



lebensministerium.at

Endbericht zum Forschungsprojekt

Untersuchungen zur Optimierung des mikrobiellen
Abbaus von Pestiziden im Grundwasserleiter





lebensministerium.at

Dieses Forschungsvorhaben wurde mit Mitteln des Landes Niederösterreich (www.noe.gv.at), vertreten durch die Gruppe Wasser - Abteilung Wasserwirtschaft, und des Bundesministeriums für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft (www.lebensministerium.at), vertreten durch die Kommunalkredit Public Consulting GmbH, gefördert.

Projektleitung

Andreas P. Loibner (Koordination, Arbeitspaket 1)

Rudolf Krska (Arbeitspaket 2)

Ines Fritz (Arbeitspaket 3)

Regina Grillari (Arbeitspaket 4)

Projektmitarbeit

Michaela Bauer, Erich Brachtl, Eva Edelmann, Ines Fritz, Katrin Greimel, Johannes Grillari, Regina Grillari, Bogdan Jug, Gertrud Kadlec, Wolfgang Kandler, Bernhard Kluger, Rudolf Krska, Ingo Lämmermann, Andreas P. Loibner, Elke Marian, Nora Neumann, Sophie Patzelt, Silvia Pfeiffer, Marco Reiter, Kerstin Scherr, Lucia Silvestrini, Michael Sulyok, Marion Sumetzberger-Hasinger, Franz Wolfsberger

Besonderer Dank sei Frau Tamara Grummt, Umweltbundesamt Bad Elster, für die Beurteilung der Gentoxizität sowie Herrn Christian Kirchnawy, OFI, für die Prüfung auf Östrogenaktivität ausgesprochen.



Untersuchungen zur Optimierung des mikrobiellen Abbaus von Pestiziden im Grundwasserleiter

Nahezu alle organischen Moleküle, wie sie auch Pestizide darstellen, unterliegen einem mikrobiologischen Angriff. Bei optimalen Abbaubedingungen kann eine natürliche Mischpopulation eine vollständige Umsetzung des Moleküls zu Kohlendioxid, Wasser und eventuell enthaltenen Mineralstoffen erreichen. Bei Kenntnis der Abbaumechanismen können diese gezielt unterstützt und so zur kontrollierten Entfernung von Verunreinigungen aus Umweltmedien eingesetzt werden. Abbauprozesse, allen voran mikrobiologische Umsetzungen, wirken einer Anreicherung von landwirtschaftlich eingesetzten Pflanzenschutzmitteln in Umweltkompartimenten und in weiterer Folge in Lebensmitteln entgegen. Diese Umsetzungsprozesse finden vorwiegend am Ort der Anwendung von Pestiziden, somit in oberflächennahen Bodenschichten statt. Zum biologischen Abbau von Pestiziden im Boden oder auch im tierischen Metabolismus sind umfangreiche Literaturdaten vorhanden, die in Datenbanken wie z.B. jener der IUPAC (Pesticides Properties Database) zusammengefasst sind.

Eine Hauptmenge an produzierten Pestiziden kommt in der Landwirtschaft bzw. Lebensmittelproduktion zum Einsatz. Auswaschung sowie Unfälle können zu einer Kontamination von Grundwasserkörpern mit Pflanzenschutzmitteln führen. Zum Abbau dieser Substanzen in Grundwasserleitern ist die Datenlage allerdings nicht ausreichend, um involvierte Mechanismen erschöpfend zu beschreiben sowie die Effizienz der Prozesse zu bestimmen. Folglich sind auch gesicherte Rückschlüsse bezüglich der Anwendbarkeit von mikrobiologischen Sanierungstechniken an kontaminierten Standorten kaum möglich.

Technologisch wird der mikrobielle Schadstoffabbau bereits in Form von *in situ* Verfahren zur Sanierung von kontaminierten Böden als auch für verunreinigtes Grundwasser bei Schadstoffbelastungen wie Mineralölen und chlorierten Kohlenwasserstoffen eingesetzt. Aufgrund der hohen Anzahl an Substanzen, die im Pflanzenschutz eingesetzt werden und die sich durch unterschiedliche physikalisch-chemische Eigenschaften charakterisieren, gibt es zur technologischen Umsetzung von mikrobiellen Abbauprozessen unter Aquiferbedingungen nur lückenhafte Erfahrungen.

Die zentralen Fragestellungen der Forschungsarbeiten umfassen einerseits den Nachweis und die Quantifizierung von natürlichen Abbauprozessen von Pestiziden in Grundwasserkörpern. Es soll geprüft werden, inwieweit ein mikrobiologischer Schadstoffabbau für die vorliegenden Pestizide erfolgreich durchgeführt werden kann. Neben einer Definition der Einsatzrandbedingungen sollen Abbauraten sowie das Ausmaß der Schadstoffreduktion ermittelt werden. Andererseits soll untersucht werden, inwieweit Abbauprozesse optimiert werden können, um sie für eine Reinigung kontaminierter Grundwasserleiter technisch nutzbar zu machen. Mittels ultrasensitiver Analytik soll weiters überprüft werden, ob es im Zuge der Abbaubersuche zu einer Anreicherung von Metaboliten kommen kann. Mit wirkungsbezogenen Methoden soll ein Monitoring von potentiellen ökotoxikologischen Effekten erfolgen und eine potentielle Hemmung von humanen Zelllinien erfasst werden.

Die Forschungsaufgaben unterteilen sich in vier Arbeitspakete:

Arbeitspaket 1

Untersuchung und Optimierung des mikrobiellen Pestizidabbaus

In Laborversuchen unterschiedlichen Maßstabs erfolgt eine Untersuchung des mikrobiologischen Abbaus verschiedener Pestizide. Bedingungen (z.B. Nährstoffe, Elektronenakzeptoren, Substrate), die den Schadstoffabbau im Grundwasser unterstützen sollen, werden in ausführlichen Tests geprüft. Versuche werden sowohl mit einzelnen Pestiziden in Nährmedium als auch mit Grundwasser eines kontaminierten Standortes in Korneuburg durchgeführt.

Arbeitspaket 2

Pestizidanalytik und Untersuchung auf potentielle Anreicherung von Metaboliten mit chemisch-analytischen Methoden

Dieser Leistungsteil umfasst einerseits die Quantifizierung der Zielpestizide im Rahmen der Abbauprobe (Arbeitspaket 1), andererseits erfolgt ein Screening nach weiteren in der Literatur beschriebenen Metaboliten mittels Produktionenscans sowie ein ungerichtetes Screening mittels hochauflösender Massenspektrometrie.

Arbeitspaket 3

Ökotoxikologische und mikrobiologische Untersuchungen

Es erfolgt ein ökotoxikologisches Monitoring von Labor-Abbauprobe durch Anwendung einer Serie von Biotests. Damit soll festgestellt werden, ob Hemmeffekte im Zuge der Abbauprobe entstehen, die so einen Hinweis auf die Anreicherung von Abbauprodukten liefern können. Darüber hinaus sollen mikrobiologische Untersuchungen Aufschluss über die am Abbau beteiligten Mikroorganismen geben.

Arbeitspaket 4

Wirkungsbezogene Bewertung mittels Zellkulturtests

In diesem Arbeitspaket werden humane Zellkulturen eingesetzt, um mögliche Auswirkungen eines Pestizidabbaus auf die Zellviabilität zu erfassen. Darüber hinaus wird auf kanzerogene Wirkung und endokrine Disruption untersucht. Die Zellkulturtests werden für ein Monitoring der Labor-Abbauprobe herangezogen.



Kernaussagen der durchgeführten Forschungsarbeiten

Thiamethoxam und Florasulam unterliegen bei Zugabe von mineralischen Nährstoffen einem weitgehend raschen mikrobiologischen Abbau, wobei Zielkonzentrationen von 0,1 µg/L in etwa 100 bis 500 Tagen unterschritten werden oder erreichbar scheinen. Die Abnahme von Clopyralid ist vergleichsweise langsamer, wobei eine quantitative Unterscheidung zwischen mikrobiellen und abiotischen Abbauprozessen nicht möglich ist. Flumetsulam zeigte im Versuchszeitraum keinen Konzentrationsrückgang.

Keine der getesteten Grundwasserproben des kontaminierten Standortes in Korneuburg zeigte Gentoxizität oder östrogene Aktivität. Keine dieser Proben übte eine Wachstumshemmung auf humane Zelllinien aus.

Leuchtbakterien und Algen zeigten keine Beeinträchtigung durch Grundwasserproben, Daphnien und Wasserlinsen zeigten moderate bis erhöhte Hemmungen, die auf Pestizidgehalte sowie Härtebildner im Grundwasser zurückgeführt werden können.

Der mikrobielle Pestizid-Abbau im Grundwassermodellsystem führte weder zu einer Zunahme der Hormonwirkung noch zu einem Auftreten von Gentoxizität. Es wurde auch keine Wachstumshemmung von humanen Zelllinien beobachtet. Abgesehen von einem Nachweis von bekannten Abbauprodukten von Thiamethoxam, Florasulam und Clopyralid konnte eine Anreicherung von Substanzen nicht verifiziert werden, die sich von den Zielpestiziden durch eine evidente Abbaureaktion ableiten lassen.

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Ziel des Forschungsvorhabens war es, das Abbauverhalten von ausgewählten Pestiziden in Grundwasserkörpern zu untersuchen. Dazu wurden sowohl Versuche mit einer Reihe an Pestiziden, aber auch mit Grundwasser eines kontaminierten Standortes in Korneuburg durchgeführt. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob durch Optimierungsmaßnahmen eine Beschleunigung des mikrobiellen Pestizidabbaus möglich ist und ob eine technische Anwendung eines mikrobiologischen Verfahrens für den kontaminierten Standort als zielführend zu erachten ist.

Abbauversuche, die mit einzelnen Pestiziden über einen Zeitraum von zwei Monaten durchgeführt wurden, zeigten einen mikrobiellen Abbau von Thiamethoxam und Florasulam, der durch einen signifikanten Konzentrationsunterschied zur abiotischen Kontrolle belegt wird. Für Thiamethoxam wird der Abbau zusätzlich durch eine stark ausgeprägte Bildung der bekannten Metaboliten CGA 355190 und CGA 353968 bestätigt. Die Abnahme der Konzentration lag für Thiamethoxam bei 59% und für Florasulam bei 34%. Ein Vergleich mit der abiotischen Kontrolle konnte einen biologischen Abbau für Clopyralid und Flumetsulam nicht bestätigen.

