

**Charakterisierung des mikrobiellen
Schadstoffabbaus in kontaminierten
Grundwasserleitern mit Hilfe
stabiler Isotope**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität

zu Kiel

vorgelegt von

Anko Fischer

Kiel, 2006

Referent: Prof. Dr. Andreas Dahmke

Korreferent: Dr. habil. Hans-Hermann Richnow

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2006

Zum Druck genehmigt: 15.11.2006

gezeichnet: Prof. Dr. Jürgen Grotemeyer, Dekan

INHALTSVERZEICHNIS

Tabellenverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Kurzfassung.....	XV
Abstract.....	XVII
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Hintergrund.....	1
1.2 Substratspezifische Isotopenfraktionierung von Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopen zur Analyse des <i>in situ</i>-Abbaus organischer Schadstoffe.....	3
1.2.1 Einführung.....	3
1.2.2 Probenahme und Extraktion von Schadstoffen aus Grundwasser.....	4
1.2.3 Verfahrensprinzip sowie methodische Grundlagen der Isotopenanalyse.....	6
1.2.4 Mikrobielle Isotopenfraktionierung und Grundlagen für Berechnungen.....	8
1.2.5 Einflussfaktoren der mikrobiellen Isotopenfraktionierung.....	10
1.2.6 Abschätzung des mikrobiellen <i>in situ</i> -Schadstoffabbaus mit Hilfe der Isotopenfraktionierung.....	11
1.2.7 Abiotische Isotopeneffekte in kontaminierten Grundwasserleitern.....	12
1.2.8 Wahl eines geeigneten Isotopenfraktionierungsfaktors.....	14
1.2.9 Validierung des Konzeptes zur Quantifizierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus anhand der Isotopenfraktionierung.....	15
1.3 Einsatz isotopisch markierter Verbindungen zur Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus im Rahmen von Tracerversuchen.....	16
1.4 Arbeitsziele und Kooperationen.....	18
2 CHARAKTERISIERUNG DES MIKROBIELLEN SCHADSTOFFABBAUS MIT HILFE VON ISOTOPENCHEMISCHEN METHODEN.....	20
2.1 Kurzfassung.....	20
2.2 Abstract.....	21
2.3 Einführung.....	21
2.4 Material und Methoden.....	23
2.4.1 Probenahme.....	23
2.4.2 Sulfatkonzentrationen.....	24
2.4.3 Schwefelisotopenverhältnisse des Sulfats.....	24
2.4.4 DIC-Konzentrationen.....	25
2.4.5 Methankonzentrationen.....	25
2.4.6 Kohlenstoffisotopenverhältnisse des Methans und DIC.....	25
2.4.7 Benzolkonzentrationen.....	26
2.4.8 Kohlenstoffisotopenverhältnisse des Benzols.....	26
2.4.9 Chemikalien.....	27

2.4.10 Berechnungen.....	27
2.5 Resultate und Diskussion.....	30
2.5.1 Hydrogeologie und Geochemie des Referenztestfeldes Zeit.....	30
2.5.2 Konzentrationen und Schwefelisotopenverhältnisse des Sulfats.....	31
2.5.3 Konzentrationen und Kohlenstoffisotopenverhältnisse des DIC.....	32
2.5.4 Konzentrationen und Kohlenstoffisotopenverhältnisse des Methans.....	35
2.5.5 Abschätzung des mikrobiellen Benzolabbaus anhand der Isotopenfraktionierung.....	37
2.5.6 Charakterisierung der vertikalen Variabilität isotopen- und hydrogeochemischer Parameter innerhalb der Schadstofffahne.....	39
2.6 Schlussfolgerung.....	41
2.7 Danksagung.....	42
3 ANALYSE DES ANAEROBEN BENZOLABBAUS: VERGLEICH VON IN SITU-MIKROKOSMEN, ELEKTRONENAKZEPTORBILANZEN UND ISOTOPENFRAKTIONIERUNGSPROZESSEN.....	43
3.1 Kurzfassung.....	43
3.2 Abstract.....	43
3.3 Einleitung.....	44
3.4 Material und Methoden.....	46
3.4.1 Isotopen-markierte Substanzen und Chemikalien.....	46
3.4.2 Standortbeschreibung.....	46
3.4.3 Tiefenorientierte Grundwasserbeprobung.....	47
3.4.4 Analytik der Grundwasserproben.....	48
3.4.5 Herstellung der BACTRAPs.....	48
3.4.6 Beladung der BACTRAPs.....	49
3.4.7 Einbau in die Grundwassermessstelle.....	50
3.4.8 Probenaufbereitung.....	50
3.4.9 Identifikation der Fettsäuremethylester (FAME) mittels GC-MS.....	50
3.4.10 Analyse der Kohlenstoffisotopenverhältnisse der FAME mittels GC-C-IRMS.....	51
3.4.11 Berechnungen.....	51
3.5 Ergebnisse.....	54
3.5.1 Geochemie.....	54
3.5.2 Ergebnisse der tiefenorientierten Untersuchungen mit den BACTRAPs.....	60
3.6 Diskussion.....	62
3.6.1 Geochemie.....	62
3.6.2 BACTRAP.....	63
3.7 Zusammenfassung.....	64
3.8 Danksagung.....	65
4 A MULTITRACER TEST PROVING THE RELIABILITY OF RAYLEIGH EQUATION-BASED APPROACH FOR ASSESSING BIODEGRADATION IN A BTEX-CONTAMINATED AQUIFER.....	66
4.1 Abstract.....	66

4.2	Introduction.....	67
4.3	Materials and methods.....	69
4.3.1	Field site.....	69
4.3.2	Injection of tracers and sampling	70
4.3.3	Calculations	70
4.4	Results and discussion	75
4.4.1	Retardation of the deuterated toluene species	75
4.4.2	Toluene biodegradation pathway	77
4.4.3	Quantification of deuterated toluene biodegradation	79
4.5	Acknowledgments.....	84
5	APPLICABILITY OF STABLE ISOTOPE FRACTIONATION ANALYSIS FOR THE CHARACTERISATION OF BENZENE BIODEGRADATION IN A BTEX-CONTAMINATED AQUIFER	85
5.1	Abstract.....	85
5.2	Introduction.....	86
5.3	Materials and methods.....	87
5.3.1	Field site.....	87
5.3.2	Theoretical background	89
5.4	Results and discussion	93
5.4.1	Hydrogeochemical conditions and isotope fractionation in the investigated aquifer.....	93
5.4.2	Determination of benzene biodegradation pathways by isotope signatures.....	96
5.4.3	Quantification of benzene biodegradation	96
5.5	Implication for the application of stable isotope fractionation analysis at field sites	102
5.6	Acknowledgments.....	103
6	SCHLUSSFOLGERUNGEN ZUR VERWENDUNG STABILER ISOTOPEN BEI DER UNTERSUCHUNG DES MIKROBIELLEN SCHADSTOFF- ABBAUS.....	104
6.1	Beurteilung der substratspezifischen Isotopenfraktionierung zur Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus	104
6.2	Beurteilung des Isotopenverhältnisses von Mineralisierungsprodukten und Elektronenakzeptoren zur Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus	108
6.3	Beurteilung des Einsatzes von BACTRAPs zur Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus	109
6.4	Ausblick.....	110
7	LITERATURVERZEICHNIS	111

DANKSAGUNG**EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG****LEBENS LAUF****PUBLIKATIONS LISTE****ANHANG**

- A: Multi component-reactive tracer test for the implementation of enhanced *in situ*-bioremediation at a BTEX-contaminated megasite**

- B: Konzept zur Quantifizierung des anaeroben *in situ*-Schadstoffabbaus in BTEX-kontaminierten Grundwasserleitern mittels Deuterium-markierter Substanzen**

- C: Simulation of a reactive tracer experiment using stochastic hydraulic conductivity fields**

- D: Nachweis des mikrobiellen Schadstoffabbaus in Grundwasserleitern**

- E: Assessment of microbial *in situ*-activity in contaminated aquifers**

- F: Supporting information for chapter 3: A multitracer test proving the reliability of stable isotope fractionation analysis for assessing anaerobic degradation in a BTEX-contaminated aquifer**

- G: Supporting information for chapter 4: Applicability of stable isotope fractionation analysis for the characterization of benzene biodegradation in a BTEX-contaminated aquifer**

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Hydrogeo- und isotopenchemische Parameter im Tiefenprofil zweier Beobachtungsbrunnen (Daten aus Messkampagne Dezember 2002).	41
Tabelle 3.1: Berechnung des biologischen Abbaus [B %] für sulfatreduzierende ($\alpha_S = 1.0036$) und methanogene Bedingungen ($\alpha_M = 1.0019$) unter Berücksichtigung der Schwankungsbreite der Isotopensignatur von Benzol in der Schadstoffquelle ($\delta^{13}C_{\text{Benzol}} = -28,5 \text{ ‰}$ bis $-29,5 \text{ ‰}$).	56
Tabelle 5.1: Percentage of benzene biodegradation (B [%]) and decrease in benzene concentration due to biodegradation (Δ_B) for the various depths of the sampling wells C - E calculated for three scenarios. For Scenario 1 it was assumed that biodegradation occurs before a non-isotope-fractionating process (Eq. 5.3), for Scenario 2 that a non-isotope-fractionating process takes place before biodegradation (Eq. 5.4) and for Scenario 3 that both processes proceed simultaneously (Eq. 5.12). n.d. - not determined, because the carbon isotope ratio was in the range of variation of the contaminant source.	99

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau eines Gaschromatographie-Isotopenmassenspektrometer-Systems für Kohlenstoffisotopenmessungen 7
- Abbildung 2.1: Flächenhafte Ausdehnung der Benzolfahne (Konzentrationsangaben in mg/l, Daten aus der Messkampagne Mai 2002) im Bereich des oberen Aquifers mit Angabe der Grundwasserisohypsen (Daten aus der Messkampagne Mai 2002). Die Strecke zwischen I und II gibt die Lage des dargestellten hydrogeologischen Profils am Standort Zeitz wieder (verändert nach (78)). 31
- Abbildung 2.2: Sulfatkonzentrationen [mg/l] und $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ -Werte [‰ V-CDT] (als Zahlen eingetragen) im Grundwasser des oberen Aquifers am Standort Zeitz (Daten aus Messkampagne Mai 2002). 32
- Abbildung 2.3: DIC-Konzentrationen [mgC/l] und $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ -Werte [‰ V-PDB] (als Zahlen eingetragen) im Grundwasser des oberen Aquifers am Standort Zeitz (Daten aus Messkampagne Mai 2002). 35
- Abbildung 2.4: Methankonzentrationen [mg/l] und $\varepsilon(\text{g})_{\text{DIC-CH}_4}$ -Werte [‰ V-PDB] (als Zahlen eingetragen) im Grundwasser des oberen Aquifers am Standort Zeitz (Daten aus Messkampagne Mai 2002). 36
- Abbildung 2.5: Konzentrationen [mg/l] und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte [‰ V-PDB] (als Zahlen eingetragen) des Benzols im Grundwasser des oberen Aquifers am Standort Zeitz (Daten aus Messkampagne Dezember 2002). 37
- Abbildung 2.6: Benzolkonzentrationen [mg/l] und prozentualer biologischer Benzolabbau [%] (als Zahlen eingetragen) unter sulfatreduzierenden (Wert vor dem Schrägstrich) und methanogenen (Wert nach dem Schrägstrich) Milieubedingungen im oberen Aquifer am Standort Zeitz (Daten aus Messkampagne Dezember 2002). A und B entsprechen der Lage der Brunnen, die für die tiefenorientierten Untersuchungen genutzt wurden. 39
- Abbildung 3.1: Verteilung der BTEX-Konzentrationen ($\mu\text{g/l}$) im oberen Aquifer im Bereich des ehemaligen Hydrierwerkes (Zeitz, Sachsen-Anhalt). 47
- Abbildung 3.2: Links: Schichtenprofil und Ausbauplan der Grundwassermessstelle Saf Zz 23/00. Tiefen 1 bis 8 bezeichnen die Positionen der Miniatur-Doppelventilpumpen und BACTRAPs. Rechts: Foto des MLPS mit Edelstahlkäfigen für BACTRAPs vor dem Einbau in die Messstelle. 48

- Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau eines BACTRAP (links) und Foto der Befestigung des Edelstahlkäfigs mit BACTRAP an der Packermembran (rechts). 49
- Abbildung 3.4: Links: Vertikale Verteilung der Eisen(II)-(\diamond), Eisen(III)-(\bullet), Nitrat-(\star), Mangan-(\blacktriangle) und Sulfatkonzentrationen (\blacksquare). Rechts: Vertikale Verteilung der Konzentrationen (\bullet) sowie der Kohlenstoffisotopenverhältnisse des Benzols (\blacksquare). 55
- Abbildung 3.5: Links: Vertikale Verteilung der Kohlenstoffisotopenverhältnisse von Methan (\blacksquare), DIC (\bullet) und der Anreicherungsfaktoren (\blacktriangledown) in der Messstelle Saf Zz 23/00. Rechts: Methan- (\blacksquare) und DIC-Konzentrationen (\bullet) in der Messstelle Saf Zz 23/00. 58
- Abbildung 3.6: Übersicht der Isotopensignaturen der Fettsäuren $\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}}$ [‰] in den einzelnen Beprobungshorizonten. Die Abkürzungen und Nomenklatur der Fettsäuren sind im Kapitel 3.4.9 erklärt. 61
- Abbildung 4.1: Map of the Zeitz field site showing the BTEX-plume within the upper aquifer with the detailed location and sampling point arrangement of the tracer test transect. 69
- Abbildung 4.2: Tracer breakthrough observed in two control planes. A) bromide (\star), toluene- d_8 (\blacktriangle), toluene- d_5 (\square), non-labelled toluene (Φ); B) sulphate (\bullet), ratio of toluene- d_8 to toluene- d_5 (X), D/H isotope signature of groundwater (o) within the middle depth of the first control plane (G 466 P2) and the second control plane (G 181 P2). The standard uncertainty of the parameters was smaller than the size of their symbols except D/H isotope signatures of groundwater with a relative standard uncertainty of ± 0.5 ‰ (see also Supporting Information of Appendix - F). 76
- Abbildung 4.3: Mass spectra of silylated benzylsuccinic acid- d_5 (BSA- d_5) obtained from a groundwater sample taken from sampling point G 466 P2 at day 29 after the tracer injection. Bold numbers stand for significant mass fragments of silylated BSA- d_5 given in the chemical structure of silylated BSA- d_5 and explained in Supporting Information (see Appendix - F). 78
- Abbildung 4.4: Cumulative concentrations of biodegraded deuterated toluene at sampling points within the middle depth of the first and second control planes calculated by methods based on CSIA (dark-grey), bromide (grey), and the deuterium enrichment (white) in groundwater. 81

-
- Abbildung 4.5: Biodegraded mass of deuterated toluene calculated for the first and second control planes by methods based on CSIA (dark-grey), bromide (grey), and the deuterium enrichment (white) in groundwater. 82
- Abbildung 5.1: Map of the Zeitz field site showing the BTEX-plume within the upper aquifer with the sampling wells of the investigated aquifer transect and groundwater table contour lines. 88
- Abbildung 5.2: Distribution of concentrations of pollutants, electron acceptors, and mineralisation products within the investigated aquifer transect. The letters stand for the sampling wells and the black dots for the depths sampled for the analyses of the hydrogeochemical parameters. The black triangle indicates the depth of the groundwater table. 94
- Abbildung 5.3: Benzene concentrations (black circle) and respective carbon (light-grey rectangle) and hydrogen (grey triangle) isotope ratios (given as delta notation) at the various sampling depths of wells B - E. 95
- Abbildung 5.4: Concurrent carbon and hydrogen isotope ratios of benzene measured at the various sampling depths of wells B - E together with isotope patterns for aerobic and anaerobic benzene degradation calculated from published enrichment factors and the isotope signature of the contaminant source using the Rayleigh equation (Eq. 5.2). 97
- Abbildung 5.5: Influence of a non-isotope-fractionating attenuation process on the quantification of the percentage of biodegradation (B [%]) via the Rayleigh equation-streamline approach. k is the ratio between the rate constants of the non-isotope-fractionating attenuation process (β) and biodegradation (μ) ($k = \beta/\mu$). High values for k indicate a high influence of the non-isotope-fractionating attenuation process. 102

Abkürzungsverzeichnis

A	Mischungsanteile der beiden Ausgangsisotopenverhältnisse $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(GA)}}$ und $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(Q)}}$
A_B	Kumulative Konzentration des mikrobiell abgebauten Toluol-d ₅ und -d ₈ während des Tracerdurchbruchs
A_{Br}	Fläche unter der Bromidurchbruchskurve
A_{real}	Fläche unter der Durchbruchskurve des gemessenen Toluol-d ₅ und -d ₈
A_{theo}	Fläche unter der theoretischen Durchbruchskurve von Toluol-d ₅ und -d ₈
Abb.	Abbildung
atomD	$^2\text{H}/^1\text{H}$ -Atomprozent
atomD ₀	$^2\text{H}/^1\text{H}$ -Atomprozent des Grundwassers zu Beginn des Tracerdurchbruchs
atomD _t	$^2\text{H}/^1\text{H}$ -Atomprozent des Grundwassers zu einem bestimmten Zeitpunkt t des Tracerdurchbruchs
B [%]	Prozentuale Biodegradation
BAME	Bakterielle Fettsäuremethylester (bacterial acid methyl ester)
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	Benzylsuccinatsäure (benzylsuccinic acid)
BSA-d ₅	Ringdeuterierte Benzylsuccinatsäure (ring-deuterated benzylsuccinic acid)
BTEX	Benzol, Toluol, Ethylbenzol, Xylol
C	Konzentration
^{12}C	Stabiler Kohlenstoff mit der Atommasse 12
$^{12}\text{C}_0$	^{12}C -Konzentration einer Verbindung vor der mikrobiellen Umsetzung bzw. in der Schadstoffquelle
$^{12}\text{C}_x$	^{12}C -Konzentration einer Verbindung an einer Messstelle im Abstand x von der Schadstoffquelle
^{13}C	Stabiler Kohlenstoff mit der Atommasse 13
$^{13}\text{C}_0$	^{13}C -Konzentration einer Verbindung vor der mikrobiellen Umsetzung bzw. in der Schadstoffquelle
$^{13}\text{C}_x$	^{13}C -Konzentration einer Verbindung an einer Messstelle im Abstand x von der Schadstoffquelle
^{14}C	Radioaktiver Kohlenstoff mit der Atommasse 14
C_0	Konzentration einer Verbindung zu Beginn (t = 0) der mikrobiellen Umsetzung

$C_{Br}(t)$	Bromidkonzentrationen zu einem bestimmten Zeitpunkt t des Tracerdurchbruchs
CB_x	An einer Messstelle zu erwartende Konzentration, die durch mikrobiellen Abbau beeinflusst wurde
$C_{DIC(B)}$	Konzentration des in der Schadstofffahne gebildeten, anorganischen, gelösten Kohlenstoffs (DIC)
$C_{DIC(GA)}$	Konzentration des anorganischen, gelösten Kohlenstoffs (DIC) im Grundwasseranstrom der Schadstofffahne
C_{d5-t}	Konzentration von Toluol- d_5 zu einer bestimmten Zeit t des Tracerdurchbruchs
C_{d8-t}	Konzentration von Toluol- d_8 zu einer bestimmten Zeit t des Tracerdurchbruchs
$C_D(t)$	Mineralisierte Konzentration von Toluol- d_5 und - d_8
C_n	Anzahl der Kohlenstoffatome einer Fettsäure
$C_{Schadstoff}$	Mineralisierte Schadstofffraktion
C_t	Konzentration einer Verbindung zu einer bestimmten Zeit (t) der mikrobiellen Umsetzung
CSIA	Komponenten-spezifische Analyse stabiler Isotope (Compound-specific stable isotope analysis)
D	Deuterium-stabiler Wasserstoff mit der Atommasse 2
DIC	Anorganischer, gelöster Kohlenstoff (dissolved inorganic carbon)
DIN	Deutsches Institut für Normung
DOC	Gelöster, organischer Kohlenstoff (dissolved organic carbon)
DNA	Desoxyribonucleinsäure (desoxyribonucleic acid)
ENA	Erhöhung der natürlichen Selbstreinigung (Enhanced Natural Attenuation)
FA	Fettsäure (fatty acid)
FAME	Fettsäuremethylester (fatty acid methyl ester)
FD	Filmdicke
Fig.	Abbildung (Figure)
f_x	Relative Konzentrationsänderung auf einer Stromlinie zwischen Schadstoffquelle und einem Messpunkt, die durch mikrobiellen Abbau verursacht wurde
F_x	Relative Konzentrationsänderung auf einer Stromlinie zwischen Schadstoffquelle und einem Messpunkt
GC	Gaschromatograph

GC-C-IRMS	Gaschromatographie-Verbrennungs-Isotopenverhältnis-Massenspektroskopie (Gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry)
GC-IRMS	Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektroskopie (Gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry)
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektroskopie
Gl.	Gleichung
GSF	Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
GW	Grundwasser
^1H	Stabiler Wasserstoff mit der Atommasse 1
^2H	Stabiler Wasserstoff mit der Atommasse 2
HPLC	Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (High performance liquid chromatography)
ID	Innendurchmesser
k	Verhältnis der Ratenkonstante für einen nicht-isotopenfraktionierenden, abiotischen Prozess und der Ratenkonstante für den mikrobiellen Abbau
Kap.	Kapitel
LCKW	Leichtflüchtige, chlorierte Kohlenwasserstoffe
m	Anstieg der Regressionsgeraden
M_B	Mikrobiell abgebaute Masse von Toluol- d_5 und - d_8
M_{Br}	Einspeismasse von Bromid
M_{d5}	Einspeismasse von Toluol- d_5
M_{d8}	Einspeismasse von Toluol- d_8
m_H	Molare Konzentration von Wasserstoff in einem Liter Wasser
MNA	Überwachung der natürlichen Selbstreinigung (Monitored Natural Attenuation)
MLPS	Multilevel-Packersystem
m uGOK	Meter unter Geländeoberkante
M(t)	Mol von Deuterium, die zu einer bestimmten Zeit t des Tracerdurchbruchs während der Mineralisierung von Toluol- d_5 und - d_8 frei wird
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -butylether
n	Effektive Porosität
NA	Natürliche Selbstreinigung (Natural Attenuation)
n.d.	Nicht bestimmt
N_{sol}	Anteil an im Grundwasser gelösten Tracer
N_{sorb}	Anteil des Tracer, der an der Aquifermatrix adsorbiert ist
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

PLFA	Phospholipid-Fettsäure (phospholipid-derived fatty acid)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Polyethylen
Q_C	Grundwasserflußrate durch eine Kontrollebene
\mathcal{R}	Retardationsfaktor
R_0	Isotopenverhältnis einer Verbindung zu Beginn ($t = 0$) der mikrobiellen Umsetzung
r_b	Rate erster Ordnung für den mikrobiellen Abbau
RETZINA	Referenztestfeld Zeitz zur Implementierung des "Natural Attenuation"-Ansatzes
r_n	Rate erster Ordnung für einen nicht-isotopenfraktionierenden, abiotischen Prozess
RNA	Ribonucleinsäure (ribonucleic acid)
R_R, R_{standard}	Isotopenverhältnis des Referenzstandards (isotope ratio of a reference standard)
R_S, R_{sample}	Isotopenverhältnis der Probe (isotope ratio of a sample)
R_t	Isotopenverhältnis einer Verbindung zu einer bestimmten Zeit (t) der mikrobiellen Umsetzung
R_x	Isotopenverhältnis einer Verbindung in der Entfernung x von der Schadstoffquelle
s	Abstand zwischen zwei Messstellen
^{32}S	Stabiler Schwefel mit der Atommasse 32
^{34}S	Stabiler Schwefel mit der Atommasse 34
SAFIRA	Sanierungsforschung in regional kontaminierten Aquiferen
SIFA	Analyse der Fraktionierung stabiler Isotope (stable isotope fractionation analysis)
SIP	Stabile Isotopenbeprobung (stable isotope probing)
SPME	Festphasen-Mikroextraktion (solid phase microextraction)
t	Zeit
$(t_{\text{max}})_{\text{conservative tracer}}$	Zeit zwischen der Tracereinspeisung und des Auftretens der maximalen Konzentration eines konservativen Tracers (time between tracer injection and the occurrence of the maximal concentration of conservative tracers)
$(t_{\text{max}})_{\text{sorptive tracer}}$	Zeit zwischen der Tracereinspeisung und des Auftretens der maximalen Konzentration eines sorptiven Tracers (time between tracer injection and the occurrence of the maximal concentration of sorptive tracers)
Tab.	Tabelle

Toluene-d ₅	Ring-deuteriertes Toluol (ring-deuterated toluene)
Toluene-d ₈	Perdeuteriertes Toluol (completely deuterium-labelled toluene)
UFZ	Umweltforschungszentrum
US-EPA	US-amerikanische Umweltbehörde (United States Environmental Protection Agency)
$v, v_{\text{groundwater}}$	Grundwasserfließgeschwindigkeit (groundwater flow velocity)
V-CDT	Vienna-Canyon-Diablo-Troilite-Standard
V-PDB	Vienna-PeeDee-Belemnite-Standard
V-SMOW	Vienna-Standard-Mean-Ocean-Water
$v_{\text{sorptive tracer}}$	Fließgeschwindigkeit eines im Grundwasser gelösten, sorptiven Tracers
x	Abstand zwischen Schadstoffquelle und einer im Grundwasserstrom abwärts liegenden Messstelle
Z_C	Anzahl der Kohlenstoffatome des Schadstoffmoleküls
α	Isotopenfraktionierungsfaktor
$\alpha(\text{g})_{\text{Edukt-Produkt}}$	Isotopenfraktionierungsfaktor für eine Gleichgewichtsreaktion zwischen Edukt und Produkt
α_M	Isotopenfraktionierungsfaktor für methanogene Abbaubedingungen
α_S	Isotopenfraktionierungsfaktor für sulfatreduzierende Abbaubedingungen
β	Ratenkonstante für einen nicht-isotopenfraktionierenden, abiotischen Prozess
β_{12}	¹² C-Ratenkonstante von Verbindungen für einen nicht-isotopenfraktionierenden, abiotischen Prozess
β_{13}	¹³ C-Ratenkonstante von Verbindungen für einen nicht-isotopenfraktionierenden, abiotischen Prozess
$\delta^{13}\text{C}$	Kohlenstoffisotopenverhältnis, angegeben auf Grundlage der Delta-Notation
$\delta^{13}\text{C}_{\text{Benzol}}$	Kohlenstoffisotopenverhältnis des Benzols
$\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$	Kohlenstoffisotopenverhältnis des Methans
$\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(GA)}}$	Kohlenstoffisotopenverhältnis des anorganischen, gelösten Kohlenstoffs (DIC) im Grundwasseranstrom der Kontamination
$\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(M)}}$	Kohlenstoffisotopenverhältnis des anorganischen, gelösten Kohlenstoffs (DIC), das im Bereich der Kontamination gemessen wurde
$\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(Q)}}$	Kohlenstoffisotopenverhältnis des in der Schadstofffahne gebildeten anorganischen, gelösten Kohlenstoffs (DIC)
$\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}}$	Kohlenstoffisotopenverhältnis einer Fettsäure
$\delta^{13}\text{C}_{\text{FAME}}$	Kohlenstoffisotopenverhältnis eines Fettsäuremethylesters

$\delta^{13}\text{C}_{\text{Edukt}}$	Kohlenstoffisotopenverhältnis eines Edukts
$\delta^{13}\text{C}_{\text{MeOH}}$	Kohlenstoffisotopenverhältnis des Methanols
$\delta^{13}\text{C}_{\text{Produkt}}$	Kohlenstoffisotopenverhältnis eines Produkts
$\delta\text{D}, \delta^2\text{H}$	Wasserisotopenverhältnis, angegeben auf Grundlage der Delta-Notation
$\delta^{34}\text{S}$	Schwefelisotopenverhältnis, angegeben auf Grundlage der Delta-Notation
$\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$	Schwefelisotopenverhältnis des Sulfats
Δ_{B}	Konzentrationsabnahme in Folge des mikrobiellen Abbaus entlang einer Stromlinie
Δx	Unsicherheit einer Messgröße
Δy	Absolutfehler
ε	Anreicherungsfaktor
$\varepsilon(\text{g})_{\text{Edukt-Produkt}}$	Anreicherungsfaktor für eine Gleichgewichtsreaktion zwischen Edukt und Produkt
λ	<i>in situ</i> -Abbaurrate erster Ordnung
μ	Ratenkonstante für den mikrobiellen Abbau
μ_{12}	^{12}C -Ratenkonstante einer Verbindung für den mikrobiellen Abbau
μ_{13}	^{13}C -Ratenkonstante einer Verbindung für den mikrobiellen Abbau

Kurzfassung

Der mikrobielle Abbau ist ein nachhaltiger Prozess zur Reduktion von organischen Schadstoffen in kontaminierten Grundwasserleitern. Die qualitative und quantitative Erfassung des *in situ*-Schadstoffabbaus ist somit ein wesentlicher Aspekt zur Charakterisierung des Selbstreinigungspotenzials eines Aquifers. Wie sich in den letzten Jahren gezeigt hat, bietet die Analyse der Kohlenstoff- bzw. Wasserstoffisotopensignatur von Kontaminanten eine geeignete Methode zum Nachweis der Biodegradation. Bei der mikrobiellen Isotopenfraktionierung werden Moleküle, die aus leichten Isotopen (^{12}C , ^1H) aufgebaut sind, meist schneller umgesetzt als solche, die ein schweres Isotop (^{13}C , ^2H) aufweisen. In der Regel kommt es daher zu einer relativen Anreicherung der schwereren Isotope innerhalb der Fraktion des nicht abgebauten Schadstoffes.

Mit Hilfe der Rayleigh-Gleichung kann die Isotopenfraktionierung für die mikrobielle Umsetzung eines Schadstoffes beschrieben werden. Dabei wird die Veränderung der Isotopenzusammensetzung und der Konzentration einer Verbindung durch den Isotopenfraktionierungsfaktor oder auch Anreicherungsfaktor parametrisiert. Wenn sich die Kohlenstoff- oder Wasserstoffanreicherungsfaktoren für verschiedene Abbauege eines Schadstoffes signifikant unterscheiden, können theoretische Bereiche für Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnisse ermittelt werden, die repräsentativ für einen bestimmten Abbaueg sind. Durch den Vergleich dieser Bereiche mit Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopensignaturen aus Umweltproben können dominierende Schadstoffabbauege in kontaminierten Grundwasserleitern identifiziert werden. Mit dieser Methode konnte für einen BTEX-kontaminierten Grundwasserleiter festgestellt werden, dass die Hauptkontaminante Benzol überwiegend unter anoxischen Milieubedingungen abgebaut wurde.

In zahlreichen Studien wurde die Rayleigh-Gleichung als Grundlage zur Berechnung des Schadstoffabbaus genutzt. In dieser Arbeit wurde durch ein Multitracer-Experiment mit ring- (d_5) und perdeuteriertem (d_8) Toluol als reaktive Tracer sowie mit Bromid als konservativem Tracer gezeigt, dass die Quantifizierung des mikrobiellen Abbaus der deuterierten Toluolisotopologen mit Hilfe der Rayleigh-Gleichung annähernd übereinstimmende Ergebnisse im Vergleich zu unabhängigen Berechnungsmethoden ergab. Somit war die Rayleigh-Gleichung eine geeignete Grundlage für die Berechnung des Abbaus der Toluolisotopologen.

Für den BTEX-verunreinigten Aquifer im Bereich eines ehemaligen Hydrierwerkes wurde eine signifikante Isotopenfraktionierung für die Hauptkontaminante Benzol nachgewiesen, was auf eine mikrobielle Umsetzung des Schadstoffes hindeutete. Jedoch konnte mit Hilfe der Rayleigh-Gleichung die Biodegradation des Benzols quantitativ nicht verlässlich

abgeschätzt werden. Daraus wurde geschlussfolgert, dass der Konzentrationsrückgang des Benzols durch einen abiotischen Prozess, wie die Verdünnung, beeinflusst wurde. Generell wird mit zunehmendem Einfluss von abiotischen Prozessen entlang einer Stromlinie die Bestimmung des mikrobiellen Schadstoffabbaus auf Grundlage der Rayleigh-Gleichung ungenauer.

Neben der Erfassung der Isotopenfraktionierung von Schadstoffen kann auch die Analyse der Isotopensignaturen von Mineralisierungsprodukten wie Kohlendioxid (CO_2) und Methan (CH_4) bzw. von Elektronenakzeptoren zur Charakterisierung der Biodegradation in kontaminierten Grundwasserleitern verwendet werden. So konnte in dieser Arbeit durch die Veränderung des Isotopenverhältnisses von CO_2 , welches als anorganischer, gelöster Kohlenstoff (DIC) bestimmt wurde, die Mineralisierung innerhalb einer Schadstofffahne abgeschätzt werden. Durch die Analyse der CH_4 -Isotopensignatur wurden Bildungswege und -zonen sowie Abbaubereiche des Methans untersucht. Weiterhin erfolgte durch die Bestimmung des Schwefelisotopenverhältnisses des Sulfats eine Charakterisierung von Zonen, in denen mit einer erhöhten Sulfatreduktion zu rechnen war.

Mit Hilfe des Einsatzes von ^{13}C -markiertem Benzol im Rahmen eines BACTRAP[®]-Experimentes konnte in stark kontaminierten Bereichen eines BTEX-verunreinigten Aquifers, in denen durch die Analyse der Isotopenfraktionierung keine Biodegradation detektierbar war, der mikrobielle Schadstoffabbau nachgewiesen werden. Somit kann mit Hilfe des BACTRAP-Systems die Biodegradation von Schadstoffen sensitiver erfasst werden.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass durch die Analyse der Isotopenfraktionierung von Schadstoffen, durch die Erfassung der Isotopensignatur von Mineralisierungsprodukten bzw. Elektronenakzeptoren sowie durch den Einsatz von isotopisch markierten Verbindungen im Rahmen von Tracer- und BACTRAP-Experimenten wesentliche Informationen zur Biodegradation in kontaminierten Grundwasserleitern bestimmt werden können. Somit sind Methoden auf Grundlage der Untersuchung stabiler Isotopen geeignet, Beurteilungen sowohl des Selbstreinigungspotenzials kontaminierter Aquifere als auch von Sanierungsmethoden, die auf der Stimulierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus basieren, durchzuführen.

Abstract

Microbial degradation is a sustainable process leading to a removal of organic pollutants in contaminated aquifers. The qualitative and quantitative investigation of *in situ*-biodegradation of pollutants is important for characterizing the natural attenuation potential of aquifers. As was shown recently, the analysis of changes in carbon and hydrogen isotope signature of pollutants provides an appropriate method for quantification of biodegradation within a contaminant plume. In most cases, microorganisms convert molecules consisting of light isotopes (^{12}C , ^1H) faster than molecules consisting of heavy isotopes (^{13}C , ^2H). Thus, biodegradation leads to an enrichment of heavy isotopes in the residual fraction of pollutants. The isotope fractionation for microbial degradation of a pollutant can be described by the Rayleigh equation, whereby the changes in isotope signature and concentration of a pollutant are parameterized by the isotope fractionation factor or the enrichment factor. If carbon and hydrogen enrichment factors, respectively, significantly differ for various degradation pathways of a pollutant, theoretical patterns of carbon and hydrogen isotope signatures can be determined for these degradation pathways. By comparing these patterns of carbon and hydrogen isotope signatures detected in a contaminated aquifer, the predominant *in situ*-biodegradation pathway for a pollutant can be ascertained. Using this method, it has been shown that benzene as a main pollutant was biodegraded under anoxic conditions.

In many studies, the Rayleigh equation was used for the quantification of *in situ*-biodegradation of pollutants in contaminated aquifers. In a multitracer experiment, the fractionation of the reactive tracers ring- (d_5) and perdeuterated (d_8) toluene was used to quantify the biodegradation of these isotopologues using the Rayleigh equation. The results were similar to the biodegradation calculated using a conservative tracer (bromide) indicating that the Rayleigh equation was an appropriate basis for the assessment of the biodegradation of reactive tracers.

By means of isotope fractionation analysis, it was shown that benzene as main pollutant was biodegraded within a BTEX-contaminated aquifer. However, the quantification of benzene biodegradation by the Rayleigh equation gave no reliable results. It could be reasoned that the decrease of benzene concentration was influenced by a non-isotope-fractionating process. In general, the quantification of pollutant biodegradation based on the Rayleigh equation becomes more and more imprecise with increasing influence of a non-isotope-fractionating process, such as dilution, volatilisation, and irreversible sorption.

Besides the analysis of isotope fractionation of pollutants, the detection of isotope signatures of mineralisation products such as carbon dioxide (CO_2) or methane (CH_4) and electron acceptors can be used for the characterization of *in situ*-biodegradation in contaminated

aquifers. In this study, the mineralisation within a contaminant plume could be assessed using carbon isotope signatures of CO₂ detected as dissolved inorganic carbon (DIC). CH₄-isotope signatures were used in order to investigate methanogenic pathways and zones as well as areas of methane oxidation. Sulphur isotope signatures of sulphate gave indications for zones where a significant sulphate reduction took place.

Pollutant biodegradation was proven within a heavily contaminated aquifer zone using microcosms (BACTRAP[®]) with ¹³C-labelled benzene. In this zone, the analysis of isotope fractionation gave no indications for pollutant biodegradation. Thus, the pollutant biodegradation can be sensitively determined by means of BACTRAPs.

It could be shown that the analysis of isotope fractionation of pollutants, the detection of isotope signatures of mineralisation products as well as electron acceptors, and the use of isotopic labelled compounds for tracer and BACTRAP experiments can considerably contribute to the investigation of biodegradation within contaminated aquifers. Therefore, methods based on stable isotopes are suitable for the evaluation of both natural attenuation of a contaminated aquifer and remediation approaches based upon the stimulation of pollutant biodegradation.

1 EINLEITUNG

1.1 Hintergrund

Mit dem Anstieg der Weltbevölkerung nimmt der Bedarf an Trinkwasser stetig zu. Ein Großteil des Trinkwassers wird heutzutage aus Grundwasserleitern gefördert. Durch die Industrialisierung seit Mitte des 19. Jahrhunderts kam es zu einer deutlichen Verunreinigung von Grundwasserreservoirs. Allein in Deutschland gibt es über 271000 altlastenverdächtige Flächen (117), wobei für einen Teil eine Grundwasserkontamination nicht ausgeschlossen werden kann. Die Mehrzahl der Grundwasserverunreinigungen sind auf organische Schadstoffe zurückzuführen. In Deutschland und den USA zählen chlorierte und monoaromatische Kohlenwasserstoffe zu den häufigsten Kontaminanten (9, 148). Für viele Verbindungen dieser beiden Stoffklassen ist eine human-toxische Wirkung bekannt (45, 68, 177). In den vergangenen Jahren sind vor allem Treibstoffadditive wie Methyl-*tert*-butylether (MTBE) zunehmend im Grundwasser nachgewiesen worden (109, 137). MTBE besitzt eine geschmacks- und geruchsbeeinträchtigende Wirkung, weshalb Grundwasser, welches bereits mit Konzentrationen von wenigen $\mu\text{g/l}$ belastet ist, nicht mehr als Trinkwasser genutzt werden kann (7). Da die genannten Schadstoffe eine Gefährdung für Mensch und Umwelt darstellen, ist es wichtig deren Verhalten in Grundwasserleitern zu verstehen. Während in kontaminierten Aquiferen abiotische Prozesse wie Sorption, Dispersion, Verdünnung und Verflüchtigung zwar zu einem wesentlichen Schadstoffrückgang im Grundwasser führen können, trägt hauptsächlich der mikrobielle Abbau zu einer nachhaltigen Reduzierung der Schadstoffmenge bei. Somit ist dessen Charakterisierung für eine zuverlässige Beurteilung eines kontaminierten Aquifers sowie die Ableitung von möglichen Sicherungs- und Sanierungsmaßnahmen von großer Bedeutung.

Zur Charakterisierung des geochemischen Abbaumilieus können Elektronendonator-Elektronenakzeptor-Bilanzierungen verwendet werden. Die Analyse der Senken von bioverfügbaren Elektronenakzeptoren wie Sauerstoff (O_2), Nitrat (NO_3^-), Mangan(IV) (Mn(IV)), Eisen(III) (Fe(III)), Sulfat (SO_4^{2-}) und Kohlendioxid (CO_2) kann wertvolle Hinweise zum Abbauverhalten von Schadstoffen geben. Die Biodegradation einzelner Schadstoffe kann über Elektronendonator-Elektronenakzeptor-Bilanzierungen meist nicht erfasst werden und Stoffbilanzen sind auf dieser Basis nur sehr schwer zu erstellen. Allerdings können Elektronendonator-Elektronenakzeptor-Bilanzierungen sehr wertvolle Informationen zur Nachhaltigkeit von Abbauprozessen liefern, indem die langfristige Verfügbarkeit von Elektronenakzeptoren für Schadstoffabbauprozesse geprüft wird.

Mikrokosmenstudien und Säulenversuche mit Standortmaterial sind konventionelle

Techniken, um die Biodegradation von Schadstoffen eines Aquifers in Laborexperimenten zu untersuchen. Die genauen biogeochemischen Bedingungen eines Standortes sind jedoch nicht einfach nachzustellen und die mikrobielle Umsetzung von verschiedenen Schadstoffen kann oft sehr langwierig sein. Insbesondere die Etablierung der anaeroben Biodegradation, die typisch für viele kontaminierte Grundwasserleiter ist, erfordert im Labor häufig mehrere Monate. Weiterhin stellt die Übertragbarkeit der Laborstudien auf den Aquifer ein wesentliches Problem dar, das bis heute nicht befriedigend gelöst werden konnte. Laborstudien liefern im Wesentlichen indirekte und qualitative Informationen über Abbauprozesse im Grundwasserleiter. Sie sind jedoch kaum geeignet, um quantitative Aussagen über die *in situ*-Biodegradation von Schadstoffen abzuleiten.

Eine Methode zur Charakterisierung des *in situ*-Abbaus von Schadstoffen, die in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen hat, basiert auf der Untersuchung der substratspezifischen Fraktionierung stabiler Isotope. Sie wird in der englischsprachigen Literatur meist als "Compound-specific stable isotope analysis (CSIA)" bzw. "Stable isotope fractionation analysis (SIFA)" bezeichnet und kann mit Hilfe der Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektroskopie (GC-IRMS) empfindlich nachgewiesen werden. Somit bietet die Untersuchung der substratspezifischen Isotopenfraktionierung eine Möglichkeit, den mikrobiellen Abbau einzelner Schadstoffe in einem kontaminierten Grundwasserleiter zu erfassen.

Eine weitere Methode, den *in situ*-Schadstoffabbau in Grundwasserleitern zu untersuchen, ist der Einsatz von isotopisch markierten Verbindungen im Rahmen von Tracerversuchen. Der Verbleib dieser Substanzen kann mit Hilfe eines konservativen Tracers überwacht werden. Weiterhin bietet die Analyse der Transformation der Isotopenmarkierung in Mineralisierungsprodukte, Metaboliten und Biomasse eine Möglichkeit der Charakterisierung bzw. Quantifizierung des *in situ*-Schadstoffabbaus.

Die Bestimmung der Isotopenfraktionierung von Schadstoffen mit natürlicher Isotopenhäufigkeit und die Analyse des Verbleibs von isotopisch markierten Verbindungen sind zwei innovative Methoden zur Untersuchung der *in situ*-Biodegradation in kontaminierten Grundwasserleitern, deren praktische Anwendbarkeit im Rahmen dieser Arbeit geprüft werden soll.

1.2 Substratspezifische Isotopenfraktionierung von Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopen zur Analyse des *in situ*-Abbaus organischer Schadstoffe

Anko Fischer, Heinrich Eisenmann, Hans-H. Richnow

(Bericht an das Hessische Landesamt für Umwelt und Geologie, Januar 2006)

1.2.1 Einführung

Der Nachweis und die Quantifizierung des mikrobiellen Abbaus organischer Schadstoffe sind für die Beurteilung kontaminierter Grundwasserleiter sowie für die Ableitung von möglichen Sicherungs- und Sanierungsmaßnahmen oft entscheidend. In kontaminierten Grundwasserleitern können abiotische Prozesse wie Verdünnung, Dispersion, Verflüchtigung und Adsorption zwar zu einem Austrag aus dem Grundwasser oder zu einer Verlagerung von Schadstoffen führen, aber nur der mikrobielle Abbau trägt zu einer signifikanten und nachhaltigen Reduzierung der Schadstoffmenge im Grundwasser bei. Die *in situ*-Biodegradation kann daher einen erheblichen Beitrag bei der Entfernung von organischen Schadstoffen leisten, somit ist ihre Charakterisierung eine wichtige Voraussetzung zur Schadensfallerkundung von kontaminierten Grundwasserleitern.

Eine Möglichkeit zur Untersuchung des *in situ*-Abbaus von Schadstoffen bietet die Nutzung der substratspezifischen Fraktionierung stabiler Isotope. Isotope eines Elementes besitzen die gleiche Menge an Protonen, aber unterscheiden sich in der Anzahl der Neutronen, weshalb sie unterschiedliche Massen besitzen. Organische Schadstoffe bestehen hauptsächlich aus Kohlenstoff und Wasserstoff. Beide Elemente weisen zwei unterschiedlich stabile Isotope auf. Der Anteil von schweren zu leichten Isotopen eines Elementes wird als Isotopenverhältnis oder häufig auch als Isotopensignatur bezeichnet (z.B. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$). Infolge des mikrobiellen Abbaus verändert sich das Isotopenverhältnis eines Substrats, weil Mikroorganismen meist Verbindungen aus leichten Isotopen schneller verwerten. Folglich kommt es während der mikrobiellen Umsetzung zu einer Anreicherung von schweren Isotopen in der nicht abgebauten Schadstofffraktion. Das Ausmaß der Isotopenfraktionierung ist unter anderem vom relativen Massenunterschied der Isotope eines Elementes abhängig. Je höher dieser ist, desto höher ist die zu erwartende Isotopenfraktionierung. Der relative Massenunterschied von Wasserstoff (^1H) und Deuterium (^2H) beträgt 100 % und der von ^{12}C - und ^{13}C -Kohlenstoff ca. ≈ 8 %. Somit sollte der biologische Abbau anhand der Wasserstoffisotopenfraktionierung empfindlicher nachgewiesen werden können. Die Messung des Kohlenstoffisotopenverhältnisses organischer Komponenten kann im Vergleich zur Bestimmung der Wasserstoffisotopensignatur bei geringeren Konzentrationen der Zielsubstanz durchgeführt werden. Damit ist die Analyse des Kohlenstoffisotopen-

verhältnisses empfindlicher. Diese weist im Gegensatz zur Wasserstoffisotopenmessung meist eine geringere Standardabweichung auf. Somit kommen die Vorteile der Wasserstoffisotopenfraktionierung auf Grund des Massenunterschiedes für die Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus gegenüber der Kohlenstoffisotopenfraktionierung oftmals nicht zum Tragen. Zudem liegen weniger Erfahrungen zur Nutzung der Wasserstoffisotopenanalysen in der Beurteilung von Schadensfällen vor, sodass die Bestimmung der Wasserstoffisotopensignatur in der praktischen Anwendung von geringerer Bedeutung ist als die Untersuchung der Kohlenstoffisotopenfraktionierung.

Die Veränderung des Isotopenverhältnisses eines Schadstoffes auf Grund der Biodegradation kann mit Hilfe der Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektroskopie (GC-IRMS) empfindlich nachgewiesen werden. Die Isotopenfraktionierung für den mikrobiellen Abbau eines Substrats wird häufig unter definierten Bedingungen in Laborversuchen bestimmt. Unter der Verwendung der so genannten Rayleigh-Gleichung kann durch die zeitliche Veränderung von Konzentration und Isotopenverhältnis eines Schadstoffes der Isotopenfraktionierungsfaktor berechnet werden. Mit Hilfe dieser ergibt sich die Möglichkeit, den mikrobiellen Schadstoffabbau in kontaminierten Grundwasserleitern quantitative abzuschätzen.

1.2.2 Probenahme und Extraktion von Schadstoffen aus Grundwasser

Die Probengewinnung erfolgt nach den üblichen Regeln der guten Grundwasserprobenahme. Geeignete Techniken zur Entnahme und Aufarbeitung von Grundwasserproben sind entsprechend der Zielverbindung in der Literatur beschrieben (51, 54, 57, 58, 91, 92, 119-121).

Grundwasserproben für die Analyse der Konzentrationen von Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylolen (BTEX) oder leichtflüchtigen chlorierten Kohlenwasserstoffen (LCKW) werden meist nicht konserviert, um das Risiko einer Kontamination über das Konservierungsmittel zu vermeiden, und weil die Bestimmung der Konzentration zeitnah erfolgen kann. Jedoch wird die Isotopenanalytik nur von wenigen Laboren angeboten, deshalb müssen Grundwasserproben oft zwischengelagert oder verschickt werden. Da somit eine zeitnahe Analyse oft nicht gewährleistet werden kann, wird eine Konservierung der Proben zur Inhibierung der biologischen Aktivität erforderlich. Dafür können übliche Techniken, wie sie auch für die Konzentrationsbestimmung verwendet werden, eingesetzt werden (54). Zur Verminderung des biologischen Abbaus bzw. der Verflüchtigung werden eine kühle Lagerung bei 4 °C und eine schnelle Bearbeitung der Grundwasserproben empfohlen. Eine Hemmung der Biodegradation kann durch die Zugabe entsprechender Mengen an Natriumazid oder anderer wirksamer Substanzen erreicht werden. Ebenfalls führt eine

Erhöhung der Salinität oder eine Verschiebung des pH-Wertes in den stark alkalischen (pH >10) oder stark sauren (pH <2) Bereich zur Unterbindung der mikrobiellen Umsetzung. Oxidierende Säuren wie Schwefelsäure oder Salpetersäure sollten zur Ansäuerung nicht verwendet werden. Wenn die Grundwasserprobe durch Ansäuerung oder Alkalisierung konserviert werden soll, muss im Einzelfall geprüft werden, in wieweit hydrolytische Prozesse die Zielverbindungen beeinflussen könnten. Auf organische Konservierungsmittel sollte verzichtet werden, um Interferenzen mit der Isotopenanalyse auszuschließen. Darüber hinaus sollte das Konservierungsmittel auch auf mögliche Verunreinigungen geprüft werden. Die Extraktionsmethode bestimmt die Menge an Analyten, die aus einer Grundwasserprobe gewonnen werden kann. Je effektiver eine Methode ist, desto besser kann das Isotopenverhältnis für eine Zielsubstanz mit niedriger Konzentration bestimmt werden. Die Wahl eines geeigneten Verfahrens ist von den Eigenschaften der Zielverbindung abhängig. In Abhängigkeit der Zielsubstanz sind für die Isotopenanalyse bisher die Lösungsmittel-, Headspace-, Purge & Trap- und Festphasenextraktion (SPME, Solid phase microextraction) am häufigsten eingesetzt worden (133, 164).

Die Headspace- bzw. SPME-Technik wird meist zur Bestimmung des Isotopenverhältnisses von MTBE, BTEX und chlorierten Ethenen eingesetzt. Für die Headspace-Technik sind keine signifikanten Isotopeneffekte beim Übergang von unpolaren und halogenierten Lösungsmitteln aus der wässrigen in die Gasphase bekannt (98, 172). Jedoch können durch die Headspace-Technik unerwünschte Isotopeneffekte bei chlorierten Methanverbindungen auftreten (99). Auch bei der SPME-Technik kann es zu Isotopeneffekten kommen. Wenn keine entsprechenden Studien über mögliche Isotopeneffekte vorhanden sind, sollten Versuche zur Auswahl einer geeigneten SPME-Faser durchgeführt bzw. Faktoren für eine Korrektur ermittelt werden (98, 217). Systematische Untersuchungen von Isotopeneffekten bei der Nutzung von SPME-Fasern sind in der Literatur nur teilweise vorhanden (49, 98, 99, 217). Bisher gibt es nur wenige systematische Studien zu Schwellenkonzentrationen, die für die Analyse des Isotopenverhältnisses durch die Headspace- bzw. SPME-Technik notwendig sind. Deshalb ist es schwierig, von einigen Untersuchungen auf die allgemeine Leistungsfähigkeit der beiden Techniken zu schließen. Somit sind durchaus niedrigere Konzentrationen, bei denen noch verlässliche Isotopenverhältnisse bestimmt werden können, für einzelne Zielsubstanzen zu erwarten, als in der Literatur angegeben sind. Für die Analyse des Kohlenstoff- bzw. Wasserstoffisotopenverhältnisses von MTBE konnten verlässliche Ergebnisse durch die Headspace-Technik bei Konzentrationen von etwa 5 bzw. 50 mg/l ermittelt werden (80). Mit der Headspace-Technik war eine Bestimmung des Wasserstoffisotopenverhältnisses von Toluol bei einer Konzentration von 2 mg/l möglich (205). Für BTEX, chlorierte Ethene und Methanverbindungen konnte das Kohlenstoff-

isotopenverhältnis durch die Headspace-Technik im Bereich zwischen 0,1 und 0,5 mg/l noch zuverlässig detektiert werden (88, 127, 172). Eine höhere Empfindlichkeit ist mit der SPME-Technik zu erzielen, wobei die Kohlenstoffisotopenanalyse für Konzentrationen zwischen 0,01 und 0,35 mg/l und die Wasserstoffisotopenanalyse bei ca. 1 mg/l durchgeführt werden konnte (49, 80, 98, 99, 217).

Die Extraktion mit Lösungsmitteln ist ein gängiges Verfahren innerhalb der Isotopenanalyse. Im Allgemeinen treten keine Isotopeneffekte auf (46). Für niedrige Nachweisgrenzen sollte ein Probenvolumen von über einem Liter mit einigen Millilitern Lösungsmittel extrahiert werden (158). Die Extraktionszeiten müssen gegebenenfalls in Versuchen je nach Schadstoffspektrum einer Grundwasserprobe optimiert werden. Ein Zeitraum von 12 h ist für die Extraktion von BTEX aus Grundwasserproben mit *n*-Pentan oder *n*-Hexan auf einem Schüttler ausreichend (67, 197). Durch die Extraktion von 1 Liter Wasserprobe mit 2 ml *n*-Pentan kann erfahrungsgemäß das Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnis von BTEX-Verbindungen bei einer Konzentration von 20 bzw. 400 µg/l noch verlässlich bestimmt werden. Die Effizienz der Lösungsmittlextraktion ist von der Wasserlöslichkeit und Polarität der Zielverbindung abhängig. Zudem können gelöste Inhaltsstoffe wie Tenside und Huminstoffe die Extraktionseffizienz herabsetzen. Die Lösungsmittlextraktion kann durch Einstellung des pH-Wertes oder Zugabe von Salzen verbessert werden.

Das Purge & Trap-Verfahren ermöglicht die Analyse des Isotopenverhältnisses bei sehr niedrigen Schadstoffkonzentrationen. So konnte für Konzentrationen von kleiner als 0,2 µg/l eine Kohlenstoffisotopenanalyse für flüchtige organische Verbindungen durchgeführt werden (217). Bei dem Verfahren wurden keine signifikanten Isotopeneffekten beobachtet (112, 175, 180, 217).

1.2.3 Verfahrensprinzip sowie methodische Grundlagen der Isotopenanalyse

Zur Analyse der Isotopensignatur verschiedenster organischer Schadstoffe wird ein GC-IRMS-System eingesetzt. Die Trennung der Zielverbindungen erfolgt mit einem Gaschromatographen (GC), der über ein so genanntes Interface mit einem Isotopenverhältnis-Massenspektrometer verbunden ist (Abb. 1.1). Für die Analyse des Kohlenstoffisotopenverhältnisses ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) besteht das Interface aus einem Verbrennungsofen, in dem die chromatographisch getrennten Zielverbindungen zu CO_2 oxidiert werden (136). Die Messung der Isotopensignaturen über die CO_2 -spezifischen Massenspuren 44, 45 und 46 erfolgt mittels selektiver Detektion eines online-geschalteten Isotopenverhältnis-Massenspektrometers. Die Isotopensignatur der Analyten wird im Vergleich zu einem Referenzgas (CO_2 für $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, H_2 für $^2\text{H}/^1\text{H}$) mit bekanntem Kohlenstoff- bzw. Wasserstoffisotopenverhältnis bestimmt.

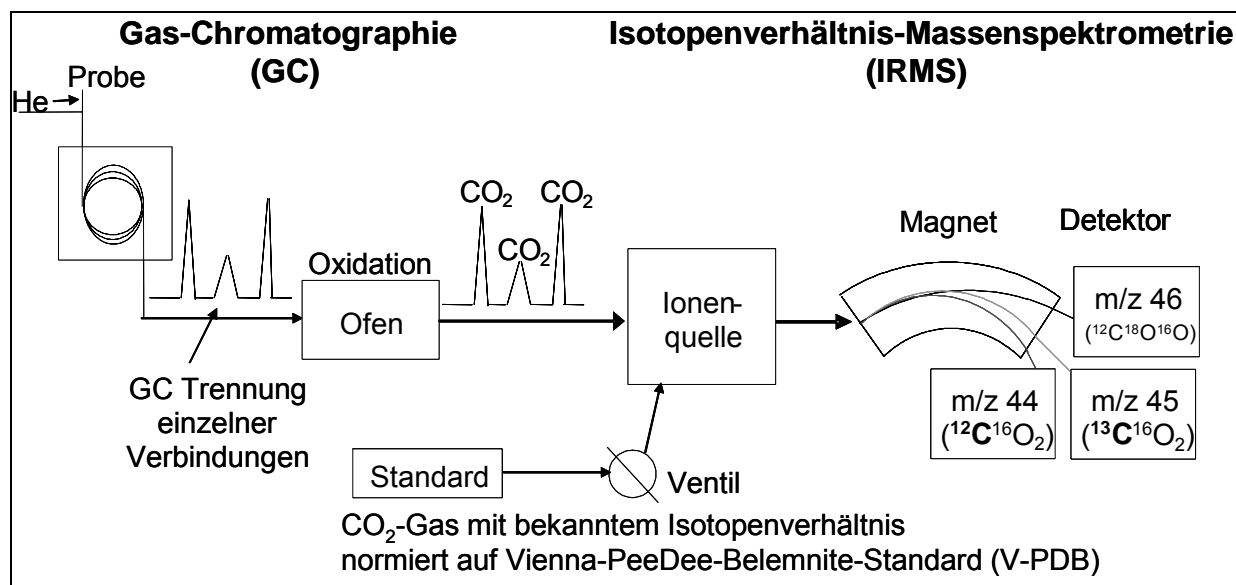


Abbildung 1.1: Schematischer Aufbau eines Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektrometer-Systems für Kohlenstoffisotopenmessungen.

Bei der Analyse des Wasserstoffisotopenverhältnisses (²H/¹H) werden die chromatographisch getrennten Substanzen durch Hochtemperaturpyrolyse in einem Graphit-beschichteten Keramikrohr bei ca. 1400 °C zu elementarem Wasserstoff pyrolysiert (22, 93). Alternativ können organische Verbindungen katalytisch über Chrom zu Wasserstoffgas bei etwa 900 °C reduziert werden (69, 70). Die Wasserstoffisotopensignatur wird anhand der Massen 2 und 3 (¹H₂, ²H¹H) mit selektiver Detektion eines online-geschalteten Isotopenverhältnis-Massenspektrometers bestimmt.

In den meisten Fällen wird die Isotopensignatur einer Verbindung relativ zu einem internationalen Standard als δ -Notation angegeben, wie es hier als Beispiel für das Verhältnis der stabilen Isotopen des Kohlenstoffs gezeigt ist:

$$\delta^{13}\text{C} [\text{‰}] = \left(\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{Probe}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{Standard}}} - 1 \right) \times 1000. \quad (1.1)$$

Dabei wird der internationale Vienna-PeeDee-Belemnite-Standard (V-PDB) mit $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = (11237,2 \pm 2,9) \times 10^{-6}$ verwendet (42). Als Bezugspunkt für die δ -Notation des Wasserstoffs wird das ²H/¹H-Verhältnis des Vienna-Standard-Mean-Ocean-Water (V-SMOW) = $(155.76 \pm 0.05) \times 10^{-6}$ genutzt (86).

Für die Messung des Isotopenverhältnisses müssen die Zielverbindungen gaschromatographisch gut trennbar sein, was bei sehr komplexen Kontaminationen zu Komplikationen führen kann. Bei Verdacht von Schadstoffgemischen mit einer Vielzahl von

Verbindungen ist eine Voruntersuchung der Inhaltsstoffe mit geeigneten Analyseverfahren, wie z.B. GC-MS, ratsam. Im Falle von BTEX und chlorierten Ethenen sind Störungen durch Wasserinhaltsstoffe erfahrungsgemäß eher selten. Beispiele für die Isotopenanalyse von BTEX, polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK), Treibstoffadditive wie MTBE und chlorierte Kohlenwasserstoffe sind in der Literatur beschrieben (67, 81, 106, 116, 122, 123, 126, 158, 160, 198, 199), wobei die Standardabweichung bei der Bestimmung von Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenverhältnissen meist kleiner als 0,5 bzw. 5 ‰ war.

1.2.4 Mikrobielle Isotopenfraktionierung und Grundlagen für Berechnungen

Die durch den mikrobiellen Abbau hervorgerufene Veränderung des Isotopenverhältnisses eines Substrats kann mit Hilfe der Rayleigh-Gleichung (Gl. 1.2) beschrieben werden (60, 128, 170). Anhand dieser Gleichung wird die Konzentrationsänderung mit der Änderung der Isotopensignatur im Verlauf des mikrobiellen Abbaus korreliert.

$$\frac{R_t}{R_0} = \left(\frac{C_t}{C_0} \right)^{\left(\frac{1}{\alpha} - 1 \right)} \quad (1.2)$$

R_t und R_0 bezeichnen das Isotopenverhältnis einer Verbindung zu einer bestimmten Zeit (t) und zu Beginn der Umsetzung ($t = 0$). C_t und C_0 geben die Konzentration der Verbindung zu einer bestimmten Zeit (t) und am Anfang der Transformationsreaktion ($t = 0$) an. Der Isotopenfraktionierungsfaktor α stellt den Zusammenhang zwischen der Änderung der Isotopenzusammensetzung (R_t/R_0) und der Konzentration (C_t/C_0) einer Verbindung in der nicht umgesetzten Substratfraktion her. Es sei darauf hingewiesen, dass in der Literatur die Rayleigh-Gleichung häufig auch folgendermaßen dargestellt wird:

$$\frac{R_t}{R_0} = \left(\frac{C_t}{C_0} \right)^{(\alpha-1)} \quad (1.3)$$

Aus Gleichung 1.3 folgt, dass der Isotopenfraktionierungsfaktor kleiner als 1 ist, wenn in Folge der Isotopenfraktionierung schwere Isotope in der verbleibenden Fraktion angereichert werden. Somit werden zwei Formen der Rayleigh-Gleichung zur Bestimmung von Isotopenfraktionierungsfaktoren benutzt. Bei Verwendung von Literaturdaten muss deshalb auf die Herleitung des Isotopenfraktionierungsfaktors geachtet werden.

Die Bestimmung eines Isotopenfraktionierungsfaktors für den mikrobiellen Abbau eines

bestimmten Substrats erfolgt im Laborexperiment, bei dem gewährleistet ist, dass die Änderung der Konzentration und des Isotopenverhältnisses des Substrats nur durch die Biotransformationsreaktion hervorgerufen wird. Dazu werden im Verlauf des mikrobiellen Abbaus die Konzentration und das Isotopenverhältnis zu bestimmten Zeitpunkten analysiert. Die Veränderung der beiden Größen R_t/R_0 und C_t/C_0 werden nach der logarithmierten Form der Rayleigh-Gleichung (Gl. 1.4) graphisch dargestellt.

$$\ln\left(\frac{R_t}{R_0}\right) = \left(\frac{1}{\alpha} - 1\right) \ln\left(\frac{C_t}{C_0}\right) \quad (1.4)$$

Wenn der mikrobielle Abbau der Rayleigh-Beziehung entspricht, sollten die logarithmierten Veränderungen der Konzentrationen ($\ln(C_t/C_0)$) und des Isotopenverhältnisses ($\ln(R_t/R_0)$) eine lineare Abhängigkeit haben. Über den Anstieg der Regressionsgeraden (m) kann der Isotopenfraktionierungsfaktor wie folgt bestimmt werden:

$$\alpha = \frac{1}{m + 1}. \quad (1.5)$$

Die Isotopenfraktionierung wird oft auch als Anreicherungsfaktor (ε [‰]) angegeben, der anhand des Isotopenfraktionierungsfaktoren (α) nach Gleichung 1.6 berechnet werden kann.

$$\varepsilon [\text{‰}] = 1000 \times (\alpha - 1) \quad (1.6)$$

Je nachdem ob α durch Gleichung 1.2 oder 1.3 bestimmt wurde, d.h. größer oder kleiner als 1 ist, ergibt sich ein positiver (Gl. 1.2) oder negativer (Gl. 1.3) Anreicherungsfaktor.

Die bis 2004 veröffentlichten Anreicherungsfaktoren zum mikrobiellen Schadstoffabbau wurden von Meckenstock *et al.* (133) und Schmidt *et al.* (164) zusammengefasst. Neu publizierte Anreicherungsfaktoren werden auf Internetdatenbanken aktualisiert (214).

1.2.5 Einflussfaktoren der mikrobiellen Isotopenfraktionierung

Ausschlaggebend für die mikrobielle Isotopenfraktionierung ist der Reaktionsmechanismus des initialen Angriffs auf das Substrat. Dabei wird die Isotopenfraktionierung an Bindungen, die direkt an der Stelle der initialen Abbaureaktion angreifen, als primärer Isotopeneffekt bezeichnet. Eine Fraktionierung von stabilen Isotopen, die nicht direkt in die Bindungsspaltung oder -bildung der initialen Abbaureaktion involviert ist, wird als sekundärer Isotopeneffekt beschrieben. Meist sind primäre Isotopeneffekte deutlich größer als sekundäre. Im Allgemeinen rufen radikalische Reaktionen und nukleophile Substitutionsreaktionen mit S_N2 -Mechanismus hohe Isotopenfraktionierungen hervor, wohingegen die Spaltung einer C=C-Doppelbindung bzw. der S_N1 -Reaktionsmechanismus niedrige Isotopeneffekte zur Folge haben (60).

Neben der biochemischen Abbaureaktion beeinflusst auch die Molekülgröße das Ausmaß der Isotopenfraktionierung. Bei der Bestimmung des Isotopenverhältnisses einer Verbindung werden alle Atome, aus denen das Molekül besteht, erfasst. Da nur an der Position, an der die Reaktion stattfindet, ein deutlicher Isotopeneffekt auftritt und der Rest der Verbindung in seiner Isotopenzusammensetzung gleich bleibt, wird die Isotopenfraktionierung durch den nicht reagierenden Teil abgeschwächt. Je mehr Atome eines Elementes ein Molekül aufbauen, desto geringer ist der messbare Isotopeneffekt. Große Moleküle weisen daher in der Regel eine geringere Veränderung der Isotopensignatur während der mikrobiellen Umsetzung auf. Die Kohlenstoffisotopenfraktionierungsfaktoren für den Abbau von BTEX, Naphthalin und Methylnaphthalin sind meist relativ niedrig im Vergleich zu chlorierten Ethenen (133, 164). Demnach kann der Nachweis der *in situ*-Biodegradation für kleine Moleküle in der Regel schon bei geringerem mikrobiellem Umsatz geführt werden. Vermutlich ist die Kohlenstoffisotopenfraktionierung höherer PAK so gering (131, 192), dass der *in situ*-Abbau nicht mehr nachgewiesen werden kann. In diesen Fällen kann es sinnvoll sein, die Wasserstoffisotopenfraktionierung zu untersuchen. Jedoch ist die Messung der Wasserstoffisotopensignatur mit höherer Messungengenauigkeit und geringerer Empfindlichkeit verbunden.

Wichtig für die Interpretation von Isotopenverhältnissen zur Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus ist die Abhängigkeit der in Laborversuchen bestimmten Isotopenfraktionierungsfaktoren von der Kultivierungstemperatur. Für den Toluolabbau unter sulfatreduzierenden Bedingungen zeigte die Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenfraktionierung im Temperaturbereich zwischen 12 bis 35 °C keine signifikanten Unterschiede, während beim aeroben Toluolabbau die Temperatur im genannten Bereich Auswirkungen auf die Isotopenfraktionierung hatte (138). Um Isotopenfraktionsuntersuchungen aus Laborstudien auf Feldstudien übertragen zu können, sollten mögliche Temperatureinflüsse

überprüft werden. Grundsätzlich sollten Isotopenfraktionierungsfaktoren für realistische Temperaturbedingungen von Grundwasserleitern bestimmt werden. Da die Temperatur des oberflächennahen Grundwassers meist nur um wenige Grad Celsius im Jahresverlauf schwankt, können so Laborerkenntnisse meist problemlos auf den entsprechenden Aquifer übertragen werden.

Die Wachstumskinetik scheint nach bisherigen Erkenntnissen keinen Einfluss auf die Isotopenfraktionierung zu haben. So wurden beim Toluolabbau unter sulfatreduzierenden Bedingungen über einen Zeitraum von 3 Monaten im Vergleich zu einem Abbauparallel von 2 Wochen keine Unterschiede bei der Isotopenfraktionierung festgestellt (138). Auch für den anaeroben Benzolabbau waren die Kohlenstoff- sowie Wasserstofffraktionierung bei deutlich höheren Abbauraten gleich (127).

Für Abbauparallele mit gleichen Reaktionsmechanismen ist die Isotopenfraktionierung in der Regel sehr ähnlich. Der anaerobe Toluolabbau verläuft über die Addition von Fumarat an die Methylgruppe des Toluols. Dieser Prozess wird durch das Enzym Benzylsuccinat-Synthase katalysiert (90, 182, 209). Bei der Untersuchung des Toluolabbaus unter nitrat-, eisen(III)- und sulfatreduzierenden Bedingungen wurde eine einheitliche Kohlenstoffisotopenfraktionierung nachgewiesen (135, 138). Auch für den anaeroben sowie aeroben MTBE-Abbau wurden jeweils sehr ähnliche Kohlenstoff- bzw. Wasserstoffisotopenfraktionierungsfaktoren bestimmt (80, 101, 112, 116, 178, 179). Weiterhin weisen die bisher bekannten Kohlenstoffisotopenfraktionierungsfaktoren für die reduktive Dechlorierung von verschiedenen chlorierten Ethenen kaum Schwankungen auf (16, 100, 122, 173).

1.2.6 Abschätzung des mikrobiellen *in situ*-Schadstoffabbaus mit Hilfe der Isotopenfraktionierung

Eine Berechnung des mikrobiellen Schadstoffabbaus wurde bereits in vielen Studien anhand der Veränderung der Isotopensignatur durchgeführt (32, 67, 81, 123, 134, 141, 146, 158-160, 184, 197-199). Dabei wurde für die prozentuale Abschätzung der mikrobiellen Schadstoffreduzierung (Biodegradation; B [%]) die Rayleigh-Gleichung verwendet. Für die Berechnung wird die Konzentrationsänderung C_t/C_0 zwischen Schadstoffquelle und einer im Grundwasserabstrom befindlichen Messstelle aus der Änderung des Isotopenverhältnisses und einem geeigneten Isotopenfraktionierungsfaktor (α) bestimmt (Gl. 1.7). Bei der Abschätzung wird davon ausgegangen, dass entlang der betrachteten Grundwasserfließstrecke keine signifikanten Verdünnungseffekte auftreten und der Anreicherungsfaktor konstant sowie repräsentativ für die intrinsische Biodegradation ist (216).

$$B[\%] = \left(1 - \frac{C_t}{C_0}\right) \times 100 = \left[1 - \left(\frac{R_t}{R_0}\right)^{\left(\frac{1}{\alpha-1}\right)}\right] \times 100 \quad (1.7)$$

Weiterhin kann eine *in situ*-Abbaurrate erster Ordnung λ mit Hilfe der Veränderung des Isotopenverhältnisses und einem geeigneten Isotopenfraktionierungsfaktor berechnet werden (Gl. 1.8) (141).

$$\lambda = -\frac{1}{(\alpha-1) \times t} \ln\left(\frac{R_t}{R_0}\right) \quad (1.8)$$

Die Zeit (t) kann über die Grundwasserfließgeschwindigkeit (v) und dem Abstand zwischen Schadstoffquelle und einer im Grundwasserabstrom befindlichen Messstelle (s) abgeschätzt werden (Gl. 1.9).

$$t = \frac{s}{v} \quad (1.9)$$

1.2.7 Abiotische Isotopeneffekte in kontaminierten Grundwasserleitern

Kontaminierte Grundwasserleiter sind komplexe Systeme, die meist durch eine heterogene Verteilung von Zonen mit hoher bzw. niedriger Biodegradation geprägt sind. Bei der konventionellen Grundwasserprobenahme über den gesamten Brunnenpegelquerschnitt kommt es häufig zur Mischung von Grundwasser aus verschiedenen Abbauzonen. Die Bereiche mit den höchsten Schadstoffkonzentrationen sind meist durch einen geringeren mikrobiellen Abbau und somit durch eine geringe oder keine Isotopenfraktionierung gekennzeichnet. Das sich durch den Mischungsprozess ergebende Isotopensignal wird von der Zone mit der höchsten Schadstoffkonzentration bestimmt. Somit wird das Isotopensignal aus Bereichen mit einer hohen Biodegradation überlagert, was zur Bestimmung einer verminderten Isotopenfraktionierung führt (67, 114, 158). Die Folge ist eine Unterschätzung des mikrobiellen Schadstoffabbaus (67, 114, 158). Durch eine tiefenorientierte Probenahme mit Hilfe von Schlauch- oder Scheibenpackern können Mischungsvorgänge vermindert (163) und der mikrobielle Schadstoffabbau anhand der Analyse der Isotopenfraktionierung in einem vertikalen Profil genauer erfasst werden.

Eine wichtige Voraussetzung zur Interpretation des mikrobiellen Schadstoffabbaus anhand der Isotopenfraktionierung ist eine hinreichend isotopisch homogene Kontaminationsquelle. Wenn sich in einem Untersuchungsgebiet ein Schadstoff aus Quellen mit unterschiedlicher Isotopensignatur mischt, kann es zu einer Anreicherung von schweren Isotopen in der Schadstofffraktion kommen, ohne dass ein mikrobieller Abbau stattgefunden hat. In diesem Fall ist eine gute hydrogeologische Erkundung des Standortes notwendig, um eine Schadstoffquelle mit ihrer Abstromfahne sicher zu korrelieren. Erfahrungsgemäß treten isotopisch inhomogene Schadstoffquellen selbst an großen Standorten nur selten auf.

Der Nachweis der Biodegradation anhand der Isotopenfraktionierung ist bei geringen Abbaugraden relativ unempfindlich. Eine messbare Veränderung der Isotopensignatur kann je nach Höhe der Isotopenfraktionierung häufig erst nach einem relativ hohen Schadstoffumsatz nachgewiesen werden. In der direkten Umgebung der Schadstoffquelle kann z.B. eine permanente Nachlösung von Schadstoff aus der Kontaminationsquelle zu einer deutlichen Abschwächung der Isotopenfraktionierung führen. Dies trägt zu einer geringen Empfindlichkeit der Methode in der unmittelbaren Nähe der Schadstoffquelle bei.

Die Verflüchtigung von Schadstoffen verursacht einen nicht nachweisbaren bzw. gering inversen Isotopeneffekt (89, 96, 101, 150, 172, 174, 203, 204). Inverse Isotopeneffekte führen im Gegensatz zur biologischen Isotopenfraktionierung zu einer Anreicherung von leichten Isotopen (^{12}C , ^1H) der im Grundwasser gelösten Schadstoffe. Wenn ein Aquifer einer starken Verflüchtigung von Schadstoffen unterliegt, kommt es zu einer Abschwächung der mikrobiellen Isotopenfraktionierung, was eine Unterschätzung des mikrobiellen Schadstoffabbaus zur Folge hätte. Da jedoch in den gemäßigten Klimazonen der Austrag von Schadstoffen aus kontaminierten Grundwasserleitern durch die Verflüchtigung meist vernachlässigbar ist, spielt dieser Prozess bei der Interpretation von Isotopendaten kaum eine Rolle.

Die Sorption von Schadstoffen an die Aquifermatrix kann die Konzentration von Schadstoffen im Grundwasser erheblich beeinflussen. Im Gegensatz dazu werden die Isotopensignaturen von Schadstoffen durch Sorption in Grundwasserleitern unter den meist Umständen nur geringfügig beeinflusst (151, 168, 171). Bei Versuchen mit Flüssigchromatographie-(HPLC-high performance liquid chromatography)-Säulen wurde festgestellt, dass durch Sorption Isotopeneffekte hervorgerufen werden können (24, 114). Somit wäre eine Isotopenfraktionierung beim Schadstofftransport im Aquifer denkbar (114). Ein Modell zur Abschätzung des maximal zu erwartenden Isotopeneffektes auf Grund der sorptiven Wechselwirkung mit der porösen Aquifermatrix wurde erarbeitet (114). Wahrscheinlich spielt die sorptive Isotopenfraktionierung beim Schadstofftransport gegenüber dem mikrobiellen Abbau im Aquifer eine untergeordnete Rolle und hat in stationären Schadstofffahnen wohl

keine Bedeutung. Eine signifikante Isotopenfraktionierung, die auf Sorption als Ursache hindeutet, konnte bisher in kontaminierten Grundwasserleitern nicht nachgewiesen werden. Chemische Reaktionen können zu einer signifikanten Isotopenfraktionierung führen. So konnte für die reduktive Dehalogenierung von chlorierten Methanverbindungen und Ethenen mittels Eisen eine deutliche Kohlenstoffisotopenfraktionierung nachgewiesen werden (14, 44, 59, 167). Auch wäre es denkbar, dass bei der Hydrolyse von MTBE eine Isotopenfraktionierung auftritt. In Grundwasserleitern sollten die abiotische Dehalogenierung sowie die Hydrolyse vernachlässigbar sein und somit kaum einen Einfluss auf die Isotopensignatur eines Schadstoffes ausüben.

1.2.8 Wahl eines geeigneten Isotopenfraktionierungsfaktors

Zur Quantifizierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus in Grundwasserleitern ist ein geeigneter Isotopenfraktionierungsfaktor notwendig, dessen richtige Wahl die Kenntnis des dominierenden Abbaupfad bzw. der Milieubedingungen erfordert. Im günstigsten Fall gibt es molekularbiologische Voruntersuchungen, Metabolitenanalysen bzw. Mikrokosmenstudien, die Aufschluss über Abbaupfade im Aquifer geben können. Diese Informationen sind jedoch nur selten verfügbar. Da aber viele Abbaupfade an bestimmte Redoxbedingungen geknüpft sind, kann meist die Auswertung von hydrogeochemischen Daten, wie z.B. die Konzentration von Elektronenakzeptoren und deren reduzierte Äquivalente sowie das Redoxpotenzial bei der Bestimmung des entsprechenden Abbaupfad und somit bei der Wahl eines geeigneten Isotopenfraktionierungsfaktors helfen. Darüber hinaus kann eine simultane Analyse der Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopensignatur eines Schadstoffes zur Charakterisierung der mikrobiellen Abbauprozesse verwendet werden. In verschiedenen Laborstudien wurde die Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenfraktionierung für den aeroben und anaeroben MTBE-Abbau untersucht (80, 101, 112, 116, 178, 179). Es zeigte sich, dass die Kohlenstoffisotopenfraktionierung für den anaeroben Abbau deutlich höher ist als für die aerobe Umsetzung. Für die Wasserstoffisotopenfraktionierung wurden dagegen umgekehrte Verhältnisse nachgewiesen. Aus dieser Erkenntnis lassen sich theoretische Bereiche für eine mögliche Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopensignatur unter oxidischen bzw. anoxischen Bedingungen ableiten. Die tatsächlich an einem Feldstandort gemessenen Isotopenverhältnisse werden mit den theoretischen Bereichen verglichen, um auf einen aeroben oder anaeroben *in situ*-MTBE-Abbau schließen zu können (116, 216). Grundsätzlich lässt sich das Prinzip auch auf andere Schadstoffe übertragen, insofern diese signifikante Unterschiede bei der Kohlenstoff- und/oder Wasserstoffisotopenfraktionierung für entsprechende Abbaupfade aufweisen.

Sind für ein und denselben Abbaupfad mehrere Isotopenfraktionierungsfaktoren

vorhanden, sollte stets derjenige für die Berechnung der Biodegradation verwendet werden, der repräsentativ für die höchste Isotopenfraktionierung ist. Somit kann das Risiko einer Überschätzung des mikrobiellen Schadstoffabbaus verringert werden. Die Abhängigkeit der berechneten Biodegradation von variierenden Isotopenfraktionierungsfaktoren demonstrierten Meckenstock *et al.* (2004) (133). Dabei zeigte sich, dass bei einer geringen Veränderung der Isotopensignatur die richtige Wahl des Isotopenfraktionierungsfaktors für die Bestimmung der Biodegradation ausschlaggebend ist. Mit zunehmender Differenz des Isotopenverhältnisses wird der Unterschied des berechneten mikrobiellen Abbaus für verschiedene Isotopenfraktionierungsfaktoren deutlich geringer.

Bei dem großen Spektrum von organischen Schadstoffen ist es möglich, dass für den Abbauweg einer bestimmten Substanz kein geeigneter Isotopenfraktionierungsfaktor publiziert wurde. In diesem Fall ist es erforderlich, anhand von Laborabbauversuchen den entsprechenden Isotopenfraktionierungsfaktor zu bestimmen. Ist jedoch der initiale Reaktionsmechanismus für den Abbau des Schadstoffes bekannt, kann unter Umständen die Größenordnung des Isotopenfraktionierungsfaktors abgeschätzt werden (60). Die Ableitung eines solchen theoretischen Faktors ersetzt jedoch nicht die Bestimmung des Isotopenfraktionierungsfaktors im Referenzexperiment.

1.2.9 Validierung des Konzeptes zur Quantifizierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus anhand der Isotopenfraktionierung

Die Analyse der Isotopenfraktionierung wurde bisher nur in einer Feldstudie hinsichtlich der Quantifizierung des biologischen Abbaus mit unabhängigen Methoden überprüft. Im Mittelpunkt stand die Frage, ob mit Hilfe eines Isotopenfraktionierungsfaktors aus Laborexperimenten der mikrobielle Schadstoffabbau anhand der Rayleigh-Gleichung berechnet werden kann. Peter *et al.* (2004) quantifizierten durch unterschiedliche Ansätze den *o*-Xylolabbau für den Grundwasserleiter eines ehemaligen Gaswerkgeländes, welches stark mit BTEX und PAK kontaminiert ist (146). Die Biodegradation wurde durch ein reaktives Transportmodell unter Verwendung der Massenflussraten des *o*-Xylols, die über integrale Pumpversuche bestimmt wurden, abgeschätzt. Weiterhin wurde der mikrobielle Abbau des *o*-Xylols anhand der Isotopenfraktionierung berechnet. Hierfür wurde ein Isotopenfraktionierungsfaktor aus einer Laborstudie ausgewählt (158), der entsprechend den Milieubedingungen am Standort den mikrobiellen *o*-Xylolabbau widerspiegelte. Als dritte Methode wurde eine Kombination aus den beiden vorher dargestellten Verfahren benutzt. Alle drei Berechnungsansätze ergaben einheitliche Ergebnisse, was darauf schließen ließ, dass die Berechnung durch die Isotopenfraktionierung für die Abschätzung des mikrobiellen Schadstoffabbaus gut geeignet ist (146).

1.3 Einsatz isotopisch markierter Verbindungen zur Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus im Rahmen von Tracerversuchen

Mit Hilfe von Tracerversuchen kann der mikrobielle Schadstoffabbau in Grundwasserleitern charakterisiert werden. Dabei wird der zu untersuchende Schadstoff als reaktiver Tracer zusammen mit einem konservativen Tracer, z.B. Salzen, Farbstoffen oder deuteriertem Wasser, in einen Aquifer eingespeist. Es kommen hauptsächlich zwei Techniken zum Einsatz, zum einen werden die Tracer in einer Messstelle eingeleitet und nach einer bestimmten Verweilzeit im Aquifer aus der gleichen Messstelle wieder extrahiert (Push & Pull-Tracertest), zum anderen wird nach der Einspeisung von Tracern an einem Injektionsbrunnen die Verteilung dieser an verschiedenen Kontrollmessstellen entlang eines Grundwasserfließfeldes überwacht. Neben dem Einsatz von Stoffen mit einer natürlichen Isotopenhäufigkeit (siehe als Beispiel (77) in Anhang A) werden häufig auch isotopisch markierte Verbindungen als reaktive Tracer eingesetzt. Da radioaktive Tracer ein Risiko für Mensch und Umwelt darstellen, werden zunehmend ^{13}C - bzw. ^2H -markierte Tracer verwendet. Die Eignung dieser Tracer zur Erkundung des Verbleibs von Schadstoffen in kontaminierten Grundwasserleitern wurde bereits in verschiedenen Tracerexperimenten untersucht (13, 176, 189) bzw. ((63, 76) siehe Anhang B und C). Die Vorteile isotopisch markierter Tracer sind, dass sie selbst in sehr geringen Konzentrationen sensitiv detektiert werden können und verglichen mit der unmarkierten Spezies ein ähnliches Transportverhalten im Grundwasserleiter aufweisen (13, 89, 151). Weiterhin können durch den Einbau der isotopischen Markierung in Bestandteile der Biomasse und in Metabolite das am Schadstoffabbau beteiligte, mikrobielle Konsortium bzw. biochemische Abbauege in kontaminierten Aquiferen charakterisiert werden. So konnten durch die ^{13}C - bzw. ^2H -Anreicherung in Fettsäuren am Schadstoffabbau beteiligte Mikroorganismengruppen identifiziert werden (3, 87, 110, 145, 149). Durch die Analyse von deuterierten Metaboliten wurden dominierende Abbauege von BTEX in kontaminierten Grundwasserleitern bestimmt (156).

Bei der Biodegradation von ^{13}C -markierten Substrat wird ^{13}C in Desoxyribonucleinsäure (DNA) oder Ribonucleinsäure (RNA) von Mikroorganismen eingebaut. Mit Hilfe des Stable Isotope Probing (SIP) kann über die Dichtegradientenzentrifugation die isotopisch markierte von der nicht markierten DNA oder RNA abgetrennt werden (152). Durch die Analyse der isotopisch markierten DNA oder RNA mit "Fingerprinting"-Methoden basierend auf Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können Mikroorganismen, die direkt am Abbau des ^{13}C -markierten Substrats beteiligt sind, identifiziert werden. Diese Methode wurde zur Charakterisierung von Naphthalin- bzw. Phenol-abbauenden Mikroorganismen im Rahmen von Tracerversuchen verwendet (103, 143).

Der Einsatz von ^{13}C - bzw. deuterierten reaktiven Tracern ermöglicht die Quantifizierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus (76, 189). Neben klassischen Modellierungsansätzen kann auch über den Einbau von ^{13}C und ^2H in Mineralisierungsprodukte (CO_2 , H_2O) bzw. Metabolite eine Abschätzung der Biodegradation vorgenommen werden (149, 156, 176).

Trotz des hohen Informationsgehalts über den *in situ*-Schadstoffabbau, der durch klassische Tracerversuche mit isotopisch markierten Verbindungen gewonnen werden kann, sind solche Experimente oftmals mit hohen Kosten verbunden, da isotopisch gelabelte Tracer meist teuer sind und in relativ hohen Mengen eingesetzt werden müssen. Eine innovative Methode zum Nachweis des *in situ*-Schadstoffabbaus ist die Exposition von Mikrokosmen, welche mit ^{13}C -markiertem Testsubstrat dotiert sind (BACTRAPs[®]) ((65, 107) siehe Anhang D, E). Ein Vorteil der BACTRAPs gegenüber klassischen Tracerversuchen ist die geringere Menge an isotopisch markierten Substanzen, die für die Versuche eingesetzt werden muss, was einen kostengünstigeren Einsatz der Methode ermöglicht. Als Trägermaterialien für die isotopisch markierten Verbindungen dienen z.B. Aktivkohlen oder künstliche Polymere. Für die Sorption von Benzol und Toluol sind hochporöse Bio-Sep[®]-Kugeln mit einer hohen inneren Oberfläche gut geeignet (21, 71, 185). Zur Herstellung der BACTRAPs wird ein perforiertes Teflonrohr mit den Bio-Sep-Kugeln oder einem anderen Trägermaterial befüllt, sterilisiert, hydratisiert und nachfolgend mit ^{13}C -markiertem Testsubstrat beladen. Die BACTRAPs werden direkt in den Grundwasserleiter über einen Zeitraum von 6 bis 12 Wochen eingebracht. Mikroorganismen, die sich auf der Oberfläche ansiedeln und das ^{13}C -markierte Testsubstrat nutzen, verwenden den schweren Kohlenstoff (^{13}C) zur Synthese ihrer Biomasse. BACTRAPs mit unmarkiertem Substrat werden zur Kontrolle der natürlichen Isotopensignatur der Biomasse eingesetzt. Anhand der Isotopensignatur von Biomarkern wie Fettsäuren oder Aminosäuren kann die Assimilation des ^{13}C -Kohlenstoffs vom markierten Testsubstrat nachgewiesen werden. Das BACTRAP-System wurde erfolgreich für den Nachweis des mikrobiellen Abbaus von Toluol und Benzol in kontaminierten Grundwasserleitern eingesetzt (21, 71, 185).

1.4 Arbeitsziele und Kooperationen

Wie bereits in vielen Studien gezeigt wurde, kann mit Hilfe der Analyse der Isotopenfraktionierung die Biodegradation in einem kontaminierten Grundwasserleiter untersucht werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Tragfähigkeit von Konzepten auf Grundlage von stabilen Isotopen zur Charakterisierung des Schadstoffabbaus an einem komplexen Feldstandort überprüft werden. Hierfür wurde die BTEX-Schadstofffahne einer ehemaligen Benzolproduktionsanlage in der Nähe von Zeitz (Sachsen-Anhalt) ausgewählt, wobei sich die Untersuchungen vor allem auf den oberen Grundwasserleiter konzentrierten. Die Arbeitsziele waren:

- Die Erfassung der Isotopenfraktionierung von Hauptkontaminanten innerhalb der BTEX-Fahne zur Charakterisierung und Quantifizierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus;
- Die Überprüfung der Quantifizierung der Biodegradation von Schadstoffen auf Grundlage der Rayleigh-Gleichung mit Hilfe von unabhängigen Berechnungsmethoden;
- Die Untersuchung des Einflusses abiotischer, nichtfraktionierender NA-Prozesse auf die Abschätzung des mikrobiellen Schadstoffabbaus anhand der Rayleigh-Gleichung;
- Die Analyse der Isotopensignatur von relevanten Elektronenakzeptoren sowie Mineralisierungsprodukten für die Bestimmung von relevanten Abbauprozessen;
- Die Anwendung von *in situ*-Mikrokosmen (BACTRAPs) zur Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus.

Für die Untersuchung der Biodegradation in der Schadstofffahne des oberen Grundwasserleiters am Standort Zeitz wurden die vertikale und horizontale Veränderung der Isotopensignatur der Hauptkontaminante Benzol in verschiedenen Monitoringkampagnen analysiert. Im Rahmen der ersten Monitoringkampagne wurden die Schadstoffisotopenverhältnisse aller im oberen Grundwasserleiter ausgebauten Messstellen erfasst (Kap. 2). Die Erhebung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Andrea Vieth (GFZ-GeoForschungsZentrum Potsdam, Section 4.3). Zusätzlich wurden die Kohlenstoffisotopensignaturen des gelösten anorganischen Kohlenstoffs (DIC) und Methans sowie das Schwefelisotopenverhältnis des Sulfats bestimmt, um weitere Informationen über die Biodegradation der Schadstoffe und Abbaubedingungen im Aquifer ableiten zu können. Die Analyse der Isotopensignatur des Sulfats wurde von Dr. Kay Knöller (UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle, Department Isotopenhydrologie) durchgeführt. Alle Konzentrationen, die in Kapitel 2 erwähnt sind, wurden durch das Handelschemische Prüfinstitut Hähnel und das Department Analytik am UFZ ermittelt.

In einer weiteren Messkampagne wurden die Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopensignatur des Benzols untersucht, um den dominierenden Abbauweg bzw. die Biodegradation des Benzols zu bestimmen (Kap. 5). Die Analyse der Isotopenverhältnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Matthias Gehre, Nicole Stelzer und Katja Theuerkorn (UFZ, Department Isotopenbiogeochemie). Alle Konzentrationen der Felduntersuchung, die in Kapitel 5 erwähnt sind, wurden durch das Handelschemische Prüfinstitut Hähnel und das Department Analytik am UFZ bestimmt. Ein weiterer Aspekt der Untersuchungen war, den Einfluss von nicht-isotopenfraktionierenden Prozessen auf die Berechnung der *in situ*-Biodegradation mittels der Rayleigh-Gleichung zu prüfen. Die mathematischen Grundlagen dafür wurden in Kooperation mit Dr. Martin Thullner (UFZ, Department Umweltmikrobiologie) erarbeitet.

Bisher gibt es nur wenige Studien, die anhand unabhängiger Methoden zeigen, dass die Rayleigh-Gleichung eine geeignete Grundlage ist, um den mikrobiellen Schadstoffabbau in einem Grundwasserleiter zu bestimmen. Deshalb wurde ein Multitracer-Experiment entwickelt, was es ermöglichte, die über die Rayleigh-Gleichung berechnete Biodegradation mit Hilfe von unabhängigen Methoden zu verifizieren (Kap. 4). Die Konzentrationen der Tracer wurden durch das Department Analytik am UFZ ermittelt. Die Feldarbeiten und Zusammenfassung der erhobenen Daten erfolgten in Zusammenarbeit mit Jana Bauer (Forschungszentrum Jülich, Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre). Für die Charakterisierung des Abbauweges im untersuchten Aquifertransekt wurden Metabolitenuntersuchungen durchgeführt. Die Analysen wurden durch Dr. Christian Griebler (GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Institut für Grundwasserökologie) geleitet. Die Isotopensignatur des Grundwassers wurde durch Willibald Stichler (GSF, Institut für Grundwasserökologie) bestimmt. Die Entwicklung der mathematischen Grundlagen zur Berechnung der während des Tracerversuches umgesetzten Massen an reaktiven Tracer wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Piotr Maloszewski (GSF, Institut für Grundwasserökologie) erarbeitet.

In zentralen Bereichen von Schadstofffahnen ist der mikrobielle Abbau von Kontaminanten oftmals zu gering, um ihn anhand der Analyse der Isotopenfraktionierung zu erfassen. Für den Nachweis des mikrobiellen Schadstoffabbaus im stark kontaminierten Bereich des Standortes Zeitz wurde ein BACTRAP-Experiment durchgeführt (Kap. 3). Die Arbeiten wurden im Wesentlichen von Nicole Stelzer (UFZ, Department Isotopenbiogeochemie) geplant und durchgeführt. Eine Unterstützung meinerseits erfolgte bei der Datenauswertung und Erstellung eines Manuskriptes über die Ergebnisse des BACTRAP-Experimentes (Kap. 3).

2 CHARAKTERISIERUNG DES MIKROBIELLEN SCHADSTOFF- ABBAUS MIT HILFE VON ISOTOPENCHEMISCHEN METHODEN

Anko Fischer, Andrea Vieth, Kay Knöller, Thorsten Wachter, Andreas Dahmke, Hans-Hermann Richnow

(Dieses Kapitel wurde in der Zeitschrift Grundwasser 3, S. 159-172, 2004 veröffentlicht.)

2.1 Kurzfassung

Zur Charakterisierung des mikrobiellen *in situ*-Schadstoffabbaus im stark kontaminierten Grundwasserleiter des ehemaligen Hydrierwerkes Zeitz wurden isotopenchemische Methoden angewendet, um das natürliche Abbaupotenzial autochthoner Mikroorganismen zu untersuchen. Die Änderung der Kohlenstoffisotopensignatur des Methans, des gelösten, anorganischen Kohlenstoffs (DIC) sowie des Schwefelisotopenverhältnisses des Sulfats dienten als biogeochemische Indikatoren für die mikrobiellen Abbauprozesse. Die Anreicherung von isotopisch leichtem DIC im Bereich der Schadstofffahne spiegelte die Mineralisierung der Kontaminanten (BTEX) wider. Mit Hilfe der berechneten Anreicherungsfaktoren $\epsilon(g)_{\text{DIC-CH}_4}$ konnten methanogene Zonen überwiegend innerhalb der stark belasteten Bereiche sowie Zonen des Methanabbaus im nördlichen Grundwasserabstrom nachgewiesen werden. Die Veränderung der Schwefelisotopensignatur des Sulfats zeigte, dass die Sulfatreduktion ein wesentlicher Prozess des mikrobiellen *in situ*-Abbaus besonders in den Randzonen der Schadstofffahne ist. In diesen Bereichen wurde anhand der Kohlenstoffisotopenzusammensetzung des Benzols ein intensiver Schadstoffabbau durch autochthone Mikroorganismen nachgewiesen. Die Analyse der vertikalen Struktur der Schadstofffahne ergab unterschiedliche Verteilungen isotopen- und hydrogeochemischer Parameter in randlichen und zentralen Zonen der Kontamination. Eine mikrobielle Umsetzung von Benzol konnte am oberen Fahnenrand im nördlichen Randbereich der Schadstofffahne auf Grund von Unterschieden in der Isotopensignatur des Benzols nachgewiesen werden.

2.2 Abstract

To characterise the microbial natural attenuation potential of a BTEX-contaminated aquifer at the test site Zeitz (Germany), isotope geochemical techniques were applied. The carbon isotope composition of methane and dissolved inorganic carbon (DIC) as well as the sulphur isotope signatures of sulphate were used to trace microbial degradation processes. The mineralisation of contaminants was reflected by the enrichment of isotopically light DIC within the plume. The enrichment of heavy sulphur isotopes in sulphate implied that sulphate reduction was a major microbial process on site. The carbon isotopic composition of methane provided evidence for active methanogenesis in the contamination plume. Methanotrophs seemed to compete with contaminant degraders for available electron acceptors, in particular at plume fringes. Additionally, the carbon isotope composition of benzene indicated that benzene was intensively degraded at marginal parts of the plume. Investigations of the vertical structure of the plume showed that *in situ*-degradation, as indicated by hydrogeological and isotopic parameters, took place at plume fringes.

2.3 Einführung

In kontaminierten Aquiferen können natürliche Prozesse zum Rückhalt bzw. Abbau der vorhandenen Schadstoffmenge beitragen. Die US-amerikanische Umweltbehörde (US-EPA) fasst diese unter dem definierten Begriff "Natural Attenuation" (NA) zusammen. Um den natürlichen Rückhalt bzw. Abbau von Schadstoffen in einem kontaminierten Grundwasserleiter als Risikosicherungskonzept anzuwenden, setzt die US-EPA eine Langzeitüberwachung der NA-Prozesse voraus. Aus dieser Intention wurde der Begriff "Monitored Natural Attenuation" (MNA) geprägt (194). Zum Nachweis, dass durch NA-Prozesse die vorhandene Schadstoffmenge an einem kontaminierten Standort zurückgehalten bzw. vermindert wird, sollen nach der US-EPA die folgenden Mindestanforderungen erfüllt werden (194):

- Dokumentation der historischen Daten der Grundwasser- und/oder Bodenchemie des Standortes, aus denen ein eindeutiger Trend der kontinuierlichen Schadstoffreduzierung hervorgeht;
- Erfassung von hydrogeologischen und geochemischen Daten, aus denen indirekt die Art(en) der NA-Prozesse und die damit verbundenen Raten des Schadstoffabbaus bzw. -rückhalts am Standort abgeleitet werden können;
- Durchführung von Feld- oder Mikrokosmenstudien, welche direkt das Selbstreinigungspotenzial eines einzelnen NA-Prozesses am Standort aufzeigen.

Zur Planung von MNA-Vorhaben sollen die einzelnen NA-Prozesse in einem konzeptionellen Standortmodell zusammengeführt werden, um eine realistische Prognose über die zukünftige Entwicklung des Schadensfalles zu erstellen (194).

Während die US-EPA auch Verdünnung, Verflüchtigung und Sorption von Schadstoffen als Rückhalte- bzw. Abbauprozesse akzeptiert, sollte im Sinne der Nachhaltigkeit bei der Anwendung des MNA-Konzeptes nicht die Verlagerung sondern nur der Abbau der Schadstoffe berücksichtigt werden. In Anbetracht einer nachhaltigen Reduzierung des Gefährdungspotenzials einer Kontamination ist die Erforschung und Quantifizierung des Abbauvermögens autochthoner Mikroorganismen ein wesentlicher Faktor für die Bewertung der natürlichen Selbstreinigungskraft eines Aquifers.

Verschiedene Forschungsarbeiten zeigen, dass der Abbau von monoaromatischen Kohlenwasserstoffen (BTEX) nicht nur unter oxischen Verhältnissen (5, 104), sondern auch unter anoxischen Bedingungen stattfindet, wie z.B. in nitrat-, eisen(III)-, sulfatreduzierenden und methanogenen Bereichen von Grundwasserleitern (6, 40, 41, 108, 140, 190, 206, 213).

Der mikrobielle Abbau dieser Verbindungen ist häufig mit einem kinetischen Isotopenfraktionierungseffekt verbunden (98, 127, 135, 139, 158-160, 183, 197). Dabei werden die leichten Isotopologe des Schadstoffes schneller durch Mikroorganismen verwertet als die schweren. Folglich kommt es bei der mikrobiellen Umsetzung zu einer Anreicherung der schwereren Isotopologe in der residualen Schadstofffraktion.

