Lösung von 3-Aminopropyl-dimethylethoxysilan in Toluol gegeben. Nach Filtration wurde der Feststoff bei 160°C für 6 Stunden getrocknet. 1,7 g Roth-Huminsäure wurde in Wasser gelöst, der pH-Wert



mit NaOH auf pH 10 gebracht. Der Feststoff wurde in dieser Lösung aufgeschlämmt und zentrifugiert. Das feuchte, huminsäurebeladene SiO<sub>2</sub> wurde in einer Lösung von Na-Acetat und N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid suspendiert und zentrifugiert, gewaschen und gefriergetrocknet (Voskamp, 2003). Dieses Material wurde durch die Firma MZ Analysetechnik (Mainz) in Methanol bei 350 bar in eine HPLC-Säule mit 250 mm Länge und 4,6 mm Durchmesser gepackt (Nielsen et al., 1997).

### 3.2 Chromatographische Trennung von o-Xylol, Benzol und 2,4-DMP

Die Peaks von Benzol, o-Xylol und 2,4-DMP wurden nach Elution über die Huminsäuresäule in einzelne Fraktionen getrennt und die Konzentrationen und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der einzelnen Substanzen bestimmt. In drei getrennten Versuchen wurden 25  $\mu\text{l}$  einer 1 g l<sup>-1</sup> Benzol enthaltenen wässrigen Lösung bzw. 50  $\mu\text{l}$  einer 150 mg l<sup>-1</sup> o-Xylol enthaltenen wässrigen Lösung bzw. 25  $\mu\text{l}$  einer 1 g l<sup>-1</sup> 2,4-DMP enthaltenen wässrigen Lösung in das HPLC-System mit der Huminsäuresäule injiziert. Als Eluent wurde Millipore-Wasser verwendet. Die Flussrate betrug 1 ml min<sup>-1</sup> (Voskamp, 2003).

Die resultierenden Peaks wurden nach Durchgang durch den DAD in einzelnen Fraktionen getrennt und die organischen Substanzen mit 100  $\mu\text{l}$  n-Pentan (für Benzol und o-Xylol) bzw. 100  $\mu\text{l}$  Benzol (für 2,4-DMP) extrahiert. Ein Aliquot der Extrakte wurde zunächst mittels eines GC-MS-Gerätes (QP 5000, Shimadzu) analysiert, um die Konzentrationen des Analyten zu bestimmen (Voskamp, 2003). Der Injektor hatte eine Temperatur von 200°C (Benzol, o-Xylol) bzw. 250°C (2,4-DMP). Für die chromatographische Trennung wurde eine DB1-Säule (30 m x 0,25 mm ID x 0,25  $\mu\text{m}$  FD, J&W Scientific, USA) verwendet. Die Analytik des Benzols verlief isotherm bei 50°C, für o-Xylol isotherm bei 70°C und für 2,4-DMP isotherm bei 120°C.

Für eine Auswahl dieser Proben wurden  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte bestimmt (s. Anhang A-4). Die chromatographische Trennung erfolgte über eine RTX-5-Säule (60 m x 0,32 mm ID x 0,5  $\mu\text{m}$  FD). Die verwendeten Temperaturprogramme sind aus Tabelle 2 ersichtlich.

**Tabelle 2** Übersicht der verwendeten substanzabhängigen Temperaturprogramme am IRM-GC/MS

Substanz	Benzol	o-Xylol	2,4-DMP
Temperaturprogramm	40°C (4 min) 4°C min <sup>-1</sup> - 85°C 20°C min <sup>-1</sup> - 150°C	60°C (4 min) 4°C min <sup>-1</sup> - 105°C 20°C min <sup>-1</sup> - 150 °C	85°C (12 min) 8°C min <sup>-1</sup> - 190°C

## A-7 Literaturverzeichnis (Material und Methoden)

- Dempster, H.S., Lollar, B.S. und Feenstra, S., (1997). Tracing organic contaminants in groundwater: A new methodology using compound-specific isotopic analysis. *Environmental Science & Technology*, 31(11): 3193-3197.
- Fischer, A., (2003). Charakterisierung der Quellen und Senken des Methans durch Isotopenanalyse in einem BTEX-kontaminierten Grundwasserleiter. Diplomarbeit, TU Bergakademie Freiberg, Freiberg.
- Griebler, C., Vieth, A., Richnow, H.H. und Meckenstock, R.U., (2003). Strategies for the assessment of anaerobic in situ biodegradation of aromatic hydrocarbons (BTEX and PAH) - I. Determination of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  stable isotope fractionation in laboratory and field studies. *Environmental Science & Technology*, eingereicht.
- Herfort, M., Ptak, T., Hümmer, O., Teutsch, G. und Dahmke, A., (1998). Testfeld Süd: Einrichtung der Testfeldinfrastruktur und Erkundung hydraulisch-hydrogeochemischer Parameter des Grundwasserleiters. *Grundwasser*, 3(4): 159-166.
- Müller, J., (2001). Hydrogeologische, hydro- und isotopenchemische Untersuchungen im kontaminierten Grundwasserbereich des Auensees, Stadtgebiet Leipzig. Diplomarbeit, TU Dresden, Dresden, 125 S..
- Nielsen, T., Siigur, K., Helweg, C., Jorgensen, O., Hansen, P.E. und Kirso, O., (1997). Sorption of polycyclic aromatic compounds to humic acid as studied by high-performance liquid chromatography. *Environmental Science & Technology*, 31: 1102-1108.
- Ptak, T., Schirmer, M. und Teutsch, G., (2000). Development and performance of a new multi-level groundwater sampling system. In: G.B. Wickramanayake, A.R. Gavaskar, M.E. Kelley and K.W. Nehring (Editors), *The second international conference on remediation of chlorinated and recalcitrant compounds*. Battelle Press, Monterey, California, pp. 95-102.
- Ruske, R., Böhme, O. und Falke, P., (2001). Dokumentationsbericht Geo-Standortmanagement SAFIRA Zeitz, Geologische Forschung und Erkundung - GFE GmbH, Halle (Saale).
- Vieth, A., Fischer, A., Kästner, M., Gehre, M., Knoeller, K., Wachter, T., Dahmke, A. und Richnow, H.H., (2003a). Isotope fractionation processes used to characterise natural attenuation of organic contaminants, ConSoil 2003, Gent, Belgium.
- Vieth, A., Kästner, M., Morasch, B., Meckenstock, R.U. und Richnow, H.H., (2001). Charakterisierung des biologischen Abbaus von BTEX im Grundwasser über Isotopenfraktionierung - Feldstudien. *TerraTech*(5): 37-41.
- Vieth, A., Kästner, M., Schirmer, M., Weiss, H., Gödeke, S., Meckenstock, R.U. und Richnow, H.H., (2003b). In-situ biodegradation of benzene and toluene in a contaminated aquifer monitored by stable isotope fractionation. *Environmental Science & Technology*, eingereicht.
- Vieth, A., Müller, J., Strauch, G., Kästner, M., Gehre, M., Meckenstock, R.U. und Richnow, H.H., (2003c). Characterisation of in-situ biodegradation of tetrachloroethene (PCE) and trichloroethene (TCE) in contaminated aquifers monitored by stable isotope fractionation. *Isotopes in Environmental Health Studies*, 39(2): angenommen.
- Voskamp, M., (2003). Doktorarbeit, Universität Leipzig, Leipzig.

- Yang, Y.H. und Koopal, L.K., (1999). Immobilisation of humic acids and binding of nitrophenol to immobilised humics. *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical Engineering Aspects*, 151: 201-212.
- Zamfirescu, D. und Grathwohl, P., (1998). Schadstoffemission durch Desorption und Lösung standortspezifischer organischer Verbindungen im Schadenszentrum, Testfeld Süd. *Grundwasser*, 3(4): 167-174.

## B Nicht publizierte Ergebnisse

### B-1 Isotopenfraktionierung durch mehrstufige Sorption (Huminsäuresäule)

**Tabelle 1** Angabe der Retentionszeit, der Signalintensität (GC/MS) und der Kohlenstoffisotopenverhältnisse des Benzols in den verschiedenen Fraktionen des Peaks bei Elution über die Huminsäuresäule

Probe	Retentionszeit (min)	counts (m/z 78)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Standard- abweichung
B2	4,40	0	n.b.	
B3	4,50	10,30	n.b.	
B4	4,60	9,63	-24,05	0,15
B5	4,70	17,28	-25,52	0,66
B6	4,80	11,02	-26,78	1,35
B7	4,90	8,52	-27,00	0,42
B8	5,00	2,83	-27,86	0,12
B9	5,10	1,23	-27,29	0,23
B10	5,20	1,57	-27,75	0,39
Summe		62,38		
Ausgangskemikalie			-25,99	0,12

**Tabelle 2** Angabe der Retentionszeit, der Signalintensität (GC/MS) und der Kohlenstoffisotopenverhältnisse des o-Xylols in den verschiedenen Fraktionen des Peaks bei Elution über die Huminsäuresäule

Probe	Retentionszeit (min)	counts (m/z 106)	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Standard- abweichung
X2	9,50	2,15	n.b.	
X4	9,70	3,40	-20,24	0,54
X5	9,80	3,38	-21,48	2,39
X6	9,90	6,27	-21,72	
X7	10,00	10,08	-23,75	0,15
X8	10,10	15,57	-26,23	0,83
X9	10,20	7,02	-27,86	0,45
X10	10,30	4,57	-28,37	0,25
X13	11,30	5,91	-31,38	0,67
X16	12,30	2,66	-32,13	0,06
Summe		61,01		
Ausgangskemikalie			-29,11	0,11

**Tabelle 3**

Angabe der Retentionszeit, der Signalintensität (GC/MS) und der Kohlenstoffisotopenverhältnisse des 2,4-DMP in den verschiedenen Fraktionen des Peaks bei Elution über die Huminsäuresäule

<b>Probe</b>	<b>Retentionszeit (min)</b>	<b>counts (m/z 122)</b>	<b><math>\delta^{13}\text{C}</math> (‰)</b>	<b>Standard- abweichung</b>
D2	5,55	65,8	-17,78	0,36
D3	5,65	500,1	-22,06	0,23
D4	5,75	939,5	-21,97	0,01
D5	5,85	1453,8	-23,56	0,40
D6	5,95	1337,4	-24,14	0,12
D7	6,05	1139,8	-24,49	
D8	6,15	835,8	-25,47	0,19
D10	6,35	435,6	-25,51	0,47
D12	6,55	505,3	-25,08	0,51
D14	6,75	385,7	-24,62	0,24
D16	7,05	534,3	-24,73	0,25
D18	7,45	402,2	n.b.	
D20	7,85	231,4	-24,90	0,32
Summe		8766,7		
Ausgangskemikalie			-23,11	0,28

## B-2 Probenahmekampagne am Standort Chemische Reinigung, Leipzig (Februar 2002)

**Tabelle 1** Konzentrationen und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für PCE und TCE in Grundwasserproben von den Messstellen des oberen Grundwasserleiters am Standort Chemische Reinigung im Februar 2002

Messstelle (oberer GWL)	Ent- fernung (m)	PCE			TCE		
		Konzentration (mg l <sup>-1</sup> )	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Standard- abweichung	Konzentration (mg l <sup>-1</sup> )	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Standard- abweichung
Au 3/l	40	141,80	-26,22	0,21	30,15	-26,19	0,47
Au 34/l	100	3,18	-23,30	0,12	3,52	-27,03	0,35
Au 38/l	190	0,09	-18,05	0,46	0,35	-17,05	0,46
Au 44/l	315	1,73	-21,98	0,30	3,16	-24,54	0,24

**Tabelle 2** Konzentrationen und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für PCE und TCE in Grundwasserproben von den Messstellen des unteren Grundwasserleiters am Standort Chemische Reinigung im Februar 2002

Messstelle (unterer GWL)	Ent- fernung (m)	PCE			TCE		
		Konzentration (mg l <sup>-1</sup> )	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Standard- abweichung	Konzentration (mg l <sup>-1</sup> )	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Standard- abweichung
Au 42	0	97,15	-27,75	0,42	40,09	-26,39	0,51
Au 34/V	100	2,78	-29,46	0,48	1,90	-27,00	0,19
Au 38/V	190	66,85	-29,14	0,58	14,87	-28,42	0,23
Au 44V	315	13,91	-27,51	0,22	4,22	-28,39	0,17

### B-3 Probenahmekampagne (Dezember 2002) am Standort Hydrierwerk Zeitz

**Tabelle 1** Konzentrationen und  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte des Benzols in integriert und tiefenorientiert genommenen Grundwasserproben vom Standort Zeitz (Dezember 2002)

Probe	Tiefe (m u GOK)	Konzentration ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	Standard- abweichung
GWM 314/99	integriert	3050	-25,98	0,07
GWM 315/99	integriert	136000	-27,96	0,10
GWM 504/97	integriert	843000	-29,48	0,40
GWM 507/97	integriert	451000	-27,52	0,27
Saf Zz 10/00	12,6	3100	-29,25	0,24
Saf Zz 10/00	13,6	26000	-27,99	0,16
Saf Zz 10/00	15	43000	-27,90	0,10
Saf Zz 10/00	16,6	58000	-27,53	0,19
Saf Zz 11/00	10,4	1510	-28,60	0,20
Saf Zz 11/00	12,5	1170	-28,84	0,11
Saf Zz 11/00	14	6270	-28,77	0,10
Saf Zz 11/00	14,4	929	-28,71	0,05
Saf Zz 11/00	15,3	6740	-28,68	0,15
Saf Zz 11/00	16,5	725	-29,17	0,15
Saf Zz 12/00	13,9	38600	-28,70	0,27
Saf Zz 12/00	15,3	75500	-28,49	0,16
Saf Zz 12/00	16,9	23300	-28,66	0,19
Saf Zz 12/00	19,1	9500	-27,04	0,10
Saf Zz 12A-1/00	8,7	71500	-28,35	0,05
Saf Zz 12A-1/00	9,5	157000	-28,42	0,11
Saf Zz 12A-1/00	10,8	195000	-28,77	0,11
Saf Zz 13/00	9,2	106000	-28,88	0,04
Saf Zz 13/00	10,3	71100	-28,95	0,07
Saf Zz 13/00	11,9	247000	-28,95	0,06
Saf Zz 13/00	12,8	165000	-29,03	0,24
Saf Zz 14/00	15,5	63	-27,88	0,25
Saf Zz 15/00	9	34	-28,07	0,36
Saf Zz 15/00	9,7	110	-23,44	0,06
Saf Zz 16/00	10	48	-27,16	0,58
Saf Zz 16/00	11	44	-27,90	0,31

Saf Zz 18/00	10,5	82200	-28,51	0,11
Saf Zz 18/00	11,5	94900	-28,81	0,14
Saf Zz 18/00	12,8	117000	-28,51	0,12
Saf Zz 18/00	13,8	184000	-28,74	0,11
Saf Zz 18/00	integriert	114000	-28,54	0,16
Saf Zz 19/00	11,8	384000	-28,30	0,09
Saf Zz 19/00	12,8	347000	-28,36	0,10
Saf Zz 19/00	14	70400	-28,09	0,11
Saf Zz 2/99	10,5	554000	-28,14	0,45
Saf Zz 2/99	11,5	1150000	-28,51	0,02
Saf Zz 2/99	12,5	1160000	-28,16	0,50
Saf Zz 2/99	integriert	84600	-28,85	0,35
Saf Zz 20/00	16,5	73	-25,89	0,25
Saf Zz 22/00	11,4	96	-28,15	0,61
Saf Zz 22/00	13,2	54200	-28,00	0,13
Saf Zz 22/00	15	51600	-27,88	0,06
Saf Zz 22/00	integriert	139000	-28,53	0,07
Saf Zz 23/00	10,2	60400	-26,91	0,10
Saf Zz 23/00	11,2	137000	-27,68	0,07
Saf Zz 23/00	13	186000	-28,65	0,05
Saf Zz 23/00	14,5	195000	-28,66	0,12
Saf Zz 23/00	16,3	176000	-28,47	0,08
Saf Zz 23/00	integriert	105000	-28,54	0,15
Saf Zz 28/02	9	279	-26,06	0,39
Saf Zz 28/02	11	136	-27,71	0,18
Saf Zz 28/02	11,5	46	-23,81	0,52
Saf Zz 3/99	11	381000	-28,56	0,16
Saf Zz 3/99	12,5	863000	-28,52	0,13
Saf Zz 3/99	13,5	646000	-28,67	0,11
Saf Zz 3/99	14,5	735000	-28,61	0,13
Saf Zz 32/02	10,5	230	-27,60	0,32
Saf Zz 32/02	15,5	46000	-27,90	0,15
Saf Zz 32/02	integriert	7290	-28,49	0,15
Saf Zz 33/02	integriert	11300	-28,33	0,09
Saf Zz 4/99	11	1160	-30,42	1,67
Saf Zz 4/99	12,5	1240	-25,75	1,49
Saf Zz 4/99	13,5	6350	-24,84	0,15



Saf Zz 4/99	14,5	4670	-24,76	0,05
Saf Zz 41/02	10,4	9300	-27,98	0,09
Saf Zz 41/02	11,2	6200	-27,75	0,10
Saf Zz 41/02	12	7420	-27,97	0,10
Saf Zz 41/02	integriert	9910	-28,24	0,14
Saf Zz 47/02	10,5	20700	-28,10	0,09
Saf Zz 47/02	11	155000	-28,06	0,55
Saf Zz 47/02	11,5	163000	-27,70	0,44
Saf Zz 47/02	12	142000	-27,91	0,58
Saf Zz 47/02	12,5	145000	-28,62	0,08
Saf Zz 47/02	13	133000	-28,56	0,12
Saf Zz 48/02	10	6400	-27,41	0,13
Saf Zz 48/02	10,4	9500	-27,45	0,23
Saf Zz 48/02	11,2	10000	-27,54	0,05
Saf Zz 48/02	11,6	12000	-27,80	0,14
Saf Zz 48/02	12	14000	-27,73	0,32
Saf Zz 6/99	10,5	16400	-26,74	0,12
Saf Zz 6/99	13	15100	-27,37	0,40
Saf Zz 6/99	14,5	16500	-27,19	0,14
Saf Zz 6/99	15,5	15500	-26,72	0,13
Saf Zz 7/99	9,6	4650	-28,61	0,28
Saf Zz 7/99	10,5	21100	-28,56	0,06
Saf Zz 7/99	13	18100	-28,61	0,05
Saf Zz 7/99	16,5	46600	-28,45	0,12
Saf Zz 7/99	18,5	23800	-28,49	0,20
Saf Zz 8/99	11	858	-27,36	0,48
Saf Zz 8/99	12	1490	-28,12	0,21
Saf Zz 8/99	13,5	6260	-28,38	0,05
Saf Zz 8/99	integriert	1310	-27,75	0,31
Saf Zz 9/00	8,5	45300	-28,94	0,09
Saf Zz 9/00	10,7	593000	-28,40	0,44
Saf Zz 9/00	integriert	11300	-29,28	0,16
Saf Zz 9B1/00	13,3	1100	-27,66	0,09
Saf Zz 9B1/00	14,9	7000	-27,50	0,17
Saf Zz 9B1/00	17	6700	-27,02	0,17
Saf Zz 9B1/00	18,5	6600	-27,31	0,09
SB 28E/96	integriert	1160000	-28,41	0,20

# Charakterisierung des biologischen Abbaus von BTEX im Grundwasser über Isotopenfraktionierung – Feldstudien

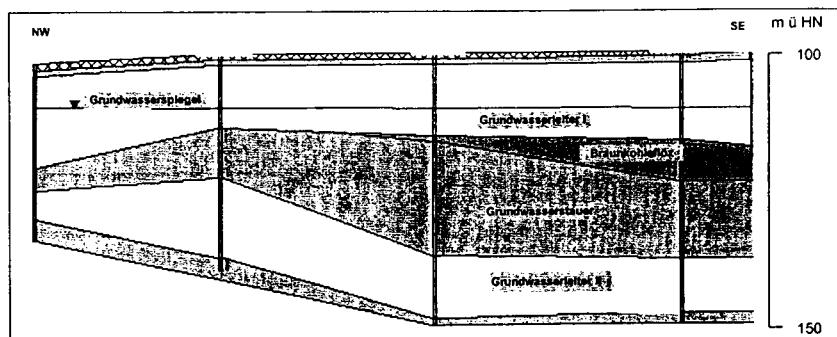
ANDREA VIETH, MATTHIAS KÄSTNER,  
BARBARA MORASCH, RAINER U. MECKENSTOCK,  
HANS H. RICHNOW

Die Charakterisierung des mikrobiellen *In-situ*-Abbaus von organischen Schadstoffen im Grundwasser ist vor allem im Rahmen der Grundwassersanierung unter Ausnutzung der Natural-Attenuation-Prozesse von besonderer Bedeutung. Hierzu wurden die Isotopensignaturen ( $\delta^{13}\text{C}$ ) der entsprechenden Komponenten und ihre Veränderungen im Abstrom herangezogen. An zwei Beispielen, einer großflächigen BTEX-Kontamination im Bereich eines ehemaligen Hydrierwerkes sowie der Sickerwasserfahne einer Mülldeponie, wird die Anwendbarkeit dieser Methode gezeigt.

Die Erfassung des biologischen *In-situ*-Abbaus organischer Schadstoffe ist zur Beurteilung von Grundwasserschadensfällen von entscheidender Bedeutung. Dies gilt sowohl für die Planung von Sanierungskonzepten, die auf dem Natural-Attenuation-Konzept beruhen, als auch für die Beurteilung des Sanierungserfolges bei aktiven *In-situ*-Verfahren.

Unter dem Begriff des Natural Attenuation werden in Anlehnung an die Definition der US-EPA die natürlichen Rückhalte- und Abbauprozesse zusammengefasst, die in einem Aquifer zur Reduzierung von Masse, Volumen und Toxizität der Kontaminanten beitragen [1]. Entsprechende Sanierungskonzepte werden in jüngerer Zeit häufig als Möglichkeit zur kostengünstigen Sanierung kontaminierten Grundwassers diskutiert.

Im Gegensatz zur US-EPA werden jedoch im europäischen Raum Prozesse wie z. B. Verdünnung nur zum Teil bei Natural-Attenuation-Sanierungen akzeptiert, da es hier nur zu einer Verlagerung des Problems und nicht zu einer Entfernung des Schadstoffes aus dem Grundwasserleiter kommt. Um Natural Attenuation als Sanierungsstrategie zu realisieren, muss der biologische *In-situ*-Abbau organischer Kontaminanten charakterisiert werden können. Doch bereitet gerade dieser Nachweis gewisse



1: Hydrogeologisches Profil (NW-SE) des Standortes Zeitz; Ausschnitt liegt bei 100 bis 150 m HN, die Profillänge beträgt etwa 50 m, das Profil verläuft quer durch die bestehende BTEX-Fahne

Schwierigkeiten [2]. Nach den Richtlinien der US-EPA sollen zum direkten Nachweis der Selbstreinigungsprozesse neben der gezielten Auswertung hydrogeochemischer Standortdaten auch Laborversuche durchgeführt werden [1], die oft sehr zeitaufwändig und kostenintensiv sind.

Im Zusammenhang mit der Planung und Umsetzung der Natural-Attenuation-Strategie an konkreten Standort wurde daher von den Autoren ein isotoopenchemisches Konzept zur Erfassung des biologischen Abbaus vorgeschlagen [3]. Die Methode wurde bereits in verschiedenen Felduntersuchungen umgesetzt. Dabei hat man Änderungen der isotopischen Zusammensetzung von aromatischen und auch chlorierten Kohlenwasserstoffen nachgewiesen und als positive Indikatoren für den biologischen *In-situ*-Abbau dieser Substanzen gewertet [3-6].

An zwei Fallbeispielen, einer ehemaligen Mülldeponie sowie einer großflächigen BTEX-Kontamination im Bereich eines ehemaligen Hydrierwerkes, wird die Analyse der Isotopenfraktionierung zur Bestimmung des biologischen *In-situ*-Abbaus dargestellt und ihr Potenzial diskutiert.

## Hydrierwerk Zeitz, Deutschland

In Zeitz wurden seit 1938 in großtechnischen Verfahren Treibstoffe, Schmieröle, Benzol und Paraffine auf der Basis der Braunkohlehydrierung und Erdöldestillation produziert. Der Grundwasser-Schadensfall liegt im Randbereich des Weißelsterbeckens und zeichnet sich geologisch durch zwei Hauptgrundwasserleiter aus (Bild 1). Der obere Grundwasserleiter umfasst sowohl Sande und Kiese der altpleistozänen Elsterterrasse als auch fluviatile Kiese und Sande des jüngeren Tertiärs, die

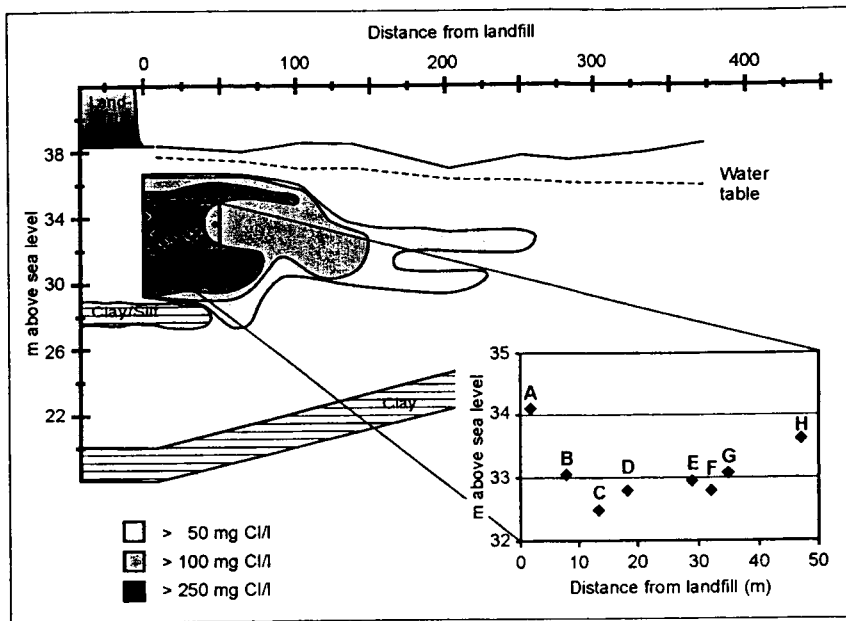
aufgrund fehlender hydraulischer Trennung als ein Grundwasserleiter angesprochen werden. Im Untersuchungsgebiet beträgt die Mächtigkeit 5 bis 11 m, der Grundwasserspiegel befindet sich zwischen 8 und 10 m unter der Geländeoberfläche.

Der Grundwasserstauer besteht aus tertiären Schluffen und Tonen und ist mit Resten eines tertiären Braunkohleflözes durchsetzt. Seine Mächtigkeit ist variabel, in Teilbereichen des Untersuchungsgebietes besteht eine hydraulische Verbindung zwischen dem oberen und dem unteren Grundwasserleiter. Der untere Grundwasserleiter, bestehend aus fluviatil abgelagerten Kiesen und Sanden des Tertiärs, ist 5 bis 19 m mächtig. Die Grundwasserverhältnisse im unteren Aquifer sind gespannt. Die Fließrichtung des Grundwassers ist generell nach Norden zum Vorfluter, der Weißen Elster, ausgerichtet.

Im oberen Grundwasserleiter wurde eine BTEX-Fahne mit bis zu 500 mg l<sup>-1</sup> Benzol, 30 mg l<sup>-1</sup> Toluol, 1,5 mg l<sup>-1</sup> Ethylbenzol und 2,5 mg l<sup>-1</sup> Xylole nachgewiesen. Im unteren Aquifer lagen die BTEX-Konzentrationen bei 100 mg l<sup>-1</sup>, auch hier wurde nahezu ausschließlich Benzol nachgewiesen. In beiden Grundwasserleitern konnten nur geringe Sauerstoffgehalte (<1 mg l<sup>-1</sup> O<sub>2</sub>) gemessen werden.

## Deponie Vejen, Dänemark

Auf der Deponie Vejen wurden im Zeitraum von 1962 bis 1981 etwa 450 kt Abfall eingelagert. Der Deponiekörper befindet sich in einem Sander des Weichselglazials. Der Grundwasserleiter ist 10 bis 20 m mächtig und besteht aus quartären Sanden, in die kleinere Ton- und Schlufflinsen eingeregelt sind. Der unbelastete Grundwasserleiter im Zustrom ist durch hohe Nitratgehalte



2: Verteilung der Chloridgehalte in einer Transekte im Abstrom der Mülldeponie Vejen, Dänemark; die Chloridgehalte zeigen die Ausbreitung des Sickerwassers aus der Deponie in den Grundwasserleiter, die Lage der Probenahme-punkte ist eingezeichnet

gekennzeichnet und enthält Sauerstoff ( $> 1 \text{ mg l}^{-1}$ ) [4]. Der Grundwasserspiegel liegt 3 bis 5 m unter der Geländeoberkante.

Das Sickerwasser innerhalb des Depo-niekörpers zeichnete sich durch einen DOC-Gehalt von ca.  $500 \text{ mg l}^{-1}$ , ein BSB<sub>5</sub>/CSB-Verhältnis von 0,08 sowie einen pH-Wert von 6,8 aus [7]. Da es kein Sammel-system für Deponiewasser gab, konnte das Sickerwasser ungehindert in den Grundwasserleiter eindringen. Die erheblichen DOC-Gehalte trugen zu einer hohen Sauerstoffzehrung bei, sodass im direkten Abstrom der Deponie, im natürlicherweise oxischen Grundwasserleiter, methanogene Bedingungen vorherrschen. In der abstromigen Kontaminationsfahne wurde die vollständige Reduktionssequenz der Elektro-nenakzeptoren über sulfat- und eisen- zu nitratreduzierenden Verhältnissen nachge-wiesen [7]. Anhand der Chloridkonzentra-

tionen des Grundwassers konnte die Schadstofffahne abgegrenzt werden; sie erstreckt sich im Abstrom über eine Länge von 370 m (Bild 2).

Wegen der heterogenen Zusammensetzung der abgelagerten Reststoffe ist auch das Schadstoffspektrum sehr komplex. In höheren Konzentrationen wurden Ethylbenzol, Xylole, Trimethylbenzole, Naphthalin, Fenchon und Campher nachgewiesen [8]. Aus den vorherrschenden Redoxbedingungen kann wegen des hohen DOC-Gehaltes kaum eine Abschätzung des mikrobiellen Abbaus erfolgen. Der gelöste Kohlenstoff diente in diesem Fall wahrscheinlich als der wesentliche Elektronendonator, sodass die Elektronenbilanzen keine Schlüsse über den *In-situ*-Abbau der obengenannten Schadstoffe zulassen.

### Grundlagen der Isotopenfraktionierung

Viele natürliche biochemische Transformationsreaktionen sind mit einer Isotopenfraktionierung, also einer Änderung der Isotopenzusammensetzung des Substrats verbunden. Beispiele hierfür sind die CO<sub>2</sub>-Fixierung in der Photosynthese [9] oder die mikrobielle Methanoxidation [10, 11]. Auch der biologische Abbau typischer Grundwasserkontaminanten wie z. B. BTEX und chlorierte Kohlenwasserstoffe führt zu einer Isotopenfraktionierung [12–16]. Dabei wird bevorzugt der leichtere Kohlenstoff (<sup>12</sup>C) verwertet und im restlichen Substrat reichert sich das schwerere Isotop (<sup>13</sup>C) an.

Das Verhältnis der Kohlenstoffisotope (<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C) einer Substanz wird zu einem internationalen Standard (PDB = Pee Dee Belemnite) ins Verhältnis gesetzt und als  $\delta$ -Wert in Promille [‰] angegeben. So änderte sich beispielsweise in mikrobiellen Abbauprobungen im Labor das Kohlenstoff-Isotopenverhältnis von Toluol um 6 bis

10 ‰ [12]. Weiterhin wurde beim Abbau von Toluol unter methanogenen Bedingungen auch eine Veränderung der Wasserstoffisotopie durch Anreicherung des schwereren Deuteriums in der nicht abgebauten Toluol-Fraktion nachgewiesen. Die Isotopenfraktionierung des Wasserstoffs war in diesen Versuchen um eine Größenordnung höher als die des Kohlenstoffs [17].

Mathematisch lässt sich die Änderung der Isotopensignatur im Verlauf des mikrobiellen Abbaus mit der Rayleigh-Gleichung (Bild 3, Gleichung 1) beschreiben [3, 18]. Das Isotopenverhältnis zur Zeit  $t$  bzw. Zeit  $t = 0$  wird durch  $R_t$  bzw.  $R_0$  ausgedrückt;  $C_t$  bzw.  $C_0$  beschreiben die Konzentrationen der Komponente zur Zeit  $t$  bzw. Zeit  $t = 0$ . Die Konzentrationen ( $C_t/C_0$ ) sind mit den Isotopenverhältnissen ( $R_t/R_0$ ) über den kinetischen Isotopenfraktionierungsfaktor  $\alpha C$  verknüpft. Der Fraktionierungsfaktor  $\alpha C$  kann aus dem Regressionskoeffizienten ( $b$ ) von  $\ln R_t/R_0$  über  $\ln C_t/C_0$  aus  $b = (1/\alpha C - 1)$  berechnet werden (Bild 3, Gleichung 2). Der Fraktionierungsfaktor  $\alpha C$  ist sowohl von der biochemischen Reaktion als auch von der Temperatur abhängig.

Die Rayleigh-Gleichung kann auch zur Beschreibung des mikrobiellen Abbaus in Bodensäulenexperimenten eingesetzt werden, wenn sich bei konstantem Stoffeintrag ein konstanter Konzentrationsgradient eingestellt hat. In diesem Fall wird nicht, wie bei der bereits beschriebenen Auswertung von Batchversuchen, die Konzentrationsänderung im Versuchszeitraum betrachtet, sondern der Konzentrationsgradient im Verlauf der Fließstrecke ausgewertet.

Grundwasserleiter mit ihren variablen Einflussfaktoren sind sicherlich komplexere Systeme als Bodensäulen. In Näherung kann ein Grundwasserleiter jedoch mit einer Bodensäule verglichen werden, wenn bei konstantem Stoffeintrag die Konzentrationsänderung entlang der Fließstrecke durch konstanten Abbau bedingt ist. Unter diesen Bedingungen kann die Rayleigh-Beziehung zur Berechnung des *In-situ*-Abbaus angewendet werden. Im Aquifer ist vor allem die Erfassung der Verdünnung durch unkontaminiertes Grundwasser sowie die Ermittlung der repräsentativen Konzentration des Eintrages ( $C_0$ ) einer Kontaminante problematisch. Prozesse wie Verdünnung, Sorption oder auch Verflüchtigung verändern das Kohlenstoff-Isotopenverhältnis einer Kontaminante nicht signifikant [19–21], daher sind Isotopeneffekte im Grundwasserleiter im Wesentlichen auf den mikrobiellen Abbau zurückzuführen.

Dies eröffnet die Möglichkeit, mit Hilfe der Rayleigh-Beziehung den prozentualen biologischen Abbau zum Zeitpunkt  $t$  zu ermitteln (Gleichung 4). Das für diese Berechnung notwendige Konzentrationsverhältnis ( $C_t/C_0$ ) ergibt sich aus den gemessenen Isotopenwerten und dem entsprechenden Fraktionierungsfaktor für den Schadstoff (Gleichung 3).  $R_0$  wird der Messstelle mit der leichtesten Isotopensignatur zugewiesen. Der so berechnete prozentuale Abbau gilt als Maß für den biologischen Abbau, der notwendig ist, um die

$$\frac{R_t}{R_0} = \left( \frac{C_t}{C_0} \right)^{\frac{1}{\alpha C - 1}} \quad (1)$$

$$\ln \frac{R_t}{R_0} = \left( \frac{1}{\alpha C} - 1 \right) \times \ln \frac{C_t}{C_0} \quad (2)$$

$$\frac{C_t}{C_0} = \left( \frac{R_t}{R_0} \right)^{\left( \frac{1}{\alpha C - 1} \right)} \quad (3)$$

$$B = \left( 1 - \frac{C_t}{C_0} \right) \times 100 \quad (4)$$

$$C_t = C_0 \times \left( \frac{R_t}{R_0} \right)^{\left( \frac{1}{\alpha C - 1} \right)} \quad (5)$$

3: Gleichungen zur Berechnung des biologischen Abbaus

gemessene Änderung der Isotopenverhältnisse zu erzeugen. Die Angaben sind nicht quantitativ, weil die Konzentration einer Kontaminante ( $C_0$  oder  $C_t$ ) nicht in die Gleichung eingeht. Da die Isotopieänderung ausschließlich vom biologischen Abbau abhängt, ist der Index „prozentualer biologischer Abbau“ unabhängig von Verdünnung und Sorption.

Wenn eine repräsentative Ausgangskonzentration ( $C_0$ ) eines Schadstoffes für eine Fließstrecke in der Fahne ermittelt werden kann, lässt sich der Konzentrationsgradient im Abstrom berechnen und somit der *In-situ*-Abbau quantifizieren (Gleichung 5). Wenn in verschiedenen Teilströmen eines Aquifers unterschiedliche Abbaugrade vorliegen, wird mit der Isotopenmethode der *In-situ*-Abbau unterschätzt. Zu einer Überschätzung des Abbaus können die Berechnungen nicht führen.

Um den mikrobiellen Abbau mit der Rayleigh-Gleichung beschreiben zu können, muss vorausgesetzt werden, dass die Kontamination aus einer isotopisch homogenen Quelle gespeist wurde. Bei einer Mischung von Schadstoffarten mit verschiedenen Isotopensignaturen ergibt sich kein repräsentatives Isotopenverhältnis für die Quelle ( $R_0$ ) und folglich kann für weitere Berechnungen die Rayleigh-Beziehung nicht angewendet werden.

**Laborversuche**

Der mikrobielle Abbau von Toluol, Xylol und Ethylbenzol wurde zur Bestimmung der Isotopenfraktionierung sowohl mit Reinkulturen als auch mit Mischkulturen kontaminierter Standorte in Batchversuchen untersucht. Mit der Rayleigh-Gleichung wurden die kinetischen Isotopenfraktionierungsfaktoren  $\alpha_C$  berechnet (Tabelle 1).

Toluol wurde als Modellkomponente eingesetzt, um die Isotopenfraktionierung verschiedener biochemischer Abbauewege sowie Temperatureffekte zu untersuchen. Zudem wurde mit Kulturen gearbeitet, die unterschiedliche Elektronenakzeptoren zur Oxidation von Toluol nutzen [12]. Die Isotopenfraktionierung unter anaeroben Bedingungen erwies sich im Labor trotz verschiedener Elektronenakzeptoren und Versuchstemperaturen zwischen 12 und 35 °C als nahezu identisch. Daher kann zur Berechnung des Toluolabbaus im anoxischen Aquifer, ungeachtet der konkreten Bedingungen, ein einheitlicher Fraktionierungsfaktor angewendet werden [5]. Substratbedingte Unterschiede in den Fraktionierungsfaktoren für Ethylbenzol, Toluol und *ortho*-Xylol sind vorhanden. Da uns keine Reinkultur, die unter anaeroben Bedingungen Benzol abbaut, zur Verfügung stand, konnte bis jetzt noch kein Fraktionierungsfaktor für Benzol bestimmt werden.

Die Isotopenfraktionierung des aeroben Toluolabbaus erwies sich als stark abhängig vom biochemischen Abbaueweg [22]. Zudem ist die Isotopenfraktionierung des aeroben Aromatenabbaus temperaturabhängig, was allerdings bei den geringen Schwankungen der Aquifertemperaturen zu vernachlässi-

**Tab. 1: Übersicht der aus Laborversuchen ermittelten Fraktionierungsfaktoren**

Bakterienkultur	Kohlenstoffquelle	Elektronenakzeptor	Fraktionierungsfaktor
<i>Thauera aromatica</i>	Toluol	Nitrat	$\alpha_C = 1,002$
<i>Geobacter metallireducens</i>	Toluol	Eisen	$\alpha_C = 1,002$
TRM1	Toluol	Sulfat	$\alpha_C = 1,011$
Anreicherungskultur (Bodensäule)	Toluol	Sulfat	$\alpha_C = 1,001$
EBN1	Ethylbenzol	Nitrat	$\alpha_C = 1,002$
Anreicherungskultur (Bodensäule)	<i>ortho</i> -Xylol	Sulfat	$\alpha_C = 1,001$
<i>Pseudomonas putida</i> m2	Toluol	Sauerstoff	$\alpha_C = 1,002$
<i>Ralstonia pickettii</i> PKO1	Toluol	Sauerstoff	$\alpha_C = 1,001$
<i>Pseudomonas putida</i> F1	Toluol	Sauerstoff	$\alpha_C = 1,004$

gen ist. Da BTEX-Kontaminationen in der Regel zu einer erheblichen Sauerstoffzehrung führen und die eigentliche Kontaminationsfahne anoxisch ist, kann mit den Faktoren des anaeroben Abbaus im Anwendungsfall gut gerechnet werden. Darüber hinaus stellt Sauerstoff selbst in natürlicherweise oxischen Aquiferen mit Sauerstoffkonzentrationen um 10 mg l<sup>-1</sup> keinen relevanten Elektronenakzeptor für den Schadstoffabbau dar. So können mit 10 mg Sauerstoff maximal 3,25 mg Benzol oder 3,19 mg Toluol vollständig zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O oxidiert werden.

**Qualitative Beschreibung des mikrobiellen Abbaus**

Am Standort Zeit wurden für den oberen Grundwasserleiter die Kohlenstoff-Isotopensignaturen der BTEX bestimmt. Für Benzol ergaben sich im zentralen Bereich der Schadstofffahne nahezu ausschließlich Werte zwischen -29 und -30 ‰. In den Randbereichen, bei Konzentrationen von <10 mg l<sup>-1</sup> Benzol, wurde eine <sup>13</sup>C-Anreicherung in der residualen Benzolfraction mit maximalen  $\delta$ -Werten von -23 ‰ nachgewiesen (Bild 4). Die gemessene <sup>13</sup>C-Anreicherung des Benzols um bis zu 7 ‰ ist ein Indikator für den biologischen *In-situ*-Abbau. Bislang gibt es nur wenige Nachweise für den mikrobiellen Abbau von Benzol unter anoxischen Bedingungen. Im Labor konnte von uns der anaerobe Benzolabbau durch eine Reinkultur bislang noch nicht

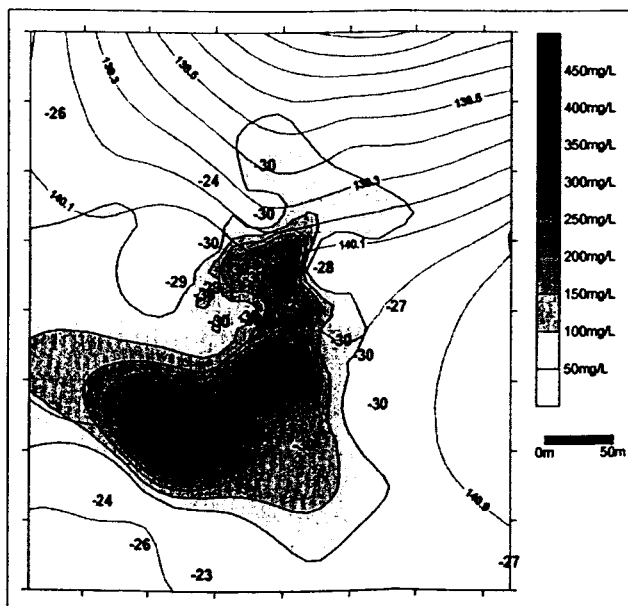
realisiert werden. Da somit kein Fraktionierungsfaktor für den Benzolabbau verfügbar ist, konnte der mikrobielle Abbau in diesem Aquifer noch nicht berechnet werden.

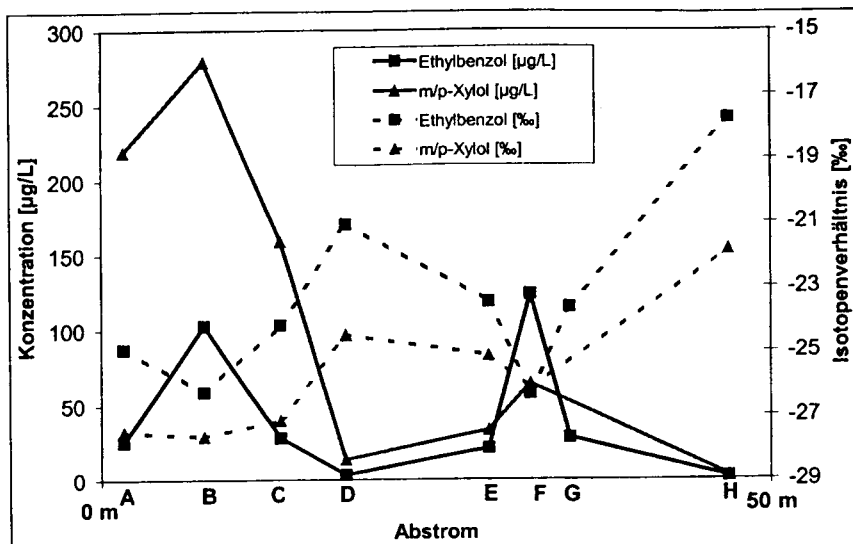
Die im Zentrum der Schadstofffahne gemessenen Isotopenverhältnisse um -30 ‰ zeigen, dass es sich hier um eine Schadstoffquelle mit einer einheitlichen Isotopensignatur handelte. Weiterhin wird deutlich, dass bei Benzolkonzentrationen zwischen 10 und 500 mg l<sup>-1</sup> kein bedeutender mikrobieller Abbau nachweisbar ist und andere Konzentrationsvermindernde Prozesse, wie z. B. Verdünnung und Sorption, keinen Isotopeneffekt verursachen. Der erhebliche Konzentrationsgradient im Kernbereich der Kontamination ist deshalb im Wesentlichen auf Verdünnungsprozesse zurückzuführen.

**Quantitative Beschreibung des mikrobiellen Abbaus**

Die sehr detaillierte Schadensfallerkundung in Vejen [7, 8] erlaubte es, gezielt acht Grundwasserproben entlang einer 50 m langen Transekte in der Achse der Abstromfahne zu gewinnen. Die Grundwasserproben stammten aus dem anoxischen Bereich, in dem methanogene, sulfatreduzierende und eisenreduzierende Bedingungen vorherrschten. In dieser Zone wurden die Konzentrationen von BTEX und anderen organischen Schadstoffen bis zur Nachweisgrenze reduziert. Die Konzentrationen und die Kohlenstoff-Isotopenverhältnisse

**4: Konzentrationen und <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C-Isotopenverhältnisse (in ‰ PDB) für Benzol im oberen Grundwasserleiter**





5: Konzentrationen und  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnisse für Ethylbenzol und *meta*-/*para*-Xylol; *m*- und *p*-Xylol wurden nicht als Einzelisomere, sondern summarisch bestimmt (Daten aus [6])

von Ethylbenzol und den Xylenen ergaben ein sehr komplexes Bild (Bild 5).

Entlang der Fließrichtung der Schadstofffahne nahmen die Konzentrationen für *meta*- und *para*-Xylol zunächst von  $220 \mu\text{g l}^{-1}$  im Brunnen A auf  $280 \mu\text{g l}^{-1}$  im Brunnen B zu und dann bis auf  $2,1 \mu\text{g l}^{-1}$  in der Messstelle H ab. Eine lokale Zunahme der Konzentrationen wurde im Bereich der Messstellen E und F beobachtet. Die  $\delta^{13}\text{C}$ -Werte liegen zwischen  $-21,9$  und  $-27,6 \text{‰}$ . Für die Messstelle G liegen keine Daten zum  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis vor.

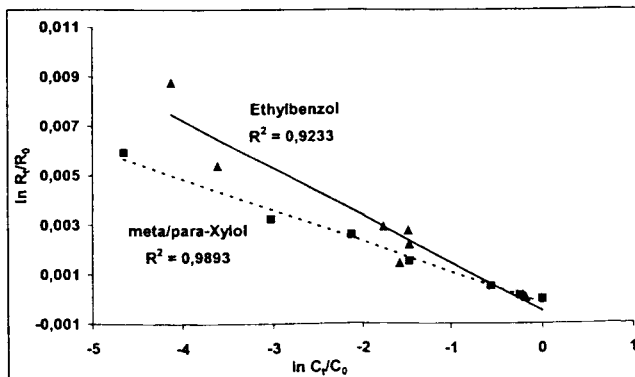
Ein ähnliches Muster ergab die Analyse der Ethylbenzolkonzentrationen. Die Konzentration nahm zunächst von  $26 \mu\text{g l}^{-1}$  in Brunnen A auf  $100 \mu\text{g l}^{-1}$  in Brunnen B zu. Geringere Konzentrationen wurden in den Brunnen C, D und E gemessen. Im Brunnen F lagen  $123 \mu\text{g l}^{-1}$  Ethylbenzol vor. In der Messstelle H wurden  $2,0 \mu\text{g l}^{-1}$  Ethylbenzol gemessen. Im weiteren Abstrom konnte kein Ethylbenzol mehr nachgewiesen werden. Die  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenwerte zeigen eine maximale Anreicherung des schwereren Kohlenstoffs um  $8,6 \text{‰}$  in Messstelle H. Im Abstrom der Messstelle H konnten die Isotopensignaturen aufgrund der geringen Schadstoffkonzentrationen nicht mehr bestimmt werden.

Der an den Messstellen E bis G gemessene Konzentrationsanstieg von Ethylbenzol und den Xyloisomeren resultiert, wie Lang-

zeituntersuchungen zeigten, vermutlich aus einer alten Schadstofffahne mit erheblich höheren Gehalten. Es handelt sich demnach um einen Bereich mit eingeschränkter Grundwasserströmung und geringem biologischen Abbau [6].

In der Datenauswertung wurden die Konzentrationen und Isotopensignaturen mit Hilfe der Rayleigh-Gleichung analysiert, um Informationen zu wesentlichen Schadstoffsenken zu gewinnen. Wenn der biologische Abbau als Schadstoffsenke dominiert, muss sich in der graphischen Darstellung der Rayleigh-Gleichung eine gute Korrelation zwischen Konzentrations- und Isotopenverhältnissen ergeben. Aus der Steigung der Regressionsgeraden kann dabei der Isotopenfraktionierungsfaktor im Feld berechnet und mit den Faktoren aus den Kulturversuchen verglichen werden. Darüber hinaus zeigt eine gute Korrelation die Anwendbarkeit der Rayleigh-Gleichung für quantitative Berechnungen.