Untersuchungsergebnisse mit Fenton-Reagenz und dem Enzym Laccase legen den Schluss nahe, dass stabile Pestizide wie Clopyralid potentiell über radikalische Reaktionen umgesetzt werden können. Geht man davon aus, dass Enzyme wie Laccasen vermehrt in Pilzen anzutreffen sind und diese in oberflächennahen Bodenschichten verstärkt vertreten sind, wohingegen in Grundwasserkörpern Bakterien einen größeren Anteil der mikrobiellen Biomasse darstellen, so erklärt das den Unterschied der beobachteten Halbwertszeiten (Grundwasser 405-556 Tage) zu den in Datenbanken (IUPAC, 2014) publizierten Werten (Boden 13-65 Tage). Die im Rahmen der Forschungsarbeiten für Clopyralid ermittelten Halbwertszeiten von rund 500 Tagen liegen auch im Bereich von Werten, die für das System Wasser/Sediment publiziert wurden,

wobei Hydrolyse und Photodegradation für diesen Abbaupfad als nicht relevant eingestuft wurden (EFSA, 2005).

Abbauversuche in Bioreaktoren mit Grundwasser des kontaminierten Standortes zeigten einen raschen Abbau von Thiamethoxam, hier konnte in 60 Tagen eine Konzentration von 0,1 µg/L unterschritten werden. Für Florasulam wurde nach einem Versuchszeitraum von 144 Tagen ein Endwert von 0,62 µg/L erreicht, wobei eine anhaltende Konzentrationsabnahme bei erweitertem Beobachtungszeitraum erwartet wird. Während eine Beimpfung mit Aquifermaterial den Abbau nicht beschleunigen konnte, hatte die Zugabe von Nährstoffen einen positiven Einfluss auf den mikrobiologischen Abbau von Thiamethoxam und Florasulam im Bioreaktor. Für Thiamethoxam verkürzte sich die Halbwertszeit im besten Fall auf 11 Tage, für Florasulam auf 157 Tage. Auch für Clopyralid wurde bei Nährstoffzugabe eine Reduktion der Halbwertszeit auf von 555 auf 405 Tage erzielt. Eine gezielte Zuordnung der Abnahme der Clopyralid-Konzentration zu biotischen und abiotischen Prozessen ist nicht möglich.

Abbauversuche in Aquifersäulen dienten als Modellsystem für einen Grundwasserleiter. Sie zeigen ein ähnliches Bild wie bereits für Bioreaktoren zu beobachten war. Thiamethoxam und Florasulam nehmen bei ausreichender Nährstoffversorgung rasch ab, wobei die Abbauraten etwas geringer im Vergleich zu den Versuchen in Bioreaktoren sind. Es konnte eine signifikante Konzentrationsabnahme der Thiamethoxam-Metaboliten CGA 355190 und CGA 353968 nachgewiesen werden. Dies legt den Schluss nahe, dass bei Vorliegen geeigneter Bedingungen ein Abbau dieser Zwischenprodukte im Grundwasserleiter möglich ist. Gleichzeitig ergab eine ökotoxikologische Untersuchung des Haupt-Metaboliten CGA 355190, der in vergleichsweise höherer Menge gebildet wurde, keine ökotoxische Wirkung für diesen Konzentrationsbereich. Selbiges ist auch in Hinblick auf die Wachstumshemmung von humanen Zelllinien zutreffend.

Für Flumetsulam wurde weder in Bioreaktoren noch in Aquifersäulen ein mikrobieller Abbau nachgewiesen.

Es wurde eine quantitative analytische Methode zur Bestimmung der Primärsubstanzen sowie für weitere Pestizide und Metaboliten, für die Referenzstandards erhältlich sind, erstellt. Für einige Analyten (z.B. Dicamba) war eine vorherige Anreicherung mittels Festphasenextraktion notwendig, um Konzentrationen, die um den Grenzwert von 0,1 µg/L liegen, erfassen zu können.

Die Suche nach bekannten Metaboliten ergab drei Treffer: Demethylflorasulam, N-2,6-difluorphenyl-1,2,4-triazolsulfonamid und 3,6-Dichlor-2-pyridinol, wobei sich die ersten beiden von Florasulam ableiten, letzterer von Clopyralid. Da alle drei aufgefundenen Substanzen jedoch nur in den um den Faktor 500 angereicherten Proben identifiziert werden konnten, sind die tatsächlichen Konzentrationen gegenüber den Ausgangssubstanzen vermutlich vernachlässigbar.

Weiters wurde nach unbekanntem Metaboliten gesucht, die eine Massendifferenz $^{35}\text{Chlor}/^{37}\text{Chlor}$ bzw. $^{32}\text{Schwefel}/^{34}\text{Schwefel}$ beinhalten. Für gefundene Massen wurde nach Möglichkeit eine Summenformel generiert, der in weiterer Folge über Datenbankabfrage nach Möglichkeit Strukturformeln zugeordnet wurden. Unter diesen Vorschlägen war jedoch bis auf das Methylanalog von Clopyralid keine Struktur, deren Entstehen bzw. Vorkommen plausibel durch eine typische Metabolisierungsreaktion der Primärsubstanzen erklärt werden könnte. Da die entsprechenden Peaks nur in den um einen Faktor 500 aufkonzentrierten Proben nachgewiesen werden konnten, sind die entsprechenden Konzentrationen vermutlich signifikant niedriger, aber mit einiger Sicherheit nicht höher als die der Primärsubstanzen. Dies konnte mangels Verfügbarkeit entsprechender Standards nicht verifiziert werden.

Die Anwesenheit von chlorierten (halogenierten) organischen Verbindungen in der Umwelt bedeutet nicht notwendigerweise, dass es sich um synthetische Verbindungen oder deren Reaktionsprodukte handelt. Die



Fachliteratur kennt jedenfalls einige tausend natürlich vorkommende halogenierte organische Verbindungen, welche von Meereslebewesen, Landpflanzen, Bakterien, Pilzen, Flechten, Insekten und sogar Wirbeltieren gebildet werden.

Mit dem Einsatz von Biotests als wirkungsbezogene Methoden können nachteilige Effekte auf ökologische Rezeptoren erfasst werden. Vier Biotests (Leuchtbakterien, Grünalgen, Wasserflöhe und Wasserlinsen) wurden zur Analyse von Grundwasserproben, Reinsubstanzen der Pestizide in gelöster Form, sowie Proben von Abbauversuchen eingesetzt. Zusätzlich kamen mikrobiologische und molekularbiologische Untersuchungsmethoden zur Charakterisierung der am mikrobiellen Abbau beteiligten Konsortien zum Einsatz.

Über die drei Probenahmezeitpunkte zwischen April und August 2013 zeigten die drei Grundwasserproben zwar leicht unterschiedliche, aber tendenziell geringe bis mäßige Hemmwirkungen für Daphnien und mäßige bis erhöhte hemmende Effekte für Wasserlinsen. Die erhöhten Messwerte können nicht eindeutig zugeordnet werden und erklären sich zum Teil aus dem Pestizidgehalt der Proben und zum Teil aus den gelösten Mineralstoffen (Wasserhärte). Eine ökotoxische Wirkung für Leuchtbakterien oder Grünalgen konnte nicht gemessen werden.

Von den Reinsubstanzen wurden durchgehend Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen bis zur maximalen Konzentration von 1 mg/L mit allen vier Testorganismen erstellt. Nennenswerte Toxizitäten zeigten erwartungsgemäß Flumetsulam und Florasulam für Wasserlinsen sowie Clopyralid, Dicamba und Chlorpyrifos für Daphnien, wobei die EC₅₀ Werte deutlich über den im Grundwasser gemessenen Konzentrationen liegen.

Das für Abbauversuche in Aquifersäulen eingesetzte Grundwasser (HF05 vom 18. November 2013) zeigte, ähnlich wie bei den vorhergehenden Entnahmen, nur nennenswerte Hemmungen im Daphnien- und im Wasserlinsentest. Während die Hemmung von Daphnien im Versuchszeitraum deutlich zurückging, lag jene von Wasserlinsen zu Ende des Hauptversuchs (Nährstoffzusatz und Belüftung) im Bereich des für den Versuch eingesetzten Grundwassers.

Aus molekularbiologischen Metagenom-Untersuchungen (DGGE / Pyrosequenzierung) konnte eine veränderte Verteilung der mikrobiellen Populationen abgelesen werden, voraussichtlich in Anpassung an die Situation im kontaminierten Grundwasserkörper. Die natürlich im Wasser vorkommenden Keimgattungen Xanthomonas und Pseudomonas traten verstärkt auf, sie waren mit großer Wahrscheinlichkeit maßgeblich an biologischen Abbauvorgängen beteiligt. Auch die Metagenome der Proben zu Ende der Bioreaktorversuche zeigten ein wiederholtes Auftreten von Bakterien der Gattung Pseudomonas.

Untersuchungen mit vier humanen Zelllinien (RPTEC/TERT1, HepG2, HUVEC/TERT7 und MCF-7) zeigten nur bei sehr hohen Konzentrationen (zumind. 800-fach höher als für das Grundwasser des kontaminierten Standortes gemessen) eine wachstumshemmende Wirkung der getesteten Pestizide Clopyralid, Thiamethoxam, Florasulam, Flumetsulam, Dicamba und Chlorpyrifos. Die Grundwasserproben zeigten im Zellkulturtest keine auffälligen Hemmeffekte auf das Wachstum der in dieser Studie verwendeten humanen Zellkulturen und induzierten auch keine Strangbrüche der DNA. Eine endokrine Wirkung der hoch kontaminierten Grundwasserprobe (HF05) konnte auch bei zweimaliger Beprobung nicht festgestellt werden.

Ein Monitoring der Abbauversuche im Grundwassermodellsystem (Aquifersäulen) ergab keine Zunahme einer endokrinen Wirkung (CALUX System) bzw. keinen Nachweis von Gentoxizität (Ames-Test,

Mikrokerntest). Es wurde auch keine Wachstumshemmung von humanen Zelllinien (HUVEC/TERT7 und RPTEC/TERT1) beobachtet.