In Laboruntersuchungen mit verschiedenen Misch- bzw. Reinkulturen wurden für den aeroben und anaeroben Benzolabbau die Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopenfraktionierung bestimmt (98, 127). Mit Hilfe dieser Fraktionierungen kann der *in situ*-Abbau des Benzols in einem kontaminierten Aquifer abgeschätzt werden (159, 196, 197). Der wesentliche Vorteil dieses isotopenchemischen Konzeptes ist, dass die Isotopenzusammensetzung im Gegensatz zur Konzentration von BTEX-Verbindungen ausschließlich durch mikrobielle Abbauprozesse und nicht signifikant durch abiotische Effekte wie Verdünnung, Verflüchtigung oder Sorption beeinflusst wird (89, 171, 172). Deshalb ist die Veränderung der Isotopensignatur von Benzol in einem Grundwasserleiter auf die Umsetzung durch autochthone Mikroorganismen zurückzuführen. Dies eröffnet die Möglichkeit, den mikrobiellen Abbau in benzolkontaminierten Grundwasserleitern anhand der Isotopenfraktionierung zu charakterisieren und somit das Isotopenkonzept als Methode in MNA-Sanierungsstrategien zu implementieren.

Weiterhin können auch die Isotopenverhältnisse der Abbauprodukte (z.B. Kohlendioxid, Methan) sowie bioverfügbarer Elektronenakzeptoren Hinweise auf mikrobielle *in situ*-Abbauprozesse in einem kontaminierten Grundwasserleiter liefern (10, 11, 17, 18, 37-39, 61, 62, 83, 84, 102, 118, 166, 196).

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von isopenchemischen Methoden der mikrobielle Schadstoffabbau in einem Aquifer beschrieben und abgeschätzt. Dabei wurden die Analysedaten aus zwei Messkampagnen (Mai und Dezember 2002) verwendet. Diese fanden im Bereich der großräumigen Benzolkontamination im oberen Grundwasserleiter des Testfeldes Zeitz statt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sind Teil des vom Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten RETZINA-Projektes (REferenzT estfeld Zeitz zur Implementierung des „Natural-Attenuation“-Ansatzes) (BMBF Förderkennzeichen 02WT0041). Dieses Verbundvorhaben ist Teil des Forschungsschwerpunkts SAFIRA (SAnierungsForschung In Regional kontaminierten Aquiferen) am UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH.

2.4 Material und Methoden

2.4.1 Probenahme

Die Grundwasserproben wurden nach der DIN-Norm 38402 Teil 13 gewonnen (51). Dabei wurde das Grundwasser mit einer elektrischen Tauchpumpe (Grundfos MP1, Bjerringbro, Dänemark) im verfilterten Bereich der Brunnen gefördert. Die Förderleistung betrug ca. 7 bis 9 l/min. Das Abfüllen in die Probenahmegefäße erfolgte erst, nachdem das zweifache Brunnenvolumen ausgetauscht worden war und die Messwerte für die chemisch-physikalischen Eigenschaften des Grundwassers (Leitfähigkeit, Sauerstoffgehalt, Redoxpotenzial, pH-Wert und Temperatur) annähernd konstant waren. Die Bestimmung des Sauerstoffgehaltes, des Redoxpotenzials, des pH-Wertes, der Leitfähigkeit und der Temperatur wurde während des Pumpens mit geeigneten Elektroden (Oxi 325, LF 325, pH 330, pH 196T; WTW, Deutschland) durchgeführt.

Für die tiefenorientierte Grundwasserbeprobung kam ein Multilevel-Packersystem (MLPS) zur Anwendung (163). Dabei wurden der Förderdruck bzw. die Takt- und Pausenzeit für die Druckbeaufschlagung der Doppelventil-Gasverdrängungspumpen (IMW - Innovative Messtechnik Weiß, Deutschland) so eingestellt, dass eine gleichmäßige und blasenfreie Grundwasserprobenahme gewährleistet werden konnte. Die Pumpen arbeiteten in der Regel mit einer Förderleistung von 40 bis 80 ml/min. Diese Förderleistung war so gering, dass bei der Probenahme die vertikalen Gradienten von isopen- sowie hydrogeochemischen Parametern durch Vermischungseffekte kaum beeinflusst wurden.

2.4.2 Sulfatkonzentrationen

Das Grundwasser wurde über einen Cellulose-Acetat-Filter (Porengröße: 0,45 µm) gegeben und in 20 ml-Kunststoffflaschen (PE) abgefüllt. Die Proben wurden bis zur Analyse bei 4 °C gelagert. Für die Bestimmung der Sulfatkonzentrationen diente ein Ionenchromatographie-System DX-500 (Dionex, USA). Dieses bestand aus einem AS 40-Autosampler, einer GB 40-Gradientenpumpe, einem LC 10-Chromatographiemodul und einem CD 20-Leitfähigkeitsdetektor. Die ionenchromatographische Trennung erfolgte über eine IonPac AS 14-Säule (Dionex, USA), der eine anorganische und organische Vorsäule (IonPac AG 14 bzw. IonPac NG 1, Dionex, USA) vorgeschaltet war.

Als Eluent diente ein Gemisch aus 3,5 mM Na₂CO₃ und 1,0 mM NaHCO₃. Die Flussrate betrug 1,2 ml/min. Die Nachweisgrenze der Ionenchromatographie-Methode für Sulfat lag bei 1 mg/l.

2.4.3 Schwefelisotopenverhältnisse des Sulfats

Für die Bestimmung der Schwefelisotopenverhältnisse des Sulfats wurden 500 ml-PE-Flaschen mit Grundwasser befüllt und mit 2 ml Chloroform versetzt, um die mikrobielle Aktivität zu hemmen. Das in den Proben vorhandene Sulfid wurde mit 0,5 g Zinkacetat zu schwerlöslichem Zinksulfid umgesetzt und der Niederschlag durch Filtration (Porengröße: 0,45 µm) entfernt. Danach wurde die Probe auf einen pH-Wert von ca. 3,0 eingestellt und das Sulfat bei 70°C durch Zugabe von gesättigter Bariumhydroxidlösung gefällt. Der Niederschlag in Form von Bariumsulfat wurde über einen Blaubandfilter (Porengröße: 0,45 µm) vollständig von der wässrigen Phase abgetrennt, anschließend gewaschen und bei 105 °C getrocknet. Der Filter mit der Probe wurde für 2 h bei 800 °C verascht. Das verbleibende Bariumsulfat wurde zur Analyse des Schwefelisotopenverhältnisses von Sulfat verwendet.

Die Messung des ³⁴S/³²S-Verhältnisses der Bariumsulfatprobe erfolgte an einem Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (IRMS, Delta S, Thermo Electron, Deutschland) mit Continuous Flow-Technik (75). Dabei wurde das Bariumsulfat in einem Elementaranalysator (Thermo Electron, Deutschland) bei 1020 °C unter Zudosierung von Sauerstoff zu Schwefeldioxid umgesetzt und im Heliumstrom dem IRMS zugeführt. Die Standardabweichung der beschriebenen Analysenmethode lag bei ≤ 0,3 ‰.

2.4.4 DIC-Konzentrationen

Der Gehalt an DIC in den Grundwasserproben wurde mit der Kohlenstoffanalyseneinheit TOC VSH (Shimadzu, USA) bestimmt. Jede Grundwasserprobe wurde mit 25 %iger Phosphorsäure angesäuert und das entstandene Kohlendioxid mit Stickstoffgas ausgetrieben. Die Bestimmung des Kohlendioxids erfolgte mittels Infrarot-Messung. Die Nachweisgrenze lag bei 10 mgC/l.

2.4.5 Methankonzentrationen

Für die Bestimmung der Methankonzentrationen wurden 5 ml der Grundwasserprobe in 20 ml-Flaschen abgefüllt und mit einem gasdichten Teflonseptum und einer Aluminiumkappe verschlossen. Die Analyse erfolgte an einem Gaschromatographen (GC) mit Flammenionisationsdetektor (6890 Plus, Agilent, USA). Die Proben wurden in einem Headspace-Sampler (7694, Agilent, USA) bei 80 °C 30 min equilibriert und anschließend in den GC injiziert. Für die chromatographische Trennung diente eine AT-Q 13939 Säule (30 m × 0,53 mm ID; Alltech Associates, USA). Das verwendete Temperaturprogramm hatte die folgenden Einstellungen: 35 °C, 4 min isotherm; 40 °C/min bis 220 °C, 5 min isotherm. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1,8 ml/min benutzt. Die Nachweisgrenze für Methan lag bei 10 µg/l.

2.4.6 Kohlenstoffisotopenverhältnisse des Methans und DIC

Für die Bestimmung der Isotopensignatur des Methans und DIC wurden 100 bzw. 200 ml-Weißglasflaschen zu je drei Viertel mit Grundwasser gefüllt. Nach der Probenahme wurden die Flaschen sofort mit einem Butylgummistopfen und einer Aluminiumbördelkappe gasdicht verschlossen und bei 4 °C bis zur Analyse gelagert. In den Flaschen befanden sich bereits ca. 10 bzw. 20 g Natriumchlorid, um die Aktivität der Mikroorganismen zu unterbinden und den Anteil des Methans sowie des Kohlendioxids in der Gasphase zu erhöhen. Vor der Analyse des Kohlenstoffisotopenverhältnisses des DIC wurden die Proben mit konzentrierter Salzsäure auf einen pH-Wert von ca. 1,0 bis 2,0 eingestellt, um einen vollständigen Übergang des DIC in Form von Kohlendioxid in die Gasphase zu gewährleisten.

Die Analyse der Isotopenverhältnisse des Methans und DIC erfolgte an einem GC-C-IRMS-System (gas chromatography/combustion/isotope-ratio mass spectrometry). Dieses bestand aus einem GC (6890 Series, Agilent Technology, USA), einem Verbrennungsofen (Thermo Electron MAT^{GC III}, Deutschland), einer modifizierten Wasserfalle (Nafion[®]-Membran, 50 cm lang, T = 0 °C) und einem Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (Thermo Electron MAT

252, Deutschland). Die Headspace-Proben wurden mit einer gasdichten Spritze (Hamilton, USA) in den GC eingespritzt. Die chromatographische Trennung des Methans und DIC erfolgte an einer CP-PoraPLOT Q-Kapillarsäule (27,5 m × 0,32 mm ID × 10 µm FD; Chrompack, Niederlande) bei einer konstanten Temperatur von 40 °C. Als Trägergas diente Helium mit einer Flussrate von 1,8 ml/min. Jede Probe wurde fünfmal vermessen. Dabei ergaben sich für die beschriebene Analysenmethode Standardabweichungen von ≤ 0,8 ‰. Für Proben, deren Methankonzentrationen kleiner als 10 µg/l waren, konnten keine reproduzierbaren Isotopenverhältnisse für Methan bestimmt werden. Die deutlich höheren DIC-Gehalte ermöglichten eine problemlose Bestimmung der ¹³C/¹²C-Verhältnisse.

2.4.7 Benzolkonzentrationen

Für die Bestimmung der Benzolkonzentrationen wurden 250 ml-Braunglasflaschen mit Schliffstopfen vollständig mit Grundwasser befüllt und bei 4 °C gelagert. Die Vermessung der Proben erfolgte innerhalb von 24 h nach der Probenahme. Für die Headspace-Analyse wurde ein GC (5890 Series II, Agilent, USA), der mit einem Autosampler (19395 A, Agilent, USA) gekoppelt war, verwendet. Vor der Injektion in den GC wurden die Proben zur Einstellung des Phasengleichgewichtes mindestens 40 min bei einer Temperatur von 80 °C equilibriert. Die Trennung der BTEX-Verbindungen erfolgte mit Hilfe einer HP-1 Säule (50 m × 0,32 mm ID × 1 µm FD; Agilent, USA) und folgendem Temperaturprogramm: 50 °C, 1 min isotherm; 5 °C/min bis 120 °C, 8 min isotherm; 8 °C/min bis 130 °C; 20 °C/min bis 250 °C. Als Trägergas diente Stickstoff mit einer Flussrate von 1,8 ml/min. Die Nachweisgrenze der Benzolanalyse betrug 5 µg/l.

2.4.8 Kohlenstoffisotopenverhältnisse des Benzols

Für die Isotopenanalyse des Benzols wurden 1000 ml-Glasflaschen (Schott, Deutschland) vollständig mit Grundwasser gefüllt und mit einem Schraubverschluss mit teflonbeschichtetem Septum (Schott, Deutschland) verschlossen. Die Konservierung der Proben erfolgte durch die Einstellung des pH-Wertes auf 10-12 mit Natriumhydroxid. Die Proben wurden bis zur Probenaufbereitung bei 4 °C gelagert. Für die Extraktion der Analyten diente *n*-Pentan (2 - 10 ml). Das Kohlenstoffisotopenverhältnis des Benzols wurde mit dem gleichen GC-C-IRMS-System bestimmt, wie es auch für die Analyse der Isotopenzusammensetzung des Methans und DIC genutzt wurde.

Je nach Konzentration der Analyten wurden 1 bis 5 µl des *n*-Pentanextraktes über einen CombiPAL-Autosampler (CTC Analytics, Schweiz) in den GC eingespritzt. Die chromatographische Trennung des injizierten Stoffgemisches erfolgte an einer ZB1

Kapillarsäule (60 m × 0,32 mm ID × 1 µm FD; Phenomenex Inc. Torrance, USA) und mit den folgenden Einstellungen des Temperaturprogramms: 40 °C, 3 min isotherm; 4 °C/min bis 100 °C, 5 min isotherm; 4 °C/min bis 120 °C; 20 °C/min bis 200 °C. Als Trägergas wurde Helium mit einer Flussrate von 1,5 ml/min verwendet. Alle Proben wurden fünfmal vermessen. Die Standardabweichung der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Messungen betrug $\leq 0,5 \text{ ‰}$. Die Lösungsmittelextraktion hat keinen signifikanten Einfluss auf die Isotopenzusammensetzung organischer Verbindungen (46).

2.4.9 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von analytischer Qualität (pA).

2.4.10 Berechnungen

Allgemein wird das Kohlenstoffisotopenverhältnis in Form der δ -Notation relativ zu dem internationalen Vienna-PeeDee-Belemnite-Standard (V-PDB) angegeben:

$$\delta^{13}\text{C} [\text{‰}] = \left(\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{Probe}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{Standard}}} - 1 \right) \times 1000. \quad (2.1)$$

Analog zu Gleichung 2.1 wird das Schwefelisotopenverhältnis $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ als δ -Notation in Bezug auf den internationalen Vienna-Canyon-Diablo-Trolyite-Standard (V-CDT) berechnet.

Die kinetische Isotopenfraktionierung einer Transformationsreaktion kann mit Hilfe der Rayleigh-Gleichung beschrieben werden (94, 154):

$$\frac{R_t}{R_0} = \left(\frac{C_t}{C_0} \right)^{\left(\frac{1}{\alpha} - 1 \right)}. \quad (2.2)$$

R_t und R_0 bezeichnen das Isotopenverhältnis einer Verbindung zu einer bestimmten Zeit (t) und zu Beginn der chemischen Umsetzung ($t = 0$). C_t und C_0 geben die Konzentration der Verbindung zu einer bestimmten Zeit (t) und am Anfang der Transformationsreaktion ($t = 0$) an. Der kinetische Isotopenfraktionierungsfaktor α stellt den Zusammenhang zwischen der Änderung der Isotopenzusammensetzung und der Konzentration einer Verbindung in der residualen Fraktion her.

Für die prozentuale Abschätzung der mikrobiellen Schadstoffreduzierung ($B \%$) in einem

verunreinigten Aquifer kann die Rayleigh-Gleichung verwendet werden. Dabei wird der prozentuale Konzentrationsrückgang aus der Änderung der Isotopenverhältnisse und dem kinetischen Isotopenfraktionierungsfaktor bestimmt:

$$B[\%] = \left(1 - \frac{C_t}{C_0}\right) \times 100 = \left[1 - \left(\frac{R_t}{R_0}\right)^{\left(\frac{1}{\alpha - 1}\right)}\right] \times 100. \quad (2.3)$$

Voraussetzung für diese Berechnung ist das Vorhandensein geeigneter Isotopenfraktionierungsfaktoren aus Laborstudien. Diese sollten entsprechend der vorherrschenden biogeochemischen Abbaubedingungen ausgewählt werden. Außerdem muss die initiale Isotopenzusammensetzung der Schadstoffquelle bekannt sein (159, 196, 197).

Die Isotopensignaturen des DIC im Bereich einer Schadstofffahne bieten die Möglichkeit, den mikrobiellen Schadstoffabbau abzuschätzen. Dabei wird die Veränderung der Isotopenverhältnisse des DIC für eine Isotopenbilanz genutzt (Gl. 2.4). Das Berechnungskonzept wurde in Anlehnung an verschiedene Feldstudien erarbeitet (17, 61, 102).

$$A \times \delta^{13}C_{DIC(GA)} + (1 - A) \times \delta^{13}C_{DIC(Q)} = \delta^{13}C_{DIC(M)} \quad (2.4)$$

$\delta^{13}C_{DIC(GA)}$ bezeichnet das Kohlenstoffisotopenverhältnis des DIC im Grundwasseranstrom der Kontamination. $\delta^{13}C_{DIC(Q)}$ ist die Kohlenstoffisotopensignatur des in der Schadstofffahne gebildeten DIC. $\delta^{13}C_{DIC(M)}$ bezeichnet das $^{13}C/^{12}C$ -Verhältnis des DIC, das im Bereich der Kontamination gemessen wurde. A und 1-A sind die Mischungsanteile der beiden Ausgangsisotopenverhältnisse ($\delta^{13}C_{DIC(GA)}$, $\delta^{13}C_{DIC(Q)}$), aus denen $\delta^{13}C_{DIC(M)}$ resultiert. Mit Hilfe von A und der Konzentration des DIC im Grundwasseranstrom der Schadstofffahne ($C_{DIC(GA)}$ [M]) ist es möglich, die Menge des in der Schadstofffahne gebildeten DIC ($C_{DIC(B)}$ [M]) zu berechnen (Gl. 2.5).

$$C_{DIC(B)} = C_{DIC(GA)} \frac{(1 - A)}{A} \quad (2.5)$$

Die mineralisierte Schadstofffraktion ($C_{Schadstoff}$ [M]) kann unter verschiedenen Annahmen, die später genauer erläutert werden, anhand von $C_{DIC(B)}$ abgeschätzt werden (Gl. 2.6).

$$C_{\text{Schadstoff}} = \frac{C_{\text{DIC(B)}}}{Z_C} \quad (2.6)$$

Z_C ist die Anzahl der Kohlenstoffatome des Schadstoffmoleküls. Es wird davon ausgegangen, dass diese bei der Mineralisierung umgesetzt wird.

In der Literatur wird häufig die Isotopenfraktionierung während der mikrobiellen Methanbildung bzw. des -abbaus anhand einer Isotopenaustauschreaktion beschrieben, welche ein spezieller Fall des allgemeinen chemischen Gleichgewichtszustandes ist (siehe Gl. 2.7) (20, 94, 95, 208). Dabei handelt es sich vielmehr um eine praktische als wissenschaftlich exakte Formulierung, weil biochemische Umsetzungen in erster Linie mit einem kinetischen Isotopeneffekt verbunden sind (94, 95, 208). Unter der Annahme, dass sich das Isotopenverhältnis und die Konzentration des Eduktes während einer biochemischen Transformationsreaktion nicht nachhaltig verändern, kann die kinetische Isotopenfraktionierung näherungsweise anhand derselben Beziehung bestimmt werden, mit der die Isotopenfraktionierung unter Gleichgewichtsbedingungen beschrieben wird.

$$\alpha(g)_{\text{Edukt-Produkt}} = \frac{\delta^{13}\text{C}_{\text{Edukt}} + 1000}{\delta^{13}\text{C}_{\text{Produkt}} + 1000} \quad (2.7)$$

In Gleichung 2.7 stellen die Ausdrücke $\alpha(g)$ den Isotopenfraktionierungsfaktor für eine Isotopenaustauschreaktion und $\delta^{13}\text{C}_{\text{Edukt}}$ bzw. $\delta^{13}\text{C}_{\text{Produkt}}$ die Kohlenstoffisotopenverhältnisse des Edukts bzw. Produkts in Form der δ -Notation dar. Die Isotopenfraktionierung zwischen Edukt und Produkt während einer Gleichgewichtsreaktion kann auch durch den Anreicherungsfaktor $\varepsilon(g)_{\text{Edukt-Produkt}}$ nach folgender Beziehung ausgedrückt werden (35, 94):

$$\varepsilon(g)_{\text{Edukt-Produkt}} \approx \delta^{13}\text{C}_{\text{Edukt}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{Produkt}} \approx 10^3 \ln \alpha(g)_{\text{Edukt-Produkt}} \quad (2.8)$$

Insbesondere bei relativ großen Unterschieden zwischen dem Isotopenverhältnis des Edukts und des Produkts muss beachtet werden, dass ein signifikanter Fehler aus der Anwendung von Gleichung 2.8 resultieren kann (35, 208).

2.5 Resultate und Diskussion

2.5.1 Hydrogeologie und Geochemie des Referenztestfeldes Zeitz

Der kontaminierte Grundwasserleiter befindet sich ca. 8 km nordöstlich der Stadt Zeitz im Bereich des ehemaligen Hydrierwerkes. Hier wurden seit 1938 in großtechnischen Verfahren Treibstoffe, Schmieröle, Benzol und Paraffine auf der Basis der Braunkohlehydrierung und Erdöldestillation hergestellt. Durch die fast vollständige Zerstörung des Werkes während des zweiten Weltkrieges, Havarien, Leckagen sowie unachtsamen Umgang bei der Ver- und Entladung von Rohstoffen bzw. Produktionsgütern kam es zu großflächigen Kontaminationen des Grundwassers.

Der Feldstandort ist durch zwei Grundwasserleiter geprägt (Abb. 2.1). Der obere Aquifer umfasst sowohl Lockergesteine der spätpleistozänen Elsterrasse als auch fluviatile Sande und Schotter des frühen Tertiärs. Beide Schichtabfolgen werden auf Grund der fehlenden hydraulischen Trennung zu einem Grundwasserleiter zusammengefasst. Er hat eine Mächtigkeit von ca. 5 bis 15 m. Der Grundwasserstauer ist hauptsächlich aus tertiären Schluffen und Tonen aufgebaut und ist mit Resten eines tertiären Braunkohleflözes durchsetzt. Seine Mächtigkeit variiert im Untersuchungsgebiet überwiegend zwischen 5 und 20 m. Der untere Grundwasserleiter besteht aus 5 bis 19 m mächtigen Kiesen und Sanden des Tertiärs. In einigen Bereichen besteht eine hydraulische Verbindung zwischen dem oberen und dem unteren Aquifer.

Gegenstand der Untersuchungen zum mikrobiellen *in situ*-Schadstoffabbau in Zeitz war der stärker kontaminierte obere Grundwasserleiter. Das Hauptschadenszentrum befindet sich in unmittelbarer Nähe des ehemaligen Benzoltanklagers und der Destillationsanlage. Hier wurden Benzolkonzentrationen von bis zu 1000 mg/l bestimmt. Von untergeordneter Bedeutung sind die Kontaminationen durch Toluol (max. 50 mg/l), Ethylbenzol (max. 3 mg/l) und Xylole (max. 5 mg/l). Entlang des nord-nordöstlichen Grundwasserabstroms des Schadenszentrums hat sich eine ca. 400 m lange Benzolfahne ausgebreitet (Abb. 2.1).

Im Grundwasser des oberen Aquifers konnten nur geringe Sauerstoff- und Nitratkonzentrationen von überwiegend weniger als 1 mg/l bestimmt werden. Für Sulfat wurden im Grundwasser des Untersuchungsgebietes maximale Gehalte von bis zu 1400 mg/l nachgewiesen (Abb. 2.2). Die DIC- bzw. Methankonzentrationen sind in den stark belasteten Zonen der Schadstofffahne wesentlich höher als in den geringfügig kontaminierten Bereichen (Abb. 2.3 und 2.4). Anhand der hydrogeochemischen Gegebenheiten des Standortes zeigte sich, dass die mikrobielle Sulfatreduktion als dominierender Abbauprozess im Bereich der Schadstofffahne in Frage kommt, während die aerobe Respiration und Nitratreduktion offensichtlich nur vernachlässigbare Anteile an der

Schadstoffumsetzung haben (62, 196). Die methanogene Fermentation hat ebenfalls einen Einfluss auf den *in situ*-Abbau. Jedoch ist davon auszugehen, dass sie im Gegensatz zur Sulfatreduktion nur einen geringeren Anteil an der Schadstoffumsetzung ausmacht (62, 196). Weiterhin wird die mikrobielle Eisen(III)-Reduktion am Standort Zeitz als gering eingeschätzt (201).

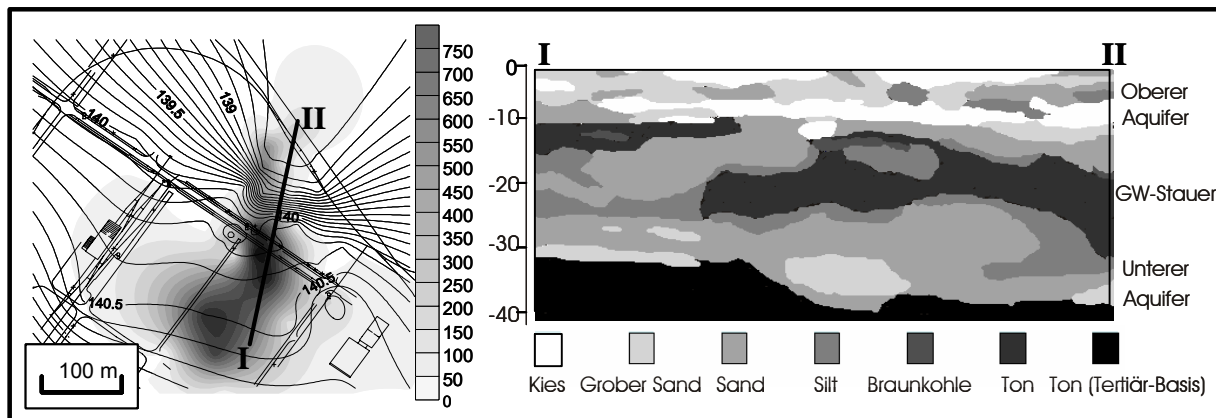


Abbildung 2.1: Flächenhafte Ausdehnung der Benzolfahne (Konzentrationsangaben in mg/l, Daten aus der Messkampagne Mai 2002) im Bereich des oberen Aquifers mit Angabe der Grundwasserisohypsen (Daten aus der Messkampagne Mai 2002). Die Strecke zwischen I und II gibt die Lage des dargestellten hydrogeologischen Profils am Standort Zeitz wieder (verändert nach (78)).

2.5.2 Konzentrationen und Schwefelisotopenverhältnisse des Sulfats

Eine deutliche Minderung der Sulfatkonzentrationen bzw. eine Änderung der Schwefelisotopensignatur des Sulfats im Bereich einer Schadstofffahne zeigt, dass die mikrobielle Sulfatreduktion ein wesentlicher Prozess des Schadstoffabbaus ist (10, 18, 166, 210). Deshalb wurde die flächenhafte Verteilung der Konzentrationen sowie der Schwefelisotopenverhältnisse des Sulfats genauer untersucht, um mögliche Bereiche der mikrobiellen Sulfatreduktion aufzuzeigen und diese mit Abbauzonen der Kontamination zu vergleichen.

Im Grundwasseranstrom der Benzolfahne waren die Sulfatgehalte größer als 400 mg/l (Abb. 2.2). Mit dem Grundwasserabstrom, in nördlicher Richtung, nahmen die Sulfatkonzentrationen ab, wobei sie stellenweise kleiner als 200 mg/l waren. Die niedrigsten Sulfatkonzentrationen wurden im Schadenszentrum sowie im nördlichen Grundwasserabstrom nachgewiesen. Im Randbereich und außerhalb der Benzolfahne waren die Sulfatkonzentrationen des Grundwassers höher als 400 mg/l.

Die $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ -Werte lagen im Untersuchungsgebiet zwischen -1 und +45 ‰ (Abb. 2.2). Im Grundwasseranstrom der Benzolfahne wurden $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ -Verhältnisse von $\leq +7$ ‰ bestimmt.

Entlang des Grundwasserabstroms stiegen die $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ -Werte an. In den Bereichen, in denen die Sulfatkonzentrationen kleiner als 200 mg/l waren, wurden Schwefelisotopenverhältnisse des Sulfats von $\geq +13$ ‰ bestimmt.

Die schwersten $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ -Verhältnisse (+18 bis +45 ‰) wurden im nördlichen Grundwasserabstrom nachgewiesen. In dieser Zone war mit einer bedeutenden Umsetzung von organischem Material durch die mikrobielle Sulfatreduktion zu rechnen. Für Bereiche, die durch Benzolgehalte von >800 mg/l geprägt waren, schwankten die Schwefelisotopenverhältnisse des Sulfats zwischen +12 und +16 ‰. Im Vergleich zum Grundwasseranstrom waren die $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ -Verhältnisse im Hauptschadenszentrum geringfügig schwerer, was auf mikrobielle Aktivität im Quellbereich der Schadstofffahne hindeutete.

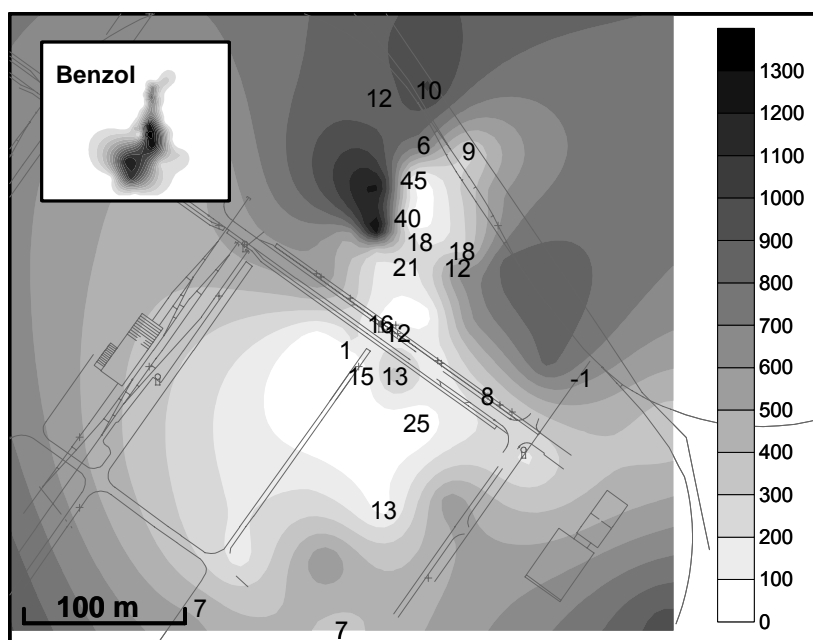


Abbildung 2.2: Sulfatkonzentrationen [mg/l] und $\delta^{34}\text{S}_{\text{SO}_4}$ -Werte [‰ V-CDT] (als Zahlen eingetragen) im Grundwasser des oberen Aquifers am Standort Zeitz (Daten aus Messkampagne Mai 2002).

2.5.3 Konzentrationen und Kohlenstoffisotopenverhältnisse des DIC

In kontaminierten Grundwasserleitern kann eine Erhöhung des DIC-Gehaltes auf die Bildung von Kohlendioxid während des mikrobiellen Schadstoffabbaus zurückgeführt werden (30, 83). Deshalb wurde die flächenhafte Verteilung der Konzentrationen und Kohlenstoffisotopensignaturen des DIC im oberen Grundwasserleiter des Standortes Zeitz näher untersucht, um mögliche Zusammenhänge zum mikrobiellen *in situ*-Abbau aufzuzeigen.

Im Untersuchungsgebiet schwankten die Konzentrationen des DIC zwischen 43 und 252 mgC/l (Abb. 2.3). Im Grundwasseranstrom der Benzolfahne wurden DIC-Gehalte von

<110 mgC/l bestimmt. Die Konzentrationen des DIC nahmen in Grundwasserfließrichtung zu, wobei die höchsten Gehalte im nördlichen Grundwasserabstrom der Benzolfahne nachgewiesen wurden. Im östlichen, westlichen und nördlichen Randbereich der Kontamination waren die Konzentrationen des DIC <150 mgC/l. Grundwasser mit DIC-Gehalten >210 mgC/l war überwiegend im Bereich des Hauptschadenszentrums und im nördlichen Grundwasserabstrom zu finden. Diese Erhöhung des DIC-Gehaltes deutete darauf hin, dass innerhalb der Kontamination der Schadstoff mikrobiell zu Kohlendioxid umgesetzt wurde.

Im Untersuchungsgebiet lagen die Kohlenstoffisotopenverhältnisse des DIC zwischen -26 und -16 ‰ (Abb. 2.3). Die leichtesten $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ -Werte (-26 bis -23 ‰) wurden in Bereichen bestimmt, in denen die Konzentrationen des DIC >150 mgC/l waren. Mit abnehmenden DIC-Gehalten wurden die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse grundsätzlich schwerer. DIC mit der größten ^{13}C -Anreicherung (-22 bis -16 ‰) wurde überwiegend im unmittelbaren Grundwasseranstrom bzw. im Randbereich der Benzolfahne nachgewiesen.

Bei der mikrobiellen Schadstoffumsetzung entsteht Kohlendioxid, eine ähnliche Kohlenstoffisotopensignatur wie das Substrat besitzt. Ist das Isotopenverhältnis des Substrates deutlich leichter als die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Signatur des DIC im Grundwasseranstrom einer Schadstofffahne, ist davon auszugehen, dass in Bereichen mit einem hohen mikrobiellen *in situ*-Abbau die Isotopenzusammensetzung des DIC im Vergleich zu Zonen mit einer geringen Schadstoffumsetzung isotopisch leichter ist. Für unbelastetes Grundwasser sind Kohlenstoffisotopenverhältnisse des DIC von -20 bis 0 ‰ repräsentativ (35, 94). Damit lagen die Kohlenstoffisotopenverhältnisse des DIC im Grundwasseranstrom bzw. in den randlichen Zonen der Benzolfahne im Bereich unbelasteter Grundwässer und konnten als natürliche Hintergrundwerte angesehen werden. Im Hauptschadenszentrum und nördlichen Grundwasserabstrom der Kontamination wurden mit steigenden DIC-Gehalten leichtere $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ -Werte beobachtet, die im Vergleich zum Hintergrund um bis zu 5 ‰ kleiner waren. Dieser Unterschied der Isotopensignatur des DIC zwischen nicht bzw. weniger belasteten und stark kontaminierten Bereichen war ein Hinweis für die Mineralisierung der Schadstoffe im Zentrum und nördlichen Grundwasserabstrom der Benzolfahne.

Für den zentralen Bereich der Schadstofffahne wurde wie oben beschrieben der Anteil an mineralisiertem Schadstoff berechnet, der aus der Veränderung der Isotopensignaturen des DIC resultierte (Gl. 2.4 – 2.6). Dafür wurden die Daten der Messkampagne Mai 2002 verwendet. Als Kohlenstoffisotopenverhältnis bzw. Konzentration des DIC im Grundwasseranstrom ($\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(GA)}}$ bzw. $C_{\text{DIC(GA)}}$) wurde ein mittlerer Wert von -19,5 ‰ bzw. 8,3 mM bestimmt. Das durchschnittliche Isotopenverhältnis in der Schadstofffahne ($\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(M)}}$) war -24,3 ‰. Für die Isotopensignatur des Schadstoffes wurde das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis des

Benzols im Schadenszentrum (-28,2 ‰) benutzt, weil Benzol den Hauptanteil der Kontamination im Untersuchungsgebiet ausmacht. Wenn Benzol vollständig mineralisiert wird, ist die Isotopensignatur des gebildeten DIC ($\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(Q)}}$) gleich dem des Benzols.

Die Abschätzung ergab, dass eine Erniedrigung des DIC-Kohlenstoffisotopenverhältnisses um 4,8 ‰ einer Mineralisierung von ca. 133 mg/l Benzol (1,7 mM) entspricht. Den Berechnungen liegen verschiedene Annahmen zu Grunde. Es wurde davon ausgegangen, dass die Transformation des Schadstoffes in DIC nicht mit einer signifikanten Isotopenfraktionierung sowie einer Nettoproduktion von Biomasse verbunden war. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass sich die Mehrheit der BTEX-Schadstofffahnen in einem Gleichgewichtszustand befindet (125, 157). Eine Nettoproduktion an Biomasse findet in solchen Schadstofffahnen nicht statt, weil die Sterberate der Mikroflora annähernd gleich der Reproduktionsrate ist (210). In diesem Fall ist eine mögliche Isotopenfraktionierung bei der Bildung der Biomasse vernachlässigbar.

Eine Isotopenfraktionierung in Folge des unvollständigen Schadstoffabbaus im zentralen Bereich der Kontamination sollte zur Bildung von DIC führen, der isotopisch leichter als der Schadstoff war. Die Bildung dieses isotopisch leichten DIC hätte zu einer Überschätzung der berechneten Schadstoffmenge geführt. Bei einem vollständigen Abbau wäre die zu Grunde gelegte Isotopenbilanz (Gl. 2.4) ausgeglichen gewesen, weil die Isotopensignatur des gebildeten DIC gleich der des nicht abgebauten Schadstoffes war.

Im Vergleich zur Mineralisierung der Schadstoffe wird bei der Lösung von Carbonat isotopisch schweres DIC gebildet (17, 61, 102). Somit würde die Carbonatlösung in der Isotopenbilanz zu einer Unterschätzung des Abbaus führen. Als Indikator für eine mögliche Carbonatlösung kann die Verteilung der Calciumkonzentrationen in einem Grundwasserleiter genutzt werden. Für das Grundwasser der meisten Messstellen innerhalb der Schadstofffahne waren die Calciumkonzentrationen (nicht dargestellt) im Vergleich zum Grundwasseranstrom niedriger bzw. gleich. Daher trug die Lösung von Calciumcarbonat im Bereich der Schadstofffahne offensichtlich nicht wesentlich zur Bildung von DIC bei.

Die Isotopenfraktionierung bei der anaeroben Carbonatatmung führt zur ^{13}C -Anreicherung in der residualen Fraktion des DIC (208). Der dominierende Prozess der Methanbildung in der Schadstofffahne war offensichtlich die Acetatgärung (siehe unten). Die anaerobe Carbonatatmung spielte wahrscheinlich in diesem Fahnenbereich nur eine untergeordnete Rolle, sodass dieser Prozess die Isotopensignatur des DIC nicht wesentlich beeinflusste. Die Isotopenfraktionierung bei der methanogenen Umsetzung von Acetat führt zur Bildung von isotopisch leichtem Methan und schwerem DIC (82). Je größer der Anteil des DIC, der aus dem methanogenen Acetatabbau stammte, im Vergleich zu dem in der Schadstofffahne gebildetem DIC war, desto größer wäre die Unterschätzung der berechneten Schadstoff-

menge gewesen. Methanoxidation im zentralen Bereich der Schadstofffahne konnte nicht nachgewiesen werden (siehe unten) und trug wahrscheinlich nicht zur Bildung von isotopisch leichtem DIC bei. Der dominierende Abbauprozess im Untersuchungsgebiet war offensichtlich die mikrobielle Sulfatreduktion. Methanogene Prozesse sollten deshalb die Isotopensignatur des DIC im zentralen Bereich der Schadstofffahne nicht maßgeblich beeinflusst haben. Unter dieser Voraussetzung konnte die Abschätzung des mikrobiellen Schadstoffabbaus auf Grundlage der Isotopensignaturen des DIC angewendet werden.

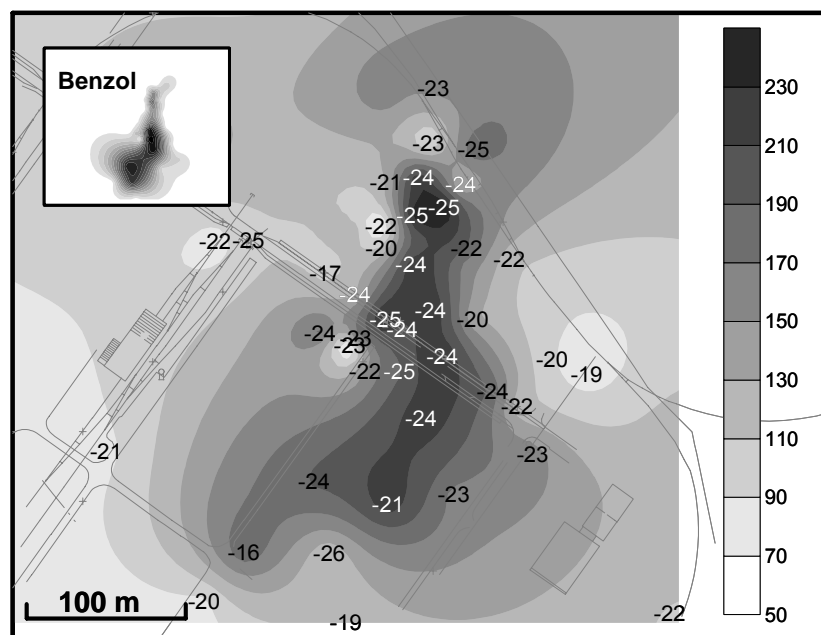


Abbildung 2.3: DIC-Konzentrationen [mgC/l] und $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ -Werte [‰ V-PDB] (als Zahlen eingetragen) im Grundwasser des oberen Aquifers am Standort Zeit (Daten aus Messkampagne Mai 2002).

2.5.4 Konzentrationen und Kohlenstoffisotopenverhältnisse des Methans

Der Anstieg der Methankonzentration innerhalb eines kontaminierten Grundwasserleiters gegenüber unbelasteten Bereichen dient als ein Indiz für den methanogenen Schadstoffabbau (31, 210). Die wesentlichen Methanbildungswege stellen die anaerobe Carbonatatmung und die Acetatgärung dar (208). Beide Prozesse können bei dem Abbau von Kohlenwasserstoffen miteinander verknüpft sein (215). Ein weiterer Prozess, der die Methankonzentration in einem kontaminierten Aquifer beeinflussen kann, ist die Methanoxidation (11, 39, 83). Mit Hilfe des Anreicherungsfaktors $\epsilon(g)_{\text{DIC-CH}_4}$ können Methanbildungs- und -abbauprozesse tendenziell unterschieden werden. Dabei sind geringe $\epsilon(g)_{\text{DIC-CH}_4}$ -Werte (<20 ‰) ein Indiz für Methanoxidation. Mittlere Anreicherungsfaktoren (10 bis 50 ‰) weisen auf Acetatgärung und hohe Anreicherungsfaktoren (>50 ‰) auf anaerobe

Carbonatatumung als den wesentlichen Prozess der Methanbildung hin (20, 35, 39, 83, 95, 202, 208).

Die höchsten Methankonzentrationen des Grundwassers im Untersuchungsgebiet waren >14 mg/l (Abb. 2.4). Sie wurden im zentralen Bereich der Schadstofffahne nachgewiesen. Die Anreicherungsfaktoren $\epsilon(g)_{\text{DIC-CH}_4}$ lagen zwischen 0 und 49 ‰ (Abb. 2.4), was sowohl auf Methanbildung als auch -abbau hindeutete. Da die $\epsilon(g)_{\text{DIC-CH}_4}$ -Werte nicht größer als 50 ‰ waren, schien die Acetatgärung der vorherrschende Methanbildungsweg im Untersuchungsgebiet zu sein. In verschiedenen Studien konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Methanbildung in kontaminierten Grundwasserleitern wesentlich durch die Acetatgärung bestimmt wird (39, 84).

Der nördliche Randbereich der Benzolfahne zeichnete sich durch sinkende Methankonzentrationen aus. Gleichzeitig fielen die $\epsilon(g)_{\text{DIC-CH}_4}$ -Werte von 21 auf 0 ‰, was ein Hinweis auf den Methanabbau in dieser Zone war. Offensichtlich wurde in diesem Bereich, welcher durch hohe Sulfat- sowie vernachlässigbare Nitrat- und Sauerstoffkonzentrationen gekennzeichnet war, das Methan hauptsächlich durch sulfatreduzierende Mikroorganismen umgesetzt. Aus diesem Ergebnis konnte abgeleitet werden, dass im nördlichen Randbereich der Benzolfahne bioverfügbare Elektronenakzeptoren nicht nur während des Schadstoffabbaus sondern auch durch die Methanoxidation verbraucht wurden.

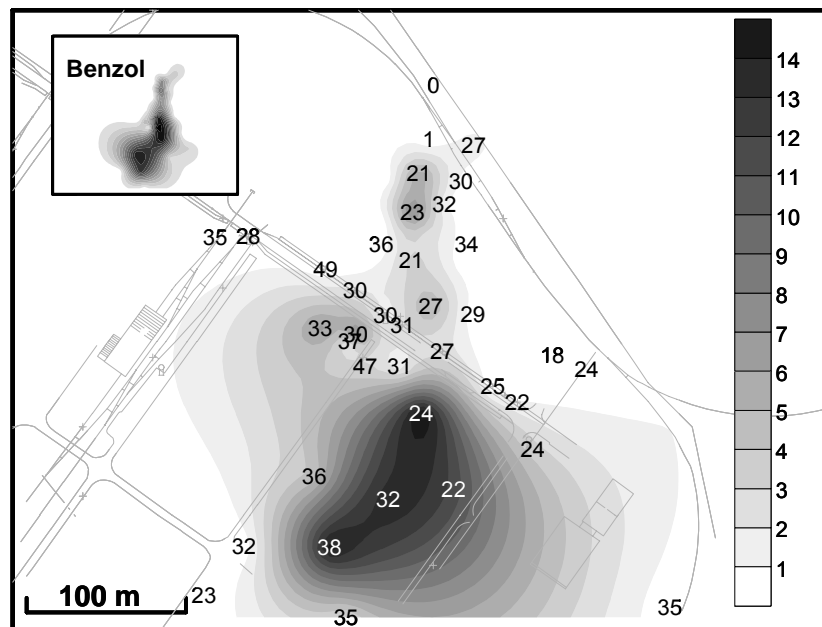


Abbildung 2.4: Methankonzentrationen [mg/l] und $\epsilon(g)_{\text{DIC-CH}_4}$ -Werte [‰ V-PDB] (als Zahlen eingetragen) im Grundwasser des oberen Aquifers am Standort Zeitz (Daten aus Messkampagne Mai 2002).

2.5.5 Abschätzung des mikrobiellen Benzolabbaus anhand der Isotopenfraktionierung

Für die Abschätzung des prozentualen biologischen Schadstoffabbaus (B %) im oberen Grundwasserleiter des Standortes Zeitz wurden die Isotopenverhältnisse des Benzols aus der Messkampagne Dezember 2002 verwendet (Abb. 2.5). Auf Grund der verschiedenen Probenahmetechniken wurden für Messstellen, die mit Hilfe eines MLPS beprobt wurden, die Isotopenverhältnisse der einzelnen Horizonte auf einen Wert normiert. Es wurde für jeden Horizont der Konzentrationsanteil bestimmt, der theoretisch in einer Mischprobe vorgelegen hätte. Dieser wurde mit dem jeweiligen Isotopenverhältnis multipliziert. Die Ergebnisse ergaben in der Summe die normierte Isotopensignatur einer mit dem MLPS beprobten Messstelle.

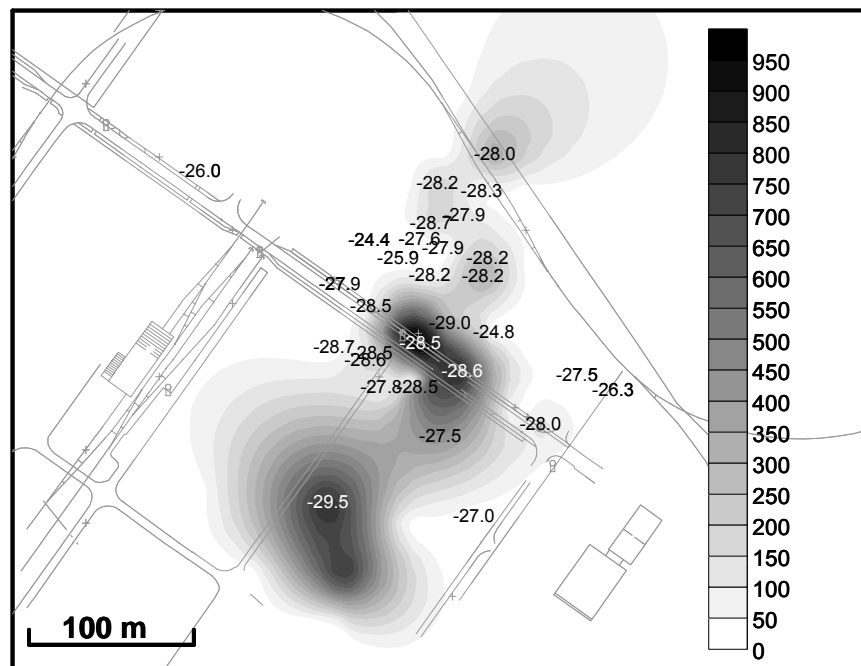


Abbildung 2.5: Konzentrationen [mg/l] und $\delta^{13}\text{C}$ -Werte [‰ V-PDB] (als Zahlen eingetragen) des Benzols im Grundwasser des oberen Aquifers am Standort Zeitz (Daten aus Messkampagne Dezember 2002).

Im zentralen Bereich der Schadstofffahne waren maximale Benzolkonzentrationen von bis zu 1000 mg/l nachgewiesen worden. Die Isotopenverhältnisse ($\delta^{13}\text{C}_{\text{Benzol}}$) lagen zwischen -29,5 und -23,4 ‰. Dabei zeichnete sich die hochkontaminierte Zone durch $\delta^{13}\text{C}_{\text{Benzol}}$ -Werte zwischen -29,5 und -28,5 ‰ aus. Besonders in den Randbereichen der Schadstofffahne konnten für Benzol schwerere $\delta^{13}\text{C}_{\text{Benzol}}$ -Werte bestimmt werden. Da die Isotopensignatur von BTEX-Verbindungen in Grundwasserleitern nicht signifikant durch abiotische Prozesse

wie Sorption, Verflüchtigung und Verdünnung beeinflusst wird, wurde davon ausgegangen, dass im Randbereich der Schadstofffahne mikrobieller Benzolabbau stattfand.

Mit den $\delta^{13}\text{C}_{\text{Benzol}}$ -Werten war es unter Verwendung von Gleichung 2.3 möglich, den prozentualen biologischen Benzolabbau für den oberen Aquifer des Standortes Zeitz abzuschätzen. Als Isotopensignatur der Schadstoffquelle (R_0) wurde ein $\delta^{13}\text{C}_{\text{Benzol}}$ -Wert von $-28,5 \text{ ‰}$ angenommen, welcher als untere Grenze für die am stärksten belastete Zone charakteristisch war. Somit wurde eine Überschätzung des prozentualen biologischen Benzolabbaus vermieden.

Die beiden wesentlichen Prozesse, die mit dem Schadstoffabbau im oberen Grundwasserleiter des Standortes Zeitz verbunden waren, waren die Sulfatreduktion und die Methanogenese. Für beide Prozesse erfolgte eine Abschätzung des prozentualen biologischen Benzolabbaus. Dabei wurde für den Benzolabbau unter sulfatreduzierenden Bedingungen ein kinetischer $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Fraktionierungsfaktor von 1,0036 und unter methanogenen Verhältnissen von 1,002 benutzt (127).

Anhand der Änderung des Isotopenverhältnisses von Benzol, der Isotopensignatur der Schadstoffquelle und der geeigneten $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Fraktionierungsfaktoren wurde ein maximaler Benzolabbau von 69 % unter sulfatreduzierenden Milieubedingungen und von 88 % unter methanogenen bestimmt (Abb. 2.6).

Weiterhin zeigte sich, dass vor allem in den Randbereichen der Schadstofffahne (Benzol $<200 \text{ mg/l}$), in denen überwiegend Sulfatkonzentrationen $>500 \text{ mg/l}$ und Methangehalte $<500 \text{ µg/l}$ nachgewiesen wurden, der höchste prozentuale biologische Benzolabbau zu verzeichnen war. Somit schien in diesen Zonen auf Grund der hydrogeochemischen Gegebenheiten die mikrobielle Sulfatreduktion gegenüber der Methanogenese vorherrschend zu sein.

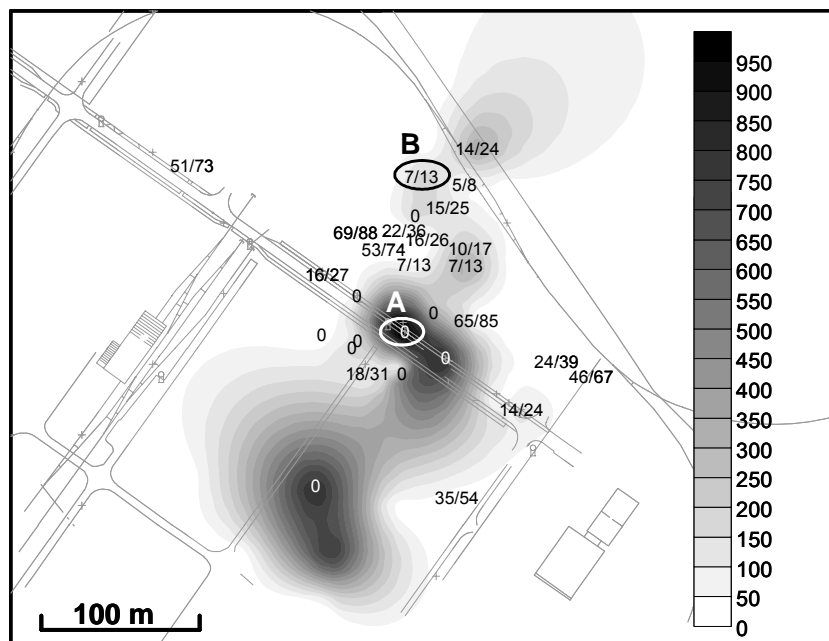


Abbildung 2.6: Benzolkonzentrationen [mg/l] und prozentualer biologischer Benzolabbau [%] (als Zahlen eingetragen) unter sulfatreduzierenden (Wert vor dem Schrägstrich) und methanogenen (Wert nach dem Schrägstrich) Milieubedingungen im oberen Aquifer am Standort Zeitz (Daten aus Messkampagne Dezember 2002). A und B entsprechen der Lage der Brunnen, die für die tiefenorientierten Untersuchungen genutzt wurden.

2.5.6 Charakterisierung der vertikalen Variabilität isoto- und hydrogeochemischer Parameter innerhalb der Schadstofffahne

Durch den Einbau eines MLPS in einige Brunnen des oberen Grundwasserleiters konnten verschiedene isoto- und hydrogeochemische Parameter tiefenorientiert analysiert werden. Für die Untersuchungen von vertikalen Gradienten innerhalb der Schadstofffahne wurde jeweils ein repräsentativer Brunnen des Kontaminationszentrums (A) sowie für den weniger belasteten Randbereich (B) ausgesucht (Abb. 2.6).

Im Brunnen A konnte eine maximale Benzolkonzentration von 860 mg/l bestimmt werden. Im Gegensatz dazu waren die Benzolgehalte im Grundwasser des Brunnen B <200 mg/l (Tab. 2.1). Die Kohlenstoffisotopenverhältnisse des Benzols ließen keine signifikanten Unterschiede im Vertikalprofil des Schadenszentrums erkennen. Für die Messstelle B im Randbereich der Schadstofffahne zeigte sich, dass die Benzolkonzentrationen von unten nach oben abnahmen, während gleichzeitig eine ^{13}C -Anreicherung in der residualen Benzolfraktion zu verzeichnen war. Dies deutete auf den mikrobiologischen Abbau von Benzol im oberen Bereich der gesättigten Zone hin. In diesem Horizont des Brunnens B ist die höchste Sulfatkonzentration bestimmt worden, was die mikrobielle Sulfatreduktion in diesem Bereich als den wesentlichen Prozess des Benzolabbaus annehmen ließ.

Die Anreicherungsfaktoren $\varepsilon(g)_{\text{DIC-CH}_4}$ zeigten Methanbildung in beiden Brunnen, jedoch konnten in Brunnen B höhere Methankonzentrationen nachgewiesen werden. Anhand der Höhe der $\varepsilon(g)_{\text{DIC-CH}_4}$ -Werte schien in beiden Messstellen die Acetatgärung der dominierende Methanbildungsprozess zu sein.

In den unteren Probenahmetiefen des Brunnens B ließen sich trotz deutlicher Veränderungen in den Benzolkonzentrationen keine Veränderungen in der Kohlenstoffisotopensignatur des Benzols gegenüber der Messstelle A nachweisen. Wahrscheinlich war die Minderung der Benzolgehalte auf Verdünnungs- bzw. Sorptionseffekte, die keine signifikante Veränderung der Isotopensignatur des Benzols verursachen, zurückzuführen.

Unterschiede zwischen beiden Beobachtungsbrunnen spiegelten sich in den Konzentrationen und Kohlenstoffisotopenverhältnissen des DIC wider. Für die Messstelle B wurden deutlich höhere DIC-Gehalte bzw. leichtere $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ -Werte als in Messstelle A registriert. Beides deutete darauf hin, dass in Brunnen A trotz vergleichbarer bzw. höherer Sulfatkonzentrationen im Gegensatz zu Brunnen B der mikrobiologische *in situ*-Abbau offensichtlich eingeschränkt war. Möglicherweise war die mikrobielle Sulfatreduktion in den stark kontaminierten Aquiferbereichen auf Grund toxischer Wirkungen des Benzols gehemmt (108). Anhand des Nachweises der Methanbildung in diesen Zonen schien ein methanogener Schadstoffabbau stattzufinden.

Es war festzustellen, dass durch die vertikale Änderung der Isotopensignatur und Konzentration des Benzols der Abbau von Benzol im oberen Bereich des nördlichen Schadstofffahnenrandes nachgewiesen werden konnte. Somit bildeten sich innerhalb einer Schadstofffahne nicht nur horizontale sondern auch vertikale Zonen des mikrobiellen *in situ*-Abbaus aus.

Bei einer Probe, die über den kompletten Filterbereich eines Brunnens gewonnen wird, werden die Isotopenverhältnisse der verschiedenen Abbauzonen vermischt. Dabei wird immer die Isotopensignatur des Schadstoffes aus dem stärker belasteten Horizont dominieren, weil der Massenanteil an der residualen Schadstofffraktion aus diesem Bereich stets größer ist als der aus weniger kontaminierten Zonen. Im Vertikalprofil des Brunnens B zeigte sich, dass mit kontinuierlich schwerer werdenden Isotopenverhältnissen auch die Konzentrationen des Benzols abnahmen, wobei der Trend beider Parameter offensichtlich auf den zunehmenden Schadstoffabbau zurückzuführen war. Bei einer Probenahme über das gesamte Tiefenprofil des Brunnens B hätte die leichtere Isotopensignatur des Benzols, welche repräsentativ für den am stärksten kontaminierten und kaum biodegradierten Horizont war, auf Grund der Mischungseffekte wesentlich die Isotopensignatur der Probe bestimmt.

Bei einer Beprobung über den gesamten verfilterten Bereich des Brunnens kann

Grundwasser aus Zonen mit einem erheblichen mikrobiellen Schadstoffabbau mit Grundwasser aus Zonen geringer mikrobieller Umsetzung vermischt werden. Dabei beeinflusst der Horizont mit der höchsten Konzentration das Isotopensignal der Probe am stärksten. Dieser Bereich ist in der Regel die Schadstofffraktion mit der geringsten Biodegradation. In einer heterogen strukturierten Schadstofffahne führt deshalb die Quantifizierung des mikrobiellen *in situ*-Abbaus anhand der Isotopensignaturen der Kontaminante (siehe Gl. 2.3) zu einer Unterschätzung der Schadstoffumsetzung. Somit bietet die isotochemische Bestimmung des prozentualen biologischen Schadstoffabbaus auf Grundlage der konventionellen Probenahme eine entsprechende Sicherheit, das Abbaupotenzial autochthoner Mikroorganismen in einem kontaminierten Grundwasserleiter nicht zu überschätzen. Dies ist besonders relevant bei der Verwendung des prozentualen biologischen *in situ*-Abbaus für Langzeitprognosen der Kontaminationsminderung.

Tabelle 2.1: Hydrogeo- und isotochemische Parameter im Tiefenprofil zweier Beobachtungsbrunnen (Daten aus Messkampagne Dezember 2002).

Brunnen	Probenahmetiefe [m uGOK]	Benzol [mg/l]	$\delta^{13}\text{C}_{\text{Benzol}}$ [‰]	Sulfat [mg/l]	Methan [µg/l]	$\varepsilon(\text{g})_{\text{DIC-CH}_4}$ [‰]	DIC [mgC/l]	$\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ [‰]
A Fahnenzentrum	11,0	381	-28,6	389	372	17,0	120	-23,4
	12,5	863	-28,5	309	148	26,1	144	-23,4
	13,5	646	-28,7	339	227	24,8	135	-23,4
	14,5	735	-28,6	256	1352	26,7	153	-22,4
B Fahnenrand	10,2	60	-26,9	358	3124	25,3	119	-26,1
	11,2	137	-27,7	154	4531	23,8	182	-26,5
	13,0	186	-28,6	176	4901	20,9	187	-25,2
	14,5	195	-28,7	160	1264	21,7	190	-25,4

2.6 Schlussfolgerung

Mit Hilfe der isotochemischen Untersuchung wurde der mikrobielle Benzolabbau im oberen Grundwasserleiter des Standortes Zeitz ermittelt. Zudem konnten wesentliche mikrobielle Prozesse, die den Schadstoffabbau beeinflussen, beschrieben werden. Damit sind in Bezug auf das eingangs beschriebene MNA-Konzept einige wichtige Bausteine zur Sicherung des Standortes Zeitz erarbeitet worden.

Es zeigte sich, dass sowohl die mikrobielle Sulfatreduktion als auch die methanogene Fermentation wesentlich am Schadstoffabbau beteiligt waren. Offensichtlich liefen beide Prozesse parallel ab, wobei die Sulfatreduktion aus energetischen Gesichtspunkten den größeren Anteil der *in situ*-Biodegradation ausmacht. Nur in Bereichen besonders niedriger Sulfat- bzw. hoher Schadstoffkonzentrationen schien die methanogene Fermentation eine

größere Bedeutung zu haben. Dies konnte auch in verschiedenen Untersuchungen an kontaminierten Grundwasserleitern nachgewiesen werden (33, 34, 210, 212).

Als Methanbildungsweg spielte im oberen Grundwasserleiter des Standortes die Acetatgärung eine zentrale Rolle. Im nördlichen Randbereich der Schadstofffahne wurde Methan abgebaut. Auf Grund der hydrogeochemischen Milieubedingungen sollte die Sulfatreduktion der dominierende Prozess des Methanabbaus gewesen sein.

Anhand der Veränderungen der $\delta^{13}\text{C}_{\text{Benzol}}$ -Werte wurde der mikrobielle Benzolabbau im oberen Grundwasserleiter des Standortes zeitlich abgeschätzt. Dabei wurde dieser auf Grund der angenommenen Isotopensignatur der Schadstoffquelle (R_0) sowie der Mischungseffekte bei der Grundwasserprobenahme über den gesamten verfilterten Bereich des Brunnens eher unterschätzt, nicht aber überschätzt. Somit handelte es sich bei der angewendeten Methode um eine konservative Bewertung des mikrobiellen Benzolabbaus. Bei den Untersuchungen konnten die höchsten Umsätze des Benzols im Randbereich der Schadstofffahne nachgewiesen werden.

Ein wesentlicher Vorteil bei der Quantifizierung des BTEX-Abbaus mit isotopenchemischen Methoden ist die Tatsache, dass das Isotopenverhältnis im Gegensatz zur Konzentration nur durch die mikrobielle Umsetzung und nicht durch abiotische Effekte wie Sorption, Verflüchtigung und Verdünnung, signifikant verändert wird. Deshalb stellt die Analyse der Isotopenverhältnisse der BTEX, der bioverfügbaren Elektronenakzeptoren und der Abbauprodukte ein geeignetes Repertoire an Methoden zur Untersuchung des mikrobiellen Schadstoffabbaus in BTEX-kontaminierten Grundwasserleitern zur Verfügung. Da der isotopenchemische Ansatz eine Charakterisierung bzw. Abschätzung des mikrobiellen *in situ*-Abbaus ermöglicht, scheint es sinnvoll zu sein, ihn für eine zeitliche Überwachung im Sinne des MNA-Konzeptes einzusetzen.

2.7 Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung und Zusammenarbeit der RETZINA-Projektpartner nicht denkbar gewesen. Dafür möchten wir besonders Prof. Dr. Georg Teutsch, Prof. Dr. Mario Schirmer und deren Mitarbeitern danken. Für die exzellente technische Assistenz bei den Feld- bzw. Laborarbeiten gilt unser Dank Dr. Matthias Gehre, Ursula Günther, Werner Kletzander, Dr. Hansjörg Weiß und den Mitarbeitern der GFE-Consult GmbH. Weiterhin möchten wir uns bei Dr. Stefan Gödeke und Michael Dietze für Ihre Hilfestellungen besonders bei Fragen zur Hydrogeologie des Standortes bedanken. Außerdem danken wir dem BMBF für die finanzielle Unterstützung des RETZINA-Projektes (BMBF-Förderkennzeichen 02WT0041). Zusätzliche Mittel wurden durch das UFZ im Rahmen des Forschungsschwerpunkts SAFIRA zur Verfügung gestellt.

3 ANALYSE DES ANAEROBEN BENZOLABBAUS: VERGLEICH VON *IN SITU*-MIKROKOSMEN, ELEKTRONENAKZEPTOR-BILANZEN UND ISOTOPENFRAKTIONIERUNGSPROZESSEN

Nicole Stelzer, Anko Fischer, Matthias Kästner, Hans-H. Richnow

(Dieses Kapitel ist akzeptiert zur Veröffentlichung in der Zeitschrift Grundwasser.)

3.1 Kurzfassung

Geochemische und isotope chemische Methoden wurden zur Charakterisierung des anaeroben Benzolabbaus am Standort eines ehemaligen Hydrierwerkes (Zeitz, Deutschland) genutzt. Im Abstrom des Schadenszentrums wurde hierfür die vertikale Struktur der Benzolfahne in verschiedenen Tiefen untersucht. Durch Einsatz von [$^{13}\text{C}_6$]-Benzol-dotierten *in situ*-Mikrokosmen konnte anhand der Transformation des markierten Kohlenstoffs in die Biomasse eindeutig das Abbaupotenzial nachgewiesen werden. Das Spektrum sowie die Isotopensignaturen der Fettsäuren war ein Indiz für eine Besiedlung durch komplexe mikrobielle Gemeinschaften, die in unterschiedlicher Weise am Benzolabbau beteiligt waren. Die Sulfatsenke in der Schadstofffahne deutet auf überwiegend sulfatreduzierende Abbaubedingungen mit einem Abbaupotenzial von etwa 1,7 mM Benzol hin. Anhand der Isotopensignaturen und Konzentrationen des DIC wurde in der Schadstofffahne ein Abbau von 2,2 mM Benzol abgeschätzt. Die Berechnung auf Grundlage der Isotopenfraktionierungsmethode ergab einen Benzolabbau von etwa 3,0 mM. Die quantitativen geochemischen und isotope chemischen Abschätzungen lagen in der gleichen Größenordnung und zeigten einen signifikanten Benzolabbau am Standort Zeitz.

3.2 Abstract

Geochemical and isotope chemical methods were applied to assess the *in situ*-biodegradation of benzene in a shallow aquifer (Zeitz, Germany). The vertical structure of the plume was investigated in a multi-level sampling approach. Benzene degradation was investigated using *in situ*-microcosms incubated with [$^{13}\text{C}_6$]-labelled benzene. The incorporation of ^{13}C into fatty acids proved biodegradation and indicated that a complex microbial community colonised the *in situ*-microcosms.

The sink of sulphate in the course of the plume indicated sulphate-reducing conditions that may account for the oxidation of 1.7 mM benzene. The concentration and isotope

composition of dissolved inorganic carbon indicated a degradation of 2.2 mM benzene within the plume. The isotope composition of benzene suggested an average degradation of 3.0 mM benzene on the groundwater flow path. The various approaches to assess the benzene degradation were in the same order and illustrated significant benzene degradation in the anoxic aquifer.

3.3 Einleitung

Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylol (BTEX) sind häufige Grundwasserkontaminanten, die eine Gefahr für Ökosysteme und die menschliche Gesundheit darstellen. In einem verunreinigten Aquifer wird der Verbleib dieser Verbindungen durch abiotische (Advektion, Dispersion, Verflüchtigung, Sorption) und biologische Prozesse beeinflusst. Eine nachhaltige Reduzierung der Schadstoffmenge erfolgt allerdings hauptsächlich durch den mikrobiellen Abbau. Bei der Anwendung von Sanierungsstrategien wie "Monitored Natural Attenuation" (MNA) und "Enhanced Natural Attenuation" (ENA) kommt somit dem mikrobiellen Schadstoffabbau eine besondere Bedeutung zu. Es werden daher geeignete Methoden benötigt, um das natürliche Selbstreinigungspotenzial eines kontaminierten Grundwasserleiters bestimmen zu können.

Eine Möglichkeit zur Untersuchung des *in situ*-Abbaus von Schadstoffen ist die Nutzung der substratspezifischen Isotopenfraktionierung (133). Diese Methode beruht darauf, dass Mikroorganismen infolge des Schadstoffabbaus das natürliche Isotopenverhältnis (z.B. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) eines Substrats verändern. Die bevorzugte Verwertung der leichten Isotopologe einer Kontaminante führt zu einer Anreicherung der schweren Isotopologe in der residualen Schadstofffraktion, was mit Hilfe der Gaschromatographie-Isotopenverhältnis-Massenspektroskopie (GC-IRMS) analytisch nachgewiesen werden kann.

Zur Abschätzung der Biodegradation in kontaminierten Grundwasserleitern werden verschiedene Verfahren angewendet, die häufig auf der Kultivierung von Mikroorganismen im Labor beruhen. Der anaerobe Schadstoffabbau ist in der Regel ein sehr langsam ablaufender Prozess und viele der am Abbau beteiligten Mikroorganismen sind bisher noch nicht oder nur eingeschränkt kultivierbar. Labortestverfahren erscheinen daher nur begrenzt geeignet zu sein, um die realen, sehr komplexen Vorgänge und anoxischen Milieubedingungen des fließenden Grundwassers nachzubilden. Darüber hinaus sind anaerobe Abbauversuche generell mit einem relativ großen Zeitaufwand verbunden.

Hieraus resultiert ein großer Bedarf an der Entwicklung geeigneter *in situ*-Methoden zur Bestimmung der im Grundwasserleiter stattfindenden Biodegradation, insbesondere für anoxische Milieubedingungen.

Der mikrobielle Abbau aller BTEX-Verbindungen konnte unter oxidischen und anoxischen Bedingungen nachgewiesen werden. Auf Grund der Sauerstofflimitation findet in kontaminierten Grundwasserleitern meist eine anaerobe Biodegradation der monoaromatischen Kohlenwasserstoffe statt (27, 124, 210). Dabei ist Benzol im Vergleich zu Toluol, Ethylbenzol und Xylole oft schwerer abbaubar, so dass folglich bis heute nur wenige anaerob benzolabbauende Konsortien und eine Reinkultur isoliert wurden (27, 36, 210). Das begründet, warum in Laborstudien der anaerobe Benzolabbau bisher nur relativ selten eindeutig nachgewiesen werden konnte und sich in Kulturversuchen nur schwer reproduzieren lässt.

Tracerexperimente mit isotopisch markierten Substanzen stellen eine alternative Methode zur Untersuchung der Biodegradation im Grundwasser dar. Radioaktiv markierte Substanzen (^{14}C) sollten auf Grund ökologischer Risiken nicht in offenen Systemen eingesetzt werden. Ersatzweise dienen stabile Isotope (D, ^{13}C) als Tracer. Während der Assimilation wird der isotopisch markierte Kohlenstoff von den Mikroorganismen zur Synthese von Biomasse verwendet. Durch den Einsatz von ^{13}C -markierten Substraten kann der mikrobielle Schadstoffabbau anhand der Anreicherung des ^{13}C -markierten Kohlenstoffs in verschiedenen Zellkomponenten nachgewiesen werden. Dabei stehen als Zellmembranbestandteile häufig Phospholipid-Fettsäuren (phospholipid-derived fatty acids, PLFA) im Mittelpunkt der Untersuchungen (2, 19, 188). Es sind nur wenige Arbeiten zur Nutzung ^{13}C -markierter Substrate für die Bestimmung des mikrobiellen Schadstoffabbaus anhand der ^{13}C -Anreicherung in PLFA bekannt. Die Methode diente zum Nachweis des Toluolabbaus. Dabei wurde Aquifermaterial in Labormikrokosmen mit [^{13}C]- α -Toluol als Substrat inkubiert, die Transformation des Isotopensignals in die Biomasse nachgewiesen und die am anaeroben Toluolabbau beteiligten Mikroorganismen identifiziert (144, 145). In ähnlichen Studien mit [$^{13}\text{C}_6$]-markiertem Toluol konnten anhand des Einbaus von ^{13}C in PLFA die mikrobiellen Populationen in aeroben Bodenmikrokosmen identifiziert werden (87). In einem Push & Pull-Tracerexperiment mit [2- ^{13}C]-Acetat als Substrat und Nitrat als Elektronenakzeptor ist anhand der Transformation der ^{13}C -Markierung in die verschiedenen PLFA die mikrobielle Abbauaktivität im Aquifer nachgewiesen worden (149). Demgegenüber wurden spezielle *in situ*-Mikrokosmen (BACTRAP) entwickelt, die mit ^{13}C -markierten Testsubstanzen beladen und direkt *in situ* im Aquifer inkubiert werden können. Anhand des Einbaus der isotopischen Markierung in die Biomasse (Membranfettsäuren) kann der Schadstoffabbau nachgewiesen werden. Zur Erprobung dieses Testsystems wurden verschiedene Experimente durchgeführt (21, 71).

Die vorliegende Arbeit stellt die Ergebnisse eines Feldversuches vor, bei dem BACTRAPs zur Analyse des Benzolabbaus genutzt wurden. Dabei sind die Mikrokosmen mit [$^{13}\text{C}_6$]-

Benzol als Substrat beladen und mit Hilfe eines Multilevel-Packersystems (MLPS) in acht verschiedenen Tiefen einer Grundwassermessstelle eines BTEX-kontaminierten Aquifers für die Dauer von 51 Tagen inkubiert worden. Der Einbau der ^{13}C -Atome aus dem Benzol in mikrobielle Fettsäuren wurde im Anschluss mittels GC-IRMS nachgewiesen und als Beweis für den *in situ*-Benzolabbau genutzt. Hydrogeo- und isotopenchemische Parameter dienen zur Charakterisierung des Abbaumilieus. Darüber hinaus wurde der *in situ*-Benzolabbau mit Hilfe der Isotopenfraktionierungsmethode und anhand von Elektronenbilanzen abgeschätzt. Die Diskussion der Ergebnisse erfolgte im Hinblick auf den Einsatz verschiedener Methoden zur Kennzeichnung des "Natural Attenuation"-Potenzials.

3.4 Material und Methoden

3.4.1 Isotopen-markierte Substanzen und Chemikalien

Es wurden ausschließlich Chemikalien in analytischer Qualität (p. A.) verwendet. Isotopisch markiertes [$^{13}\text{C}_6$]-Benzol wurde von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) mit einer chemischen Reinheit von 99 % bezogen.

3.4.2 Standortbeschreibung

Bei dem Untersuchungsstandort handelt es sich um einen BTEX-Schadensfall im Bereich eines ehemaligen Hydrierwerkes bei Zeitz (Sachsen-Anhalt, Deutschland). Am Standort sind im Wesentlichen zwei Grundwasserleiter ausgebildet, die durch einen eozänen Braunkohle-führenden Ton-Schluff-Komplex voneinander getrennt sind, jedoch lokal teilweise infolge Erosion des Stauerkomplexes in direktem hydraulischem Kontakt stehen. Die Geschichte, Hydrogeologie und Geochemie des Standortes wurden ausführlich beschrieben (43, 67, 78, 79, 162, 197, 198). Benzol stellt mit einem Anteil von mehr als 99 % die Hauptkontaminante dar, wobei im Zentrum der Schadstofffahne Konzentrationen von >1000 mg/l bestimmt wurden. Der mikrobielle BTEX-Abbau ist überwiegend durch anaerobe Prozesse wie Sulfatreduktion geprägt (67, 198).

Die hier beschriebenen Untersuchungen wurden im oberen, ca. 2-10 m mächtigen jungtertiären und quartären Aquifer (GWL I) durchgeführt, der hauptsächlich aus Terrassenschottern der Weißen Elster besteht. Die vertikale Struktur der Kontaminationsfahne wurde im Bereich der Grundwassermessstelle Saf Zz 23/00, die sich im nördlichen Abstrom des Kontaminationsherdes befindet, untersucht (Abb. 3.1).

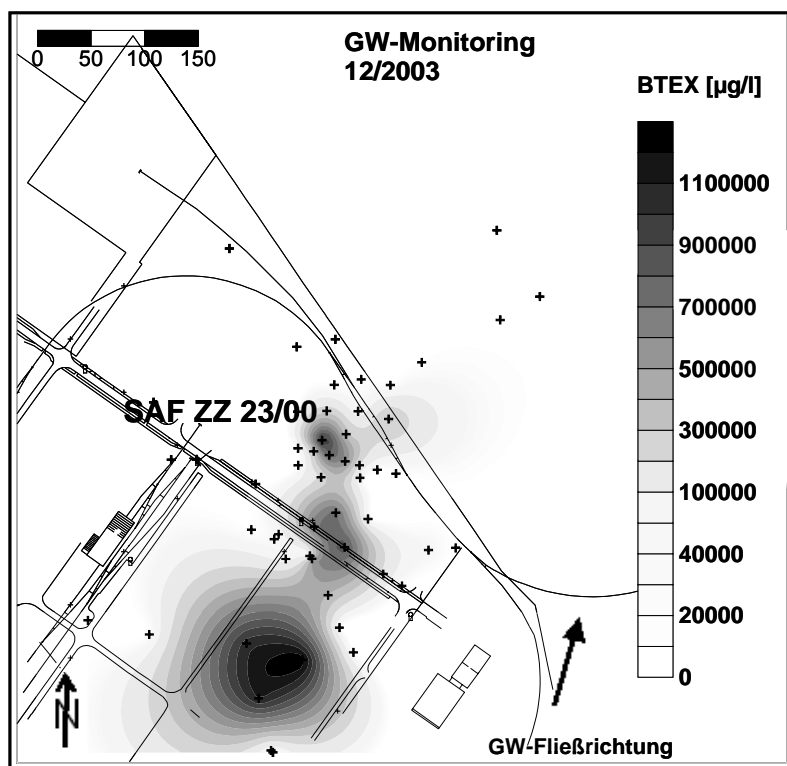


Abbildung 3.1: Verteilung der BTEX-Konzentrationen ($\mu\text{g/l}$) im oberen Aquifer im Bereich des ehemaligen Hydrierwerkes (Zeitz, Sachsen-Anhalt).

3.4.3 Tiefenorientierte Grundwasserbeprobung

Die tiefenorientierte Grundwasserbeprobung wurde mit Hilfe eines Multilevel-Packersystems (MLPS) durchgeführt (163). Die Förderung des Grundwassers erfolgte dabei mit pneumatisch regulierbaren Miniatur-Doppelventil-Pumpen (Innovative Messtechnik Weiß, Deutschland), die eine gleichmäßige und blasenfreie Probenahme gewährleisten. Bei geringer Förderleistung (ca. 100 ml/min) sowie einem Abstand zwischen den einzelnen Pumpen von etwa einem Meter werden bei der Entnahme der Grundwasserproben vertikale hydrogeochemische Gradienten nicht durch Vermischungseffekte beeinflusst. Für die Erzeugung des benötigten Pumpendruckes wurde Stickstoff aus einer Druckflasche benutzt, um Sauerstoffeintrag während der Probenahme auszuschließen. Mit Ausnahme des Horizontes in 9,40 m Tiefe konnte aus allen verbleibenden sieben Tiefen das benötigte Probenvolumen für die Analysen entnommen werden (Abb. 3.2). Die Grundwasserproben wurden bis zur weiteren Analyse bei 4 °C und dunkel gelagert.

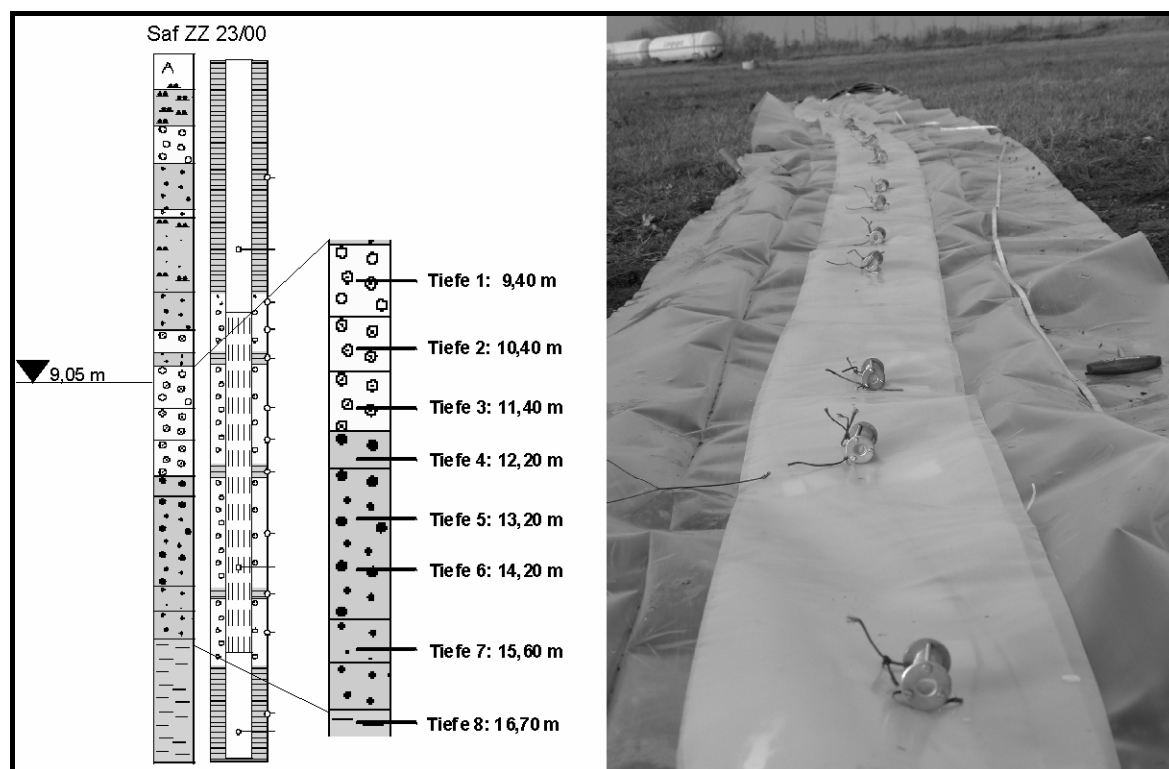


Abbildung 3.2: Links: Schichtenprofil und Ausbauplan der Grundwassermessstelle Saf Zz 23/00. Tiefen 1 bis 8 bezeichnen die Positionen der Miniatur-Doppelventilpumpen und BACTRAPs. Rechts: Foto des Multilevel-Packersystems (MLPS) mit Edelstahlkäfigen für BACTRAPs vor dem Einbau in die Messstelle.

3.4.4 Analytik der Grundwasserproben

Die Benzolkonzentrationen sind gaschromatographisch nach DIN 38407-F9-1 bestimmt worden (53). Die ionenchromatographische Analyse der Sulfat- und Nitrat-Konzentrationen basiert auf DIN EN ISO 10304-1 D19 (55). Die Bestimmung der Konzentration des gelösten anorganischen Kohlenstoffs (DIC) erfolgte nach DEV D8 (48), der Eisen(II)-Konzentrationen nach DIN 38406-E1-1 (52) und der Eisen(III)- sowie Mangan-Konzentrationen nach DIN EN ISO 11885-E22 (56).

Zur Bestimmung der Kohlenstoffisotopensignaturen des Benzols ($\delta^{13}\text{C}_{\text{Benzol}}$), des Methans ($\delta^{13}\text{C}_{\text{CH}_4}$) und des DIC ($\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$) sind erprobte Methoden verwendet worden (67, 198).

3.4.5 Herstellung der BACTRAPs

Bei der Herstellung der BACTRAPs dienen Bio-Sep[®]-Kugeln (K. L. Sublette; Universität Tulsa, USA) als Trägermaterial für die Testsubstanzen [$^{12}\text{C}_6$]- und [$^{13}\text{C}_6$]-Benzol sowie als Aufwuchskörper für die Mikroorganismen. Dabei handelt es sich um Kugeln mit 2-3 mm Durchmesser, bestehend aus 75 % pulverisierter Aktivkohle eingebettet in einer Matrix aus

thermostabilem Nomex[®]. Die Oberfläche der Kugeln weist Poren mit einem Durchmesser von 2-10 µm auf. Bei einer Dichte von ca. 0,16 g/cm³ zeichnen sich die Kugeln besonders durch ihre hohe innere Oberfläche von >600 m²/g Bio-Sep-Material aus (207). Die Kugeln wurden zur Entfernung residualer organischer Kohlenstoffverbindungen bei 300 °C im Muffelofen für ca. 3 h ausgeheizt.

Für die Herstellung der BACTRAPs ist ein Teflonrohr (VWR Darmstadt, Deutschland) mit 10 mm Durchmesser in jeweils 40 mm lange Stücke zerschnitten und anschließend perforiert worden, um einen Grundwasserdurchfluss gewährleisten zu können (Abb. 3.3). Pro BACTRAP wurden jeweils 0,4 g Bio-Sep verwendet. Ein Glaswollestopfen am oberen und unteren Ende verhinderte das Herausfallen des Bio-Sep-Materials.

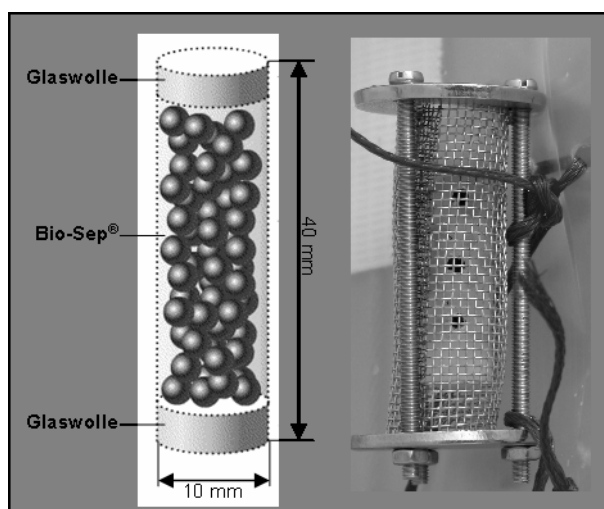


Abbildung 3.3: Schematischer Aufbau eines BACTRAP (links) und Foto der Befestigung des Edelstahlkäfigs mit BACTRAP an der Packermembran (rechts).

3.4.6 Beladung der BACTRAPs

Die BACTRAPs wurden im Autoklav sterilisiert und hydratisiert. Im Anschluss erfolgte die Beladung der Mikrokosmen mit [¹²C₆]- bzw. [¹³C₆]-Benzol. BACTRAPs ohne Benzolaufschlag dienten als Kontrolle zur Analyse der mikrobiellen Besiedlung ohne zusätzliches Substrat.

Die BACTRAPs wurden in verschließbare Glasgefäße überführt und jeweils mit etwa 76 mg Benzol pro Gramm Bio-Sep bei einem Unterdruck von ca. 60 mbar beladen. Um einen Gleichgewichtszustand in der Gasphase herzustellen und eine einheitliche Beladung der Aktivkohle mit dem Benzol gewährleisten zu können, verblieben die BACTRAPs zur Inkubation bei Raumtemperatur für mindestens 48 h in den verschlossenen Gefäßen. Die Beladung ist mit einer Standardabweichung von ± 5 % reproduzierbar (71). Die BACTRAPs wurden im Anschluss in einer Anaerobox mit sterilem, sauerstofffreiem Wasser

überschichtet, kurz evakuiert und dann unter anoxischer Atmosphäre entspannt. Dadurch füllte sich ein Teil des Porenraums der Kugeln mit sauerstofffreiem Wasser und der Kontakt mit Luftsauerstoff beim Einbau der BACTRAPs wurde vermieden. Die BACTRAPs wurden in diesem Wasser bis zur Installation in den Brunnen gelagert.

3.4.7 Einbau in die Grundwassermessstelle

Die BACTRAPs wurden mittels MLPS in acht Tiefen der Messstelle Saf Zz 23/00 (Abb. 3.2) eingebracht. Um eine gleichmäßige Durchströmung der BACTRAPs mit dem Grundwasser zu gewährleisten, wurden sie in Edelstahlkäfigen eingefasst (Abb. 3.3). Die Edelstahlkäfige dienten dabei als Abstandhalter, um direkte Kontakte mit dem Pegelrohr sowie der Packermembran zu vermeiden.

3.4.8 Probenaufbereitung

Nach einer Expositionszeit von 51 Tagen wurden die Mikrokosmen aus der Messstelle entnommen und zur Konservierung bei -15 °C gelagert.

Die Extraktion der Fettsäuren erfolgte nach einer modifizierten Methode von Bligh und Dyer (15). Dabei wurden 2 ml einer Methanol-Dichlormethan-Lösung (Verhältnis 1:3) zu den Biosep-Kugeln aus den jeweiligen BACTRAPs gegeben. Für die Herstellung der Fettsäuremethylester (FAME) dienten 300 µl eines Derivatisierungsreagenz aus Chlortrimethylsilan und wasserfreiem Methanol im Verhältnis 1:8. Die Veresterung erfolgte bei einer Temperatur von 70 °C und einer Reaktionsdauer von 2 h. Die FAME wurden in Hexan gelöst und anschließend mittels GC-MS bzw. GC-IRMS analysiert.

3.4.9 Identifikation der Fettsäuremethylester (FAME) mittels GC-MS

Die Bestimmung der FAME erfolgte mit einem Gaschromatographen (HP 6890 Series, Agilent Technology, USA) mit gekoppeltem Massenspektrometer (HP 5973 Mass Selective Detector, Agilent Technologie, USA). Zur gaschromatographischen Trennung der FAME wurde eine BPX 5-Säule (30m x 0,32 mm x 0.25 µm FD; Agilent Technologie, USA) eingesetzt. Das Temperaturprogramm begann bei 120 °C. Nach 4 Minuten stieg die Temperatur mit 4 °C/min auf 250 °C und schließlich mit 20 °C/min auf 300 °C, die abschließend 10 Minuten konstant gehalten wurden. Die FAME sind mit Hilfe des *Bacterial Acid Methyl Ester*-Standards (BAME, Supelco, USA) durch den Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren identifiziert und auf ihre Reinheit geprüft worden. Fettsäuren werden im Allgemeinen nach folgender Nomenklatur benannt: A:B_wC, wobei A

die Anzahl der Kohlenstoffatome, B die Anzahl der Doppelbindungen und C die Entfernung der nächsten Doppelbindung vom aliphatischen Ende des Moleküls repräsentieren (ω -Nomenklatur). Durch die Vorsilben *iso* (i-) und *anteiso* (a-) wird die Position der Methylverzweigung gekennzeichnet.

3.4.10 Analyse der Kohlenstoffisotopenverhältnisse der FAME mittels GC-C-IRMS

Zur Analyse der Kohlenstoffisotopenverhältnisse der FAME wurde ein "Gas-Chromatography-Combustion-Isotope-Ratio-Mass-Spectrometer"-System (GC-C-IRMS) verwendet. Das System bestand aus einem Gaschromatograph (HP 6890 Series, Agilent Technology, USA), der an einen Verbrennungsofen, ein GC-C-III-Interface (Combustion III, Finnigan MAT, Deutschland), eine Wasserfalle (Nafion[®]-Membran) und ein Massenspektrometer (IRMS MAT 252, Finnigan MAT, Deutschland) gekoppelt war. Eine Beschreibung zur verwendeten Gerätekonfiguration geben Richnow *et al.* (158).

Zur Auftrennung der FAME wurde eine BPX 5-Säule (50m x 0,32 mm x 0,5 μ m FD; SGE GmbH, Deutschland) mit folgendem Temperaturprogramm verwendet: eine Minute 70 °C isotherm, 20 °C/min auf 170 °C, 2 °C/min auf 280 °C und mit 20 °C/min auf 300 °C, die für 5 min isotherm gehalten wurden.

3.4.11 Berechnungen

Die Kohlenstoffisotopensignaturen werden als δ -Notation [‰] relativ zu dem internationalen V-PDB-Standard (Vienna-PeeDee-Belemnite mit $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0,0112372$) angegeben (35, 94) (Gl. 3.1).

$$\delta^{13}\text{C} = \frac{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{\text{Probe}} - \left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{\text{V-PDB-Standard}}}{\left(\frac{^{13}\text{C}}{^{12}\text{C}}\right)_{\text{V-PDB-Standard}}} \times 1000 \quad (3.1)$$

Während der Methylierung der Fettsäuren (FA) zu Fettsäuremethylestern (FAME) wird ein zusätzliches Kohlenstoffatom in das Produkt eingefügt, so dass die ursprüngliche Isotopensignatur aller FA verändert wird. Die gemessenen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte der FAME wurden deshalb nach der Gleichung 3.2 korrigiert, um die Isotopenverhältnisse der Fettsäuren ($\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}}$) zu ermitteln (2).

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}} = \frac{((C_n + 1) \times \delta^{13}\text{C}_{\text{FAME}} - \delta^{13}\text{C}_{\text{MeOH}})}{C_n} \quad (3.2)$$

C_n entspricht der Anzahl der Kohlenstoffatome in den Fettsäuren, $\delta^{13}\text{C}_{\text{FAME}}$ ist die Isotopensignatur der Fettsäuremethylester (FAME) und $\delta^{13}\text{C}_{\text{MeOH}}$ die Isotopensignatur des für die Methylierung benutzten Methanols [-38,15 ‰].

Mit der Rayleigh-Gleichung (Gl. 3.3) wird die Beziehung zwischen der Konzentrationsänderung eines mikrobiell umgesetzten Substrates in Verbindung mit der Änderung der Isotopensignatur durch den Isotopenfraktionierungsfaktor α dargestellt (94).

$$\frac{R_t}{R_0} = \left(\frac{C_t}{C_0} \right)^{\left(\frac{1}{\alpha} - 1 \right)} \quad (3.3)$$

R_0 und R_t geben die Isotopenzusammensetzung (Gl. 3.4), C_t und C_0 die Konzentrationen des Substrats zu den Zeitpunkten t und 0 der mikrobiellen Umsetzung an.

$$\frac{R_t}{R_0} = \frac{\delta_t^{13}\text{C} + 1000}{\delta_0^{13}\text{C} + 1000} \quad (3.4)$$

Der prozentuale biologische Schadstoffabbau wird nach Gleichung 3.5 berechnet. Dabei wird (C_t/C_0) durch Umstellen der Rayleigh-Gleichung ersetzt (Gl. 3.6), sodass der prozentuale biologische Abbau unter Verwendung von Isotopenwerten quantifiziert werden kann (134).

$$B[\%] = \left(1 - \frac{C_t}{C_0} \right) \times 100 \quad (3.5)$$

$$B[\%] = \left(1 - \frac{C_t}{C_0} \right) \times 100 = \left[1 - \left(\frac{R_t}{R_0} \right)^{\left(\frac{1}{\alpha} - 1 \right)} \right] \times 100 \quad (3.6)$$

Die Veränderungen der Kohlenstoffisotopensignatur und der Konzentration des gelösten anorganischen Kohlenstoffs (DIC) innerhalb einer Schadstofffahne dienen als biogeochemische Indikatoren und können zur Abschätzung der Schadstoffmineralisierung nach Gleichung 3.7 verwendet werden (67).

$$A \times \delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(GA)}} + (1-A) \times \delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(Q)}} = \delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(M)}} \quad (3.7)$$

Dabei bezeichnet $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(GA)}}$ das Kohlenstoffisotopenverhältnis des DIC im Grundwasseranstrom der Kontamination. $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(Q)}}$ steht für das Kohlenstoffisotopenverhältnis des während der Schadstoffmineralisierung gebildeten DIC. Es wird angenommen, dass $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(Q)}}$ die Isotopensignatur des nicht abgebauten Schadstoffs (Ausgangssubstrats) in der Quelle trägt (102). $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(M)}}$ entspricht dem $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis des DIC, das innerhalb der Schadstofffahne gemessen wurde. A und (1-A) stellen die Mischungsanteile der beiden Ausgangsisotopenverhältnisse ($\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(GA)}}$ und $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(Q)}}$) dar, aus denen $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(M)}}$ resultiert. Anhand der DIC-Konzentration im Grundwasseranstrom der Schadstofffahne ($C_{\text{DIC(GA)}}$) und mit Hilfe von A kann auf die Menge des in der Schadstofffahne gebildeten DIC ($C_{\text{DIC(B)}}$) geschlossen werden (Gl. 3.8).

$$C_{\text{DIC(B)}} = C_{\text{DIC(GA)}} \frac{(1-A)}{A} \quad (3.8)$$

Schließlich ist eine Abschätzung der mineralisierten Schadstofffraktion ($C_{\text{Schadstoff}}$) anhand des gebildeten DIC ($C_{\text{DIC(B)}}$) möglich (Gl. 3.9).

$$C_{\text{Schadstoff}} [\text{M}] = \frac{C_{\text{DIC(B)}}}{Z_{\text{C}}} \quad (3.9)$$

Z_{C} bezeichnet die Anzahl der Kohlenstoffatome des Schadstoffmoleküls, die bei der Mineralisierung umgesetzt werden.

3.5 Ergebnisse

Die Messstelle Saf Zz 23/00 im nordöstlichen Abstrom der Schadstofffahne (Abb. 3.1) wies in Monitoringkampagnen der letzten Jahre BTEX-Konzentrationen in einer Schwankungsbreite von ca. 40 bis 700 mg/l auf. Im Dezember 2004 wurde mit einem MLPS die vertikale hydrogeochemische Struktur der BTEX-Schadstofffahne untersucht und der *in situ*-Benzolabbau anhand der Isotopensignatur des Benzols und DIC charakterisiert. Um den mikrobiellen Benzolabbau innerhalb der verschiedenen geochemischen Zonen charakterisieren zu können, wurde parallel ein BACTRAP-Experiment in acht Tiefen durchgeführt.

3.5.1 Geochemie

Benzol stellte mit einem Anteil von mehr als 99 % die wesentliche BTEX-Komponente in der Messstelle Saf Zz 23/00 dar. Toluol, Ethylbenzol sowie die Xylole überschritten als Summenparameter in keinem Beprobungshorizont Gesamtkonzentrationen von 2 mg/l (nicht dargestellt). Die Benzolfahne war vertikal strukturiert (Abb. 3.4). Der maximale Benzolgehalt von >6,4 mM (>500 mg/l) wurde in 14 m Tiefe bestimmt. Zum oberen und unteren Schadstofffahnenrand nahmen die Benzolkonzentrationen kontinuierlich bis auf 0,4 bzw. 1,7 mM ab.

Die Isotopensignatur des Benzols wies in den mittleren Tiefen $\delta^{13}\text{C}$ -Werte zwischen -28,0 ‰ und -29,0 ‰ auf (Abb. 3.4), was im wesentlichen den Werten des Benzols im Schadenszentrum (-28,5 bis -29,5 ‰) entsprach (67, 198). In dieser Zone der Kontaminationsfahne konnte daher über die Isotopenfraktionierungsmethode kein bzw. nur ein geringer biologischer Abbau von Benzol nachgewiesen werden (Tab. 3.1). Im oberen und unteren Bereich des Vertikalprofils der Messstelle Saf Zz 23/00 war eine ^{13}C -Anreicherung in der residualen Benzolfraktion um 3 bzw. 6 ‰ festzustellen, die offensichtlich auf Abbauprozesse hinwies. Eine Quantifizierung des prozentualen biologischen Schadstoffabbaus (B %) wurde unter Annahme sulfatreduzierender bzw. methanogener Bedingungen durchgeführt. Die Berechnung basierte auf den von Mancini *et al.* für den Benzolabbau bestimmten Fraktionierungsfaktoren (α), mit 1,0036 für sulfatreduzierende und 1,002 für methanogene Abbaubedingungen (127). Der mikrobielle Benzolabbau unter der Verwendung der schweren Isotopensignatur der Quelle von -28,5 ‰ und dem höheren Isotopenfraktionierungsfaktor für sulfatreduzierende Bedingungen ($\alpha = 1,0036$) zeigte Abbaugrade bis zu 59 % am oberen und bis zu 83 % am unteren Fahnenrand (Tab. 3.1). Die Berechnung mit dem Fraktionierungsfaktor für methanogene Bedingungen ($\alpha = 1,002$) unter Annahme einer relativ leichten Benzolquelle (-29,5 ‰) ergab einen entsprechend höheren Abbau von 89 bis

98 % für die Fahnenränder. Mit Hilfe der hier berechneten Variabilität der Abbaugrade und den gemessenen Benzolkonzentrationen (C_t) in den einzelnen Tiefen der Messstelle Saf Zz 23/00 konnte auf die theoretischen Schadstoffkonzentrationen der Kontaminationsquelle (C_0) zu Beginn des biologischen Abbaus ($t = 0$) zurückgerechnet werden (Tab. 3.1). Die Berechnung des Benzolabbaus für sulfatreduzierende Bedingungen zeigte, dass diese theoretisch bestimmten Konzentrationen von >10 mM im unteren Aquiferbereich in etwa mit den Benzolkonzentrationen der Schadstoffquelle (>12,8 mM) vergleichbar waren. Unter der Annahme methanogener Abbaubedingungen ergaben sich hypothetische Benzolkonzentrationen für die Schadstoffquelle von >90 mM, die die physikalische Löslichkeit des Benzols im Wasser überschreiten und daher unrealistisch waren. Das unterstrich frühere Ergebnisse, nach denen die Methanogenese im Vergleich zur Sulfatreduktion am Standort keinen wesentlichen Anteil am Benzolabbau hat (67). Unter sulfatreduzierenden Bedingungen ergab sich ein Benzolabbau von bis zu 9 mM (ca. 700 mg/l) auf dem Fließweg zwischen Quelle und Messpunkt im unteren Fahnenbereich, welcher auf Grund der hohen Benzolkonzentrationen im Schadenszentrum durchaus möglich sein konnte. Im oberen Rand der Fahne ergab sich ein entsprechend geringerer Benzolabbau zwischen 0,2 bis 0,7 mM (16-55 mg/l).

