

**Deutsch-Israelisches Wassertechnologie-Forschungsprogramm**

Joint German-Israeli Water Technology Research Program

**Schlussbericht**

Entwicklung eines innovativen Verfahrens für die  
Bewertung des *in situ*-Abbaus von bromorganischen  
Schadstoffen im Grundwasser

Innovative tools for the evaluation of *in situ* degradation of brominated organic contaminants  
in groundwater

“INTIME”

**Zuwendungsempfänger:** Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ  
Permoserstr. 15  
04318 Leipzig

**Ausführende Stelle:** Department Isotopenbiogeochemie

**Projektleiter:** Dr. Hans H. Richnow

**Bearbeiter:** Dr. Kevin Kuntze  
Dr. Ivonne Nijenhuis

**Kooperationspartner:** Ben-Gurion University of the Negev (BGU)  
P.O.B. 653  
The Department of Environmental Hydrology and Microbiology  
Zuckerberg Institute for Water Research  
The Jacob Blaustein Institute for Desert Research  
Beer Sheva 84105 Israel  
Prof. Dr. Zeev Ronen

**Projektzeitraum:** 01.09.2011 – 31.12.2014

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem **Förderkennzeichen 02WU1221** gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

Leipzig, 23.06.2015

Dr. Kevin Kuntze  
(Projektbearbeiter)

Dr. Ivonne Nijenhuis  
(Projektbearbeiter)

Dr. Hans H. Richnow  
(Projektleiter)

## **I. Kurze Darstellung**

### **1. Aufgabenstellung**

Ziel des Forschungsprojektes war die Entwicklung eines Verfahrens zur Bewertung der natürlichen Rückhalte- und Abbauprozesse (*natural attenuation*) bromierter organischer Verbindungen (BOC). Zur Erfassung des biologischen Abbaus dieser BOCs sollte ein Konzept der Komponenten-spezifischen Isotopenanalyse (CSIA) entwickelt werden. Die Fraktionierungsfaktoren sollten zur Entwicklung eines multi-dimensionalen Konzeptes zur Charakterisierung und Quantifizierung des *in situ*-Abbaus zusammengefasst werden, mit dessen Hilfe das natürliche Abbaupotential persistenter bromierter Schadstoffe in Aquiferen beurteilt werden sollte. Parallel dazu sollten molekularbiologische Methoden zur Erfassung der Biodiversität BOC-abbauender Mikroorganismen entwickelt werden. Abschließend sollten die entwickelten Isotopen- und molekularbiologischen Konzepte zum Abbau bromierter Kontaminanten in konventionelle Grundwasserüberwachungsstrategien implementiert und zur Erfassung des natürlichen Abbaupotentials in kontaminierten Grundwasserleitern des Negevgebietes in Israel erprobt werden.

### **2. Voraussetzungen unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde**

Am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH – UFZ standen die nötige Infrastruktur und das Knowhow zur Komponenten-spezifischen Isotopenanalyse und zur Charakterisierung und Quantifizierung des *in situ*-Abbaus zur Verfügung. Für die Durchführung des Vorhabens wurde zum 01.01.2012 der promovierte Wissenschaftler Dr. Kevin Kuntze eingestellt.

Die Planung und Durchführung des Projektes erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Zeev Ronen von der Ben-Gurion Universität (BGU) in SedeBoqer, Israel (Negevgebiet) sowie den Kooperationspartnern an der Geological Survey of Israel (GSI) in Jerusalem (Dr. Faina Gelman und Dr. Ludwik Halicz). Am GSI stand die nötige Infrastruktur zur Bromisotopenanalyse zur Verfügung. Die Feldarbeiten am Industriestandort im Negevgebiet wurden in Kooperation mit der BGU durchgeführt.

Die Auswertung der Felddaten sowie die Entwicklung und Bewertung eines allgemeinen Bewertungskonzepts für die Altlastenbearbeitung wurde in Zusammenarbeit mit der Isodetect GmbH (Leipzig, Deutschland) durchgeführt.

### **3. Planung und Ablauf des Vorhabens**

Der Beginn des Vorhabens war am 01.09.2011 mit einer Laufzeit von 36 Monaten. Die Einstellung des für dieses Projekt zuständigen Mitarbeiters Dr. Kevin Kuntze erfolgte zum 01.01.2012. Mit dem Schreiben vom 05.06.2014 wurde der Antrag auf kostenneutrale Laufzeitverlängerung zum 31.12.2014 seitens BMBF bestätigt. Die Planung des Forschungsprojektes erfolgte anhand der im Antrag auf Forschungsförderung erarbeiteten Arbeitspakete und Meilensteine.

Die unter Abschnitt II dargestellten Ergebnisse zeigten, dass sich die Erfahrungen aus dem Abbau chlororganischer Verbindungen nicht direkt auf den Abbau bromorganischer Verbindungen übertragen ließen. Diese Ergebnisse wurden mit der Antragsstellung nicht erwartet. Demzufolge musste unter anderem das Methodenkonzept der Isotopen-

fraktionierung im Abbau verschiedener bromorganischen Substanzklassen mit Hilfe des CSIA-Verfahrens innerhalb des Projektes völlig neu gestaltet werden, was zu einem höheren Aufwand in der Bearbeitung der AP 1, 2, 4 und 5 führte. Drei Probenkampagnen (03/2012, 10/2012, 04/2014) erfolgten für die Bearbeitung der AP 5 und 6, wobei bei den ersten beiden Probenkampagnen die Erkundung des Standortes, die Aufnahme des Schadstoffprofils sowie die Gewinnung von Probenmaterial für die Bearbeitung der AP 3 und AP 4 im Vordergrund standen. Im Zuge der Probenkampagnen ergab sich eine unerwartete hohe Komplexität der hydrologischen Bedingungen im Kluftaquifer am Feldstandort Ramat Hovav (Negevgebiet) in Israel (siehe Ergebnisse AP6). Diese Komplexität erschwerte und verzögerte die Anwendung und Auswertung der Felddaten. Die Daten aus Voruntersuchungen haben diesen Umstand bei der Antragstellung nicht erwarten lassen. So musste im Verlauf des Projektes ein neues Standortmodell des Kluftaquifers entwickelt werden (AP6).

#### **4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere**

- mit Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden;
- Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste.

Zu Beginn des Forschungsprojektes gab es nur wenige Kenntnisse über den mikrobiellen Abbau von BOCs. Dies galt besonders für die Biodegradation unter anoxischen Milieubedingungen, welche oftmals in kontaminierten Aquiferen vorherrschen. Erste Arbeiten zeigten eine mikrobielle Aktivität im Abbau von bromierten Ethenen und Propenen [1-3]. Im Vergleich zur relativ gut untersuchten mikrobiellen reduktiven Dechlorierung gab es vor Beginn des Forschungsprojektes keine systematischen Untersuchungen der anaeroben Debromierungswege.

Das CSIA-Verfahren eröffnet Möglichkeiten den *in situ*-Abbau von Kontaminanten in Aquifersystemen zu untersuchen [4]. Infolge des mikrobiologischen Abbaus verändert sich das Isotopenverhältnis eines Schadstoffs (z.B.  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ), weil chemische Verbindungen aus leichten Isotopen schneller umgesetzt werden. Demzufolge kommt es zu einer Anreicherung von schweren Isotopen im noch nicht umgesetzten Schadstoffpool. Dieser Prozess wird als Isotopenfraktionierung bezeichnet. Das CSIA-Verfahren erfordert die Kenntnis von Isotopenfraktionierungsfaktoren. Zu Beginn des Forschungsprojektes lagen keinerlei Faktoren für die Kohlenstoff- sowie Bromisotopenfraktionierung bromierter Schadstoffe vor.

Das von unserem israelischen Partner entwickelte Verfahren der Bromisotopenanalyse basiert auf der Kopplung der Gaschromatographie mit einem *multicollector inductively coupled plasma mass spectrometer* (GC-MC-ICPMS) [5-7]. Dieses Verfahren wurde in diesem Forschungsprojekt erstmals für die Bestimmung von Bromisotopenfraktionierungsfaktoren in mikrobiellen Abbauprozessen angewandt. Das Verfahren der mehrdimensionalen Isotopenanalyse eröffnet des Weiteren neue Perspektiven zur verbesserten Charakterisierung und Quantifizierung des *in situ*-Schadstoffabbaus [8-9]. Auf Grund der geringen Verfügbarkeit genauer und empfindlicher Methoden zur Bromisotopenanalyse war die mehrdimensionale CSIA zur Erfassung des Abbaus bromierter Schadstoffe zu Beginn des Forschungsprojektes kaum entwickelt.

