

Sanierung eines PCE-Schadens in einem makroskopisch oxischen Grundwasserleiter durch Stimulation anaerober dehalogenierender Bakterien

Daniel Buchner¹ · Meenakshi Schweikhart¹ · Sebastian Behrens^{1,3} · Thomas Schöndorf² · Christine Laskov^{1,4} · Stefan B. Haderlein¹

Eingegangen: 30. April 2018 / Überarbeitet: 12. Oktober 2018 / Online publiziert: 1. Februar 2019
© Springer-Verlag GmbH Deutschland, ein Teil von Springer Nature 2019

Zusammenfassung

Eine erfolgreiche biologische In-situ-Sanierung von PCE-kontaminierten Grundwasserleitern erfordert hinreichend reduzierende Bedingungen sowie die Anwesenheit von molekularem Wasserstoff, der dehalogenierenden Bakterien als Elektronendonator dient. Durch Injektion eines biologisch gut abbaubaren Hilfsstoffs (Auxiliarsubstrat) können diese Faktoren gesteuert werden.

Die vorliegende Fallstudie beschreibt die Verfahrensschritte für eine erfolgreiche Stimulierung des biologischen PCE-Abbaus in einem ursprünglich sauerstoffhaltigen Grundwasserleiter. Laboruntersuchungen in Mikrokosmen (Stufe I) verifizierten das standorteigene bakterielle Abbaupotenzial sowie die Eignung des Auxiliarsubstrats (hier: Melasse). Basierend auf hydrogeologischen und geochemischen Felddaten wurde die erforderliche Melassemenge abgeschätzt sowie deren Wirkungsbereich im Aquifer modelliert (Stufe II). Im Feldversuch erfolgten periodische Injektionen des Auxiliarsubstrats (hier: 170 Tage) begleitet von geochemischen und molekularbiologischen Analysen (Stufe III). Durch die Melasseinjektion konnten im PCE-kontaminiertem Bereich des Aquifers methanogene Bedingungen sowie eine massive Zunahme von Schlüsselbakterien der Gattung *Dehalococcoides* induziert werden. Der erfolgreiche In-situ-Bioabbau von PCE zu Ethen wurde durch substanzspezifische Kohlenstoff-Isotopenanalysen bestätigt.

Zusatzmaterial online Zusätzliche Informationen sind in der Online-Version dieses Artikels (<https://doi.org/10.1007/s00767-018-00410-x>) enthalten.

✉ Daniel Buchner
daniel.buchner@uni-tuebingen.de

Meenakshi Schweikhart
meenakshiloganathan@gmail.com

Sebastian Behrens
sbehrens@umn.edu

Thomas Schöndorf
Thomas.Schoendorf@hpc.ag

Christine Laskov
christine.laskov@posteo.de

Stefan B. Haderlein
haderlein@uni-tuebingen.de

¹ Zentrum für angewandte Geowissenschaften,
Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Tübingen, Deutschland

² HPC AG, Freiburg i.Br., Deutschland

³ Department of Civil, Environmental, and Geo-engineering,
University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA

⁴ Fugro Consult GmbH, Mössingen, Deutschland

Stimulation of anaerobic PCE dechlorinating bacteria in a macroscopic oxic aquifer

Abstract

A successful biological in situ remediation of PCE contaminated aquifers requires suitable redox conditions as well as molecular hydrogen used by dehalogenating bacteria as the electron donor. Injecting an easily biodegradable auxiliary substrate allows to control both factors. The present study describes the procedural steps for a successful stimulation of biological PCE-degradation in a primary oxygen-containing aquifer. A microcosm study (level I) showed the bacterial potential of the site and the suitability of molasses as an auxiliary substrate. Using hydrogeological and geochemical field data, the amount of molasses was estimated and its zone of influence was modelled (level II). In a field test, molasses was periodically injected (170 days) accompanied by geochemical and molecular biological analysis (level III). Following the injection of molasses, methanogenic conditions as well as a significant increase of *Dehalococcoides* was observed. In situ biodegradation of PCE to ethene was verified by compound-specific carbon isotope analysis.

Keywords ENA · *Dehalococcoides* · Isotope analysis · Molasses

Einleitung

Leichtflüchtige chlorierte Kohlenwasserstoffe (LCKW) stellen aufgrund ihrer hohen Persistenz bis heute besonders grundwässergefährdende Schadstoffe dar (Panagos et al. 2013). Um LCKW-belastete Grundwässer wieder nutzbar zu machen, ist in vielen Fällen eine aktive Sanierung erforderlich. Neben physikalischen und hydraulischen Sanierungsmaßnahmen, wie dem Auskoffern des kontaminierten Bodens, der Installation von Pump & Treat-Anlagen oder von reaktiven Barrieren, finden zunehmend auch biologische Verfahren Anwendung, die sich LCKW-respirierende Bakterien zunutze machen (Major et al. 2002; Ni et al. 2014; Nijenhuis und Kuntze 2016). Während physikalische Verfahren in der Praxis häufig einen kleinräumigen Wirkungsbereich aufweisen, eignen sich biologische Verfahren vor allem für größer flächige Sanierungen von im Grundwasser gelösten Schadstoffanteilen, sowie als „Polishing“-Verfahren nach einer vorausgegangenen physikalischen (Teil-)Sanierung eines Schadensherdes. Kann durch Injektion eines Auxiliarsubstrates eine gesteigerte biologische Aktivität und ein ausreichender Solubilisierungseffekt (gesteigerter Schadstofftransfer der sorbierten Schadstoffanteile in das Grundwasser) erzeugt werden, eignen sich biologische Verfahren auch zur Quellsanierung.

LCKW-respirierende Bakterien werden unter dem Oberbegriff Organohalid-respirierende Bakterien (OHRB) zusammengefasst. Neben LCKW können OHRB eine Vielzahl an bromierten oder chlorierten Organohaliden reduzieren (Adrian und Löffler 2016; Schubert et al. 2016).

Bei der vollständigen Reduktion der chlorierten Ethene von Perchlorethen (PCE) zu Ethen mit den Zwischenprodukten Trichlorethen (TCE), Dichlorethen (DCE) und Vinylchlorid (VC) wird sukzessive je ein Chloratom abgespalten und durch ein Wasserstoffatom ersetzt. Generell sinkt die Reaktionsbereitschaft für reduktiven Abbau innerhalb dieser Abbaukette. Während PCE bereits unter nitratredu-

zierenden Bedingungen umgesetzt werden kann, sind für die Reduktion von TCE zu DCE mindestens eisenreduzierende Bedingungen und für die weitere Reduktion von DCE zu VC mindestens sulfatreduzierende Bedingungen erforderlich (Bradley 2000; Chapelle 1997; Vogel et al. 1987). Der Schritt von VC zu nichtchloriertem Ethen ist hingegen nur unter extrem stark reduzierenden, methanogenen Bedingungen möglich (Bradley 2000 und Zitate darin). Dies zeigt, dass die am Standort vorherrschenden Redoxbedingungen einen wesentlichen Einfluss auf den vollständigen reduktiven Umsatz von PCE haben.

Neben den Redox-Bedingungen wird das biologische Abbaupotenzial eines Standortes in erster Linie durch die Anwesenheit bestimmter Schlüsselbakterien bestimmt. Während eine Vielzahl von OHRB PCE und TCE abbauen können, ist der Umsatz von DCE und VC auf Stämme von *Dehalococcoides* beschränkt (Löffler et al. 2013; Taş et al. 2010; Zinder 2016). Ein Nachweis von *Dehalococcoides* an PCE kontaminierten Standorten wird daher häufig als Schlüsselparameter und Voraussetzung für eine erfolgreiche biologische Sanierung angesehen (Hendrickson et al. 2002; Lu et al. 2009; Taş et al. 2009).

Wenn der In-situ-Abbau der chlorierten Ethene nur langsam oder unvollständig abläuft, kann durch Zugabe von Auxiliarsubstraten (z.B. Melasse, Laktat) die Abbautätigkeit stimuliert werden (enhanced natural attenuation; ENA). Ziel der Auxiliarsubstratzugabe ist, (1) durch Erhöhung des organischen Kohlenstoffgehalts (C_{org}) reduzierende Bedingungen und folglich einen geeigneten Reaktionsraum für OHRB zu etablieren und (2) durch Fermentation des Auxiliarsubstrates den Gehalt an elementarem Wasserstoff (H_2) zu erhöhen. Elementarer Wasserstoff stellt den einzigen nutzbaren Elektronendonator für *Dehalococcoides* dar (Löffler et al. 2013). Für die Durchführung einer ENA-Maßnahme ist es zunächst wichtig, in einer ersten Stufe die generelle Eignung des Standortes, also das vorhandene biologische Abbaupotenzial zu beurteilen. Im Anschluss gilt es, die Auxi-

liarsubstratzugabe gezielt zu steuern, damit sich ein stabiler Reaktionsraum ausbildet und ein ausreichendes H₂-Niveau gewährleistet ist.

Ziel der vorliegenden Studie war es, mittels eines Dreistufenkonzepts die Eignung eines makroskopisch sauerstoffhaltigen Grundwasserleiters für eine ENA-Maßnahme systematisch zu evaluieren. Die in Stufe I durchgeführte Mikrokosmenstudie diente der Beurteilung des standorteigenen biologischen Abbaupotenzials, sowie der Bewertung verschiedener Auxiliarsubstrate zu dessen Stimulation. In Stufe II wurde basierend auf der Mikrokosmenstudie sowie hydrogeochemischen Daten des Grundwasserleiters ein modellbasiertes Sanierungskonzept erarbeitet, um die Auxiliarsubstratezugabe gezielt zu steuern (Installation der Injektionspegl; Abschätzung des Auxiliarsubstratbedarfs). In Stufe III erfolgte die Umsetzung des Sanierungskonzepts im Feld. Das Monitoring der Sanierungsmaßnahme zur Prozesssteuerung erfolgte mittels verschiedener Analyseverfahren (geochemische und molekularbiologische Analysen sowie substanzspezifische Isotopenanalytik).