Für Ethylbenzol und die Xyloisomere wurden  $\ln C_i/C_0$  gegen  $\ln R_i/R_0$  aufgetragen (Bild 6). Als  $C_0$  bzw.  $R_0$  wurden die jeweils höchsten Konzentrationen mit dem kleinsten  $\delta^{13}\text{C}$ -Wert ausgewählt, weil diese Proben wahrscheinlich am geringsten abgebaut wurden. Die Korrelation zwischen der Änderung der Isotopensignaturen und dem Konzentrationsverhältnis zeigt deutlich den direkten Zusammenhang zwischen biologi-



6: Anwendung der Rayleigh-Gleichung für Ethylbenzol und *meta*-/*para*-Xylol (Daten aus [6])

chem Abbau und Konzentrationsrückgang. Für Ethylbenzol und die Xylole gilt, dass sie in dem untersuchten Abstrombereich jeweils einem Abbauprozess mit einheitlicher Isotopenfraktionierung unterlagen. Damit sind die Voraussetzungen für eine quantitative Abschätzung des biologischen Schadstoffabbaus mit Hilfe der Rayleigh-Gleichung erfüllt.

### Berechnung des prozentualen Abbaus

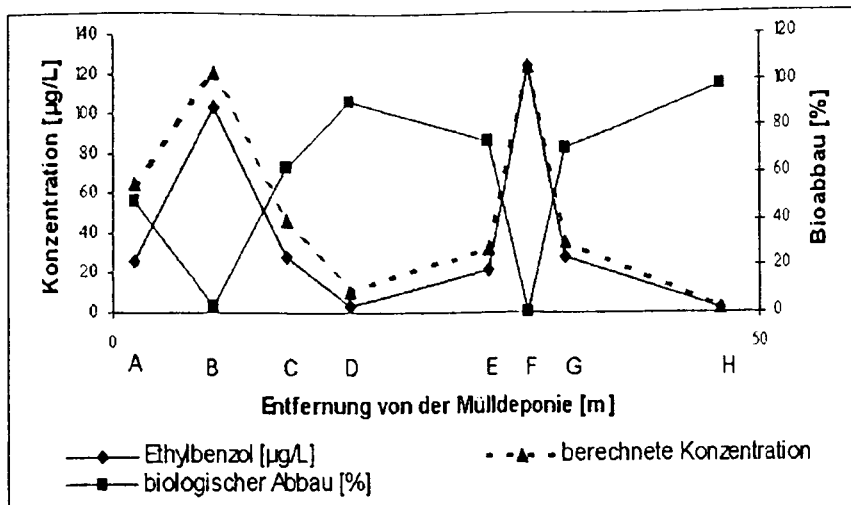
Die Rayleigh-Gleichung kann verwendet werden, um den biologischen Abbau abzuschätzen. Im Schadensfall Vejen wurde für Ethylbenzol die Messstelle F mit dem leichtesten  $\delta$ -Wert als  $R_0$  ausgewählt und aus den Isotopenverhältnissen ( $R_i$ ) in den anderen Messstellen der Abbau berechnet. Diese Kalkulation des prozentualen Abbaus ist unabhängig von den tatsächlich gemessenen Konzentrationen und beruht ausschließlich auf den gemessenen Isotopenwerten und dem im Labor ermittelten Fraktionierungsfaktor (Bild 3, Gleichungen 4 und 3). Durch dieses Vorgehen werden ausschließlich Prozesse, die einen Isotopeneffekt bewirken, berücksichtigt. Der Fraktionierungsfaktor ( $\alpha_C = 1,0022$ ) stammt aus einem Abbaueversuch mit Ethylbenzol unter nitratreduzierenden Bedingungen (s. Tabelle 1).

Die Berechnung zeigt einen prozentualen Abbau von bis zu  $90 \text{‰}$  in Bezug zur Messstelle F (Bild 7). Mit dem prozentualen Abbau als Index ist es möglich, die Zonen des Abbaus in einem Aquifer anhand der Isotopenwerte zu charakterisieren. Dieses semi-quantitative Vorgehen ist insbesondere interessant für Schadensfälle, in denen keine repräsentative Konzentration ( $C_0$ ) für die Schadstoffquelle gewonnen werden kann bzw. Fließstrecken des Aquifers nur unzureichend bekannt oder sehr heterogen sind.

### Quantifizierung des Abbaus

Zur Quantifizierung des *In-situ*-Abbaus muss neben einem repräsentativen Isotopenwert ( $R_0$ ) eine Ausgangskonzentration ( $C_0$ ) für eine Fließstrecke, in der der mikrobielle Abbau ermittelt werden soll, bekannt sein. Die Bestimmung eines repräsentativen  $C_0$  ist erheblich schwieriger als die Festlegung eines entsprechenden  $R_0$ -Wertes, weil die Konzentration einer Komponente neben der Biodegradation auch von Prozessen wie Verdünnung und Sorption abhängig ist.

Wenn die Fließstrecken näherungsweise bekannt sind, kann die höchste Konzentration mit dem leichtesten Isotopenwert als repräsentativer Konzentrations- bzw. Isotopenwert ( $C_0$ ,  $R_0$ ) genutzt werden und die Konzentrationen an den weiteren Messstellen mit Gleichung 5 (s. Bild 3) berechnet werden. Die gemessenen und berechneten Konzentrationen am Standort Vejen zeigten ähnliche Tendenzen, wenn die Messstelle F als Bezugsgröße ( $C_0$ ) zur Quantifizierung der Konzentration eingesetzt wurde



7: Konzentrationen (gemessen und berechnet) sowie prozentualer biologischer Abbau für Ethylbenzol (Daten aus [6])

(Bild 7). Die im Feld gemessenen Konzentrationen lagen teilweise allerdings erheblich unter den berechneten Werten, was zeigt, dass neben dem Abbau auch Prozesse wie Verdünnung und Sorption einen erheblichen Einfluss auf die Konzentration haben.

### Schlussfolgerung

Der biologische *In-situ*-Abbau kann anhand von Isotopensignaturen qualitativ und auch quantitativ erfasst werden. Voraussetzung für die Anwendung der Isotopenmethode zur Charakterisierung des mikrobiellen Abbaus, z. B. im Rahmen von Natural-Attenuation-Sanierungskonzepten, ist eine gewisse Kenntnis der Standortbedingungen. Es sollten die Schadstoffquelle, die Fließstrecke und das Schadstoffinventar hinreichend bekannt sein.

Die Isotopenmethode ist nicht mit aufwändigen Laborversuchen verbunden, denn die Bestimmung der Isotopenverhältnisse erfolgt aus den Grundwasserproben, die im Rahmen der Standorterkundung gewonnen werden. Lediglich die zu verwendenden Fraktionierungsfaktoren müssen einmalig in Laborversuchen ermittelt werden. Zur qualitativen und quantitativen Analyse des mikrobiellen Abbaus im Aquifer lässt sich die Rayleigh-Beziehung einsetzen. Sie zeigt die Korrelation zwischen Isotopenfraktionierung und der Konzentration eines Schadstoffes.

### Literaturhinweise

- [1] US-EPA, „Use of Monitored Natural Attenuation at Superfund, RCRA Corrective Action, and Underground Storage Tank Sites“, Directive Number: 9200.4-17P (1999).
- [2] Sturchio, N. C.; Clausen, J. L.; Heraty, L. J.; Huang, L.; Holt, B. D.; Abrajano, T. A.: „Chlorine Isotope Investigation of Natural Attenuation of Trichloroethene in an Aerobic Aquifer“, *Environmental Science and Technology* 32, S. 3037-3042 (1998).
- [3] Richnow, H. H.; Meckenstock, R. U.: „Isotopen-geochemisches Konzept zur In-situ-Erfassung des biologischen Abbaus in kontaminiertem Grundwasser“, *TerraTech* 8, Nr. 5/1999, S. 38-41.
- [4] Sherwood Lollar, B.; Slater, G. F.; Sleep, B.; Wutt, M.; Klecka, G. M.; Harkness, M.; Spivack, J.: „Stable Carbon Isotope Evidence for Intrinsic Bioremediation of Tetrachloroethene and Trichloroethene at Area 6, Dover Air Force Base“, *Environmental Science and Technology* 35, S. 261-269 (2001).
- [5] Meckenstock, R. U.; Morasch, B.; Kastner, M.; Vieth, A.; Richnow, H. H.: „Assessment of bacterial degradation activities in the environment by analysis of stable carbon isotope fractionation“, *Water, Air and Soil Pollution (eingereicht)* (2001).
- [6] Richnow, H. H.; Meckenstock, R. U.; Ask, L.; Baun, A.; Ledin, A.; Christensen, T. H.: „In situ biodegradation determined by isotope fractionation of aromatic hydrocarbons in an anaerobic landfill leachate plume“, *Journal of Contaminant Hydrology (eingereicht)* (2001).
- [7] Lyngkilde, J.; Christensen, T. H.: „Redox zones of a landfill leachate pollution plume (Vejen, Denmark)“, *Journal of Contaminant Hydrology* 10, S. 273-289 (1992a).
- [8] Lyngkilde, J.; Christensen, T. H.: „Fate of organic contaminants in the redox zones of a landfill leachate pollution plume (Vejen, Denmark)“, *Journal of Contaminant Hydrology* 10, S. 291-307 (1992b).

- [9] O'Leary, M. H.: „Carbon isotope fractionation in plants“, *Phytochemistry* 20, S. 553-567 (1981).
- [10] Coleman, D. D.; Risatti, B.; Schoell, M.: „Fractionation of carbon and hydrogen isotopes by methane-oxidizing bacteria“, *Geochimica et Cosmochimica Acta* 45, S. 1033-1037 (1981).
- [11] Boltz, R.; Pokojski, H. D.; Schmitt, M.; Thomm, M.: „Carbon isotope fractionation during bacterial methanogenesis by CO<sub>2</sub> reduction“, *Organic Geochemistry* 25, S. 255-262 (1996).
- [12] Meckenstock, R. U.; Morasch, B.; Warthmann, R.; Schink, B.; Annweiler, E.; Michaelis, W.; Richnow, H. H.: „<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C isotope fractionation of aromatic hydrocarbons during microbial degradation“, *Environmental Microbiology* 1, S. 409-414 (1999).
- [13] Ahad, J. M. E.; Sherwood Lollar, B.; Edwards, E. A.; Slater, G. F.; Sleep, B. E.: „Carbon Isotope Fractionation during Anaerobic Biodegradation of Toluene: Implications for Intrinsic Bioremediation“, *Environmental Science and Technology* 34, S. 892-896 (2000).
- [14] Bloom, Y.; Aravena, R.; Hunkeler, D.; Edwards, E.; Frappe, S. K.: „Carbon Isotope Fractionation during Microbial Dechlorination of Trichloroethene, cis-1,2-Dichloroethene, and Vinyl Chloride: Implications for Assessment of Natural Attenuation“, *Environmental Science and Technology* 34, S. 2768-2772 (2000).
- [15] Hunkeler, D.; Butler, B. J.; Aravena, R.; Barker, J. F.: „Monitoring Biodegradation of Methyl tert-Butyl Ether (MTBE) Using Compound-Specific Carbon Isotope Analysis“, *Environmental Science and Technology* 35, S. 676-681 (2001).
- [16] Heraty, L. J.; Fuller, M. E.; Huang, L.; Abrajano Jr, T.; Sturchio, N. C.: „Isotopic fractionation of carbon and chlorine by microbial degradation of dichloromethane“, *Organic Geochemistry* 30, S. 793-799 (1999).
- [17] Ward, J. A. M.; Ahad, J. M. E.; Lacrampe-Couloume, G.; Slater, G. F.; Edwards, E. A.; Sherwood Lollar, B.: „Hydrogen Isotope Fractionation during Methanogenic Degradation of Toluene. Potential for Direct Verification of Bioremediation“, *Environmental Science and Technology* 34, S. 4577-4581 (2000).
- [18] Hoefs, J.: „Stable isotope geochemistry“, Springer Verlag, Berlin 1997.
- [19] Slater, G. F.; Dempster, H. S.; Sherwood Lollar, B.; Ahad, J.: „Headspace Analysis: A New application for Isotopic Characterization of Dissolved Organic Contaminants“, *Environmental Science and Technology* 33, S. 190-194 (1999).
- [20] Slater, G. F.; Ahad, J. M. E.; Sherwood Lollar, B.: „Carbon Isotope Effects Resulting from Equilibrium Sorption of Dissolved VOCs“, *Analytical Chemistry* 72, S. 5669-5672 (2000).
- [21] Harrington, R. R.; Poulson, S. R.; Drever, J. I.; Colberg, P. J. S.; Kelly, E. F.: „Carbon isotope systematics of monoaromatic hydrocarbons: vaporization and adsorption experiments“, *Organic Geochemistry* 30, S. 765-775 (1999).
- [22] Morasch, B.; Richnow, H. H.; Schink, B.; Meckenstock, R. U.: „Carbon and hydrogen stable isotope fractionation during aerobic bacterial degradation of aromatic hydrocarbons“, *Environmental Microbiology (eingereicht)* (2001).

# ASSESSMENT OF BACTERIAL DEGRADATION OF AROMATIC HYDROCARBONS IN THE ENVIRONMENT BY ANALYSIS OF STABLE CARBON ISOTOPE FRACTIONATION

RAINER U. MECKENSTOCK<sup>1\*</sup>, BARBARA MORASCH<sup>2</sup>, MATTHIAS KÄSTNER<sup>3</sup>,  
ANDREA VIETH<sup>3</sup> and HANS HERMANN RICHNOW<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Eberhard-Karls University of Tübingen, Center for Applied Geoscience, Tübingen, Germany;

<sup>2</sup> University of Konstanz, Faculty of Biology, Konstanz, Germany; <sup>3</sup> Center for Environmental Research, Department of Remediation Research, Leipzig, Germany

(\* author for correspondence, e-mail: rainer.meckenstock@uni-tuebingen.de, fax:

++49 (0)7071 5139)

**Abstract.**  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  stable carbon isotope fractionation was used to assess biodegradation in contaminated aquifers with toluene as a model compound. Different strains of anaerobic bacteria (*Thauera aromatica*, *Geobacter metallireducens*, and the sulfate-reducing strain TRM1) showed consistent  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  carbon isotope fractionation with fractionation factors between  $\alpha\text{C} = 1.0017$  and  $1.0018$ . In contrast, three cultures of aerobic organisms, using different mono- and dioxygenase enzyme systems to initiate toluene degradation, showed variable isotope fractionation factors of  $\alpha\text{C} = 1.0027$  (*Pseudomonas putida* strain mt-2),  $\alpha\text{C} = 1.0011$  (*Ralstonia pickettii*), and  $\alpha\text{C} = 1.0004$  (*Pseudomonas putida* strain F1). The great variability of isotope fractionation between different aerobic bacterial strains suggests that interpretation of isotope data in oxic habitats can only be qualitative. A soil column was run as a model system for contaminated aquifers with toluene as the carbon source and sulfate as the electron acceptor and samples were taken at different ports along the column. Microbial toluene degradation was calculated based on the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope fractionation factors of the batch culture experiments together with the observed  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope shifts of the residual toluene fractions. The calculated percentage of biodegradation,  $B$ , correlated well with the decreasing toluene concentrations at the sampling ports and indicated the increasing extent of biodegradation along the column. The theoretical toluene concentrations as calculated based on the isotope values matched the measured concentrations at the different sampling ports indicating that the Rayleigh equation can be used to calculate biodegradation in quasi closed systems based on measured isotope shifts. A similar attempt was performed to assess toluene degradation in a contaminated, anoxic aquifer. A transect of groundwater wells was monitored along the main direction of the groundwater flow and revealed decreasing concentrations accompanied with an increase in the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  stable carbon isotope ratio of the residual toluene. Calculation of the extent of biodegradation based on the isotope values and laboratory derived isotope fractionation factors showed that the residual toluene was degraded to more than 99% by microbial activity. Calculation of the theoretical residual toluene concentrations based on the measured isotope values described the strongly decreasing concentrations along the plume. Other aromatic hydrocarbons like benzene and naphthalene which were analysed in the same course also showed decreasing concentrations along the groundwater flow path accompanied by increasing  $\delta^{13}\text{C}$  values indicating biodegradation.

**Keywords:** anaerobic degradation, aromatic hydrocarbons, biodegradation, BTEX, natural attenuation, PAH



*Water, Air, and Soil Pollution: Focus* **2**: 141–152, 2002.

© 2002 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

## 1. Introduction

Due to steadily increasing problems with contamination of groundwater by organic pollutants such as mineral oil products or chlorinated solvents there is an interest in the quantification of their natural degradation by microorganisms. This is particularly relevant in the context of natural attenuation as a means to manage contaminated sites. Although the degradation of aromatic hydrocarbons like benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) has been proven for aerobic and anaerobic bacterial cultures in the laboratory (Gibson and Subramanian, 1984; Heider *et al.*, 1999) it is still difficult to assess microbial degradation activities in the environment. The mere disappearance of a specific compound is often not sufficient to indicate biodegradation because other sinks of contaminants such as dilution, adsorption or evaporation may be significant.

Analysis of stable isotope fractionation has been discussed recently as an appropriate tool to analyse biodegradation at contaminated sites. Stable isotope fractionation occurs in numerous biochemical reactions with carbon fixation by plants being one of the best investigated examples (O'Leary, 1980, 1984). The degradation of contaminants was first reported to be accompanied by stable isotope effects in 1969 (Lebedew *et al.*, 1969; Stahl, 1980). However, the application of stable isotope analysis to study biological degradation of complex mixtures of hydrocarbons was scarce until single compound stable isotope analysis by gas chromatography-combustion-isotope ratio-mass spectroscopy (GC-C-IRMS) became commercially available. Since then, a number of field and laboratory studies have shown that the biological degradation of many contaminants is accompanied by a relative increase of the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  stable isotope ratio in the non-degraded residual substrate fraction (Meckenstock *et al.*, 1999; Lollar *et al.*, 1999; Hunkeler *et al.*, 1999; Richnow and Meckenstock, 2000; Ahad *et al.*, 2000; Bloom *et al.*, 2000; Morasch *et al.*, 2001).

Here we report on basic features of stable isotope fractionation of aromatic hydrocarbons resulting from microbial degradation and on distinct differences in the fractionation by aerobic and anaerobic bacteria. The laboratory-derived fractionation factors were applied to describe biodegradation in a field site.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. STRAINS AND CULTIVATION

The sulfate-reducing strain TRM1 was isolated in our laboratory (Meckenstock, 1999), *Desulfobacterium cetonicum* (DSM 7267), *Thauera aromatica* strain K172 (DSM 6984), and *Geobacter metallireducens* strain GS-15 (DSM 7210) were purchased from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany). *Pseudomonas putida* strain mt-2 was a kind gift of J. R. van der Meer, Dübendorf, Switzerland. *Pseudomonas putida* strain F1



and *Ralstonia pickettii* strain PKO1 were kindly provided by A. M. Cook (Konstanz, Germany) and J. J. Kukor (Rutgers, NJ, U.S.A.).

Anaerobic strains were cultivated in carbonate-buffered freshwater mineral medium, pH 7.2–7.4 (Widdel and Bak, 1992) prepared in the absence of oxygen under a N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> atmosphere (80/20) and reduced with sodium sulfide (1 mM). Either Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10 mM) or NaNO<sub>3</sub> (10 mM) were supplemented as electron acceptors. FeCl<sub>2</sub> (3 mM) was added to the medium for strain TRM1 in order to scavenge produced sulfide. The medium for *Geobacter metallireducens* was reduced with FeCl<sub>2</sub> (1 mM) instead of sulfide, and Fe(III) citrate (50 mM) was used as electron acceptor.

Aerobic bacteria were cultivated in mineral medium M9 (Sambrook *et al.*, 1989) and shaken at 100 rounds min<sup>-1</sup>. Serum bottles (500 mL) were half-filled with mineral medium and tightly sealed with Viton rubber stoppers (Maag Technik, Dübendorf, Switzerland). Toluene was injected into the culture bottles with syringes through the stoppers and allowed to equilibrate overnight before inoculation. All substrates were of analytical grade.

Column experiments were performed with soil taken from a BTEX-contaminated aquifer near Stuttgart, Germany, at 8 m depth. The glass columns (5 × 45 cm) were equipped with 5 sampling ports at 2.5, 7, 16, 26, and 36 cm distance from the inlet and were operated bottom to top with carbonate-buffered fresh-water medium (Widdel and Bak, 1992) supplemented with 3 mM FeSO<sub>4</sub> as reducing agent. A flow of 0.25 column volumes per day was adjusted with peristaltic pumps and toluene was continuously added in a mixing chamber (100 mL) with a SP 220i infusion pump (World Precision Instruments, Berlin, Germany). The columns were operated for several month at 16 °C in the dark.

Water samples from the contaminated aquifer were taken with submersible pumps after intensively purging the groundwater wells with at least one well volume. The redox potential was continuously measured in the pumped water and samples were taken when the potential reached constant values. For isotope analysis one litre glass flasks were filled without headspace to avoid evaporation and sealed with Teflon lined caps. One gram of NaOH was added before to stop any biological degradation activities. The flasks were stored at 4 °C and extracted with *n*-pentane within 10 hr after sampling.

## 2.2. ANALYSIS AND SAMPLING

Growth of sulfate-reducing bacteria and *Geobacter metallireducens* was followed by measuring the formation of sulfide or Fe(II) (Cline, 1969; Stookey, 1970). Growth of all other strains was determined as increase in optical density at 578 nm. Toluene concentrations in the culture samples were analysed by high performance liquid chromatography (HPLC; System Gold, Beckman, Fullerton, CA, U.S.A.) with a C<sub>18</sub> reversed-phase column (GROM-SIL, ODS-5 ST, 250 mm, 5 μm particle size, Grom, Herrenberg, Germany) and UV detection at 206 nm. The eluent was

acetonitrile/100 mM ammonium phosphate buffer, pH 3.5, 70/30 (v/v). Culture samples (250  $\mu$ L) were diluted 1:5 with ethanol (99%) and centrifuged (14 000  $\times$  g, 5 min) to remove precipitates before HPLC-analysis.

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope ratios were determined with a GC-C-IRMS. The system consisted of a GC (HP-5890, Hewlett-Packard Co., San Diego, CA, U.S.A.) which was connected *via* a combustion unit (GC-combustion interface, Finnigan, Bremen, Germany) to an isotope mass spectrometer (Finnigan MAT 252, Finnigan, Bremen, Germany). The GC was equipped with a fused silica capillary column (BPX-5, 500 mm, 0.32 mm inner diameter, 0.5  $\mu$ m film thickness, SGE, Darmstadt, Germany). The temperature program was: 2 min at 40  $^{\circ}\text{C}$  and linear temperature increase to 180  $^{\circ}\text{C}$  at 6  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Samples were injected splitless at 250  $^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3. CALCULATIONS

When toluene was supplied in isotope fractionation experiments, isotope ratios  $R_t$  were determined from the common  $\delta$ -values according to Equations (1) and (2) (Meckenstock *et al.*, 1999). The international PDB standard was applied to calculate  $\delta$ -values from GC-C-IRMS analysis. When the logarithms of the isotope ratios ( $R_t/R_0$ ) are plotted over the respective logarithms of the concentrations ( $c_t/c_0$ ), according to Equations (3) and (4) (Rayleigh, 1896; Hoefs, 1997; Meckenstock *et al.*, 1999), the kinetic isotope fractionation factor  $\alpha$  can be determined from the slopes  $b$  of the curves with  $b = 1/\alpha - 1$  (Equation (4)).  $\delta_0$  is the initial isotope signature of the substrate. Equation (6) was taken to calculate the theoretical remaining substrate fraction  $c_t$  using the isotope fractionation factor  $\alpha$  and the initial substrate concentration  $c_0$ . The percentage of biodegradation  $B$  of the residual substrate fraction is calculated with Equation (7).

$$\delta t^{13}\text{C}[\text{‰}] = \left( \frac{R_{\text{sample}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (1)$$

$$\frac{R_t}{R_0} = \frac{\delta_t + 1000}{\delta_0 + 1000} \quad (2)$$

$$\frac{R_t}{R_0} = \left( \frac{C_t}{C_0} \right)^{\left( \frac{1}{\alpha} - 1 \right)} \quad (3)$$

$$\ln \left( \frac{R_t}{R_0} \right) = \left( \frac{1}{\alpha} - 1 \right) \times \ln \left( \frac{C_t}{C_0} \right) \quad (4)$$

$$\frac{C_t}{C_0} = \left( \frac{R_t}{R_0} \right)^{\left( \frac{1}{\frac{1}{\alpha} - 1} \right)} \quad (5)$$

$$C_t = C_0 \times \left( \frac{R_t}{R_0} \right)^{\left( \frac{1}{\frac{1}{\alpha} - 1} \right)} \quad (6)$$

$$B[\%] = \left(1 - \frac{C_t}{C_0}\right) \times 100 \quad (7)$$

### 3. Results and Discussion

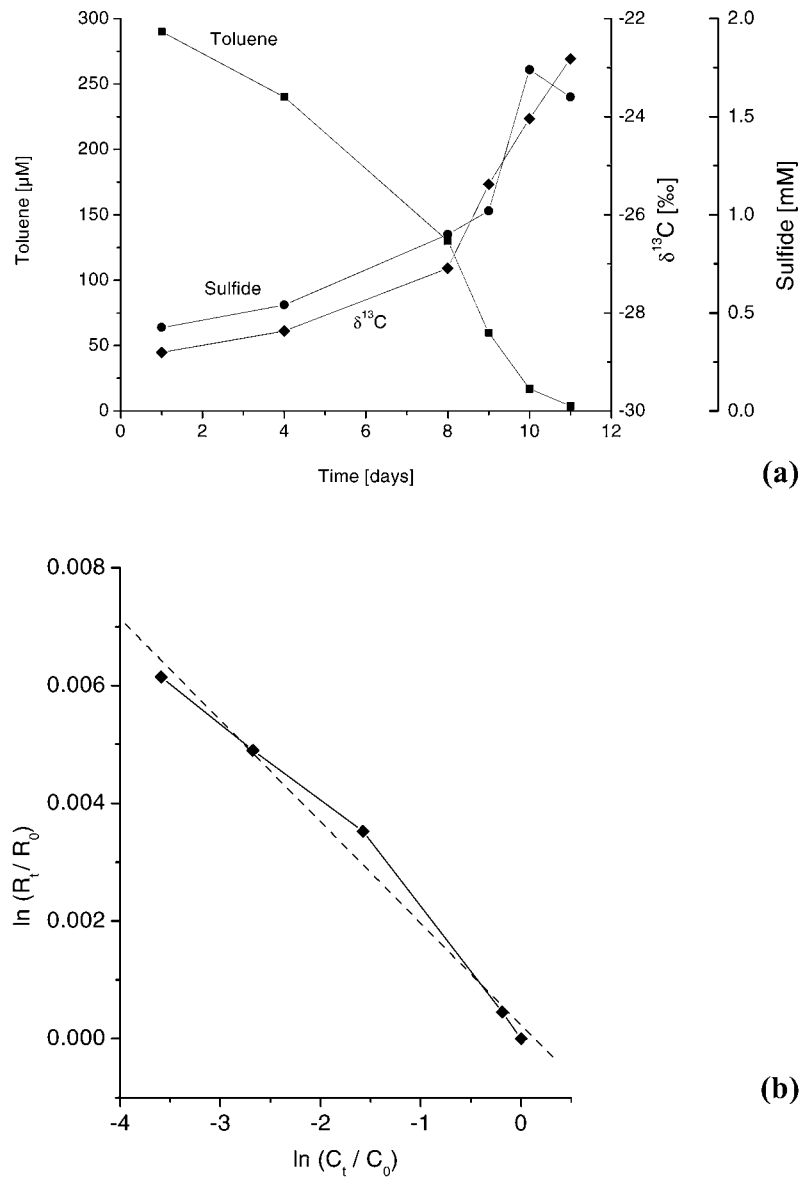
Anaerobic degradation of toluene was investigated with the sulfate-reducing strain TRM1 (Figure 1A) (Meckenstock, 1999). The culture degraded about 300  $\mu\text{M}$  of toluene attended by an increase in sulfide by 1.25 mM indicating a complete oxidation to  $\text{CO}_2$ . The concomitant increase of the stable carbon isotope ratio in the residual substrate fraction by 6  $\delta^{13}\text{C}$  units implied a significant carbon isotope fractionation (Meckenstock *et al.*, 1999). The logarithms of the stable isotope ratios ( $\ln R_t/R_0$ ) correlated linearly with the logarithms of the concentrations ( $\ln C_t/C_0$ ) according to Equation (4) and therefore could be described by the Rayleigh equation (Figure 1B). The slope of the regression curve  $b$  revealed an isotope fractionation factor of  $\alpha_C = 1.0017 \pm 0.003$  (Table I).

Similar experiments with toluene as substrate for growth were performed with *Thauera aromatica*, and *Geobacter metallireducens* as representatives for denitrifying and iron-reducing bacteria (Meckenstock *et al.*, 1999). The fractionation factors  $\alpha_C = 1.0017$  and  $\alpha_C = 1.0018$ , respectively, were similar to those obtained in experiments with the sulfate-reducing strain TRM1 (Table I). Taking these strains as representatives for microbial communities in the different anoxic redox zones of contaminated aquifers (denitrifying, iron-reducing, sulfate-reducing), the isotope fractionation factor for toluene degradation should be identical for all the anoxic zones of an aquifer. This is an important prerequisite for a quantitative assessment of biodegradation in a contaminated aquifer.

TABLE I

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope fractionation factors for toluene degradation by different aerobic and anaerobic organisms

Bacterial strain	Electron acceptor	Fractionation factor $\alpha_C$	Reference
<i>Thauera aromatica</i>	Nitrate	$1.0017 \pm 0.0003$	(Meckenstock <i>et al.</i> , 1999)
<i>Geobacter metallireducens</i>	Ferric iron	$1.0018 \pm 0.0003$	(Meckenstock <i>et al.</i> , 1999)
Sulfate-reducing strain TRM1	Sulfate	$1.0017 \pm 0.0003$	(Meckenstock <i>et al.</i> , 1999)
<i>Pseudomonas putida</i> strain mt2	Oxygen	$1.0033 \pm 0.0003$	(Morasch <i>et al.</i> , 2001)
<i>Ralstonia pickettii</i> strain PKO1	Oxygen	$1.0011 \pm 0.0002$	(Morasch <i>et al.</i> , 2001)
<i>Pseudomonas putida</i> strain F1	Oxygen	$1.0004 \pm 0.0003$	(Morasch <i>et al.</i> , 2001)



*Figure 1.* Stable carbon isotope fractionation in the residual substrate fraction during growth of the sulfate-reducing strain TRM1 with toluene as sole source of carbon and electrons. (a) Plot of the (■) toluene concentrations, (●) sulfide concentrations, and (◆) stable carbon isotope ratios  $\delta^{13}\text{C}$  over time. (b) Isotope values in the residual substrate fraction (◆) in a double logarithmic plot over the respective concentrations according to Equation (4). The isotope fractionation factor  $\alpha\text{C}$  can be calculated from the slope  $b$  of a regression of the data points (dashed line) (Data are taken from Meckenstock *et al.*, 1999).

In contrast to stable carbon isotope fractionation during toluene degradation by anaerobic bacteria which was consistent for every investigated culture (Meckenstock *et al.*, 1999; Morasch *et al.*, 2001; Ahad *et al.*, 2000) the isotope fractionation by different aerobic strains was variable (Table I). The strongest carbon isotope fractionation was observed for toluene degradation by *P. putida* strain mt-2 ( $\alpha_C = 1.0033$ ) which attacks toluene on the methyl group by xylene monooxygenase (Worsey and Williams, 1975). Isotope fractionation observed for the ring-monooxygenase reaction of *R. pickettii* strain PKO1 (Olsen *et al.*, 1994) showed significant carbon isotope fractionation ( $\alpha_C = 1.0011 \pm 0.0002$ ) although less pronounced than *P. putida* strain mt-2. The dioxygenase reaction of *P. putida* strain F1 (Yeh *et al.*, 1977) did not show significant carbon isotope fractionation upon toluene degradation ( $\alpha_C = 1.0004 \pm 0.0003$ ). These results clearly point out that the great mechanistic variability of oxygenase enzymes of different bacterial strains degrading toluene leads to different extents of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope fractionation. Thus, isotope fractionation observed in oxic habitats may be a qualitative indication for biodegradation of aromatic hydrocarbons such as toluene but a quantitative assessment is not possible because the degradation pathways of the aerobic bacterial community involved in the degradation are not known. On the other hand, the absence of isotope fractionation in oxic environments, however, cannot be taken as evidence that microbial degradation of aromatic hydrocarbons is not taking place because dioxygenase reactions hydroxylating the aromatic ring do not exhibit isotope effects.

The consistent isotope fractionation during anaerobic degradation might be a consequence of the fact that all of the known cultures investigated so far degrade toluene *via* the benzylsuccinate synthase pathway. Nevertheless, it has to be considered that the number of anaerobic toluene-degrading bacterial isolates is limited as compared to aerobic organisms, although anaerobic organisms have been discovered for almost every type of anaerobic respiration (Dolfing *et al.*, 1990; Lovley and Lonergan, 1990; Rabus *et al.*, 1993; Meckenstock, 1999; Ahad *et al.*, 2000). Other possible anaerobic pathways, if they exist, could lead to isotope fractionation effects different from the ones of the cultures investigated.

As a first attempt to describe biodegradation in complex systems based on isotope fractionation, we studied toluene degradation in a soil column. The column was filled with aquifer material from a contaminated site, and the experiment was conducted over several months with an anoxic, toluene-containing mineral medium and sulfate as electron acceptor. After significant toluene degradation was established, water samples were taken from several ports along the column and toluene concentrations and the respective isotope ratios were determined (Figure 2) (Meckenstock *et al.*, 1999). In contrast to the growth experiments with batch cultures, the concentrations and isotopic compositions varied over the distance from the source of the contaminants instead of time. The percentage of biodegradation was calculated with Equation (7) based on the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope ratios in the residual toluene measured at the different sample ports and the isotope fractionation factor

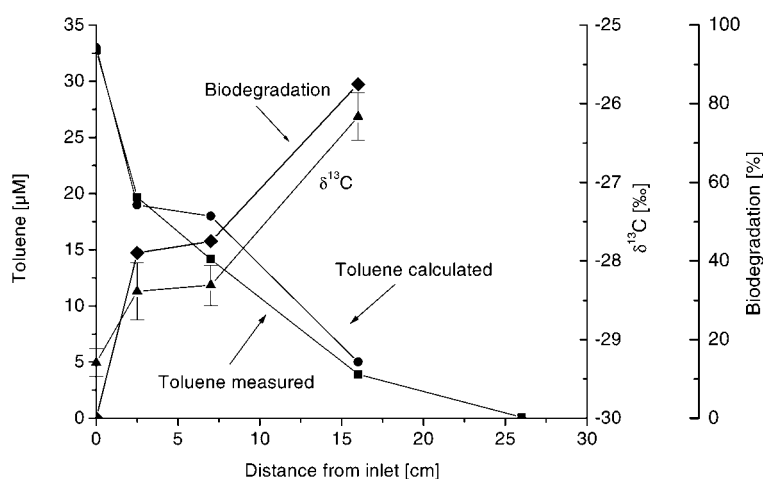


Figure 2. Stable carbon isotope fractionation during degradation of aromatic hydrocarbons in an anoxic soil column. (■) Toluene concentrations, and (▲) stable isotope values in the residual substrate fraction of the soil column operated with sulfate as electron acceptor. (◆) Depict the percentage of biodegradation using Equation (7) based on the measured isotope values, and (●) the theoretical toluene concentrations as calculated by Equation (6) and the inlet concentration  $C_0$ .

$\alpha C = 1.0017$  obtained from batch culture experiments with strain TRM1. The calculations indicated that 85% of the toluene was degraded after 16 cm along the column flow path. The toluene concentration at the last sampling port was below the detection limit of the isotope analysis. A calculation of the theoretical residual substrate fraction  $C_r$  in the soil column was performed with Equation (6) using the initial concentration at the inlet of the column  $C_0$  and the isotope fractionation factor  $\alpha C = 1.0017$  obtained from the batch cultures. The calculated residual toluene concentrations matched the measured toluene concentrations along the column (Figure 2). This was certainly due to steady state conditions in the soil column implying that other sinks of toluene such as adsorption and dilution could be neglected. The Rayleigh equation, developed for closed systems like batch cultures, could therefore be used to calculate the concentrations of the residual substrate fraction.

A similar attempt was made to describe the extent of biodegradation  $B$  in a petroleum-contaminated aquifer located near the city of Ingolstadt, Germany, which was spilled by a tank truck accident in 1987. Concentrations of toluene and other aromatic hydrocarbons and their respective isotope ratios were analysed along a profile of 25 m (Figure 3, Table II). The negative redox potentials in all sampling wells indicated anoxic conditions. The toluene concentrations showed a steep gradient between 0 and 5 m but a significant amount remained present until 10 m distance from the first well. The corresponding  $\delta^{13}\text{C}$  isotope ratios of the residual toluene increased significantly with distance from the first well implying relevant biodegradation in the aquifer. The percentage of biodegradation  $B$  [%] in

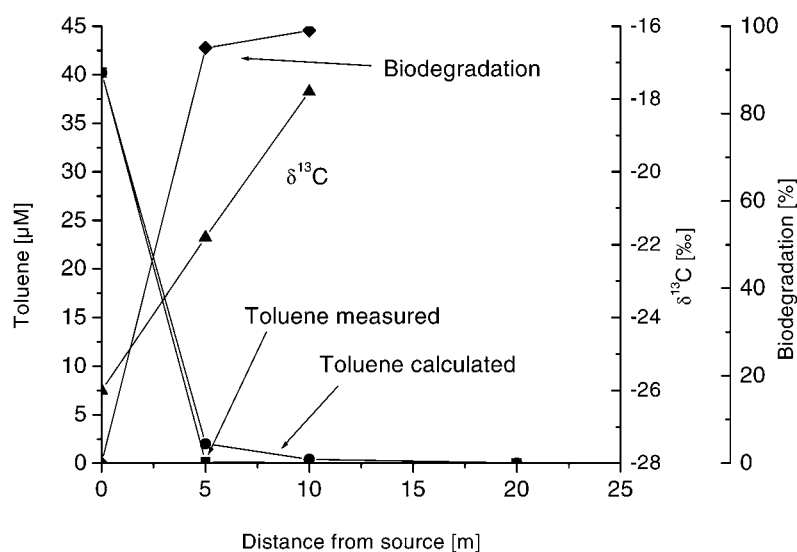


Figure 3. Stable carbon isotope fractionation during degradation of aromatic hydrocarbons in a contaminated aquifer. (■) Toluene concentrations, and (▲)  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  carbon isotope ratios along a monitoring profile of a contaminated site near the city of Ingolstadt, Germany. The extent of biodegradation (◆) is calculated with Equation (5) based on the measured isotope values. Theoretical toluene concentrations (●) are calculated with Equation (6).

TABLE II

Concentrations and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope values of selected contaminants along a monitoring profile of a contaminated aquifer

Distance from source (m)	0		5		10		20	
	Conc.	$\delta^{13}\text{C}$	Conc.	$\delta^{13}\text{C}$	Conc.	$\delta^{13}\text{C}$	Conc.	$\delta^{13}\text{C}$
Benzene	1300	-25.9	440	-25.4	290	-24.5	33	-22.0
Toluene	3700	-26.0	11	-21.8	3	-17.8	0	n.d. <sup>a</sup>
Ethylbenzene	780	-27.0	220	-26.9	39	-25.7	2	n.d. <sup>a</sup>
<i>o</i> -Xylene	752	-26.9	11	-20.2	32	-18.7	0	n.d. <sup>a</sup>
Naphthalene	67	-28.1	34	-26.5	3	-22.3	2	n.d. <sup>a</sup>

Concentrations are given in  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

<sup>a</sup> n.d. = Not detectable.

the aquifer was calculated using the isotope data and the laboratory-derived isotope fractionation factor for anaerobic toluene degradation by strain TRM1 ( $\alpha\text{C} = 1.0017$ ) because reducing conditions were detected along the plume (Figure 3). The percentage of biodegradation showed that within a distance of 10 m from the first monitoring well of the profile more than 99% of the original toluene concentration was reduced by biodegradation. This calculation of the extent of biodegradation

was independent on the groundwater flow and dilution or adsorption because it is solely based on isotope values which are altered as a consequence of biodegradation. Other sinks may also have contributed to the reduction of the contaminant concentrations but they did not affect the isotope ratios and thus had no effect on the calculated extent of biodegradation (Meckenstock *et al.*, 1999). Therefore, the calculated extent of biodegradation is a good indicator of the intensity of biological degradation processes in distinct zones of an aquifer.

The extent of biodegradation of the residual substrate fraction was quantified, assuming that (I) all monitoring wells were located directly downstream of the source of contamination, and (II) dilution and adsorption could be neglected. Based on these assumptions, the isotopic compositions and concentrations monitored in the first well could be employed as  $R_0$  and  $C_0$  to calculate the absolute amount of biodegraded toluene in the wells (Equations (5) and (6)). The residual toluene concentrations calculated showed a strong decrease in the wells at 5 and 10 m distance from the source matching the residual concentrations measured (Figure 3). The calculated residual concentrations were slightly higher than the measured concentrations which might be a consequence of dilution or adsorption as additional sinks of toluene.

Concentrations of other aromatic hydrocarbons analysed also decreased with distance along the monitoring profile (Table II), accompanied by a concomitant increase in their  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope ratios. As isotope fractionation factors were not available for these compounds the extent of biodegradation could not be calculated. However, a qualitative interpretation of the isotope data indicated biodegradation of all compounds. This was in agreement with the fact that the plume did not grow during the last 5 yr but was slowly decreasing in size (data not shown).

#### 4. Conclusions

We have shown that stable isotope fractionation can serve as a valuable tool to assess *in situ* biodegradation in contaminated aquifers. The carbon isotope fractionation during anaerobic degradation of toluene was consistent for different bacterial strains and could be used to quantify biodegradation. Isotope fractionation of aromatic hydrocarbons such as toluene in oxic habitats is probably much more variable due to different oxygenase enzyme systems initiating the degradation and exhibiting different extents of fractionation. Nevertheless, the observation of isotope fractionation can be used as a positive indicator for biodegradation in general and this may be increasingly important for the assessment of natural attenuation processes. The absence of isotope fractionation in oxic habitats, however, should be interpreted with care because it is not necessarily indicative of the absence of biodegradation.



### Acknowledgement

The authors thank Bernhard Schink, Konstanz, for consistent support. This work has been financed in part by the German Federal Ministry for Education and Science (BMBF) through Grant 02 WT 0022.

### References

- Ahad, J. M. E., Lollar, B. S., Edwards, E. A., Slater, G. F. and Sleep, B. E.: 2000, 'Carbon Isotope Fractionation during Anaerobic Biodegradation of Toluene: Implications for Intrinsic Bioremediation', *Environ. Sci. Technol.* **34**, 892–896.
- Bloom, Y., Aravena, R., Hunkeler, D., Edwards, E. and Frape, S. K.: 2000, 'Carbon Isotope Fractionation during Microbial Degradation of Trichloroethene, *cis*-1,2-dichloroethene, and Vinyl Chloride: Implications for Assessment of Natural Attenuation', *Environ. Sci. Technol.* **34**, 2768–2772.
- Cline, J. D.: 1969, 'Spectrophotometric Determination of Hydrogen Sulfide in Natural Waters', *Limnol. Oceanogr.* **14**, 454–458.
- Dolfing, J., Zeyer, J., Binder-Eicher, P. and Schwarzenbach, R. P.: 1990, 'Isolation and Characterization of a Bacterium that Mineralizes Toluene in the Absence of Molecular Oxygen', *Arch. Microbiol.* **154**, 336–341.
- Gibson, D. T. and Subramanian, V.: 1984, 'Microbial Degradation of Aromatic Hydrocarbons', in D. T. Gibson (ed.), *Microbial Degradation of Organic Compounds*, Dekker, New York, pp. 181–252.
- Heider, J., Spormann, A. M., Beller, H. R. and Widdel, F.: 1999, 'Anaerobic Bacterial Metabolism of Hydrocarbons', *FEMS Microbiol. Rev.* **22**, 459–473.
- Hoefs, J.: 1997, *Stable Isotope Geochemistry*, Springer Verlag, Berlin.
- Hunkeler, D., Aravena, R. and Butler, B. J.: 1999, 'Monitoring Microbial Dechlorination of Tetrachloroethene (PCE) in Groundwater using Compound-specific Stable Isotope Carbon Ratios: Microcosm and Field Studies', *Environ. Sci. Technol.* **33**, 2733–2738.
- Lebedew, W. C., Owsjannikow, W. M., Mogilewskij, G. A. and Bogdanow, W. M.: 1969, 'Fraktionierung der Kohlenstoffisotope durch Mikrobiologische Prozesse in der Biochemischen Zone', *Angew. Geol.* **15**, 621–624.
- Lollar, B. S., Slater, G. F., Ahad, J., Sleep, B., Spivack, J., Brennan, M. and MacKenzie, P.: 1999, 'Contrasting Carbon Isotope Fractionation during Biodegradation of Trichloroethylene and Toluene: Implications for Intrinsic Bioremediation', *Org. Geochem.* **30**, 813–820.
- Lovley, D. R. and Lonergan, D. J.: 1990, 'Anaerobic Oxidation of Toluene, Phenol, and *p*-cresol by the Dissimilatory Iron-reducing Organism, GS-15', *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1858–1864.
- Meckenstock, R. U.: 1999, 'Fermentative Toluene Degradation in Anaerobic Defined Syntrophic Cocultures', *FEMS Microbiol. Lett.* **177**, 67–73.
- Meckenstock, R. U., Morasch, B., Warthmann, R., Schink, B., Annweiler, E., Michaelis, W. and Richnow, H. H.: 1999,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Isotope Fractionation of Aromatic Hydrocarbons during Microbial Degradation', *Environ. Microbiol.* **1**, 409–414.
- Morasch, B., Richnow, H. H., Schink, B. and Meckenstock, R. U.: 2001, 'Carbon and Hydrogen Stable Isotope Fractionation during Aerobic Bacterial Degradation of Aromatic Hydrocarbons', *Environ. Microbiol.* (submitted).
- O'Leary, M. H.: 1980, 'Determination of Heavy-atom Isotope Effects on Enzyme-catalyzed Reactions', in D. L. Purich (ed.), *Enzyme Kinetics and Mechanism*, Academic Press, New York, pp. 83–103.
- O'Leary, M. H.: 1984, 'Carbon Isotope Fractionation in Plants', *Phytochemistry* **20**, 553–567.

- Olsen, R. H., Kukor, J. J. and Kaphammerq, B.: 1994, 'A Novel Toluene-3-monooxygenase Pathway Cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO1', *J. Bacteriol.* **176**, 3749–3756.
- Rabus, R., Nordhaus, R., Ludwig, W. and Widdel, F.: 1993, 'Complete Oxidation of Toluene under Strictly Anoxic Conditions by a New Sulfate-reducing Bacterium', *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1444–1451.
- Rayleigh, J. W. S.: 1896, 'Theoretical Considerations Respecting the Separation of Gases by Diffusion and Similar Processes', *Philos. Mag.* **42**, 493–498.
- Richnow, H. H. and Meckenstock, R. U.: 1999, 'Isotopen-geochemisches Konzept zur *In Situ* Erfassung des Biologischen Abbaus in Kontaminiertem Grundwasser', *TerraTech* **5/1999**, 38–41.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, R.: 1989, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Stahl, W. J.: 1980, 'Compositional Changes and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Fractionations during the Degradation of Hydrocarbons by Bacteria', *Geochim. Cosmochim. Acta* **44**, 1903–1907.
- Stookey, L. L.: 1970, 'Ferrozine – A New Spectrophotometric Reagent for Iron', *Anal. Chem.* **42**, 779–781.
- Widdel, F. and Bak, F.: 1992, 'Gram-negative Mesophilic Sulfate-reducing Bacteria', in A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer (eds), *The Prokaryotes*, Springer Verlag, New York, pp. 3352–3378.
- Worsey, M. J. and Williams, P. A.: 1975, 'Metabolism of Toluene and Xylenes by *Pseudomonas putida* (Arvilla) mt-2: Evidence for a New Function of the TOL Plasmid', *J. Bacteriol.* **124**, 7–13.
- Yeh, W. K., Gibson, D. T. and Liu, T.-N.: 1977, 'Toluene Dioxygenase: A Multicomponent Enzyme System', *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**, 401–410.

## Carbon and Hydrogen Stable Isotope Fractionation during Aerobic Bacterial Degradation of Aromatic Hydrocarbons†

Barbara Morasch,<sup>1,‡</sup> Hans H. Richnow,<sup>2</sup> Bernhard Schink,<sup>1</sup> Andrea Vieth,<sup>2</sup>  
and Rainer U. Meckenstock<sup>1,‡,\*</sup>

Fakultät für Biologie, Universität Konstanz, D-78457 Konstanz,<sup>1</sup> and Umweltforschungszentrum  
Leipzig-Halle GmbH, D-04318 Leipzig,<sup>2</sup> Germany

Received 23 January 2002/Accepted 1 July 2002

**<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C and D/H stable isotope fractionation during aerobic degradation was determined for *Pseudomonas putida* strain mt-2, *Pseudomonas putida* strain F1, *Ralstonia pickettii* strain PKO1, and *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816 grown with toluene, xylenes, and naphthalene. Different types of initial reactions used by the respective bacterial strains could be linked with certain extents of stable isotope fractionation during substrate degradation.**

Intrinsic microbial degradation is an important process in elimination of contaminants in polluted aquifers, which can be used for the sustainable cleanup of contaminated sites. However, cost-effective remediation strategies such as natural attenuation require a profound knowledge of the microbial degradation processes in the subsurface. Although biodegradation of aromatic hydrocarbons by aerobic and anaerobic bacteria has been investigated in detail in laboratory systems (11, 32), assessment at field sites remains difficult. Stable carbon isotope analysis is one approach to quantify microbial activities in situ. For laboratory cultures, isotope fractionation has been shown to occur during degradation of aromatic hydrocarbons, such as toluene (1, 19, 20), or chlorinated hydrocarbons, such as trichloroethene (3, 7, 26). In addition, in contaminated field sites, carbon isotope fractionation could be observed and was interpreted to be indicative of microbial degradation in situ (15, 24). For toluene as a model compound, it has been demonstrated that isotope fractionation is caused mainly by the first enzyme reaction in the degradation pathway, whereas transport to and into the cell appears not to be relevant for fractionation. The extent of isotope fractionation is considered to be independent of differences in the growth kinetics of the bacteria (20). Isotope fractionation during anaerobic degradation of toluene was on the same order of magnitude for denitrifying, iron (III)-reducing, sulfate-reducing, and fermenting bacteria (1, 19), probably because, in these cases, degradation was initiated by benzylsuccinate synthase. This finding suggests that, in anoxic environments, isotope fractionation could be applied to assess biological degradation quantitatively, as has been worked out recently for several aquifers (23, 25).