Mit der Untersuchung, ob Mikroorganismen, die zur reduktiven Dechlorierung befähigt sind, auch analoge Bromverbindungen umsetzen, sollte überprüft werden, ob die molekularbiologischen Methoden für den *in situ*-Nachweis von debromierenden

Mikroorganismen angewandt werden können. Verwendet wurden die bekannten Verfahren zum Nachweis von mikrobiellen Gemeinschaften, die unter anderem chlorierte Ethene abbauen (z.B. *Sulfurospirillum* spp., *Desulfitobacterium* spp., *Geobacter* sp., *Dehalococcoides* spp.) [10-13]. Einige dieser Methoden wurden bereits erfolgreich in Feldstudien zum Abbau von chlorierten Schadstoffen angewandt [14-15].

Zu Beginn des Forschungsprojektes war bekannt, dass unter anderem BOCs wichtige Grundwasserleiter im Bereich des Chemieindustriearials Ramat Hovav (Neot Hovav) in der Negev-Wüste kontaminieren. An diesem Standort befindet sich die Hauptproduktion der Chlor- und Bromchemie in Israel. Der Untergrund des Standortes ist hauptsächlich durch klüftigen Kalkstein mit zum Teil wenig durchlässigen Bereichen gekennzeichnet. Eine genaue Grundwasserfließrichtung war nicht bekannt.

- [1] Maymo-Gatell X, Chien Y, Gossett JM & Zinder SH (1997) Isolation of a bacterium that reductively dechlorinates tetrachloroethene to ethene. *Science* **276**: 1568-1571.
- [2] Magnuson JK, Romine MF, Burris DR & Kingsley MT (2000) Trichloroethene reductive dehalogenase from *Dehalococcoides ethenogenes*: sequence of tceA and substrate range characterization. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5141-5147.
- [3] Ye LD, Schilhabel A, Bartram S, Boland W & Diekert G (2010) Reductive dehalogenation of brominated ethenes by *Sulfurospirillum multivorans* and *Desulfitobacterium hafniense* PCE-S. *Environmental Microbiology* **12**: 501-509.
- [4] Meckenstock RU, Morasch B, Griebler C & Richnow HH (2004) Stable isotope fractionation analysis as a tool to monitor biodegradation in contaminated aquifers. *Journal of Contaminant Hydrology* **75**: 215-255.
- [5] Van Acker MRMD, Shahar A, Young ED & Coleman ML (2006) GC/multiple collector-ICPMS method for chlorine stable isotope analysis of chlorinated aliphatic hydrocarbons. *Analytical Chemistry* **78**: 4663-4667.
- [6] Sylva SP, Ball L, Nelson RK & Reddy CM (2007) Compound-specific Br-81/Br-79 analysis by capillary gas chromatography/multicollector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **21**: 3301-3305.
- [7] Gelman F & Halicz L (2010) High precision determination of bromine isotope ratio by GC-MC-ICPMS. *International Journal of Mass Spectrometry* **76**: 2336-2342.
- [8] Fischer A, Herklotz I, Herrmann S, et al. (2008) Combined carbon and hydrogen isotope fractionation investigations for elucidating benzene biodegradation pathways. *Environmental Science & Technology* **42**: 4356-4363.
- [9] Abe Y, Aravena R, Zopfi J, Shouakar-Stash O, Cox E, Roberts JD & Hunkeler D (2009) Carbon and Chlorine Isotope Fractionation during Aerobic Oxidation and Reductive *Technology* **43**: 101-107.
- [10] Smidt H, Akkermans ADL, van der Oost J & de Vos WM (2000) Halorespiring bacteria molecular characterization and detection. *Enzyme and Microbial Technology* **27**: 812-820.
- [11] Smits THM, Devenoges C, Szynalski K, Maillard J & Holliger C (2004) Development of a real-time PCR method for quantification of the three genera *Dehalobacter*, *Dehalococcoides*, and *Desulfitobacterium* in microbial communities. *Journal of Microbiological Methods* **57**: 369-378.
- [12] Cupples AM (2008) Real-time PCR quantification of *Dehalococcoides* populations: Methods and applications. *Journal of Microbiological Methods* **72**: 1-11.
- [13] Fletcher KE, Costanza J, Cruz-Garcia C, Ramaswamy NS, Pennell KD & Löffler FE (2011): Effects of Elevated Temperature on *Dehalococcoides* Dechlorination Performance and DNA and RNA Biomarker Abundance. *Environmental Science & Technology* **45**: 712-718.
- [14] Nijenhuis I, Nikolausz M, Koth A, et al. (2007) Assessment of the natural attenuation of chlorinated ethenes in an anaerobic contaminated aquifer in the Bitterfeld/Wolfen area using stable isotope techniques, microcosm studies and molecular biomarkers. *Chemosphere* **67**: 300-311.
- [15] Imfeld G, Nijenhuis I, Nikolausz M, et al. (2008) Assessment of in situ degradation of chlorinated ethenes and bacterial community structure in a complex contaminated groundwater system. *Water Research* **42**: 871-882.

## **5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Außer mit dem im Antrag auf Förderung beschriebenen Kooperationspartnern mit der BGU, GSI und der Isodetect GmbH sowie der für die Organisation der Probenahme am Feldstandort verantwortlichen lokalen Stellen erfolgte keine weitere Zusammenarbeit mit anderen Stellen.

## II Eingehende Darstellung

### 1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnis im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Die eingehende Darstellung der Forschungsergebnisse wird im Folgenden den jeweiligen Arbeitspaketen zugeordnet.

#### AP1: Mikrobielle Debromierung

In diesem Arbeitspaket sollte die mikrobielle Debromierung mit der bereits gut untersuchten Dechlorierung verglichen werden. Abbauversuche von bromierten Ethenen und Benzolen unter primär anoxischen Bedingungen sollten mit bekannten dechlorierenden Mikroorganismen durchgeführt werden.

#### *Ergebnisse & Auswertung*

In diesem AP wurden wie geplant die Modellorganismen *Sulfurospirillum multivorans* und *Desulfitobacterium hafniense* mit *cis/trans*-1,2-Dibromethen (1,2-DBE) als terminale Elektronenakzeptoren kultiviert. Ein vollständiger Abbau zu Ethen wurde bestätigt. Ein Wachstum auf 1,1,2-Tribromethen wurde nicht nachgewiesen. Dieser bromierte Schadstoff wird demnach nur mittels Zell-freiem Extrakt (AP2) umgesetzt. Eine Substrataufnahme während des Wachstums scheint demnach verhindert zu sein. Die Ergebnisse wurden für die Ermittlung der Kohlenstoff- und Bromisotopenfraktionierungsfaktoren verwendet (AP2).

Das geplante Spektrum der zu untersuchenden bromorganischen Substanzklassen (bromierte Ethene und Benzole) wurde zudem mit den Untersuchungen zum Abbau von Dibrommethan (DBM) und 1,2-Dibromethan (EDB) erweitert. Diese Verbindungen besitzen aufgrund ihrer Toxizität und möglichen karzinogenen Eigenschaften ebenfalls eine hohe Umweltrelevanz. Über einen *in vivo*-Abbau dieser Verbindungen war zu Beginn dieses Forschungsprojektes nicht viel bekannt. Es wurden sowohl der aerobe sowie der anaerobe Abbau dieser Verbindungen untersucht. Mit dem Abschluss dieses APs wurde erstmalig der mikrobiologische Abbau dieser Verbindungen nachgewiesen. So wies der verwendete Dichlormethan (DCM)-abbauende Mikroorganismus *Hyphomicrobium* sp. GJ-21 auch eine aerobe Abbauaktivität für DBM auf, unter anoxischen Bedingungen wird diese Verbindung jedoch nicht umgesetzt. EDB wird unter oxischen Bedingungen durch *Ancylobacter aquaticus* und unter anoxischen Bedingungen durch *S. multivorans* vollständig beziehungsweise zu Ethen abgebaut. In der Umsetzung der bromierten Schadstoffe ergaben sich jedoch signifikante Unterschiede im Vergleich zu den chlorierten Verbindungen. So erfolgt unter anderem ein Abbau von DBM erst nach vorheriger Kultivierung auf DCM. Des Weiteren ist die Aktivität im Abbau von DBM wesentlich geringer als von DCM. Ein simultaner Abbau von DCM und DBM wurde nicht nachgewiesen. Prozesse wie Substrataufnahme und Substratbindung können einen Einfluss auf die Reaktionskinetik haben. Die ermittelten Abbauraten wurden für eine Bewertung des *in situ*-Abbaus verwendet (AP6). Durch die erfolgreiche Kultivierung auf DBM konnten erstmalig Kohlenstoff- und Bromisotopenanreicherungsfaktoren ermittelt werden (AP2). Ein Abbau unter anoxischen Bedingungen für DBM wurde nicht nachgewiesen. Damit ist ein anaerober Abbau von DBM (und DCM) weiterhin weitestgehend unbekannt. Im aeroben Abbau von EDB wurde analog zum Abbau von 1,2-Dichlorethan (DCA) eine nucleophile Substitution als initialer Reaktionsschritt vermutet. Diese wurde mit den Untersuchungen in diesem AP erstmalig