Generell können zum Monitoring von In-situ-Abbauprozessen verschiedene Methoden angewandt werden, wie etwa Konzentrationsmessungen (Nachweis von Abbauprodukten), geochemische Analysen (Bestimmung der Redoxbedingungen), molekularbiologische Untersuchungen (Nachweis von Schlüsselbakterien z.B. *Dehalococcoides*; Nachweis funktioneller Gene) sowie die substanzspezifische Isotopenanalyse (CSIA) (Bombach et al. 2010; Fischer et al. 2016; Meckenstock et al. 2004). Ein Monitoring mittels verschiedener Methoden führt zu einem verbesserten Verständnis der im Grundwasserleiter ablaufenden (Abbau-)Prozesse. Die Charakterisierung der Redoxbedingungen erlaubt zwar keine Rückschlüsse auf In-situ-Abbauaktivität, jedoch liefert sie wichtige Informationen darüber, welche Abbauprozesse im Grundwasserleiter überhaupt stattfinden können (Atashgahi et al. 2016; Christensen et al. 2000). Molekularbiologische Methoden liefern Informationen zum generellen biologischen Abbaupotenzial sowie indirekte Hinweise auf die aktuelle In-situ-Abbauaktivität (Lee et al. 2008; Scheutz et al. 2008). Ein Alleinstellungsmerkmal der substanzspezifischen Isotopenanalyse ist, dass sie neben einem qualitativen Nachweis von In-situ-Abbau auch eine Abschätzung des Schadstoffumsatzes erlaubt (Aeppli et al. 2010; Van Breukelen et al. 2005; Hunkeler et al. 2008; Pooley et al. 2009; Schmidt und Jochmann 2012).

Standorteigenschaften und Milieubedingungen vor der Sanierungsmaßnahme

Im Bereich eines ca. 5 m × 10 m großen ehemaligen Absetzbeckens, in das Betriebsabwässer einer Tierkörperverwertungsanstalt eingeleitet worden waren, liegen im Grundwasser Verunreinigungen durch leichtflüchtige chlorierte Kohlenwasserstoffe (LCKW) vor (Lageplan siehe Abb. S1 erweiterte Informationen). 1996 wurde der Schadensherd bis ca. 2 m unter GOK ausgehoben (ca. 40 m³ Aushub). Eine im Anschluss durchgeführte Bodenluftabsaugung diente der Sanierung der ungesättigten Bodenzone. Nach den durchgeführten Sanierungsmaßnahmen lagen die LCKW-Konzentration im Bereich von 10 bis 1000 µg/l im Grundwasser, zum überwiegenden Teil PCE. Periodisch traten TCE und *cis*-DCE auf. VC sowie weitere Schadstoffe wurden nicht nachgewiesen.

Lithostratigraphisch kann der Standort der Freiburger Bucht zugeordnet werden, in die quartäre Sedimente des Dreisam-Schwemmfächers geschüttet wurden, bestehend aus Kies und Schottersediment. Da die Ursprungsgesteine primär Silikatgesteine aus Gneisen und Graniten des Schwarzwaldes sind, weist der karbonatfreie Grundwasserleiter nur eine geringe Pufferkapazität auf. Bei Injektionen eines Auxiliarsubstrates ist durch die Säurebildung bei dessen Abbau daher mit einer pH-Wert-Absenkung zu rechnen.

Der oberflächennahe, ungespannte Grundwasserleiter besitzt Durchlässigkeitsbeiwerte von $k_f = 1 - 2 \cdot 10^{-3}$ m/s, der Grundwasserflurabstand beträgt im Versuchsfeld 5–7 m. Begrenzt wird der obere Grundwasserleiter durch stark verwitterte und verbackene Kiese (Breisgaufaltung) 13 bis 15 m unter GOK ($k_f = 0,1 - 0,5 \cdot 10^{-4}$ m/s).

Vier tiefenionierte Probennahmen (Auflösung 1 m) der im Schadenszentrum gelegenen Grundwassermessstelle *Zentrum* innerhalb von fünf Monaten ergaben Sauerstoffkonzentrationen von 3,8 bis 7,3 mg/l sowie Redoxpotenziale zwischen +380 und +400 mV. Der pH-Wert lag zwischen 6,2 und 6,6 (Abb. S2 erweiterte Informationen).

Methoden

Stufe I – Mikrokosmenstudie

Die Mikrokosmenstudie diente (1) der Evaluierung des standorteigenen biologischen Abbaupotenzials für einen kompletten reduktiven PCE-Abbau sowie (2) als Test verschiedener Auxiliarsubstrate zur Stimulation eines biologischen Abbaus. Als Inokulum für die Mikrokosmenstudie wurde Standortmaterial (Sediment und Wasser) aus der Grundwassermessstelle *Zentrum* verwendet, das mit ei-

Tab. 1 Aufbau der drei Versuchsreihen zur Beurteilung des standorteigenen biologischen Abbaupotenzials für einen vollständigen reduktiven PCE-Abbau. Beimpft wurden Mikrokosmen mit Standortsediment und Standortwasser

	Technisches Substrat ^a	Melasse ^a		Laktat ^a		Mit Zusatz ^b	Ohne Zusatz ^c
		PCE	PCE	<i>cis</i> -DCE	PCE	<i>cis</i> DCE	PCE
1. Versuchsreihe	×	×	–	×	–	×	×
2. Versuchsreihe	–	×	×	×	×	–	×
3. Versuchsreihe	–	×	×	×	×	×	–

^aNeben dem Auxiliarsubstrat wurden diese Versuchsansätze mit einem Bikarbonatpuffer und zwei Vitaminlösungen versetzt

^bDiese Versuchsansätze wurden lediglich mit einem Bikarbonatpuffer und zwei Vitaminlösungen versetzt

^cDiese Versuchsansätze enthielt lediglich Standortmaterial ohne weitere Zusätze

nem Teflonschöpfer entnommen wurde. Die gewonnene Sediment-Suspension wurde mittels Magnetrührer homogenisiert und zu gleichen Teilen auf die einzelnen Versuchsreihen verteilt.

In drei separaten Versuchsreihen wurden die Auxiliarsubstrate Melasse, Laktat und ein technisches Substrat zur Stimulierung OHRB getestet. Es wurden Versuchsansätze mit PCE (Aldrich, Steinheim) und/oder *cis*-DCE (Aldrich, Steinheim) als Primärschadstoff versetzt, denen zusätzlich Bikarbonatpuffer und zwei Vitaminlösungen zugegeben wurde (Buchner et al. 2015). Die anfängliche nominelle Konzentration der Primärschadstoffe wurde auf 50 µM eingestellt. Als Kontrolle dienten zwei Versuchsansätze, von denen einer nur Bikarbonatpuffer und die beiden Vitaminlösungen enthielt und der zweite zusatzfrei war. Die einzelnen Versuchsansätze hatten eine identisch angesetzte Sterilkontrolle, die durch 2 g/l Natriumazid (NaN₃) inaktiviert wurde. Insgesamt wurden drei Versuchsreihen durchgeführt, für die jeweils in separaten Probennahmen Standortmaterial gewonnen worden war (Stichtage der drei Probennahmen: 11.05./06.08./11.09.). Die verschiedenen Versuchsansätze der drei Versuchsreihen sind in Tab. 1 (sowie Tab. S1–3 inkl. Mengenangaben) zusammenfassend dargestellt.

Die Mikrokosmen wurden in 560 ml Serumflaschen angesetzt (Ochs GmbH, Bovenden/Lenglern). Standortwasser und die Sedimentsuspension wurden 0,5 h bzw. 2,5 h mit Stickstoff (N₂) begast um standorteigene LCKW auszutreiben, was durch eine GC-MS Messung verifiziert wurde. Die Mikrokosmen wurden in der anoxischen und H₂-freien Atmosphäre einer Anaerobenkammer (MBraun Unilab Glovebox mit 100 % N₂) angesetzt, mit einem Butylgummistopfen gasdicht verschlossen und anschließend außerhalb der Anaerobenkammer im Wasserbad bei konstant 22 °C gelagert.

Probennahme für Konzentrations- und Isotopenbestimmung der chlorierten Ethene aus den Mikrokosmen

Die Probennahme für die Konzentrations- und Isotopenanalyse der chlorierten Ethene erfolgte mit gasdichten Spritzen (Hamilton). Das entnommene Probevolumen (5–15 ml) wurde durch Stickstoff (N₂) ersetzt um konstante Druckverhältnisse in den Mikrokosmen zu gewährleisten. Die Proben sowohl für die Konzentrations- als auch für die Kohlenstoffisotopenbestimmung wurden mit 300 µl Phosphorsäure (H₃PO₄; 1 M) fixiert. Die Konzentrationsanalyse/δ¹³C-Analyse erfolgte in Duplikaten bzw. Triplikaten. Die Proben für δ¹³C-Analytik wurden entweder direkt nach Probennahme vermessen oder bei –20 °C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt analysiert (Elsner et al. 2006).

Stufe III – Monitoring der Sanierungsmaßnahme

Probennahme

Neben den turnusmäßigen Steuerungs- und Kontrollbeprobungen erfolgten spezielle Probennahmen mit Beginn der Melasseinjektionen über einen Zeitraum von 33 Monaten (bis 27 Monate nach der letzten Melasseinjektion). Beprobt wurden primär die Grundwassermessstellen IP2 (zustromiger Schadensrand), Zentrum (Schadensherd) und Abstrom (unmittelbarer zentraler Abstrom). Diese Proben wurden analysiert bezüglich der LCKW-Konzentration und deren Isotopensignatur, des Gehalts an redoxsensitiven Spezies, DOC und der Entwicklung der bakteriellen 16S rRNA-Genkopien sowie der 16S rRNA-Genkopien an *Dehalococcoides* und der beiden funktionellen Gene *pceA* und *vcrA* von *Dehalococcoides*. Die Wasserproben wurden mittels Pumpe (MP1) oder Schöpfer entnommen, ohne Gasraum abgefüllt und mittels Kupfersulfat (CuSO₄) mikrobiell fixiert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C bis zur Analytik.

Quantifizierung von LCKW, redoxsensitive Spezies und DOC

Die Konzentrationsanalytik bzgl. LCKW und redoxsensitiver Spezies in den Wasserproben wurde vom Institut Fresenius GmbH durchgeführt. Die LCKW-Analytik mittels statischer Headspace-Injektion (DIN EN ISO 10301 (DIN 1997b)) Bestimmungsgrenzen (BG): für PCE und TCE 0,1 µg/l, für cis-DCE, trans-DCE und VC 1 µg/l. Methan, Ethan und Ethen wurden mittels eines GC-FID (BG 10 µg/l) bestimmt; gesamtgelöstes Eisen und Mangan wurden entsprechend der DIN EN ISO 11885 (DIN 2009b) quantifiziert (BG: 10 und 5 µg/l), Sulfat, Nitrat und Nitrit wurden entsprechend der DIN EN ISO 10304-1 (DIN 2009a) analysiert (BG: 1, 0,5 und 0,02 mg/l). Die Quantifizierung von Ammonium erfolgte entsprechend der DIN EN ISO 11732 (DIN 2005) (BG: 40 µg/l); der Gesamtgehalt an Sulfid wurde entsprechend der DIN 38405-7 (DIN 2002) quantifiziert (BG: 30 µg/l). Der Gehalt an gelöstem organischen Kohlenstoff (DOC) wurde nach DIN EN 1484 (DIN 1997a) bestimmt (BG: 0,5 mg/l).