The objective of this study was to examine whether carbon and hydrogen isotope fractionation could be used to quantify intrinsic biodegradation as well in oxic environments. Previous studies with the aerobic bacterium *Pseudomonas putida* strain mt-2 showed an extent of isotope fractionation similar to that of anaerobic toluene-degrading strains (19), whereas isotope fractionation during toluene degradation by undefined aerobic microbial communities was not detected (26). Therefore, we started a systematic investigation of the effects of different oxygenase enzymes and stable isotope fractionation.

*P. putida* strain mt-2 (20), *Ralstonia pickettii* strain PKO1 (J. J. Kukor, Rutgers University, New Brunswick, N.J.), and *P. putida* strain F1 (A. M. Cook, Konstanz, Germany) were taken as representatives of bacteria by using different toluene degradation pathways in polluted aquifers. Strains were grown in 200-ml batch cultures with 15  $\mu$ l of toluene, *m*-xylene, or *p*-xylene (analytical grade quality; Fluka, Buchs, Switzerland) as described previously (20). Cultures for isotope fractionation experiments were inoculated with 5% (vol/vol) of precultures (optical density at 578 nm [OD<sub>578</sub>] = 0.25), and growth was monitored by measuring the OD<sub>578</sub>. Hydrocarbon concentrations were determined by high-performance liquid chromatography (20). During degradation of toluene by *P. putida* strain mt-2 (methyl monooxygenase), the <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C isotope ratios in the nondegraded toluene were determined by gas chromatography–combustion-isotope ratio monitoring mass spectrometry (GC-C-IRMS) (20) and shifted from  $\delta^{13}\text{C} = -29.18\text{‰} \pm 0.35\text{‰}$  to more positive values of  $\delta^{13}\text{C} = -23.22\text{‰} \pm 0.32\text{‰}$  after 80% of the substrate was degraded (equation 4) (Fig. 1). Analysis of the carbon isotope ratios  $\ln(R_t/R_0)$  and the respective concentrations  $\ln(c_t/c_0)$  according to the Rayleigh equation for closed systems (equation 1) (13, 22) resulted in an isotope fractionation factor:  $\alpha_{\text{C}} = 0.9967 \pm 0.0003$  (Fig. 2A).  $R_t$  and  $c_t$  are the <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C isotope ratio and the residual substrate concentration at time  $t$ , and  $R_{\text{Std}}$  is the isotope ratio of an international standard (Vienna PDB).

For direct comparison between the bacterial pure cultures, isotope fractionation will be referred to as “enrichment factor  $\epsilon$ ” (equation 2), which is indicated as  $\epsilon_n$  in experiments with unlabeled toluene. During toluene degradation by *P. putida*

\* Corresponding author. Present address: Zentrum für Angewandte Geowissenschaften, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Sigwartstr. 10, D-72076 Tübingen, Germany. Phone: 49-(0)7071-2973150. Fax: 49-(0)7071-295139. E-mail: rainer.meckenstock@uni-tuebingen.de.

† This paper represents publication no. 182 of the Deutsche Forschungsgemeinschaft priority program 546 “Geochemical processes with long-term effects in anthropogenically affected seepage- and groundwater.”

‡ Present address: Zentrum für Angewandte Geowissenschaften, Eberhard-Karls-Universität Tübingen, D-72076 Tübingen, Germany.

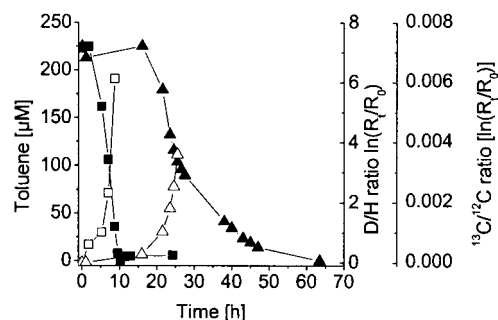


FIG. 1. Isotope shifts during degradation of toluene and a toluene-toluene- $d_8$  mixture by *P. putida* strain mt-2. The decrease in toluene (■) and concomitant increase in  $^{13}\text{C}$  ( $R = ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) in the remaining substrate (□) and the decrease in toluene-toluene- $d_8$  concentration (▲) and concomitant increase in deuterium  $R_t = [\text{toluene-}d_8]/[\text{toluene}]$  in the residual nondegraded substrate fraction (△) were monitored over time. In every case, data are shown for one representative experiment out of three performed.

strain mt-2, the enrichment factor was  $\epsilon_n = -3.3 \pm 0.3$  for  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope fractionation (Table 1).

$$\frac{R_t}{R_0} = \left(\frac{c_t}{c_0}\right)^{(\alpha C - 1)} \quad (1)$$

$$\epsilon = (\alpha - 1) \times 1,000 \quad (2)$$

$$\ln\left(\frac{R_t}{R_0}\right) = \ln\left[\frac{\left(\frac{c_t}{c_0}\right)}{(1 + R_t)/(1 + R_0)}\right] \times (\alpha H - 1) \quad (3)$$

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{R_{\text{Sample}}}{R_{\text{Std}} - 1}\right) \times 1,000 \quad (4)$$

*P. putida* strain mt-2 also degrades *m*- and *p*-xylene by using the same enzyme as toluene (methyl monooxygenase) (29). The enrichment factors for carbon isotope fractionation obtained during degradation of *m*- and *p*-xylene were slightly smaller than those of toluene (Table 1).

Toluene degradation by *R. pickettii* strain PKO1 (ring monooxygenase) resulted in a carbon isotope fractionation that was three times lower than that with strain mt-2. The third toluene-degrading strain, *P. putida* strain F1, hydroxylated the substrate with a toluene-dioxygenase to the corresponding catechol. The concomitant  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope fractionation was insignificant. The same was observed with *P. putida* strain NCIB 9816 in degradation experiments with naphthalene (DSM 8368; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany). Strain NCIB 9816 attacks naphthalene by a dioxygenase reaction similar to that of strain F1. It was grown in batch culture with 150 to 200  $\mu\text{M}$  dissolved naphthalene as a carbon source. Naphthalene was transferred into the culture bottles as a solid crystal and autoclaved in 180 ml of  $\text{H}_2\text{O}$ . After cooling, the stock solutions for mineral medium M9 were added. The carbon isotope ratio in the residual naphthalene did not change during degradation over time, and the isotope fractionation was not significant (Fig. 2A and Table 1).

Hydrogen isotope fractionation during degradation of aro-

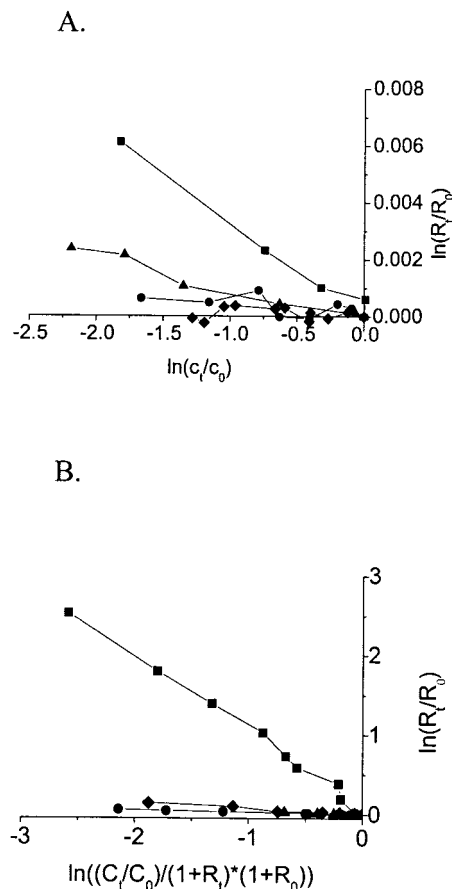


FIG. 2. Carbon (A) and hydrogen (B) stable isotope fractionation during degradation of toluene by *P. putida* mt-2 (■), *R. pickettii* PKO1 (▲), and *P. putida* F1 (●) and isotope fractionation during degradation of naphthalene by *P. putida* NCIB 9816 (◆).  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  carbon isotope fractionation was plotted according to equation 1. D/H isotope fractionation was determined with equation 3 during growth with equal amounts of per-deuterated toluene- $d_8$  and toluene and per-deuterated naphthalene- $d_8$  and naphthalene.

matic hydrocarbons was investigated by cultivating the same four bacterial strains with a mixture of nondeuterated toluene and per-deuterated toluene- $d_8$  (8  $\mu\text{l}$  each) or with a mixture of nonlabeled naphthalene and per-deuterated naphthalene- $d_8$  (3 mg each). The ratio of residual labeled to nonlabeled substrate in the culture during growth was analyzed in pentane extracts of liquid samples (2 to 7 ml) by GC (20). Naphthalene and per-deuterated naphthalene- $d_8$  were separated by GC to the baseline at a constant oven temperature of 140°C. Isotope fractionation factors were calculated according to equation 3 with the isotope ratio  $R_t = [\text{deuterated substrate}]/[\text{substrate}]$  (2). For a very high abundance of the heavier isotope, as was used in the experiments for hydrogen isotope fractionation, equation 1 changes to equation 3 (2).

Enrichment factors derived from equation 3 are depicted as  $\epsilon_r$ . Degradation of half of the substrate mixture by *P. putida* strain mt-2 (methyl monooxygenase) was accompanied by a 40-fold enrichment of per-deuterated toluene- $d_8$ , correlated with a near-total depletion of nonlabeled toluene (Fig. 1). The

TABLE 1.  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  and D/H isotope fractionation by different aerobic bacterial strains during growth with aromatic hydrocarbons<sup>a</sup>

Strain	Enzyme mechanism	Carbon source	$\epsilon_{\text{C}}$	$\epsilon_{\text{D}}$
<i>P. putida</i> strain mt-2	Methyl monooxygenase	Toluene	$-3.3 \pm 0.3$	$-905 \pm 71$
	Methyl monooxygenase	<i>m</i> -Xylene	$-1.7 \pm 0.04$	ND <sup>b</sup>
	Methyl monooxygenase	<i>p</i> -Xylene	$-2.3 \pm 0.3$	ND
<i>R. pickettii</i> strain PKO1	Ring monooxygenase	Toluene	$-1.1 \pm 0.2$	$-16 \pm 5.3$
<i>P. putida</i> strain F1	Ring dioxygenase	Toluene	$-0.4 \pm 0.3$	$-28 \pm 10$
<i>P. putida</i> strain NCIB 9816	Ring dioxygenase	Naphthalene	$-0.1 \pm 0.2$	$-65 \pm 13$

<sup>a</sup> Stable carbon isotope fractionation is given as the enrichment factor,  $\epsilon_{\text{C}}$ , and was calculated with equations 1 and 2. Hydrogen isotope fractionation with mixtures (50:50) of per-deuterated and nonlabeled substrate was determined with equation 3. The enrichment factor for labeled substances,  $\epsilon_{\text{D}}$ , was determined by equation 2. Mean values  $\pm$  standard deviation are given based on three independent growth experiments with fivefold isotope analysis per data point.

<sup>b</sup> ND, not determined.

D/H isotope fractionation determined in the first growth phase was  $\epsilon_{\text{D}} = -905 \pm 71$ . *R. pickettii* strain PKO1 (ring monooxygenase) and *P. putida* strain F1 (ring dioxygenase) degraded the toluene-toluene-*d*<sub>8</sub> mixture, resulting in D/H isotope fractionations more than 10 and 50 times stronger than the carbon isotope fractionation by the same strains, but still 50 and 30 times lower, respectively, than the D/H fractionation by *P. putida* strain mt-2. *P. putida* strain NCIB 9816 (ring dioxygenase) grown with naphthalene-naphthalene-*d*<sub>8</sub> showed a D/H isotope fractionation that was twice as strong as the D/H isotope fractionation by *P. putida* strain F1 (Fig. 2B and Table 1).

Of the four strains examined, *P. putida* strain mt-2 showed by far the highest  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  and D/H isotope fractionation during aerobic toluene degradation. The methyl monooxygenase of this bacterium exhibits similarities in its amino acid sequence to the methane monooxygenase of *Methylosinus trichosporium* OB3b (12, 33). Oxygen bound as an oxene group to the catalytic iron of methane monooxygenase is proposed to lead to a homolytic C-H bond cleavage of the substrate. The reaction is associated with strong isotope effects during methane conversion and minor effects during ethane and propane conversion (4). The authors assume that the reaction mechanism with methane differs slightly from that with other substrates. Similarly, in our study, the xylene monooxygenase of *P. putida* strain mt-2 caused strong hydrogen and carbon isotope fractionation. Minor differences in the enzymatic reactions with toluene and *m*- and *p*-xylene might be the reason for the variations in the respective  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope fractionation factors. Cytochrome P450 is another well-known example of an enzyme that dissociates a C-H bond and inserts oxygen into benzylic or aliphatic substrates (35). In an experimental study, Manchester et al. (18) found the strongest isotope effects with *p*-xylene and toluene, which showed six times higher rate constants than deuterated *p*-xylene and toluene.

Toluene degradation by *R. pickettii* strain PKO1 is catalyzed by a monooxygenase reaction hydroxylating carbon 3 of the aromatic ring (21). The amino acid sequence of this toluene-3-monooxygenase is remarkably similar to that of toluene-4-monooxygenase of *Pseudomonas mendocina* strain KR1, an enzyme studied in great detail (31). The poor hydrogen isotope fractionation of strain PKO1 is probably due to an enzymatic reaction with the  $\pi$ -electron system of the aromatic substrate. The hydroxylation presumably is a two-step process starting with an electrophilic attack of iron-bound oxygen on the aro-

matic ring and the formation of a C-O  $\sigma$ -bond. In a faster second step, the hydrogen atom bound to this carbon atom is released as a proton, and the electrons are used to reconstitute the aromaticity of the carbon ring skeleton (5). The weak carbon and hydrogen isotope fractionation observed here might be due to secondary isotope effects caused by atoms of the substrate molecule not directly contributing to the reaction.

*P. putida* strains F1 and NCIB 9816 both attack toluene through an initial dioxygenase reaction on the aromatic ring (6, 16, 34). Initially,  $\Pi$ -electrons of the aromatic substrate are attracted by activated oxygen, which is bound to a catalytic iron center (28). Primary isotope effects do not accompany this reaction, because there is no distinct bond cleavage involved. The first reaction product of toluene and naphthalene oxidation is a *cis*-dihydrodiol, which is dehydrogenated in a subsequent step to form a catechol derivative (9). The terminal oxygenase units of toluene and naphthalene dioxygenase of strains F1 and NCIB 9816 are both hexamers ( $\alpha_3\beta_3$ ) with catalytic mononuclear ferrous iron centers (8, 17, 30). The amino acid sequences of their subunits suggest that they derived from a common ancestor (12) and share the same reaction mechanism (10). Accordingly,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope fractionation was very weak during toluene degradation by *P. putida* strain F1 and was not significant during naphthalene degradation by *P. putida* strain NCIB 9816. The more pronounced secondary D/H isotope fractionation effects of *P. putida* strain NCIB 9816 might be caused by individual features of the naphthalene degradation mechanism.

Recently, Hunkeler et al. (14) found relatively small amounts of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  and D/H isotope fractionation during benzene degradation by *Acinetobacter* sp. and *Burkholderia* sp. Others observed a small amount of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope fractionation during benzene degradation by an aerobic mixed culture that was enriched from groundwater of a petrochemical site (27). The small isotope fractionation factors and the increase in  $\delta^{13}\text{C}$  for the initial mono- or dioxygenase reactions at the benzene ring that were documented in these papers are in agreement with our observations that oxygenases acting on  $\Pi$ -electron system of the aromatic ring produce only minor isotope effects.

The present study and previous investigations allow some preliminary conclusions to be drawn about when stable isotope fractionation could be used to assess biodegradative activities in contaminated groundwater. Consistent carbon isotope frac-

tionation during toluene degradation by anaerobic microorganisms allows a quantitative assessment of bacterial degradation under anoxic conditions. Hydrogen isotope effects are stronger than carbon isotope effects by 2 or 3 orders of magnitude, but are also more variable between different types of anaerobic bacteria. Small extents of degradation are detectable, but quantification *in situ* might be difficult. However, D/H and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope fractionation in oxic zones of contaminated aquifers could be used only as a qualitative indicator of biodegradation. The differences in isotope fractionation between bacterial strains with different oxygenase reactions preclude a quantitative assessment of *in situ* biodegradation based on isotope fractionation in oxic zones. Nevertheless, combined measurement of carbon isotope fractionation for *in situ* quantification and hydrogen isotope fractionation as a positive indicator of bacterial activities could be a valuable tool to assess biodegradation in the environment.

This work was financially supported by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (grant 02WT0022) and by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (grant Schi 180/7).

#### REFERENCES

- Ahad, J. M. E., B. Sherwood Lollar, E. A. Edwards, G. F. Slater, and B. E. Sleep. 2000. Carbon isotope fractionation during anaerobic biodegradation of toluene: implications for intrinsic bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* **34**:892–896.
- Biegeleisen, J., and M. Wolfsberg. 1958. Theoretical and experimental aspects of isotope effects in chemical kinetics. *Adv. Chem. Phys.* **1**:15–76.
- Bloom, Y., R. Aravena, D. Hunkeler, E. Edwards, and S. K. Frape. 2000. Carbon isotope fractionation during microbial degradation of trichloroethene, *cis*-1,2-dichloroethene, and vinyl chloride: implications for assessment of natural attenuation. *Environ. Sci. Technol.* **34**:2768–2772.
- Brazeau, B. J., and J. D. Lipscomb. 2000. Kinetics and activation thermodynamics of methane monooxygenase compound Q formation and reaction with substrates. *Biochemistry* **39**:13503–13515.
- Carey, F. A., and R. J. Sundberg. 1990. *Advanced organic chemistry*. Plenum Press, New York, N.Y.
- Carredano, E., A. Karlsson, B. Kauppi, D. Choudhury, D. T. Gibson, H. Eklund, and S. Ramaswamy. 2000. Substrate binding site of naphthalene 1,2-dioxygenase: functional implications of indole binding. *J. Mol. Biol.* **296**:701–712.
- Ertl, S., F. Seibel, L. Eichinger, F. H. Frimmel, and A. Kettrup. 1996. Determination of the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope ratio of organic compounds for the biological degradation of tetrachloroethene (PCE) and trichloroethene (TCE). *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **24**:16–21.
- Gassner, G. T., M. L. Ludwig, D. L. Gatti, C. C. Correll, and D. P. Ballou. 1995. Structure and mechanism of the iron-sulfur flavoprotein phthalate dioxygenase reductase. *FASEB J.* **9**:1411–1418.
- Gibson, D. T., G. E. Cardini, F. C. Maseles, and R. E. Kallio. 1970. Incorporation of oxygen-18 into benzene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* **9**:1631–1635.
- Gibson, D. T., and R. E. Parales. 2000. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**:236–243.
- Gibson, D. T., and V. Subramanian. 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons, p. 181–252. *In* D. T. Gibson (ed.), *Microbial degradation of organic compounds*, vol. 13. Dekker, New York, N.Y.
- Harayama, S., M. Kok, and E. L. Neidle. 1992. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**:565–601.
- Hoefs, J. 1997. *Stable isotope geochemistry*, 4th ed. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Hunkeler, D., N. Andersen, R. Aravena, S. M. Bernasconi, and B. J. Butler. 2001. Hydrogen and carbon isotope fractionation during aerobic biodegradation of benzene. *Environ. Sci. Technol.* **35**:3462–3467.
- Hunkeler, D., R. Aravena, and B. J. Butler. 1999. Monitoring microbial dechlorination of tetrachloroethene (PCE) in groundwater using compound-specific stable carbon isotope ratios: microcosm and field studies. *Environ. Sci. Technol.* **33**:2733–2738.
- Jeffrey, A. M., H. J. C. Yeh, D. M. Jerina, T. R. Patel, J. F. Davey, and D. T. Gibson. 1975. Initial reactions in the oxidation of naphthalene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* **14**:575–584.
- Kauppi, B., K. Lee, E. Carredano, R. E. Parales, D. T. Gibson, H. Eklund, and S. Ramaswamy. 1998. Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase–naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure* **6**:571–586.
- Manchester, J. I., J. P. Dinnocenzo, L. Higgins, and J. P. Jones. 1997. A new mechanistic probe for cytochrome P450: an application of isotope effect profiles. *J. Am. Chem. Soc.* **119**:5069–5070.
- Meckenstock, R. U., B. Morasch, R. Warthmann, B. Schink, E. Annweiler, W. Michaelis, and H. H. Richnow. 1999.  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope fractionation of aromatic hydrocarbons during microbial degradation. *Environ. Microbiol.* **1**:409–414.
- Morasch, B., H. H. Richnow, B. Schink, and R. U. Meckenstock. 2001. Stable hydrogen and carbon isotope fractionation during microbial toluene degradation: mechanistic and environmental aspects. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:4842–4849.
- Olsen, R. H., J. J. Kukor, and B. Kaphammer. 1994. A novel toluene-3-monooxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO1. *J. Bacteriol.* **176**:3749–3756.
- Rayleigh, J. W. S. 1896. Theoretical considerations respecting the separation of gases by diffusion and similar processes. *Philos. Mag.* **42**:493–498.
- Richnow, H. H., M. Gehre, M. Kästner, B. Morasch, and R. U. Meckenstock. 2001. Characterisation of microbial *in situ* degradation of aromatic hydrocarbons, p. 99–108. *In* V. S. Magar, T. M. Vogel, M. Aelion, and A. Leeson (ed.), *Innovative methods in support of bioremediation*. Battelle Press, Columbus, Ohio.
- Richnow, H. H., and R. U. Meckenstock. 1999. Isotopen-geochemisches Konzept zur *in situ* Erfassung des biologischen Abbaus in kontaminiertem Grundwasser. *TerraTech* **5**:38–41.
- Richnow, H. H., A. Vieth, M. Kästner, M. Gehre, and R. U. Meckenstock. 2002. Isotope fractionation of toluene: a perspective to characterise microbial *in situ* degradation. *Sci. World J.* **2**:7227–7234.
- Sherwood Lollar, B., G. F. Slater, J. Ahad, B. Sleep, J. Spivack, M. Brennan, and P. MacKenzie. 1999. Contrasting carbon isotope fractionation during biodegradation of trichloroethylene and toluene: implications for intrinsic bioremediation. *Org. Geochem.* **30**:813–820.
- Stehmeier, L. G., M. M. Francis, T. R. Jack, E. Diegor, L. Winsor, and T. A. Abrajano. 1999. Field and *in vitro* evidence for *in situ* bioremediation using compound-specific  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio monitoring. *Org. Geochem.* **30**:821–833.
- Subramanian, V., T.-N. Liu, W. K. Yeh, and D. T. Gibson. 1979. Toluene dioxygenase: purification of an iron-sulfur protein by affinity chromatography. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**:1131–1139.
- Suzuki, M., T. Hayakawa, J. P. Shaw, M. Rekik, and S. Harayama. 1991. Primary structure of xylene monooxygenase: similarities to and differences from the alkane hydroxylation system. *J. Bacteriol.* **173**:1690–1695.
- Torok, D. S., S. M. Resnick, J. M. Brand, D. L. Cruden, and D. T. Gibson. 1995. Desaturation and oxygenation of 1,2-dihydronaphthalene by toluene and naphthalene dioxygenase. *J. Bacteriol.* **177**:5799–5805.
- Whited, G. M., and D. T. Gibson. 1991. Toluene-4-monooxygenase, a three-component enzyme system that catalyzes the oxidation of toluene to *p*-cresol in *Pseudomonas mendocina* KR1. *J. Bacteriol.* **173**:3010–3016.
- Widdel, F., and R. Rabus. 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**:259–276.
- Worsey, M. J., and P. A. Williams. 1975. Metabolism of toluene and xylenes by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid. *J. Bacteriol.* **124**:7–13.
- Yeh, W. K., D. T. Gibson, and T.-N. Liu. 1977. Toluene dioxygenase: a multicomponent enzyme system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**:401–410.
- Yoshizawa, K., Y. Kagawa, and Y. Shioto. 2000. Kinetic isotope effects in a C-H bond dissociation by the iron-oxo species of cytochrome P450. *J. Phys. Chem.* **104**:12365–12370.

## Short Communication

Analysis, Toxicity and Biodegradation of Organic Pollutants in  
Groundwater from Contaminated Land, Landfills and Sediments  
*TheScientificWorldJOURNAL* (2002) 2, xxx-xxx  
ISSN 1537-744X; DOI 10.1100/tsw.2002.210



# Isotope Fractionation of Toluene: A Perspective to Characterise Microbial *in situ* Degradation

H.H. Richnow<sup>1,\*</sup>, A. Vieth<sup>1</sup>, M. Kästner<sup>1</sup>, M. Gehre<sup>1</sup>, and R.U. Meckenstock<sup>2</sup>

<sup>1</sup>UFZ Centre for Environmental Research Leipzig Halle Ltd., Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Germany; <sup>2</sup>Eberhard-Karls University of Tübingen, Center for Applied Geoscience, Sigwartstr. 10, 72076 Tübingen, Germany

Emails: [richnow@san.ufz.de](mailto:richnow@san.ufz.de); [vieth@san.ufz.de](mailto:vieth@san.ufz.de); [kaestner@san.ufz.de](mailto:kaestner@san.ufz.de); [gehre@ana.ufz.de](mailto:gehre@ana.ufz.de); [rainer.meckenstock@uni-tuebingen.de](mailto:rainer.meckenstock@uni-tuebingen.de)

Received November 21, 2001; Revised February 27, 2002; Accepted March 10, 2002; Published May \_\_, 2002

---

A concept to assess *in situ* biodegradation of organic contaminants in the aquifer is presented. The alteration of the carbon isotope composition of contaminants along the groundwater flow path indicates microbial degradation processes and can be used as an indicator for *in situ* biodegradation. The Rayleigh equation was applied to calculate the percentage of the *in situ* biodegradation ( $B[\%]$ ) using the change in the isotopic composition of contaminants ( $R_t/R_0$ ) along the ground water flow path and a kinetic carbon isotope fractionation factor ( $\alpha_C$ ) derived from defined biodegradation experiments in the laboratory. When the groundwater hydrology is known and a representative source concentration ( $C_0$ ) for a groundwater flow path can be determined, the extent of *in situ* biodegradation can be quantified.

**KEY WORDS:** contaminated aquifers, *in situ* biodegradation, natural attenuation

**DOMAINS:** applied microbiology, bacteriology, bioremediation and bioavailability, environmental chemistry, environmental management, environmental monitoring, environmental sciences, environmental technology, isotopes in the environment, water science and technology

---

## INTRODUCTION

*In situ* biodegradation is a major sink of organic contaminants in the aquifer. Thus, *in situ* biodegradation is an important parameter in groundwater monitoring to evaluate *in situ* bioremediation approaches. Today, *in situ* biodegradation is assessed by monitoring the decrease of the concentration of contaminants in time series. However, a decrease of contaminant concentration in a plume could

\* Corresponding author.  
© 2002 with author.

have many causes, such as dilution, sorption, or biological degradation, but only the latter leads to a sustainable contaminant reduction.

Moreover, in the context of economically reasonable remediation strategies, monitored natural attenuation has gained importance. When considering natural attenuation as a reliable remediation strategy, the assessment of *in situ* degradation is the key factor to demonstrating the feasibility of this concept. Thus, innovative approaches have to be developed to monitor processes governing the fate of contaminants in the aquifer.

Biodegradation of pollutants such as aromatic hydrocarbons and chlorinated ethenes leads to an enrichment of  $^{13}\text{C}$  and  $^2\text{H}$  in the residual fraction[1,2,3]. Dilution and volatilisation processes[4], as well as sorption, are unlikely to induce significant fractionation under field conditions. To characterise *in situ* biodegradation, a concept based on the isotope fractionation of organic contaminants during biodegradation had been developed[1,2,3,4,5] and was tested in several field studies. For this report, we selected three field sites of different sizes and origins of contaminants to demonstrate that the *in situ* biodegradation of toluene can be monitored downstream of the source area by applying the isotope fractionation concept.

## EXPERIMENTAL METHODS/PROCEDURES

### Zeitz

The aquifer is located on the site of a former hydrogenation plant in Zeitz (Saxonia-Anhalt, Germany) and represents a massive contamination resulting from benzene production. The site is characterised by two aquifers, which are separated by silt and clay of Tertiary age and parts of a lignite seam. The upper aquifer is a 5–10 m layer of sandy and clayey deposits of predominantly Pleistocene age. The groundwater table is situated 8 to 10 m below surface. The lower aquifer is composed of sand and gravel of Tertiary age. Both aquifers are partly connected hydraulically. The general groundwater flow direction is to the north. Both aquifers are virtually free of dissolved oxygen (data not shown) suggesting that only anaerobic microbial processes may be involved in the degradation of pollutants in contaminated parts. The prevailing contaminants of the upper aquifer are benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX), dominated by high benzene concentrations up to  $500\text{ mg l}^{-1}$ , followed by toluene ( $50\text{ mg l}^{-1}$ ), ethylbenzene ( $1.5\text{ mg l}^{-1}$ ), and  $2.5\text{ mg l}^{-1}$  xylene, respectively. The BTEX concentrations in the aquifer of Tertiary age are considerably lower ( $100\text{ mg l}^{-1}$ ), and benzene is again the dominant pollutant.

### Hamburg

The aquifer is located in an industrial area near the city of Hamburg, Germany, and represents a tar oil contamination. The contamination dated back more than 30 years and was caused by leaking storage tanks containing an aromatic oil rich in naphthalene. The groundwater flux generated a contamination plume more than 800 m long. In the contaminated area of the aquifer anoxic conditions are prevailing. The Pleistocene aquifer is composed of Quaternary sands and gravel with a thickness ranging between 7 and 15 m overlying erratic marls (Drente I)[[unable to identify this term]]. Large parts of the aquifer were covered by erratic marls (Drente II) leading to confined groundwater conditions with a minor infiltration of surface water along the contamination plume. The groundwater table was 3–10 m below the surface.

### Ingolstadt

The aquifer is located at a motorway junction near the city of Ingolstadt, Germany, and represents a small fuel contamination. The aquifer was contaminated with gasoline as a result of a car accident with a tank lorry. Several cubic m of gasoline, mainly BTEX, contaminated a shallow sandy aquifer



and generated a plume of about 25 m in length. The naturally oxic sandy aquifer changed to anoxic conditions in the area of the plume (data not shown).

Groundwater samples were taken and extracted with *n*-pentan. The carbon isotopic composition of the contaminants was measured with an isotope ratio monitoring–gas chromatography–mass spectrometry system (IRM-GC-MS). The IRM-GC-MS system consists of a GC unit connected to a Finnigan MAT combustion device with a water removal assembly coupled to a Finnigan MAT 252 mass spectrometer. All carbon isotope ratios are reported in the delta notation as  $\delta^{13}\text{C}$  values (‰) in relation to Pee Dee belemnite (PDB).

The Rayleigh equation (Eq. 1) can be applied to describe the fractionation process, where  $R_t$  gives the isotope ratio  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  at time  $t$ ,  $R_0$  gives the isotope ratio  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  at time 0, and  $f$  is the fraction of substrate remaining at time  $t$  ( $f = C_t/C_0$ ). The kinetic isotope fractionation factor ( $\alpha C$ ) gives the relation between concentration and isotopic composition of a compound. When  $\ln R_t/R_0$  is plotted over  $\ln C_t/C_0$ , the slope of the linear regression curve expresses  $\alpha C$  as  $(1/\alpha C - 1)$  (Eq. 2). Based on the measured isotope values, the percentage of biodegradation can be calculated (Eqs. 3 and 4). The “percentage of biodegradation” is an index to describe the extent of biodegradation. Here the variation of isotopic ratios measured in the field ( $R_t/R_0$ ) and a compound-specific fractionation factor ( $\alpha C$ ) from a biodegradation experiment with pure culture are used to calculate the extent of biodegradation.

The remaining substrate fraction ( $C_t$ ) along a groundwater flow path can be calculated using the isotope fractionation factor ( $\alpha C$ ), the isotope ratios measured in the field ( $R_t/R_0$ ) and the concentra-

$$\frac{R_t}{R_0} = \left( \frac{C_t}{C_0} \right)^{\left( \frac{1}{\alpha C} - 1 \right)} \quad (1)$$

$$\ln \left( \frac{R_t}{R_0} \right) = \left( \frac{1}{\alpha C} - 1 \right) \times \ln \left( \frac{C_t}{C_0} \right) \quad (2)$$

$$\frac{C_t}{C_0} = \left( \frac{R_t}{R_0} \right)^{\left( \frac{1}{\alpha C - 1} \right)} \quad (3)$$

$$B[\%] = \left[ 1 - \left( \frac{R_t}{R_0} \right)^{\left( \frac{1}{\alpha C - 1} \right)} \right] \times 100 \quad (4)$$

$$C_t = C_0 \times \left( \frac{R_t}{R_0} \right)^{\left( \frac{1}{\alpha C - 1} \right)} \quad (5)$$

FIGURE 1. Equations used for calculations.

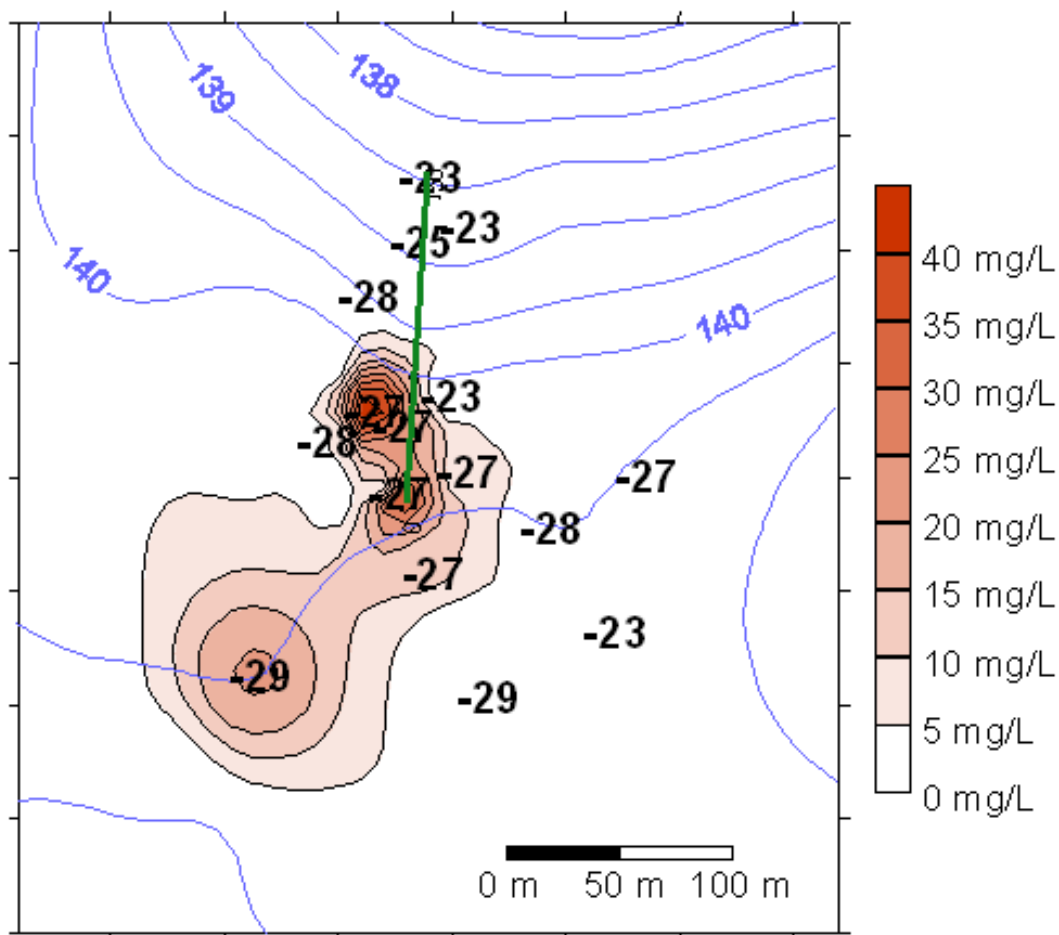
tion in the area of the source of contaminants ( $C_0$ ) (Eqs. 3 and 5). The concentration ( $C_0$ ) must be representative for the input concentration of a contaminant for a given groundwater flow path.

The carbon isotope fractionation factor ( $\alpha_C = 1.0017$ ) used to calculate the *in situ* biodegradation of toluene was obtained from anaerobic biodegradation experiments with pure cultures[1].

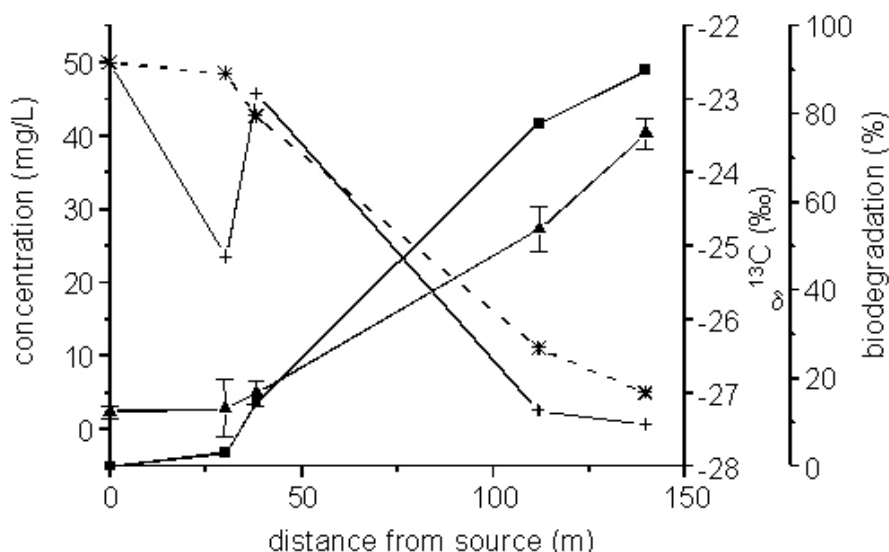
## RESULTS AND DISCUSSION

### Zeitz

Concentration and carbon isotopic signatures of toluene were measured in 16 groundwater samples from the upper aquifer. In these samples the toluene concentrations were in a range between 50 mg l<sup>-1</sup> and 5 µg l<sup>-1</sup>. In the centre of the plume the carbon isotope ratios were around -27‰. However, further downstream the isotopic signature of toluene was enriched in <sup>13</sup>C, leading to isotope ratios of -23‰. Within this groundwater flow path the carbon isotopic enrichment of up to 4 d-units indicates *in situ* biodegradation (Fig. 2). The percentage of biodegradation was calculated for a selected groundwater flow path according to equation 4 (Fig. 3). The isotopic ratio of the toluene source in this area of the plume was -27.2‰ assuming that the highest local concentration of



**FIGURE 2.** Concentration and isotopic composition of toluene in the upper aquifer in Zeitz, Germany. The blue lines indicate the depth of the groundwater table above the sea level (m). Black figures show the location of monitoring wells and the isotopic composition of toluene. The green line shows the position of the monitoring profile depicted in Fig. 3.



**FIGURE 3.** Concentration (crosses) and isotope composition (triangles) of toluene along the monitoring profile depicted in Fig. 2. The percentage of biodegradation (squares) and the residual substrate fraction (stars) were calculated with Eqs. 4 and 5 using an isotope fractionation factor characteristic for anaerobic biodegradation of toluene.

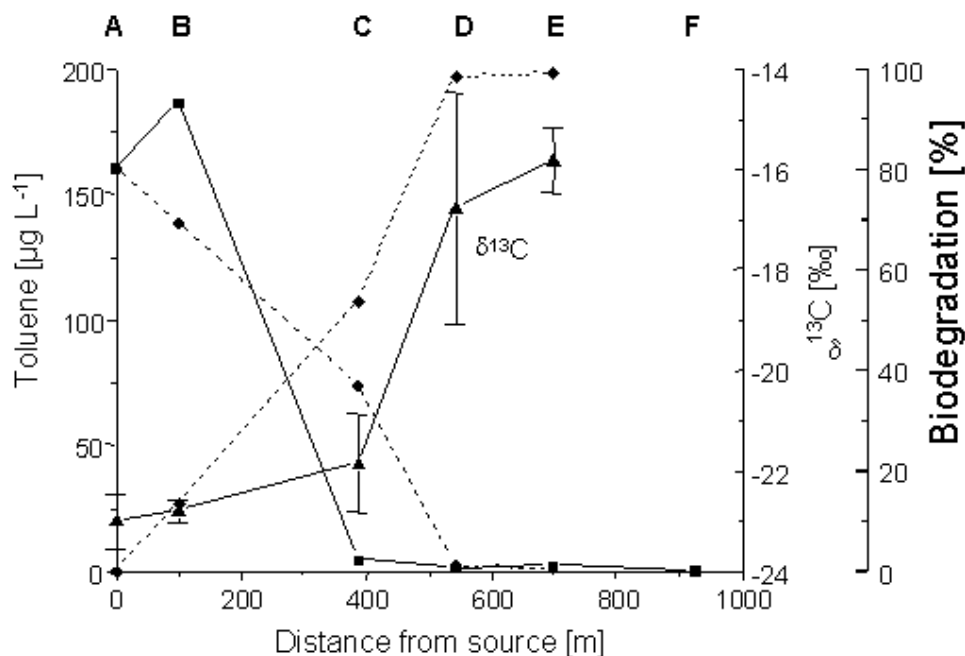
toluene ( $50 \text{ mg l}^{-1}$ ) represents a less degraded toluene fraction. In the second to fifth monitoring wells, the isotopic signature of toluene was enriched in  $^{13}\text{C}$  up to  $-24.4\text{‰}$ , indicating intensive *in situ* biodegradation. The shift in the isotope ratios was employed to calculate the percentage of biodegradation ( $B[\%]$ , Eq. 4) using the fractionation factor for anaerobic biodegradation of toluene ( $\alpha_C = 1.0017$ ). The index “percentage of biodegradation” clearly increases along the water flow path describing the zones of intensive biodegradation.

The concentration of the remaining toluene fraction can be calculated with Eq. 5 (Fig. 3). Therefore, it was assumed that the isotope ratio of  $-27.2\text{‰}$  and concentration of  $50 \text{ mg l}^{-1}$  represented the local source of toluene relevant for the water flow path. The calculated residual toluene concentrations were similar to the measured toluene concentrations downstream the groundwater flow path, although clear differences between measured and calculated concentrations were obvious at the second groundwater well. Overall, the concentration gradient can be explained by *in situ* biodegradation, suggesting that microbial processes govern the fate of toluene in this particular field site.

## Hamburg

Along the 800 m profile downstream of the contamination source, toluene showed a significant concentration gradient decreasing from  $160 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$  to below the detection limit of  $0.5 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ . With decreasing concentrations, the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope ratio in the residual toluene fraction was enriched up to  $7.2 \pm 1\text{‰}$  between the first and fifth wells (Fig. 4). Using the carbon isotope fractionation factor for anaerobic toluene degradation ( $\alpha_C = 1.0017$ ) the percentage of biodegradation was calculated. The isotopic composition at the first well was used as the initial isotopic composition of a theoretical source ( $R_0$ ) to calculate the extent of the biodegradation (Fig. 4). However, applying the isotope value  $\delta^{13}\text{C}$  at the third well, the remaining toluene fraction had been biodegraded by about 54%. Further downstream from this well, the calculations indicate that the percentage of biodegradation increased to more than 99% at the fifth well.

The extent of biodegradation of the residual substrate fraction can be quantified assuming that all monitoring wells were located directly downstream of the source of contamination. Based on this

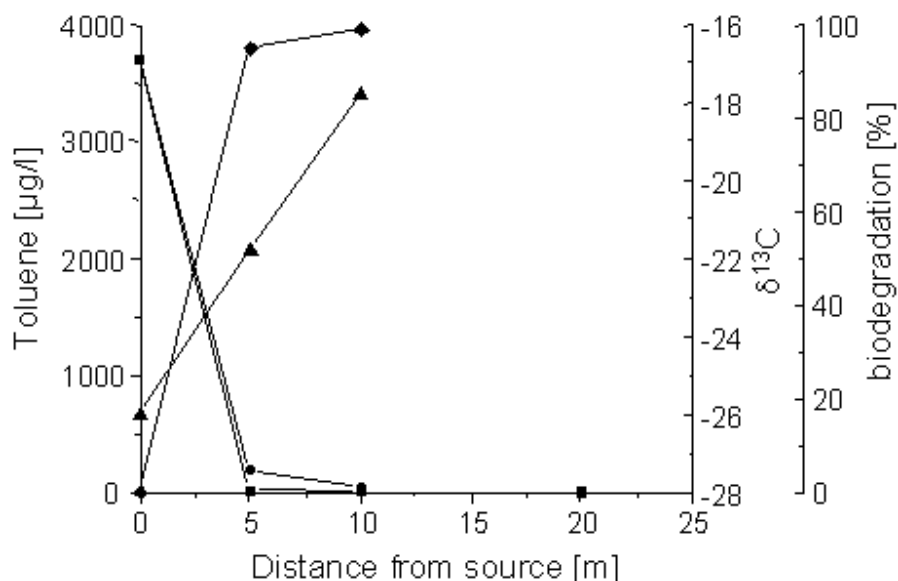


**FIGURE 4.** Concentrations (squares) and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope ratios (triangles) of toluene along the monitoring profile (A – E) of a contaminated aquifer (Hamburg, Germany). The percentage of biodegradation (circles) and theoretical residual toluene fraction (diamonds) are calculated with Eqs. 4 and 5 using a carbon isotope fractionation factor for anaerobic biodegradation (adapted from [6]).

assumption, the isotopic compositions and concentrations monitored in the first well could be employed as  $R_0$  and  $C_0$  to calculate the absolute amount of biodegraded toluene in the second to fifth wells. The residual toluene concentrations calculated showed a slow decrease for the second and third wells, only roughly matching the residual concentrations measured (Fig. 4). However, further downstream the calculated concentrations decreased strongly, reflecting the measured toluene concentrations in the wells.

## Ingolstadt

Concentration and isotopic composition of toluene was determined along a profile of 25 m downstream the water flow path (Fig. 5). The toluene concentrations showed a steep gradient between 0 and 5 m and were still considerably high until 10 m distance from the first well. The corresponding isotope ratios  $\delta^{13}\text{C}$  of the residual toluene increased significantly, implying relevant biodegradation in the aquifer. The percentage of biodegradation ( $B[\%]$ ), calculated as mentioned above, showed that within a distance of 10 m from the first monitoring well of the profile the toluene concentration was reduced to more than 99% by biodegradation (Fig. 5). The concentration of the residual toluene fraction was calculated with the assumption that all wells were located directly downstream of the contamination source and the first well was a representative source ( $C_0$ ). The calculated residual toluene concentrations show a strong decrease in the wells at 5 and 10 m distance from the source, matching the residual concentrations observed in the field (Fig. 5). The calculated residual concentrations were slightly higher than the measured concentrations, which might be a consequence of dilution or adsorption as additional sinks of toluene.



**FIGURE 5.**-Toluene concentration (squares) and carbon isotope composition (triangles) along a monitoring profile of a contaminated site near the city of Ingolstadt, Germany. The percentage of biodegradation (diamonds) and theoretical toluene concentrations (circles) are calculated with Eqs. 4 and 5 using a carbon isotope fractionation factor for anaerobic biodegradation. (adapted from [7])

## CONCLUSIONS

This paper shows the various aspects of using isotope fractionation to characterise *in situ* biodegradation. Isotope fractionation may be well used to evaluate the biodegradation in contaminated aquifers. The percentage of biodegradation shows zone of biodegradation and serves as a semiquantitative index. This index is independent of the groundwater flow and dilution or adsorption because it is solely based on isotope values, which are altered during *in situ* biodegradation. Other sinks may also have contributed to the reduction of the contaminant concentrations, but they did not affect the isotope ratios and thus had no effect on the results[1]. This index may be well used as an indicator of the intensity of biological degradation processes in distinct zones of an aquifer.

The theoretical concentration of the residual substrate fraction was quantified, assuming that (I) all monitoring wells were located directly downstream of the source of contamination, and (II) dilution and adsorption did not affect the concentrations to a major extent. When source concentration ( $C_0$ ) is representative for the groundwater flow path, the concentration of the residual fraction ( $C_r$ ) can be calculated. On the three test sites, the calculated residual concentrations are comparable to the toluene concentrations observed in the field, which indicates that *in situ* biodegradation was the major sink of toluene.

In the context of natural attenuation, the stable isotope chemistry may be well used to characterise *in situ* biodegradation. The concept to quantify *in situ* biodegradation may have a large potential to improve groundwater remediation strategies.

## ACKNOWLEDGMENTS

This paper was presented at the CSIC/ESF workshop Analysis, Toxicity and Biodegradation of Organic Pollutants in Groundwater from Contaminated Land, Landfills and Sediments, Barcelona, Spain, 8–10 November, 2001. The work was supported by the Federal Ministry of Education and Research, Germany (BMBF), grant 02WT0022.

