



18 **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

12 **Offenlegungsschrift**  
10 **DE 100 06 798 A 1**

51 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 12 Q 1/64**  
G 01 N 33/24  
G 01 N 33/18

21 Aktenzeichen: 100 06 798.0  
22 Anmeldetag: 15. 2. 2000  
43 Offenlegungstag: 30. 11. 2000

**DE 100 06 798 A 1**

<p>66 Innere Priorität: 199 06 193. 9      15. 02. 1999 100 04 275. 9      01. 02. 2000</p> <p>71 Anmelder: Meckenstock, Rainer, Dr., 78479 Reichenau, DE; Richnow, Hans-Hermann, Dr., 20146 Hamburg, DE</p> <p>74 Vertreter: Dr. Weiss, Weiss &amp; Brecht, 78234 Engen</p>	<p>72 Erfinder: Meckenstock, Rainer, Dr., 78479 Reichenau, DE; Richnow, Hans-Hermann, Dr., 20146 Hamburg, DE; Schink, Bernhard, Dr., 78465 Konstanz, DE; Michaelis, Walter, Dr., 20146 Hamburg, DE</p>
--	--

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

- 54 Verfahren zum Ermitteln eines biologischen Schadstoffabbaus in der Umwelt
- 57 Bei einem Verfahren zum Ermitteln eines biologischen Schadstoffabbaus in der Umwelt (Boden, Wasser) sollen die Isotopensignaturen bzw. eine Isotopenfraktionierung des jeweiligen Schadstoffes bestimmt und der Abbau berechnet werden.

**DE 100 06 798 A 1**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Ermitteln eines biologischen Schadstoffabbaus in der Umwelt (Boden, Wasser).

Die Beurteilung kontaminierter Böden oder Grundwasserleiter gewinnt angesichts grossflächiger Kontaminationen mit Mineralölprodukten und organischen Chemikalien zunehmend an Bedeutung. Neben der Ermittlung des Verursachers stehen Fragen zur Schadstoffverlagerung mit dem Grundwasserstrom sowie insbesondere auch die biologische Abbaubarkeit unter typischen Aquiferbedingungen im Zentrum.

Gewöhnlich wird ein Schadensfall in einem Grundwasserleiter durch eine Kartierung der Schadstoffausbreitung im Untergrund festgestellt. Im Abstrom einer Schadstoffquelle stellt sich oft ein Konzentrationsgradient wassergefährdender Substanzen ein, der auf Prozessen wie Adsorption an die Aquifermatrix, Verdünnung mit unkontaminiertem Grundwasser, Ausgasungen im Falle wasserflüchtiger Substanzen oder auch dem in-situ Schadstoffabbau durch die autochthone Mikroflora beruhen kann.

Bisher kann der mikrobielle Abbau in z. B. kontaminierten Grundwässern nicht zuverlässig quantifiziert werden. Teilweise werden zur Abschätzung des mikrobiellen Abbaus die Schadstoffkonzentrationen gemessen und mit hydrologischen Grundwassermodellen nicht-biologische Faktoren, wie Verdünnung oder Adsorption, die zu einer Abnahme der Schadstoffkonzentration führen können, abgeschätzt. Alle anderen Abnahmen werden dem mikrobiellen Abbau zugeschrieben.

Weitere alternative Ansätze versuchen, über die Quantifizierung der Elektronenakzeptoren im Grundwasser, die Anreicherung von  $^{12}\text{CO}_2$  im Boden aus Abbau von Biomasse oder Bildung von Sulfid oder Metaboliten den mikrobiellen Abbau zu quantifizieren.

Die bisher zuverlässigste Methode, den mikrobiellen Abbau zu quantifizieren, besteht im Entnehmen von Bodenproben und dem anschliessenden Inkubieren in Bodensäulen oder Mikrokosmosversuchen, wo der bakterielle Umsatz quantifiziert wird. Teilweise geschieht das unter Einbeziehung von radioaktiven Substraten. Es werden Bohrkern- oder Bodenproben unter Laborbedingungen z. B. mit radioaktiv markierten Substanzen auf ihren mikrobiellen Schadstoffabbau hin untersucht. Gewonnene Abbauraten werden dann auf Feldsituationen übertragen.

Auch die Isotopenfraktionierung ist ein seit langem bekannter Prozess in biologischen Reaktionen. Bisher wurde biologische Isotopenfraktionierung nur bei relativ kleinen Molekülen, wie  $\text{CO}_2$  und Methan, genauer untersucht. Vor allem für Methan wurden einige Untersuchungen publiziert, in denen gezeigt wurde, dass beim biologischen Abbau von organischen Molekülen eine Anreicherung der schweren Isotope in der noch nicht abgebauten Restfraktion des Substrats passiert. Aufgrund dieser Anreicherung kann ein Isotopenfraktionierungsfaktor  $\alpha$  berechnet werden. Mit Hilfe der Rayleigh-Gleichung und dieser Konstanten kann der bakterielle Umsatz für ein Substrat berechnet werden, sofern die Isotopenwerte zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt werden.