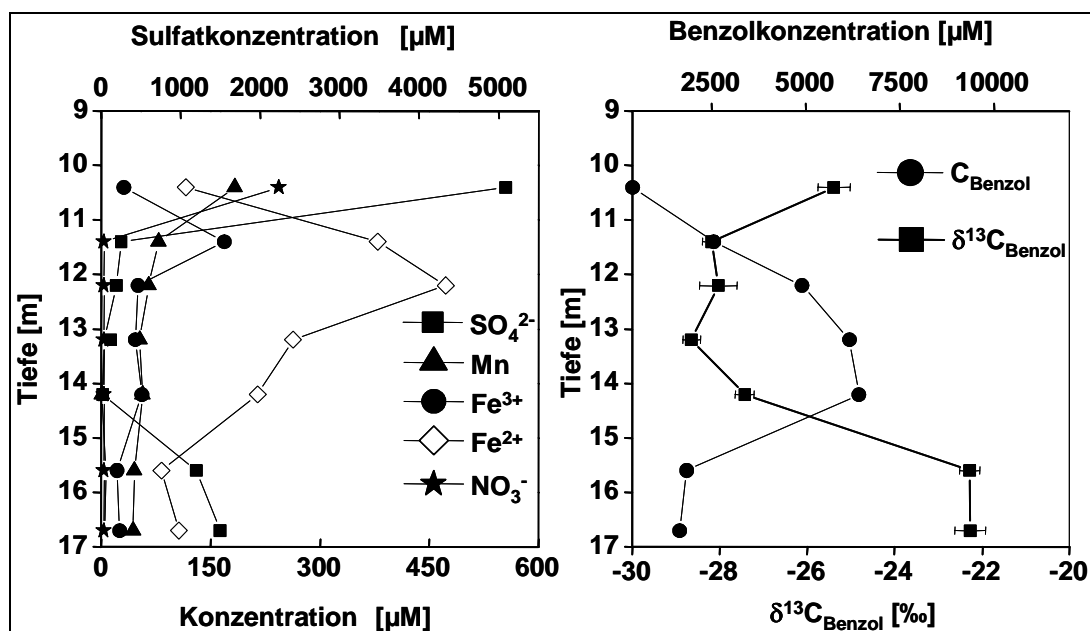


Abbildung 3.4: Links: Vertikale Verteilung der Eisen(II)-(\diamond), Eisen(III)-(\bullet), Nitrat-(\star), Mangan-(\blacktriangle) und Sulfatkonzentrationen (\blacksquare). Rechts: Vertikale Verteilung der Konzentrationen (\bullet) sowie der Kohlenstoffisotopenverhältnisse des Benzols (\blacksquare).

In unbelasteten Bereichen des Aquifers wurden Sulfatkonzentrationen von >10 mM nachgewiesen, so dass Sulfat den wichtigsten Elektronenakzeptor für mikrobielle Abbau-

prozesse darstellte (67, 198). Im Vertikalprofil schwankten die Sulfatkonzentrationen zwischen ca. 20 μM in einer Tiefe von 14 m und >5 mM am oberen Fahnenrand (Abb. 3.4). Verglichen mit unbelasteten Bereichen des Aquifers deutete die Abnahme des Sulfats infolge einer mikrobiellen Sulfatreduktion auf eine deutliche Sulfatsenke in der Fahne hin.

Der höchste Nitratgehalt von 244 μM wurde am oberen Rand der Fahne im Übergangsbereich zur ungesättigten Zone festgestellt (Abb. 3.4). In tieferen Zonen konnte kein Nitrat nachgewiesen werden. Im Vergleich zum Sulfat stand für Abbauprozesse Nitrat als Elektronenakzeptor also nur in der oberen Zone des Aquifers in relativ geringen Konzentrationen zur Verfügung.

Tabelle 3.1: Berechnung des biologischen Abbaus [B %] für sulfatreduzierende ($\alpha_S = 1,0036$) und methanogene Bedingungen ($\alpha_M = 1,002$) unter Berücksichtigung der Schwankungsbreite der Isotopensignatur von Benzol in der Schadstoffquelle ($\delta^{13}\text{C}_{\text{Benzol}} = -28,5$ ‰ bis $-29,5$ ‰).

Tiefe [m]	C_{Benzol} [μM]	$\delta^{13}\text{C}_{\text{Benzol}}$ [‰]	B %(S) ¹ [%]	B %(M) ² [%]	C_0 (S) ³ [μM]	C_0 (M) ⁴ [μM]
10,4	415	$-25,4 \pm 0,4$	59	89	1013	3857
11,4	2557	$-28,2 \pm 0,2$	9	51	2795	5208
12,2	4901	$-28,0 \pm 0,4$	13	55	5608	10886
13,2	6159	$-28,6 \pm 0,2$	0	37	5916	9825
14,2	6419	$-27,4 \pm 0,2$	26	68	8725	19743
15,6	1840	$-22,3 \pm 0,2$	83	98	10871	91177
16,7	1668	$-22,3 \pm 0,4$	83	98	9916	83647

¹ Berechnung des biologischen Abbaus für sulfatreduzierende Bedingungen unter Annahme von $R_0 = -28,5$ ‰
² Berechnung des biologischen Abbaus für methanogene Bedingungen unter Annahme von $R_0 = -29,5$ ‰
³ Berechnung der Benzolkonzentration der Quelle auf Grundlage von B %(S)¹
⁴ Berechnung der Benzolkonzentration der Quelle auf Grundlage von B %(M)²

Die Mangankonzentrationen betragen etwa 180 μM am oberen Rand der Fahne und reduzierten sich mit zunehmender Tiefe kontinuierlich auf Konzentrationen um 44 μM (Abb. 3.4). Eine mikrobielle Manganreduktion konnte in der oberen Zone der Kontaminationsfahne einen Beitrag zum Schadstoffabbau liefern. Insgesamt waren die Mangankonzentrationen für einen signifikanten Schadstoffabbau jedoch zu gering.

Die Konzentrationen von Eisen(III) lagen im Bereich von ca. 20 - 60 μM mit Ausnahme von ca. 170 μM in einer Tiefe von 11,5 m. Die Eisen(II)-Werte schwankten zwischen etwa 80 - 470 μM (Abb. 3.4). Erhöhte Fe(II)-Konzentrationen zwischen 11 - 14 m wiesen auf eine Fe(II)-Mobilisierung hin, die durch Abbauprozesse verursacht hätte sein können. Auffällig war, dass die Bereiche erhöhter Fe(II)-Gehalte (11 - 14 m) durch die geringsten Sulfid-Konzentrationen gekennzeichnet waren. Diese lagen zwar generell bei ≤ 6 μM (nicht dargestellt), aber die Fällung von Fe(II) durch Sulfid konnte zu einer Unterschätzung der

Eisenreduktion beitragen. Gefälltes Eisensulfid verbleibt an der Aquifermatrix und kann im Grundwasser nicht quantitativ nachgewiesen werden, sodass der Anteil der Eisenreduktion anhand der Eisenmobilisierung kaum quantifizierbar ist. Es kann aber grundsätzlich davon ausgegangen werden, dass Eisen(III) am Standort keinen bedeutenden Elektronenakzeptor für Abbauprozesse darstellte (200).

Die Sauerstoffkonzentrationen lagen in der Messstelle mit Ausnahme des Übergangsbereichs zur ungesättigten Zone unterhalb von $40 \mu\text{M}$, so dass Sauerstoff als Elektronenakzeptor in tieferen Zonen der Fahne nicht zur Verfügung stand (nicht dargestellt). Die DIC-Konzentrationen verhielten sich proportional zum Schadstoff (Abb. 3.5). Die höchsten Konzentrationen von $>17 \text{ mMC}$ wurden für den am stärksten kontaminierten Bereich zwischen 11 - 14 m registriert und nahmen am oberen und unteren Fahnenrand ab. Die maximal gemessenen DIC-Werte des Vertikalprofils entsprachen in der Größenordnung den DIC-Konzentrationen, die für die Hauptschadenszonen der BTEX-Fahne ermittelt wurden (67). Im unteren Bereich der Fahne ging die DIC-Konzentration bis auf rund $1,3 \mu\text{MC}$ zurück. Die Verteilung der verschiedenen Spezies des DIC im Grundwasser ist pH-Wert abhängig. Im Bereich der Schadstofffahne wurden pH-Werte von 6,5 - 7,0 bestimmt, sodass entsprechend dem Kalk-Kohlensäure-Gleichgewicht davon auszugehen war, dass Hydrogencarbonat die dominierende Spezies des DIC am Standort darstellte und Fällungsreaktionen ausgeschlossen werden konnten (35). Dieser Trend wurde auch im Tiefenprofil der Messstelle Saf Zz 23/00 beobachtet, wo neutrale pH-Werte von ca. 7,0 für alle Tiefen bestimmt wurden.

Unter der Annahme, dass die Sulfatreduktion der dominierende Prozess des mikrobiellen Schadstoffabbaus am Standort war (200), konnte folgende Abschätzung vorgenommen werden: Nach Wiedemeier *et al.* werden bei der Mineralisierung von 1 mmol Benzol unter der Bildung von 6 mmol CO_2 3,75 mmol Sulfat verbraucht (210). Eine mikrobielle Oxidation von rund 1,3 mM Benzol unter Bildung von etwa 8 mMC DIC kann somit theoretisch eine Sulfatsenke von ca. 5 mM bewirken, wenn der Aufbau zelleigener Biomasse unberücksichtigt bleibt. Verglichen mit der DIC-Konzentration von ca. 8,3 mMC im Anstrom der BTEX-Fahne konnte eine maximale Konzentrationszunahme um ca. 10 mMC im stark kontaminierten Bereich der Messstelle Saf Zz 23/00 beobachtet werden. Aus der maximalen Differenz der DIC-Konzentrationen im Grundwasseranstrom und im Bereich der Messstelle Saf Zz 23/00 berechnete sich ein theoretisches Abbaupotenzial von ca. 1,7 mM Benzol. Aus den beiden Berechnungsansätzen resultierte ein Unterschied von etwa $400 \mu\text{M}$ Benzol.

In kontaminierten Aquiferen gilt die Zunahme von Methan als ein Indiz für Biodegradation unter methanogenen Milieubedingungen (210). Die CH_4 -Konzentrationen im Grundwasser können außerdem durch Methanoxidation beeinflusst werden (83, 195). Die Methanogenese

führt zur Bildung von isotopisch leichtem Methan, während die Methanoxidation mit einer Anreicherung schwerer Isotope verbunden ist. Um Methanbildungs- oder -abbauprozesse voneinander zu unterscheiden, kann der Anreicherungsfaktor $\epsilon_{\text{DIC-CH}_4}$, die Differenz zwischen der Kohlenstoffisotopensignatur des DIC und Methans, genutzt werden (67). Geringe $\epsilon_{\text{DIC-CH}_4}$ -Werte von $<20\text{‰}$ gelten als Indiz für Methanoxidation, höhere Anreicherungsfaktoren deuten auf Methanbildung hin (methanogene Acetatspaltung $10 - 50\text{‰}$; $>50\text{‰}$ CO_2 -Reduktion) (67, 208). Die berechneten Anreicherungsfaktoren für das Tiefenprofil der Messstelle Saf Zz 23/00 variierten von $17 - 26\text{‰}$ (Abb. 3.5). Im Beprobungshorizont bei $10,4\text{ m}$ wurden sowohl die geringsten Methankonzentrationen als auch die geringsten Anreicherungsfaktoren bestimmt, sodass im Übergang zur ungesättigten Zone des Aquifers eine Methanoxidation denkbar war. Mit zunehmender Tiefe trug wahrscheinlich die Methanogenese zum Abbau der BTEX bei und führte zu einer Erhöhung der CH_4 -Konzentration auf ca. $350\text{ }\mu\text{M}$, was etwa einem Abbau von $93\text{ }\mu\text{mol}$ (7 mg/l) Benzol entsprach (210). Wie anhand der Anreicherungsfaktoren abgeleitet werden konnte, war die methanogene Acetatspaltung hierbei vermutlich der dominierende Methanbildungsprozess. Die relativ niedrigen Methankonzentrationen zeigten jedoch, dass die Methanogenese keinen signifikanten Beitrag am Schadstoffabbau lieferte.

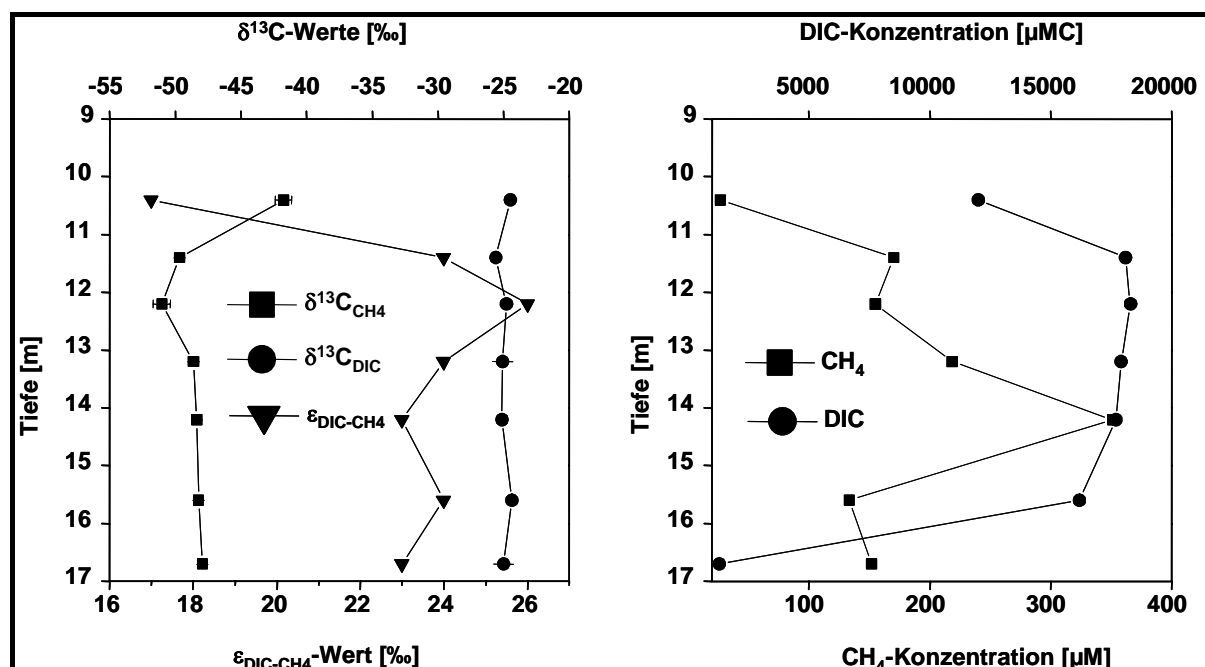


Abbildung 3.5: Links: Vertikale Verteilung der Kohlenstoffisotopenverhältnisse von Methan (■), DIC (●) und der Anreicherungsfaktoren (▼) in der Messstelle Saf Zz 23/00. Rechts: Methan- (■) und DIC-Konzentrationen (●) in der Messstelle Saf Zz 23/00.

Bei der vollständigen Mineralisierung von Benzol entsteht Kohlendioxid, das fast die gleiche Isotopensignatur wie das Ausgangssubstrat trägt (67, 98). Im Anstrom der Fahne lag die natürliche DIC-Isotopensignatur im Mittel bei $-19,5 \text{ ‰}$ (67), im Bereich der Messstelle Saf Zz 23/00 waren die $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ -Werte hingegen durchschnittlich um ca. $5,5 \text{ ‰}$ leichter ($-24,5$ bis $-25,6 \text{ ‰}$) und zeigten keine markanten Unterschiede über die Tiefe (Abb. 3.5). Werte dieser Größenordnung sind generell im stärker kontaminierten Bereich der BTEX-Fahne beobachtet worden (67). Anhand dieser Veränderung des Isotopensignals über die Fließstrecke wurde die Umsetzung von mineralisiertem Benzol berechnet (Gl. 3.7 - 3.9). Als Kohlenstoffisotopenverhältnis ($\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(GA)}}$) bzw. Konzentration ($C_{\text{DIC(GA)}}$) des DIC im Grundwasseranstrom wurde ein mittlerer Wert von $-19,5 \text{ ‰}$ für $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(GA)}}$ bzw. $8,3 \text{ mM}$ für $C_{\text{DIC(GA)}}$ angenommen (67). Das durchschnittliche Isotopenverhältnis des DIC im Profil der Messstelle Saf Zz 23/00 ($\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(M)}}$) betrug ca. $-25,0 \text{ ‰}$. Unter der Annahme identischer Isotopensignaturen des Benzols im Schadenszentrum und des infolge einer Mineralisierung des Schadstoffs entstehenden DIC wurde für die Quantifizierung ein $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(Q)}}$ -Wert von $-28,5 \text{ ‰}$ benutzt, da im Fall einer vollständigen Mineralisierung eine geschlossene Isotopenbilanz zu erwarten war. Die Abschätzung ergab für die Fließstrecke zwischen dem Zentrum der Schadstofffahne und der Messstelle Saf Zz 23/00 eine Mineralisierung von etwa $2,16 \text{ mM}$ Benzol (169 mg/l).

Wenn Biomasse gebildet wird oder der Abbau unvollständig ist, kann für den aeroben Benzolabbau eine Isotopenfraktionierung zwischen nicht abgebautem Benzol und gebildetem DIC von bis zu $4 - 6 \text{ ‰}$ auftreten (98). Die Fraktionierung zwischen Benzol und DIC beim anaeroben Abbau ist nicht untersucht. Wäre eine Fraktionierung zwischen nicht abgebautem Benzol und gebildetem DIC von maximal 6 ‰ ($\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC(Q)}} = -34,5 \text{ ‰}$) bei der Quantifizierung des anaeroben Benzolabbaus berücksichtigt worden, so hätte sich die Menge des mineralisierten Benzols ($808 \text{ } \mu\text{M}$ bzw. 63 mg/l) erheblich verringert. Die Abschätzung des Abbaus setzte voraus, dass die Quellen organischen Materials für das DIC isotopisch charakterisiert waren. Am Standort Zeitz stand vorherrschend Benzol zur Verfügung. Wenn andere Quellen wie natürlicher, gelöster, organischer Kohlenstoff (DOC) oder andere Schadstoffe zur DIC-Bildung beitragen hätte, wäre eine Abschätzung schwierig gewesen. Es war daher offensichtlich, dass die Abschätzung des Abbaupotenzials über eine Isotopenbilanz mit Unsicherheiten verbunden war.

3.5.2 Ergebnisse der tiefenorientierten Untersuchungen mit den BACTRAPs

Die BACTRAPs mit und ohne Benzolbeaufschlagung (^{12}C -Benzol, ^{13}C -Benzol, Kontrolle) zeigten für alle Beprobungshorizonte vergleichbare Fettsäuremuster. Dominierende Fettsäuren waren C16:0 (>40 %) und C18:0 (>20 %) sowie die ungesättigten Fettsäuren C16:1 und C18:1 mit einem prozentualen Anteil von jeweils ca. 10 %. Untergeordnet, in geringen Anteilen (<10 %), konnten die Fettsäuren C14:0, C15:0, i-C15:0, a-C15:0, C18:2 sowie eine weitere C18:1 Fettsäure mittels GC-MS identifiziert werden.

Da sich die Fettsäuremuster der mit Benzol beladenen und unbeladenen BACTRAPs nicht wesentlich voneinander unterschieden, konnte weder ein Substrateinfluss noch eine Abhängigkeit des mikrobiellen Konsortiums vom geochemischen Milieu in den einzelnen Tiefen festgestellt werden. Die Fettsäuren lieferten daher keinen Hinweis auf eine unterschiedliche Besiedlung der BACTRAPs in den einzelnen Beprobungshorizonten.

Verglichen mit einem BACTRAP-Experiment, das in einer Messstelle im weiter entfernten Grundwasserabstrom durchgeführt wurde (71), waren die Fettsäuremuster im Bereich der Messstelle Saf Zz 23/00 homogener und weniger komplex. Das ließ auf eine geringere Biodiversität der auf den BACTRAPs angesiedelten Mikroorganismengemeinschaft schließen.

Die Kohlenstoffisotopensignaturen der Fettsäuren ($\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}}$) aus dem Kontrollexperiment variierten zwischen -23 und -34 ‰. Die Isotopenanalysen der Proben aus dem Markierungsexperiment zeigten die höchsten ^{13}C -Anreicherungen (zwischen +28 und +468 ‰) für die C16:1-Fettsäure (Abb. 3.6). Eine etwas geringere Markierung wurde für die Fettsäuren i-C15:0, C14:0, C16:0 und C18:1 (-20 ‰ bis +145 ‰) bestimmt. Die signifikante ^{13}C -Anreicherung von Fettsäuren war auf den Einbau von ^{13}C aus dem Benzol in die Biomasse zurückzuführen. Keine signifikante Inkorporation der ^{13}C -Markierung des Benzols wurde in die Fettsäuren a-C15:0, C15:0 und C18:0 mit $\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}}$ -Werten von -14 bis -25 ‰ beobachtet (Abb. 3.6).

Die Isotopensignatur der Fettsäuren einer Spezies spiegelt, abgesehen von geringen Unterschieden, die auf Isotopenfraktionierungsprozessen beruhen, im wesentlichen das Isotopenverhältnis des Wachstumssubstrats wider (2). Auch in Experimenten mit isotopisch markierten Substraten ist die Isotopensignatur bei PLFA verschiedener Kettenlänge etwa gleich (144) und kaum vom Wachstumsstadium beeinflusst (2). Der Kohlenstoff wird also etwa gleichermaßen zum Aufbau von Membranlipiden verwendet. Die unterschiedlich starke Markierung zeigte daher die Besiedlung des BACTRAPs durch mikrobielle Konsortien, welche ^{13}C -Benzol unterschiedlich effektiv als Kohlenstoffquelle nutzten. Zum Beispiel schienen Organismen, die unmarkierte Fettsäuren wie C18:0, a-C15:0 oder C15:0 besitzen,

das markierte Benzol nicht oder nur kaum zu metabolisieren und bevorzugten offensichtlich andere Kohlenstoffquellen zur Fettsäuresynthese. Als zusätzliche Kohlenstoffquellen, die den Mikroorganismen zur Verfügung hätte stehen können und die durch eine natürliche Isotopensignatur gekennzeichnet waren, kamen aromatische Kohlenwasserstoffe wie zum Beispiel BTEX aus der Kontamination sowie auch DOC in Frage.

Anhand der Intensität der ^{13}C -Anreicherung in den Fettsäuren konnten Zonen unterschiedlicher mikrobiologischer Aktivität identifiziert werden. Im obersten Bereich der untersuchten Messstelle (9,4 – 11,4 m) zeigte die isotopische Anreicherung von $>+350\text{‰}$ in der C16:1 demnach die größte mikrobielle Aktivität an. Im mittleren Tiefenintervall (12 m) wurden die geringsten Markierungen ($+40\text{‰}$) für C16:1 nachgewiesen. Im unteren Bereich der Messstelle (14 - 15 m) zeigte die C16:1-Fettsäure mittlere ^{13}C -Anreicherung von ca. $+94\text{‰}$ (14,2 m) bzw. $+188\text{‰}$ (15,6 m). Die Ergebnisse verdeutlichten, dass nicht nur in den Randbereichen der Schadstofffahne sondern auch in den stark belasteten Zonen des Aquifers ein mikrobieller Benzolabbau stattfand.

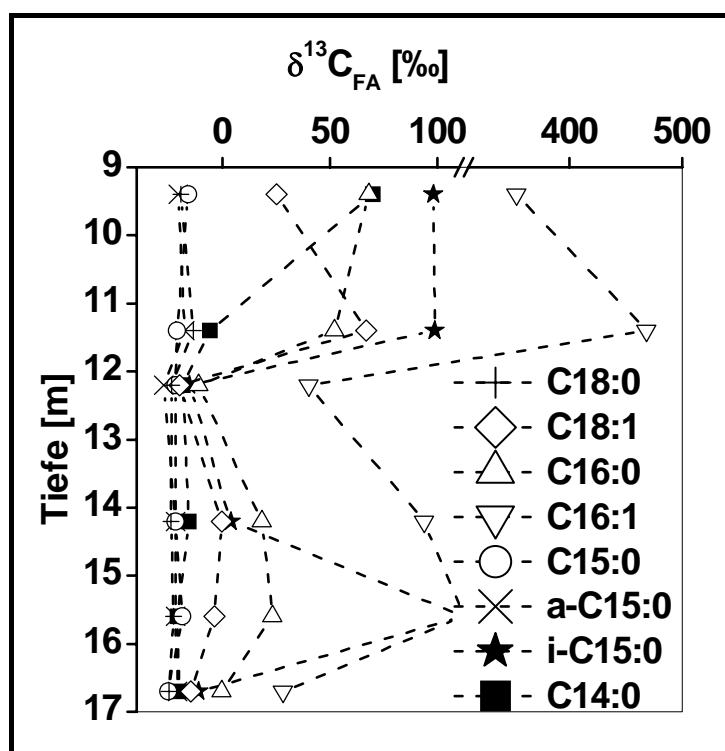


Abbildung 3.6: Übersicht der Isotopensignaturen der Fettsäuren $\delta^{13}\text{C}_{\text{FA}}$ [‰] in den einzelnen Beprobungshorizonten. Die Abkürzungen und Nomenklatur der Fettsäuren sind im Kapitel 3.4.9 erklärt.

3.6 Diskussion

3.6.1 Geochemie

Die Abschätzung des Benzolabbaus anhand der Isotopensignaturen des Benzols bzw. DIC und Methans hat gezeigt, dass hauptsächlich im oberen und unteren Randbereich der Fahne ein *in situ*-Abbau stattfand. Im Tiefenintervall von ca. 12 - 14 m gaben die $\delta^{13}\text{C}_{\text{Benzol}}$ -Werte keinen Hinweis auf mikrobiellen Abbau, da sie ungefähr das Isotopensignal des Quellbereichs (-28,5 ‰) trugen. Vermutlich war im Bereich der sehr hohen BTEX-Konzentrationen der Anteil des mikrobiell abgebauten Benzols im Verhältnis zum nicht umgesetzten zu gering, um eine Veränderung der Isotopensignatur eindeutig nachzuweisen. Die konservative Abschätzung des Abbaus auf dem Fließweg zwischen Quelle und Messstelle Saf Zz 23/00 anhand der Isotopenmethode ergab für sulfatreduzierende Bedingungen einen Benzolabbau von bis zu 9 mM (ca. 700 mg/l). Der gemittelte Abbau über alle Tiefen lag bei ca. 3 mM (ca. 230 mg/l). Mit Hilfe der Konzentrationen und Isotopensignaturen des DIC wurde ein Benzolabbau von etwa 2,16 mM (ca. 169 mg/l) abgeschätzt. Aus der Elektronenbilanz über die Sulfatsenke ergab sich ein Abbaupotenzial von 1,7 mM (ca. 133 mg/l) Benzol. Etwa 350 μM (ca. 28 mg/l) Benzol konnten zusätzlich über methanogene Prozesse abgebaut worden sein. In der Summe errechnete sich ein möglicher Benzolabbau infolge Sulfatreduktion und Methanogenese von 2,05 mM (ca. 160 mg/l). Dieser Wert entsprach etwa der Abschätzung der Mineralisation über das DIC. Die Quantifizierung des Abbaus anhand der Isotopenfraktionierung des Benzols lag etwa um ein Drittel höher, aber in der gleichen Größenordnung. Die verschiedenen Berechnungsansätze lieferten in der Größenordnung übereinstimmende Ergebnisse, sodass die Werte für den berechneten Benzolabbau realistisch erschienen.

Eine Diskussion der Abweichungen der verschiedenen vorgestellten Ansätze zur Abschätzung des anaeroben Benzolabbaus war schwierig. Das Karbonatsystem (DIC) konnte durch Fällungen beeinflusst gewesen sein. Dies schien auf Grund neutraler pH-Werte am Standort jedoch unwahrscheinlich zu sein. Ausgasungen in erheblichem Umfang waren nur im Bereich der Zonen mit direktem Kontakt zur ungesättigten Bodenzone zu erwarten und über die Mächtigkeit des gesamten Aquifers eher als gering anzusehen. In der Elektronenbilanz fehlte im Wesentlichen die Eisenmobilisierung, weil Fe(II) unter sulfatreduzierenden Bedingungen gefällt und für quantitative Abschätzungen nicht erfasst hätte werden können.

Die Beurteilung des mikrobiellen Schadstoffabbaus über die Methode der Isotopenfraktionierung gab vermutlich eine realistische Größe für den Abbau zwischen Quelle und der untersuchten Messstelle. Diese Methode führte zu einer eher konservativen Abschätzung,

wobei der mikrobielle Abbau nicht wesentlich überschätzt werden sollte. Mischungsprozesse auf dem Fließweg von Grundwasserströmen mit einerseits kaum und andererseits stark abgebauten Schadstoffmengen hätten eine Unterschätzung des tatsächlichen Abbaus zur Folge gehabt (67, 158). Zu einer Überschätzung des Abbaus führt die Isotopenmethode in der Regel nicht.

3.6.2 BACTRAP

Die Auswertung des BACTRAP-Experiments hat gezeigt, dass in allen untersuchten Tiefen ein Einbau von ^{13}C -Kohlenstoff in die Fettsäuren erfolgte. Es konnte daher nachgewiesen werden, dass über den gesamten Bereich des untersuchten Vertikalprofils ein Benzolabbau stattfand. Wie auf Grund der unterschiedlichen Intensität der Markierung abgeleitet werden konnte, schien der mikrobielle Benzolabbau offensichtlich in den Bereichen der maximalen Schadstoffbelastungen geringer als in den Randbereichen der Fahne zu sein. Da mit den BACTRAPs der mikrobielle Benzolabbau auch in stark kontaminierten Zonen nachgewiesen werden konnte, war die Sensitivität dieses Testsystems höher als beim Nachweis der Biodegradation über die Methode der Isotopenfraktionierung.

Die Quantifizierung des Benzolabbaus und Erstellung von Stoffumsatzbilanzen mit der Methode der BACTRAPs gestaltet sich problematisch. BACTRAPs verlieren unter vergleichbaren Bedingungen zu diesem Experiment etwa 80 bis 85 % der Menge des beaufschlagten Substrats (Benzol bzw. Toluol) (71). Ein Teil des Substrats wird im Wasser gelöst und mit dem Grundwasserstrom abtransportiert. Dieser Verlust ist nur sehr schwer abschätzbar. Qualitativ konnte in anderen Multilevel-Versuchen eine Desorption des ^{13}C -markierten Substrats aus den BACTRAPs nachgewiesen werden. BACTRAPs mit nicht markierten Substraten, die in ca. 25 cm Entfernung zu ^{13}C -markierten BACTRAPs exponiert waren bzw. Grundwasserproben aus ähnlicher Tiefe zeigten eine ^{13}C -Anreicherung (unveröffentlichte Ergebnisse). Zukünftig sind Referenzversuche mit inerten, nicht abbaubaren Substraten zur Bestimmung der Desorptionskinetik, zur Berechnung des den Mikroorganismen tatsächlich zur Verfügung stehenden markierten Substrats sowie zur Abschätzung von Verlusten nötig.

Ein weiterer Teil des Substrats wird offensichtlich mineralisiert und als CO_2 bzw. Methan aus dem BACTRAP in den Grundwasserstrom abgegeben und steht somit zur Quantifizierung einer geschlossenen Massenbilanz nicht zur Verfügung. Da Mikroorganismen in der Regel einen bestimmten Teil des Substrats zur Synthese eigener Biomasse verwenden, könnten zur Abschätzung der Schadstofftransformation Ertragskoeffizienten dienen. Diese beschreiben das Verhältnis zwischen Mineralisierung und Bildung von Biomasse und könnten in geschlossenen Modellsystemen bestimmt werden. Allerdings sind *ex situ*-

Referenzversuche im Labor schwierig, da anaerob Benzol-abbauende Mikroorganismen gegenwärtig nur schwer kultivierbar sind. Alternativ könnte eine Abschätzung der Ertragskoeffizienten für die verschiedenen terminalen Elektronenakzeptoren mittels Referenzkulturen in Versuchen mit leichter abbaubaren Substraten wie Toluol oder Acetat bestimmt werden, die dann zunächst als Richtwerte für verschiedene biogeochemische Bedingungen zur Verfügung stehen.

Zukünftig soll anhand der Isotopensignatur der Anteil des in die Biomasse transformierten Substrats quantifiziert werden, sodass perspektivisch eine Abschätzung der Mineralisierung möglich scheint. Methoden zur Extraktion der gesamten Biomasse aus den *in situ*-Mikrokosmen werden gegenwärtig entwickelt.

BACTRAPs stellen ein bedeutendes Testsystem zum direkten Nachweis der im Grundwasserleiter stattfindenden Biodegradation dar. Der entscheidende Vorteil des Testsystems ist, dass der Nachweis des mikrobiellen Schadstoffabbaus unter realen Aquiferbedingungen innerhalb nur weniger Monate erfolgen kann. Ein Nachteil zu Laborversuchen besteht derzeit in der eingeschränkten Möglichkeit zur Bilanzierung des Abbaus. In Laborsystemen können geschlossene Stoffbilanzen einfach erfasst werden. Das ist, wie bereits dargestellt, mit *in situ*-Mikrokosmen zur Zeit nicht möglich. Da Testverfahren für Sedimente und Böden im Labor in der Regel nicht die Komplexität der Umweltbedingungen reproduzieren können, ist eine Übertragung der quantitativen Laborergebnisse auf den Aquifer ein kontrovers diskutiertes, ungelöstes Problem. Außerdem erfolgt der anaerobe Abbau meist sehr langsam, weshalb Laborverfahren häufig relativ aufwendig und zeitintensiv sind. Deshalb besitzen im Vergleich zu diesen herkömmlichen Systemen Untersuchungen sowohl der Isotopenfraktionierung als auch der *in situ*-Mikrokosmen mit isotopisch markierten Substanzen ein erhebliches Potenzial zur Charakterisierung des mikrobiellen *in situ*-Schadstoffabbaus in kontaminierten Grundwasserleitern.

3.7 Zusammenfassung

Eine tiefenorientierte Untersuchung von Kontaminationsfahnen erlaubt die Analyse hydrogeochemischer Gradienten im Aquifer. Konzentrationen von Elektronenakzeptoren geben Aufschluss über vorherrschende biogeochemische Prozesse. Die vertikale Analyse der Kontaminationsfahne anhand der Konzentration und Isotopensignatur von Kontaminanten liefert qualitative und quantitative Indikatoren für den *in situ*-Schadstoffabbau. Anhand der Methode der Isotopenfraktionierung konnten Abbauprozesse an den vertikalen Fahnenrändern des untersuchten Tiefenprofils analysiert werden. Eine messbare Veränderung der Isotopensignatur kann meist erst nach einem relativ hohen

Schadstoffumsatz nachgewiesen werden. Bei geringem Abbau ist die Isotopenmethode relativ unempfindlich. Zusätzliche Untersuchungen mit den BACTRAPs konnten hier weiterhelfen, da mit dieser Methode der Schadstoffabbau mit einer höheren Empfindlichkeit nachgewiesen werden konnte. Mit der Isotopenmethode ist eine quantitative Abschätzung des Abbaus auf dem Fließweg zwischen Quelle und Messpunkt möglich. Der Einsatz von *in situ*-Mikrokosmen mit isotopisch markierten Substanzen kann als ein empfindliches Testsystem für den eindeutigen Nachweis des Abbaus genutzt werden. Es werden qualitative Informationen zum Abbaupotenzial in Bereich der untersuchten Messstelle gewonnen. Verglichen mit Abbauxperimenten im Labor geben *in situ*-Mikrokosmen direkte Aussagen zur Biodegradation im Grundwasserleiter. Schwierigkeiten bestehen derzeit noch in der quantitativen Interpretation der Daten. Die vertikale Analyse von geochemischen Gradienten und Isotopensignaturen von Schadstoffen, DIC sowie Methan, verbunden mit dem Einsatz von *in situ*-Mikrokosmen, liefert Informationen zu biogeochemischen Abbauprozessen, die für einen Schadensfall relevant sind. Der Einsatz von MLPS in Verbindung mit modernen geochemischen und isotopenchemischen Verfahren ermöglicht somit mit vertretbarem Aufwand die Gewinnung entscheidender Informationen für die Planung von "Natural Attenuation"-Vorhaben bzw. für die Überwachung von aktiven Sanierungs- bzw. "Enhanced Natural Attenuation"-Verfahren.

3.8 Danksagung

Die Bio-Sep-Beads wurden von Dr. Kerry L. Sublette (Universität Tulsa, USA) für die Experimente zur Verfügung gestellt. Wir bedanken uns bei Ursula Günther und Dr. Matthias Gehre (Department für Isotopenbiogeochemie, UFZ) für ihre Hilfe während der Isotopenanalysen, bei Ralf Trabitze und Prof. Dr. Holger Weiß (Department für Grundwassersanierung, UFZ) für ihre Unterstützung bei der Planung und Koordination der Feldarbeiten und bei Dr. Hansjörg Weiß (IMW, Tübingen) für die Hilfe bei der Installation des MLPS. Das Vorhaben wurde finanziell durch den Projektbereich SAFIRA des UFZ unterstützt. Nicole Stelzer wird von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt (DBU) durch ein Promotionsstipendium (AZ 20004/751) finanziell gefördert.

4 A MULTITRACER TEST PROVING THE RELIABILITY OF RAYLEIGH EQUATION-BASED APPROACH FOR ASSESSING BIODEGRADATION IN A BTEX-CONTAMINATED AQUIFER

Anko Fischer, Jana Bauer, Rainer U. Meckenstock, Willibald Stichler, Christian Griebler, Piotr Maloszewski, Matthias Kästner, Hans H. Richnow

(This chapter was published in *Environmental Science & Technology*, 40, pp. 4245-4252, 2006.)

4.1 Abstract

Compound-specific stable isotope analysis (CSIA) is one of the most important methods for assessing biodegradation activities in contaminated aquifers. Although the concept is straightforward, the proof that the method cannot only be used for a qualitative analysis but also to quantify biodegradation in the subsurface was missing. Therefore, we performed a multitracer test in the field with ring-deuterated (d_5) and completely deuterium-labelled (d_8) toluene isotopologues (400 g) as reactive tracers as well as bromide as a conservative tracer. The compounds were injected into the anoxic zone of a BTEX-plume located down-gradient of the contaminant source. Over a time period of 4.5 months, the tracer concentrations were analyzed at two control planes located 24 and 35 m down-gradient of the injection well. Deuterium-labelled benzylsuccinate was found in the aquifer, indicating the anaerobic biodegradation of deuterated toluene via the benzylsuccinate synthase pathway. Three independent methods were applied to quantify biodegradation of deuterated toluene. Firstly, fractionation of toluene- d_8 and toluene- d_5 using the Rayleigh equation and an appropriate laboratory-derived isotope fractionation factor was used for the calculation of the microbial decomposition of deuterated toluene isotopologues (CSIA-method). Secondly, the biodegradation was quantified by the changes of the concentrations of deuterated toluene relative to bromide. Both methods gave similar results, implying that the CSIA-method is a reliable tool to quantify biodegradation in contaminated aquifers. The results of both methods yielded a biodegradation of deuterated toluene isotopologues of approximately 23 - 29 % for the first and 44 - 51 % for the second control plane. Thirdly, the mineralisation of deuterated toluene isotopologues was verified by determination of the enrichment of the deuterium in the groundwater. This method indicated that parts of deuterium were assimilated into the biomass of toluene degrading microorganisms.

4.2 Introduction

Benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene isomers (BTEX) are among the most frequent pollutants in contaminated aquifers. In many cases, natural attenuation (NA) of these compounds has emerged as an appropriate remediation strategy (210). Abiotic NA-processes such as advection, dispersion, sorption, and volatilisation cause a displacement of BTEX-compounds from contaminated groundwater into other compartments. Only microbial degradation leads to a sustainable reduction of BTEX-concentrations associated with an effective mass reduction in groundwater. Since most BTEX-contaminated sites are anoxic, anaerobic biodegradation is of special interest in the evaluation of contaminated aquifers.

The application of NA as a remediation strategy requires methods to prove and quantify *in situ*-biodegradation (194). Spatial or temporal changes in concentrations of BTEX, electron acceptors or mineralisation products are often used to assess BTEX-biodegradation. However, this approach involves a significant uncertainty as it is extremely difficult to distinguish between biotic and abiotic sinks of organic pollutants.

In recent years, compound-specific stable isotope analysis (CSIA) for assessing *in situ*-biodegradation of organic pollutants in contaminated aquifers has gained more and more attention (123, 126, 133, 164). The concept relies on the observation of the shift in stable isotope ratios of carbon, hydrogen or other elements that are involved in the breakage or generation of chemical bonds during biodegradation of organic contaminants. The detection of a significant enrichment of the heavier stable isotope in the residual fraction of a pollutant gives indications for the biodegradation of this substance. The changes in stable isotope ratios of pollutants are used to calculate the extent of biodegradation in contaminated aquifers using the Rayleigh equation associated with laboratory-derived isotope fractionation factors. CSIA is commonly used for pollutants consisting of stable carbon or hydrogen isotopes in natural abundance. An alternative technique for investigating the microbial BTEX-decomposition by CSIA is to determine fractionation of labelled BTEX-isotopologues. The fractionation of toluene isotopologues with and without a deuterated methyl group during anaerobic biodegradation is caused by the first enzymatic attack on the toluene molecule (138). The reaction is performed by benzylsuccinate synthase which catalyses the addition of fumarate to the methyl group of toluene (90, 182). The principle of fractionation during anaerobic biodegradation of toluene with and without a deuterated methyl group is that more energy is required to break a bond between carbon and deuterium than to break a bond between carbon and protonium (138). Hence, toluene without a labelled methyl group is preferentially biodegraded during anaerobic decomposition in comparison to toluene with a deuterated methyl group. The consequence is an enrichment of toluene with a deuterium-labelled methyl group in the fraction that has not yet been biodegraded. In batch

experiments, laboratory-derived fractionation factors for the biodegradation of mixtures of differently labelled toluene by several anaerobic bacteria were obtained (132, 138).

The applicability of deuterium-labelled compounds for the assessment of BTEX-biodegradation in tracer tests has been shown in several studies (156, 189). The advantage of deuterium-labelled compounds is that they can easily be detected even though the non-labelled isotopologue is present in high concentrations in an aquifer. The disadvantage of fully deuterium-labelled BTEX-compounds is a slower transformation relative to non-deuterated analogues (115, 138). Hence, the use of fully deuterated tracer species can lead to an underestimation of the occurred BTEX-biodegradation in the field.

To evaluate the applicability of the CSIA-method for the assessment of *in situ*-biodegradation of different labelled isotopologues, we designed a multitracer test with a half-and-half mixture of ring-deuterated (d_5) and completely deuterium-labelled (d_8) toluene (i.e. toluene without and with a deuterated methyl group) as reactive tracers and bromide as conservative tracer. With this approach, we were able to monitor and assess the biotransformation and mineralisation of deuterated toluene by means of several techniques: (I) CSIA-method based on the fractionation of toluene- d_5 and toluene- d_8 , (II) the changes of labelled toluene isotopologues relative to bromide, and (III) the enrichment of deuterium in groundwater.

Although, biodegradation of pollutants was often demonstrated by CSIA in contaminated aquifers, it is questioned whether the concept can be practically used to quantify microbial decomposition. It was recently shown by an analytical modelling approach that the quantification of biodegradation by the CSIA-method gives reliable results in terms of aquifer heterogeneities like various dispersive conditions, degrees of biodegradation, plume geometries as well as travel times (1). However, there is only one study showing the reliability of the CSIA-method for the quantification of *in situ*-biodegradation using independent methods (146). The process of isotope fractionation of a non-labelled pollutant as well as the fractionation of labelled isotopologues upon microbial degradation is similar and can be described by the Rayleigh equation (60, 97, 133). Thus, we applied a multitracer test to validate the Rayleigh approach with two independent methods to demonstrate the applicability of the CISA method for the assessment of biodegradation in contaminated aquifers.

4.3 Materials and methods

4.3.1 Field site

The test site is located in the area of a former benzene plant close to the city of Zeitz (Saxony-Anhalt, Germany). The dominant contaminants are benzene and toluene with concentrations up to 850 mg/l and 50 mg/l, respectively. At the test site, the biodegradation of benzene and toluene was indicated by means of CSIA (67, 198). The predominant electron acceptor used for biodegradation was sulphate (67, 78, 198). Additional information about the hydrogeology and the hydrochemistry of the contaminated aquifer in Zeitz are given in the Supporting Information (see Appendix - F).

The multitracer test was performed within the upper aquifer downstream of the source of the BTEX-plume (Fig. 4.1). The aquifer thickness in the area where the test took place varied from 4 to 6 m and the groundwater table was located approximately 9.20 m below ground level. The effective porosity ranged between 0.19 and 0.24 and the organic carbon content of the aquifer sediment (C_{org}) was $<0.1\%$. Shortly before the tracer injection, toluene concentrations within the area of the multitracer experiment were typically below $1\ \mu\text{g/l}$.

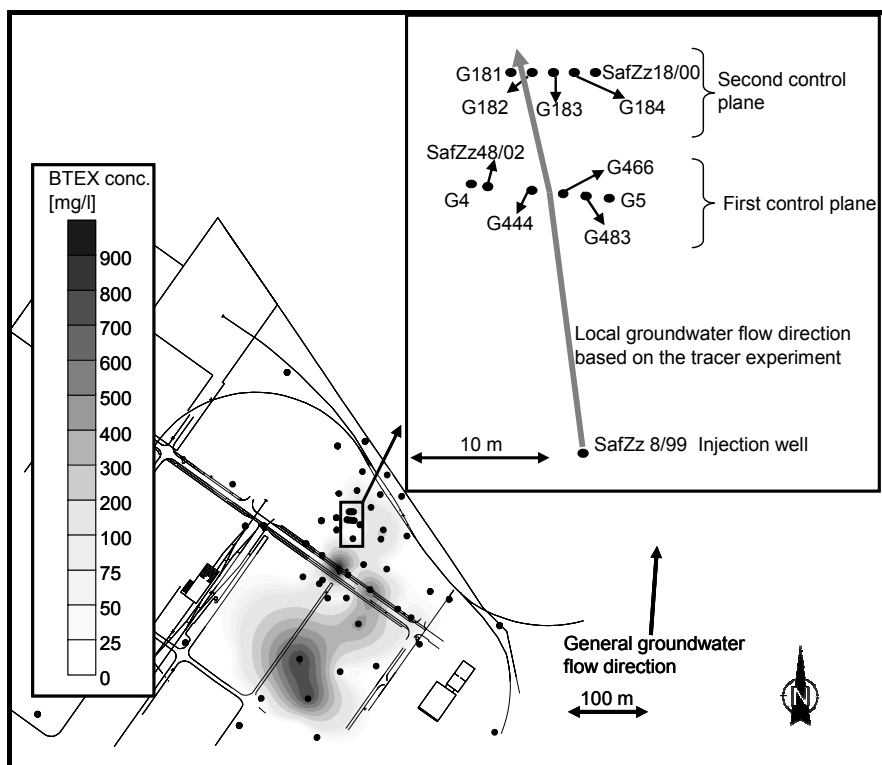


Figure 4.1: Map of the Zeitz field site showing the BTEX-plume within the upper aquifer with the detailed location and sampling point arrangement of the tracer test transect.

4.3.2 Injection of tracers and sampling

5 m³ groundwater was pumped out of well Saf Zz 8/99 with a submersible electrical pump (MP1, Grundfos, Denmark). After this, 6.72 kg bromide as potassium bromide (KMF-Laborchemie Handels GmbH, Germany, 99 % degree of purity) was dissolved in the extracted groundwater which was continuously purged with argon to prevent penetration of atmospheric oxygen into the anoxic groundwater. A mixture of 195 g toluene-d₅ (CIL-Cambridge Isotope Laboratories, USA; 98 % degree of purity) and 205 g toluene-d₈ (Chemotrade, Germany; 99 % degree of purity) was added into the injection well (Saf Zz 8/99) during the injection of the extracted groundwater. More details about the tracer injection are given in the Supporting Information (see Appendix - F).

Groundwater samples were taken at two control planes located approximately 24 and 35 m downstream of the injection well (Saf Zz 8/99) (Fig. 4.1). The sampling points were installed by means of the direct push technique (50). PVC tubes equipped with small gas-driven double-valve-pumps (IMW-Innovative Measurement Technology Weiss, Germany) were installed at different depths within the boreholes. The upper section was referred to as P1 (>137 m above sea level), the middle as P2 (<137-135.5 m above sea level), and the lower as P3 (<135.5-134 m above sea level). The pumping rates of the gas-driven double-valve pumps were up to 0.05 l/min. Additionally, the broadening of tracers was analyzed at monitoring wells (Saf Zz 48/02, Saf Zz 18/00) using a submersible electrical pump (MP1, Grundfos, Denmark) with a pumping rate of 7 to 9 l/min. At least two well volumes of groundwater were removed before the samples were taken. The chemical and isotope analyses are described in the Supporting Information (see Appendix - F).

4.3.3 Calculations

The retardation of a tracer dissolved in groundwater due to instantaneous equilibrium sorption with the porous matrix can be expressed by the retardation factor (\mathcal{R}) which can be approximated using equation 4.1.

$$\mathcal{R} = \frac{nN_{\text{sol}} + (1-n)N_{\text{sorb}}}{nN_{\text{sol}}} = \frac{v_{\text{groundwater}}}{v_{\text{sorptive tracer}}} \approx \frac{(t_{\text{max}})_{\text{sorptive tracer}}}{(t_{\text{max}})_{\text{conservative tracer}}} \quad (4.1)$$

N_{sol} is the amount of tracer dissolved in groundwater, N_{sorb} the amount adsorbed to the aquifer matrix and n is the effective porosity of the aquifer. $v_{\text{groundwater}}$ and $v_{\text{sorptive tracer}}$ are the groundwater flow velocity and the velocity of a sorptive tracer dissolved in groundwater,

respectively. Generally, it is assumed that the groundwater flow velocity equals the velocity of a conservative tracer dissolved in groundwater. Thus the retardation factor (\mathcal{R}) can be estimated from the migration time between tracer injection and the occurrence of the maximal concentration of conservative and sorptive tracers: $(t_{\max})_{\text{conservative tracer}}$ and $(t_{\max})_{\text{sorptive tracer}}$ respectively.

Three methods were used to calculate the biodegradation of deuterated toluene in the investigated aquifer transect. The first method is based on the CSIA-method using the Rayleigh equation (60, 97) (Eq. 4.2).

$$\frac{R_t}{R_0} = \left(\frac{(1+R_0)}{(1+R_t)} \times \frac{C_t}{C_0} \right)^{\left(\frac{1}{\alpha} - 1 \right)} \quad (4.2)$$

R_t and R_0 are the ratios of toluene- d_8 to toluene- d_5 (C_{d8}/C_{d5}) at a given time and prior to biodegradation, respectively. α is the fractionation factor. C_t and C_0 are the sum of the concentrations of the two deuterated toluene species ($C_{d8} + C_{d5}$) at a given time and prior to biodegradation, respectively.

At every sampling time the sum of the concentrations of toluene- d_5 and toluene- d_8 which was not affected by biodegradation ($C_0(t)$) can be determined by transformation of equation 4.2 to:

$$C_0(t) = \frac{(1+R_0) \times C_t}{(1+R_t) \times \left(\frac{R_t}{R_0} \right)^{\left(\frac{1}{\alpha} - 1 \right)}} \quad (4.3)$$

By plotting the calculated $C_0(t)$ over the corresponding sampling time (t), theoretical breakthrough curves were obtained. The area below the theoretical breakthrough curve (A_{theo}) and the real breakthrough curve (A_{real}) quantified according the equations 4.4 and 4.5 were used to calculate the cumulative concentrations of the biodegraded toluene species (A_B) (Eq. 4.6).

$$A_{\text{theo}} = \int_0^{\infty} C_0(t) dt \quad (4.4)$$

$$A_{\text{real}} = \int_0^{\infty} C_t(t) dt \quad (4.5)$$

$$A_B = A_{\text{theo}} - A_{\text{real}} \quad (4.6)$$

For the second method, the breakthrough curves of bromide as a conservative tracer were used to quantify the biodegradation of deuterated toluene. In this case, the cumulative concentration of the deuterated toluene which was not affected by the biodegradation (A_{theo}) was determined by:

$$A_{\text{theo}} = \frac{A_{\text{Br}} (M_{\text{d8}} + M_{\text{d5}})}{M_{\text{Br}}} \quad (4.7)$$

where M_{d5} , M_{d8} , and M_{Br} are the injected masses of toluene-d₅, toluene-d₈, and bromide, respectively. The area below the bromide breakthrough curve (A_{Br}) was calculated as:

$$A_{\text{Br}} = \int_0^{\infty} C_{\text{Br}}(t) dt. \quad (4.8)$$

In equation 4.8, $C_{\text{Br}}(t)$ is the bromide concentration at every sampling time of the tracer breakthrough. A_{theo} calculated according to equation 4.7 was used in equation 4.6 to determine the cumulative concentrations of the biodegraded toluene isotopologues (A_B).

The third method for the calculation of the mineralisation of deuterated toluene isotopologues is based on the enrichment of deuterium in groundwater during the tracer breakthrough. For the quantification the deuterium/hydrogen ratios of groundwater given by the δ -notation (δD) according to equation 4.9 were transformed to the atom percentage (atomD) using equation 4.10.

$$\delta D[\text{‰}] = \left(\frac{R_S}{R_R} - 1 \right) \times 1000 \quad (4.9)$$

R_S and R_R are the respective deuterium/hydrogen ratios (D/H) in the sample and in the reference standard which is the Vienna-Standard-Mean-Ocean-Water with $D/H = (155.76 \pm 0.05) \times 10^{-6}$ (86).

$$\text{atomD}[\%] = \frac{100}{\frac{1}{R_R \times \left(1 + \frac{\delta D}{1000}\right)} + 1} \quad (4.10)$$

The enrichment of deuterium concentration in groundwater caused by the mineralisation of the deuterated toluene species $C_D(t)$ at a given sampling time (t) of tracer breakthrough was assessed by equation 4.11:

$$C_D(t) = \frac{(\text{atomD}_t - \text{atomD}_0) \times m_H}{100} \quad (4.11)$$

where atomD_t and atomD_0 are the deuterium/hydrogen ratios at a given sampling time and at the beginning of tracer breakthrough, respectively. m_H is the molar concentration of hydrogen in groundwater (≈ 111.1 M). To calculate the amount of toluene mineralisation on the basis of the enrichment of deuterium in groundwater (C_D) it is necessary to know how many moles of deuterium could be formed during the mineralisation of 1 mole of the mixture of toluene- d_5 and toluene- d_8 . Theoretically, if toluene- d_5 and toluene- d_8 were mineralised in equal amounts, 6.5 moles of deuterium would be formed by the microbial decomposition of 1 mole of the toluene mixture. Since toluene- d_5 is preferentially decomposed compared to toluene- d_8 (138), a smaller amount of deuterium than 6.5 moles may be expected. Therefore, the biodegraded proportions of the deuterated toluene species have to be taken into account when determining the moles of deuterium released at a given sampling time ($M(t)$) as follows:

$$M(t) = \frac{C_{d5-t} \times 8 + \frac{C_{d8-t}}{R_0} \times 5}{C_{d5-t} + \frac{C_{d8-t}}{R_0}} \quad (4.12)$$

where C_{d8-t} and C_{d5-t} are the concentrations of toluene- d_8 and toluene- d_5 at a given sampling time, respectively. R_0 is the initial ratio of toluene- d_8 to toluene- d_5 for the tracer injection ($R_0 = 1.05$). The normalisation of the concentration of toluene- d_8 (C_{d8-t} and C_{d8-0}) by R_0 was necessary because the deuterated toluene species were not injected in exactly equal amounts. Using $M(t)$ and $C_D(t)$, the cumulative concentrations of mineralised toluene- d_5 and toluene- d_8 (A_B) can be assessed with equation 4.13.

$$A_B = \int_0^{\infty} \frac{C_D(t)}{M(t)} dt \quad (4.13)$$

The mass of toluene-d₅ and toluene-d₈ biodegraded at the two control planes can be calculated from:

$$M_B = \sum_{i=1}^k (A_B)_i \times Q_C \quad (4.14)$$

where i is the individual sampling site, k is the total number of sampling sites in one control plane, and Q_C is the apparent groundwater flow rate through the control plane assuming 100 % recovery of conservative tracer in the control plane. It can be calculated using bromide breakthrough curves observed at the sampling points as:

$$Q_C = \frac{M_{Br}}{\sum_{i=1}^k (A_{Br})_i} \quad (4.15)$$

The uncertainties of the cumulative concentrations and masses of the biodegraded toluene isotopologues (A_B and M_B) were calculated as follows:

$$\Delta y = \sum_{i=1}^k \left(\frac{\partial y}{\partial x_i} \right) \times \Delta x_i \quad (4.16)$$

where Δy is the absolute error of A_B and M_B , respectively, and Δx is the uncertainty of each parameter x_i used for the calculation of A_B and M_B .

4.4 Results and discussion

Although CSIA is often used to characterise biodegradation in contaminated aquifers, the validation of the method to assess biodegradation quantitatively is not that much investigated. Therefore, we designed a multitracer test where we quantified biodegradation by the CSIA-method and compared the results with two independent methods. For comparison, we used the results derived from changes of the concentrations of deuterated toluene relative to bromide and the enrichment of deuterium in groundwater, respectively. The basis for the quantification of the biodegradation was the investigation of the hydrological behavior of the tracers within the investigated aquifer transect with respect to their broadening (see the Supporting Information of Appendix - F) and retardation.

4.4.1 Retardation of the deuterated toluene species

In order to investigate the transport behavior of toluene-d₈ and toluene-d₅, retardation factors (\mathcal{R}) of the two isotopologues were obtained from their breakthrough curves and the breakthrough curves of bromide representing the conservative tracer which should show no retardation ($\mathcal{R} = 1$) (Fig. 4.2A). The retardation factors of the deuterated toluene isotopologues were about 1.01 and slightly higher ($\mathcal{R} = 1.08$) at sampling point G 466 P3 (Tab. 1 in the Supporting Information of Appendix - F). This indicates that toluene-d₈ and toluene-d₅ were only weakly retarded along the investigated aquifer transect. The low retardation of the deuterated toluene species can be attributed to the low organic carbon content ($C_{\text{org}} < 0.1\%$) within the investigated aquifer transect. Furthermore, the retardation of the deuterated toluene isotopologues was only slightly influenced by sorption onto mineral surfaces as it would be expected for hydrophobic compounds in sandy aquifers with typically low organic carbon content ($C_{\text{org}} < 0.1\%$) (147, 169). Nevertheless, because the retardation factor was higher than 1.01 in some cases it can be reasoned that there are zones where the ability to sorb toluene onto organic carbon or mineral surfaces is slightly higher compared to the bulk aquifer transect. However, sorption of BTEX seems to play no important role as a NA-process in the contaminated aquifer in Zeitz. Our results are comparable to other field tracer tests within contaminated aquifers with a low carbon content where the retardation factors of toluene were smaller than 1.1 (161, 165, 189).

Poulson *et al.* showed in a laboratory experiment that fully deuterated and non-deuterated BTEX have a very similar sorption behavior and concluded that the deuterated compounds are excellent tracers for hydrologic behavior of groundwater contaminants (151). In our field tracer experiment, retardation factors of toluene-d₈ and toluene-d₅ did not differ significantly, indicating that the two species had nearly the same transport behavior in the aquifer. Consequently, if non-deuterated toluene is similarly retarded as toluene-d₈, also toluene-d₅

should be similarly transported through an aquifer compared to non-deuterated toluene. Thus, not only toluene-d₈ but also toluene-d₅ appears to be suitable to investigate the transport behaviour of toluene in a contaminated aquifer.

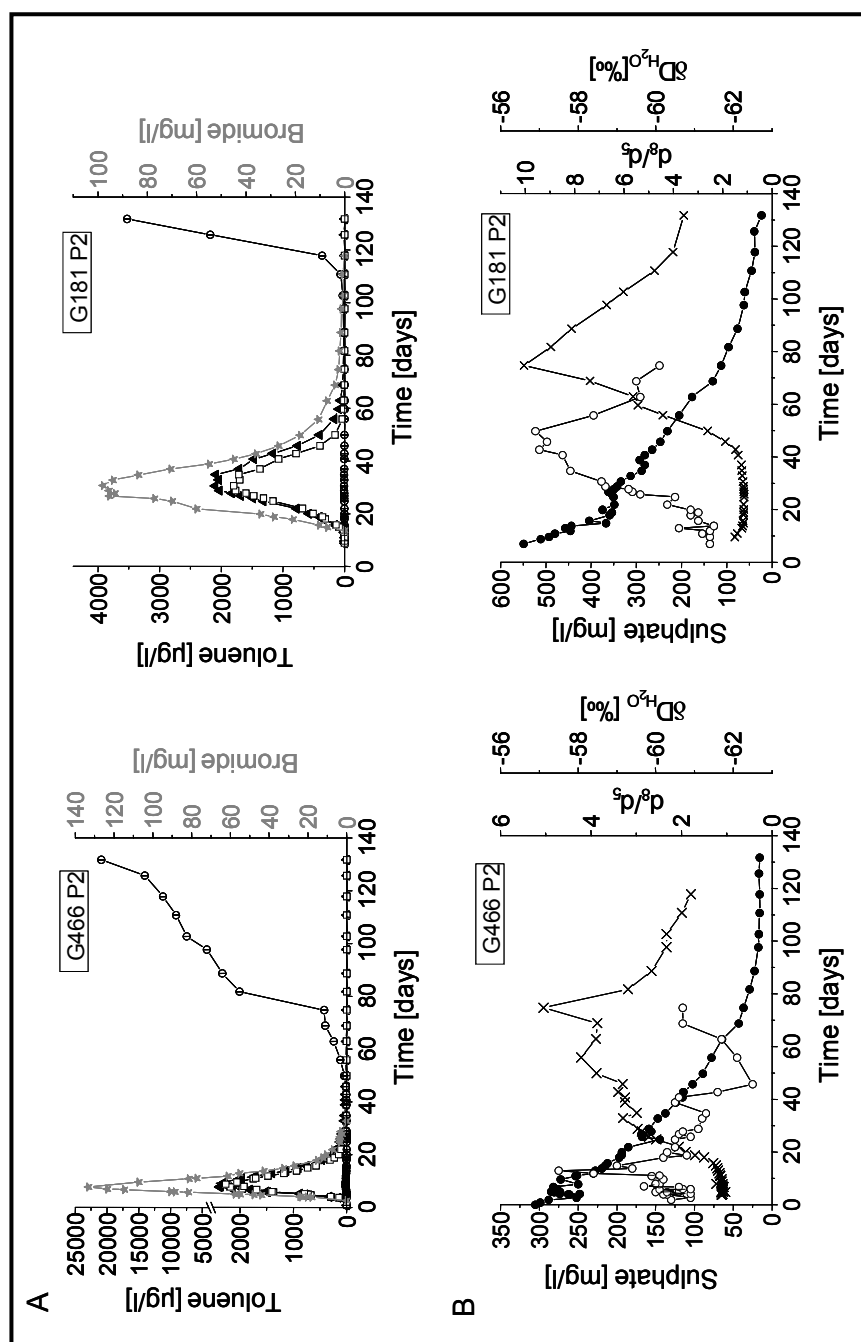


Figure 4.2: Tracer breakthrough observed in two control planes. A) bromide (★), toluene-d₈ (▲), toluene-d₅ (□), non-labelled toluene (Φ); B) sulphate (●), ratio of toluene-d₈ to toluene-d₅ (X), D/H isotope signature of groundwater (o) within the middle depth of the first control plane (G 466 P2) and the second control plane (G 181 P2). The standard uncertainty of the parameters was smaller than the size of their symbols except D/H isotope signatures of groundwater with a relative standard uncertainty of ±0.5 ‰ (see also Supporting Information of Appendix - F).

Besides sorption, also volatilization can act as a NA-process of BTEX. Since the concentrations of toluene-d₅ and toluene-d₈ are low in the upper monitoring sections of the multi-level sampling points (see Tab. 2 in the Supporting Information of Appendix - F), it can be assumed that the tracer cloud did not reach the groundwater table. Therefore, the volatilization of the deuterated toluene isotopologues can be neglected during the transport through the investigated aquifer transect.

4.4.2 Toluene biodegradation pathway

In order to reveal the degradation pathway of toluene in the aquifer we analysed water samples for putative metabolites. Benzylsuccinic acid (BSA) is a very specific metabolite for the anaerobic degradation pathway of toluene (90, 182) and has been detected in a number of petroleum hydrocarbon contaminated aquifers (4, 12, 155). The identification of benzylsuccinic acid-d₅ (BSA-d₅) in selected samples from well G 466 P2 unambiguously proved the anaerobic *in situ*-degradation of toluene-d₅ (Fig. 4.3). BSA-d₅ was found at concentrations between 0.5 (which was the detection limit for BSA with our GC-MS protocol) and 3.5 µg/l resulting in BSA-d₅/toluene-d₅ ratios between 0.0001 and 0.067. Detailed information about the formation, identification and the concentration measurement of BSA-d₅ as well as BSA-d₅/toluene-d₅ ratios are given in Supporting Information (see Appendix - F). Similar to our approach, Reusser *et al.*, who injected toluene-d₈ and *o*-xylene-d₁₀ in single-well push & pull tracer tests into BTEX-contaminated aquifers, proved the occurrence of anaerobic *in situ*-transformation of these compounds via detection of BSA-d₈ and *o*-methyl BSA-d₁₀ (156). Concentrations of deuterated BSA and BSA/toluene ratios were in the same range as found in our study (156). However, we could only detect BSA-d₅ but no BSA-d₈, which is probably due to the significantly larger turnover of toluene-d₅ compared to toluene-d₈ resulting in a higher BSA-d₅ concentration. Further metabolites of the anaerobic toluene degradation could not be found in our samples, probably as a result of low concentrations or relatively high analytical detection limits of our GC-MS protocol for other metabolites than BSA.

Previous studies at the test site in Zeitz have shown that sulphate reduction was the predominant electron-accepting process during BTEX-biodegradation (67, 78, 198). During the tracer breakthrough, sulphate concentrations decreased continuously from greater than 300 mg/l to lower than 25 mg/l (Fig. 4.2B). Simultaneous to the detection of the lowest sulphate concentrations, an increase in the concentration of non-labelled toluene could be observed (Fig. 4.2A). The precise reason for changing sulphate and toluene concentrations is not known but is probably associated with the fluctuation in the contaminant plume due to season dependent hydraulic conditions in the shallow aquifer. The biochemical conditions in

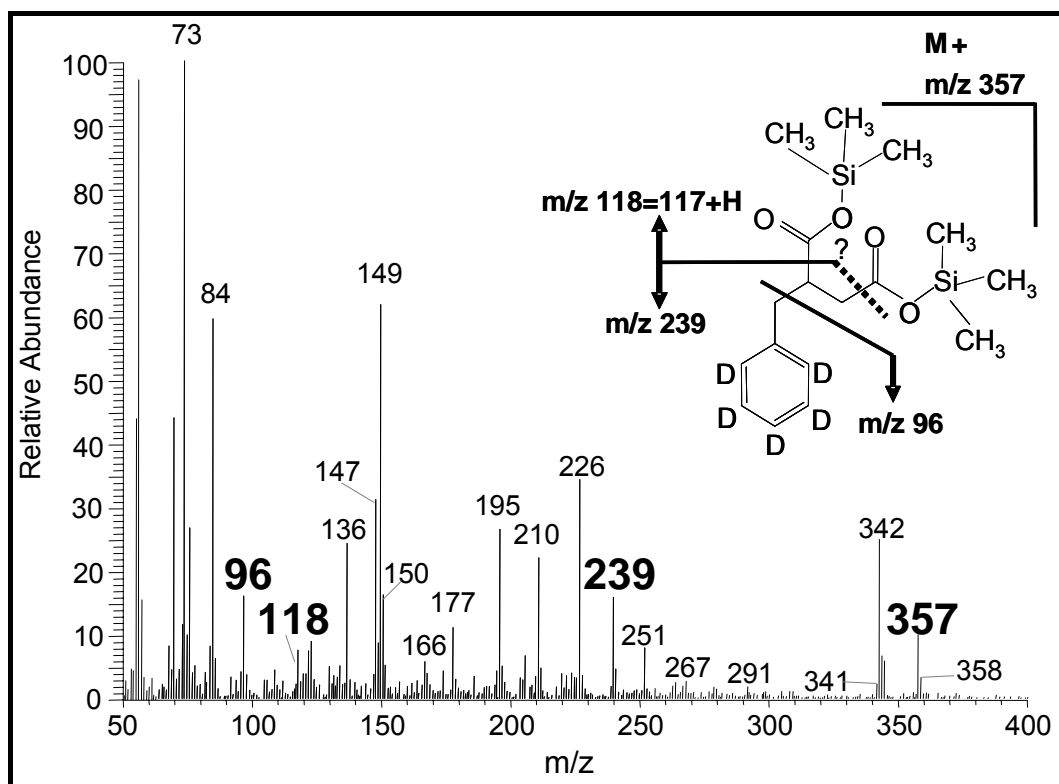


Figure 4.3: Mass spectra of silylated benzylsuccinic acid-d₅ (BSA-d₅) obtained from a groundwater sample taken from sampling point G 466 P2 at day 29 after the tracer injection. Bold numbers stand for significant mass fragments of silylated BSA-d₅ given in the chemical structure of silylated BSA-d₅ and explained in Supporting Information (see Appendix - F).

the investigated aquifer transect are suggested to be predominantly sulphidogenic; however, the concentrations of deuterated toluene were too low to cause the observed sulphate loss by microbial sulphate reduction. Instead, other electron donors such as non-labelled benzene and toluene potentially present in high concentrations within the contamination plume might have caused sulphate consumption by microbial sulphate reduction. For example, at the end of the tracer breakthrough, non-labelled toluene from the contamination surprisingly increased from less than 1 µg/l up to 3.5 mg/l (Fig. 4.2A). Within the first control plane, toluene concentration rose to more than 15 mg/l whereas sulphate concentrations decreased to less than 20 mg/l. Thus, at the end of the tracer breakthrough, the sulphate concentrations were too small to mineralise toluene completely, indicating that the sulphate concentration became a limiting factor for microbial sulphate reduction. Besides toluene, other electron donors may also cause a decrease of sulphate. Benzene concentrations were not determined during the tracer test, but previous studies showed that these were high enough, so that they might have induced the decrease in sulphate by microbial sulphate reduction in this aquifer transect (67, 198).

4.4.3 Quantification of deuterated toluene biodegradation

During the tracer breakthrough, the ratio of toluene-d₈ to toluene-d₅ increased significantly compared to the initial ratio at the injection ($R_0 = 1.05$) (Fig. 4.2B). In batch experiments, the biodegradation of a half-and-half mixture of toluene-d₈ and toluene-d₅ was always associated with a significant increase of the ratio of these two isotopologues (138, 139). Since abiotic NA-processes like sorption and volatilisation, which might have caused a fractionation of toluene-d₈ and toluene-d₅, are negligible in the aquifer, changes in the ratio of the two isotopologues should be mainly due to biodegradation. For the calculation of biodegraded toluene isotopologues by the CSIA-method (Eq. 4.2 - 4.6), a fractionation factor ($\alpha = 2.06 \pm 0.09$) was applied which was derived from biodegradation experiments with a half-and-half mixture of toluene-d₈ and toluene-d₅ under sulphate-reducing conditions (132, 138). At the end of the tracer breakthrough, the ratio of toluene-d₈ to toluene-d₅ began to decrease (Fig. 4.2B), indicating that parts of the deuterated toluene were only slightly influenced by biodegradation when they passed through the aquifer transect. The high concentration of non-labelled toluene observed at this time should be sufficient for the induction of the benzylsuccinate synthase pathway. Probably, limitation in sulphate reduction led to a lower biodegradation of the deuterated toluene at the end of the tracer breakthrough.

Further indication for the toluene biodegradation was given by the increase of the injection ratio of the conservative tracer bromide to the deuterated toluene ($M_{Br}/(M_{d8}+M_{d5})$) and the ratio of the breakthrough curve areas of bromide to those of the deuterated toluene (A_{Br}/A_{real}) (data not shown). The increase between these two ratios could only be significantly influenced by biodegradation and possibly to a lower extent by sorption of the deuterated toluenes. Since sorption of toluene was negligible in the investigated aquifer transect, only the biodegradation could cause significant changes between the injection ratios and breakthrough curve areas of the tracers. Therefore, these changes were used to calculate the biodegradation of deuterated toluene (Eq. 4.7 - 4.8, and 4.6).

The D/H-ratio of the groundwater increased significantly during the tracer breakthrough (Fig. 4.2B). This deuterium enrichment can be explained by the release of deuterated water into the groundwater due to the mineralisation of deuterium-labelled toluene. Thus, the changes of the D/H-ratios of the groundwater which were detected before and during the tracer breakthrough were used for the determination of the mineralisation of deuterated toluene (Eq. 4.9 - 4.13).

The amounts of biodegraded deuterated toluene isotopologues calculated for the sampling times of the tracer breakthrough were used to generate curves of biodegraded toluene. The areas under the curves gave cumulative concentrations of the biodegraded deuterated toluene isotopologues over the complete tracer breakthrough in the unit mg*d/l (Fig. 4.4). In

the middle part of the first control plane, the microbial decomposition of deuterated toluene calculated by the CSIA-method ranged between 14 mg*d/l (G 466 P2) and 20 mg*d/l (G 444 P2). The method based upon the changes between the injection ratios and breakthrough curve areas of bromide and deuterated toluene, respectively, gave biodegradation of deuterated toluene of 18 mg*d/l (G 466 P2) and 28 mg*d/l (G 444 P2), which is a difference of only approximately 24 % compared to the CSIA-method. The mineralisation of deuterated toluene calculated by the deuterium enrichment in groundwater was up to 52 % lower than the biodegradation calculated by the two other methods. Within the second control plane, the biodegradation of deuterated toluene calculated according to the CSIA-method varied from 20 to 48 mg*d/l for the different sampling points (Fig. 4.4). Slightly lower differences in biodegradation (<23 %) were estimated using the method based on the changes between the injection ratios and breakthrough curve areas of bromide and deuterated toluene isotopologues. The method using deuterium enrichment in groundwater yielded values for mineralisation of deuterated toluene which were lower compared to the biodegradation calculated for the two other methods (<47 %). However, the quantification of the mineralisation is associated with a high uncertainty (Fig. 4.4) due to the low precision of the deuterium measurements and the relatively low shift in the deuterium content in the groundwater. The results of the CSIA- and bromide approach differ only slightly indicating that the CSIA-method is suitable to describe the biodegradation of deuterated toluene isotopologues in the investigated aquifer. The mineralisation of the toluene isotopologues derived from deuterium release in groundwater tends to be smaller than the transformation of deuterated toluene determined by the CSIA- and bromide methods as expected. Obviously, parts of the deuterium derived from the biodegradation of deuterated toluene were assimilated into the biomass of microorganisms colonizing the aquifer matrix. For example, the fixation of deuterium in phospholipid fatty acids was observed during the biodegradation of completely deuterated styrene-(d₈) (3). In addition, minor parts might have been bound to metabolites such as BSA or have been transformed into dissolved organic carbon (DOC).

The cumulative concentrations of the biodegraded deuterated toluene determined for the various sampling points were used to quantify the mass of injected toluene degraded in the two control planes (Eq. 4.14 - 4.15). The mass of biodegraded toluene calculated by the three different methods ranged between 65 and 117 g for the first control plane and between 127 and 204 g for the second control plane (Fig. 4.5). The results of the CSIA- and bromide methods gave biodegradation of the injected mass of deuterated toluene (400 g) between 23 and 29 % on the way from the injection well to the first control plane and between 44 and 51 % on the way from the injection well to the second control plane. The results of the method based on the enrichment of deuterium in groundwater showed that approximately 16

and 32 % of the injected mass of deuterated toluene (400 g) was identified as mineralisation product on the way from the injection well to the first control plane and to the second control plane, respectively.

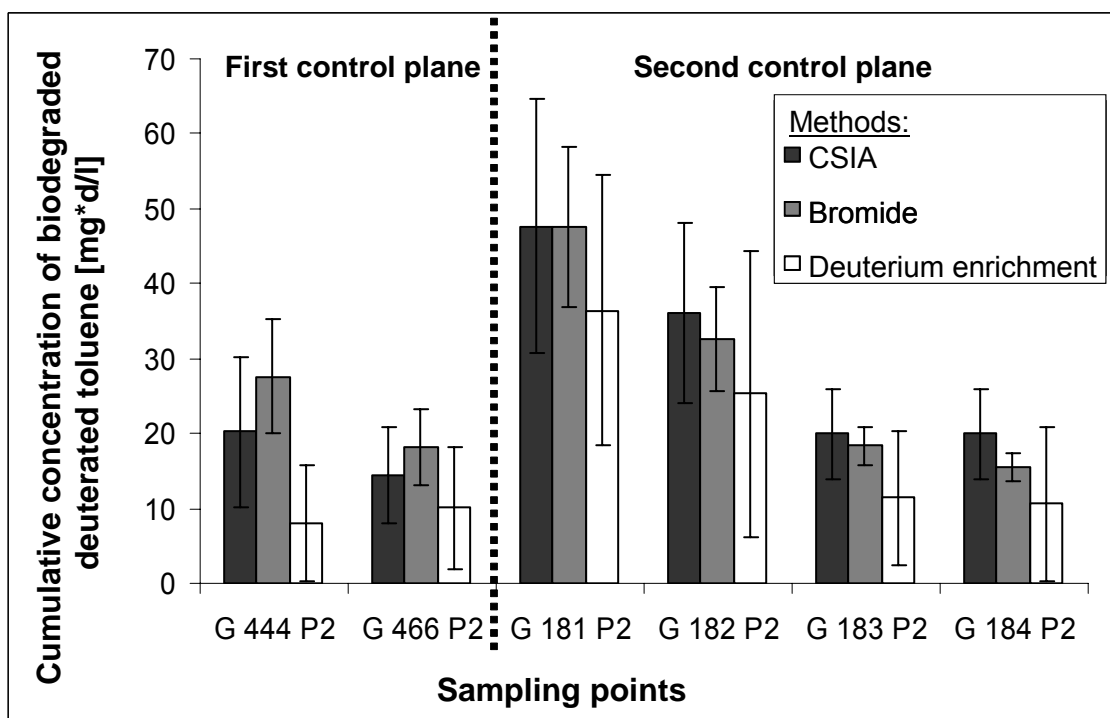


Figure 4.4: Cumulative concentrations of biodegraded deuterated toluene at sampling points within the middle depth of the first and second control planes calculated by methods based on CSIA (dark-grey), bromide (grey), and the deuterium enrichment (white) in groundwater.

Nevertheless, the relatively consistent results of the CSIA- and bromide methods indicated that the Rayleigh equation was an appropriate basis for assessing the biodegradation of deuterated toluene. However, Kopinke *et al.* hypothesized that isotope fractionation by sorption may be relevant in contaminated aquifers and therefore may lead to uncertainties for the quantification of biodegradation by the CSIA-method (114). For a short contamination event, which is comparable with a tracer injection, the heavier isotopologue of a pollutant migrates faster through the aquifer than the lighter isotopologue. Thus, the ratio between the heavier and the lighter isotopologues should be higher at the front of a pollutant peak and should decrease in the direction of the peak tail. At the beginning of the tracer breakthrough of deuterated toluene isotopologues, no significant changes in the ratio of toluene-d₈ to toluene-d₅ could be observed. Obviously, sorption did not lead to a significant fractionation for toluene-d₈ to toluene-d₅ in the investigated aquifer transect and therefore, it could be neglected for our quantifications. Consistent with the findings from our tracer experiment, it was assumed in several studies that sorption does not cause a significant carbon and

hydrogen isotope fractionation in contaminated aquifers (89, 168, 171).

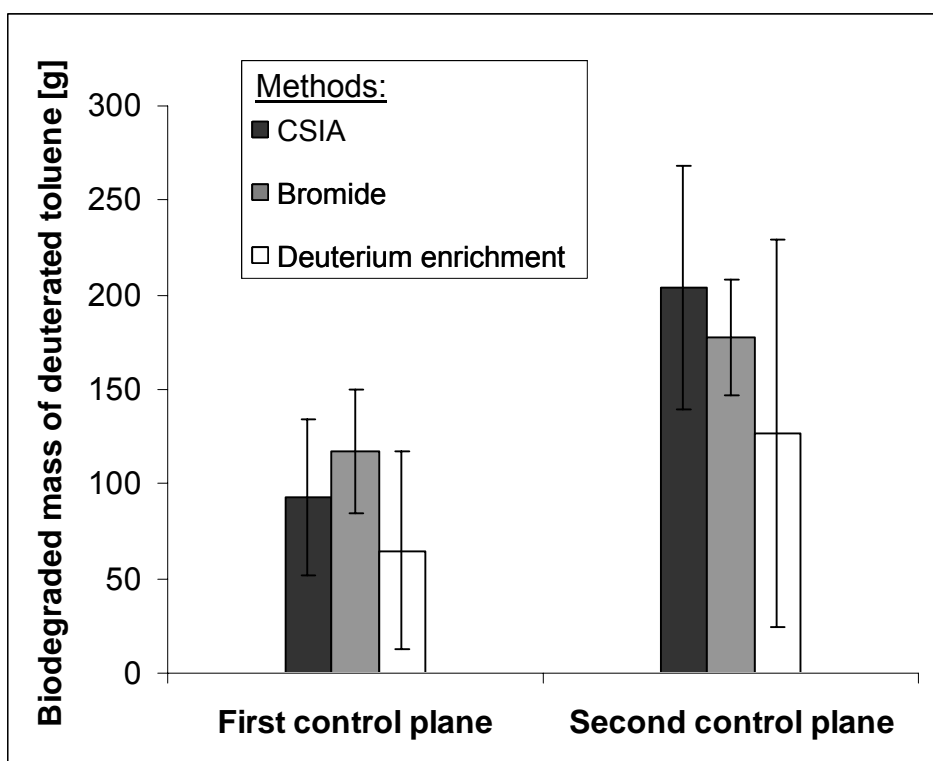


Figure 4.5: Biodegraded mass of deuterated toluene calculated for the first and second control planes by methods based on CSIA (dark-grey), bromide (grey), and the deuterium enrichment (white) in groundwater.

Heterogeneity of aquifers can result in varying extents of biodegradation within different groundwater flow paths which may affect the quantification by the CSIA-method and lead to an underestimation of biodegradation (67, 114). If different extents of biodegradation occur on distinct flow paths, after mixing of these flow paths the isotope composition of contaminants will be dominated by the fraction contributing the higher amount of contaminant, which is commonly the less degraded fraction. Kopinke *et al.* denoted this phenomenon as the segregation problem and presented a mathematical model to predict uncertainties for the CSIA-method (114). However, the quantification of biodegradation using a conservative tracer is not affected by the segregation problem. Since the quantifications using bromide as conservative tracer were nearly identical to the results of the CSIA-method, the segregation problem was obviously not relevant in the investigated aquifer transect. However, although a flow path of 35 m was investigated, it can not be concluded that the segregation problem cannot affect the quantification of *in situ*-biodegradation in general. In our experiment, the tracer breakthrough was monitored on particular flow paths with a limited mixing of water in the sampling points and therefore the micro-scale heterogeneities probably

present in this aquifer did not have a significant impact on the ratio of toluene-d₈ to toluene-d₅.

For a proper assessment of biodegradation by the CSIA-method, it is important to choose a laboratory-derived fractionation factor for the initial step of biodegradation which is dominant in the investigated aquifer (133). For example, the use of a fractionation factor representative for aerobic biodegradation of toluene-d₈ and toluene-d₅ by the methyl monooxygenase pathway of *Pseudomonas putida* mt-2 ($\alpha = 13.65 \pm 2.45$) (132) would lead to a significant underestimation of the biodegradation of deuterated toluene within the investigated aquifer transect (data not shown). However, the similar results derived from the CSIA-method compared to bromide method showed that the fractionation factor used for the quantification was suitable and therefore representative for the dominant biodegradation pathway in the area of the investigated aquifer transect.

The results of our multitracer test showed that the CSIA-method was adequate for the quantification of the biodegradation of deuterated toluene in a BTEX-contaminated aquifer. Therefore, the quantification of biodegradation by the CSIA-method was verified in comparison to independent methods. Several investigations provided indications that the CSIA-method can be used to recalculate the concentration gradient of organic pollutants in a contaminant plume applying the Rayleigh equation-based approach (81, 158, 198). In an analytical approach, it was recently shown that the CSIA-method is quite robust and always conservative for the quantification of contaminant biodegradation in respect to aquifer heterogeneities including various dispersive conditions, degrees of biodegradation, plume geometries as well as travel times (1). The applicability of the CSIA-method for the quantification of biodegradation in an aquifer has also been demonstrated by the adjustment with an independent *in situ*-approach (146). The biodegradation of non-labelled *o*-xylene within an aquifer of a former gasworks site was determined by means of the Rayleigh equation and these results were compared to the amount of biodegradation derived from mass flow rates of *o*-xylene in an integral pumping test. The similar results derived from the Rayleigh equation and the integral pumping test indicated the reliability of the CSIA-method for assessing *in situ*-biodegradation. In accordance to previous studies, we demonstrated the applicability of the CISA-concept by independent methods in a field tracer experiment for the first time. Thus, it could be shown that the CSIA-method is a reliable way of assessing biodegradation in contaminated aquifers.

4.5 Acknowledgments

Financial support was obtained from the German Federal Ministry of Education and Research (Grant 02WT0041) and from the UFZ (SAFIRA-Project). We thank Ralf Trabitze, Prof. Dr. Holger Weiß, Prof. Dr. Mario Schirmer, Dr. Stefan Gödeke, Werner Kletzander, Michael Dietze, Dr. Andrea Vieth, Dörthe von Seggern, Dr. Jürgen Mattusch, Claudia Eckerl, Günther Teichmann and Reimo Kindler for their help during the tracer experiment and for discussions. Dr. Harry Beller is acknowledged for providing an authentic standard for BSA-d₅.

5 APPLICABILITY OF STABLE ISOTOPE FRACTIONATION ANALYSIS FOR THE CHARACTERISATION OF BENZENE BIODEGRADATION IN A BTEX-CONTAMINATED AQUIFER

Anko Fischer, Katja Theuerkorn, Nicole Stelzer, Matthias Gehre, Martin Thullner, Hans H. Richnow

(This chapter was submitted for publication in Environmental Science & Technology.)

5.1 Abstract

In recent years, the analysis of stable isotope fractionation has increasingly been used for characterizing and quantifying biodegradation of contaminants in aquifers. For a BTEX-contaminated aquifer located in the area of a former hydrogenation plant, carbon and hydrogen isotope signatures of benzene gave indications that biodegradation mainly occurred under anoxic conditions. This finding was consistent with the investigation of hydrogeochemical conditions within the aquifer transect and other recent studies. Furthermore, the biodegradation of benzene was calculated by changes in carbon isotope signatures using the Rayleigh equation-streamline approach. Since contaminant concentrations can also be affected by non- or hardly-isotope-fractionating abiotic processes such as dilution, volatilisation or irreversible sorption to the aquifer matrix, the Rayleigh equation-streamline approach was adjusted for scenarios assuming that biodegradation and an abiotic process occur either consecutively or simultaneously along a groundwater flow path between contaminant source and sampling well. The results of the scenarios differed significantly, indicating that an abiotic attenuation process (typically dilution) causes a decrease in benzene concentration within the investigated aquifer transect. This comparison of results derived from the different scenarios can help to identify whether biodegradation is the predominant process for decrease in contaminant concentration. However, for a proper quantification of biodegradation, the temporal sequence between biodegradation and dilution needs to be known. In general, quantification of pollutant biodegradation by the Rayleigh equation-streamline approach can lead to high imprecision when a non-isotope-fractionating abiotic process causes a significant natural attenuation.

5.2 Introduction

Benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX) are groundwater pollutants of particular environmental concern, since these compounds represent a significant health risk due to their high abundance and toxicity (9, 45, 148, 177). It has been shown that all BTEX-compounds can be biodegraded under oxic and anoxic conditions (see (26, 27, 74, 90) for reviews). Biodegradation is the most significant process leading to a decrease in BTEX-concentrations in groundwater coupled with a sustainable mass reduction. Therefore, the evaluation of *in situ*-biodegradation of BTEX is essential for the implementation of groundwater management strategies such as Natural Attenuation (NA) (194). In recent years, stable isotope fractionation analysis has gained more and more attention as a tool for characterizing and assessing *in situ*-biodegradation of organic pollutants in contaminated aquifers (see (133, 164) for reviews). This concept relies on the fractionation of stable isotopes during the microbial degradation, leading to an enrichment of heavier stable isotopes in the residual fraction of a pollutant. Thus, the isotope fractionation of carbon, hydrogen or other elements involved in the cleavage or formation of chemical bonds during the initial step of microbial transformation can be used as an indicator for the *in situ*-biodegradation.

However, effects of abiotic processes on the isotopic signature of the target compound have to be known in order to characterize biodegradation of organic pollutants in aquifers using stable isotope fractionation analysis. No significant changes in the isotopic signature of contaminants occur during the dilution with pristine water (46, 172). The isotope fractionation due to volatilisation is mostly negligible in contaminated aquifers (89, 174, 204). Several laboratory studies showed that sorption of BTEX causes no significant isotope effect, leading to the assumption that this NA process has no influence on the isotope signature of a pollutant dissolved in groundwater (89, 167, 171). However, Kopinke *et al.* showed that for an aquifer where no biodegradation occurs sorption can lead to a significant isotope fractionation at the front of an expanding contaminant plume or a breakthrough curve occurring after a short contamination event (114). In the case of a stationary contaminant plume with biodegradation activity, the degree of isotope fractionation due to sorption will be smaller and possibly insignificant (114). Another process that can affect the isotope signature of pollutants in aquifers is the mixing of groundwater from aquifer zones which exhibit a different degree of biodegradation. This mixing effect leads to a decrease in the observable isotope fractionation of a pollutant (67, 114, 158). A detailed study about the influence on isotope fractionation due to mixing of groundwater with different degrees of biodegradation is given by Kopinke *et al.* (114).

In many studies, the percentage of contaminant biodegradation was determined by the

Rayleigh equation-based approach (67, 81, 116, 123, 126, 133, 158, 160, 198, 199, 216), whereby the decrease in the concentration of a pollutant is determined by its changes in isotope signatures as detected in the contaminant source and monitoring wells down-gradient of the plume. Abe and Hunkeler showed that the Rayleigh equation-based approach for the quantification of the percentage of contaminant biodegradation is quite robust and always conservative in respect to various dispersive conditions, degrees of biodegradation, plume geometries, and travel times (1). Besides the quantification purposes, the simultaneous changes in carbon and hydrogen isotope signatures were used for the characterization of aerobic or anaerobic degradation of methyl *tert*-butyl ether (MTBE) in contaminated aquifers (116, 216).

In this study, stable isotope fractionation analysis was used to characterize and assess the *in situ*-biodegradation of benzene in a highly contaminated aquifer. Based on multi-level sampling, the vertical and horizontal distributions of carbon and hydrogen isotope ratios for benzene were detected within the contaminant plume. By means of the isotope ratios, it could be determined whether the biodegradation of benzene occurred under oxic or anoxic conditions. Furthermore, the percentage of benzene biodegradation was assessed based on the Rayleigh equation. In most cases, the isotope signatures of pollutants are not affected by abiotic processes in contaminated aquifers. However, the concentration of a pollutant can be significantly influenced by abiotic processes. Thus, it is questionable whether the Rayleigh equation can be used as a base for the quantification of biodegradation under any circumstances. To determine the applicability of the Rayleigh equation for assessing pollutant biodegradation in contaminated aquifers, various scenarios were considered where, on the one hand, the shift in isotope ratios is only a result of microbial transformation, and on the other hand, the changes in concentrations are influenced not only by biodegradation but also by a non-isotope-fractionating abiotic process.

5.3 Materials and methods

5.3.1 Field site

The investigated field site is located in the area of a former hydrogenation plant close to the city of Zeitz (Saxony-Anhalt, Germany). The history and the hydrogeological conditions of the field site are described in detail in recent studies (78, 162) and in the Supporting Information (see Appendix - G).

In the near-source areas of the upper aquifer, the BTEX-concentration can exceed 900 mg/l. The dominant contaminants are benzene and toluene with concentrations up to 850 mg/l and 50 mg/l, respectively. Ethylbenzene and xylenes are present in only minor concentrations

below 3 mg/l. In the lower aquifer, the highest BTEX-concentrations, consisting mainly of benzene, are approximately 150 mg/l. At the test site, the predominant electron acceptor was sulphate (67, 78, 198). In addition, methanogenesis accounted for minor microbial BTEX-transformation in the contaminant plume but was more significant in the source area (67). Other electron acceptors such as oxygen, nitrate, and ferrous iron played only a marginal role for biodegradation processes at the site (67, 78, 198).

For hydrochemical and isotopic analyses, groundwater samples were taken at several multi-level sampling wells (A, B, C, D, E) along a transect in the upper aquifer extending from a source area to the fringe of the contaminant plume following the main groundwater flow direction (Fig. 5.1). The sampling and analytical methods are described in detail in the Supporting Information (see Appendix - G).

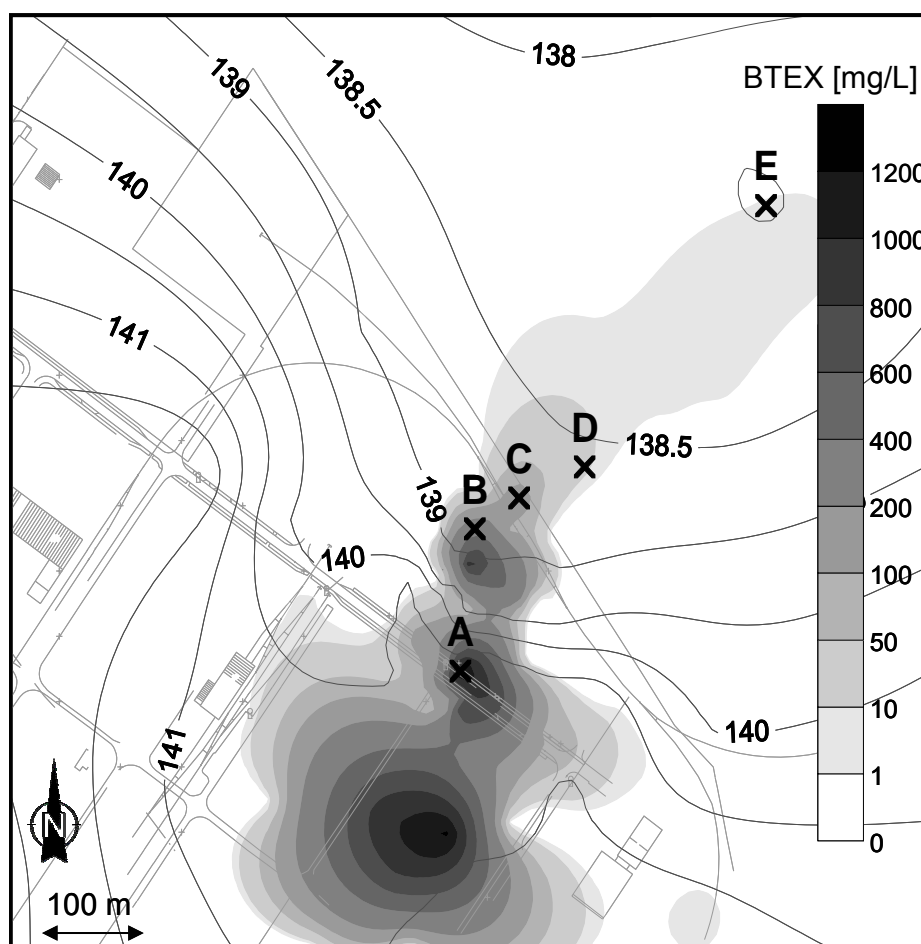


Figure 5.1: Map of the Zeitz field site showing the BTEX-plume within the upper aquifer with the sampling wells of the investigated aquifer transect and groundwater table contour lines.

5.3.2 Theoretical background

The carbon and hydrogen isotope ratios were expressed in the delta notation ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$) in per mil (‰) units according to equation 5.1.

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{sample}} \quad \text{or} \quad \delta^2\text{H}_{\text{sample}} \text{ [‰]} = \left(\frac{R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}}}{R_{\text{standard}}} \right) \cdot 1000 \quad (5.1)$$

In equation 5.1, R_{sample} and R_{standard} are the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ - or $^2\text{H}/^1\text{H}$ -ratios of the sample and an international standard, respectively. Vienna-PeeDee-Belemnite (V-PDB) was used as the standard for the analysis of carbon isotope signature and Vienna-Standard-Mean-Ocean Water (V-SMOW) was used as the standard for the detection of hydrogen isotope ratios (8). For the description of isotope fractionation of biochemical reactions the Rayleigh equation can be used (128):

$$\frac{R_t}{R_0} = \left(\frac{C_t}{C_0} \right)^{\frac{\epsilon}{1000}} \quad (5.2)$$

where R_t and R_0 are the stable isotope ratios of a compound at a given point in time and at the beginning of a transformation reaction, respectively. C_t and C_0 are the concentrations of a compound at the given point in time and at the beginning of the transformation reaction, respectively. The enrichment factor ϵ [‰] provides the link between the changes in stable isotope ratios (R_t/R_0) and the changes in the concentrations (C_t/C_0).

In several studies, the Rayleigh equation was used to quantify the biodegradation of pollutants in contaminated aquifers. It was assumed that the changes in the isotope ratios were mostly caused by microbial transformation processes. An appropriate enrichment factor and the changes in isotope signatures of the contaminant (R_x/R_0) may be used to calculate the microbial decrease in the pollutant concentration along a flow path between a contaminant source and a sampling well ($f_x = C_{B_x}/C_0$, C_{B_x} is the expected pollutant concentration at a sampling point resulting only from biodegradation). This calculation results in the quantification of the percentage of biodegradation (B [%]) by the well-known Rayleigh equation-streamline approach (67, 81, 116, 123, 126, 134, 158, 160, 198, 199, 216):

$$B[\%] = (1 - f_x) \cdot 100 = \left[1 - \left(\frac{R_x}{R_0} \right)^{\left(\frac{1000}{\epsilon} \right)} \right] \cdot 100. \quad (5.3)$$

In order to estimate the amount of biodegraded pollutant in the presence of a non-isotope-fractionating process leading to a decrease of contaminant concentration, three contrasting scenarios were considered. The derivation of the following equations is given in detail in the Supporting Information (see Appendix - G).

In the first scenario, it was assumed that along the streamline between contaminant source and sampling well biodegradation occurs first then stops, after which a non-isotope-fractionating process decreases pollutant concentration. Thus, the non-isotope fractionating process does not affect the percentage of biodegradation (B [%]) and therefore it can be calculated by changes in isotope ratios using an appropriate enrichment factor according to equation 5.3.

For the second scenario, it was assumed that along a streamline a non-isotope-fractionating process occurs first and only after its termination biodegradation takes place. Assuming that at the transition from the non-isotope-fractionating process to biodegradation the isotope ratio is equal to the isotope ratio of the contaminant source, the percentage of biodegradation (B [%]) can be quantified as follows:

$$B[\%] = \left(\frac{F_x}{\left(\frac{R_x}{R_0} \right)^{\left(\frac{1000}{\epsilon} \right)}} \cdot \left(1 - \left(\frac{R_x}{R_0} \right)^{\left(\frac{1000}{\epsilon} \right)} \right) \right) \cdot 100 \quad (5.4)$$

where F_x is the overall extent of concentration decrease along the streamline ($F_x = C_x/C_0$).