## REFERENCES

1. Meckenstock, R.U., Morasch, B., Warthmann, R., Schink, B., Annweiler, E., Michaelis, W., and Richnow, H.H. (1999)  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope fractionation of aromatic hydrocarbons during microbial degradation. *Environ. Microbiol.* **1**, 409–414.
2. Hunkeler, D., Aravena, R., and Butler, B.J. (1999) Monitoring microbial dechlorination of tetrachloroethene (PCE) in groundwater using compound-specific stable carbon isotope ratios: microcosm and field studies. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 2733–2738.
3. Bloom, Y., Aravena, R., Hunkeler, D., Edward, E., and Frappe, S.K. (2000) Carbon isotope fractionation during microbial dechlorination of trichloroethene, cis-1,2-dichloroethene, and vinyl chloride: implications for assessment of natural attenuation. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 2768–2772.
4. Slater, G.F., Dempster, H.S., Sherwood Lollar, B., and Ahad, J. (1999) Headspace analysis: a new application for isotopic characterization of dissolved organic contaminants. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 190–194.
5. Richnow, H.H. and Meckenstock, R.U. (1999) Isotopen-geochemisches Konzept zur In-situ-Erfassung des biologischen Abbaus in kontaminiertem Grundwasser. *TerraTech* **5**, 38–41.
6. Richnow, H.H., Annweiler, E., Michaelis, W., Schink, B., and Meckenstock, R. (2001) Microbial *in situ* degradation of aromatic hydrocarbons in a contaminated aquifer monitored by carbon isotope fractionation. *J. Contam. Hydrol.*, in revision.
7. Meckenstock, R.U., Morasch, B., Kästner, M., Vieth, A., and Richnow, H.H. (2001) Assessment of bacterial degradation activities in the environment by analysis of stable carbon isotope fractionation. *Water, Air, Soil Pollution*, in press.

---

**This article should be referenced as follows:**

Richnow, H.H., Vieth, A., Kästner, M., Gehre, M., and Meckenstock, R.U. (2002) Isotope fractionation of toluene: a perspective to characterise microbial *in situ* degradation. In Analysis, Toxicity and Biodegradation of Organic Pollutants in Groundwater from Contaminated Land, Landfills and Sediments. *TheScientificWorldJOURNAL* **2**, xxx-xxx.

**Handling Editor:**

Jordi Dachs, Principal Editor for *Isotopes in the Environment* — a domain of *TheScientificWorldJOURNAL*.

---

# Isotope fractionation as a tool to document the *in-situ* biodegradation of organic pollutants in contaminated aquifers

Andrea Vieth<sup>a</sup>, Michael Voskamp<sup>a</sup>, Frank-Dieter Kopinke<sup>a</sup>, Rainer U. Meckenstock<sup>b</sup>, Hans H. Richnow<sup>a</sup>

<sup>a</sup>UFZ Centre for Environmental Research Leipzig-Halle, Department of Remediation Research, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Germany; mail: vieth@san.ufz.de; Tel: ++49-(0)341-2352051

<sup>b</sup>Eberhard-Karls University Tübingen, Center of Applied Geoscience, Sigwartstr. 10, 72076 Tübingen, Germany

*In-situ* biodegradation can be characterised by monitoring the isotope ratios and concentrations of organic contaminants in aquifers. Reversed phase chromatography experiments show that partitioning of contaminants between the polar water phase and a hydrophobic aquifer matrix may lead to isotope fractionation. Isotope fractionation induced by hydrophobic sorption can be significant in chromatographic columns. However, with the assumption that the source of contaminants is continuously leached by bypassing groundwater transport-related isotope fractionation within the plume is hardly observable.

## 1 INTRODUCTION

The implementation of *Natural Attenuation* as a strategy to remediate contaminated aquifers requires the assessment of *in-situ* biodegradation as the most important sink of organic contaminants in the aquifer (1). A simple decrease in concentration can not be used as an indicator for *in-situ* biodegradation, because other processes, like dilution and sorption may also effect the concentration. Isotope fractionation of organic contaminants such as aromatic hydrocarbons and chlorinated ethenes during biodegradation leads to an enrichment of <sup>13</sup>C and <sup>2</sup>H in the residual fraction (3-7). Based on the isotope fractionation a concept was developed (2-4) to qualify and quantify biodegradation in the field. The validity of this concept was tested at the site of a former hydrogenation plant.

In order to assess *in-situ* biodegradation using isotope fractionation processes it was necessary to investigate effects of other processes such as sorption, dilution and volatilisation on the isotopic composition of contaminants. Dilution and volatilisation processes certainly can be neglected as reasons of isotope fractionation under aquifer field conditions (8, 9). However, little is known about isotope effects during sorption of contaminants which plays an important role for transport processes in the aquifer. Therefore, the isotope fractionation during partitioning of the organic contaminant between a polar mobile phase and a less polar stationary phase was investigated in this study. In a first approach, batch-experiments were conducted to evaluate the effect of sorption on humic acid to the carbon isotope ratio of the residual contaminant fraction. Transport of organic contaminants in the aquifer may result in consecutive sorption steps which are know from reversed-phase chromatography and which lead to a significant isotope fractionation (10). Thus, we applied reversed-phase chromatography as a model system for transport in aquifers, assuming that sorption is mainly due to hydrophobic sites in humic substances and that water is the polar eluent.

## 2 MATERIALS AND METHODS

### 2.1 Field site

The test field is located in the area of a former hydrogenation plant in Zeitz (Saxonia-Anhalt, Germany). The geological situation is characterised by two aquifers which are hydraulically connected to some extent. The upper aquifer (aquifer I) consists of sand and gravel deposited predominantly during the Pleistocene Elster-glacial and is 2 to 8 m thick. The lower aquifer (aquifer II) is composed of sand and gravel of tertiary age and is 5 to 19 m thick. The groundwater table is situated 8 to 10 m below surface. The general groundwater flow direction is to the North. Aquifer I is virtually free of dissolved oxygen suggesting that only anaerobic microbial processes may be involved in the degradation of pollutants. The prevailing contaminants of aquifer I are BTEX, dominated by high benzene concentrations up to 850 mg L<sup>-1</sup>, followed by toluene (50 mg L<sup>-1</sup>), ethylbenzene (2.5 mg L<sup>-1</sup>) and xylenes (4 mg L<sup>-1</sup>), respectively.

### 2.2 Groundwater samples

Groundwater samples were taken in May 2001. Sampling was performed after oxygen-concentration, pH and redox-potential in the groundwater were constant. 1000 ml groundwater was filled into glass bottles. NaOH was added to increase the pH to 10 to inhibit biodegradation. Extraction of BTEX was performed with *n*-pentane.

Samples were stored at 4°C until extraction. Pentane extraction has no effect on the isotope composition of the organic compound (11).

### 2.3 One-step sorption experiments

For the one-step sorption experiment 60 g humic acid (Roth) was suspended in 600 ml of deionised water (+ 0.02M NaCl + 0.003 M NaN<sub>3</sub>). Amounts of cyclohexane and toluene were added from an ethanolic stock solution to reach final concentrations of 900 and 750 ppm, respectively. The suspension was allowed to equilibrate by shaking for 24 h. The same experiment was performed without humic acid. Herein, the concentration of cyclohexane and toluene were about 20 ppm and 50 ppm in the water. The isotopic composition of the analytes was measured using 20 to 100 µl of the headspace. Headspace analysis has no effect on the isotopic compositions as was shown for PCE and toluene (8). The δ-value is the average of two parallel experiments, each of them was measured at least three times.

### 2.4 Reversed-phase chromatography experiment

An aliquot of a stock solution of naphthalene in ethanol was dissolved in acetonitrile:water (50:50 Vol-%), leading to a final concentration of 5 g L<sup>-1</sup> naphthalene. This solution was injected into an HPLC-system, consisting of a pump, an injector with a 200µl loop, a 250 mm HPLC-column (Alltech Adsorbosphere XL C18 5U, Alltech Munich, Germany), an UV-detector (λ = 260 nm) and a RI-detector. The eluting naphthalene peak was cut into 40 fractions (10 drops per fraction). Each fraction was extracted with 100 µl *n*-hexane to isolate the naphthalene. Concentrations and carbon isotope ratios of naphthalene were determined by GC-MS and GC-C-IRMS measurements.

### 2.5 Stable isotope analysis

<sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C isotope ratios were determined by GC-C-IRMS. The system consisted of a GC (HP 5890, Hewlett Packard Co, USA) which was connected *via* a combustion unit (GC-combustion interface, Finnigan, Bremen, Germany) to an isotope mass spectrometer (Finnigan MAT 252, Finnigan, Bremen, Germany). The GC was equipped with a fused silica capillary column (DB 5, 30 m, i.d. 0,32 mm; film thickness 0,5 µm; Agilent Technologies GmbH, Germany). The temperature program varied depending on the analytes (BTEX: 40°C (3 min) – 4 K/min - 150°C – 15 K/min – 250°C; sorption experiments: 40°C (4 min) – 6 K/min - 150°C - 15 K/min – 200°C; reversed-phase chromatography experiments: 70°C (2 min) – 8 K/min - 250°C (1 min)). Samples were injected splitless at 250°C.

### 2.6 Calculations

The isotope fractionation process can be described by the Rayleigh-equation for closed systems (equation 1). The relation between concentration and isotopic composition of a compound is characterised by the kinetic isotope fractionation factor (α). R<sub>t</sub> gives the isotope ratio <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C at time t, R<sub>0</sub> gives the isotope ratio <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C at time 0 and f = C<sub>t</sub>/C<sub>0</sub> is the fraction of substrate remaining at time t. When ln R<sub>t</sub>/R<sub>0</sub> is plotted over ln C<sub>t</sub>/C<sub>0</sub>, the slope of the linear regression curve expresses α as (1/α-1) (equation 2). The isotope fractionation factors can be used to quantify the biodegradation in the field. Based on the isotope values that were measured in groundwater samples, the percentage of biodegradation can be calculated (equation 3). The percentage of biodegradation is used as an index to describe the extent of biodegradation which is necessary to alter the isotopic composition of a contaminant. The remaining substrate concentration (C<sub>t</sub>) along a groundwater flow path can be calculated using the isotope fractionation factor (α), the isotope ratios measured in the field (R<sub>t</sub>/R<sub>0</sub>) and the concentration in the area of the source of contaminants (C<sub>0</sub>) (equation 4). The concentration (C<sub>0</sub>) must be representative for the in-put concentration of a contaminant for a respective groundwater flow path.

All carbon isotope ratios are given in the delta notation as δ<sup>13</sup>C values [‰] in relation to PDB (Pee Dee Belemnite) standard.

### 2.7 Equations

$$\frac{R_t}{R_0} = \left(\frac{C_t}{C_0}\right)^{\left(\frac{1}{\alpha}-1\right)} \quad (1)$$

$$\ln\left(\frac{R_t}{R_0}\right) = \left(\frac{1}{\alpha}-1\right) \times \ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) \quad (2)$$

$$B[\%] = \left[1 - \left(\frac{R_t}{R_0}\right)^{\left(\frac{1}{\alpha}-1\right)}\right] \times 100 \quad (3)$$

$$C_t = C_0 \times \left(\frac{R_t}{R_0}\right)^{\left(\frac{1}{\alpha}-1\right)} \quad (4)$$



### 3 RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 One-step sorption experiments

In the experiments without humic acid, the isotopic start composition of toluene and cyclohexane were  $-28.0\text{‰}$  ( $\pm 0.6$ ) and  $-30.3\text{‰}$  ( $\pm 0.8$ ), respectively. In the batch experiment with humic acids, where 97 % of the cyclohexane and about 80 % of the toluene were sorbed,  $\delta$ -values of  $-27.7\text{‰}$  ( $\pm 0.5$ ) and  $-30.1\text{‰}$  ( $\pm 0.6$ ) were measured for the freely dissolved compounds. The very small shift in the isotope composition was within one standard deviation ( $1\sigma$ ), i.e. not significant. From these data fractionation factor for a single sorption step can be estimated as  $\alpha = 1.00006$  and  $\alpha = 1.0002$ . Similar sorption experiments with benzene and toluene on graphite and activated carbon, did not show a significant isotope fractionation (12). Thus, a simple one step phase partitioning will not affect the isotope composition of hydrophobic organic contaminants in an aquifer.

#### 3.2 Reversed-phase chromatography experiment

The isotope fractionation of consecutive sorption steps was investigated using a reversed phase HPLC column. The carbon isotope ratio of the applied naphthalene was  $-26.1\text{‰}$  ( $\pm 0.5$ ). The naphthalene-peak was divided into 40 fractions and the carbon isotope ratios were monitored (Fig. 1). The first two fractions showed an isotopic enrichment of  $-20.5\text{‰}$  and  $-18.2\text{‰}$ . The fraction with the highest naphthalene concentration had a composition of  $-23.7\text{‰}$ . In the following fractions the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio decreases to a minimum of  $-28.5\text{‰}$ . Then the isotopic composition rose again up to the  $^{13}\text{C}$  content of the bulk substrate ( $-26.1\text{‰}$ ). Two chromatographic runs were performed with almost identical results. It is obvious that the partitioning of naphthalene between a polar mobile phase and a less polar stationary phase causes a shift in the isotopic composition through the whole peak. The  $^{13}\text{C}$  isotopomers elute faster than the lighter  $^{12}\text{C}$  isotopomers because of lower interaction with the stationary phase. The increase of the  $\delta$ -value in the tailing of the peak indicates that the tailing is caused by mechanisms other than phase partitioning, e.g. by slow elution of a small dead volume or by slow desorption from high affinity sorption sites.

The used HPLC-column had a separation efficiency of about 1700 theoretical plates for naphthalene. As an empirical approach, the Rayleigh-equation was used to assess the isotope fractionation in the course of the chromatographic process. The naphthalene concentrations of the individual fractions were determined by GC-MS-analysis of the hexane extracts. The sum of the individual naphthalene concentrations gave the total amount of naphthalene applied in this experiment. This sum was used as  $C_0$  to calculate the isotope fractionation.  $C_t$  was calculated as the sum of naphthalene amounts up to the fraction  $t$  starting ones from the left and ones from the right end of the peak.  $R_0$  was the carbon isotope ratio of the bulk chemical ( $-26.1\text{‰}$ ) and  $R_t$  the isotope ratio of the individual fraction of the naphthalene peak. Isotope fractionation factors were calculated for the two fractions with the most enriched ( $\alpha = 1.0017$ ) and most depleted ( $\alpha = 0.9991$ ) carbon composition, respectively. If no isotope fractionation occurs,  $\alpha$  is equal to 1.  $\alpha > 1$  indicates an enrichment in  $^{13}\text{C}$  and  $\alpha < 1$  reflects the depletion in  $^{13}\text{C}$ . The total isotope fractionation within this naphthalene peak was about 1.0026. Assuming a separation efficiency of the column of about 1700 theoretical plates, the resulting fractionation factor is about 1.0000015 per plate.

Obviously, a large number of consecutive partitioning steps can lead to significant isotope fractionation. However, it is difficult to evaluate this result with respect to the situation in a real aquifer. Theoretically, a large number of sorption/desorption steps during the transport of organic compounds through an aquifer could have a similar effect. A typical contaminant plume (some hundreds of meters) is much longer than an HPLC column (some cm). However, the separation efficiency of a more or less heterogeneous aquifer is very low. Different scenarios are possible. In a situation, where a cloud of contaminants from a single event is migrating through the aquifer chromatographic fractionation effects might be relevant. In contrast, in most contaminated aquifers the source area of the plume is continuously leached by the bypassing stream of groundwater and the plume is virtually in a steady-state. In this situation, isotope fractionation by chromatographic processes is restricted to the outer margins of the plume when the plume is expanding. When the plume is in steady-state phase partitioning is unlikely to effect the isotope composition of contaminants.

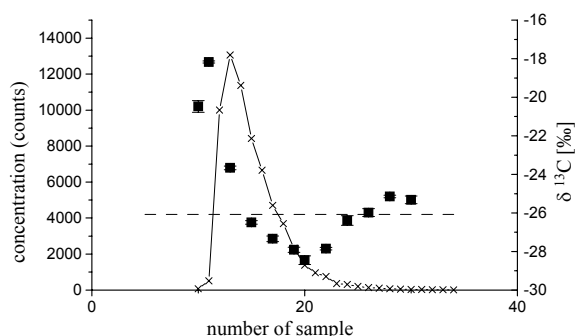


Fig. 1: Carbon isotope ratio (black squares) and content of naphthalene (crossed line) in the different fractions of the eluted peak from the HPLC column. The dashed line gives the isotopic composition of the bulk naphthalene.

### 3.3 Field site investigation

The Zeitz-area was mapped for the concentration and isotopic composition of benzene, toluene, ethylbenzene and o-xylene (BTEX). The high concentration of BTEX at point B ( $882 \text{ mg L}^{-1}$ ) characterises the centre of the plume (Fig. 2). The predominant contaminant within the plume was benzene, contributing to 95 % of the total BTEX-concentration.

The concentration and carbon isotope ratios of BTEX showed quite different behaviour along the groundwater flow path (sampling points A to E) (Fig. 3). The concentration of benzene varied between  $854$  and  $140 \text{ mg L}^{-1}$  whereas the carbon isotope ratio remained relatively constant ( $-29.0 \text{ ‰}$ ) (Fig 3 I). Only at sampling point E, benzene was enriched in  $^{13}\text{C}$  leading to a  $\delta$ -value of  $-28.3 \text{ ‰}$ . This may indicate microbial benzene degradation. However, monitoring wells downstream of point E were not available and the margins of the benzene contamination could not be described precisely. Additionally, the quantification of benzene biodegradation by using the carbon isotope data was not possible, because an isotope fractionation factor for anaerobic benzene degradation was not available.

Ethylbenzene concentration at well A was  $2300 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  and decreased to  $900 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  at well E, with a strong increase at well C ( $4000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Fig. 3 III). The carbon isotope ratios of ethylbenzene showed no significant isotope fractionation and remained stable along this groundwater flow path. Thus, by the means of isotope data, no positive indication was found for *in-situ* degradation of ethylbenzene. Other concentration-diminishing processes like sorption or dilution may control the concentration of ethylbenzene in this part of the plume. However, both processes obviously have no effect on the carbon isotope ratio of benzene and ethylbenzene. This may serve as an indicator that transport-related processes do not influence the isotopic composition of aromatic hydrocarbons in this aquifer. Along the monitored profile the toluene concentration decreased from  $50 \text{ mg L}^{-1}$  in well A to  $0.6 \text{ mg L}^{-1}$  in well E which was correlated with an enrichment of  $^{13}\text{C}$  by  $3.8 \text{ } \delta$ -units in the residual toluene fraction (Fig. 3 II). This strongly implies *in-situ* biodegradation. The Rayleigh-equation could be used to calculate the percentages of biodegradation (equation 3) and the theoretical residual concentrations along the groundwater flow path (equation 4). To calculate the percentage of biodegradation, the isotope ratio of toluene ( $-27 \text{ ‰}$ ) at well A was used as the local source ( $R_0$ ) which may be representative for the flow path, because the lightest  $\delta$ -value represents the least degraded toluene fraction. The isotope fractionation factor for toluene degradation under anaerobic conditions is  $\alpha = 1.0017$  (3) and the isotope compositions of toluene downstream the source ( $R_t$ ) were used. The percentage of biodegradation increased from 3 to 90 % downstream of the source area, indicating a significant removal of the toluene. To calculate the theoretical residual concentrations the representative in-put concentration ( $C_0$ ) for a groundwater flow path is necessary. It was assumed that the toluene concentration of  $50 \text{ mg L}^{-1}$  with an isotope composition of  $-27 \text{ ‰}$  represents the relevant source area for the cross section A to E. The calculated concentrations of the residual toluene fraction matched the measured concentrations quite well. However, at well B measured and calculated concentrations differed significantly. This shows that at this point biodegradation is not the only process that effects toluene concentration. The other calculated toluene concentrations indicate that *in-situ* biodegradation took place in the course of the plume.

The spatial distribution of o-xylene along the groundwater flow path is similar to ethylbenzene. The o-xylene concentration at well A was  $1,600 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  and decreased to  $119 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  at well E, with a local maximum at well C ( $2,320 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Fig. 3 IV). Along the course of this profile,  $\delta$ -values of o-xylene become enriched in  $^{13}\text{C}$  about  $2.6 \text{ } \delta$ -units. Laboratory experiments about the biodegradation of o-xylene at sulphate-reducing conditions gave an isotope fractionation factor of  $1.0013$ . Using this factor and the isotope composition and concentration of o-xylene in well A, the percentage of biodegradation and theoretical o-xylene concentrations were calculated (Fig. 3 IV). Within the groundwater flow path, the percentage of biodegradation increased continuously to 87 %. The calculated residual concentrations, with exception of sampling point C, are in good agreement with concentrations found in groundwater.

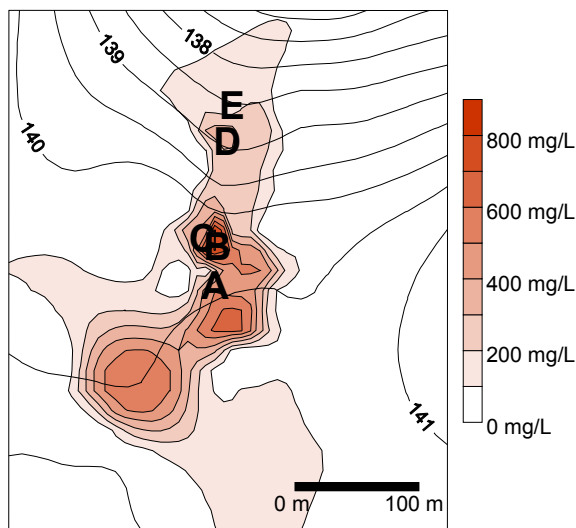


Fig. 2: Contour plot give the concentration of BTEX at the site of the former hydrogenation plant. Lines and numbers present the groundwater level relative to sea level; A to E show the monitoring wells of the groundwater flow path.

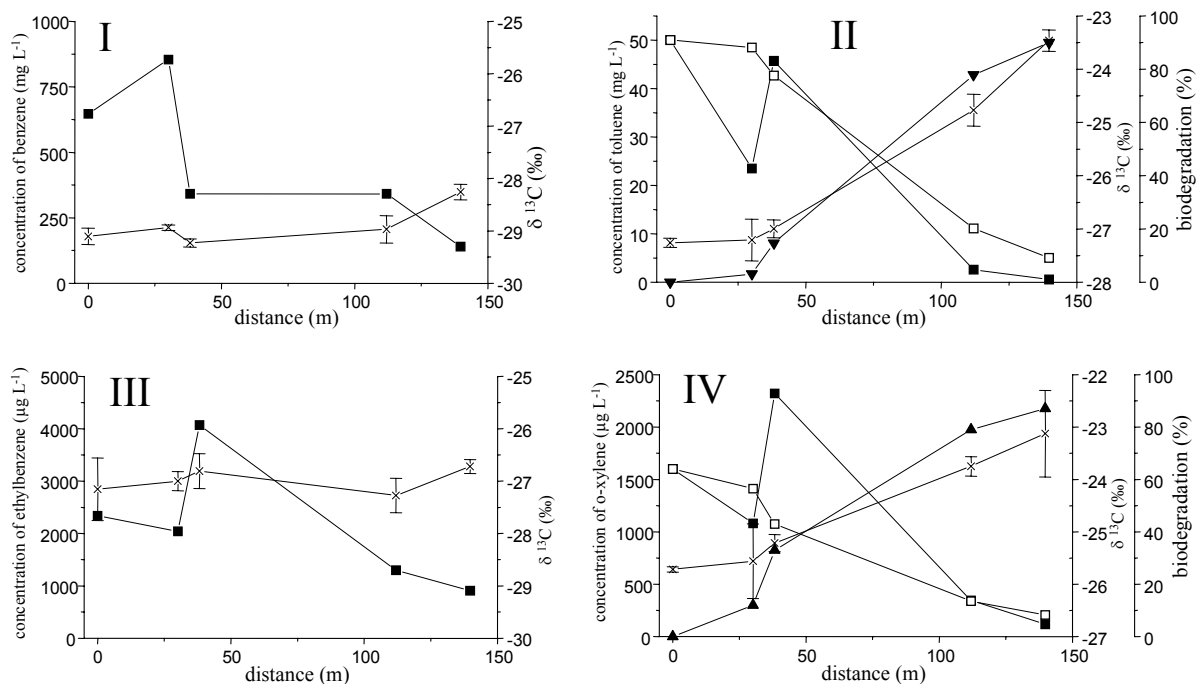


Fig. 3: Concentration (filled squares) and carbon isotope ratios (crossed line) of benzene (I), toluene (II), ethylbenzene (III) and o-xylene (IV) along the monitored groundwater flow path in Zeitz. Percentage of biodegradation (triangles) and theoretical residual concentrations (open squares) were calculated for toluene (II) and o-xylene (IV).

#### 4 SUMMARY AND CONCLUSIONS

When *in-situ* biodegradation is quantified by using isotope fractionation, it is necessary to know the effect of sorption on the isotopic composition of contaminants. It was shown that a one-step sorption of toluene and cyclohexane on humic acid did not cause significant isotope fractionation. Exaggerating this effect by eluting naphthalene from a HPLC-column showed a shift of 10  $\delta$ -units over the whole width of the peak. This shift can be interpreted by means of an isotope fractionation factor of 1.0000009 per theoretical plate which may be thought to be equivalent to a one phase partitioning step. However, it is unlikely that consecutive sorption-desorption equilibria may lead to significant isotope fractionation in a real aquifer system. This conclusion is supported by the observation that ethylbenzene did not exhibit isotope fractionation although this compound was transported over a distance of at least 140m. Toluene and o-xylene were transported over the same distance. Their isotope pattern was characteristic of biodegradation in this particular aquifer.

As laboratory studies already indicated, the microbial degradation of typical groundwater contaminants like toluene and o-xylene leads to an enrichment of the heavier isotopes in the residual contaminant fraction which can be used as an indicator to evaluate *in-situ* biodegradation. By using the Rayleigh-equation, the percentage of *in-situ* biodegradation and theoretical concentrations could be calculated for toluene and o-xylene along the groundwater flow path. For ethylbenzene, no *in-situ* biodegradation was evident in this part of the contaminant plume.

#### References:

1. US-EPA (1999): OSWER Directive 9200.4-17P
2. Richnow HH, Meckenstock RU (1999): TerraTech 5, 38-41
3. Meckenstock RU, Morasch B, Warthmann R, Schink B, Annweiler E, Michaelis W, Richnow HH (1999): Environ. Microbiol. 1, 409-414
4. Richnow HH, Annweiler E, Michaelis W, Meckenstock RU (2000): J. Contam. Hydrol. (submitted)
5. Hunkeler D, Aravena R, Butler BJ (1999): Environ. Sci. Technol. 33, 2733-2738
6. Bloom Y, Aravena R, Hunkeler D, Edward E, Frape SK (2000): Environ. Sci. Technol. 34, 2768-2772
7. Ward JA, Ahad JME, Lacrampe-Couloume G, Slater GF, Edwards EA, Sherwood Lollar B (2000): Environ. Sci. Technol. 34, 4577-4581
8. Slater GF, Dempster HS, Sherwood Lollar B, Ahad J (1999): Environ. Sci. Technol. 33, 190-194
9. Poulson SR, Drever JI (1999): Environ. Sci. Technol. 33, 3689-3694
10. Caimi RJ, Brenna T (1997): J. of Chromatography A 757, 307-310
11. Dempster HS, Sherwood Lollar B, Feenstra S (1997): Environ. Sci. Technol. 31, 3193-3197
12. Slater GF, Ahad JME, Sherwood Lollar B, Allen-King R, Sleep B (2000): Anal. Chem. 72, 5669-5672

Strategies to assess anaerobic *in situ* biodegradation of aromatic hydrocarbons (BTEX and PAH) – I. Determination of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  stable isotope fractionation in laboratory and field studies

C. Griebler<sup>1\*</sup>, A. Vieth<sup>2</sup>, H.H. Richnow<sup>2</sup>, R.U. Meckenstock<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center for Applied Geosciences, Eberhard-Karls-University of Tübingen, Department of Environmental Mineralogy, Wilhelmstrasse 56, D-72074 Tübingen, Germany

<sup>2</sup>Centre for Environmental Research (UFZ), Department of Remediation Research, Permoserstrasse 15, D-04318 Leipzig, Germany.

keywords: biodegradation, BTEX, monitored natural attenuation, PAH, petroleum hydrocarbons, stable isotopes

author for correspondence:

Christian Griebler

Center for Applied Geosciences

Eberhard-Karls-University of Tübingen

Department of Environmental Mineralogy

Wilhelmstrasse 56

D-72074 Tübingen, Germany

tel. + 49 (0) 7071 2973151

fax. + 49 (0) 7071 295139

e-mail: [christian.griebler@uni-tuebingen.de](mailto:christian.griebler@uni-tuebingen.de)

## Abstract

$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  fractionation during microbial degradation of aromatic hydrocarbons was studied in a tar-oil contaminated anoxic aquifer at a former gaswork site (Stuttgart, Germany). Compound-specific isotope analysis (CSIA) revealed direct evidence for *in situ* biodegradation of benzene, toluene, *o*-xylene, *m/p*-xylene, naphthalene and 1-methylnaphthalene. In laboratory growth studies,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope enrichment factors for anaerobic degradation of naphthalene ( $\varepsilon = -1.1 \pm 0.4$ ) and 2-methylnaphthalene ( $\varepsilon = -0.9 \pm 0.1$ ) were determined with the sulfate-reducing enrichment culture N47, which was originally isolated from the investigated test site. Based on these and other laboratory-derived fractionation factors from the literature, *in situ* biodegradation could be quantified for toluene, *o*-xylene, *m/p*-xylene and naphthalene. Stable carbon isotope fractionation was also observed for ethylbenzene, 2-methylnaphthalene and benzothiophene, but without providing conclusive results. However, an effective turnover of these later compounds *in situ* could be shown by a signature metabolites analysis (SMA; part II of this paper (Griebler et al., 2003)). The combined application of CSIA and SMA, as two reliable tools to collect direct evidence on intrinsic bioremediation, leads to a substantially improved evaluation of natural attenuation *in situ*.

## Introduction

In the last decades, aromatic hydrocarbons have been released to the environment from leaking storage tanks and landfills, by accidental surface spills, fuel production and use. Although there is growing knowledge on the degradability and specific degradation pathways of individual hydrocarbons, their fate in the environment remains mostly unclear.

Since “natural attenuation” is on the way to become an important remediation strategy for organically polluted aquifers, methods are required to identify and monitor the degradation of individual pollutants *in situ*. Following the OSWER (Office of Solid Waste and Emergency Response) directive of the United States Environmental Protection Agency (USEPA), three steps are suggested to “prove” *in situ* bioremediation: (1) groundwater chemistry data that demonstrate a clear and meaningful trend of decreasing contaminant mass and/or concentration over time, (2) hydrogeologic and geochemical data that can be used to demonstrate indirectly the type(s) of natural attenuation processes active at the site, and (3) data which provide direct evidence for biodegradation taking place in actual contaminated site media (microcosms) or *in situ* (aquifer) (USEPA, 1999). The first two requirements can in most cases be achieved by physico-chemical analysis of field samples and related mass balance calculations. Evidence for the degradation potential of the indigenous microbial community at a contaminated site may be obtained by means of microcosm studies with field material. However, (3) the assessment of an active biodegradation *in situ*, is most difficult to prove.

Methods for the detection of *in situ* activities are scarce. One promising approach to detect the degradation of organic contaminants such as aromatic hydrocarbons, is the identification and quantification of degradation products specific for a certain degradation pathway, which we call signature metabolites (Beller, 2000). At best, the detection of a metabolite in the field can be related to the degradation of only one compound and some metabolites may be indicative of distinct degradation pathways. Based on this approach, an *in situ* bioremediation could be shown, among others, for the BTEX compounds toluene and xylene, the PAH naphthalene and the heterocyclic aromatic hydrocarbon benzothiophene (Cozzarelli et al., 1995; Elshahed et al., 2001; Gieg and Sufliata, 2002; Phelps et al., 2002). However, metabolites may be indicative for *in situ* biodegradation processes, but probably fail in a quantitative approach to

assess biodegradation because their actual presence is part of a continuous formation and further degradation, which probably depends on many factors. An other approach to detect bioremediation of hydrocarbons *in situ* is the compound-specific isotope analysis (CSIA). Lebedew and coworkers (Lebedew et al., 1969) first mentioned an isotope effect along with the oxidation of hydrocarbons in soils and sediments resulting in a change of the carbon isotopic signatures in the residual organic compound fraction. Later, Stahl (Stahl, 1980) reported a  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  fractionation to occur during the aerobic degradation of hydrocarbons in a mixture of petroleum and seawater. Here, the degradation of alkanes was accompanied by a slight enrichment of the  $^{13}\text{C}$  content of the residual material. However, aerobic degradation of hydrocarbons is not necessarily accompanied by a stable carbon isotope fractionation. For toluene, no fractionation could be observed in degradation experiments with undefined enrichment cultures (Sherwood Lollar et al., 1999). In contrast, experiments with the aerobic culture *Pseudomonas putida* strain mt-2 yielded a significant carbon isotope fractionation upon the degradation of toluene (Meckenstock et al., 1999a). A systematic study by Morasch et al. elucidated that isotope fractionation depends on different enzymatic pathways. Strong stable isotope fractionation was observed for a bond cleaving methyl-monooxygenase (*Pseudomonas putida* mt2) but no fractionation was observed for dioxygenase reactions (Morasch et al., 2001a; Morasch et al., 2002). Therefore, under aerobic conditions, the extent of fractionation may strongly vary prohibiting quantification of biodegradation in oxic environments. Meckenstock et al. showed that anaerobic toluene degradation was accompanied by a similar  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  fractionation for all terminal electron accepting processes (TEAP) tested (Meckenstock et al., 1999b). Growth experiments with various bacterial strains degrading toluene under denitrifying, iron-reducing and sulfate-reducing conditions revealed similar enrichment factors, *i.e.* on average  $\epsilon = -1.7 \pm 0.3 \text{ ‰}$ . This was suggested to be due to the fact that every anaerobic culture or strain investigated so far degraded toluene via the benzylsuccinate synthase pathway (Heider et al., 1999; Spormann and Widdel, 2000; Widdel and Rabus, 2001). Slightly smaller enrichment factors for toluene have been determined by Ahad et al. under sulfate-reducing ( $\epsilon = -0.5 \text{ ‰}$ ) and methanogenic conditions ( $\epsilon = -0.8 \text{ ‰}$ ) (Ahad et al., 2000). To date, several laboratory and field studies showed that anaerobic degradation of hydrocarbons, such as BTEX and PAHs induces  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  fractionation. A qualitative evidence for *in situ*

biodegradation was provided for benzene (Vieth et al., 2001; Mancini et al., 2002; Mancini et al., 2003), toluene (Meckenstock et al., 1999b; Morasch et al., 2001a; Meckenstock et al., 2002; Richnow et al., 2002; Richnow et al., 2003a), ethylbenzene (Richnow et al., 2003b; Mancini et al., 2002), xylene isomers (Wilkes et al., 2000; Richnow et al., 2003b; Richnow et al., 2003a), ethyltoluene (Wilkes et al., 2000; Richnow et al., 2003b), 1,2,4-trimethylbenzene (Richnow et al., 2003b) and naphthalene (Richnow et al., 2003a).

Beside a qualitative evidence for *in situ* biodegradation of individual contaminants, a major interest is to apply stable carbon isotope fractionation in the environment to quantify *in situ* bioremediation of individual contaminants. The basic requirement for such a quantitative approach is a compound-specific fractionation factor which is representative for a range of environmental conditions. This could be shown for toluene, where the anaerobic degradation under different anoxic conditions proceeds via the same degradation pathway and revealed similar stable carbon isotope enrichment factors (Meckenstock et al., 1999b). Today, a growing number of fractionation factors is available, e.g. for BTEX compounds and chlorinated solvents, which can be used to quantify *in situ* biodegradation.

In groundwater environments the isotope ratio is not interfered by processes others than the biological hydrocarbon oxidation such as adsorption and dilution (Meckenstock et al., 1999b). Thus, for many compounds that are subject to isotope fractionation a quantification of *in situ* bioremediation can be done.

Here we report on laboratory experiments in which we determined stable carbon isotope fractionation factors for the anaerobic degradation of PAH compounds, *i.e.* naphthalene and 2-methylnaphthalene, by a sulfate-reducing enrichment culture. These and other laboratory-derived fractionation factors were used for a qualitative and quantitative evaluation of natural attenuation at a former gaswork site.

Furthermore, an assessment of anaerobic *in situ* biodegradation of aromatic hydrocarbons (selected BTEX, PAHs, and heterocyclic aromatic hydrocarbons) was carried out by SMA parallel to CSIA. Results from the metabolite studies are introduced and discussed in part II. of this paper (Griebler et al., 2003).



## **Material and Methods**

### **Organisms and growth conditions in laboratory experiments**

Stable carbon isotope fractionation experiments were carried out with the sulfate-reducing culture N47 which was enriched from contaminated soil of the study site, Testfeld Süd (Morasch et al., 2001b). Precultures were grown with naphthalene as the sole carbon and energy source in the presence of the solid adsorber resin Amberlite-XAD7 (Fluka, Switzerland) which functions as a substrate reservoir and maintains low but constant substrate concentrations in the liquid phase (Morasch et al., 2001b). For the experiments, a bicarbonate-buffered mineral medium (pH 7.2-7.4) was reduced with 1 mM sodium sulfide, and 10 mM sodium sulfate was added as an electron acceptor (Widdel and Bak, 1992). The medium was carefully filled into 500 mL bottles and either solid naphthalene or 2-methylnaphthalene were added in excess. The headspace of the bottles was subsequently flushed with N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80:20), and the bottles were closed with butyl rubber stoppers (Maag Technik, Switzerland). After one week of incubation at 30°C, the substrate-saturated medium was splitted in 50 mL aliquotes into 100 mL serum bottles. Headspace of the bottles was again flushed with N<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> (80:20), and the bottles were closed with viton stoppers (Maag Technik, Switzerland). Serum bottles were inoculated in triplicates with sterile syringes through the stoppers and incubated at 30°C in the dark. Subsamples for concentration measurements and stable carbon isotope analysis were taken periodically with a syringe and extracted with cyclohexane (Acros Organics, USA) at ratios of 1:1 (v:v) at the beginning and 20:1 (v:v) at the end of the growth experiments. Biological activity in the subsamples was stopped with the amendment of NaOH (0.1 M final concentration). After 10 min of shaking, the cyclohexane phase was collected and stored for later isotope analysis. Bacterial growth was monitored by measuring of the sulfide concentration (Cline, 1969).

### **Field investigation site**

The investigation site (Testfeld-Süd) is a former gas work site located in the Neckar river valley, in the north-eastern part of the city of Stuttgart, South-West-Germany (Figure 1). The shallow Quaternary aquifer mainly consists of gravels and sands with a layer of loamy sediment embeddings and artificial fillings in the unsaturated zone (Herfort et al., 1998). Local influx of mineral water from the deeper confined

groundwater system into the alluvial aquifer and several drainage systems collecting the local infiltration result in a complex hydraulic situation.

Multiple contaminant sources are distributed over the Testfeld-Süd area. Tar pits in the southern part originate from hundred years (1875-1974) of gas manufacturing and *on site* deposition or further processing of by-products. Further BTEX and PAH sources from benzene distillery are located in the central and western part, close to and within the investigated area (Figure 1). Non aqueous phase liquids (NAPLs) are present in both the saturated and the unsaturated zones (Zamfirescu & Grathwohl, 1998) and cover an approximate area of 20,000 m<sup>2</sup> (Herfort et al., 1998). The resulting contaminant plume has an estimated width of 120 m and low molecular weight PAH compounds were detected at a distance of 280 m downstream of the NAPL zone (Bockelmann et al., 2001). The overall length of the plume is unknown as no monitoring wells are available further downstream so far.

The actual investigation focused on a 7,500 m<sup>2</sup> section within the area of the proposed PAH plume (Figure 1). In this area more than 20 monitoring wells equipped with filter screens through the entire aquifer have been installed and 15 wells have been selected for sampling and measurements (Figure 1). Within the investigated area we detected two point sources, one North-West (termed source 1; S1) and another located in the central part of the section (termed source 2; S2; Figure 1).

### **Sampling procedures**

The well water was replaced at least once by means of an submersible pump (MP1, Grundfos Corp.) before water was sampled and filled into pre-cleaned brown glass bottles which were closed without headspace by screw caps with teflon-coated silicon septa. Sample bottles (1 L) for PAH analysis already contained an internal standard mixture and 10 mL cyclohexane for later extraction. Samples for stable carbon isotope analysis were filled in 500 ml brown glass bottles and a volume of 3 mL from filled bottles was replaced by pentane (Merck, Germany). Biological activity in the samples was prevented with the amendment of NaOH (0.1 M final concentration). Samples for BTEX and the analysis of major an- and cations were filled without pre-treatment into 100 mL flasks avoiding headspace. Samples were transported and stored under cooled conditions (4 °C) until extraction. For extraction, the solvent phase (pentane or cyclohexane) was collected after 60 min of intensive shaking and stored at 4°C for subsequent isotope analysis.

## Sample analysis

Analysis of major an- and cations was performed by ion-chromatography (Dionex DX-120).

Concentration of BTEX compounds were analysed directly from untreated samples by Purge and Trap/GC-MS. The Teckmar 3000 Purge and Trap autosampler device operated with Helium as a carrier (gas flux 50 mL min<sup>-1</sup>, purge time 11 min) and was connected to a GC-MS system (GC: HP 5972A, MS: HP 6890). A VOCARB<sup>TM</sup> 3000 (Supelco, USA) trap was used at a desorption temperature of 225°C and a desorption time of 4 min. A DB-624 GC column (60 m length; 0.25 mm inner diameter; 1.4 µm film-thickness; J. & W. Scientific, USA) was used for the separation of the target compounds. A split ratio of 10:1 was used and flow rate of the carrier gas was 1 mL min<sup>-1</sup>. The oven temperature was held at 44°C for 5 min, then increased at a rate of 8°C min<sup>-1</sup> to 90°C and held for 4 min, then increased further with a rate of 6°C min<sup>-1</sup> to 200°C and held for 5 min, and increased finally with a rate of 20°C min<sup>-1</sup> to 230°C and held for 3 min. The GC-MS transfer line was held at 315°C resulting in a temperature of 175°C in the ion source. The MS was operated in the Selected Ion Mode (SIM). A stock solution of fluorobenzene and 1, 2-dichlorobenzene-*d*<sub>4</sub> in methanol, 200 µg mL<sup>-1</sup> each (USEPA standard No. 524, Supelco), was used as internal standard for calibration. The detection limit for each of the BTEX compounds was between 0.1 and 1 µg L<sup>-1</sup> depending on the total load of contaminants and required sample dilution.

Naphthalene, methylnaphthalenes, and benzothiophene were extracted from the pretreated and weighted water samples (see above) and analysed with a GC-MS (GC: HP 6890; MS: HP 5973). The GC column for separation of target compounds was a DB-5MS (film thickness: 0.25 µm; inner diameter: 0.2 mm; length: 30 m; J. & W. Scientific). Samples were injected pulsed splitless with a flow rate of the carrier gas (Helium) of 1 mL min<sup>-1</sup>. The oven temperature was held at 65°C for 4 min, then increased at a rate of 10°C min<sup>-1</sup> to 270°C and held for 10 min, then increased further with a rate of 10°C min<sup>-1</sup> to 310°C and held for 6.5 min. The GC-MS transfer line was held at 315°C resulting in temperature of 175°C in the ion source. The MS was operated in the SIM. For quantification, an internal standard (Restek) was used, which contained 200 mg L<sup>-1</sup> of naphthalene-*d*<sub>8</sub> and acenaphthene-*d*<sub>10</sub> dissolved in

cyclohexane. The detection limit for PAH compounds was between 0.01 and 0.1  $\mu\text{g L}^{-1}$  depending on the total load of contaminants and required dilution of extracts.

### **Compound-specific isotope analysis (CSIA)**

The carbon isotope composition of hydrocarbons was measured using a GC-C-IRMS (gas chromatography/combustion/isotope-ratio mass spectrometry) system (Finnigan MAT, ThermoFinnigan, Germany). The GC-C-IRMS system consisted of a gas chromatograph (6890 Series, Agilent Technology, USA) connected to a Finnigan MAT GC III combustion device with a 50 cm long water removal assembly held at 0 °C (Nafion<sup>®</sup> membrane). The Finnigan MAT 252 mass spectrometer was coupled via open split to the combustion device. Organic substances were combusted to CO<sub>2</sub> in the furnace held at 940°C on a CuO/Ni/Pt catalyst and transferred on-line into the MS to determine the isotope composition. Aliquots (0.5 to 4  $\mu\text{L}$ ) of extracts were injected using a hot injector held at 250°C operated in split or splitless mode depending on the concentration of target compounds. A capillary column (ZB1 60 m x 0.32 mm, 1  $\mu\text{m}$  film, Phenomenex Inc. Torrance, USA) was used for the chromatographic separation. The temperature program for field samples was: 40°C held for 3 min isothermally and then increased with a rate of 3 °C min<sup>-1</sup> to 250°C, and then increased to 300 °C with a rate of 20 °C min<sup>-1</sup> and held for 5 min. Helium was used as carrier gas with a flow rate of 1.5 mL min<sup>-1</sup>. The temperature for the analysis of naphthalene and methyl-naphthalene from batch experiments were: 80°C held for 2 min and then increase to 250°C at a rate of 6°C min<sup>-1</sup> and held for 5 min. All samples were measured in at least 5 replicates.

Systematic analytical error with respect to the linearity and precision of the instrument of due to non-linearity is 0.1  $\delta$ -units per decade in the signal interval between 45 and 3500 mV (Richnow et al., 2003b).

### **Calculations**

Calculations were based on the Rayleigh Equation (Equation (1)) for closed systems, which originally was developed to describe distillation processes (Rayleigh, 1896), and adapted for isotope fractionation (Hoefs, 1997). The isotope ratio  $R_t$  was determined from  $\delta$ -values according to Equation (2) and (3). All carbon isotope ratios are given in delta notation as  $\delta^{13}\text{C}$  values [‰] which are related to the Vienna-PDB (Pee Dee Belemnite) standard.

Growth experiments with bacterial strains and the respective hydrocarbon compound as the sole carbon and energy source were performed to obtain a compound-specific isotope fractionation factor ( $\alpha_C$ ) or an isotope enrichment factor ( $\varepsilon$ ); see Equations (4) and (5). With knowledge of the initial substrate concentration and the laboratory-derived substrate-specific isotope fractionation factor ( $\alpha_C$ ), the theoretical remaining substrate fraction  $C_t$  can be calculated (Equation 6). Here, an error propagation was considered for all measured input parameters of Equation (6). As only single measurements were performed for hydrocarbon concentrations from field samples a standard deviation of 10 % for the  $C_0$  values was considered. Isotope fractionation factors used for the theoretical isotope fractionation are given in Table 2. The percentage of biodegradation  $B$  of the residual substrate fraction was calculated according to Equation (7).

$$(1) \quad \frac{R_t}{R_0} = \left( \frac{C_t}{C_0} \right)^{(\alpha_C - 1)}$$

$$(2) \quad \delta^{13}C = \left( \frac{R_{sample}}{R_{standard}} - 1 \right) \times 1000 \quad [‰]$$

$$(3) \quad \frac{R_t}{R_0} = \frac{\delta_t + 1000}{\delta_0 + 1000}$$

$$(4) \quad \ln \left( \frac{R_t}{R_0} \right) = (\alpha_C - 1) \times \ln \left( \frac{C_t}{C_0} \right)$$

$$(5) \quad \varepsilon = (\alpha_C - 1) \times 1000$$

$$(6) \quad C_t = C_0 \times \left( \frac{R_t}{R_0} \right)^{(\alpha_C - 1)}$$

$$(7) \quad B = \left( 1 - \frac{C_t}{C_0} \right) \times 100 \quad [\%]$$

## Results

### Stable carbon isotope fractionation during anaerobic degradation of naphthalene and 2-methylnaphthalene

Degradation of naphthalene by the sulfate-reducing enrichment culture N47 from about 55  $\mu\text{M}$  to 20  $\mu\text{M}$  was accompanied by an isotope shift of less than 1  $\delta^{13}\text{C}$  in the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio of the residual substrate fraction (Figure 2A). However, the absolute change in the isotope signature along with the complete oxidation of naphthalene may be assumed higher, as at the end of the growth experiment (last subsampling) the naphthalene concentrations were too low to achieve reliable isotope values. This observation was confirmed in a second experiment, where the total isotope shift accounted for slightly more than 1  $\delta^{13}\text{C}$  along with a concentration change in naphthalene from 60  $\mu\text{M}$  to 30  $\mu\text{M}$  (data not shown). Fractionation factors calculated for the three repetitive naphthalene degradation experiments showed a high correlation within the individual experiments but some variation within the calculated  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  fractionation factors (Equation 4) with an average value of  $\alpha_{\text{C}} = 0.9989 \pm 0.0004$  ( $\varepsilon = -1.1 \pm 0.4 \text{ ‰}$ ) (Figure 2A).

The same set of growth experiments with strain N47 but 2-methylnaphthalene as sole carbon and energy source revealed a slightly smaller fractionation as compared to naphthalene. Along with a decrease in 2-methylnaphthalene from about 60  $\mu\text{M}$  to 10  $\mu\text{M}$  a change in the  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ratio of the residual substrate fraction of approximately 2.5 ‰ could be determined (Figure 2B). The larger absolute isotope shift compared to the naphthalene degradation experiment reflected the advanced stage of substrate depletion. A tight linear relation was observed in all replicates (Figure 2B), resulting in an average fractionation factor of  $\alpha_{\text{C}} = 0.9991 \pm 0.0001$  ( $\varepsilon = -0.9 \pm 0.1 \text{ ‰}$ ).

### Testfeld-Süd site characteristics

Concentrations of individual hydrocarbons varied between the examined groundwater wells. Highest concentrations were found for naphthalene with 86  $\text{mg L}^{-1}$  at B54, which is about 3 times the water solubility and indicates that the groundwater sample contained NAPL phase (Table 1). All selected contaminants showed a strong decrease in concentration with distance from the sources along the groundwater flow path. Naphthalene, for example, dropped from 86  $\text{mg L}^{-1}$  at B54 (S2) to 14  $\mu\text{g L}^{-1}$  at B42, the least contaminated well which is located about 90 m downstream from S2.

