

**„Sorption and Degradation Studies of Organic Environmental Chemicals  
by Compound-specific Stable Isotope Analysis”**

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
Heide Katharina Viola Schürner, geb. Bensch  
aus Starnberg

Tübingen  
2015

## Summary

In view of the increasing worldwide importance of groundwater as drinking water resource, the investigation of organic micropollutants and their behavior in the environment is of great societal interest. A prime of environmental sciences is, therefore, to obtain a process understanding of the biological and physical behavior of these substances, which is essential for risk assessments regarding the environment and human health. However, evaluating these processes is often difficult, since, for instance, the degradation of a pollutant may be overestimated, if only concentrations are determined and dilution is not taken into account. In recent years, Compound-specific Stable Isotope Analysis (CSIA) has developed into an important tool, particularly in the assessment of biological pollutant degradation by microorganisms. This method analyzes the change in the naturally occurring isotopic ratio (*e.g.*,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) during a (bio)chemical reaction and, therefore, offers the ability to assess degradation independent of concentration measurements. To this end, the influence of physical processes such as sorption and diffusion on observable isotope fractionation is typically neglected.

In the first part of this work, CSIA was used to investigate the degradation mechanism of the herbicides atrazine and ametryn by the enzyme *s*-triazine hydrolase (TrzN), an enzyme which plays a central role in important microorganisms responsible for natural *s*-triazine degradation. Previous studies with *Arthrobacter aurescens* TC1 showed an inverse nitrogen isotope effects in atrazine degradation that delivered highly characteristic  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  fractionation trends for pathway identification and suggested that a *s*-triazine ring nitrogen atom was protonated in the enzyme TrzN. Additionally, TrzN crystal structure and mutagenesis indicated proton transfer from the residue E241. This study tested the general validity of these conclusions for atrazine and ametryn with purified TrzN and a site-directed mutant (TrzN-E241Q). The degradation of both herbicides by TrzN revealed a normal carbon and an inverse nitrogen isotope effect. TrzN-E241Q lacked activity with ametryn, whereas degradation of atrazine showed again a normal carbon and an inverse nitrogen isotope effect. Surprisingly, mutant TrzN-E241Q was – despite its loss of the acidic function – still capable

of activating the substrates by protonation implicating another proton donor besides E241. Additionally, analysis of the sulfur isotope ratios of ametryn revealed that bond cleavage between ametryn and the  $\text{CH}_3\text{S}^-$  leaving group in enzymatic catalysis with TrzN was rate-determining, while this is not the case for ametryn hydrolysis at pH 1.75. Furthermore, the measured normal sulfur isotope effect provided an explanation why TrzN-E241Q is able to convert atrazine, but not ametryn. Overall, the results emphasize a robust inverse  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  fractionation pattern for identifying microbial *s*-triazine hydrolysis in the environment caused by multiple protonation options in TrzN. The results of this study were recently published in Environmental Science and Technology.

A second part of this work took a step towards natural systems and investigated isotope fractionation of organic micropollutants in a mesoscale aquifer model with the aim to enhance the understanding of how degradation and sorption of this substance class is reflected in compound-specific isotope values. Particular emphasis was paid to the possibility of CSIA to provide direct evidence of different microbial degradation kinetics as indicators of limitations to degradation at low concentrations. In a previous study on the degradation and sorption behavior of toluene, an U-shaped breakthrough profile of carbon isotope ratios was indicative of Michaelis-Menten kinetics indicating a strong concentration dependency of degradation. In the present study, the behavior of 2,6-dichlorobenzamide (BAM), bentazone, diclofenac, and ibuprofen was investigated. A comparison of their concentration breakthrough curves with that of the conservative tracer  $\text{D}_2\text{O}$  demonstrated that BAM and ibuprofen showed neither degradation nor sorption, while bentazone was transformed, but did not sorb. Diclofenac, in contrast, showed both degradation and sorption. Subsequently, carbon and nitrogen isotope fractionation confirmed the results for BAM (no degradation, no sorption), while significant enrichment of  $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  compared to input values corroborated degradation of diclofenac. In contrast to toluene, however, a S-shaped rather than an U-shaped isotope profile was obtained indicating that first-order kinetics prevailed (combined with sorption) and that the degradation kinetics was independent of concentrations. Thus, these results confirm that isotope analysis is not only an appropriate method to monitor micropollutants in aquifers. In addition, it allows making statements about prevailing degradation kinetics revealing the natural limitations of *in situ* biodegradation. This information bears potential to support, for instance, remediation strategies for affected aquifers.