Das Auffinden von Abbauprodukten von Thiamethoxam und Florasulam (in Spuren) in den Experimenten, die mit kontaminiertem Grundwasser durchgeführt wurden, weist auf die Möglichkeit eines mikrobiologischen Abbaus der jeweiligen Pimärs substanz im Aquifer des kontaminierten Standortes hin. Werden die im Säulenexperiment ermittelten Abbauraten als Kalkulationsbasis herangezogen, so schlagen diese für die Anwendung eines biologischen Verfahrens eine Unterschreitung des Grenzwertes von 0,1 µg/L in 129 Tagen (Thiamethoxam, Startwert 1,23 µg/L) sowie 441 Tagen (Florasulam, Startwert 0,33 µg/L) vor. Auf Basis der durchgeführten Untersuchungen erscheint jedoch eine technologische Umsetzung eines mikrobiologischen Verfahrens zur Entfernung von Clopyralid und Flumetsulam am kontaminierten Standort in Korneuburg bei gegenwärtigem Kenntnisstand nicht zielführend zu sein.

Key Findings of the Study

Thiamethoxam and Florasulam are readily biodegraded upon addition of mineral nutrients. Target concentrations of 0.1 µg/L seem to be attainable within 100 to 500 days. The decline of Clopyralid is comparably slower, a quantitative discrimination of biological and abiotic degradation processes however, is not possible. Flumetsulam showed no decrease in concentration for the whole test period.

None of the tested groundwater samples of the contaminated site in Korneuburg showed DNA damage or estrogen activity. None of these samples showed growth inhibition on human cell lines.

Luminescent bacteria and green algae showed no adverse effects upon exposure to groundwater samples, Daphnia and Lemna showed moderate to increased inhibition, which can be explained by pesticide content and water hardness of groundwater samples.

Microbial degradation of pesticides in the groundwater model system showed no increase of hormone effects or genotoxicity. Neither growth inhibition of human cell lines was observed. Apart from the confirmation of known degradation products of Thiamethoxam, Florasulam and Clopyralid, no enrichment of substances could be verified, that may be derived from target pesticides by an evident degradation reaction.



Summary and Conclusions

The main focus of this study was put on the investigation of the fate of selected pesticides in groundwater bodies with respect to microbial transformation. For that purpose, experiments were performed with both selected pesticides and groundwater originating from a contaminated site in the town Korneuburg. In addition, possibilities to enhance microbial pesticide degradation were investigated and the potential of a technical application of bioremediation processes for a contaminated site was evaluated.

Degradation experiments with individual pesticides over two months confirm biodegradation for Thiamethoxam and Florasulam by a significant concentration difference to the abiotic control, for Thiamethoxam additionally by the generation of the known metabolites CGA 355190 and CGA 353968. The decline in concentration amounted to 59% for Thiamethoxam and to 34% for Florasulam. For Clopyralid and Flumetsulam biodegradation was not confirmed when compared to the abiotic control.

Results of treatments with Fenton reagent and the enzyme Laccase suggest that stabile pesticides like Clopyralid can be potentially transferred by radical reactions. Given that enzymes like Laccases occur mainly in fungi that are abundant in surface soil layers whereas bacteria represent a bigger proportion of the microbial biomass in groundwater bodies, the difference between observed half-life times (groundwater 405-556 days) and published ones (soil 13-65 days; IUPAC, 2014) can be explained. The observed half-life of about 500 days is also in line with data that were published for the water/sediment system, with hydrolysis and photodegradation being considered as not relevant for this degradation pathway (EFSA, 2005).

Degradation experiments in bioreactors with groundwater of the contaminated site showed a rapid degradation of Thiamethoxam: the concentration fell below the quality criterion of 0.1 µg/L within 60 days. For Florasulam a final value of 0.62 µg/L was reached over a period of 144 days, whereas an ongoing decline for a prolonged treatment period is anticipated. Degradation was not enhanced by inoculation with aquifer material, whilst the addition of mineral nutrients had a positive effect on the microbial degradation of Thiamethoxam and Florasulam. In the best case, the half-life of Thiamethoxam was reduced to 11 days and of Florasulam to 157 days. Also for Clopyralid a reduction of the half-life from 555 to 405 days was achieved upon nutrient addition. A precise assignment of Clopyralid losses to biotic and abiotic processes is not possible.

Degradation experiments in aquifer columns served as model systems for groundwater bodies. Degradation behavior of pesticides was similar compared to bioreactors. Thiamethoxam and Florasulam concentrations declined quickly upon sufficient nutrient supply with degradation rates being somewhat lower compared to bioreactor experiments. In addition, a significant decline of Thiamethoxam metabolites CGA 355190 and CGA 353968 could be observed suggesting that further break down of these degradation intermediates in groundwater reservoirs is possible at appropriate conditions. Moreover, an ecotoxicological evaluation of the main Thiamethoxam metabolite CGA 355190 exhibited no ecotoxic effects for the relevant concentration range. This is also true with regard to human cell lines.

For Flumetsulam biodegradation was neither observed in bioreactors nor in aquifer columns.

A quantitative analytic method was provided for the determination of primary substances and of further pesticides and metabolites for which reference standards were available. For some analytes (e.g. Dicamba) an enrichment step using solid phase extraction was necessary to detect concentrations close to the criterion of 0.1 µg/L.

The search for known metabolites resulted into three hits: Demethylflorasulam, N-2,6-difluorophenyl-1,2,4-triazolsulfonamid and 3,6-Dichlor-2-pyridinol, whereupon the first two are derived from Florasulam and the last from Clopyralid. All three could only be determined in samples that were concentrated by a factor of 500, the actual concentrations are probably negligible compared to the primary substances.

Furthermore, an untargeted screening for sulfur and chlorine containing compounds was accomplished in connection with an algorithm for data processing that is based on the exact mass difference between the corresponding 35/37 chlorine and 32/34 sulfur isotopes, respectively. Where possible, an elemental formula was generated for detected masses, which was subsequently matched to structural formulas retrieved from a database. From these suggestions, only the structure of a methylated analogue of Clopyralid could be explained reasonably by a typical metabolic reaction of primary substances. As corresponding peaks could be detected only in concentrated samples, the respective concentrations are probably lower, but certainly not higher than the primary substances. A lack of reference standards prohibited verification.

The occurrence of chlorinated (halogenated) organic compounds in the environment does not necessarily imply their synthetic origin. In literature, some thousand naturally occurring halogenated organic compounds are known which are built by marine organisms, terrestrial plants, bacteria, fungi, lichens, insects and even vertebrates.

Bioassays are effect based methods that are used to detect impacts on ecologic receptors. Four assays using luminescent bacteria, green algae, Daphnia or Lemna were employed to test groundwater samples, selected pesticides and samples from degradation experiments. In addition, microbiological and molecular biological tools were applied to characterize consortia that are involved in pesticide biodegradation.

Groundwater samples taken between April and August 2013 showed slightly distinctive, but by trend little to moderate inhibiting effects on Daphnia and moderate to increased inhibiting effects on Lemna. Increased effects cannot be assigned directly and may be explained partly by the pesticide content of samples partly by dissolved minerals (water hardness). Ecotoxic effects on luminous bacteria or green algae were not detected.

All four test organisms were employed to determine concentration-effect relationships for pure pesticides up to a maximum concentration of 1 mg/L. As expected, ecotoxic effects were observed for Flumetsulam and Florasulam (Lemna) as well as Clopyralid, Dicamba and Chlorpyrifos (Daphnia). EC₅₀ values, however, are significantly higher than groundwater concentrations.

Groundwater (HF05, November 18th 2013) that was used for degradation experiments in aquifer columns showed only noteworthy inhibitions in Daphnia and Lemna tests, similar to previously taken groundwater samples. While the inhibition of Daphnia clearly decreased in the course of the degradation experiment, the inhibition of Lemna at the end of the main experiment (addition of nutrients and aeration) did not decrease compared to groundwater used in this experiment.

Metagenom analysis (DGGE / Pyrosequencing) suggests a change in the relative distribution of microbial species, presumably an adaptation to the situation in the contaminated groundwater body. The naturally occurring genera *Xanthomonas* und *Pseudomonas* have increased, most probably a consequence of



participating in the biological degradation process of pesticides. Similarly, the metagenoms of samples from the end of the bioreactor experiments showed a frequent occurrence of bacteria of the genus *Pseudomonas*.

Analysis with four human cell lines (RPTEC/TERT1, HepG2, HUVEC/TERT7 und MCF-7) showed a growth inhibiting effect of the tested pesticides Clopyralid, Thiamethoxam, Florasulam, Flumetsulam, Dicamba and Chlorpyrifos only at very high concentrations (at least 800 times higher than measured for the groundwater of the contaminated site). The groundwater samples showed no inhibiting effects on the growth of human cell cultures used in this study and did not induce DNA disruption. An endocrine effect of highly contaminated groundwater samples could not be detected.

Monitoring of the degradation experiments in the groundwater model system (aquifer columns) did not result in an increase of endocrine (CALUX system) or in genotoxic effects (Comet assay with HEPG2 und RPTEC/TERT1). No growth inhibition of human cell lines (HUVEC/TERT7 and RPTEC/TERT1) could be observed.

Degradation products of Thiamethoxam and Florasulam (traces) were detected in experiments using groundwater from the contaminated site. This indicates the possibility of microbiological break down of the respective primary substance in the aquifer system. Degradation rates from the column experiment suggest remediation periods for meeting a threshold concentration of 0.1 µg/L of 129 days (Thiamethoxam, initial value 1.23 µg/L) and of 441 days (Florasulam, initial value 0.33 µg/L). Data generated in investigations using groundwater from the contaminated site in Korneuburg does not indicate bioremediation being an appropriate technique for removing Clopyralid and Flumetsulam from the contaminated aquifer.