Within the same distance 1-methylnaphthalene and 2-methylnaphthalene declined to concentrations of  $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. Within the BTEX compounds, benzene declined fastest followed by toluene, *m/p*-xylene, ethylbenzene and *o*-xylene in relation to their source concentrations at S2. However, at the most downgradient well of the investigated area (well B42), benzene was the most prominent compound with  $46 \text{ mg L}^{-1}$  (Table 1).

The physical-chemical conditions in the investigated aquifer, *i.e.* redox potential, dissolved oxygen, sulfate, nitrate and iron, were mainly influenced by the distribution of the contaminants. With an exception in well B42 (least contaminated), oxygen was always below  $1 \text{ mg L}^{-1}$ . This was in agreement with redox measurements indicating anoxic conditions for the whole test site with lowest values at S1 and S2 ( $E_{\text{H}} = -260$  to  $-340 \text{ mV}$ ) suggesting strongly reducing conditions. With increasing distance to the sources, redox values showed a continuous increase reaching  $+40 \text{ mV}$  at B42. Nitrate was always depleted to concentrations near or below the detection limit ( $\leq 0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) with exceptions at well B27 and B42, where nitrate was found in concentrations of 20 and  $117 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively. Sulfate was abundant throughout the investigation site (between 30 and  $480 \text{ mg L}^{-1}$ ) with generally lower concentrations close to S1 and S2 and higher values with increasing distance from the sources. Also the presence of soluble iron and/or sulfide in the sampled groundwater indicated that the organic pollution lead to anoxic conditions in the aquifer at the time of sampling and anaerobic processes dominated the hydrocarbon degradation (data not shown).

### **$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ stable isotope pattern of selected hydrocarbons**

For almost every of the selected hydrocarbons, the most negative  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope values coincided with highest concentrations at either source area S1 (well B14) or S2 (wells B54 and B56) (Figure 3 & 4, Table 1). Among the BTEX, every compound showed at least a  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope shift of  $\geq 3.3 \text{ ‰}$  along the groundwater flow path whereas the investigated naphthalenes were characterized by smaller changes ranging between 1.3 and 3.6 ‰ with respect to the most negative isotope values in one of the two source areas (Table 2). In detail, strongest  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  fractionation was observed for *o*-xylene with an absolute shift of  $\Delta^{13}\text{C} = 10.7 \text{ ‰}$ , followed by toluene ( $\Delta^{13}\text{C} = 8.1 \text{ ‰}$ ), and *m/p*-xylene ( $\Delta^{13}\text{C} = 7.1 \text{ ‰}$ ) (Table 1, Figure 3). A moderate but still significant fractionation was found for ethylbenzene ( $\Delta^{13}\text{C} = 3.7 \text{ ‰}$ ), naphthalene

( $\Delta^{13}\text{C} = 3.6 \text{ ‰}$ ), benzene ( $\Delta^{13}\text{C} = 3.3 \text{ ‰}$ ), and 2-methylnaphthalene ( $\Delta^{13}\text{C} = 2.3 \text{ ‰}$ ) (Table 1, Figure 3 & 4). Smallest fractionation was detected for 1-methylnaphthalene ( $\Delta^{13}\text{C} = 1.4 \text{ ‰}$ ).

The carbon isotope compositions of the target compounds from the individual wells were plotted according to the Rayleigh Equation to check if concentrations and isotope signatures were correlated (Figure 5). The data could be fitted by a linear regression which shows that the observed isotope fractionation at the field site can be described by the Rayleigh Equation, where the most negative isotope values and highest compound concentrations represent the common source of contamination. Three wells did not fit into the trend as they did not belong to the same plume (Figure 5). In addition to the isotope data and contaminant concentrations, several physico-chemical parameters and some previous hydrological investigations supported this assumption. However, no correlation between concentrations and carbon isotope composition were found for ethylbenzene and 2-methylnaphthalene, although it is likely that these compounds belong to the same plume as the other selected compounds.

When the slope of the regression curve of the individual compounds is compared with the  $\ln(R_t/R_0)$  over  $\ln(C_t/C_0)$  relation from the laboratory growth studies, field fractionation patterns (Figure 5) are in good agreement with most laboratory derived fractionation factors (Table 2) suggesting that *in situ* degradation is active in the contaminated aquifer. A weak agreement between field and laboratory data was observed for benzene and ethylbenzene.

### **Quantification of biodegradation**

Based on a previous tracer study (Bösel et al., 2000) and an adapted groundwater flow model (K. Mak, master thesis, Center of Applied Geosciences, University of Tübingen, 2003) seven monitoring wells following a 110 m long transect along the groundwater flow path with well B14 as the source (S1) were chosen (Figure 1) for a quantitative examination of *in situ* biodegradation using the Rayleigh model (Equations 6 and 7). Calculations were carried out for all compounds, where a laboratory derived fractionation factor was available; *i.e.* toluene, *o*-xylene, *m/p*-xylene (fractionation factor of *m*-xylene was used), and naphthalene (Table 2). No calculations were carried out for ethylbenzene and 2-methylnaphthalene, as no



convincing correlation between compound concentrations and isotope signature was observed (Figure 5).

Theoretical benzene concentrations calculated with Equation (6) were in good agreement with measured concentrations at the first three wells (Figure 6A). Further downstream, calculated concentrations started to deviate significantly from observed concentrations. Whereas a total decrease in concentration of 83 % was observed between the source well B14 and well B28, only 35 % of this mass reduction could be attributed to anaerobic biodegradation (Figure 6A). Calculated toluene concentrations were very close to the measured concentrations and could well describe the observed toluene decrease over the whole transect (Figure 6B). Almost all toluene degradation took place between S1 and B44, the first monitoring well downgradient. The  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  signature of toluene at S1 ( $\delta^{13}\text{C} = -21.9 \text{ ‰}$ ) changed by about 5 ‰ along the selected transect. Samples at B28 (the most downgradient well of the transect where a  $\delta^{13}\text{C}$  values could be obtained) showed a disappearance of 99.9 % of toluene in relation to the source concentration, whereas the calculations predicted a 86% removal by biodegradation (Figure 6B). A good agreement between measured and calculated concentration was also obtained for *o*-xylene, *m/p*-xylene, and naphthalene. *o*-Xylene showed a reduction in concentration of 99.4 % between the source well B14 and well B28. Calculations assumed a biodegradation of 99.9 % (Figure 6C). Although, calculations for the coeluting isomers *m*- and *p*-xylene were performed with a fractionation factor for *m*-xylene, a good prediction of biodegradation was achieved for the chosen transect, with an exception in well B47 (Figure 6D). At the end of the transect, the calculated value underestimated the actual concentration by 20 %. Predictions of naphthalene degradation generally agreed well with the observed concentration gradient in the field (Figure 6E) only deviating 30 % at well B28.

## Discussion

To date, only two approaches may provide the researcher with a direct evidence of *in situ* biodegradation of aromatic hydrocarbons in petroleum contaminated aquifers, *i.e.* (1) the analysis of a compound-specific stable isotope fractionation (Hunkeler et al., 1999; Meckenstock et al., 1999b; Mancini et al., 2002; Meckenstock et al., 2002; Meckenstock et al., 2003; Richnow et al., 2002; Hunkeler et al., 2003) and (2) the

identification of degradation-specific metabolites (Beller, 2000; Elshahed et al., 2001; Gieg and Suflita, 2002; Phelps et al., 2002). This study, for the first time, combined these two approaches with the goal of an improved evaluation of the natural attenuation potential of a tar-oil contaminated aquifer at a former gas work site (see also part II of this project; (Griebler et al., 2003)).

Compound-specific isotope analysis (CSIA) at the Testfeld Süd, provided qualitative evidence for an *in situ* biodegradation of a number of selected BTEX and PAH compounds, *i.e.* benzene, toluene, ethylbenzene, *o*-xylene, *m/p*-xylene, naphthalene, 1-methylnaphthalene, and 2-methylnaphthalene. Beside these, a significant  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  fractionation was also observed for indane and indene, *i.e.*  $\Delta^{13}\text{C}$  of 4 and 5 ‰, respectively. For the two later, no compound concentrations were available allowing quantitative interpretation of this observation. A change in the stable carbon isotope composition and therefore a qualitative evidence for *in situ* biodegradation of aromatic hydrocarbons, especially for individual BTEX compounds, has also been provided by a few other field studies which documented a distinct stable carbon isotope fractionation for benzene (Vieth et al., 2001; Mancini et al., 2002), toluene (Meckenstock et al., 1999b; Morasch et al., 2001a; Meckenstock et al., 2002; Richnow et al., 2002; Richnow et al., 2003a), ethylbenzene (Richnow et al., 2003b; Mancini et al., 2002), xylene isomers (Richnow et al., 2003b; Richnow et al., 2003a), ethyltoluene (Richnow et al., 2003b), and 1,2,4-trimethylbenzene (Richnow et al., 2003b). Data concerning isotope fractionation of PAHs are scarce. Richnow et al. (Richnow et al., 2003a) observed a concentration decline of naphthalene following the groundwater flow path which was accompanied by a small but distinct  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  fractionation ( $\delta^{13}\text{C} = 1.2$  ‰) in a tar-oil contaminated aquifer near Hamburg, Germany.

Qualitative support for the indication of *in situ* biodegradation of individual BTEX and PAH compounds at the Testfeld Süd site were obtained from signature metabolites analysis (SMA), carried out parallel to the CSIA. SMA revealed the presence of putative metabolites indicative for the anaerobic degradation of various alkylbenzenes, such as ethylbenzene and individual xylene isomers, as well as PAHs, such as naphthalene and methylnaphthalenes (Griebler et al., 2003).

Beside a qualitative evidence for the biological removal of individual contaminants, the big challenge of the stable carbon isotope approach is the quantification of *in situ* bioremediation. As this requires the determination of  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  fractionation factors, the

availability of anaerobic aromatic hydrocarbon degrading bacterial cultures and strains is at the moment still a limiting factor. However, laboratory studies revealed already fractionation factors for ethylbenzene, toluene, *o*- and *m*-xylene (Table 1), and its number is steadily increasing (Meckenstock et al., 2003). Very recently Mancini et al. (Mancini et al., 2003) reported  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  fractionation factors for the anaerobic degradation of benzene by undefined enrichment cultures under nitrate-reducing ( $\alpha_{\text{C}} = 0.9977$ ), sulfate-reducing ( $\alpha_{\text{C}} = 0.9964$ ), and methanogenic ( $\alpha_{\text{C}} = 0.9980$ ) conditions. Here we report for the first time  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  fractionation factors for anaerobic degradation of two PAH compounds, *i.e.* naphthalene and 2-methylnaphthalene.

At the Testfeld Süd, the quantitative estimation of *in situ* biodegradation was successful for toluene, *o*-xylene, *m/p*-xylene, and naphthalene. Calculations according to the Rayleigh model suggested that most downgradient of a chosen hydraulic transect 70 % to 100 % of the observed mass loss of the individual hydrocarbons in relation to their source concentration can be attributed to *in situ* biodegradation. Calculations for benzene using a fractionation factor from the literature could only describe the actually observed concentration gradient for the first part of the chosen transect, but showed some increasing deviation between observed and calculated values with distance from the source. At the most downgradient well, only 35 % of the determined concentration decline could be attributed to biodegradation. As the fractionation factors for anaerobic benzene degradation reported in the literature show strong variations with different redox conditions (Mancini et al., 2003), one can not exclude different degradation pathways and therefore different enzyme reactions and extents of fractionation to occur in contaminated aquifers. The applied fractionation factor may be inadequate for our test site. However, correlation analysis between benzene concentrations and isotopic compositions from the Testfeld Süd indicated that the concentration loss is correlated to the isotope fractionation processes. In the field, compound concentrations can be affected by abiotic processes such as dilution and sorption. The lack of a significant correlation of concentration and isotope data prevented the application of the quantitative approach for ethylbenzene and 2-methylnaphthalene, in case of 1-methylnaphthalene we still lack a fractionation factor.

The precision of calculated *in situ* biodegradation is theoretically determined by the quality of all parameters needed for calculation. The Rayleigh equation contains the

source concentration ( $C_0$ ), the isotopic composition of the given compound at the source ( $R_0$ ) and any other sampling point ( $R_t$ ), as well as the applied laboratory derived fractionation factor ( $\alpha_C$ ). These parameters are affected by some variation (here: standard deviation) as a result of sampling and analytical measurement. In our data set, isotope measurements showed standard deviations (SD) between 1 % and 12 % (with an overall average of 5 %), individual fractionation factors applied were affected by SD between 7 % and 36 %, and as there were only single measurements available for hydrocarbon concentrations a SD of 10 % was assumed for  $C_0$  values. Interestingly, only the quality of the  $C_0$  value determines the quality of the calculated values, whereas the SD of all other parameters showed no significant influence as was revealed by an error propagation. Thus, for the chosen transect the major concentration decline within the first two to three wells could in most cases be perfectly described and significant deviations between calculated and observed values were only apparent at sampling points where the hydrocarbon concentrations already decreased by 2 to 3 orders of magnitude.

Hydrocarbon data from the Testfeld Süd point to a very active microbial community as BTEX and PAH concentrations of up to several milligramms per liter at source 1 and 2 declined to concentrations of less than  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  within a distance of only 100 m. CSIA could provide direct evidence for the biological nature of this hydrocarbon mass loss. Comparable quantitative data on the anaerobic in situ biodegradation of hydrocarbons are scarce. Concerning the anaerobic degradation of toluene, CSIA showed a similar good fit of the calculated extent of biodegradation with the observed data along a transect in an anoxic petroleum-hydrocarbon contaminated aquifer in Hamburg, Germany. There, the toluene concentration decreased from about  $160 \mu\text{g L}^{-1}$  near the source to below the detection limit within a distance of 800 m following groundwater flow path. The  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope ratio in the residual toluene fraction was enriched by about 7 ‰ suggesting an extent of *in situ* biodegradation of 99 % as calculated with the Rayleigh Equation (Richnow et al., 2002). Similar results were obtained at a petroleum-hydrocarbon contaminated aquifer at Zeitz (Germany), where a pronounced  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  fractionation could be observed for toluene and benzene. The quantification of biodegradation with isotope fractionation could again explain the measured concentrations of toluene (Richnow et al., 2002). Very high microbial activities were found during recent investigations of a petroleum spill site near the city of Ingolstadt, Germany. Ten years after the accident, an efficient

remediation of toluene by the indigenous microbial community could be shown. Within a distance of only 10 m from the source, the toluene concentrations showed a decline from about 3.5 mg L<sup>-1</sup> to 5 µg L<sup>-1</sup>. The percentage of biodegradation, calculated with the Rayleigh model, showed that the toluene concentration was reduced to more than 99% by biodegradation within the distance of 10 m (Meckenstock et al., 2002).

Limitations of the quantitative stable isotope fractionation approach become apparent where the biodegradation of individual compounds does not lead to a <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C fractionation. Investigations at the tar-oil contaminated field site in Hamburg showed a sharp concentration decrease for indane and indene with distance from the source but no shift of the <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C signature in the residual compound fraction ((Richnow et al., 2003a)). At the Testfeld Süd, a shift of about 5 δ<sup>13</sup>C and 4 δ<sup>13</sup>C was determined for indane and indene, respectively (data not shown). Another example is the Vejen aquifer, where the residual fraction of 1,2,3-trimethylbenzene, o-xylene, naphthalene and fenchone, did not show significant changes in the <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C ratio with distant from the source, although a strong decrease in concentrations was observed (Richnow et al., 2003b). This could mean that the compounds are either not degraded by biological activity or some as yet undiscovered microbial degradation pathways do not lead to isotope effects as it was observed for some aerobic biochemical reactions (Morasch et al., 2002). For some of these compounds the look for degradation-specific metabolites would offer an alternative approach to obtain direct evidence on *in situ* biodegradation, as a lack of <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C fractionation does not exclude biodegradation to take place. For example, SMA proved the degradation of the heterocyclic aromatic hydrocarbon benzothiophene, which did not show any conclusive <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C fractionation patterns at the investigated site (Griebler et al., 2003). We therefore propose a combination of CSIA and the SMA approach.

#### Acknowledgments

Financial support was obtained from a BMBF grant (No. 02WT0022). Thanks go to W. Kürner, R. Seelig, and T. Wendel for help in sampling and sample analysis. We are further grateful to R. Liedl who provided support for the error propagation calculations. B. Morasch is acknowledged for comments on an earlier draft of this paper.

## References

- Ahad, J., Sherwood Lollar, B.S., Edwards, E., Slater, G.F., and Sleep, B.E. (2000) Carbon isotope fractionation during anaerobic biodegradation of toluene: implications for intrinsic bioremediation. *Environmental Science & Technology* **34**: 892-896.
- Beller, H.R. (2000) Metabolic indicators for detecting *in situ* anaerobic alkylbenzene degradation. *Biodegradation* **11**: 125-139.
- Bockelmann, A., Ptak, T., and Teutsch, G. (2001) An analytical quantification of mass fluxes and natural attenuation rate constants at a former gasworks site. *Journal of Contaminant Hydrology* **53**: 429-453.
- Bösel, D., Herfort, M., Ptak, T., and Teutsch, G. (2000) Design, performance, evaluation and modelling of a natural gradient multitracer transport experiment in a contaminated heterogeneous porous aquifer. In *Tracers and Modelling in Hydrogeology*. Dassargues, A. (ed). Liege: IAHS, pp. 45-51.
- Cline, J.D. (1969) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnology and Oceanography* **14**: 454-458.
- Cozzarelli, I.M., Herman, J.S., and Baedeker, M.J. (1995) Fate of microbial metabolites of hydrocarbons in a coastal plain aquifer: the role of electron acceptors. *Environmental Science & Technology* **29**: 458-469.
- Elshahed, M.S., Gieg, L.M., McInerney, M.J., and Suflita, J.M. (2001) Signature metabolites attesting to the *in situ* attenuation of alkylbenzenes in anaerobic environments. *Environmental Science & Technology* **35**: 682-689.
- Gieg, L.M., and Suflita, J.M. (2002) Detection of anaerobic metabolites of saturated and aromatic hydrocarbons in petroleum-contaminated aquifers. *Environmental Science & Technology* **36**: 3755-3762.
- Griebler, C., Safinowski, M., Richnow, H.H., and Meckenstock, R. (2003) Strategies for the assessment of anaerobic *in situ* biodegradation of aromatic hydrocarbons - II. Analysis of degradation-specific metabolites. *Environmental Science & Technology* **XX**: in preparation.
- Heider, J., Spormann, A.M., Beller, H.R., and Widdel, F. (1999) Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiology Reviews* **22**: 459-473.
- Herfort, M., Ptak, T., Hümmer, O., Teutsch, G., and Dahmke, A. (1998) Testfeld Süd: Einrichtung der Testfeldinfrastruktur und Erkundung hydraulisch-

- hydrogeochemischer Parameter des Grundwasserleiters. *Grundwasser* **4**: 159-166.
- Hoefs, J. (1997) *Stable isotope geochemistry*. Berlin: Springer.
- Hunkeler, D., Aravena, R., and Butler, B.J. (1999) Monitoring microbial dechlorination of tetrachloroethene (PCE) in groundwater using compound-specific stable isotope carbon ratios: microcosm and field studies. *Environmental Science & Technology* **33**: 2733-2738.
- Hunkeler, D., Aravena, R., Parker, B.L., Cherry, J.A., and Diao, X. (2003) Monitoring oxidation of chlorinated ethenes by permanganat in groundwater using stable isotopes: laboratory and field studies. *Environmental Science & Technology* **37**: 798-804.
- Lebedew, W.C., Owsjannikow, W.M., Mogilewskij, G.A., and Bogdanow, W.M. (1969) Fraktionierung der Kohlenstoffisotope durch mikrobiologische Prozesse in der biochemischen Zone. *Zeitschrift für Allgemeine Geologie* **15**: 621-624.
- Mancini, S.A., Ulrich, A., Lacrampe-Couloume, G., Sleep, B., Edwards, E.A., and Sherwood Lollar, B.S. (2003) Carbon and hydrogen isotopic fractionation during anaerobic biodegradation of benzene. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 191-198.
- Mancini, S.A., Lacrampe-Couloume, G., Jonker, H., Van Breukelen, B.M., Groen, J., Volkering, F., and Lollar, B.S. (2002) Hydrogen isotopic enrichment: An indicator of biodegradation at a petroleum hydrocarbon contaminated field site. *Environmental Science & Technology* **36**: 2464-2470.
- Meckenstock, R., Morasch, B., Kästner, M., Vieth, A., and Richnow, H.H. (2002) Assessment of bacterial degradation of aromatic hydrocarbons in the environment by analysis of stable carbon isotope fractionation. *Water Air and Soil Pollution: Focus* **2**: 141-152.
- Meckenstock, R.U., Morasch, B., and Griebler, C. (2003) Analysis of stable isotope fractionation as a tool to monitor biodegradation in contaminated aquifers. *Journal of Contaminant Hydrology*, submitted.
- Meckenstock, R.U., Annweiler, E., Warthmann, R., Schink, B., Michaelis, W., and Richnow, H.H. (1999a)  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  stable isotope fractionation of toluene by anaerobic degradation. A new method to monitor biological degradation *in situ*? In *Novel approaches for bioremediation of organic pollution*. al., F.e. (ed). New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

- Meckenstock, R.U., Morasch, B., Warthmann, R., Schink, B., Annweiler, E., Michaelis, W., and Richnow, H.H. (1999b)  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope fractionation of aromatic hydrocarbons during microbial degradation. *Environmental Microbiology* **1**: 409-414.
- Morasch, B., Richnow, H.H., Schink, B., and Meckenstock, R.U. (2001a) Stable hydrogen and carbon isotope fractionation during microbial toluene degradation: Mechanistic and environmental aspects. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 4842-4849.
- Morasch, B., Annweiler, E., Warthmann, R.J., and Meckenstock, R.U. (2001b) The use of a solid adsorber resin for enrichment of bacteria with toxic substrates and to identify metabolites: degradation of naphthalene, o-, and m-xylene by sulfate-reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **44**: 183-191.
- Morasch, B., Richnow, H.H., Schink, B., Vieth, A., and Meckenstock, R. (2002) Carbon and hydrogen stable isotope fractionation during aerobic bacterial degradation of aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5191-5194.
- Phelps, C.D., Battistelli, J., and Young, L.Y. (2002) Metabolic biomarkers for monitoring anaerobic naphthalene biodegradation *in situ*. *Environmental Microbiology* **4**: 532-537.
- Rayleigh, J.W.S. (1896) Theoretical considerations respecting the separation of gases by diffusion and similar processes. *Philos. Mag.* **42**: 493-498.
- Richnow, H.H., Annweiler, E., Michaelis, W., and Meckenstock, R.U. (2003a) Microbial *in situ* degradation of aromatic hydrocarbons in a contaminated aquifer monitored by carbon isotope fractionation. *Journal of Contaminant Hydrology*, in press.
- Richnow, H.H., Vieth, A., Kästner, M., Gehre, M., and Meckenstock, R.U. (2002) Isotope fractionation of toluene: a perspective to characterise microbial *in situ* degradation. *The Scientific World Journal* **2**: 1-8.
- Richnow, H.H., Meckenstock, R.U., Ask, L., Baun, A., Ledin, M., and Christensen, T.H. (2003b) *In situ* biodegradation determined by carbon isotope fractionation of aromatic hydrocarbons in an anaerobic landfill leachate plume (Vejen, Denmark). *Journal of Contaminant Hydrology*, in press.
- Sherwood Lollar, B.S., Slater, G.F., Ahad, J., Sleep, B., Spivack, J., Brennan, M., and MacKenzie, P. (1999) Contrasting carbon isotope fractionation during



- biodegradation of trichloroethylene and toluene: implications for intrinsic bioremediation. *Organic Geochemistry* **30**: 813-820.
- Spormann, A.M., and Widdel, F. (2000) Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation* **11**: 85-105.
- Stahl, W.J. (1980) Compositional changes and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  fractionation during the degradation of hydrocarbons by bacteria. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **44**: 1903-1907.
- USEPA (1999) Use of monitored natural attenuation at superfund, RCRA corrective action, and underground storage tank sites. In: OSWER Directive, p. 32.
- Vieth, A., Kästner, M., Morasch, B., Meckenstock, R., and Richnow, H.H. (2001) Charakterisierung des biologischen Abbaus von BTEX im Grundwasser über Isotopenfraktionierung - Feldstudien. *TerraTech* **5**: 37-41.
- Widdel, F., and Bak, F. (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In *The Prokaryotes*. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.-H. (eds). New York: Springer Verlag, pp. 3352-3378.
- Widdel, F., and Rabus, R. (2001) Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology* **12**: 259-276.
- Wilkes, H., Boreham, C., Harms, G., Zengler, K., and Rabus, R. (2000) Anaerobic degradation and carbon isotopic fractionation of alkylbenzenes in crude oil by sulfate-reducing bacteria. *Organic Geochemistry* **31**: 101-115.

## Legends

Figure 1: Schematic overview of the former gaswork site “Testfeld Süd”. The arrow depicts the main direction of the groundwater flow. The insert shows the investigation area and the positions of selected observation wells, the two source zones S1 and S2 (areas marked with dashed lines), and the transect chosen for detailed quantitative investigations. Isolines show the hydraulic heads at the time of sampling.

Figure 2: Isotope fractionation during anaerobic degradation of naphthalene (A) and 2-methylnaphthalene (B). Concentrations (squares) and isotope ratios (triangles) in growth experiments with the sulfate-reducing enrichment culture N47; three batch experiments are shown for the respective compound (Exp. AI-AIII and BI-BIII). Diagrams on the right side show the carbon isotope composition and concentrations plotted according to Equation (4). Solid lines represent the linear regression of the individual batch experiments; *i.e.* Exp. AI (white circle),  $y = -0.0016x$ ,  $R^2 = 0.91$ ; Exp. AII (grey circles),  $y = -0.0008x$ ,  $R^2 = 0.92$ ; Exp. AIII (black circles),  $y = -0.001x$ ,  $R^2 = 0.71$ ; Exp. BI,  $y = -0.0008x$ ,  $R^2 = 0.91$ ; Exp. BII,  $y = -0.001x$ ,  $R^2 = 0.93$ ; Exp. BIII,  $y = -0.0009x$ ,  $R^2 = 0.99$ ; the dashed lines represent the average slope, *i.e.* for naphthalene  $y = -0.0011$ ; for 2-methylnaphthalene  $y = -0.0009$ .

Figure 3: Spatial distribution of concentrations and isotopic compositions of selected BTEX compounds over the investigated area (for location see insert in Figure 1).

Figure 4: Spatial distribution of concentrations and isotopic compositions of selected PAH compounds (for location see insert in Figure 1).

Figure 5: Diagram showing the correlation between the change in concentration and isotopic composition of individual aromatic hydrocarbons plotted according to the Rayleigh equation (3). The solid lines represent the linear regression of data from all sampling points ignoring data from the wells B27, B29 and B55 (empty circles), which were hydrologically not connected with the other wells. The well with the highest compound concentration and the lightest  $\delta$  – value were used as  $C_0$  and  $R_0$ .  $Y$  gives the slope of the regression curve and  $R^2$  the coefficient of determination.

Figure 6: Calculation of the extent of biodegradation along a monitoring transect applying isotope fractionation factors given in Table 1. Diagrams on the left side show concentrations and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope ratios of selected aromatic hydrocarbons, with well B14 representing the source of contamination ( $C_0$ ,  $R_0$ ). Error bars of the isotope ratios (triangles) depict the standard deviation (SD) of  $\geq 5$  replicate measurements. Observed concentrations (black squares) show no error bars, because they represent single measurements. The error bars of the calculated concentrations (open squares) are obtained from an error propagation of all parameters used in Equation (6), assuming a SD of 10 % for  $C_0$ . Diagrams on the right side show the extent of biodegradation (empty squares) in relation to the parent values at B14 calculated from observed isotope signatures in comparison to the actually observed concentrations (black squares). The error bars of the calculated biodegradation are calculated by error propagation.

Table 1: Concentrations and  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  signatures of selected BTEX and PAH compounds in different monitoring wells of the investigated site Testfeld Süd. SD is the standard deviation of the isotope values

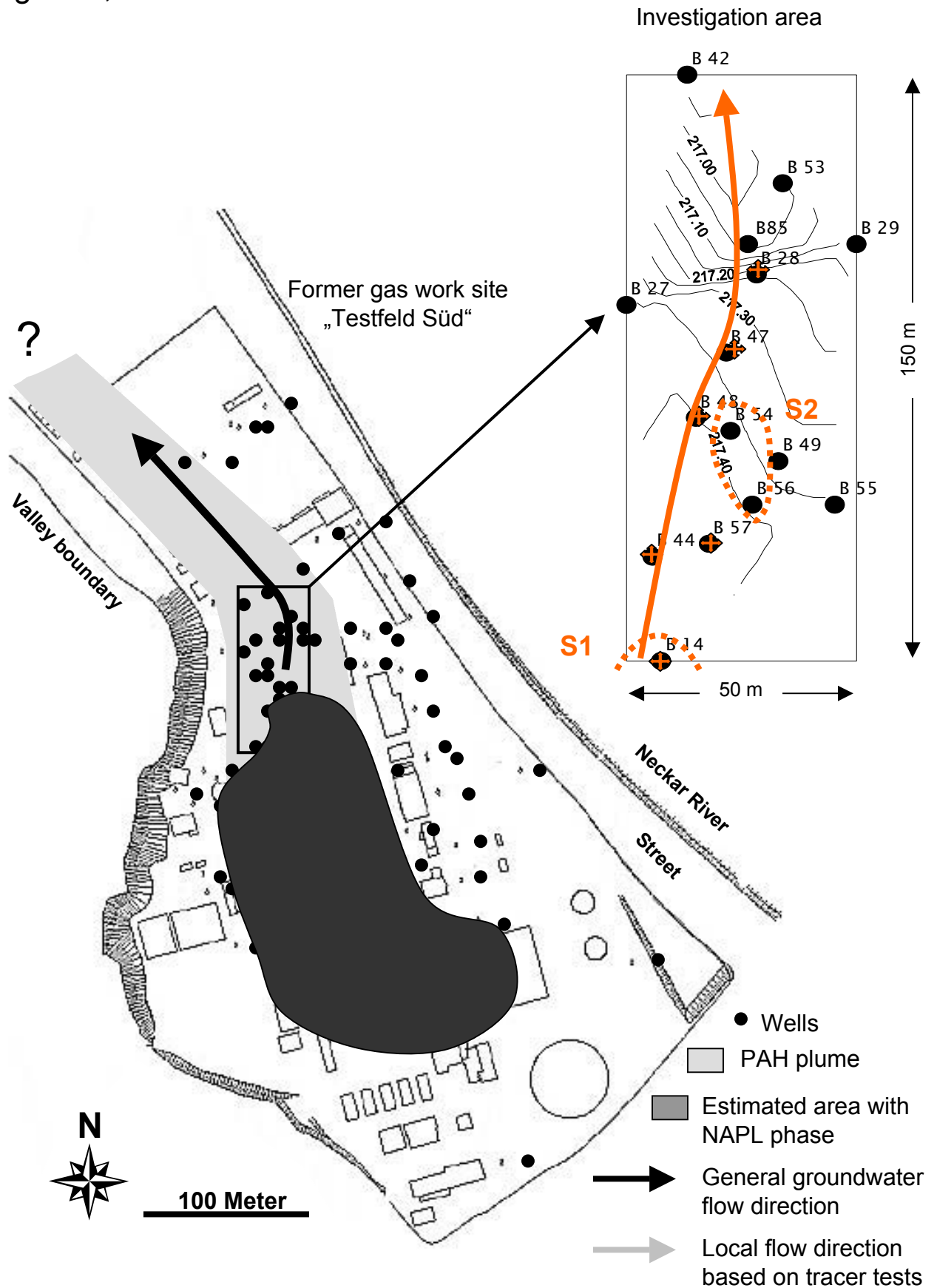
Compound	Unit	B14	B27	B28	B29	B42	B44	B47	B48	B49	B53	B54	B55	B56	B57	B85
<b>Benzene</b>	$[\mu\text{g L}^{-1}]$	1,401	51	238	50	46	1,191	411	1,130	3,520	321	3,626	126	4,230	1,215	257
	$\delta^{13}\text{C} [\text{‰}]$	-25.89	-23.55	-24.68	-23.17	b.d.	-25.15	-25.38	-25.64	-25.93	-23.74	-26.15	-22.88	-26.18	-25.49	n.d.
	SD	0.13	0.35	0.39	0.35		0.28	0.30	0.09	0.54	0.29	0.12	0.22	0.40	0.32	
<b>Toluene</b>	$[\mu\text{g L}^{-1}]$	420	2.4	5.4	3.5	7.4	20	9.6	18	342	5	3,841	11	1,765	15	4.7
	$\delta^{13}\text{C} [\text{‰}]$	-21.87	b.d.	-18.55	-18.35	b.d.	-17.08	-17.31	-17.8	-23.03	b.d.	-25.15	-20.56	-24.55	-18.21	n.d.
	SD	0.74		0.90	1.5		0.60	0.20	1.21	0.40		0.29	0.22	0.21	2.11	
<b>Ethylbenzene</b>	$[\mu\text{g L}^{-1}]$	1,145	11	187	19	10	968	454	1,020	936	198	1,706	38	1,228	800	235
	$\delta^{13}\text{C} [\text{‰}]$	-23.67	-20.71	-23.02	-21.79	b.d.	-22.87	-24.25	-22.9	-23.21	-22.31	-24.4	-22.62	-23.41	-23.53	n.d.
	SD	0.92	0.77	0.67	0.47		0.11	0.50	0.33	0.23	0.22	0.85	0.51	0.46	0.47	
<b>o-Xylene</b>	$[\mu\text{g L}^{-1}]$	676	1.1	9	1.1	1.8	127	37	75	337	30	1,625	18	780	61	12
	$\delta^{13}\text{C} [\text{‰}]$	-25.86	b.d.	-16.37	b.d.	b.d.	-21.23	-15.19	-19.32	-23.82	-18.05	-23.76	-21.51	-25.18	-19.7	n.d.
	SD	1.15		1.95			0.89	0.44	1.73	0.57	1.07	0.45	0.72	0.69	0.78	
<b>m/p-Xylene</b>	$[\mu\text{g L}^{-1}]$	734	3.5	22	7.6	5	99	33	71	551	28	3,610	14	1,601	56	23
	$\delta^{13}\text{C} [\text{‰}]$	-23.44	-22.49	-19.27	-22.96	b.d.	-20.09	-21.54	-19.09	-22.98	-20.88	-24.77	-22.39	-24.53	-17.7	n.d.
	SD	1.64	0.78	2.22	0.91		0.94	1.32	0.88	0.28	0.47	0.33	0.53	0.67	1.27	
<b>Naphthalene</b>	$[\mu\text{g L}^{-1}]$	4,716	9.5	109	14	14	169	17	68	2,552	299	86,523	152	13,258	65	103
	$\delta^{13}\text{C} [\text{‰}]$	-25.2	b.d.	-23.97	-23.8	b.d.	-23.72	-22.94	-22.78	-24.93	-24.45	-25.72	-24.72	-25.46	-22.14	n.d.
	SD	0.14		0.40	1.03		0.46	1.39	0.41	0.26	0.14	0.14	0.19	0.36	1.13	
<b>1-Methylnaphthalene</b>	$[\mu\text{g L}^{-1}]$	1,020	3.6	36	2.8	2.5	622	147	323	444	42	1,911	190	3,464	238	48
	$\delta^{13}\text{C} [\text{‰}]$	-24.31	b.d.	-23.45	-23.1	b.d.	-24.39	-23.33	-24.05	-24.17	-23.17	-24.53	-24.28	-24.17	-24.08	n.d.
	SD	0.59		0.95	0.68		0.21	0.28	0.46	1.25	0.56	0.88	0.34	0.54	0.41	
<b>2-Methylnaphthalene</b>	$[\mu\text{g L}^{-1}]$	48	1.3	1.4	1.4	1.5	4	1.5	6.3	124	2.4	3,950	16	5,436	3.9	1.6
	$\delta^{13}\text{C} [\text{‰}]$	-25.15	-23.51	b.d.	b.d.	b.d.	-22.99	-24.18	-24.72	-22.81	-23.99	-24.51	-23.38	-24.09	-24.22	n.d.
	SD	0.71	1.56				0.36	0.27	0.29	0.53	0.20	0.62	1.33	0.51	0.62	

b.d. means below detection limit; n.d. means not determined.

Table 2:  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  Isotope fractionation factors used for the calculation of *in situ* biodegradation.

Compound	$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - Fractionation factor ( $\alpha_{\text{C}}$ )	Redox conditions	$^{13}\text{C}$ -Enrichment factor ( $\epsilon$ )	Reference
<b>BTEXs</b>				
Benzene	$0.0064 \pm 0.0003$	sulfate-reducing	$-3.6 \pm 0.3$	(Mancini et al., 2003)
Toluene	$0.9983 \pm 0.0003$	sulfate-reducing	$-1.7 \pm 0.3$	(Meckenstock et al., 1999b)
<i>o</i> -Xylene	$0.9987 \pm 0.0003$	sulfate-reducing	$-1.3 \pm 0.1$	(Meckenstock et al., 2003)
<i>m</i> -Xylene	$0.9985 \pm$	sulfate-reducing	$-1.5 \pm$	(Meckenstock et al., 2003)
<b>PAHs</b>				
Naphthalene	$0.9989 \pm 0.0004$	sulfate-reducing	$-1.1 \pm 0.4$	this study

Figure 1, Griebler et al.



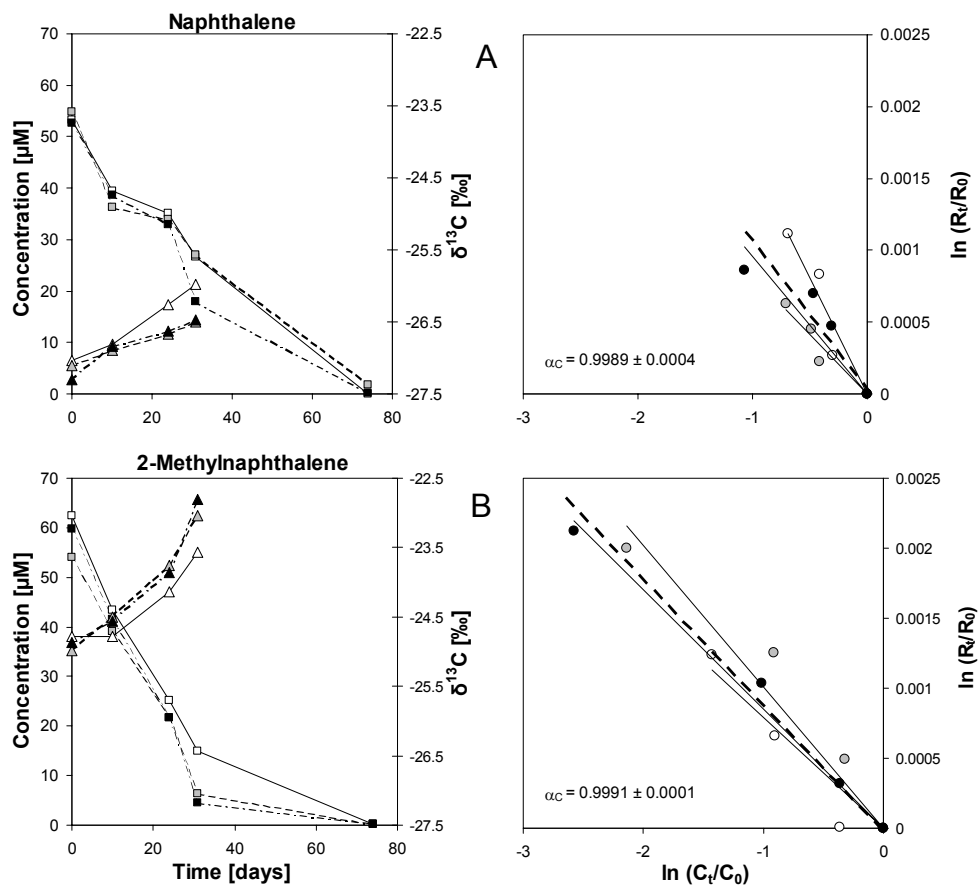


Figure 2, Griebler et al.

# BTEX

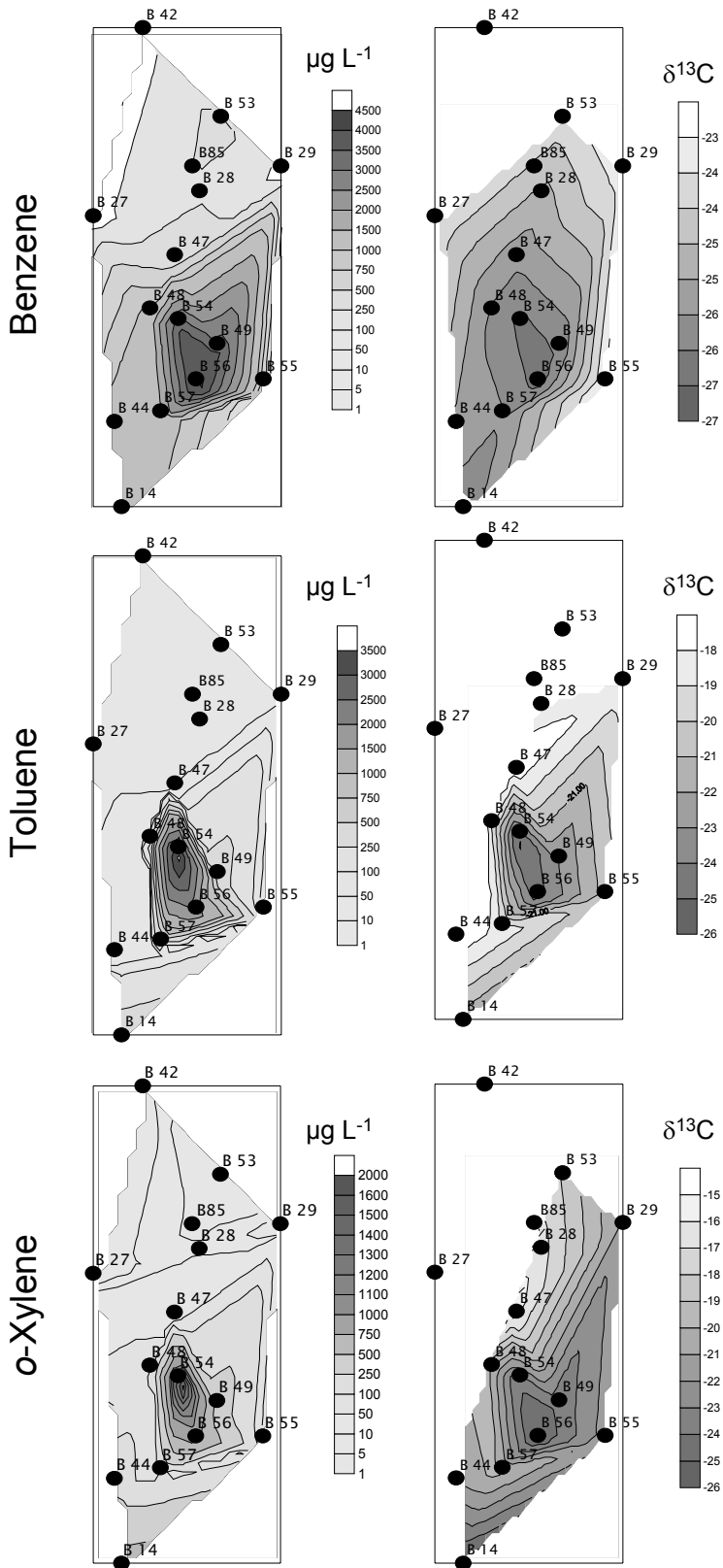


Figure 3, Griebler et al.



# PAH

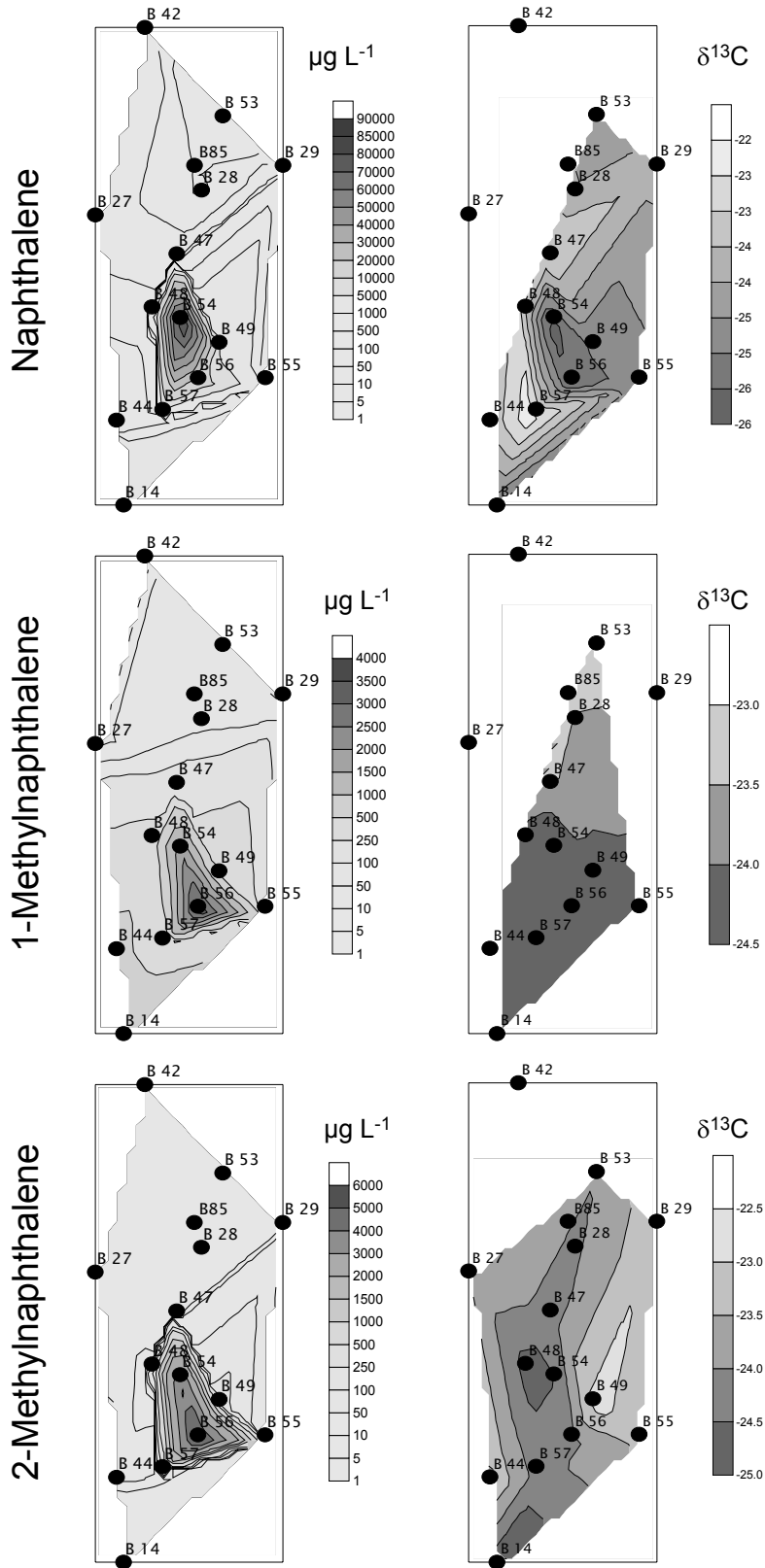


Figure 4, Griebler et al.

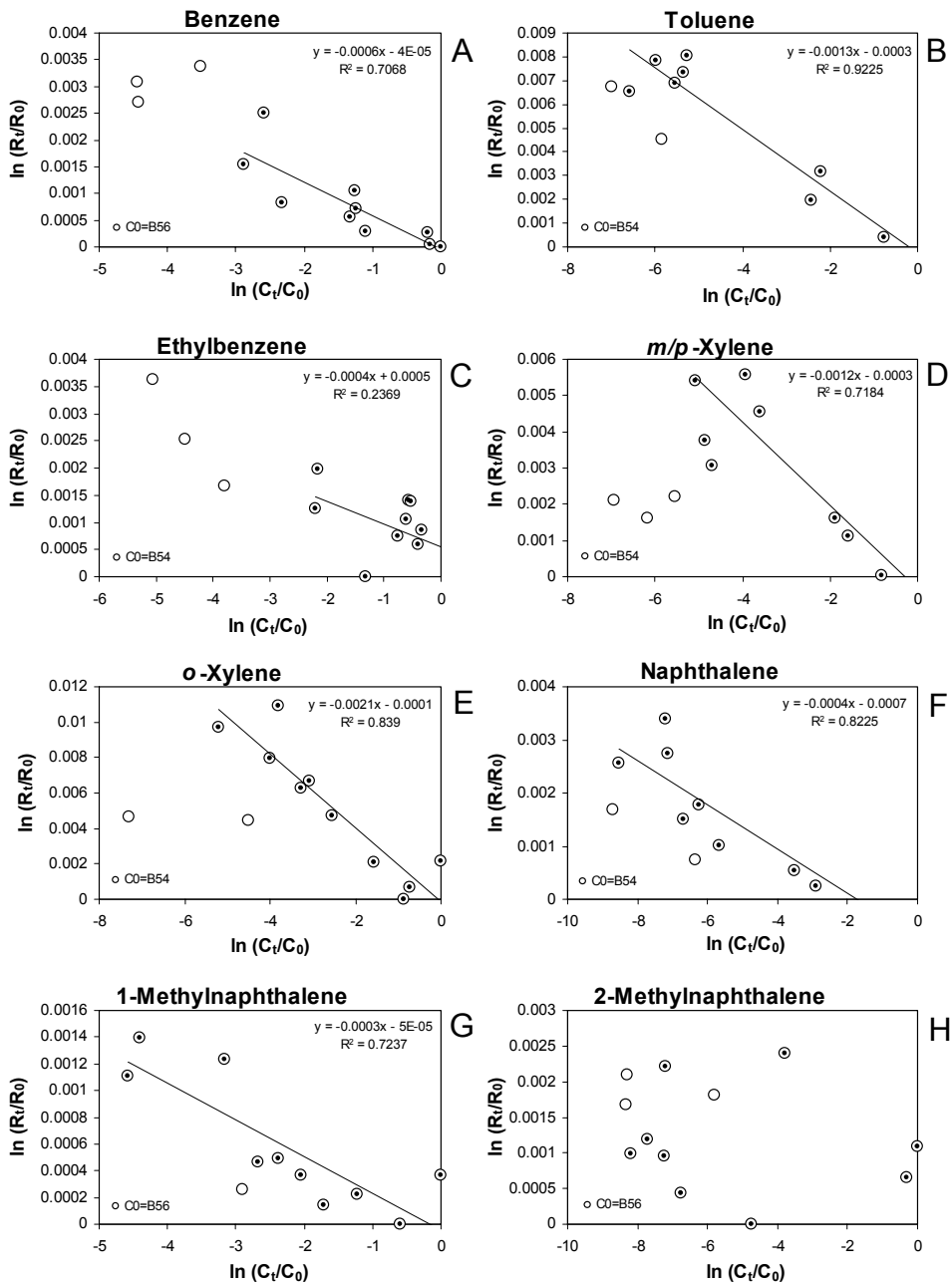


Figure 5, Griebler et al.