A third part of this work focused on isotope fractionation caused by physical processes, in particular by sorption. The aim of this project was to provide a basic understanding of the processes associated with the sorption of contaminants to soil components. Thereby, the isotope effects that occur during sorption of a substance between water and organic soil matrix were investigated by separate consideration of water-air and organic phase-air partitioning, respectively. This methodological approach is based (i) on the fact that in air no interactions between molecules occur and (ii) on the assumption that hydrogen bonds (normal isotope effect) and van-der-Waals forces (inverse isotope effect) represent the most important intermolecular interactions. To test these hypotheses, the equilibrium isotope effects of carbon (benzene, triethylamine, and trichloromethane) and hydrogen (trichloromethane) were determined for water-air partitioning with a modified headspace vial. For organic phase-air partitioning, some restrictions arose and the isotope analysis in this system is therefore pending. Nevertheless, the calculation of the expected sorption isotope effect using the measured water-air partitioning effect and a literature value (Rayleigh distillation of the pure substance) for benzene demonstrated good consistency with the isotope effect obtained in a study that investigated sorption of benzene to humic substances. Thus, for the first time sorption isotope effects could be explained by the underlying interactions between the solute and its surrounding solvent providing fundamental process understanding of sorption in different condensed phases.

## Zusammenfassung

Im Hinblick auf die weltweit steigende Bedeutung von Grundwasser als Trinkwasserquelle ist die Untersuchung von organischen Spurenschadstoffen und deren Verhalten in der Umwelt von großem gesellschaftlichem Interesse. Hierbei steht vor allem das Prozessverständnis des biologischen und physikalischen Verhaltens dieser Substanzen im Mittelpunkt der Umweltwissenschaften, was für eine Risikoabschätzung der Gefahren für Mensch und Umwelt unerlässlich ist. Die Beurteilung dieser Prozesse ist jedoch oft schwierig, da durch Konzentrationsbestimmungen allein beispielsweise der Abbau eines Schadstoffes überschätzt würde, wenn Verdünnung nicht berücksichtigt wird. Substanzspezifische Stabilisotopenanalytik (CSIA) hat sich in den letzten Jahren, insbesondere bei der Bewertung des biologischen Schadstoffabbaus durch Mikroorganismen, zu einem wichtigen Instrument entwickelt und bietet durch die Analyse der während einer (bio)chemischen Reaktion auftretenden Änderung des natürlichen Isotopenverhältnisses (z.B.  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) die Möglichkeit, Abbau unabhängig von Konzentrationsbestimmung zu beurteilen. Dabei wird der Einfluss, den physikalische Prozesse wie Sorption und Diffusion auf die zu beobachtende Isotopenfraktionierung haben, typischerweise vernachlässigt.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde CSIA zur Aufklärung des Abbaumechanismus der Herbizide Atrazin und Ametryn durch das Enzym *s*-Triazinhydrolase (TrzN) verwendet. Dieses Enzym spielt eine zentrale Rolle in wichtigen Mikroorganismen, die für den Atrazinabbau in der Umwelt verantwortlich sind. Erste Studien mit *Arthrobacter aurescens* TC1 zeigten einen inversen Stickstoffisotopeneffekt beim Abbau von Atrazin, der charakteristische  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  Fraktionierung zur Identifizierung des Abbauweges lieferte und vermuten ließ, dass eines der Stickstoffatome des aromatischen *s*-Triazinringes durch das Enzym TrzN protoniert wird, wobei die Kristallstruktur und eine Mutagenese des Enzymes auf eine Protonenübertragung durch die Aminosäure Glutaminsäure E241 hindeuteten. Die generelle Gültigkeit dieser Schlussfolgerungen wurde in der vorliegenden Arbeit für Atrazin und Ametryn mit gereinigtem TrzN und einem spezifischen Mutanten (TrzN-E241Q) getestet. Der Abbau beider Herbizide mit TrzN ergab einen normalen Kohlenstoff- und einen inversen Stickstoffisotopeneffekt. Eine Umsetzung von Ametryn mit TrzN-E241Q war nicht möglich, wohingegen der Abbau von Atrazin erneut einen normalen Kohlenstoff- und einen inversen Stickstoffisotopeneffekt zeigte. Mutant TrzN-E241Q war

somit trotz Verlustes der Säurefunktion überraschenderweise in der Lage die Substrate durch Protonierung eines Stickstoffatoms zu aktivieren, was neben Glutaminsäure E241 auf einen weiteren Protonendonator innerhalb des katalytisch aktiven Zentrums hindeutet. Die Analyse der Schwefelisotopenverhältnisse von Ametryn ergab zudem, dass in der enzymatischen Katalyse mit TrzN der Bindungsbruch zwischen Ametrynmolekül und Abgangsgruppe  $\text{CH}_3\text{S}^-$  geschwindigkeitsbestimmend ist, während dies auf die chemische Hydrolyse bei pH 1.75 nicht zutrifft. Des Weiteren lieferte der gemessene normale Schwefelisotopeneffekt eine Erklärung dafür, dass TrzN-E241Q zwar Atrazin, jedoch nicht Ametryn umwandelt. Insgesamt betonen die Ergebnisse der Studie das Vorhandensein einer charakteristischen, inversen Fraktionierung von  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$  durch mehrfache Protonierungsmöglichkeiten in TrzN, die zur Identifizierung mikrobiologischer Hydrolyse von *s*-Triazinen in der Umwelt dienen kann. Die Ergebnisse dieser Studie wurden kürzlich in „Environmental Science and Technology“ veröffentlicht.