Für Methan wurde versucht, aufgrund der Isotopenverhältnisse den biologischen Abbau in der Umwelt nachzuweisen (Rayleigh, J. W. S. 1896. Theoretical considerations respecting the separation of gases by diffusion and similar processes. Philos. Mag. 42: 493-498; Hoefs, J. 1997. Stable isotope geochemistry, 4bd. Springer Verlag, Berlin; Whiticar M. J. and E. Faber. 1985. Methane oxidation in sediment and water column environments-isotope evidence. Adv.

Org. Geochem. 10: 759-768).

Die bisherigen Methoden zur Quantifizierung des mikrobiellen Abbaus in der Umwelt haben alle den Nachteil, nur indirekt Informationen über den mikrobiologischen Schadstoffabbau zu geben. Die Quantifizierung des Schadstoffabbaus im Grundwasser ist praktisch nicht möglich mit den bisherigen Methoden, weil nicht unterschieden werden kann, auf welche Art und Weise der Schadstoff im Grundwasser verschwindet. Der Schadstoff kann durch Verdünnung, Adsorption an der Bodenmatrix usw. oder auch den biologischen Schadstoffabbau abnehmen, was aber nicht unterschieden werden kann.

Laboruntersuchungen haben den Nachteil, dass die jeweiligen Bodenproben nicht mehr unter in-situ Bedingungen vorliegen. Das führt dazu, dass die abbauenden Bakterien sich eventuell anreichern, wenn die Kultivierungsbedingungen geeignet sind, obwohl die gleichen Organismen im Grundwasserleiter unter Umweltbedingungen nicht wachsen würden. Dadurch wird auf der einen Seite der Abbau durch Bakterien, die unter den artifiziellen Laborbedingungen gut wachsen, überschätzt. Auf der anderen Seite wird die Mehrzahl der Bakterien unter Laborbedingungen nicht wachsen und deren Abbauleistung wird unterschätzt. Vor allem anaerobe Bakterien sind für die meisten Umweltschadstoffe bis heute weder beschrieben noch kultivierbar. Prinzipiell kann mit dieser Methode nur gezeigt werden, ob ein Abbaupotential für einen bestimmten Schadstoff vorliegt oder nicht.

Laboruntersuchungen in diesem Stil sind sehr zeitaufwendig, da das Wachstum der schadstoffabbauenden Bakterien normalerweise sehr langsam ist. Es ist mit mehreren Monaten bis Jahren zu rechnen.

Aber auch das direkte Verfolgen der Schadstoffe in der Umwelt selbst muss über einen langen Zeitraum erfolgen (Jahre), um zuverlässige Aussagen über das langfristige Verhalten einer Kontamination machen zu können.

Für bisherige Untersuchungen müssen ausgiebige hydrogeologische Untersuchungen sowie Brunnenfassungen vorliegen oder Bohrkernbohrungen bzw. Baggerschlitze gemacht werden, was extrem teuer ist. Alle Methoden zur Quantifizierung des mikrobiellen Abbaus, die Summenparameter, wie Sulfidentwicklung oder Veränderungen der Isotopensignatur im entstandenen  $\text{CO}_2$  benutzen, können nur eine allgemeine Aussage geben, ob biologischer Abbau wahrscheinlich vorhanden ist oder nicht. Es kann weder quantifiziert werden, um Raten zu bestimmen, noch kann für bestimmte Substanzklassen spezifisch gesagt werden, ob sie auch abgebaut werden, da nicht zwischen den verschiedenen Substanzen unterschieden werden kann. Diese Effekte können auch aus dem biologischen Abbau irrelevanter Stoffe oder z. B. toter Biomasse kommen.

Aufgabe des vorliegenden Verfahrens ist die Verbesserung der Quantifizierung des biologischen Schadstoffabbaus sowohl für einzelne relevante Substrate als auch für ganze Stoffklassen in-situ, in der Umwelt, d. h., in Böden und Grundwässern oder auch ex-situ in Mieten etc..

Zur Lösung dieser Aufgabe führt, dass Isotopensignaturen bzw. eine Isotopenfraktionierung des jeweiligen Schadstoffes bestimmt werden und der Abbau berechnet wird.

Mit diesem Verfahren wird ein Konzept zur Kennzeichnung des biologischen in-situ Abbaus entwickelt, das auf der mikrobiellen Isotopenfraktionierung von organischen Schadstoffen, wie z. B. von BTEX-Schadstoffen und Naphthalin, beruht. Damit kann der biologische Schadstoffabbau anhand der Kohlenstoffisotopenverhältnisse wassergefährdender Substanzen unabhängig von anderen Einflüssen, wie Adsorption und Verdünnung, im Aquifer erfasst werden. Damit ist eine neue Bewertung des intrinsischen Abbaupo-

tentials und der zu erwartenden Ausbreitung von Schadstofffahnen möglich.