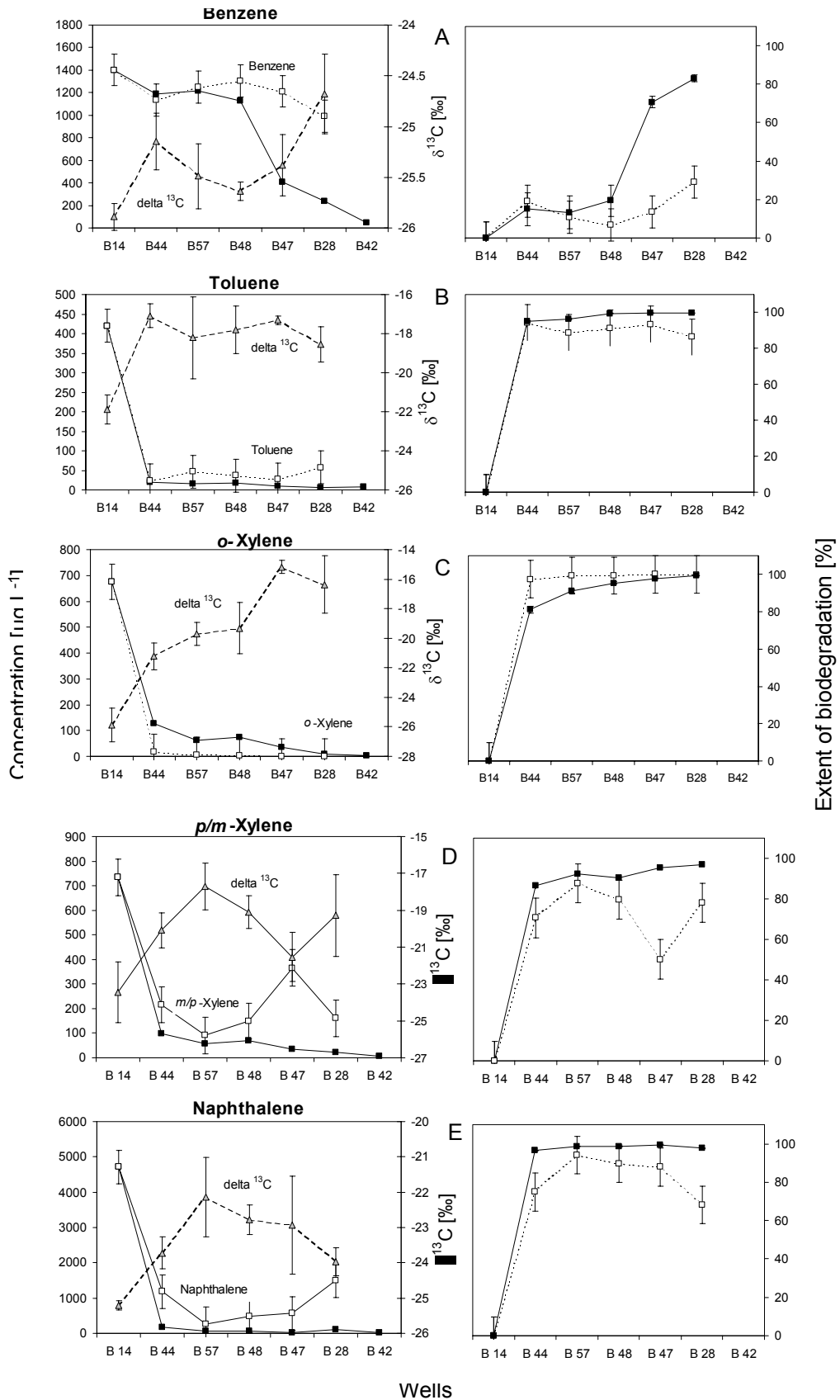


Figure 6, Griebler et al.

## ISOTOPE FRACTIONATION PROCESSES USED TO CHARACTERISE NATURAL ATTENUATION OF ORGANIC CONTAMINANTS

Vieth A.\*<sup>1</sup>, Fischer, A.<sup>1</sup>, Kästner M.<sup>1</sup>, Gehre M.<sup>1</sup>, Knoeller, K.<sup>1</sup>, Wachter, T.<sup>2</sup>, Dahmke, A.<sup>2</sup>, Richnow, H.H.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UFZ Centre for Environmental Research Leipzig-Halle, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Germany

<sup>2</sup>Christian-Albrechts-University of Kiel, Institute for Geosciences, Ludewig-Meyn-Str. 10, 24098 Kiel, Germany

\*vieth@san.ufz.de

### Introduction

In-situ biodegradation is a major sink of organic contaminants in polluted aquifers and thus, its assessment is very important in groundwater monitoring. Today, in-situ biodegradation is assessed by monitoring the decrease in concentration of the contaminants in time series. However, a decrease of contaminant concentration in a plume could have many reasons like dilution, sorption or biological degradation, but only the latter mentioned leads to a sustainable contaminant reduction.

Moreover, in the context of economically reasonable remediation strategies, monitored natural attenuation has gained importance. When considering natural attenuation as a reliable remediation strategy, the assessment of in-situ degradation is the key factor to demonstrate the feasibility of this concept. Thus, innovative approaches have to be developed to monitor processes governing the fate of contaminants in the aquifer.

Biodegradation of organic pollutants such as aromatic hydrocarbons and chlorinated ethenes leads to an enrichment of <sup>13</sup>C in the residual fraction [1-3]. Dilution and volatilization processes [4], as well as sorption [5], are unlikely to induce significant isotope fractionation under field conditions. To characterize in-situ biodegradation, a concept based on the isotope fractionation of organic contaminants during biodegradation had been developed [1, 6] and was tested in several field studies [7-10].

Besides knowledge of microbial degradation processes that caused a decrease of contaminant concentration, it is of further importance to assess the biogeochemical processes such as sulfate-reduction, methanogenesis, and methane oxidation that affect biodegradation at the contaminated site. To provide qualitative evidence of microbially mediated sulfate-reduction, methanogenesis and methane oxidation isotope analysis can be employed. Microbially mediated sulfate-reduction [11] as well as methanogenesis [12] and methane oxidation [13] are associated with isotope fractionation.

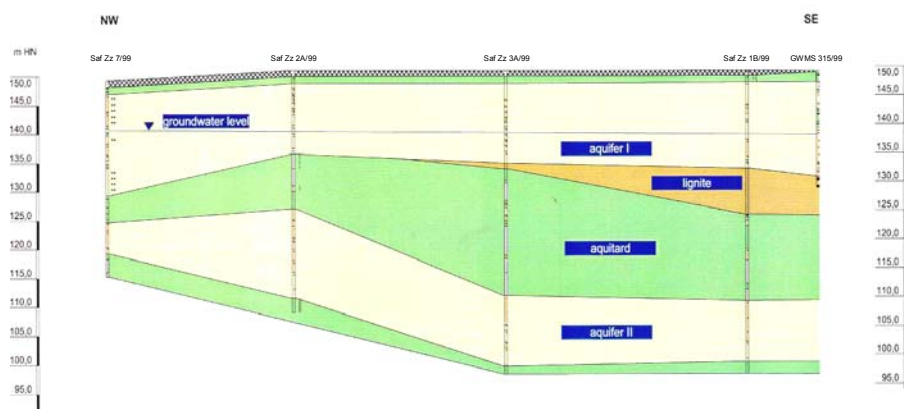
In this report we analyse isotope fractionation processes to evaluate the natural attenuation potential at a BTEX-contaminated site using carbon isotope ratios of the BTEX and methane as well as sulfur isotope ratios of the sulfate in an integrated approach.

### Material and Methods

**Field site** – The aquifer is located in the area of a former hydrogenation plant in Zeitz (Sachsen-Anhalt, Germany) and represents a massive contamination resulting from benzene production. The site is characterized by two aquifers, separated by silt and clay and partly by a lignite seam (fig. 1). The upper aquifer is a 5 to 10 m layer of sandy deposits of Tertiary and Quaternary age. The groundwater table is situated 8 to 10 m below surface. The lower aquifer is composed of gravel deposited by an Eocene river. Both aquifers are partly connected hydraulically. The general groundwater flow is directed towards North and North-East. The groundwater flow velocity averages to about 2 m d<sup>-1</sup>.

The source area of the BTEX-plume is located in the area of the former benzene storage tanks and distillation facilities. The concentrations of BTEX in groundwater of the upper aquifer were up to 850 mg l<sup>-1</sup> benzene, 50 mg l<sup>-1</sup> toluene, and a few mg l<sup>-1</sup> ethylbenzene and xylenes.

The BTEX-concentrations in the aquifer of Tertiary age are considerably lower ( $100 \text{ mg l}^{-1}$ ), and benzene is again the predominant pollutant.



**fig. 1** scheme of the hydrogeological situation at the site of the former hydrogenation plant (Zeitz, Germany)

Geochemistry of this site implies that sulfate-reduction is the major redox-process whereas nitrate reduction, iron-III-reduction and aerobic respiration seem to be of lower importance for BTEX-degradation. Additionally, methanogenesis may contribute to BTEX-degradation.

**Sampling** – Water samples were taken using submersible electrical pumps (Grundfos MP1) in May 2002. The wells had an inner diameter of 15 cm and were filtered throughout the whole upper aquifer. For the integrated sampling of groundwater at least two well volumes of water were removed before samples were taken. Concentrations of dissolved oxygen, temperature, pH, redox-potential and conductivity were determined immediately at the site using the appropriate electrodes (Oxi 325, LF 325, pH 330, pH 196T; WTW, Germany).

**BTEX concentration analysis** – Samples for BTEX concentration analysis were collected in 500 ml glass bottles and stored at  $4^\circ\text{C}$ . Concentrations of BTEX were determined within 24 hours after sampling by using a HP 19 395A-headspace autosampler (Agilent Technology, USA) in line with a HP 5890 series II gas chromatograph (Agilent Technology, USA) equipped with a flame ionization detector. Within the headspace autosampler, sample vials were tempered at  $80^\circ\text{C}$  for at least 40 min for equilibration. After that, the headspace sample was transferred into the injector, held at  $220^\circ\text{C}$  in split-mode. To separate the different BTEX-compounds a HP-1 column (50 m x 0.32 mm x 1.0  $\mu\text{m}$ , Agilent Technology, USA) was used. m- and p-xylene could not be separated chromatographically and the concentrations are given as sum of both compounds. The temperature program started at  $50^\circ\text{C}$ , held for 1 min, increased with  $5^\circ\text{C min}^{-1}$  to  $120^\circ\text{C}$  and held for 8 min isothermally. Then the column was heated with  $8^\circ\text{C min}^{-1}$  to  $130^\circ\text{C}$  and then to a final temperature of  $250^\circ\text{C}$  with a rate of  $10^\circ\text{C min}^{-1}$ . Nitrogen was used as the carrier gas. The detection limit of this GC-analysis was  $5 \mu\text{g l}^{-1}$ .

**BTEX isotope analysis** - For isotope analysis, glass flasks sealed with Teflon-lined caps were filled without headspace to avoid evaporation. The water samples were adjusted to pH 10 to 12 using NaOH pellets to decrease biological activity. The flasks were stored at  $4^\circ\text{C}$  until the extraction with *n*-pentane at least 2 days after sampling. Solvent extraction is unlikely to affect the isotope composition of the organic compound [14]. The carbon isotope composition of BTEX was measured with a GC-C-IRMS (gas chromatography/combustion/isotope-ratio mass spectrometry) system (FINNIGAN MAT, Bremen, Germany). The GC-C-IRMS system consisted of a GC unit (6890 Series, Agilent Technology, USA) connected to a FINNIGAN MAT GC III combustion device with a modified water removal assembly (Nafion<sup>®</sup> membrane, 50 cm long,  $T = 0^\circ\text{C}$ ) coupled via open split to a FINNIGAN MAT 252 mass spectrometer. Organic substances in the GC effluent stream were oxidized to  $\text{CO}_2$  in the combustion furnace held at  $940^\circ\text{C}$  on a CuO/Ni/Pt catalyst and were transferred on-line to the mass spectrometer to determine  $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$  ratios. Aliquots (0.5 to 4  $\mu\text{l}$ ) of *n*-pentane extracts were injected using a split/splitless injector held at  $250^\circ\text{C}$  and separated on a capillary column (ZB1 60 m x

0.32 mm, 1 µm film, Phenomenex Inc. Torrance, USA). M- and p-xylene could not be separated chromatographically and the isotope ratios of both compounds are given as mixture. The temperature program started at 40°C held for 3 min isothermally and then increased with a rate of 4 °C min<sup>-1</sup> to 100°C, held for 5 min. Then the temperature was risen with 4°C min<sup>-1</sup> to 120°C. Finally, the temperature increased by 20°C min<sup>-1</sup> to 200°C. Helium, set to a flow rate of 2 ml min<sup>-1</sup> was used as carrier gas. All samples were measured at least in 5 replicates.

The linearity and precision of the mass spectrometer was checked with the reference gas (CO<sub>2</sub>) and toluene. Systematic analytical error due to non-linearity of the instrument is 0.1 δ-units per decade in the signal internal between 45 and 3500 mV [9].

**Sulfate concentration analysis** – Groundwater samples were filtered immediately through 0.45 µm cellulose-acetate-filters in the field and the filtrate was filled into 20 ml PE-vials. Samples were stored at 4°C. Concentrations of sulfate were determined by using an IC-system (ion-chromatography) Dx-500 equipped with an AS40-autosampler and Ion Pac AS14 analytical column (Dionex, Germany). 3.5 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and 1 mM NaHCO<sub>3</sub> were used as eluent with a flow rate of 1.2 ml min<sup>-1</sup>.

**Sulfate isotope analysis** – Samples for isotopic analysis of sulfate were taken in 500 ml PE-bottles. Water samples were mixed with 2 ml chloroform to inhibit biological activity. Sulfide was precipitated with 0.5 g of zinc acetate to form zinc sulfides. Sulfate was precipitated with a saturated barium hydroxide solution. The solution was acidified with 5 ml 3N HCl, heated to boiling for 1 hour and allowed to cool. The barium sulfate was filtered, washed neutral, and dried at 105°C.

Sulfur isotope ratios of the bariumsulfate were determined by using an IRM-system (delta S, Finnigan MAT) equipped with an elemental analyzer in continuous-flow technique (Carlo Erba, Italy). Oxygen was used within the silica reactor of the elemental analyzer at a reactor-temperature of 1020°C to transform bariumsulfate to sulfur dioxide. Helium was used as carrier gas. Standard error of this method was 0.15 ‰.

**Methane concentration analysis** – 5 ml groundwater were transferred into 20 ml headspace vials which were closed with gastight Teflon septa and aluminium caps. Concentrations of methane were measured with a GC-FID-system consisting of HP 7694 headspace sampler (Agilent Technologie, USA) connected to a HP 6890 Plus (Agilent Technologie, USA). For chromatographic separation an AT-Q 13939 column (30 m x 0.53 mm ID, Alltech Associates, USA) was used. Vials were equilibrated at 80°C for 30 min. Then headspace samples were transferred to the split/splitless-injector, held at 230°C. GC oven was set to 35°C for 4 min. Then the temperature increased by 40°C min<sup>-1</sup> to 220°C and kept constant for 5 min.

**Methane isotope analysis** - Samples for isotopic analysis of methane were taken in 200 ml glass bottles supplemented with 10 g of NaCl to increase the partitioning of the methane into the headspace. Bottles were immediately capped with butylrubber stoppers and crimp caps. Samples were stored at 4°C. Carbon isotope ratios of the methane were determined using the IRM-GC/MS-system described above. Headspace samples were injected using a split/splitless injector held at 200°C and separated on a CP-PoraPLOT Q capillary column (27.5 m x 0.32 mm x 10 µm, Chrompack, Netherlands). Temperature of the GC-oven was adjusted to 40 °C. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1.8 ml min<sup>-1</sup>. Headspace analysis was proven to have only minor effect on the isotope composition of the analytes [4, 14, 15]. All samples were measured at least in 5 replicates.

**Chemicals** - All chemicals and organic solvents were obtained in reagent quality from Merck (Germany).

**Calculations** - The carbon isotope composition is reported in δ-notation (per mill) relative to Vienna Pee Dee Belemnite standard (V-PDB) [16] according to equation 1.

equation 1

$$\delta_t^{13}C [\text{‰}] = \left( \frac{(^{13}C/^{12}C)_{\text{Sample}}}{(^{13}C/^{12}C)_{\text{Standard}}} - 1 \right) \cdot 1000$$

In analogy, the sulfur isotope composition is reported in δ-notation (per mill) relative to Vienna Canyon Diabolo Troylite (V-CDT) [17].

Isotope fractionation associated with microbially mediated degradation of BTEX can be described by the Rayleigh-equation (equation 2) [18].

$$\text{equation 2} \quad \frac{R_t}{R_0} = \left( \frac{C_t}{C_0} \right)^{\left( \frac{1}{\alpha} - 1 \right)}$$

$R_t$  and  $R_0$  give the isotope composition of the contaminant at time  $t$  and zero,  $C_t$  and  $C_0$  represent the concentration of the compound at time  $t$  and zero, respectively. The isotope fractionation factor  $\alpha$  relates the change in the isotope composition to changes in concentration of the residual fraction during the transformation.

The percentage of biodegradation ( $B$ ) of the residual substrate fraction is an index to describe the progress of a reaction by applying the isotope fractionation factor ( $\alpha$ ) and the isotope composition of a substrate at the beginning of the reaction ( $R_0$ ) and the change in the isotope composition during the transformation reaction (equation 3).

$$\text{equation 3} \quad B[\%] = \left[ 1 - \left( \frac{R_t}{R_0} \right)^{\left( \frac{1}{\alpha} - 1 \right)} \right] \times 100$$

The concentration of the remaining substrate fraction ( $C_t$ ) can be calculated using the isotope fractionation factor ( $\alpha$ ), the concentration at the beginning of the transformation process ( $C_0$ ) and the change in the isotopic composition during the reaction (equation 4).

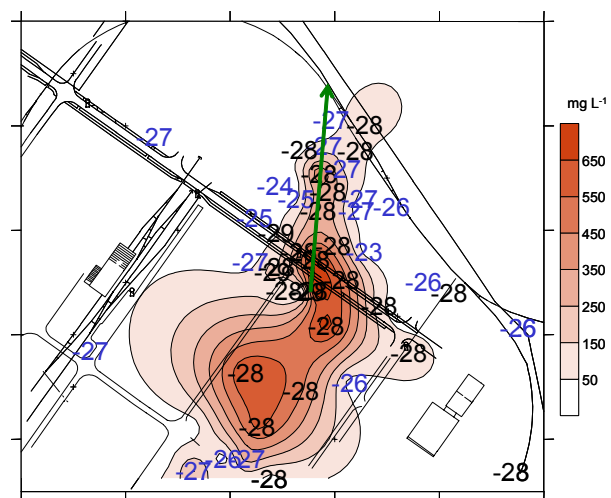
$$\text{equation 4} \quad C_t = C_0 \times \left( \frac{R_t}{R_0} \right)^{\left( \frac{1}{\alpha} - 1 \right)}$$

These calculations are based on the changes of concentrations and the carbon isotope ratios over time. In a contaminant plume, the concentration and the carbon isotope ratio of the contaminants vary over time according to the retention time of the contaminant along the water flow path. Thus, the Rayleigh-equation can be used to describe the in-situ biodegradation at a contaminated site when (I) the source area of the plume is homogeneous, (II) the leachate of the source is constant in concentration and (III) carbon isotope ratio and the water flow path is known.

## Results and Discussion

Concentration and carbon isotopic signatures of benzene were measured in groundwater samples from more than 40 monitoring wells placed in the upper aquifer. In these samples the benzene concentrations were in a range between 746 mg L<sup>-1</sup> and the detection limit (5 µg L<sup>-1</sup>). In the centre of the plume the carbon isotope ratios were about -28 ‰. However, at the margins of the plume the isotopic signature of benzene was enriched in <sup>13</sup>C, indicated by isotope ratios of -23 ‰ (fig. 2). This enrichment in <sup>13</sup>C suggested microbial in-situ degradation of benzene at the margins of the plume.

For detailed analysis, a monitoring profile was chosen that consisted of 9 wells (wells A



**fig. 2:** carbon isotope ratios (in ‰ V-PDB) and concentrations (contour plot, mg l<sup>-1</sup>) of benzene in groundwater of the monitoring campaign (May 2002)

to I). The position of the profile is indicated by an arrow in fig. 2. The profile stretches from the centre of the plume, where the highest concentrations of benzene and toluene were determined, downgradient the water flowpath. Monitoring wells H and I, however, are already located at the fringe of the plume, where BTEX concentrations decreased to the detection limit (table 1).

Along the monitoring profile, up to well F, benzene concentration decreased from 746 mg l<sup>-1</sup> to 461 mg l<sup>-1</sup> whereas the carbon isotope ratios remained relatively stable (table 1). The  $\delta$ -values ranged from -28.4 ‰ to -27.5 ‰. This profile represents the centre of the benzene plume where the decrease in concentration was not correlated to an enrichment of <sup>13</sup>C in the residual benzene. Variation in concentrations of benzene in the groundwater at well A to F probably was caused by dilution or sorption which did not affect isotope composition to a relevant extent. Wells G and H show low concentrations of benzene and a slight enrichment of <sup>13</sup>C in the residual fraction. Thus, indication of benzene biodegradation by the means of isotope analysis can be obtained only along the last part of the profile.

**table 1** concentrations and carbon isotope ratios with standard deviation (std-dev) of benzene, ethylbenzene and m/p-xylene along the monitoring profile (n.d. not detectable)

well	distance (m)	benzene (mg l <sup>-1</sup> )	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	std-dev	ethylbenzene ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	std-dev	m/p-xylene ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	std-dev
A	0	746	-27.5	0.1	1400	-24.9	0.3	1400	-25.4	0.3
B	30	701	-28.1	0.1	2950	-24.9	0.3	2690	-25.0	0.2
C	38	320	-28.4	0.2	4600	-25.6	0.2	4200	-25.1	0.1
D	77	322	-28.0	0.2	1800	-26.4	0.3	1200	-25.0	0.1
E	96	318	-28.0	0.2	1200	-26.2	0.3	130	-25.1	0.4
F	112	460	-28.3	0.4	1200	-25.9	0.3	350	-24.9	0.6
G	140	63,6	-27.1	0.4	27	-23.6	0.5	3	n.d.	
H	165	0,017	-26.7	0.2	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.	
I	204	n.d.	n.d.		n.d.	n.d.		n.d.	n.d.	

The ethylbenzene concentration increased from 1400  $\mu\text{g l}^{-1}$  to 4600  $\mu\text{g l}^{-1}$  on the water flow path between the monitoring wells A to C (table 1). Further downstream the concentration decreased to the detection limit. The increase in ethylbenzene concentration (wells A to C) is associated with a small depletion of <sup>13</sup>C in the residual fraction of 0.7  $\delta$ -units, which is in the range of the analytical uncertainty. The carbon isotope ratio of ethylbenzene measured in groundwater of well D was -26.4 ‰. Further downstream carbon isotope ratios showed a small enrichment to -23.6 ‰ at well H. Along this monitoring profile no continuous increase in carbon isotope ratios was found. Isotopic signatures of ethylbenzene measured in groundwater of wells A to C were slightly higher than the isotope ratios determined for wells D to F, with exception of well G (-23.6 ‰), where low concentrations seem to be a result of in-situ biodegradation. The difference in isotope ratios of ethylbenzene in wells A to C and wells D to G may suggest that ethylbenzene originated from slightly different sources with respect to isotope composition, which is not unlikely in a massive groundwater contamination. This may demonstrate that the assessment of in-situ biodegradation should be related to a shift in the isotope composition of the contaminants that clearly exceeds the variation of isotope composition in the source area.

The concentration of m/p-xylene was 1400  $\mu\text{g l}^{-1}$  at the first well of the profile. The concentration increased to 4200  $\mu\text{g l}^{-1}$  at well C and then decreased to 3  $\mu\text{g l}^{-1}$  at well G. The carbon isotope ratios of m/p-xylene remained relatively stable at about -25.1 ‰. This isotope ratio is an average of the individual signatures of m- and p-xylene. Thus the interpretation of the fate of these xylene isomers is difficult by the means of carbon isotope ratios. It is known that the different xylene isomers can be degraded anaerobically, but with different biodegradation rate constants [19]. M-xylene is supposed to be degraded with a higher rate than p-xylene. Thus, the proportion of both isomers may change along the monitoring profile and the carbon isotope ratio, measured for m/p-xylene mixture, will be dominated by the less degraded isomer resulting in an underestimation of the in-situ degradation of the xylene isomers. Additionally, aerobic degradation experiments of m- and p-xylene individually by *Pseudomonas putida* mt-2 revealed different isotope fractionation factors [20]. This may imply that degradation of the xylenes under anaerobic conditions could result as well in different isotope fractionation factors. Taking into account both, different biodegradation rates and different isotope fractionation factors, use of isotope signatures for quantitative approaches is difficult. In the future, a



chromatographic separation of these compounds will be essential to investigate the in-situ biodegradation of individual isomers.

In monitoring wells A to C toluene concentrations of 36.6 mg l<sup>-1</sup> to 47.1 mg l<sup>-1</sup> were measured. At well D the concentration is strongly decreased to 3.2 mg l<sup>-1</sup> and remained near the detection limit in wells E to G. The carbon isotope ratios of toluene at wells A, B, and C were -25.7 ‰, -26.2 ‰, and -25.8 ‰, respectively. With decrease in concentration an enrichment of <sup>13</sup>C was observed in the residual toluene fraction leading to δ-values of -24.9 ‰, -24.4 ‰ and -16.6 ‰ of wells D, E, and F, respectively. The source area of toluene was characterized by an isotope composition of about -26.2 ‰. This value was applied to calculate percentage of biodegradation using equation 3 and served as R<sub>0</sub>. The isotope fractionation factor of α = 1.0017 represented the isotopic shift in toluene associated with anaerobic biodegradation [1]. From well B the percentage of biodegradation increased to 56 %, 66 %, and 99 % along the monitoring profile. With the assumption that toluene concentration (46.6 mg l<sup>-1</sup>) in the groundwater at well B represents the source area, theoretical concentrations were calculated for the monitoring wells further downstream (fig. 3). At well F calculated and measured concentrations seem to fall in the same range and suggested that in-situ biodegradation is a major sink for toluene. However, the difference in calculated and measured concentrations along the monitoring profile indicate that in addition to in-situ biodegradation decrease in toluene may be a result of sorption and dilution.

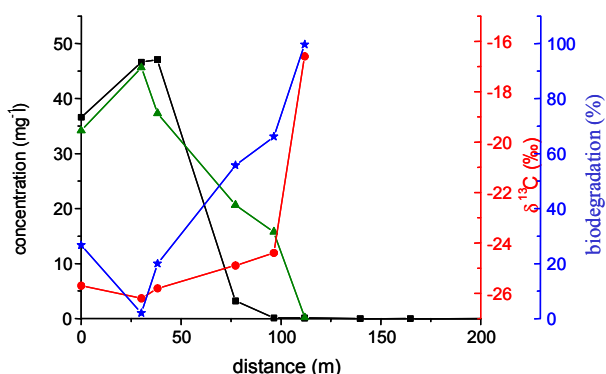


fig. 3 concentration (black squares) and isotope composition (red circles) of toluene along the profile; percentage of biodegradation (blue stars) and theoretical concentrations (green triangles) were calculated based on carbon isotope ratios using the fractionation factor of α = 1.0017 [1]

### Sulfate

Sulfate serves as terminal electron acceptor in BTEX-degradation under anaerobic conditions. At the site background concentrations of sulfate were about 1 g l<sup>-1</sup>. Within the BTEX-plume, sulfate decreased to below 100 mg l<sup>-1</sup> (fig. 4). Microbial sulfate reduction is associated with an enrichment of the heavier <sup>34</sup>S-isotope in the residual sulfate fraction [11]. Thus, an increase in sulfur isotope ratios indicates microbial sulfate reduction. Along the monitoring profile δ <sup>34</sup>S-values of sulfate were measured (fig. 5). Within the

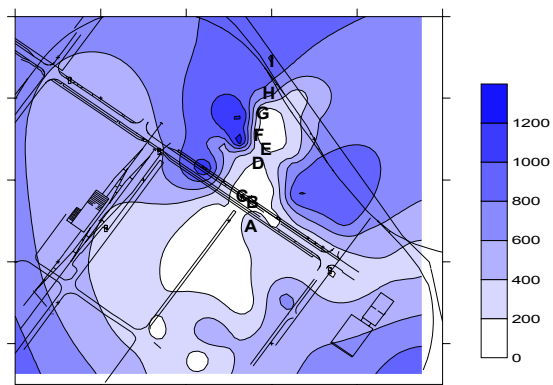


fig. 4 sulfate concentrations (mg l<sup>-1</sup>) in groundwater of the upper aquifer (May 2002)

central parts of the BTEX-plume, concentrations of sulfate varied between 20 mg l<sup>-1</sup> and 363 mg l<sup>-1</sup>. At

the fringe of the plume, the sulfate concentration increased to 1023 mg l<sup>-1</sup>. This corresponds to the background concentration of sulfate at this site.

Within the BTEX-plume the <sup>34</sup>S values of the sulfate became enriched from 12 ‰ to 45 ‰. The δ <sup>34</sup>S-values of sulfate in samples from wells H and I were about 6 ‰ to 10 ‰. Sulfate in groundwater of one monitoring well located upstream of the BTEX-plume showed a sulfur isotope ratio of 7 ‰, characterizing the pristine groundwater in this area. The enrichment

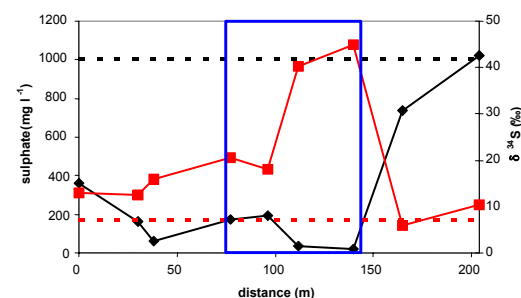
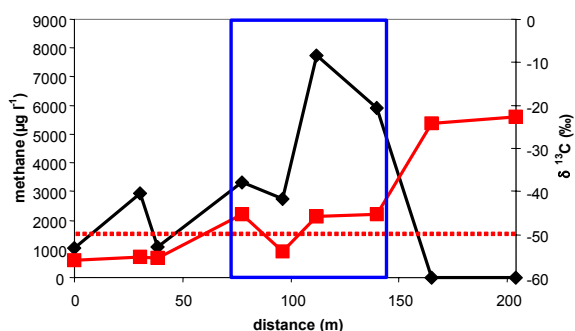


fig. 5 sulfate concentrations (black diamonds) and isotope composition (red squares) occurring along the profile; concentration (black dashed line) and isotope ratio (red dashed line) of sulfate upstream the plume; blue rectangle represents zone of toluene degradation

biodegradation is correlated with the area of sulfate-reduction (fig. 5).

Along the monitoring profile methane concentrations increased from  $1 \text{ mg l}^{-1}$  to  $7.7 \text{ mg l}^{-1}$  in well F. Groundwater from wells H and I show very low methane concentrations of  $15 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$  (fig. 6). Samples from wells A to F showed carbon isotope ratios of methane between  $-56 \text{ ‰}$  and  $-45 \text{ ‰}$ . Carbon isotope ratios of biogenic methane fall in a range of  $-110 \text{ ‰}$  to  $-50 \text{ ‰}$  [21] and suggest that formation of methane in the plume is caused by microbial methanogenesis. Our results suggested that in-situ biodegradation of toluene, sulfate reduction and methanogenesis will be relevant processes within the same part of this BTEX-plume.

At monitoring wells H and I, low methane concentrations and strongly enriched carbon isotope ratios of methane were measured. Decrease in methane concentration is probably a result of methane oxidation which is associated with an enrichment of  $^{13}\text{C}$  in the residual methane fraction [13] at the fringe of the plume. The oxidation of methane may consume terminal electron acceptors such as oxygen, nitrate, iron(III) or even sulfate [22, 23]. Thus, in marginal parts of this plume microbial processes responsible for methane oxidation and BTEX-degradation may compete for electron acceptors.



**fig. 6** methane concentrations (black diamonds) and  $\delta^{13}\text{C}$  (red squares) along the monitoring profile; biogenic methane isotope ratios are more depleted than  $-50 \text{ ‰}$  [21] (red dashed line); blue rectangle gives zone of toluene degradation

## Summary and Conclusion

This report described the various aspects of isotope analysis to characterize in-situ biodegradation. Isotope fractionation may be well suited to evaluate the biodegradation in contaminated aquifers. The percentage of biodegradation shows the zone of biodegradation and serves as a semi-quantitative index. This index is independent of the groundwater flow and dilution or adsorption because it is solely based on isotope values which are altered during in-situ biodegradation. Other sinks may also have contributed to the reduction of the contaminant concentrations but they did not affect the isotope ratios and thus had no effect calculating the percentage of biodegradation [1]. This index may be used as an indicator of the intensity of biological degradation processes in distinct zones of an aquifer.

The theoretical concentration of the residual substrate fraction was quantified, assuming that (I) all monitoring wells were located directly downstream of the source of contamination, and (II) dilution and adsorption did not effect the concentrations to a major extent. When the source concentration ( $C_0$ ) is representative for the groundwater flowpath, the concentration of the residual fraction ( $C_t$ ) can be calculated for monitoring wells further downstream.

Additionally, sulfur isotope ratios of sulfate and carbon isotope ratios of methane in groundwater can be used to evaluate processes like sulfate-reduction, methanogenesis, and methane oxidation, qualitatively. This approach may provide further evidence for microbial in-situ biodegradation of organic contaminants.

In the context of natural attenuation, the stable isotope chemistry may be used to characterize in-situ biodegradation. This concept may have a large potential to improve groundwater remediation strategies.

## Acknowledgement

The project was financially supported by the German Ministry of Education, Science, Research and Technology (BMBF) grant 02WT0041.

## References

1. Meckenstock, R.U., Morasch, B., Warthmann, R., Schink, B., Annweiler, E., Michaelis, W., Richnow, H.H. (1999):  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  isotope fractionation of aromatic hydrocarbons during microbial degradation. *Environ. Microbiol.* **1**, 409-414
2. Hunkeler, D., Aravena, R., Butler, B.J. (1999): Monitoring microbial dechlorination of tetrachloroethene (PCE) in groundwater using compound-specific stable carbon isotope ratios: microcosm and field studies. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 2733-2738
3. Bloom, Y., Aravena, R., Hunkeler, D., Edward, E., Frapet, S.K. (2000): Carbon isotope fractionation during microbial dechlorination of trichloroethene, cis-1,2-dichloroethene, and vinyl chloride: implications for assessment of natural attenuation. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 2768-2772
4. Slater, G.F.; Dempster, H.S.; Lollar, B.S.; Ahad, J. (1999): Headspace analysis: a new application for isotopic characterization of dissolved organic contaminants. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 190-194
5. Slater, G.F., Ahad, J.M.E., Sherwood Lollar, B., Allen-King, R., Sleep, B. (2000) Carbon isotope effects resulting from equilibrium sorption of dissolved VOCs. *Anal. Chem.* **72**, 5669-5672
6. Richnow, H.H., Meckenstock, R.U. (1999): Isotopen-geochemisches Konzept zur In-situ-Erfassung des biologischen Abbaus in kontaminiertem Grundwasser. *TerraTech* **5**, 38-41
7. Vieth, A., Kästner, M., Morasch, B., Meckenstock, R.U., Richnow, H.H. (2001): Charakterisierung des biologischen Abbaus von BTEX im Grundwasser über Isotopenfraktionierung – Feldstudien; *TerraTech* **5**, 37-41
8. Meckenstock, R.U., Morasch, B., Kästner, M., Vieth, A., Richnow, H.H. (2002): Assessment of bacterial degradation of aromatic hydrocarbons in the environment by analysis of stable carbon isotope fractionation. *Water, Air, Soil Pollut.: Focus* **2**: 141-152
9. Richnow, H.H., Meckenstock, R.U., Ask, L., Baun, A., Ledin, A., Christensen, T.H. (2003): In situ biodegradation determined by carbon isotope fractionation of aromatic hydrocarbons in an anaerobic landfill leachate plume (Vejen, Denmark). *J. Contam. Hydrol.*, in press
10. Vieth, A., Müller, J., Strauch, G., Kästner, M., Gehre, M., Meckenstock, R.U., Richnow, H.H. (2003): Characterisation of in-situ biodegradation of tetrachloroethene (PCE) and trichloroethene (TCE) in contaminated aquifers monitored by stable isotope fractionation; *Isot. Environ. Health Stud.*, submitted
11. Bottrell, S.H., Hayes, P.J., Bannon, M., Williams, G.M. (1995): Bacterial sulphate reduction and pyrite formation in a polluted sand aquifer. *Geomicrobiol. J.* **13**, 75-90
12. Krzycki, J.A., Kenealy, W.R., DeNiro, M.J., Zeikus, J.G. (1987): Stable isotope fractionation by *Methanosarcina barkeri* during methanogenesis from acetate, methanol, or carbon dioxide-hydrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2597-2599
13. Whiticar, M.J., Faber, E. (1986): Methane oxidation in sediment and water column environments – isotope evidence. *Adv. Org. Geochem.* **10**, 759-768
14. Dempster, H.S., Lollar, B.S., Feenstra, S. (1997): Tracing organic contaminants in groundwater: a new methodology using compound-specific isotopic analysis. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 3193–3197
15. Hunkeler, D., Andersen, N., Aravena, R., Bernasconi, S.M., Butler, B.J. (2001): Hydrogen and carbon isotope fractionation during aerobic biodegradation of benzene. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 3462-3467
16. Anonymous, (1995): IAEA-TECHDOC-825, International Atomic Energy Agency, Vienna
17. Jensen, M.L., Nakai, N. (1962): Sulfur isotope meteorite standards, results and recommendations. In: Jensen, ML (ed.) Biogeochemistry of sulfur isotopes. NSF Symp Vol p.31
18. Hoefs, J. (1997): Stable isotope geochemistry. Springer-Verlag, Berlin
19. Wiedemeier, T.H., Rifai, H.S., Newell, C.J., Wilson, J.T. (1999): Natural attenuation of fuels and chlorinated solvents in the subsurface. John Wiley & Sons, Inc, New York
20. Morasch, B., Richnow, H.H., Schink, B., Vieth, A., Meckenstock, R.U. (2002): Carbon and hydrogen stable isotope fractionation during aerobic bacterial degradation of aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5191-5194
21. Whiticar, M.J. (1999): Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chem. Geol.* **161**, 291-314
22. Valentine, D.L. (2002): Biogeochemistry and microbial ecology of methane oxidation in anoxic environments: a review. *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **81**, 271-282
23. Grossman, E.L., Cifuentes, L.A., Cozzarelli, I.M. (2002): Anaerobic methane oxidation in a landfill-leachate plume. *Env. Sci. Technol.* **36**, 2436-2442

1 In-situ biodegradation of benzene and toluene in a contaminated aquifer monitored by stable  
2 isotope fractionation

3

4 Andrea Vieth<sup>1</sup>, Matthias Kästner<sup>1</sup>, Mario Schirmer<sup>2</sup>, Holger Weiß<sup>3</sup>, Stefan Gödeke<sup>3</sup>, Rainer  
5 U. Meckenstock<sup>4</sup>, Hans H. Richnow<sup>1\*</sup>

6

7 <sup>1,3</sup>UFZ-Centre for Environmental Research Leipzig-Halle, <sup>1</sup>Department of Remediation  
8 Research; <sup>3</sup>Interdisciplinary Department of Industrial and Mining Landscapes, Permoserstr.  
9 15, 04318 Leipzig, Germany

10 <sup>2</sup>UFZ-Centre for Environmental Research Leipzig-Halle, Department of Hydrogeology,  
11 Theodor-Lieser Str. 4, 06120 Halle/Saale

12 <sup>4</sup>Eberhard-Karls University of Tübingen, Center for Applied Geosciences, Wilhelmstr. 56,  
13 72074 Tübingen, Germany

14

15 \*Author for correspondence:

16 Tel: ++49-(0)341-235-2810

17 Fax: ++49-(0)341-235-2492

18 E-mail: richnow@san.ufz.de

19

20 **KEY words:** in situ biodegradation, BTEX, isotope fractionation, natural attenuation

21

## 22 **Abstract**

23 Intrinsic biodegradation of benzene and toluene in a heavily contaminated aquifer at the site  
24 of a former hydrogenation plant was investigated by means of isotope fractionation processes.

25 The carbon isotope compositions of benzene and toluene were monitored in two campaigns  
26 during a time period of 12 months to assess the extent of the in-situ biodegradation and the

27 stability of the plume over time. The spatial distribution of the carbon isotope composition of  
28 benzene suggested that in-situ biodegradation occurred at marginal zones of the plume where

29 concentrations were lower than 30 mg l<sup>-1</sup>. The investigation of the vertical structure of the  
30 benzene plume provided evidence for in-situ degradation processes at the upper and lower

31 fringes of the plume. The Rayleigh-model, applied to calculate the extent of biodegradation  
32 and residual theoretical concentrations of toluene, showed that in-situ biodegradation was a

33 relevant attenuation process. The biodegradation rate constant for toluene was estimated to be  
34  $k = -5.7 \pm 0.5 \mu\text{M d}^{-1}$  on the ground water flow path downstream of the source area. The

1 results show that isotope fractionation can be used to quantify microbial in-situ degradation in  
2 contaminated aquifers and to develop conceptual models for natural attenuation approaches.

### 4 **Introduction**

5 Gasoline components such as benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes (BTEX) belong to  
6 the most widely detected contaminants in aquifers. Leaking gasoline pipes and storage tanks,  
7 accidents, improper filling operations and waste disposal led to wide spread soil and aquifer  
8 pollution. Among the gasoline derived contaminants, benzene is of particular concern because  
9 it has a relative high solubility in water and is a toxic component with carcinogenic potential  
10 (1, 2).

11 Microbial degradation is thought to be the ultimate sink of organic contaminants in the  
12 environment, which explains the interest in the characterisation of in-situ biodegradation in  
13 contaminated aquifers, especially when considering natural attenuation as a remediation  
14 approach (3). Long-term monitoring of concentration gradients along the groundwater flow  
15 path provides information on the stability of the plume, but is of limited value to assess the in-  
16 situ degradation of specific compounds in the aquifer. Physical processes such as dilution,  
17 sorption and volatilisation may also lead to attenuation of pollutants. On the one hand this  
18 implies the demand for methods to assess the in-situ biodegradation but on the other hand  
19 demonstrates the difficulties of the distinct field situations. Mass balances of electron donors  
20 and acceptors, increasing biomass, concentrations of degradation specific metabolites and  
21 laboratory degradation experiments in microcosms with aquifer material may provide  
22 evidence for active in-situ biodegradation (3, 4). Nevertheless these methods do not enable  
23 assessment of the in-situ biodegradation of specific compounds quantitatively.

24 The large demand of electron acceptors for BTEX degradation implies that the dissolved  
25 molecular oxygen is rapidly consumed and anaerobic degradation processes are predominant  
26 in fuel contaminated aquifers (5, 6). A number of studies provide evidence for in-situ  
27 biodegradation of BTEX in anaerobic aquifers (7, 8, 9).

28 Recently, concepts were developed to apply hydrogen and carbon isotope fractionation of  
29 contaminants to assess the extent of in-situ biodegradation in contaminated aquifers (10, 11,  
30 12, 13). Isotope fractionation of BTEX compounds has been studied systematically during  
31 biodegradation (14, 15, 16, 17) in laboratory experiments with pure and enrichment cultures.  
32 Under anaerobic conditions, biodegradation of BTEX compounds was associated with carbon  
33 and pronounced hydrogen isotope fractionation. The concept to evaluate biodegradation based  
34 on isotope fractionation relies on the determination of isotope fractionation factors in

1 laboratory studies which are applied to calculate the extent of in-situ biodegradation of  
2 BTEX-compounds in the field (11, 12, 18).  
3 Isotope fractionation can be applied to characterise the in-situ biodegradation when the source  
4 of contaminants is homogeneous with respect to the isotope composition, because the  
5 enrichment of  $^{13}\text{C}$  down gradient a source area is the decisive parameter to calculate the  
6 amount of in-situ degradation (13). Dilution and sorption may affect the concentration of  
7 contaminants, but have been proven not to change the isotope composition (19, 20) which  
8 allows the use of isotopic composition of the contaminant to describe its microbial  
9 degradation.  
10 In the present work, we have monitored the BTEX concentration and isotope composition in a  
11 near surface aquifer at the site of a former hydrogenation plant in order to validate the isotope  
12 fractionation approach to assess in-situ biodegradation on a complex field site. The source  
13 area and the contaminant plume, which stretches 300 m downgradient of the source, were  
14 investigated applying isotope signatures of contaminants to assess the temporal and spatial  
15 aspects of in-situ biodegradation. In particular, the carbon isotope compositions and the  
16 concentrations of contaminants were monitored to investigate the vertical structure of the  
17 plume and to evaluate the stability of the plume over time. Moreover, the concentration  
18 gradient of toluene, as calculated by the change in isotopic compositions, was used to  
19 compute the zero-order degradation rate constant in the field.

20

## 21 **Materials and Methods**

22 **Site description** - The test field is located in the area of a former hydrogenation plant in Zeitz  
23 (Sachsen-Anhalt, Germany) where benzene production led to a massive groundwater  
24 contamination. The site is characterized by two aquifers, separated by silt and clay of tertiary  
25 age and partly by a lignite seam (Figure 1). The upper aquifer consists of a 2 to 10 m layer of  
26 sand and gravel deposits of Quaternary and Tertiary age. The groundwater table is located 8  
27 to 10 m below surface. The lower aquifer is composed of sand and gravel deposited by an  
28 Eocene river. Both aquifers are partly hydraulically connected. The general groundwater flow  
29 direction is to the North. The prevailing contaminants of the upper aquifer were BTEX,  
30 dominated by high benzene concentrations up to  $850 \text{ mg l}^{-1}$ , followed by toluene ( $50 \text{ mg l}^{-1}$ ),  
31 ethylbenzene ( $1.5 \text{ mg l}^{-1}$ ) and  $2.5 \text{ mg l}^{-1}$  of xylenes, respectively. The BTEX-concentrations in  
32 the lower aquifer were considerably lower ( $100 \text{ mg l}^{-1}$ ) but benzene was again the dominant  
33 pollutant. Both aquifers were virtually free of dissolved oxygen suggesting only anaerobic  
34 microbial processes to be involved in the degradation of pollutants. In the shallow aquifer,

1 nitrate was depleted ( $< 1 \text{ mg l}^{-1}$ ) within the BTEX-plume. In the vicinity, nitrate  
2 concentrations were found up to  $60 \text{ mg l}^{-1}$  in wells where no BTEX were detectable. The  
3 concentrations of sulfate in uncontaminated parts of the upper aquifer were around  $1 \text{ g l}^{-1}$ ,  
4 whereas in the centre of the plume only a few  $\text{mg l}^{-1}$  sulfate were detected. Within the BTEX-  
5 plume methane was determined in concentrations up to  $14 \text{ mg l}^{-1}$ .

6 The investigations were limited to the BTEX-plume within the upper aquifer. A monitoring  
7 profile was chosen for the detailed analysis of this BTEX plume. In May 2001 this profile  
8 consisted of four monitoring wells that are located along the groundwater flow direction. Due  
9 to installation of further monitoring wells in the course of the project seven down gradient  
10 monitoring wells were available in May 2002. The position of the profile within the plume is  
11 given in Figure 2.

12 Modeling of groundwater flow was performed using GMS (Groundwater Modeling System,  
13 Brigham Young University). The average water flow velocity was estimated by advective  
14 transport modelling based on regular groundwater level measurements at the field site using a  
15 site-specific geological model. The field velocity was estimated to be  $1.9 \text{ m} \pm 0.5 \text{ m d}^{-1}$ .

16

17 **Chemicals** - All chemicals and organic solvents were obtained in reagent quality from Merck  
18 (Germany).

19

20 **Sampling** – Integrated water samples of the wells were taken using submersible electrical  
21 pumps (MP1, Grundfos, Bjerringbro, Denmark) in May 2001 and May 2002. The wells had  
22 an inner diameter of 15 cm and were filtered throughout the whole upper aquifer. For  
23 integrated sampling of groundwater at least two well volumes of water were removed before  
24 the samples were taken. Concentrations of dissolved oxygen, temperature, pH, redox potential  
25 and conductivity were determined immediately at the site using the appropriate electrodes  
26 (Oxi 325, LF 325, pH 330, pH 196T; Wissenschaftlich Technische Werkstätten (WTW),  
27 Weilheim, Germany).

28 Level determined groundwater samples were taken in wells equipped with a multi-level-  
29 packer-system (MLPS), consisting of a non-elastic, double-walled packer (21). The MLPS  
30 was installed into the borehole filling the entire inside to avoid any vertical water flow and  
31 introduction of air. The sampling equipment like pumps and tubing was located between two  
32 membranes whereas the sampling ports were placed at the outside. Small gas-driven double-  
33 valve-pumps, installed every 0.9 to 2.5 m, were used to pump up the water sample (21).