Die Analyse der LCKW-Isotopensignaturen sowie der molekularbiologischen Parameter erfolgten am Zentrum für Angewandte Geowissenschaften der Universität Tübingen. Isotopenproben wurden in 240 ml-Braunglasflaschen (Glastechnik Grönroda GmbH) ohne Gasraum abgefüllt und durch Deckel mit Tefroneinlage verschlossen. Die Proben wurden gekühlt transportiert und bis zur Verwendung abgedunkelt bei 4 °C gelagert. Die Proben für die molekularbiologische Analytik wurden durch 0,22 µm Filtration gewonnen (Millipore, MA, USA) und die Filtrate bei -20 °C gelagert.

Die Konzentrationsmessungen der chlorierten Ethene für die Mikrokosmenstudie erfolgten ebenfalls am Zentrum für Angewandte Geowissenschaften mit einem Gaschromatographen (TraceGC 2000, Thermo Finnigan, Mailand, Italien) gekoppelt mit einem Single-Quadrupole-Massen-Spektrometer (Trace DSQ, Thermo Finnigan, Austi TX, USA). Die chronographische Trennung erfolgte auf einer RTX-VMS-Kapillarsäule (60 m × 0,32 mm; Restek Bellfont). Mittels statischer Headspace-Technik wurde ein Volumen von 500 µl durch einen CTC-CombiPAL Autosampler (Chromtech, Idstein, Deutschland) injiziert. Jede Probensequenz wurde von Standardgeraden umschlossen. Das Temperaturprogramm war wie folgt: 40 °C für 5 min; Heizrate 12 °C/min auf 150 °C, gehalten für 2 min.

Die Konzentrationsmessung von Ethen erfolgte mit einem GC (Varian 3800)-FID auf einer AT-Molekularsiebsäule (30 m × 0,53 mm). Hierbei wurden die Proben mit einer verschließbaren gasdichten Hamiltonspritze direkt aus dem Headspace der Mikrokosmen entnommen und manuell injiziert. Die FID-Detektortemperatur lag bei 220 °C.

Die Analyse der stabilen Kohlenstoffisotope ($\delta^{13}\text{C}$) der chlorierten Ethene erfolgte mit einem Gaschromatogra-

phen (Trace GC Ultra, Thermo Finnigan, Mailand, Italien) gekoppelt an ein „Sektorfeld-Massenspektrometer“ (Delta Plus XP, Thermo Finnigan MAT, Bremen). Die Probenaufgabe erfolgte mittels Festphasenmikroextraktion (SPME) (Beschichtung: 5 µm Carboxen/Polyeddimethylsiloxan; Supelco, Bellefonte) aus der Gasphase. Nach einer Extraktionszeit von 20 min erfolgte eine Desorption im Injektor (30 s bei 270 °C). Bei Konzentrationen unter 50 µg/l erfolgte die Probenaufgabe mittels Purge and Trap wie zuvor beschrieben bei (Zwank et al. 2003) Das Temperaturprogramm war wie folgt: 40 °C für 5 min; Heizrate 7 °C/min auf 180 °C, gehalten für 2 min. Während der Analyse wurden nach 10 bis 12 Proben jeweils zwei externe Vinylchlorid-Referenzstandards ($\delta^{13}\text{C}_{\text{PCE}} = -27,3\text{\textperthousand}$ $\delta^{13}\text{C}_{\text{TCE}} = -26,7\text{\textperthousand}$; $\delta^{13}\text{C}_{\text{cis-DCE}} = -25,8\text{\textperthousand}$; $\delta^{13}\text{C}_{\text{VC}} = -22,5\text{\textperthousand}$, VC intern gegen PCE referenziert) vermessen.

Molekularbiologische Analysen: Aus der auf den Filtern zurückgehaltenen Biomasse wurde die DNA mit dem PowerWater® DNA isolation kit (MoBio Laboratories, Carlsbad, CA) extrahiert, der Anleitung des Herstellers folgend. Die Inkubationszeit bei 70 °C sowie der Zellaufschlusschritt wurden auf 10 min verlängert, um die DNA-Ausbeute zu erhöhen.

Die qPCR erfolgte in 20 µL Reaktionsvolumen mit folgender Zusammensetzung: 1 x SsoFast EvaGreen® Supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), 250 nM Vorwärts- und Rückwärtsprimer sowie 2 µl DNA. Die Amplifikation erfolgte auf einem iCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Die qPCR-Temperatur-Programme sowie die verwendeten Primer sind in Tab. S4 sowie S5 aufgeführt. Als Standardplasmid für die Quantifizierung der funktionellen Gene *pceA*, *vcrA* von *Dehalococcoides* sowie der 16S rRNA-Genkopien von *Dehalococcoides* wurde das Plasmid pCR2.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) verwendet (Behrens et al. 2008). Für die Bestimmung der Kopienzahl an bakteriellen 16S rRNA-Genen wurde ein Plasmid verwendet, das ein 16S rRNA-Gen-Fragment von *Thiomonas* spp. beinhaltet (Muyzer et al. 1993). Für die Quantifizierung wurden zehnfache Verdünnungsreihen des Standard-Plasmides benutzt, wobei in jedem qPCR-Lauf eigene Standardkurven analysiert wurden. Bei der Datenanalyse wurde zunächst der Hintergrund eliminiert und die Daten mittels des online-Programms „Real-Time PCR Miner“ ausgewertet (Behrens et al. 2008; Zhao und Fernald 2005). Die Nachweisgrenzen für die funktionellen Gene und das 16S rRNA-Gen von *Dehalococcoides* (Dhc 16S rRNA) lagen bei $5 \cdot 10^1$ Kopien/ml Grundwasser und für das bakterielle 16S rRNA-Gen (Bac 16S rRNA) bei $1 \cdot 10^2$ Kopien/ml Grundwasser.

Tab. 2 Beobachtete Endprodukte der Dehalogenierung in den unterschiedlichen Versuchsansätzen der drei Versuchsreihen. Die Mikrokosmen wurden mit Sediment und Wasser aus der Grundwassermessstelle Zentrum beimpft. Die Werte in Klammern geben die max. Laufzeit bzw. den Zeitraum in Tagen bis zum vollständigen Umsatz zu Ethenen an

	Technisches Substrat	Melasse		Laktat		Mit Zusatz	Ohne Zusatz
		PCE	PCE	cis-DCE	PCE	cis-DCE	PCE
1. Versuchsreihe	cis-DCE (103)	cis-DCE (100)	–	cis-DCE (90)	–	PCE (61)	PCE (61)
2. Versuchsreihe	–	Ethen (56)	Ethen (56)	PCE (60)	cis-DCE (60)	–	PCE (55)
3. Versuchsreihe	–	Ethen (112)	Ethen (112)	cis-DCE (72)	cis-DCE (72)	PCE (80)	–

Resultate und Diskussion

Stufe I – Mikrokosmenstudie

Die Mikrokosmenstudie diente der Evaluierung des standorteigenen biologischen Abbaupotenzials sowie als Eignungstest für drei potenzielle Auxiliarsubstrate. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefasst.

In den Versuchsansätzen ohne Zugabe von Auxiliarsubstrat fand kein Umsatz von LCKWs statt.

Ein vollständiger Umsatz von PCE zu Ethenen erfolgte in beiden mit Melasse versetzten Versuchsansätzen, in den anderen Versuchsansätzen (Laktat; technisches Substrat) fand jedoch kein Abbau über cis-DCE hinaus statt. Generell wurden keine Unterschiede im Abbauverhalten abhängig vom primären LCKW (PCE oder cis-DCE) beobachtet.

Die Melasse-Versuchsansätze unterschieden sich bezüglich des ersten Auftretens von Ethenen (56 Tage beim 2. Ansatz; 112 Tage beim 3. Ansatz). Im Melasse-Versuchsansatz der 2. Versuchsreihe wurde nach neun Tagen ausschließlich cis-DCE beobachtet, nach 32 Tagen setzte dann der Umsatz zu VC und weiter zu Ethenen ein (Abb. 1). Die bakteriellen 16S rRNA-Genkopien lagen initial bei 10^{10} Genkopien/g Boden und zeigten nach neun Tagen ein Maximum von 10^{24} Kopien/g Boden im Einklang mit dem Umsatz der Melasse. Die 16S rRNA-Genkopien von *Dehalococcoides* blieben mit 10^4 Kopien/g Boden bis Tag 32 nahezu unverändert und erreichten an Tag 42 ein Maximum von 10^9 Kopien/g Boden. Dieser Verlauf ging einher mit einem Anstieg der Kopien der funktionellen Gene *pceA* und *vcrA* von *Dehalococcoides* auf 10^9 Kopien/g Boden bzw. 10^{12} Kopien/g Boden. Die molekularbiologischen Daten belegen zum einen eine generelle Zunahme der bakteriellen Biomasse durch die Zugabe von Melasse, zum anderen die erfolgreiche Stimulation von Bakterien der Gattung *Dehalococcoides*, die den Umsatz der geringer chlorierten Ethene bewirken.

Die Ergebnisse aus Stufe I – Mikrokosmenstudie – belegen die Anwesenheit von strikt anaeroben *Dehalococcoides*-Stämmen am Standort trotz der makroskopisch oxischen Bedingungen im Grundwasserleiter und somit

grundsätzlich das Potenzial des Standortes für eine biologische Sanierung. Die Auxiliarsubstrattests zeigen die Eignung von Melasse zur Stimulierung des anaeroben biologischen PCE-Abbaus aus der standorteigenen Bakteriengemeinschaft.

Stufe II – Abschätzung des Melassebedarfs und Ausbreitungswege

Stufe II diente dazu, den Mengenbedarf des für den Feldversuch ausgewählten Auxiliarsubstrats Melasse abzuschätzen mit dem Ziel, (1) einen reduktiven Reaktionsraum zu etablieren und aufrecht zu erhalten sowie (2) den Elektronendonator H₂ in ausreichendem Maße für OHRB zur Verfügung zu stellen.

