

COMPOUND SPECIFIC ISOTOPE ANALYSIS TO INVESTIGATE SOURCES AND DEGRADATION OF GLYPHOSATE

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Vorgelegt von
Emmanuel Onyonka Mogusu
aus München

Tübingen
2015

Summary

Synthetic organic pesticides have world wide applications for agriculture and livestock management for the control of pest, disease and weeds. Increasing detection of pesticides in groundwater is of concern to drinking water providers. Therefore, to assess fate and transformation of organic pesticides in the environment the first step is to address the risks of soil and water contamination. Biodegradation, or natural attenuation, is the most sustainable approach for the removal of pesticides in the environment. However, to identify this process, conventional methods (measuring changes in concentrations and identifying metabolites) is challenging and not always conclusive. In particular, transformation products are not always detected and other processes such as dilution, dispersion and sorption may also cause changes in contaminant concentrations. Complementary tools are therefore warranted. Compound-specific isotopic analysis (CSIA) is a complementary approach to investigate sources and degradation of organic pollutants based on patterns and changes in their stable isotope ratios.

This thesis focuses on glyphosate (*N*-phosphomethylglycine), a widely used post-emerging, non-selective herbicide that is effective against weeds. Glyphosate and its main degradation product AMPA (aminomethyl phosphonic acid) are frequently detected in surface and groundwater above the EU (European Union) general concentration threshold value of pesticides (0.1 µg/L). In addition, recently, it was classified as probably carcinogenic to humans by the World Health Organization's cancer research unit. To investigate sources and degradation of glyphosate and AMPA, we bring forward CSIA as a promising complementary tool.

The first objective of this thesis was the development and optimization of a stable isotope analysis method to analyze $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ in glyphosate and AMPA. A recent study on $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ analysis of glyphosate and AMPA demonstrated the potential, but also the limitations for product authentication when only isotopes of one element were analyzed [Kujawinski et al., 2013]. My motivation was to advance isotope ratio analysis of an additional element so as to exploit the full potential of multiple elements analysis ("two-dimensional CSIA"). To this end, chapter 2 presents compound-specific $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ analysis of glyphosate and AMPA by a

two-step derivatization in combination with GC/IRMS. In the first step, the N-H group was derivatized with isopropyl chloroformate (iso-PCF), and in the second step the remaining acidic groups were methylated with trimethylsilyldiazomethane (TMSD). Buffering the solution at pH 10 was crucial to obtain accurate nitrogen isotope ratios. The limits for accurate $\delta^{15}\text{N}$ analysis of glyphosate and AMPA were 150 ng and 250 ng injected, respectively. A combination of $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ analysis (i) enabled an improved distinction of commercial glyphosate products and (ii) showed that glyphosate isotope values during degradation by MnO_2 clearly fell outside the commercial product range. This highlights the potential of combined carbon and nitrogen isotopes analysis to trace sources and degradation of glyphosate.

The second objective of my thesis was to determine isotope fractionation during degradation of glyphosate. To this end, chapter 3 was dedicated to determining bulk isotope enrichment factors in laboratory experiments as a basis to characterization abiotic and biotic degradation processes (biodegradation vs. abiotic degradation of glyphosate with MnO_2). A bacterial strain was isolated from a vineyard field site (northern France, using enrichment cultivation) and showed the ability to utilize glyphosate as phosphorus source. The strain was identified by 16S rRNA sequence analysis as *Ochrobactrum* sp. FrEM 15651. AMPA was not detected during glyphosate biodegradation, however, the evidence of sarcosine confirmed an alternative degradation route – the sarcosine pathway (C-P cleavage). A small carbon and nitrogen isotope fractionation of $-6\text{‰} \pm 0.5\text{‰}$ and $-0.6\text{‰} \pm 0.7\text{‰}$ respectively, was observed during biodegradation of glyphosate with *Ochrobactrum* sp. FrEM. This suggests that the intrinsic isotope fractionation may have been masked. The $\text{AKIE}_{\text{carbon}}$ for biotic degradation was calculated as 1.016. In the case of abiotic degradation of glyphosate with manganese dioxide (MnO_2), the nitrogen isotope fractionations were as high as $\epsilon_{\text{N}} = -17\text{‰} \pm 0.5\text{‰}$. The strong nitrogen isotope fractionation during abiotic degradation of glyphosate would leave a robust imprint of degradation in natural systems. The $\text{AKIE}_{\text{carbon}}$ during abiotic degradation was calculated as 1.011. The dual isotopic analysis for $\Delta \delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ slope (4.6 ± 0.03 , 0.4 ± 0.03) was able to distinguish abiotic and biotic degradation pathways.