Arbeitspaket 1

Untersuchung und Optimierung des mikrobiellen Pestizidabbaus

Als organische Moleküle können Pestizide prinzipiell mikrobiologisch abgebaut werden. Da es sich aber um eine Schadstoffgruppe mit Substanzen unterschiedlichster Eigenschaften handelt, ist eine generelle Vorhersage bezüglich deren Umwelt- und Abbauverhalten nicht möglich. In der Fachliteratur sind für einzelne Substanzen Hinweise auf eine mikrobiologische Transformation enthalten; diese beziehen sich allerdings vorwiegend auf den mikrobiellen Abbau der Kontaminanten im Boden (Herbizide) bzw. die Metabolisierung der Schadstoffe zum Beispiel im tierischen Organismus (Insektizide). Bezüglich der Abbaubarkeit von Pestiziden im Grundwasser ist die Datenlage nicht ausreichend, um konkrete Aussagen bezüglich der möglichen Anwendbarkeit mikrobiologischer Sanierungstechniken für diese Stoffgruppe zu erhalten.

Zielsetzung im Arbeitspaket

Die Zielsetzung dieses Hauptarbeitspaketes entspricht der Ausrichtung des Gesamtforschungsvorhabens: Es soll geprüft werden, inwieweit unter Aquiferbedingungen ein mikrobiologischer Schadstoffabbau für eine Gruppe von Pestiziden möglich ist. Neben einer Definition der Voraussetzungen sollen Abbauraten sowie Abbaugrade ermittelt werden.

Das Hauptaugenmerk dieses Arbeitspaketes liegt in der Durchführung von Laborexperimenten zur Untersuchung des mikrobiellen Pestizidabbaus, wobei das Abbauverhalten nicht nur mit dotierten Nährmedien sondern auch mit Grundwasserproben eines kontaminierten Standortes in Korneuburg überprüft wird. In Versuchen unterschiedlicher Größe soll das Abbauverhalten sowohl von einzelnen Pestiziden als auch von Pestizidgemischen abgeschätzt werden. Einer Charakterisierung von Grundwasser- und Feststoffproben aus dem Aquifer folgt eine Anreicherung von Mikroorganismen unter Vorlage der jeweiligen Pestizide.

Mittels chemischer Reagenzien werden Reaktionsmechanismen hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zum Abbau weitgehend persistenter Pestizide untersucht. Zusätzlich werden Optimierungsmaßnahmen beispielsweise durch Zusatz von mineralischen Nährstoffen, Co-Substraten, Impfmaterialein, Enzymen oder Redox-Mediatoren sowie durch Änderung von Milieubedingungen geprüft. Abbauprobungen in Bioreaktoren und Aquifersäulen werden mit Grundwasser des kontaminierten Standortes durchgeführt und sollen durch möglichst realitätsnahe Abbildung der für den mikrobiellen Pestizidabbau relevanten Aquiferbedingungen eine Abschätzung der Abbauraten der einzelnen Pestizide zulassen.



Materialien und Beprobung

Nachfolgend sind die im Forschungsvorhaben eingesetzten Materialien, Beprobungen sowie Probenahmestellen dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die Experimente gemeinsam mit den dazugehörigen Ergebnissen beschrieben.

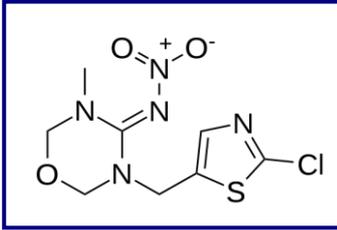
Auswahl an Pestiziden

Im Rahmen dieses Forschungsprojektes wurden folgende Pestizide einer näheren Untersuchung unterzogen:

- (1) Thiamethoxam (TMX)
- (2) Clopyralid (CLO)
- (3) Flumetsulam (FLU)
- (4) Florasulam (FLO)
- (5) Dicamba (DIC)
- (6) Chlorpyrifos (CHP)

Die ersten vier Substanzen sind im Grundwasserkörper des kontaminierten Standortes anzutreffen. Weiters wurden auch Dicamba und Chlorpyrifos in die Untersuchungen einbezogen. Das Hauptaugenmerk der durchgeführten Experimente und Untersuchungen lag auf Vertretern dieser Liste, darüber hinaus wurden gegebenenfalls in einzelnen Versuchen auch Metaboliten oder weitere Pestizide berücksichtigt. Wo zutreffend, ist dies im Ergebnisteil dargestellt.

Die Wirkweise der genannten Substanzen, relevante physikalisch-chemische Kenngrößen (IUPAC, 2014) sowie die Konzentrationen zu Projektstart einer vergleichsweise hoch belasteten Messstelle (Hotspot 2/HF05) am kontaminierten Standort sind nachfolgend dargestellt.

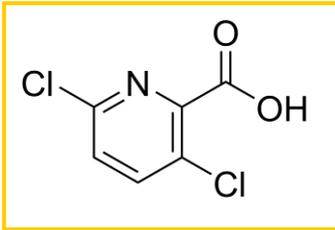


Thiamethoxam – ist ein systemisches Insektizid (Acetylcholinrezeptor-Agonist) aus der Klasse der Neonicotinoide und wird gegen ein breites Spektrum an Insekten eingesetzt.

Ausgewählte Stoffeigenschaften

Parameter	Wert	Interpretation
Molare Masse (g/mol)	291,71	-
Summenformel	$C_8H_{10}ClN_5O_3S$	-
Löslichkeit Wasser bei 20°C (mg/L)	4.100	hoch
Koc (mL/g)	56,2	mobil
Henry Konstante bei 25°C: ($Pa\ m^3\ mol^{-1}$),	$4,70 \times 10^{-10}$	nicht flüchtig
Abbau Boden, DT50 (Tage)	34 - 233	moderat persistent - persistent
Abbau Wasser/Sediment, DT50 (Tage)	40	moderat schnell
Hydrolyse, DT50 (Tage)	stabil	sehr persistent

Die Thiamethoxam-Konzentration der Messstelle HF05 (Hotspot 2) lag zu Projektbeginn bei 3,99 µg/L.

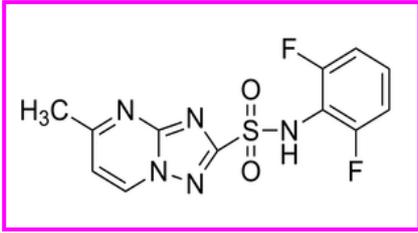


Clopyralid – es handelt sich um ein selektives systemisches Herbizid (synthetisches Auxin), das über Blätter und Wurzeln aufgenommen werden kann. Es wird insbesondere zur Bekämpfung von zweikeimblättrigen Unkräutern eingesetzt.

Ausgewählte Stoffeigenschaften

Parameter	Wert	Interpretation
Molare Masse (g/mol)	192,0	-
Summenformel	$C_6H_3Cl_2NO_2$	-
Löslichkeit Wasser bei 20°C (mg/L)	143.000	hoch
Koc (mL/g)	5	sehr mobil
Henry Konstante bei 25°C: ($Pa\ m^3\ mol^{-1}$),	$1,80 \times 10^{-11}$	nicht flüchtig
Abbau Boden, DT50 (Tage)	13-65	nicht bis moderat persistent
Abbau Wasser, DT50 (Tage)	148	stabil
Hydrolyse, DT50 (Tage)	stabil	sehr persistent

Die Clopyralid-Konzentration in der Messstelle HF05 (Hotspot 2) lag zu Projektbeginn bei 64,2 µg/L.

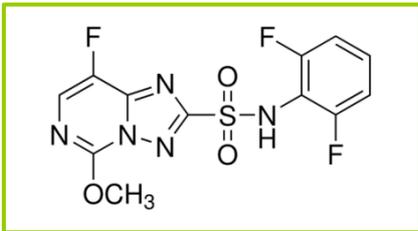


Flumetsulam – wirkt als selektives systemisches Herbizid (Acetolactat-Synthase Inhibitor) auf zweikeimblättrige Unkräuter und wird z. B. zu deren Bekämpfung in Maisfeldern eingesetzt.

Ausgewählte Stoffeigenschaften

Parameter	Wert	Interpretation
Molare Masse (g/mol)	325,29	-
Summenformel	$C_{12}H_9F_2N_5O_2S$	-
Löslichkeit Wasser bei 20°C (mg/L)	5.650	hoch
Koc (mL/g)	28	mobil
Henry Konstante bei 25°C: ($Pa\ m^3\ mol^{-1}$),	$2,00 \times 10^{-14}$	nicht flüchtig
Abbau Boden, DT50 (Tage)	30-90	moderat persistent
Abbau Wasser/Sediment, DT50 (Tage)	-	-
Hydrolyse, DT50 (Tage)	-	-

Die Flumetsulam-Konzentration in der Messstelle HF05 (Hotspot 2) lag zu Projektbeginn bei 1,64 µg/L.

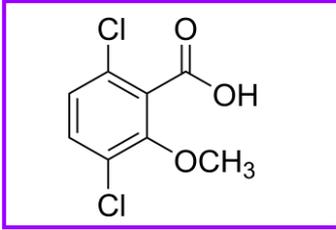


Florasulam – wird als selektives Herbizid (Acetolactat-Synthase Inhibitor) gegen einjährige zweikeimblättrige Unkräuter eingesetzt, z. B. im Getreideanbau.

Ausgewählte Stoffeigenschaften

Parameter	Wert	Interpretation
Molare Masse (g/mol)	359,28	-
Summenformel	$C_{12}H_8F_3N_5O_3S$	-
Löslichkeit Wasser bei 20°C (mg/L)	6.360	hoch
Koc (mL/g)	-	-
Henry Konstante bei 25°C: ($Pa\ m^3\ mol^{-1}$),	$4,35 \times 10^{-07}$	nicht flüchtig
Abbau Boden, DT50 (Tage)	0,7 - 8,5	nicht persistent
Abbau Wasser/Sediment, DT50 (Tage)	13,3	schnell
Hydrolyse, DT50 (Tage)	stabil	sehr persistent

Die Florasulam-Konzentration in der Messstelle HF05 (Hotspot 2) lag zu Projektbeginn bei 1,29 µg/L.

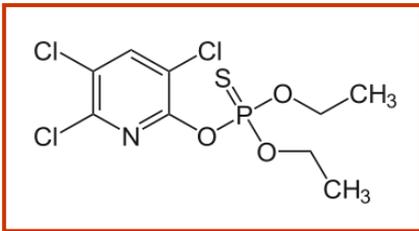


Dicamba – synthetisches Auxin, wird als systemisches Herbizid gegen zweikeimblättrige Unkräuter in der Landwirtschaft sowie auf Rasenflächen verwendet.