nachgewiesen. Für den anaeroben Abbau von EDB wurde eine Dibromoeliminierung nachgewiesen. Die reduktive Dehalogenase PceA aus *S. multivorans* setzt demnach neben den chlorierten Ethenen auch bromierte Ethene und EDB um (AP3). Ein Abbau von DCA wurde überraschend nicht nachgewiesen. Demnach ergeben sich in der anaeroben Umsetzung von EDB Unterschiede zum chlorierten Äquivalent. Die biologischen (sowie chemischen, siehe AP4) Abbaureaktionen des EDB wurden für die Ermittlung der Kohlenstoff- und Bromisotopenfraktionierungsfaktoren genutzt (AP2).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte Wagner *et al.* 2012<sup>1</sup> zeigen, dass der Mikroorganismus *Dehalococcoides mccartyi* Stamm CBDB1 Tri, Di und Monobrombenzol als terminale Elektronenakzeptoren in einer anaeroben Atmungskette nutzen kann. Diese Ergebnisse wurden in diesem Forschungsprojekt genutzt. Mit der etablierten Kultivierung wurden erstmalig Isotopenfraktionierungsfaktoren ermittelt (AP2).

Die Laboruntersuchungen zum mikrobiologischen Abbau von BOCs zeigen, dass ein Abbau nicht auf chlorierte Verbindungen begrenzt ist, sondern auch BOCs umgesetzt werden können. Es ist zu vermuten, dass ein solcher Abbau auch unter *in situ*-Bedingungen stattfindet (AP5). Die Ergebnisse zeigen jedoch wesentliche Unterschiede in der Spezifität und Aktivität im Vergleich zu den chlorierten Verbindungen. Etablierte Methoden und Konzepte zum *in situ*-Nachweis für chlorierte Verbindungen können somit nicht direkt auf bromorganische Verbindungen übertragen werden. Eine nähere Betrachtung der Reaktionsmechanismen sollte mit dem Konzept der dualen Isotopenfraktionierung erfolgen (AP4).

## **AP2: Isotopenfraktionierung und Bestimmung von Isotopenanreicherungsfaktoren**

In diesem Arbeitspaket sollte die Isotopenfraktionierung im mikrobiellen Abbau ausgewählter bromierter Verbindungen (Ergebnisse aus AP1) im Vergleich zu chlorierten Substraten untersucht werden. Es sollten Fraktionierungsfaktoren für Wasserstoff-, Kohlenstoff- und Bromisotopen ermittelt werden. Zusammenfassend sollte eine Datenbank mit Isotopenfraktionierungsfaktoren für ausgewählte bromierte Modelverbindungen aufgebaut werden.

### *Ergebnisse & Auswertung*

Die Bestimmung der Kohlenstoffisotopenverhältnisse ( $\delta^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) erfolgte mittels GC-C-IRMS (*gas chromatography combustion isotope ratio mass spectrometry*) am UFZ. Die Bestimmung der Bromisotopenverhältnisse ( $\delta^{81}\text{Br}/^{79}\text{Br}$ ) erfolgte mittels GC-MC-ICPMS (*gas chromatography multicollector plasma mass spectrometry*) in Zusammenarbeit am GSI in Israel.

Mit dem Abschluss dieses APs liegt für den Abbau von BOCs zum ersten Mal eine umfangreiche Datenbank an Kohlenstoff- und Bromisotopenfraktionierungsfaktoren vor (Tabelle 1, Abschnitt III). Die Fraktionierungsfaktoren wurden für die Erarbeitung eines zweidimensionalen-CSIA-Konzepts verwendet (AP4). Das CSIA-Verfahren kann somit zum Monitoring des *in situ*-Abbaus bromierter Schadstoffe in der konventionellen Grundwasser-Überwachung eingesetzt werden (AP7).

Mit den ermittelten Fraktionierungsfaktoren ergeben sich jedoch signifikante Unterschiede im Vergleich zum Abbau chlororganischer Verbindungen. So fällt unter anderem die Kohlenstoffisotopenfraktionierung im aeroben Abbau von DBM zehnfach geringer aus als im

---

<sup>1</sup> Wagner A, Cooper M, Ferdi S, Seifert J & Adrian L (2012) Growth of *Dehalococcoides mccartyi* strain CBDB1 by reductive dehalogenation of brominated benzenes to benzene. *Environmental science & technology* 46: 8960-8968



Abbau von DCM. In Versuchen mit Mischungen von DCM und DBM wurde gezeigt, dass die Isotopenfraktionierung des Abbaus des DCM nicht durch einem simultanen Abbau des DBM beeinflusst wird. Demnach können die jeweils ermittelten Fraktionierungsfaktoren für eine Bewertung des *in situ*-Abbaus verwendet werden. Unterschiede in der Isotopenfraktionierung ergaben sich auch im anaeroben Abbau von bromierten Ethenen (1,1,2-TBE und *cis/trans*-1,2-DBE; reduktive Debromierung) sowie im aeroben und anaeroben Abbau von EDB im Vergleich zum chlorierten Äquivalent. Die Kohlenstoffisotopenfraktionierung der Debromierung unterscheidet sich des Weiteren signifikant zwischen den für den Abbau verwendeten Modellorganismen, wohingegen die Bromisotopenfraktionierung nahezu identisch ist. Die für den anaeroben Abbau der bromierten Benzole ermittelten Kohlenstofffraktionierungsfaktoren aus Versuchen mit Zellsuspensionstests unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Konstitutionsisomeren (z.B. 1,2- und 1,3-Dibrombenzol) und sind unabhängig vom Ausgangssubstrat (z.B. Hexa- oder Tribrombenzol), mit denen die Zellsuspensionen kultiviert wurden. Diese Erkenntnis ist essentiell für eine Bewertung des *in situ*-Abbaus bromierter Benzole.

Die Ergebnisse zur Isotopenfraktionierung beim Abbau der BOCs im Vergleich zu den chlorierten Verbindungen zeigen, dass die Isotopenfraktionierung von chlorierten Substanzen dieser Stoffklasse nicht auf die bromierten analogen Substanzen übertragen werden können. Dies muss in der Bewertung des *in situ*-Abbaus berücksichtigt werden (AP6). Die Ergebnisse deuten entweder auf einen unterschiedlichen Mechanismus im initialen Abbauschritt oder auf eine starke Ratenlimitierung hin, gegeben beispielsweise durch eine geringere Substrataufnahme oder eine unterschiedliche Substratbindung am Enzym. Diese Faktoren spielen für die Bewertung des *in situ*-Abbaus eine große Rolle. Die vorliegende Datenbank an Fraktionierungsfaktoren des Abbaus von BOCs ermöglicht erstmalig den Nachweis und Quantifizierung des *in situ*-Abbaus dieser Verbindungen. Eine Variabilität der Fraktionierungsfaktoren zwischen verschiedenen Mikroorganismen, welche die gleichen bromorganischen Schadstoffe verwerten, verdeutlicht die Notwendigkeit der genauen Kenntnis der mikrobiellen Gemeinschaft am Standort (AP3).

Eine Wasserstoffisotopenfraktionierung wurde bislang nicht untersucht, weil die Methode zur Bestimmung der Wasserstoffisotopenmuster noch nicht vollständig entwickelt wurde. Im Verlauf dieses Vorhabens wurde gezeigt, dass die Wasserstoffisotopenbestimmung von Halogenverbindungen neu entwickelt werden muss<sup>2</sup>. Unsere Untersuchungen haben des Weiteren gezeigt, dass unter anoxischen Bedingungen (Grundwasser im Negevgebiet) die reduktive Debromierung und die Dibromoeliminierung die relevanten initialen Reaktionsmechanismen sind. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Kohlenstoff-Brom-Bindungsspaltung. Erst im folgenden Schritt erfolgt die Protonierung (im Falle der Debromierung). Demzufolge würde eine Wasserstoffisotopenfraktionierung keine für einen Nachweis des *in situ*-Abbaus relevanten Informationen liefern.