Für den Nachweis der biologischen Abbauaktivität in der Umwelt ist es notwendig, die Konzentrationen der jeweiligen Schadstoffe zu ermitteln. Dazu werden Bodenproben oder Wasserproben genommen, die Schadstoffe extrahiert und mittels herkömmlicher Methoden, wie Gaschromatographie oder HPLC (High Performance Liquid Chromatography) quantifiziert. Für die Probenahme werden herkömmliche standardisierte Methoden verwendet. Grundwasserproben werden mit herkömmlichen Methoden, wie z. B. Grundwasserbrunnen gewonnen. Es muss jedoch eine Verdünnung der Schadstoffe im Zuge der Probenahme oder Aufbereitung ausgeschlossen werden.

Schadstoffkonzentrationen und Isotopendaten können in gängige Modellierungen eingebunden werden, wofür etablierte Methoden zur Verfügung stehen.

Eine Messung der Isotopenverhältnisse eines Stoffes kann auch mit Massenspektroskopie oder IRM-GC-MS (Isotope Ratio Monitoring-Gas-Chromatographie-Mass-Spectrography) erfolgen.

Im praktischen Fall werden, wie oben erwähnt, die Boden- oder Wasserproben gewonnen. Aus den Proben werden die Schadstoffe mit organischen Lösungsmitteln, solid phase micro-extraction oder anderen Extraktionen extrahiert. Die Extrakte werden mit Isotope-Ratio-Monitoring-GC-Massenspektroskopie oder mit normaler Massenspektroskopie oder anderen Methoden, die eine Bestimmung des Isotopenverhältnisses erlauben, auf ihre Isotopensignatur untersucht. Dabei können sowohl stabile Kohlenstoffisotope, Deuterium/Wasserstoff, Chlorisotope, Schwefelisotope, Stickstoff- und Sauerstoffisotope untersucht werden. Weiterhin sind alle Organometall- oder Organohalogenverbindungen potentiell untersuchbar, sowohl für die Fraktionierung des Heteroatoms bzw. des Metallatoms oder des Kohlenstoffs oder des Deuteriums. Verschiebungen im ermittelten Isotopenverhältnis über die Zeit oder die Grundwasserstrecke werden jetzt benutzt, um mit Hilfe eines Isotopenfraktionierungsfaktors  $\alpha$  den Anteil des bakteriellen Abbaus am Gesamtverschwinden des Schadstoffs zu quantifizieren. Dazu werden die Schadstoffkonzentrationen, die biologisch umgesetzt wurden, nach folgender Gleichung errechnet:

$$\ln(R_t/R_0) = (1/\alpha C - 1) \cdot \ln(C_t/C_0)$$

Diese Gleichung ist aus der Rayleigh-Gleichung  $[R_t/R_0 = (C_t/C_0)^{1/\alpha-1}]$  abgeleitet.

R ist ein Isotopenverhältnis zur Zeit 0 bzw. t und C ist die Konzentration zur Zeit 0 bzw. t. Anstatt der Zeit kann auch die durchflossene Wegstrecke als Parameter gewählt werden.  $\alpha$  ist der Isotopenfraktionierungsfaktor.

Der Isotopenfraktionierungsfaktor kann für eine bestimmte Substanz entweder direkt im Labor gewonnen werden, in dem hier in einem definierten Abbauexperiment mit Bakterienkulturen die Schadstoffkonzentrationen und die Isotopenwerte bestimmt werden, oder der Fraktionierungsfaktor kann an einem gut untersuchten Feldfall (z. B. eine Altlast) für einige typische Schadstoffe ermittelt werden.

Die ermittelten Werte für den biologischen Abbau können jetzt vom Gesamtverschwinden des Schadstoffs abgezogen werden und die Differenz ergibt das unspezifische Verschwinden des Schadstoffes durch Adsorption, Verdünnung etc..

Bevorzugt wird der biologische Abbau von Umweltschadstoffen zunächst für eine Reihe von in Frage kommenden Typen von Bakterien, die diesen Stoff umsetzen können, untersucht, wobei die Isotopenfraktionierungsfaktoren für

die jeweiligen Elemente des Schadstoffes bestimmt werden. Mit diesen Faktoren wird der biologische Umsatz in der Umwelt berechnet.

Weiterhin kann von vorhandenen Feldsituationen, in denen geklärt ist, dass die Schadstoffe biologisch abgebaut werden, ein Fraktionierungsfaktor ermittelt werden und diese Werte auf neue unbekannte Testfelder übertragen werden, um die dortige Abbausituation abzuschätzen.

Bevorzugt sollen die Isotopenverhältnisse verschiedener Elemente eines Schadstoffes ermittelt werden, wodurch die gewonnenen Daten unterstützt werden. Durch die gleichzeitige Ermittlung der biologischen Isotopenfraktionierung verschiedener Elemente kann auch eine Quellenzuordnung bzw. Verursacherzuordnung von Schadstoffen erfolgen. Dies ist der Fall, wenn zwei Schadstoffquellen zwar die gleiche Isotopensignatur eines Elementes zeigen, sich aber in der Signatur eines zweiten Elementes unterscheiden.

Die biologische Isotopenfraktionierung wird auch dazu verwendet, um das Isotopenverhältnis von Schadstoffen an einem bestimmten Punkt einer Schadstofffahne zu ermitteln.