Ein weiteres Kapitel dieser Arbeit machte einen Schritt in Richtung natürlicher Systeme und befasste sich mit der Isotopenfraktionierung von organischen Spurenschadstoffen in einem mesoskaligen Modell eines Grundwasserleiters, mit dem Ziel, das Verständnis darüber zu erweitern, wie Abbau und Sorption dieser Substanzklasse in der Umwelt durch komponentenspezifische Isotopenwerte wiedergegeben wird. Besonderer Fokus lag dabei auf der Möglichkeit, CSIA zu verwenden, um einen direkten Nachweis von verschiedenen mikrobiellen Abbaukinetiken als Indikatoren für deren Limitationen gegenüber dem Abbau bei niedrigen Konzentrationen zu liefern. So konnte in einer ersten Studie zum Abbau- und Sorptionsverhalten von Toluol gezeigt werden, dass das U-förmige Durchbruchprofil der Kohlenstoffisotope ein Hinweis auf Michaelis-Menten-Kinetik war und auf eine starke Abhängigkeit des Abbaus von der Konzentration hinwies. In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten der Kontaminanten 2,6-Dichlorbenzamid (BAM), Bentazon, Diclofenac und Ibuprofen zunächst durch Vergleich ihrer Konzentrationsdurchbruchkurven mit der des konservativen Tracers  $\text{D}_2\text{O}$  ermittelt. BAM und Ibuprofen zeigten dabei weder Abbau, noch Sorption, während Bentazon umgewandelt wurde, aber nicht sorbierte. Diclofenac zeigte hingegen sowohl Abbau, als auch Sorption. Anschließend bestätigte die fehlende Kohlenstoff- und Stickstoffisotopenfraktionierung die Ergebnisse für BAM (kein Abbau, keine Sorption), während deutliche Anreicherung von  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  gegenüber dem Ausgangswert Abbau von Diclofenac untermauerte. Im Gegensatz zu Toluol jedoch, wurde ein S-förmiges anstatt eines U-förmigen Isotopenprofils erhalten, was darauf hindeutet, dass

eine Abbaukinetik 1. Ordnung (zusammen mit Sorption) vorherrschte und die Abbaukinetik unabhängig von der Diclofenackonzentration war. Diese Ergebnisse bestätigen somit, dass Isotopenanalytik nicht nur eine geeignete Methode ist, um Spurenschadstoffe in Grundwasserleitern zu überwachen. Durch die Erfassung charakteristischer Isotopenprofile ist es zudem möglich, Aussagen über vorherrschende Abbaukinetiken zu treffen und somit die natürlichen Limitationen des Schadstoffabbaus aufzudecken. Diese Informationen können beispielsweise eine Sanierung betroffener Grundwasserleiter unterstützen.

Der letzte Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Isotopenfraktionierung, die durch physikalische Prozesse hervorgerufen wird, wobei besonders die Sorption im Vordergrund stand. Ziel des Projektes war es dabei, ein grundlegendes Verständnis für die Prozesse zu schaffen, die mit der Sorption von Kontaminanten an Bodenbestandteile zusammenhängen. Die Isotopeneffekte, die bei der Sorption einer Substanz zwischen Wasser und organischer Bodenmatrix auftreten, wurden dabei durch getrennte Betrachtung der Substanzverteilung zwischen Wasser-Luft und organischer Phase-Luft aufgeschlüsselt. Dieser methodische Ansatz beruht darauf, dass (i) in Luft keinerlei Wechselwirkung zwischen Molekülen stattfindet und (ii) Wasserstoffbrückenbindungen (normaler Isotopeneffekt) und van-der-Waals Kräfte (inverser Isotopeneffekt) die wichtigsten intermolekularen Wechselwirkungen darstellen. Mit dem entwickelten Modellsystem (ein speziell angefertigtes Headspace-Vial) konnte die Isotopenfraktionierung von Kohlenstoff (Benzol, Triethylamin und Trichlormethan) und Wasserstoff (Trichlormethan) im Gleichgewicht zwischen Wasser und Luft bestimmt werden. Für die Verteilung zwischen organischer Phase und Luft ergaben sich Einschränkungen in dem oben genannten System, daher steht die Isotopenanalytik in diesem System noch aus. Dennoch zeigte die Berechnung des erwarteten Sorptionsisotopeneffektes mittels des gemessenen Wasser-Luft- und eines Literaturwertes (Rayleigh-Destillation der reinen Substanz) für Benzol eine gute Übereinstimmung mit einer Studie, die die Sorption von Benzol an Huminstoffe untersuchte. Damit konnten Sorptionsisotopeneffekte zum ersten Mal mit den Wechselwirkungen zwischen gelöstem Stoff und dem ihn umgebenden Lösungsmittel erklärt werden, was ein grundlegendes Prozessverständnis für Sorption in verschiedenen kondensierten Phasen liefert.