Ausgewählte Stoffeigenschaften

Parameter	Wert	Interpretation
Molare Masse (g/mol)	221,04	-
Summenformel	$C_8H_6Cl_2O_3$	-
Löslichkeit Wasser bei 20°C (mg/L)	250.000	hoch
Koc (mL/g)	-	-
Henry Konstante bei 25°C: ($Pa\ m^3\ mol^{-1}$),	$1,0 \times 10^{-04}$	nicht flüchtig
Abbau Boden, DT50 (Tage)	2,1 - 10,5	nicht persistent
Abbau Wasser/Sediment, DT50 (Tage)	41	moderat schnell
Hydrolyse, DT50 (Tage)	stabil	sehr persistent

Dicamba konnte im Grundwasser im Rahmen der Untersuchungen des Forschungsvorhabens nicht nachgewiesen werden.



Chlorpyrifos – ist ein nicht-systemisches Insektizid (Acetylcholinesterase Inhibitor) welches gegen saugende und beißende Insekten sowie Bodenschädlinge in der Landwirtschaft und im Haushalt eingesetzt wird.

Ausgewählte Stoffeigenschaften

Parameter	Wert	Interpretation
Molare Masse (g/mol)	350,89	-
Summenformel	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	-
Löslichkeit Wasser bei 20°C (mg/L)	1,05	gering
Koc (mL/g)	-	-
Henry Konstante bei 25°C: ($Pa\ m^3\ mol^{-1}$),	0,478	moderat flüchtig
Abbau Boden, DT50 (Tage)	11 – 141	nicht persistent – persistent
Abbau Wasser/Sediment, DT50 (Tage)	36,5	moderat schnell
Hydrolyse, DT50 (Tage)	25,5	nicht persistent

Chlorpyrifos konnte im Grundwasser im Rahmen der Untersuchungen des Forschungsvorhabens nicht nachgewiesen werden.

Grundwasserbeprobung und chemisch-analytische Charakterisierung

Sichtung zugänglicher Daten und Festlegung von Probenahmepunkten

Korneuburg diente als Referenzstandort zur Abschätzung des Abbaupotentials von Pestiziden im Grundwasser. Ebendort erfolgte die Entnahme von kontaminierten Grundwasser- und Feststoffproben zur Durchführung der Experimente und Analysen. Im Rahmen der Projektplanung wurden bereits vorhandene Daten berücksichtigt (<http://www.grundwassersanierung-korneuburg.at/>) und die zu beprobenden Messstellen und Pestizid-Konzentrationsbereiche für Abbauxperimente mit Grundwasser festgelegt. Darüber hinaus wurden von der Fa. Kwizda Pläne zur Verfügung gestellt, welche eine Auswahl von geeigneten Bohrkernproben zur Gewinnung von Aquifermaterial ermöglichten.

Am kontaminierten Standort wurden an drei verschiedenen Messstellen Grundwasserproben entnommen. Die Auswahl der Messstellen richtete sich nach den jeweilig vorhandenen Pestizidkonzentrationen mit dem Ziel, einen breiten Konzentrationsbereich abzudecken. Ausgewählt wurden folgende Messstellen:

- (1) KS06 – Brunnenreihe Fetter, mittlere Kontamination
- (2) HF05 – Hotspot 2, erhöhte Kontamination
- (3) FB01 – Fahnenbegrenzung, niedrige Kontamination

Diese Messstellen wurden in regelmäßigen Abständen beprobt und einer Multiparameteranalyse unterzogen.

Weiters wurde Feststoff aus dem Grundwasserkörper (Aquifermaterial) an verschiedenen Stellen gewonnen und hinsichtlich seiner physikalisch-chemischen Zusammensetzung charakterisiert. Dieses Material wurde zur Simulation von Standortbedingungen in den Abbauxperimenten eingesetzt. Darüber hinaus wurde einer Abwassersammelgrube der Fa. Kwizda Sediment entnommen. Dieser Schlamm diente als Ausgangsmaterial für die Erstellung von Anreicherungskulturen.



Probenahme Grundwasser

Am kontaminierten Standort wurden an drei Probenahmepunkten (siehe Abbildung 1.1) Grundwasserproben entnommen. Bei allen Probenahmen handelt es sich um Hahnenentnahmen. Die Messstellen wurden an jeweils vier Probenahmeterminen beprobt (08.04.2013, 05.06.2013, 19.08.2013 und 18.11.2013).

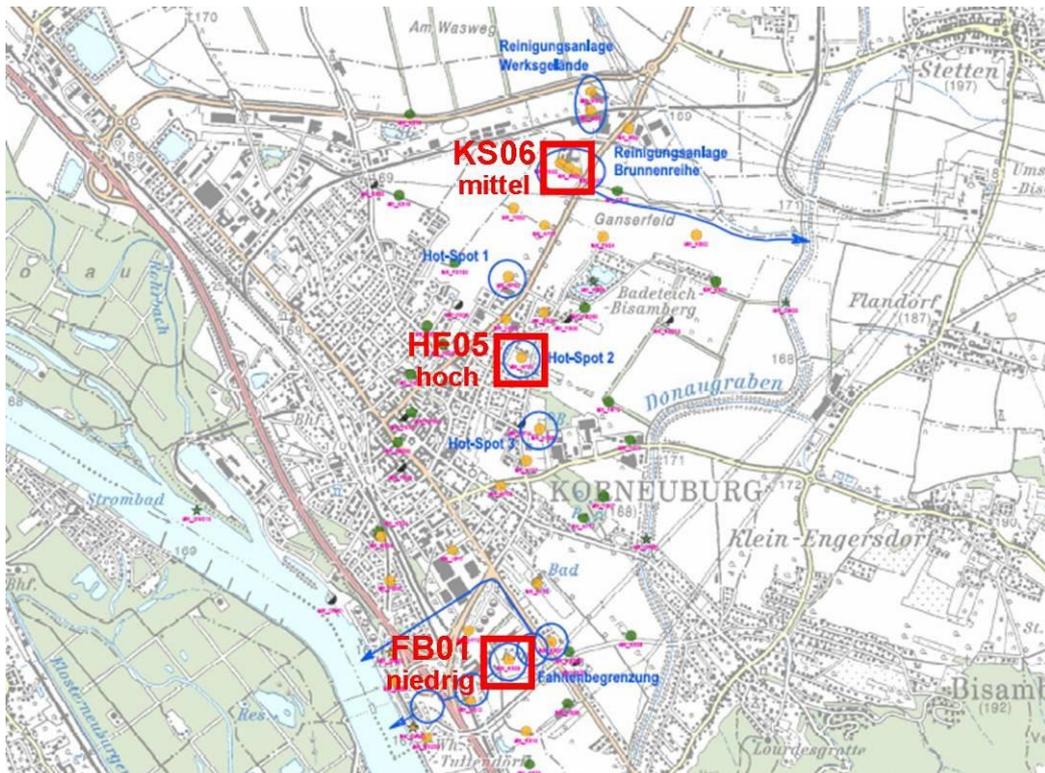


Abbildung 1.1: Entnahmestellen der im Forschungsprojekt untersuchten Grundwasserproben (KS06, HF05 und FB01). Die Bezeichnungen „mittel“, „hoch“ und „niedrig“ leiten sich aus einem Vergleich der Pestizidkonzentrationen der einzelnen Messstellen ab.

Grundwassercharakterisierung

Folgende Parameter wurden mittels eines portablen Geräts (Hach-Lange) vor Ort unmittelbar bei der Entnahme der Probe bestimmt (Ergebnisse in Tabelle 1.1):

- pH-Wert (pH)
- elektrische Leitfähigkeit (Lf)
- Temperatur (T)
- Sauerstoffgehalt (O₂)
- Redoxpotential (Redox)

Tabelle 1.1: Messparameter ermittelt bei Grundwasserprobenahme

Physikalisch-chemische Parameter Grundwasser					
	Einheit	Probenahme	KS06	HF05	FB01
pH		08.04.2013	7,6	7,6	7,7
		05.06.2013	7,5	7,5	7,5
		19.08.2013	7,0	7,0	7,0
Lf	µS/cm	08.04.2013	1.255	1.143	1.289
	µS/cm	05.06.2013	1.311	1.259	1.312
	µS/cm	19.08.2013	1.208	1.113	1.167
T	°C	08.04.2013	11,0	11,0	11,0
	°C	05.06.2013	11,3	11,6	11,0
	°C	19.08.2013	12,6	12,7	12,8
O₂	mg/L	08.04.2013	4,4	4,9	6,0
	mg/L	05.06.2013	4,5	8,1	7,3
	mg/L	19.08.2013	3,6	6,5	5,1
Redox	mV	08.04.2013	329	323	323
	mV	05.06.2013	182	189	183
	mV	19.08.2013	252	242	205

Die pH-Werte der Proben liegen im neutralen Bereich. Die für alle Messstellen ermittelte Leitfähigkeit deutet auf eine hohe Mineralisierung des Wassers hin (siehe Tabelle 1.2 und Tabelle 1.3). Die Temperatur entspricht ebenfalls normalen Werten. Die Sauerstoffgehalte schwanken in den Messstellen, liegen aber immer im aeroben Bereich. Dies wird durch die positiven Werte für das Redoxpotential bestätigt.