### **AP3: Molekularbiologischer Nachweis debromierender Mikroorganismen *in situ***

In diesem AP stand die Entwicklung von molekularbiologischen Methoden zum Nachweis von debromierenden Mikroorganismengemeinschaften im Fokus. Es sollte überprüft werden, inwieweit molekularbiologische Sonden zum Nachweis für Debromierer verwendet werden

---

<sup>2</sup> Gehre M, Renpenning J, Gilevska T, Qi H, Coplen TB, Meijer HA, Brand WA & Schimmelmann A (2015) On-line hydrogen-isotope measurements of organic samples using elemental chromium: an extension for high temperature elemental-analyzer techniques. *Anal Chem* 87: 5198-5205

können. Hierbei sollte ermittelt werden, ob dieselben Enzyme der Dechlorierung auch zur Debromierung befähigt sind und entsprechend exprimiert werden.

### *Ergebnisse & Auswertung*

Die Ergebnisse aus AP1 und AP2 zeigen signifikante Unterschiede im Abbau der bromierten im Vergleich zu den chlorierten organischen Verbindungen. Ob identische oder unterschiedliche Enzyme den jeweiligen Abbau katalysieren, konnte in diesem AP nicht vollständig geklärt werden. Die reduktiven Dehalogenasen (PceA) aus *S. multivorans* und *D. hafniense* katalysieren sowohl die Debromierung (als auch die Dechlorierung) bromierter (chlorierter) Ethene bis hin zum Ethen. Des Weiteren katalysiert die Dehalogenase aus *A. aquaticus* sowohl die Umsetzung von Dichlorethan als auch Dibromethan. Die Aktivität dieser Enzyme scheint demnach nicht auf chlorierte Verbindungen begrenzt zu sein. Es ergaben sich jedoch auch signifikante Unterschiede in Spezifität und Kinetik. PceA aus *S. multivorans* scheint demnach ausschließlich die Umsetzung von EDB zu katalysieren. Die Unterschiede in der Umsetzung von DBM und DCM können ebenfalls einen enzymatischen Grund haben. Untersuchungen dazu werden nach Projektende anhand von Genomuntersuchungen fortgesetzt. Welche Enzyme die Umsetzung von bromierten Benzolen in *D. mccartyi* katalysieren, konnte nicht aufgeklärt werden. Bisherige Untersuchungen weisen auf eine Expressierung von 6 verschiedenen reduktiven Dehalogenasen während der Umsetzung von bromierten Benzolen. Untersuchungen zur Spezifität des Abbaus bromorganischer Schadstoffe sind essentiell für eine Bewertung des *in situ*-Abbaus. Bereits etablierte Verfahren zum Nachweis mikrobieller Gemeinschaften, die chlororganische Verbindungen abbauen, können demnach nur teilweise auf den Nachweis von BOC-abbauenden Mikroorganismen übertragen werden (AP6). Ob spezifische Enzyme oder möglicherweise spezifische Organismen zum ausschließlichen Abbau von BOCs befähigt sind, sollte anhand einer umfangreichen Mikrokosmen-Studie im AP5 untersucht werden.

### **AP4: Entwicklung eines multidimensionalen CSIA-Konzeptes**

Ziel dieses AP war mit den aus AP1 und AP2 erzielten Ergebnissen die Erstellung und Erprobung eines multidimensionalen CSIA-Konzeptes, bei dem die Korrelation der Isotopenfraktionierung als Indikator für den Abbau und die Unterscheidung von Reaktionsmechanismen bzw. aerobe und anaerobe Abbauewege genutzt werden.

### *Ergebnisse & Auswertung*

Aus den in AP1 und AP2 erzielten Ergebnissen war erstmalig eine zweidimensionale (2D) Betrachtung der Isotopenfraktionierung ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  vs.  $^{81}\text{Br}/^{79}\text{Br}$ ) im Abbau von BOCs möglich (Tabelle 1, Abschnitt III). Wie anschaulich in Abbildung 1 am Beispiel von EDB dargestellt, kann durch die 2D-Isotopenfraktionierung zwischen verschiedenen Reaktionsmechanismen unterschieden werden (z.B. nucleophile Substitution und Dibromoeliminierung bzw. biologischen/biotischen zu chemischen/abiotischen). Die Isotopenfraktionierung bei einer Reaktion nach dem Mechanismus einer nucleophilen Substitution (AP1 und 3) unterscheidet sich bei dem biologischen aeroben Abbau des EDB (Umsetzung durch *A. aquaticus*, AP1) signifikant zur Dibromoeliminierung im biologischen anaeroben Abbau (Umsetzung durch *S. multivorans*, AP1). Zur näheren Aufklärung des Reaktionsmechanismus wurden in Kooperation mit unseren israelischen Partnern zusätzliche chemische (abiotische) Abbauxperimente (alkalische Hydrolyse, Oxidation mittels Fenton-Reaktion, chemische

reduktive Debromierung) durchgeführt. Die Unterschiede in der Isotopenfraktionierung zwischen chemischem und biologischem Abbau indizieren einen möglichen Einfluss einer Ratenlimitierung oder eines unterschiedlichen Reaktionsmechanismus bei dem biologischen Abbau. Demnach können die Fraktionierungsfaktoren des chemischen Abbaus nicht auf den biologischen Abbau übertragen werden. Eine 2D-Isotopenfraktionierung ermöglicht somit eine Unterscheidung von chemischen und mikrobiellen *in situ*-Abbauprozessen. Neben den Untersuchungen zum Abbau von EDB liegen mit dem Abschluss dieses APs auch erstmalig Ergebnisse zur 2D-Isotopenfraktionierung des anaeroben Abbaus von TBE und DBE sowie des aeroben Abbaus von DBM vor. Erstaunlich war dabei, dass Untersuchungen mit den Modellorganismen *S. multivorans* und *D. hafniense* eine Variabilität in der 2D-Fraktionierung zeigen, obwohl es sich hierbei um den gleichen Reaktionsmechanismus (reduktive Debromierung) handelt. Mögliche Einflussfaktoren können unter anderem die Substratbindung am Enzym sein. Diese Ergebnisse bilden demnach eine essentielle Grundlage für weitere spezifische Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus.

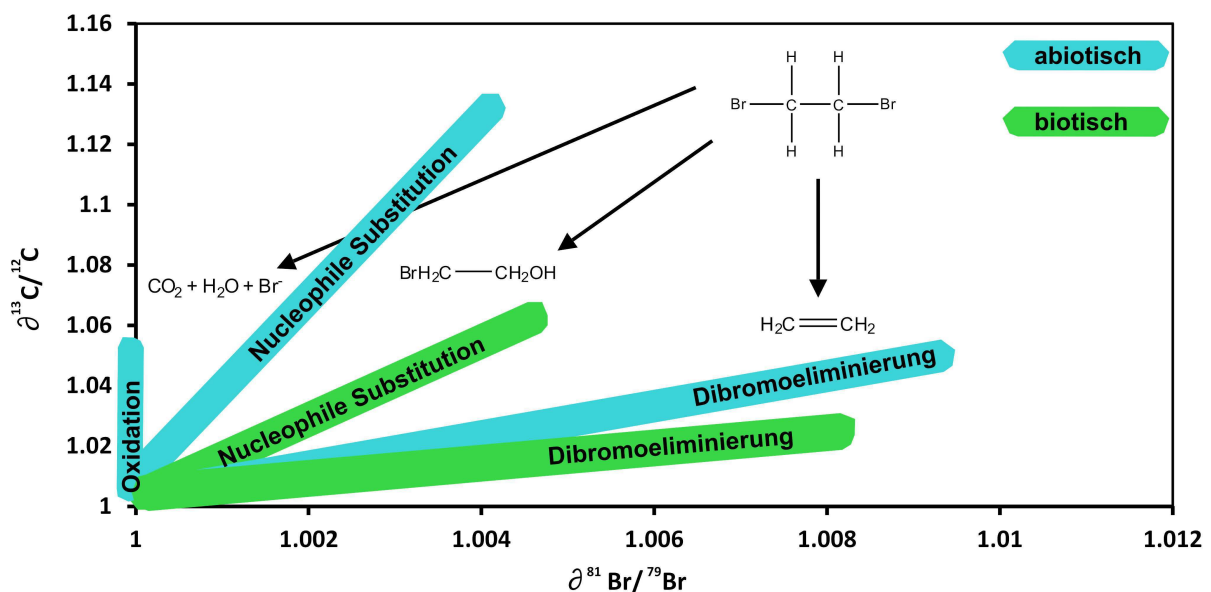


Abb. 1: Anschauliche Darstellung der 2D-Isotopenfraktionierung im abiotischen (blau) und biotischen Abbau (grün) von EDB (Daten im Erfolgskontrollbericht dargestellt).

#### AP5: Entwicklung eines Konzeptes zum Nachweis des *in situ*-Abbaus

Aus den Resultaten der APs 3 und 4 sollte in diesem AP ein integratives Konzept zur Erfassung des *in situ*-Abbaus von bromierten Schadstoffen entwickelt werden. Das Konzept sollte in definierten Laborsystemen mit Anreicherungskulturen aus belasteten Standorten aus dem Negev Bereich geprüft werden.