In the third scenario, it was assumed that biodegradation and a non-isotope-fractionating process occur simultaneously. A similar approach has been used to characterize denitrification in a chalk aquifer where in addition to denitrification a second hardly-isotope-fractionating nitrate sink existed (129). Furthermore, the biodegradation of MTBE has been calculated for such a scenario whereby evaporation as a non- or hardly-isotope-fractionating process causes a simultaneous MTBE reduction (85, 113). Assuming that biodegradation and a non-isotope-fractionating attenuation process follow first order kinetics, rates of both processes for pollutant concentration decrease (r_b and r_n , respectively) along a streamline

between contaminant source and sampling well are given by:

$$r_b = \mu \cdot C \quad (5.5)$$

and

$$r_n = \beta \cdot C \quad (5.6)$$

with C as concentration of a pollutant, μ and β as rate constants of biodegradation and the non-isotope-fractionating attenuation process, respectively. If biodegradation and the non-isotope-fractionating process are the only attenuation processes along a streamline from the source to a sampling well with the distance (x), and if a constant transport velocity (v) is assumed, the overall decrease in pollutant concentrations (F_x) can be calculated as follows:

$$F_x = \exp\left(-[\mu + \beta] \cdot \frac{x}{v}\right). \quad (5.7)$$

The carbon isotope ratio of a pollutant at a well (R_x) can be described by the following expression:

$$R_x = \frac{{}^{13}\text{C}_x}{{}^{12}\text{C}_x} = \frac{{}^{13}\text{C}_0}{{}^{12}\text{C}_0} \exp\left(-[\mu_{13} + \beta_{13}] \cdot \frac{x}{v} + [\mu_{12} + \beta_{12}] \cdot \frac{x}{v}\right) \quad (5.8)$$

where ${}^{13}\text{C}$ and ${}^{12}\text{C}$ are the concentrations of carbon isotopes with mass 13 and 12 for a pollutant, respectively. Furthermore, μ_{12} and β_{12} are the rate constants of biodegradation and a non-isotope-fractionating attenuation process for ${}^{12}\text{C}$. μ_{13} and β_{13} are the rate constants of biodegradation and the non-isotope-fractionating attenuation process for ${}^{13}\text{C}$. Since microbial enrichment factors can be determined by biodegradation rate constants ($\epsilon/1000 + 1 = \mu_{13}/\mu_{12}$) (128) and β_{13} is equal to β_{12} for a non-isotope-fractionating attenuation process, equation 5.8 can be rearranged to:

$$R_x = R_0 \cdot \exp\left(-\mu_{12} \cdot \left[\frac{\epsilon}{1000}\right] \cdot \frac{x}{v}\right) \approx R_0 \cdot \exp\left(-\mu \cdot \left[\frac{\epsilon}{1000}\right] \cdot \frac{x}{v}\right) = R_0 \cdot \left[\exp\left(-\mu \cdot \frac{x}{v}\right)\right]^{\frac{\epsilon}{1000}} \quad (5.9)$$

which leads to:

$$\frac{R_x}{R_0} = \left[\exp\left(-\mu \cdot \frac{x}{v}\right) \right]^{\frac{\varepsilon}{1000}}. \quad (5.10)$$

The percentage of biodegradation (B [%]) along a streamline between source and well is given by:

$$B[\%] = \frac{\mu}{\mu + \beta} \cdot (1 - F_x) \cdot 100. \quad (5.11)$$

By substituting $\mu + \beta$ (from the rearranged Eq. 5.7) and μ (from the rearranged Eq. 5.10) into equation 5.11, the percentage of biodegradation (B [%]) for a streamline can be calculated by:

$$B[\%] = \frac{\ln\left(\left(\frac{R_x}{R_0}\right)^{\frac{1000}{\varepsilon}}\right)}{\ln(F_x)} \cdot (1 - F_x) \cdot 100. \quad (5.12)$$

Assuming that the rate constants for biodegradation and a non-isotope-fractionating attenuation process follow a constant relation $k = \beta/\mu$, the influence of the non-isotope-fractionating attenuation process for the calculation of B [%] along a streamline between the source and a well can be described by transforming equation 5.11 to:

$$B[\%] = \frac{1}{1+k} \cdot \left(1 - \left(\left(\frac{R_x}{R_0} \right)^{\frac{1000}{\varepsilon}} \right)^{1+k} \right) \cdot 100. \quad (5.13)$$

5.4 Results and discussion

5.4.1 Hydrogeochemical conditions and isotope fractionation in the investigated aquifer

In order to describe the aquifer conditions under which biodegradation of BTEX occurred, the distribution of pollutants, electron acceptors, and mineralisation products were investigated for various multi-level sampling wells along the main groundwater flow direction (Fig. 5.2). The BTEX-concentration in the source area (sampling well A) was 1335 mg/l, which exceeded the highest previously known source concentration of BTEX (approximately 900 mg/l (67, 198)) significantly. Benzene was the main contaminant with up to 1310 mg/l. The water solubility of benzene at the temperature measured in the aquifer (12 - 13 °C) is approximately 1610 mg/l and thus does not differ highly from the source concentration of benzene, which indicates the existence of a pure pollutant phase. BTEX-concentrations decreased by up to 96 % along the transect. Pollutant concentrations were highest between 12 and 17 m below the ground surface and decreased towards upper and deeper zones. Hydrogen carbonate concentrations of up to 1100 mg/l were significantly higher within the transect compared to the groundwater upstream of the contaminant plume (350 - 650 mg/l) (67). The increase in hydrogen carbonate concentration is an indication for mineralisation processes at this site (67). The high methane concentrations (up to 4 mg/l) especially in the source area indicated that biodegradation can occur under methanogenic conditions. Along the transect, the highest sulphate concentrations (approximately 1500 mg/l) were detected near the groundwater table. Sulphate concentrations were lower than 200 mg/l in the highly contaminated zones, especially in and near the source area, indicating sulphate reduction as the dominant biodegradation process. Further downstream from the contaminant source, nitrate was detected in higher concentrations (up to 275 mg/l) near the groundwater table and decreased towards deeper zones of the aquifer and along the groundwater flow path. This decrease can be attributed to microbial nitrate reduction or denitrification. In several zones, dissolved iron could be determined at relatively high concentrations (up to 54 mg/l). At the near neutral pH of this site, dissolved iron should mainly occur in the reduced form (Fe(II)). Thus, the observed increase in iron concentration indicates biodegradation under iron-reducing conditions.

In principle, the biodegradation along the transect takes place under anoxic conditions. Similar results were obtained in previous studies for the upper aquifer of the Zeitz test site (47, 67, 78, 198).

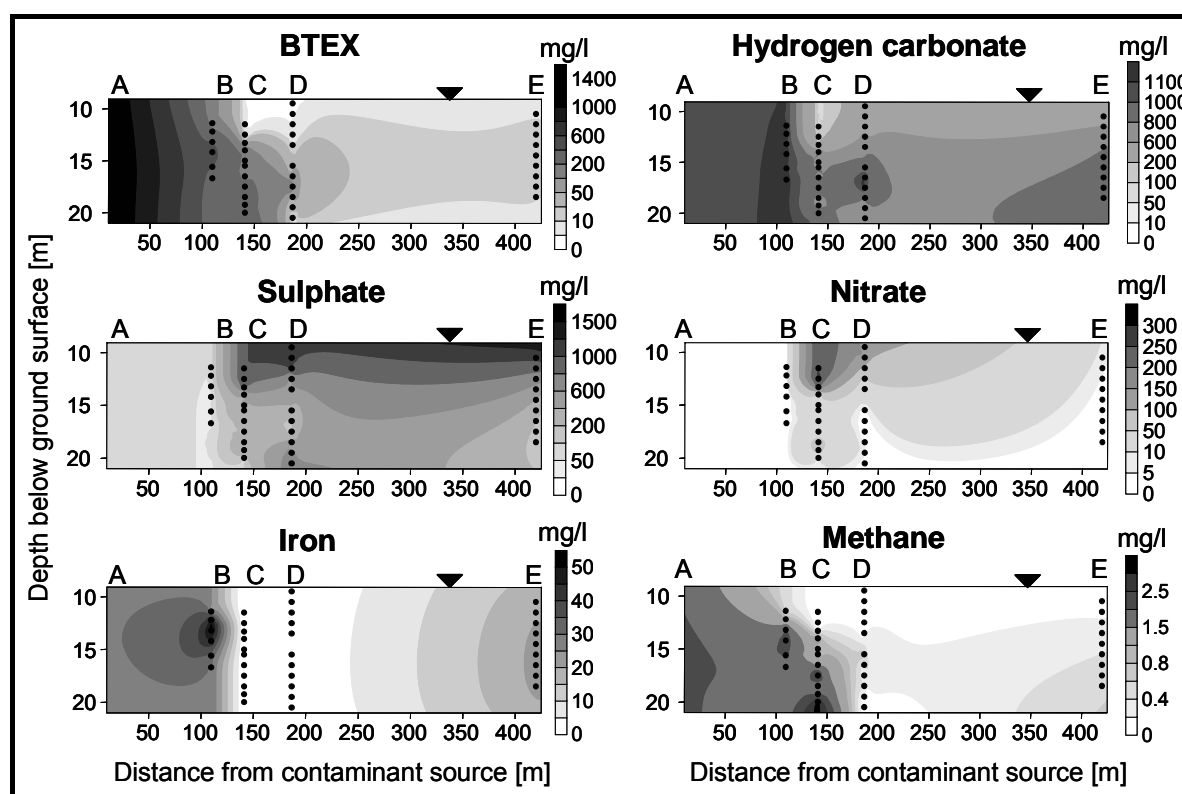


Figure 5.2: Distribution of concentrations of pollutants, electron acceptors, and mineralisation products within the investigated aquifer transect. The letters stand for the sampling wells and the black dots for the depths sampled for the analyses of the hydrogeochemical parameters. The black triangle indicates the depth of the groundwater table.

For the characterisation of the biodegradation, stable isotope fractionation analyses were carried out for samples from the investigated aquifer transect (Fig. 5.1 and 5.2). Since benzene accounted for up to 98 % of the BTEX-source concentration, the main investigations focused on the benzene plume.

The carbon and hydrogen isotope signatures of benzene in the source area (sampling well A) were $-28.8 \pm 0.5 \text{ ‰}$ and $-147 \pm 1 \text{ ‰}$, respectively. While benzene concentrations decreased by more than 60 %, no significant carbon and hydrogen isotope fractionation could be determined at a distance of approximately 110 m from the source area (sampling well B) (Fig. 5.3). Further downstream from the source area, a significant enrichment of ^{13}C and ^2H in the residual benzene fraction was detected within the upper part of sampling well C, where benzene concentrations were lower than 20 mg/l. At sampling wells D and E, carbon and hydrogen isotope fractionation was detected at all sampled depths. The increase in carbon and hydrogen isotope ratios correlated with a significant decrease in benzene concentrations, which can be attributed to biodegradation.

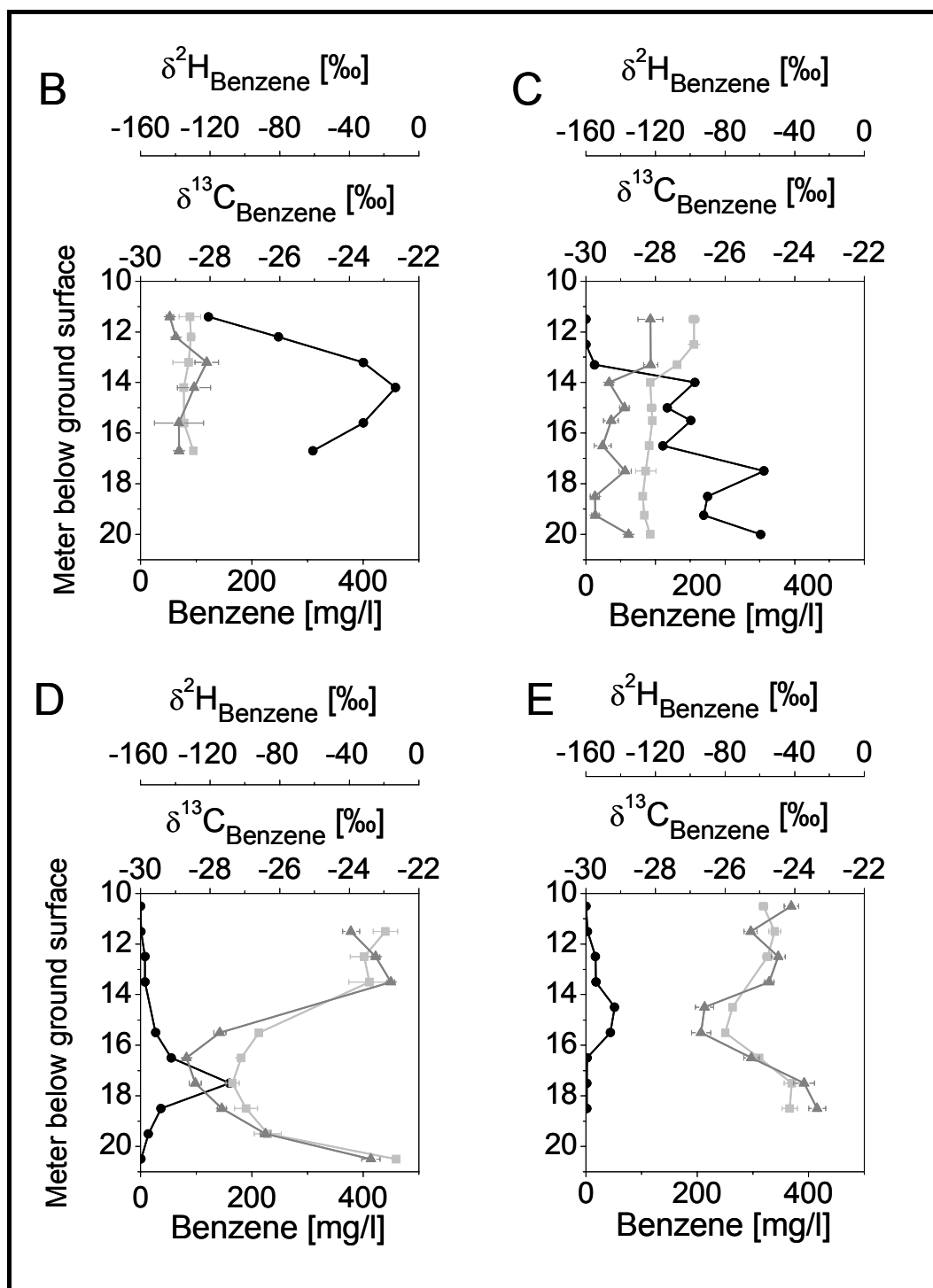


Figure 5.3: Benzene concentrations (black circle) and respective carbon (light-grey rectangle) and hydrogen (grey triangle) isotope ratios (given as delta notation) at the various sampling depths of wells B - E.

5.4.2 Determination of benzene biodegradation pathways by isotope signatures

In order to investigate under which conditions benzene biodegradation occurred, carbon and hydrogen enrichment factors from the literature (98, 127) were used to determine possible ranges of isotope signature patterns representing aerobic and anaerobic transformation, respectively. The carbon enrichment factors (ϵ_C) for aerobic and anaerobic benzene degradation range between -1.5 and -3.6 ‰ and show no significant trend for anoxic or oxic conditions. Hydrogen enrichment factors differ significantly for aerobic ($\epsilon_H = -11$ to -13 ‰) and anaerobic ($\epsilon_H = -29$ to -79 ‰) benzene degradation. It has been suggested that the initial step of the anaerobic benzene transformation involves a primary hydrogen isotope effect, which means that a C-H bond is broken (127). Although recent studies have pointed out that anaerobic degradation of benzene can be initiated by methylation, carboxylation or hydroxylation (28, 193), no detailed information about the reaction mechanism is known. The first attack during aerobic biodegradation of benzene by monooxygenases (73, 142, 187) or dioxygenases (23, 130) forms a benzene epoxide or *cis*-1,2-dihydroxycyclohexadiene as intermediate, where the oxygen addition to the benzene ring involves no C-H cleavage (72). Therefore, only small or no hydrogen isotope effects could be observed for aerobic benzene biodegradation (98, 153, 191, 211).

Carbon and hydrogen isotope ratios (R_x) were calculated by means of the Rayleigh equation (Eq. 5.2) using arbitrarily chosen changes in benzene concentrations (f_x), highest and lowest known enrichment factors (ϵ_C , ϵ_H) for aerobic and anaerobic benzene biodegradation, and measured carbon and hydrogen isotope ratios of the benzene source (R_0). The theoretical ranges of isotope signature patterns obtained for aerobic and anaerobic benzene degradation were plotted together with the isotope ratios detected for the sampling wells of the investigated transect (Fig. 5.4). Most of the measured data exhibited carbon and hydrogen isotope signatures which are indicative of anaerobic benzene biodegradation. This is supported by the hydrogeochemical conditions of the investigated aquifer transect and by recent studies (47, 67, 78, 198).

5.4.3 Quantification of benzene biodegradation

The detected carbon isotope ratios were used to quantify the biodegradation of benzene within the aquifer transect. Since sulphate reduction is the predominant electron-accepting process in the upper aquifer of the Zeitz test site (67, 78, 198), the enrichment factor derived from benzene biodegradation experiments under sulphate-reducing conditions ($\epsilon_C = -3.6$ ‰) (127) was chosen for the calculation. This is also the factor representing the highest carbon

isotope fractionation known from benzene biodegradation experiments, leading to a conservative assessment of biodegradation (133, 198).

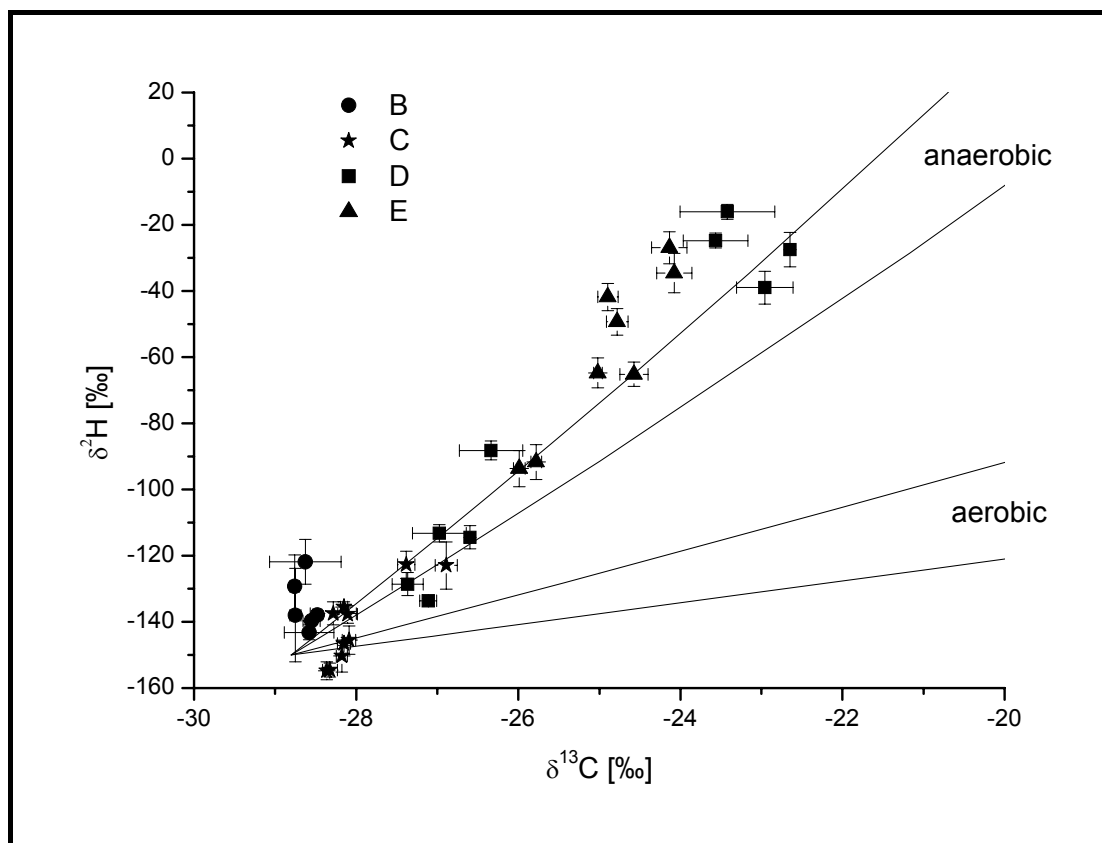


Figure 5.4: Concurrent carbon and hydrogen isotope ratios of benzene measured at the various sampling depths of wells B - E together with isotope patterns for aerobic and anaerobic benzene degradation calculated from published enrichment factors (98, 127) and the isotope signature of the contaminant source using the Rayleigh equation (Eq. 5.2).

Benzene biodegradation was quantified for three scenarios: 1) biodegradation occurring before a non-isotope-fractionating attenuation process takes place (Eq. 5.3), 2) a non-isotope-fractionating attenuation process occurring first, followed by biodegradation (Eq. 5.4), and 3) both processes taking place simultaneously (Eq. 5.12) along a groundwater flow path between contaminant source and the sampling wells. For the calculation, it was assumed that the enrichment factor did not change along this flow path.

At all sampling depths of well B, carbon isotope ratios were in the range of the variation of the source area ($\delta^{13}\text{C} = -28.8 \pm 0.5 \text{ ‰}$), therefore, no calculations were performed for this well. The relative benzene biodegradation B [%] for Scenario 1 ranged between 17 - 42 %, 34 - 83 %, and 55 - 74 % for sampling wells C, D and E, respectively (Tab. 5.1). By multiplying the percentage of biodegradation (B [%]) with the benzene concentration in the source area ($C_0 =$ approximately 1310 mg/l), the reduction in benzene concentration due to

biodegradation (Δ_B) can be calculated for the streamlines between the contaminant source and each sampling depth of the wells (Tab. 5.1). For Scenario 1, the highest decrease in benzene concentrations caused by biodegradation exceeds 1000 mg/l. To verify whether such high benzene concentrations could be biodegraded within the aquifer transect, an assessment of the biodegradation potential of electron-accepting processes was carried out. For the biodegradation of 1 mg/l benzene, 4.77 mg/l nitrate or 4.6 mg/l sulphate is needed and 21.5 mg/l reduced iron (Fe(II)) or 0.77 mg/l methane is formed, respectively (210). Using the highest concentrations of nitrate (275 mg/l), sulphate (1500 mg/l), iron (54 mg/l) and methane (4 mg/l) measured in the aquifer transect, a maximum benzene biodegradation potential of up to 400 mg/l can be expected from the electron-accepting processes. Since reduced iron can be precipitated in the presence of sulphide, the potential of electron-accepting processes for benzene biodegradation might be higher than estimated by the hydrogeochemical indicators. Nevertheless, it is not expected to be much higher because iron reduction does not play an important role for biodegradation in the investigated aquifer (47). However, the highest reduction of benzene concentrations due to biodegradation derived from Scenario 1 was more than 600 mg/l higher than could be expected from the potential of the electron-accepting processes. Thus, Scenario 1, representing the conventional Rayleigh equation-streamline approach (Eq. 5.3), probably leads to an overestimation of benzene biodegradation along the flow paths between contaminant source and the various depths of the sampling wells.

For Scenarios 2 and 3, the decrease in benzene concentrations due to biodegradation (Δ_B) calculated for the streamlines between the contaminant source and the various sampling depths of the wells was lower than 83 and 405 mg/l, respectively (Tab. 5.1). Thus, both scenarios provided assessments for benzene biodegradation which are consistent with the potential of electron-accepting processes (up to 400 mg/l). However, the benzene biodegradation derived from Scenario 2 was only approximately one-fifth of the capacity of the electron-accepting processes, which indicates an underestimation of benzene biodegradation by Scenario 2.

Scenarios 1 and 2 represent opposite extremes for the effect of a non-isotope-fractionating attenuation process on the quantification of biodegradation based on stable isotope analysis. Thus, differences between results for these scenarios indicate the range of uncertainty caused by the occurrence of a non-isotope-fractionating attenuation process at a given site. If biodegradation is the predominant attenuation process, then the biodegradation calculated for Scenarios 1 and 2 should be nearly the same. Since the benzene biodegradation calculated for these two scenarios differed highly (Tab. 5.1), it can be assumed that another attenuation process influenced the decrease of benzene concentrations.

Table 5.1: Percentage of benzene biodegradation (B [%]) and decrease in benzene concentration due to biodegradation (Δ_B) for the various depths of the sampling wells C - E calculated for three scenarios. For Scenario 1 it was assumed that biodegradation occurs before a non-isotope-fractionating process (Eq. 5.3), for Scenario 2 that a non-isotope-fractionating process takes place before biodegradation (Eq. 5.4) and for Scenario 3 that both processes proceed simultaneously (Eq. 5.12). n.d. - not determined, because the carbon isotope ratio was in the range of variation of the contaminant source.

Well	Depth below ground surface [m]	Scenario 1 (Eq. 5.3)		Scenario 2 (Eq. 5.4)		Scenario 3 (Eq. 5.12)	
		B [%]	Δ_B [mg/l]	B [%]	Δ_B [mg/l]	B [%]	Δ_B [mg/l]
C	11.50	42	555	<1	<1	6	77
	12.50	42	555	<1	<1	6	73
	13.30	34	441	1	8	9	120
	14.00	17	227	3	41	9	112
	15.00	18	240	2	33	8	107
	15.50	19	246	3	44	9	120
	16.50	17	218	2	28	7	95
	17.50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	18.50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	19.25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
D	20.00	17	227	5	66	10	133
	11.50	81	1063	<1	4	23	305
	12.50	78	1017	2	28	29	382
	13.50	79	1029	2	29	30	393
	15.50	47	615	2	24	16	209
	16.50	39	506	3	35	15	193
	17.50	34	446	6	83	17	228
	18.50	41	537	2	26	14	188
	19.50	51	664	1	14	15	202
	20.50	83	1084	<1	5	24	321
E	10.50	67	883	2	22	23	302
	11.50	70	920	2	27	25	332
	12.50	68	896	2	27	25	321
	14.50	58	760	2	20	19	249
	15.50	55	726	1	19	18	236
	16.50	66	867	2	32	24	321
	17.50	74	971	4	50	31	405
	18.50	74	965	4	52	31	405

At the Zeitz field site, it is unlikely, due to the low carbon content (<0.1 %), that irreversible sorption leads to a significant decrease in pollutant concentrations (64, 77). Since benzene could only be detected in minor concentrations (<1 mg/l) approximately one meter below the groundwater table along the aquifer transect, it can be assumed that only a very small proportion of the benzene might be affected by volatilisation. Thus, volatilisation can be neglected as an attenuation process causing a significant decrease of benzene concentrations. Since irreversible sorption and volatilization obviously only led to a minor reduction in benzene concentration, dilution with pristine water is apparently a significant attenuation process at the field site. The dilution of pollutants with water has no significant effect on the isotopic composition (46, 172), but leads to a reduction of pollutant concentration. The differences for benzene biodegradation calculated by Scenario 1 and 2 were always higher for depths within the fringe of the benzene plume compared to depths within the centreline (Tab. 5.1). For contaminant plumes, it is to be expected that dilution with pristine water is higher within marginal zones than within the centreline. Thus, the differences of benzene biodegradation for Scenario 1 and 2 would be consistent with the higher influence of dilution within the fringe of the benzene plume compared to the centreline. To include such dilution effects into the quantification of biodegradation, the temporal evolution of both processes along a streamline needs to be known. Since in most cases this is commonly not known, no reliable assessment of pollutant biodegradation can be provided when results derived on the basis of Scenarios 1 and 2 differ significantly. In general, the strictly sequential order assumed for Scenario 1 and 2 is unlikely to be appropriate for the Zeitz site or most other aquifers, which is also indicated by these scenarios highly over- or underestimating the biodegradation potential of the electron-accepting processes. In contrast, Scenario 3 relies on a more realistic assumption of biodegradation and dilution occurring simultaneously, which is supported by the amount of biodegradation predicted by Scenario 3 matching the degradation capacity of the electron-accepting processes. If the quantification of pollutant biodegradation gives similar results for Scenarios 1 and 2, then it can be reasoned that biodegradation is the predominant attenuation process along a streamline and a reliable assessment is obtainable, whereby the calculation according to Scenario 2 gives the most conservative results. However, for the Zeitz site, benzene biodegradation calculated on the basis of Scenarios 1 and 2 differs significantly (Tab. 5.1), and therefore no reliable assessment for benzene biodegradation can be obtained for the streamlines of the aquifer transect without knowledge about the influence of dilution on the decrease in benzene concentration.

In order to illustrate the influence of a non-isotope-fractionating attenuation process for the accuracy of quantification of pollutant biodegradation via the conventional Rayleigh equation-

streamline approach (Eq. 5.3), Scenario 3 was expanded (Eq. 5.13). The relation between the two processes was expressed by $k = \beta/\mu$ being the ratio of the first-order rate constants of a non-isotope-fractionating attenuation process (β) and biodegradation (μ), respectively (Fig. 5.5). If $k = 1$, the non-isotope-fractionating attenuation process and biodegradation influence the decrease in pollutant concentration in equal proportions along a streamline between contaminant source and sampling point. If $k = 0$, the non-isotope-fractionating attenuation process has no effect on the reduction of pollutant concentration and biodegradation calculated by the conventional Rayleigh equation-streamline approach gives correct results. With increasing k , i.e. with increasing influence of the non-isotope-fractionating attenuation process, the conventional Rayleigh equation-based approach leads to an overestimation of pollutant biodegradation along a streamline (Fig. 5.5). An overestimation of pollutant biodegradation using conventional Rayleigh equation-streamline approach (Eq. 5.3) would also be expected when volatilisation causes a reduction of pollutant concentration (85, 113). The same effect can be expected for irreversible sorption. Dilution leads to displacement of pollutants out of a streamline but, in contrast to volatilisation and irreversible sorption, does not remove contaminants out of the groundwater. Hence, although the portion of the pollutants leaving the streamline can be biodegraded after the transfer into another groundwater segment, the biodegradation of this portion is not ascertainable by the Rayleigh equation-streamline approach. In a homogeneous aquifer, where biogeochemical conditions are similar everywhere, a reliable extent of biodegradation can be obtained from the conventional Rayleigh equation-based approach for a streamline as its vicinity may be exhibited similar biodegradation rates. In many cases, however, aquifers are heterogeneous systems with strongly changing biogeochemical conditions. Therefore, it is difficult to predict the extent of biodegradation for the portion of pollutant leaving a streamline. In order to improve the assessment of pollutant biodegradation based on the Rayleigh equation-streamline approach, the determination of changes in isotope signatures for cross-sections along the pollutant plume is necessary. The obtained isotope data can be used to calculate pollutant biodegradation for a number of streamlines. Using these results, biodegradation for these cross-sections can be assessed using an appropriate conceptual model. Thus, further studies need to focus on two- or three-dimensional investigations to determine the influence of non-isotope-fractionating pollutant processes on the calculation of biodegradation using stable isotope fractionation analysis.

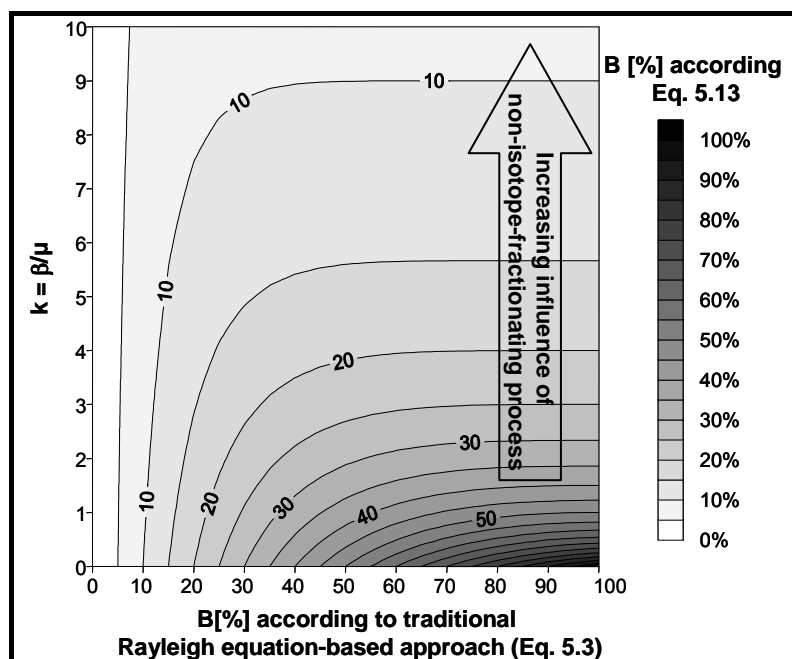


Figure 5.5: Influence of a non-isotope-fractionating attenuation process on the quantification of the percentage of biodegradation (B [%]) via the Rayleigh equation-streamline approach. k is the ratio between the rate constants of the non-isotope-fractionating attenuation process (β) and biodegradation (μ) ($k = \beta/\mu$). High values for k indicate a high influence of the non-isotope-fractionating attenuation process.

5.5 Implication for the application of stable isotope fractionation analysis at field sites

In many cases, there is insufficient information about biogeochemical conditions in a contaminated aquifer. As shown in this study, the combined analysis of carbon and hydrogen isotope fractionation can be used to determine whether the benzene biodegradation occurred under anoxic or oxic conditions. This concept has been applied previously to investigate under which biogeochemical conditions MTBE was biodegraded (116, 216). However, analysis of carbon and hydrogen isotope fractionation may not only be used to distinguish between anaerobic or aerobic biodegradation but also for the identification of predominant biodegradation pathways taking place within an aquifer. The basic requirement is that the isotope fractionation for at least carbon or hydrogen differs significantly for the various degradation pathways.

Stable isotope fractionation analysis can not only be used for the characterization of degradation conditions or pathways but also to quantify biodegradation in a contaminated aquifer. It was shown that the percentage quantification of contaminant biodegradation using the Rayleigh equation-based approach is quite robust with respect to aquifer heterogeneities along a flow path, including effects due to longitudinal dispersion, variable degrees of biodegradation, plume geometries and travel times (1). However, the conventional Rayleigh

equation-streamline approach (Eq. 5.3) can lead to an overestimation of biodegradation if dilution, volatilization or irreversible sorption affects pollutant concentration along a streamline between contaminant source and sampling well. To verify the influence of non-isotope-fractionating abiotic processes on the decrease in pollutant concentration, biodegradation can be calculated on the basis of the assumption that the biodegradation occurs before a non-isotope-fractionating abiotic process (Scenario 1). This scenario can be described by the conventional Rayleigh equation-streamline approach (Eq. 5.3). Alternatively, biodegradation can be quantified assuming that a non-isotope-fractionating abiotic process occurs before biodegradation (Scenario 2, Eq. 5.4). If the results of both scenarios are similar, then biodegradation can be regarded as the predominant attenuation process. If the results of both scenarios differ significantly, then without knowledge about the influence of non-isotope-fractionating abiotic processes the Rayleigh equation-streamline approach can lead either to a significant overestimation or underestimation of biodegradation depending on the scenario assumed.

In several contaminated aquifers, measured concentrations (C_x) of toluene and xylenes were quite similar to concentrations predicted by the Rayleigh equation-streamline approach (CB_x), indicating that biodegradation was the predominant attenuation process for these compounds (81, 134, 158, 198). In other studies, it was shown that biodegradation of toluene and xylenes calculated by the Rayleigh equation-streamline approach were similar to the results of independent methods (64, 146). In contrast to these findings, measured benzene and MTBE concentrations (C_x) differed significantly from the concentrations predicted by the Rayleigh equation-streamline approach (CB_x) (81, 216), which may imply that non-isotope-fractionating processes such as dilution lead to a strong decrease in pollutant concentrations. Toluene and xylenes are known to be more easily biodegradable than benzene and MTBE under anoxic conditions (27, 181, 210). In general, the assessment of biodegradation by the Rayleigh equation-streamline approach should lead to more reliable results for highly biodegradable pollutants, which tend to form smaller contaminant plumes with a lower influence of dilution than persistent pollutants.

5.6 Acknowledgments

This work was supported by the German Federal Ministry of Education and Research (Grant 02WT0041) and by the UFZ (SAFIRA-Project). We thank Ralf Trabitze and Prof. Dr. Holger Weiß for their help in the field site management. We acknowledge Werner Kletzander, Steffi Herrmann, Petra Bombach, Dr. Hansjörg Weiß and Ursula Günther for their help during the field and analytical work, and Prof. Dr. Frank-Dieter Kopinke for his helpful discussion.

6 SCHLUSSFOLGERUNGEN ZUR VERWENDUNG STABILER ISOTOPEN BEI DER UNTERSUCHUNG DES MIKROBIELLEN SCHADSTOFFABBAUS

Für die Charakterisierung eines kontaminierten Grundwasserleiters ist es wichtig, die Prozesse, die zum Rückgang der Schadstoffkonzentrationen führen, zu identifizieren und gegebenenfalls zu quantifizieren. Der mikrobielle Abbau bewirkt eine nachhaltige Verminderung von Kontaminanten, während es bei abiotischen Prozessen wie Sorption, Verflüchtigung, Verdünnung und Dispersion lediglich zu einer Verlagerung in die Bodenluft oder an die Aquifermatrix bzw. einer Verteilung innerhalb der wässrigen Phase kommt. Somit ist es erforderlich, geeignete Methoden zum Nachweis und zur Quantifizierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus für die Charakterisierung eines kontaminierten Grundwasserleiters anzuwenden bzw. zu entwickeln.

6.1 Beurteilung der substratspezifischen Isotopenfraktionierung zur Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus

Eine Methode zum Nachweis und zur Bestimmung des mikrobiellen Schadstoffabbaus, die in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen hat, ist die Untersuchung der substratspezifischen Isotopenfraktionierung. Da abiotische NA-Prozesse normalerweise kaum Isotopeneffekte bei im Grundwasser gelösten Schadstoffen verursachen, ist die Veränderung der Isotopensignatur einer Kontaminante hauptsächlich auf den mikrobiellen Schadstoffabbau zurückzuführen. Dadurch ermöglicht die Analyse der substratspezifischen Isotopenfraktionierung den Nachweis der Biodegradation von Schadstoffen in Grundwasserleitern.

Weiterhin kann mit Hilfe der substratspezifischen Isotopenfraktionierung der mikrobielle *in situ*-Schadstoffabbau auf Grundlage der Rayleigh-Gleichung berechnet werden. Da die Anreicherungsfaktoren (ϵ [‰]) für die jeweiligen Abbauege einer Kontaminante untereinander stark variieren können, ist die Wahl eines geeigneten Anreicherungsfaktors für eine verlässliche Quantifizierung der Biodegradation erforderlich. Für die Berechnung des mikrobiellen Schadstoffabbaus wird hauptsächlich die Kohlenstoffisotopenfraktionierung verwendet, weil im Gegensatz zur Wasserstoffisotopenfraktionierung die Anreicherungsfaktoren für einen bestimmten Abbauege meist geringer schwanken, die Kohlenstoffisotopenanalyse etablierter ist und eine geringere Messungenauigkeit aufweist.

Der Abbauweg von Kontaminanten ist abhängig von den Milieubedingungen in einem Aquifer. Für den anaeroben Toluolabbau ist damit zu rechnen, dass dieser nur über den Benzylsuccinatabbauweg erfolgt. Dementsprechend wurden für den anaeroben Toluolabbau unter verschiedenen Redoxbedingungen konsistente Kohlenstoffanreicherungsfaktoren bestimmt (135, 138). Auf Grund dieser Anreicherungsfaktoren scheint eine verlässliche Abschätzung der Biodegradation von Toluol im anoxischen Bereich von Schadstoffzonen möglich zu sein. Der aerobe Toluolabbau kann durch eine Methyl-, Ringmonooxygenase oder Dioxygenase eingeleitet werden. Für diese Abbauwege wurden deutlich unterschiedliche Kohlenstoffanreicherungsfaktoren ermittelt (135, 139). Somit kann ohne die Kenntnis des dominierenden Abbauwegs die mikrobielle Toluolumsetzung in oxischen Zonen eines Grundwasserleiters nur unzureichend bestimmt werden. Anhand des Beispiels des Toluolabbaus wird deutlich, dass es wichtig ist, die Milieubedingungen für die Berechnung des Schadstoffabbaus auf Grundlage der Rayleigh-Gleichung zu kennen.

Die vorherrschenden Milieubedingungen können durch die Untersuchung der Konzentrationen von Elektronenakzeptoren und deren Redoxäquivalenten bzw. spezifischen Metaboliten charakterisiert werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, kann durch die simultane Bestimmung der Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopensignaturen eines Schadstoffes auf den dominierenden Abbauweg in einem Aquifer geschlossen werden. Voraussetzung dafür ist, dass sich die Kohlenstoff- oder Wasserstoffanreicherungsfaktoren für verschiedene Abbauwege signifikant unterscheiden ((66) siehe Kap. 5). Mit Hilfe der simultanen Bestimmung der Kohlenstoff- und Wasserstoffisotopensignaturen wurde eine Charakterisierung des mikrobiellen Benzol- und MTBE-Abbaus in Grundwasserleitern durchgeführt (66, 116, 216).

Fraglich blieb bisher, ob Anreicherungsfaktoren aus Laborabbauversuchen für die Quantifizierung des mikrobiellen *in situ*-Schadstoffabbaus geeignet sind. Die Abschätzung der *in situ*-Biodegradation von Xylol auf Grundlage der Rayleigh-Gleichung ergab fast identische Ergebnisse im Vergleich zu unabhängigen Berechnungsmethoden (146). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Multitracer-Experiment durchgeführt, was es ermöglichte, die Bestimmung des mikrobiellen Abbaus von verschiedenen deuterierten Toluolisotopologen anhand der Rayleigh-Gleichung durch unabhängige Quantifizierungsansätze zu verifizieren ((64) siehe Kap. 4). Die Ergebnisse aus den verschiedenen Berechnungsmethoden waren sehr ähnlich. Beide Studien zeigen, dass die verwendeten Anreicherungsfaktoren repräsentativ für den dominierenden Abbauweg in den untersuchten Grundwasserleitern waren.

Die Wahl eines geeigneten Anreicherungsfaktors ist schwierig, wenn nicht bekannt ist, welcher Abbauweg in einem Aquiferbereich vorherrschend ist. Zum Beispiel ist der initiale

Schritt des anaeroben Benzolabbaus weitestgehend unbekannt. Kürzlich veröffentlichte Studien zeigen, dass eine Methylierung, Carboxylierung bzw. Hydroxylierung des Benzolrings möglich sein kann (28, 193). Verschiedene Abbauewege sind eventuell der Grund für stark variierende Kohlenstoffanreicherungsfaktoren, welche für verschiedene anoxische Redoxbedingungen ermittelt wurden (127). Grundsätzlich sollte bei fehlenden Kenntnissen des Abbauewegs bzw. der Milieubedingungen, welche einen Rückschluss auf den Abbaueweg zulassen, derjenige Anreicherungsfaktor verwendet werden, der repräsentativ für die höchste Isotopenfraktionierung ist. Somit kann eine Überschätzung des mikrobiellen *in situ*-Schadstoffabbaus weitestgehend ausgeschlossen werden (133, 198).

Neben der Wahl eines geeigneten Anreicherungsfaktors ist es wichtig, ob abiotische NA-Prozesse einen Einfluss auf die Berechnung der Biodegradation von Schadstoffen anhand der Rayleigh-Gleichung haben. Es ist davon auszugehen, dass in Grundwasserleitern abiotische NA-Prozesse meist keinen signifikanten Isotopeneffekt bei Schadstoffen verursachen, aber einen deutlichen Konzentrationsrückgang bewirken können. Der Einfluss der Konzentrationsminderung durch Verdünnung als ein nicht-isotopenfraktionierender NA-Prozess wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht ((66) siehe Kap. 5). Allgemein konnte abgeleitet werden, dass der mikrobielle Schadstoffabbau auf Grundlage der Rayleigh-Gleichung nur ungenau bestimmt werden kann, wenn der Konzentrationsrückgang eines Schadstoffes über einen Fließweg zwischen Schadstoffquelle und einer Messstelle maßgeblich durch einen abiotischen, nicht-isotopenfraktionierenden NA-Prozess beeinflusst wird. So wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass unter Verwendung des konventionellen Rayleigh-Modells der mikrobielle Abbau eines Schadstoffs, dessen Konzentration durch Verdünnung reduziert wird, deutlich überschätzt werden kann ((66) siehe Kap. 5). Auch die Verflüchtigung von Schadstoffen verursacht eine Überschätzung der Biodegradation anhand des konventionellen Rayleigh-Modells (85, 113). Gleiches ist zu erwarten, wenn irreversible Sorption entlang eines Fließweges zu einer Konzentrationsminderung führt. Im Gegensatz zur Verflüchtigung und irreversiblen Sorption bewirkt die Verdünnung keinen Austrag von Schadstoff aus dem Grundwasser. Es wird lediglich Schadstoff aus dem betrachteten Fließweg in andere Grundwassersegmente verlagert. Somit ist der Anteil, der durch Verdünnung den betrachteten Fließweg verlässt, über das Rayleigh-Modell nicht direkt erfassbar. Unter der Annahme eines homogenen Aquifers, in dem überall die gleichen biogeochemischen Bedingungen vorherrschen, sollte der mikrobielle Schadstoffabbau entlang des betrachteten Fließweges gleich dem der angrenzenden Grundwasserleitersegmente sein. In diesem Fall würde die berechnete Biodegradation auf Grundlage des konventionellen Rayleigh-Modells dem Abbau im Segment, welches der Schadstoff auf Grund der Verdünnung eingenommen hat, entsprechen. Meistens sind Aquifere jedoch

heterogene Systeme, in denen Bereiche mit hohem und niedrigem Schadstoffabbau innerhalb weniger Zentimeter oder gar Millimeter auftreten können. Somit wird eine Abschätzung für die Biodegradation eines Schadstoffes, der den betrachteten Fließweg verlässt, schwierig. Hierbei könnten 2- bzw. 3-dimensionale Modellierungsansätze helfen, die Unsicherheiten durch den Einfluss von Verdünnung bei der Abschätzung des mikrobiellen Schadstoffabbaus anhand der Rayleigh-Gleichung zu verringern.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, bietet die Rayleigh-Gleichung die Möglichkeit, zu prüfen, ob abiotische NA-Prozesse wesentlich den Schadstoffrückgang entlang eines Fließweges beeinflussen ((66) siehe Kap. 5). Dafür wurden zwei Szenarien verwendet, bei denen angenommen wurde, dass über einen Fließweg zwischen Schadstoffquelle und Messstelle 1) die Biodegradation zuerst stattfindet, dann endet und anschließend ein abiotischer NA-Prozess zum Schadstoffrückgang führt bzw. 2) erst der abiotische Prozess wirksam ist und dann die Biodegradation. Wenn die Ergebnisse der Bestimmung des mikrobiellen Schadstoffabbaus für beide Szenarien stark von einander abweichen, wird der Konzentrationsrückgang des Schadstoffes durch abiotische NA-Prozesse beeinflusst. Grundsätzlich führt Szenario 2 zu einer konservativen Abschätzung der Biodegradation von Schadstoffen.

Anhand der Rayleigh-Gleichung konnte der Konzentrationsrückgang für leicht abbaubare BTEX-Verbindungen wie Toluol oder Xylol gut reproduziert werden (81, 134, 158, 198). Für diese Schadstoffe wurde auch gezeigt, dass die Biodegradation, welche auf Grundlage der Rayleigh-Gleichung berechnet wurde, gut mit den Ergebnissen unabhängiger Methoden übereinstimmte (146) bzw. ((64) siehe Kap. 4). Im Gegensatz dazu konnte der Konzentrationsrückgang der schwer abbaubaren Schadstoffe Benzol und MTBE mit Hilfe der Rayleigh-Gleichung nicht nachgestellt werden (81, 216). Es ist anzunehmen, dass im Vergleich zu schwer abbaubaren Kontaminanten leicht abbaubare Schadstoffe kürzere Schadstofffahnen ausbilden und somit in der Regel weniger durch abiotische NA-Prozesse beeinflusst sein sollten. Allgemein scheint die Rayleigh-Gleichung eine geeignete Grundlage für die Bestimmung der Biodegradation für leicht abbaubare Kontaminanten zu sein. Der Konzentrationsrückgang in einer langen Schadstofffahne resultiert meist aus abiotischen NA-Prozessen, was eine Quantifizierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus anhand der Rayleigh-Gleichung schwierig macht.

6.2 Beurteilung des Isotopenverhältnisses von Mineralisierungsprodukten und Elektronenakzeptoren zur Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bestimmung der Isotopensignaturen von Mineralisierungsprodukten und Elektronenakzeptoren geeignet ist, um den mikrobiellen Schadstoffabbau in einem Grundwasserleiter zu charakterisieren ((67, 186) siehe Kap. 2, 3). Bei der Umsetzung von Schadstoffen entsteht meist DIC, was eine signifikant leichtere Isotopensignatur als das natürlich vorhandene DIC hat ((67, 186) siehe Kap. 2, 3). Ist davon auszugehen, dass isotopisch leichtes DIC nicht signifikant aus der mikrobiellen Umsetzung natürlicher Kohlenstoffquellen (z.B. Pflanzenresten) resultiert, kann die Schadstoffmineralisierung anhand einer DIC-Isotopenbilanz bestimmt werden. Mit dieser Methode kann jedoch keine Aussage über den Abbau einzelner Schadstoffe gemacht werden. Für die Berechnungen der Schadstoffmineralisierung in einem Aquifer muss die Isotopenfraktionierung zwischen dem Substrat, was im Falle einer Grundwasserkontamination hauptsächlich die Schadstofffraktion ist, und dem gebildeten DIC bekannt sein. Gegenwärtig gibt es nur für den aeroben Benzolabbau Kenntnisse über die Substrat-DIC-Isotopenfraktionierung (98). Um die Methode zu verbessern, sind in Zukunft weitere Referenzversuche besonders für die Charakterisierung der Substrat-DIC-Isotopenfraktionierung für den anaeroben Schadstoffabbau notwendig (102). Die Abschätzung der Schadstoffmineralisierung anhand einer DIC-Isotopenbilanz bietet sich an, wenn für einen Schadstoff keine substratspezifische Isotopenfraktionierung nachgewiesen werden kann. Dies tritt oftmals in stark kontaminierten Aquiferbereichen auf, wo der Schadstoffumsatz zu gering ist, um eine signifikante Isotopenfraktionierung hervorzurufen. Eine Veränderung der Isotopensignatur ist auch nicht für den Abbau von Schadstoffen mit einer Anzahl von mehr als 10 Kohlenstoffatomen bzw. bei verschiedenen Abbauebenen, wie z.B. dem Umsatz von Toluol oder Monochlorbenzol durch Dioxygenasen, zu erwarten (106, 131, 139, 192).

Anhand des Isotopenverhältnisses von Elektronenakzeptoren kann abgeleitet werden, in welchen Bereichen der Schadstofffahne ein bestimmter Redoxprozess stattfindet. So konnte in dieser Arbeit mit Hilfe der Schwefelisotopensignatur des Sulfats für den Standort Zeitz Zonen bestimmt werden, die durch sulfatreduzierende Bedingungen geprägt sind. Eine Quantifizierung der Sulfatreduktion auf Grundlage der Rayleigh-Gleichung war nicht möglich, weil die Anreicherungs-faktoren für diesen Redoxprozess sehr variabel waren (25, 111).

Die Bestimmung der Isotopensignatur des Methans ermöglicht die Charakterisierung von Methanbildungs- bzw. -abbauprozessen. Für den Standort Zeitz wurde im Rahmen dieser

Arbeit gezeigt, dass die Acetatgärung der wesentliche Methanbildungsprozess im zentralen Bereich der Kontamination war. Weiterhin konnte ein mikrobieller Abbau von Methan in Randzonen der Schadstofffahne nachgewiesen werden. Somit scheint in diesen Bereichen der Elektronenakzeptorverbrauch durch schadstoffabbauende in Konkurrenz zu methanotrophe Mikroorganismen zu stehen.

6.3 Beurteilung des Einsatzes von BACTRAPs zur Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus

Wie in dieser Arbeit beschrieben wurde, kann durch die Exposition von Mikrokosmen, welche mit isotopisch markierten Testsubstraten dotiert sind (BACTRAPs), der *in situ*-Schadstoffabbau ohne besondere Vorkenntnisse der biogeochemischen Milieubedingungen und Hydrogeologie in einem kontaminierten Grundwasserleiter charakterisiert werden ((186) siehe Kap. 3). Dabei ergibt sich durch die Bestimmung der Inkorporation von ^{13}C oder ^{15}N in Biomarkern, wie Fettsäuren oder Aminosäuren, ein sensitiver Nachweis der Biodegradation eines Testsubstrats. Der Einsatz von BACTRAPs bietet sich an, wenn durch die Analyse der Isotopenfraktionierung kein mikrobieller Schadstoffabbau erfassbar ist. Die ^{13}C -Anreicherung von spezifischen Fettsäuren kann genutzt werden, um Mikroorganismengruppen, die am Schadstoffabbau beteiligt sind, zu charakterisieren (2). Das BACTRAP-Konzept ermöglicht auf Grundlage des "Stable Isotope Probing" (SIP) die Identifizierung von Mikroorganismen, die am Umsatz von Kontaminanten beteiligt sind (29, 105). Durch die Extraktion von ^{13}C -markierten Metaboliten von BACTRAPs können Schadstoffabbauwege bestimmt werden (185). Das BACTRAP-Konzept kann nur angewendet werden, wenn Mikroorganismen das Testsubstrat als Kohlenstoffquelle nutzen. Deshalb ist der mikrobielle Abbau von halogenierten Schadstoffen, welche durch den Prozess der reduktiven Dehalogenierung umgesetzt werden und somit nicht zum Aufbau von Biomasse beitragen, nicht möglich. Bisher konnte auf Grundlage des BACTRAP-Systems keine Quantifizierung des Schadstoffabbaus durchgeführt werden. Zukünftige Untersuchungen sind notwendig, um eine Berechnung der Biodegradation anhand des BACTRAP-Systems zu ermöglichen.

6.4 Ausblick

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch die Veränderung des natürlichen Verhältnisses stabiler Isotope und durch den Einsatz von isotopisch markierten Tracern der mikrobielle Schadstoffabbau in kontaminierten Grundwasserleitern charakterisiert werden kann. Somit bieten Anwendungen auf Grundlage von stabilen Isotopen reichhaltige Möglichkeiten für die zuverlässige Beurteilung der Biodegradation von Schadstoffen. Durch den kombinierten Einsatz einzelner Methoden können wichtige Erkenntnisse über den mikrobiellen *in situ*-Schadstoffabbau gewonnen werden, die für die Planung von MNA-Vorhaben bzw. zur Beurteilung von Sanierungsmassnahmen, basierend auf der Stimulierung von Mikroorganismen, notwendig sind. Um jedoch eine optimale Vernetzung der verschiedenen Verfahren für eine verbesserte Charakterisierung des *in situ*-Schadstoffabbaus zu gewährleisten, sind weitere Untersuchungen erforderlich. Ebenfalls sollten Erkenntnisse zur *in situ*-Biodegradation von Schadstoffen, die durch Methoden auf Grundlage von stabilen Isotopen erhoben wurden, bei der Implementierung eines Standortmodells berücksichtigt werden. Dafür ist es zukünftig sinnvoll, geeignete Schnittstellen zwischen Modellierungsansätzen und einzelnen Isotopenmethoden zu finden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Abe, Y., D. Hunkeler.** 2006. Does the Rayleigh equation apply to evaluate field isotope data in contaminant hydrogeology? *Environ. Sci. Technol.* **40**:1588-1596.
2. **Abraham, W. R., C. Hesse, O. Pelz.** 1998. Ratios of carbon isotopes in microbial lipids as an indicator of substrate usage. *Appl. Environ. Microb.* **64**:4202-4209.
3. **Alexandrino, M., C. Knief, A. Lipski.** 2001. Stable-isotope-based labeling of styrene-degrading microorganisms in biofilters. *Appl. Environ. Microb.* **67**:4796-4804.
4. **Alumbaugh, R. E., L. M. Gieg, J. A. Field.** 2004. Determination of alkylbenzene metabolites in groundwater by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1042**:89-97.
5. **Alvarez, P. J. J., P. J. Anid, T. M. Vogel.** 1991. Kinetics of aerobic biodegradation of benzene and toluene in sandy aquifer material. *Biodegradation* **2**:43-51.
6. **Anderson, R. T., D. R. Lovley.** 2000. Anaerobic bioremediation of benzene under sulfate-reducing conditions in a petroleum-contaminated aquifer. *Environ. Sci. Technol.* **34**:2261-2266.
7. **Anonymous.** 1988. Health advisory set for fuel oxygenate MTBE. *Environ. Sci. Technol.* **32**:83A.
8. **Anonymous.** 1995. IAEA-TECHDOC-825. International Atomic Energy Agency.
9. **Arnth, J. D., G. Milde, H. H. Kerndorff, R. Schleyer.** 1989. Waste deposit influences on groundwater quality as a tool for waste type and site selection for final storage quality. *In* P. Baccini (ed.), *The Landfill.- Lecture Notes in Earth Sciences*, vol. 20. Springer-Verlag, Berlin.
10. **Asmussen, G., G. Strauch.** 1998. Sulfate reduction in a lake and the groundwater of a former lignite mining area studied by stable sulfur and carbon isotopes. *Water Air Soil Poll. Focus* **108**:271-284.
11. **Barker, J. F., P. Fritz.** 1981. The occurrence and origin of methane in some groundwater-flow systems. *Can. J. Earth Sci.* **18**:1802-1816.
12. **Beller, H. R., W.-H. Ding, M. Reinhard.** 1995. Byproducts of anaerobic alkylbenzene metabolism useful as indicators of *in situ* bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* **29**:2864-2870.
13. **Benker, E., G. B. Davis, D. A. Barry.** 1998. Estimating the retardation coefficient of trichloroethene for a sand aquifer low in sediment organic carbon - a comparison of methods. *J. Contam. Hydrol.* **30**:157-178.
14. **Bill, M., C. Schüth, J. A. C. Barth, R. M. Kalin.** 2001. Carbon isotope fractionation during abiotic reductive dehalogenation of trichloroethene (TCE). *Chemosphere* **44**:1281-1286.
15. **Bligh, E. G., W. J. Dyer.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**:911-917.
16. **Bloom, Y., R. Aravena, D. Hunkeler, E. Edwards, S. K. Frape.** 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.
17. **Bolliger, C., P. Höhener, D. Hunkeler, K. Häberli, J. Zeyer.** 1999. Intrinsic bioremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer and assessment of mineralization based on stable carbon isotopes. *Biodegradation* **10**:201-217.
18. **Bolliger, C., M. H. Schroth, S. M. Bernasconi, J. Kleikemper, J. Zeyer.** 2001. Sulfur isotope fractionation during microbial sulfate reduction by toluene-degrading bacteria. *Geochim. Cosmochim. Ac.* **65**:3289-3298.
19. **Boschker, H. T. S., J. J. Middelburg.** 2002. Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology. *Fems Microbiol. Ecol.* **40**:85-95.
20. **Botz, R., H. D. Pokojski, M. Schmitt, M. Thomm.** 1996. Carbon isotope fractionation

- during bacterial methanogenesis by CO₂ reduction. *Org. Geochem.* **25**:255-262.
21. **Büning, C., F. Pfeifer, E. Podwojewski, W. Quecke, A. B. Dohrmann, C. C. Tebbe, M. Kästner, H. H. Richnow.** 2005. *In situ*-Mikrokosmenuntersuchungen mit C-13-markiertem Benzol und Toluol zum Nachweis des natürlichen biologischen Abbaus im Grundwasser und zur molekularbiologischen Analyse der abbauaktiven Mikroflora. *Altlastenspektrum* **14**:137-145.
 22. **Burgoyne, T. W., J. M. Hayes.** 1998. Quantitative production of H₂ by pyrolysis of gas chromatographic effluents. *Anal. Chem.* **70**:5136-5141.
 23. **Butler, C. S., J. R. Mason.** 1997. Structure-function analysis of the bacterial aromatic ring-hydroxylating dioxygenases. *Adv. Microb. Physiol.* **38**:47-84.
 24. **Caimi, R. J., J. T. Brenna.** 1997. Quantitative evaluation of carbon isotopic fractionation during reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* **757**:307-310.
 25. **Canfield, D. E., C. A. Olesen, R. P. Cox.** 2006. Temperature and its control of isotope fractionation by a sulfate-reducing bacterium. *Geochim. Cosmochim. Ac.* **70**:548-561.
 26. **Cerniglia, C. E.** 1984. Microbial transformation of aromatic hydrocarbons. *In* R. M. Atlas (ed.), *Petroleum microbiology*. Macmillan Publishing Company, New York.
 27. **Chakraborty, R., J. D. Coates.** 2004. Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Appl. Microbiol. Biot.* **64**:437-446.
 28. **Chakraborty, R., J. D. Coates.** 2005. Hydroxylation and carboxylation - two crucial steps of anaerobic benzene degradation by *Dechloromonas* strain RCB. *Appl. Environ. Microb.* **71**:5427-5432.
 29. **Chang, Y. J., P. E. Long, R. Geyer, A. D. Peacock, C. T. Resch, K. Sublette, S. Pfiffner, A. Smithgall, R. T. Anderson, H. A. Vronis, J. R. Stephen, R. Dayvault, I. Ortiz-Bernad, D. R. Lovley, D. C. White.** 2005. Microbial incorporation of C-13-labeled acetate at the field scale: Detection of microbes responsible for reduction of U(VI). *Environ. Sci. Technol.* **39**:9039-9048.
 30. **Chapelle, F. H., P. M. Bradley, D. R. Lovley, D. A. Vroblesky.** 1996. Measuring rates of biodegradation in a contaminated aquifer using field and laboratory methods. *Ground Water* **34**:691-698.
 31. **Chapelle, F. H., P. B. McMahon, N. M. Dubrovsky, R. F. Fujii, E. T. Oaksford, D. A. Vroblesky.** 1995. Deducing the distribution of terminal electron-accepting processes in hydrologically diverse groundwater systems. *Water Resour. Res.* **31**:359-371.
 32. **Chartrand, M. M. G., P. L. Morrill, G. Lacrampe-Couloume, B. S. Lollar.** 2005. Stable isotope evidence for biodegradation of chlorinated ethenes at a fractured bedrock site. *Environ. Sci. Technol.* **39**:4848-4856.
 33. **Christensen, T. H., P. L. Bjerg, S. A. Banwart, R. Jakobsen, G. Heron, H. J. Albrechtsen.** 2000. Characterization of redox conditions in groundwater contaminant plumes. *J. Contam. Hydrol.* **45**:165-241.
 34. **Christensen, T. H., P. Kjeldsen, P. L. Bjerg, D. L. Jensen, J. B. Christensen, A. Baun, H. J. Albrechtsen, C. Heron.** 2001. Biogeochemistry of landfill leachate plumes. *J. Contam. Hydrol.* **16**:659-718.
 35. **Clark, I. D., Fritz, P.** 1997. *Environmental isotopes in hydrogeology*, 1 ed. Lewis Publishers, Boca Raton.
 36. **Coates, J. D., R. Chakraborty, J. G. Lack, S. M. O'Connor, K. A. Cole, K. S. Bender, L. A. Achenbach.** 2001. Anaerobic benzene oxidation coupled to nitrate reduction in pure culture by two strains of *Dechloromonas*. *Nature* **411**:1039-1043.
 37. **Coleman, D. D., C. L. Liu, K. C. Hackley, L. J. Benson.** 1993. Identification of landfill methane using carbon and hydrogen isotope analysis. Presented at the 16th International Madison Waste Conference, Municipal & Industrial Waste, Dep. of Engineering Professional Development, Univ. of Wisconsin-Madison.
 38. **Conrad, M. E., P. F. Daley, M. L. Fischer, B. B. Buchanan, T. Leighton, M. Kashgarian.** 1997. Combined C-14 and delta C-13 monitoring of *in situ*-biodegradation of petroleum hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* **31**:1463-1469.

39. **Conrad, M. E., A. S. Templeton, P. F. Daley, L. Alvarez-Cohen.** 1999. Seasonally-induced fluctuations in microbial production and consumption of methane during bioremediation of aged subsurface refinery contamination. *Environ. Sci. Technol.* **33**:4061-4068.
40. **Cozzarelli, I. M., M. J. Baedecker, R. P. Eganhouse, D. F. Goerlitz.** 1994. The geochemical evolution of low-molecular-weight organic-acids derived from the degradation of petroleum contaminants in groundwater. *Geochim. Cosmochim. Ac.* **58**:863-877.
41. **Cozzarelli, I. M., R. P. Eganhouse, M. J. Baedecker.** 1990. Transformation of monoaromatic hydrocarbons to organic-acids in anoxic groundwater environment. *Environ. Geol. Water S.* **16**:135-141.
42. **Craig, H.** 1957. Isotopic standards for carbon and oxygen and correction for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide. *Geochim. Cosmochim. Ac.* **12**:133-149.
43. **Dahmke, A., T. Wachter, F. Dethlefsen.** 2004. Geochemische Untersuchungen des Aquifers. Teil des Projektendberichts RETZINA: REferenzTestfeld Zeitz zur Implementierung des "Natural Attenuation" Ansatzes. Lehrstuhl für Angewandte Geologie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
44. **Dayan, H., T. Abrajano, N. C. Sturchio, L. Winsor.** 1999. Carbon isotopic fractionation during reductive dehalogenation of chlorinated ethenes by metallic iron. *Org. Geochem.* **30**:755-763.
45. **Dean, B. J.** 1985. Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. *Mutat. Res.* **154**:153-81.
46. **Dempster, H. S., B. S. Lollar, S. Feenstra.** 1997. Tracing organic contaminants in groundwater: A new methodology using compound-specific isotopic analysis. *Environ. Sci. Technol.* **31**:3193-3197.
47. **Dethlefsen, F., F. Bliss, T. Wachter, A. Dahmke.** 2004. Reaktive Tracer zur Bestimmung der sedimentären Aquifer-Oxidationskapazität im Labor- und Feldversuch. *Grundwasser* **9**:12-20.
48. **DEV.** 1971. D8-Berechnung des gelösten Kohlendioxids (der freien Kohlensäure), des Carbonat- und Hydrogencarbonat-Ions. Wasserchemische Gesellschaft.
49. **Dias, R. F., K. H. Freeman.** 1997. Carbon isotope analyses of semivolatile organic compounds in aqueous media using solid-phase microextraction and isotope ratio monitoring GC/MS. *Anal. Chem.* **69**:944-950.
50. **Dietrich, P., C. Leven.** 2006. Direct push technologies. In R. Kirsch (ed.), *Groundwater geophysics - A tool for hydrogeology*, 1 ed. Springer, Berlin.
51. **DIN.** 1985. 38402-Teil 13 Probenahme aus Grundwasserleitern. Deutsches Institut für Normung e. V.
52. **DIN.** 1983. 38406-E 1-1 Photometrische Bestimmung von Eisen mittels 1,10-Phenanthrolin. Deutsches Institut für Normung e. V.
53. **DIN.** 1991. 38407-F 9-1 Bestimmung von Benzol und einigen Derivaten mittels Gaschromatographie durch Dampfdruckanalyse. Deutsches Institut für Normung e. V.
54. **DIN.** 1996. EN ISO 5667-3 (A 21) Anleitung zur Konservierung und Handhabung von Proben. Deutsches Institut für Normung e. V.
55. **DIN.** 1995. EN ISO 10304-1 (D 19) Anleitung zur Konservierung und Handhabung von Proben. Deutsches Institut für Normung e. V.
56. **DIN.** 1998. EN ISO 11885 (E 22) Bestimmung von 33 Elementen durch induktiv gekoppelte Plasma-Atom-Emissionsspektrometrie (ICP-OES). Deutsches Institut für Normung e. V.
57. **DVWK.** 1997. Merkblatt-245 Tiefenorientierte Probenahme aus Grundwassermessstellen. Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e.V.
58. **DVWK.** 1992. Regeln-128 Entnahme und Untersuchungsumfang von Grundwasserproben. Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall e.V.

59. **Elsner, M., S. B. Haderlein, T. Kellerhals, S. Luzi, L. Zwank, W. Angst, R. P. Schwarzenbach.** 2004. Mechanisms and products of surface-mediated reductive dehalogenation of carbon tetrachloride by Fe(II) on goethite. *Environ. Sci. Technol.* **38**:2058-2066.
60. **Elsner, M., L. Zwank, D. Hunkeler, R. P. Schwarzenbach.** 2005. A new concept linking observable stable isotope fractionation to transformation pathways of organic pollutants. *Environ. Sci. Technol.* **39**:6896-6916.
61. **Fang, J. S., M. J. Barcelona, R. V. Krishnamurthy, E. A. Atekwana.** 2000. Stable carbon isotope biogeochemistry of a shallow sand aquifer contaminated with fuel hydrocarbons. *Appl. Geochem.* **15**:157-169.
62. **Fischer, A.** 2003. Diplomarbeit: Charakterisierung der Quellen und Senken von Methan in einem BTEX-kontaminierten Grundwasserleiter. TU Bergakademie Freiberg.
63. **Fischer, A., J. Bauer, M. Dietze, S. Gödeke, M. Schirmer, H. Weiß, M. Kästner, R. U. Meckenstock, H. H. Richnow.** 2005. Konzept zur Quantifizierung des anaeroben *in situ*-Schadstoffabbaus in BTEX-kontaminierten Grundwasserleitern mittels Deuterium-markierter Substanzen. *Altlastenspektrum* **14**:5-12.
64. **Fischer, A., J. Bauer, R. Meckenstock, W. Stichler, C. Griebler, P. Maloszewski, M. Kästner, H. H. Richnow.** 2006. A multitracer test proving the reliability of stable isotope fractionation analysis for assessing anaerobic degradation in a BTEX contaminated aquifer. *Environ. Sci. Technol.* **40**:4245-4252.
65. **Fischer, A., N. Stelzer, H. Eisenmann, H. H. Richnow.** 2006. Nachweis des mikrobiellen Schadstoffabbaus in Grundwasserleitern. *TerraTech* **1-2**:14-17.
66. **Fischer, A., K. Theuerkorn, N. Stelzer, M. Gehre, M. Thullner, H. H. Richnow.** 2006. Applicability of stable isotope fractionation analysis for the characterization of benzene biodegradation in a BTEX contaminated aquifer. *Environ. Sci. Technol.* **submitted**.
67. **Fischer, A., A. Vieth, K. Knöllner, T. Wachter, A. Dahmke, H. H. Richnow.** 2004. Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus mit Hilfe von isotopenchemischen Methoden. *Grundwasser* **9**:159-172.
68. **Fishbein, L.** 1976. Industrial mutagens and potential mutagens I. Halogenated aliphatic derivatives. *Mutat. Res.* **32**:267-307.
69. **Gehre, M., R. Hoefling, P. Kowski.** 1996. Methodical studies for D/H-isotope analysis - A new technique for the direct coupling of sample preparation to an IRMS. *Isot. Environ. Health. S.* **32**:335-340.
70. **Gehre, M., R. Hoefling, P. Kowski, G. Strauch.** 1996. Sample preparation device for quantitative hydrogen isotope analysis using chromium metal. *Anal. Chem.* **68**:4414-4417.
71. **Geyer, R., A. D. Peacock, A. Miltner, H. H. Richnow, D. C. White, K. L. Sublette, M. Kästner.** 2005. *In situ*-assessment of biodegradation potential using biotrap amended with C-13-labeled benzene or toluene. *Environ. Sci. Technol.* **39**:4983-4989.
72. **Gibson, D. T., G. E. Cardini, F. C. Maseles, R. E. Kallio.** 1970. Incorporation of oxygen-18 into benzene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry* **9**:1631-5.
73. **Gibson, D. T., J. R. Koch, R. E. Kallio.** 1968. Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. I. Enzymatic formation of catechol from benzene. *Biochemistry* **7**:2653-62.
74. **Gibson, D. T., V. Subramanian.** 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. *In* D. T. Gibson (ed.), *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker, Inc., New York.
75. **Giesemann, A., H. J. Jager, A. L. Norman, H. P. Krouse, W. A. Brand.** 1994. Online sulfur isotope determination using an elemental analyzer coupled to a mass spectrometer. *Anal. Chem.* **66**:2816-2819.
76. **Gödeke, S., H. Geistlinger, A. Fischer, H. H. Richnow, M. Schirmer.** 2006. Simulation of a reactive tracer experiment using stochastic hydraulic conductivity fields. *Environ. Geol.* **in prep**.
77. **Gödeke, S., H. H. Richnow, H. Weiß, A. Fischer, C. Vogt, H. Borsdorf, M. Schirmer.**

2006. Multi component-reactive tracer test for the implementation of enhanced *in situ*-bioremediation at a BTEX-contaminated megasite. *J. Contam. Hydrol.* **in press**.
78. **Gödeke, S., H. Weiß, H. Geistlinger, A. Fischer, H. H. Richnow, M. Schirmer.** 2004. Strömungs- und Tracer-Transportmodellierung am Natural Attenuation-Standort Zeitz. *Grundwasser* **9**:3-11.
79. **Gödeke, S., H. Weiß, H. H. Richnow, H. Borsdorf, R. Trabitzsch, M. Dietze, M. Schirmer.** 2004. Tracertest zur Analyse des reaktiven Transports im Aquifer am Industriestandort Zeitz. *Alllastenspektrum* **13**:1-9.
80. **Gray, J. R., G. Lacrampe-Couloume, D. Gandhi, K. M. Scow, R. D. Wilson, D. M. Mackay, B. S. Lollar.** 2002. Carbon and hydrogen isotopic fractionation during biodegradation of methyl *tert*-butyl ether. *Environ. Sci. Technol.* **36**:1931-1938.
81. **Griebler, C., M. Safinowski, A. Vieth, H. H. Richnow, R. U. Meckenstock.** 2004. Combined application of stable carbon isotope analysis and specific metabolites determination for assessing *in situ*-degradation of aromatic hydrocarbons in a tar oil-contaminated aquifer. *Environ. Sci. Technol.* **38**:617-631.
82. **Grossman, E. L.** 1997. Stable carbon isotopes as indicators of microbial activity in aquifers, p. 565-576. *In* C. J. Hurst (ed.), *Manual of environmental microbiology*. American Society for Microbiology, Washington DC.
83. **Grossman, E. L., L. A. Cifuentes, I. M. Cozzarelli.** 2002. Anaerobic methane oxidation in a landfill-leachate plume. *Environ. Sci. Technol.* **36**:2436-2442.
84. **Hackley, K. C., C. L. Liu, D. D. Coleman.** 1996. Environmental isotope characteristics of landfill leachates and gases. *Ground Water* **34**:827-836.
85. **Haderlein, S. B., T. C. Schmidt, M. Elsner, L. Zwank, M. Berg, R. P. Schwarzenbach.** 2005. Response to comment on "New evaluation scheme for two-dimensional isotope analysis to decipher biodegradation processes: Application to groundwater contamination by MTBE". *Environ. Sci. Technol.* **39**:8543-8544.
86. **Hagemann, R., G. Nief, E. Roth.** 1970. Absolute isotopic scale for deuterium analysis of natural waters. Absolute D/H ratio for SMOW. *Tellus* **22**:712-715.
87. **Hanson, J. R., J. L. Macalady, D. Harris, K. M. Scow.** 1999. Linking toluene degradation with specific microbial populations in soil. *Appl. Environ. Microb.* **65**:5403-5408.
88. **Harper, D. B., R. M. Kalin, J. T. G. Hamilton, C. Lamb.** 2001. Carbon isotope ratios for chloromethane of biological origin: Potential tool in determining biological emissions. *Environ. Sci. Technol.* **35**:3616-3619.
89. **Harrington, R. R., S. R. Poulson, J. I. Drever, P. J. S. Colberg, E. F. Kelly.** 1999. Carbon isotope systematics of monoaromatic hydrocarbons: vaporization and adsorption experiments. *Org. Geochem.* **30**:765-775.
90. **Heider, J., A. M. Spormann, H. R. Beller, F. Widdel.** 1998. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *Fems Microbiol. Rev.* **22**:459-473.
91. **Hein, H., W. Kunze.** 2004. *Umweltanalytik mit Spektrometrie und Chromatographie*, 3 ed. Wiley-VCH, Weinheim.
92. **Hellmann, H.** 1999. *Umweltanalytik von Kohlenwasserstoffen*. Wiley-VCH.
93. **Hilkert, A. W., C. B. Douthitt, H. J. Schluter, W. A. Brand.** 1999. Isotope ratio monitoring gas chromatography mass spectrometry of D/H by high temperature conversion isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.* **13**:1226-1230.
94. **Hoefs, J.** 1997. *Stable isotope geochemistry*, 4 ed. Springer-Verlag, Berlin.
95. **Hornibrook, E. R. C., F. J. Longstaffe, W. S. Fyfe.** 2000. Evolution of stable carbon isotope compositions for methane and carbon dioxide in freshwater wetlands and other anaerobic environments. *Geochim. Cosmochim. Ac.* **64**:1013-1027.
96. **Huang, L., N. C. Sturchio, T. Abrajano, L. J. Heraty, B. D. Holt.** 1999. Carbon and chlorine isotope fractionation of chlorinated aliphatic hydrocarbons by evaporation. *Org. Geochem.* **30**:777-785.
97. **Hunkeler, D.** 2002. Quantification of isotope fractionation in experiments with deuterium-labeled substrate. *Appl. Environ. Microb.* **68**:5205-5206.

98. **Hunkeler, D., N. Anderson, R. Aravena, S. M. Bernasconi, B. J. Butler.** 2001. Hydrogen and carbon isotope fractionation during aerobic biodegradation of benzene. *Environ. Sci. Technol.* **35**:3462-3467.
99. **Hunkeler, D., R. Aravena.** 2000. Determination of compound-specific carbon isotope ratios of chlorinated methanes, ethanes, and ethenes in aqueous samples. *Environ. Sci. Technol.* **34**:2839-2844.
100. **Hunkeler, D., R. Aravena, E. Cox.** 2002. Carbon isotopes as a tool to evaluate the origin and fate of vinyl chloride: Laboratory experiments and modeling of isotope evolution. *Environ. Sci. Technol.* **36**:3378-3384.
101. **Hunkeler, D., B. J. Butler, R. Aravena, J. F. Barker.** 2001. Monitoring biodegradation of methyl *tert*-butyl ether (MTBE) using compound-specific carbon isotope analysis. *Environ. Sci. Technol.* **35**:676-681.
102. **Hunkeler, D., P. Höhener, S. Bernasconi, J. Zeyer.** 1999. Engineered *in situ*-bioremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer: assessment of mineralization based on alkalinity, inorganic carbon and stable carbon isotope balances. *J. Contam. Hydrol.* **37**:201-223.
103. **Jeon, C. O., W. Park, P. Padmanabhan, C. DeRito, J. R. Snape, E. L. Madsen.** 2003. Discovery of a bacterium with distinctive dioxygenase that is responsible for *in situ*-biodegradation in contaminated sediment. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:13591-13596.
104. **Jindrova, E., M. Chocova, K. Demnerova, V. Brenner.** 2002. Bacterial aerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene. *Folia Microbiol.* **47**:83-93.
105. **Kasai, Y., Y. Takahata, M. Manefield, K. Watanabe.** 2006. RNA-based stable isotope probing and isolation of anaerobic benzene-degrading bacteria from gasoline-contaminated groundwater. *Appl. Environ. Microb.* **72**:3586-3592.
106. **Kaschl, A., C. Vogt, S. Uhlig, I. Nijenhuis, H. Weiss, M. Kästner, H. H. Richnow.** 2005. Isotopic fractionation indicates anaerobic monochlorobenzene biodegradation. *Environ. Toxicol. Chem.* **24**:1315-1324.
107. **Kästner, M., A. Fischer, I. Nijenhuis, R. Geyer, N. Stelzer, P. Bombach, C. C. Tebbe, H. H. Richnow.** 2006. Assessment of microbial *in situ*-activity in contaminated aquifers. *Eng. Life Sci.* **6**:234-251.
108. **Kazumi, J., M. E. Caldwell, J. M. Suflita, D. R. Lovley, L. Y. Young.** 1997. Anaerobic degradation of benzene in diverse anoxic environments. *Environ. Sci. Technol.* **31**:813-818.
109. **Klinger, J., C. Stieler, F. Sacher, H. J. Branch.** 2002. MTBE (methyl tertiary-butyl ether) in groundwaters: Monitoring results from Germany. *J. Environ. Monitor* **4**:276-279.
110. **Knief, C., K. Altendorf, A. Lipski.** 2003. Linking autotrophic activity in environmental samples with specific bacterial taxa by detection of C-13-labelled fatty acids. *Environ. Microbiol.* **5**:1155-1167.
111. **Knöller, K., C. Vogt, H. H. Richnow, S. M. Weise.** 2006. Sulfur and oxygen isotope fractionation during benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene degradation by sulfate-reducing bacteria. *Environ. Sci. Technol.* **40**:3879-3885.
112. **Kolhatkar, R., T. Kuder, P. Philp, J. Allen, J. T. Wilson.** 2002. Use of compound-specific stable carbon isotope analyses to demonstrate anaerobic biodegradation of MTBE in groundwater at a gasoline release site. *Environ. Sci. Technol.* **36**:5139-5146.
113. **Kopinke, F. D., A. Georgi, H. H. Richnow.** 2005. Comment on "New evaluation scheme for two-dimensional isotope analysis to decipher biodegradation processes: Application to groundwater contamination by MTBE". *Environ. Sci. Technol.* **39**:8541-8542.
114. **Kopinke, F. D., A. Georgi, M. Voskamp, H. H. Richnow.** 2005. Carbon isotope fractionation of organic contaminants due to retardation on humic substances: Implications for natural attenuation studies in aquifers. *Environ. Sci. Technol.* **39**:6052-6062.

115. **Krieger, C. J., H. R. Beller, M. Reinhard, A. M. Spormann.** 1999. Initial reactions in anaerobic oxidation of *m*-xylene by the denitrifying bacterium *Azoarcus* sp. strain T. *Journal of Bacteriology* **181**:6403-6410.
116. **Kuder, T., J. T. Wilson, P. Kaiser, R. Kolhatkar, P. Philp, J. Allen.** 2005. Enrichment of stable carbon and hydrogen isotopes during anaerobic biodegradation of MTBE: Microcosm and field evidence. *Environ. Sci. Technol.* **39**:213-220.
117. **LABO.** 2005. Bundesweite Kennzahlen zur Altlastenstatistik. Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Bodenschutz.
118. **Landmeyer, J. E., D. A. Vroblesky, F. H. Chapelle.** 1996. Stable carbon isotope evidence of biodegradation zonation in a shallow jet-fuel contaminated aquifer. *Environ. Sci. Technol.* **30**:1120-1128.
119. **LAWA.** 1999. Empfehlungen zu Konfiguration von Messnetzen sowie zu Bau und Betrieb von Grundwassermessstellen - (qualitativ). Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser.
120. **LAWA.** 1993. Richtlinien für Beobachtung und Auswertung, Teil 3 - Grundwasserbeschaffenheit. Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Wasser.
121. **LfUG.** 1998. Probenahme bei der technischen Erkundung von Altlasten. Sächsisches Landesamt für Umwelt und Geologie.
122. **Lollar, B. S., G. F. Slater, J. Ahad, B. Sleep, J. Spivack, M. Brennan, P. MacKenzie.** 1999. Contrasting carbon isotope fractionation during biodegradation of trichloroethylene and toluene: Implications for intrinsic bioremediation. *Org. Geochem.* **30**:813-820.
123. **Lollar, B. S., G. F. Slater, B. Sleep, M. Witt, G. M. Klecka, M. Harkness, J. Spivack.** 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.
124. **Lovley, D. R.** 2001. Bioremediation - Anaerobes to the rescue. *Science* **293**:1444-1446.
125. **Mace, R. E., R. S. Fisher, D. M. Welch, S. P. Para.** 1997. Extent, mass, and duration of hydrocarbon plumes from leaking petroleum storage tank sites in Texas. Bureau of Economic Geology, University of Texas at Austin.
126. **Mancini, S. A., G. Lacrampe-Couloume, H. Jonker, B. M. Van Breukelen, J. Groen, F. Volkering, B. S. Lollar.** 2002. Hydrogen isotopic enrichment: An indicator of biodegradation at a petroleum hydrocarbon contaminated field site. *Environ. Sci. Technol.* **36**:2464-2470.
127. **Mancini, S. A., A. C. Ulrich, G. Lacrampe-Couloume, B. Sleep, E. A. Edwards, B. S. Lollar.** 2003. Carbon and hydrogen isotopic fractionation during anaerobic biodegradation of benzene. *Appl. Environ. Microb.* **69**:191-198.
128. **Mariotti, A., J. C. Germon, P. Hubert, P. Kaiser, R. Letolle, A. Tardieux, P. Tardieux.** 1981. Experimental-determination of nitrogen kinetic isotope fractionation - some principles - illustration for the denitrification and nitrification processes. *Plant Soil.* **62**:413-430.
129. **Mariotti, A., A. Landreau, B. Simon.** 1988. N-15 isotope biogeochemistry and natural denitrification process in groundwater - Application to the chalk aquifer of Northern France. *Geochim. Cosmochim. Ac.* **52**:1869-1878.
130. **Mason, J. R., C. S. Butler, R. Cammack, J. K. Shergill.** 1997. Structural studies on the catalytic component of benzene dioxygenase from *Pseudomonas putida*. *Biochem. Soc. Trans.* **25**:90-5.
131. **Mazeas, L., H. Budzinski, N. Raymond.** 2002. Absence of stable carbon isotope fractionation of saturated and polycyclic aromatic hydrocarbons during aerobic bacterial biodegradation. *Org. Geochem.* **33**:1259-1272.
132. **Meckenstock, R., H. H. Richnow.** 2002. Quantification of isotope fractionation in experiments with deuterium-labeled substrate - Authors reply. *Appl. Environ. Microb.* **68**:5206-5207.

133. **Meckenstock, R. U., B. Morasch, C. Griebler, H. H. Richnow.** 2004. Stable isotope fractionation analysis as a tool to monitor biodegradation in contaminated aquifers. *J. Contam. Hydrol.* **75**:215-255.
134. **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 Soil Poll. Focus* **2**:141-152.
135. **Meckenstock, R. U., B. Morasch, R. Warthmann, B. Schink, E. Anweiler, W. Michaelis, H. H. Richnow.** 1999. C-13/C-12 isotope fractionation of aromatic hydrocarbons during microbial degradation. *Environ. Microbiol.* **1**:409-414.
136. **Merritt, D. A., K. H. Freeman, M. P. Ricci, S. A. Studley, J. M. Hayes.** 1995. Performance and optimization of a combustion interface for isotope ratio monitoring gas-chromatography mass-spectrometry. *Anal. Chem.* **67**:2461-2473.
137. **Moran, M. J., J. S. Zogorski, P. J. Squillace.** 2005. MTBE and gasoline hydrocarbons in ground water of the United States. *Ground Water* **43**:615-627.
138. **Morasch, B., H. H. Richnow, B. Schink, R. U. Meckenstock.** 2001. Stable hydrogen and carbon isotope fractionation during microbial toluene degradation: Mechanistic and environmental aspects. *Appl. Environ. Microb.* **67**:4842-4849.
139. **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. *Appl. Environ. Microb.* **68**:5191-5194.
140. **Morgan, P., S. T. Lewis, R. J. Watkinson.** 1993. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in gas-condensate-contaminated groundwater. *Environ. Pollut.* **82**:181-190.
141. **Morrill, P. L., G. Lacrampe-Couloume, G. F. Slater, B. E. Sleep, E. A. Edwards, M. L. McMaster, D. W. Major, B. S. Lollar.** 2005. Quantifying chlorinated ethene degradation during reductive dechlorination at Kelly AFB using stable carbon isotopes. *J. Contam. Hydrol.* **76**:279-293.
142. **Olsen, R. H., J. J. Kukor, B. Kaphammer.** 1994. A novel toluene-3-monoxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO1. *J. Bacteriol.* **176**:3749-56.
143. **Padmanabhan, P., S. Padmanabhan, C. DeRito, A. Gray, D. Gannon, J. R. Snape, C. S. Tsai, W. Park, C. Jeon, E. L. Madsen.** 2003. Respiration of C-13-labeled substrates added to soil in the field and subsequent 16S rRNA gene analysis of C-13-labeled soil DNA. *Appl. Environ. Microb.* **69**:1614-1622.
144. **Pelz, O., A. Chatzinotas, N. Andersen, S. M. Bernasconi, C. Hesse, W. R. Abraham, J. Zeyer.** 2001. Use of isotopic and molecular techniques to link toluene degradation in denitrifying aquifer microcosms to specific microbial populations. *Arch. Microbiol.* **175**:270-281.
145. **Pelz, O., A. Chatzinotas, A. Zarda-Hess, W. R. Abraham, J. Zeyer.** 2001. Tracing toluene-assimilating sulfate-reducing bacteria using C-13-incorporation in fatty acids and whole-cell hybridization. *Fems Microbiol. Ecol.* **38**:123-131.
146. **Peter, A., A. Steinbach, R. Liedl, T. Ptak, W. Michaelis, G. Teutsch.** 2004. Assessing microbial degradation of *o*-xylene at field-scale from the reduction in mass flow rate combined with compound-specific isotope analyses. *J. Contam. Hydrol.* **71**:127-154.
147. **Piwoni, M. D., P. Banerjee.** 1989. Sorption of volatile organic solvents from aqueous solution onto subsurface solids. *J. Contam. Hydrol.* **4**:163-179.
148. **Plumb, R. H.** 1987. A comparison of groundwater monitoring data from CERCLA and RCRA Sites. *Ground Water Monit. R.* **7**:94-100.
149. **Pombo, S. A., O. Pelz, M. H. Schroth, J. Zeyer.** 2002. Field-scale C-13-labeling of phospholipid fatty acids (PLFA) and dissolved inorganic carbon: tracing acetate assimilation and mineralization in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Fems Microbiol. Ecol.* **41**:259-267.
150. **Poulson, S. R., J. I. Drever.** 1999. Stable isotope (C, Cl, and H) fractionation during vaporization of trichloroethylene. *Environ. Sci. Technol.* **33**:3689-3694.

151. **Poulson, S. R., J. I. Drever, P. J. S. Colberg.** 1997. Estimation of K_{oc} values for deuterated benzene, toluene, and ethylbenzene, and application to ground water contamination studies. *Chemosphere* **35**:2215-2224.
152. **Radajewski, S., P. Ineson, N. R. Parekh, J. C. Murrell.** 2000. Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* **403**:646-649.
153. **Rataj, M. J., J. E. Kauth, M. I. Donnelly.** 1991. Oxidation of deuterated compounds by high specific activity methane monooxygenase from *Methylosinus trichosporium*. Mechanistic implications. *J. Biol. Chem.* **266**:18684-90.
154. **Rayleigh, J. W. S.** 1896. Theoretical considerations respecting the separation of gases by diffusion and similar processes. *Philos. Mag.* **42**:493-498.
155. **Reusser, D. E., J. A. Field.** 2002. Determination of benzylsuccinic groundwater by solid-phase acid in gasoline-contaminated extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **953**:215-225.
156. **Reusser, D. E., J. D. Istok, H. R. Beller, J. A. Field.** 2002. *In situ*-transformation of deuterated toluene and xylene to benzylsuccinic acid analogues in BTEX-contaminated aquifers. *Environ. Sci. Technol.* **36**:4127-4134.
157. **Rice, D. W., R. D. Grose, J. C. Michaelsen, B. P. Doohar, D. H. Mac Queen, S. J. Cullen, W. E. Kastenber, L. G. Everett, M. A. Marino.** 1995. California leaking underground fuel tank (LUFT) historical case analyses. California State Water Resources Control Board.
158. **Richnow, H. H., E. Annweiler, W. Michaelis, R. U. Meckenstock.** 2003. Microbial *in situ*-degradation of aromatic hydrocarbons in a contaminated aquifer monitored by carbon isotope fractionation. *J. Contam. Hydrol.* **65**:101-120.
159. **Richnow, H. H., R. Meckenstock.** 1999. Isotopen-geochemisches Konzept zur *in situ*-Erfassung des biologischen Abbaus in kontaminiertem Grundwasser. *TerraTech* **5**:38-41.
160. **Richnow, H. H., R. U. Meckenstock, L. A. Reitzel, A. Baun, A. Ledin, T. H. Christensen.** 2003. *In situ*-biodegradation determined by carbon isotope fractionation of aromatic hydrocarbons in an anaerobic landfill leachate plume (Vejen, Denmark). *J. Contam. Hydrol.* **64**:59-72.
161. **Rügge, K., P. L. Bjerg, J. K. Pedersen, H. Mosbaek, T. H. Christensen.** 1999. An anaerobic field injection experiment in a landfill leachate plume, Grindsted, Denmark 1. Experimental setup, tracer movement, and fate of aromatic and chlorinated compounds. *Water Resour. Res.* **35**:1231-1246.
162. **Schirmer, M., A. Dahmke, P. Dietrich, M. Dietze, S. Gödeke, H. H. Richnow, K. Schirmer, H. Weiss, G. Teutsch.** 2006. Natural attenuation research at the contaminated megasite Zeitz. *J. Hydrol.* **328**:393-407.
163. **Schirmer, M., I. Jones, G. Teutsch, D. N. Lerner.** 1995. Development and testing of multiport sock samplers for groundwater. *J. Hydrol.* **171**:239-257.
164. **Schmidt, T. C., L. Zwank, M. Elsner, M. Berg, R. U. Meckenstock, S. B. Haderlein.** 2004. Compound-specific stable isotope analysis of organic contaminants in natural environments: a critical review of the state of the art, prospects, and future challenges. *Anal. Bioanal. Chem.* **378**:283-300.
165. **Schreiber, M. E., J. M. Bahr.** 2002. Nitrate-enhanced bioremediation of BTEX-contaminated groundwater: parameter estimation from natural-gradient tracer experiments. *J. Contam. Hydrol.* **55**:29-56.
166. **Schroth, M. H., J. Kleikemper, C. Bolliger, S. M. Bernasconi, J. Zeyer.** 2001. *In situ*-assessment of microbial sulfate reduction in a petroleum-contaminated aquifer using push-pull tests and stable sulfur isotope analyses. *J. Contam. Hydrol.* **51**:179-195.
167. **Schüth, C., M. Bill, J. A. C. Barth, G. F. Slater, R. A. Kalin.** 2003. Carbon isotope fractionation during reductive dechlorination of TCE in batch experiments with iron samples from reactive barriers. *J. Contam. Hydrol.* **66**:25-37.
168. **Schüth, C., H. Taubald, N. Bolano, K. Maciejczyk.** 2003. Carbon and hydrogen isotope effects during sorption of organic contaminants on carbonaceous materials. *J.*

- Contam. Hydrol. **64**:269-281.
169. **Schwarzenbach, R. P., P. Westall.** 1981. Transport of nonpolar organic compounds from surface water to groundwater. Laboratory sorption studies. Environ. Sci. Technol. **15**:1360-1367.
 170. **Scott, K. M., X. Lu, C. M. Cavanaugh, J. S. Liu.** 2004. Optimal methods for estimating kinetic isotope effects from different forms of the Rayleigh distillation equation. Geochim. Cosmochim. Ac. **68**:433-442.
 171. **Slater, G. F., J. M. E. Ahad, B. S. Lollar, R. Allen-King, B. Sleep.** 2000. Carbon isotope effects resulting from equilibrium sorption of dissolved VOCs. Anal. Chem. **72**:5669-5672.
 172. **Slater, G. F., H. S. Dempster, B. S. Lollar, J. Ahad.** 1999. Headspace analysis: A new application for isotopic characterization of dissolved organic contaminants. Environ. Sci. Technol. **33**:190-194.
 173. **Slater, G. F., B. S. Lollar, B. E. Sleep, E. A. Edwards.** 2001. Variability in carbon isotopic fractionation during biodegradation of chlorinated ethenes: Implications for field applications. Environ. Sci. Technol. **35**:901-907.
 174. **Smallwood, B. J., R. P. Philp, J. D. Allen.** 2002. Stable carbon isotopic composition of gasolines determined by isotope ratio monitoring gas chromatography mass spectrometry. Org. Geochem. **33**:149-159.
 175. **Smallwood, B. J., R. P. Philp, T. W. Burgoyne, J. D. Allen.** 2001. The use of stable isotopes to differentiate specific source markers for MTBE. Environ. Forensics **2**:215-221.
 176. **Smith, R. L., B. L. Howes, S. P. Garabedian.** 1991. *In situ*-measurement of methane oxidation in groundwater by using natural-gradient tracer tests. Appl. Environ. Microb. **57**:1997-2004.
 177. **Snyder, R.** 2004. Xenobiotic metabolism and the mechanism(s) of benzene toxicity. Drug Metab. Rev. **36**:531-547.
 178. **Somsamak, P., H. H. Richnow, M. M. Häggblom.** 2006. Carbon isotope fractionation during anaerobic degradation of methyl tert-butyl ether under sulfate-reducing and methanogenic conditions. Appl. Environ. Microb. **72**:1157-1163.
 179. **Somsamak, P., H. H. Richnow, M. M. Häggblom.** 2005. Carbon isotopic fractionation during anaerobic biotransformation of methyl *tert*-butyl ether and *tert*-amyl methyl ether. Environ. Sci. Technol. **39**:103-109.
 180. **Song, D. L., M. E. Conrad, K. S. Sorenson, L. Alvarez-Cohen.** 2002. Stable carbon isotope fractionation during enhanced *in situ*-bioremediation of trichloroethene. Environ. Sci. Technol. **36**:2262-2268.
 181. **Spence, M. J., S. H. Bottrell, S. F. Thornton, H. H. Richnow, K. H. Spence.** 2005. Hydrochemical and isotopic effects associated with petroleum fuel biodegradation pathways in a chalk aquifer. J. Contam. Hydrol. **79**:67-88.
 182. **Spormann, A. M., F. Widdel.** 2000. Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. Biodegradation **11**:85-105.
 183. **Stehmeier, L. G., M. M. Francis, T. R. Jack, E. Diegor, L. Winsor, T. A. Abrajano.** 1999. Field and *in vitro*-evidence for *in situ*-bioremediation using compound-specific C-13/C-12 ratio monitoring. Org. Geochem. **30**:821-833.
 184. **Steinbach, A., R. Seifert, E. Annweiler, W. Michaelis.** 2004. Hydrogen and carbon isotope fractionation during anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons - A field study. Environ. Sci. Technol. **38**:609-616.
 185. **Stelzer, N., C. Büning, F. Pfeifer, C. C. Tebbe, I. Nijenhuis, M. Kästner, H. H. Richnow.** 2006. *In situ*-microcosms to evaluate natural attenuation potentials in contaminated aquifers. Org. Geochem. **accepted**.
 186. **Stelzer, N., A. Fischer, M. Kästner, H. H. Richnow.** 2006. Analyse des anaeroben *in situ*-Benzolabbaus anhand von Mikrokosmen (BACTRAPs) und Isotopenfraktionierungsprozessen. Grundwasser **akzeptiert**.
 187. **Tao, Y., A. Fishman, W. E. Bentley, T. K. Wood.** 2004. Oxidation of benzene to

- phenol, catechol, and 1,2,3-trihydroxybenzene by toluene 4-monooxygenase of *Pseudomonas mendocina* KR1 and toluene 3-monooxygenase of *Ralstonia pickettii* PKO1. Appl. Environ. Microbiol. **70**:3814-20.
188. **Taylor, J., R. J. Parkes.** 1983. The cellular fatty-acids of the sulfate-reducing bacteria, *Desulfobacter* sp., *Desulfobulbus* sp. and *Desulfovibrio-Desulfuricans*. J. Gen. Microbiol. **129**:3303-3309.
189. **Thierrin, J., G. B. Davis, C. Barber.** 1995. A ground-water tracer test with deuterated compounds for monitoring *in situ*-biodegradation and retardation of aromatic hydrocarbons. Ground Water **3**:469-475.
190. **Thierrin, J., G. B. Davis, C. Barber, B. M. Patterson, F. Pribac, T. R. Power, M. Lambert.** 1993. Natural degradation rates of BTEX-compounds and naphthalene in a sulfate-reducing groundwater environment. Hydrolog. Sci. J. **38**:309-322.
191. **Tomaszewski, J. E., D. M. Jerina, J. W. Daly.** 1975. Deuterium isotope effects during formation of phenols by hepatic monooxygenases. Evidence for an alternative to arene oxide pathway. Biochemistry **14**:2024-31.
192. **Trust, B. A., J. G. Mueller, R. B. Coffin, L. A. Cifuentes.** 1995. The biodegradation of fluoranthrene as monitored using stable carbon isotopes, p. 233– 239. In R. E. Hinchee, G. S. Douglas, S. K. Ong (ed.), Monitoring and verification of bioremediation. Batelle Press, Columbus.
193. **Ulrich, A. C., H. R. Beller, E. A. Edwards.** 2005. Metabolites detected during biodegradation of C-13(6)-benzene in nitrate-reducing and methanogenic enrichment cultures. Environ. Sci. Technol. **39**:6681-6691.
194. **US-EPA.** 1999. Use of monitored natural attenuation at superfund, RCRA corrective action, and underground storage tank sites. Final Directive Number: 9200.4-17P. United States Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response (OSWER).
195. **van Breukelen, B. M., J. Griffioen.** 2004. Biogeochemical processes at the fringe of a landfill leachate pollution plume: Potential for dissolved organic carbon, Fe(II), Mn(II), NH₄, and CH₄ oxidation. J. Contam. Hydrol. **73**:181-205.
196. **Vieth, A.** 2003. Dissertation: "Anwendung stabiler Isotope zur Beschreibung des mikrobiellen Abbaus organischer Schadstoffe in kontaminierten Aquiferen". Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
197. **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 **5**:37-41.
198. **Vieth, A., M. Kästner, M. Schirmer, H. Weiss, S. Gödeke, R. U. Meckenstock, H. H. Richnow.** 2005. Monitoring *in situ*-biodegradation of benzene and toluene by stable carbon isotope fractionation. Environ. Toxicol. Chem. **24**:51-60.
199. **Vieth, A., J. Müller, G. Strauch, M. Kästner, M. Gehre, R. U. Meckenstock, H. H. Richnow.** 2003. *In situ*-biodegradation of tetrachloroethene and trichloroethene in contaminated aquifers monitored by stable isotope fractionation. Isot. Environ. Health. S. **39**:113-124.
200. **Wachter, T.** 2004. Dissertation: Geostatistische Analyse der Variabilität hydrogeochemischer Parameter und Quantifizierung der NA-Kapazität am Beispiel des BTEX-kontaminierten Aquifers in Zeitz/Sachsen-Anhalt. Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
201. **Wachter, T., F. Dethlefsen, A. Dahmke.** 2001. Neubewertung der Eisen(III)-Oxidationskapazität bei NA-Prozessen anhand von Literatur- und Feldstandortdaten. Presented at the 3. Symposium Natural Attenuation, Frankfurt a.M.
202. **Waldron, S., I. A. Watson-Craik, A. J. Hall, A. E. Fallick.** 1998. The carbon and hydrogen stable isotope composition of bacteriogenic methane: A laboratory study using a landfill inoculum. Geomicrobiol. J. **15**:157-169.
203. **Wang, Y., Y. S. Huang.** 2001. Hydrogen isotope fractionation of low molecular weight *n*-alkanes during progressive vaporization. Org. Geochem. **32**:991-998.