Folgende Gehalte an Anionen im Grundwasser wurden mittels Ionenchromatographie (IC; Dionex ICS-900, AS14A) ermittelt:

Tabelle 1.2: Grundwasserproben des kontaminierten Standortes – Gehalte ausgewählter Anionen

Anionen Grundwasser					
	Einheit	Probenahme	KS06	HF05	FB01
Fluorid	mg/L	08.04.2013	0,16	0,13	0,12
	mg/L	05.06.2013	0,18	0,18	0,19
	mg/L	19.08.2013	0,21	0,21	0,20
Chlorid	mg/L	08.04.2013	103	97,4	107
	mg/L	05.06.2013	110	99,6	113
	mg/L	19.08.2013	97,1	97,1	112
Nitrat	mg/L	08.04.2013	43,3	34,8	38,8
	mg/L	05.06.2013	40,0	36,7	42,6
	mg/L	19.08.2013	39,8	36,7	39,3
Sulfat	mg/L	08.04.2013	164	143	193
	mg/L	05.06.2013	159	159	200
	mg/L	19.08.2013	153	159	192



Die in Tabelle 1.3 dargestellten Werte wurden mittels Inductive Coupled Plasma Mass-Spectroscopy (ICP-MS; Horiba Jobin Yvon, Ultima) ermittelt:

Tabelle 1.3: Grundwassercharakterisierung mittels ICP-MS

ICP-MS Grundwasser (08.04.2013)					
	Einheit	BG*	KS06	HF05	FB01
Ca	mg/kg	0,14	130	119	128
Mg	mg/kg	0,02	59,5	55,7	67,8
Na	mg/kg	0,25	40,7	38,0	39,8
K	mg/kg	0,03	9,33	7,20	9,10
Ag	µg/kg	0,02	< BG	< BG	< BG
Cd	µg/kg	0,01	0,01	0,02	0,02
Ce	µg/kg	0,02	< BG	< BG	< BG
Co	µg/kg	0,01	0,07	0,06	0,09
Cr	µg/kg	0,01	0,50	0,54	0,09
Cu	µg/kg	0,14	< BG	0,30	0,77
Fe	µg/kg	15,0	< BG	< BG	< BG
Hg	µg/kg	0,04	< BG	< BG	< BG
Mn	µg/kg	0,30	< BG	< BG	96,4
Mo	µg/kg	0,14	0,47	0,88	0,62
Ni	µg/kg	0,01	0,45	0,46	1,13
Pb	µg/kg	0,07	0,27	0,07	0,08
Sb	µg/kg	0,01	0,17	0,22	0,53
Se	µg/kg	0,13	2,29	2,33	1,63
Sn	µg/kg	0,03	< BG	< BG	< BG
U	µg/kg	0,01	7,36	8,58	25,8
Zn	µg/kg	0,28	22,2	8,76	3,16
*) Bestimmungsgrenze					

Bestimmung der Pestizidkonzentrationen

Die Bestimmung der Pestizidgehalte für Grundwasserproben als auch für alle Abbau- und Anreicherungsversuche erfolgte mittels LC-MS/MS. Die Methode ist in Arbeitspaket 2 ausführlich dargestellt.

In Tabelle 1.4 sind die Pestizidgehalte der Probenahmen im April, Juni, August und November zusammengefasst. Zur Gewinnung von Grundwasser, erforderlich für die Durchführung der Abbauprobe in Aquifersäulen, erfolgte im November lediglich eine Beprobung der Messstelle HF05.

Tabelle 1.4: Pestizidgehalte der Grundwasserproben des kontaminierten Standortes

Pestizidgehalte Grundwasser					
Parameter	Einheit	Probenahme	KS06	HF05	FB01
Thiamethoxam	µg/L	08.04.2013	0,39	3,99	0,36
	µg/L	05.06.2013	0,45	2,36	0,23
	µg/L	19.08.2013	0,41	1,38	0,73
	µg/L	18.11.2013	-*	1,23	-
CGA 355190	µg/L	08.04.2013	0,06	6,30	0,38
	µg/L	05.06.2013	0,12	3,60	0,25
	µg/L	19.08.2013	0,16	2,31	1,12
	µg/L	18.11.2013	-	1,84	-
CGA 353968	µg/L	08.04.2013	0,19	0,73	0,05
	µg/L	05.06.2013	0,23	0,44	0,03
	µg/L	19.08.2013	0,14	0,33	0,10
	µg/L	18.11.2013	-	0,26	-
Clopyralid	µg/L	08.04.2013	5,40	64,2	6,00
	µg/L	05.06.2013	7,97	3,84	3,84
	µg/L	19.08.2013	7,55	24,4	14,3
	µg/L	18.11.2013	-	20,2	-
Flumetsulam	µg/L	08.04.2013	0,39	1,64	0,22
	µg/L	05.06.2013	0,53	1,04	0,10
	µg/L	19.08.2013	0,35	0,49	0,22
	µg/L	18.11.2013	-	0,45	-
Florasulam	µg/L	08.04.2013	0,41	1,29	0,09
	µg/L	05.06.2013	0,48	0,79	0,04
	µg/L	19.08.2013	0,35	0,49	0,22
	µg/L	18.11.2013	-	0,33	-
*) - nicht beprobt					

Die drei beprobten Grundwassermessstellen sind im Vergleich unterschiedlich hoch mit Pestiziden belastet. In allen Messstellen wird jedoch die Hauptkontamination durch Clopyralid verursacht, gefolgt von Thiamethoxam und seinen Abbauprodukten CGA 355190 und CGA 353986, Flumetsulam und Florasulam. Für Dicamba, Chlorpyrifos und Clothianidin lagen die Werte bei allen Probenahmen unter 0,1 µg/L. HF05 (Hotspot 2) weist die höchsten Konzentrationen auf, wobei für diese Messstelle im Beobachtungszeitraum sowohl für die Zielpestizide als auch für die beiden Thiamethoxam-Abbauprodukte ein Konzentrationsrückgang zu verzeichnen ist (Tabelle 1.4).



Probenahme und Charakterisierung der Feststoffproben

Von Kwizda wurden Bodenproben aus Bohrungen, die am Firmenareal getätigt wurden, zur Verfügung gestellt. Dieses Aquifermaterial, i.e. Feststoff aus der grundwasserführenden Schicht, wurde hinsichtlich seiner chemischen Zusammensetzung analysiert.

Aquifermaterial wird einerseits in Laborversuchen verwendet, um die Bedingungen am Standort zu simulieren. Andererseits liegt nahe, dass in Material aus einem kontaminierten Aquifer bereits Mikroorganismen vorhanden sind, die (i) durch Pestizide nicht maßgeblich gehemmt werden und die (ii) Pestizide möglicherweise metabolisieren können. Somit kann dieses Aquifermaterial auch zur Beimpfung von Anreicherungskulturen und Abbauprobversuchen eingesetzt werden. Vor demselben Hintergrund wurden Schlammproben aus Abwassergruben der Fa. Kwizda entnommen und auf mikrobiellen Bewuchs untersucht.

Des Weiteren wurde ein Modellboden eingesetzt, mit dem am IFA-Tulln bereits zahlreiche Erfahrungen in verschiedenen Experimenten gesammelt werden konnten. Es kann davon ausgegangen werden, dass in dieser Probe vorhandene Mikroorganismen bereits in Kontakt mit Pestiziden waren. Dieser Boden kommt auch als Strukturmaterial für ausgewählte Abbauprobversuche zum Einsatz, der erhöhte Gehalt an organischer Substanz soll die Milieubedingungen für mikrobielles Wachstum verbessern.

Probenahme Feststoffe

Die Probenahme für Aquifermaterial und Schlammproben fand am 5. April 2013 am Gelände der Fa. Kwizda statt. Dabei wurden Feststoff aus Bohrkernen von drei Bohrungen (B1, B7, B9) sowie Schlammproben aus zwei Abwassergruben (A1, A3) entnommen (siehe Abbildung 1.2).

Feststoff wurde aus den Bohrkernen in folgenden Tiefen entnommen:

- B1 – Mischprobe: 3,5-6 m
- B7 – Mischprobe: 3-6 m
- B9 – Mischprobe: 4,5-6 m

Die Tiefenzonierung der Beprobung der Bohrkern (siehe Abbildung 1.3, links) orientierte sich am Grundwasserschwankungsbereich. Die entnommenen Proben beinhalten Feststoff aus der gesättigten Zone und dem Bereich des Kapillarsaums. Alle drei Kernproben sind mit einem Gemisch an Pestiziden kontaminiert.

In den Versuchen des Forschungsprojekts kam eine Mischprobe zum Einsatz, die zu gleichen Massenanteilen Feststoff der Proben B1, B7 und B9 enthielt. Das Material wurde < 2 mm gesiebt.

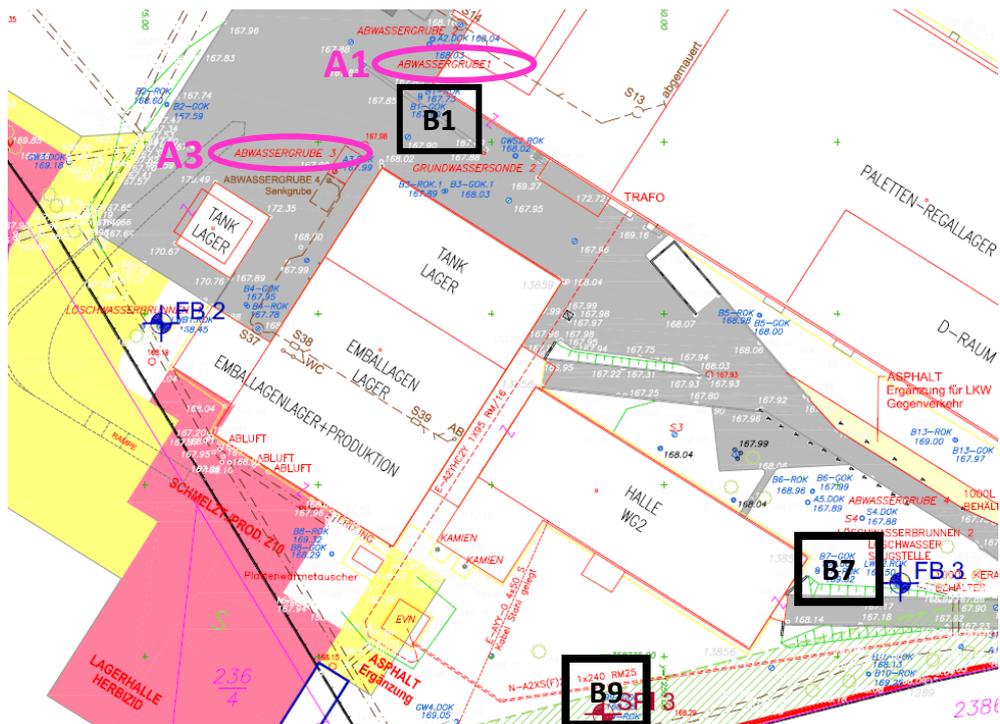


Abbildung 1.2: Lokalisation der Bohrungen (Aquifermaterial) und Abwassergruben (Schlammproben) am Gelände der Fa. Kwizda

Schlammproben wurden aus folgenden Abwassergruben entnommen:

- A1 – Schlammprobe aus Abwassergrube 1
- A3 – Schlammprobe aus Abwassergrube 3

Das Material, das den Abwassergruben (siehe Abbildung 1.3, rechts) entnommen wurde, stammt aus dem Bodensatz der jeweiligen Grube, wobei Abwassergrube 1 vorwiegend Abwässer aus der Fungizid-Formulierung, Abwassergrube 3 vorwiegend Abwässer aus der Herbizid-Formulierung enthält. Die pinke Färbung ist auf eine im Herstellungsprozess verwendete Lebensmittelfarbe zurückzuführen.