#### Ergebnisse & Auswertung

Es wurde gezeigt, dass sich das neu entwickelte zweidimensionale CSIA-Konzept zum Nachweis des *in situ*-Abbaus von bromorganischen Schadstoffen hervorragend eignet. So kann bereits mit Hilfe des CSIA-Konzeptes zwischen verschiedenen chemischen und mikrobiellen Abbauprozessen unterschieden werden. Die Variabilität der Isotopenfraktionierung zwischen verschiedenen Mikroorganismen, welche die gleiche Abbaureaktion katalysieren (AP 4), zeigt jedoch die Notwendigkeit der zusätzlichen Untersuchung der gegebenen mikrobiellen Gemeinschaft, wenn zur Quantifizierung des Abbaus ein spezifischer Isotopenfraktionierungsfaktor ausgewählt werden soll. Ergebnisse

aus AP3 zeigen dabei die Möglichkeit der Übertragung von Nachweismethoden für Mikroorganismen, welche chlororganische Schadstoffe abbauen. Im AP3 konnte jedoch nicht hinreichend geklärt werden, ob spezifische Enzyme oder möglicherweise spezifische Organismen die Umsetzung von bromorganischen Schadstoffen katalysieren. Dies sollte mittels einer umfangreichen Mikrokosmenstudie in diesem AP näher untersucht werden. Anhand der Untersuchungen im Industriegebiet Hovav (Negev) (AP6) wurden verschiedene Grundwasserleiter für eine potentielle Anreicherung von BOC-abbauenden Mikroorganismen ausgewählt. Neben Grundwasser diente auch Sediment aus einem mit chlororganischen Schadstoffen kontaminierten Industriegebiet in Deutschland (Kooperation innerhalb des Departments Isotopenbiogeochemie) als Inoculum. Es wurden Ansätze erstellt, in denen jeweils chlorierte und bromierte Ethene, Ethane bzw. Methane sowie eine Mischung aus beiden als mögliche Elektronenakzeptoren vorgelegt wurden. Als Elektrondonor-/Kohlenstoffquelle diente Lactat, H<sub>2</sub>/Acetat sowie die bereits im Grundwasser/Sediment vorhandene organische Zusammensetzung. Zusammenfassend wiesen nach einer langen Adaptionsphase (bis zu 6 Monate) die Mikrokosmen mit bromierten Schadstoffen eine höhere Aktivität auf als Ansätze mit chlorierten Verbindungen. Eine solche Aktivität wurde vor allem in Ansätzen mit EDB nachgewiesen. Aktive Ansätze wurden entsprechend angereichert und hinsichtlich der Diversität und Aktivität der mikrobiellen Gemeinschaft untersucht. So zeigten aktive Ansätze eine spezifische Anreicherung von teilweise bis zu 90% Reinheit (z.B. Anreicherungen der Gattung *Desulfovibrio* auf EDB mit der weitere Untersuchungen geplant sind). Leider konnten die Arbeiten zur Untersuchung, ob spezifische Enzyme diesen Abbau katalysieren, aufgrund der unerwarteten langen Adaptionszeit und des langsamen Wachstums nicht abgeschlossen werden. Die Untersuchungen zur mikrobiellen Gemeinschaft in Zusammenhang mit den 2D-CSIA zeigen jedoch bereits die erfolgreiche Anwendung des entwickelten integrativen Konzepts aus molekularbiologischen Methoden und des CSIA-Verfahrens. High-throughput-Methoden wie die Illumina-Sequenzierung ermöglichen eine vergleichsweise kostengünstige und schnelle Methode zur (semi)-quantitativen Analyse der gegebenen mikrobiellen Gemeinschaft. Das integrative Konzept soll perspektivisch um den quantitativen Nachweis funktioneller Gene, welche spezifische BOC-abbauende Enzyme kodieren, erweitert werden. Die Ergebnisse aus diesem AP ermöglichen neben der erfolgreichen Anwendung des integrativen Konzepts zum Nachweis des *in situ*-BOC-Abbaus auch erstmalig detaillierte Untersuchungen von Mikroorganismen, welche ausschließlich diesen Abbau katalysieren.

#### **AP6: Anwendung des Konzeptes zur Beurteilung des Abbaus bromierter Verbindungen am Standort**

In diesem Arbeitspaket sollten die entwickelten molekularbiologischen und CSIA-Methoden zusammen mit hydrologischen und hydrochemischen Informationen zur Charakterisierung des *in situ*-Abbaus der bromierten Schadstoffe am Industriestandort Hovav im Negevgebiet eingesetzt werden. Begleitend sollte die Isodetect GmbH die erforderlichen Randbedingungen für die Verwendung der entwickelten molekularbiologischen und CSIA-Methoden bei konventionellen Monitoringkampagnen bewerten und Handlungsempfehlungen für eine verbesserte Verknüpfung der verschiedenen Verfahren ableiten.

#### *Ergebnisse & Auswertung*

Im Zuge der Probenkampagnen ergab sich eine unerwartete hohe Komplexität der hydrologischen Bedingungen im Kluftaquifer am Feldstandort Ramat Hovav in Israel. Diese Komplexität erschwerte die Anwendung des entwickelten Konzeptes zum Nachweis des *in*

*situ*-Abbaus der BOCs am Standort. Die Fließwege im Kluftaquifer konnten nur unzureichend ermittelt werden und damit war der hydrologische Fließweg kompliziert zu rekonstruieren. Für die Anwendung des CSIA-Verfahrens (Rayleigh Gleichung) zur Quantifizierung mittels Isotopenfraktionierung ist die Kenntnis des Fließweges wichtig. Etablierte hydrologische Modelle für eine Auswertung und Quantifizierung des *in situ*-Abbaus von bromorganischen Schadstoffen anhand stabiler Isotopensignaturen konnten demnach nur zum Teil verwendet werden. Die Daten aus Voruntersuchungen haben diesen Umstand bei der Antragstellung nicht erwarten lassen. Im Verlauf des Projektes wurde ein neues Standortmodell des Kluftaquifers entwickelt. In diesem Modell (Mixing-Cells-Model) wird der Eintrag verschiedener Grundwasserleiter innerhalb des Kluftaquifers anhand von ermittelten Schadstoffkonzentrationen unter Berücksichtigung der hydraulischen Verhältnisse modelliert. Die Anwendung des CSIA-Konzeptes erbrachte unter anderem den Nachweis des *in situ*-Abbaus von Vinylbromid und DBM. Neben der Anwendung des CSIA-Konzeptes wurde am Standort eine umfangreiche Biodiversitätsstudie durchgeführt. So wurden neben der Aufnahme der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft mit Hilfe von Taxon-spezifischen Primern unter anderem Bakterien der Gattungen *Dehalococcoides* and *Geobacter* nachgewiesen. Insbesondere Bakterien der Gattung *Dehalococcoides* sind als dehalogenierende Bakterien beschrieben. Funktionelle Gene von reduktiven Dehalogenasen wurden nur an drei Grundwassermessstellen nachgewiesen.

Die Isodetect GmbH erarbeitete anhand der Ergebnisse folgende Handlungsempfehlungen für die Verwendung der entwickelten molekularbiologischen und CSIA-Methoden bei konventionellen Monitoringkampagnen:

1. Die ermittelten Kohlenstoffisotopenfraktionierungsfaktoren erwiesen sich als geeignet, um den mikrobiellen *in situ*-Abbau der untersuchten bromierten Schadstoffe (bromierte Ethene, Ethane, Methane, Benzole, folgend zusammengefasst als leichtflüchtige bromierte Kohlenwasserstoffe, LBKW) nachzuweisen und entsprechend zu quantifizieren.
2. Die Erweiterung zur 2D-Isotopenfraktionierung ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  vs.  $^{81}\text{Br}/^{79}\text{Br}$ ) ermöglicht des Weiteren eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Abbauprozesse (z.B. aerobe / anaerobe, mikrobielle / chemische Abbauprozesse), welche essentiell für konventionelle Monitoringkampagnen sind.
3. Das entwickelte CSIA-Konzept erweist sich demnach als leistungsstarke Methode zum Nachweis und Quantifizierung des *in situ*-Abbaus von LBKWs.
4. Im Vergleich zu konventionellen Konzentrationsanalysen hat die CSIA-Methode einen deutlich höheren analytischen Aufwand und demnach einen deutlich höheren Preis. Der Mehrgewinn an Informationen (= wesentliche, nachhaltigen Minderungsprozesse verschiedener bromierter Schadstoffe), gleicht diesen Aufwand jedoch wieder aus.
5. Es wird empfohlen, eine Kombination der CSIA-Methode mit molekularbiologischen Methoden wie der Aufnahme des Gesamt-Community sowie dem Nachweis von funktionellen Genen sowie die Untersuchung der gegebenen Hydrogeochemischen Situation zu kombinieren. Ein Mehrmethoden-Ansatz (*multiple line of evidence*) ermöglicht einen eindeutigen Nachweis natürlicher Abbauprozesse und eine entsprechende Prognose der Schadstofffahnenentwicklung sowie der Erarbeitung eines optimierten Sanierungskonzepts.