The third objective of this thesis was to develop an enrichment method to extract glyphosate and AMPA from water. The Chapter 4 of this thesis describes the preliminary results of enrichment tests using activated alumina-packed columns to extract and enrich glyphosate from water. The activated alumina had an adsorption capacity and surface density of 85 mg/g and $2 \mu\text{mol}/\text{m}^2$, respectively. The adsorption of glyphosate on activated alumina was pH

dependent. Glyphosate was adsorbed at a pH value that was lower than the PZC (point of zero charge) of the alumina surface so that the surface was positively and glyphosate negatively charged. Desorption of glyphosate, in contrast, was favored above pH 10 where glyphosate molecules and the alumina surface were both negatively charged. Preliminary isotope values ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ & $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) of glyphosate after enrichment on activated alumina suggest no significant isotope effect is expected compared to the input laboratory working glyphosate standard when extraction conditions are optimized. Therefore, there is promising potential to use activated alumina for the enrichment of glyphosate and AMPA from water to enable CSIA applications to detect glyphosate degradation, and to explore the source of AMPA, in the environment.

Zusammenfassung

Synthetische organische Pestizide finden bei der Bekämpfung von Schädlingen, Krankheiten und Unkräutern in den Bereichen der Landwirtschaft und Viehzucht weltweite Anwendung. Der Nachweis dieser Pestizide in Grundwasser gewinnt immer mehr an Bedeutung bei der Trinkwasserproduktion. Daher muss zur Risikobeurteilung von möglichen Boden- und Wasserverunreinigungen das Verhalten und v.a. der Abbau der organischen Pestizide abgeschätzt werden. Der biologische Abbau, auch natürliche Attenuation genannt, stellt den nachhaltigsten Prozess dar, um Pflanzenschutzmittelverunreinigungen aus der Umwelt zu beseitigen. Allerdings kann dieser Prozess mit den momentan eingesetzten Methoden (Bestimmung von Konzentrationsänderungen und Metabolitenbestimmung) nur bedingt nachgewiesen werden, und ist nicht immer zielführend. Insbesondere besteht das Problem, dass zum einen die Abbauprodukte häufig nicht nachgewiesen werden können, und zum anderen, dass auch Prozesse wie Verdünnung, Dispersion und Sorption zu einer Abnahme der Konzentration des Pflanzenschutzmittels führen können. Aus diesem Grund braucht es zusätzliche komplementäre Herangehensweisen. Die substanz-spezifische Isotopenanalytik (CSIA) stellt eine komplementäre Vorgehensweise dar, die es ermöglicht, Kontaminationsquellen und den Abbau von organischen Umweltschadstoffen anhand von deren Mustern und Veränderungen in den stabilen Isotopenverhältnissen bei natürlicher Häufigkeit zu untersuchen.

Der Fokus meiner Doktorarbeit liegt auf dem Herbizid Glyphosat (N-Phosphomethylglycin). Es wird weitgehend in der Nacherntephase eingesetzt, gilt als nicht-selektives Herbizid und wird zur effizienten Bekämpfung von Unkräutern eingesetzt. Glyphosat und sein Hauptabbauprodukt AMPA (Aminomethylphosphonsäure, engl. aminomethyl phosphonic acid) werden häufig in Oberflächengewässern und Grundwässern detektiert und übersteigen oftmals den von der EU (Europäischen Union) für Pestizide festgelegten Grenzwert von 0.1 µg/L. Weiterhin wurde vor kurzem Glyphosat von der Krebsforschungsagentur der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als „wahrscheinlich krebserzeugend beim Menschen“ eingestuft. Um Kontaminationsquellen und Abbau von Glyphosat und AMPA besser charakterisieren zu können, wurde CSIA dieser beiden Zielsubstanzen, als vielversprechende komplementäre Herangehensweise erprobt.

Das erste Ziel der Arbeit bestand in der Entwicklung und der Optimierung der isotopenanalytischen Methode zur Bestimmung des $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Verhältnisses (natürliche Häufigkeiten) von Glyphosat und AMPA. In einer kürzlich veröffentlichten Studie zur Bestimmung des $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ Verhältnisses von Glyphosat und AMPA konnte das Potenzial, aber auch die Limitierung gezeigt werden, wenn zur Produktauthentifizierung nur das Isotopenverhältnis eines Elements herangezogen wird [Kujawinski et al., 2013]. Meine Motivation bestand daher darin, die Analyse des Isotopenverhältnisses eines weiteren Elements voranzutreiben um das ganze Potenzial einer Mehrelementanalyse („zweidimensionale CSIA“) auszuschöpfen. In diesem Zusammenhang wird im zweiten Kapitel der Arbeit die substanz-spezifische $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ Isotopenanalyse des Glyphosats und AMPA mittels eines zweistufigen Derivatisierungsverfahrens in Kombination mit der gaschromatographischen Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (GC/IRMS) vorgestellt. Im ersten Schritt wurde die N-H Bindung mit Hilfe von Isopropylchlorformiat (iso-PCF) derivatisiert. Im zweiten Schritt wurde die verbleibende Säuregruppe mit Trimehtylsilyldiazomethan (TMSD) methyliert. Um richtige Stickstoffisotopenverhältnisse bestimmen zu können, war es entscheidend, dass die gepufferte Lösung einen pH von 10 hatte. Die analytische Grenze für präzise und richtige $\delta^{15}\text{N}$ Analysen lag für Glyphosate bei injizierten 150 ng und für AMPA bei 250ng. Die Kombination von $\delta^{15}\text{N}$ und $\delta^{13}\text{C}$ Analysen ermöglichte (i) eine verbesserte Unterscheidbarkeit von kommerziell erhältlichen Glyphosatprodukten und zeigte (ii), dass die Isotopenwerte von Glyphosat nach Abbau mittels MnO_2 eindeutig außerhalb des Bereiches der kommerziell erhältlichen Produkte gewesen sind. Dies unterstreicht das Potenzial der kombinierten Kohlenstoff und Stickstoff Isotopenanalysen bei der Identifikation der Quellen und des Abbaus von Glyphosat.