Ferner kann auch die Aktivierungsenergie des initiellen oder des ratenlimitierenden Schritts und somit des fraktionierenden Schritts im Abbau für die zu untersuchenden Isotope bestimmt werden (Arrheniusgleichung) und dann über die Beziehung  $\ln\alpha = (E_{a1} - E_{a2})/RT$  für jede beliebige Umwelttemperatur der Fraktionierungsfaktor dieser Reaktion ausgerechnet und für die Ermittlung des biologischen Abbaus am Standort eingesetzt werden.

Der Nachweis der biologischen Isotopenfraktionierung soll sowohl qualitativ, als Aussage, ob überhaupt Abbau stattfindet, als auch quantitativ als Quantifizierung des Anteils des Abbaus am Gesamtverschwinden des Substrates, geführt werden.

Es ist auch daran gedacht, dass einzelne Schadstoffe, die in ihrem Umweltverhalten typisch sind, für bestimmte Stoffklassen, als representative Vertreter dieser Klasse untersucht werden, und die Anteile von Adsorption, Verdünnung etc., die für diesen Stoff ermittelt wurden, auf andere Vertreter dieser Klasse übertragen werden.

Möglich ist auch, für einen Vertreter einer Substanzklasse den biologischen Abbau mittels Isotopenfraktionierung zu bestimmen und aufgrund dieser Daten den biologischen Abbau für andere Vertreter dieser Klasse, die sich physikalisch chemisch ähnlich verhalten, zu ermitteln. Dies geschieht, indem die für die Modellsubstanz errechneten Anteil von Verdünnung, Adsorption etc. auf den zweiten Vertreter dieser Klasse übertragen werden und der biologische Abbau der Differenz zum Gesamtverschwinden gleichgesetzt wird. Der somit gewonnene Fraktionierungsfaktor kann auf andere Standorte übertragen werden.

Nach der Ermittlung des biologischen Abbaus werden bevorzugt die Restanteile, die sich aus der Differenz zum Gesamtverschwinden einer Substanz ergeben, verwendet, um den Boden in Bezug auf das Adsorptionsverhalten und andere Parameter bezüglich des Umweltverhaltens eines Schadstoffes zu charakterisieren.

Nach der Ermittlung des biologischen Abbaus gemäß der vorliegenden Erfindung des eben beschriebenen Umweltverhaltens des Schadstoffes kann der Schadstoff selber als Tracersubstanz betrachtet werden, um beispielsweise Grundwasserflüsse zu charakterisieren und zu quantifizieren. Weiterhin können Richtungen und Mengen von Grundwasserflüssen ermittelt werden.

In Fällen, in denen sich die Fraktionierungsfaktoren einzelner Elemente für den aeroben Abbau, den anaeroben Abbau oder verschiedene Redoxverhältnisse unterscheiden, können die Redoxverhältnisse im Untergrund oder Boden aufgrund der Isotopenfraktionierung bestimmt bzw. die

Hauptelektronenakzeptoren und Abbaubedingungen ermittelt werden. Damit kann eine eventuelle Sanierung optimiert werden.

Die wesentlichen Vorteile der vorliegenden Erfindung liegen in der erstmalig möglichen Erfassung des mikrobiellen Schadstoffabbaus direkt im Grundwasser oder in Böden bzw. allgemein in der Umwelt. Es kann zum ersten Mal nur der biologische Abbau ansich, unabhängig von Verdünnung oder anderen chemischen, physikalischen Einflüssen, bestimmt werden.

Die Methode ist mit einem ganz geringen Probenahmeaufwand verbunden. Im Vergleich zu Laboruntersuchungen mit Bodenproben, die sehr arbeitsaufwendig sind, muss ein kleiner Aufwand, nämlich nur das isotopische Analysieren von Wasserproben erfolgen, wenn einmal der Fraktionierungsfaktor für eine Substanz bestimmt wurde. Ausserdem kann die Quantifizierung bei bekannten Fraktionierungsfaktoren innerhalb von wenigen Tagen erfolgen, im Vergleich zu Monaten bis Jahren, die bisher aufgewendet wurden.

Die Ermittlung des biologischen Abbaus als wichtigste Grösse in der Risikoanalyse kann aus den o. g. Gründen wesentlich kostengünstiger durchgeführt werden als mit bisherigen Methoden.

Mit dem neuen Verfahren können Aussagen über das Langzeitverhalten von Substanzen im Aquifer gemacht werden.

Es kann für jeden einzelnen Schadstoff eine differenzierte Analyse gemacht werden und somit über das Verhalten einzelner wichtiger Schadstoffe eine Aussage bezüglich des Abbauverhaltens oder Adsorptionsverhaltens getroffen werden.

Es kann mittels der Isotopenanalyse verschiedener Elemente des gleichen Moleküls bzw. Schadstoffs unterschieden werden, ob sich im Laufe des biologischen Abbaus eine Isotopensignatur eingestellt hat, die zufällig einer bestimmten Signatur aus der Quelle eines Verursachers entspricht oder ob es sich wirklich um eine Kontamination aus dieser Quelle handelt.