## AP7: Entwicklung eines allgemeinen Bewertungskonzeptes zur Beurteilung organischer Bromkontaminationen und Ermittlung des Marktpotentials der neuen Methode

Ziel dieses APs war anhand der Auswertung von den am Referenzstandort erhobenen Daten ein allgemeines Bewertungskonzept für die Beurteilung des mikrobiellen Abbaupotenzials bromierter Schadstoffe unter maßgeblicher Beteiligung der Isodetect GmbH zu entwickeln. Es sollte eine Recherche der erforderlichen Kenndaten, die für eine Beurteilung der Vermarktung notwendig sind, durchgeführt und die Ergebnisse entsprechend des Marktpotentials ausgewertet werden.

### Ergebnisse & Auswertung

Anhand der vorliegenden Daten konnte ein folgendes allgemeines Bewertungskonzept (Abb. 2) für den *in situ*-Abbau von bromorganischen Schadstoffen abgeleitet werden:

Grundlagen	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Kartierung der Schadstoffausbreitung am Standort anhand von Konzentrationsanalysen.</li> <li>2. Bestimmung der hydrogeologischen und hydraulischen Verhältnisse (Aufbau des Untergrunds – Grundwasserleiter/-stauer, Grundwasserfließrichtung, -geschwindigkeit).</li> <li>3. Beurteilung des hydrogeochemischen Milieus zur Erfassung von Redoxzonen sowie zur Hypothesenbildung potenzieller Schadstoffabbaumechanismen.</li> <li>4. Ableitung eines konzeptionellen Standortmodells sowie eines Grundwassertransportmodell</li> </ol>
Monitoring & Bewertung	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Entwicklung eines Probenahmeplans für die innovativen Monitoring-Verfahren (CSIA, molekularbiologische Methoden) auf Grundlage des konzeptionellen Modells; bei Standorten mit hoher hydrogeologischer Komplexität können Grundwassertransportmodelle verwendet werden (z.B. Mixing-Cells-Model am Standort Hovav)</li> <li>2. Bewertung des mikrobiellen Abbaus von bromierten Verbindungen:             <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Direkter Nachweis des <i>in situ</i>-Abbaus bromierter Verbindungen mittels CSIA</li> <li>b. Erfassung von schadstoffabbauenden Mikroorganismen durch molekularbiologische Methoden (Gesamt-Community/funktionelle Marker)</li> <li>c. Bestimmung von dominierenden Abbauwegen mittels 2D-CSIA (<math>^{13}\text{C}/^{12}\text{C}</math> vs. <math>^{81}\text{Br}/^{79}\text{Br}</math>) sowie Verifizierung mittels molekularbiologische Methoden</li> <li>d. Quantifizierung des Abbaus bromierter Verbindungen mittels CSIA</li> </ol> </li> <li>3. Laborversuche zur Verifizierung der Felddaten sowie Simulierung des <i>in situ</i>-Abbaus</li> </ol>
Prognose	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Optimierung des konzeptionellen Standortmodells</li> <li>2. Prognose der Schadstofffahnenentwicklung auf Grundlage von reaktiver Transportmodellierung</li> <li>3. Ableitung eines für den Standort optimierten Sanierungskonzeptes</li> </ol>

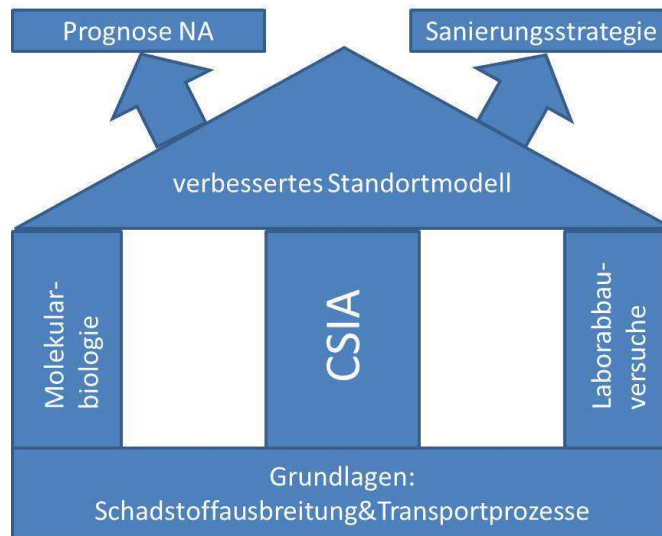


Abb.2: Schematische Darstellung des allgemeinen Bewertungskonzepts zum Nachweis des *in situ*-Abbaus bromorganischer Schadstoffe.

Methoden zur Erfassung des natürlichen Abbaus bromierter Kontaminanten sind für eine Gefährdungsabschätzung wichtig und liefern Informationen, welche im Rahmen des professionellen Wassermanagement genutzt werden können. Durch das Projekt sind wesentliche Bewertungsgrundlagen für den *in situ*-Abbau bromorganischer Schadstoffe geschaffen worden. Die bisherigen Ergebnisse beziehen sich auf leichtflüchtige bromierte Schadstoffe wie bromierte Ethene, Ethane und Benzole (LBKW).

Eine Recherche seitens Isodetect ergab, dass in Deutschland nur wenige LBKW-kontaminierte Standorte vorhanden sind (z.B. Bereich des ehemaligen Betriebsgeländes der Berlinchemie AG). Die Relevanz der LBKW in Deutschland ist demnach deutlich geringer als LCKWs. In der Öffentlichkeit handelt es sich demnach um keine prioritäre Schadstoffklasse. LBKW besitzen jedoch ein erhebliches Gefährdungspotential.<sup>3,4</sup> In Israel gibt es aufgrund der bromchemischen Industrie eine deutlich höhere Dichte an LBKW-produzierenden Standorten<sup>5</sup>, demzufolge ist das Marktpotenzial des allg. Bewertungskonzepts in Israel, sowie auch in Gesamt-Europa, deutlich höher als in Deutschland. In Zusammenarbeit mit den israelischen Partnern können neue Projekte/Aufträge akquiriert werden. Durch die vergleichsweise verstärkte Verwendung an LBKWs wie z.B. EDB als Zusatz in verbleitem Treibstoff zur Vermeidung von Bleirückständen oder als Pestizid, ist im nordamerikanischen Raum eine Vielzahl an Altlastenflächen bekannt, wodurch ein hohes Marktpotenzial für die Anwendung eines Bewertungskonzeptes zum Nachweis und Quantifizierung des *in situ*-Abbaus bromierter Schadstoffe zu erwarten ist.<sup>6</sup>

<sup>3</sup> Patterson, B.M., Cohen, E., Prommer, H., Thomas, D.G., Rhodes, S., and McKinley, A.J. (2007) Origin of a mixed brominated ethene groundwater plume: contaminant degradation pathways and reactions. *Environ Sci Technol* 41:1352–1358

<sup>4</sup> U.S. Environmental Protection Agency. Integrated Risk Information System (IRIS) on 1,2-Dibromoethane. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington, DC. 1999.

<sup>5</sup> <http://www.science.co.il/Chemistry-Companies.asp?s=chemicals>

<sup>6</sup> Falta RW, Bulsara N, Henderson JK, Mayer RA. (2005). Leaded-gasoline additives still contaminate groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 39:378A–384A.

Als problematisch gelten neben den LBKWs vor allem bromierte Flammschutzmittel, zu denen polybromierte Diphenylether (PBDE), Tetrabrombisphenol A (TBBPA) und Hexabromcyclododecan (HBCD) gehören.<sup>7</sup> Unser israelischer Partner lieferte erste Ergebnisse zum aeroben Abbau des bromierten Flammschutzmittel 2,2-bis(bromomethyl)propanol (TBNPA).<sup>8</sup> Eine Nutzung des CSIA-Verfahrens zur Beurteilung des Abbaus bromierte Flammschutzmittel ist demnach möglich. Aufgrund der hohen Produktion an Flammschutzmittel in Europa, sowie auch im nordamerikanischen und asiatischen Raum ergibt sich mit der Übertragung des integrativen Nachweisverfahrens ein hohes Marktpotenzial.