Die Abschätzung des Melassebedarfs erfolgte basierend auf den geochemischen und hydrologischen Daten des Grundwasserleiters unter Berücksichtigung der Schadensgeometrie. Das Versuchsfeld umfasste den Kernbereich zwischen den Grundwassermessstellen *Zentrum* und *Abstrom*. Bei ca. 6 m Breite, 25 m Länge und einer relevanten Grundwasserleitermächtigkeit von rund 8 m ergibt sich ein Reaktionsraum von ca. 1200 m³ mit etwa 250 m³ verfügbarem Porenvolumen. Das verfügbare Porenvolumen wurde nach Angaben des Geologischen Landesamtes für den regionalen Aquifer mit aufgerundet ca. 20 % angesetzt. Reduziert werden müssen sowohl vorhandene gelöste als auch kontinuierlich zuströmende Elektronenakzeptoren von Sauerstoff bis Sulfat und sedimentgebundene oxidierte Verbindungen, vorwiegend Fe(III)-haltige Mineralcoatings. Zudem soll die Melasse (bzw. der freigesetzte Wasserstoff) als Elektronendonator zur Dehalogenierung der LCKW zur Verfügung stehen. Um die Menge bzw. erforderliche Elektronendonorkapazität (EDK) der Melasse abzuschätzen, wurde der in der Melasse enthaltene Anteil an Saccharose (50%) genutzt unter Berücksichtigung folgender Punkte:

1. Gelöste Verbindungen im Behandlungsraum mit EDK > EAK inkl. LCKW: Die Summe der vorhandenen Elektronenakzeptorkapazität (EAK) von Sauerstoff

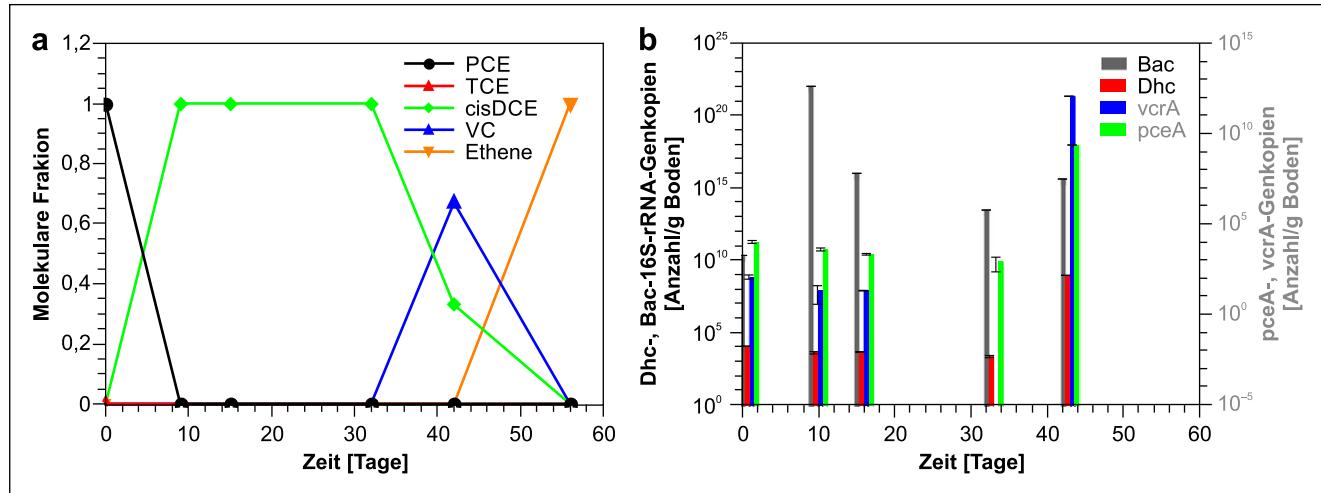


Abb. 1 Ergebnisse des mit Melasse versetzten Mikrokosmenansatzes der 2. Versuchsreihe. **a** Verlauf der chlorierten Ethene. **b** Entwicklung der Anzahl an bakteriellen 16S rRNA-Genkopien und der Anzahl an *Dehalococcoides* 16S rRNA-Genkopien sowie die Entwicklung der funktionellen Gene *pceA* und *vcrA* von *Dehalococcoides*

bis Sulfat – $\Sigma \text{EAK}(\text{O}_2\text{-SO}_4^{2-})$ – betrug für das Untersuchungsgebiet ca. $4,3 \cdot 10^{-3}$ mol Elektronen/l (bzw. 34,2 mg/l O₂-Äquivalente) einschl. gelöster LCKW. Bezogen auf Saccharose als Elektronendonator (48 e⁻ pro Mol bei Oxidation zu CO₂) wird dann eine Konzentration von $89,6 \cdot 10^{-3}$ mmol/l, d. h. 30,7 g/l Saccharose benötigt. Bei einem 50%igen Zuckeranteil und Vernachlässigung anderer organischer Anteile entspricht dies rund 61 g/l Melasse und etwa 20 mg/l DOC, die vorsorglich sowohl an der zustromigen Seite sowie im Reaktionsraum selbst nicht unterschritten werden sollten. Anwender aus den USA empfehlen etwa 100 ppm DOC zu 1 ppm LCKW, d. h. ein ähnliches Verhältnis (hier i. M. $\approx 200 \mu\text{g/l}$ LCKW) (Suthersan et al. 2002).

2. *Kontinuierliche Reduktion der zuströmenden terminalen Elektronenakzeptoren (TEA_{IN})*: Unter Berücksichtigung einer Aquifermächtigkeit von 8 m betrug TEA_{IN} ca. 44,7 mole⁻-Äquivalente (bzw. 358 g O₂-Äquivalente) pro Tag und Meter. Bezogen auf die im Rahmen des Pilotversuches zu erfassende Breite von 6 m ergab sich ein TEA_{IN} Wert von 268 mol Elektronen/d. Dies entsprach einer Menge von knapp 27 kg Melasse, die pro Woche zur Reduktion der zuströmenden e⁻-Akzeptoren rechnerisch benötigt wurde. Bei einem Versuchszeitraum von 6 Monaten summiert sich dies auf 650 kg Melasse.

3. *Sedimentgebundene e⁻-Akzeptoren*: Basierend auf Analyse von Sedimentproben aus den Grundwassermessstellen wurde für die Berechnung ein Gehalt von 2 g/kg amorphes, bioverfügbares Fe(III) angenommen. Bei einem Reaktorvolumen von 1200 m³ mit rd. 2400 Tonnen Sedimentmasse ergab sich ein Melassebedarf von ca. 1250 kg Melasse ($86 \cdot 10^{-3}$ mole⁻-Äquivalente) für die Fe(III)-Reduktion. Hinzu kamen nicht weiter quantifizierte, ge-

bundene Elektronenakzeptoren wie z. B. Mn(IV), die einen zusätzlichen Melassebedarf erfordern.

In der Summe waren nach stöchiometrischer Bilanzierung rund 2000 kg Melasse zur Etablierung des Reaktionsraumes sowie zum Umsatz der LCKW erforderlich. In der Praxis ist ein Mehrfaches der stöchiometrisch benötigten Menge anzusetzen (ITRC 2008), zumal davon ausgegangen werden muss, dass aufgrund der hohen Grundwasserfließgeschwindigkeit und entsprechend hoher Melasse (DOC)-Verluste mit dem Grundwasserabstrom mehrere Injektionen zur Aufrechterhaltung der DOC-Zielkonzentration von 20 mg/l erforderlich sind. Es wurde folglich angenommen, dass im Verlauf von 6 Monaten Injektionen mit größtenteils 5 Tonnen Melasse erfolgen müssen (ca. 1650 kg DOC), um einen In-situ-Reaktionsraum zu etablieren und aufrecht zu erhalten, sowie zur Stimulation LCKW-veratmender Organismen.

Um die Ausbreitung der Melasse bei gegebenen örtlichen Untergrundverhältnissen abzuschätzen, wurden Szenarien auf Grundlage der analytischen Lösung der partiellen Differenzialgleichung für den 2-dimensionalen Stofftransport nach pulsförmiger Eingabe gerechnet. Für die Zugabe der Melasse wurden drei Injektionspegel (IP) (2 Zoll IP1-3/Tiefe von 13,1–13,4 m u. GOK) installiert. Die hohe Permeabilität und die vergleichsweise geringe Heterogenität des Grundwasserleiters ließ generell eine gute Verteilung des Auxiliarsubstrates im Untergrund erwarten. Die Anordnung der IP erfolgte unter Berücksichtigung der Schadensgeometrie sowie der hydraulischen Eigenschaften des Grundwasserleiters. Durch die Installation drei eng benachbarter IP (Distanz < 2 m) sollte der auf Grund hoher Fließgeschwindigkeiten sehr schmalen lateralen Melassevertei-

lung Rechnung getragen werden. Ziel war es, eine Melasseverteilung zu erzielen, die quer zur Strömung zumindest die Schadensbreite ausreichend abdeckte. Die Ergebnisse der Modellierung lieferten orientierende Werte in Form von zu erwartenden DOC-Konzentrationen mit einer räumlichen und zeitlichen Auflösung.

Die Modellierung zeigte eine schmale und rasche Verteilung der DOC-Lösung mit dem Grundwasserfluss, wobei im zentralen Abstrom der Injektion die DOC-Konzentrationen von 1000 mg/l auf 100 mg/l in 20 m Entfernung und weiter innerhalb von 5 bis 6 Tagen auf < 20 mg/l abnahmen, während lateral die DOC-Konzentration bereits nach 30 bis 50 cm stark zurückging. Folglich wurden Melasseinjektionen in Intervallen von 5–6 Tagen zur Aufrechterhaltung einer DOC-Konzentration von ca. 20 mg/l im Schadenszentrum (Grundwassermessstelle *Zentrum*) geplant.

Stufe II lieferte wichtige Schätzwerte bezüglich Melassebedarf, Ausbreitung und Injektionsintervallen als Grundlage für die Dimensionierung und Durchführung des Pilotversuchs aber auch die Grobplanung des Feldversuchs und die Abschätzung der entstehenden Kosten (benötigte Melassemenge; Anzahl der Injektionspegel usw.).

Stufe III – Pilotversuch

Ziel der Stufe III war es, durch Melasseinjektionen über die neu installierten Injektionspegel einen reduktiven Reaktionsraum zu etablieren und folglich den biologischen Abbau von PCE zu Ethen zu stimulieren.