Das erfindungsgemässe Verfahren erlaubt, dass bei der Untersuchung von kontaminierten Böden und Wässern, wie z. B. Grundwässer neben der hydrologischen Beschreibung und der Erfassung der Schadstoffe auch eine Abschätzung gemacht werden kann, wie sich die Schadstoffe bzw. die Schadstofffahnen in Zukunft verhalten werden. Der mikrobielle Abbau ist der wesentliche Faktor für die potentielle Abnahme von Schadstoffen und trägt ganz entscheidend zur Risikobeurteilung von Altlasten bei.

Bei der biologischen Bodensanierung sowohl ex-situ als auch in-situ ist eine Erfolgskontrolle für den Auftraggeber notwendig. Diese kann bisher nur über abnehmende Schadstoffgehalte gegeben werden. Da aber, wie oben erwähnt, die Grösse aus vielen Parametern besteht, kann nur über die Quantifizierung des mikrobiellen Abbaus auch eindeutig bestimmt werden, ob die angewandten Massnahmen der biologischen Bodensanierung auch wirklich den biologischen Abbau stimulieren und nicht andere Faktoren, wie Adsorption etc.. Durch das erfindungsgemässe Verfahren ist diese Erfolgskontrolle leicht möglich.

Neben dem biologischen Abbau ist das sonstige Verhalten des Schadstoffes in der Umwelt in Bezug auf Adsorption, Verdünnung etc. interessant und sollte für eine zuverlässige Beurteilung bestimmt werden. Der Schadstoff selber kann als hydrologischer Tracer für Grundwasseruntersuchungen benutzt werden, ohne artifiziell Stoffe zuzusetzen, wenn der biologische Abbau bekannt ist. Da der biologische Abbau mit Hilfe der Isotopenfraktionierung berechnet werden kann, sind andere Parameter, wie Adsorption und Verdünnung bzw. Grundwasserflüsse aufgrund der gemessenen

Konzentrationen abschätzbar.

Die Erfindung wird anhand von Ausführungsbeispielen und graphischen Darstellungen näher erläutert, wobei

Fig. 1 den Toluolabbau einer *Pseudomonas putida* Kultur zeigt, mit abnehmender Substratkonzentration erfolgt eine Zunahme des  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses;

Fig. 2 zeigt den Toluolabbau einer sulfatreduzierenden Kultur, Stamm TRM1. Mit abnehmender Substratkonzentration erfolgt eine Zunahme des  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisses;

Fig. 3 zeigt einen Toluolabbau von verschiedenen Bakterienkulturen. Auftragung der Isotopenwerte und der Konzentration nach der Rayleigh-Gleichung. Die Steigung der Kurven ergeben den Isotopenfraktionierungsfaktor  $\alpha$ ;

Fig. 4 zeigt einen Toluolabbau in einer Bodensäule. Mit steigender Distanz vom Einlass wird das Substrat Toluol zunehmend abgebaut. Gleichzeitig steigt das  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis in der noch nicht abgebauten Restsubstanz;

Fig. 5 zeigt die Berechnung des biologischen Toluolabbaus in einem kontaminierten Grundwasserleiter gemäss dem erfindungsgemässen Verfahren. Das Verfahren beschreibt den Abbau entlang der Schadstofffahne zu über 95%.

### Beispiel 1

#### Biologischer Abbau von Toluol unter Umweltbedingungen

Das erfindungsgemässe Verfahren wurde angewendet, um den biologischen Abbau von Toluol unter Umweltbedingungen zu beweisen. Dazu wurde Toluol als Substrat in Wachstumsexperimenten mit verschiedenen Bakterien eingesetzt. Die Organismen wurden so ausgewählt, dass alle potentiellen Redoxverhältnisse eines Aquifers vertreten waren, um auch die verschiedensten anaeroben Verhältnisse zu simulieren. Es wurde der Aerobier *Pseudomonas putida*, der Denitrifizierer *Thauera aromatica*, der Eisenreduzierer *Geobacter metallireducens* und ein Sulfatreduziererstamm TRM1 eingesetzt. Die Bakterien wurden mit Toluol als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle angezogen und zu verschiedenen Zeitpunkten der Wachstumskurve das Isotopenverhältnis von Toluol in der jeweiligen nicht abgebauten Restfraktion mit Isotope-Ratio-Monitoring-GC-MS bestimmt (Fig. 1 bis 4). Die Isotopenwerte wurden entsprechend der Rayleigh-Gleichung aufgetragen und die Fraktionierungsfaktoren  $\alpha$  bestimmt. Mit diesen Fraktionierungsfaktoren wurde der mikrobielle Umsatz von Toluol in einem Schadensfall quantifiziert. Dazu wurden Wasserproben aus Grundwasserbrunnen entnommen, die Isotopenwerte von Toluol gemessen und mittels der bestimmten Fraktionierungsfaktoren der bakterielle Umsatz im Feld errechnet. Da der Fraktionierungsfaktor von der Temperatur abhängt, kann dies mit Hilfe der Arrheniusgleichung auch für jede mögliche Temperatur durchgeführt werden.