## 2. Wichtigste Positionen des zahlungsmäßigen Nachweises

- Personalkosten für Dr. Kevin Kuntze
- FE-Leistungen für die Isodetect GmbH
- Materialkosten für Entwicklung und Durchführung der CSIA- und molekularbiologischen Methoden
- Reisekosten für Projektkoordination mit israelischem Partner sowie Durchführung der Probenkampagnen und Bromisotopenmessungen

## 3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Zu Beginn des Forschungsprojektes lagen keine integrativen Konzepte zur Analyse des *Natural-Attenuation*-Potenzials bromierter Schadstoffe mit molekularbiologischen und CSIA-Verfahren vor. BOCs besitzen aufgrund ihrer hohen toxischen und karzinogenen Eigenschaften eine große Umweltrelevanz. So kontaminieren BOCs unter anderem wichtige Grundwasserleiter im Bereich des Chemieindustriearcals Hovav in der Negev-Wüste in Israel. Die Folgen der Kontamination sind großflächige Verunreinigungen des Grundwassers durch ein breites Spektrum an brom- und chlororganischen Schadstoffen wie bromierte und chlorierte Ethene, Ethane, Benzole und Phenole. Sie tragen zum sukzessiven Schadstoffeintrag in wertvolle Grundwasserressourcen bei und besitzen daher ein langfristiges Gefährdungspotenzial für Trinkwasser- und Nutzwassereinzugsgebiete der Region. Der Kenntnisstand über den mikrobiologischen Abbau dieser bromierten Schadstoffe war zu Beginn des Forschungsschwerpunktes gering.

Die Ergebnisse dieses Forschungsprojekts tragen erheblich zu einem verbesserten Verständnis des mikrobiologischen sowie chemischen Abbaus von BOCs bei. Es liegen erstmalig Hinweise über unterschiedliche Abbaumechanismen im Vergleich zu den chlorierten Verbindungen vor. Demnach ist davon ausgehen, dass spezifische Enzyme den Abbau von BOCs katalysieren. Diese Informationen sind essentiell für eine Weiterentwicklung von molekularbiologischen Nachweismethoden. Das entwickelte 2D-CSIA-Verfahren erwies sich als eine äußerst leistungsstarke Methode für den Nachweis des *in situ*-Abbaus von BOCs. Das entwickelte Verfahren ermöglicht mit der erarbeiteten Datenbank an Fraktionierungsfaktoren zudem eine Quantifizierung des *in situ*-Abbaus für die Erstellung einer Prognose innerhalb der konventionellen Grundwasserüberwachung. Das

<sup>7</sup> UBA, Presseinformation Nr. 20, 2008

<sup>8</sup> Anna Kozell, Yinon Yechezkel, Noa Balaban, Ishai Dror, Ludwik Halicz, Zeev Ronen, and Faina Gelman (2015) Application of Dual Carbon–Bromine Isotope Analysis for Investigating Abiotic Transformations of Tribromoneopentyl Alcohol (TBNPA) *Environ Sci Technol* 49:(7)4433-4440



entwickelte 2D-CSIA-Verfahren ermöglicht des Weiteren den Nachweis vorherrschender Abbaumechanismen. In Kombination mit molekularbiologischen Methoden wie dem Nachweis gruppenspezifischer Mikroorganismen oder der Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft (Gesamt-Community Analyse) und hydrogeochemischen Untersuchungen können die Ergebnisse entsprechend verifiziert werden. Die umfangreiche Labormikrokosmen-Studie ermöglicht darüber hinaus eine Beurteilung des Abbaupotenzials von BOCs am Standort.

#### **4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere der Verwertbarkeit der Ergebnisse im Sinne des Verwertungsplans**

Das entwickelte allgemeine Bewertungskonzept zur Charakterisierung und Quantifizierung des *in situ*-Abbaus bromierter Schadstoffe erwies sich als geeignet für eine wirtschaftliche Verwertung im Bereich der Altlastenerkundung und –sanierung (siehe AP7). Das allgemeine Bewertungskonzept wird bereits schrittweise durch die Isodetect GmbH zur Altlastenerkundung und -sanierung auf dem deutschen Markt etabliert. Nachfolgend soll dieses Konzept auch auf dem israelischen und gesamteuropäischen Markt etabliert werden. Vor allem der israelische Markt und gesamteuropäische Markt bieten ein enormes Marktpotenzial. Weiterführend soll das entwickelte Konzept auf bromierte Flammschutzmittel erweitert werden. Erste Ergebnisse zeigen bereits eine solche erfolgreiche Übertragung (AP7). Durch die Anwendung des Konzeptes zur Charakterisierung und Quantifizierung des *in situ*-Abbaus bromierter Schadstoffe sowie der weiterführenden engen Zusammenarbeit mit den israelischen Partnern kann Isodetect sich ein neues Marktsegment und demzufolge einen neuen Kundenkreis erschließen. Dadurch wird seine Wettbewerbsfähigkeit gegenüber Konkurrenzverfahren, -produkten und -firmen deutlich erhöht. Das allgemeine Bewertungskonzept kann des Weiteren als eine Richtlinie in Handlungsempfehlungen aufgenommen und so potentiellen Nutzern zur Verfügung gestellt werden. Der Wirtschaftsstandort Deutschland wird demnach auf dem Gebiet der Altlastenerkundung und der Umsetzung von Sanierungsmaßnahmen wesentlich gestärkt. Dies wird unter anderem dadurch begründet, dass MNA- und ENA-Maßnahmen aufgrund ihrer kostengünstigen und effizienten Einsatzmöglichkeiten zukünftig einen höheren Stellenwert erlangen werden und dass das integrative Bewertungskonzept deutliche Vorteile gegenüber dem Einsatz von einzelnen Nachweismethoden im Bereich der Altlastenbewertung und –sanierung, im speziellen für bromierte Schadstoffe hat. Das CSIA-Verfahren ermöglicht auch Informationen zur Herkunft von bromierten Chemikalien zu gewinnen. Informationen über Quellen, Transportwege und Senken im regionalen oder globalen Maßstab können somit erfasst werden. Die Erschließung von neuen Geschäftsfeldern wird somit ermöglicht.

Des Weiteren ist es geplant, die Projektergebnisse in hochrangigen Fachzeitschriften zu veröffentlichen, was zu einer Steigerung der wissenschaftlichen Konkurrenzfähigkeit des UFZ führt. Mit den gewonnenen Erkenntnissen über die Abbaumechanismen bromierter Schadstoffe, insbesondere der Unterschied im Vergleich zum Abbau chlorierter Verbindungen haben sich wesentliche neue Wissenschaftsfelder ergeben. So sind weiterführende Studien, unter anderem in Zusammenarbeit mit der Isodetect GmbH sowie den israelischen Partnern aber auch mit anderen Kooperationspartnern geplant. So wurde bereits ein EU-Forschungsvorhaben mit einem AP zur Untersuchung von Dehalogenierungsprozessen unter salinen Bedingungen (wie gegeben am Standort Negev) eingereicht. In einer Kooperation mit der Universität Strasburg wird bereits das Genom des Modellorganismus *H. sp. GJ-21* nach der Adaption auf DBM untersucht, um mögliche

Mutationen im Vergleich zum Abbau der chlorierten Verbindungen zu untersuchen. Die Anreicherung von BOC-abbauenden Mikroorganismen eröffnet weitere Möglichkeiten zum Studium der spezifischen Abbaumechanismen im Vergleich zu chlorierten Verbindungen. Eine Isolierung und Charakterisierung von bisher unbekanntem, spezifisch BOC-abbauenden Mikroorganismen aus der Umwelt ist denkbar. Die charakteristische Umsetzung bromierter Verbindungen kann genutzt werden, um einen tieferen Einblick in den Reaktionsmechanismus, insbesondere während der reduktiven Debromierung zu erlangen. So werden bereits in Kooperation mit der Universität in Jena erste Untersuchungen am gereinigten Enzym PceA aus *S. multivorans* durchgeführt. Die Projektergebnisse haben demnach einen wesentlichen Teil dazu beigetragen, den wissenschaftlichen Fokus auch auf bromierte Verbindungen zu erweitern. Zu Beginn des Forschungsprojektes gab es nur wenige Kenntnisse über den mikrobiellen, insbesondere anaeroben Abbau von BOCs.

#### **5. Während der Durchführung dem ZE bekannt gewordenen Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen.**

Fortschritte anderer Stellen zur Entwicklung eines allgemeinen Bewertungskonzepts zur Charakterisierung und Quantifizierung des *in situ*-Abbaus bromierter Schadstoffe sind dem ZE nicht bekannt.