204. **Wang, Y., Y. S. Huang.** 2003. Hydrogen isotopic fractionation of petroleum hydrocarbons during vaporization: implications for assessing artificial and natural remediation of petroleum contamination. *Appl. Geochem.* **18**:1641-1651.
205. **Ward, J. A. M., J. M. E. Ahad, G. Lacrampe-Couloume, G. F. Slater, E. A. Edwards, B. S. Lollar.** 2000. Hydrogen isotope fractionation during methanogenic degradation of toluene: Potential for direct verification of bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* **34**:4577-4581.
206. **Weiner, J. M., D. R. Lovley.** 1998. Rapid benzene degradation in methanogenic sediments from a petroleum-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microb.* **64**:1937-1939.
207. **White, D. C., J. S. Gouffon, A. D. Peacock, R. Geyer, A. Biernacki, G. A. Davis, M. Pryor, M. B. Tabacco, K. L. Sublette.** 2003. Forensic analysis by comprehensive rapid detection of pathogens and contamination concentrated in biofilms in drinking water systems for water resource protection and management. *Environ. Forensics* **4**:63-74.
208. **Whiticar, M. J.** 1999. Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chem. Geol.* **161**:291-314.
209. **Widdel, F., R. Rabus.** 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotech.* **12**:259-276.
210. **Wiedemeier, T. H., Rifai, H.S., Newell, C.J., Wilson, J.T.** 1999. Natural attenuation of fuels and chlorinated solvents in the subsurface, 1 ed. John Wiley & Sons, INC., New York.
211. **Wilkins, P. C., H. Dalton, C. J. Samuel, J. Green.** 1994. Further evidence for multiple pathways in soluble methane-monooxygenase-catalysed oxidations from the measurement of deuterium kinetic isotope effects. *Eur. J. Biochem.* **226**:555-60.
212. **Williams, G. M., R. W. Pickup, S. F. Thornton, D. N. Lerner, H. E. H. Mallinson, Y. Moore, C. White.** 2001. Biogeochemical characterisation of a coal tar distillate plume. *J. Contam. Hydrol.* **53**:175-197.
213. **Wilson, B. H., G. B. Smith, J. F. Rees.** 1986. Biotransformations of selected alkylbenzenes and halogenated aliphatic-hydrocarbons in methanogenic aquifer material - A microcosm study. *Environ. Sci. Technol.* **20**:997-1002.
214. **www.isodetect.de**
215. **Zengler, K., H. H. Richnow, R. Rossello-Mora, W. Michaelis, F. Widdel.** 1999. Methane formation from long-chain alkanes by anaerobic microorganisms. *Nature* **401**:266-269.
216. **Zwank, L., M. Berg, M. Elsner, T. C. Schmidt, R. P. Schwarzenbach, S. B. Haderlein.** 2005. New evaluation scheme for two-dimensional isotope analysis to decipher biodegradation processes: Application to groundwater contamination by MTBE. *Environ. Sci. Technol.* **39**:1018-1029.
217. **Zwank, L., M. Berg, T. C. Schmidt, S. B. Haderlein.** 2003. Compound-specific carbon isotope analysis of volatile organic compounds in the low-microgram per liter range. *Anal. Chem.* **75**:5575-5583.

DANKSAGUNG

Einen ganz besonderen Dank widme ich Dr. Hans-Hermann Richnow, der zu jeder Zeit für Diskussionen, Problemlösungen und gute Ideen mir zur Seite stand.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Andreas Dahmke für die Annahme meines Promotionsthemas am Lehrstuhl für Angewandte Geologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Ein herzliches Dankeschön gilt den Diplomandinnen Jana Bauer, Katja Theuerkorn und Ilka Herklotz, die mit ihren Arbeiten wertvolle Beiträge zu meinem Promotionsthema leisteten.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Matthias Gehre und Ursula Günther, die stets für die Funktionsfähigkeit der Isotopenmesssysteme sorgten und somit wesentlich zur Datenerhebung meiner Arbeit beitrugen.

Für die Korrekturlesung meiner Dissertation danke ich ganz herzlich Nicole Stelzer, Stefan Feisthauer, Dr. Stefanie Weber und Grit Neumann.

Für die Unterstützung bei der Organisation von Projekten und Messkampagnen am Standort Zeitz möchte ich mich recht herzlich bei Prof. Dr. Holger Weiß und Ralf Trabitzsch bedanken.

Die Daten, die im Rahmen des RETZINA-Projektes zur Erkundung des Standortes Zeitz erhoben wurden, waren eine wesentliche Grundlage für meine Arbeit. Dafür bedanke ich mich vor allem bei Dr. Andrea Vieth, Dr. Stefan Gödeke, Dr. Thorsten Wachter, Dr. Frank Dethlefsen und Michael Dietze.

Ein großer Dank gilt auch Werner Kletzander, Jörg Ahlheim und Dr. Hansjörg Weiß, die mir bei Feldarbeiten mit Rat und Tat sowie technischem Know-how geholfen haben.

Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. Matthias Kästner, Prof. Dr. Mario Schirmer und Prof. Dr. Frank-Dieter Kopinke für Ihre hilfreichen Diskussionen bei fachlichen Fragen bedanken.

Auf Grund der Hilfsbereitschaft bei Anliegen jeder Art im gesamten Zeitraum meiner Promotion danke ich recht herzlich Dr. Carsten Vogt, Dr. Ivonne Nijenhuis, Dr. Uwe Kappelmeyer und Dr. Hermann-Josef Heipieper.

Der Doktorandenriege des Departments Isotopenbiogeochemie und Bioremediation sei besonders gedankt für Kooperationen, fachliche Anregungen, Diskussionen und Korrekturlesungen. Ich kann leider nicht alle aufzählen, aber erwähnt sei hier Petra Bombach, Steffi Herrmann, Ilka Duldhardt, Claudia Hoffmann-Jähnicke, Reimo Kindler und Gwenaël Imfeld.

Bei der Unterstützung im Rahmen von mathematischen und analytischen Fragestellungen bedanke ich mich herzlich bei Dr. Martin Thullner, Jens Müller und Dr. Kay Knöller.

Durch die Kooperation mit Mitarbeitern des Instituts für Grundwasserökologie am Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (GSF) konnten wichtige Erkenntnisse im Rahmen meiner Promotion erlangt werden. Besonders danke ich PD Dr. Rainer U. Meckenstock, Prof. Dr. Piotr Maloszewski, Dr. Christian Griebler und Willibald Stichler.

Ein großes Dankeschön möchte ich auch an Kerstin Ethner, Ines Mäusezahl, Inge Haufe und Liane Paul richten, die mich in labortechnischen und UFZ-bürokratischen Belangen unterstützt haben.

Last but not least möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, auf deren Unterstützung ich während meiner gesamten Promotion zählen konnte.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit von mir selbständig angefertigt wurde, abgesehen von der Beratung durch meinen Betreuer und unter Anwendung der entsprechend gekennzeichneten Hilfsmittel und Literaturangaben. Mit Ausnahme der gekennzeichneten Teile ist die Arbeit noch nicht veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht.

Leipzig, 06.09.2006

LEBENS LAUF



Name:		Anko Fischer
Geburtsdatum:		2. August 1977
Geburtsort:		Zwickau
Nationalität:		deutsch
Familienstand:		ledig
Schulbildung:	09/84 – 07/88	Grundschule "Dr. Theodor Neubauer" in Kirchberg
	09/88 – 07/92	Mittelschule "Dr. Theodor Neubauer" in Kirchberg
	09/92 – 06/96	Gymnasium "Christoph Graupner" in Kirchberg
Schulabschluss:	06/96	Abitur mit Note 2,0
Wehrdienst:	11/96 – 08/97	7./ Wachbataillon BMVg in der "Julius-Leber-Kaserne" Berlin
Studium:	10/97 – 09/99	Grundstudium der Geoökologie an der TU Bergakademie Freiberg
	09/99	Vordiplom mit der Note 1,9
	10/02 - 05/03	Diplomarbeit mit dem Thema "Charakterisierung der Quellen und Senken von Methan durch Isotopenanalyse in einem BTEX-kontaminierten Grundwasserleiter" am Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle (UFZ) in der Sektion Sanierungsforschung
	06/03	Abschluss des Studiums mit der Note 1,4
Praktische Tätigkeiten:	09/01 – 10/01	Fachpraktikum in der Umweltschutzabteilung des VW-Werkes Salzgitter
	11/01 – 01/02	Fachpraktikum an der Unteren Abfall- und Bodenschutzbehörde des Landratsamtes Zwickauer Land
	06/02 – 09/02	Fachpraktikum am Umweltforschungszentrum Leipzig, Sektion Sanierungsforschung
	03/02 – 12/02	Nebenberufliche Tätigkeit als Betreuer von Außenarbeiten für die Erstellung von Baugrund- und Umweltgutachten bei der Gesellschaft für Angewandte Geowissenschaften mbH GEONORM in Glauchau
	seit 07/03	Doktorand am Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle (UFZ) im Department Isotopenbiogeochemie und der Arbeitsgruppe Angewandte Geologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

PUBLIKATIONSLISTE

Artikel:

- Fischer, A.; Vieth, A.; Knöller, K.; Wachter, T.; Dahmke, A.; Richnow, H. H.: Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus mit Hilfe von isotopenchemischen Methoden. *Grundwasser*. 2004, 9, 159-172.
- Fischer, A.; Bauer, J.; Dietze, M.; Gödeke, S.; Schirmer, M.; Weiß, H.; Kästner, M.; Meckenstock, R. U.; Richnow, H. H.: Konzept zur Quantifizierung des anaeroben *in situ*-Schadstoffabbaus in BTEX-kontaminierten Grundwasserleitern mittels Deuterium-markierter Substanzen. *Altlastenspektrum*. 2005, 14, 5-12.
- Fischer, A.; Stelzer, N.; Eisenmann, H.; Richnow, H. H.: Nachweis des mikrobiellen Schadstoffabbaus in Grundwasserleitern. *TerraTech*. 2006, 1-2, 14-17.
- Fischer, A.; Bauer, J.; Meckenstock, R.; Stichler, W.; Griebler, C.; Maloszewski, P.; Kästner, M.; Richnow, H. H.: A multitracer test proving the reliability of stable isotope fractionation analysis for assessing anaerobic degradation in a BTEX contaminated aquifer. *Environ. Sci. Technol.* 2006, 40, 4245-4252.
- Fischer, A.; Theuerkorn, K.; Stelzer, N.; Gehre, M.; Thullner, M.; Richnow, H. H.: Applicability of stable isotope fractionation analysis for the characterization of benzene biodegradation in a BTEX contaminated aquifer. *Environ. Sci. Technol.* 2006, submitted.
- Vieth, A.; Fischer, A.; Kästner, M.; Gehre, M.; Knöller, K.; Wachter, T.; Dahmke, A.; Richnow, H. H.: Isotope fractionation processes used to characterise natural attenuation of organic contaminants. 2003, Proceedings of the 8th International FZK/TNO Conference on Soil-Water Systems (ConSoil), Gent, Belgium, 2384-2391.
- Gödeke, S.; Weiß, H.; Geistlinger, H.; Fischer, A.; Richnow, H.-H.; Schirmer, M.: Strömungs- und Tracer-Transportmodellierung am Natural Attenuation-Standort Zeitz. *Grundwasser*. 2004, 9, 3-11.
- Vogt, C.; Gödeke, S.; Fischer, A.; Knöller, K.; Trabitze, R.; Weiss, H.; Richnow, H. H.; Schirmer, M.: Evidence for benzene mineralization under sulfate-reducing conditions in sand- and pumice-filled columns infiltrated with benzene contaminated groundwater. 2005, Proceedings of the 9th International FZK/TNO Conference on Soil-Water Systems (ConSoil), Bordeaux, France, 1419-1430.
- Kästner, M.; Fischer, A.; Nijenhuis, I.; Geyer, R.; Stelzer, N.; Bombach, P.; Tebbe, C. C.; Richnow, H. H.: Assessment of microbial *in situ*-activity in contaminated aquifers. *Eng. Life Sci.* 2006, 6, 234-251.

- Gödeke, S.; Richnow, H. H.; Weiß, H.; Fischer, A.; Vogt, C.; Borsdorf, H.; Schirmer, M.: Multi component-reactive tracer test for the implementation of enhanced *in situ*-bioremediation at a BTEX-contaminated megasite. *J. Contam. Hydrol.* 2006, in press.
- Stelzer, N.; Fischer, A.; Kästner, M.; Richnow, H. H.: Analyse des anaeroben *in situ*-Benzolabbaus anhand von Mikrokosmen (BACTRAPs) und Isotopenfraktionierungsprozessen. *Grundwasser.* 2006, akzeptiert.
- Gödeke, S.; Geistlinger, H.; Fischer, A.; Richnow, H. H.; Schirmer, M.: Simulation of a reactive tracer experiment using stochastic hydraulic conductivity fields. *Environ. Geol.* 2006, in prep.

Konferenzvorträge:

- Fischer, A.; Toikka, T.; Probst, F.; Rohwerder, T.; Häggblom, M.; Somsamak, P.; Richnow, H. H.: Compound-specific stable isotope analysis (CSIA) - A useful method for monitoring methyl *tert*-butyl ether (MTBE) biodegradation in contaminated aquifers. 2004, 2nd European Conference on MTBE, Barcelona, Spain, pp. 36-38.
- Fischer, A.; Bauer, J.; Meckenstock, R.; Kästner, M.; Richnow, H. H.: A multitracer experiment to quantify the *in situ*-biodegradation of toluene in a BTEX-contaminated aquifer. 2005. 2nd European Conference on Natural Attenuation, Soil and Groundwater Risk Management, Frankfurt am Main, Germany, pp. 21-22.
- Fischer, A.; Bauer, J.; Meckenstock, R.; Griebler, C.; Stichler, W.; Richnow, H. H.: A multitracer experiment to quantify the *in situ*-biodegradation of toluene in a BTEX-contaminated aquifer. 2005, The Joint International Symposia for Subsurface Microbiology (ISSM) and Environmental Biogeochemistry (ISEB), Jackson Hole, Wyoming, USA, p. 99.
- Nijenhuis, I.; Stelzer, N.; Fischer, A.; Kästner, M.; Richnow, H. H.: Isotope concepts to assess natural attenuation in contaminated aquifers. 2005, The General Assembly of the European Geosciences Union (EGU), Vienna, Austria, p. 179.
- Vogt, C.; Gödeke, S.; Fischer, A.; Knöller, K.; Trabitsh, R.; Weiss, H.; Richnow, H. H.; Schirmer, M.: Evidence for benzene mineralization under sulfate-reducing conditions in sand- and pumice-filled columns infiltrated with benzene contaminated groundwater. 2005, Proceedings of the 9th International FZK/TNO Conference on Soil-Water Systems (ConSoil), Bordeaux, France, pp. 1419-1430.
- Kästner, M.; Fischer, A.; Nijenhuis, I.; Geyer, R.; Stelzer, N.; Bombach, P.; Tebbe, C. C.; Richnow, H. H.: Assessment of microbial *in situ*-activity in contaminated aquifers. 2006, International Conference on Environmental Biotechnology (ISEB, ESEB, JSEB), Leipzig, Germany.

Konferenzposter:

- Fischer, A.; Bauer, J.; Eckerl, C.; von Seggern, D.; Dietze, M.; Meckenstock, R.; Richnow, H. H.: Multi-Komponenten-Tracereperiment zur Quantifizierung des *in situ*-Schadstoffabbaus - erste Ergebnisse. 2003, 5. Symposium Natural Attenuation, Frankfurt am Main, Germany, S. 173-175.
- Fischer, A.; Nijenhuis, I.; Stelzer, N.; Gödeke, S.; Weiss, H.; Schirmer, M.; Kästner, M.; Richnow, H. H.: Isotope concepts to assess natural attenuation in contaminated aquifers. 2004. 4th International Conference on Groundwater Quality, Waterloo, Canada, p. 35.
- Fischer, A.; Bauer, J.; Griebler, C.; Meckenstock, R.; Stichler, W.; Richnow, H. H.: A multitracer experiment to quantify the *in situ*-biodegradation. 2005, 1st German American Workshop on Biogeochemical Gradients, Tübingen, Germany, p. 9.
- Fischer, A.; Bauer, J.; Kästner, M.; Griebler, C.; Stichler, W.; Meckenstock, R.; Richnow, H. H.: Multitracer-Experiment zur Charakterisierung des *in situ*-Schadstoffabbaus in einem BTEX-kontaminierten Grundwasserleiter mittels verschieden deuterierten Toluolspezies. 2005, Workshop zu Perspektiven molekularer und isotopischer Methoden zum Nachweis des natürlichen Schadstoffabbaus in Böden, Braunschweig, Germany, S. 105-107.
- Fischer, A.; Vogt, C.; Herrmann, S.; Stelzer, N.; Theuerkorn, K.; Eisenmann, H.; Richnow, H. H.: Monitoring *in situ*-benzene biodegradation within an anoxic BTEX contaminated aquifer using stable isotope fractionation analysis (SIFA). 2006, VAAM-Jahrestagung 2006, Jena, Germany, p. 129.
- Fischer, A.; Vogt, C.; Herrmann, S.; Stelzer, N.; Theuerkorn, K.; Herklotz, I.; Thullner, M.; Richnow, H. H.: Characterization and assessment of BTEX biodegradation within aquifers using compound-specific stable isotope analysis (CSIA). 2006, HydroEco 2006-International Multidisciplinary Conference on Hydrology and Ecology, Karlovy Vary, Czech Republic.
- Vieth, A.; Fischer, A.; Kästner, M.; Gehre, M.; Knöller, K.; Wachter, T.; Dahmke, A.; Richnow, H. H.: Isotope fractionation processes used to characterise natural attenuation of organic contaminants; 2003; Proceedings of the 8th International FZK/TNO Conference on Soil-Water Systems (ConSoil), Gent, Belgium, 2384-2391.
- Stelzer, N.; Geyer, R.; Fischer, A.; Kästner, M.; Miltner, A.; Richnow, H. H.: Assessment of microbial *in situ*-activity using "BACTRAPs" with ¹³C-labelled substrates. 2004, 4th International Conference on Groundwater Quality, Waterloo, Canada, p. 35.
- Vogt, C.; Gödeke, S.; Treutler, H.-C.; Fischer, A.; Weiß, H.; Schirmer, M.; Richnow, H.

H.: Benzene oxidation under sulfate reducing conditions: Mass balances, degradation rates and isotope fractionation in columns running under close to *in situ*-conditions. 2006, VAAM-Jahrestagung 2006, Jena, Germany, p. 127.

ANHANG

ANHANG A

2. Revised Version

**Multi Tracer Test for the Implementation of Enhanced In-Situ
Bioremediation at a BTEX-Contaminated Megasite**

**Stefan Gödeke^{1,#}, Hans-Hermann Richnow², Holger Weiß¹, Anko Fischer²,
Carsten Vogt³, Helko Borsdorf⁴, Mario Schirmer^{5,*}**

**UFZ – Centre for Environmental Research Leipzig-Halle in the Helmholtz
Association,**

**¹Department of Groundwater Remediation, ²Department of Isotope
Biogeochemistry, ³Department of Environmental Microbiology,
⁴Department of Analytics, ⁵Department of Hydrogeology,
Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Germany**

**# New address: MWH Australia Pty Ltd, 178 St Georges Terrace, 6000
Perth, Western Australia, Australia**

* Corresponding author

Phone: ++ 49 341 235 3981
Fax: ++ 49 341 235 2126
E-mail: mario.schirmer@ufz.de

May 09, 2006

1 **Abstract**

2

3 At the Centre for Environmental Research Leipzig-Halle (UFZ) research site in Zeitz,
4 Germany, benzene contaminates the lower of two aquifers with concentrations of up to 20
5 mg/l. Since the benzene plume has a minimum length of approximately 1 km, enhanced
6 natural attenuation measures are being considered as a remediation strategy. This study
7 describes the performance and evaluation of a multi-species reactive tracer test using the
8 tracers fluorescein and bromide as conservative tracers and toluene as reactive tracer.
9 Sampling was performed over a period of six months using a detailed network of multilevel
10 sampling wells. Toluene was only slightly retarded in comparison to bromide, whereas
11 fluorescein was retarded considerably stronger. Therefore, it was not possible to use
12 fluorescein as an in situ tracer for the determination of groundwater velocities. The ionic
13 nature of fluorescein is assumed to be the major reason for its retardation. The results show
14 that the infiltration conditions were suitable to produce a wide spreading of the tracer front
15 along the full thickness of the aquifer. Thus, a large aquifer volume can be treated in future
16 enhanced bioremediation measures. The total quantity of infiltrated toluene (24 l) was
17 degraded under sulfate-reducing conditions over a flow path of 50 m. Benzylsuccinate was
18 identified as a metabolite of toluene degradation under sulfate-reducing conditions at this site.
19 The modelling results show that toluene degradation was described more accurately using
20 Monod kinetics than first-order kinetics. Since toluene was only slightly retarded in
21 comparison to bromide, sorption and desorption processes were considered to be negligible.

22

23

24 **Keywords:** Tracer test, Monod, fluorescein, first-order kinetics, toluene, sulfate-reduction,
25 enhanced bioremediation

26

27 **1 Introduction**

28

29 Numerous remediation approaches have been proposed for the treatment of organic chemicals
30 in groundwater. They can be generally divided into active and passive technologies (Norris et
31 al., 1993). Active technologies, which often involve continuous pumping, aim at a high
32 control over the system hydraulics and low capital costs, whereas passive technologies such
33 as permeable reactive barriers aim at low operating costs and a successful long-term
34 performance (Devlin et al., 2004).

35 Over the past years, special emphasis has been placed on in-situ bioremediation strategies,
36 which offer potential low-cost solutions. Enhanced in-situ bioremediation is an approach
37 which has been successfully used for the anaerobic stimulation of BTEX (benzene, toluene,
38 ethylbenzene and the xylene isomers) degradation in contaminated aquifers (Schreiber and
39 Bahr, 2002; Eckert and Appelo, 2002; Anderson and Lovley, 2000). It involves the addition
40 of electron acceptors (e.g., nitrate or sulfate) and/or nutrients using either continuous or
41 pulsed injection schemes. However, the stimulation of the anaerobic degradation of benzene
42 as the contaminant of highest environmental concern among the BTEX compounds has only
43 been successful in one field experiment so far (Anderson and Lovley, 2000). This stimulation
44 was achieved by the injection of sulphate.

45 In comparison to benzene, toluene is more easily degraded in contaminated aquifers
46 (Edwards et al., 1992; Chapelle et al., 1996). More field studies are necessary to determine the
47 conditions under which enhanced in-situ bioremediation for BTEX contaminants can be
48 successful. Therefore, knowledge is required regarding the volume of contaminated
49 groundwater, which can be treated by the addition of electron acceptors or nutrients. Thus, an
50 investigation is required to assess 1) the infiltration of electron acceptors and nutrients, 2) the
51 mixing processes within groundwater and 3) the stimulation of the microbial activity. In terms
52 of that, not only the groundwater flow direction and velocity at the site have to be known, but

53 also the physical and chemical heterogeneity of the aquifer (Cozzarelli et al., 1999). It was
54 shown that the solute transport of the infiltrated compounds can be greatly affected by
55 physical and chemical aquifer heterogeneities (Zheng and Gorelick, 2003). The
56 characterization of these heterogeneities makes depth-determined groundwater sampling
57 inevitable (e.g., Schirmer et al., 1995).

58 In this respect, tracer tests are best suited to analyze the dispersive transport of the tracers and
59 to investigate the site-specific hydraulic conditions. Reactive tracer tests have been used to
60 evaluate the in-situ microbial degradation potential for specific compounds, to study the
61 reactive transport under variable chemical conditions, and to provide data sets for the
62 calibration of reactive transport models (Thierrin et al., 1995; Davis et al., 2000; Hess et al.,
63 2002; Julian et al., 2001; Sandrin et al., 2004). A review of recent tracer techniques and trends
64 has been published by Ptak et al. (2004).

65 This paper describes the performance and evaluation of a multi-component reactive tracer test
66 (MRTT) at the research site of the Centre for Environmental Research Leipzig-Halle (UFZ)
67 near the city of Zeitz, Germany (Figure 1). The lower aquifer was investigated in this study in
68 order to evaluate future enhanced in situ bioremediation measures. Bromide and fluorescein
69 ($C_{20}H_{10}O_5Na_2$) were used as conservative tracers and toluene as reactive tracer. Toluene was
70 chosen as BTEX-model compound in order to investigate its in-situ microbial degradation
71 potential and its distribution and retardation in comparison to the conservative tracers.

72 The goal of the tracer test was to study the distribution of the tracers downstream of the
73 infiltration well using a network of multilevel sampling (MLS) wells, and to provide a data set
74 for the calibration of the local groundwater model. Since possible future enhanced natural
75 attenuation measures aim at treating a large aquifer volume, we intended to produce a rather
76 wide tracer plume.

77

78 **2 Site Description**

79 The MRTT was carried out on the site of a former lignite hydrogenation plant, where benzene
80 was produced from 1963-1990 (Schirmer et al., 2006; Gödeke et al., 2004). During the
81 production period, large amounts of contaminants, with benzene as the predominant
82 compound causing concern, entered the groundwater and over the years reached a depth of 30
83 m below ground.

84 At the site two main heterogeneous aquifers can be distinguished, separated by a lignite and
85 clay layer (Figure 2). Contaminant plumes have developed in both aquifers, showing that the
86 lignite and clay unit is discontinuous at the site. Groundwater monitoring showed that the
87 benzene plume of the lower, confined aquifer has a minimum length of approximately 1 km,
88 indicating that natural attenuation (NA) processes are not very effective for the lower aquifer.
89 Here, benzene concentrations are as high as 12 mg/l 800 m downstream from the source zone.
90 Therefore, the potential of enhanced NA (ENA) within the lower aquifer which is strictly
91 anoxic was investigated by the MRTT. The aquifer thickness varies between 12 and 20 m.
92 The sediments consist of glacio-fluvial deposits and contain an organic carbon content of
93 approximately 0.1 % ($f_{oc} = 0.001$, DIN ISO 10694) and a mean effective porosity of
94 approximately 0.22. The water table varies between 8 and 10 m below ground surface (bgs)
95 depending on the time of year and location.

96 In comparison to the upper aquifer, the lower one contains more sandy material and fewer
97 layers of gravel. Typical sedimentological features are “fining upwards” sequences. Subrosion
98 has caused significant vertical displacement throughout the stratigraphic units. Therefore, the
99 depths of the stratigraphic horizons vary.

100 Generally toluene, xylene and ethylbenzene concentrations are below the detection limit
101 within the investigated aquifer section. Monitoring data from different sampling campaigns
102 performed over the course of one year at the lower aquifer showed that an order of decay
103 exists at the site which is (from preferential to less preferential degradable compound):
104 toluene > *m,p*-xylene > ethylbenzene > benzene (Gödeke et al., 2002). O-xylene

105 concentrations are generally below the detection limit for the lower aquifer. Sulfate is the
106 predominant terminal electron acceptor (Vieth et al., 2005; Fischer et al., 2004; Wachter et
107 al., 2004; Schirmer et al., 2006).

108 The variance of the ln-transformed hydraulic conductivities ($\sigma^2 \ln K$) based on sieve analyses
109 using the method proposed by Beyer (Beyer, 1964) exemplifies the geological heterogeneity
110 at the site (Table 1). The variances added up to 2.87 for the upper and 1.84 for the lower
111 aquifer. These values are in the range of values determined by Ptak and Teutsch (1994) and
112 higher than reported for other field sites, such as the Borden and Cape Cod field site with
113 values between 0.1 and 0.3 (Sudicky 1986; Hess et al., 1992). However, the variance was
114 significantly lower than the value of 4.5 reported by Boggs et al. (1992) for the Columbus
115 field site.

116

117 **3 Materials and Methods**

118 **3.1 Hydrological Model.**

119 The flow model based on the geological model developed by Györösi (2001) was used for the
120 planning and implementation of the tracer experiment. Based on the simulations using GMS
121 4.0 (Groundwater Modeling System), the wells to be equipped with washer packer systems
122 and the amount of tracer mass were determined. The flow model covers an area of 250 m x
123 250 m. Since the tracer test was performed in the lower aquifer, only this aquifer was included
124 in the model. A discretization of 5 m x 5 m x 0.5 m was chosen. The model was refined in the
125 tracer test area to 1 m x 1 m x 0.5 m. The total number of model layers is 42. The large
126 number of model layers was necessary because the screens of infiltration and pumping wells
127 are located at different depth levels. Six different geologic materials were identified: coal,
128 clay, sand, coarse sand, fine gravel and silt. For a further refinement, additional materials
129 representing transitions between the main materials were included for the tracer test area.
130 Constant head cells were used as boundary conditions on all sides of the model and set at a

131 distance far from the tracer test area in order to rule out any influence. The calibration was
132 accomplished with groundwater level data from the same month in which the tracer test was
133 being performed. Twenty-four monitoring wells were included in the calibration process. The
134 horizontal hydraulic conductivities were set according to the results of the sieve analyses
135 (Beyer, 1964; Gödeke et al., 2004; Table 1). The vertical hydraulic conductivities were
136 generally assumed to be 1/10 of the horizontal hydraulic conductivities. With the data from
137 the tracer test, the model was recalibrated in a subsequent step (OSWER, 1997). During
138 calibration, the boundary conditions were iteratively adjusted. For the hydraulic heads, an
139 absolute mean error of 3.4 cm was achieved, which was a very good calibration result.

140 The volume and time of the tracer injection was determined based on transport simulations
141 using the local numerical flow model. Sufficiently short time intervals were chosen for the
142 simulations to ensure that the Courant number remained below one. Simulations were
143 performed using the MOC (method of characteristics) algorithm (Leonard, 1988). Resulting
144 mass balance errors which are known to occur in connection with sharp concentration fronts
145 and high flow velocities were not observed (data not shown). The tracer experiment has been
146 performed within the framework of a long-term infiltration experiment; groundwater has been
147 injected before the experiment at a rate of 3.5 m³/h over a monitoring period of 15 months.
148 Therefore, steady-state conditions were assumed for the numerical simulations.

149 **3.2 Tracer injection.**

150 The tracers were injected during the infiltration experiment over a time period of 24 hours.
151 The infiltration concentrations were 480 mg/l for bromide, 23 mg/l for fluorescein and 245
152 mg/l for toluene (Table 2). Especially for toluene, it was important to achieve complete
153 dissolution in the groundwater. Therefore, toluene was mixed with the volume flow using a
154 centrifugal pump (Grundfos CRN3, Denmark). Since it was intended to achieve a wide tracer
155 plume and thus a large investigated aquifer section, the infiltration of groundwater with a high

156 pumping rate was continued after the tracer injection. Therefore, the pumping and infiltration
157 rate of 3.5 m³/h was kept constant throughout the tracer test.

158 In order to determine the tracer breakthrough curves (BTCs) and the vertical distribution of
159 the tracers, 11 fully screened wells (6 inches) positioned along several control planes (Figure
160 1) were equipped with washer packer systems (WPS; Innovative Messtechnik Weiss (IMW),
161 Germany). The monitoring wells of the first control plane are located 11 to 16 m from the
162 infiltration well. The monitoring wells of the second control plane are at a distance of 27 to 38
163 m, and the wells of the third control plane are situated 55 to 57 m far away from the
164 infiltration well. The minipressure pumps (MPP) of the sampling ports in each well were
165 separated by washers. Thus, any vertical flow inside the well is prevented. The washers made
166 of high density polyethylene (HDPE) were manufactured according to the well diameter (2 to
167 6 inches) and clamped with bells at the designated positions. Three to five multilevel
168 sampling ports spaced 2.5 to 5 m apart were installed for each well. A stable connection
169 between the different sampling ports was created using nested polyethylene tubes and through
170 a stainless steel cable inside.

171 **3.3 Sampling of tracers and hydrochemical parameters**

172 Sampling was performed over a period of six months. The sampling pumps were operated via
173 the electropneumatic pump controllers (Grips, Tübingen, Germany) at a pumping rate of 50 to
174 100 ml/min. During tracer breakthrough, samples were taken from the wells where tracers
175 arrived up to five times a day for each depth. With decreasing tracer concentrations, the
176 sampling was reduced to once per day and later to three times a week.

177 Sampling was conducted to analyze the concentrations of tracers fluorescein, bromide and
178 toluene as well as sulfate and benzene. Fluorescein samples were collected in 150-ml brown
179 screw-cap glass bottles, and samples for bromide and sulfate were collected in 150-ml HDPE
180 screw-cap bottles. BTEX samples were collected in 250-ml brown glass flasks with a glass
181 plug.

182 **3.4 Analyses of tracers and hydrochemical parameters**

183 Dissolved oxygen, pH, redox and temperature were measured using appropriate electrodes
184 (WTW, Weilheim, Germany). In the first two weeks of the tracer test, BTEX and sulfate were
185 measured on site. Fluorescein was measured on site during the entire tracer test, enabling real-
186 time field determination of tracer breakthrough.

187 For the detection of fluorescein, a mobile fluorometer equipped with a low-pressure mercury
188 lamp (OCEAN Optics, USA) was used.

189 The gas chromatographic measurements of the BTEX concentrations were performed using a
190 mobile gas chromatograph (GC) (ECH 87.20, ELEKTROCHEMIE HALLE, Germany)
191 coupled with a headspace sampler (DANI HSS 86.50, DANI, Italy), (Borsdorf et al., 2002).
192 10 ml of water samples were poured into headspace vials and then equilibrated at 80°C over
193 30 min in the headspace samples. After equilibration, the samples were injected by the
194 headspace sampler into the GC. There the analytes were separated using a SE-54 capillary
195 column (30 m x 0.32 i.d.; film thickness: 1 µm, Agilent Technologies, USA). The column
196 temperature program was as follows: 40°C 2 min isothermal, 8°C/min to 150°C, 150°C 2 min
197 isothermal. The substances were detected using a photoionization detector (10.2 eV). The
198 system was calibrated for concentrations up to 3 mg/L. The detection of higher concentrations
199 requires the dilution of water samples. The detection limits for benzene and toluene were 1
200 and 4 µg/l, respectively.

201 Ion chromatography was used to detect bromide and sulfate. The ion chromatograph DX 500
202 (Dionex, Sunnyvale, USA) was equipped with an autosampler AS 3500, a gradient pump GP
203 40 and a conductivity detector CD20 with a thermo stated conductivity cell (35°C). The
204 analytes were separated using an anion exchange guard column IonPac AG 4 SC in series
205 with the analytical column IonPac AS 4 SC (Dionex, Sunnyvale, USA), and an eluent
206 consisting of 1.7 mM NaHCO₃ / 1.8 mM Na₂CO₃. Samples were diluted to the appropriate
207 concentration with de-ionized water (Seral, Ransbach, Germany).

208 **3.5 Numerical Modelling**

209 Dispersivities were calculated from the BTCs of the tracer bromide to characterize the
210 spreading of the tracer mass and to find reliable input values for the numerical model.

211 Dispersivities were determined using the method developed by Sauty (1980) and by moment
212 analyses (Vanderborght and Vereecken, 2001; Jury and Roth, 1990).

213 Assuming an instantaneous tracer injection in a 1-dimensional uniform flow field, Equation 1
214 can be applied (Sauty, 1980; Akin, 2001):

215
$$C_R(t_R, P) = \frac{K'}{t_R^{1/2}} \exp\left(-\frac{P}{4t_R} \cdot (1-t_R)^2\right) \quad (1)$$

216 with

217
$$K' = t_{R\max}^{1/2} \exp\left(\frac{P}{4t_{R\max}} (1-t_{R\max})^2\right) \quad (2)$$

218 and

219
$$t_{R\max} = (1+P^{-2})^{1/2} - P^{-1} \quad (3)$$

220

221 with P as the Peclet number, calculated from the distance L [m] between the monitoring well
222 and the infiltration well, field velocity v_x [m/d] and the dispersion coefficient D_L [m²/d]:

223

224
$$P = v_x L / D_L \quad (4)$$

225

226 C_R stands for the relationship between measured concentration (C) and peak concentration
227 (C_{\max}), t_R stands for dimensionless time, and $t_{R\max}$ stands for the dimensionless time at which
228 the peak concentration occurs.

229 The longitudinal dispersivity (α_L) can then be calculated using the equation:

230

231
$$\alpha_L = L/P \quad (5)$$

232

233 The BTCs for different Peclet numbers were compared to the transformed BTCs using a least-
234 squares technique.

235 The tailing of the BTCs could only be described insufficiently using Sauty's 1-D method.

236 Therefore, dispersivities were also calculated by means of moment analysis (e.g., Jury and

237 Roth, 1990; Vanderborcht and Vereecken, 2001). The first two normalized temporal moments

238 (τ_1, τ_2) of a BTC are:

$$239 \quad \tau_1(x) = \int_0^{\infty} t c(x, t) dt \quad (5)$$

$$240 \quad \tau_2(x) = \int_0^{\infty} t^2 c(x, t) dt \quad (6)$$

241 with

$$242 \quad c(x, t) = \frac{C(x, t)}{\int_0^{\infty} C(x, t) dt} = \frac{C(x, t)}{T_0(x)} \quad (7)$$

243

244 $C(x, t)$ [ML^{-3}] describing the total (measured) concentration, $c(x, t)$ [T^{-1}] the normalized

245 concentration at position x for time t , and $T_0(x)$ [ML^{-3}T] the area under the BTC at position x .

246 With the assumption that the solute tracer mass is applied instantaneously and that a large

247 amount of tracer mass spreads in the main flow direction, the following is valid:

$$248 \quad \mu_t(x) = \tau_1(x) \quad (8)$$

249 with $\mu_t(x)$ describing the average arrival time of the tracer at position x . The variance of the

250 tracer arrival time ($\sigma_t^2(x)$) can be described by:

$$251 \quad \sigma_t^2(x) = \tau_2(x) - \tau_1^2(x) \quad (9)$$

252 The average arrival velocity ($v_{eq}(x)$) and dispersivity ($\lambda_{eq}(x)$) of the BTC are characterized

253 by:

254 $v_{eq}(x) = x_1 / \mu_t(x)$ (10)

255 and

256 $\lambda_{eq}(x) = \frac{\sigma_t^2(x)x_1}{2\mu_t(x)^2}$ (11)

257

258 Retardation factors for toluene and fluorescein were calculated from the ratio of the
259 groundwater flow velocities of conservative and reactive tracers (Käss, 1992; Table 3) using
260 the equation:

261

262 $R = \frac{v_{con}}{v_{reac}}$ (12)

263

264 with R being the retardation factor, v_{con} the groundwater flow velocity of the conservative
265 tracer, and v_{reac} the field velocity of the reactive tracer.

266 To estimate the amount of toluene degradation, the BTCs of the tracers toluene and bromide
267 were compared. For the calculations, it was important that the tracer-breakthroughs had been
268 completely recorded beforehand. The BTCs of bromide and toluene were integrated and both
269 areas divided. Subsequently, the resulting quotient was compared to the injection ratio of
270 toluene and bromide, and the percentage of biodegradation of toluene was estimated using
271 this discrepancy.

272 The degradation of the reactive tracer toluene was simulated using first-order kinetics and
273 Monod kinetics. Monod kinetics were chosen in order to take the growth of microorganisms
274 into account (Monod, 1949). Several derivations of the Monod expression have been used,
275 including the multiple Monod equation, in which biodegradation is affected by the
276 concentrations of all substances participating in the reaction. Examples of the simulation of

277 contaminant degradation using Monod kinetics are provided by Rifai and Bedient (1990),
 278 Reddy et al. (1996) or Clement et al. (1998), among others. Alfnes et al. (2004) used Monod
 279 kinetics to simulate the degradation of toluene and o-xylene in the unsaturated zone. Schirmer
 280 et al. (2000) simulated the degradation of gasoline in the Borden Aquifer based on laboratory-
 281 derived kinetic Monod parameters (Schirmer et al., 1999). A simplification of the multiple
 282 Monod equation is the double Monod equation, in which biodegradation is limited by two
 283 substances, usually the substrate and one electron acceptor. In this study, simulations were
 284 performed using the double Monod module implemented in RT3D (Clement, 1997). The
 285 simulations were performed in a transport window with the dimensions 100 m x 65 m x 13 m.
 286 Transport calculations with a conservative tracer showed that the simulated concentrations of
 287 the conservative tracer were the same for the transport window and for the model as a whole.
 288 Thus, the transport window was used for the calculations. A change in hydraulic
 289 conductivities or effective porosities (e.g. bioclogging) is not taken into account in the model.
 290 The model assumes that the degradation reactions take place in the aqueous phase. The
 291 reaction terms of the coupled partial differential equations for the electron donor (13), the
 292 electron acceptor (14), the dissolved microorganisms concentration (15) and the
 293 microorganisms concentration (16) for the solid phase are:

$$294 \quad \frac{d[S]}{dt} = -\frac{\mu_m}{R_D} \left([X] + \frac{\rho\tilde{X}}{\phi} \right) \left(\frac{[S]}{K_D + [S]} \right) \left(\frac{[A]}{K_A + [A]} \right) \quad (13)$$

$$295 \quad \frac{d[A]}{dt} = -\frac{Y_{A/D}\mu_m}{R_A} \left([X] + \frac{\rho\tilde{X}}{\phi} \right) \left(\frac{[S]}{K_D + [S]} \right) \left(\frac{[A]}{K_A + [A]} \right) \quad (14)$$

$$296 \quad \frac{d[X]}{dt} = Y_{X/D}\mu_m \left([X] + \frac{\rho\tilde{X}}{\phi} \right) \left(\frac{[S]}{K_D + [S]} \right) \left(\frac{[A]}{K_A + [A]} \right) + \frac{K_{det}\rho\tilde{X}}{\phi} - K_{att}[X] - K_e[X] \quad (15)$$

$$297 \quad \frac{d[\tilde{X}]}{dt} = \frac{K_{att}\rho\tilde{X}}{\phi} - K_{det}[\tilde{X}] + Y_{X/D}\mu_m \tilde{X} \left(\frac{[S]}{K_D + [S]} \right) \left(\frac{[A]}{K_A + [A]} \right) - K_e[\tilde{X}] \quad (16)$$

298

299 with S being the concentration of the electron donor [ML^{-3}], A the concentration of the
300 electron acceptor [ML^{-3}], μ_m the maximum degradation rate [T^{-1}], R_D the retardation
301 coefficient of the electron donor, ρ the soil density, ϕ the porosity, R_A the retardation
302 coefficient of the electron acceptor, X the dissolved microorganisms concentration [M L^{-3}].
303 \tilde{X} describes the bacteria concentration in the solid phase [M M^{-1}], K_D describes the half-
304 saturation constant for the electron donor [M L^{-3}], K_A is the half-saturation constant for the
305 electron acceptor [M L^{-3}], $Y_{X/D}$ the microbial yield coefficient, $Y_{A/D}$ the stoichiometric
306 coefficient between the electron donor and the electron acceptor, K_{att} the bacterial attachment
307 coefficient [T^{-1}], K_{det} the bacterial detachment coefficient [T^{-1}], and K_e the microbial decay
308 rate [T^{-1}].

309 A bacteria exchange between the groundwater and the aquifer matrix (use of K_{att} and K_{det}) is
310 not taken into account in the simulations. However, it is recognized that changes in
311 groundwater chemistry can alter bacterial attachment or detachment rates (Mailloux and
312 Fuller 2003).

313 **3.6 Microbiological Experiments**

314 For the application in the Monod approach, total cell counts in the groundwater were
315 determined by staining, using 4', 6-Diamino-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI; Porter
316 and Feig, 1980). Groundwater was stained with DAPI ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) for 15 minutes and
317 subsequently concentrated onto black polycarbonate filters ($0.2 \mu\text{m}$ pore size; Corning Costar,
318 No. 110656). The filter was washed with particle-free water and mounted on a glass
319 microscope slide in $10 \mu\text{l}$ phosphate-buffered saline/glycerol. DAPI-stained cells were
320 identified and enumerated by means of a fluorescence microscope (Zeiss Axioskop equipped
321 with a filter set for UV excitation).

322 The potential of groundwater samples for toluene degradation under sulfate-reducing
323 conditions was determined in microcosm experiments. Two different groundwater samples
324 were tested: BW BB2 P4, sampled on May 11, 2003 (toluene concentration approx. 33 mg/l),

325 and BW BB2 P4, sampled on May 21, 2003 (toluene concentration approx. 5.5 mg/l). Two
326 sets of microcosms were prepared for each groundwater sample: groundwater without
327 amendments, and groundwater mixed half with anoxic mineral salt medium for sulfate-
328 reducing bacteria, to compensate for possible nutrient limitations.

329 The mineral salt medium contained the following stock ingredients (in g/l): NaCl, 0.5; MgCl₂,
330 0.5; KH₂PO₄, 0.5; NH₄Cl, 0.4; KCl, 0.4; and CaCl₂, 0.1. The medium was completed by
331 adding the following amounts of stock solutions (per l): 30 ml NaHCO₃ (84 g/l, CO₂-
332 saturated), 1 ml SL-10 trace element solution (Overmann, 2004), 5 ml vitamin solution
333 (containing, per mg/l: 4-aminobenzoate, 8; D(+)-biotine, 2; nicotinic acid, 20; Ca-D(+)-
334 pantothenate, 10; pyridoxamine hydrochloride, 30; thiamine dichloride, 20), 1 ml selenite-
335 tungstate solution (containing, per mg/l: NaOH, 500; Na₂SeO₃ x 5 H₂O, 3; Na₂WO₄ x 2 H₂O,
336 4), and 20 ml Na₂SO₄ (142 g/l). Finally, the medium was reduced with a few grains (15-20
337 mg) of sodium dithionite. The pH was adjusted to 7 using HCl (1 M) or NaOH (1 M). All
338 chemicals mentioned were sterilized by filtration or autoclaving and flushed with N₂ (to
339 remove oxygen) before use. The medium and microcosms were prepared in an anoxic glove
340 box (gas atmosphere: 95% nitrogen, 5% hydrogen; Coy Laboratory Products Inc., USA). For
341 preparation of pure groundwater microcosms, 118-ml serum bottles were filled with 100 ml
342 groundwater. For the preparation of nutrient-amended groundwater microcosms, 118-ml
343 serum bottles were filled with 50 ml groundwater and 50 ml mineral salt medium. To create
344 similar toluene concentrations in both types of microcosms, nutrient-amended microcosms
345 were spiked with an appropriate volume of toluene from an anoxic toluene stock solution (5
346 mM toluene, dissolved in distilled water). Each type of microcosm was prepared in triplicate.
347 Single abiotic controls were produced for each type of microcosm by adding HgCl₂ (0.5 g/l).
348 Finally, all bottles were sealed and made gas-tight using teflon-coated butyl rubber stoppers
349 and aluminium crimps (ESWE Analysentechnik Gera GmbH, Germany). The microcosms

350 were incubated statically at 14°C in the dark and periodically sampled using syringes for
351 sulfide, toluene and benzene concentrations.

352 The concentrations of sulfide in the microcosms were analyzed colorimetrically using the
353 method developed by Cline (1969). For fixing sulfide, samples (10-100 µl) were mixed
354 immediately after sampling with 1 ml zinc acetate (3%) prior to the analytical steps. The
355 concentrations of toluene and benzene in the microcosms were determined by headspace gas
356 chromatography as described elsewhere (Alfreider et al., 2003).

357

358 **4 Results and Discussion**

359 After infiltration, the tracer plume spread in the east-northeast direction. The preferential flow
360 is the result of larger hydraulic conductivities in this direction. This was already indicated by
361 the sieve analyses (data not shown). Here the wells BB3 and BB2 showed the highest bromide
362 concentrations, with peak concentrations of 52 and 75 mg/l (Figure 3). Bromide arrived first
363 at well BB2, which is 2 m further from the infiltration well than well BB3. This indicates that
364 preferential flow took place in this direction. At a greater distance from the infiltration well,
365 the centre of the tracer cloud shifted towards the north (Figure 1, Figure 4). The tracers seized
366 the full thickness of the aquifer, since they were determined from each monitoring well
367 sampling port of the first and second control plane (Figure 3, Figure 5). Thus, a wide tracer
368 front spreading along the full thickness of the aquifer was generated due to the continuous
369 groundwater infiltration. The tracers were detected over a width of 35 m at each well of
370 control plane 1.

371 However, the tracer concentrations were generally higher towards the base of the aquifer,
372 where the highest hydraulic conductivities have been measured by means of sieve analyses.
373 Possibly density gradients between the tracer solution might have caused a sinking of the
374 plume. The low concentrations of bromide, fluorescein, and toluene at well BB4 show that the
375 well is located at the northwest boundary of the tracer plume. All BTCs of the first control

376 plane, especially those of fluorescein, showed significant tailing and sometimes double peaks
377 (e.g., wells BB3 (Figure 3) and Saf Zz 44A (Figure 5)). This could be caused by macroscopic
378 zones with different hydraulic conductivities.

379 The tailing is not as pronounced for the BTCs of the second and third control planes (Figure 4
380 and 5). However, very broad bromide BTCs were determined at some depth levels (e.g., well
381 Saf Zz 44A (Figure 5)). The tailing of BTC within the first control plane could be partly
382 related to the infiltration time of 24 hours. Again, zones of lower hydraulic conductivities in
383 combination with groundwater mixing are a likely reason for the tailing effect. The
384 groundwater flow velocities derived from the BTC peaks showed significant variations
385 between 0.5 and 3.1 m/d (Table 4). They were calculated from the BTC of bromide by
386 dividing the elapsed time it took to reach the maximum concentration by the distance between
387 measurement point and infiltration well. The highest values result from the forced gradient
388 due to the continuous infiltration of groundwater. The smallest velocities within the first
389 control plane were detected at well BB4, located at the boundary of the generated tracer
390 plume. Further downstream of the first control plane, the groundwater flow velocities
391 decreased to a mean of 0.5 m/d (Table 5).

392 The longitudinal dispersivities estimated using Equation 1 were in the range of 0.1 to 2 m.
393 The dispersivities calculated using moment analysis ranged between 0.5 and 3.85 m; the wells
394 of the first control plane especially showed higher dispersivities (1.2-3.85 m) due to the more
395 pronounced tailing. These values are much higher than the dispersivities derived from the
396 evaluation of extensive natural gradient tracer tests (NGTTS) at the field site in Borden
397 (Canada). Here, Sudicky (1986) calculated a dispersivity of 0.36 m. But they are considerably
398 lower than the dispersivity of the geologically highly heterogeneous aquifer at the Columbus
399 site (5-10 m), USA (e.g. Julian et al., 2001).

400 Fluorescein was transported more slowly than toluene and bromide (Tables 4 and 5). The
401 distinct retardation of fluorescein (see for example Figure 5) was not expected (Harden et al.,

402 2003; Kasnavia et al., 1999). Sabatini (1991) found a K_{oc} -value of 120 cm³/g for fluorescein.
403 This value is in the same order of magnitude for reported K_{oc} -values for toluene. However,
404 the retardation of fluorescein was much greater than toluene. To our knowledge there is no
405 specific information about the anaerobic degradation of fluorescein. Therefore, it can be
406 assumed that it is stable under anoxic conditions. Fluorescein is a large organic molecule with
407 a molecular weight of 376 which would not be water soluble without its ionic functional
408 groups COO⁻ Na⁺. These ionic groups can interact with oppositely charged surfaces and thus
409 fluorescein can be retarded in an aquifer. At in situ pH it is a polar molecule. However, the
410 ionic species on the dye are pH dependent (Kasnavia et al., 1999). The dyes anionic group
411 becomes hydrogenated with decreasing pH causing a decrease of water solubility of the dyes.
412 The pH values in groundwater varied during the experiment between 6.7 and 7.1. In this pH-
413 range fluorescein is present in the ionic form and, therefore, water soluble. It is assumed that
414 the retardation of fluorescein in this case is due to the interaction of its ionic groups and
415 opposite charged surfaces. Since fluorescein is significantly retarded compared to bromide, it
416 is not a suitable tracer for the determination of accurate groundwater flow velocities (Käss,
417 1992).

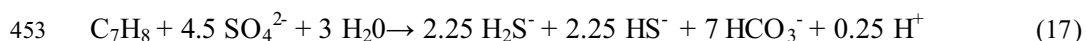
418 Toluene was retarded only slightly in comparison to bromide. The low retardation for the
419 tracer toluene could be related to the relatively small amount of organic matter in the aquifer.
420 Apparently, sorption or desorption processes for toluene are negligible for the investigated
421 aquifer section.

422 Bromide was detected at all depth levels of the monitoring wells of the third control plane, but
423 neither fluorescein nor toluene was discovered in significant concentrations above the
424 detection limit. The analysis of the breakthrough curves of toluene and fluorescein showed
425 that the lack of detection of toluene in control plane 3 is probably due to biodegradation,
426 whereas the lack of detection for fluorescein could be caused by dispersion and retardation.

427 The estimated percentage of degradation for toluene was based on the concentration ratio
428 between toluene and bromide at the time of infiltration (Table 2). It became apparent that the
429 degradation of toluene did not proceed uniformly (Table 6). The wells of the first control
430 plane oriented towards the main flow direction (NE) did not show any toluene degradation.
431 Here, toluene peak concentrations reached 40 mg/l and above. Up to 10 mg/l toluene was still
432 detected for well Saf Zz 27A, 23 m away from the infiltration well. For wells of the third
433 control plane (Saf Zz 31A, Saf Zz 44A, Saf Zz 45A) toluene concentrations were less than 4
434 µg/l. The changes of the concentration ratios of bromide to toluene between tracer injection
435 and detection at the control planes show that toluene biodegradation was very effective
436 between the second and third control planes. Taking the arrival time of toluene for the wells
437 of the first control plane into account, the resulting lag phase for the microorganisms was at
438 least 5 days. For control plane 1, only well BB1, positioned at the boundary of the tracer
439 plume, showed a percentage of degradation of up to 50 percent. During the tracer
440 breakthrough, sulfate concentrations showed a significant decline during toluene
441 breakthrough for all depth levels of wells Saf Zz 27A and Saf Zz 17A downstream of the
442 infiltration well (Figure 6) indicating that toluene biodegradation is coupled to sulphate
443 reduction. When the tracers passed through well Saf Zz 27A benzylsuccinate could be
444 detected with a concentration of 38 µg/l. Benzylsuccinate is a specific metabolite of anaerobic
445 toluene degradation (Biegert et al., 1996). Benzylsuccinate was detected using HPLC (High
446 Performance Liquid Chromatography).

447 The sulfate concentrations at the time of the tracer infiltration were around 407 mg/l (Figure
448 6). Concentrations for the tracer test area ranged between 250 and 400 mg/l. Assuming that
449 sulfate is used as the sole electron acceptor for the oxidation of toluene, a decrease in sulfate
450 concentrations of 65 mg/l for well Saf Zz 27A shows that around 14 mg/l of toluene can be
451 oxidized, based on the equation:

452



454

455 Considering the estimated percentage of degradation for this level (Table 6), it becomes
456 obvious that the decrease in sulfate would have been sufficient to mineralize all toluene.
457 Therefore, it is likely that part of the sulfate was used for the oxidation of dissolved organic
458 carbon (DOC) or other electron donors. Benzene concentrations between control planes 1 and
459 3 ranged between 26 and 11 mg/l for the duration of the experiment. Comparing this decline
460 to the decline in bromide along the flow path, it can be attributed to longitudinal and
461 transverse dispersion.

462 The degradation of toluene under sulfate reducing conditions was also seen in microcosms,
463 incubated at 14°C, using groundwater from well BW BB2 P4. However, the observed lag
464 period for the microcosms was longer than the one in the field. Since the samples were taken
465 at different times during the tracer breakthrough they contained different toluene
466 concentrations. The results from the laboratory experiments showed that toluene was
467 degraded after a lag phase of at least 50 days (Figure 7). The longer lag time of toluene
468 degradation in the microcosms could be due to the fact that they were prepared with
469 groundwater only and not with additional aquifer material. It has been previously shown that
470 attached bacteria contribute 90 to 99.99 % of the total bacteria community or biomass in
471 pristine and contaminated aquifers (Alfreider et al., 1997; Griebler et al., 2002; Hazen et al.,
472 1991); thus, the amount of toluene degrading bacteria in groundwater samples is expected to
473 be much lower than *in situ*, leading to longer lag phases.

474 Toluene degradation was correlated with sulfide production (Figure 7B, D). More sulfide was
475 produced in diluted, nutrient-amended microcosms, indicating that sulfate reduction was
476 limited or inhibited in the groundwater samples tested. In contrast, the amount of biodegraded
477 benzene was negligible in the microcosm experiments within 525 days of incubation (Figure
478 7). In summary, the microcosm data demonstrate that bacteria capable of degrading toluene

479 under sulfate-reducing conditions exist in the groundwater of the test site. In contrast, no
480 evidence for the presence of bacteria capable of degrading benzene under sulfate-reducing
481 conditions were found. These results corresponded well with the field data for toluene
482 degradation and benzene recalcitrance shown above in the investigated aquifer section.

483 The verification of the numerical model was performed by comparing experimental with
484 simulated BTCs of bromide. For each well, the BTCs with the highest bromide concentration
485 were chosen and assigned to the relevant depth level in the model. During model calibration,
486 it became evident that the chosen hydraulic conductivities of the aquifer materials based on
487 sieve analyses significantly underestimated the tracer transport velocities. Thus, hydraulic
488 conductivities of the aquifer material had to be modified in the model. The adapted hydraulic
489 conductivities ranged between $5 \cdot 10^{-4}$ m/s and $3 \cdot 10^{-3}$ m/s. The effective porosities were chosen
490 in accordance with laboratory measurements and ranged between 0.2 and 0.25 for the various
491 materials (Gödeke et al., 2004). Hydraulic conductivities were iteratively adjusted using a
492 trial and error approach. Since hydraulic conductivities and porosities cannot be determined
493 independently from each other, porosities were not changed during the calibration process, as
494 it is known that porosities can be defined more precisely in laboratory experiments than
495 hydraulic conductivities. Despite the high variance $\sigma^2 \ln K$ of 1.84, the classic advection-
496 dispersion theory could be used for the simulation of the tracer transport. With a longitudinal
497 dispersivity between 0.5 m and 0.7 m, a good match of observed and simulated BTCs of Br-
498 was achieved (Figure 8 to Figure 9). Longitudinal and transversal dispersivities were fitting
499 parameters during the simulations and iteratively adjusted. The chosen ratio of longitudinal to
500 transverse dispersivity is higher than ratios in other published studies (e.g. Essaid et al., 2003;
501 Cirpka and Kitanidis 2000), but within the range of published values (Pickens and Grisak
502 1980; Aliewi et al., 2001). Applying a longitudinal dispersivity of 0.5 m and a ratio of
503 longitudinal dispersivity to transversal dispersivity of 0.2 derived from the transport

504 simulations, the width of the tracer front within the third control plane should be
505 approximately 38.5 m.

506 Toluene degradation using first-order kinetics was simulated by applying the transport code
507 MT3DMS (Zheng and Wang, 1999). Here the effect of toluene retardation is taken into
508 account by using a different particle velocity. The same first-order degradation rates for
509 adsorbed and dissolved toluene were applied in the model. The simulation results showed that
510 with a decay rate of 0.02 d^{-1} , which is equal to a half-life of 34.7 days and a retardation factor
511 of 1.1, the degradation of toluene was overestimated for most sampling points, but
512 underestimated for wells of the third control plane (Saf ZZ 31A, 44A and 45A). In this plane,
513 toluene concentrations of up to 0.4 mg/l were calculated, whereas in reality only toluene
514 concentrations in range of the detection limit were found. The chosen rate of 0.02 d^{-1} lies
515 below the mean value (0.06 d^{-1} , $n=14$) of published first-order rates of toluene degradation
516 under sulfate-reducing conditions (Suarez and Rifai, 1999). The results show that the
517 degradation of toluene in groundwater could not be accurately determined using first-order
518 kinetics in this case.

519 During model calibration using Monod kinetics, experimental and measured toluene
520 concentrations were matched for wells of the first, second and third control planes using a
521 trial and error approach (Figures 10 to 13). A lag phase for toluene degradation was not
522 accounted for in the model. The simulation parameters are summarized in Table 8. The
523 bacteria concentration in the groundwater and on the aquifer matrix was based on cell counts
524 of 5 groundwater samples from 3 wells of the investigated aquifer section (BB2, Saf Zz 31A,
525 Saf Zz 44A). The value was converted into mg/l by taking the weight of a standard bacteria
526 cell into account (Ilic et al., 2004). The calculated bacteria concentration of 22100 cells per ml
527 can be regarded as low. It is assumed that all cells are metabolically active. The resulting
528 growth rate for toluene oxidation with sulfate as the electron acceptor is very low, and is
529 orders of magnitude smaller than for toluene degradation under aerobic conditions (Suarez

530 and Rifai, 1999). Since the half-saturation constant and the maximum degradation rate are
531 highly correlated, the half-saturation constant was not adjusted during the simulation runs
532 (Schirmer et al., 2000). The Figures 11 - 13 show the BTCs of toluene after a flow path of 12,
533 23 and 52 m. The toluene concentrations calculated using Monod kinetics and first-order
534 kinetics tend to overestimate degradation for wells of the first control plane. Therefore, it can
535 be confirmed that no significant toluene degradation occurred for a time of approximately five
536 days until the peak arrival of toluene at the first control plane. The simulated BTCs of the first
537 control plane do not differ much for first-order and Monod kinetics, due to the comparatively
538 fast arrival of the tracers at these sampling points. However, the differences are more evident
539 further downstream at the second and third control planes. It becomes apparent that the
540 degradation of toluene could be better described using Monod kinetics than first-order
541 kinetics. With increasing transport time and thus increasing microbial growth, the difference
542 between Monod and first-order kinetics become more apparent (Figure 13). It is assumed that
543 the concentration of microorganisms was low at the beginning of the toluene input and that a
544 sufficient growth of microorganisms was necessary for toluene degradation.

545 The maximum degradation rate and the concentration of microorganisms in the liquid and
546 solid phase proved to be very sensitive parameters during model calibration. A higher starting
547 concentration of microorganisms and higher maximum degradation rates resulted in
548 intensified toluene degradation, especially for wells of the first and second control planes.

549 The simulated sulfate concentrations deviated strongly from the experimentally derived
550 curves. Field data show that high concentration differences were observed within a few days,
551 which could not be explained by toluene degradation due to microbial sulfate reduction alone
552 (Figure 14). Thus the decrease in sulfate is higher than stoichiometrically expected. Therefore,
553 it can be concluded that other electron donors besides toluene are oxidized by means of
554 microbial sulfate reduction. After a decrease in sulfate concentrations, experimental and
555 simulated sulfate curves show a sequential rise in sulfate concentrations after day 45 (Figure

556 14). This rise is a result of the continuous infiltration of groundwater through the infiltration
557 well IB3. The initial sulfate concentration of the simulated curve is derived from the mean
558 sulfate concentration estimated using field data from the pumping well capture zone.

559

560 **5 Conclusions**

561

562 With the MRTT, the hydraulic conditions of the infiltration area were investigated in detail.

563 The use of the washer packer systems in combination with a detailed monitoring program
564 over the course of six months allowed the precise documentation of the tracer breakthroughs.

565 The application of the site-specific numerical flow and transport model proved to be essential
566 for the planning and evaluation of the tracer test. Despite the geological heterogeneity, the
567 tracer spreading was simulated with sufficient accuracy. The recalibration of the flow model
568 with the data from the tracer test significantly improved the results of the numerical model.

569 The results show that Monod kinetics were better suited to the simulation of toluene
570 degradation than first-order kinetics in this case. It became obvious that other electron donors
571 besides toluene need to be considered to explain the decrease in sulfate during toluene
572 breakthrough.

573 The pronounced retardation of fluorescein during the experiment was not expected. Whereas
574 toluene was only slightly retarded in comparison to bromide, fluorescein was retarded the
575 most, making it a problematic in situ tracer for the derivation of accurate groundwater flow
576 velocities. The ionic nature of fluorescein is assumed to be the major reason for its retardation
577 in this case. Due to the low retardation of toluene, sorption and desorption processes are
578 assumed to be negligible for the examined area. The total quantity of the infiltrated toluene
579 (24 l) was degraded under sulfate-reducing conditions along the investigated flow path of 50
580 m. The lag phase until the start of degradation added up to a minimum of five days. As a
581 metabolite of anaerobic toluene degradation, benzylsuccinate was identified at the site.

582 It was shown that a wide tracer front was produced which seized the full thickness of the
583 aquifer. 50 m downstream of the infiltration well, the tracer front had a width of 38.5 m. Thus,
584 with the infiltration conditions used in this experiment, a large aquifer section can be treated
585 in a future in-situ bioremediation approach. Due to the continuous pumping and infiltration of
586 groundwater, an improved mixing of electron acceptors and donors is achieved, which is
587 suitable for enhanced natural attenuation processes. Furthermore, the continuous infiltration
588 of groundwater prevents a deficiency of the terminal electron acceptor sulfate. Despite the
589 geological heterogeneity, the tracer spreading was simulated with sufficient accuracy. The
590 recalibration of the flow model with the data from the tracer test significantly improved the
591 results of the numerical model. The results show that Monod kinetics were better suited to the
592 simulation of toluene degradation than first-order kinetics in this case. It became obvious that
593 other electron donors besides toluene need to be considered to explain decrease in sulfate
594 during toluene breakthrough.

595

596 **Acknowledgments**

597 We are grateful for the funding of the RETZINA-Project by the German Federal Ministry of
598 Education and Research (BMBF) under reference numbers 02WT0040, 02WT0041 and
599 02WT0042. We would like to thank our co-workers from the RETZINA-Project team for
600 their excellent co-operation. Additional funding for the project has been provided through the
601 SAFIRA (Remediation research in regionally contaminated aquifers) Programme of the UFZ
602 Centre for Environmental Research Leipzig-Halle in the Helmholtz Association. We thank
603 Ralf Trabitsh (UFZ) and Olaf Böhme (GFE Consult GmbH) for the site management. We
604 acknowledge the LAF (Landesanstalt für Altlastenfreistellung), the MDSE (Mitteldeutsche
605 Sanierungs- und Entsorgungsgesellschaft mbH) and the ZSG (Zeitzer Standortgesellschaft
606 mbH) for their support. In addition, we thank Poul Bjerg and an anonymous reviewer for their
607 helpful comments and suggestions.

608

609

610 **References**

611

612 Akin, S. 2001. Analysis of tracer tests with simple spreadsheet models. *Computers &*
613 *Geosciences* 27, 171-178.

614 Alfnes, E., Breedveld, G.D., Kinzelbach, W., and Aagaard, P., 2004. Investigation of
615 hydrogeologic processes in a dipping layer structure 2. Transport and
616 biodegradation of organics. *Journal of Contaminant Hydrology*, 69, 173-194.

617 Alfreider, A., Krössbacher, M. and Psenner, R. 1997. Groundwater samples do not reflect
618 bacterial densities and activity in subsurface systems. *Water Research*, 31, 832–
619 840.

620 Alfreider, A., Vogt, C. and Babel, W. (2003). Expression of chlorocatechol
621 1,2-dioxygenase and chlorocatechol 2,3-dioxygenase genes in
622 chlorobenzene-contaminated subsurface systems. *Applied Environmental*
623 *Microbiology* 69, 1372-1376.

624 Aliewi, AS; Mackay, R; Jayyousi, A; Nasereddin, K; Mushtaha, A; Yaqubi, A. 2001.
625 Numerical simulation of the movement of saltwater under skimming and
626 scavenger pumping in the Pleistocene aquifer of Gaza and Jericho areas,
627 Palestine. *Transport in Porous Media*, 43, 1, 195-212

628 Anderson, R.T. and Lovley, D.R. 2000. Anaerobic Bioremediation of Benzene under Sulfate-
629 Reducing Conditions in a Petroleum-Contaminated Aquifer. *Environmental*
630 *Science Technology*, 34, 2261-2266.

- 631 Biegert, T., Fuchs, G., and Heider, J., 1996. Evidence that anaerobic oxidation of toluene in
632 the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of
633 benzylsuccinate from toluene and fumarate. Eur. J. Biochem. 238: 661-668.
- 634 Beyer, W. 1964. Zur Bestimmung der Wasserdurchlässigkeit von Kiesen und Sanden aus der
635 Kornverteilung. Wasserwirtschaft und Wassertechnik, 14, 165-169.
- 636 Borsdorf, H, Köhler, R., Weiß, H., 2002. Einsatz mobiler Messtechniken zur
637 Schadstofffassung und Prozessüberwachung im Umweltbereich. Proceedings
638 des Symposiums "Vor Ort Analytik"; Veranstaltung des UBA und des LfU
639 Baden-Württemberg; Stuttgart.
- 640 Boggs, J.M., S. C., Beard, L.M., Gelhar, L.W., Rehfeldt, K.R., Adams, E.E. 1992. Field Study
641 of dispersion in a heterogeneous aquifer 1. Overview and site description. Water
642 Resources Research, 28(12), 3281-3291.
- 643 Chapelle, F.H., Bradley, P.M., Lovley, D.R., and Vroblesky, D.A. 1996. Measuring Rates of
644 biodegradation in a contaminated aquifer using field and laboratory methods.
645 Groundwater, 34(4), 691-697.
- 646 Cirpka, O.A. and Kitanidis, P.K. 2000. Characterization of mixing and dilution in
647 heterogeneous aquifers by means of local temporal moments. Water Resources
648 Research, 36(5), 1221-1236.
- 649 Clement, T. P. 1997. RT3D: A Modular Computer Code for Simulating Reactive Multispecies
650 Transport in 3-Dimensional Groundwater Systems. [1.0]. 1997. Battelle Pacific
651 Northwest Laboratory.

652 Clement, T.P., Sun, Y., Hooker, B.S., and Petersen, J.N. 1998. Modeling multispecies reactive
653 transport in groundwater. *Groundwater Monitoring and Remediation*, 18(2), 79-
654 92.

655 Cline, J. D. 1969. Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters.
656 *Limnology and Oceanography*, 14, 454-458.

657 Cozzarelli, I.M., Herman, J.S., Baedeker, M.J., and Fischer, J.M. 1999. Geochemical
658 heterogeneity of a gasoline-contaminated aquifer. *Journal of Contaminant*
659 *Hydrology*, 40(3), 261-284.

660 Davis, J.A., Kent, D.B., Coston, J.A., Hess, K.M., and Joye, J.L., 2000. Multispecies reactive
661 tracer test in an aquifer with spatially variable chemical conditions. *Water*
662 *Resources Research*, 36(1), 119-134.

663 Devlin, J.F., Katic, D., Barker, J.F. 2004. In situ sequenced bioremediation of mixed
664 contaminants in groundwater. *Journal of Contaminant Hydrology*, 69(3-4), 233-
665 261.

666 DIN ISO 10694. 1996: Bodenbeschaffenheit – Bestimmung von organischem Kohlenstoff
667 und Gesamtkohlenstoff nach trockener Verbrennung (Elementaranalyse)

668 Eckert, P. and Appelo, C.A.J. 2002. Hydrogeochemical modeling of enhanced benzene,
669 toluene, ethylbenzene, xylene (BTEX) remediation with nitrate. *Water*
670 *Resources Research*, 38(8), 1-11.

671 Edwards, E.A., Wills, L.E., Reinhard, M., and Grbic-Galic, D. 1992. Anaerobic Degradation of
672 Toluene and Xylene by Aquifer Microorganisms under Sulfate-Reducing
673 Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(3): 794-800.

674 Essaid, H.I., Cozzarelli, I.M., Eganhouse, R.P., Herkelrath, W.N., Bekins, B.A., Delin, G.N.
675 2003. Inverse modeling of BTEX dissolution and biodegradation at the Bemidji,
676 MN crude-oil spill site. *Journal of Contaminant Hydrology*, 67(1-4), 269-299.

677 Fischer, A., Vieth, A., Knöller, K., Wachter, T., Dahmke, A., Richnow, H. H. 2004.
678 Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus mit Hilfe von
679 isotopenchemischen Methoden. *Grundwasser* 9, 159-172.

680 Frommichen, R, Kellner, S, and Friese, K. 2003. Sediment conditioning with organic and/or
681 inorganic carbon sources as a first step in alkalinity generation of acid mine pit
682 lake water (pH 2-3). *Environmental Science & Technology*, 37(7), 1414-1421.

683 Gödeke, S., Schirmer, M., Vogt, C., Trabitzsch, R., and Weiß, H., 2002. SAFIRA Zeitz -
684 Realization and procedure. Third International Conference on Water Resources
685 and Environmental Research (ICWRER), Dresden, Vol. III, pp. 78-81.

686 Gödeke, S., Weiß, H., Geistlinger, H., Fischer, A., Richnow, H.H., Schirmer, M. 2004.
687 Natural Attenuation Standort Zeitz: Strömungs- und
688 Tracertransportmodellierung. *Grundwasser*, 1(9), 3-11.

689 Griebler, C., Mindl, B., Slezak, D. and Geiger-Kaiser, M. (2002) Distribution pattern of
690 attached and suspended bacteria in pristine and contaminated shallow aquifers
691 studies with an *in situ* sediment exposure. *Aquat Microb Ecol* 28, 117-129.

692 Györösi, I. 2001. Interpretation and 3D CAD visualization of subsurface geology. MSc-
693 Thesis Zentrum für Angewandte Geowissenschaften, University of Tübingen.

694 Hazen, T. C., Jimenez, L., Lopez de Victoria, G. and Fliermans, C. B. 1991. Comparison of
695 bacteria from deep subsurface sediments and adjacent groundwater. *Microbial*
696 *Ecology*, 22, 293-304.

697 Harden, H.S., Chanton, J.P., Rose, J.B., John, D.E., and Hooks, M.E., 2003. Comparison of
698 sulfur hexafluoride, fluorescein and rhodamine dyes and the bacteriophage PRD-
699 1 in tracing subsurface flow. *Journal of Hydrology*, 277: 100-115.

700 Hess, K.M., Wolf, S.H., and Celia, M.A. (1992) Large-scale natural gradient tracer test in
701 sand and gravel, Cape Cod, Massachusetts: 3. Hydraulic-conductivity variability
702 and calculated macrodispersivities, *Water Resources Research*, 28(8), 2011-
703 2027.

704 Hess, K.M., Davis, J.A., Kent, D.B., and Coston, J.A., 2002. Multispecies reactive tracer test
705 in an aquifer with spatially variable chemical conditions, Cape Cod,
706 Massachusetts: Dispersive transport of bromide and nickel. *Water Resources*
707 *Research*, 38(8): 10.1029/2001WR000945.

708 Ilic, B., Craighead, H.G., Krylov, S., Ober, C., and Neuzil, P., 2004. Attogram detection using
709 nanoelectromechanical oscillators. *Journal of Applied Physics*, 95: 3694-3703.

710 Julian, H.E., Boggs, J.M., Zheng, C., and Feehley, C.E., 2001. Numerical Simulation of a
711 Natural Gradient Tracer Experiment for the Natural Attenuation Study: Flow and
712 Physical Transport. *Groundwater*, 39(4): 534-545.

713 Jury, W. A. and Roth, K. 1990. *Transfer Functions and Solute Movement through Soil:*
714 *Theory and Applications*. Birkhäuser, Basel.

715 Käss, W. 1992. *Geohydrologische Markierungstechnik*. Berlin, Borntraeger.

716 Kasnavia, T., Vu, D., and Sabatini, D.A. 1999. Fluorescent dye and media properties affecting
717 sorption and tracer dilution. *Groundwater*, 37(3), 376-381.

718 Leonard, B.P. 1988. *Universal Limiter for Transient Interpolation*

719 Modeling of the Advective Transport Equations: The ULTIMATE
720 Conservative Difference Scheme, Technical Memorandum 100916
721 ICOMP-88-11, NASA, Washington, DC.

722 Mailloux, B.J. and Fuller, M.E. 2003. Determination of In Situ Bacterial Growth Rates in
723 Aquifers and Aquifer Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*,
724 69(7): 3798-3808.

725 MacQuarrie, K. T. B., and Sudicky, E. A. (1990). Simulation of biodegradable organic
726 contaminants in groundwater - 2. Plume behavior in uniform and random flow
727 fields. *Water Resources Research*, 26(2), 223-239.

728 Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Reviews of Microbiology*, 3, 371-
729 394.

730 Norris, R.D. 1993. *Handbook of Bioremediation*. Lewis Publishers, Inc.

731 OSWER 1997. Use of Monitored Natural Attenuation at Superfund, RCRA Corrective
732 Action, and Underground Storage Tank Sites. 9200.4-17P USEPA.

733 Overmann, J., 2004. The Family Chlorobiaceae. In *The Prokaryotes*. On-line edition, Release
734 3.16.

735 Pickens, F.J. and Grisak, E.G. 1980. Scale-dependant dispersion in a stratified granular
736 aquifer. *Water Resources Research*, 17(4), 1191-1211.

737 Porter, K.G. and Feig, Y.S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic
738 microflora. *Limnology and Oceanography*, 25, 943-948.

739 Ptak, T., Piepenbrink, M., and Martac, E. 2004. Tracer tests for the investigation of
740 heterogeneous porous media and stochastic modelling of flow and transport-a
741 review of some recent developments. *Journal of Hydrology*, 294(1-3), 122-163.

742 Ptak, T. and Teutsch, G., 1994. Forced and natural gradient tracer testst in a highly
743 heterogenuous porous aquifer: instrumentation and measurements. *Journal of*
744 *Hydrology*, 159, 79-104.

745 Reddy, H.L. and Ford, R.M. 1996. Analysis of biodegradation and bacterial transport:
746 Comparison of models with kinetic and equilibrium bacterial adsorption. *Journal*
747 *of Contaminant Hydrology*, 22, 271-287.

748 Rifai, H.S. and Bedient, P.B. 1990. Comparison of biodegradation kinetics with an
749 instantaneous reaction model for groundwater. *Water Resources Research*, 26(4),
750 637-645.

751 Sabatini, D.A., Al Austin, T. 1991. Characteristics of Rhodamine WT and Fluorescein as
752 adsorbing ground water tracers. *Ground Water* 29 (3), 341-349

753 Sandrin, S.K., Brusseau, M.L., Piatt, J.J., Bodour, A.A., Blanford, W.J., Nelson, N.T. 2004.
754 Spatial variability of in situ microbial activity: Biotracer tests. *Groundwater*,
755 42(3), 374-383.

756 Sauty, J.P., 1980. An Analysis of Hydrodispersive Transfer in Aquifers. *Water Resources*
757 *Research*, 16(1), 145-188.

758 Schirmer, M., Richnow, H.H., Gödeke, S., Schirmer, K., Weiß, H., Dahmke, A., Teutsch, G.,
759 2006. Natural Attenuation Research at the Contaminated Megasite Zeitz. *Journal*
760 *of Hydrology*, in press.

761 Schirmer, M., Jones, I., Teutsch, G., and Lerner, D.N. 1995. Development and testing of
762 multiport sock samplers for groundwater. *Journal of Hydrology*, 171(3-4), 239-
763 257.

764 Schirmer, M., Butler, B.J., Roy, J.W., Frind, E.O., Barker, J.F. 1999. A relative-least
765 squares technique to determine unique Monod kinetic parameters of BTEX
766 compounds using batch experiments. *Journal of Contaminant Hydrology*, 37
767 (1-2), 69-86.

768 Schirmer, M., Molson, J.W., Frind, E.O., and Barker, J.F. 2000. Biodegradation modelling of
769 a dissolved gasoline plume applying independent laboratory and field parameters.
770 *Journal of Contaminant Hydrology*, 46, 339-374.

771 Schreiber, M.E. and Bahr, J.M., 2002. Nitrate-enhanced bioremediation of BTEX-
772 contaminated groundwater: parameter estimation from natural gradient tracer
773 experiments. *Journal of Contaminated Hydrology*, 55, 29-56.

774 Suarez, M.P. and Rifai, H.S., 1999. Biodegradation Rates for fuel Hydrocarbons and
775 chlorinated solvents in groundwater. *Bioremediation Journal*, 3(4), 337-362.

776 Sudicky, E.A., 1986. A natural gradient experiment on solute transport in sand aquifer:
777 spatial variability of hydraulic conductivity and its role in the dispersion
778 process. *Water Resources Research*, 22(13), 2069-2082.

779 Thierrin, J., Davis, G.B., Barber, C. 1995. A ground-water tracer test with deuterated
780 compounds for monitoring in situ biodegradation and retardation of aromatic
781 hydrocarbons. *Ground Water* 33, 469-475.

782 Vanderborght, J. and Vereecken, H. 2001. Analyses of locally measured bromide BTCs from
783 a natural gradient tracer experiment at Krauthausen. *Journal of Contaminant*
784 *Hydrology*, 48, 23-43.

785 Vieth, A., Kästner, M., Schirmer, M., Weiß, H., Gödeke, S., Meckenstock, R., Richnow, H.
786 H. 2005. Monitoring in situ biodegradation of benzene and toluene by stable
787 carbon isotope fractionation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(1),
788 151-160.

789 Wachter, T., Dethlefsen, F., Gödeke, S., Dahmke, A. 2004. Räumlich-statistische
790 Charakterisierung der Hydrogeochemie einer BTEX-Grundwasserkontamination
791 am Standort "RETZINA"/Zeitz.- *Grundwasser*, 9, 1, 21-32.

792 Zheng, C. and Wang, P. P. 1999. MT3DMS: A modular three-dimensional multispecies
793 model for simulation of advection, dispersion and chemical reactions of
794 contaminants in groundwater systems. SERDP-99-1 U.S. Army Engineer
795 Research and Development Center.

796 Zheng, C. and Gorelick, S.M. 2003. Analysis of Solute Transport in Flow Fields Influenced
797 by Preferential Flowpaths at the Decimeter Scale. *Ground Water*, 41(2), 142-
798 155.

799
800
801

802

803 **List of Figures**

804

805 Figure 1: Location of the research site and map of the tracer test area (the general
806 groundwater flow direction is towards the NE).

807

808 Figure 2: Schematic geological cross-section of control plane 1.

809

810 Figure 3: Profile of BTCs for wells of the first control plane.

811

812 Figure 4: Profile of BTCs of the third control plane (left column Saf Zz 31A, middle column
813 Saf Zz 44A, right column Saf Zz 45A).

814

815 Figure 5: Profile of BTCs of the second control plane (left column Saf Zz 27A, right column
816 Saf Zz 17A).

817

818 Figure 6: Sulfate and toluene concentrations for Well Saf Zz 27A (sampling depth: 32.5 m
819 below upper edge of well, distance to infiltration well: 23 m).

820

821 Figure 7: Toluene degradation and sulfide production in anoxic microcosms prepared from
822 groundwater samples with low (A, B) and high (C, D) initial toluene concentrations. Benzene
823 was not degraded. ■ benzene; □ benzene, nutrients added; ▲ toluene; □ toluene, nutrients
824 added; ● sulfide; ○ sulfide, nutrients added. Solid lines: biotic samples (n = 3); dotted lines:
825 abiotic samples (n = 1).

826

827 Figure 8: Simulated and experimental BTCs of the tracer bromide for Well BB4 (sampling
828 depth: 40.8 m bgl, distance from IB3: 14.1 m).

829

830 Figure 9: Simulated and experimental BTCs of the tracer bromide for monitoring Well Saf Zz
831 27 A (sampling depth: 42,7 m bgl, distance from IB3: 23 m).

832

833 Figure 10: Simulated and experimental BTCs of the tracer bromide for monitoring Well Saf
834 Zz 44 A (sampling depth: 42,3 m bgl, distance to IB3: 55.6 m).

835

836 Figure 11: Simulated (Monod and first-order kinetics) and experimental BTCs of toluene for
837 monitoring well Saf Zz BB2 (sampling depth: 44,8 m bgl, distance from infiltration well: 13.1
838 m).

839

840 Figure 12: Simulated (Monod and first-order kinetics) and experimental BTCs of toluene for
841 Well Saf Zz 27A (sampling depth: 42,7 m bgl, distance from infiltration well: 27.7 m).

842

843 Figure 13: Simulated (Monod and first-order kinetics) and experimental BTCs of toluene for
844 Well Saf Zz 31A (sampling depth: 41,8 m bgl, distance from infiltration well: 55.7 m).

845

846 Figure 14: Simulated and experimental sulfate concentrations for monitoring well Saf Zz 27A
847 (sampling depth: 42,7. m bgl).

848

849

850 **List of Tables**

851

852 Table 1: Statistical evaluation of hydraulic conductivities, estimated using sieve analyses for
853 geological material at the Zeitz site.

854

855 Table 2: Infiltration Conditions of the Tracer Test.

856

857 Table 3: Retardation factors (R) for toluene (T) and fluorescein (F) for the monitoring depths
858 of wells 27A and 17A (second control plane).

859

860 Table 4: Field velocities in m/d of the tracer bromide for wells BB1 to BB5 for sampling
861 pumps P1 to P4. The abbreviations P1 to P4 indicate the position of the relevant sampling
862 pumps, with a higher labelling number indicating a greater pump depth.

863

864 Table 5: Field velocities in [m/d] of the tracer bromide for wells of the second and third
865 control planes for sampling pumps P1 to P4. The abbreviations P1 to P4 indicate the position
866 of the relevant sampling pumps, with a higher labelling number indicating a greater pump
867 depth.

868

869 Table 6: Estimated percentage of degradation of toluene in comparison to bromide.

870

871 Table 7: Parameters of the transport simulation.

872

873 Table 8: Parameters for the simulation of toluene degradation using Monod kinetics.

874

Figure 1
[Click here to download high resolution image](#)

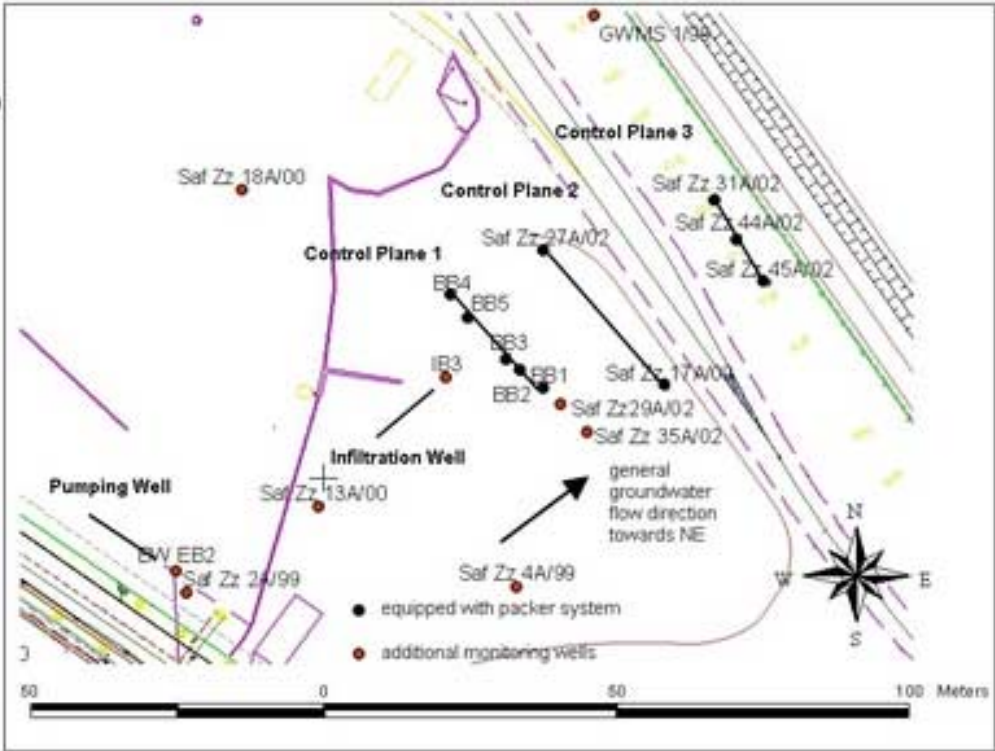


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

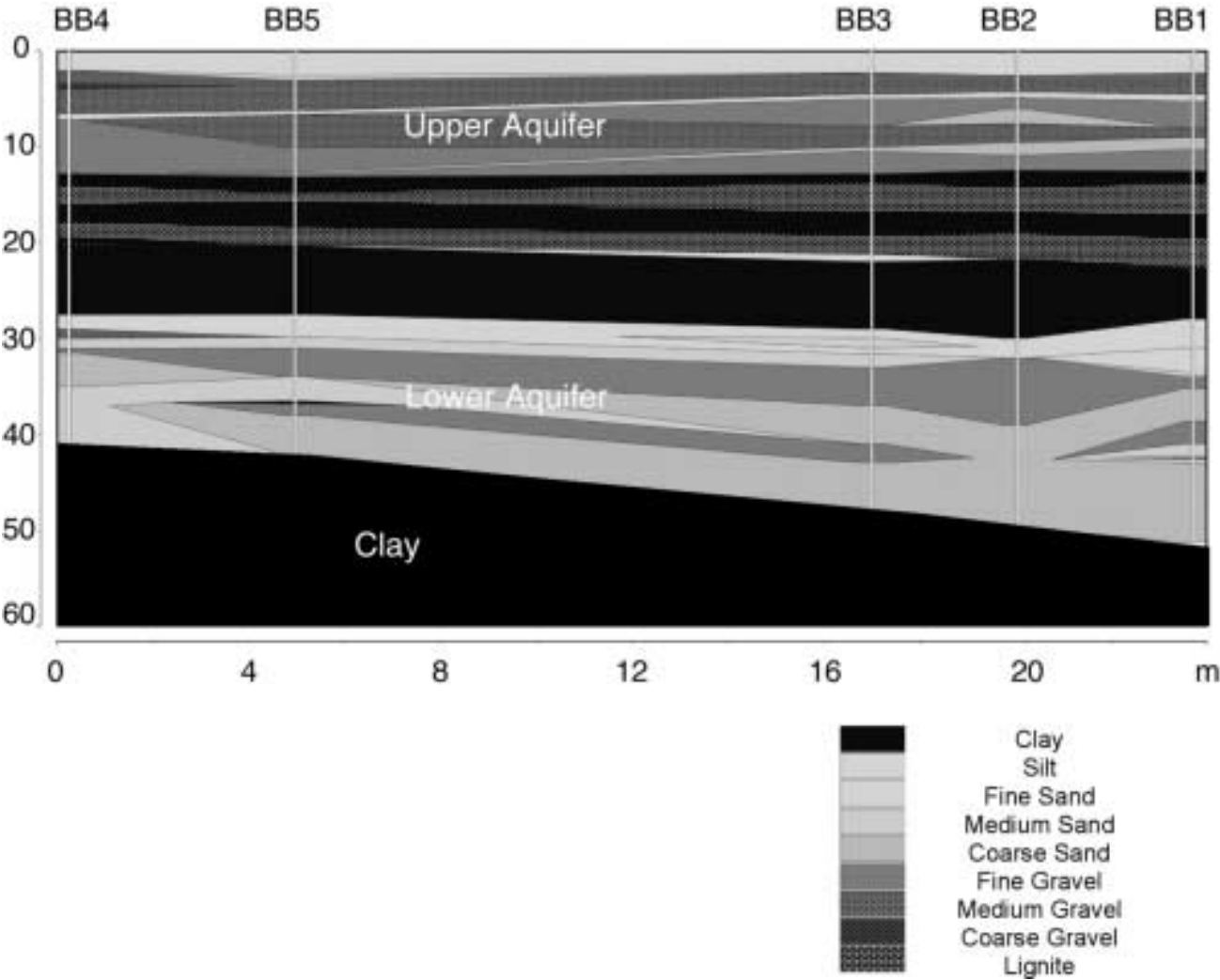


Figure 3
[Click here to download high resolution image](#)

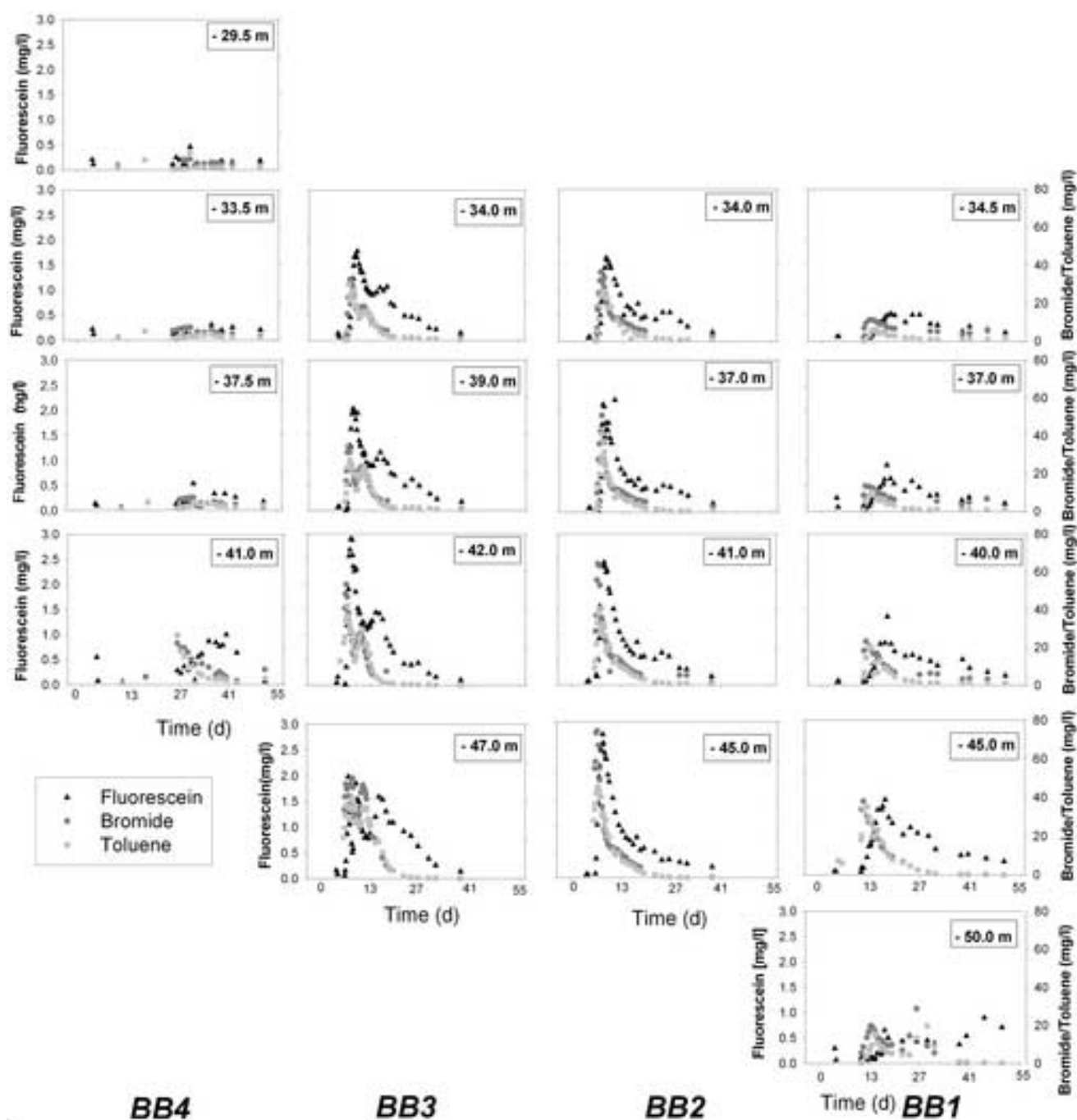


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

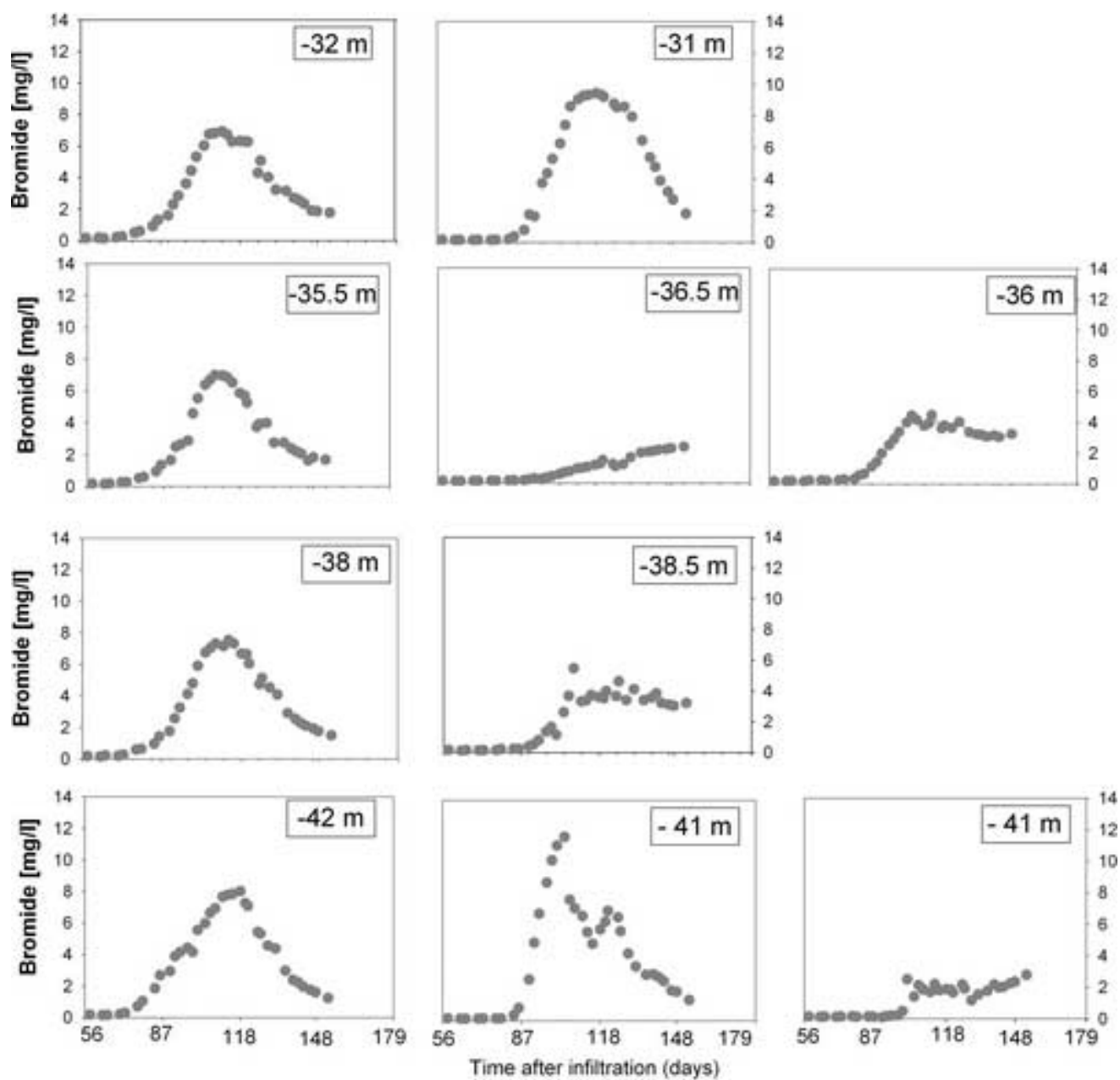


Figure 5
[Click here to download high resolution image](#)