34

1 **BTEX concentration analysis** – Water samples were collected in 250 ml glass bottles and  
2 were stored at 4°C. Concentrations of BTEX were determined within 24 hours after sampling  
3 using a HP 19 395A-headspace autosampler (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) in line  
4 with a HP 5890 series II gas chromatograph (Agilent Technologies, Palo Alto, USA)  
5 equipped with a flame ionization detector. Headspace sample vials were tempered at 80°C  
6 for at least 40 min. The headspace sample was transferred into the injector, held at 220°C in  
7 split-mode. To separate different BTEX-compounds a HP-1 column (50 m x 0.32 mm x 1.0  
8 µm; Agilent Technologies, USA) was used. The temperature program started at 50°C, held  
9 for 1 min and then increased with 5°C min<sup>-1</sup> to 120°C and held for 8 min isothermally. Then  
10 the column was heated to 130°C with 8°C min<sup>-1</sup>. Finally, the temperature was increased to  
11 250°C at a rate of 10°C min<sup>-1</sup>. Nitrogen was used as the carrier gas. The detection limit of this  
12 GC-analysis was 2 µg l<sup>-1</sup> for BTEX compounds.

13

14 **BTEX isotope analysis** - Glass flasks sealed with Teflon-lined caps were filled without  
15 headspace to avoid evaporation. The water samples were adjusted to pH 10 to 12 using NaOH  
16 pellets to inhibit microbial activity. The flasks were stored at 4°C until the extraction with n-  
17 pentane at least 2 days after sampling. Solvent extraction is considered not to affect the  
18 isotope composition of the organic compounds (22). The carbon isotope composition of  
19 BTEX was measured by GC-C-IRMS (gas chromatography/combustion/isotope-ratio mass  
20 spectrometry). The GC-C-IRMS system consisted of a GC unit (6890 Series, Agilent  
21 Technology, USA) connected to a Finnigan MAT GC III combustion device with a modified  
22 water removal assembly (Nafion<sup>®</sup> membrane, 50 cm long, T = 0°C) coupled via open split to  
23 a Finnigan MAT 252 mass spectrometer (ThermoFinnigan, Germany). The organic  
24 substances of the GC effluent stream were oxidised to CO<sub>2</sub> in the combustion furnace held at  
25 940°C on a CuO/Ni/Pt catalyst. CO<sub>2</sub> was transferred on line to the mass spectrometer to  
26 determine carbon isotope ratios. Aliquots (0.5 to 4 µl) of n-pentane extracts were injected  
27 using a split/splitless injector held at 250°C and were separated on a capillary column (ZB1  
28 60 m x 0.32 mm, 1 µm film, Phenomenex Inc. Torrance, USA). The temperature program  
29 started at 40°C held for 3 min isothermally and then increased with a rate of 4 °C min<sup>-1</sup> to  
30 100°C, held for 5 min. Then the temperature was increased at 4°C min<sup>-1</sup> to 120°C. Finally the  
31 temperature was increased to 200°C with a rate of 20°C min<sup>-1</sup>. Helium, set to a flow rate of  
32 1.5 ml min<sup>-1</sup> was used as carrier gas. All samples were measured in at least 5 replicates.



1 The linearity and precision of the mass spectrometer were checked with the reference gas  
 2 (CO<sub>2</sub>) and toluene. Systematic analytical error due to non-linearity of the instrument is 0.1  
 3 δ–units per decade in the signal interval between 45 and 3500 mV (13).

4  
 5 **Calculations** - The carbon isotope composition is reported in δ-notation (per mill) relative to  
 6 Vienna Pee Dee Belemnite standard (V-PDB) (23) according to

$$7 \quad \delta_t^{13}C [\text{‰}] = \left( \frac{(^{13}C/^{12}C)_{\text{Sample}}}{(^{13}C/^{12}C)_{\text{Standard}}} - 1 \right) \cdot 1000 \quad (1)$$

8 Isotope fractionation associated with microbially mediated degradation of BTEX can be  
 9 described by the Rayleigh-equation (Equation 2) (24).

$$10 \quad \frac{R_t}{R_0} = \left( \frac{C_t}{C_0} \right)^{\left( \frac{1}{\alpha-1} \right)} \quad (2)$$

11  
 12 R<sub>t</sub> and R<sub>0</sub> give the isotope composition of the contaminant at times t and zero, C<sub>t</sub> and C<sub>0</sub>  
 13 represent the concentration of the compound at times t and zero. The isotope fractionation  
 14 factor α relates the changes in the isotope composition to changes in concentration of the  
 15 residual fraction during the transformation. The isotope fractionation can also be described by  
 16 the enrichment factor ε which is given by (Equation 3) (25).

$$17 \quad \varepsilon = (\alpha - 1) \times 1000 \quad (3)$$

18 The percentage of biodegradation (B) of the residual substrate fraction is an index to describe  
 19 the progress of a reaction by applying a known isotope fractionation factor (α) and the isotope  
 20 composition of a substrate at the beginning of the reaction (R<sub>0</sub>) and the change in the isotope  
 21 composition during the transformation reaction (Equation 4) (13).

$$22 \quad B[\text{‰}] = \left[ 1 - \left( \frac{R_t}{R_0} \right)^{\left( \frac{1}{\alpha-1} \right)} \right] \times 100 \quad (4)$$

23 The concentration of the remaining substrate fraction (C<sub>t</sub>) can be calculated using the isotope  
 24 fractionation factor (α), the concentration at the beginning of the transformation process (C<sub>0</sub>)  
 25 and the change in the isotopic composition during the reaction (Equation 5).

$$26 \quad C_t = C_0 \times \left( \frac{R_t}{R_0} \right)^{\left( \frac{1}{\alpha-1} \right)} \quad (5)$$

1 These calculations are based on the changes of concentrations and the carbon isotope ratios  
2 over time. In a contaminant plume, the concentration and the carbon isotope ratio of the  
3 contaminants vary over time according to the retention time of the contaminant along the  
4 groundwater flow path. Thus, the Rayleigh-equation is valid to describe the in-situ  
5 biodegradation at a contaminated site when (I) the source area of the plume is homogeneous,  
6 (II) the leachate of the source is constant in concentration and carbon isotope ratio and (III)  
7 the groundwater flow path is known (26).

8  
9 **Quantification of in-situ biodegradation** - To estimate biodegradation rate constants zero-  
10 order kinetics were assumed (Equation 6) for this field situation as given by

$$11 \quad C_t = -kt + C_0 \quad (6)$$

12 where  $C_t$  and  $C_0$  give concentrations of the compound at times  $t$  and zero and  $k$  gives the rate  
13 constant.

## 14 **Results and Discussion**

15 **Elucidation of the vertical structure of the plume by multi-level sampling** – In order to  
16 investigate in-situ biodegradation related to the vertical structure of the plume, concentration  
17 and isotope composition of benzene were measured in water samples taken from different  
18 depths. Three wells were chosen for this investigation, two are located in the source area and  
19 one at the margin of the benzene plume. The conventional groundwater sampling leads to a  
20 mixture of sampled water from different vertical layers in the aquifer according to the length  
21 of the filter in the borehole. The concentration in the sample is therefore a mixture of the  
22 concentrations present in the layers over the entire filter interval. To avoid mixing of water  
23 from different layers, selective water layers were sampled in wells equipped with MLPS. Two  
24 wells located in the centre of the benzene plume were investigated. In well Z 13/00 benzene  
25 concentrations were found to be 361 and 376 mg l<sup>-1</sup> at 11.9 and 12.8 m depth, respectively,  
26 and the carbon isotope ratio of the benzene in both samples was about -28.3 ‰ (Table 1)  
27 which is the  $\delta$ -value of the source area of the benzene contamination (Figure 3). The benzene  
28 concentrations in well Z 22/00, located down gradient of well Z 13/00, were 124 and 102 mg  
29 l<sup>-1</sup> in samples from 11.3 and 13.1 m depth. The benzene showed carbon isotope ratios of -27.5  
30 and -27.7 ‰, respectively (Table 1). In both wells no significant vertical gradient in  
31 concentration and carbon isotope ratio of the benzene was obtained. The carbon isotope  
32 composition was almost identical in these wells within the analytical error. This may indicate  
33 that the benzene plume is not vertically structured in the centre of the plume. The decrease in  
34

1 concentration between Z 13/00 and Z 22/00 was not correlated to a significant shift in the  
2 carbon isotope ratios, indicating an isotopically homogeneous benzene source which is  
3 characterized by carbon isotope ratios between  $-28.5$  and  $-27.5$  ‰ (Figure 3).  
4 Within well Z 6/99, located at the eastern fringe of the plume where the aquifer has a  
5 thickness of 5 m, a significant gradient in concentration and isotope composition was found  
6 (Figure 4). In the water layer between 10.5 and 13.0 m below ground, benzene was detectable  
7 in concentrations of  $3.5$  and  $2.8$  mg l<sup>-1</sup> and with an isotope signature of  $-26.9$  and  $-27.0$  ‰  
8 (Figure 4). In the depth of 14.5 m below ground, the benzene concentration was  $90.1$  mg l<sup>-1</sup>  
9 and the carbon isotope ratio was determined to  $-28.1$  ‰, which was similar to the carbon  
10 isotope ratios found in the centre of the plume. In the deepest sampled water layer  $1.9$  mg l<sup>-1</sup>  
11 benzene was measured and the isotope signature was  $-26.3$  ‰. This indicates that the plume  
12 at the eastern fringe is structured according to depth with respect to both concentration and  
13 isotopic composition.

14  
15 The groundwater sample from 14.5 m below ground showed the highest concentration of  
16 benzene of the four different layers and the carbon isotope ratio suggests that this benzene  
17 fraction was not biodegraded to a significant extent. In order to evaluate the relation between  
18 the benzene concentrations and the corresponding isotopic signatures, data of well Z 6/99  
19 were analyzed according to the Rayleigh-equation (Equation 2). The linear regression resulted  
20 in a coefficient of determination of 0.92 and a fractionation factor of  $\alpha_f = 1.0004$  for benzene  
21 degradation in the field (graph not shown). The fractionation factor  $\alpha$  relates concentration to  
22 isotopic composition of a compound and thus the fractionation factor calculated from field  
23 data is dependent on biodegradation, which alter concentration and isotopic signature, but also  
24 on processes which only influence the concentration of contaminants, such as sorption and  
25 dilution. Thus, this fractionation factor ( $\alpha_f$ ) is not comparable to fractionation factors obtained  
26 in laboratory experiments which relate the isotope discrimination and concentration that are  
27 only the result of degradation processes. However, the fractionation factor calculated from  
28 field data may be used to check the correlation of isotope and concentration data and  $\alpha_f > 1$   
29 gives evidence that biodegradation is present, whereby the coefficient of determination of the  
30 linear regression curve shows the quality of the correlation. The comparison of  $\alpha_f$  and  
31 fractionation factors derived from appropriate laboratory experiments may provide a first  
32 estimate to what extent concentration is affected by in-situ biodegradation. In this part of the  
33 plume sulfate reduction is suggested to be the dominant process and the fractionation factor  
34 ( $\alpha = 1.0036$ ) for benzene degradation under sulfate-reducing (17) conditions is significantly

1 higher, indicating that dilution and sorption are quite relevant processes at the field site.  
2 However, the results show that the decrease in concentration within the different layers of  
3 well Z 6/99 would be caused by in-situ biodegradation. Thus, in-situ biodegradation may have  
4 led to a vertical differentiation of the benzene plume, where biodegradation was found in  
5 upper and lower fringes of the plume. Vertical gradients, concerning contaminant  
6 concentration (27), microbial degradation potential (28) and sulfate reduction (29) have  
7 already been characterized in multiple level-determined samples from wells within a phenol-  
8 plume in a sandstone aquifer. It can be concluded that the plume fringes are the most active  
9 parts within a contaminant plume and therefore monitoring should be extended to better  
10 characterization of these parts of the plumes.

11 Moreover, in integrated ground water sampling and pumping different layers were mixed over  
12 the entire well screen which will result in averaged concentrations of the contaminant in the  
13 sample. The isotope signatures of contaminants are dominated by the layer with the highest  
14 concentration. However, water with high concentrations probably represents the least  
15 biodegraded fraction. Thus, it is obvious that in-situ biodegradation will be underestimated by  
16 the means of isotope data.

17  
18 **Qualitative assessment of in-situ biodegradation** - A field survey, monitoring  
19 concentrations and carbon isotope ratios of benzene in more than 40 wells, was conducted in  
20 May 2002 by conventional groundwater sampling to investigate zones of benzene  
21 biodegradation (Figure 3). In the centre of the plume, benzene concentrations were found up  
22 to 746 mg l<sup>-1</sup> showing relatively homogeneous isotopic composition of about -28 ‰. Despite  
23 significant changes in benzene concentrations of several hundred mg l<sup>-1</sup>, the carbon isotopic  
24 signatures remained at a level between -28.5 and -27.5 ‰ providing no evidence for in-situ  
25 biodegradation. This strong concentration gradient was probably a result of sorption and  
26 dilution processes that do not affect the isotope composition (19, 22). Slightly enriched  
27 carbon isotope ratios of benzene were only detected in marginal parts of the plume with  
28 concentrations below 30 mg l<sup>-1</sup> independent of the groundwater flow direction. The most  
29 enriched carbon isotope signature was found in samples of well Z 4/99 (-23.3 ‰), located on  
30 the eastern side of the plume, where a low benzene concentration of 120 µg l<sup>-1</sup> was detected.  
31 This may provide evidence of microbial in-situ degradation of benzene present at the plume.  
32 However, in marginal parts of the plume, few samples with low benzene concentrations gave  
33 benzene carbon isotope ratios less enriched than -27.5 ‰. In these samples no positive

1 indication of in-situ biodegradation of benzene could be obtained by means of isotope  
2 signatures.

3 At this field site all monitoring wells with benzene concentrations  $> 31.2 \text{ mg l}^{-1}$  showed an  
4 isotopic composition of the benzene between  $-28.5 \text{ ‰}$  and  $-27.5 \text{ ‰}$ , whereas isotope  
5 fractionation was evident at lower concentrations. In a number of laboratory studies,  
6 biodegradation of benzene was reported when benzene concentrations at time of inoculation  
7 were lower than  $58 \text{ mg l}^{-1}$  (17, 30, 31, 32, 33). However, no information on the growth  
8 inhibition of anaerobic benzene degrading bacteria by elevated benzene concentrations is  
9 available yet. Toxicity of organic solvents such as toluene and benzene towards aerobic  
10 bacteria occurs at concentrations that are an order of magnitude higher and can be explained  
11 by interference of the organic chemical with the bacterial membrane (34). One may speculate  
12 that anaerobic benzene degraders are more sensitive to organic solvents. The fact that no  
13 evidence was found for benzene degradation at concentrations much higher than  $30 \text{ mg l}^{-1}$   
14 leads to the hypothesis that anaerobic benzene degradation is inhibited by the high  
15 concentrations found in the source area of this field site.

16

17 **Semi-quantitative approach to assess the in-situ biodegradation** – In order to estimate the  
18 extent of in-situ biodegradation a semi-quantitative approach was used (13) applying  
19 differences in the isotopic composition in the course of the plume to calculate the extent of  
20 biodegradation. Therefore, Equation 4 was applied to calculate the percentage of  
21 biodegradation using the laboratory-derived fractionation factors ( $\alpha$ ) and taking into account  
22 the variability of the isotope composition of benzene in the source ( $R_0 = -27.5$  to  $-28.5 \text{ ‰}$ ) of  
23 the test site (Figure 5). The fractionation factors were selected according to the conditions  
24 governing the biochemical degradation pathway. Sulfate is considered to be the dominant  
25 electron acceptor of BTEX-degradation at this site because towards the centre of the BTEX-  
26 plume sulfate became depleted to concentrations of  $20 \text{ mg l}^{-1}$  compared to  $1000 \text{ mg l}^{-1}$  in  
27 pristine sections of this aquifer. In addition, methane evolution suggested methanogenesis  
28 also to be associated with BTEX degradation, but to a minor extent. To estimate the  
29 uncertainty of in-situ biodegradation, the percentage of biodegradation was calculated using  
30 the benzene fractionation factor for methanogenic conditions ( $\alpha = 1.0020$ ) and for sulfate-  
31 reducing conditions ( $\alpha = 1.0036$ ) (17). The calculation shows the possible range of this  
32 estimation (Figure 5). In-situ biodegradation is evident by the significant differences in the  
33 isotope signatures at this site. However, even if the fractionation factor of the dominant  
34 degradation process and the isotope signature of the source ( $R_0$ ) are not known exactly, a

1 conservative estimate of the in-situ degradation is feasible. At the test site the predominant  
2 electron acceptor was sulfate and the isotope fractionation factor representing sulfate-reducing  
3 benzene degradation is higher than the one for methanogenic conditions. Therefore, the  
4 calculation of the percentage of biodegradation using the higher fractionation factor gives a  
5 conservative estimate in any case.

6 To identify zones of in-situ biodegradation, the percentage of biodegradation was calculated  
7 for the monitoring wells located at the fringe of the plume using the fractionation factor ( $\alpha =$   
8 1.0036) indicative for benzene degradation under sulfate-reducing conditions (Figure 6). For  
9 the calculation the variability of the isotopic composition of the source ( $R_0 = -27.5$  and  $-28.5$   
10 ‰) was taken into account implying the uncertainty of this approach to assess biodegradation.  
11 The calculation showed that zones of in-situ biodegradation can be identified. Most intensive  
12 biodegradation was found in marginal parts of the plume parallel to the ground water flow  
13 direction where the index gave values up to 77 % of biodegradation. The percentage of  
14 biodegradation was lower downstream the water flow path and no appropriate monitoring  
15 well was available to assess the percentage of biodegradation at the front of the benzene  
16 plume. Sulfate was mostly depleted in central parts of the plume and downgradient of the  
17 source. Possibly, the depletion of electron acceptors needed for in-situ biodegradation is  
18 responsible for a lower extent of biodegradation downgradient the source. A similar attempt  
19 to assess in-situ biodegradation of halogenated ethenes was reported by Sherwood Lollar and  
20 coworkers (10), who were able to quantify in-situ biodegradation of tetrachloroethene and  
21 trichloroethene by using carbon isotope ratios.

22 The index “percentage of biodegradation” (B) is only dependent on the isotope ratios of the  
23 contaminants measured in groundwater samples of the field site. Therefore, this index has the  
24 advantage of being independent of concentration data influenced by dilution with pristine  
25 water or by sorption to the aquifers matrix. This index may be useful to estimate the in-situ  
26 biodegradation, giving a concentration-independent semi-quantitative parameter of special  
27 interest particularly at field sites where the groundwater flow path is not known.

28

29 **Quantitative approach to assess the in-situ biodegradation** – In order to quantify in-situ  
30 biodegradation in terms of concentration a monitoring profile stretching 168 m downgradient  
31 the source of the contamination was chosen (Figure 2) and the in-situ biodegradation of  
32 benzene and toluene along the water flow path was evaluated. Concentration and isotope data  
33 from two monitoring campaigns carried out in May 2001 and 2002 were used to assess the  
34 degradation potential in the aquifer over time.

1 In May 2001, the benzene concentrations decreased from 854 mg l<sup>-1</sup> in well Z 2/00 to 140.5  
2 mg l<sup>-1</sup> in well Z 23/00 and the isotopic composition was analysed to be between -28.9 and -  
3 28.1 ‰, respectively (Table 2). In May 2002, the concentrations along the monitoring profile  
4 were slightly lower and decreased from 746.0 mg l<sup>-1</sup> at well Z 9/00 to 144.5 mg l<sup>-1</sup> at well Z  
5 32/02. The isotope ratio was in the range of -27.1 and -28.1 ‰ at well Z 9/00 and Z 32/02,  
6 respectively.

7 In May 2001, the toluene concentrations decreased from 50 mg l<sup>-1</sup> at well Z 9/00 to 0.6 mg l<sup>-1</sup>  
8 in well Z 23/00 correlated to an enrichment of <sup>13</sup>C by 3.8 ‰ in the residual toluene fraction  
9 (Table 2). In May 2002, toluene concentrations were slightly lower and decreased from 46.6  
10 mg l<sup>-1</sup> at monitoring well Z 2/99 to 0.09 mg l<sup>-1</sup> at well Z 18/00 associated with enrichment in  
11 <sup>13</sup>C of 9.6 ‰ in the residual toluene fraction (Table 2).

12 The course of benzene or toluene concentrations was comparable in the two monitoring  
13 campaigns. However, variations in terms of concentration and isotopic composition were  
14 found in the source area, which may be related to the hydrogeological situation and the  
15 complex spatial distribution of free contaminant phases within the source. One may speculate  
16 that ground water flux and position of the water table have some impact on the leaching of  
17 contaminants from free contaminant phases. Comparing both monitoring campaigns, the  
18 isotope values of benzene and toluene show a trend to slightly higher values in May 2002,  
19 which may give an indication for the complex situation within the source. Nevertheless, the  
20 input of benzene and toluene was similar over the investigated time span, which also accounts  
21 for a declining concentration gradient along the groundwater flow path.

22  
23 To test if in-situ biodegradation may have caused the decrease in concentration along the flow  
24 path, the Rayleigh-equation (Equation 2) was applied. The natural logarithms of  $R_t/R_0$  were  
25 plotted over natural logarithms of  $C_t/C_0$  to test the relation between the changes of isotope  
26 compositions and concentrations, where the slope of the linear regression shows the extent of  
27 isotope fractionation caused by in-situ biodegradation. In both campaigns, the highest  
28 concentrations of benzene and toluene along the monitoring profile were used as the most  
29 likely source concentration ( $C_0$ ) and the lowest  $\delta^{13}\text{C}$ -value as the most likely isotopic  
30 composition of source ( $R_0$ ). The concentrations and isotopic compositions of benzene cannot  
31 be correlated implying that in-situ biodegradation is not a major process affecting the  
32 concentration of this compound along this flow path (Figure 7). The decrease in  
33 concentration, caused by dilution or sorption, is very likely not to alter the isotopic  
34 composition.

1 Toluene concentrations and isotopic compositions could be correlated with a reasonable linear  
2 fit of  $R^2 = 0.86$  and a field fractionation factor of  $\alpha_f = 1.0013$  (Figure 7). Because in-situ  
3 biodegradation is likely the process in the aquifer to be responsible for the alteration of  
4 isotopic composition, the good correlation implies that the concentrations of toluene on the  
5 flow path are mainly affected by in-situ biodegradation. This gives reason to calculate the  
6 extent of in-situ biodegradation for both campaigns individually to obtain more quantitative  
7 information on the process.

8 The percentage of biodegradation (Equation 4) and the theoretical concentrations (Equation 5)  
9 of toluene were calculated for the two campaigns, where in May 2001 and 2002  $R_0$  was set to  
10  $-27.1$  and  $-26.2$  ‰, respectively. The laboratory-derived isotope fractionation factor for  
11 toluene degradation at anaerobic conditions of  $\alpha = 1.0017$  (14) was applied. In both years, the  
12 percentage of biodegradation increased to more than 90 % downstream of the source (Figures  
13 8a, b). To calculate the concentration of the residual toluene fraction, the concentrations at  
14 well Z 9/00 and Z 2/99 were used as representative in-pit concentrations ( $C_0$ ) for the flow  
15 path in May 2001 and 2002, respectively. The highest concentration observed on the flow  
16 path in this section of the aquifer is the most reasonable value for the input of the contaminant  
17 to the investigated flow path.

18 In the wells located more than 100 m downgradient, the calculated concentrations of the  
19 residual toluene fraction matched the measured concentrations observed in the aquifer (Figure  
20 8a, b), whereas large differences were found in zones located closer to the source. Thus,  
21 toluene concentrations are obviously not only affected by in-situ biodegradation. However,  
22 the results of both campaigns indicate in-situ biodegradation to be a major process leading to  
23 the decrease of toluene concentrations along this flow path.

24 Comparing both monitoring campaigns may further indicate that in-situ biodegradation was  
25 intensified in May 02 (Figures 8a, b) and further monitoring is needed to evaluate if the  
26 toluene plume is shrinking at the test site. This seems to be likely since toluene is often  
27 preferentially degraded compared to benzene as many field studies suggested (35). The  
28 quantification of in-situ biodegradation by the means of stable isotope patterns relies to a  
29 significant extent on the representative determination of the source concentration and isotopic  
30 composition ( $R_0$ ,  $C_0$ ) which was possible because the source zone was relatively  
31 homogeneous and not structured according to depth. When no information about the vertical  
32 structure of the plume is available from level-determined samples, one can expect mixing of  
33 water layers in conventional sampling. This can result in an under- but no overestimation of  
34 the in-situ biodegradation and therefore leads to a conservative assessment. Nevertheless, the



1 study of isotopic signatures provides evidence that in-situ biodegradation down stream of the  
2 source area governs the concentration gradient of toluene leading to a sustainable elimination  
3 of this contaminant and indicates the stability of the plume over time. The latter assumption  
4 gives rise to calculate degradation rates of toluene along the water flow path.

5  
6 **Calculation of rate constant of toluene degradation** – Concentrations of toluene  
7 determined in the field are the result of several processes, such as sorption, dilution and  
8 biodegradation and will therefore result in overall attenuation rates. In order to calculate in-  
9 situ biodegradation rates that only rely on the decrease in concentration caused by in-situ  
10 biodegradation, theoretical concentrations, as calculated with Equation 5 by the means of  
11 carbon isotope composition, were used. An average groundwater flow velocity of  $1.9 \pm 0.5 \text{ m}$   
12  $\text{d}^{-1}$ , was estimated to be representative for the area of the monitoring profile. The retardation  
13 of toluene due to interaction with the aquifer matrix was assumed to be 1.2 (36). This will  
14 prolong the travel time (t) of the toluene along the water flow path by a factor of 1.2 in  
15 comparison to the travel time of water. With these assumptions zero-order biodegradation rate  
16 constant was estimated by plotting theoretical concentrations ( $\mu\text{M}$ ) over travel time (d)  
17 according to Equation 6 (Figure 9). The linear regression had a coefficient of determination of  
18  $R^2 = 0.84$  and a biodegradation rate constant of  $k = -5.7 \mu\text{M d}^{-1}$  was found. Taking into  
19 account the variation in groundwater flow velocity, a range of the biodegradation rate  
20 constant of  $k = -5.7 \pm 1.5 \mu\text{M d}^{-1}$  can be determined, which corresponds to an average  
21 biodegradation rate of  $3.6 \mu\text{M} \pm 0.9 \mu\text{M}$  per meter flow path of toluene or  $2.08 \pm 0.55 \text{ mM}$  per  
22 year.

23 The zero-order rate constant calculated for toluene from field data is in the same order of  
24 magnitude as rate constants estimated for other contaminated sites ranging from  $k = -1.2 \mu\text{M}$   
25  $\text{d}^{-1}$  to  $k = -2 \mu\text{M d}^{-1}$  (37,38). The zero-order rate constants derived for toluene biodegradation  
26 in a column experiment (39) were orders of magnitude higher ( $160$  and  $260 \mu\text{M d}^{-1}$ ) and  
27 probably give an unrealistic scenario for the field site. However, as discussed above the  
28 assessment of in-situ biodegradation using isotope signatures is a conservative estimation and  
29 the real degradation rate in the field may be higher.

30 Nevertheless, the degradation rates calculated using data from the quantitative assessment of  
31 in-situ biodegradation of toluene in this field study demonstrate that isotope data can be used  
32 to estimate degradation rates of contaminants in the field. The rates can be used to develop  
33 conceptual models required for evaluating natural attenuation approaches.

34

1 **Acknowledgement:**

2 We thank our colleagues from the University of Tübingen (Georg Teutsch) and the University  
3 of Kiel (Andreas Dahmke) for their support concerning geological and hydrogeochemical data  
4 of the field site. The project was funded by the German Federal Ministry of Education and  
5 Research (BMBF), grant 02WT0041. Additional funding for the project is provided through  
6 the SAFIRA-(remediation research in regionally contaminated aquifers) Programme of the  
7 UFZ Centre for Environmental Research Leipzig-Halle.

8

9

10 **References**

- 11 1. Snyder, R. *J. Toxicol. Env. Health. A* **2000**, *61*, 339-346.
- 12 2. Snyder, R. *Crit. Rev. Toxicol.* **2002**, *32*, 155-210.
- 13 3. Environmental Protection Agency (US-EPA), *OSWER Directive 9200.4-17P*, **1999**.
- 14 4. Christensen, T.H.; Bjerg, P.L.; Banwart, S.A.; Jacobsen, R.; Heron, G.; Albrechtsen,  
15 H.J. *J. Contam. Hydrol.* **2000**, *45*, 165-241.
- 16 5. Berry, D.F.; Francis, A.J.; Bollag, J.M. *Microbiol. Rev.* **1987**, *51*, 43-59.
- 17 6. Krumholz, L.R.; Caldwell, M.E.; Suflita, J. M. In: *Bioremediation: Principles and*  
18 *Applications*. Cambridge University Press: Cambridge, U.K **1996**, pp. 61-99.
- 19 7. Kazumi, J.; Caldwell, M.E.; Suflita, J.M.; Lovley, D.R.; Young, L.Y. *Environ. Sci.*  
20 *Technol.* **1997**, *31*, 813-818.
- 21 8. Elshahed, M.S.; Gieg, L.M.; Mcinerney, M.J.; Suflita, J.M. *Environ. Sci. Technol.*  
22 **2001**, *35*, 682-689.
- 23 9. Reusser, D.E.; Istok, J.D.; Beller, H.R.; Field, J.A. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*,  
24 4127-4134.
- 25 10. Sherwood Lollar, B.; Slater, G.F.; Sleep, B.; Witt, M.; Klecka, G.M.; Harkness, M.;  
26 Spivack, J. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 261-269.
- 27 11. Mancini, S.A.; Lacrampe-Couloume, G.; Jonker, H.; van Breukelen, B. M.; Groen, J.;  
28 Volkering, F.; Sherwood Lollar, B. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 2464-2470.
- 29 12. Meckenstock, R.U.; Morasch, B.; Kästner, M.; Vieth, A.; Richnow, H.H. *Water. Air.*  
30 *Soil. Poll.* **2002**, Focus 2, 141-152.
- 31 13. Richnow, H.H.; Meckenstock, R.U.; Ask, L.; Baun, A.; Ledin, A.; Christensen, T.H. *J*  
32 *Contam. Hydrol.* **2003**, in press.
- 33 14. Meckenstock, R.U.; Morasch, B.; Warthmann, R.; Schink, B.; Annweiler, E.;  
34 Michaelis, W.; Richnow, H.H. *Environ. Microbiol.* **1999**, *1*, 409-412.

- 1 15. Morasch, B.; Richnow, H.H.; Schink, B.; Meckenstock, R.U. *Appl. Environ.*  
2 *Microbiol.* **2001**, *67*, 4842-4849.
- 3 16. Morasch, B.; Richnow, H.H.; Schink, B.; Vieth, A.; Meckenstock, R.U. *Appl. Environ.*  
4 *Microbiol.* **2002**, *68*, 5191-5194.
- 5 17. Mancini, S.A.; Ulrich, A.C.; Lacrampe-Couloume, G.; Sleep, B.; Edwards, E.;  
6 Sherwood Lollar, B. *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 191-198.
- 7 18. Richnow, H.H.; Vieth, A.; Kästner, M.; Gehre, M.; Meckenstock, R.U.  
8 *TheScientificWorldJournal* **2002**, *2*, 1227-1234.
- 9 19. Slater, G.F.; Ahad, J.M.E.; Lollar, B.S.; Allen-King, R.; Sleep, B. *Anal. Chem.* **2000**,  
10 *72*, 5669-5672.
- 11 20. Harrington, R.R.; Poulson, S.R.; Drever, J.I.; Colberg, P.J.S.; Kelly, E.F. *Org.*  
12 *Geochem.* **1999**, *30*, 765-775.
- 13 21. Ptak, T.; Schirmer, M.; Teutsch, G. In: *Risk, regulatory and monitoring considerations*  
14 *– remediation of chlorinated and recalcitrant compounds; 2<sup>nd</sup> International*  
15 *conference on remediation of chlorinated and recalcitrant compounds*. Battelle Press:  
16 Columbus, Richland, **2000**, pp. 95-102.
- 17 22. Dempster, H.S.; Lollar, B.S.; Feenstra, S. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 3193-3197.
- 18 23. International Atomic Energy Agency (IAEA), *IAEA-TECHDOC-825*, **1995**.
- 19 24. Hoefs, J. *Stable isotope geochemistry*, Springer: Berlin. **1997**.
- 20 25. Mariotti, A.; Germon, J. C.; Hubert, P.; Kaiser, P.; Letolle, T.; Tardieux, A.; Tardieux,  
21 P. *Plant Soil* **1981**, *62*, 413-430.
- 22 26. Richnow, H.H.; Annweiler, E.; Michaelis, W.; Meckenstock, R.U. *J Contam. Hydrol.*  
23 **2003**, in press.
- 24 27. Thornton, S.F.; Quigley, S.; Spence, M.J.; Banwart, S.A.; Bottrell, S.; Lerner, D.N. *J*  
25 *Contam. Hydrol.* **2001**, *53*, 233-267.
- 26 28. Pickup, R.W.; Rhodes, G.; Alamillo, M.L.; Mallinson, H.E.H.; Thornton, S.F.; Lerner,  
27 D.N. *J Contam. Hydrol.* **2001**, *53*, 269-284.
- 28 29. Spence, M.J.; Bottrell, S.H.; Thornton, S.F.; Lerner, D.N. *J Contam. Hydrol.* **2001**, *53*,  
29 285-304.
- 30 30. Edwards, E.A.; Grbić-Galić, D. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 2663-2666.
- 31 31. Lovley, D.R.; Coates, J.D.; Woodward, J.C.; Phillips, E.J.P. *Appl. Environ. Microbiol.*  
32 **1995**, *61*, 953-958.
- 33 32. Phelps, C.D.; Kazumi, J.; Young, L.Y. *FEMS Microbiol. Lett.* **1996**, *145*, 433-437.

- 1 33. Coates, J.D.; Chakraborty, R.; Lack, J.G.; O'Connor, S.M.; Cole, K.A.; Bender, K.S.;  
2 Achenbach, L.A. *Nature* **2001**, *411*, 1039-1042.
- 3 34. Heipieper, H.J.; Weber, F.J.; Sikkema, J.; Keweloh, H.; de Bont, J.A.M. *Trends*  
4 *Biotechnol.* **1994**, *12*, 409-415.
- 5 35. Wiedemeier, T.H.; Rifai, H.S.; Newell, C.J.; Wilson, J.T. *Natural Attenuation of Fuels*  
6 *and Chlorinated solvents in the subsurface*, John Wiley: New York, **1999**.
- 7 36. Devlin, J.F.; McMaster, M.; Barker, J.F. *Water Resour. Res.* **2002**, *38*, 1-11.
- 8 37. Reinhard, M.; Shang, S.; Kitanidis, P.K.; Orwin, E.; Hopkins, G.D.; Lebron, C.A.  
9 *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 28-36.
- 10 38. Suarez, M.P.; Rifai, H.S. *Bioremediation J.* **1999**, *3*, 337-362.
- 11 39. Zheng, Z.; Aagaard, P.; Breedveld, G.D. *Environ. Geol.* **2002**, *41*, 922-932.

1 Figure 1: Schematic hydrogeological cross section along the monitoring profile in Zeitz (for  
2 location see Figure 2)  
3

4 Figure 2: Concentration of BTEX in the plume (contour plot) and the location of the water  
5 table (lines) in the upper aquifer in May 2002. The position of the monitoring profile is  
6 indicated by an arrow; locations of MLPS wells (✕) are presented.  
7

8 Figure 3: Concentration (contour plots) and carbon isotopic composition (numbers) of  
9 benzene in May 2002. In the centre of the plume, carbon isotope ratios of  $-28 \pm 0.5$  ‰ are  
10 predominant, whereas in marginal parts of the benzene plume enriched  $\delta^{13}\text{C}$ -values were  
11 detected.  
12

13 Figure 4: Concentration (squares) and carbon isotope ratios (circles) of benzene in samples  
14 from different depths in well Z 6/99 (May 2002)  
15

16 Figure 5: Variation in the “percentage of biodegradation” (Equation 4) calculated according to  
17  $R_0 = -27.5$  and  $-28.5$  ‰ and the isotope fractionation factors ( $\alpha = 1.0020$  and  $1.0036$ )  
18

19 Figure 6: Spatial distribution of benzene biodegradation (percentage of biodegradation) at the  
20 fringe of the plume; contour plot gives the benzene concentration, percentage of  
21 biodegradation is given in bold numbers as calculated by using Equation 4 ( $R_0 = -27.5$  ‰ and  
22  $-28.5$  ‰,  $\alpha = 1.0036$ ); locations of sampling wells (+) are presented.  
23

24 Figure 7: Concentrations and carbon isotope ratios of benzene (open triangles) and toluene  
25 (filled squares) of monitoring campaigns in May 2001 and May 2002 plotted according to the  
26 Rayleigh-equation (Equation 2) as  $\ln R_t/R_0$  over  $\ln C_t/C_0$ . Data are presented in Table 2.  
27

28 Figure 8: Concentration (filled squares) and isotope composition (circles) of toluene down  
29 gradient of the contaminant source in May 2001 (a) and May 2002 (b) on the monitoring  
30 profile (location is given in Figure 2); percentage of biodegradation (stars) and theoretical  
31 concentrations (open squares) were calculated according to Equations 4 and 5 using the  
32 fractionation factor ( $\alpha = 1.0017$ ).  
33

1 Figure 9: The theoretical concentrations ( $\mu\text{M}$ ) of toluene calculated with Equation 5 are  
2 plotted over travel time (d) and give a toluene degradation rate constant of  $k = -5.7 \mu\text{M d}^{-1}$

3

4 Table 1: Concentrations and carbon isotope ratios (with standard deviation) of benzene in  
5 different depths of the plume (location of both wells is shown in Figure 2)

6

7 Table 2: Concentrations and carbon isotope ratios (with standard deviation) of benzene and  
8 toluene along the monitoring profile in May 2001 and May 2002; n.d. – not determined; n.a. –  
9 well not available in May 2001

Figure 1

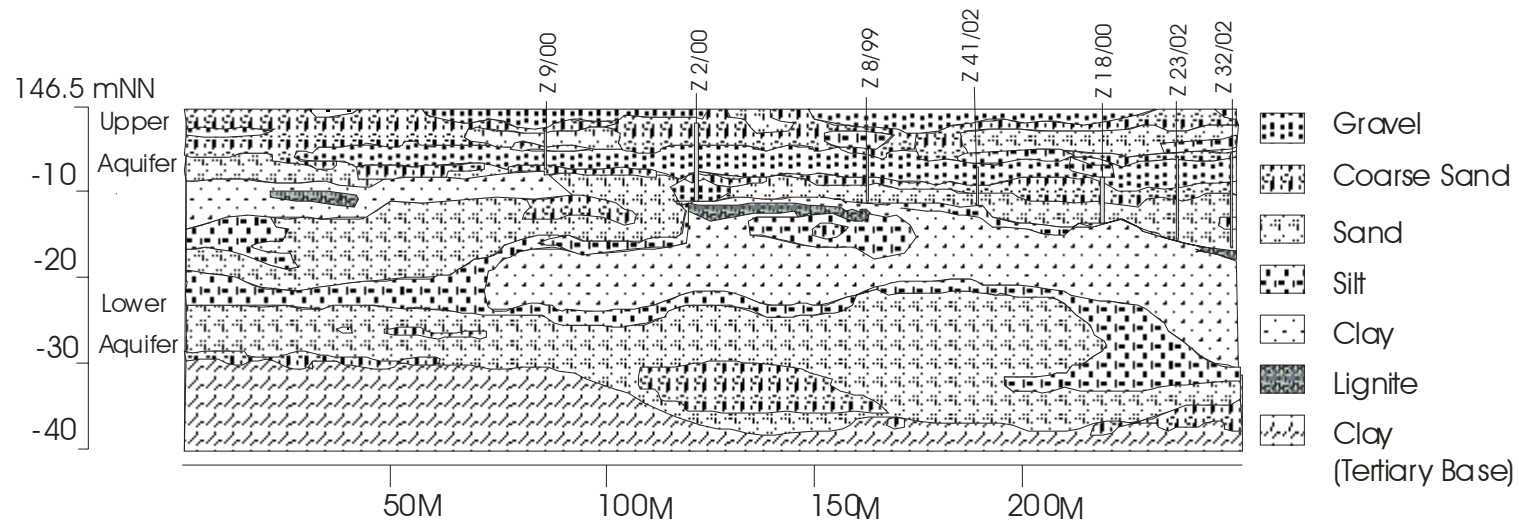


Figure 2

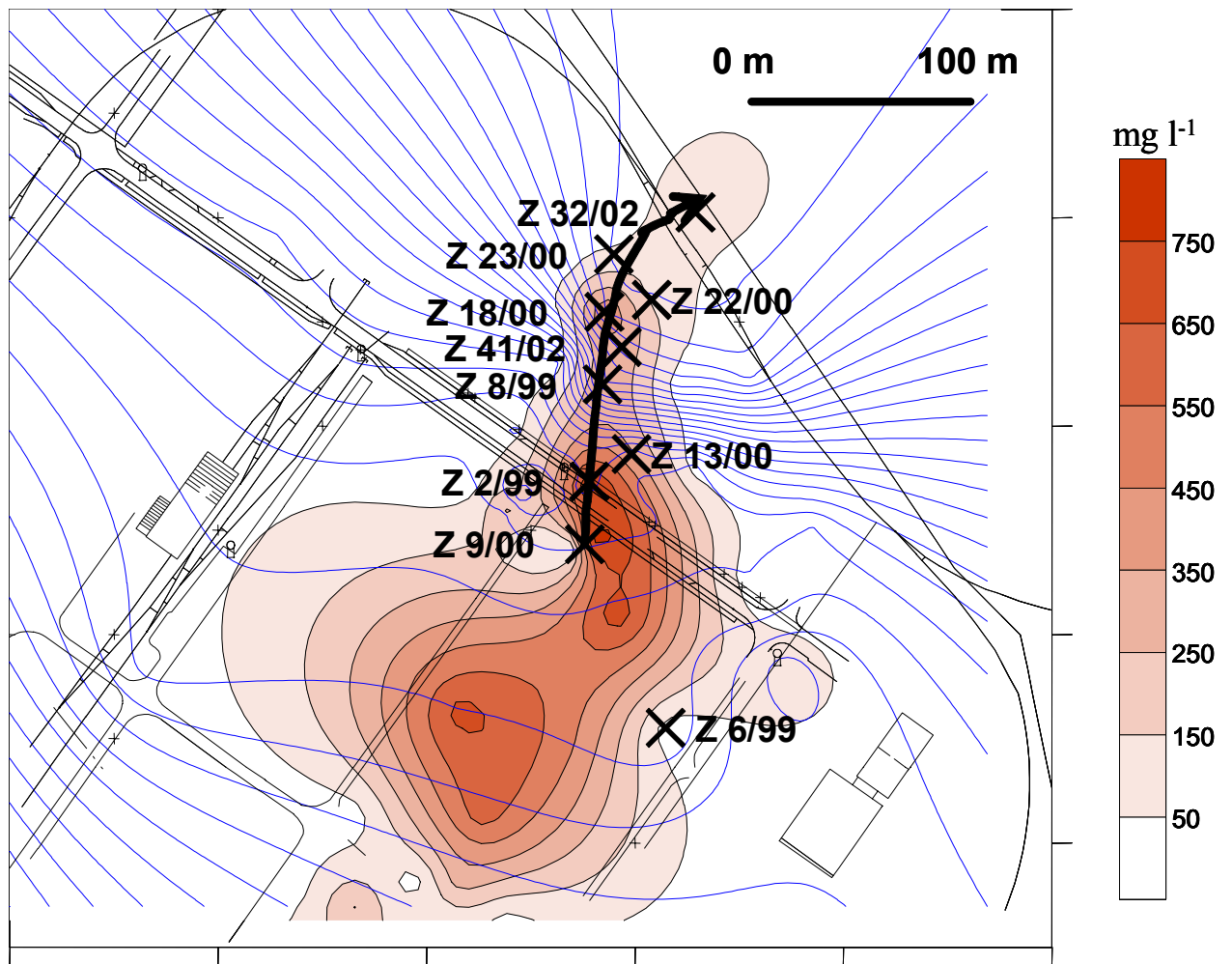






Figure 4

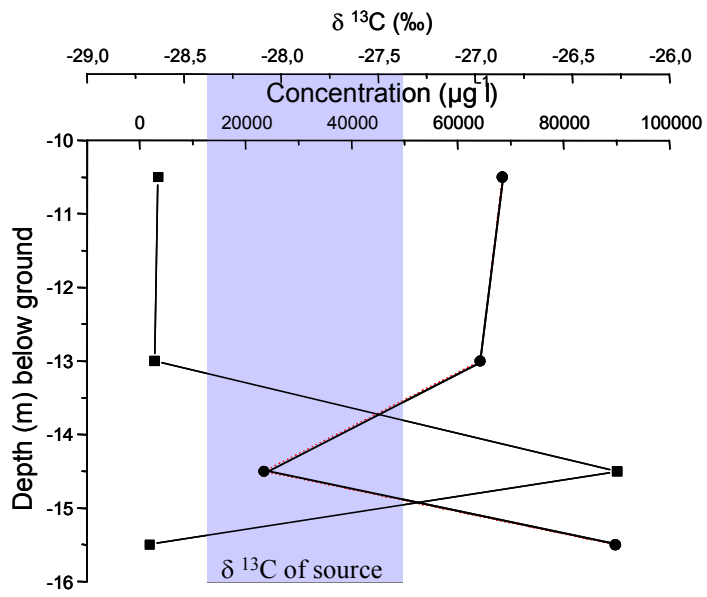


Figure 5

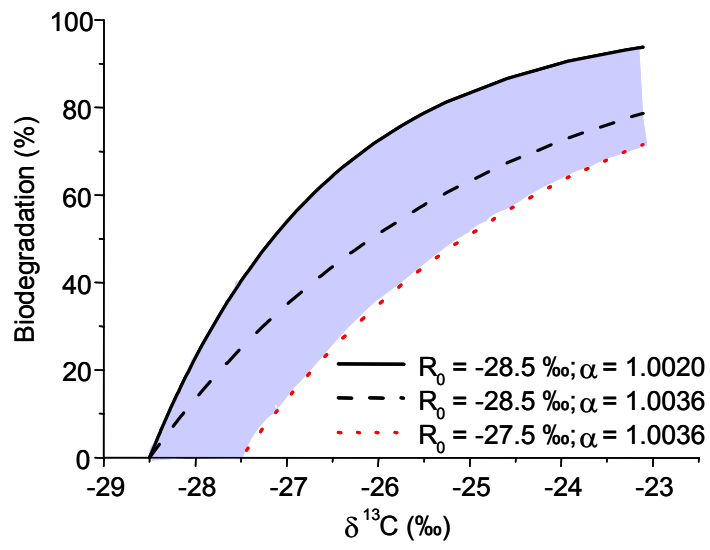


Figure 6

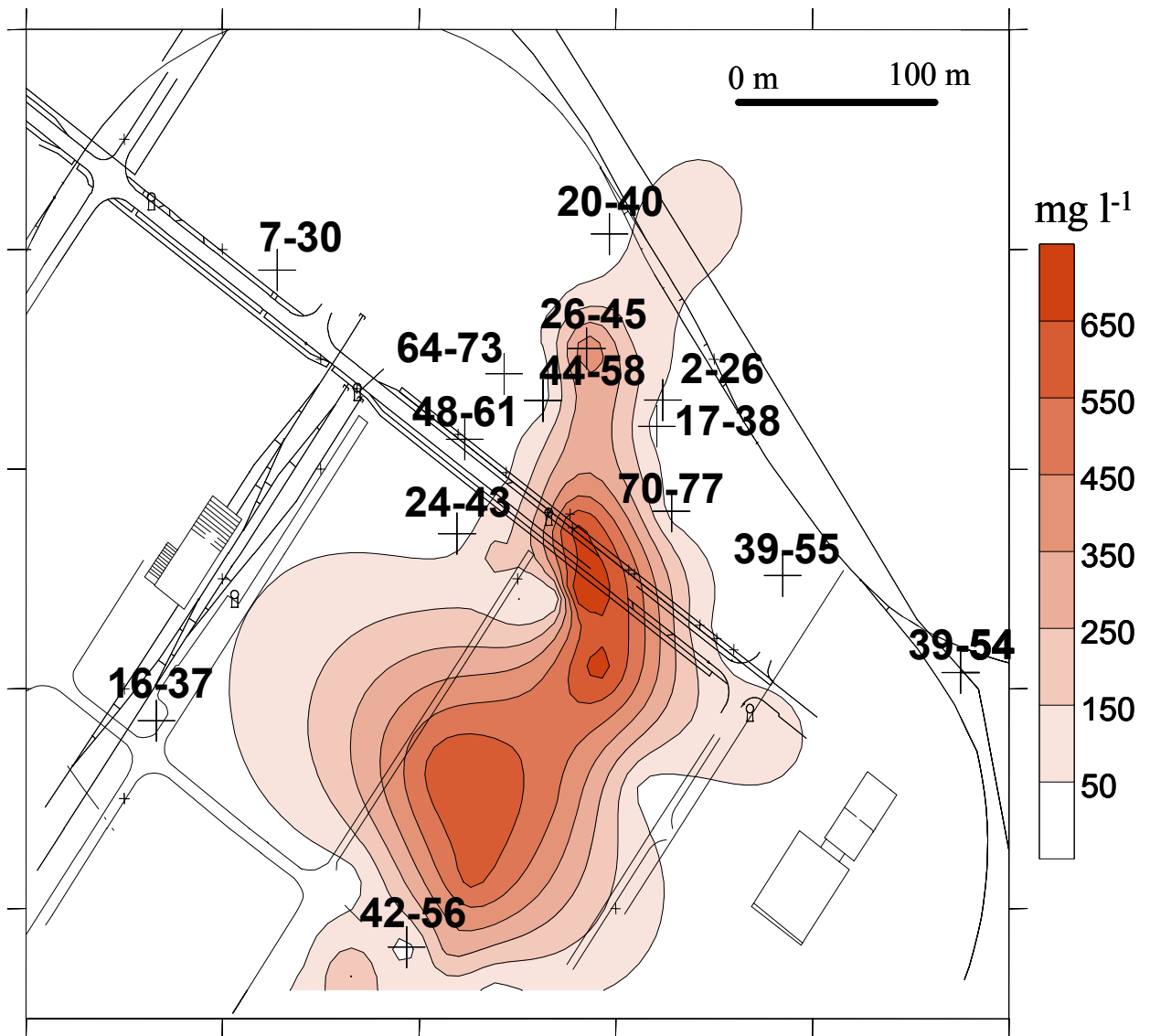


Figure 7

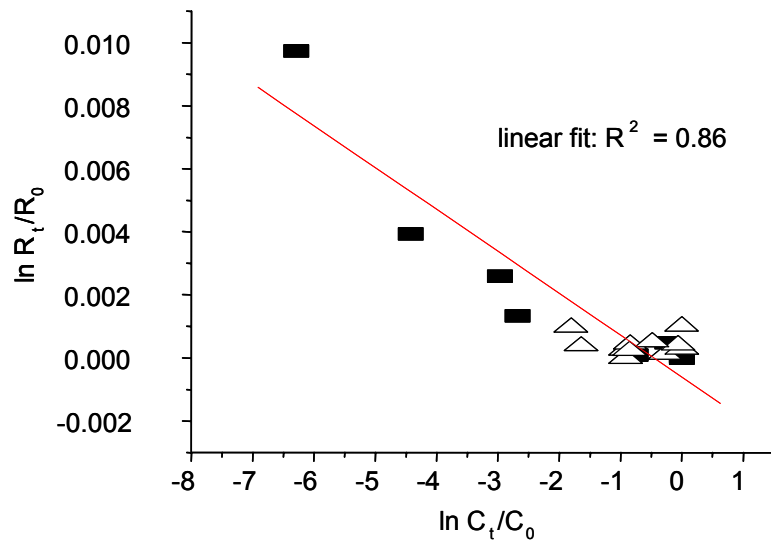


Figure 8a:

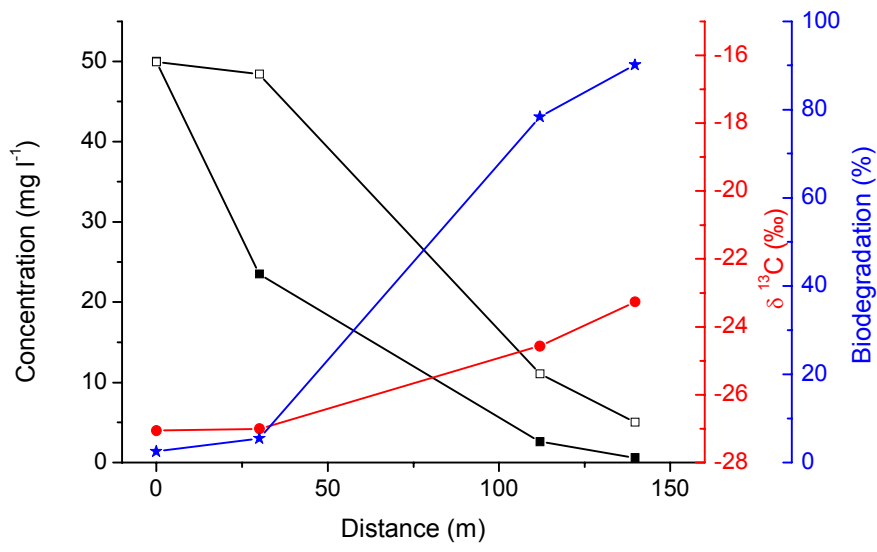


Figure 8b

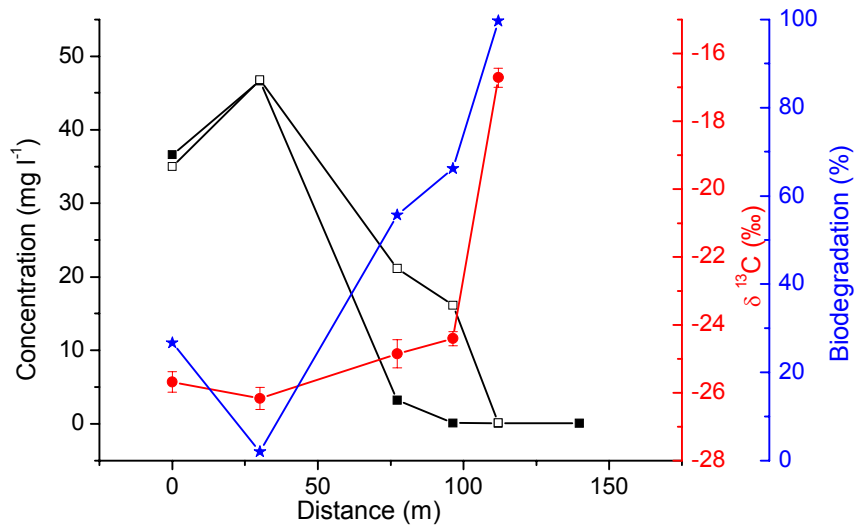


Figure 9

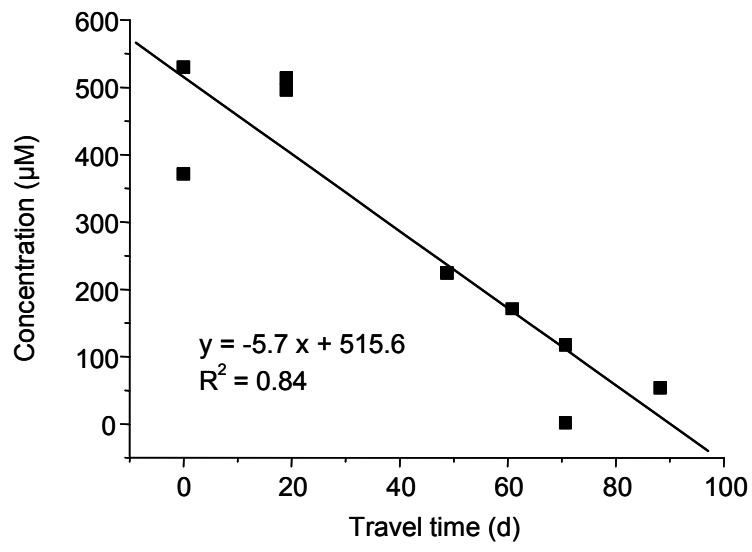


Table 1:

well	sampling depth (m below ground)	benzene (mg l <sup>-1</sup> )	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	std-dev
Z 13/00	11.9	360.9	-28.3	0.14
Z 13/00	12.8	375.5	-28.2	0.09
Z 22/00	11.3	124.2	-27.5	0.47
Z 22/00	13.1	101.5	-27.7	0.32



Table 2:

well	date	distance (m)	benzene			toluene		
			concentration (mg l <sup>-1</sup> )	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	std-dev	concentration (mg l <sup>-1</sup> )	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	std-dev
Z 9/00	May 2001	0	646.8	-28.9	0.15	50.0	-27.1	0.09
Z 2/99	May 2001	30	854.1	-28.7	0.05	23.5	-27.0	0.39
Z 8/99	May 2001	77	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Z 41/02	May 2001	96	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Z 18/00	May 2001	112	341.7	-28.8	0.26	2.6	-24.6	0.30
Z 23/00	May 2001	140	140.0	-28.1	0.15	0.6	-23.3	0.20
Z 32/02	May 2001	168	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Z 9/00	May 2002	0	746.0	-27.5	0.09	36.6	-25.7	0.30
Z 2/99	May 2002	30	701.0	-28.1	0.08	46.6	-26.2	0.33
Z 8/99	May 2002	77	322.0	-28.1	0.21	3.2	-24.9	0.41
Z 41/02	May 2002	96	460.9	-28.0	0.16	0.13	-24.4	0.21
Z 18/00	May 2002	112	318.0	-28.3	0.39	0.09	-16.6	0.28
Z 23/00	May 2002	140	354.8	n.d.	n.d.	0.08	n.d.	n.d.
Z 32/02	May 2002	168	144.5	-28.1	0.19	0.01	n.d.	n.d.

## **IN-SITU BIODEGRADATION OF TETRACHLOROETHENE AND TRICHLOROETHENE IN CONTAMINATED AQUIFERS MONITORED BY STABLE ISOTOPE FRACTIONATION**

A. VIETH<sup>a</sup>, J. MÜLLER<sup>a</sup>, G. STRAUCH<sup>a</sup>, M. KÄSTNER<sup>a</sup>, M. GEHRE<sup>a</sup>,  
R. U. MECKENSTOCK<sup>b</sup> and H. H. RICHNOW<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>UFZ Centre for Environmental Research Leipzig-Halle, 04318 Leipzig, Germany; <sup>b</sup>Eberhard-Karls University of Tübingen, Center for Applied Geoscience, Sigwartstr. 10, 72076 Tübingen, Germany

(Received 10 November 2002; In final form 22 January 2003)

Stable carbon isotope analysis of tetrachloroethene (PCE) and trichloroethene (TCE) was applied to evaluate natural attenuation processes in the upper Quaternary and lower Tertiary aquifer in the area of a former dry-cleaning plant located in Leipzig, Germany. Groundwater samples were taken during one monitoring campaign in 2001. The <sup>13</sup>C enrichment in contaminants along the water flow path suggested that both, PCE and TCE were degraded in the Quaternary aquifer. The enrichment of <sup>13</sup>C in the residual PCE fraction and an isotope fractionation factor from laboratory experiments were used to calculate the extent of biodegradation in the Quaternary aquifer. These calculations indicated that a major portion of PCE was biodegraded in the course of the plume. In the Tertiary aquifer the carbon isotope ratios of PCE and TCE indicated that the decreasing concentrations of these contaminants were probably not caused by microbial processes.

*Keywords:* Carbon isotopes; Tetrachloroethene; Trichloroethene; Isotope fractionation; Groundwater

### **INTRODUCTION**

Chlorinated ethenes such as tetrachloroethene (PCE) and trichloroethene (TCE) are some of the most widely used solvents for cleaning and degreasing purposes in the United States and are assigned as priority pollutants by the US Environmental Protection Agency [1]. Improper use, waste disposal and leaking storage facilities led to frequent contamination of aquifers by PCE and TCE. Today, these compounds belong to the most widespread groundwater contaminants being present in 38% to 42% of polluted aquifers [2]. PCE and TCE are frequently detected at former industrialised areas, especially at sites of former dry-cleaning plants.

The use of biological processes plays an important role to remediate PCE and TCE-contaminated sites. Both compounds are relatively persistent under aerobic conditions, but are microbially dechlorinated under anaerobic conditions which prevail in contaminated groundwaters [3,4]. Under anaerobic conditions, TCE and PCE can undergo reductive dechlorination to less chlorinated ethenes and ethene [5]. Evidence from field experiments has shown that *in-situ* biodegradation occurred under anaerobic conditions when additional

---

\* Corresponding author. Tel.: +49-(0)341-235-2810; Fax: +49-(0)341-235-2492; E-mail: richnow@san.ufz.de

carbon sources of anthropogenic or natural origin serve as electron donors [6] although in many cases the transformation is not complete [7].

However, the assessment of *in-situ* biodegradation in aquifers is difficult. Monitoring the decrease of contaminants over time may be insufficient because complex interaction of processes such as retardation, mixing, dispersion and biodegradation may control the concentration of contaminants in an aquifer plume, but only biodegradation leads to a sustainable contaminant reduction. A careful multidisciplinary approach including field and laboratory studies is often essential to demonstrate *in-situ* biodegradation in the field [8]. A novel approach to characterise the microbial *in-situ* degradation of organic contaminants relies on the analysis of stable carbon isotopic signatures. Microbial dechlorination of PCE and TCE is associated with carbon isotope fractionation [9–12]. By using the Rayleigh-equation, an isotope fractionation factor of  $\alpha = 1.0055$  was estimated for the reductive dechlorination of PCE [13]. The dechlorination of TCE by a facultative anaerobic consortium was associated with an isotope fractionation factor of  $\alpha = 1.0071$  [10]. TCE degradation by enrichment cultures of methanogenic consortia fall in the range between  $\alpha = 1.0066$  [11] and  $\alpha = 1.0138$  [13].

Recently, isotope fractionation factors of PCE and TCE from laboratory studies were used to estimate the extent of *in-situ* biodegradation of TCE in a contaminated aquifer [13]. Similar approaches were applied to evaluate toluene degradation in mineral oil contaminated aquifers [14] and to assess benzene and ethylbenzene degradation at a petroleum hydrocarbon contaminated field site [15, 16].

In this study, we evaluate the *in-situ* degradation of PCE and TCE in a plume down gradient of a severe contamination at the site of a former dry-cleaning plant by using the isotope composition of PCE and TCE as indicators. Groundwater samples were taken at different points of the plume and concentrations and the carbon isotope ratios of the contaminants as well as the concentrations of their possible metabolites were monitored. Previously published fractionation factors [13] were applied to assess the extent of *in-situ* biodegradation based on the shifts in carbon isotope ratios in the course of massive groundwater contamination. To our knowledge, this is the first study where a sequence of monitoring wells down gradient a PCE and TCE contamination plume was studied in an integrated approach to evaluate *in-situ* degradation.

## MATERIALS AND METHODS

### Site Description

The contaminated site is located in the area of Leipzig, Germany. The operation of a dry-cleaning plant, started in 1892, has caused severe ground water contamination by PCE and TCE as a result of leakages, sludge disposal in open dump sites without containment, and accidents. In the time period from 1939 to 1975 predominantly TCE and from 1975 to 1991 predominantly PCE were the most used chemicals. The plant was closed in 1991.

### Hydrogeological Situation

The general hydrogeological situation is characterised by a sequence of two aquifers (Fig. 1) [17]. The shallow Quaternary aquifer consists of 1 to 7 m thick fluvial sands and gravels of the Saale-Weichsel-Elster glaciation and is overlaid by clays and marls. This aquifer is slightly confined and has a hydraulic conductivity of  $8 \times 10^{-4}$  to  $3 \times 10^{-3} \text{ m s}^{-1}$ . The lower Tertiary aquifer consists of Oligocene sand layers (Bitterfelder Glimmersand) with a thickness of 4 to 18 m. The hydrology is characterised by confined conditions and a hydraulic

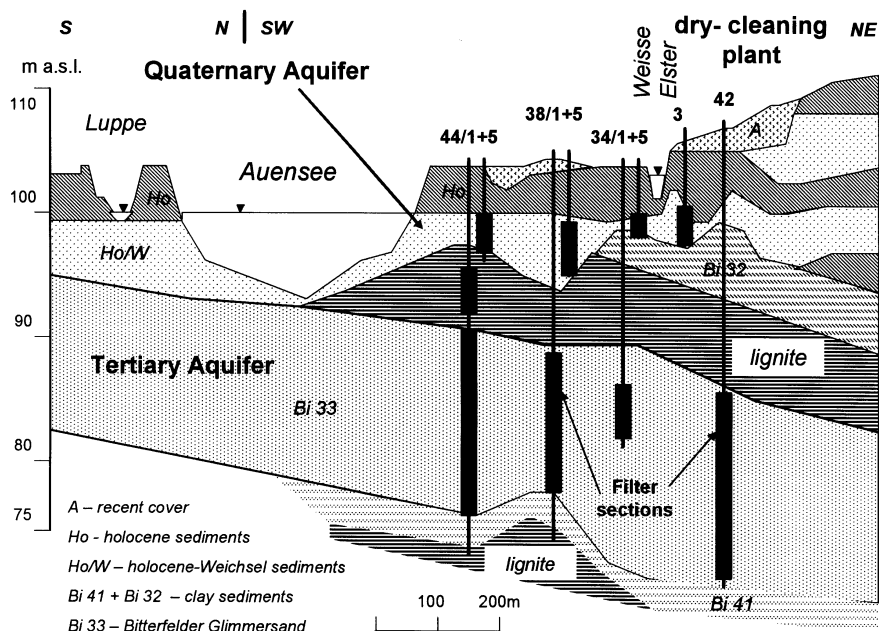


FIGURE 1 Schematic hydrogeological cross section of the field site, showing the well locations.

conductivity of  $4.6 \times 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$ . Clays and silts of low hydraulic conductivity underlay this sequence. The ground water flow direction in both aquifers is NE–SW towards the river Weisse Elster and the lake Auensee. Both aquifers are partly separated by the lignite seam Bitterfelder Oberbank and clay layers of varying thickness. However, the presence of contaminants in both aquifers implies a hydraulic connection in the source area. During sampling, pH values in both aquifers were between 6.9 and 7.3. The oxygen concentrations were below detection limit ( $<0.1 \text{ mg l}^{-1}$ ). The redox potential increased with distance from the source area, with Eh-values between  $-220 \text{ mV}$  and  $-100 \text{ mV}$  in the Quaternary aquifer and  $-160 \text{ mV}$  and  $-120 \text{ mV}$  in the deeper Tertiary aquifer. The electrical conductivity of  $1.24 \text{ mS cm}^{-1}$  to  $1.74 \text{ mS cm}^{-1}$  in the Quaternary aquifer indicated a higher load of ions than the conductivity of  $0.64 \text{ mS cm}^{-1}$  to  $0.93 \text{ mS cm}^{-1}$  in the deeper Tertiary aquifer. Nitrate concentrations were always below  $1 \text{ mg l}^{-1}$  in all groundwater samples. In the Quaternary aquifer sulphate concentrations decreased from  $428 \text{ mg l}^{-1}$  to  $224 \text{ mg l}^{-1}$  along the monitored flow path, whereas in the Tertiary aquifer sulphate is present in concentrations between  $73 \text{ mg l}^{-1}$  and  $32 \text{ mg l}^{-1}$ . The concentrations of DOC in the Quaternary aquifer were generally higher than in the Tertiary aquifer. Down gradient, the concentrations of DOC decreased in the Quaternary and Tertiary aquifer from  $11.5 \text{ mg l}^{-1}$  to  $5.7 \text{ mg l}^{-1}$  and  $7.5 \text{ mg l}^{-1}$  to  $4.0 \text{ mg l}^{-1}$ , respectively.

### Monitoring Wells

Eight monitoring wells, four wells in each aquifer, were selected for sampling of groundwater. These wells represent the groundwater flow path from the centre of the plume at the site of the former dry-cleaning plant to the fringe of the plume, located about 300 m further downstream (Fig. 2). The monitoring wells were equipped with filters through the entire depth of the aquifer.

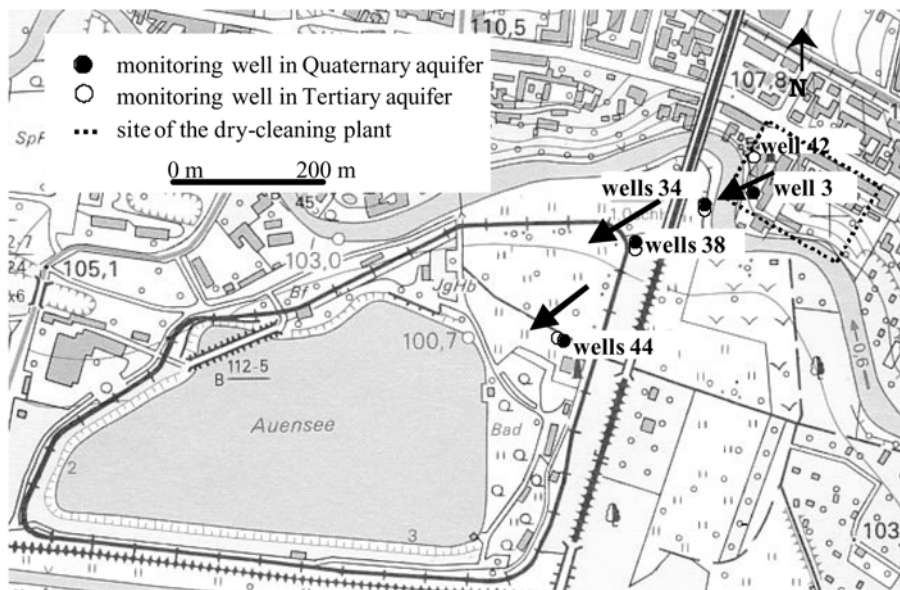


FIGURE 2 Map of the field site showing the locations of the monitoring wells (open circles = Tertiary aquifer; filled circles = Quaternary aquifer). Arrows indicate the groundwater flow path.

### Sampling

Groundwater samples were taken during one groundwater monitoring campaign in 2001 with a submersible pump (MP1, Grundfos<sup>®</sup>, Germany) according to good sampling practice [18]. Field parameters such as temperature, electrical conductivity, pH, redox potential and oxygen content were measured with an electrode array (MultiLine P4, WTW, Germany) during sampling.

### Chemicals

All chemicals and organic solvents were obtained in analytical quality from Merck (Germany).

### DOC Analysis

Dissolved organic carbon analysis was performed with a DOC-Analyser (Shimadzu 5050, Shimadzu, Japan). Dissolved carbonates were removed by acidification of the water sample to pH 2 with hydrochloric acid before DOC determination.

### GC Analysis

Quantification of chlorinated ethenes was conducted using a GC system (Star 3400 CX, Varian, USA) equipped with an autosampler (8200 CX, Varian, USA) and a flame ionization detector. Solid phase microextraction (SPME) of headspace samples was applied for the analytes. The SPME fibre (85 µm polyacrylate film) was equilibrated in a 15 ml headspace vial filled with 10 ml water sample for 25 min. The fibre was desorbed in the injector (1078 Universal Capillary Injector, Varian, Germany) at 250 °C in split/splitless mode. For separation of target compounds a capillary column (DB5, 30 m × 0.32 mm, 1.0 µm

film thickness, J&W Scientific, USA) was used with hydrogen as carrier gas. The oven temperature was initially set to 40 °C for 5 min. The temperature was then increased with 10 °C min<sup>-1</sup> to 190 °C and was kept constant at 190 °C for 5 min. PCE and TCE concentrations were measured with 2 to 3 replicates, whereas *cis*-1,2-DCE concentration was determined in samples of the Quaternary aquifer without repetition.

### Extraction of Groundwater for Isotope Analysis

One litre flasks with Teflon lined screw caps were nearly completely filled with groundwater and immediately extracted with 2 to 5 ml of *n*-pentane. The flasks were shaken on a rotary shaker for 2 h at 20 °C and were cooled down to 5 °C before the *n*-pentane phase was sampled to avoid evaporation. The *n*-pentane phase was stored at 5 °C until GC-C-IRMS analysis.

### GC-C-IRMS Measurements

The carbon isotope composition of the chlorinated compounds was measured with a GC-C-IRMS (gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry) system. Aliquots (0.5 to 5 µl) of the extracts were injected into the GC (Agilent 6890, Agilent Technology, USA) in splitless mode and separated on a capillary column (ZB1 60 m × 0.32 mm, 1.0 µm film thickness, Phenomenex Inc., USA). The injector temperature was set to 250 °C. The oven temperature was initially set to 40 °C and held for 6 min. The temperature was then increased at a rate of 6 °C min<sup>-1</sup> to 200 °C. The GC unit was connected to a combustion device (GC-III, FINNIGAN MAT, Germany) with a modified water removal assembly (Nafion<sup>®</sup> membrane) coupled to a FINNIGAN MAT 252 mass spectrometer (FINNIGAN MAT, Germany). Organic substances in the GC effluent stream were oxidised to CO<sub>2</sub> in the combustion furnace held at 980 °C on a CuO/Ni/Pt catalyst and were transferred online via open split to the isotope ratio mass spectrometer to determine <sup>13</sup>C/<sup>12</sup>C ratios of CO<sub>2</sub>. The instrument was calibrated using a reference gas (CO<sub>2</sub>) with known isotopic composition. All samples were measured in at least 5 replicates. The standard deviations of the δ<sup>13</sup>C values obtained were below ±0.6‰.

### Calculations

The carbon isotope composition is reported in the δ notation (per mill) relative to Vienna Pee Dee Belemnite standard (V-PDB) [19] according to Eq. (1).

$$\delta^{13}\text{C}[\text{‰}] = \left( \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{Sample}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{Standard}}} - 1 \right) \times 1000 = \left( \frac{R_{\text{Sample}}}{R_{\text{Standard}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (1)$$

Isotope fractionation associated with microbially mediated degradation of chlorinated ethenes can be described by the Rayleigh-equation [Eq. (2)] [20].

$$\frac{R_t}{R_0} = \left( \frac{C_t}{C_0} \right)^{[(1/\alpha)-1]} \quad (2)$$

$R_t$  and  $R_0$  give the isotope compositions of the contaminant at times  $t$  and zero,  $C_t$  and  $C_0$  represent the concentrations of the compound at times  $t$  and zero, respectively. The isotope fractionation factor  $\alpha$  relates the change in the isotope composition to changes in concentration of the residual fraction during the transformation.

The percentage of biodegradation ( $B$ ) of the residual substrate fraction is an index to describe the progress of a reaction by applying the isotope fractionation factor ( $\alpha$ ) and the

isotope composition of a substrate at the beginning of the reaction ( $R_0$ ) and the change in the isotope composition during the transformation reaction [Eq. (3)] [14].

$$B = \left[ 1 - \left( \frac{R_t}{R_0} \right)^{1/((1/\alpha)-1)} \right] \times 100 \quad (3)$$

The concentration of the remaining substrate fraction ( $C_t$ ) can be calculated using the isotope fractionation factor ( $\alpha$ ), the concentration at the beginning of the transformation process ( $C_0$ ) and the change in the isotopic composition during the reaction [Eq. (4)].

$$C_t = C_0 \times \left( \frac{R_t}{R_0} \right)^{1/((1/\alpha)-1)} \quad (4)$$

The calculations shown here are based on the changes of concentrations and the carbon isotope ratios over time. In a contaminant plume, the concentration and the carbon isotope ratio of the contaminants vary over time according to the degradation rate of the contaminants and their retention time required to travel along the water flow path. Thus, the Rayleigh-equation can be used to describe the *in-situ* biodegradation at a contaminated site when (I) the source area of the plume is isotopically homogeneous, (II) the leachate of the source is constant in concentration and carbon isotope ratio and (III) the water flow path is known.

## RESULTS

The source area of the contamination in the Quaternary aquifer (well 3) was characterised by PCE and TCE concentrations of 168 and 45 mg l<sup>-1</sup>, whereas in the source area of the Tertiary aquifer (well 42) PCE and TCE were detected in concentrations of 138 and 54 mg l<sup>-1</sup>, respectively (Tab. I). The relative concentration of TCE compared to PCE was slightly higher in the Tertiary aquifer. The *cis*-1,2-DCE concentration increased slightly from 13.5 to 19.0 mg l<sup>-1</sup> in well 42/1 and then decreased to 11.0 mg l<sup>-1</sup> in monitoring well 44/1 in the Quaternary aquifer, whereas in the Tertiary aquifer the *cis*-1,2-DCE concentration was almost constant between 1.9 and 2.1 mg l<sup>-1</sup> on the water flow path. The carbon isotope composition of PCE in the source area of the Quaternary (-27.0‰) and Tertiary aquifers (-27.4‰) were similar. In the source area of both aquifers, the carbon isotope compositions of TCE were almost identical (Quaternary aquifer: -26.2‰; Tertiary aquifer: -26.0‰). Thus, although there were some

TABLE I Concentrations of PCE, TCE and *cis*-1,2-DCE with Standard Deviations (S.D.) in Groundwater of Wells from the Quaternary and Tertiary Aquifer; Concentrations of *cis*-1,2-DCE in Samples of Quaternary Aquifer were Measured Without Replicates.

	PCE (mg l <sup>-1</sup> )	S.D.	TCE (mg l <sup>-1</sup> )	S.D.	<i>cis</i> -DCE (mg l <sup>-1</sup> )	S.D.
Well 3	168.20	7.70	44.88	1.67	13.47	
Well 34/1	4.37	0.07	4.56	0.09	19.00	
Well 38/1	1.07	0.11	3.30	0.06	15.26	
Well 44/1	0.78	0.12	1.69	0.05	11.03	
Well 42	137.75	1.83	54.33	0.55	2.09	0.07
Well 34/5	3.74	0.22	3.05	0.04	1.88	0.03
Well 38/5	80.16	0.78	17.92	0.31	1.96	0.09
Well 44/5	15.07	0.98	6.57	0.30	2.06	0.06

differences in the concentrations of PCE and TCE in both aquifers, the carbon isotope compositions suggest an isotopically homogeneous source of these contaminants.

In the Quaternary aquifer PCE concentrations decreased from  $168 \text{ mg l}^{-1}$  in the centre of the plume to  $0.8 \text{ mg l}^{-1}$  along the water flow direction (Fig. 3A). The decrease in PCE concentration

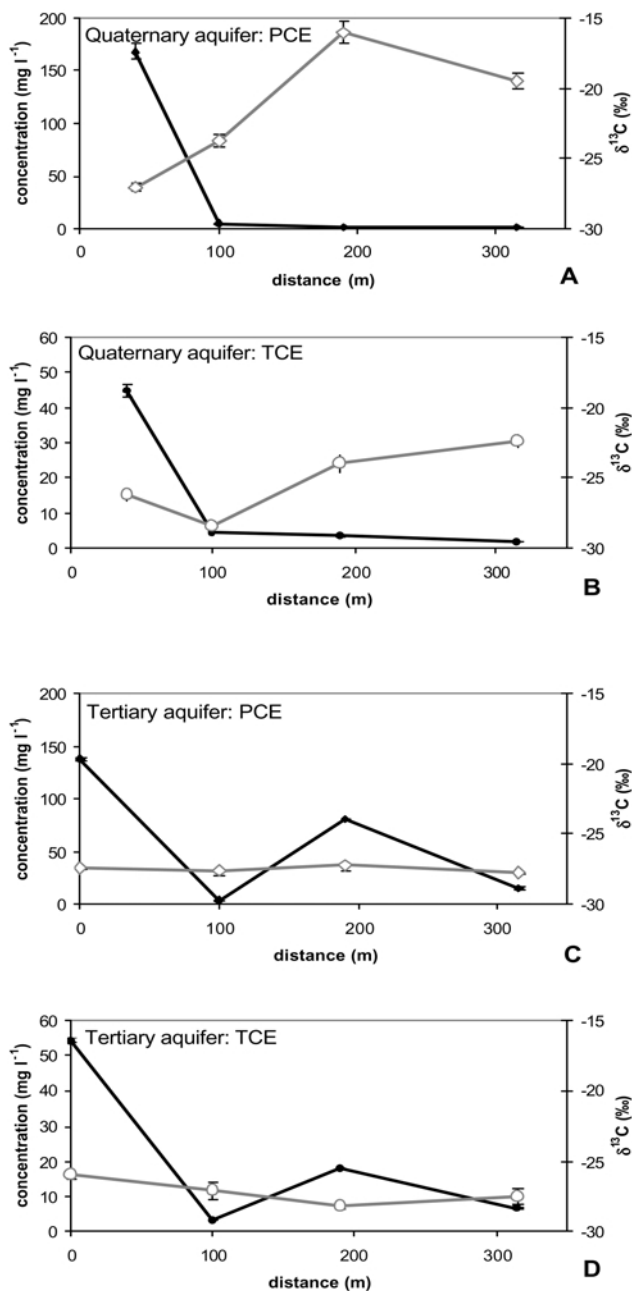


FIGURE 3 Monitoring profile showing the concentrations (filled symbols) and carbon isotope ratios (open symbols) of PCE (diamonds) and TCE (circles) along the groundwater flow path. A and B depict the data from the monitoring wells 3, 34/1, 38/1 and 44/1 in the Quaternary aquifer. C and D depict the data from wells 42, 34/5, 38/5 and 44/5 in the Tertiary aquifer.



along the monitoring profile was accompanied by an enrichment of  $^{13}\text{C}$  in the residual contaminant fraction by about 11‰ (Fig. 3A). The TCE concentration decreased from  $45\text{ mg l}^{-1}$  to  $1.7\text{ mg l}^{-1}$  along the water flow path and was associated with an increase in  $\delta^{13}\text{C}$  by 4‰ (Fig. 3B). Surprisingly, in the second monitoring well 34/1 a  $\delta^{13}\text{C}$  value of  $-28.5\text{‰}$  was found for TCE, corresponding to a depletion of about 2.3‰ as compared to the source area.

In the Tertiary aquifer the concentrations of both compounds did not decrease steadily along the groundwater flow path (Fig. 3C, D). The  $\delta^{13}\text{C}$  values of PCE remained relatively constant at  $-27.5\text{‰}$  ( $\pm 0.17$ ) along the monitoring profile (Fig. 3C). The  $\delta^{13}\text{C}$  values of TCE varied between  $-26.0\text{‰}$  and  $-28.2\text{‰}$ , with the lowest value occurring at the third well (38/5) along the water flow path (Fig. 3D). The decrease of the PCE and TCE concentrations was not associated with a significant enrichment of  $^{13}\text{C}$ .

Isotope fractionation during biodegradation can be described by the Rayleigh-equation [Eq. (2)] where the isotope fractionation factor ( $\alpha$ ) describes the relation between concentration and isotope composition during the degradation reaction. A good correlation between the decreasing concentration and the enrichment of  $^{13}\text{C}$  in the contaminant indicates a biological transformation reaction along the groundwater flow path. The slope of the linear regression curve shows the extent of isotope fractionation.

The concentration and isotope composition of PCE in well 3 of the Quaternary aquifer were used as source area values ( $C_0 = 168.2\text{ mg l}^{-1}$ ,  $R_0 = -27.0\text{‰}$ ). The sample of this well contained the highest concentration as well as the most depleted  $\delta^{13}\text{C}$  value of PCE along the profile implying that this PCE fraction has undergone the least biodegradation.

Concentrations and isotope signatures of PCE in the Quaternary aquifer along the monitoring transect were used as  $C_t$  and  $R_t$  to analyse the degradation reaction. When plotting the natural logarithms of  $C_t/C_0$  and  $R_t/R_0$  according to the Rayleigh-equation, the correlation between concentration and isotopic composition gave a reasonable level of confidence ( $R^2 = 0.77$ ) (Fig. 4). From the slope of the linear regression curve an isotope fractionation factor for the *in-situ* dechlorination of PCE along the monitoring profile was calculated and gives the field fractionation factor  $\alpha_f = 1.0017$ . The decrease in concentration ( $C_t/C_0$ ) is a result of all processes affecting concentration such as dilution, sorption and biodegradation, however, only the latter can change the isotope composition. The correlation between

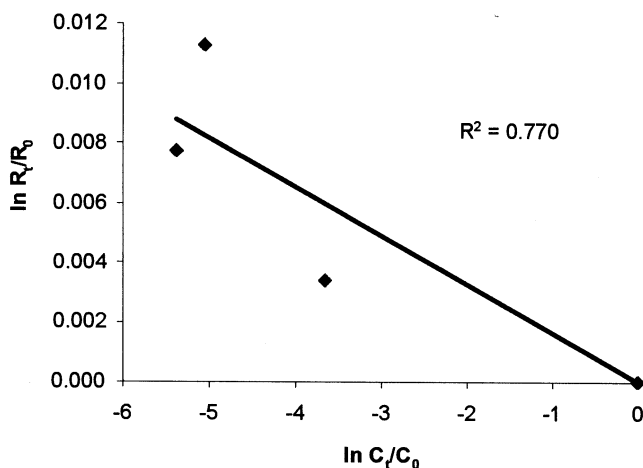


FIGURE 4 Correlation of carbon isotope ratios and concentrations of PCE in the Quaternary aquifer according to the Rayleigh-equation. The concentration and isotope composition of PCE in well 3 was used as  $C_0$  and  $R_0$ .  $C_t$  and  $R_t$  depict the respective concentrations and carbon isotope ratios down gradient of the first well.

TABLE II Concentrations ( $C$ ), Percentage of Biodegradation ( $B$ ) and Calculated Residual Concentrations ( $C_r$ ) of PCE in the Shallow Aquifer. The Isotope Fractionation Factor  $\alpha = 1.0055$  Obtained from Ref. [13] was Used in these Calculations.

Well	$C$ ( $\text{mg l}^{-1}$ )	$B$ [%]	$C_r$ ( $\text{mg l}^{-1}$ )
3/I	168.2	0	168.2
34/I	4.4	46	90.8
38/I	1.1	87	21.5
44/I	0.8	76	40.8

concentration and isotope composition of TCE in the Quaternary aquifer was analysed with the Rayleigh-equation, but gave a low level of confidence ( $R^2 = 0.23$ ) (data not shown). This was mainly caused by data of well 34/1, where a low concentration and an enrichment of the light isotope were measured.

The percentage of biodegradation and theoretical concentrations of PCE in the Quaternary aquifer were calculated by applying the Rayleigh equation [Eqs. (3) and (4)]. The change in the isotope composition down gradient ( $R_t$ ) was employed to calculate the percentage of biodegradation ( $B$ ) as a qualitative index for *in-situ* biodegradation assuming that the isotope ratio of PCE in well 3 represents the isotope composition of the source ( $R_0$ ). For the calculation, the published isotope fractionation factor ( $\alpha = 1.0055$ ) of microbial PCE degradation with an enrichment culture was used [13]. Along the selected water flow path, the percentage of biodegradation increased to 46%, 87% and 76% (Tab. II).

With the further assumption that the PCE concentration in well 3 was representative for the source area ( $C_0$ ), removal of this contaminant was quantified using the alteration in the isotope composition and the isotope fractionation factor ( $\alpha$ ) [Eq. (4)]. The calculated values ( $C_r$ ) gave the residual concentrations that were expected if concentration was only influenced by biodegradation. The residual concentrations calculated for PCE were  $90.8 \text{ mg l}^{-1}$ ,  $21.5 \text{ mg l}^{-1}$  and  $40.8 \text{ mg l}^{-1}$  at the wells 34/1, 38/1 and 44/1, respectively (Tab. II).

## DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The decrease in PCE and TCE concentration in the Quaternary aquifer was accompanied by an enrichment of  $^{13}\text{C}$  in the residual contaminant fraction by about 11 and 4‰, respectively, indicating *in-situ* biodegradation. In the Tertiary aquifer, the decrease of PCE and TCE concentrations was not associated with a significant enrichment of  $^{13}\text{C}$  and thus, no evidence for *in-situ* biodegradation was found by means of the isotopic composition. *Cis*-1,2-DCE can be formed during the reductive dehalogenation of PCE to a certain extent [3]. Elevated *cis*-1,2-DCE concentrations in the Quaternary aquifer and the slight increase in *cis*-1,2-DCE in the sample of the second monitoring well may indicate reductive dehalogenation processes in the zone near the source area. In contrast, in the Tertiary aquifer *cis*-1,2-DCE concentrations were significantly lower and nearly constant on the water flow path providing no evidence for reductive dehalogenation. In addition to interpreting possible precursor-product relationships of the contaminant pattern, our results and results from previous investigations [13] implied that the carbon isotope composition of the contaminants can be used to verify concentration data with respect to the assessment of *in-situ* biodegradation.

A previous study showed that the extent of TCE *in-situ* degradation can be calculated using its carbon isotope signatures [13]. However, only one monitoring well was tested

using this approach. In our study, a water flow path stretching about 300 m down gradient a contamination plume was investigated showing that this approach may be applied to a complex field situation.

A prerequisite for the application of isotope fractionation techniques to assess biodegradation is the presence of an isotopically homogeneous source of the contaminant and the absence of other processes than *in-situ* biodegradation that may alter the isotope composition of contaminants in the aquifer.

Variation of the carbon isotope composition of PCE and TCE, produced by different manufacturers, was reported by van Warmerdam and coworkers [21]. They found carbon isotope signatures of PCE and TCE in the range of  $-37.2$  to  $-23.2\text{‰}$  and  $-31.9$  to  $-27.8\text{‰}$ , respectively. Thus, the variability in carbon isotope compositions may allow differentiation between sources of contaminants, if no secondary processes have altered the isotope composition. At the investigation area, the  $\delta^{13}\text{C}$  values of PCE ( $-27.0$  to  $-27.4\text{‰}$ ) and TCE ( $-26.0$  to  $-26.2\text{‰}$ ) in the source area of both aquifers agree with the above mentioned range of isotope composition of PCE and TCE containing solvents. The almost identical carbon isotope compositions of PCE and TCE in the Quaternary and Tertiary aquifer provided evidence for a common, isotopically homogeneous source of each compound in the contaminant plume.

Sorption and dilution may influence the concentration of contaminants in the aquifer but are unlikely to affect their carbon isotope compositions [22, 23]. Thus, the enrichment in  $^{13}\text{C}$  along the water flow path can be used as an indicator for *in-situ* biodegradation. At the field site the shift of the carbon isotope compositions of PCE in the Quaternary aquifer clearly indicates *in-situ* biodegradation. In contrast, the isotope compositions of PCE and TCE in the Tertiary aquifer were almost constant, providing no isotopic evidence for *in-situ* biodegradation.

To demonstrate that *in-situ* biodegradation is a relevant sink for contaminants in the Quaternary aquifer the correlation between concentration and isotopic composition was analysed with the Rayleigh-equation (Fig. 4). The level of confidence of this correlation describes the association of the isotope fractionation process with microbial degradation in the field. The slope of the regression curve indicates the extent of isotope fractionation and gives the field isotope fractionation factor  $\alpha_f$ . In aquifers, the isotope composition of the contaminant is mainly affected by biodegradation, whereas the concentration can also be influenced by dilution and sorption to the aquifer matrix which does not alter the isotope composition of contaminants. Therefore, the isotope fractionation factor  $\alpha_f$ , derived from field data should be smaller than fractionation factors obtained in laboratory biodegradation experiments. Indeed, the fractionation factor ( $\alpha_f = 1.0017$ ) for PCE degradation in the contaminated aquifer was significantly lower than the fractionation factor for reductive dechlorination ( $\alpha = 1.0055$ ) in laboratory studies [13], suggesting that processes such as dilution with pristine water or sorption to the aquifer matrix influenced the concentration of PCE in the Quaternary aquifer. However,  $\alpha_f$  is useful to show the correlation between concentration and carbon isotope composition but cannot be used for the quantitative assessment of *in-situ* biodegradation. The concentrations and carbon isotope compositions of TCE in the Quaternary aquifer showed no significant relation when they were evaluated using the Rayleigh-equation. TCE in well 34/1 was more depleted in  $^{13}\text{C}$  than in the source area (well 3). Neither biological degradation nor physical alteration of TCE likely explains the depletion of  $^{13}\text{C}$  within the aquifer. This suggests that TCE at this well may originate from additional sources.

It may be assumed that  $^{13}\text{C}$  depleted TCE was added on the groundwater flow path, excluding quantitative assessment of the *in-situ* biodegradation. It is not unlikely that isotopically depleted TCE may be leached from an additional TCE source, because (I) the

isotope composition of TCE at well 34/1 fell in the range of carbon isotope signatures found in commercial TCE [20] and (II) historical investigation showed that TCE was used as a solvent in the dry-cleaning plant for an operation period of 36 years. TCE may also be produced during *in-situ* biodegradation via a reductive dechlorination of PCE [5] leading to a depletion in  $^{13}\text{C}$  compared to the PCE [9]. With the limited number of monitoring wells and data currently available it is not possible to evaluate if TCE may have been added from additional sources or from the dehalogenation of PCE.

The percentage of biodegradation ( $B$ ) illustrates the removal of contaminants by *in-situ* biodegradation and characterises the zones of *in-situ* biodegradation in this particular aquifer. The calculation of  $B$  requires that the isotope composition of the source ( $R_0$ ) is representative for the plume.  $B$  is not related to concentration and, thus, not quantitative in terms of concentration.  $B$  is calculated by using the difference in isotope composition between source area and marginal parts of the plume and describes the relative amount of contaminant removal caused by *in-situ* biodegradation which is needed to alter the isotope composition. Because the isotope composition is unlikely to be affected by sorption and dilution the index  $B$  describes *in-situ* biodegradation independent of other processes which may alter the concentration of contaminants. Therefore, this index can also be applied when a representative concentration of a contaminant source cannot be obtained or when the precise water flow path is unknown.

In the Quaternary aquifer, the calculated residual concentration ( $C_r$ ) was significantly higher than the concentration of PCE in the monitoring wells, suggesting that other concentration diminishing processes such as dilution and sorption are important on this field site. However, quantification of the contaminant removal by *in-situ* biodegradation presumes that the concentration of the source ( $C_0$ ) is representative for the water flow path. This presumption is not an easy task because in practice, site investigation only allows the installation of a limited number of monitoring wells and, thus, a ground water model showing the precise water flow path is missing. Nevertheless, the calculation of contaminant removal may be a useful approach to estimate the extent of *in-situ* biodegradation for risk assessment operations.

### **Acknowledgement**

The authors would like to thank two anonymous reviewers for their valuable criticism and corrections. We are grateful for the financial support of the BMBF: grant 02WT0022.

### **References**

- [1] Doherty, R. E. (2000). A history of the production and use of carbon tetrachloride, tetrachloroethylene, trichloroethylene and 1,1,1-trichloroethane in the United States: Part I – Historical background; carbon tetrachloride and tetrachloroethylene. *Journal of Environmental Forensics*, **1**, 69–81.
- [2] Teutsch, G., Grathwohl, P. and Schiedek, T. (1997). Literaturstudie zum natürlichen Rückhalt/Abbau von Schadstoffen im Grundwasser. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg. <http://www.uvm.baden-wuerttemberg.de/alfaweb/index.html>.
- [3] Maymo-Gatell, X., Chien, Y.-T., Gossett, J. M. and Zinder, S. H. (1997). Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science*, **226**, 1568–1571.
- [4] Holliger, C., Wohlfarth, G. and Diekert, G. (1999). Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, **22**, 383–398.
- [5] Maymo-Gatell, X., Anguish, T. and Zinder, S. H. (1999). Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1,2-dichloroethane by *Dehalococcoides ethenogenes*. *Appl. Environ. Microb.*, **65**, 3108–3113.
- [6] Wiedemeier, T. H., Swanson, M. A., Moutoux, D. E., Gordon, E. K., Wilson, J. T., Wilson, B. T., Kampbell, D. H., Haas, P. E., Miller, R. N., Hansen, J. E. and Chapelle, F. H. (1998). Technical Protocol for evaluating natural attenuation of chlorinated solvents in ground water. [www.epa.gov/ada/download/reports/protocol.pdf](http://www.epa.gov/ada/download/reports/protocol.pdf).
- [7] Vogel, T. M., Criddle, C. S. and McCarty, P. L. (1987). Transformations of halogenated aliphatic compounds. *Environ. Sci. Technol.*, **21**, 722–736.

- [8] Skubal, K. L., Barcelona, M. J. and Adriaens, P. (2001). An assessment of natural biotransformation of petroleum hydrocarbons and chlorinated solvents at an aquifer plume transect. *J. Contam. Hydrol.*, **49**, 151–169.
- [9] Hunkeler, D., Aravena, R. and Butler, B. J. (1999). Monitoring microbial dechlorination of tetrachloroethene (PCE) in groundwater using compound-specific stable carbon isotope ratios: Microcosm and field studies. *Environ. Sci. Technol.*, **33**, 2733–2738.
- [10] Lollar, B., Slater, G. F., Ahad, J., Sleep, B., Spivack, J., Brennan, M. and MacKenzie, P. (1999). Contrasting carbon isotope fractionation during biodegradation of trichloroethylene and toluene: Implications for intrinsic bioremediation. *Org. Geochem.*, **30**, 813–820.
- [11] Bloom, Y., Aravena, R., Hunkeler, D., Edwards, E. and Frappe, S. K. (2000). Carbon isotope fractionation during microbial dechlorination of trichloroethene, *cis*-1,2-dichloroethene, and vinyl chloride: Implications for assessment of natural attenuation. *Environ. Sci. Technol.*, **34**, 2768–2772.
- [12] Barth, J. A. C., Slater, G., Bill, M., Downey, A., Larkin, M. and Kalin, R. M. (2002). Carbon isotope fractionation during aerobic biodegradation of trichloroethene by *Burkholderia cepacia* G4: A tool to map degradation mechanisms. *Appl. Environ. Microb.*, **68**, 1728–1734.
- [13] Lollar, B., Slater, G. F., Sleep, B., Witt, M., Klecka, G. M., Harkness, M. and Spivack, J. (2001). Stable carbon isotope evidence for intrinsic bioremediation of tetrachloroethene and trichloroethene at Area 6, Dover Air Force Base. *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 261–269.
- [14] Meckenstock, R. U., Morasch, B., Kästner, M., Vieth, A. and Richnow, H. H. (2002). Assessment of bacterial degradation of aromatic hydrocarbons in the environment by analysis of stable carbon isotope fractionation. *Water, Air, Soil Poll., Focus*, **2**(3), 141–152.
- [15] Mancini, S. A., Lacrampe-Couloume, G., Jonker, H., Van Breukelen, B. M., Groen, J., Volkering, F. and Lollar, B. S. (2002). Hydrogen isotopic enrichment: An indicator of biodegradation at a petroleum hydrocarbon contaminated field site. *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 2464–2470.
- [16] Richnow, H. H., Vieth, A., Kästner, M., Gehre, M. and Meckenstock, R. U. (2002). Isotope fractionation of toluene: A perspective to characterise microbial in situ degradation. *The Scientific World Journal*, **2**, 1227–1234.
- [17] Müller, J. (2001). Hydrogeologische, hydro- und isopenchemische Untersuchungen im kontaminierten Grundwasserbereich des Auensees, Stadtgebiet Leipzig – Berichtsteil. TU Dresden, Fakultät für Forst-, Geo- und Hydrowissenschaften, Diplomarbeit, unveröffentlicht.
- [18] DVWK (Deutscher Verband für Wasserwirtschaft und Kulturbau e.V.) (1997). Tiefenorientierte Probenahme aus Grundwassermessstellen. DVWK-Merkblatt 245.
- [19] Anonymous (1995). IAEA-TECHDOC-825, International Atomic Energy Agency, Vienna.
- [20] Slater, G. F., Sherwood Lollar, B., Sleep, B. E. and Edwards, E. A. (2001). Variability in carbon isotopic fractionation during biodegradation of chlorinated ethenes: Implications for field applications. *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 901–907.
- [21] van Warmerdam, E. M., Frappe, S. K., Aravena, R., Drimmie, R. J., Flatt, H. and Cherry, J. A. (1995). Stable chlorine and carbon isotope measurements of selected chlorinated organic solvents. *Appl. Geochem.*, **10**, 547–552.
- [22] Slater, G. F., Ahad, J. M. E., Lollar, B. S., Allen-King, R. and Sleep, B. (2000). Carbon isotope effects resulting from equilibrium sorption of dissolved VOCs. *Anal. Chem.*, **72**, 5669–5672.
- [23] Dempster, H. S., Lollar, B. S. and Feenstra, S. (1997). Tracing organic contaminants in groundwater: A new methodology using compound-specific isotopic analysis. *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 3193–3197.