Fortschritte im Bereich der Grundlagenforschung zum mikrobiellen Abbau von bromierten Schadstoffen waren lediglich eine Studie über die Kinetiken zum Abbau von 1,2-Dichlorethan und 1,2-Dibromethan in anaeroben Anreicherungskulturen (Rong *et al.*, Kinetics of 1,2-Dichlorethane and 1,2-Dibromethane Biodegradation in Anaerobic Enrichment Cultures, Appl. Environ. Microbiol 2013, 79(4):1359) sowie eine Studie zur Kohlenstoffisotopenfraktionierung des chemischen Abbau von EDB (Kuder T, Wilson JT, Philp P & He YT, Carbon isotope fractionation in reactions of 1,2-dibromoethane with FeS and hydrogen sulfide. Environ Sci Technol 2012, 46:7495-7502). Die Ergebnisse dieser Studien hatten keinen Einfluss auf die Durchführung des Vorhabens im Sinne einer Änderung des Forschungsplaners und die Ergebnisse konnten flankierend genutzt werden.

#### **6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses nach Nr. 11**

Derzeit befinden sich folgende Manuskripte zur Veröffentlichung in Fachzeitschriften in Bearbeitung:

- Duale Isotopenfraktionierung im Abbau von 1,2-Dibromethan (Ergebnisse aus AP1, AP2 und AP4); geplante Einreichung des Manuskriptes zur Veröffentlichung in Environ Sci Technol im Juli 2015 in Kooperation mit den israelischen Partnern
- Duale Isotopenfraktionierung im Abbau von 1,1,2-Tri – und cis/trans-1,2-Dibromethen (Ergebnisse aus AP1, AP2 und AP4) geplante Einreichung in Environ Sci Technol im August 2015 in Kooperation mit den israelischen Partnern
- Mikrokosmenstudie zum Vergleich Abbau chlorierter und bromierter Verbindung mit Anwendung der entwickelten CSIA- und molekularbiologischen Verfahren (Ergebnisse aus AP3, AP4, AP5); geplante Einreichung in Environ Sci Technol im September

- Es ist weiterhin geplant, die Ergebnisse zum Abbau von DBM, der bromierten Benzole sowie die Anwendung des CSIA-Konzepts am Standort (in Kombination mit dem MCM-Modell) im Rahmen weiterer Untersuchungen und Kooperationen zu veröffentlichen.

Teilergebnisse des Forschungsprojektes wurden bereits durch die Projektbearbeiter auf folgenden Konferenzen präsentiert:

- 12. Status Seminar BMBF-MOST Water Technology Research (14.-16.10.2012 in Haifa, Israel)  
*Innovative tools for the evaluation of in situ degradation of brominated organic contaminants in groundwater*  
Zeev Ronen, Anat Bernstein, Faina Gelman, Kevin Kuntze, Hans H. Richnow
- Dehalocon (23.-26.03.2014 in Jena, Deutschland)  
*A comparison of microbial dechlorination vs. debromination*  
Kevin Kuntze, Angela Woods, Ivonne Nijenhuis
- Jesium 2012 (02.-07.09.2012 in Leipzig, Deutschland)  
*Evaluation of in situ degradation of brominated organic contaminants using stable isotope techniques and molecular biomarkers*  
Kevin Kuntze, Anat Bernstein, Zeev Ronen, Faina Gelman, Ludwik Halicz, Hans H. Richnow, Ivonne Nijenhuis  
Poster
- VAAM 2013 (10.-13.3.2015 in Bremen, Deutschland)  
*To evaluate the in situ degradation of brominated compounds by stable isotope and molecular biological analysis*  
Kevin Kuntze, Angela Woods, Zeev Ronen, Hans H. Richnow, Ivonne Nijenhuis  
Poster
- FEMS 2013 (21.-25.07.2013)  
*Comparison of chlorinated vs. brominated compound biodegradation and related microbial communities*  
Angela Woods, Kevin Kuntze, Ivonne Nijenhuis  
Poster

## Berichtsblatt

1. ISBN oder ISSN geplant	2. Berichtsart (Schlussbericht oder Veröffentlichung) Schlussbericht
3. Titel Entwicklung eines innovativen Verfahrens für die Bewertung des <i>in situ</i> -Abbaus von bromorganischen Schadstoffen im Grundwasser - INTIME	
4. Autor(en) [Name(n), Vorname(n)] Kuntze, Kevin Nijenhuis, Ivonne Richnow, Hans H.	5. Abschlussdatum des Vorhabens 31.12.2014
	6. Veröffentlichungsdatum geplant
	7. Form der Publikation Fachzeitschrift
8. Durchführende Institution(en) (Name, Adresse) Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ Department Isotopenbiogeochemie Permoserstr. 15 04318 Leipzig	9. Ber. Nr. Durchführende Institution
	10. Förderkennzeichen 02WU1221
	11. Seitenzahl 19
12. Fördernde Institution (Name, Adresse)  Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. Literaturangaben 25
	14. Tabellen 0
	15. Abbildungen 2
16. Zusätzliche Angaben Schlussbericht	
17. Vorgelegt bei (Titel, Ort, Datum)	
18. Kurzfassung Zu Beginn des Forschungsprojektes gab es nur wenige Kenntnisse über den mikrobiellen Abbau bromierter organischer Verbindungen (BOC). Es lagen keine systematischen Untersuchungen zu anaeroben Debromierungswegen vor. Ziel des Forschungsprojektes war die Entwicklung und Anwendung eines integrativen Verfahrens von Komponenten-spezifischen stabile Isotopenanalysen (CSIA) und molekularbiologischen Methoden, mit dessen Hilfe das natürliche Abbaupotential persistenter bromierter Schadstoffe in Aquiferen beurteilt werden sollte. Mit dem Abschluss dieses Forschungsprojektes liegt erstmalig eine umfangreiche Datenbank an Kohlenstoff- und Bromisotopenfraktionierungsfaktoren zur Charakterisierung und Quantifizierung des <i>in situ</i> -Abbaus bromierter Schadstoffe vor. Untersuchung zu Abbaumechanismen wiesen signifikante Unterschiede zum Abbau von chlorierten Verbindungen auf, woraus sich weitere Forschungsvorhaben ergaben. Ein integratives Konzept zur Charakterisierung und Quantifizierung des <i>in situ</i> -Abbaus bromierter Schadstoffe wurde entwickelt und dessen Anwendung an Anreicherungs-kulturen sowie am Standort Negev (Israel) erfolgreich validiert. Dieses Konzept soll folgend im Bereich der Grundwasser- und Altlastenerkundung implementiert werden.	
19. Schlagwörter natürlicher Abbau bromierter Schadstoffe; Komponenten-spezifische Kohlenstoff-/Brom-Isotopenanalyse; Altlastenerkundung	
20. Verlag	21. Preis

## Document Control Sheet

1. ISBN or ISSN planned	2. type of document (e.g. report, publication) final report
3. title Innovative tools for the evaluation of <i>in situ</i> degradation of brominated organic contaminants in groundwater - INTIME	
4. author(s) (family name, first name(s)) Kuntze, Kevin Nijenhuis, Ivonne Richnow, Hans H.	5. end of project 31.12.2014
	6. publication date planned
	7. form of publication journal
8. performing organization(s) (name, address)	9. originator's report no.
	10. reference no. 02WU1221
	11. no. of pages 19
12. sponsoring agency (name, address)  Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) 53170 Bonn	13. no. of references 25
	14. no. of tables 0
	15. no. of figures 2
16. supplementary notes final report	
17. presented at (title, place, date)	
18. abstract At the beginning of this research project the microbial degradation of brominated organic compounds (BOCs) was poorly understood. There were no systematic studies on anaerobic debromination available. The main goal of this research project was the development and application of an integrative approach of compound-specific stable isotope analyses (CSIA) and molecular biological tools for the characterization and quantification of the <i>in situ</i> degradation of BOCs. With this approach the potential of natural attenuation of persistent brominated contaminants in aquifers should be assessed. For the first time, with the completion of this research project an extensive database of carbon and bromine isotope enrichment factors for the characterization and quantification of <i>in situ</i> degradation of brominated pollutants is available. Studies on reaction mechanisms by dual-element isotope analyses revealed significant differences in the degradation of brominated compound compared to their chlorinated analogues and provide further possible investigations. An integrative concept for the characterization and quantification of the <i>in situ</i> degradation of BOCs was developed and validated by its application on BOCs degrading enrichment cultures and at a contaminated field site (Negev, Israel). This concept will be integrated into groundwater monitoring strategies in order to evaluate the extent of natural attenuation of BOCs.	
19. keywords Natural attenuation of brominated organic compounds, compound-specific carbon/bromine isotope analyses; groundwater monitoring	
20. publisher	21. price