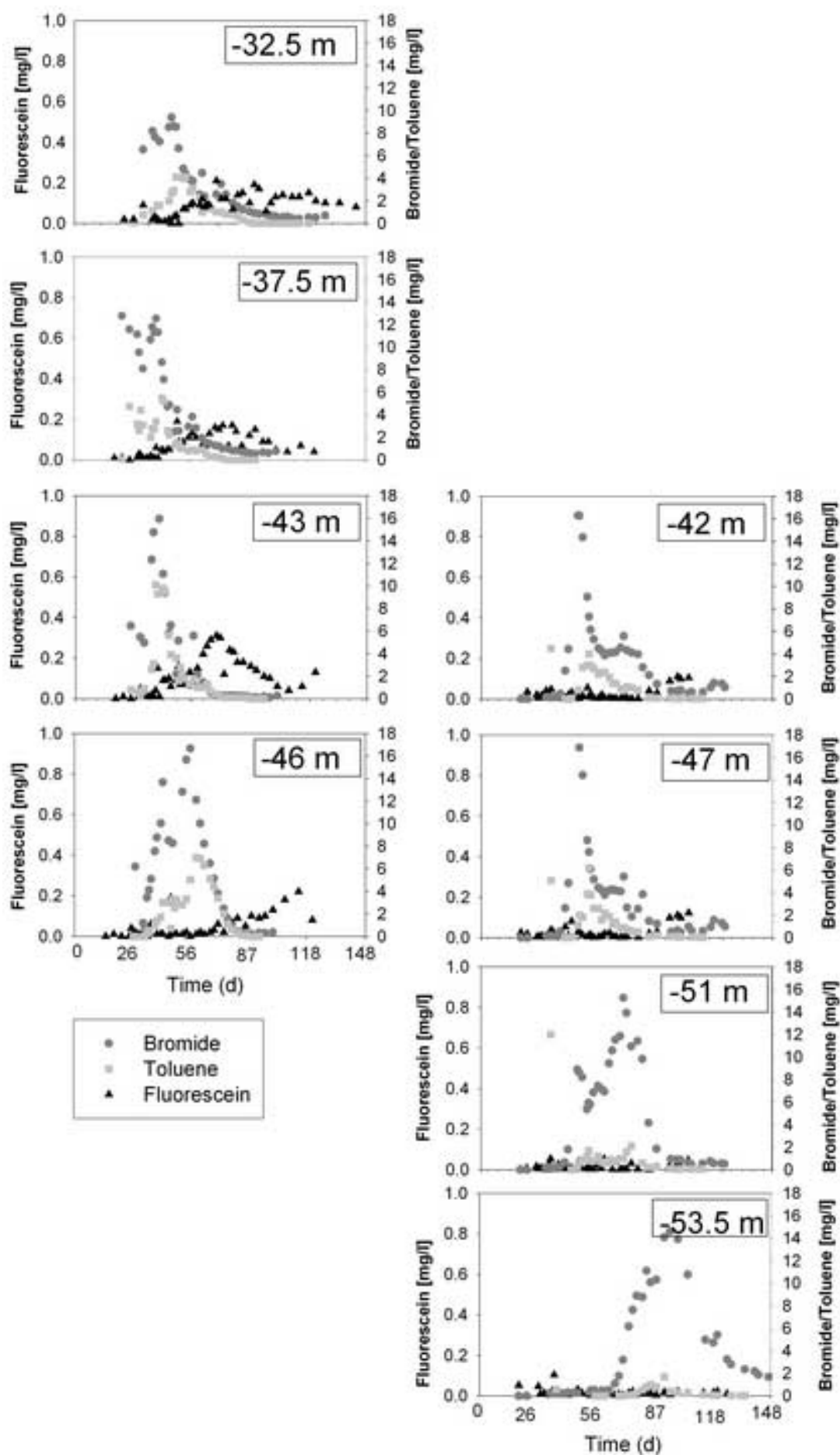


Figure 6
[Click here to download high resolution image](#)

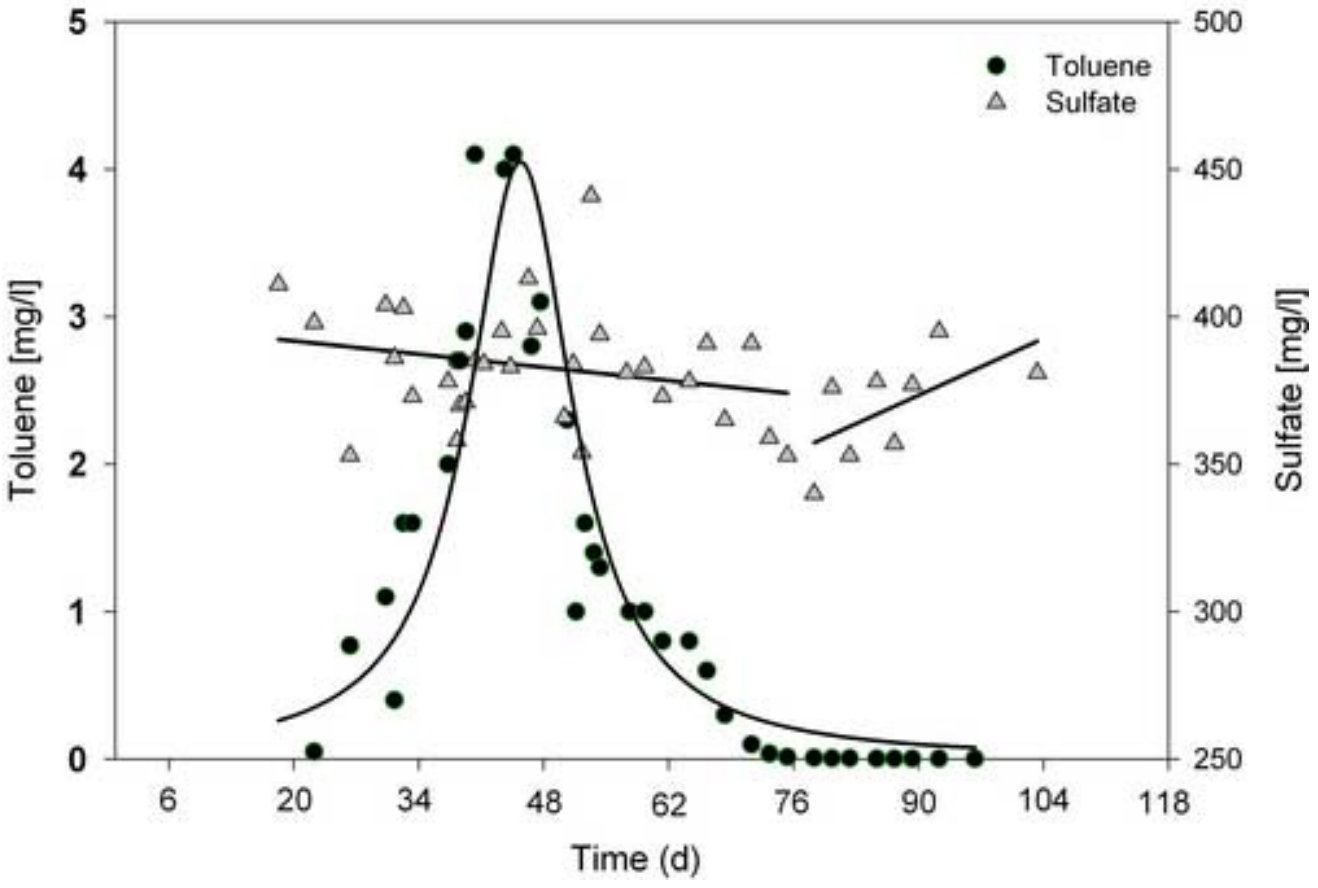


Figure 7
[Click here to download high resolution image](#)

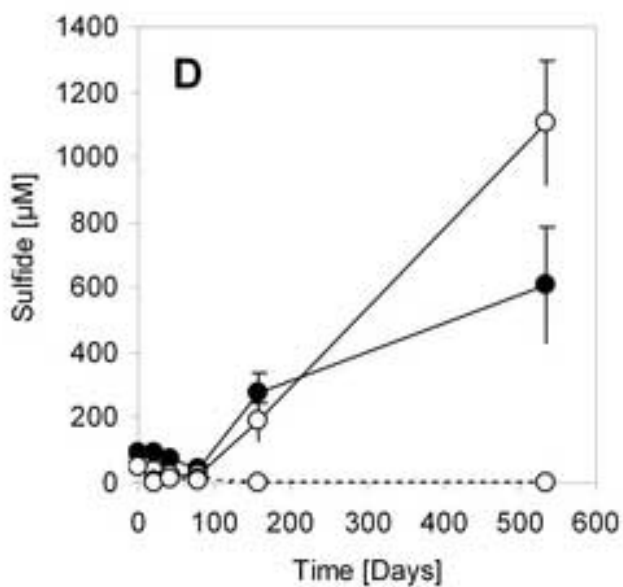
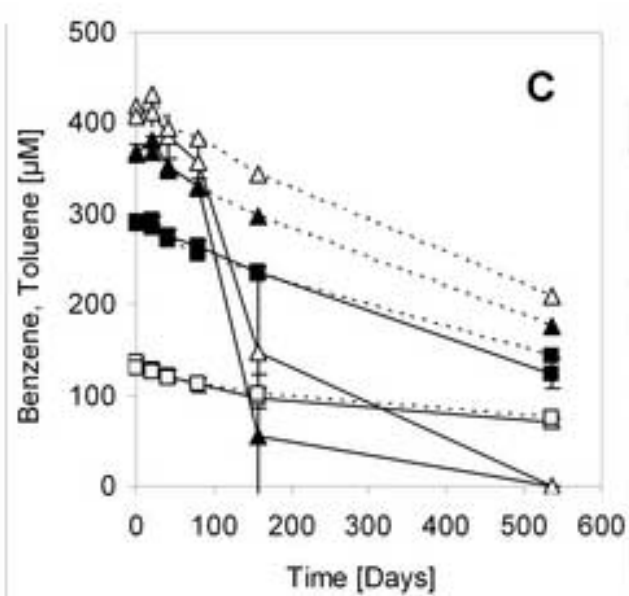
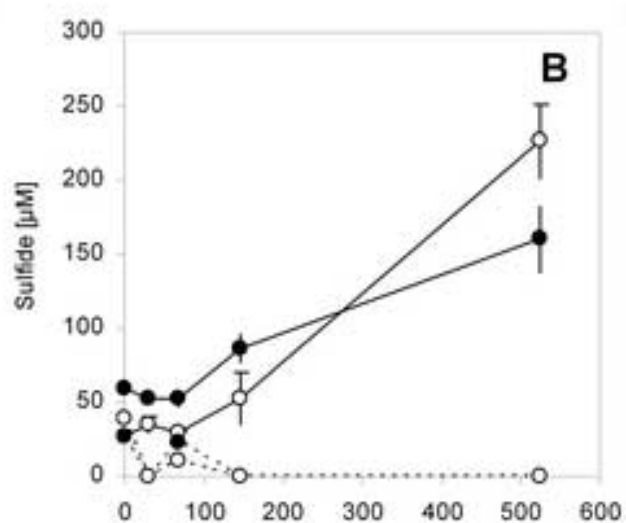
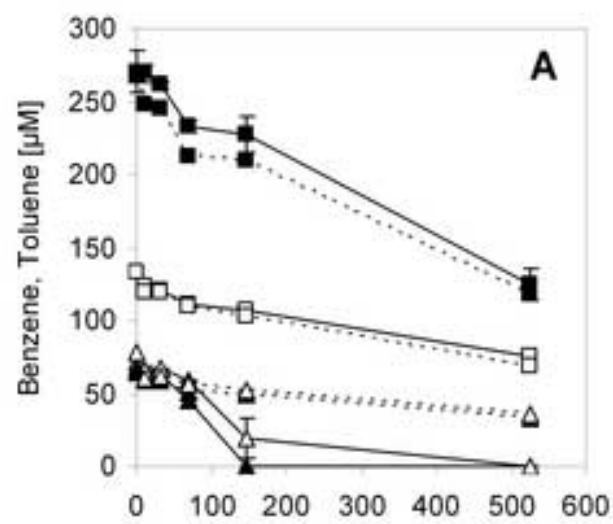


Figure 8
[Click here to download high resolution image](#)

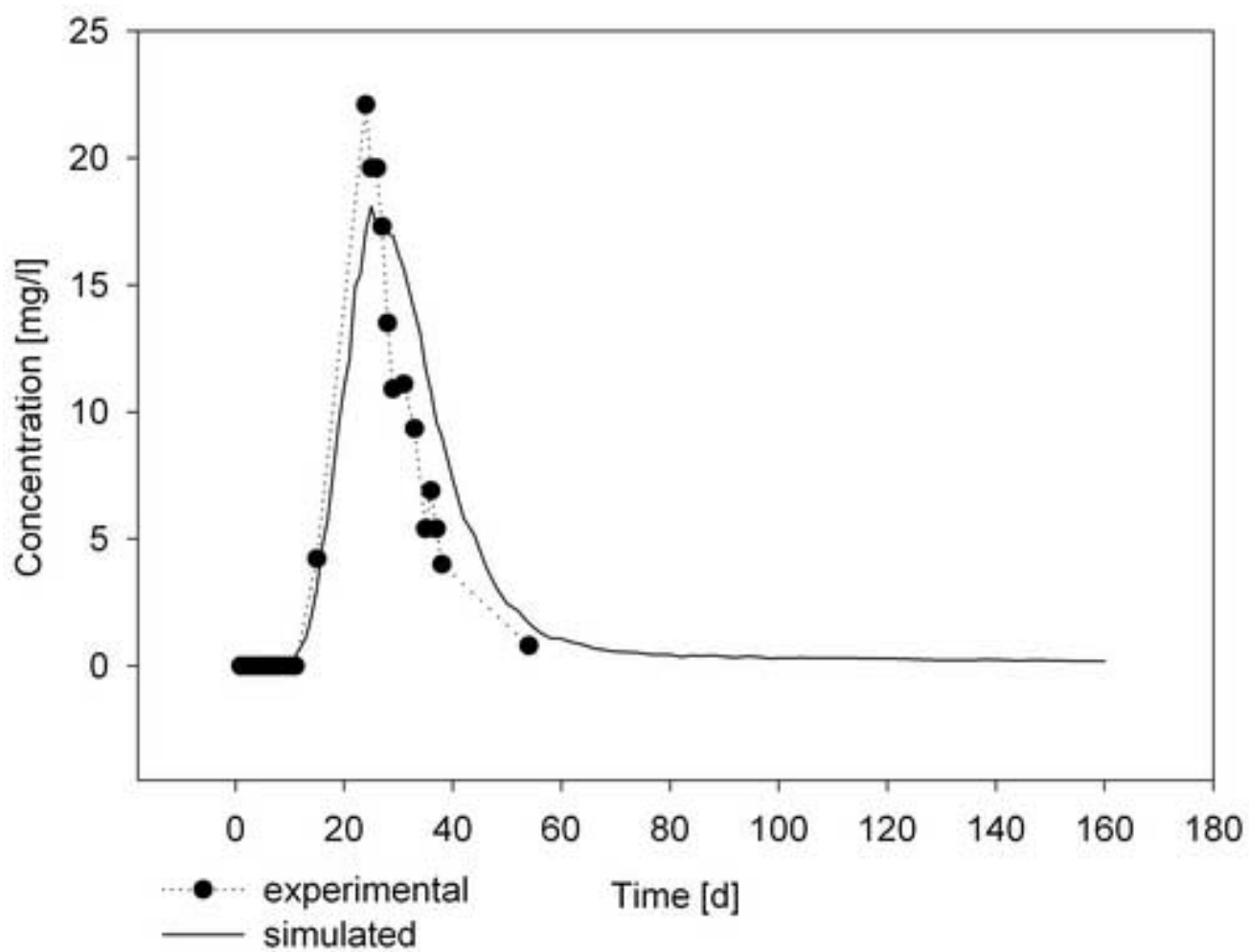


Figure 9
[Click here to download high resolution image](#)

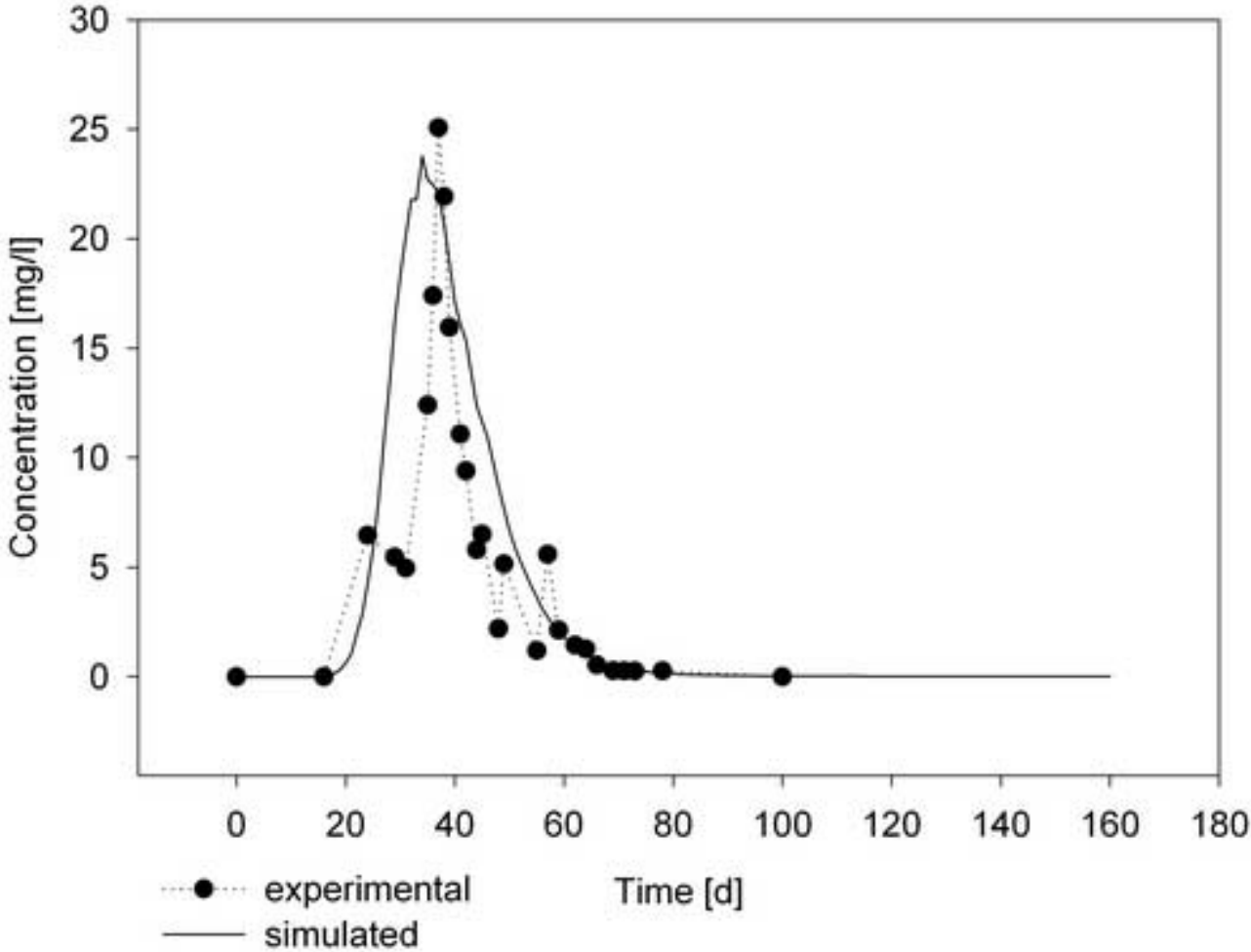


Figure 10
[Click here to download high resolution image](#)

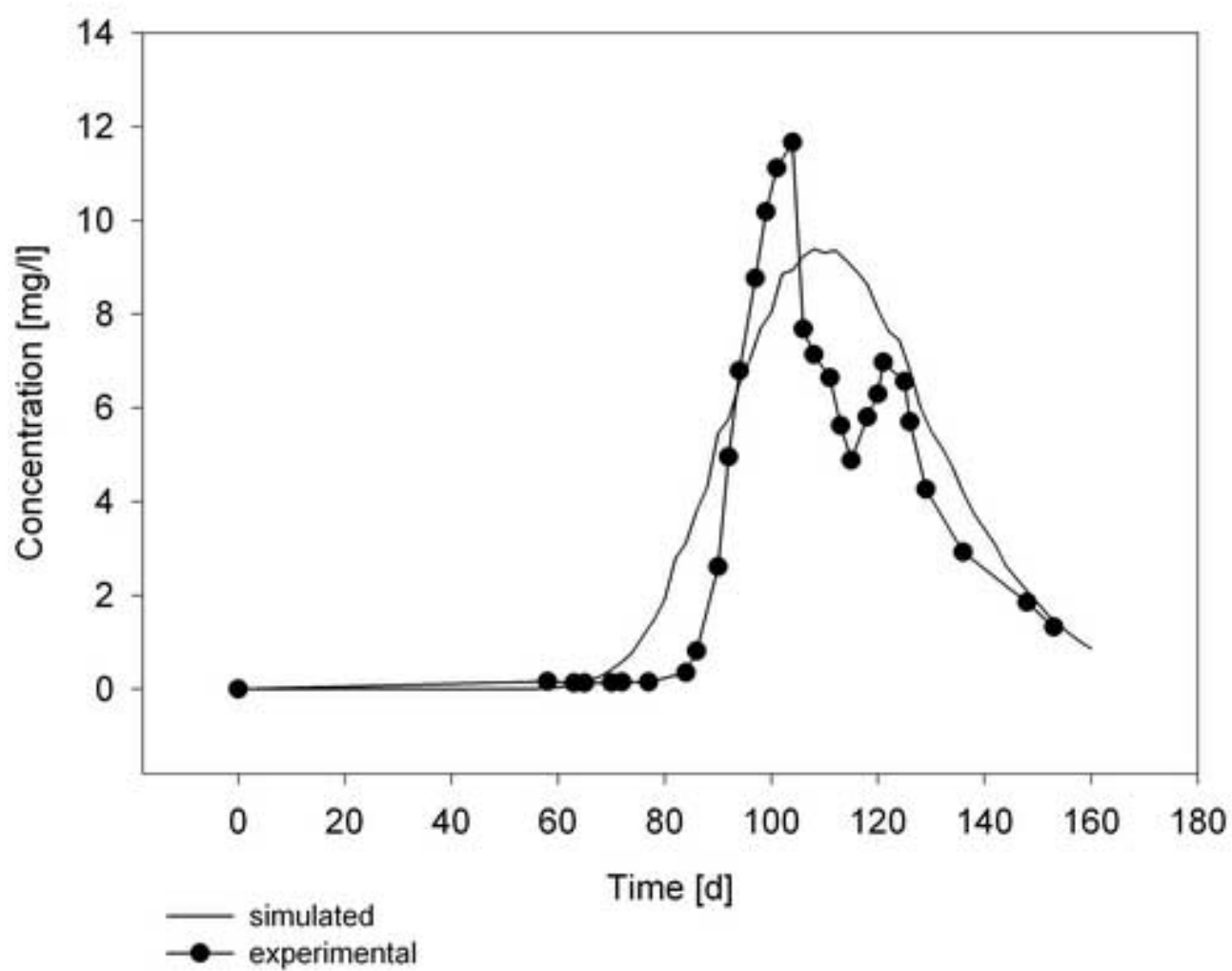


Figure 11
[Click here to download high resolution image](#)

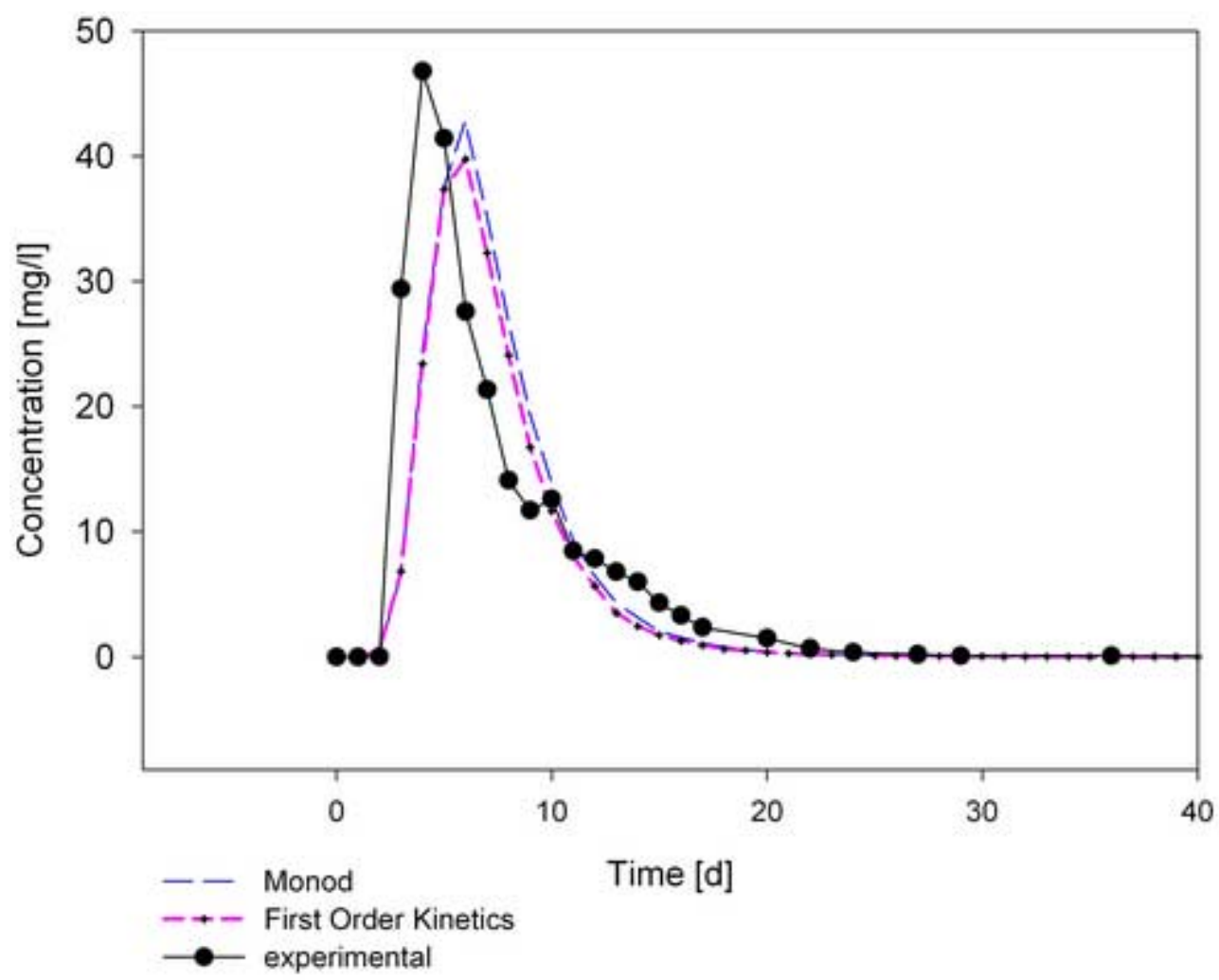


Figure 12
[Click here to download high resolution image](#)

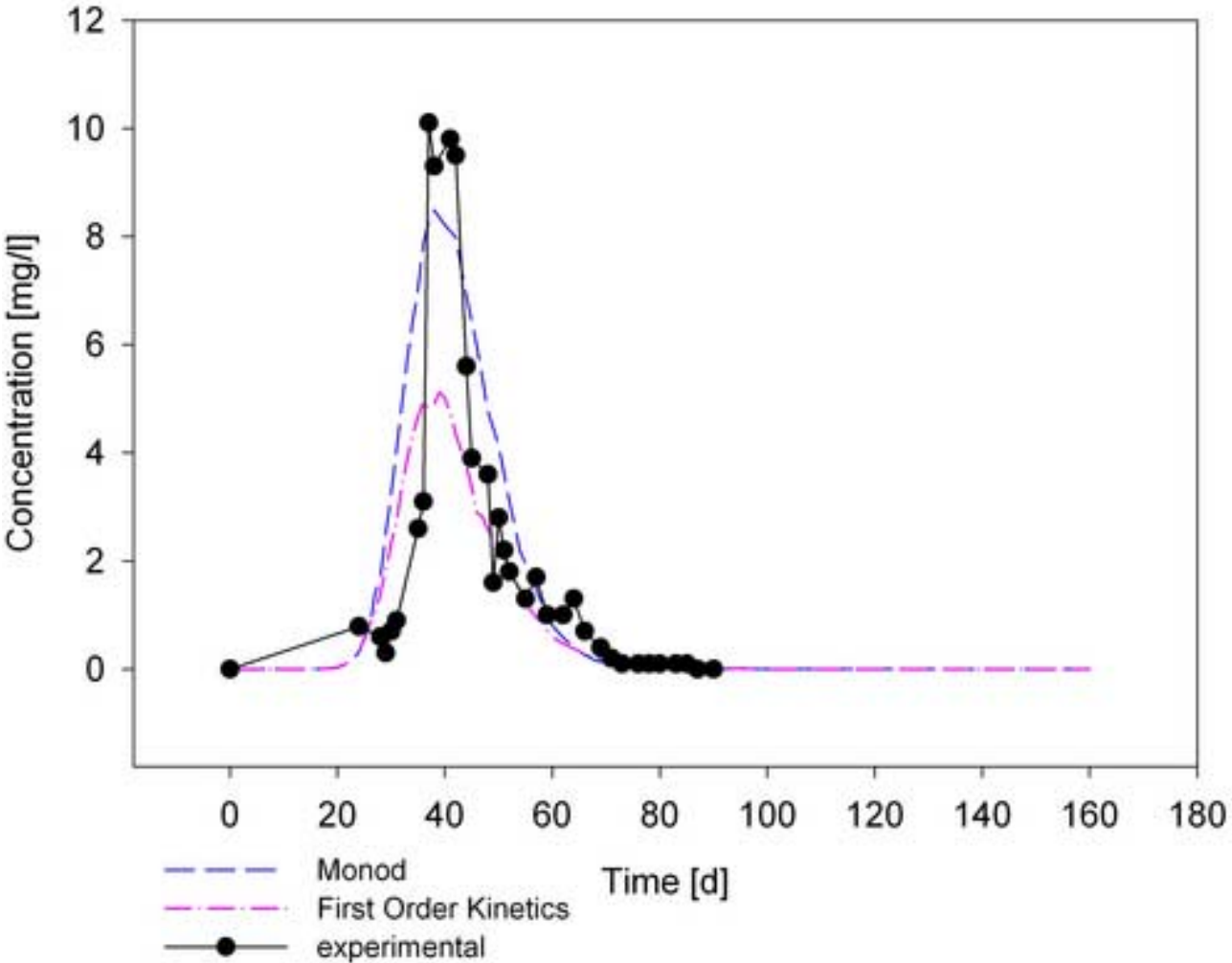


Figure 13
[Click here to download high resolution image](#)

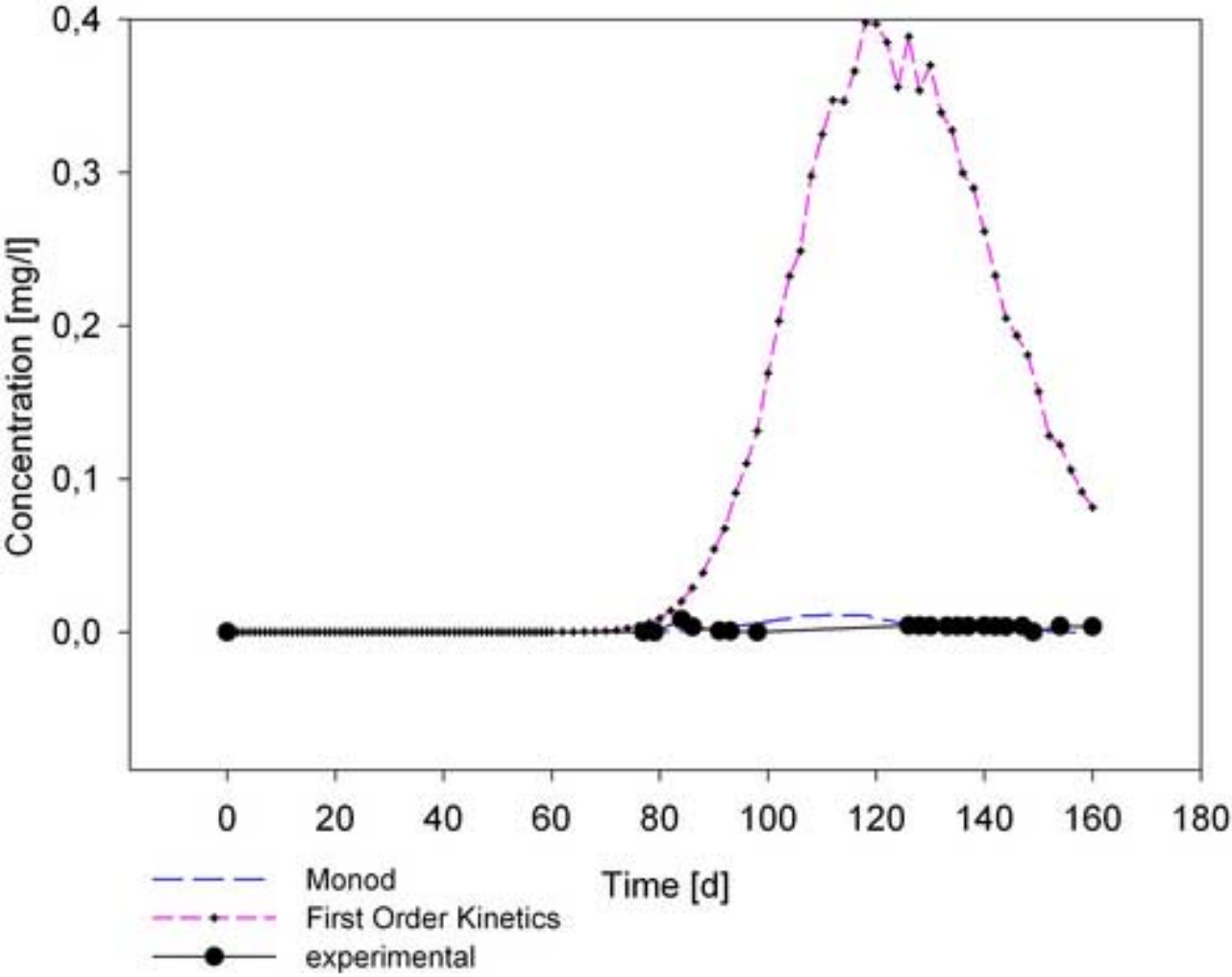
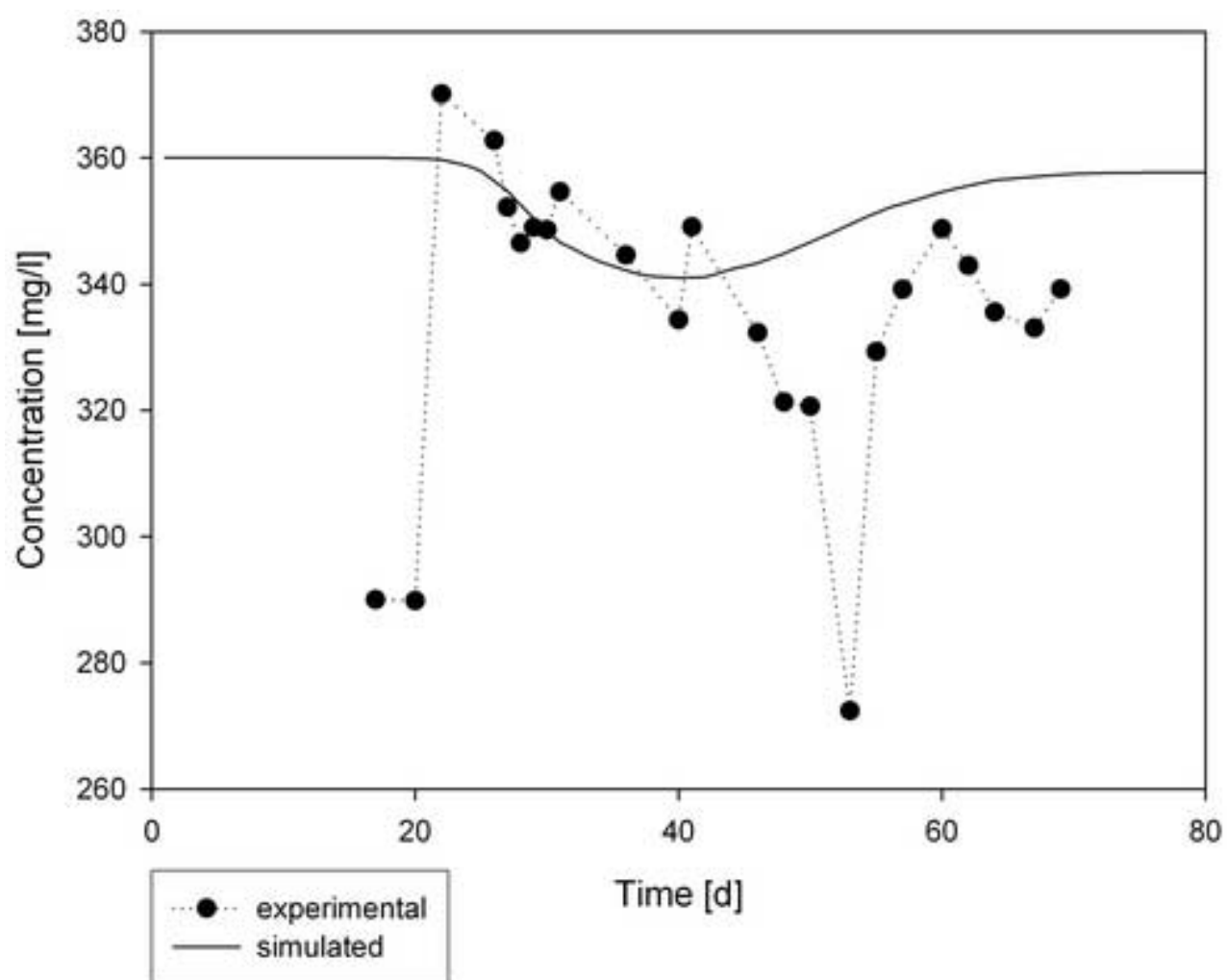


Figure 14
[Click here to download high resolution image](#)



1 Table 1: Statistical evaluation of hydraulic conductivities, estimated using sieve analyses for
2 geological material at the Zeitz site.

3

Material	Median K [m/s]	Minimum K [m/s]	Maximum K [m/s]	Number of samples
fine gravel	3.9E-04	7.80E-06	2.54E-02	186
coarse gravel	3.7E-04	2.32E-05	2.46E-03	104
medium sand	1.5E-04	4.17E-06	9.33E-04	139
silt	9.00E-08	8.20E-12	9.50E-05	25
clay	1.76E-10	2.32E-11	6.99E-10	13
lignite	8.95E-09	1.73E-09	1.55E-08	5

4

5

6 Table 2: Infiltration Conditions of the Tracer Test.

7

<i>Tracer (Amount)</i>	
Fluorescein [kg]	2
Potassic Bromide [kg]	60
Toluene [l]	24
Infiltration Rate [m ³ /h]	3.5
<i>Input Concentration [mg/l]</i>	
Fluorescein	23
Bromide	480
Toluene	245
Infiltration Time [h]	24
Infiltration Depth [m, bgs]	33-45
Screen Length [m]	12
Infiltration Well	IB 3

8

9 Table 3: Retardation factors (R) for toluene (T) and fluorescein (F) for the monitoring depths
 10 of wells 27A and 17A (second control plane).

Well	P1		P2		P3		P4	
	R (T)	R (F)	R (T)	R (F)	R (T)	R (F)	R (T)	R (F)
Saf Zz 27A	1	2	-	-	1	1.9	1.1	-
Saf Zz 17A	1.2	2	1.1	-	1	-	1	-
BB1	1.1	1.7	1.2	1.9	1.1	1.9	1.1	1.9
BB2	1.2	1.3	1	1.1	1.1	1.4	1.1	1.44
BB3	0.9	1.3	1.1	1.4	1.1	1.4	1	0.8
BB4	-	-	-	-	-	-	1	1.6
BB5	1.1	3	1	3.1	1.1	1.3	-	-

11

12

13

14 Table 4: Field velocities in m/d of the tracer bromide for wells BB1 to BB5 for sampling
15 pumps P1 to P4. The abbreviations P1 to P4 indicate the position of the relevant sampling
16 pumps, with a higher labelling number indicating a greater pump depth.

17

Well	P1	P2	P3	P4
BB1	1.45	1.61	1.61	1.61
BB2	2.62	2.62	3.1	3.1
BB3	2.07	2.34	2.53	1.74
BB4	-	-	-	0.56
BB5	1.61	1.67	1.85	-

18

19 Table 5: Field velocities in [m/d] of the tracer bromide for wells of the second and third
20 control planes for sampling pumps P1 to P4. The abbreviations P1 to P4 indicate the position
21 of the relevant sampling pumps, with a higher labelling number indicating a greater pump
22 depth.

23

Well	P1	P2	P3	P4
17A	0.61	0.61	0.4	0.35
27A	0.64	-	0.62	0.39
31A	0.47	0.48	0.46	0.44
44A	0.33	0.43	0.49	-
45A	-	0.47	0.49	-

24

25 Table 6: Estimated percentage of degradation of toluene in comparison to bromide.

26

Well	BB1	BB2	BB3	BB4	BB5	Saf Zz 17A	Saf Zz 27A
Sampling Pump	Percentage of degradation (%)						
1	47	0	0	0	0	61	50
2	38	0	0	0	0	60	55
3	10	0	0	0	0	80	21
4	0	0	0	0	-	89	42

27

28 Table 7: Parameters of the transport simulation.

29

Size of model area (x,y,z)	250m·250m·10m
Discretization $\Delta x, \Delta y, \Delta z$	5m·5m·0.5m, local: 1m·1m·0.5m
Number of grid cells	699048
Time period	160 d
Time interval, Δt	0.0365 d
Porosity (aquifer)	0.2 - 0.25
Mean hydraulic gradient (local)	0.002
Mean flow velocity (local)	0.5 m/d
Grid Peclet number	1.4 - 2
Longitudinal dispersivity	0.5 - 0.7 m
Transversal dispersivity α_T / longitudinal dispersivity α_L	0.2
Vertical dispersivity α_V / longitudinal dispersivity α_L	0.01

30

31 Table 8: Parameters for the simulation of toluene degradation using Monod kinetics.

32

Parameter	Value (remark, reference)
μ_{\max}	$8 \cdot 10^{-7} \text{ d}^{-1}$
K_D	0.79 mg/l (Schirmer 2000)
K_A	0.1 mg/l (MacQuarrie et al., 1990)
$Y_{X/D}$	0.3 (assumed due to lack of information)
$Y_{A/D}$	4.7 (assuming toluene mineralization under sulfate-reducing conditions)
K_e	$1 \cdot 10^{-9} \text{ d}^{-1}$ (decay rate assumed due to lack of information)
A (sulfate)	360 mg/l (mean from field data)
D (toluene)	245 mg/l (in filtration concentration)
X, \bar{X}	0.0185 mg/l
K_d	$2 \cdot 10^{-8} \text{ [m}^3/\text{g]}$
density (matrix)	1,600,000 $[\text{g}/\text{m}^3]$

33

34

ANHANG B

Konzept zur Quantifizierung des anaeroben *in situ*-Schadstoffabbaus in BTEX-kontaminierten Grundwasserleitern mittels Deuterium-markierter Substanzen

Anko Fischer, Jana Bauer, Michael Dietze, Stefan Gödeke, Mario Schirmer, Holger Weiß, Matthias Kästner, Rainer U. Meckenstock, Hans-Herrmann Richnow

1 Einleitung

Eine umfassende Schadensfallerkundung ist die Voraussetzung für die Erarbeitung einer geeigneten Sanierungsstrategie von kontaminierten Grundwasserleitern. Da aktive Sanierungsmethoden wie z. B. „Pump-and-Treat“ oder „Reaktive Wände“ oft sehr teuer sind, werden kostengünstigere Alternativen gesucht. In diesem Zusammenhang ist es in manchen Fällen sinnvoll, das intrinsische Selbstreinigungspotenzial in einem Aquifer für die Sanierung zu nutzen. Dies wird als „Natural Attenuation“ (NA) bezeichnet (OSWER, 1999).

In mit Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylole (BTEX) kontaminierten Grundwasserleitern kann durch abiotische Prozesse wie die Sorption, Dispersion und Verflüchtigung zwar die Schadstoffkonzentration im Grundwasser wesentlich verringert werden, aber nur der mikrobielle Abbau führt zu einer nachhaltigen Reduzierung der Schadstoffmenge.

Eine Möglichkeit zur Untersuchung der komplexen Abbau- und Transportprozesse im Grundwasser bieten Tracerexperimente mit konservativen und reaktiven Markierungstoffen. Der Einsatz konservativer Tracer wie z. B. Salzen, deuteriertem Wasser und Farbstoffen dient hauptsächlich zur Erkundung von Grundwasserfließwegen, -fließgeschwindigkeiten, Dispersion, Aquiferheterogenitäten und Verdunstung. Deshalb sollen konservative Markierungstoffe möglichst keinem Abbau und keinen Interaktionen mit der Aquifermatrix unterliegen, um das Transportverhalten des Grundwassers möglichst genau erfassen zu können. Reaktive Tracer werden eingesetzt, um die Wechselwirkungen mit der Aquifermatrix bzw. den chemischen und/oder biologischen Abbau im Grundwasser zu untersuchen. Je stärker diese Prozesse im Grundwasserleiter auf einen reaktiven Tracer einwirken, desto größer ist der Rückhalt (Retardation) bzw. Verlust auf einem bestimmten Fließweg. Wichtig bei dem Einsatz konservativer und reaktiver Markierungstoffe ist deren eindeutige qualitative und quantitative Bestimmbarkeit in dem zu untersuchenden Aquiferbereich. Zu diesem Zweck wurden in der Vergangenheit schon BTEX-Verbindungen mit schweren stabilen Isotopen (Deuterium=D, Kohlenstoff mit der Massenzahl 13=¹³C) markiert, um den Verbleib dieser Stoffe in kontaminierten Grundwasserleitern zu untersuchen.

Die Kombination von reaktiven und konservativen Tracern in einem Multi-Komponenten-Tracerexperiment

(MKTE) kann zur Untersuchung des *in situ*-Schadstoffabbaus verwendet werden. Durch den Einsatz von vollständig deuteriertem Benzol (D₆), Toluol (D₈) sowie p-Xylol (D₁₀) als reaktive und Bromid als konservativer Tracer konnten sowohl die biologische Halbwertszeit der eingesetzten Schadstoffe unter sulfatreduzierenden Bedingungen als auch deren Retardation in einem BTEX-kontaminierten Grundwasserleiter bestimmt werden (Thierrin *et al.*, 1995). Für den Bezug auf das reale Verhalten einer Kontaminante in einem Aquifer muss gewährleistet sein, dass die deuterierten Verbindungen ein gleiches bzw. sehr ähnliches Transportverhalten wie die nicht deuterierten Verbindungen haben. In einer Laborstudie konnte gezeigt werden, dass deuterierte und nicht-deuterierte BTEX-Verbindungen identisch sorbieren (Poulson *et al.*, 1997) und somit in einem Aquifer etwa gleichermaßen retardiert werden sollten.

In den letzten Jahren wurde die substratspezifische Isotopenfraktionierung von Schadstoffen zunehmend zur Quantifizierung des mikrobiellen Abbaus in kontaminierten Aquiferen genutzt. Zur Berechnung des Abbaus sind Isotopenfraktionierungsfaktoren (α) aus Laborversuchen notwendig (Fischer *et al.*, 2004; Griebler *et al.*, 2004; Meckenstock *et al.*, 2002; Richnow *et al.*, 2003a; Richnow *et al.*, 2003b; Vieth *et al.*, 2001; Vieth *et al.*, 2004).

Morasch *et al.* haben in Batch-Versuchen mit Reinkulturen die Wasserstofffraktionierung beim Abbau von verschiedenen deuterierten Toluolspezies mit Sulfat als Elektronenakzeptor untersucht (Morasch *et al.*, 2001). Dabei konnte gezeigt werden, dass nicht-markiertes (H₈) bzw. ringdeuteriertes (D₅) Toluol schneller umgesetzt wird als vollständig deuteriertes (D₈) bzw. methyldeuteriertes (D₃) Toluol (Abbildung 1). Die Folge ist eine deutliche Fraktionierung während des Abbaus von Gemischen aus Toluolspezies mit und ohne deuterierter Methylgruppe (D₈ und H₈, D₃ und H₈, D₈ und D₅; $\alpha > 1$). Im Gegensatz dazu konnte bei Abbaueversuchen, bei denen ein Toluolgemisch mit einer vollständig deuterierten (D₈ und D₃) bzw. keiner deuterierten (D₅ und H₈) Methylgruppe eingesetzt wurde, keine signifikante Fraktionierung ($\alpha \approx 1$) beobachtet werden. Für die genannten Abbaureaktionen wurden Isotopenfraktionierungsfaktoren berechnet (Meckenstock & Richnow, 2002; Morasch *et al.*, 2001) (Abbildung 1).

Es wurde ein Konzept für ein MKTE entwickelt, bei dem Bromid und Uranin als konservative Tracer so-

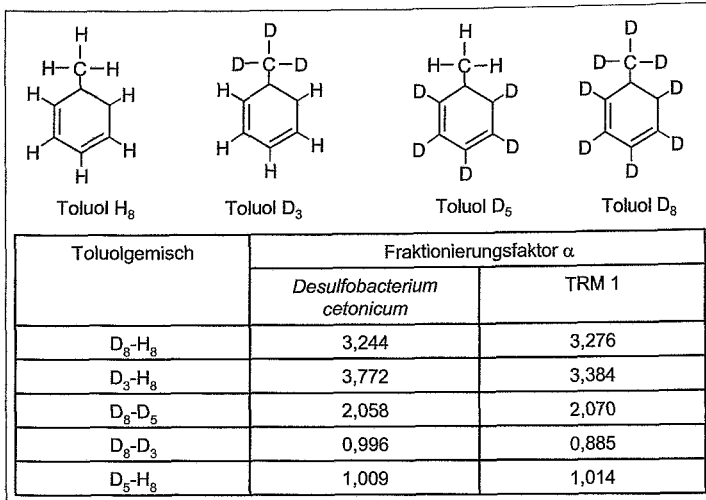


Abbildung 1: Strukturformeln deuterierter Toluolspezies und Fraktionierungsfaktoren für den mikrobiellen Abbau von Gemischen aus verschiedenen deuterierten Toluolspezies durch zwei sulfatreduzierende Bakterienstämme (Meckenstock & Richnow, 2002; Morasch et al., 2001)

wie verschieden deuterierte Toluole als reaktive Tracer eingesetzt wurden. Ziel war die Quantifizierung der anaeroben Schadstoffabbaus anhand der Fraktionierung der deuterierten Toluole sowie mit Hilfe der konservativen Tracer.

Als repräsentative Modellsubstanz wurde Toluol in einem Gemisch aus Toluol D₅ und D₈ verwendet. Diese deuterierten Toluolspezies haben den Vorteil, dass sie analytisch eindeutig bestimmbar und von nicht-markiertem Toluol unterscheidbar sind. Toluol D₅ wird im Vergleich zu Toluol D₈ mikrobiell schneller umgesetzt. Daher kann anhand der Veränderung des Konzentrationsverhältnisses dieser Spezies der Abbau qualitativ nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist es möglich, durch die Verwendung einer modifizierten Rayleigh-Gleichung den mikrobiellen Toluolabbau zu berechnen (siehe Kap. 2.4, Gl. 2-6).

Die Eignung der Methode sollte durch die Bestimmung des mikrobiellen Toluolabbaus anhand des Einsatzes von konservativen Tracern überprüft werden (siehe Kap. 2.4, Gl. 7). Dafür wurden im Rahmen des MKTE Bromid und Uranin als konservative Tracer eingesetzt. Weiterhin sollte durch die Bestimmung der Retardationsfaktoren von Toluol D₅ und D₈ mit Hilfe der konservativen Tracer deren Transportverhalten untersucht werden (siehe Kap. 2.4, Gl. 1). Es kann davon ausgegangen werden, dass das Transportverhalten der beiden deuterierten Toluolspezies annähernd dem von nicht-markiertem Toluol entspricht (Poulson et al., 1997).

Das MKTE fand auf dem SAFIRA-Standort Zeitz (Sanierungsforschung In Regional kontaminierten Aquiferen) statt. Die Untersuchungen waren Teil des vom Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten RETZINA-Projektes (REFERENZTESTFELD Zeitz zur Implementierung des „Natural Attenuation“-Ansatzes) (BMBF Förderkennzeichen 02WT0041).

2 Material und Methoden

2.1 Standortbeschreibung

Der Untersuchungsstandort befindet sich ca. 8 km nordöstlich der Stadt Zeitz (Sachsen-Anhalt) im Bereich eines ehemaligen Hydrierwerkes. Hier wurden seit 1938 in großtechnischen Verfahren Treibstoffe, Schmieröle, Benzol und Paraffine auf der Basis der Braunkohlehydrierung und Erdöldestillation hergestellt. Durch die fast vollständige Zerstörung des Werkes während des Zweiten Weltkrieges, Havarien, Leckagen sowie unachtsamen Umgang bei der Ver- und Entladung von Rohstoffen bzw. Produktionsgütern kam es zu großflächigen Kontaminationen des Grundwassers. Die Hydrogeologie des Standortes ist in verschiedenen Arbeiten detailliert beschrieben worden (Dahmke et al., 2004; Fischer et al., 2004; Gödeke et al., 2004a; Gödeke et al., 2004b; Vieth et al., 2001; Vieth et al., 2004).

Das MKTE wurde im Bereich des stärker kontaminierten oberen Grundwasserleiters durchgeführt. Das Hauptschadenszentrum befindet sich in unmittelbarer Nähe des ehemaligen Benzoltanklagers und der Destillationsanlage. Hier wurden BTEX-Konzentrationen von bis zu 1000 mg/l gemessen. Diese relativ hohen Konzentrationen weisen auf residuale Schadstoffphasen im Zentrum der Kontamination hin, aus denen die Schadstofffahne gespeist wird. Entlang des nord-nordöstlichen Grundwasserabstroms des Schadenszentrums hat sich eine mindestens 350 m lange BTEX-Fahne ausgebildet (Abbildung 2). Anhand der hydrogeo- und isopenchemischen Gegebenheiten des Standortes zeigte sich, dass die mikrobielle Sulfatreduktion der dominierende Abbauprozess im Bereich der Schadstofffahne ist, während die aerobe Respiration, Nitrat-, Eisen(III)-Reduktion und Methanogenese offensichtlich nur vernachlässigbare Anteile an der Schadstoffumsetzung haben (Dahmke et al., 2004; Fischer et al., 2004; Vieth et al., 2001; Vieth et al., 2004).

Das MKTE wurde im nordöstlichen Randbereich der BTEX-Fahne durchgeführt (Abbildung 2). In dieser

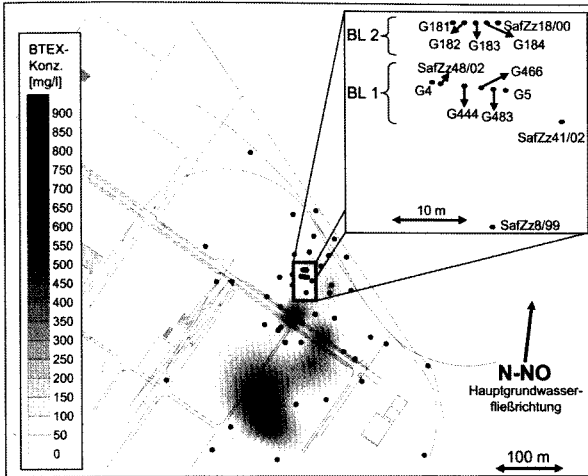


Abbildung 2:
Lageplan der Grundwassermessstellen des Standortes Zeitz mit der BTEX-Schadstofffahne (Konzentrationen in mg/l aus der Messkampagne Dez. 2002).
Als Detailbild (oben rechts) sind während des MTKE beprobte Messstellen dargestellt. BL = Beobachtungslinie

Zone sind die Toluolkonzentrationen im Grundwasser kleiner als 50 µg/l. Im Vergleich dazu wurden im Schadenszentrum Toluolgehalte von mehr als 40 mg/l bestimmt. Anhand der substratspezifischen ¹³C/¹²C-Fraktionierung des Toluols entlang des Grundwasserabstroms der BTEX-Fahne konnte ein mikrobieller Toluolabbau nachgewiesen werden (Vieth *et al.*, 2004). Für das Wiederfinden der eingespeisten Tracer wurden über einen Zeitraum von ca. 4,5 Monaten an zwei Beobachtungslinien, die ca. 24 und 35 m im Grundwasserabstrom des Injektionsbrunnens (Saf Zz 8/99) liegen, Grundwasserproben entnommen (Abbildung 2). In diesem Bereich hat der Grundwasserleiter eine Mächtigkeit von ca. 4 bis 6 m und der Grundwasserspiegel lag bei ca. 9,20 m unter der Geländeoberkante (m u GOK) (Abbildung 3). Die Probenahme erfolgte an unausgebauten Messstellen (in Abbildung 2 mit G bezeichnet), die mittels „direct push“-Verfahren (Geoprobe®) abgeteuft wurden. In die Bohrlöcher wurden PVC-Rohre eingebracht, an denen in verschiedenen Abständen Doppelventil-Gasverdrängungspumpen (IMW-Innovative Messtechnik Weiß,

Deutschland) befestigt wurden, so dass eine tiefenorientierte Beprobung durchgeführt werden konnte. Dabei wurde die untere Beobachtungstiefe einer Messstelle mit P1, die mittlere mit P2 und die obere mit P3 bezeichnet (Abbildung 3). Zusätzlich wurde die Tracerausbreitung an ausgebauten Messstellen (Saf Zz 41/02, 48/02, 18/00) überwacht. Diese wurden mit einer elektrischen Tauchpumpe (MP1, Bjerringbro, Dänemark) beprobt.

2.2 Tracereinspeisung

Vor der Tracereinspeisung wurden aus der Messstelle Saf Zz 8/99 5 m³ Grundwasser entnommen (Abbildung 4). Dieses wurde vom Zeitpunkt der Befüllung bis zum Abschluss der Einspeisung mit Argon begast, um eine Lösung von Luftsauerstoff in das Wasser zu verhindern und das gelöste Toluol zu entfernen. Nachdem nach ungefähr 24 Stunden der Grundwasserspiegel in der Messstelle Saf Zz 8/99 auf den gleichen Pegelstand wie vor der Grundwasserentnahme gestiegen war, wurden dem entnommenem Wasser 10 kg Kaliumbromid und

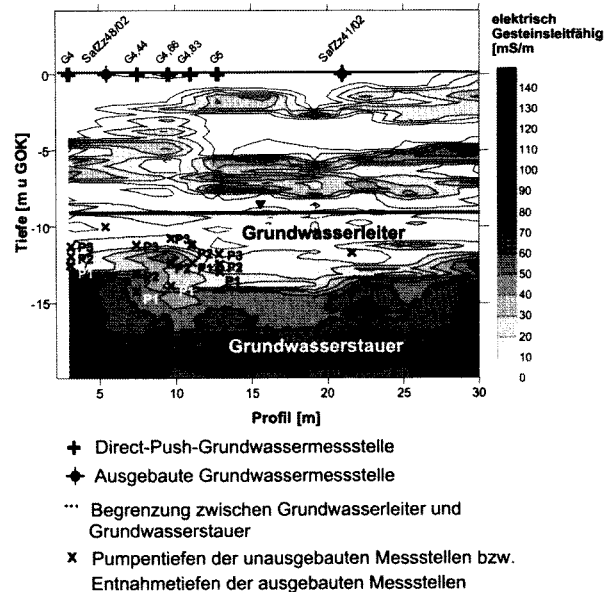


Abbildung 3:
Schematische Darstellung der elektrischen Gesteinsleitfähigkeit im Bereich der 1. Beobachtungslinie. Je größer die elektrische Gesteinsleitfähigkeit ist, desto größer ist der Anteil an Schluff bzw. Ton.

Wir machen Bodenschutz möglich ...

seit 25 Jahren

in mehr als 150 Gutachten und Projekten im Inland,

über 30 im Ausland sowie 16 F+E-Vorhaben für Bundes- und Landesbehörden.

KOMPETENZ und ERFAHRUNG

BSD Bodenschutzdienst für Städte und Gemeinden GmbH

bfb+ büro für bodenbewertung Dr. Wolfram D. Kneib

www.bsd-bodenschutzdienst-gmbh.de

www.bfb-buero-fuer-bodenbewertung.de

Rehsenweg 75 D 24148 Kiel

Telekommunikation via:

AD+L Zentrale Fon ++49 +431 720500 – Fax 720540

adl-zentrale@t-online.de www.adl-zentrale.com

www.bodenschutz-praxis.net

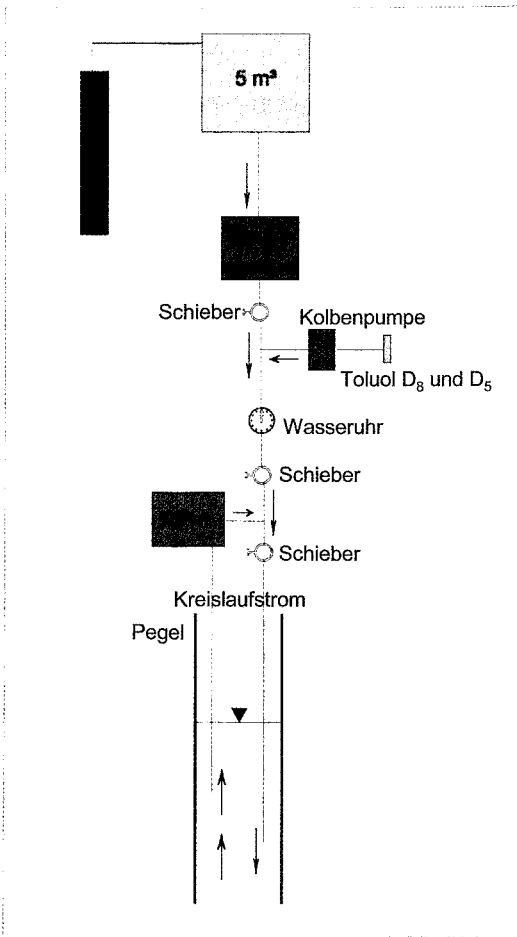


Abbildung 4:
Schematischer Aufbau der Einspeisapparatur

100 g Uranin zugesetzt. Nach deren vollständigen Lösung erfolgte die Einspeisung des Wassers mit einer Saugpumpe (Gardena, Deutschland) über einen Zeitraum von sechs Stunden. Das Toluolgemisch bestehend aus 195 g Toluol D₅ (CIL-Cambridge Isotope Laboratories, USA; chemischer Reinheitsgrad 98 %) und 205 g Toluol D₈ (Chemotrade, Deutschland; chemischer Reinheitsgrad 99 %) wurde mit einer Kolbenpumpe (Ismatec, Kolbenpumpenkopf FMI 365, Pumpenantrieb MCP-ISM 404, Schweiz) über eine eigens hergestellte Düse in Form sehr kleiner Tropfen dem Tracerfluss kontinuierlich zugegeben. Dadurch sollte die Bildung von Toluolphasen verhindert und somit eine möglichst vollständige Lösung in dem Wasser erreicht werden. Danach wurde das mit den Tracern versetzte Wasser über einen Kreislaufstrom in einer Tiefe von 12,50 m u GOK in den Injektionsbrunnen (Saf Zz 8/99) eingeleitet. Der Kreislaufstrom wurde durch eine elektrische Tauchpumpe (MP1, Bjerringbro, Dänemark) bis zum Ende der Einspeisung aufrecht gehalten und diente zur Homogenisierung der eingespeisten Tracer innerhalb der Messstelle (Abbildung 4).

Um die Einleitungskapazität des Injektionsbrunnens und das Fließfeld der Tracer im Grundwasser-

strom richtig abschätzen zu können, wurde auf Erfahrungen von Vorversuchen zurückgegriffen. Ohne die Dauer der Tracereingabe zu stark auszudehnen, wurde eine mittlere Einspeisrate von ca. 0,25 l/s angestrebt. So wurde mit Hilfe einer Wasseruhr die Rate des eingespeisten Wassers ständig kontrolliert und an Schiebern, die an verschiedenen Positionen der Apparatur eingebaut waren, eingestellt (Abbildung 4). Dabei wurde die Zugabe des Toluolgemisches über eine Steuereinheit an der Kolbenpumpe stets an die Einspeisrate des Wassers angepasst.

2.3 Analytik der Tracer

Für die Bestimmung der Uraninkonzentrationen wurden die Proben unmittelbar nach der Probenahme mittels eines Lichtletermesssystems (Avantes, Deutschland) und einer Tauchsonde aus Quarzglas (220 – 1.100 nm, 90°-Messung; Hellma, Deutschland) analysiert. Die Bromid-, Sulfat- und Nitratkonzentrationen wurden ionenchromatographisch bestimmt. Die für die Analyse verwendete Geräteeinheit bestand aus einem Ionenchromatographen mit einer AG 11 Vorsäule (4 × 250 mm; Dionex, USA) und einer IonPac AS 11 7 Trennsäule (4 × 50 mm; Dionex, USA). Dieser war direkt mit einem ASRS-I Anionensuppressor (4mm; Dionex, USA) und einem CD 20 Leitfähigkeitsdetektor (Dionex, USA) verbunden.

Die Konzentrationsbestimmung von Toluol D₅ und D₈ erfolgte an einem Gaschromatographen (GC 6890; Agilent Technologie, USA) gekoppelt mit einem massenselektiven Detektor (MS 5973; Agilent Technologie, USA). Zur Trennung der Analyten diente eine DB 624-Säule (30 m × 0,25 mm ID × 1,4 µm FD; Agilent Technologie, USA).

2.4 Berechnungsmethoden

Für die Charakterisierung des Transportverhaltens eines Stoffes im Grundwasserleiter wird häufig der Retardationsfaktor r verwendet. Er gibt an, um wie viel sich ein jeweils betrachteter Stoff gegenüber dem Grundwasser langsamer bewegt. Näherungsweise kann r wie folgt bestimmt werden:

$$r \approx \frac{v_a}{v_t} \quad [1]$$

Dabei ist v_a die Abstandsgeschwindigkeit eines konservativen Tracers und v_t die Abstandsgeschwindigkeit des zu untersuchenden Stoffes im Grundwasser. Die Abstandsgeschwindigkeit kann für schmale und steile Durchgangskurven durch die Geschwindigkeit, die zum Zeitpunkt der maximalen Tracerkonzentration eintritt, abgeschätzt werden (Käss, 1992).

Zur Quantifizierung des mikrobiellen Toluolabbaus auf einer Fließstrecke zwischen Einspeisbrunnen und jeweiligem Messpunkt wurden zwei Methoden verwendet.

Die erste Methode beruht auf der Grundlage einer modifizierten Rayleigh-Gleichung (Gleichung 2) (Hunkeler, 2002).

$$\frac{C_t}{C_0} = \frac{1+R_t}{1+R_0} \left(\frac{R_t}{R_0} \right)^{\left(\frac{1}{\alpha} \right)} \quad [2]$$

R_t und R_0 bezeichnen die Konzentrationsverhältnisse der beiden Toluolspezies D_8 und D_5 zu einer bestimmten Zeit (t) und zu Beginn der Tracereinspeisung ($t = 0$). C_t und C_0 geben die absoluten Toluolkonzentrationen aus der Summe von Toluol D_8 und D_5 zu einer bestimmten Zeit (t) und zu Beginn der Tracereinspeisung ($t = 0$) an. α ist der kinetische Fraktionierungsfaktor. Der prozentuale mikrobielle Abbau für einen bestimmten Probenahmezeitpunkt B_t kann anhand der Veränderung der Toluolkonzentrationen C_t und C_0 bestimmt werden (Gleichung 3).

$$B_t[\%] = \left(1 - \frac{C_t}{C_0} \right) \times 100 \quad [3]$$

In einem Aquifer wird die Toluolkonzentration C_t nicht nur durch mikrobielle Abbauprozesse sondern auch durch abiotische Effekte beeinflusst. Je stärker die abiotischen Effekte C_t verändern, desto ungenauer wird die Bestimmung von B_t durch Gleichung 3. Doch mit Hilfe von Gleichung 2 kann B_t durch die Änderung des Konzentrationsverhältnisses R_t und R_0 sowie eines geeigneten Fraktionierungsfaktoren α berechnet werden (Gleichung 4). R_t wird im Gegensatz zu C_t ausschließlich durch den mikrobiellen Abbau beeinflusst (Schüth *et al.*, 2003).

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

Anhand von B_t wurden theoretische Toluolkonzentrationen C_{theo} berechnet, die während des Transports durch den Grundwasserleiter nicht durch mikrobielle Umsetzung beeinflusst wurden (Gleichung 5).

$$C_{theo} = \left(\frac{C_t}{100 - B_t} \right) \times 100 \quad [5]$$

Zur Bestimmung des prozentualen mikrobiellen Abbaus B auf einer Fließstrecke zwischen Einspeisbrunnen und dem jeweiligen Messpunkt wurden die Flächen der realen Durchbruchkurven aus der Summe der Toluolkonzentrationen D_5 und D_8 (A_{D5+D8}) und die Flächen der theoretischen Toluolkonzentrationen (C_{theo} , berechnet nach Gleichung 5) (A_{theo}) verwendet (Gleichung 6).

$$B[\%] = \left(\frac{A_{theo} - A_{D5+D8}}{A_{theo}} \right) \times 100 \quad [6]$$

Für die zweite Methode der Bestimmung des mikrobiellen Toluolabbaus auf einer Fließstrecke zwischen Einspeisbrunnen und dem jeweiligen Messpunkt wurden die Durchbruchkurven der konservativen Tracer genutzt. Dabei wurde B durch die Veränderung des Verhältnisses der eingespeisten Menge eines konservativen Tracers (m_{kons}) und des deuterierten Toluols (m_{D5+D8}) sowie des Verhältnisses der Durchbruchkurvenflächen eines konservativen Tracers (A_{kons}) und des deuterierten Toluols (A_{D5+D8}) bestimmt (Gleichung 7).

$$B[\%] = 100 - 100 \times \frac{A_{D5+D8}}{A_{kons}} \times \frac{m_{kons}}{m_{D5+D8}} \quad [7]$$

3 Resultate und Diskussion

Am Beispiel der Tracerdurchgangskurven der Messpunkte G 466 P2 (1. Beobachtungslinie) und G 182 P2 (2. Beobachtungslinie, Abbildung 5) wurden die Retardationsfaktoren für Toluol D_5 und D_8 sowie Uranin berechnet (siehe Kapitel 2.4, Gleichung 1) (Tabelle 1). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für die anderen Messpunkte im zentralen Bereich der Tracerfahne bestimmt.

Für die Berechnungen konnte nur Bromid als konservativer Tracer, der das Transportverhalten des Grund-

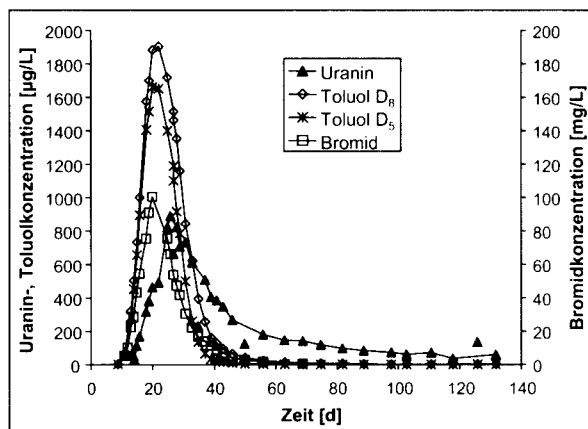


Abbildung 5: Durchgangskurven der eingespeisten Tracer am Messpunkt G 182 P2

Tabelle 1: Berechnete Retardationsfaktoren r für Toluol D_5 und D_8 sowie Uranin an den Messpunkten G466 P2 (1. Beobachtungslinie) und G 182 P2 (2. Beobachtungslinie). Als konservativer Tracer wurde für die Berechnungen Bromid ($r_{Bromid} = 1$) verwendet.

Messstelle	Entfernung vom Einspeisbrunnen [m]	Entnahmetiefe [m u GOK]	Retardationsfaktor r		
			Toluol D_5	Toluol D_8	Uranin
G 466 P2	23,78 (1. Beobachtungslinie)	12,30	1,09	1,10	1,23
G 182 P2	35,08 (2. Beobachtungslinie)	12,80	1,01	1,05	1,26

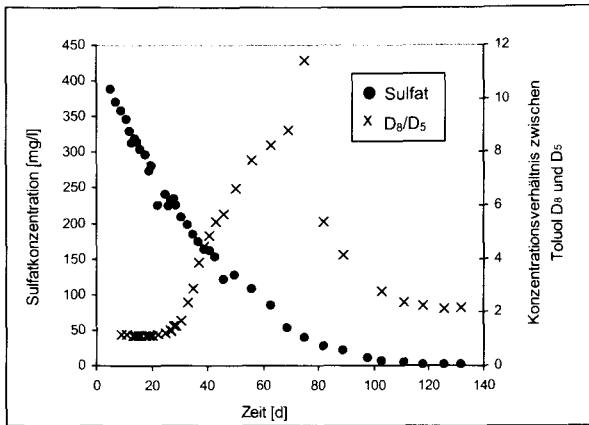


Abbildung 6:
Änderung der Sulfatkonzentrationen und des Konzentrationsverhältnisses zwischen Toluol D_8 und Toluol D_5 während des Tracerdurchgangs am Messpunkt G182 P2

wassers widerspiegelt, verwendet werden ($r_{\text{Bromid}} = 1$). Uranin wurde im Vergleich zu den anderen Tracern deutlich später detektiert (Abbildung 5) und wurde demzufolge langsamer als das Grundwasser durch den Aquifer transportiert. Deshalb ist die Berechnung der Retardationsfaktoren für Toluol D_5 und D_8 im Bezug zu Uranin nicht geeignet. Auch bei einem MKTE im Bereich des unteren Grundwasserleiters des Standortes Zeitz konnte Uranin aufgrund seines verzögerten Transportes nicht als konservativer Tracer für die Berechnung der Retardationsfaktoren verwendet werden (Gödeke et al., 2004b).

Anhand der Retardationsfaktoren zeigt sich, dass Bromid im Vergleich zu Toluol D_5 und D_8 annähernd gleich retardiert wurde. Offensichtlich ist das Rückhaltevermögen der Aquifermatrix gegenüber Toluol in Zeitz relativ gering. Deshalb scheint die Sorption als NA-Prozess am Standort Zeitz keine wichtige Rolle zu spielen. In einem MKTE, bei dem ebenfalls Bromid und Toluol D_8 als Tracer eingesetzt wurden, konnte ein fast identischer Retardationsfaktor für Toluol D_8 (1,04) berechnet werden (Thierrin et al., 1995).

Für Uranin wurde ein deutlich größerer Retardationsfaktor bestimmt. Somit wird Uranin im Aquifer stärker sorbiert als Bromid bzw. Toluol D_5 und D_8 und weist demnach ein deutlich verzögertes Transportverhalten auf.

Wie am Beispiel des Messpunktes G 182 P2, welcher repräsentativ für die anderen Messpunkte im zentralen Bereich der Tracerfahne ist, gezeigt werden kann, stieg das Konzentrationsverhältnis zwischen Toluol D_8 und D_5 im Verlauf des Tracerdurchganges an (Abbildung 6). Da beide Toluolspezies annähernd gleich im Grundwasserleiter retardiert bzw. verdünnt wurden, ist dieser Anstieg auf den schnelleren mikrobiellen Abbau von Toluol D_5 gegenüber Toluol D_8 zurückzuführen. Somit konnte ein qualitativer Nachweis für den mikrobiellen Toluolabbau zwischen Einspeisbrunnen

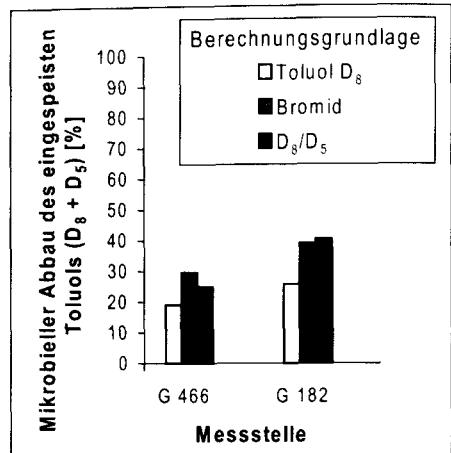


Abbildung 7:
Prozentualer mikrobieller Toluolabbau B auf der Fließstrecke zwischen Einspeisbrunnen Saf Zz 8/99 und den Messpunkten G466 P2 (1. Beobachtungslinie) und G182 P2 (2. Beobachtungslinie) berechnet auf der Grundlage von Toluol D_8 (weißer Balken), Bromid (grauer Balken) und dem Konzentrationsverhältnis zwischen Toluol D_8 und Toluol D_5 unter Verwendung einer modifizierten Rayleigh-Gleichung (schwarzer Balken)

und den im Grundwasserabstrom befindlichen Messstellen erbracht werden.

Am Ende des Tracerdurchgangs konnte in den jeweiligen Grundwasserproben eine Abnahme des Verhältnisses D_8/D_5 registriert werden (Abbildung 6). Dies deutet darauf hin, dass der mikrobielle Abbau des eingespeisten Toluols eingeschränkt war. Offensichtlich wurde die mikrobielle Umsetzung durch den erheblichen Rückgang des Sulfats als relevanter Elektronenakzeptor gehemmt. In den Wasserproben des Messpunktes G 182 P2 mit Sulfatkonzentrationen von kleiner als 28 mg/l sank das Verhältnis von Toluol D_8 zu D_5 stetig (Abbildung 6). Dieser Zusammenhang könnte den Rückgang des mikrobiellen Toluolabbaus erklären. Eine Limitation der Sulfatreduktion wurde ebenfalls im Kernbereich von Schadstofffahnen, in dem die Sulfatkonzentrationen im Vergleich zum Fahnenrand stark vermindert waren, nachgewiesen (Christensen et al., 2000; Christensen et al., 2001; Cozzarelli et al., 2000). In marinen Bereichen konnte eine eingeschränkte Sulfatreduktion ab Sulfatkonzentrationen unterhalb von 20 mg/l beobachtet werden (Habicht et al., 2002; Whitticar, 1999).

Mit Hilfe der Veränderung des Konzentrationsverhältnisses von Toluol D_8 und D_5 konnte durch Verwendung einer modifizierten Rayleigh-Gleichung der prozentuale mikrobielle Abbau über die Fließstrecke zwischen dem Einspeisbrunnen und dem jeweiligen Messpunkt berechnet werden (siehe Kapitel 2.4, Gleichung 2–6). Um die Anwendbarkeit der Methode zu überprüfen, wurde der prozentuale mikrobielle Abbau mittels der Tracer Bromid und Toluol D_8 bestimmt (siehe Kapitel 2.4, Gleichung 7). Eine Quantifizierung anhand von Uranin wurde nicht durchgeführt, weil durch das

lange Peak tailing der Durchbruchskurven (siehe Abbildung 5) keine verlässlichen Durchbruchskurvenflächen für diesen Tracer bestimmt werden konnten.

Die durch die verschiedenen Methoden bestimmten Ergebnisse sind in Abbildung 7 am Beispiel der Messpunkte G466 P2 (1. Beobachtungslinie) und G 182 P2 (2. Beobachtungslinie) dargestellt. Diese Messpunkte sind repräsentativ für alle Messpunkte im zentralen Bereich der Tracerfahne, an denen Berechnungen durchgeführt wurden. Die Quantifizierung des prozentualen mikrobiellen Toluolabbaus auf Grundlage der modifizierten Rayleigh-Gleichung und des Bromids ergaben annähernd gleiche Ergebnisse. Der prozentuale mikrobielle Toluolabbau, der Toluol D₈ in die Berechnungen einbezieht, ist deutlich geringer. Das liegt daran, dass Toluol D₈ nicht konservativ ist, sondern auch der mikrobiellen Umsetzung im Aquifer unterliegt. Somit ergibt sich durch diese Methode ein Mindestwert des mikrobiellen Toluolabbaus.

4 Schlussfolgerung und Ausblick

Durch den Einsatz des reaktiven Tracergemisches aus Toluol D₈ und D₅ konnten qualitative und quantitative Aussagen über den mikrobiellen Schadstoffabbau am Standort Zeitz abgeleitet werden. Zusätzlich war es durch die gleichzeitige Einspeisung konservativer Tracer möglich, die Berechnungsmethode auf Grundlage der modifizierten Rayleigh-Gleichung zu überprüfen sowie das Transportverhalten der deuterierten Toluolspezies zu untersuchen. Dabei war es nicht möglich, durch Uranin den mikrobiellen Abbau verlässlich zu bestimmen. Somit ist die Wahl geeigneter konservativer Tracer ein wichtiges Kriterium bei der Durchführung des hier vorgestellten Konzeptes.

Bisher wurde die Eignung von Isotopenfraktionierungsfaktoren, die im Labor bestimmt wurden, für die Quantifizierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus in einem kontaminierten Grundwasserleiter noch nicht nachgewiesen. Aufgrund der annähernd gleichen Ergebnisse, die unter Verwendung des Bromids als konservativer Tracer und der modifizierten Rayleigh-Gleichung bestimmt wurden, konnte gezeigt werden, dass die im Labor bestimmten Fraktionierungsfaktoren für die Bestimmung des mikrobiellen Toluolabbaus in einem BTEX-belasteten Aquifer verwendbar sind. Gleiches sollte somit auch für Berechnungen mit Fraktionierungsfaktoren, welche bei Laborabbauversuchen anhand von Substraten mit natürlichen Isotopenverhältnissen bestimmt wurden, gelten (Fischer *et al.*, 2004; Griebler *et al.*, 2004; Meckenstock *et al.*, 2002; Richnow *et al.*, 2003a; Richnow *et al.*, 2003b; Vieth *et al.*, 2001; Vieth *et al.*, 2004). Dabei sollten Laborfraktionierungsfaktoren ausgewählt werden, die die bio-geochemischen Verhältnisse eines kontaminierten Grundwasserleiters repräsentieren und somit den mikrobiellen Abbau in dem Aquifer widerspiegeln.

In Zukunft wird überprüft, inwieweit die Anreicherung des Deuteriums in Wasser oder Methan infolge des ana-

eroben *in situ*-Abbaus deuterierter Schadstoffe zu deren Quantifizierung geeignet ist. Außerdem wird versucht, durch den Nachweis von deuterierten Metaboliten Aussagen über die Abbauewege der Schadstoffe im Aquifer abzuleiten. Eine erfolgreiche Quantifizierung des mikrobiellen *in situ*-Abbaus durch die Anreicherung von Deuterium in Metaboliten konnte bereits für einen Push-Pull-Test, bei dem vollständig deuteriertes Toluol D₈ und o-Xylol D₁₀ als Substrate eingesetzt wurden, beschrieben werden (Reusser *et al.*, 2002).

Im Rahmen des hier dargestellten MKTE wurde gezeigt, dass durch den Einsatz verschieden deuterierter Toluolspezies der Transport und der mikrobielle Abbau eines Schadstoffes in einem kontaminierten Aquifer erfasst werden kann. Somit wurde ein Konzept vorgestellt, welches auch auf andere Schadstoffe bzw. Grundwasserschadensfälle übertragbar ist, insofern geeignete Fraktionierungsfaktoren für die Berechnung des prozentualen mikrobiellen Abbaus zur Verfügung stehen. Ein wesentlicher Vorteil des MKTE ist, dass im Gegensatz zu Bodensäulenversuchen bzw. anderen Laborexperimenten direkt Aussagen zum Verhalten eines Schadstoffes in einem Grundwasserleiter abgeleitet werden können. Dadurch erscheint die Verwendung des MKTE-Konzeptes bei der Schadensfallerkundung sowie Schadensfallüberwachung im Rahmen einer Sanierungsstrategie auf Grundlage von Monitored Na-

ALSTOM Power Environmental Consult
und **TODA KOGYO** präsentieren

Nanotechnologie in der
Altlastensanierung



IRON FOR YOU!

Die Sanierungstechnologie, auf die alle schon
immer gewartet haben

www.Fe4U.de

Ideal für LHKW-, PCB-, Schwer-
metall- und weitere Schäden

tural Attenuation (MNA) sehr Erfolg versprechend zu sein. Außerdem können die aus dem MKTE gewonnenen Ergebnisse als Datenbasis zur Erstellung und Überprüfung eines Schadstofftransportmodells dienen.

5 Danksagung

Für die technische Assistenz bei den Feldarbeiten und die Durchführung von chemischen Analysen gilt unser Dank Claudia Eckerl, Werner Kletzander, Dörthe von Seggern, Jürgen Mattuschund den Mitarbeitern der GFE-Consult GmbH. Weiterhin möchten wir uns bei Andrea Vieth für Ihre Mithilfe bei der Organisation des MKTE und bei Anett Georgi für Ihre fachliche Beratung bei der Dateninterpretation bedanken. Diese Arbeit wurde durch das Bundesministeriums für Bildung und Forschung unterstützt (BMBF Förderkennzeichen 02WT0041). Zusätzliche Mittel wurden durch das UFZ im Rahmen des Forschungsschwerpunkts SAFIRA zur Verfügung gestellt. Beiden Institutionen danken wir für die finanzielle Unterstützung. Außerdem möchten wir uns für die enge Zusammenarbeit im Rahmen der Forschungsarbeiten am SAFIRA-Standort Zeitz bei der Landesanstalt für Altlastenfreistellung (LAF, Magdeburg), der Mitteldeutschen Sanierungs- und Entsorgungsgesellschaft (MDSE, Bitterfeld) und der GINCON GmbH (Dresden) bedanken.

6 Literatur

Christensen, T.H., Bjerg, P.L., Banwart, S.A., Jakobsen, R., Heron, G., Albrechtsen, H.J., (2000) Characterization of redox conditions in groundwater contaminant plumes. *Journal of Contaminant Hydrology*, 45(3-4), 165-241.

Christensen, T.H., Kjeldsen, P., Bjerg, P.L., Jensen, D.L., Christensen, J.B., Baun, A., Albrechtsen, H.J., Heron, C., (2001) Biogeochemistry of landfill leachate plumes. *Applied Geochemistry*, 16(7-8), 659-718.

Cozzarelli, I.M., Sufliata, J.M., Ulrich, G.A., Harris, S.H., Scholl, M.A., Schlottmann, J.L., Christenson, S., (2000) Geochemical and microbiological methods for evaluating anaerobic processes in an aquifer contaminated by landfill leachate. *Environmental Science & Technology*, 34(18), 4025-4033.

Dahmke, A., Dethlefsen, F., Wachter, T., (2004) Geochemische Untersuchungen des Aquifers. Teil des Projektendberichts REF-ZINA: Referenztestfeld Zeitz zur Implementierung des „Natural Attenuation“ Ansatzes. Institut für Geowissenschaften, Christian-Albrechts Universität Kiel. http://www.gpi.uni-kiel.de/Angewandte/angewandte_geologie.htm.

Fischer, A., Vieth, A., Knöller, K., Wachter, T., Dahmke, A., Richnow, H.-H., (2004) Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus mit Hilfe von Isotopenchemischen Methoden. *Grundwasser*, 9(3), 159-172.

Gödeke, S., Weiß, H., Geistlinger, H., Fischer, A., Richnow, H.-H., Schirmer, M., (2004a) Strömungs- und Tracer-Transportmodellierung am Natural Attenuation-Standort Zeitz. *Grundwasser*, 9(1), 3-11.

Gödeke, S., Weiß, H., Richnow, H.H., Borsdorf, H., Trabiszsch, R., Dietze, M., Schirmer, M., (2004b) Tracertest zur Analyse des reaktiven Transports im Aquifer am Industriestandort Zeitz. *altlasten spektrum*, 13(4), 1-9.

Griebler, C., Safinowski, M., Vieth, A., Richnow, H.H., Meckenstock, R.U., (2004) Combined application of stable carbon isotope analysis and specific metabolites determination for assessing *in situ* degradation of aromatic hydrocarbons in a tar oil-contaminated aquifer. *Environmental Science & Technology*, 38(2), 617-631.

Habicht, K.S., Gade, M., Thamdrup, B., Berg, P., Canfield, D.E., (2002) Calibration of sulfate levels in the Archean Ocean. *Science*, 298(5602), 2372-2374.

Hunkeler, D., (2002) Quantification of isotope fractionation in experiments with deuterium-labeled substrate. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 5205-5206.

Käss, W., (1992) *Geohydrologische Markierungstechnik*. Gebrüder Borntraeger, Berlin Stuttgart.

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 and Soil Pollution: Focus*, 2(3), 141-152.

Meckenstock, R.U., Richnow, H.H., (2002) Quantification of isotope fractionation in experiments with deuterium-labeled substrate - Authors' reply. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(10), 5206-5207.

Morasch, B., Richnow, H.H., Schink, B., 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.

OSWER, (1999) Use of monitored natural attenuation at superfund, RCRA corrective action, and underground storage tank sites, pp. 32. Office of solid waste and emergency response-United States Environmental Protection Agency, Washington.

Poulsson, S.R., Drever, J.I., Colberg, P.J.S., (1997) Estimation of K_{oc} values for deuterated benzene, toluene, and ethylbenzene, and application to ground water contamination studies. *Chemosphere*, 35(10), 2215-2224.

Reusser, D.E., Istok, J.D., Beller, H.R., Field, J.A., (2002) *In situ* transformation of deuterated toluene and xylene to benzylsuccinic acid analogues in BTEX-contaminated aquifers. *Environmental Science & Technology*, 36(19), 4127-4134.

Richnow, H.H., Annweiler, E., Michaelis, W., Meckenstock, R.U., (2003a) Microbial *in situ* degradation of aromatic hydrocarbons in a contaminated aquifer monitored by carbon isotope fractionation. *Journal of Contaminant Hydrology*, 65(1-2), 101-120.

Richnow, H.H., Meckenstock, R.U., Reitzel, L.A., Baun, A., Ledin, A., Christensen, T.H., (2003b) *In situ* biodegradation determined by carbon isotope fractionation of aromatic hydrocarbons in an aerobic landfill leachate plume (Vejen, Denmark). *Journal of Contaminant Hydrology*, 64(1-2), 59-72.

Schüth, C., Taubald, H., Bolano, N., Maciejczyk, K., (2003) Carbon and hydrogen isotope effects during sorption of organic contaminants on carbonaceous materials. *Journal of Contaminant Hydrology*, 64(3-4), 269-281.

Thierrin, J., Davis, G.B., Barber, C., (1995) A ground-water tracer test with deuterated compounds for monitoring *in situ* biodegradation and retardation of aromatic hydrocarbons. *Ground Water*, 3, 469-475.

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

Vieth, A., Kästner, M., Schirmer, M., Weiß, H., Gödeke, S., Meckenstock, R.U., Richnow, H.H., (2004) *In-situ* biodegradation of benzene and toluene in a contaminated aquifer monitored by stable isotope fractionation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, im Druck.

Whiticar, M.J., (1999) Carbon and hydrogen isotope systematics of bacterial formation and oxidation of methane. *Chemical Geology*, 161(1-3), 291-314.

Anschrift der Autoren:

Anko Fischer, Jana Bauer, Matthias Kästner,
Hans-Herrmann Richnow
Department Bioremediation
UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH
Permoserstr. 15, 04318 Leipzig

Stefan Gödeke, Holger Weiß
Department Grundwasseranierung
UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH
Permoserstr. 15, 04318 Leipzig

Mario Schirmer
Department Hydrogeologie
UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH
Theodor-Lieser-Str. 4, 06120 Halle (Saale)

Michael Dietze
Zentrum für Angewandte Geowissenschaften
Universität Tübingen
Sigwartstr. 10, 72076 Tübingen

Rainer U. Meckenstock
Institut für Grundwasserökologie
GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH
Ingolstädter Landstr. 1, 85764 Neuherberg

ANHANG C

Version for Submission for the Journal

Environmental Geology

**Simulation of a reactive tracer experiment using stochastic
hydraulic conductivity fields**

**Stefan Gödeke¹, Helmut Geistlinger², Anko Fischer³, Hans-Hermann
Richnow³, Mario Schirmer^{4*}**

¹MWH Australia Pty Ltd, 178 St Georges Terrace, 6000 Perth, Australia

UFZ Centre for Environmental Research Leipzig-Halle

²Department of Soil Physics, Theodor-Lieser-Str. 4, 06120 Halle/Saale, Germany

³Department of Isotope Biogeochemistry, ⁴Department of Hydrogeology, Permoserstr.

15, 04318, Leipzig, Germany

*Corresponding author

Phone: ++ 49 341 235 3981

Fax: ++ 49 341 235 2126

E-mail: mario.schirmer@ufz.de

May 09, 2006

Abstract

Reactive tracer tests are usually performed to derive flow and transport as well as in situ biodegradation parameters. This paper describes the simulation of a reactive tracer test using the transition probability geostatistical approach. Fifty different equally probable aquifer realizations were generated based on the geological information of 107 boreholes in an area of 0.0625 km². One realization was chosen for the reactive transport simulations based on the results of the groundwater flow simulation and on particle tracking calculations. Field velocities at the site vary between 0.4 and 3 m/d. The transport of the reactive tracers toluene d5 and toluene d8 is simulated and first-order biodegradation rates of 0.017 d⁻¹ for toluene d5 and 0.012 d⁻¹ for toluene d8 are calculated.

Keywords

reactive transport, first-order biodegradation, toluene d5, toluene d8, transition probability geostatistics

Introduction

The solute transport of organic substances in groundwater is of particular interest at many contaminated sites today. At these sites reactive tracer tests have been performed in the field using a variety of compounds including herbicides (Maloszewski et al. 2003), fluorbenzoate (Boggs & Adams 1992), heavy metals (Ni, Cr(VI)) (Hess et al. 2002) and EDTA (ethylenediaminetetraacetate) (Davis et al. 2000). Typical parameters derived from these tests are dispersivity and retardation values, solute travel times and in-situ-biodegradation rates. Depending on the compound of interest, the type of tracer test being performed, the injection- and site-specific conditions, these rates can vary over several orders of magnitude (Suarez & Rifai 1999, Brouyere et al. 2005).

The investigated reactive tracer test described in this study was performed at the UFZ (Centre for Environmental Research Leipzig-Halle) research site at Zeitz, Eastern Germany (Gödeke et al., 2004, 2006). Here, two main heterogeneous aquifers can be distinguished, separated by a lignite and clay layer. The sediments consist of fluvial deposits of quaternary and tertiary age. The variance of the ln-transformed hydraulic conductivities at the investigation site determined from sieve analysis was 2.86, which shows that the local geology is highly heterogeneous (Gödeke et al. 2004). The tracer test was performed in the upper aquifer at the site. Major contaminants in groundwater are benzene discovered as pure phase at the contaminant source zone and toluene with concentrations of up to 50 mg/l. Deuterated toluene species (toluene d5 and toluene d8) were used as reactive tracers besides the conservative tracer bromide to investigate their biodegradation potential and to analyse the isotopic fractionation of these compounds (Fischer et al. 2005, Vieth et al. 2005). The terms d5 and -d8 refer to deuterium isotopes replacing hydrogen isotopes of the toluene molecule. More specific, toluene d5 refers to a ring deuterated molecule, whereas toluene d8 stands for a fully deuterated molecule.

The goal of this study was to derive first-order in-situ-biodegradation rates for the deuterated toluene species from a modeling approach and to show the applicability of using stochastic generated hydraulic conductivity fields for the simulation of a reactive tracer test. Field and numerical studies have indicated that hydraulic conductivity can vary by orders of magnitude over short distances (meters or decimeters) and that this variability greatly influences fluid flow and transport (Zheng & Gorelick 2003).

A deterministic approach for the characterization of such complex patterns may be inappropriate, because it will require the estimation of a large number of parameters, which cannot be supported by the small number of measurements available in many applications (Rubin 2003).

Material and Methods

For the tracer test 195 g of toluene d5 and 205 g toluene d8 together with 10,000 g potassium bromide were dissolved in 5 m³ of groundwater and injected into the well Saf Zz 8 during a time period of 8 hours (Figure 1, Table 1).

The tracer test is described in detail by Fischer et al. 2005. The resulting infiltration concentrations were 1345 mg/l for bromide, 39 mg/l for toluene d5 and 41 mg/l for toluene d8. Multilevel sampling was possible at each monitoring point.

Monitoring downstream of the injection well was being performed along two Geoprobe[®] control planes situated approximately 24 and 35 m away from the infiltration well for a period of 4.5 months. A previous tracer test has been performed in this area that suggested a flow direction in between these control planes (unpublished data).

For the simulation of the tracer test the transition probability approach was used (Carle & Fogg 1996). Several examples of the successful application of this method have been published (Weissmann et al. 1999, Weissmann & Fogg 1999).

The transition probability is defined by:

$$t_{jk}(h) = \Pr(k \text{ occurs at } x + h \mid j \text{ occurs at } x), \quad (1)$$

where k and j refer to categories or geologic units, x is a spatial location vector and h is a separation vector, also known as lag (Carle & Fogg 1996). The use of the transition probability approach demands to categorize the geologic information of each borehole into different hydrogeologic units. Five units were distinguished: gravel (1), medium and coarse sand (2), fine sand (3) lignite (4) and clay (5) (Table 2).

It can be seen that the geologic materials gravel followed by medium and coarse sand dominate the distribution.

From the calculated transition probabilities a Markov-chain model can be constructed. A Markov chain model is calculated from:

$$T(h, \phi) = \exp [R \phi h \phi], \quad (2)$$

Where $T(h, \phi)$ stands for a $K \times K$ matrix of transition probabilities, K stands for the number of categories, h is the lag or separation vector, ϕ represents direction and $R \phi$ is a matrix of transition rates (e.g. Weissman et al. 1999). The Markov chains are used for the generation of the different aquifer realizations. Fifty different equally probable aquifer realizations were generated using the transition probability module in GMS (Groundwater Modeling System). The simulations were based on the available borehole data of the site. Additional boreholes in the immediate vicinity of the investigated area were included in the simulations. Thus a total of 107 boreholes were used in an area of 0.0625 km². Borehole information of the lower aquifer where the distribution of the geologic materials is different from the upper aquifer was excluded. The different realizations are conditioned, meaning that the generated geologic materials at the borehole locations are the same materials as known from the borehole information.

An important part in the generation of the different aquifer realizations was the analysis of the vertical transition probability data. The transition probabilities from the borehole data were calculated using a sampling interval of 0.1 m. Subsequently, the Markov chains were adjusted to the measured transition rates in a curve fitting procedure. For the simulation a discrete lag distance of 8 m provided a good fit between the Markov chains and the measured transition probabilities. Generally the transition probability curve flattens out at some distance, whereas the flat part of the curve represents the mean proportion of the material. The Markov chains are defined by the proportions lens length (of the geologic material) and transition rate. The slope at the beginning of each Markov chain represents the transition rate. These transition rates can be used to identify possible fining upwards or coarsening upwards sequences (Table 3).

In our case it becomes obvious that coarsening upwards sequences between the materials sand and gravel and between fine sand and silt exist: The transition rate from gravel to sand is smaller than from sand to gravel and the transition rate from sand to fine sand is smaller than from fine sand to sand.

The mean lens lengths can be derived from the intersection of a tangent line from the early part of the curve with the lag distance axis. The mean lens lengths can also be calculated from the transition rates of the different materials (diagonal entries in Table 3) using the following equation (Carle & Fogg 1997):

$$r_{kk, \phi} = \frac{1}{L_{k, \phi}} \quad (3)$$

where L represents the mean lens length and r_{kk} , the transition rate between the different materials in the direction ϕ (Table 4).

It was assumed that the transition rates in the vertical direction can be used to derive the transition rates in the horizontal direction. Thus, a value of 10 was used to describe the ratio between mean lens lengths in the horizontal and mean lens lengths in the vertical direction. Borehole information of the tracer test area, where gravel is the dominant hydrogeologic unit, supported this ratio. Generally, the higher this ratio is assigned the more continuous in space are the different geologic units.

Each aquifer realization covered an area of 250 x 250 m and was divided into 20 layers, whereas the finite difference grid cells had the dimensions of 5 x 5 x 0.5 m. After the different aquifer realizations were generated the most appropriate realization was sought for the subsequent transport simulations. The criteria of choice were firstly a flow direction in the tracer test area representing the one observed in the field and secondly a low overall error for the flow field calibration. Stochastic simulations were performed using Modflow 2000 (Harbaugh et al. 2000). Constant head cells were used as boundary conditions on all sides of the model (Gödeke et al. 2004).

A total of 37 monitoring wells were used in the calibration process. Particle tracking simulations using Modpath (Pollock 1994) were performed for the determination of the flow direction. For the tracer test area a finer discretization of 1 m x 1m x 0.5 m was used to

minimize numerical dispersion for the subsequent tracer-transport simulations. Beforehand, six concentration observation wells and the infiltration well were established at the respective depth level. Transport simulations were performed using the mass-conservative TVD (time variation diminishing) algorithm (Leonard 1988) available with MT3DMS (Zheng & Wang 1999). Care was taken that the exact amount of tracer mass was infiltrated during the different simulations. First the conservative tracer bromide was simulated. In a next step the reactive tracers toluene d5 and toluene d8 were simulated. The simulation time was 50 days. Concentrations were calibrated for the highest observed breakthrough curve of each sampling point.

The calibration results were evaluated with the normalized root mean square residual error, defined by:

$$\text{Normalized root mean square error (NRMS)} = \frac{1/n \cdot \sqrt{\sum_{i=1}^n R_i^2}}{(X_{obs})_{\max} - (X_{obs})_{\min}} \quad (4)$$

Whereas R_i is the residual between calculated and observed head and $X_{obs \max}$ and $X_{obs \min}$ are the minimum and maximum values of the observed head.

Results and Conclusion

For the chosen grid a NRMS of 5.4 % was regarded as acceptable taking the highly heterogeneous geologic conditions at the site into account and since the flow direction of the grid in the tracer test area mirrored the one observed in the field. The flow directions of the particles starting from the infiltration well of the tracer test area of the different grids varied at an angle of approximately 30 degrees.

Generally the highest concentrations were observed at the greatest depth of each sampling point (in the field and for the model). The simulation of the conservative tracer showed that the breakthrough curves of the two control planes could not be fitted using only one hydraulic conductivity for the area between the two control planes. Although the observation points 181 and 182 were only 1.5 m apart from each other and were sampled at the same depth level, peak arrival times differed by as much as 11 days. This shows that small scale heterogeneities at the meter and possible sub-meter scale were of considerable influence on the tracer transport. Therefore the horizontal hydraulic conductivities between the two control planes of the tracer test area were adjusted and values between 5 and 60 m/d were chosen (Table 5).

The chosen vertical hydraulic conductivities were 1/10 of the horizontal hydraulic conductivities. A uniform longitudinal dispersivity of 0.6 m and an effective porosity of 0.25 were used for the calculations. The chosen transverse and vertical dispersivity values were 3 cm and 0.3 cm respectively.