Da der Fraktionierungsfaktor gleich dem Quotienten der Reaktionsgeschwindigkeiten ist, verhält er sich direkt umgekehrt proportional zur Temperatur.  $\ln\alpha = (E_{a1} - E_{a2})/RT$ .

### Beispiel 2

Ermittlung der Quelle bzw. des Verursachers einer Kontamination aus dem biologischen Abbau und den Isotopensignaturen.

Zwei Kontaminationen vermischen sich im Grundwasser und sind aufgrund der Kohlenstoffisotopensignatur nicht voneinander zu unterscheiden. Die Untersuchung des biologischen Abbaus mit Isotopenfraktionierung zeigt, dass sich in den Kontaminationsfahnen im Grundwasser die Isotopensignaturen aufgrund des biologischen Abbaus geändert ha-

ben. In diesem Fall wird zusätzlich die Deuteriumisotopenfraktionierung hinzugezogen, um definiertere Aussagen über die Quelle zu bekommen.

### Beispiel 3

Eine Gemeinde hat einer Firma den Auftrag für eine biologische Bodensanierung gegeben. Die Firma wendet ein bestimmtes Verfahren an und es zeigen sich tatsächlich Abnahmen des Schadstoffgehaltes. In diesem Fall ist es notwendig, zu zeigen, wohin der Schadstoff verschwunden ist, um sicher zu sein, dass der Schadstoff auch wirklich abgebaut wurde oder ob der Schadstoff nur immobilisiert wurde und später wieder freigesetzt werden kann. Dieser Beweis kann durch die Bestimmung des biologischen Abbaus mittels Untersuchung der Isotopenfraktionierung durchgeführt werden.

### Patentansprüche

1. Verfahren zum Ermitteln eines biologischen Schadstoffabbaus in der Umwelt (Boden, Wasser), **dadurch gekennzeichnet**, dass Isotopensignaturen bzw. eine Isotopenfraktionierung des jeweiligen Schadstoffes bestimmt werden und der Abbau berechnet wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Proben der Umwelt genommen, die Schadstoffe extrahiert und ihre Isotopensignaturen bzw. -fraktionierung bestimmt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln, solid phase micro extraction oder anderen Extraktionsmethoden erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Isotopensignaturen bzw. der Isotopenfraktionierung mit Isotope-Ratio-Monitoring-GC-Massenspektroskopie, mit normaler Massenspektroskopie erfolgt, oder anderen Methoden, die eine Bestimmung des Isotopenverhältnisses erlauben.
5. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass an mehreren Stellen der Umwelt Proben genommen und Verschiebungen im ermittelten Isotopenverhältnis über die Zeit und/oder die Entfernung dazu benutzt werden, um mit Hilfe eines Isotopenfraktionierungsfaktors  $\alpha$  den Anteil des bakteriellen Abbaus am Gesamtverschwinden des Schadstoffes zu quantifizieren.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Schadstoffkonzentrationen, die biologisch umgesetzt wurden, nach folgender Gleichung errechnet werden:

$$\ln(R_t/R_0) = (1/\alpha C - 1) \cdot \ln(C_t/C_0)$$

wobei

$\alpha$  der Isotopenfraktionierungsfaktor,

R das Isotopenverhältnis zur Zeit 0 bzw. t,

C die Konzentration zur Zeit 0 bzw. t ist, wobei an die Stelle der Zeit auch die Entfernung treten kann.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Isotopenfraktionierungsfaktor  $\alpha$  vorab im Labor oder bei einem Feldversuch für einige typische Schadstoffe ermittelt wird.

8. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass der ermittelte Wert für den biologischen Abbau vom Gesamtverschwinden des Schadstoffes abgezogen und so als Differenz ein unspezifisches Ver-

schwinden des Schadstoffes durch Adsorption, Verdünnung od. dgl. ermittelt wird.

9. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Isotopenverhältnisse verschiedener Elemente eines Schadstoffmoleküls ermittelt werden.

10. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Aktivierungsenergie des initiellen oder des ratenlimitierenden Schritts und somit des fraktionierenden Schritts im Abbau für die zu untersuchenden Isotope bestimmt wird (Arrheniusgleichung) und dann über die Beziehung