Abbildung 1.3: links Probenahme Bohrkern (Aquifermaterial) und rechts Probenahme Schlamm aus einer Abwassergrube



Die Probenahme des Modellbodens fand am 25. April 2013 statt. Aus einer Tiefe von 0-10 cm wurde landwirtschaftlichen Versuchsfeldern in Tulln eine Mischprobe entnommen. Die Felder wurden zuletzt im Herbst 2012 mit Pestiziden behandelt. Für die weitere Verwendung wurde die Probe < 2 mm gesiebt.

Charakterisierung der Feststoffproben

Die Feststoffproben (Boden- und Schlammproben) wurden hinsichtlich ihrer physikalisch-chemischen Zusammensetzung (Tabelle 1.5 und Tabelle 1.6) untersucht. Weiters wurde nach Extraktion der Pestizidgehalt der Proben abgeschätzt (Tabelle 1.7).

Tabelle 1.5: Physikalisch-chemische Charakterisierung des Aquifermaterials (Kernprobe) und der Bodenprobe vom Versuchsfeld (Modell-Boden)

Physikalisch-chemische Parameter Feststoff				
	TS [%]	pH	TOC [%]	TIC [%]
Kernprobe	93.3	8.21	0.02	1.95
Modellboden	91.8	7.92	1.43	0.84

Tabelle 1.6: Mittels ICP-MS bestimmte chemische Zusammensetzung des Aquifermaterials (Kernprobe) und der Bodenprobe vom Versuchsfeld (Modellboden)

ICP-MS Boden							
Parameter	Einheit	Kernprobe	Modellboden	Parameter	Einheit	Kernprobe	Modellboden
Al	mg/kg	6.503	43.020	Mg	mg/kg	13.256	12.306
As	mg/kg	3,86	8,25	Mn	mg/kg	196	699
Ca	mg/kg	51.849	29.770	Na	mg/kg	513	1235
Cd	mg/kg	< BG	1,65	Ni	mg/kg	6,27	31,8
Co	mg/kg	2,02	10,3	P	mg/kg	169	1.019
Cr	mg/kg	10,8	57,9	Pb	mg/kg	4,82	32,1
Cu	mg/kg	5,67	24,9	S	mg/kg	72,3	371
Fe	mg/kg	7.682	28.516	Se	mg/kg	< BG	0,15
Hg	mg/kg	< BG	< BG	Zn	mg/kg	12,6	82,2
K	mg/kg	2.222	12.637				

Die Feststoffproben wurden mittels einer halbautomatischen Soxhlet-Apparatur (Gerhardt, Soxtherm 2000; Abbildung 1.4, links) mit Ethylacetat extrahiert (Abbildung 1.4, rechts) und die Pestizidgehalte anschließend mit LC-MS/MS quantifiziert (Tabelle 1.7).



Abbildung 1.4: links Soxtherm-Apparatur und rechts Ethylacetat-Extrakte der Schlammprobe A1

Tabelle 1.7: Pestizidgehalte des Aquifermaterials (Kernprobe), der Bodenprobe vom Versuchsfeld (Modell-Boden) und der Schlammproben (A1 und A3)

Pestizidgehalte Feststoff					
Parameter	Einheit	Kernprobe	Modellboden	A1	A3
Thiamethoxam	µg/kg	5,0	0,09	12.766	30
CGA 355190	µg/kg	2,5	0,03	2.327	16
CGA 353968	µg/kg	0,70	0,04	43	1,1
Clopyralid	µg/kg	4,9	0,43	1.238	288
Flumetsulam	µg/kg	0,56	0,23	8,5	8,3
Florasulam	µg/kg	1,8	0,44	< BG*	18
Dicamba	µg/kg	0,04	n.g.**	0,30	n.g.
Chlorpyrifos	µg/kg	170	0,87	320.086	241

*) Bestimmungsgrenze ***) nicht gemessen

Im Aquifermaterial (Kernprobe) konnten die selben Pestizide, wie sie auch im Grundwasser des Standortes vorzufinden sind, nachgewiesen werden (Thiamethoxam, Clopyralid, Flumetsulam, Florasulam). Darüber hinaus ist für die Kernprobe ein hoher Gehalt an Chlorpyrifos zu verzeichnen; diese Substanz konnte in den entnommenen Grundwasserproben nicht in nennenswerten Konzentrationen festgestellt werden. Dies lässt sich aus der vergleichsweise geringen Wasserlöslichkeit (1,05 mg/L bei 20°C) und den hydrophoben Eigenschaften von Chlorpyrifos ableiten, wodurch eine Tendenz zur Sorption an Feststoffen (z.B. unpolare Bodenbestandteile) nahe liegt (WHO, 2004).

Im Modellboden konnten die projektrelevanten Pestizide nur in geringen Spuren nachgewiesen werden. Diese stammen vermutlich von früheren Pestizid-Behandlungen des Versuchsfelds.

In beiden Schlammproben (A1 und A3) wurden ebenfalls alle im Grundwasser des kontaminierten Standortes analysierten Pestizide nachgewiesen. Neben den Hauptkontaminanten Thiamethoxam (inklusive Metaboliten) sowie Clopyralid wurden in den Schlammproben, wie bereits im Aquifermaterial, hohe bis sehr hohe Gehalte an Chlorpyrifos gefunden.



Experimentelle Ansätze und Ergebnisse

Anreicherung von Pestizid-abbauenden Mikroorganismen

Durch Anreicherungskulturen werden jene Mikroorganismen gezielt vermehrt, die in der Lage sind, vorhandene Substrate in einer Konkurrenzsituation energetisch effizient zu verwerten. Folglich können Pestizid-metabolisierende Mikroorganismen durch Vorlage der entsprechenden Pestizide angereichert werden.

Es wurden sowohl Versuche mit sechs Einzelsubstanzen (Zielpestizide) als auch ein Versuch mit einer Mischung durchgeführt. Die so erhaltenen Kulturen wurden als Inokulum für Abbauprobversuche eingesetzt und sollten hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Abbaubeschleunigung untersucht werden.

Experimentelle Durchführung und Ergebnisse

Die Versuche wurden in geschüttelten 1 L (Einzelsubstanzen) bzw. 2 L (Pestizid-Gemisch) Erlenmeyerkolben bei Raumtemperatur im Dunkeln durchgeführt. Folgende Ansätze wurden gewählt:

- (1) Thiamethoxam
- (2) Clopyralid
- (3) Flumetsulam
- (4) Florasulam
- (5) Dicamba
- (6) Chlorpyrifos
- (7) Pestizid-Mischung Grundwasser

Für Einzelpestizide wurde eine Startkonzentration von jeweils 10 mg/L gewählt; im Versuch mit der Pestizid-Mischung wurden Grundwasser vom Standort (HF05 „hoch belastet“, Grundwasserprobenahme vom 08.04.2013) und Schlammproben (A1 und A3) eingesetzt. Alle Versuche wurden mit Nährstoffen (Mineralmedium) versetzt. In den Ansätzen der Einzelsubstanzen wurden zusätzlich je 1,2 g Modell-Boden als Aufwuchsfläche und potentielle Startkultur zugegeben.

Das Mineralmedium setzt sich wie folgt zusammen und kam, so nicht anders angeführt, in allen Experimenten zur Anwendung: Ammoniumnitrat 13,3 mg/L, Kaliumdihydrogenphosphat 2,3 mg/L, Dinatriumhydrogenphosphat 2,4 mg/L, Spurenelementlösung 10 mL/L (Tabelle 1.8), Vitaminlösung 1 mL/L (Tabelle 1.9).

Tabelle 1.8: Zusammensetzung der Spurenelementlösung

Spurenelementlösung			
	Summenformel	Einwaage	
Borsäure	H ₃ BO ₄	3	mg/L
Calciumchlorid	CaCl ₂	531	mg/L
Kobaltchlorid	CoCl ₂	3,9	mg/L
Kupfersulfat Pentahydrat	CuSO ₄ *5H ₂ O	17,3	mg/L
Eisensulfat Heptahydrat	FeSO ₄ *7H ₂ O	206	mg/L
Kaliumjodid	KI	101	mg/L
Mangansulfat Monohydrat	MnSO ₄ *H ₂ O	14	mg/L
Natriummolybdat Dihydrat	Na ₂ MoO ₄ *H ₂ O	5,3	mg/L
Natriumselenat	Na ₂ SeO ₄	0,6	mg/L
Nickelchlorid Hexahydrat	NiCl ₂ *6H ₂ O	4,6	mg/L
Zinksulfat Heptahydrat	ZnSO ₄ *7H ₂ O	20,5	mg/L
Schwefelsäure (98%)	H ₂ SO ₄	1	mL/L

Tabelle 1.9: Zusammensetzung der Vitaminlösung

Vitaminlösung			
	Summenformel	Einwaage	
p-Aminobenzoesäure	C ₇ H ₇ NO ₂	5	mg/L
Biotin	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	2	mg/L
Folsäure	C ₁₉ H ₁₉ N ₇ O ₆	2	mg/L
Liponsäure	C ₈ H ₁₄ O ₂ S ₂	5	mg/L
Nicotinsäure (98%)	C ₆ H ₅ NO ₂	5	mg/L
Ca-Pantothenat	C ₉ H ₁₆ NO ₅ * 1/2Ca	5	mg/L
Pyridoxamin (B6)	C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₂ * 2 HCl	10	mg/L
Riboflavin (B2)	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ O ₆	5	mg/L
Thiamin (B1)	C ₁₂ H ₁₇ ClN ₄ OS * HCl	5	mg/L
Cobalamine (B12) (99%)	C ₇₂ H ₁₀₀ CoN ₁₈ O ₁₇ P	0,1	mg/L

Der Anreicherungsversuch „Pestizid-Mischung“ sollte einerseits Substanzen zusätzlich zu den Zielpestiziden einschließen – es wurde Grundwasser wie am kontaminierten Standort anzutreffen eingesetzt – andererseits sollte eine in den Grundwasser- bzw. Schlammproben bereits erfolgte Anreicherung von abbaufähigen Mikroorganismen Berücksichtigung finden.