The simulation of the conservative tracer bromide provided a good fit between simulated and experimental breakthrough curves (Figure 2-7). At this step it has to be pointed out that true concentrations (mg/l) are displayed. Some breakthrough curves (e.g. Geo 4.44) show a pronounced tailing which is generally a sign of significant geological heterogeneities and varying field velocities. The analysis of the breakthrough curves showed that field velocities varied between 0.4 and 3 m/d.

At measurement point 181 the simulated concentrations are lower than the observed concentrations. Here, a lower longitudinal dispersivity value would have provided a better fit. However, it was not the aim to perform a simulation using distributed transport parameters.

Based on the simulation of the conservative tracer, the reactive tracers toluene d5 and toluene d8 were simulated (Figure 8 and 9). It became obvious that toluene was only slightly retarded during transport, possibly due to the low organic carbon content of the aquifer. Sorption was considered based on a linear isotherm. The chosen K_d value was $1.5 \text{ e}^{-8} \text{ m}^3/\text{mg}$ and the density of the matrix was 1.6 g/cm^3 . Thus the retardation factor is 1.1.

As expected, the first-order degradation constant for toluene d5 was higher than for toluene d8 since toluene d5 is preferentially degraded. The derived degradation constants were 0.017 d^{-1} for toluene d5 and 0.012 d^{-1} for toluene d8. The rate constants were the same for dissolved and sorbed toluene. These rate constants are comparable to values from the literature (e.g., Suarez & Rifai 1999). A better fit between simulated and observed toluene concentrations could have probably been achieved using Monod kinetics. However since no reliable concentration of the dissolved microorganism- and microorganism concentration of the solid phase was available at that time, a simulation using monod kinetics was not performed.

This study shows the applicability of using the transition probability approach combined with stochastic simulations for the simulation of a reactive tracer test. The derived rate constants are plausible. Although the number of available boreholes was comparatively large (107) more boreholes, especially in the tracer test area would have been necessary to reduce the calibration time which was significant in this case.

Acknowledgments

We would like to thank our co-workers from the RETZINA Project team for their excellent co-operation. We are grateful for the funding of the RETZINA Project by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) under reference numbers 02WT0040, 02WT0041 and 02WT0042. Additional funding for the project has been provided through the SAFIRA (Remediation research in regionally contaminated aquifers) Programme of the UFZ Centre for Environmental Research Leipzig-Halle in the Helmholtz Association. We thank Olaf Böhme GFE-Consult GmbH, Halle, Germany and Ralf Trabisch (UFZ) for the site management.

Product names are only mentioned for identification purposes.

References

- Boggs JM, Adams EE 1992 Field Study of Dispersion in a Heterogenous Aquifer. 4. Investigation of Adsorption and Sampling Bias. *Water Resources Research* (28)12, 3325-3336
- Brouyere S, Carabin G, Dassargues 2005: Influence of Injection Conditions on Field Tracer Experiments. *Ground Water* 43(3), 389-400
- Carle SF, Fogg, GE 1996 Transition Probability-Based Indicator Geostatics. *Mathematical Geology* 28(4), 453-476
- Carle SF, Fogg GE 1997 Modeling spatial variability with one- and multi-dimensional continuous Markov chains. *Mathematical Geology* 29, 231-244
- Davis JA, Kent DB, Coston JA, Hess KM and Joye JL 2000 Multispecies reactive tracer test in an aquifer with spatially variable chemical conditions. *Water Resources Research*, 36(1): 119-134.
- Fischer A, Bauer J, Dietze M, Gödeke S, Schirmer M, Weiß H, Kästner M, Meckenstock R, Richnow H-H (2005). Konzept zur Quantifizierung des anaeroben in situ Schadstoffabbaus in BTEX-kontaminierten Grundwasserleitern mittels Deuterium-markierter Substanzen. *Altlastenspektrum* 1 (2005), 1-9
- Gödeke S, Richnow, HH, Weiß H, Fischer A, Vogt C, Borsdorf H, Schirmer M Multispecies-reactive tracer test for the implementation of enhanced in situ bioremediation at a BTEX contaminated megasite. *Journal of Contaminant Hydrology*, in press.
- Gödeke S, Weiss H, Geistlinger H, Fischer A, Richnow HH, Schirmer, M 2004. Natural Attenuation Standort Zeitz: Strömungs- und Tracertransportmodellierung. *Grundwasser*, 1(9): 3-11.
- Harbaugh, AW, Banta, ER, Hill, MC, and McDonald, MG 2000, MODFLOW-2000, the U.S. Geological Survey modular ground-water model – user guide to modularization concepts and the ground-water flow process: U.S. Geological Survey Open-File Report 00-92, 121 p.
- Hess, KM, Davis, JA, Kent, DB, and Coston, JA, 2002 Multispecies reactive tracer test in an aquifer with spatially variable chemical conditions, Cape Cod, Massachusetts: Dispersive transport of bromide and nickel. *Water Resources Research*, 38(8): 10.1029/2001WR000945.

Leonard, BP 1988 Universal Limiter for Transient Interpolation: Modeling of the Advective Transport Equations: The ULTIMATE Conservative Difference Scheme, Technical Memorandum 100916 ICOMP-88-11, NASA, Washington, DC.

Maloszewski, P, Zuber, A, Bedbur, E, Matthes, G 2003 Transport of three Herbicides in Ground Water at Twin Lake Test Site, Chalk River, Ontario, Canada

Pollock, DW 1994 User`s Guide for Modpath/Modpath-Plot, Version 3: A Particle Tracking Post-Processing Package for Modflow, the U.S. Geological Survey Finite-Difference Ground-Water Flow Model (Open-File Report No. 94-464). U.S. Geological Survey

Rubin 2003

Suarez, MP, Rifai, HS 1999 Biodegradation Rates for fuel Hydrocarbons and chlorinated solvents in groundwater. *Bioremediation Journal*, 3(4), 337-362.

Vieth, A, Kästner M, Schirmer M, Weiß H, Gödeke S, Meckenstock RU, Richnow HH 2005: In-situ biodegradation of benzene and toluene in a contaminated aquifer monitored by stable isotope fractionation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (1), 51-60

Weissmann, GS, Carle, SF, Fogg, GE 1999: Three-dimensional hydrofacies modeling based on soil surveys and transition probability geostatistics. *Water Resources Research* 35, 1761-1770

Weissmann, GS, Fogg, GE 1999 Multi-scale alluvial fan heterogeneity modeled with transition probability geostatistics in a sequence stratigraphic framework. *Journal of Hydrology* 226, 48-65

Zheng, C, Wang, PP 1999 MT3DMS: A modular three-dimensional multispecies model for simulation of advection, dispersion and chemical reactions of contaminants in groundwater systems: Documentation and user`s guide. Contract Report SERDP-99-1. Vicksburg, Mississippi: U.S. Army Engineer Research and Development Center

Zheng, C, Gorelick, SM 2003. Analysis of Solute Transport in Flow Fields Influenced by Preferential Flowpaths at the Decimeter Scale. *Ground Water*, 41(2), 142-155.

List of Tables

Table 1: Infiltration conditions of the tracer test

Table 2: Relative frequency of hydrogeologic units

Table 3: Transition rates between the different geologic materials

Table 4: Mean lens lengths of the different geologic materials in the vertical direction

Table 5: Horizontal hydraulic conductivities used for the transport simulation

List of Figures

Figure 1: Location of infiltration and observation wells

Figure 2: Simulated vs. observed concentration for point Geo 4.44 (measurement depth: 135.92 mNN)

Figure 3: Simulated vs. observed concentration for point Geo 466 (measurement depth: 136.52 mNN)

Figure 4: Simulated vs. observed bromide concentration for point Geo 181 (measurement depth: 135.87 mNN)

Figure 5: Simulated vs. observed bromide concentration for point Geo 182 (measurement depth: 135.9 mNN)

Figure 6: Simulated vs. observed bromide concentration for point Geo 183 (measurement depth: 136 mNN)

Figure 7: Simulated vs. observed bromide concentration for point Geo 184 (measurement depth: 136 mNN)

Figure 8: Simulated vs. observed toluene d5 concentration for point Geo 182 (measurement depth: 135.9 mNN)

Figure 9: Simulated vs. observed toluene d8 concentration for point Geo 182 (measurement depth: 135.9 mNN)

Figure 1: Location of infiltration and observation wells.

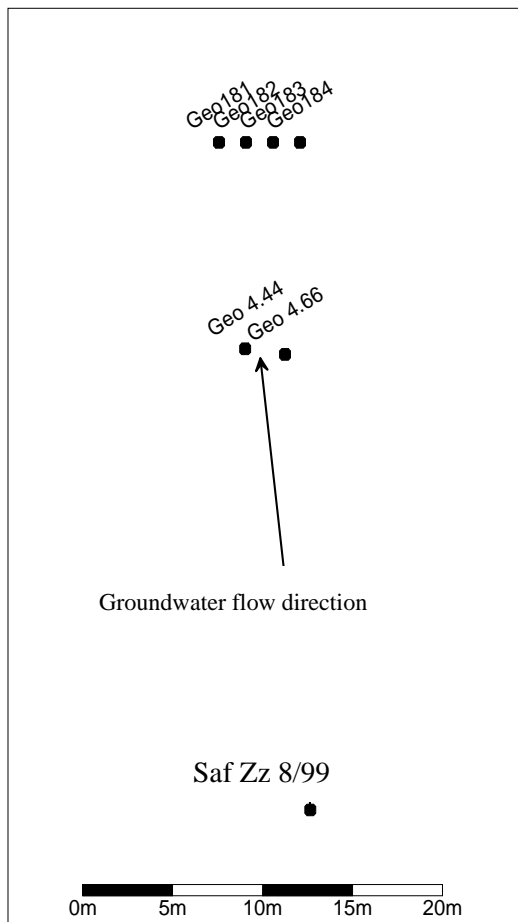


Figure 2: Simulated vs. observed concentration for point Geo 4.44 (measurement depth: 135.92 mNN)

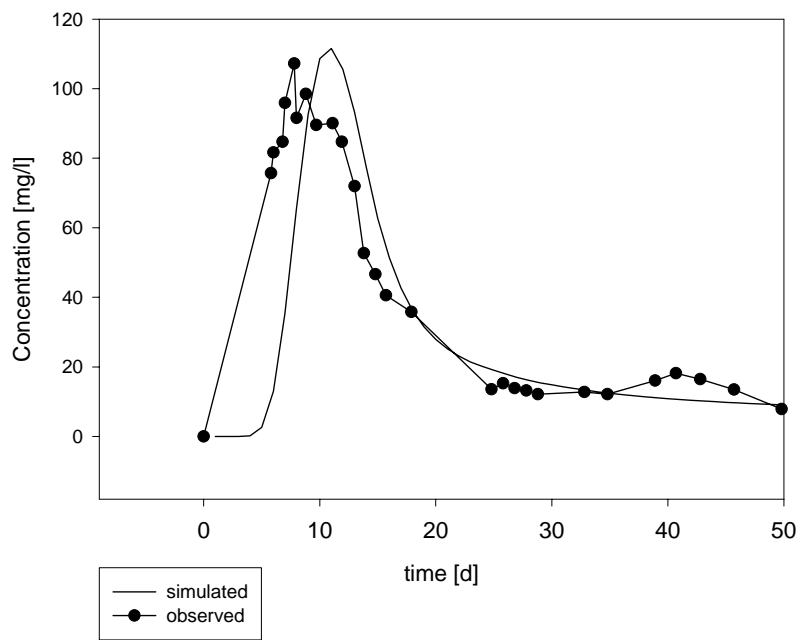


Figure 3: Simulated vs. observed concentration for point Geo 466 (measurement depth: 136.52 mNN)

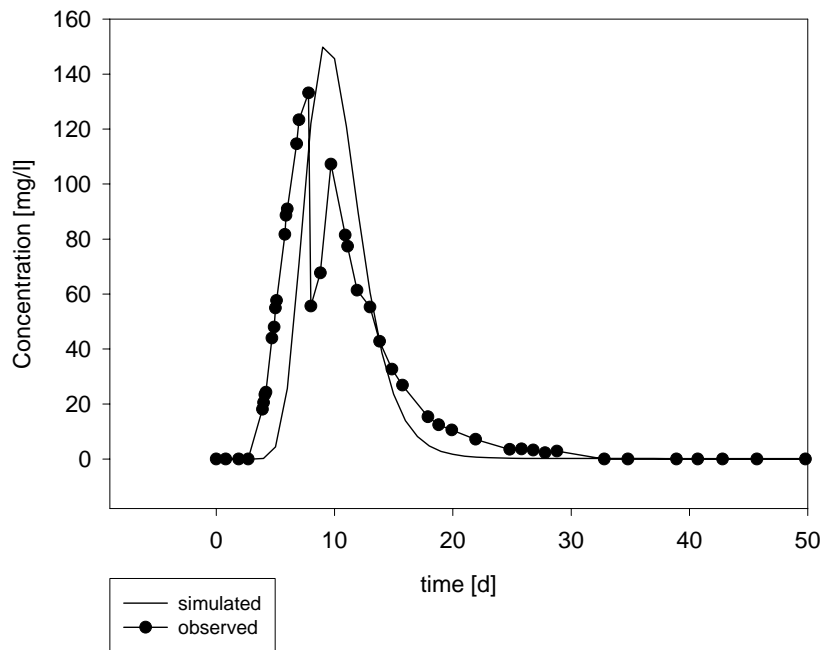


Figure 4: Simulated vs. observed bromide concentration for point Geo 181 (measurement depth: 135.87 mNN)

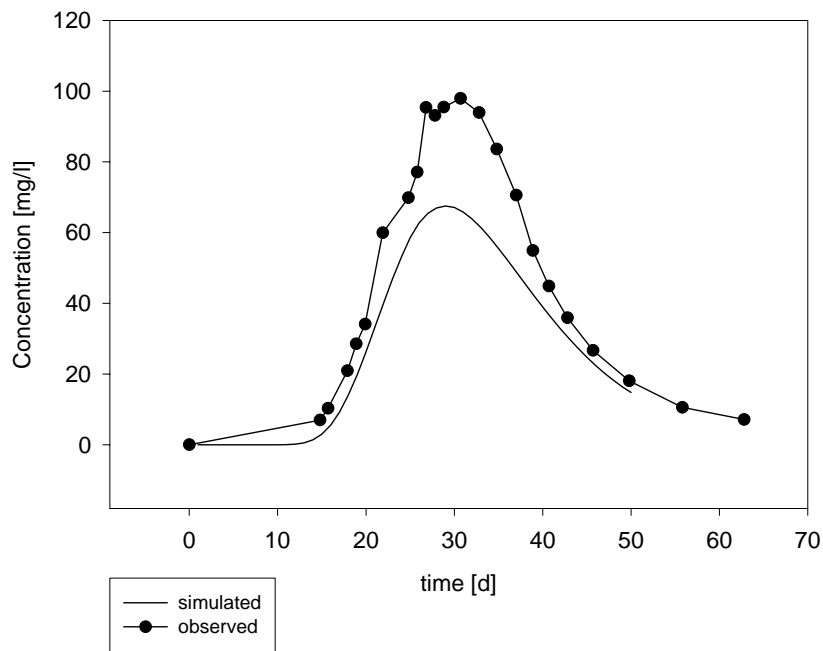


Figure 5: Simulated vs. observed bromide concentration for point Geo 182 (measurement depth: 135.9 mNN)

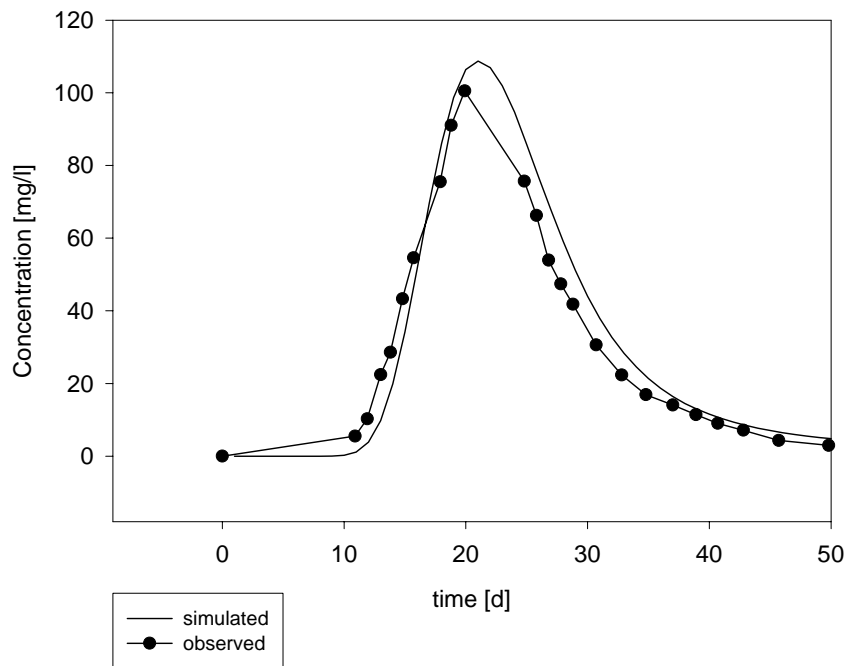


Figure 6: Simulated vs. observed bromide concentration for point Geo 183 (measurement depth: 136 mNN)

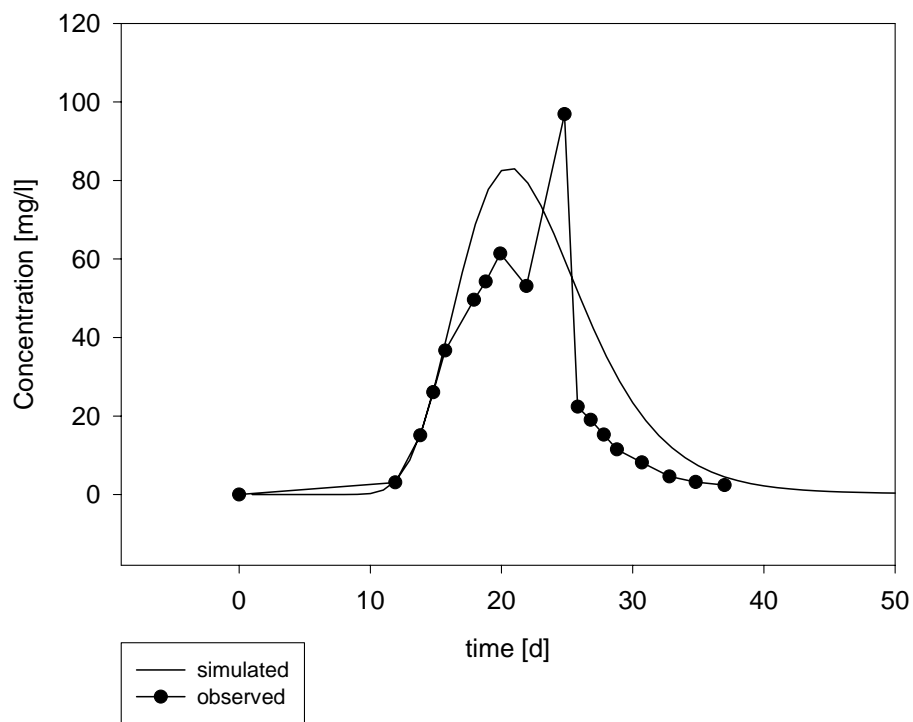


Figure 7: Simulated vs. observed bromide concentration for point Geo 184 (measurement depth: 136 mNN)

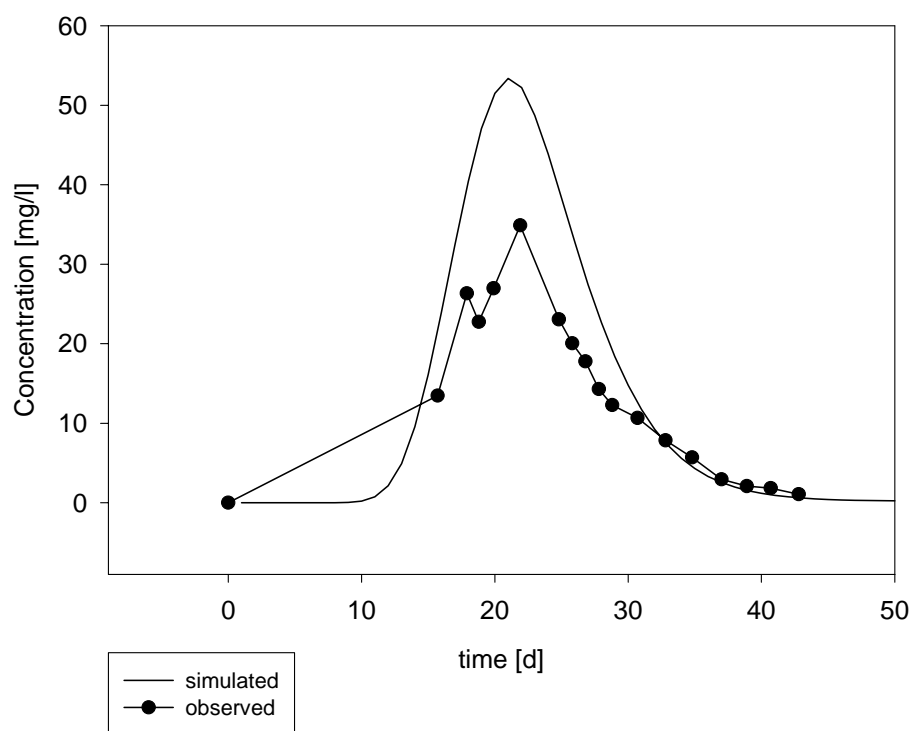


Figure 8: Simulated vs. observed toluene d5 concentration for point Geo 182 (measurement depth: 135.9 mNN)

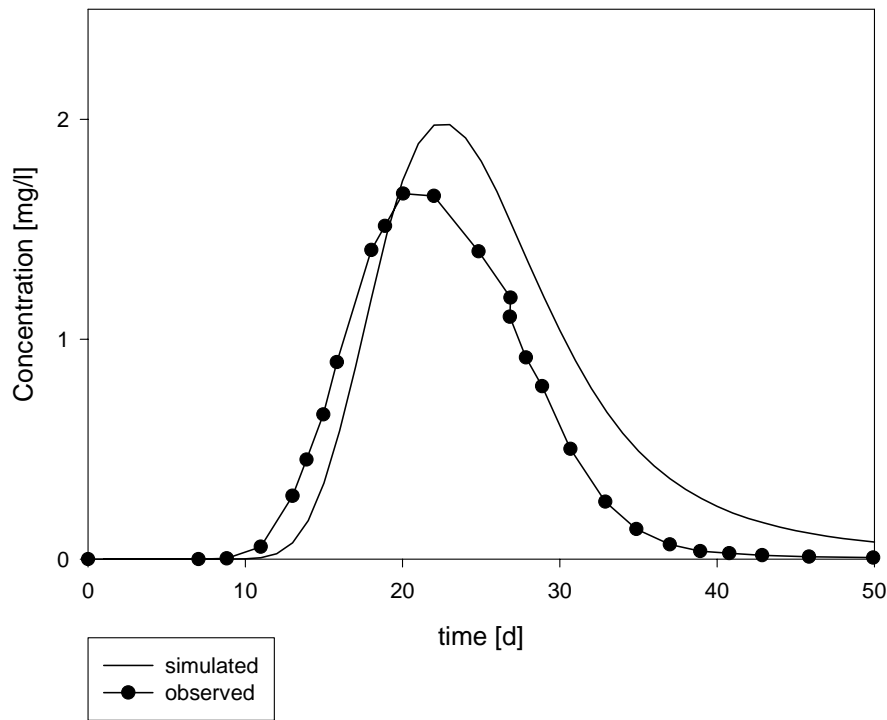


Figure 9: Simulated vs. observed toluene d8 concentration for point Geo 182 (measurement depth: 135.9 mNN)

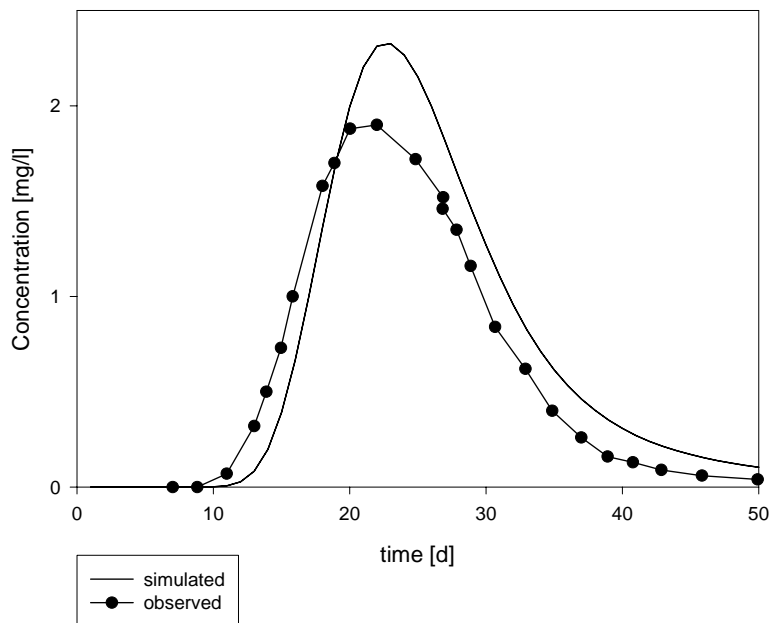


Table 1: Infiltration conditions of the tracer test

Species	Mass (g)	Infiltration Concentration (mg/l)
Potassium Bromide	10,000	1345 (Bromide)
Toluene d5	195	39
Toluene d8	205	41

Table 2: Relative frequency of hydrogeologic units

Geologic Material	Frequency (%)
gravel	43.1
medium + coarse sand	19
fine sand	2.5
lignite	20.8
clay	14.6

Table 3: Transition rates between the different geologic materials

Material	gravel	sand	fine sand	silt	clay
gravel	-0.39	0.2	0.01	0.15	0.03
sand	0.55	-0.58	0.06	0.07	-0.09
fine sand	0.11	0.71	-1.05	0.17	0.05
lignite	0.15	0.22	0.09	-0.82	0.37
clay	0.009	0.05	0.03	0.39	-0.5

Table 4: Mean lens lengths of the different geologic materials in the vertical direction

Geologic Material (m)	Lens length (m)
gravel	2.58
sand	1.72
fine sand	0.95
lignite	1.2
clay	2.09

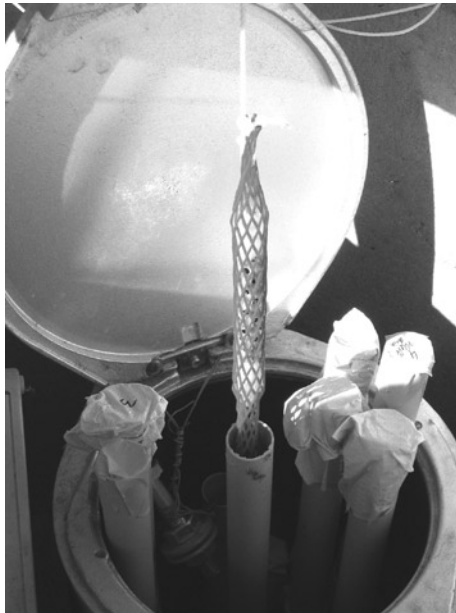
Table 5: Horizontal hydraulic conductivities used for the transport simulation

Geologic Material (m)	Horizontal Conductivity (m/d)
Gravel	60
Sand	40
Fine Sand	5
Lignite	0.0007
Clay	0.0002
Tracer Test Area	5-60

ANHANG D

Nachweis des mikrobiellen Schadstoffabbaus in Grundwasserleitern

Innovative Isotopenverfahren erfassen Abbauprozesse direkt im kontaminierten Grundwasser



Feldanwendung: Einbringen von Bactraps in die Grundwasserbrunnen einer Altlast

oder den Umsatz von isotopisch-markierten Zielsubstraten im Rahmen von *In-situ*-Mikrokosmenexperimenten nutzen.

Isotopenfraktionierung zur Kennzeichnung des *In-situ*-Schadstoffabbaus

Das Konzept zur Nutzung der Isotopenfraktionierung bei der Untersuchung des *In-situ*-Schadstoffabbaus wurde schon vor einigen Jahren in TerraTech vorgestellt [4]. Seitdem ist das Konzept stetig weiterentwickelt worden. Dadurch liegen reichhaltige Erfahrungen zur qualitativen und quantitativen Beurteilung des mikrobiellen Schadstoffabbaus vor (Tabelle 1).

Der mikrobielle Abbau eines Schadstoffes ist häufig mit einer Veränderung des Isotopenverhältnisses, sprich einer Isotopenfraktionierung, verbunden. Dabei werden Moleküle, die nur aus leichten Isotopen aufgebaut sind, meist schneller durch Mikroorganismen verwertet als solche, die ein schweres Isotop aufweisen. In der Regel kommt es bei der mikrobiellen Umsetzung zu einer relativen Anreicherung der schwereren Isotope (^{13}C , ^2H) innerhalb des nicht abgebauten Schadstoffes. Häufig ist davon auszugehen, dass abiotische Prozesse wie Sorption, Verdünnung und Verflüchtigung keinen oder nur einen vernachlässigbaren Einfluss auf das Isotopenverhältnis von Schadstoffen in einem kontaminierten Grundwasserleiter haben. Somit ist der Nachweis einer signifikanten Isotopenfraktionierung hauptsächlich auf den mikrobiellen Schadstoffabbau zurückzuführen [5, 6]. Sofern bei der Kohlenstoff- und/oder Wasserstoffisotopenfraktionierung signifikante Unterschiede für entsprechende Abbauprozesse eines Schadstoffes auftreten, kann anhand der Analyse der Kohlen- und Wasserstoffisotopenverhältnisse eine Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffumsatzes in einem Grundwasserleiter vorgenommen werden [7].

Das Ausmaß der Isotopenfraktionierung einer organischen Verbindung wird von deren Molekülgröße beeinflusst. Da meist nur an der Position, an der die Reaktion stattfindet, ein deutlicher Isotopeneffekt auftritt und der Rest der Verbindung in seinem Iso-

Anko Fischer, Nicole Stelzer,
Heinrich Eisenmann, Hans H. Richnow

Bei der Sanierung von Altlasten spielen natürliche Selbstreinigungsprozesse auch aus Kostengründen eine immer wichtigere Rolle. Voraussetzung für die Planung von Maßnahmen sind sichere Nachweise der mikrobiellen Abbauprozesse. Innovative Isotopenverfahren wie die Isotopenfraktionierung und *In-situ*-Mikrokosmen, die sich hinsichtlich Qualität und Sensitivität ergänzen, erfassen Abbauprozesse direkt im kontaminierten Grundwasserleiter.

Die Planung und der Erfolg von Grundwassersanierungsprojekten sind maßgeblich von der Erkundung des Selbstreinigungspotenzials eines kontaminierten Standortes abhängig. Heute erlaubt die Anwendung innovativer Erkundungsverfahren oft wesentlich kostengünstigere Sicherungs- und Sanierungsmaßnahmen. Für moderne Sanierungskonzepte, wie sie bereits standardmäßig im Rahmen des „Monitored-Natural-Attenuation“-Ansatzes in den USA [1] durchgeführt werden, spielt vor allem der intrinsische mikrobielle Abbau aufgrund seiner nachhaltigen Schadstoffminderung eine wesentliche Rolle [2, 3]. Somit wird eine Charakterisierung der mikrobiellen Abbauleistung oder zumindest des Abbaumögens für die zuverlässige Beurteilung eines kontaminierten Grundwasserleiters und die Prognose eines Schadensfalls unerlässlich. Intensive Forschungsaktivitäten im Rahmen des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Forschungsverbundes KORA (Kontrollierter natürlicher Rückhalt und Abbau von Schadstoffen bei der Sanierung kontaminierter Grundwässer und Böden) zeigen, dass innovative Erkundungsverfahren hierbei eine Schlüsselfunktion haben. Zum Nachweis der natürlichen mikrobiellen Selbstreinigung können moderne Isotopenverfahren eingesetzt werden, welche die Isotopenfraktionierung des Schadstoffs

topenverhältnis gleich bleibt, wird die Isotopenfraktionierung durch den nicht reaktiven Teil des Moleküls abgeschwächt. Je mehr Atome eines Elementes ein Molekül aufbauen, desto geringer ist der messbare Isotopeneffekt. Große Moleküle weisen daher in der Regel eine geringere Veränderung des Isotopenverhältnisses beim mikrobiellen Abbau auf. Die Kohlenstoffisotopenfraktionierung ist bei Molekülen mit mehr als 12 Kohlenstoffatomen, wie z.B. bei vielen PAKs, kaum nachweisbar (Tabelle 1). Für niedermolekulare PAKs wie Naphthalin und Methylnaphthalin, gab die Veränderung der Isotopensignatur erst bei hohem mikrobiellen Umsatz eine Indikation auf mikrobiellen Abbau [8]. Somit ist der Nachweis der Biodegradation dieser Verbindungen anhand der Isotopenfraktionierung entsprechend unempfindlich. Dagegen kann der Nachweis des *In-situ*-Schadstoffabbaus für kleine Moleküle wie MTBE, BTEX sowie chlorierte Ethene und Monoaromaten (CKW) schon bei geringerem mikrobiellen Umsatz geführt werden.

Eine wichtige Voraussetzung zur Interpretation des mikrobiellen Schadstoffabbaus mit Hilfe der Isotopenfraktionierung ist eine hinreichend isotopisch-homogene Kontaminationsquelle. Die Isotopensignatur eines Schadstoffs kann je nach Hersteller variieren [9]. Im Falle von isotopisch-inhomogenen Quellen besteht die Gefahr einer Fehlinterpretation, weil die Änderung der Isotopenverhältnisse neben dem mikrobiellen Schadstoffabbau auch durch Mischung unterschiedlicher Quellsotopensignaturen verursacht werden kann. In der Praxis spielen isotopisch-inhomogene Schadstoffquellen selbst auf großen Standorten erfahrungsgemäß eine geringe Rolle.

Bei der konventionellen Grundwasserprobennahme können sich unterschiedliche Grundwasserströme mit verschiedenen residualen Schadstoffgehalten stark vermischen. Das sich ergebende Isotopensignal wird dann vom Grundwasserstrom mit der höheren Schadstoffkonzentration, d.h. mit geringem Abbau, bestimmt. Das Isotopensignal aus dem Grundwasserstrom mit hohem Abbau wird somit überlagert. Die Folge ist eine Abschwächung der Isotopenfraktionierung [10, 11]. Eine tiefenorientierte Probennahme mit Hilfe von Schlauch- oder Scheibenpackern vermag Mischungsvorgänge zu vermindern, und der mikrobielle Schadstoffabbau kann anhand der Analyse der Isotopenfraktionierung in einem vertikalen Profil genau erfasst werden.

Zur quantitativen Bewertung des mikrobiellen Schadstoffabbaus wird die Veränderung des Isotopenverhältnisses zwischen der Kontaminationsquelle und den im Grundwasserabstrom befindlichen Messstellen verwendet. Die Methode erfasst somit die Schadstoffumsetzung über die jeweiligen Fließwege. Die Parametrisierung des mikrobiellen Abbaus erfolgt durch den

Tabelle 1: Anwendbarkeit innovativer Isotopenmethoden zur Charakterisierung des mikrobiellen *In-situ*-Abbaus typischer Schadstoffe (verändert nach [19])

Gruppe	Schadstoff	Isotopenfraktionierung	BACTRAPs®
<u>Schadstoffe >12 C-Atome</u>			☒
<u>Benzinadditive</u>			
MTBE	Methyl-tert-Butylether	☒ ● ○	☒
TBA	Tert-butylalkohol	☒ ○	
<u>Monozyklische Kohlenwasserstoffe (BTEX)</u>			
	Benzol	☒ ● ○	☒
	Toluol	☒ ● ○	☒
	Ethylbenzol	☒ ● ○	☒
	m/p/o-Xylol	☒ ● ○	☒
<u>Phenole</u>			
	m/p-Cresol	☒ ●	
<u>Polyzyklische Kohlenwasserstoffe (PAK)</u>			
	Naphtalin	☒ ●	
	2-Methyl-Naphtalin	☒ ●	
	Phenanthren		☒
	andere		☒
<u>Halogenierte aliphatische Kohlenwasserstoffe (CKW)</u>			
PCE	Poly-Chlorethen	☒ ●	
TCE	Tri-Chlorethen	☒ ● ○	
DCE	cis/trans-Di-Chlorethen	☒ ● ○	
	1,2/1,1-Di-Chlorethen	☒ ●	
VC	Vinylchlorid	☒ ● ○	
	1,2-Di-Chlorethan	☒ ● ○	
	1,1,2-Tri-Chlorethan	☒ ●	
<u>Halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (CKW)</u>			
MCB	Mono-Chlorbenzol	☒ ●	☒
TCB	1,2,4-Tri-Chlorbenzol	☒ ○	

☒ = Anwendung erfolgreich erprobt
 ● = für anoxische Verhältnisse
 ○ = für oxische Verhältnisse
 ☒ = Anwendung in bestimmten Fällen = derzeit keine Anwendung

Isotopenfraktionierungsfaktor (α) mithilfe der Rayleigh-Gleichung [5, 6]. α stellt den Zusammenhang zwischen der Änderung des Isotopenverhältnisses und der Konzentrationsabnahme während des mikrobiellen Abbaus her. Die schadstoffspezifischen Isotopenfraktionierungsfaktoren (α) können Übersichtsartikeln oder Datenbanken (www.isodetect.de) entnommen werden. Einen aktuellen Überblick über Studien zur Anwendung der Isotopenfraktionierung im Rahmen der Schadensfallbewertung geben Meckenstock et al. [5] und Schmidt et al. [6]. Dabei zeigt sich, dass das Konzept vor allem bei BTEX-, MTBE- und CKW-Schadensfällen eingesetzt wurde (z.B. [10, 7, 12]).

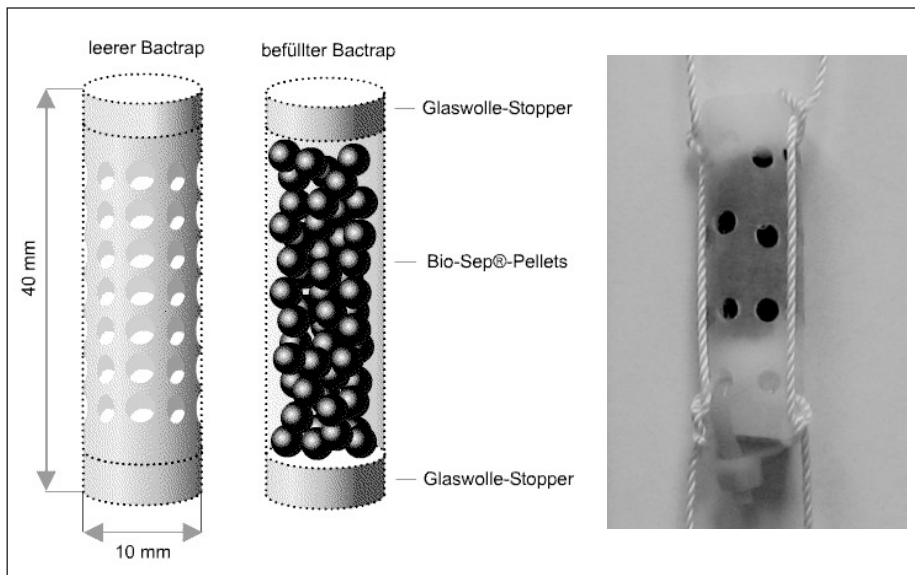
***In-situ*-Mikroskosmen zum Nachweis des mikrobiellen Schadstoffabbaus**

Am Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle (UFZ) wurde ein Verfahren zur empfindlichen Analyse der Biodegradation in Grundwasserleitern auf Grundlage von *In-situ*-Mikroskosmen (BACTRAP®) entwickelt. Diese können mit isotopisch-markierten Substanzen beladen werden. Der Abbau wird anhand der Isotopenmarkierung der

Biomasse nachgewiesen. Radioaktiv markierte Substanzen (^{14}C) können in offenen Systemen auf Grund ökologischer Bedenken in der Regel nicht eingesetzt werden. Eine Alternative bieten organische Substanzen, die mit stabilen Isotopen (^{13}C ; ^{15}N) markiert sind. Beim Abbau verwenden Mikroorganismen einen Teil des ^{13}C -markierten Kohlenstoffs zur Synthese von Biomasse. Analog können ^{15}N -markierte Substanzen zum Nachweis für deren Abbau eingesetzt werden.

Als Indikator für den mikrobiellen *In-situ*-Abbau der ^{13}C -markierten Testsubstanz kann die Transformation in die Fraktion der Phospholipid-Fettsäuren (*phospholipid-derived fatty acids*, PLFA) genutzt werden [13]. In früheren Untersuchungen wurden ^{13}C -markierte Substrate direkt in die Grundwasserleiter gegeben, um anhand der ^{13}C -Anreicherung in PLFA deren Metabolisierung nachzuweisen [14]. Diese Möglichkeit ist auf Grund des hohen Preises ^{13}C -markierter Substanzen in Verbindung mit dem hohen Mengeneinsatz in der routinemäßigen Anwendung kaum durchführbar.

Wesentlich geringere Mengen an ^{13}C -markiertem Substrat sind erforderlich, wenn eine vorherige Sorption an Trägerma-



Schematischer Aufbau (links) und Foto (rechts) eines Bactraps

terial erfolgt, dass in Form eines *In-situ*-Mikrokosmos (Bactrap) in Grundwasserbrunnen eingebracht werden kann. Als Trägermaterialien können Aktivkohlen, künstliche Polymere oder auch BIO-Sep®-Kugeln verwendet werden. So sind z.B. hochporöse Bio-Sep-Kugeln mit einer hohen inneren Oberfläche für die Sorption von Benzol und Toluol gut geeignet [15, 16]. Für die Herstellung der Bactraps wird ein perforiertes Teflonrohr mit den Bio-Sep-Kugeln oder einem anderen Trägermaterial befüllt, sterilisiert, hydratisiert und nachfolgend mit ^{13}C -markiertem Schadstoff beladen (siehe Bild). Bactraps mit unmarkiertem Substrat werden zur Kontrolle der natürlichen Isotopensignatur der Biomasse verwendet. Zum Nachweis des mikrobiellen Schadstoffabbaus wird die ^{13}C -Anreicherung in den Biomolekülen im Vergleich zu deren natürlichen Isotopenverhältnissen verwendet.

INFO Isodetect

Die im September 2005 entstandene Isodetect Umweltmonitoring GmbH in Neuherrberg/Oberschleißheim ist eine gemeinsame Gründung von Mitarbeitern des Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit (GSF) in München und des Umweltforschungszentrums Leipzig-Halle (UFZ). Die Gründer, die sich seit den 90er-Jahren durch gemeinsame wissenschaftliche Arbeiten auf dem Gebiet der Mikrobiologie von Sedimenten kennen, haben nach der Patentanmeldung gemeinsamer Forschungsergebnisse zur Isotopenfraktionierung im Jahr 2000 die neuen Monitoringmethoden von Grundwasserkontaminationen zur Marktreife gebracht. Damit können jetzt aussagekräftige Nachweisverfahren für die Erkundung und Sanierung von Altlasten eingesetzt werden.

www.isodetect.de

Die Bactraps werden direkt im Grundwasserleiter über einen Zeitraum von sechs bis zwölf Wochen eingebracht. Kleine Mengen des beladenen Substrats werden während der Inkubation freigesetzt und können durch Mikroorganismen, die den Bactrap besiedeln, metabolisiert werden. In der Regel wird ein Bactrap mit etwa 50 bis 100 mg Substrat beladen. Nach etwa sechs Wochen Inkubation im Grundwasserleiter wurden im Fall von Toluol und Benzol noch 15 bis 18 % der ursprünglichen Beladung nachgewiesen [15, 16]. Auf den Bactraps bildet sich in der Regel ein Biofilm, aus dem die Fettsäuren der PLFA extrahiert und dann deren Isotopenverhältnisse bestimmt werden. Der Schadstoffabbau wird anhand einer deutlichen ^{13}C -Markierung der Fettsäuren nachgewiesen. Das Fettsäuremuster und die Anreicherung von ^{13}C -Kohlenstoff in einzelnen Fettsäuren kann Aufschluss über die Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften geben [13].

In Feldversuchen konnte mit Hilfe von BACTRAPs der mikrobielle Abbau von Schadstoffen wie Benzol, Toluol, MTBE, Chlorbenzol und ausgewählter PAKs in kontaminierten Grundwasserleitern gezeigt werden [17, 15, 18, 16] (Tabelle 1). Bactrap-Systeme funktionieren jedoch nur, wenn Mikroorganismen die markierten Schadstoffe als Kohlenstoffquelle nutzen. Deshalb kann die Methode nicht zur Analyse des mikrobiellen CKW-Abbaus, der auf reduktiver Dehalogenierung beruht, angewendet werden. In diesem Fall nutzen die Mikroorganismen die CKWs nur zur Energiegewinnung und nicht als Kohlenstoffquelle.

Bactraps können zur vertikalen Untersuchung von Schadstofffahnen in Verbindung mit Scheiben- oder Schlauchpackersystemen eingesetzt werden. In der vertikalen Schichtung einer Schadstofffahne lassen sich Abbauprozesse entsprechend nutzbarer Elektronenakzeptoren nachweisen. Die

vertikale Analyse eines BTEX-kontaminierten Grundwasserleiters mithilfe von Bactraps ergab unterschiedliche Abbaupotenziale in Abhängigkeit von Schadstoffkonzentrationen und bioverfügbarer Elektronenakzeptoren [16]. Die Identifikation abbauintensiver Zonen kann die Auswahl und Planung eines geeigneten Sanierungskonzeptes erleichtern.

Der Nachweis des mikrobiellen Schadstoffabbaus mit Hilfe von Bactraps bietet im Vergleich zu Labormikrokosmen einige Vorteile. Ein entscheidender Aspekt ist der Nachweis der *In-situ*-Biodegradation direkt im Grundwasserleiter. Darüber hinaus ist selbst bei schwer abbaubaren Schadstoffen ein Nachweis des Abbaus nach 30 bis 60 Tagen sogar unter anoxischen Bedingungen möglich. In dieser Zeitspanne ist der Nachweis im Labor meist nicht möglich. Experimente mit Labormikrokosmen sind oft zeitaufwändig, vor allem, wenn der anaerobe Schadstoffabbau eines kontaminierten Grundwasserleiters nachgestellt werden soll. Zudem sind die Bedingungen eines Grundwasserleiters selbst durch aufwändige Säulenversuche im Labor nur näherungsweise realisierbar. Aus diesen Gründen sind Labormikrokosmen in Routineuntersuchungen zur Analyse des anaeroben *In-situ*-Schadstoffabbaus oft nur eingeschränkt geeignet. Labormikrokosmen mit Grundwasser oder Sedimentmaterial können aber auch interessante Informationen zum Abbaupotenzial liefern, die mit *In-situ*-Mikrokosmen nicht gewonnen werden können. So kann z.B. eine geschlossene Elektronenbilanz im Labormikrokosmos quantitativen Aufschluss über die Umsetzung des verwendeten Elektronenakzeptors geben.

Zusammenfassung

Zur Charakterisierung der Biodegradation von Schadstoffen in verunreinigten Grundwasserleitern können Untersuchungskonzepte auf Basis der Analyse der Isotopenfraktionierung oder von Bactrap-Systemen wertvolle Informationen liefern. Beide Konzepte erfassen Abbauprozesse direkt im kontaminierten Grundwasserleiter und ergänzen sich hinsichtlich ihrer Qualität und Sensitivität. Mit Hilfe der Isotopenfraktionierungsmethode kann der mikrobielle Schadstoffabbau und gegebenenfalls dessen initialer Schritt des Abbauprozesses erfasst und abgeschätzt werden. Bactraps liefern einen qualitativen Hinweis auf die *In-situ*-Biodegradation und können selbst kleine Abbauprozesse zweifelsfrei nachweisen. Die Anwendbarkeit beider Methoden ist unter Bezug auf bisher durchgeführte Studien in Tabelle 1 zusammengefasst. Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass beide Konzepte zukünftig eine zunehmende Bedeutung bei der Planung und Durchführung von Sanierungsprojekten haben werden.

Ein wesentlicher Aspekt zur Implementierung innovativer Isotopenmethoden im Rahmen der Altlastenbewertung ist deren Zugänglichkeit für Behörden, Gutachter und Sanierungsfirmer. Aus diesem Grund hat sich im Jahr 2005 die Firma Isodetect, die innovative Isotopenmethoden zum Nachweis und Monitoring des mikrobiellen Schadstoffabbaus im Rahmen der wissenschaftlichen Dienstleistung anbietet, gegründet.

Literaturhinweise:

- [1] US-EPA, 1999. *Use of Monitored Natural Attenuation at Superfund, RCRA Corrective Action, and Underground Storage Tank Sites. Final Directive Number: 9200.4-17P*, United States Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response (OSWER), Washington D.C.
- [2] ITVA, 2004. *Arbeitshilfe H1-12/04 Monitored Natural Attenuation*, Ingenieurtechnischer Verband Altlasten e.V. ITVA, Berlin
- [3] LABO, 2005. *Berücksichtigung natürlicher Schadstoffminderungsprozesse bei der Altlastenbearbeitung*, Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Bodenschutz
- [4] Richnow, H.H. and Meckenstock, R., 1999. *Isotopen-geochemisches Konzept zur In-situ Erfassung des biologischen Abbaus in kontaminiertem Grundwasser*. TerraTech 8(1999) Nr. 5: 38-41
- [5] Meckenstock, R.U., Morasch, B., Griebler, C. and Richnow, H.H., 2004. *Stable isotope fractionation analysis as a tool to monitor biodegradation in contaminated aquifers*. *Journal of Contaminant Hydrology*, 75(3-4): 215-255
- [6] Schmidt, T.C. et al., 2004. *Compound-specific stable isotope analysis of organic contaminants in natural environments: a critical review of the state of the art, prospects, and future challenges*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(2): 283-300
- [7] Kuder, T. et al., 2005. *Enrichment of stable carbon and hydrogen isotopes during anaerobic biodegradation of MTBE: Microcosm and field evidence*. *Environmental Science & Technology*, 39(1): 213-220
- [8] Griebler, C., Safinowski, M., Vieth, A., Richnow, H.H. and Meckenstock, R.U., 2004. *Combined application of stable carbon isotope analysis and specific metabolites determination for assessing in situ degradation of aromatic hydrocarbons in a tar oil-contaminated aquifer*. *Environmental Science & Technology*, 38(2): 617-631
- [9] Smallwood, B.J., Philp, R.P. and Allen, J.D., 2002. *Stable carbon isotopic composition of gasolines determined by isotope ratio monitoring gas chromatography mass spectrometry*. *Organic Geochemistry*, 33(2): 149-159
- [10] Fischer, A. et al., 2004. *Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus mit Hilfe von isotopechemischen Methoden*. *Grundwasser*, 9(3): 159-172
- [11] Kopinke, F.D., Georgi, A., Voskamp, M. and Richnow, H.H., 2005. *Carbon isotope fractionation of organic contaminants due to retardation on humic substances: Implications for natural attenuation studies in aquifers*. *Environmental Science & Technology*, 39(16): 6052-6062
- [12] Morrill, P.L. et al., 2005. *Quantifying chlorinated ethene degradation during reductive dechlorination at Kelly AFB using stable carbon isotopes*. *Journal of Contaminant Hydrology*, 76(3-4): 279-293
- [13] Abraham, W.R., Hesse, C. and Pelz, O., 1998. *Ratios of carbon isotopes in microbial lipids as an indicator of substrate usage*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11): 4202-4209
- [14] Pelz, O. et al., 2001. *Use of isotopic and molecular techniques to link toluene degradation in denitrifying aquifer microcosms to specific microbial populations*. *Archives of Microbiology*, 175(4): 270-281
- [15] Geyer, R. et al., 2005. *In situ assessment of biodegradation potential using biotrap amended with C-13-labeled benzene or toluene*. *Environmental Science & Technology*, 39(13): 4983-4989
- [16] Stelzer, N., Fischer, A., Kästner, M. and Richnow, H.H., 2006. *Analyse des anaeroben in-situ Benzolabbaus anhand von Mikrokosmen (BAC-TRAPS) und Isotopenfraktionierungsprozessen*. *Grundwasser*, eingereicht
- [17] Büning, C. et al., 2005. *In situ Mikrokosmenuntersuchungen mit ¹³C-markiertem Benzol und Toluol zum Nachweis des natürlichen biologischen Abbaus im Grundwasser und zur molekularbiologischen Analyse der abbauaktiven Mikroflora*. *Altlastenspektrum*, 14(3): 137-145
- [18] Rückert, M. et al., 2005. *Untersuchung natürlicher Abbaupotenziale für altlastbedingte Belastungen in Fließgewässern*. *Altlastenspektrum*, 14(3): 125-130
- [19] Isodetect, 2005. *Altlastenbewertung mit Isotopenanalysen*. Kundeninformation Nr.1 - 11/2005, Isodetect Umweltmonitoring GmbH, München

ANHANG E

Assessment of Microbial In Situ Activity in Contaminated Aquifers

By M. Kästner*, A. Fischer, I. Nijenhuis, R. Geyer, N. Stelzer, P. Bombach, C. C. Tebbe, and H. H. Richnow

DOI: 10.1002/elsc.200620125

Microbial ecologists and environmental engineers share the interest in identifying the key microorganisms responsible for compound turnover in the environment and in estimating the respective transformation rates. For the successful application of Natural Attenuation processes, a reliable assessment of the in situ turnover of a contaminant in an aquifer is essential. Here, we review and present new details of two recently developed approaches concerning the assessment of in situ biodegradation: (i) determination of biodegradation caused by microbial metabolism in a contamination plume by stable isotope fractionation analysis (SIFA) and (ii) determination of the actual degradation under the respective environmental conditions in the aquifer by using in situ microcosms (BACTRAPs®) amended with ¹³C-labeled substrates as tracer compounds. Based on stable isotope fractionation analysis, the degradation occurring under anoxic biogeochemical conditions at a respective site can be calculated for the entire plume. This has been shown for benzene and toluene at the Zeitz site and partly for chlorobenzene at the Bitterfeld site. By use of the in situ microcosm approach with ¹³C-labeled compounds, the microbial in situ degradation under strictly anaerobic conditions could be proven for benzene and toluene in Zeitz and for chlorobenzene in Bitterfeld. The transformation of ¹³C-carbon of the labeled substrate into microbial fatty acids confirmed the assimilation of the pollutant resulting in the formation of biomass. In addition, metabolites such as benzylsuccinic acid were found in the toluene-amended microcosms indicating anaerobic degradation of toluene. This result corresponds to the geochemical conditions found at the field site and therefore, the microcosm approach with ¹³C-labeled compounds can be used to assign the predominant in situ degradation pathways in a contaminated aquifer. Since fatty acids profiles alone are often too unspecific for a community analysis at species level, the composition of the microbial communities was analyzed by genetic profiling and sequencing of partial 16S rRNA genes PCR-amplified from total DNA extracted directly from the microcosms. Sequences retrieved from the microcosms indicated a dominance of not yet cultivated bacteria. Several sequences were phylogenetically closely related to sequences of bacteria known to be iron and sulfate reducers, typically found at sites polluted with BTEX and/or mineral oil. The results show that the current methods for monitoring microbial in situ activity at present stage are valuable tools for improving environmental control of compound turnover and will speed up engineering approaches.

1 Introduction

Since Winogradski's column experiments, microbiologists and biochemists have long tried to link the transformation of compounds in the environment with the key microorganisms involved in the respective transformation. This linking is a crucial prerequisite for shedding light into the black box of real world microbial processes. From a technical perspective, it is also necessary to have a detailed knowledge about the key processes for purposes of control and successful engineering. In the past decade, methodological advances in linking the structure of microbial communities with the actual activity and function of their members generated dramatic progress in the knowledge of microbial mediated envi-

ronmental processes and led to the development of new innovative approaches such as waste water treatment using the Anammox process [68].

The fate of pollutants in contaminated aquifers is mainly governed by microbial degradation. Abiotic processes such as dispersion, dilution, sorption, and volatilization may contribute to a decrease in concentration but do not lead to a significant reduction of the mass of contaminants. Therefore, the evaluation of in situ biodegradation is essential for the implementation of Natural Attenuation (NA) concepts in groundwater management strategies (Oswer directive; [80]). Plate counting methods were used in the past for the assessment of the number of microbes present, however, these methods only provide information about the culturable species. Advanced conventional methods apply the laborious quantification of electron balances of typically complex electron donor-terminal electron acceptor interactions. Calculations then relate the decreasing contaminant concentrations to the consumption of electron acceptors in order to assess biodegradation processes [14]. When tracing the fate of single compounds in contaminant mixtures, this approach is complicated particularly on the field scale in the very heterogeneous natural environment where several electron acceptor-donor interactions compete. Laboratory microcosm

[*] M. Kästner (author to whom correspondence should be addressed, e-mail: matthias.kaestner@ufz.de), UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Department Bioremediation, Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig, Germany; A. Fischer, I. Nijenhuis, N. Stelzer, H. H. Richnow, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Department Isotopenbiogeochemie, Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig, Germany; R. Geyer, UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Department Umweltmikrobiologie, Permoserstrasse 15, 04318 Leipzig, Germany; C. C. Tebbe, Institut für Agrarökologie, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), D-38116 Braunschweig, Germany.

studies are often used to obtain information on in situ biodegradation. However, this approach is not reliable because the majority of microorganisms have not yet been cultivated [64, 84]. In particular, the reproducible cultivation of anaerobic bacteria that degrade typical contaminants such as BTEX and PAHs can be difficult and may lead to misinterpretation of the intrinsic biodegradation potentials. Laboratory microcosm studies or percolation column experiments, simulating the contaminant degradation under controlled water flow conditions, are time-consuming; furthermore, the conditions in the laboratory are mostly different to the natural environmental conditions resulting in certain limitations in the reliability of the data acquired.

Recently, the ^{13}C -enrichment of phospholipid-derived fatty acids (PLFA) related to the consumption of ^{13}C -labeled substrates was used to characterize bacterial toluene degradation in soil, sediment or aquifer microcosms [25, 54, 55] and to trace the assimilation of toluene along a food chain [43], [58]. The ^{13}C -tracer concept can provide useful information on carbon fluxes, metabolites and microbial food webs. At the field scale, microbial incorporation of ^{13}C -labeled acetate into biomarker molecules such as PLFA and DNA was successfully assessed to indicate microbes which were suggested to be responsible for the reduction of uranium(VI) [12]. A mesocosm was designed to monitor the in situ dynamics of the microbial community in a BTEX polluted aquifer [29]. In this study, uncontaminated aquifer material was incubated either in the uncontaminated area or in a contaminated area of the aquifer located nearby, and the developed bacterial communities were analyzed by molecular biology techniques. Other authors applied the electron donors glucose and ethanol to acidic uranium and nitrate contaminated groundwater. Fortunately, they were able to show the increase of 16S rRNA gene sequences related to previously cultured metal reducing δ -proteobacteria by 1–2 orders of magnitude using quantitative PCR techniques and time resolved sampling at the site [52]. These approaches provide valuable information on the functional biodiversity in soils and sediments. However, from a perspective of the contaminant history they do not provide reliable information on the compound turnover actually occurring under in situ conditions in an aquifer. In addition, it is difficult to provide any predictive data on the future fate of the residual contaminants under varying environmental conditions. These approaches may even fail, if organisms with necessary physiological properties were not cultured previously, or if the physiological capacities of the respective organisms are not generally expressed even though the organisms are present in the contaminated aquifer. Such effects are known from *Dehalococcoides* sp. [31, 35].

The objective of the present work is to review the recently developed approaches focusing on the assessment of the in situ biodegradation in contaminated aquifers. Two approaches will be described dealing with (i) determining the cumulated biodegradation in a contamination plume by use of fractionation of stable isotopes at natural abundance dur-

ing microbial metabolism and (ii) the assessment of the actual degradation under the respective environmental conditions in the aquifer. The latter approach employs in situ microcosms (BACTRAPs[®]) amended with ^{13}C -labeled substrates such as toluene, benzene, and monochlorobenzene and enables the reliable quantification of the actual degradation. It will also enable the identification of the microbial key players in the near future. We present new results from applying the two approaches at field sites.

2 Materials and Methods

2.1 Chemicals

The chemicals and solvents were obtained in p.A. quality from Merck unless otherwise stated. [$^{13}\text{C}_6$] benzene, [^{13}C]- α -toluene and benzylsuccinic acid were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). [$^{13}\text{C}_6$]-monochlorobenzene and [$^{13}\text{C}_7$]-toluene were purchased from Chemotrade Leipzig (Germany). All the isotopically labeled compounds had a chemical purity higher than 99 %.

2.2 Field Sites (Zeitz, Bitterfeld)

Zeitz (Saxony-Anhalt, Germany)

The benzene, toluene, ethylbenzene and *o,m,p*-xylene (BTEX) contaminated aquifer is located in the area of a former hydrogenation plant close to the city of Zeitz in Saxony-Anhalt, Germany. A detailed description of the site hydrogeology and hydrochemical conditions of the contamination plume at the SAFIRA (Remediation research in regional contaminated aquifers) site was given in previous studies [18, 86]. The thickness of the upper aquifer varies between 4 to 6 m. Depth discrete investigation of geochemical and isotope parameters in Zeitz have been previously described [76]. In the source area BTEX exceeded concentrations of 900 mg/L and benzene and toluene were present in concentrations up to 850 mg/L and 50 mg/L, respectively. Ethylbenzene and xylenes are typically present in concentrations lower than 3 mg/L. The groundwater was sampled from the wells indicated in Figs. 2A and B. At the test site, the predominant electron acceptor used for biodegradation was sulfate [86] and the contribution of methanogenic processes in the microbial transformation in the BTEX-plume is of minor importance [18]. Other electron acceptors such as oxygen, nitrate and iron play a minor role for the overall biodegradation processes at the site.

Bitterfeld (Saxony-Anhalt, Germany)

The monochlorobenzene (MCB) contaminated aquifer is located near the city of Bitterfeld in Saxony-Anhalt, Ger-

many. Concentrations up to 30 mg/L of MCB and lower concentrations of chlorinated aliphatic compounds (<5 mg/L), benzene (<0.77 mg/L), and dichlorobenzenes (<3 mg/L) were found in the aquifer [89]. Due to the 150-year history of the chemical industry at the site, the time of spillage is not exactly known but chlorobenzenes have been produced at the industrial site since the first half of the last century. The hydrogeological situation is characterized by a shallow Quaternary aquifer system consisting of glaciofluvial sand and gravel and a deeper Tertiary aquifer system of micaceous sand overlying glauconite sand. A lignite layer overlaid by a Miocene clay layer formerly separated the Quaternary and Tertiary aquifer systems, which has been partially removed by open-cast mining. Today the two aquifer systems are hydraulically connected at several locations. A Rupelian clay layer is the major regional aquitard of the Tertiary aquifer system [27, 28].

The MCB plume stretches down-gradient at the bottom of a Quaternary hydrogeological channel structure in a southeasterly direction [34]. This Quaternary channel is located above the lignite layer, the local aquitard, separating the Quaternary from the underlying Tertiary aquifer. Oxygen concentrations in the aquifer were generally below 1 mg/L. Significant nitrate concentrations were only found in the upper layers of the aquifer indicating that nitrate was not a relevant terminal electron acceptor (TEA). Some iron and manganese reduction was indicated by low Fe(II) and Mn(II) concentrations. Elevated sulfide concentrations associated with sulfate depletion indicated sulfate reduction, and sulfate concentrations of up to 1.48 g/L suggested that sulfate was the principle TEA in this aquifer [34]. Methane was not found in the aquifer indicating that methanogenesis was a very unlikely electron acceptor process. The groundwater in Bitterfeld was sampled in a cross section A-B between 17 and 21 m below ground (Left fringe: wells SAF11, SAF12, SAF27, SAF28, and right fringe: SAF7, SAF30, SAF31, SAF23, see Figs. 7 and 8) of the lower aquifer in monitoring wells which are perpendicular to the contamination plume as described in details elsewhere [34]. In addition, in well SAF 4/97 the upper, Quaternary aquifer was investigated during a depth discrete multilevel sampling campaign.

2.3 Isotope Fractionation and Calculations

The carbon isotope composition of contaminants and fatty acids is reported in δ -notation (‰) relative to the Vienna-PeeDee-Belemnite-Standard (V-PDB) with $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = (11237.2 \pm 2.9) \times 10^{-6}$ [15] (Eq. (1)):

$$\delta^{13}\text{C}[\text{‰}] = \left(\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{Probe}}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{\text{Standard}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (1)$$

The determination of the fractionation of stable isotopes caused by primary enzymatic transformation reaction of a compound during microbial degradation can be described

with the Rayleigh equation [30, 41]. The Rayleigh equation (Eq. (2)) can be used to relate the change in concentration (C_t/C_0) to the instantaneous change in isotope composition (R_t/R_0) by the isotope fractionation factor (α):

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

R_0 and R_t are the isotope ratios at the beginning of the transformation reaction ($t = 0$) and after a given time (t), respectively. C_0 and C_t are the corresponding concentrations at the beginning of the reaction ($t = 0$) and after a distinct time (t), respectively. The isotope fractionation factor α quantifies the extent of isotope fractionation. The isotope fractionation is often reported as the enrichment factor ϵ [‰] = $(\alpha - 1) \times 1000$.

Isotope fractionation factors are determined in laboratory reference experiments with microcosms, column experiments or pure cultures where microbial degradation is the only sink of contaminants. In this case the change in isotope ratio (R_t/R_0) can be related unequivocally to the change in concentration (C_t/C_0). In a double logarithmic plot of C_t/C_0 and R_t/R_0 , the isotope fractionation factor can be determined from the slope of the linear regression curve. Isotope fractionation factors (αD , αC , αCl) published until 2004 can be obtained from recent reviews [44, 69] or from a frequently updated data base (www.isodetect.de).

The isotope fractionation concept for quantifying the microbial in situ degradation is based on the fact that in situ biodegradation is the major process altering the isotope composition of priority contaminants such as BTEX, chlorobenzenes and chlorinated ethenes in groundwater to a significant extent. Other processes such as sorption and volatilization may affect the isotope composition but do not alter the isotope composition to a significant extent in comparison to biodegradation. Therefore, the isotope composition of contaminants in groundwater provides information about the cumulated extent of intrinsic transformation. The isotope fractionation caused by biodegradation leads to an enrichment of heavy isotopomers in the residual fraction of the contaminant. A modified Rayleigh equation is used to quantify the microbial in situ degradation degree (Biodegradation; B [%]). B [%] represents the concentration decrease expected along a theoretical streamline plug flow without mixing and a single degradation process with a constant isotope fractionation factor. The change in concentration (C_t/C_0) down gradient from the source of contaminants is calculated employing the changes in the isotope ratio between the source (R_0) and a monitoring well (R_t) and an appropriate isotope fractionation factor (α) (Eq. (3)).

$$B[\%] = \left(1 - \frac{C_t}{C_0} \right) \times 100 = \left[1 - \left(\frac{R_t}{R_0} \right)^{\left(\frac{1}{\alpha} - 1 \right)} \right] \times 100 \quad (3)$$

2.4 Preparation and Incubation of In Situ Microcosms

The in situ microcosm experiments were performed using the BACTRAP system described elsewhere [10, 20]. Briefly, Bio-Sep[®] beads (provided by K. Sublette, University of Tulsa, Tulsa, USA) were loaded with contaminants as a carbon source for microorganisms. The spherical beads, 2 to 3 mm in diameter, consist of powdered activated carbon (PAC) incorporated within an aramid polymer matrix (Nomex[®]). The beads have a porosity of 75 %, an internal surface area greater than 600 m²/g and outer pores of 1–10 microns [53, 90]. The beads were heated at 300 °C for 4 hours to remove organic residues and then 0.5 g of beads per trap were transferred into perforated Teflon[®] tubes and fixed with glass wool plugs at both ends. The filled microcosms were autoclaved at 121 °C for sterilization and hydration of the bead material and then air-dried for 24 hours. The microcosms were loaded with the substrates (benzene, toluene or chlorobenzene) using gas phase under reduced pressure. The substrate and the microcosms were placed in small glass containers and evacuated for at least 48 hours to 60 mbar in order to allow uniform adsorption of the contaminants on the beads. In order to keep the beads anoxic, the vacuum was released by filling oxygen free water into the glass container and the beads were stored under anoxic conditions until their deployment in the monitoring wells.

The BACTRAPs for the microcosm experiments in Zeitz were loaded with [¹³C₆]-benzene to a concentration of about 88 mg/g bead material and with [¹³C]- α -toluene to 112 mg/g. The microcosms were deployed in the well Saf Zz 32/02 at a depth of 14–15 m (4 m below the groundwater table). The in situ microcosms for the experiments in Bitterfeld were amended with [¹³C₆]-chlorobenzene to a concentration of 38 mg/g. For control experiments, the BACTRAPs were loaded with non-labeled benzene, toluene or chlorobenzene in similar concentration. Material from these control microcosms was used for molecular biological studies and to investigate the isotope composition of fatty acids at natural abundance.

A multi level packer system (MLPS) was used for depth discrete sampling from a groundwater well in Bitterfeld [34, 66], which was equipped with a filter screen from 4.5 to 22.3 m depth below ground. The multi-level packer system is a water-filled sock tube inserted into the well, which allows various sampling systems to be separated from each other at different depths. Small submersible pumps allowed depth-specific sampling without cross-currents. A detailed description of the multi-level sampling system is given by [66]. The microcosms were deployed in the well for 49 d at a depth of 10.7 m below the surface. The well is located in the anoxic central part of the plume and by the conventional sampling 0.3 mg MCB/L was found. In the depth discrete sampling campaign, concentrations below 1.0 mg/L were found up to the depth of 18 m and the concentration increase to more than 13 mg/L in the deeper part of the well.

2.5 Groundwater Sampling and Analyses

Groundwater sampling for the determination of concentrations and isotope signatures was performed according to good sampling practice. No specific efforts are needed and the samples can be taken in parallel during conventional groundwater monitoring campaigns. Sampling techniques are described in the literature for example according to the German Industrial Norm [1, 2]. The biological activity in the samples can be stabilized by adding HgCl₂, sodium azide, or other stabilizers depending on the target compound. Water samples with target compounds resistant to hydrolysis such as hydrocarbons can be stabilized by rising or lowering the pH. For the sampling of BTEX and monochlorobenzene (MCB), a 1 L bottle was completely filled with groundwater. NaOH pellets were added in order to raise the pH to at least 10 and the bottle was closed with a Teflon lined screw cap.

The sensitivity of gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry (GC-C-IRMS) systems is lower than conventional gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) techniques and therefore GC-C-IRMS requires more analyte in order to obtain reliable data. For reproducible carbon isotope analysis about 12 ng carbon is necessary. For hydrogen isotope analysis 5 to 10 times more material is needed. Therefore, the efficiency of the extraction technique to enrich the target compound is critical for the lowest concentration that can be analyzed. Depending on the target, solvent extraction, solid phase micro-extraction, and purge & trap techniques have been shown to be appropriate for isotope analysis [44, 69].

The solvent extraction procedure, which is described in more detail elsewhere [34, 60, 86], was employed for the isotope analysis of BTEX and MCB in this work. Briefly, depending on the estimated concentrations, 1–2 mL *n*-pentane were used for the extraction of 1 L of groundwater. Although this extraction is not quantitative, no isotope effects were associated with this extraction method [16], and MCB and BTEX compounds can be analyzed to concentrations as low as some μ g/L.

The beads of the microcosms were extracted using a dichloromethane-methanol-water mixture as a solvent modified according to Bligh et al. [9]. After phase separation, the dichloromethane phase containing the fatty acids (FA) was evaporated to dryness and derivated using a trimethylchlorosilane (TMCS) methanol mixture (1:8; v:v) as a reactant for 2 h at 70 °C to obtain fatty acid methyl esters (FAME) [79]. After evaporation to complete dryness, the FAME fraction was dissolved in *n*-hexane for subsequent analysis by GC-MS and GC-C-IRMS.

For the determination of concentrations and the identification or structural characterization of FAME and benzylsuccinic acid methyl ester by GC-MS, a Hewlett Packard 6890 gas chromatograph coupled to a 5973 quadrupole mass spectrometer (Agilent Technology, Palo Alto, USA) was used. The carboxylic acid fraction was separated on a BPX-5

column (30 m × 0.32 mm × 0.25 μm; SGE, Darmstadt, Germany) with a temperature program of 120 °C initial temperature for 4 min, heat at 4 °C/min to 250 °C, heat at 20 °C/min to 300 °C, and hold for 10 min. FAME were identified by co-injection of an authentic standard mix (bacterial acid methyl ester mix, Supelco International) and quantified relative to an external standard mix or an internal standard (Henicosanoic acid, C21:0). The fatty acids are designated in the form of *A:BωC* where *A* is the number of carbon atoms, *B* is the number of double bonds and *C* is the distance of the closest double bond from the aliphatic end of the molecule (unsaturation, ω-nomenclature. The prefix *i* (*iso*) and *a* (*anteiso*) refer to methyl branching. The benzylsuccinic acid methyl ester was characterized by co-injection and comparison with mass spectra obtained for the authentic reference compound which was derivated as described below.

The carbon isotope composition of the carboxylic acids fractions was analyzed using a GC-C-IRMS system. It consists of a gas chromatograph (6890 Series, Agilent Technology, Palo Alto, USA) coupled via a Conflow III interface (ThermoFinnigan, Bremen, Germany) to a MAT 252 mass spectrometer (ThermoFinnigan, Bremen, Germany). The performance of the measurement has been described previously [60]. A BPX-5 column (50 m × 0.32 mm × 0.5 μm; SGE, Darmstadt, Germany) was used for chromatographic separation with helium as a carrier gas at a flow rate of 1.5 mL/min and a temperature program with an initial temperature of 60 °C for 2 min, heat at 20 °C/min to 120 °C, heat at 2 °C/min to 300 °C, and hold for 20 min [48]. The carbon isotope composition analysis of BTEX and MCB on the same system was described previously [34, 86].

The methylation of carboxylic acids for gas-chromatographic analyses introduces an additional carbon into the structure of the analyte, which affects its isotopic composition. Therefore the isotope signature of fatty acids ($\delta^{13}C_{FA}$) was corrected for the isotope effect due to derivatization FAME with methanol as described previously [3, 4, 21].

Molecular biological analyses of the beads from the exposed microcosms were performed according to the following procedure: For each sample, a total of 50 beads were transferred into 15 mL Falcon tubes containing 12 mL of TES buffer (50 mM NaCl₂, 10 mM Na₂EDTA, 50 mM Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride [Tris HCl], pH 8.0) with 1 % sodium dodecylsulfate (SDS). Five cycles of freeze-thaw lysis were performed, each with 5 min in liquid nitrogen (-196 °C) and 5 min at 65 °C in a shaking water bath, each cycle was interrupted by 10 s of vigorous vortexing. DNA was

then extracted with phenol-chloroform, as described elsewhere [70, 71]. The isopropanol precipitated and purified DNA of each tube was resuspended in a total of 40 μL of 10 mM Tris in 10 μL aliquots. Aliquots were kept at 4 °C for further analysis or stored at -20 °C.

Partial 16S rRNA genes, including two variable regions, were amplified from total DNA by PCR, using primers Com1 and Com2ph [67]. The PCR products were converted into DNA-single strands by lambda-exonuclease digestion, following the protocol of Schwieger and Tebbe [71]. Genetic profiles of each sample were generated by single strand conformation polymorphism (SSCP) on non-denaturing polyacrylamide gels, as described elsewhere [17, 78]. Single bands were selected for further DNA-sequencing after PCR-amplification and cloning in *Escherichia coli*. Sequencing is described in the same references. Consensus sequences were compared to database sequences using the Fasta Nucleotide Database Query provided by the European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/fasta>).

3 Results and Discussion

3.1 Benzene and Toluene Degradation at the SAFIRA Reference Site Zeitz

3.1.1 Stable Isotope Fractionation Analyses (Cumulated Biodegradation Approach)

In order to obtain information about the degradation processes that have already been performed by the microorganisms at a contaminated site, the cumulated biodegradation approach was developed based on stable isotope fractionation analysis (SIFA). The overall workflow is summarized in Fig. 1. First, the concentrations of BTEX in the wells of the

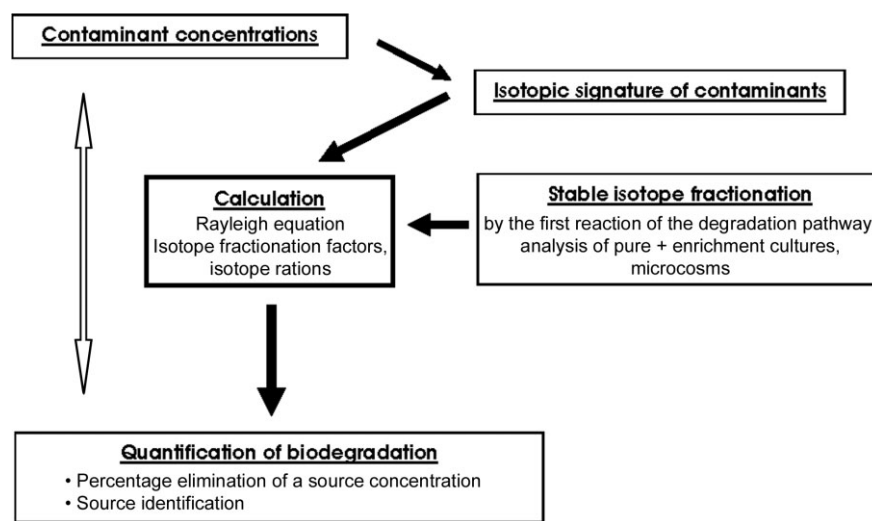


Figure 1. Approach I: Assessment of the cumulated biodegradation in a contaminated aquifer by use of stable isotope fractionation analysis (SIFA) at natural abundance; for details see text.

SAFIRA reference site Zeitz were analyzed where benzene is the predominant compound (see Fig. 2A). Next, the natural carbon isotope composition of benzene in the course of the plume was determined (see Fig. 2B). The center of the plume with concentrations of up to more than 950 mg/L was

characterized by an average isotope composition of $-28.5 \pm 0.5\%$. Down gradient, at the fringes of the plume, the concentration decreases to below 1 mg/L and the benzene isotope composition was enriched to maximum values of -24.4% indicating biodegradation [18].

In order to quantify the extent of biodegradation, it is necessary to determine how a given microbial metabolic pathway fractionates $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ during transformation. Isotope fractionation by microbial degradation is a result of the higher transformation rate of lighter isotopomers compared to heavier isotopomers by enzymatic reactions [8,19]. This kinetic isotope fractionation enriches the amount of the ^{13}C isotopomer in the residual substrate. The isotope fractionation factor (α) describes the relation between the decrease in concentration and change in the isotope ratio during the degradation reaction and can be described by the Rayleigh equation (Eq. (2)). The isotope fractionation factor can be obtained in reference degradation experiments with pure cultures or at least well defined cultures in which the degradation pathway or the redox conditions are known and in which no other elimination process may alter the concentrations except biodegradation [44]. The extent of isotope fractionation depends on the initial enzymatic degradation reaction of the respective biochemical pathway. Without the knowledge of the terminal electron acceptor process and degradation pathway, isotope fractionation factors from microcosm studies are not very precise because they may vary upon experimental conditions. Finally, with an appropriate isotope fractionation factor, the percentage of biodegradation along a flow path in a contamination plume can be calculated by the data from the SIFA using Eq. (3).

The metabolic degradation pathway governs the extent of isotope fractionation and, therefore, it is important to apply the appropriate isotope fractionation factor for calculation. For example, from pure cultures able to degrade toluene it is known that the aerobic degradation and the resulting isotope fractionation can vary significantly depending on the initial oxidation reaction at the methyl group or at the aromatic ring system

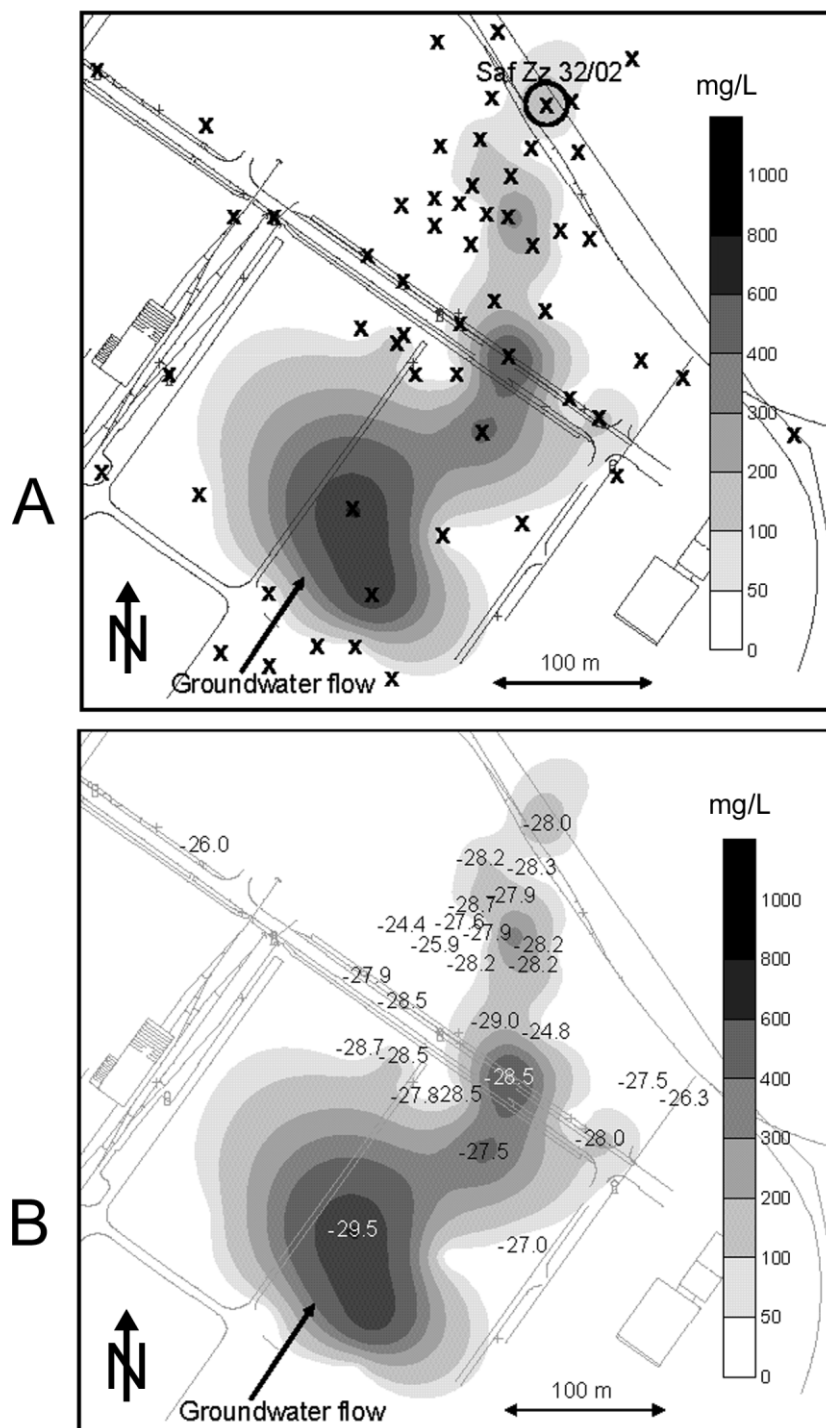


Figure 2. A) Spatial distribution of the benzene contaminations in the wells of the Zeitz aquifer in 2002 and 2004 (X = location of sampling wells; Saf Zz 32/02 well of the in situ microcosm experiment). B) Spatial distribution of the carbon isotope composition of benzene in the wells of the Zeitz aquifer.

[50]. However, under anaerobic conditions, the benzylsuccinate pathway attacking toluene at the methyl group shows quite similar isotope fractionation factors under nitrate- iron-, and sulfate-reducing conditions [26, 46, 49, 73, 93]. At a contaminated site, the microbial pathway relevant for the degradation can be deduced by the redox conditions in the aquifer or by assessment of the primary metabolites of the compound of interest [23]. In the case of toluene, benzylsuccinate was detected in Zeitz, which supports the assumption that sulfate reducing conditions govern the anaerobic degradation of toluene in the aquifer. Similarly, the fractionation of benzene also varies under these conditions ($\alpha = 1.0036$) but is lower under methanogenic conditions ($\alpha = 1.002$) [39]. Because sulfate was the major electron acceptor in Zeitz, here we used the fractionation factor for benzene degradation under sulfate reducing conditions for calculating the in situ degradation. To show the uncertainty, we also calculated the degradation with a fractionation factor characterizing methanogenic conditions ($\alpha = 1.002$). Using the larger fractionation factor ($\alpha = 1.0036$) characteristic for sulfate reducing conditions, the interpretation of the benzene isotope composition gives a more conservative estimate (up to 69 % degradation) whereas the calculation with the lower factor ($\alpha = 1.002$) indicative for methanogenic conditions suggests a higher degradation (up to 88 %). A field survey over the contamination plume enabled mapping of the degradation of contaminants (see Fig. 3). A previously published monitoring campaign in Zeitz shows similar results [86]. Examinations of other wells or other BTEX contaminated sites are described elsewhere [10, 20, 76, 77].

In addition, a number of field studies exist where the enrichment of heavy isotopes in the residual fraction of mostly BTEX or chlorinated ethenes was used to estimate the in situ degradation [13, 18, 23, 36, 45, 51, 56, 60, 62, 63, 75, 85–87]. For other compounds such as naphthalenes, chlorinated benzenes, phenols, fuel oxygenates (MTBE, ETBE, [95]) less experience exists showing the need for further field studies. The rapid increase of the references within the last five years shows a broad acceptance of the general approach, and the reliability of the technique will be further improved with increasing data sets for isotope fractionation factors. At present, a range of fractionation factors for several compounds under different environmental conditions are reported in recent reviews [47, 69] and data bases (www.isodetect.de). Particularly for the mono-aromatic BTEX contaminants, the applicability of the technique is highly reliable. However, at present the cumulated biodegradation or SIFA approach is of limited value for contaminants such as tert-butyl alcohol, tri-, dichloroethylene, and vinylchloride which can be both, substrate or metabolite. Aquifers con-

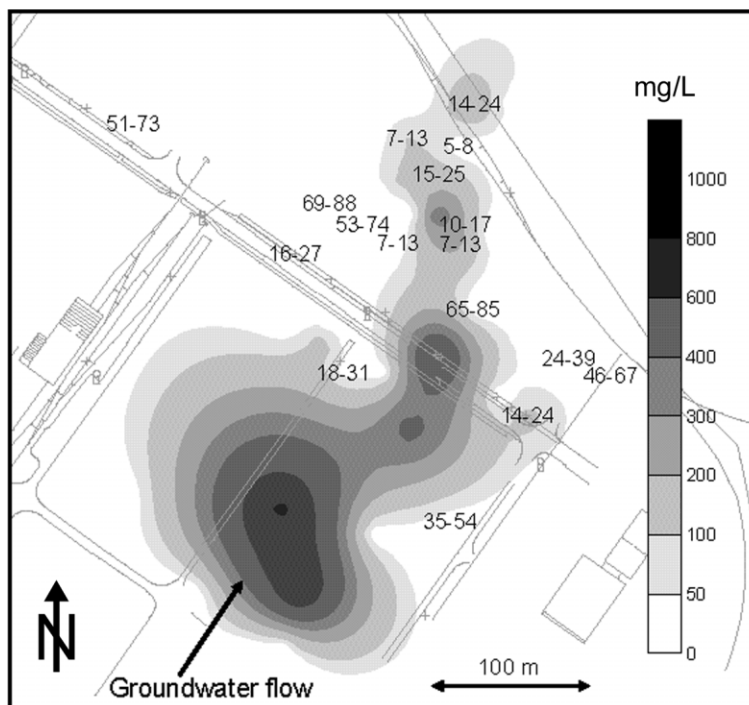


Figure 3. Percentage of benzene degradation in the wells of the contamination plume calculated by use of Eq. 3 (isotopic composition of the source $[R_0] = -28.5\text{‰}$, $\alpha = 1.0020$ (methanogenic) -1.0036 (sulfate reducing); modified from [18]).

taminated by tetra- and trichloroethene may show a sequential transformation pattern with varying isotope compositions which are not easy to interpret [42].

3.1.2 In Situ Microcosms with Stable Isotope Labeled Substrates (BACTRAP Approach)

At many sites, however, there is only limited access to the contamination plume due to the small number of wells or the insufficient data base for the respective compounds. Therefore, a method to prove the microbial degradation of the contaminants is necessary which can be applied directly in the groundwater monitoring wells. In order to provide evidence and to estimate the turnover and the relevant pathway, the in situ microcosm approach was developed [20]. The system consists of beads containing activated carbon in a granular shape that are loaded with ^{13}C -labeled contaminants as shown for benzene or toluene at the Zeitz site. The beads provide a large amount of internal surface area for colonization or attached growth of degrading bacteria (biofilm formation). If the indigenous bacteria of the well colonize the beads and productively consume the contaminants under in situ conditions, the ^{13}C -labeled carbon will be incorporated into the growing cells and can be traced within biomarker molecules such as fatty acids or nucleic acids. The overall workflow of the approach is presented in Fig. 4.

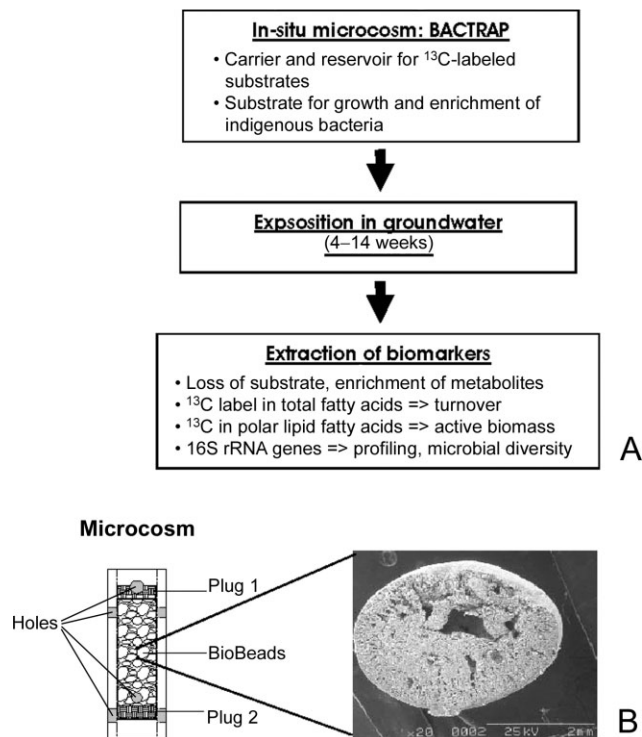


Figure 4. Approach II (A): Assessment of biodegradation potentials in a contaminated aquifer by use of in situ microcosms (BACTRAPs) with tracer compounds labeled with stable isotopes; B: microcosm containing Bio-Sep® beads.

(Picture: Copyright (2003) from Environmental Forensics, 2003, 4 (1) by White et al.; reproduced by permission of the Taylor & Francis Group, LLC., <http://www.taylorandfrancis.com>).

In order to analyze the microbial activity, sterilized in situ microcosms were loaded with ^{13}C -labeled benzene or toluene and were exposed for 32 d in well Saf Zz 32/02 in Zeitz. Non-amended microcosms served as controls. After exposure and development of the biofilms on the beads, the residual substrates and the lipid biomarkers were extracted and analyzed by means of mass spectrometry. About 88 to 112 mg of benzene and toluene per g of bead material in the microcosm was initially applied and around 16 mg/g was recovered after exposure (see Tab. 1). Isotopic analysis of the residual amounts of ^{13}C -benzene or ^{13}C -toluene in the recovered microcosms from Saf Zz 32/02 in September 2003 showed only a slight accumulation of the contaminants from the aquifer in the bead material in this well. In July–August 2004, however, an accumulation of up to 5.6 mg/g from the aquifer was observed in the controls after 112 d of exposure as a result of the much higher contaminant concentrations of about 300 mg/L at this time. The overall standard deviation of the recovered substrates from the BACTRAP systems amounted to < 10 %.

Total lipid fatty acid (TLFA) patterns of extracts and their isotopic compositions, as well as polar lipid fatty acids (PLFA) of the beads from the microcosms were analyzed and the TLFA patterns are shown in Fig. 5. TLFA from

Table 1. Concentrations and ^{13}C abundance of contaminants in the in situ microcosms (BACTRAPs) before and after exposure in well Saf Zz 32/02 (modified from [20]).

	Before exposure		After 32 d		
	^{13}C [Atom %]	Load [mg/g ^a]	^{13}C [Atom %]	Concentration [mg/g ^a]	Loss [%]
Benzene	0.1	88 ± 1.0	0.1	15.8 ± 0.2	82
Toluene	0.1	112 ± 1.1	0.1	16.0 ± 1.4	85
[$^{13}\text{C}_6$]-Benzene	98.0	88 ± 0.2	98.0	15.8 ± 0.2	82
[$^{13}\text{C}_1$]- α -Toluene	14.0	112 ± 1.2	14.0	17.8 ± 1.4	84
Control	–	0.0	0.1	0.46 (benz.) ^b	–
(Control)	–	0.0	0.1	5.6 (benz.) ^c	–

^a) Per g bead material.

^b) Non-loaded control; accumulation from aquifer contaminant plume after 32 d of exposure in September 2003.

^c) Non-loaded control; accumulation from the aquifer after 112 d of exposure in July–August 2005 showing much higher benzene concentrations and lower biofilm formation.

both, ^{13}C -benzene and ^{13}C -toluene amended microcosms showed ^{13}C -enrichment of up to $\delta = 13360\text{‰}$ in the fatty acids, providing clear evidence for benzene and toluene biodegradation with transformation of ^{13}C into the microbial biomass. The decrease in contaminant concentrations of the microcosms can thus be considered to be attributable to microbial activity. Extracts from ^{13}C -toluene-amended beads showed incorporation of ^{13}C into more or less the same fatty acids as found in the ^{13}C -benzene microcosm.

Estimation of the ^{13}C Recovery in the Biomass

The incorporation of ^{13}C into the fatty acid fraction causing a shift of up to $\delta 13360\text{‰}$ indicates that [^{13}C]- α -toluene (~14.5 atom %, see Tab. 1) was more intensively incorporated into microbial biomass than [$^{13}\text{C}_6$]-benzene (98 atom %). This was expected because toluene is considered to be more easily degradable than benzene. For 16:1 ω 7c, the isotope composition was 13360‰ (13.9 atom %), very similar to the toluene substrate, which indicates that at least one organism producing this fatty acid used the applied toluene nearly exclusively as a carbon source. The isotope signatures of C15:0, C16:0 and 18:1 ω 7c, of 7946‰ (9.1 atom %); 6283‰ (7.6 atom %); and 9684‰ (10.7 atom %), respectively, demonstrate that other organisms in the consortium assimilated the labeled C from toluene to a major extent but not exclusively. Fatty acids with a lighter isotope composition such as for 18:0 with 92‰ (1.2 atom %) indicated that some organism colonized the in situ microcosms using other carbon sources than the labeled toluene, e.g., other contaminants or natural organic matter to a major extent.

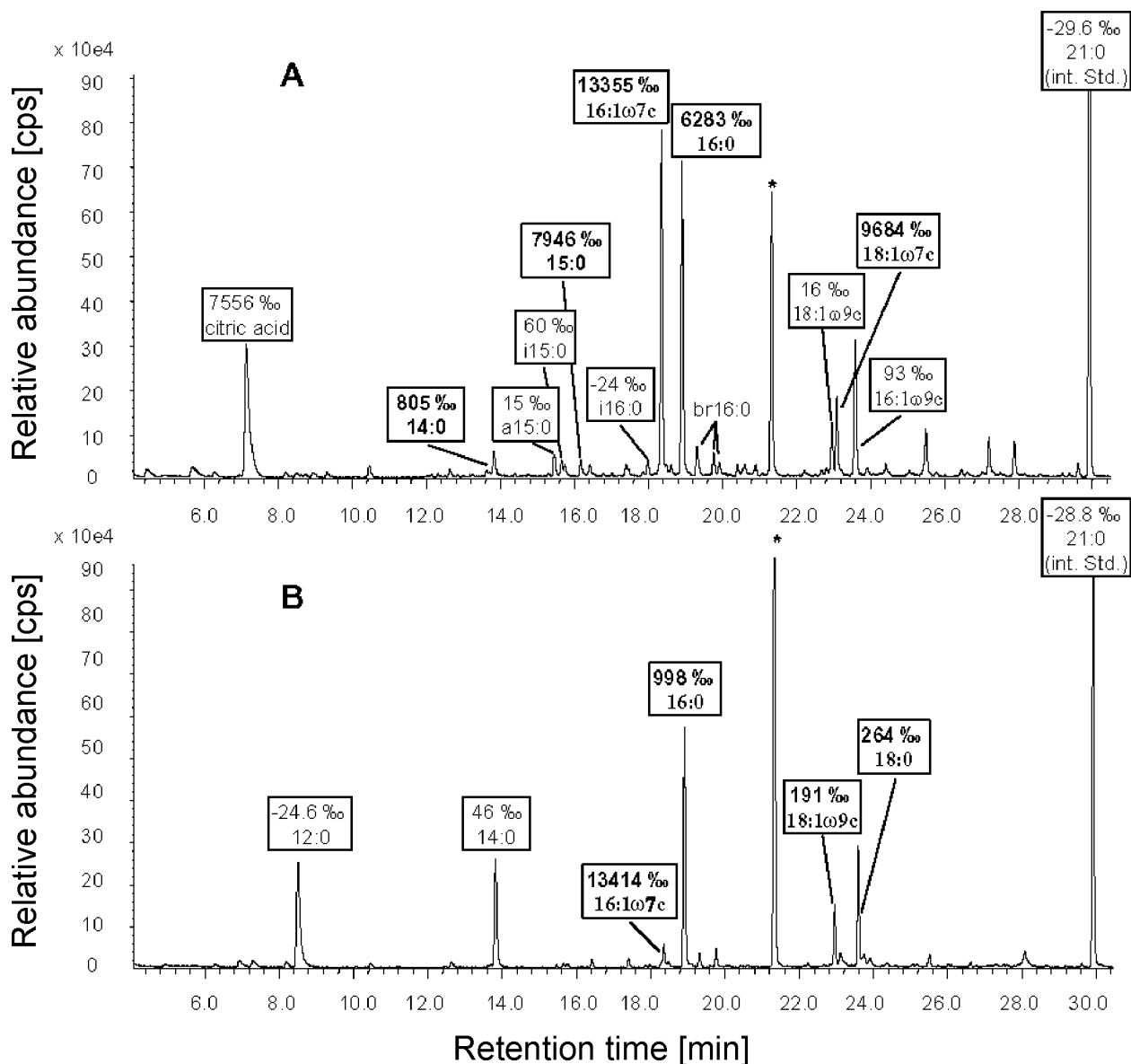


Figure 5. GC-MS profiles and isotope enrichment of fatty acids in total lipid extracts obtained from the $[^{13}\text{C}_1]$ - α -toluene (A) and $[^{13}\text{C}_6]$ -benzene (B) amended microcosms deployed in well Saf Zz 32/02 in the Zeitz aquifer for 32 days. Major fatty acids with retention time in brackets given in minutes were 14:0 (13.83), i15:0 (15.46), a15:0 (15.66), 15:0 (16.42), i16:0 (17.98), 16:1ω7c (18.36), 16:0 (18.91), 18:1ω9c (22.96), 18:1ω7c (23.10), 18:0 (23.59), br16:0 (19.92, 20.41, 20.60) with undetermined position of methyl-branching, * phthalate (21.31) from extraction process. (The $\delta^{13}\text{C}$ values for the isotopic composition of the respective methyl esters represent the isotopic shift compared to the PDB standard.)

The most intensively labeled fatty acid on the $[^{13}\text{C}_6]$ -benzene amended microcosms was 16:1ω7c with an isotope composition of 13410‰ corresponding to 13.9 atom %. The isotope composition of $[^{13}\text{C}_6]$ -benzene was about 98 atom % and therefore around $1/7^{\text{th}}$ of the carbon was derived from the labeled benzene. Thus, the majority of carbon was derived from non-labeled carbon sources which may comprise non-labeled benzene from the contamination, natural organic carbon sources or CO_2 used for synthesis of fatty acid. The C16:0 and C18:0 fatty acids were much lower labeled indicating that some organisms use benzene only to a minor

extent for biosynthesis. Almost non-labeled fatty acids (C12:0) suggest that parts of the microbial community colonizing the beads are not involved in the biodegradation of benzene and use other carbon sources exclusively.

The concentrations and isotope compositions of individual fatty acids were used to calculate the amount of ^{13}C converted from the contaminant according to the method described by Richnow et al. [61]. Since the isotope composition of fatty acids from the non-amended in situ microcosms was typically between -35 and -25 ‰, it was considered that an isotope composition enriched to more than -20 ‰ was signif-

icantly affected by the transformation of the labeled contaminants. On the benzene amended trap about 3.1 nmol $^{13}\text{C}/\text{g}$ bead material corresponding to 43 ng $^{13}\text{C}/\text{g}$ labeled benzene was bound in the fatty acid fraction. The ^{13}C - α -toluene derived carbon bound within fatty acids was orders of magnitude higher. The amount of 456 nmol toluene derived carbon/g corresponds to the equivalent of 6062 ng labeled toluene. Therefore, the assimilation of C from toluene was more than 140 times higher than that of benzene. Considering that fatty acids account for up to 5 % of the total biomass carbon and that the carbon isotope signature in lipids is similar to that in other fractions of the biomass, the overall amount of labeled carbon bound within the biomass is 20 times higher than that found in the fatty acids. If we expect furthermore, that around 95 % of the carbon source is metabolized and 5 % is used for biosynthesis of biomass ($y_{x/s} = 0.05$), the total productive metabolization can be estimated as 2400 μg toluene and 17.2 μg benzene during incubation in the aquifer. These values only account for 2.5 % of the toluene loss and 0.024 % of the benzene loss. The ^{13}C -label of benzene, however, was highly diluted due to the background concentrations of benzene from the aquifer.