Das durchgeführte Monitoring umfasste folgende Parameter: Konzentration und $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopensignatur der chlorierten Ethene, Konzentrationen von DOC sowie redoxsensitiver Spezies, pH-Messungen und molekularbiologische Parameter (Gesamtzahl an bakterieller 16S rRNA-Kopien (Bac 16S rRNA), Zahl an *Dehalococcoides* (Dhc 16S rRNA) und die Quantifizierung der funktionellen Gene *pceA* und *vcrA* von *Dehalococcoides*).

Salztracer-Test

Zur Verifizierung der modellierten Melasseausbreitung wurde parallel zur Erstinjektion im mittleren der drei Injektionspegel (IP2) ein Salztracer-Test durchgeführt. Mittels Kochsalzes (NaCl; 50 kg Kochsalz auf 3 m³) wurde die elektrische Leitfähigkeit der Injektionslösung auf ca. 40.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ erhöht, was dem etwa 100-fachen des natürlichen Hintergrundwertes entspricht. Die raumzeitliche Ausbreitung der Eingabelösung wurde über eine quasi-kontinuierliche Aufzeichnung mittels Leitfähigkeitssensoren und Datenloggern in den Grundwassermessstellen (GWM), *Zentrum*, *MW2* und *Abstrom* erfasst (siehe Abb. 2).

Aus den Ganglinien der elektrischen Leitfähigkeit ist bei den Maximalkonzentrationen eine Verdünnung des Tracers

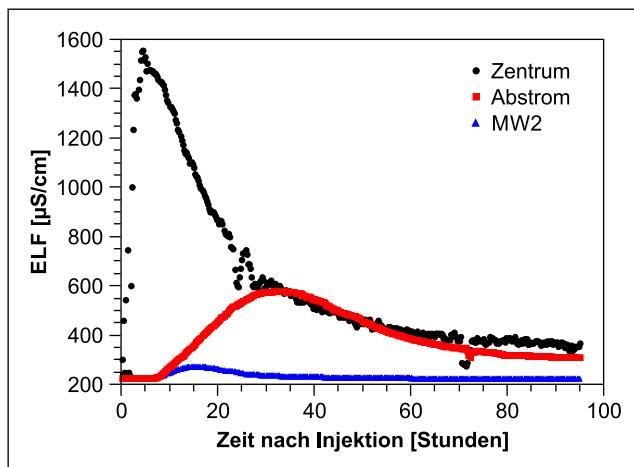


Abb. 2 Ganglinien der elektrischen Leitfähigkeit in den Grundwassermessstellen *Zentrum*, *Abstrom* und *MW2* nach Erstinjektion von 331 kg Melasse +50 kg NaCl (40.000 $\mu\text{S}/\text{cm}$) gelöst in 3 m³ Injektionsvolumen in Grundwassermessstelle IP2

um den Faktor 20 in GWM *Zentrum* (ca. 10,2 m abstromig) und um den Faktor 50 in GWM *Abstrom* (ca. 25 m abstromig) zu erkennen. GWM *MW2* reagierte nur gering auf den Salztracer und definiert folglich den seitlichen Rand des beeinflussten Bereiches. Die Ergebnisse dieses Tests belegten die hohe Strömungsgeschwindigkeit und eine damit einhergehende geringe transversale Dispersion entsprechend der vorausgegangenen Modellrechnungen. Folglich waren für punktuelle Melasseinjektionen nur schmale laterale Einflusszonen zu erwarten. Der Tracer-Test verifizierte IP2 als geeigneten Pegel zur Melasseinjektion.

Melasseinjektionen

Die Rohmelasse wurde am Standort auf 1:20 bis 1:10 verdünnt und anschließend mittels druckdichter Ankopplung an den Injektionspegel in den Untergrund injiziert. Pumperraten wurden über eine Wasseruhr kontrolliert und mittels Kugelkopfventil eingeregelt. In einem Zeitraum von 175 Tagen wurden in 38 einzelnen Injektionen (Injektionsintervalle 3 bis 14 Tage) 6,1 Tonnen Melasse (je Einzelinjektion: 78 bis 474 kg) in den Grundwasserleiter eingebracht (Abb. S2).

Gelöster organischer Kohlenstoff (DOC)

Die DOC-Konzentration wurde als Parameter für die Ausbreitung, die Verteilung, sowie den Umsatz der injizierten Melasse herangezogen (Hintergrund < 1 mg/l DOC) (Atashgahi et al. 2016). Abb. 3 zeigt den räumlichen und zeitlichen Verlauf der DOC-Konzentration.

Räumlich nahmen die DOC-Konzentrationen in Abstromrichtung (*IP2* → *Zentrum* → *Abstrom*) erwartungsgemäß ab. Zeitlich war zunächst eine nahezu vollständige

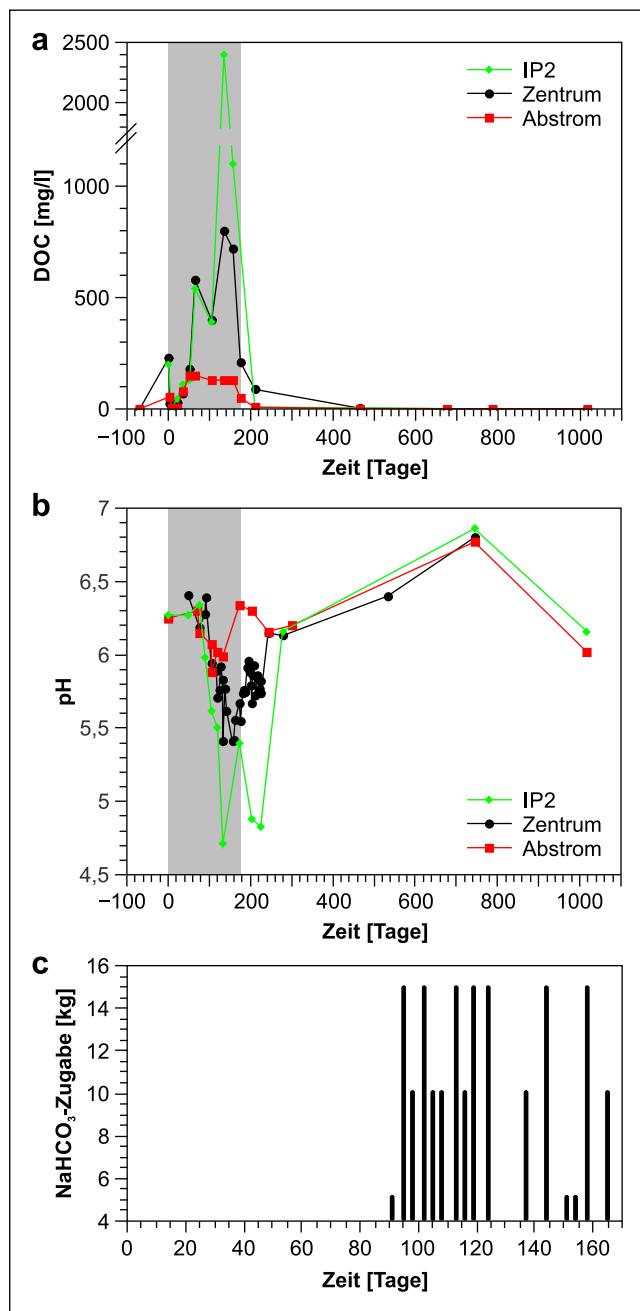


Abb. 3 Zeitlicher Verlauf von DOC (a) und pH (b) in den Grundwassermessstellen IP2, Zentrum und Abstrom. In Abb. c ist die Pufferwirkung des zudosierten NaHCO₃ nach ca. 200 Tagen erkennbar. Der graue Bereich kennzeichnet den Zeitraum der Melasseinjektionen

Zehrung der Melasse in den ersten 20 Tagen zu beobachten. Anschließend lagen die Konzentrationen bei ca. 100 mg/l DOC in den GWM Zentrum und Abstrom somit über dem gesetzten Zielwert von 20 mg/l DOC. Die zunehmenden DOC-Gehalte in GWM Zentrum und IP2 lassen sich durch einen geringeren Verbrauch an DOC für die Reduktion sedimentgebundener Elektronenakzeptoren erklären. Infolge der geringeren Zehrung der injizierten Melasse wurden ma-

ximale DOC-Werte von 800 mg/l (*Zentrum*) und 2400 mg/l (*IP2*) gemessen. 35 Tage nach der letzten Melasseinjektion waren die DOC-Werte auf 88 mg/l in GWM *Zentrum* und 8,2 mg/l im GWM *Abstrom* abgefallen mit weiter fallender Tendenz und zeigen die weitgehende Zehrung der zuvor akkumulierten Melasse.

pH-Werte

Durch den Umsatz der Melasse bzw. des darin enthaltenen Zuckers kann es zur Bildung niedermolekularer Säuren kommen, die bei geringer Pufferkapazität des Grundwasserleiters zu einer pH-Absenkung mit negativen Auswirkungen auf das biologische Abbaupotenzial führen (Delgado et al. 2012; Yang et al. 2017). Wie bei den DOC-Werten war auch bei den pH-Werten eine zeitliche und räumliche Entwicklung zu beobachten (siehe Abb. 3). Räumlich wurde die stärkste pH-Absenkung in *IP2* beobachtet (pH ≥ 4,7) während sich die Absenkung in Abstrom-Richtung abschwächte (*Zentrum* pH ≥ 5,4; *Abstrom* pH ≥ 5,9). Auf der Zeitachse nahm die pH-Absenkung mit weiteren Melasseinjektionen zu. Durch Zugabe von Natriumhydrogencarbonat ($\sum = 180$ kg) zu der Injektionslösung ab Tag 92 wurde der pH-Abfall entgegengesteuert, um eine weitere, für das biologische Abbaupotenzial kritische Absenkung zu verhindern (siehe Abb. 3). 25 Tage nach Ende der Melasseinjektionen lagen die pH-Werte bei ca. 6,4 in den GWM *Zentrum* und *Abstrom*.