$$\ln \alpha = (E_{a1} - E_{a2}) / RT$$

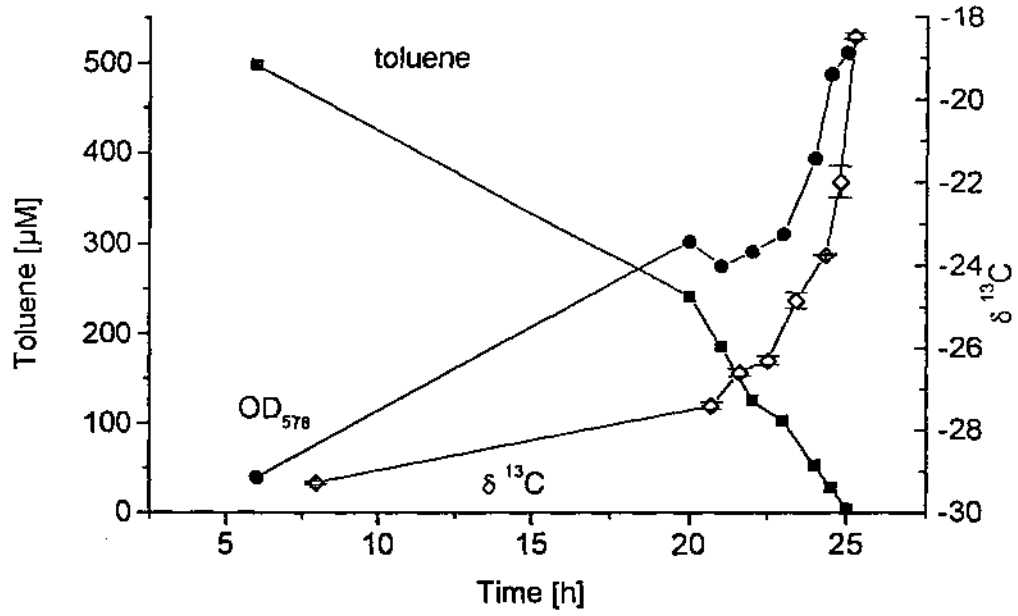
für jede beliebige Umwelttemperatur der Fraktionierungsfaktor dieser Reaktion ausgerechnet und für die Ermittlung des biologischen Abbaus am Standort eingesetzt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass in den Fällen, in denen sich die Fraktionierungsfaktoren einzelner Elemente für einen aeroben Abbau, einen anaeroben Abbau oder verschiedene Redoxverhältnisse unterscheiden, die Redoxverhältnisse in der Umwelt aufgrund der Isotopenfraktionierung bestimmt bzw. die Hauptelektronenakzeptoren und Abbaubedingungen ermittelt werden.