Phospholipid fatty acids (PLFA) are parameters for microbial membrane phosphoglycerolipid content and thus an indicator for viable cells [24]. The total PLFA amounts were highest in the ^{13}C -toluene microcosms with 8870 pmol and 8480 pmol in the ^{12}C -toluene microcosm [20]. The microcosms with ^{13}C - or ^{12}C -benzene and the control contained 5860 pmol, 2410 pmol and 860 pmol PLFA, respectively. Applying the conversion factor of $1.4\text{--}4.0 \times 10^4$ cells/pmol of PLFA, these values correspond to $2.3 \times 10^7\text{--}2.4 \times 10^8$ bacterial cells with the size of *Escherichia coli* [91] verifying a considerable microbial colonization in the bead material of the microcosms.

Even though no strictly anaerobic pure cultures able to degrade benzene under iron or sulfate reducing conditions are yet available, the in situ microcosm approach with ^{13}C -labeled compounds could prove the microbial in situ degradation of benzene under strict anaerobic conditions in Zeitz. At present, only nitrate or perchlorate reducing pure cultures responsible for the degradation of benzene have been described [11]. The transformation of ^{13}C -carbon from the labeled substrate into microbial fatty acids provided clear evidence for the assimilation of the pollutant resulting in the formation of biomass. This easy to handle and cost-effective microcosm approach can be used to provide the information required to implement Monitored Natural Attenuation (MNA) as requested by the OSWER directive [80] for approval of Natural Attenuation as a treatment measure for contaminated sites.

Metabolites

The activated carbon of the beads may enrich degradation metabolites that can be used to identify the involved degra-

ation pathways. The formation of labeled benzy succinate upon toluene degradation was observed in the Zeitz aquifer (data not shown) and is indicative of the anaerobic degradation pathways of aromatic compounds in microorganisms using nitrate, sulfate, and iron as terminal electron acceptors [26, 73, 93]. The non-labeled analogue was also found in the control microcosms indicating a degradation of the aquifer contaminants under the respective conditions. Reusser et al. [59] applied push and pull experiments with deuterium labeled toluene and xylene to verify in situ degradation of the compounds in a contaminated aquifer. Although deuterium labeled contaminants may be useful tracer compounds for proving in situ degradation, much higher amounts of labeled substances are needed during push and pull experiments compared to the BACTRAP approach. The application of in situ microcosms as described here can significantly reduce the amount of labeled material and gives, in principle, information similar to that obtained from push and pull experiments. However, by using ^{13}C -labeled compounds in the in situ microcosms the transformation into biomass can be traced by analyzing the biomarker molecules providing the proof of principle for biodegradation.

Biodiversity

The biodiversity of the microbial biomass from in situ microcosms exposed in well Saf Zz 32/00 in summer 2004 over a period of 7 to 98 d was characterized by cultivation independent molecular biological approaches based on PCR-amplified partial 16S rRNA genes from total DNA [72]. Total DNA was directly extracted from the in situ microcosms and the PCR products amplified from the various samples were compared to each other on the basis of their SSCP profiles (see Fig. 6). The community profiles were typically composed of approx. 20 bands with about 5 to 10 bands being more dominant. Most of the profiles generated from in situ microcosms taken after different incubation times were relatively similar to each other, indicating a highly reproducible colonization pattern of the bead material. For most samples analyzed, the compositions of the bacterial community on the benzene and toluene loaded microcosms were not severely altered in comparison to the non-amended controls although highly labeled microbial fatty acids extracted from the ^{13}C -experiments showed a substrate degradation and incorporation into biomass (see Tab. 1). This indicates a coordinated degradation by certain members of the indigenous microbial community colonizing the in situ microcosms and channeling of the ^{13}C carbon into the microbial food web. However, the isotope composition showed that these organisms also used other carbon sources. Benzene and toluene were the major carbon sources but other BTEX compounds, contaminants, or humic substances were certainly present and may be used as additional carbon sources.

The comparison of the profiles of the non-amended controls with the loaded microcosms showed that the DNA and

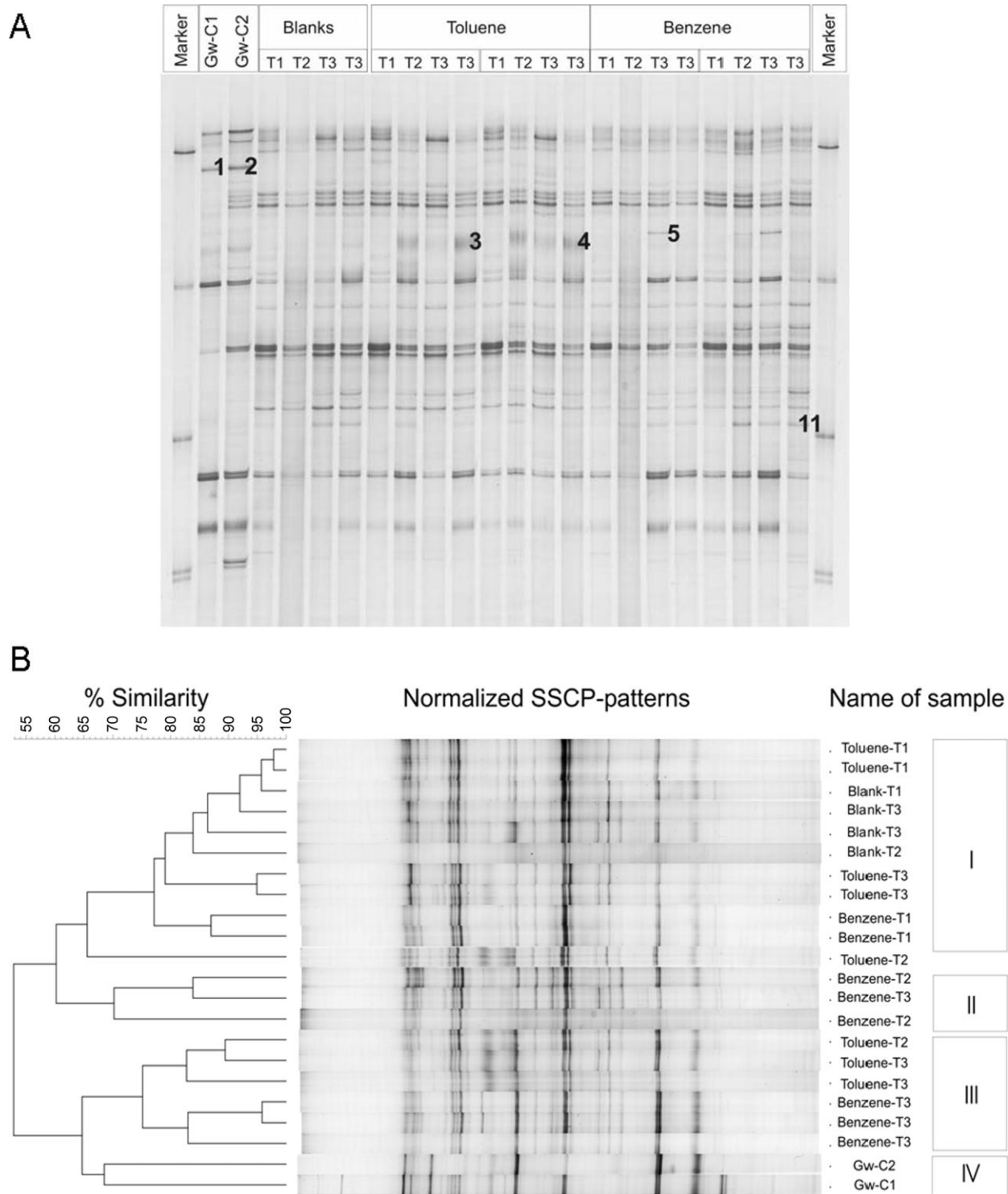


Figure 6. SSCP Gel (A) and digital image analyses of SSCP-profiles (B) of PCR amplified 16S rDNA isolated from groundwater and microcosms loaded with toluene or benzene and controls (blanks) after exposure of 24 d (T1), 49 d (T2), and 92 d (T3) in well Saf Zz 32/02. Selected bands of these profiles were sequenced for identification, numbers indicated in the gel image can be found in Tab. 2.

FA patterns were only slightly different. This reflects the fact that the bead material (activated carbon) of the control (blank) extracted a certain amount of contaminants, in particular, benzene from the contaminated aquifer (see also

Tab. 1) leading to similar conditions in the non-loaded and benzene-loaded microcosms. A comparison of the SSCP-profiles of the bead samples with the profiles of the groundwater samples from the same well showed that with the ex-

ception of two bands all bands found in the water were also present on the beads; conversely, only three bands found on the beads were not present in the groundwater samples (see Fig. 6A). Hence, it can be concluded that the bead material provided a nearly non-selective surface for the growth of the indigenous microbial community from BTEX contaminated groundwater.

DNA-patterns from the toluene loaded microcosms were also highly similar indicating that toluene degraders were already members of the colonizing community and may have conducted the toluene degradation at the site. Cluster analysis of the profiles (see Fig. 6A) revealed four major groups (see Fig. 6B). Cluster I contained communities from all microcosms collected after short time exposure (24 d) or without loaded substrates (T1, see also legend of Fig. 6). In addition, two toluene loaded microcosms from a later sampling (T3) were found in this group. Cluster II contained samples from microcosms loaded with benzene. Other replicates of this treatment and sampling were found in Cluster III which mainly contained samples from substrate loaded treatments, collected later during the kinetic study. As expected, on the one hand, the community profiles generated from the surrounding groundwater was different from the biofilm material extracted from the beads (Cluster IV), but on the other hand, similarities between both sample types were evident. This indicated that, in fact, the dominant bacteria from the surrounding groundwater contributed to the biofilm communities. Interestingly, the similarity of the groundwater samples was higher with Cluster III (later samplings) than that with Cluster I, which can be explained by the fact that several of the bacteria from the aquifer were only slowly growing on the bead material.

Due to the similarity of the profiles to each other, it was in most cases not really possible to identify bands which were highly characteristic for a certain substrate or period of incubation. However, for toluene, a characteristic band seems to be generated during the incubation (see Fig. 6, bands 3 and 4). DNA-sequencing of selected bands revealed that most

bacteria in this community were Proteobacteria from the Alpha- and Beta-subgroup (see Tab. 2). Similarities to known sequences in the databases for these partial rRNA genes ranged from 85 to 100 %. Complete similarity was found with an uncultured bacterial clone isolated from monochlorobenzene contaminated groundwater [5]. Other sequences, which were derived from the toluene-specific bands, were found to originate from *Azoarcus* sp., one of them most closely related to an organism that has been shown to degrade toluene and *m*-xylene under denitrifying conditions [7, 94]. Despite the fact that 16S rRNA genes are generally not reliable indicators for bacterial functions, the so far characterized sequences give no rise to assume growth of sulfate-reducing or other strictly anaerobic bacteria, but rather indicates the presence of bacteria capable of growing under denitrifying conditions. Other sequences indicated α -proteobacteria adapted to the exposition with metals, assuming physiological similarities with their closest relatives [37, 74]. However, it is known from other strictly anaerobic bacteria, for example, *Dehalococcoides* sp. that no PCR products were found with the universal COM1/COM2 primers.

3.2 Monochlorobenzene Degradation at the SAFIRA Reference Site Bitterfeld

3.2.1 Stable Isotope Fractionation Analysis (Cumulated Biodegradation Approach)

Monochlorobenzene (MCB) is a xenobiotic compound which has been commonly used for chemical manufacturing processes over decades and is a common groundwater contaminant at many chemical production sites in Europe and the United States [6, 65]. In addition, higher chlorinated benzenes can be degraded via reductive dechlorination to MCB under anaerobic conditions (for review see Van Agteren et al. [82]) and may also be produced from the microbial trans-

Table 2. Characterization of rRNA genes isolated from groundwater and microcosms loaded with toluene or benzene and controls after exposure in well Saf Zz 32/02 (see also Fig. 6).

Band No. ^{a)}	Length [bp]	Similarity [%]	Closest relative or sequence (Accession No.)	Phylogenetic group	Source of isolation or habitat of closest relative or relevant metabolic activity of closest relative
1	370	100	Uncultured bacterium (AY05094)	Betaproteobacteria	Monochlorobenzene contaminated aquifer
2	205	85	<i>Acidovorax</i> sp. (AJ864847)	Betaproteobacteria	High mountain lake habitat
3	370	99	<i>Azoarcus</i> sp. (AF515816)	Betaproteobacteria	Degradation of toluene and benzene under denitrifying conditions
4	360	95	<i>Azoarcus denitrificans</i> (L33690)	Betaproteobacteria	Growth on toluene under denitrifying conditions
5	350	93	Uncultured bacterium (AY475201)	Alphaproteobacteria	From metal rich, acidic river Tinto (Spain)
11	210	90	Uncultured bacterium (AF418953)	Alphaproteobacteria	From metal rich freshwater reservoir

^{a)} PCR-products obtained from bands indicated in Fig. 6A; no products were obtained from other bands.

formation of hexachlorocyclohexane (HCH) in anoxic aquifers [57,83]. MCB is the major contaminant of the pollution plume in the Quaternary anoxic aquifer in Bitterfeld. The aquifer belongs to the regional aquifer system, in which about 200 million m³ of groundwater are contaminated with predominantly chlorinated compounds [27,28]. Field studies demonstrating the anaerobic microbial transformation of MCB are completely lacking. Thus, no pathways and mechanisms of anaerobic transformation of MCB are yet known. Taking into account that the plume formed in the aquifer several decades ago, a significant selection pressure for MCB degrading microorganisms can be expected. Therefore, assuming biodegradation we applied the SIFA approach (see Fig. 1) to the complex contamination plumes in Bitterfeld [34].

The MCB plume stretches down-gradient in a SE-direction, following a Quaternary hydrogeological channel structure oriented in a NW/SE direction, which strongly affects contaminant flow. Since the access to the groundwater by wells was limited, we decided to analyze a cross section of wells A-B perpendicular to the groundwater flow in the lower aquifer which covers the concentration gradients at both sides of the plume (see Fig. 7). The concentrations of MCB increased up to 20 mg/L in the center of the plume and the isotopic signatures increased from values of -26.7‰ at the center to -23.0‰ at the fringes of the plume (see Fig. 8 left side)

showing a significant ¹³C-enrichment in the residual MCB at the fringes. In addition, we analyzed the vertical distribution of MCB and its isotope signature in the upper aquifer by multilevel sampling in well SAF4/97 showing the same trends with a clear vertical MCB stratification (see Fig. 8, right side). The ¹³C-enrichment found at the fringes of the plume relative to the source area of about 4 δ units clearly shows the occurrence of in situ biodegradation of MCB. This would result in a field isotope fractionation factor of α = 1.0005. However, field fractionation factors are always

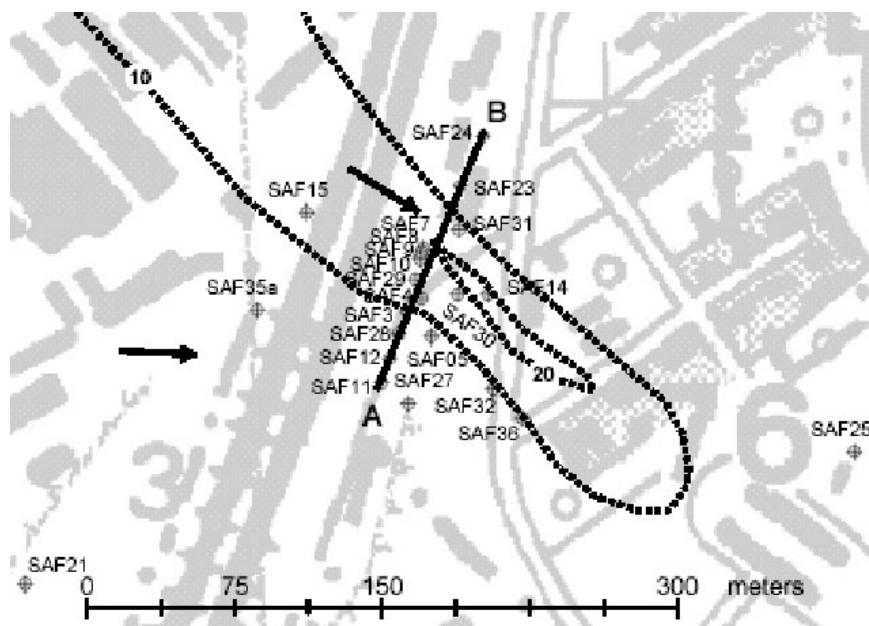


Figure 7. Monitoring wells and distribution of the monochlorobenzene plume in Bitterfeld modified from [35]. Concentrations are given by the dotted lines in mg/L. The arrows indicate the groundwater flow in November 2002. The solid line (A to B) represents the position of the cross-section perpendicular to the monochlorobenzene plume at the location of the SAFIRA research station. (Saf 4 = monitoring well for the vertical analysis).

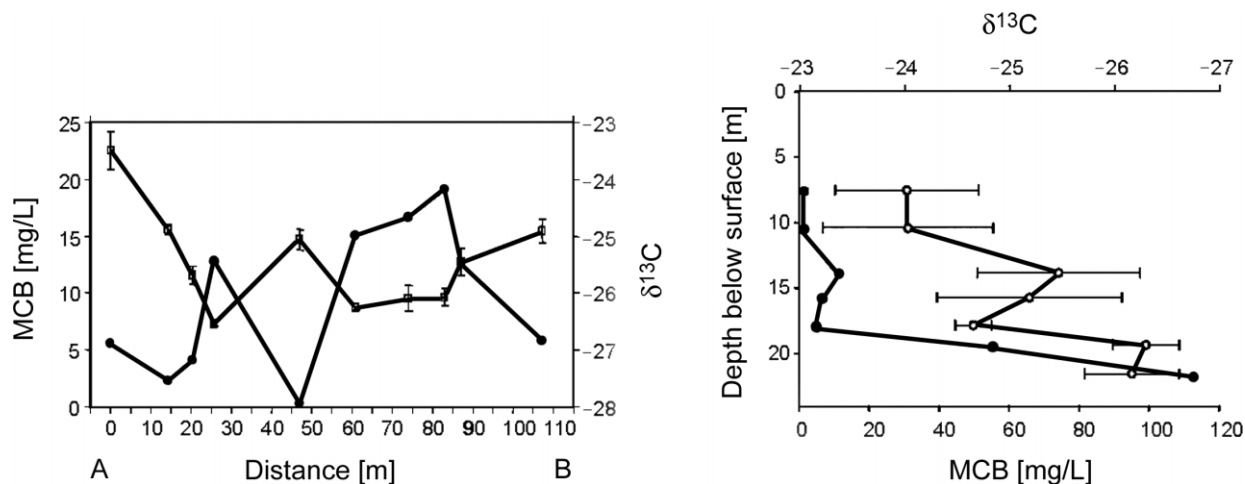


Figure 8. Monochlorobenzene concentrations and isotopic signatures of the cross-section A-B, depth of 17–21 m (left) and the vertical profile in Saf4 (right); modified from [35]. ● = MCB concentrations □ and ○ = δ¹³C of MCB.

lower than factors obtained from laboratory experiments in closed systems in which only biodegradation can diminish the concentrations. In the field, the concentrations may be affected by abiotic effects leading to much smaller fractionation factors suspending the calculation of the effective biodegradation according to Eq. (3).

Several degradation pathways are conceivable under anaerobic conditions. MCB may be degraded similarly to other aromatic compounds by processes such as nitrate-, Fe(III)-, sulfate-reduction, or fermentation coupled to methanogenesis [11, 26, 73, 81, 93]. In addition, microbial reductive dechlorination of MCB requiring an electron donor may also be considered. Batch experiments using several aerobic pure cultures of bacteria showed that the known aerobic pathway initiated by dioxygenases did not result in a significant carbon isotopic fractionation [34]. Conversely, the field isotope fractionation factor for MCB obtained in the anoxic aquifer was higher, especially, if dispersion and dilution effects are accounted for [34]. Thus, it is evident that in this aquifer a novel anaerobic pathway resulting in an isotopic fractionation, which is untypical for aerobic MCB transformation, must be considered to be the predominant process of the in situ MCB degradation. However, the present data do not allow the anaerobic pathway of MCB degradation to be identified. The transformation of MCB appears to be very slow and most of the microbial activity appears to be located at the plume fringes.

Fig. 9 illustrates the various fractionation processes likely for the MCB degradation in comparison to the field data. Since these field-derived fractionation factors for MCB are significantly higher than the laboratory-derived factors for aerobic degradation, it is evident that an anaerobic pathway governs the MCB fractionation in the Bitterfeld aquifer. All

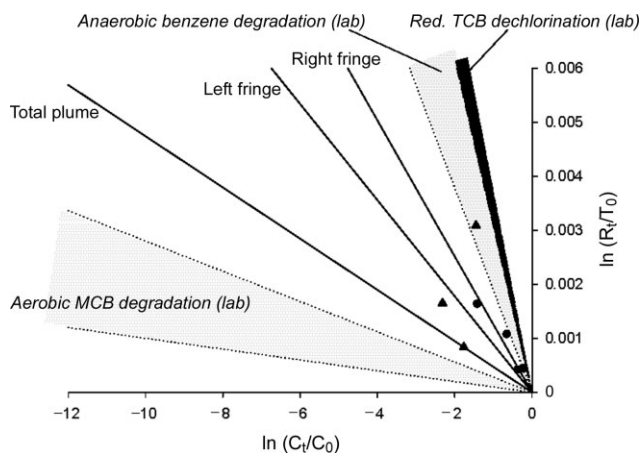


Figure 9. Rayleigh plot illustrating field-derived and laboratory-derived fractionation factors: aerobic degradation of MCB in batch experiments ($\alpha = 1.0001$ – 1.00028), the field fractionation factor for the whole MCB plume ($\alpha_f = 1.00043$), the (▲) left (Saf11, Saf12, Saf27, Saf28) and (●) right fringe (Saf7, Saf30, Saf31, Saf23) of the plume at the cross-section A–B ($\alpha_f = 1.00083$ and 1.00106 , respectively) and, for comparison, batch experimental data for the reductive dechlorination of TCBS ($\alpha = 1.0031$ – 1.0037 [22]) and anaerobic degradation of benzene ($\alpha = 1.0019$ – 1.0036 [39]).

known aerobic microbial cultures investigated used the ring-dioxygenase pathway to degrade MCB [88] but the dioxygenase pathway did not lead to a significant isotope fractionation of MCB in batch experiments. This result is in accordance with studies using toluene and naphthalene as model compounds showing that the dioxygenase reaction does not lead to significant carbon isotope fractionation [50]. Aerobic degradation of TCB by pure cultures exhibiting the dioxygenase reaction also did not show any significant isotope fractionation [22]. However, the field fractionation factors obtained are lower compared to laboratory experiments investigating the anaerobic degradation of benzene or 1,2,3-trichlorobenzene (TCB) [22, 39]. This may be explained by dilution, dispersion and sorption processes in the aquifer, which affect concentrations (C_i) without altering the isotopic composition (R_i). Hence, when using the Rayleigh equation (Eq. (2)) for field data, the resulting field isotope fractionation factor is always lower than that determined in culture experiments. However, in a cross section perpendicular to the contaminant plume, the dispersion and sorption processes should have affected MCB concentrations in a similar way, since the distance from the original source of the contamination is comparable. Accordingly, the fractionation factor determined at the left and right fringe was higher than that of the whole plume and was significantly higher than the low isotopic fractionation expected from aerobic transformation. The anaerobic degradation of various aromatic hydrocarbons led to a significant isotope fractionation of about $\alpha = 1.0017$ to 1.0036 [39, 46, 49].

In addition, a number of studies have demonstrated that the anaerobic reductive dehalogenation of halogenated ethenes and TCBS is always associated with higher isotope fractionation factors [22, 23, 32, 33]. Analogously, it can be expected that a reductive dehalogenation of MCB should also be associated with a significant isotope fractionation. Alternatively, MCB may be degraded similarly to benzene under anaerobic conditions. Although the anaerobic degradation pathway for benzene has not yet been completely identified, the isotope fractionation of benzene yields fractionation factors of 1.0020 (methanogenic), 1.0036 (sulfate-reducing) and 1.0022–1.0024 (nitrate-reducing conditions) in enrichment cultures [39]. A degradation of MCB following the anaerobic benzene pathway should therefore show a significant isotope fractionation.

3.2.2. In Situ Microcosms with Stable Isotope Labeled Substrates (BACTRAP Approach)

The in situ approach based upon microcosms amended with ^{13}C -labeled tracer compounds was also applied for MCB in the aquifer in Bitterfeld. The accumulation of MCB in anoxic aquifers initially led to the assumption that anaerobic biodegradation of MCB is difficult or even impossible, because neither pure nor enrichment cultures and microcosm studies had demonstrated biodegradation of MCB un-

der these conditions. However, the isotopic signatures of the contamination plumes clearly show biotransformation in the course of the MCB plume [34]. BACTRAPs amended with MCB were incubated for 7 weeks in a groundwater well under anoxic conditions. Geochemical analysis led to the conclusion that anaerobic conditions prevailed in the well where the BACTRAPs were tested.

After exposition for 49 d, more than 80 % of ^{13}C -MCB had been lost from the microcosms and the extracted total lipid fatty acids were found to be significantly labeled (see Fig. 10). Hexadecanoic acid (16:0) showed the highest incorporation of ^{13}C with $\delta^{13}\text{C}$ of 579‰ (see Fig. 10). Octadecenoic acid (18:1) was also labeled significantly to 158‰. Octadecanoic acid (C18:0) and tetradecanoic acid (14:0) showed a lower incorporation of ^{13}C of 10‰ and 46‰, respectively. Unsaturated hexadecenoic acid (16:1) showed a strong ^{13}C signal indicating high label incorporation but the concentration was also too small for quantitative analysis. Similar to the in-situ microcosm studies with benzene and toluene, the data provided evidence for the assumption of an unknown anaerobic MCB degradation process actually occurring in Bitterfeld. In addition, the incorporation of the label into marker molecules of the biomass also clearly indicates that this pathway supports growth and energy conservation from MCB for the respective bacteria under the given environmental conditions.

4 Concluding Remarks

Both approaches presented in this overview provide promising tools for the assessment of in situ microbial degradation activities in contaminated aquifers. They have certain implications and the evaluation of the practical benefits and limitations is currently in progress. The isotope fractionation

(SIFA) approach interpreting the isotope signatures of contaminants provides a technique for assessing the cumulated biodegradation in an aquifer, which has occurred on the groundwater flow path down gradient from a source of contaminants. SIFA relies on the availability of a sufficient number of monitoring wells, the availability of distinct isotope fractionation factors for the respective degradation pathways and biogeochemical conditions, and a detailed knowledge about the hydrology of the aquifer. Even if no specific isotope fractionation factor is available, a qualitative estimation of the biodegradation can be made by comparison with other isotope fractionation factors of known pathways and may provide valuable information on the processes likely to occur in the investigated aquifer. However, if multiple sources of contaminants with different initial isotopic signatures contribute to a mixed plume, this approach may be too complex for the reliable quantification of in situ biodegradation. In addition, the applicability of the approach is limited, if processes without significant isotope fractionation govern in situ biodegradation as shown for aerobic toluene degradation pathways catalyzed by mono- or dioxygenase enzymes reacting with the aromatic ring system [46].

The in situ microcosm approach (BACTRAP) with isotopic labeled contaminants and analysis of the isotope composition of lipid biomarkers provides an excellent tool for assessment by proving the microbial in situ activity in contaminated aquifers and for monitoring natural attenuation processes. This relatively simple, low-cost approach provides information in a reasonable time frame and the results are more reliable than ex-situ approaches. Even if the details of the metabolism of a target compound are not yet known, valuable information about the presumable pathway can be obtained by this approach. In particular, if metabolites of the parent compound can be identified on the bead material of the microcosms, a clear indication of the relevant degradation pathways can be given by this approach. Future investigations will provide the basis for a quantification of the biodegradation potential by this approach. Therefore, it is necessary to investigate the sorption behavior of the bead material in the presence and absence of bacteria. The key organisms related to contaminant degradation could not yet be identified; however, this aspect of the approach is currently under investigation. Future experiments to investigate the kinetics of the colonization as traced by quantitative PCR may elucidate the development of communities and may provide an indication for organisms supported by the test substrate. When the concentration of the label in the biomass is sufficiently high, stable isotope prob-

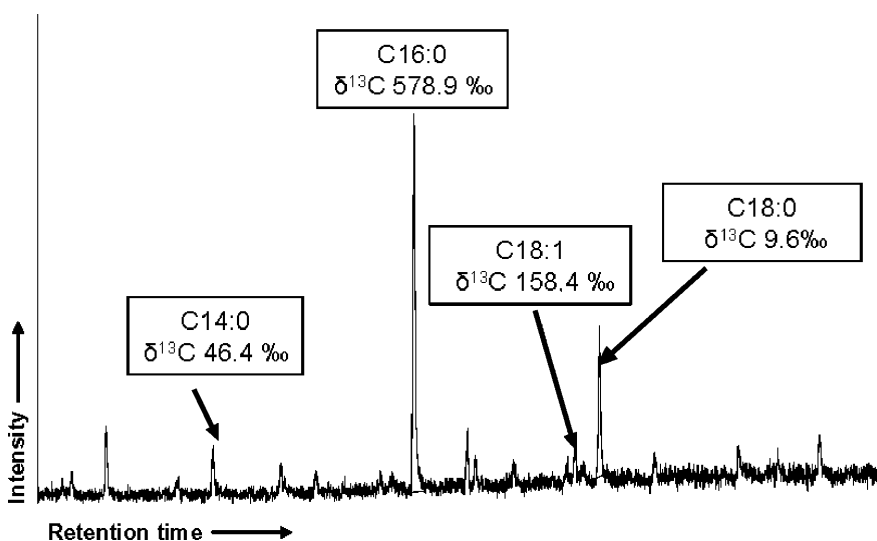


Figure 10. Total ion current of the fatty acid extracts from a BACTRAP amended with $^{13}\text{C}_6$ -monochlorobenzene exposed for 49 d in an anaerobic aquifer in well Saf 4/97 at the Bitterfeld field site. Identified fatty acids and their isotope compositions are indicated in the boxes.

ing (SIP) can also be employed to identify organisms which use the ^{13}C -labeled contaminants as a carbon substrate [38,40,92]. This may open the “black box” of subsurface microbial ecology by linking structure and function.

Acknowledgements

Dr. Kerry Sublette University of Tulsa, USA, provided the Bio-Sep[®] beads for this work. The fellowship of Nicole Stelzer is supported by the Deutsche Bundesstiftung Umwelt (grant 20004/751). The Department of Groundwater Remediation and the SAFIRA Project of the UFZ are acknowledged for assistance in the field work and for providing well-characterized test sites.

The authors are grateful to Dr. Matthias Gehre and Ursula Günther for support in our isotope laboratory. They also would like to thank the BMBF (grant 02WT0022) and the EU for financial support within the 6th framework research project WELCOME (EVK1-2001-00132) and the Marie Curie Development Host Fellowship project BIOISOTOPE (EVK1-CT-2000256120).

Received: January 16, 2006 [ELS 125]
Received in revised form: March 19, 2006
Accepted: March 23, 2006

References

- [1] DIN 38402 – Teil 13, **1985**.
- [2] DIN EN ISO 5667-3 (A 21), **1996**.
- [3] W. R. Abraham, C. Hesse, O. Pelz, Ratios of carbon isotopes in microbial lipids as an indicator of substrate usage, *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 4202–4209.
- [4] T. A. Abrajano, D. E. Murphy, J. Fang, P. Comet, J. M. Brooks, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios in individual fatty acids of marine mytilids with and without bacterial symbionts, *Org. Geochem.* **1994**, *21*, 611–617.
- [5] A. Alfreider, C. Vogt, D. Hoffmann, W. Babel, Diversity of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large-subunit genes from groundwater and aquifer microorganisms, *Microb. Ecol.* **2003**, *45*, 317–328.
- [6] J. D. Arneith, G. Milde, H. Kerndorff, R. Schleyer, Waste deposit influences on groundwater quality as tool for waste type and site selection for final storage quality, in *The Landfill, Lecture Notes in Earth Science* (Ed: P. Baccini), Vol. 20, Springer-Verlag, Berlin (Germany) **1989**.
- [7] M. J. L. Barragan, M. Carmona, M. T. Zamarro, B. Thiele, M. Boll, G. Fuchs, et al., The bzd gene cluster, coding for anaerobic benzoate catabolism in *Azoarcus* sp. strain CIB, *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 5762–5774.
- [8] H. Bisswanger, *Enzymkinetik*, Wiley-VCH, Weinheim **2000**, 268.
- [9] E. G. Bligh, W. J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, *37*, 911–917.
- [10] C. Büning, F. Pfeifer, E. Podwojewski, W. Quecke, A. B. Dohrmann, C. C. Tebbe, et al., In situ Mikrokosmenuntersuchungen mit ^{13}C -markiertem Benzol und Toluol zum Nachweis des natürlichen biologischen Abbaus im Grundwasser und zur molekularbiologischen Analyse der abbauaktiven Mikroflora, *Altlastenspektrum* **2005**, *14*, 137–146.
- [11] R. Chakraborty, J. D. Coates, Hydroxylation and carboxylation—two crucial steps of anaerobic benzene degradation by *Dechloromonas* strain RCB, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 5427–5432.
- [12] Y. J. Chang, P. E. Long, R. Geyer, A. D. Peacock, C. T. Resch, K. L. Sublette, et al., Microbial incorporation of ^{13}C labeled acetate at the field scale: Detection of microbes responsible for reduction of U(VI), *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 9039–9048.
- [13] M. M. G. Chartrand, P. L. Morrill, G. Lacrampe-Couloume, B. S. Lollar, Stable isotope evidence for biodegradation of chlorinated ethenes at a fractured bedrock site, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 4848–4856.
- [14] T. P. Clement, M. J. Truex, P. Lee, A case study for demonstrating the application of US EPA’s monitored natural attenuation screening protocol at a hazardous waste site, *J. Contamin. Hydrol.* **2002**, *59*, 133–162.
- [15] H. Craig, Isotopic standards for carbon and oxygen and correction for mass-spectrometric analysis of carbon dioxide, *Geochim. Cosmochim. Acta* **1957**, *12*, 133–149.
- [16] H. S. Dempster, B. S. Lollar, S. Feenstra, Tracing organic contaminants in groundwater: A new methodology using compound-specific isotopic analysis, *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 3193–3197.
- [17] A. B. Dohrmann, C. C. Tebbe, Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP), in *Molecular Microbial Ecology Manual* (Eds: G. A. Kowalchuk, F. J. de Bruijn, I. M. Head, A. D. Akkermans, J. D. van Elsas), Vol. 2, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht **2004**, 809–838.
- [18] A. Fischer, A. Vieth, K. Knöller, T. Wachter, A. Dahmke, H.-H. Richnow, Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus mit Hilfe von isotopechemischen Methoden, *Grundwasser* **2004**, *9*, 159–172.
- [19] E. Galimov, *The Biological Fractionation of Isotopes*, Academic Press, Inc., London **1985**, 261.
- [20] R. Geyer, A. D. Peacock, A. Miltner, H. H. Richnow, D. C. White, K. L. Sublette, et al., In situ assessment of biodegradation potential using biotrials amended with ^{13}C -labeled benzene or toluene, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 4983–4989.
- [21] K. J. Goodmann, J. T. Brenna, High sensitivity tracer detection using high-precision gas chromatography-combustion isotope ratio mass spectrometry and highly enriched [^{13}C]-labeled precursors, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1088–1096.
- [22] C. Griebler, L. Adrian, R. U. Meckenstock, H. H. Richnow, Stable carbon isotope fractionation during aerobic and anaerobic transformation of trichlorobenzene, *FEMS Microbiol. Ecol.* **2004**, *48*, 313–321.
- [23] C. Griebler, M. Safinowski, A. Vieth, H. H. Richnow, R. U. Meckenstock, Combined application of stable carbon isotope analysis and specific metabolites determination for assessing in situ degradation of aromatic hydrocarbons in a tar oil-contaminated aquifer, *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 617–631.
- [24] J. B. Guckert, C. P. Antworth, P. D. Nichols, D. C. White, Phospholipid, ester-linked fatty-acid profiles as reproducible assays for changes in prokaryotic community structure of estuarine sediments, *FEMS Microbiol. Ecol.* **1985**, *31*, 147–158.
- [25] J. R. Hanson, J. L. Macalady, D. Harris, K. M. Scow, Linking toluene degradation with specific microbial populations in soil, *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 5403–5408.
- [26] J. Heider, A. M. Spormann, H. R. Beller, F. Widdel, Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons, *FEMS Microbiol. Rev.* **1999**, *22*, 459–473.
- [27] S. Heidrich, M. Schirmer, H. Weiß, P. Wycisk, J. Grossmann, A. Kaschl, Regionally contaminated aquifers – toxicological relevance and remediation options (Bitterfeld case study), *Toxicology* **2004**, *205*, 143–155.
- [28] S. Heidrich, H. Weiß, A. Kaschl, Attenuation reactions in a multiple contaminated aquifer in Bitterfeld (Germany), *Environ. Pollut.* **2004**, *129*, 277–288.
- [29] B. Hendrickx, W. Dejonghe, W. Boenne, M. Brennerova, M. V. Cernik, T. Lederer, et al., Dynamics of an oligotrophic bacterial aquifer community during contact with a groundwater plume contaminated with benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes: An in situ mesocosm study, *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 3815–3825.
- [30] J. Hoefs, *Stable Isotope Geochemistry*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg **1997**.
- [31] T. Holscher, R. Krajmalnik-Brown, K. M. Ritalahti, F. von Wintzingerode, H. Gorisch, F. E. Löffler, et al., Multiple nonidentical reductive-dehalogenase-homologous genes are common in *Dehalococcoides*, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 5290–5297.
- [32] D. Hunkeler, R. Aravena, B. J. Butler, Monitoring microbial dechlorination of tetrachloroethene (PCE) in groundwater using compound-specific stable carbon isotope ratios: Microcosm and field studies, *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 2733–2738.
- [33] D. Hunkeler, R. Aravena, E. Cox, Carbon isotopes as a tool to evaluate the origin and fate of vinyl chloride: Laboratory experiments and modeling of isotope evolution, *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 3378–3384.
- [34] A. Kaschl, C. Vogt, S. Uhlig, I. Nijenhuis, H. Weiss, M. Kastner, et al., Isotopic fractionation indicates anaerobic monochlorobenzene biodegradation, *Environ. Toxicol. Chem.* **2005**, *24*, 1315–1324.
- [35] M. Kube, A. Beck, S. H. Zinder, H. Kuhl, R. Reinhardt, L. Adrian, Genome sequence of the chlorinated compound respiring bacterium *Dehalococcoides* species strain CBDB1, *Nature Biotechnol.* **2005**, *23*, 1269–1273.
- [36] B. S. Lollar, G. F. Slater, B. Sleep, M. Witt, G. M. Klecka, M. Harkness, et al., Stable carbon isotope evidence for intrinsic bioremediation of tetrachloroethene and trichloroethene at area 6, Dover Air Force Base, *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 261–269.

- [37] A. I. Lopez-Archilla, E. Gerard, D. Moreira, P. Lopez-Garcia, Macrofilamentous microbial communities in the metal-rich and acidic River Tinto, Spain, *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *235*, 221–228.
- [38] T. Lueders, M. Manefield, M. W. Friedrich, Enhanced sensitivity of DNA- and rRNA-based stable isotope probing by fractionation and quantitative analysis of isopycnic centrifugation gradients, *Environ. Microbiol.* **2004**, *6*, 73–78.
- [39] S. A. Mancini, A. C. Ulrich, G. Lacrampe-Couloume, B. Sleep, E. A. Edwards, B. S. Lollar, Carbon and hydrogen isotopic fractionation during anaerobic biodegradation of benzene, *Appl. Environ. Microbiol.* **2003**, *69*, 191–198.
- [40] M. Manefield, A. S. Whiteley, M. J. Bailey, What can stable isotope probing do for bioremediation? *Internat. Biodeterior. Biodegrad.* **2004**, *54*, 163–166.
- [41] A. Mariotti, J. C. Germon, P. Hubert, P. Kaiser, R. Letolle, A. Tardieux, et al., Experimental determination of nitrogen kinetic isotope fractionation: some principles; illustration for the denitrification and nitrification processes, *Plant Soil* **1981**, *62*, 413–430.
- [42] H. M. Martin, S. Ertl, Personal communication and presentation on the occasion of the *DECHEMA Workshop* 29.30.9.2005 at the FAL, Braunschweig **2005**.
- [43] L. Mauclore, O. Pelz, M. Thullner, W. R. Abraham, J. Zeyer, Assimilation of toluene carbon along a bacteria-protist food chain determined by C-13-enrichment of biomarker fatty acids, *J. Microbiol. Methods* **2003**, *55*, 635–649.
- [44] R. U. Meckenstock, B. Morasch, C. Griebler, H. H. Richnow, Stable isotope fractionation analysis as a tool to monitor biodegradation in contaminated aquifers, *J. Contamin. Hydrol.* **2004**, *75*, 215–255.
- [45] R. U. Meckenstock, B. Morasch, M. Kästner, A. Vieth, H. H. Richnow, Assessment of bacterial degradation of aromatic hydrocarbons in the environment by analysis of stable carbon isotope fractionation, *Water Air Soil Pollut.* **2002**, *2*, 141–152.
- [46] R. U. Meckenstock, B. Morasch, R. Warthmann, B. Schink, E. Annweiler, W. Michaelis, et al., C-13/C-12 isotope fractionation of aromatic hydrocarbons during microbial degradation, *Environ. Microbiol.* **1999**, *1*, 409–414.
- [47] R. U. Meckenstock, M. Safinowski, C. Griebler, Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *FEMS Microbiol. Ecol.* **2004**, *49*, 27–36.
- [48] A. Miltner, H. H. Richnow, F. D. Kopinke, M. Kästner, Assimilation of CO₂ by soil microorganisms and transformation into soil organic matter, *Org. Geochem.* **2004**, *35*, 1015–1024.
- [49] B. Morasch, H. H. Richnow, B. Schink, R. U. Meckenstock, Stable hydrogen and carbon isotope fractionation during microbial toluene degradation: Mechanistic and environmental aspects, *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 4842–4849.
- [50] B. Morasch, H. H. Richnow, B. Schink, A. Vieth, R. U. Meckenstock, Carbon and hydrogen stable isotope fractionation during aerobic bacterial degradation of aromatic hydrocarbons, *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 5191–5194.
- [51] P. L. Morrill, G. Lacrampe-Couloume, G. F. Slater, B. E. Sleep, E. A. Edwards, M. L. McMaster, et al., Quantifying chlorinated ethene degradation during reductive dechlorination at Kelly AFB using stable carbon isotopes, *J. Contam. Hydrol.* **2005**, *76*, 279–293.
- [52] N. N. North, S. L. Dollhopf, L. Petrie, J. D. Istok, D. L. Balkwill, J. E. Kostka, Change in bacterial community structure during in situ biostimulation of subsurface sediment cocontaminated with uranium and nitrate, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 4911–4920.
- [53] A. D. Peacock, Y. J. Chang, J. D. Istok, L. Krumholz, R. Geyer, B. Kinsall, et al., Utilization of microbial biofilms as monitors of bioremediation, *Microb. Ecol.* **2004**, *47*, 284–292.
- [54] O. Pelz, A. Chatzinotas, N. Andersen, S. M. Bernasconi, C. Hesse, W. R. Abraham, et al., Use of isotopic and molecular techniques to link toluene degradation in denitrifying aquifer microcosms to specific microbial populations, *Arch. Microbiol.* **2001**, *175*, 270–281.
- [55] O. Pelz, A. Chatzinotas, A. Zarda-Hess, W. R. Abraham, J. Zeyer, Tracing toluene-assimilating sulfate-reducing bacteria using C-13-incorporation in fatty acids and whole-cell hybridization, *FEMS Microbiol. Ecol.* **2001**, *38*, 123–131.
- [56] A. Peter, A. Steinbach, R. Liedl, T. Ptak, W. Michaelis, G. Teutsch, Assessing microbial degradation of *o*-xylene at field-scale from the reduction in mass flow rate combined with compound-specific isotope analyses, *J. Contam. Hydrol.* **2004**, *71*, 127–154.
- [57] T. M. Phillips, A. G. Seech, H. Lee, J. T. Trevors, Biodegradation of hexachlorocyclohexane (HCH) by microorganisms, *Biodegradation* **2005**, *16*, 363–392.
- [58] S. A. Pombo, O. Pelz, M. H. Schroth, J. Zeyer, Field-scale C-13-labeling of phospholipid fatty acids (PLFA) and dissolved inorganic carbon: Tracing acetate assimilation and mineralization in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer, *FEMS Microbiol. Ecol.* **2002**, *41*, 259–267.
- [59] D. E. Reusser, J. D. Istok, H. R. Beller, J. A. Field, In situ transformation of deuterated toluene and xylene to benzylsuccinic acid analogues in BTEX-contaminated aquifers, *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 4127–4134.
- [60] H. H. Richnow, E. Annweiler, W. Michaelis, R. U. Meckenstock, Microbial in situ degradation of aromatic hydrocarbons in a contaminated aquifer monitored by carbon isotope fractionation, *J. Contamin. Hydrol.* **2003**, *65*, 101–120.
- [61] H. H. Richnow, A. Eschenbach, B. Mahro, M. Kastner, E. Annweiler, R. Seifert, et al., Formation of nonextractable soil residues: A stable isotope approach, *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 3761–3767.
- [62] H. H. Richnow, R. Meckenstock, Isotopen-geochemisches Konzept zur In-situ-Erfassung des biologischen Abbaus in kontaminiertem Grundwasser, *TerraTech* **1999**, 38–41.
- [63] H. H. Richnow, R. U. Meckenstock, L. A. Reitzel, A. Baun, A. Ledin, T. H. Christensen, In situ biodegradation determined by carbon isotope fractionation of aromatic hydrocarbons in an anaerobic landfill leachate plume (Vejen, Denmark), *J. Contamin. Hydrol.* **2003**, *64*, 59–72.
- [64] D. B. Ringelberg, S. Sutton, D. C. White, Biomass, bioactivity and biodiversity: microbial ecology of the deep subsurface: analysis of ester-linked phospholipid fatty acids, *FEMS Microbiol. Rev.* **1997**, *20*, 371–377.
- [65] T. Schiedeck, P. Grathwohl, G. Teutsch, Literaturstudie zum natürlichen Rückhalt/Abbau von Schadstoffen im Grundwasser. Texte und Berichte zur Altlastenbearbeitung 35/37 (Ed: State Agency for Environmental Protection Baden-Württemberg, Karlsruhe, Germany), Vol. 35/37, **1997**.
- [66] M. Schirmer, I. Jones, G. Teutsch, D. N. Lerner, Development and testing of multi-level sock samplers for groundwater, *J. Hydrol.* **1995**, *171*, 239–257.
- [67] A. Schmalenberger, F. Schwieger, C. C. Tebbe, Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small subunit rRNA gene in PCR-based microbial community analyses and genetic profiling, *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 3557–3563.
- [68] I. Schmidt, O. Sliemers, M. Schmid, E. Bock, J. Fuerst, J. G. Kuenen, et al., New concepts of microbial treatment processes for the nitrogen removal in wastewater, *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, *27*, 481–492.
- [69] T. C. Schmidt, L. Zwank, M. Elsner, M. Berg, R. U. Meckenstock, S. B. Haderlein, Compound-specific stable isotope analysis of organic contaminants in natural environments: A critical review of the state of the art, prospects, and future challenges, *Analyt. Bioanalyt. Chem.* **2004**, *378*, 283–300.
- [70] F. Schwieger, C. C. Tebbe, Effect of field inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33 on the composition of bacterial communities in rhizospheres of a target (*Medicago sativa*) and a non-target plant (*Chenopodium album*) – Linking 16S rRNA gene based SSCP-community profiles and diversity of cultivated isolates, *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 3556–3565.
- [71] F. Schwieger, C. C. Tebbe, A new approach to utilize PCR-single-strand conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 4870–4876.
- [72] K. M. Scow, K. A. Hicks, Natural attenuation and enhanced bioremediation of organic contaminants in groundwater, *Current Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 246–253.
- [73] A. M. Spormann, F. Widdel, Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria, *Biodegradation* **2000**, *11*, 85–105.
- [74] L. Y. Stein, G. Jones, B. Alexander, K. Elmund, C. Wright-Jones, K. H. Nealon, Intriguing microbial diversity associated with metal-rich particles from a freshwater reservoir, *FEMS Microbiol. Ecol.* **2002**, *42*, 431–440.
- [75] A. Steinbach, R. Seifert, E. Annweiler, W. Michaelis, Hydrogen and carbon isotope fractionation during anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons – A field study, *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 609–616.
- [76] N. Stelzer, C. Büning, F. Pfeifer, C. C. Tebbe, I. Nijenhuis, M. Kästner, et al., In situ microcosms (BACTRAP) to evaluate natural attenuation potentials in contaminated aquifers, *Org. Geochem.*, submitted **2006**.
- [77] N. Stelzer, A. Fischer, M. Kästner, H. H. Richnow, Analyse des anaeroben In-situ-Benzolabbaus anhand von Mikrokosmen (BACTRAPs) und Isotopenfraktionierungsprozessen, *Grundwasser*, submitted **2006**.
- [78] C. C. Tebbe, A. Schmalenberger, S. Peters, F. Schwieger, Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for microbial community analysis, in *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications* (Ed: P. A. Rochelle), Horizon Scientific Press, Wymondham (UK) **2001**, 161–175.

- [79] V. Thiel, J. Peckmann, H. H. Richnow, U. Luth, J. Reitner, W. Michaelis, Molecular signals for anaerobic methane oxidation in Black Sea seep carbonates and a microbial mat, *Marine Chem.* **2001**, *73*, 97–112.
- [80] *Use of Monitored Natural Attenuation at Superfund, RCRA Corrective Action and Underground Storage Tank Sites* (Ed: U.S.-EPA), Directive Number: 9200.4-17P, **1999**.
- [81] A. C. Ulrich, H. R. Beller, E. A. Edwards, Metabolites detected during biodegradation of C-13(6)-benzene in nitrate-reducing and methanogenic enrichment cultures, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 6681–6691.
- [82] M. H. Van Agteren, S. Keuning, D. B. Janssen, *Handbook on Biodegradation and Biological Treatment of Hazardous Organic Compounds*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht **1998**.
- [83] M. H. A. Van Eekert, N. J. P. Van Ras, G. H. Mentink, H. H. M. Rijnaarts, A. J. M. Stams, F. A. Field, et al., Anaerobic transformation of beta-hexachlorocyclohexane by methanogenic granular sludge and soil microflora, *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 3299–3304.
- [84] J. R. Vestal, D. C. White, Lipid analysis in microbial ecology: Quantitative approaches to the study of microbial communities, *Bioscience* **1989**, *39*, 535–541.
- [85] A. Vieth, M. Kästner, B. Morasch, R. U. Meckenstock, H. H. Richnow, Charakterisierung des biologischen Abbaus von BTEX im Grundwasser über Isotopenfraktionierung-Feldstudien, *TerraTech* **2001**, 37–41.
- [86] A. Vieth, M. Kastner, M. Schirmer, H. Weiss, S. Godeke, R. U. Meckenstock, et al., Monitoring in situ biodegradation of benzene and toluene by stable carbon isotope fractionation, *Environ. Toxicol. Chem.* **2005**, *24*, 51–60.
- [87] A. Vieth, J. Muller, G. Strauch, M. Kastner, M. Gehre, R. U. Meckenstock, et al., In-situ biodegradation of tetrachloroethene and trichloroethene in contaminated aquifers monitored by stable isotope fractionation, *Isotopes Environ. Health Studies* **2003**, *39*, 113–124.
- [88] C. Vogt, D. Simon, A. Alfreider, W. Babel, Microbial degradation of chlorobenzene under oxygen-limited conditions leads to accumulation of 3-chlorocatechol, *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, *23*, 265–270.
- [89] H. Weiß, M. Schirmer, G. Teutsch, P. Merkel, Sanierungsforschung in regional kontaminierten Aquiferen (SAFIRA): 2. Projektübersicht und Pilotanlage, *Grundwasser* **2002**, *3*, 135–139.
- [90] D. C. White, J. S. Gouffon, A. D. Peacock, R. Geyer, A. Biernacki, G. A. Davis, et al., Forensic analysis by comprehensive rapid detection of pathogens and contamination concentrated in biofilms in drinking water systems for water resource protection and management, *Environ. Forensics* **2003**, *4*, 63–74.
- [91] D. C. White, J. O. Stair, D. B. Ringelberg, Quantitative comparisons of in situ microbial biodiversity by signature biomarker analysis, *J. Ind. Microbiol.* **1996**, *17*, 185–196.
- [92] A. S. Whiteley, M. Manefield, T. Lueders, Unlocking the "microbial black box" using RNA-based stable isotope probing technologies, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, *16*, 1–5.
- [93] F. Widdel, R. Rabus, Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 259–276.
- [94] J. Z. Zhou, M. R. Fries, J. C. Cheesanford, J. M. Tiedje, Phylogenetic analyses of a new group of denitrifiers capable of anaerobic growth on toluene and description of *azoarcus-tolulyticus* sp. nov., *Intern. J. Systematic Bacteriol.* **1995**, *45*, 500–506.
- [95] L. Zwank, M. Berg, M. Elsner, T. C. Schmidt, R. P. Schwarzenbach, S. B. Haderlein, New evaluation scheme for two-dimensional isotope analysis to decipher biodegradation processes: Application to groundwater contamination by MTBE, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 1018–1029.

ANHANG F

Supporting Information

A multi-tracer test proving the reliability of stable isotope fractionation analysis for assessing anaerobic degradation in a BTEX contaminated aquifer

Anko Fischer[†], Jana Bauer*, Rainer U. Meckenstock[§], Willibald Stichler[§], Christian Griebler[§],
Piotr Maloszewski[§], Matthias Kästner^{||}, Hans H. Richnow^{†*}

[†]UFZ-Center for Environmental Research Leipzig-Halle, Department of Isotope
Biogeochemistry, Permoserstr. 15, D-04318 Leipzig, Germany

*Research Centre Jülich, Institute of Chemistry and Dynamics of the Geosphere, Agrosphere
Institute, D-52425 Jülich, Germany

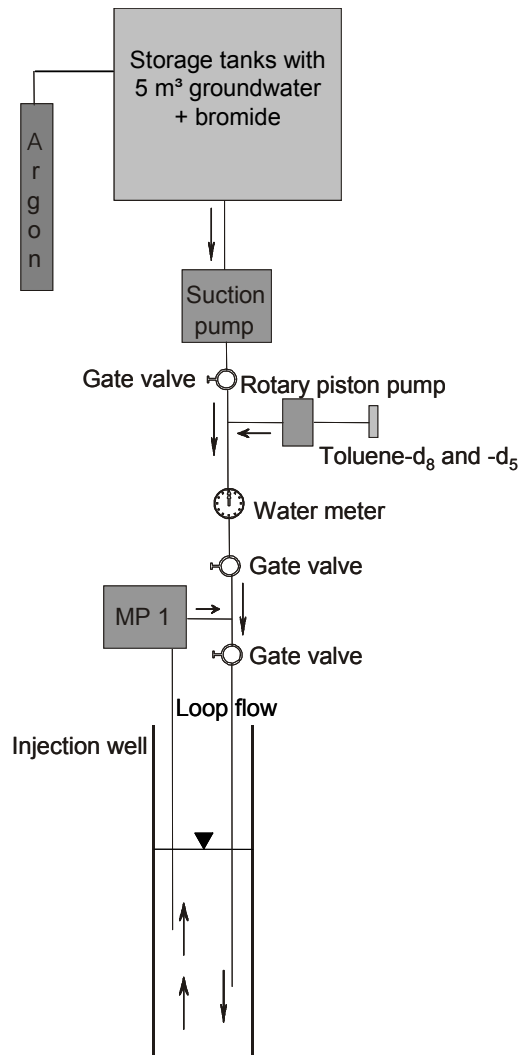
[§]GSF-National Research Center for Environment and Health, Institute of Groundwater
Ecology, Ingolstädter Landstr. 1, D-85764 Neuherberg, Germany

^{||}UFZ-Center for Environmental Research Leipzig-Halle, Department of Bioremediation,
Permoserstr. 15, D-04318 Leipzig, Germany

*Corresponding author: Hans H. Richnow, Phone: ++49-341/235-2810, Fax: ++49-341/235-
2492, E-Mail: hans.richnow@ufz.de

39 **Field Site.** The test site is located in the area of a former benzene plant close to the city of
40 Zeitz (Saxony-Anhalt, Germany). The massive BTEX contamination, especially by benzene
41 and toluene, was mainly caused by several leakages, damages and accidents during the
42 operation of the plant between 1960 and 1990. The hydrogeology of the site is characterized
43 by two aquifers. The upper aquifer is composed of a 2 to 10 m thick layer of sand and gravel
44 deposits of Quaternary and Tertiary age. The lower aquifer consists of sand and gravel
45 deposited by an Eocene river. The aquifers are largely separated by a silt and clay layer of
46 Tertiary age and partly by a lignite seam. The general groundwater flow direction is to the
47 north-northeast (1-3). In the nearby source area, the BTEX concentration can exceed 900
48 mg L⁻¹ (Fig. 1). The dominant contaminants are benzene and toluene with concentrations up
49 to 850 mg L⁻¹ and 50 mg L⁻¹, respectively. Ethylbenzene and xylenes are only present in
50 minor concentrations below 3 mg L⁻¹. At the test site, the predominant electron acceptor was
51 sulfate (1-3). In addition, methanogenesis accounted for minor microbial BTEX-
52 transformation in the BTEX plume but was more significant in the source area (1). Other
53 electron acceptors such as oxygen, nitrate and ferrous iron played only a marginal role in
54 biodegradation processes at the site (1-3). The strong decrease of toluene concentration with
55 distance from the source zone along the main groundwater flow direction was shown to be
56 linked with biodegradation (3).

57 **Tracer injection.** The injection of the tracer solution was started after the groundwater table
58 had reached the initial level. The extracted groundwater was pumped (Gardena, Germany)
59 continuously into the aquifer (Fig. 1). The mixture of toluene-d₅ and 205 g toluene-d₈ was
60 added as tiny drops to the water stream via a self-made orifice. The addition rate of
61 deuterated toluene was controlled by a rotary piston pump (ISMATEC, Switzerland).
62 Previous tests had shown that this technique largely avoids the formation of toluene droplets
63 and thus results in an almost total dissolution of toluene in the water phase. The
64 groundwater/tracer solution was injected via a loop flow at a depth of 12.50 m below ground
65 in well Saf Zz 8/99 (Fig. 1). The loop flow was maintained by a submersible electrical pump
66 (MP1, Grundfos, Denmark) and served to mix the tracers within the well.



67
68 Figure 1. Schematic illustration of the equipment used for the tracer injection.

69

70 **Sample analysis.** All samples were transported and stored at 4 °C in darkness until further
 71 analysis. For the analysis of toluene-d₅ and toluene-d₈, 250 ml brown glass bottles were filled
 72 with groundwater and closed without headspace by a glass plug. Later, 10 mL of sample was
 73 filled into a 20 mL vial and capped gastight after the addition of chlorobenzene as an internal
 74 standard. A gas chromatograph (GC 6890; Agilent Technology, USA) connected with a mass
 75 spectrometer (MS 5973; Agilent Technology, USA) was employed for the determination of
 76 the concentrations of the deuterated toluene species. The GC was equipped with a DB-624
 77 GC column (30 m x 0.25 mm x 1.4 µm; Agilent J&W Scientific, USA). Helium was used as
 78 carrier with a flow rate of 1 mL min⁻¹. The oven temperature program started at 40 °C, held
 79 for 1 min and then increased with a rate of 8 °C min⁻¹ to 130 °C and held for 5 min. The
 80 detection limit of this method was 0.1 µg L⁻¹.

81 To determine the concentration of bromide, 20 ml groundwater samples were filled into
82 polyethylene bottles and capped by a screw plug. The bromide concentration was analyzed
83 using an ion chromatograph equipped with a pre-column (AG 11; 4 x 250 mm; Dionex, USA)
84 and a guard column (IonPac AS 11; 4 x 50 mm; Dionex, USA). The ion chromatograph was
85 connected with an anion self-regenerating suppressor (ASRS-1; Dionex, USA) and an
86 electrical conductivity detector (CD 20; Dionex, USA). Compounds in the sample were
87 separated by changes of sodium hydroxide concentrations in the eluent. After sample
88 injection, the sodium hydroxide concentration of 0.5 mM was held constant for 3.5 min and
89 subsequently increased to 5 mM within 3.5 min and then to 38.25 mM within 8 min. The flow
90 rate of the sodium hydroxide eluent was 2 mL min⁻¹. The working range for the analyses of
91 bromide was 0.5 to 10 mg L⁻¹. Due to the high bromide concentrations, some samples were
92 diluted tenfold (1:10) before analysis.

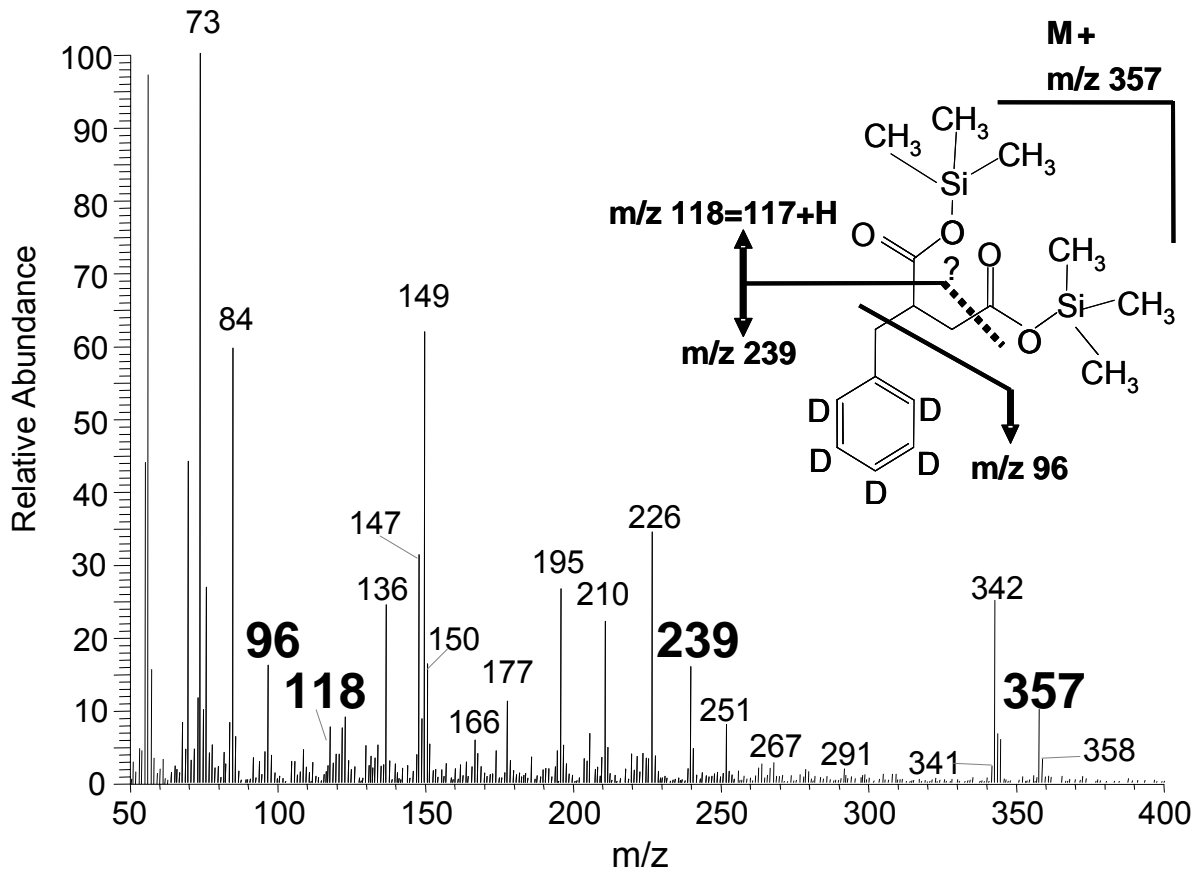
93 Water samples for analysis of hydrogen isotope signatures of groundwater were collected
94 in 15 ml vials without headspace. Before sampling, approximately 1.5 g activated carbon
95 (A.U.G.-Neue Aktivkohle und Umweltschutztechnik GmbH & Co. KG, Germany) was added
96 in order to completely adsorb the deuterated toluene species and organic pollutants which
97 could affect the analysis of the hydrogen isotope signature of the water. Stable isotope ratios
98 of hydrogen in groundwater samples were determined with isotope ratio mass spectrometers
99 (IRMS) using standard routines (4,5) and are expressed by the δ -notation. The
100 measurements of hydrogen isotope ratios were performed with a modified IRMS MAT Delta
101 S (Thermo Electron Corporation, Germany) after reduction of the water samples on uranium
102 metal at 800 °C. The precision of the δ D-measurements was ± 1 ‰.

103 For the analysis of deuterated metabolites, 1 L glass bottles were filled with groundwater
104 and closed without headspace by Teflon-coated screw plugs. Microbial activity was inhibited
105 by increase of the pH-value by means of the addition of 1 g sodium hydroxide pellets.
106 Detection and identification of metabolites from degradation of toluene-d₅ and toluene-d₈ in
107 groundwater samples were performed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).
108 Samples to which sodium hydroxide had been added were acidified with hydrochloric acid

109 (37%, Merck, Germany) to $\text{pH} \leq 2$ and extracted twice with 50 mL of diethyl ether (Merck,
110 Germany). The extracts were combined and dried with anhydrous sodium sulfate. The liquid
111 phase was then transferred into a vial and the solvent was concentrated with a vacuum
112 rotary-evaporator to a final volume of about 1 mL and subsequently dried under a continuous
113 nitrogen gas stream. The residue was dissolved in 500 μL cyclohexane (Merck, Germany).
114 For silylation, 500 μL *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA, Sigma-Aldrich,
115 Germany) was added and the mixture was allowed to react at 60 °C for 5 hours in order to
116 convert carboxylic acids to the trimethylsilylesters. The solution was then dried under a
117 continuous nitrogen stream and dissolved in 1 mL cyclohexane (Merck, Germany) for
118 subsequent GC-MS analysis (Finnigan GC-ultra gas chromatograph coupled with a Finnigan
119 Trace DSQ mass spectrometer, Thermo Electron Corporation, Germany). A fused silica
120 capillary column (DB-5MS film thickness: 0.25 μm ; inner diameter: 0.2 mm; length: 30 m;
121 Agilent J&W Scientific, USA) was used for separation of target compounds. Samples were
122 injected in the splitless mode; the flow rate of the carrier gas (He) was 0.9 mL min^{-1} . The
123 oven temperature was held at 43°C for 5 min, then increased at a rate of 4 °C min^{-1} to 280 °C
124 and held for 5 min. The MS was operated in scan mode and acquired data from 29 to 500
125 mass units (m/z). The detection limit for the silylated authentic standard of benzylsuccinic
126 acid- d_5 was 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Metabolites were identified by comparison with published mass
127 spectra and co-injection of authentic reference compounds.

128 **Detection of toluene metabolites.** Under anoxic conditions, benzylsuccinic acid (BSA) is
129 the first intermediate in toluene degradation (6-8). BSA has been detected in samples from a
130 number of petroleum hydrocarbon contaminated aquifers (9-13). The identification of
131 benzylsuccinic acid- d_5 provided evidence for the anaerobic microbial transformation of
132 toluene- d_5 (Fig. 2). Mass fragments m/z 96, 239, 357 indicate that the benzene ring is
133 completely labeled by deuterium. Mass fragment m/z 239 suggests the cleavage of a
134 silylated carboxygroup and the mass 118 indicates a rearrangement of a hydrogen atom
135 abstracted by one of the silylated carboxygroups. A further central metabolite in the
136 anaerobic degradation of alkylbenzenes is benzoic acid (10). However, benzoic acid- d_5 was

137 not found in our samples, probably as a result of low concentrations and the relatively high
 138 analytical detection limits for benzoic acid.
 139



140
 141 Figure 2. Mass spectra of silylated benzylsuccinic acid-d₅ obtained from a groundwater
 142 sample.

143
 144 **Tracer broadening.** Along the first control plane, bromide and the deuterated toluene
 145 species were detected at the sampling points G 4, G 444, G 466, G 483 and Saf Zz 48/02
 146 (Tab. 1). No tracers were found in G 5. The maximum tracer concentrations arrived at the
 147 first control plane approximately 10 days after the tracer injection (Fig 3A). The center of the
 148 tracer cloud passed through the first control plane near sampling point G 466 (Tab. 1). The
 149 groundwater flow velocity for each sampling point was estimated by the method of moments
 150 (14,15) (Tab. 1). For the first control plane, groundwater flow velocities of 2.2 m d⁻¹ in the
 151 upper part of the aquifer (P1), 3.0 m d⁻¹ within the middle part (P2) and 1.7 m d⁻¹ within the
 152 lower part (P3) were determined.

153 At the second control plane, all tracers were found at the sampling points G 181, G 182, G
154 183 and G 184, but only the deuterated toluene and no bromide was detected within Saf Zz
155 18/00 (Tab. 1). The maximum tracer concentrations were found at the second control plane
156 approximately 30 days after the tracer injection (Fig. 3A). The groundwater flow velocities
157 ranged between 1.2 and 1.8 m d⁻¹ within the middle part of the aquifer (Tab. 1).
158

159 Table 1. Characterization of the tracer broadening at sampling points of the first and second control planes. G - sampling point installed by direct
 160 push technique, Saf Zz - monitoring well, MLS - multi-level-system, n.d. - not detected; n.a. - not applicable because of insufficient recorded
 161 breakthrough curves.

162
 163

Control plane	Sampling point	Sampled depth [m above sea level]	Manner of sampling	Estimated groundwater flow velocity [m d ⁻¹]	Maximum tracer concentration			Retardation factor	
					Bromide [mg L ⁻¹]	Toluene-d ₈ [µg L ⁻¹]	Toluene-d ₅ [µg L ⁻¹]	Toluene-d ₈	Toluene-d ₅
1	G 4	136.7 (P2)	MLS	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.
		136.3 (P2)		n.a.	42.1	1.1	0.8	n.a.	n.a.
	Saf Zz 48/02	137.2 (P1)	Pump	n.a.	136.1	1887	1636	n.a.	n.a.
	G 444	137.4 (P1)	MLS	2.2	2.5	50.9	37.6	1.00	1.00
		135.9 (P2)		3.0	107.2	2149	1957	1.01	1.01
	G 466	136.5 (P2)	MLS	3.0	133.1	2513	2265	1.00	1.00
		135.0 (P3)		1.7	48.2	1018	921	1.08	1.08
	G 483	137.5 (P1)	MLS	n.a.	5.4	52.4	31.9	n.a.	n.a.
	G 5	137.2 (P1)	MLS	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.
		136.7 (P2)		n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.a.	n.a.
2	G 181	135.9 (P2)	MLS	1.2	97.9	2101	1799	1.00	1.00
	G 182	135.9 (P2)	MLS	1.7	100.5	1904	1662	1.01	1.01
		134.4 (P3)		n.a.	39.9	834	703	n.a.	n.a.
	G 183	137.5 (P1)	MLS	n.a.	5.7	48.3	38.4	n.a.	n.a.
		136.0 (P2)		1.8	96.9	1049	875	1.01	1.01
		134.5 (P3)		n.a.	57.4	1329	965	n.a.	n.a.
	G184	136.0 (P2)	MLS	1.7	34.9	468	357	1.00	1.00
		134.5 (P3)		n.a.	26.1	581	419	n.a.	n.a.
	Saf Zz 18/00	135.7 (P2)	Pump	n.a.	n.d.	431	409	n.a.	n.a.

Literature Cited

- (1) Fischer, A.; Vieth, A.; Knöller, K.; Wachter, T.; Dahmke, A.; Richnow, H.-H. Charakterisierung des mikrobiellen Schadstoffabbaus mit Hilfe von isotopenchemischen Methoden. *Grundwasser*. **2004**, 9, 159-172.
- (2) Gödeke, S.; Weiß, H.; Geistlinger, H.; Fischer, A.; Richnow, H.-H.; Schirmer, M. Strömungs- und Tracer-Transportmodellierung am Natural Attenuation-Standort Zeitz. *Grundwasser*. **2004**, 9, 3-11.
- (3) Vieth, A.; Kästner, M.; Schirmer, M.; Weiss, H.; Gödeke, S.; Meckenstock, R. U.; Richnow, H. H. Monitoring in situ biodegradation of benzene and toluene by stable carbon isotope fractionation. *Environ. Toxicol. Chem.* **2005**, 24, 51-60.
- (4) Moser, H.; Rauert, W. *Isotopenmethoden in der Hydrologie*; Gebrüder Borntraeger: Berlin-Stuttgart, 1980.
- (5) IAEA *Guidebook on Nuclear Techniques in Hydrology*; 1983 Edition ed.; IAEA: Vienna, 1983; 91.
- (6) Heider, J.; Spormann, A. M.; Beller, H. R.; Widdel, F. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *Fems Microbiol. Rev.* **1998**, 22, 459-473.
- (7) Spormann, A. M.; Widdel, F. Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation*. **2000**, 11, 85-105.
- (8) Widdel, F.; Rabus, R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Curr. Opin. Biotech.* **2001**, 12, 259-276.
- (9) Alumbaugh, R. E.; Gieg, L. M.; Field, J. A. Determination of alkylbenzene metabolites in groundwater by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. **2004**, 1042, 89-97.
- (10) Beller, H. R. Metabolic indicators for detecting *in situ* anaerobic alkylbenzene degradation. *Biodegradation*. **2000**, 11, 125-139.
- (11) Beller, H. R. Analysis of benzylsuccinates in groundwater by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its use for monitoring *in situ* BTEX biodegradation. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, 36, 2724-2728.
- (12) Beller, H. R.; Ding, W.-H.; Reinhard, M. Byproducts of anaerobic alkylbenzene metabolism useful as indicators of *in situ* bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* **1995**, 29, 2864-2870.
- (13) Reusser, D. E.; Field, J. A. Determination of benzylsuccinic groundwater by solid-phase acid in gasoline-contaminated extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. **2002**, 953, 215-225.
- (14) Maloszewski, P.; Zuber, A. On the parameter estimation from artificial tracer experiments. In *ModelCARE 90: Calibration and Reliability in Groundwater Modelling*; Kovar, K., Ed.; IAHS Pub., 1990; Vol. 195, pp 53-62.
- (15) Maloszewski, P.; Zuber, A. On the calibration and validation of mathematical models for the interpretation of tracer experiments in groundwater. *Adv. Water Resour.* **1992**, 15, 47-62.

ANHANG G

1 **Supporting Information**

2
3
4 **Applicability of stable isotope fractionation analysis for the characterization of**
5 **benzene biodegradation in a BTEX-contaminated aquifer**
6

7
8 Anko Fischer[†], Katja Theuerkorn[†], Nicole Stelzer[†], Matthias Gehre[†], Martin Thullner[§], Hans
9 H. Richnow^{†*}

10
11
12 UFZ-Centre for Environmental Research Leipzig-Halle, [†]Department of Isotope
13 Biogeochemistry and [§]Department of Environmental Microbiology, Permoserstr. 15, D-04318
14 Leipzig, Germany

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24 *Corresponding author: Hans H. Richnow, Phone: ++49-341/235-2810, Fax: ++49-341/235-
25 2492, E-Mail: hans.richnow@ufz.de

26
27

27 **Field site**

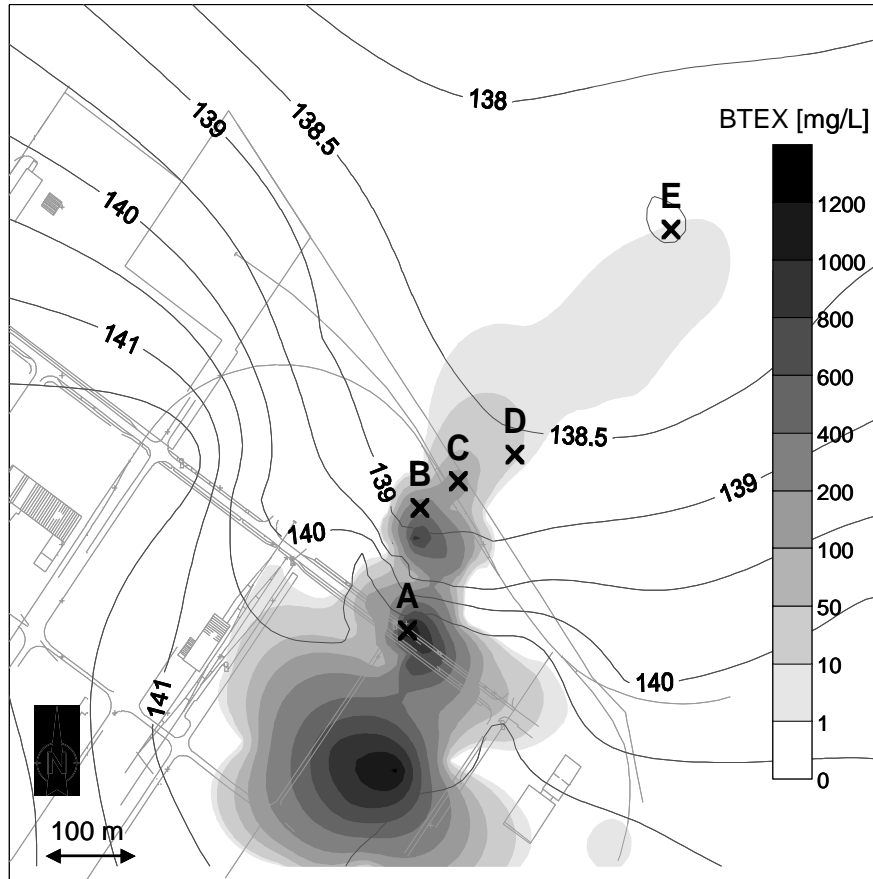
28 The investigated field site is located in the area of a former hydrogenation plant close to the
29 city of Zeitz (Saxony-Anhalt, Germany). The hydrogenation plant was founded in 1938 to
30 produce gasoline and lubricants. At the end of the Second World War it was largely
31 destroyed, leading to the entry of large volumes of raw materials as well as industrial goods
32 into the subsurface. During the existence of the former German Democratic Republic (GDR),
33 parts of the production facilities were reconstructed and later expanded with new plant
34 sectors. Benzene production at the test site lasted from 1963 to 1990. After the re-unification
35 of Germany in 1990 the plant was shut down because the production was no longer
36 economically feasible. Consequently, all facilities were demolished and removed (1,2).

37 At the site two main heterogeneous aquifers can be distinguished, separated by a
38 discontinuous lignite-clay layer of Tertiary age. The upper aquifer is composed of a 2 to 10 m
39 thick layer of Quaternary and Tertiary sand and gravel deposits. The lower aquifer, with a
40 thickness of 12 to 20 m, consists of sand and gravel deposited by an Eocene river. The
41 general groundwater flow direction is to the north-northeast. The two aquifers have an
42 organic carbon content of approximately 0.1 % ($f_{oc} = 0.001$) and a mean effective porosity of
43 approximately 0.22. The water table varies between 8 and 10 m below ground surface (bgs)
44 depending on the time of year and the location (1,2).

45 In the near-source areas of the upper aquifer, the BTEX concentration can exceed 900
46 mg/L. The dominant contaminants are benzene and toluene with concentrations up to 850
47 mg/L and 50 mg/L, respectively. Ethylbenzene and xylenes are only present in minor
48 concentrations below 3 mg/L. In the lower aquifer the highest BTEX concentrations,
49 consisting mainly of benzene, are approximately 150 mg/L. At the test site, the predominant
50 electron acceptor is sulphate (1,3,4). In addition, methanogenesis leads to minor microbial
51 BTEX transformation in the contaminant plume but is more significant in the source area (3).
52 Other electron acceptors such as oxygen, nitrate and ferrous iron play only a marginal role in
53 biodegradation processes at the site (1,3,4). For hydrochemical and isotopic analyses,
54 groundwater samples were taken at several multi-level sampling wells (A, B, C, D, E) along a

55 transect in the upper aquifer extending from a source area to the fringe of the contaminant
56 plume following the main groundwater flow direction (Fig. 1).

57



58

59 Figure 1. Map of the Zeitz field site showing the BTEX plume within the upper aquifer with
60 the sampling wells of the investigated aquifer transect and groundwater table contour
61 lines.

62

63 **Chemicals**

64 The chemicals were obtained in reagent quality from Merck (Germany) unless otherwise
65 stated.

66

67 **Sampling**

68 For hydrochemical and isotopic analyses, groundwater samples were taken along a transect
69 in the upper aquifer extending from the source area to the fringe of the contaminant plume

70 along the main groundwater flow direction. Groundwater samples from the source area were
71 collected by using submersible electrical pumps (MP1, Grundfos, Denmark) according to
72 good sampling practice (5). The other wells were equipped with a multilevel packer system
73 for vertical sampling of the contaminant plume (6). Small gas-driven double-valve-pumps
74 (IMW-Innovative Measurement Technology Weiss, Germany) installed every 0.7 to 1.4 m
75 were used with pumping rates up to 0.05 L/min to collect groundwater samples.

76 For the analysis of benzene isotope signatures, groundwater was filled into 1 L Duran[®]
77 glass bottles sealed with Teflon[®]-coated caps (Schott, Germany) without headspace, thus
78 avoiding evaporation. The water samples were adjusted to pH 10 to 12 using sodium
79 hydroxide pellets to inhibit microbial activity. Water samples for BTEX concentrations
80 analyses were collected in 100 mL brown glass flasks without headspace and sealed with
81 glass stoppers. The samples were conserved by 1 mL sulphuric acid. For the analysis of
82 sulphate and nitrate concentrations, groundwater was filled into 20 mL polyethylene bottles.
83 To determine the iron concentration in groundwater, samples were collected in 20 mL
84 polyethylene bottles. For conservation of the samples, the groundwater was adjusted to pH <
85 2 using nitric acid. Water samples for hydrogen carbonate analysis were collected in 250 mL
86 polyethylene bottles. For the analysis of methane concentrations, 20 mL headspace vials
87 were filled with groundwater and sealed with gas-tight caps. All samples were stored in the
88 dark and at 4 °C.

89

90

90 **Analytical Methods**

91 For the analysis of carbon and hydrogen isotope signatures of benzene, the groundwater
92 samples were extracted with 1 or 2 mL *n*-pentane, depending on benzene concentration.
93 After shaking the bottles at least for 4 h at 20 °C the samples were cooled down to 4 °C in
94 order to avoid evaporation effects during subsequent removal of the *n*-pentane phase which
95 in each case was filled into a 5 mL glass vial and sealed with a Teflon[®]-coated cap. Solvent
96 extraction is considered not to affect the isotope signature of BTEX (7). To avoid evaporation
97 effects the vials were stored on their heads at 4 °C until the analysis. The carbon and
98 hydrogen isotope signatures of benzene were determined using two independent gas
99 chromatography isotope ratio mass spectrometry (GC IRMS) systems. Each system
100 consisted of a HP 6890 Series gas chromatograph (Agilent Technology, USA) into which
101 aliquots of the *n*-pentane extract was injected via an AS Combi Pal auto sampler
102 (Chromtech, Germany). The injector temperature was set at 250 °C. Benzene was separated
103 from other groundwater compounds by a ZB-1 capillary column (60 m x 0.32 mm ID x 1 µm
104 FD; Phenomenex, Inc. Torrance, USA). The temperature program started at 40 °C, was held
105 for 5 min isothermally, was increased at a rate of 3 °C/min to 90 °C where it was held for 2
106 min, then was increased at 20 °C/min to 300 °C. Helium was used as carrier gas with a flow
107 rate of 2.0 mL/min for carbon isotope ratio analysis and 1.4 mL/min for hydrogen isotope
108 ratio analysis. After the separation, the benzene was transferred to a combustion furnace
109 (MAT GC-III, Thermo Electron, Germany) for carbon isotope ratio analysis where it was
110 converted at 980 °C on a CuO/Ni-catalyst to carbon dioxide and water. The water was
111 separated via a Nafion[®] membrane (50 cm long, T = 0 °C, DuPont, USA). For the hydrogen
112 isotope ratio analysis, the benzene was transferred to a pyrolysis device (GC-pyrolysis,
113 Thermo Electron, Germany) consisting of a ceramic tube where the benzene was converted
114 at 1400 °C to molecular hydrogen and graphite. The pyrolysis device was oxidized daily to
115 remove the graphite remaining in the ceramic tube. After the conversion of the benzene,
116 carbon dioxide and hydrogen were transferred on-line to a MAT 252 and 253 mass
117 spectrometer (Thermo Electron, Germany), respectively, in order to determine the

118 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^2\text{H}/^1\text{H}$ ratios which were representative for the analogue benzene.
119 Because the formation of H_3^+ ions contributes to the $^2\text{H}/^1\text{H}$ signal, it was adjusted by a
120 correction factor. The GC IRMS systems were calibrated using gases (CO_2 and H_2) with
121 known isotope composition. The isotope composition of gases were determined by means of
122 International Atomic Energy Agency (IAEA) reference materials (8) using elemental analysis.
123 The carbon and hydrogen isotope ratios were expressed in the delta notation ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^2\text{H}$)
124 in per mil [‰] units according to Equation 1. All samples were measured in at least 3
125 replicates. The standard deviation of the single measurements of the $\delta^{13}\text{C}$ values was always
126 better than ± 0.5 ‰ and for the $\delta^2\text{H}$ values always better than ± 10 ‰.

127

$$128 \quad \delta^{13}\text{C}_{\text{sample}} \quad \text{or} \quad \delta^2\text{H}_{\text{sample}} \text{ [‰]} = \left(\frac{R_{\text{sample}} - R_{\text{standard}}}{R_{\text{standard}}} \right) \cdot 1000 \quad (1)$$

129

130 In Equation 1, R_{sample} and R_{standard} are the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -ratios or $^2\text{H}/^1\text{H}$ -ratios of the sample and an
131 international standard, respectively. Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) was used as the
132 standard for the analysis of carbon isotope signature and Vienna Standard Mean Ocean
133 Water (VSMOW) was used as the standard for the detection of hydrogen isotope ratios (8).

134 Concentrations of benzene were determined with a gas chromatograph (Perkin-Elmer,
135 USA) equipped with a flame ionization detector. The samples were injected via a headspace
136 auto-sampler (HS 40, Perkin-Elmer, USA). Headspace sample vials were kept at 80 °C for at
137 least 40 min. The headspace samples were transferred into the injector held at 169 °C in
138 split-mode. Benzene was separated from other groundwater compounds by a capillary
139 column (DBVRX, 75 m x 0.45 mm ID x 2.5 µm FD, Restek, Germany). The temperature
140 program started at 33 °C and was held for 5 min isothermally, then increased at 6 °C/min to
141 200 °C and at 12 °C/min to 240 °C where it remained for 5 min isothermally. Helium was
142 used as the carrier gas. The detection limit of the GC analysis was 2 µg/L for benzene.

143 Ion chromatography was used to detect sulphate and nitrate concentrations. The ion
144 chromatograph (DX 500, Dionex, USA) was equipped with an auto-sampler (AS 3500,

145 Dionex, USA), a gradient pump (GP 40, Dionex, USA) and a conductivity detector (CD20,
146 Dionex, USA). The analytes were separated using an anion exchange guard column (IonPac
147 AG11, 4 mm x 50 mm, Dionex, USA) in series with the analytical column (Ion Pac AS11, 4
148 mm x 250 mm, Dionex, USA) and a H₂O/NaOH gradient as eluent. Where necessary,
149 samples were diluted to the appropriate concentration with deionized water. The detection
150 limit for sulphate was 1.1 mg/L and for nitrate 0.28 mg/L.

151 Iron concentrations were detected via inductive coupled plasma-atomic emission
152 spectroscopy (ICP-AES). Samples were injected via a pneumatic atomizer into the inductive
153 coupled plasma of the ICP-AES system (CIROS^{CCD}, Spectro Analytical Instruments, USA)
154 which had a temperature of 6000 to 8000 °C. At these temperatures, the elements in the
155 sample are ionized leading to the release of radiation with an element-specific wavelength.
156 Since the intensity of the radiation at these wavelengths is proportional to the concentration
157 of the respective element, quantitative information could be obtained about the amount of
158 iron in the groundwater sample. The detection limit for iron was 0.05 mg/L.

159 Hydrogen carbonate concentrations were analyzed via titration with hydrochloric acid to
160 pH 4.3. The pH values were controlled by a pH-electrode (WTW, Weilheim, Germany). At the
161 transition point of pH 4.3 the amount of hydrochloric acid added was used to calculate the
162 hydrogen carbonate concentrations. The detection limit for hydrogen carbonate
163 concentration was 0.1 mg/L.

164 Methane concentrations were determined by means of a GC system (GC-System XL,
165 Perkin Elmer, USA) equipped with a thermal conductivity detector. The samples were
166 transferred via an auto-sampler into the injector of the GC system at a temperature of 145
167 °C. The analytes were separated by a Poraplot-Q-HT column (30 m x 0,53 mm ID,
168 Chrompack, Netherlands) adjusted at 20 °C isothermally. Helium was used as the carrier
169 gas. The detection limit for methane concentration was 0.2 mg/L.

170

171

171 **Rayleigh equation-based approach for quantifying pollutant biodegradation**

172 For the description of isotope fractionation of biochemical reactions the Rayleigh equation
173 can be used (9):

174

175
$$\frac{R_t}{R_0} = \left(\frac{C_t}{C_0} \right)^{\frac{\epsilon}{1000}} \quad (2)$$

176

177 where R_t and R_0 are the stable isotope ratios of a compound at a given point in time and at
178 the beginning of a transformation reaction, respectively. C_t and C_0 are the concentrations of a
179 compound at the given point in time and at the beginning of the transformation reaction,
180 respectively. The enrichment factor (ϵ [‰]) provides the link between the changes in stable
181 isotope ratios (R_t/R_0) and the changes in the concentrations (C_t/C_0).

182 For the quantification of benzene biodegradation, three scenarios were considered: 1)
183 biodegradation occurring before a non-isotope-fractionating process takes place, 2) a non-
184 isotope-fractionating process occurring first, followed by biodegradation, and 3) both
185 processes taking place simultaneously along a groundwater flow path between contaminant
186 source and a sampling point.

187 For the first scenario, biodegradation of benzene (B [%]) can be quantified according to
188 the conventional Rayleigh equation-streamline approach (10):

189

190
$$B[\%] = (1 - f_x) \cdot 100 = \left[1 - \left(\frac{R_x}{R_0} \right)^{\left(\frac{1000}{\epsilon} \right)} \right] \cdot 100 \quad (3)$$

191

192 where R_x/R_0 is the change in isotope signature of the contaminant and f_x is the decrease in
193 the pollutant concentration due to biodegradation along a flow path between a contaminant
194 source and a sampling well ($f_x = C_{B_x}/C_0$, where C_{B_x} is the expected pollutant concentration at
195 a sampling point resulting only from biodegradation), respectively.

196 For the second scenario it was assumed that a non-isotope-fractionating process occurs
 197 first, after the end of which biodegradation begins. Assuming that at the transition from the
 198 non-isotope-fractionating process to biodegradation the pollutant concentration is given as C_d
 199 $= h_d \cdot C_0$ (where h_d is the factor of decrease in pollutant concentration due to the non-isotope-
 200 fractionating process) and that the isotope ratio at the transition point is $R_d = R_0$, the Rayleigh
 201 equation can be used to calculate changes in pollutant concentrations caused by
 202 biodegradation along a streamline:

203

$$204 \quad \frac{C_x}{C_d} = \left(\frac{R_x}{R_d} \right)^{\frac{1000}{\epsilon}} = \left(\frac{R_x}{R_0} \right)^{\frac{1000}{\epsilon}} \quad (4)$$

205

206 The overall changes in pollutant concentrations ($F_x = C_x/C_0$) along a flow path between a
 207 contaminant source and a sampling well can be expressed as:

208

$$209 \quad F_x = \frac{\left(\left(\frac{R_x}{R_0} \right)^{\frac{1000}{\epsilon}} \cdot C_d \right)}{C_0} = \frac{\left(\left(\frac{R_x}{R_0} \right)^{\frac{1000}{\epsilon}} \cdot h_d \cdot C_0 \right)}{C_0} = \left(\left(\frac{R_x}{R_0} \right)^{\frac{1000}{\epsilon}} \right) \cdot h_d \quad (5)$$

210

211 The percentage of biodegradation (B [%]) is then given as:

212

$$213 \quad B[\%] = \left(\frac{C_d - C_x}{C_0} \right) \cdot 100 = \left(\frac{h_d \cdot C_0 - h_d \cdot \left(\left(\frac{R_x}{R_0} \right)^{\frac{1000}{\epsilon}} \cdot C_0 \right)}{C_0} \right) \cdot 100 = \left(h_d \cdot \left(1 - \left(\frac{R_x}{R_0} \right)^{\frac{1000}{\epsilon}} \right) \right) \cdot 100$$

214 (6)

215

216 or

217

$$B[\%] = \left(\frac{F_x}{\left(\frac{R_x}{R_0}\right)^{\left(\frac{1000}{\epsilon}\right)}} \cdot \left(1 - \left(\frac{R_x}{R_0}\right)^{\left(\frac{1000}{\epsilon}\right)} \right) \right) \cdot 100 \quad (7)$$

219

220 In third scenario, biodegradation and a non-isotope-fractionating process occur
221 simultaneously along a flow path between a contaminant source and a sampling well.
222 Assuming that both processes follow first order kinetics, rates of biodegradation and a non-
223 isotope-fractionating process (r_b and r_n , respectively) are given by:

224

$$r_b = \mu \cdot C \quad (8)$$

226

227 and

228

$$r_n = \beta \cdot C \quad (9)$$

230

231 with C as concentration of a pollutant, μ and β as rate constants of biodegradation and a
232 non-isotope-fractionating process, respectively. Additionally, a constant transport velocity (v)
233 was assumed which allows pollutant concentration resulting from the influence of
234 biodegradation and a non-isotope-fractionating process over the distance from the source to
235 a sampling point (x) to be expressed as follows:

236

$$C_x = C_0 \cdot \exp\left(-[\mu + \beta] \cdot \frac{x}{v}\right). \quad (10)$$

238

239 The overall changes in pollutant concentrations along the flow path between source and a
240 sampling point can be derived from Equation 10:

241

$$242 \quad F_x = \exp\left(-[\mu + \beta] \cdot \frac{x}{v}\right). \quad (11)$$

243

244 The carbon isotope ratio of a pollutant at a sampling point can be described by the following
245 expression:

246

$$247 \quad R_x = \frac{{}^{13}\text{C}_x}{{}^{12}\text{C}_x} = \frac{{}^{13}\text{C}_0}{{}^{12}\text{C}_0} \cdot \exp\left(-[\mu_{13} + \beta_{13}] \cdot \frac{x}{v} + [\mu_{12} + \beta_{12}] \cdot \frac{x}{v}\right) \quad (12)$$

248

249 where ${}^{13}\text{C}$ and ${}^{12}\text{C}$ are the concentrations of carbon with mass 13 and 12 for a pollutant. μ_{12}
250 and β_{12} are the rate constants of biodegradation and a non-isotope-fractionating process for
251 carbon with mass 12. μ_{13} and β_{13} are the rate constants of biodegradation and a non-isotope-
252 fractionating process for carbon with mass 13. Since kinetic isotope fractionation factors for
253 biodegradation can be determined by rate constants ($\alpha = \mu_{13}/\mu_{12}$) (9), Equation 12 can be
254 rearranged to:

255

$$256 \quad R_x = R_0 \cdot \exp\left(-\mu_{12} \cdot \left[\frac{\varepsilon}{1000}\right] \cdot \frac{x}{v}\right) \approx R_0 \cdot \exp\left(-\mu \cdot \left[\frac{\varepsilon}{1000}\right] \cdot \frac{x}{v}\right) = R_0 \cdot \left[\exp\left(-\mu \cdot \frac{x}{v}\right)\right]^{\frac{\varepsilon}{1000}}$$

257 (13)

258

259 with the assumption that that ${}^{13}\text{C} \ll {}^{12}\text{C}$, which is justified for natural conditions (${}^{12}\text{C}$
260 approximately 99% of total C). This leads to:

261

$$262 \quad \frac{R_x}{R_0} = \left[\exp\left(-\mu \cdot \frac{x}{v}\right)\right]^{\frac{\varepsilon}{1000}} \quad (14)$$

263

264 The percentage of biodegradation (B [%]) along the flow path between source and a
265 sampling point is given by:

266

$$267 \quad B[\%] = \frac{\int_0^{t_x} r_b d\tau}{C_0} \cdot 100 = \frac{1}{v} \cdot \frac{\int_0^x r_b d\zeta}{C_0} \cdot 100 = \frac{1}{v} \cdot \frac{\mu}{\mu + \beta} \cdot C_0 \cdot v \cdot \left(1 - \exp\left[-(\mu + \beta) \cdot \frac{x}{v}\right] \right) \cdot 100 \quad (15)$$

268

269 Using Equation 11, Equation 15 can be rearranged to:

270

$$271 \quad B[\%] = \frac{\mu}{\mu + \beta} \cdot (1 - F_x) \cdot 100 \quad (16)$$

272

273 By inserting the rearranged Equation 10

274

$$275 \quad \mu + \beta = -\frac{v}{x} \cdot \ln(F_x) \quad (18)$$

276

277 and rearranged Equation 14

278

$$279 \quad \mu = -\frac{v}{x} \cdot \ln\left(\left(\frac{R_t}{R_0}\right)^{\left(\frac{1000}{\varepsilon}\right)}\right) \quad (19)$$

280

281 into Equation 16, finally the percentage of biodegradation (B [%]) can be calculated by:

282

$$283 \quad B[\%] = \frac{\ln\left(\left(\frac{R_x}{R_0}\right)^{\frac{1000}{\varepsilon}}\right)}{\ln(F_x)} \cdot (1 - F_x) \cdot 100 \quad (20)$$

284

285 Assuming that the rate parameters for a non-isotope-fractionating process and

286 biodegradation follow a constant relation $k = \beta/\mu$, and using Equations 10 and 14, the

287 influence of the non-isotope-fractionating process for the calculation of B[%] can be
288 described by transforming Equation 16 to:

289

$$290 \quad B[\%] = \frac{1}{1+k} \cdot \left(1 - \exp\left(-\mu \cdot \frac{x}{v} \cdot (1+k)\right) \right) = \frac{1}{1+k} \cdot \left(1 - \left(\left(\frac{R_t}{R_0} \right)^{\frac{1000}{\epsilon}} \right)^{1+k} \right) \cdot 100 \quad (21)$$

291

291 **Literature Cited**

292

- 293 (1) Gödeke, S.; Weiß, H.; Geistlinger, H.; Fischer, A.; Richnow, H.-H.; Schirmer, M. Strömungs- und
294 Tracer-Transportmodellierung am Natural Attenuation-Standort Zeitz. *Grundwasser*. **2004**, 9, 3-11.
- 295 (2) Schirmer, M.; Dahmke, A.; Dietrich, P.; Dietze, M.; Gödeke, S.; Richnow, H. H.; Schirmer, K.; Weiss,
296 H.; Teutsch, G. Natural attenuation research at the contaminated megasite Zeitz. *J. Hydrol.* **2006**, in press.
- 297 (3) Fischer, A.; Vieth, A.; Knöller, K.; Wachter, T.; Dahmke, A.; Richnow, H.-H. Charakterisierung des
298 mikrobiellen Schadstoffabbaus mit Hilfe von isopenchemischen Methoden. *Grundwasser*. **2004**, 9, 159-172.
- 299 (4) Vieth, A.; Kästner, M.; Schirmer, M.; Weiss, H.; Gödeke, S.; Meckenstock, R. U.; Richnow, H. H.
300 Monitoring in situ biodegradation of benzene and toluene by stable carbon isotope fractionation. *Environ.*
301 *Toxicol. Chem.* **2005**, 24, 51-60.
- 302 (5) DIN "38402-Teil 13 Probenahme aus Grundwasserleitern", Deutsches Institut für Normung e. V., 1985.
- 303 (6) Schirmer, M.; Jones, I.; Teutsch, G.; Lerner, D. N. Development and Testing of Multiport Sock
304 Samplers for Groundwater. *J. Hydrol.* **1995**, 171, 239-257.
- 305 (7) Dempster, H. S.; Lollar, B. S.; Feenstra, S. Tracing organic contaminants in groundwater: A new
306 methodology using compound-specific isotopic analysis. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, 31, 3193-3197.
- 307 (8) Anonymous "IAEA-TECHDOC-825", International Atomic Energy Agency, 1995.
- 308 (9) Mariotti, A.; Germon, J. C.; Hubert, P.; Kaiser, P.; Letolle, R.; Tardieux, A.; Tardieux, P. Experimental
309 determination of nitrogen kinetic isotope fractionation: some principles; illustration for the denitrification and
310 nitrification processes. *Plant Soil*. **1981**, 62, 413-430.
- 311 (10) Meckenstock, R. U.; Morasch, B.; Griebler, C.; Richnow, H. H. Stable isotope fractionation analysis as
312 a tool to monitor biodegradation in contaminated aquifers. *J. Contam. Hydrol.* **2004**, 75, 215-255.
- 313