Das zweite Ziel meiner Doktorarbeit war die Bestimmung der Isotopenfraktionierung während des Abbaus von Glyphosat. Dementsprechend handelt das dritte Kapitel von der Bestimmung von „bulk“ Isotopenanreicherungsfaktoren, die aus Abbaustudien im Labor gewonnen wurden. Diese Anreicherungsfaktoren dienen als Grundlage zur Charakterisierung von abiotischen und biotischen Abbauprozessen (Bioabbau vs. abiotischen Abbau von Glyphosat mittel MnO_2). Dazu wurde zuerst ein Bakterienstamm aus der Umwelt (Weinanbaugebiet, Nordfrankreich) isoliert (Anreicherungskultivierung), der die Fähigkeit hat, Glyphosat als Phosphorquelle zu nutzen. Der Bakterienstamm wurde mittels 16S rRNA Sequenzanalysen als *Ochrobactrum* sp. FrEM 15651 charakterisiert. AMPA wurde während des biologischen Abbaus von Glyphosat nicht detektiert. Der Nachweis von Sarkosin

hingegen, bestätigte einen alternativen Abbaueg- den Sarkosin Abbaueg (C-P Bindungsbruch). Mit $\epsilon_{\text{Kohlenstoff}} = -6\text{‰} \pm 0.5\text{‰}$ und $\epsilon_{\text{Stickstoff}} = -0.6\text{‰}$ fiel die detektierbare C und N Isotopenfraktionierung, die mit dem Glyphosatabbau durch *Ochrobactrum sp.* FrEM assoziiert gewesen ist, gering aus. Dies lässt vermuten, dass die intrinsische Isotopenfraktionierung „maskiert“ gewesen ist. Der daraus abgeleitete $\text{AKIE}_{\text{Kohlenstoff}}$ betrug für den biologischen Abbau 1.016. Im Falle des abiotischen Glyphosatabbaus mittels Mangandioxid (MnO_2) hingegen betrug die Stickstoffisotopenfraktionierung $\epsilon_{\text{Stickstoff}} = -17\text{‰} \pm 0.5\text{‰}$. Die, während des abiotischen Glyphosatabbaus auftretende stark ausgeprägte Isotopenfraktionierung im Stickstoff würde vermutlich auch in natürlichen Systemen einen robusten „Fußabruck“ des Abbaus hinterlassen. Der $\text{AKIE}_{\text{Kohlenstoff}}$ betrug für den abiotischen Abbau 1.011. Anhand der unterschiedlichen Steigungen ($\Delta_{\text{biotic}} = 4.6 \pm 0.03$ und Δ_{abiotic}) der zweidimensionalen Isotopenplots ($\delta^{13}\text{C}$ vs $\delta^{15}\text{N}$) war es möglich den abiotischen und biotischen Abbaueg des Glyphosates zu unterscheiden.

Das dritte Ziel der Arbeit bestand in der Entwicklung einer Anreicherungs-methode, um Glyphosat und AMPA aus Wasser zu extrahieren. In Kapitel 4 werden die Ergebnisse aus Anreicherungsverfahren, die - mit Hilfe von mit aktiviertem Aluminiumoxid gepackten Säulen - Glyphosat und AMPA aus Wasser extrahierten und anreicherten, gezeigt und diskutiert. Das aktivierte Aluminiumoxid hatte eine Adsorptionskapazität von 85 mg/g und eine Oberflächendichte von $2 \mu\text{mol}/\text{m}^2$. Die Adsorption des Glyphosates auf dem aktivierten Aluminiumoxid war pH abhängig. Glyphosat wurde bei einem pH, der niedriger als der PZC (Nullladungspunkt) des Aluminiumoxides war, adsorbiert. Somit war die Oberflächenladung des Aluminiumoxides positiv und die Ladung des Glyphosates zugleich negativ. Im Gegensatz dazu war die Desorption des Glyphosates bei einem pH über 10 begünstigt. Bei diesem pH sind sowohl die Glyphosatmoleküle als auch die Oberfläche des Aluminiumoxides negativ geladen. Bisher gemessene Isotopenwerte ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ & $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) deuten darauf hin, dass nach weiterer Optimierung des getesteten Anreicherungsverfahrens keine signifikanten Veränderungen im ursprünglichen Isotopenverhältnis des Glyphosates zu erwarten sind. Deshalb besteht das Potenzial, dass die Anwendung von aktiviertem Aluminiumoxid zur Anreicherung von Glyphosat und AMPA aus Wasserproben es ermöglicht, CSIA zur Erforschung der Herkunft von AMPA und dem Nachweis des Glyphosatabbaus in der Umwelt anzuwenden.