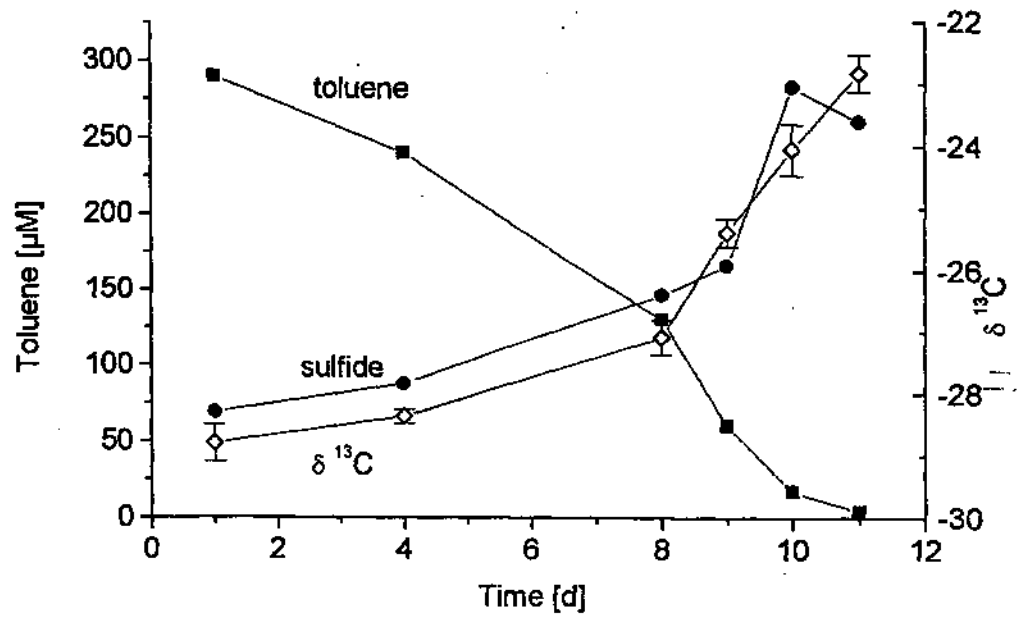
---

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

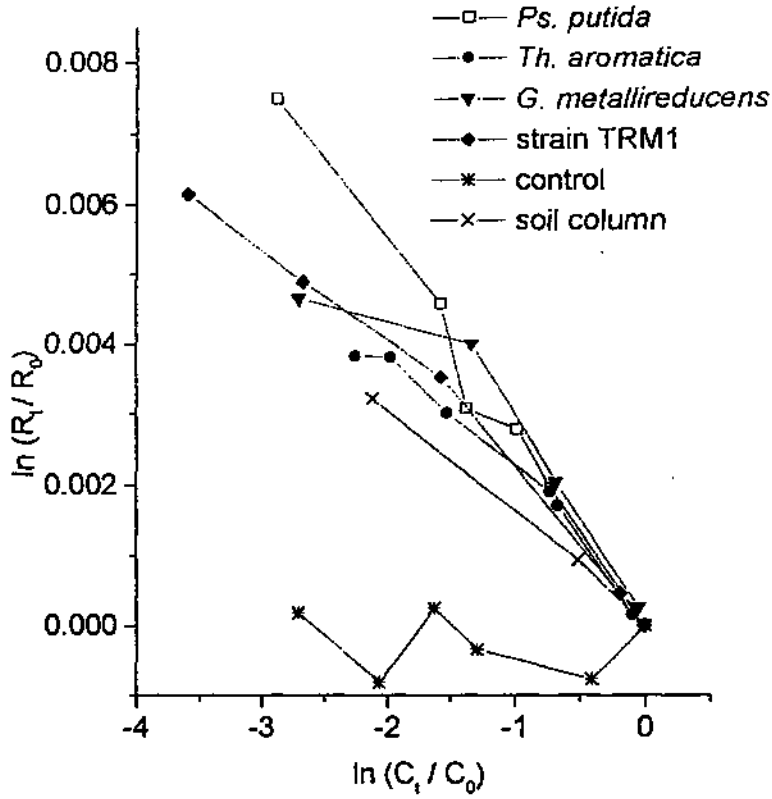
---



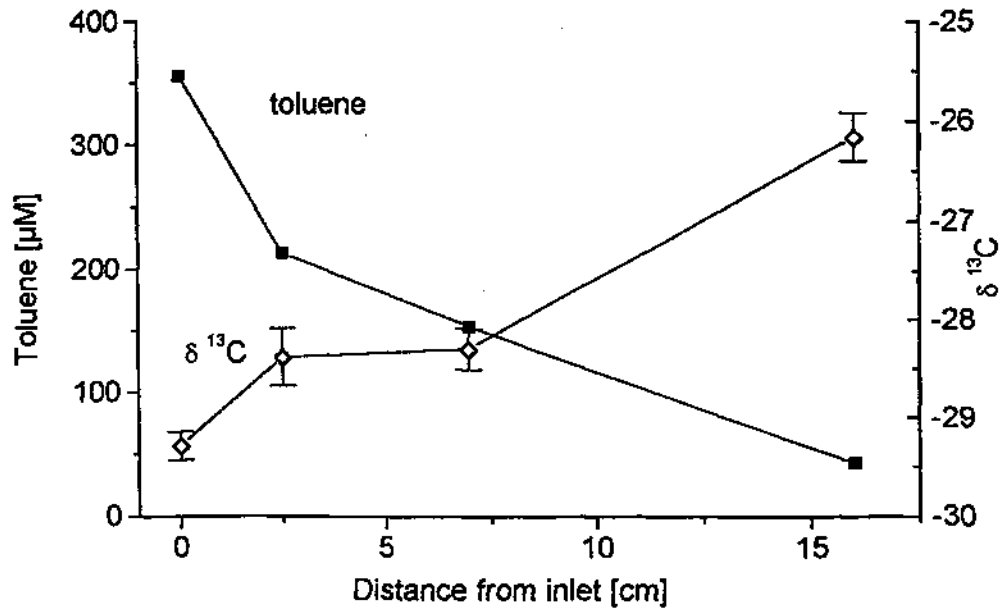
Figur 1



Figur 2



Figur 3



Figur 4

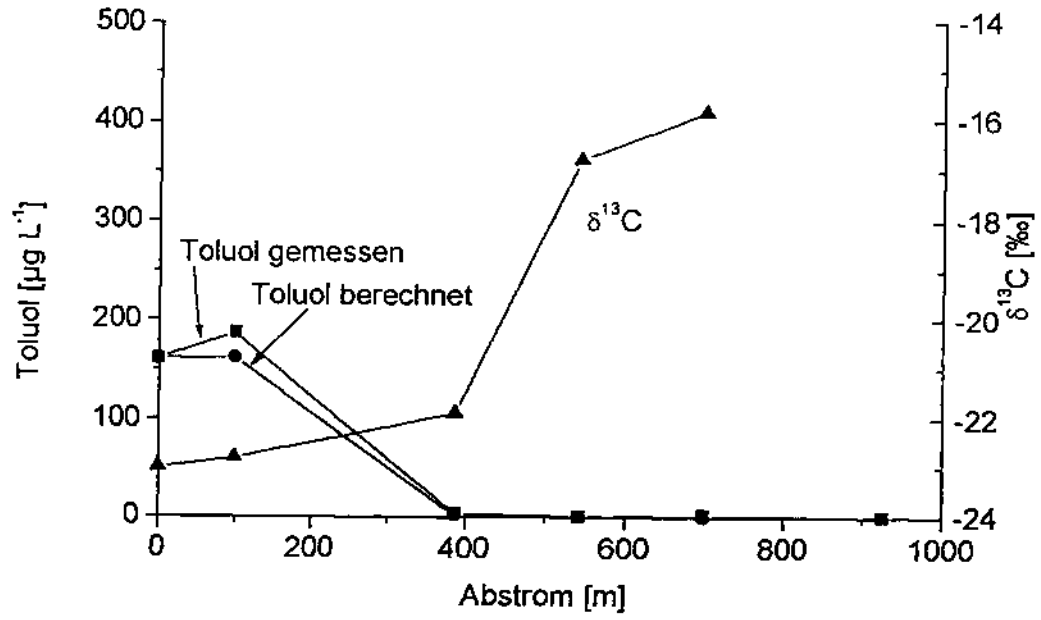


Fig. 5