Entwicklung des Redoxmilieus

Ein Ziel der Melasseinjektion war es, zuströmende sowie im Reaktionsraum vorhandene Elektronenakzeptoren (O₂, NO₃⁻, Fe³⁺, SO₄²⁻, CH₄) aufzubrauchen und somit reduktive Milieubedingungen für OHRB zu etablieren. Die Entwicklung des Redoxmilieus wird exemplarisch an der Entwicklung der redoxsensitiven gelösten Spezies in GWM *Zentrum* dargelegt (siehe Abb. 4a und b). Vor der Erstinjektion wurden Sauerstoffgehalte von 0,16 mM gemessen. Mit Beginn der Melasseinjektionen kam es zu einer vollständigen Zehrung des Sauerstoffs und in der Folge zu einem Aufbrauch von Nitrat und der Bildung von Ammonium. Im Weiteren stiegen die Konzentrationen von Fe²⁺ durch die Reduktion von Eisenoxid (Fe³⁺-Coatings) auf Werte von 1,2 mM an; anschließend kam es zur Zehrung von Sulfat einhergehend mit der Bildung von Sulfid. Methan trat erstmals 105 Tage nach Erstinjektion auf und zeigte eine maximale Konzentration von 0,85 mM nach 175 Tagen. Nach Ende der Melasseinjektionen war eine langsame Oxidation der reduzierten Spezies zu Sulfat, Nitrat und Sauerstoff zu beobachten. So wurden die Ausgangskonzentrationen erst nach 290 Tagen (SO₄²⁻) bzw. 800 Tagen (NO₃⁻/O₂) nach Injektionsende wieder erreicht.

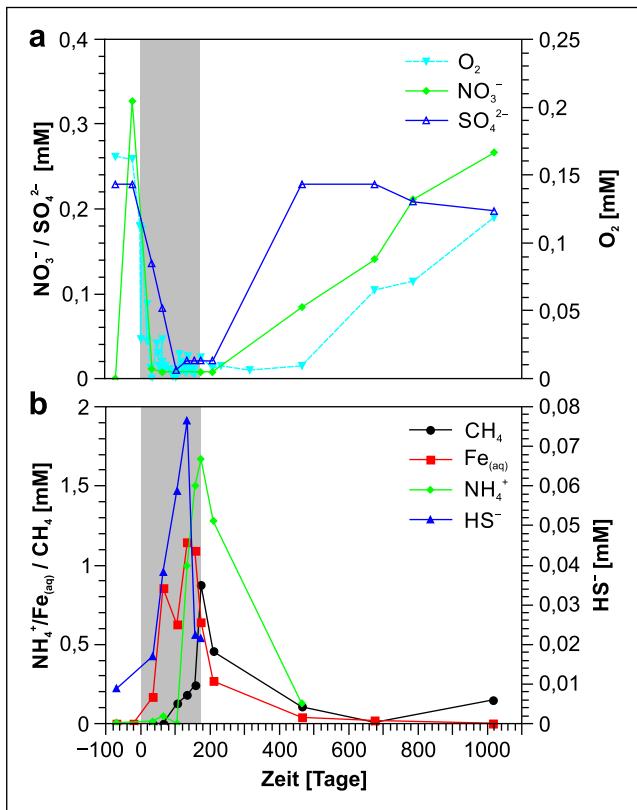


Abb. 4 Verlauf redoxsensitiver gelöster Stoffe in der Grundwassermessstelle Zentrum. **a** Entwicklung der oxidierten Spezies, **b** Entwicklung der reduzierten Spezies. Der grau markierte Bereich kennzeichnet den Zeitraum der Melasseinjektionen

Die Entwicklung der redoxsensitiven Spezies zeigte den Verbrauch vorhandener Elektronenakzeptoren entsprechend der Redoxfolge bis hin zur Etablierung von methanogenen Bedingungen (Borch et al. 2010; Christensen et al. 2000; Damgaard et al. 2013; Helz et al. 2011). Folglich konnte mittels Melasseinjektionen der gewünschte In-situ-Reaktionsraum für den vollständigen Umsatz von PCE zu Ethen etabliert werden.

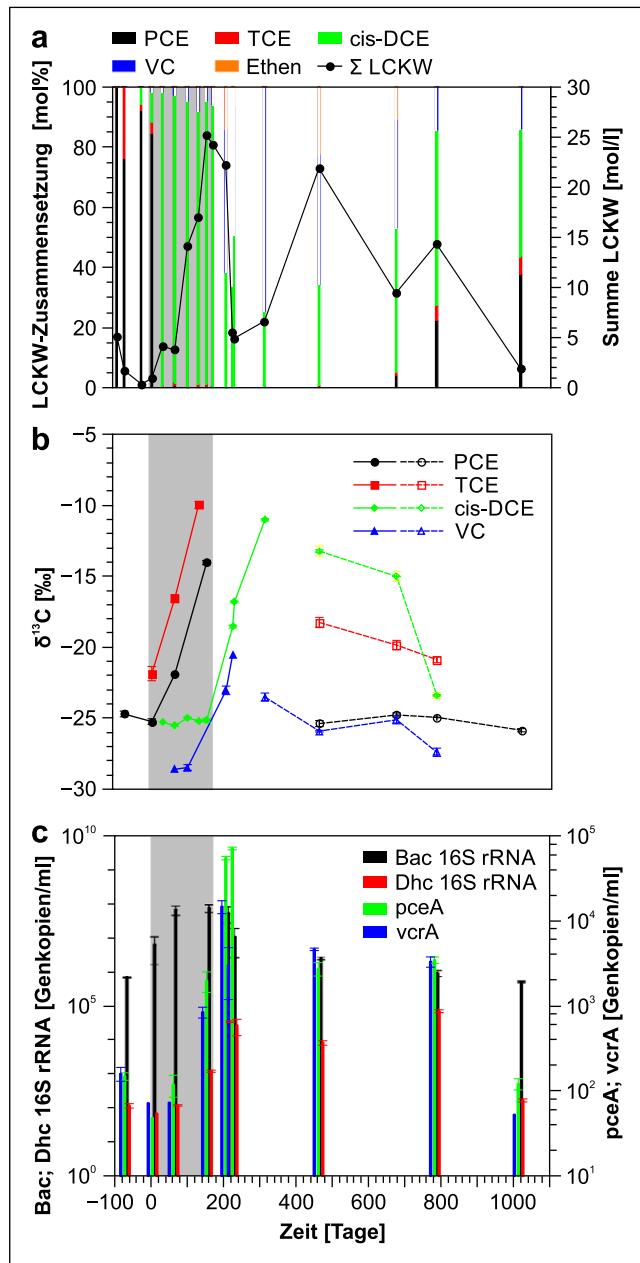
Konzentrationen und $\delta^{13}\text{C}$ -Isotopensignatur der chlorierten Ethene

Mit Beginn der Melasseinjektionen zeigte sich eine Verschiebung von einer von PCE und TCE dominierten Zusammensetzung der Schadstofffracht ($\Sigma_{\text{PCE}+\text{TCE}} = 100\%$) hin zu *cis*-DCE mit Anteil von 90–97 % (siehe Abb. 5a). Sporadisch wurde auch VC als weiteres Abbauprodukt nachgewiesen. Diese Zusammensetzung blieb über den Zeitraum der Melasseinjektionen nahezu unverändert (PCE/TCE < 1 %, *cis*-DCE > 90 %, VC < 9 %). Nach Ende der Melasseinjektionen war ein Rückgang sowohl der *cis*-DCE-Konzentration (Faktor 10), als auch eine Verringerung dessen Anteils (< 40 %) an der Schadstofffracht zu beobachten.

Gleichzeitig nahmen der Anteil an VC (< 74 %) zu, während die Anteile an PCE und TCE bei ca. 1 % lagen. Ethen konnte erstmals 30 Tage nach Ende der Melasseinjektion nachgewiesen werden und erreichte einen maximalen Anteil von 32 %. 500 Tage nach Ende der Melasseinjektion war in der LCKW-Zusammensetzung eine Rückentwicklung zu beobachten. So nahmen die Anteile und Konzentrationen an PCE und TCE stetig zu und der Anteil der Abbauprodukte VC und Ethen ab. Diese Rückentwicklung korreliert mit der Rückentwicklung des Redoxmilieus und deutet darauf hin, dass die Abbauprozesse zum Erliegen kamen und die Sanierung des Schadensherds unvollständig war.

Die initiale PCE-Isotopensignatur lag vor Sanierungsbeginn bei $-24,7\text{\textperthousand}$. Über den Zeitraum der Melasseinjektionen wurden zunehmend positivere $\delta^{13}\text{C}$ -Werte sowohl von PCE als auch von TCE beobachtet mit einer maximalen Anreicherung auf $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von $-14\text{\textperthousand}$ für PCE bzw. $-10\text{\textperthousand}$ für TCE (Abb. 5b). Auffallend sind die stets positiveren $\delta^{13}\text{C}$ -Werte von TCE im Vergleich zu PCE. Ein solches Bild entsteht, wenn der Prozess des TCE-Abbaus einer stärkeren Isotopenfraktionierung unterliegt als die TCE-Bildung. Man spricht hierbei von isotopischem Überholen (Aelion et al. 2009). Die *cis*-DCE-Isotopensignatur blieb über den Zeitraum der Melasseinjektionen mit einem Mittelwert von $-25,2\text{\textperthousand} \pm 0,2\text{\textperthousand}$ nahezu unverändert. Nach Ende der Melasseinjektion wurden die *cis*-DCE $\delta^{13}\text{C}$ -Werte sukzessive positiver (max. $\delta^{13}\text{C}$ -Werte = $-11\text{\textperthousand}$). Der VC $\delta^{13}\text{C}$ -Wert an Tag 65 lag bei $-28,6\text{\textperthousand}$. Im Folgenden wurde eine Anreicherung auf einen maximalen $\delta^{13}\text{C}$ -Wert von $-20,5\text{\textperthousand}$ (Tag 228) beobachtet. Dieser signifikant positivere $\delta^{13}\text{C}$ -Wert für VC im Vergleich zur anfänglichen PCE-Isotopensignatur ($-24,7\text{\textperthousand}$) ist konsistent mit einem Abbau von VC zu Ethen und korreliert mit dem Auftreten von Ethen.

Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für PCE 290 Tage nach Ende der Melasseinjektionen lagen bei $-25\text{\textperthousand} \pm 0,3\text{\textperthousand}$ und waren somit identisch zur initialen PCE-Isotopensignatur ($-24,7\text{\textperthousand}$). PCE, das 290 Tage nach Injektionsende wieder in der Grundwassermessstelle *Zentrum* durchbricht, unterlag somit keinem Abbau. Die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für TCE und *cis*-DCE wurden nach Ende der Melasseinjektion zunehmend leichter, was nicht durch Abbauprozesse erklärt werden kann, sondern als Resultat von Mischungsprozessen interpretiert wird. Der Verlauf der $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für *cis*-DCE kann durch folgendes Szenario erklärt werden. Der *cis*-DCE- $\delta^{13}\text{C}$ -Wert setzt sich aus zwei Komponenten zusammen: *Komponente A* ist residuale *cis*-DCE aus einem Bereich, in dem Abbau von *cis*-DCE zu VC erfolgte und besitzt folglich einen positiveren $\delta^{13}\text{C}$ -Wert. Dieses *cis*-DCE wurde gebildet, als noch geeignete Redoxbedingungen für *cis*-DCE zu VC abbauenden Bakterien vorhanden waren. *Komponente B* besteht aus *cis*-DCE, das keinem Abbau zu VC unterlag und folglich unter den dort vorherrschenden Redoxbedingungen das Endprodukt der reduktiven Abbau-



kette von PCE darstellt. Als Endprodukt besitzt dieses *cis*-DCE negativere $\delta^{13}\text{C}$ -Werte als die initiale PCE-Signatur von $-24,7\text{ ‰}$. Gebildet wurde *cis*-DCE der Komponente B, als die Redoxbedingungen nach Ende der Melasseinjektionen weniger reduktiv wurden und die Aktivität von *cis*-DCE-abbauenden Bakterien zum Erliegen kam. Ein zunehmender Mischungsanteil von Komponente B gegenüber

Komponente A erklärt die Beobachtung, dass die $\delta^{13}\text{C}$ -Werte für *cis*-DCE sukzessiv negativer wurden. Die Isotopenmessungen stellen folglich neben den Konzentrations- und Redoxmessungen eine zusätzliche unabhängige Methode dar, die den sukzessive zum Erliegen kommenden biologischen Abbau genau abbilden und plausibilisieren.

Molekularbiologische Untersuchungen

Die Bac 16S rRNA-Genkopien stiegen nach Beginn der Melasseinjektionen von 10^5 Genkopien/ml auf ein Maximum von $5 \cdot 10^7$ Genkopien/ml an (siehe Abb. 5c). Nach Ende der Melasseinjektion nahmen die Bac 16S rRNA-Genkopien stetig ab mit 10^6 Genkopien/ml nach 1017 Tagen. Vor Beginn der Melasseinjektion lag die Zahl der *Dhc* 16S rRNA-Genkopien bei $1 \cdot 10^2$ Genkopien/ml. Das Vorkommen von strikt anaeroben Bakterien wie *Dehalococcoides*, deren Metabolismus ausschließlich auf Organohalid-Atmung beschränkt ist, kann durch im Aquifer vorhandene anoxische Mikrohabitaten (< mm) erklärt werden (Adrian und Löffler 2016; Gibert et al. 1994; Madigan et al. 2013). In solchen Mikrohabitaten können geeignete Bedingungen für OHRB vorliegen, die mit der makroskopischen Auflösung in der Wassersäule einer Grundwassermessstelle nicht erfasst werden.

Mit Beginn der Melasseinjektion stieg die Zahl der *Dhc* 16S rRNA-Genkopien kontinuierlich an und erreichte ein Maximum von $3 \cdot 10^4$ Genkopien/ml an Tag 278 (103 Tage nach Ende der Melasseinjektion). Im Folgenden blieben die *Dhc* 16S rRNA-Genkopien bis Tag 786 nahezu unverändert und nahmen erst nach 1017 Tagen auf den Ursprungswert von $1,5 \cdot 10^2$ Genkopien/ml ab. Die Genkopien der beiden funktionellen Gene *pceA* und *vcrA* von *Dehalococcoides* erreichten ihr Maximum an Tag 278 mit $7 \cdot 10^4$ Genkopien/ml bzw. das *vcrA*-Gen an Tag 210 mit $1,5 \cdot 10^4$ Genkopien/ml.

Die molekularbiologischen Untersuchungen zeigten folglich ein generelles Anwachsen der Bakterien durch die Zugabe der Melasse. Wie in anderen Feldstudien konnte ein Zusammenhang zwischen dem Abbau der geringer chlorierten Ethene und der Zunahme an *Dhc*, sowie dem *vcrA*-Gen, das für ein *cis*-DCE zu Ethen abbauendes Enzym kodiert, gezeigt werden (Cupples et al. 2003; Hendrickson et al. 2002; Taş et al. 2009). Im Gegensatz dazu korrelierte der Anstieg der *pceA*-Genkopien (kodiert für ein PCE zu *cis*-DCE abbauendes Enzym) (Maymo-Gatell et al. 1990) nicht mit dem Abbau von PCE und/oder TCE. Folglich ist davon auszugehen, dass zumindest der anfängliche Umsatz von PCE zu *cis*-DCE nicht durch *Dehalococcoides*-Stämme erfolgte.

Schlussfolgernd konnte in Stufe III – Feldstudie – gezeigt werden, dass am untersuchten Standort trotz anfänglich sauerstoffhaltiger Bedingungen ein vollständiger anaerober PCE-Abbau stimuliert werden konnte. Durch wieder-

holte Melasseinjektion erfolgte eine sukzessive Reduktion energiereicher Elektronenakzeptoren und in der Folge die Ausbildung eines geeigneten Milieus für PCE zu Ethen abbauenden OHRB. Zunächst setzte der Abbau von PCE zu *cis*-DCE ein, dann mit der Ausbildung von methanogenen Bedingungen der Abbau von *cis*-DCE zu Ethen. Der Abbau der geringer chlorierten Ethene korrelierte mit der Zunahme an *Dehalococcoides* (*Dhc* 16S rRNA) und dem Markergen *vcrA*. Ab Injektionsbeginn war ein Zeitraum von 6–9 Monaten bis zum Einsetzen des vollständigen reduktiven LCKW-Abbaus erforderlich.

Isotopen- und geochemische Daten zeigen dafür, dass nach vollständiger Zehrung der injizierten Melasse die Abbauschritte nach und nach zum Erliegen kamen und im Rahmen des zeitlich begrenzten Pilotversuchs noch keine vollständige PCE-Sanierung am Standort erfolgte. Die Erkenntnisse und Erfahrungen aus dem Pilotversuch wurden nachfolgend auf einen benachbarten gröberskaligen PCE-Schadensfall erfolgreich übertragen.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie, dass bei geeigneter Substratwahl und geeigneter Versuchsführung ein kompletter reduktiver Umsatz von PCE zu Ethen auch in einem makroskopisch sauerstoffhaltigen Grundwasserleiter (O_2 initial > 4 mg/l) mit zudem ungünstiger starker Grundwasserströmung (kontinuierlicher Elektronenakzeptorzustrom) stimulierbar ist. Das systematische Vorgehen im Rahmen des Dreistufenkonzepts, ausgehend von einer Mikrokosmenstudie (Stufe I) über eine Modellierung (Stufe II) hin zur Feldstudie (Stufe III), hat sich als zielführend erwiesen im Hinblick auf die Bewertung des standorteigenen biologischen Abbaupotenzials, die Auswahl, Bedarfsabschätzung und Injektion eines geeigneten Auxiliarsubstrates und den Aufbau eines geeigneten Monitoringprogramms zum Nachweis der *in situ* ablaufenden Prozesse.

Literatur

- Adrian, L., Löffler, F.E.: Organohalide-respiring bacteria. Springer, Heidelberg (2016)
- Aelion, C.M., Patrick, H., Daniel Hunkeler, R.A.: Environmental isotopes in biodegradation and bioremediation. CRC Press, Boca Raton (2009)
- Aeppli, C., Hofstetter, T.B., Amaral, H.I.F., Kipfer, R., Schwarzenbach, R.P., Berg, M.: Quantifying *in situ* transformation rates of chlorinated ethenes by combining compound-specific stable isotope analysis, groundwater dating, and carbon isotope mass balances. Environ. Sci. Technol. **44**, 3705–3711 (2010). <https://doi.org/10.1021/es903895b>
- Atashgahi, S., Lu, Y., Zheng, Y., Saccenti, E., Suarez-Diez, M., Ramiro-Garcia, J., Eisenmann, H., Elsner, M., Stams, A.J., Springael, D., Dejonghe, W., Smidt, H.: Geochemical and microbial community determinants of reductive dechlorination at a site biostimulated with glycerol. Environ. Microbiol. **18**, 1–34 (2016). <https://doi.org/10.1111/1462-2920>
- Behrens, S., Azizian, M.F., McMurdie, P.J., Sabalowsky, A., Dolan, M.E., Semprini, L., Spormann, A.M.: Monitoring abundance and expression of *Dehalococcoides* species chloroethene-reductive dehalogenases in a tetrachloroethene-dechlorinating flow column. Appl. Environ. Microbiol. **74**, 5695–5703 (2008). <https://doi.org/10.1128/AEM.00926-08>
- Bombach, P., Richnow, H.H., Kästner, M., Fischer, A.: Current approaches for the assessment of *in situ* biodegradation. Appl. Microbiol. Biotechnol. **86**, 839–852 (2010)
- Borch, T., Kretzschmar, R., Skappler, A., Van Cappellen, P., Ginder-Vogel, M., Voegelin, A., Campbell, K.: Biogeochemical redox processes and their impact on contaminant dynamics (2010) <https://doi.org/10.1021/es9026248>
- Bradley, P.M.: Microbial degradation of chloroethenes in groundwater systems. Hydrogeol. J. **8**, 251–253 (2000). <https://doi.org/10.1007/s100400050011>
- Van Breukelen, B.M., Hunkeler, D., Volkering, F.: Quantification of sequential chlorinated ethene degradation by use of a reactive transport model incorporating isotope fractionation. Environ. Sci. Technol. **39**, 4189–4197 (2005). <https://doi.org/10.1021/es048973c>
- Buchner, D., Behrens, S., Laskov, C., Haderlein, S.B.: Resiliency of stable isotope fractionation ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{37}\text{Cl}$) of trichloroethene to bacterial growth physiology and expression of key enzymes. Environ. Sci. Technol. **49**, 13230–13237 (2015). <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02918>
- Chapelle, F.H.: Identifying redox conditions that favor the natural attenuation of chlorinated ethenes in contaminated ground-water systems. In: Office of Research and Development (Hrsg.) Proceedings of the symposium on natural attenuation of chlorinated organics in ground water, S. 19–22. Office of Research and Development, Washington, DC (1997). https://cfpub.epa.gov/si/si_public_file_download.cfm?p_download_id=438427
- Christensen, T.H., Bjerg, P.L., Banwart, S.A., Jakobsen, R., Heron, G., Albrechtse, H.-J.: Characterization of redox conditions in groundwater contaminant plumes. J. Contam. Hydrol. **45**, 165–241 (2000)
- Cupples, A.M., Spormann, A.M., McCarty, P.L.: Growth of a *Dehalococcoides*-like microorganism on vinyl chloride and *cis*-Dichloroethene as electron acceptors as determined by competitive PCR. Appl. Environ. Microbiol. **69**, 953–959 (2003). <https://doi.org/10.1128/aem.69.2.953-959.2003>
- Damgaard, I., Bjerg, P.L., Jacobsen, C.S., Tsitonaki, A., Kerr-Jespersen, H., Broholm, M.M.: Performance of full-scale enhanced reductive dechlorination in clay till. Ground Water Monit. Remediat. **33**, 48–61 (2013). <https://doi.org/10.1111/j.1745-6592.2012.01405.x>
- Delgado, A.G., Parameswaran, P., Fajardo-Williams, D., Halden, R.U., Krajmalnik-Brown, R.: Role of bicarbonate as a pH buffer and electron sink in microbial dechlorination of chloroethenes. Microb. Cell. Fact. **11**, 128 (2012). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-128>
- DIN EN 1484. Wasseranalytik – Anleitungen zur Bestimmung des gesamten organischen Kohlenstoffs (TOC) und des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC). Dtsch. Fassung EN 1484-1997-08. (1997a)
- DIN EN ISO 10301. Wasserbeschaffenheit – Bestimmung leichtflüchtiger halogenierter Kohlenwasserstoffe – Gaschromatographische Verfahren. Dtsch. Fassung EN ISO 10301-1997-07. (1997b)
- DIN 38405-7. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung – Anionen (Gruppe D) – Teil 7: Bestimmung von Cyaniden in gering belastetem Wasser mit Ionenchromatographie oder potentiometrischer Titration (D 7). 2002:04. (2002)
- DIN EN ISO 11732. Wasserbeschaffenheit – Bestimmung von Ammoniumstickstoff – Verfahren mittels Fließanalytik (CFA und FIA) und spektrometrischer Detektion. Dtsch. Fassung EN ISO 11732-2005-05. (2005)
- DIN EN ISO 10304-1. Wasserbeschaffenheit – Bestimmung von gelösten Anionen mittels Flüssigkeits-Ionenchromatographie –

