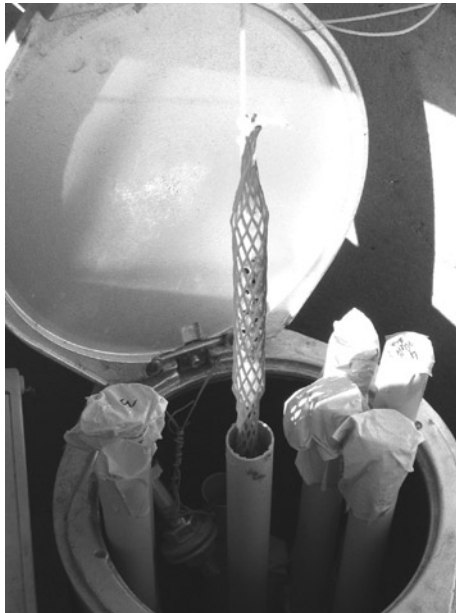


Nachweis des mikrobiellen Schadstoffabbaus in Grundwasserleitern

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]).

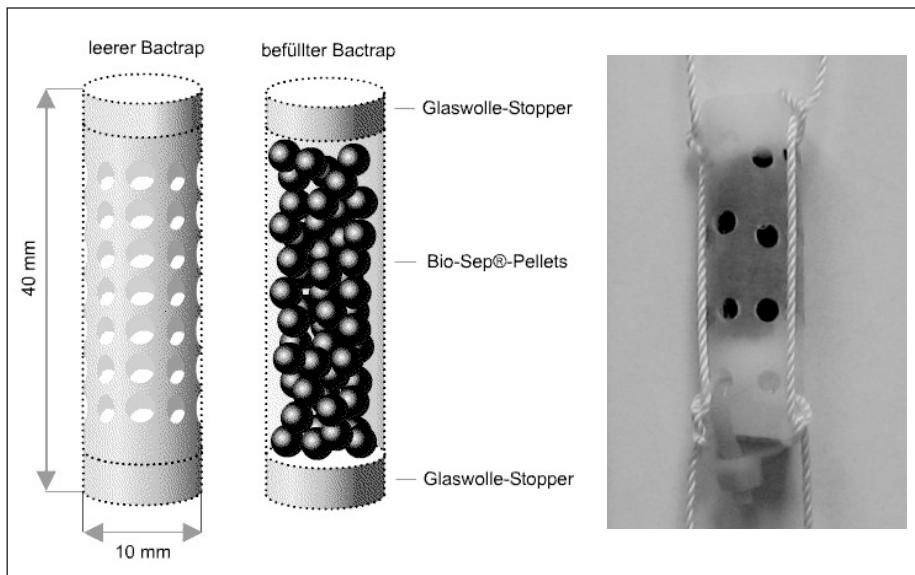
***In-situ*-Mikroskosmen zum Nachweis des mikrobiellen Schadstoffabbaus**

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