- Teil 1: Bestimmung von Bromid, Chlorid, Fluorid, Nitrat, Nitrit, Phosphat und Sulfat. Dtsch. Fassung EN ISO 10304-12009-07. (2009a)
- DIN EN ISO 11885. Wasserbeschaffenheit – Bestimmung von ausgewählten Elementen durch induktiv gekoppelte Plasma-Atom-Emissionsspektrometrie (ICP-OES). Dtsch. Fassung EN ISO 118852009-09. (2009b)
- Elsner, M., Couloume, G.L., Sherwood Lollar, B.: Freezing to preserve groundwater samples and improve headspace quantification limits of water-soluble organic contaminants for carbon isotope analysis. *Anal. Chem.* **78**, 7528–7534 (2006)
- Fischer, A., Manefield, M., Bombach, P.: Application of stable isotope tools for evaluating natural and stimulated biodegradation of organic pollutants in field studies. *Curr. Opin. Biotechnol.* **41**, 99–107 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.04.026>
- Gibert, J., Danielopol, D.L., Stanford, J.A.: Groundwater ecology. Academic Press, New York, Boston, London, Oxford (1994)
- Helz, G.R., Ciglenečki, I., Krznarić, D., Bura-Nakić, E.: Aquatic redox chemistry. American Chemical Society, Washington, DC (2011) <https://doi.org/10.1021/bk-2011-1071>. ISBN 978-0841226524
- Hendrickson, E.R., Payne, J.A., Young, R.M., Starr, M.G., Perry, M.P., Fahnestock, S., Ellis, D.E., Ebersole, R.C.: Molecular analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout North America and Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 485 (2002)
- Hunkeler, D., Meckenstock, R., Sherwood Lollar, B., Schmidt, T.C., Wilson, J.T.: A guide for assessing biodegradation and source identification of organic ground water contaminants using compound specific isotope analyses (CISA). United States Environmental Prot. Agency, Washington, D.C. (2008)
- ITRC In situ bioremediation of chlorinated ethene: DNAPL source zones. BIO-LNAPL-3. Washington, D.C.: Interstate Technology & Regulatory Council, Bioremediation of Dense Nonaqueous Phase Liquids (Bio DNAPL) Team. <https://www.itrcweb.org/> (2008)
- Lee, P.K.H., Macbeth, T.W., Sorenson Jr., K.S., Deeb, R.A., Alvarez-Cohen, L., Sorenson Jr., K.S., Deeb, R.A., Alvarez-Cohen, L.: Quantifying genes and transcripts to assess the *in situ* physiology of „*Dehalococcoides*“ spp. in a trichloroethene-contaminated groundwater site. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2728 (2008). <https://doi.org/10.1128/AEM.02199-07>
- Löffler, F.E., Yan, J., Ritalahti, K.M., Adrian, L., Edwards, E.A., Konstantinidis, K.T., Müller, J.A., Fullerton, H., Zinder, S.H., Spormann, A.M.: *Dehalococcoides mccartyi* gen. nov., sp. nov., obligately organohalide-respiring anaerobic bacteria relevant to halogen cycling and bioremediation, belong to a novel bacterial class, *Dehalococcoidia* class nov., order *Dehalococcoidales* ord. nov. and famili. Int J Syst Evol Microbiol **63**, 625–635 (2013). <https://doi.org/10.1099/ijns.0.034926-0>
- Lu, X., Wilson, J.T., Kampbell, D.H.: Comparison of an assay for *Dehalococcoides* DNA and a microcosm study in predicting reductive dechlorination of chlorinated ethenes in the field. *Environ. Pollut.* **157**, 809–815 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.015>
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., Clark, D.P.: Brock Mikrobiologie. Pearson, London (2013)
- Major, D.W., McMaster, M.L., Cox, E.E., Edwards, E., Dworatzek, S.M., Hendrickson, E.R., Starr, M.G., Payne, J.A., Buonamici, L.W., David, W., McMaster, M.L., Cox, E.E., Edwards, E., Dworatzek, S.M., Hendrickson, E.R., Starr, M.G., Payne, J.A., Buonamici, L.W.: Field demonstration of successful bioaugmentation to achieve dechlorination of tetrachloroethene to ethene. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 5106–5116 (2002). <https://doi.org/10.1021/es0255711>
- Maymo-Gatell, X., Yueh-tyng, C., James, M.G., Stephen, H.Z.: Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* **80**(276), 219–221 (1990)
- Meckenstock, R.U., Morasch, B., Griebler, C., Richnow, H.-H.H.: Stable isotope fractionation analysis as a tool to monitor biodegradation in contaminated aquifers. *J. Contam. Hydrol.* **75**, 215–255 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2004.06.003>
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G.: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**(3), 695–700 (1993)
- Ni, Z., Smit, M., Grotenhuis, T., Van Gaans, P., Rijnhaarts, H.: Effectiveness of stimulating PCE reductive dechlorination: A step-wise approach. *J. Contam. Hydrol.* **164**, 209–218 (2014). <https://doi.org/10.1016/j.jconhyd.2014.06.005>
- Nijenhuis, I., Kuntke, K.: Anaerobic microbial dehalogenation of organohalides—state of the art and remediation strategies. *Curr. Opin. Biotechnol.* **38**, 33–38 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.11.009>
- Panagos, P., Hiederer, R., Van Liedekerke, M., Bampa, F.: Estimating soil organic carbon in Europe based on data collected through an European network. *Ecol. Indic.* **24**, 439–450 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.07.020>
- Pooley, K.E., Blessing, M., Schmidt, T.C., Haderlein, S.B., Macquarrie, K.T.B., Prommer, H.: Aerobic biodegradation of chlorinated ethenes in a fractured bedrock aquifer: Quantitative assessment by compound-specific isotope analysis (CSIA) and reactive transport modeling. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 7458–7464 (2009). <https://doi.org/10.1021/es900658n>
- Scheutz, C., Durant, N.D., Dennis, P., Hansen, M.H., Jørgensen, T., Jakobsen, R., Cox, E.E., Bjerg, P.L.: Concurrent ethene generation and growth of *Dehalococcoides* containing vinyl chloride reductive dehalogenase genes during an enhanced reductive dechlorination field demonstration. *Environ. Sci. Technol.* **42**, 9302–9309 (2008). <https://doi.org/10.1021/es800764t>
- Schmidt, T.C., Jochmann, M.A.: Origin and fate of organic compounds in water: Characterization by compound-specific stable isotope analysis. *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif.)* **5**, 133–155 (2012). <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-062011-143143>
- Schubert, T., Adrian, L., Diekert, G., Jena, U.: Organohalid-Atmung bei Mikroorganismen. *BIOspektrum* **22**(5), 462–464 (2016). <https://doi.org/10.1007/s12268-016-0712-1>
- Suthersan, S.S., Lutes, C.C., Palmer, P.L., Lenzo, F., Payne, F.C., Liles, D.S., Burdick, J.: Technical protocol for using soluble carbohydrates to enhance reductive dechlorination of chlorinated aliphatic hydrocarbons (2002). <http://www.dtic.mil/docs/citations/ADA611470>
- Taş, N., Van Eekert, M.H.A., Schraa, G., Zhou, J., De Vos, W.M., Smidt, H.: Tracking functional guilds: „*Dehalococcoides*“ spp. in European river basins contaminated with hexachlorobenzene. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 4696–4704 (2009). <https://doi.org/10.1128/AEM.02829-08>
- Taş, N., Van Eekert, M.H.A., De Vos, W.M., Smidt, H.: The little bacteria that can—Diversity, genomics and ecophysiology of „*Dehalococcoides*“ spp. in contaminated environments. *Microb. Biotechnol.* **3**, 389–402 (2010). <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00147.x>
- Vogel, T.M., Criddle, C.S., McCarty, P.: Transformation of halogenated aliphatic compounds. *Environ. Sci. Technol.* **21**, 722–736 (1987)
- Yang, Y., Cápiro, N.L., Marcet, T.F., Yan, J., Pennell, K.D., Löffler, F.E.: Organohalide respiration with chlorinated ethenes under low pH conditions. *Environ. Sci. Technol.* **51**(15), 8579–8588 (2017). <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01510>
- Zhao, S., Fernald, R.D.: Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J. Comput. Biol.* **12**, 1047–1064 (2005). <https://doi.org/10.1089/cmb.2005.12.1047>
- Zinder, S.H.: *Dehalococcoides* has a dehalogenation complex. *Environ. Microbiol.* **18**, 2773–2775 (2016). <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13204>
- Zwank, L., Berg, M., Schmidt, T.C., Haderlein, S.B.: Compound-specific carbon isotope analysis of volatile organic compounds in the low-microgram per liter range. *Anal. Chem.* **75**, 5575–5583 (2003)