Nach einer Inkubation von einem Monat wurden die Überstände ausgewählter Proben mikroskopisch geprüft, wobei in den Ansätzen mit Thiamethoxam und der Pestizidmischung eine höhere Mikroorganismendichte als im Clopyralid-Ansatz erkennbar war. Nach vier Monaten erfolgte eine Passage der Kulturen. Dazu wurde jeweils 1 mL der Suspension entnommen, erneut mit einzelnen Pestiziden bzw. Grundwasser versetzt und in 250 mL Schikanenkolben mit Mineralmedium kultiviert. Mit dem Überführen der Überstände wurde für die Einzelsubstanz-Ansätze die jeweilige Pestizidkonzentration ermittelt.



In den in Tabelle 1.10 dargestellten Ansätzen konnte ein Rückgang der Pestizidkonzentration beobachtet werden, wobei die Abnahme je nach Substanz deutlich variiert. Eine ausgeprägte Konsumation der jeweiligen Zielsubstanz legt nahe, dass zum Abbau befähigte Mikroorganismen angereichert wurden. Die höchste Zehrung wurde für Thiamethoxam beobachtet, mittlere bis sehr geringe Abnahmen in den Ansätzen Florasulam, Dicamba, Clopyralid und Flumetsulam.

Tabelle 1.10: Pestizidgehalte in Anreicherungskulturen nach einem Kultivierungszeitraum von 4 Monaten

Pestizidgehalte Anreicherungskulturen		
	Einheit	Monat 4
Thiamethoxam	µg/L	2.282
Clopyralid	µg/L	8.688
Flumetsulam	µg/L	9.565
Florasulam	µg/L	7.223
Dicamba	µg/L	7.656

Aufgrund der unpolaren Eigenschaften von Chlorpyrifos und der daraus folgenden starken Tendenz zur Verteilung in organische Phasen (WHO, 2004), konnte für diese Substanz kein belastbarer Wert ermittelt werden. Die mikro- und molekularbiologischen Untersuchungen der Anreicherungskulturen sind in Arbeitspaket 3 dargestellt.

Untersuchung des mikrobiellen Abbaus von Pestiziden

Das Abbauverhalten der Zielpestizide wurde in separaten Versuchen unter Vorlage jeweils eines Pestizids als alleinige Kohlenstoffquelle einer näheren Betrachtung unterzogen. Zusätzlich wurde untersucht, ob sich bei gleichzeitigem Vorliegen von mehreren Pestiziden Änderungen in der metabolischen Verwertung der Zielsubstanzen ergeben. Diese Versuchsserien dienen dazu, Kenntnis über die grundlegende Abbaukinetik der Zielpestizide in Submerskultur zu erlangen. Um in diesem Stadium der Versuche potentielle Limitierungen durch zu geringe Substratvorlagen (Pestizidgehalte) zu vermeiden, wurden Substratkonzentrationen gewählt, die über dem Konzentrationsbereich der Zielpestizide am kontaminierten Standort liegen. Gehalte von wenigen Mikrogramm pro Liter (Standortkonzentrationen) können bereits im Bereich der Schwellwertkonzentrationen liegen, unter denen eine mikrobiologische Verwertung des Substrats energetisch u.U. nicht mehr zielführend ist und somit i.d.R. ein mikrobieller Abbau nicht stattfindet. Ausgenommen davon sind z.B. co-metabolisch ablaufende Prozesse, in denen die für den Abbau erforderliche Energie von einem zusätzlichen gut verwertbaren Substrat stammt.

Abbauversuche mit einzelnen Pestiziden

Versuchsaufbau

Der Abbauversuch mit einzelnen Pestiziden wurde als Suspensionsversuch in Schüttelkolben ausgeführt und umfasst insgesamt 109 Einzelansätze. Folgende Pestizide fanden im Rahmen dieser Experimente Berücksichtigung:

- (1) Thiamethoxam
- (2) Clopyralid
- (3) Flumetsulam
- (4) Florasulam
- (5) Dicamba
- (6) Chlorpyrifos

Als initiale Pestizidkonzentration der Abbauversuche wurde 1 mg/L gewählt. Allen Ansätzen wurden Nährstoffe (Mineralmedium) sowie je 100 mg Modell-Boden zugegeben (bzw. je 1,2 g Modell-Boden in den Dicamba-Ansätzen).

Alle Versuche (außer Dicamba) wurden am Orbitalschüttler in 100 mL Schikanenkolben bei Raumtemperatur im Dunkeln durchgeführt (siehe Abbildung 1.5). Die einzelnen Ansätze (jeweils Triplikate, Probenahmen am Tag 7, 14, 28 und 56), wurden im Zuge der Probenahme verworfen, lediglich der Ansatz des letzten Probenahmetags wurde zu Kontrollzwecken weitergeführt. Parallel zu den biotischen Ansätzen wurde eine mit HgCl_2 (1% m/v) vergiftete abiotische Kontrolle geführt. Diese dient zur Abschätzung des abiotischen Konzentrationsrückgangs, eine Beprobung erfolgte an Tag 28 und Tag 42.

Für Dicamba wurde der Versuch aus analytischen Gründen (größeres Probenvolumen zwecks Aufkonzentrierung erforderlich) in 1 L Erlenmeyerkolben (Triplikat) durchgeführt. Parallel wurde eine abiotische Kontrolle geführt.



Abbildung 1.5: Abbauversuch Einzelpestizide in 100 mL Schikanenkolben



Ergebnisse Einzelabbau

Der Abbau von einzelnen Pestiziden ist nachfolgend für Thiamethoxam und Florasulam graphisch dargestellt, da für diese beiden Pestizide die höchsten Abbauraten zu verzeichnen waren. Die Ergebnisse aller Abbauversuche mit Pestizid-Einzelsubstanzen sind in Tabelle 1.11 zusammengefasst.

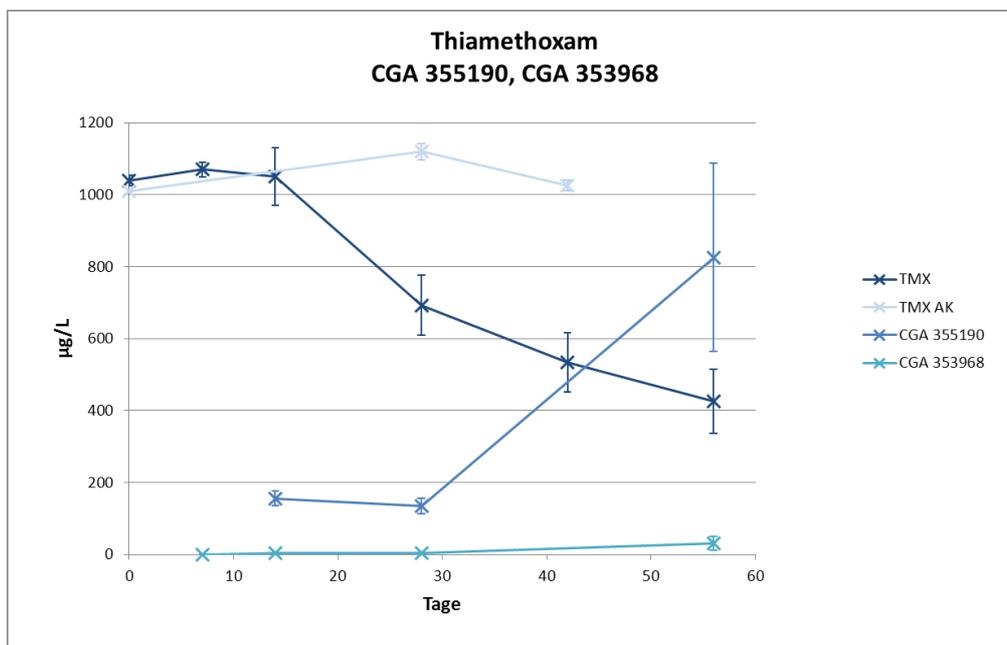


Abbildung 1.6: Abbauverlauf von Thiamethoxam (TMX) inklusive abiotischer Kontrolle (AK) sowie TMX-Hauptmetaboliten CGA 355190 und CGA 353968; Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung, n=3. Die erhöhte Standardabweichung für die hohe CGA 355190 Konzentration ist auf eine Sättigung des Detektors zurückzuführen.

Für Thiamethoxam konnte im Einzelabbauversuch nach einer Adaptierungsphase der Mikroorganismen von etwa 14 Tagen eine deutliche Abnahme der Konzentration um etwa 60% erreicht werden (Tabelle 1.11). Da in der abiotischen Kontrolle vergleichsweise kein Konzentrationsrückgang zu verzeichnen ist (Abnahmerate nicht signifikant von null verschieden), kann auf einen biologischen Abbau von Thiamethoxam geschlossen werden. Dies wird ebenfalls durch die Zunahme der Konzentrationen der beiden Thiamethoxam-Metaboliten, speziell CGA 355190, bestätigt.

Für Florasulam startete die Konzentrationsabnahme nach einer Adaptierungsphase von ca. einer Woche (Abbildung 1.7). Im Laufe von zwei Monaten war ein Rückgang der Florasulam-Konzentration um mehr als 30% zu verzeichnen. Für die abiotische Kontrolle konnte kein Konzentrationsrückgang verzeichnet werden (Abnahmerate nicht signifikant von null verschieden). Die Konzentrationsdifferenz zur abiotischen Kontrolle legt einen biotischen Abbau nahe, wie er auch bereits für Thiamethoxam zu beobachten war.

Im Abbauversuch mit Clopyralid konnte ebenfalls ein Konzentrationsrückgang von etwa 30% beobachtet werden. Zu Ende des Vergleichszeitraums von 42 Tagen wies jedoch auch die abiotische Kontrolle eine Clopyralid-Konzentration auf, die sich nicht signifikant von jener des mikrobiellen Versuchsansatzes unterscheidet, so dass eine abiotisch bedingte Konzentrationsabnahme nicht ausgeschlossen werden kann.

Für Flumetsulam konnte im Versuchszeitraum kein Rückgang der Pestizidkonzentration beobachtet werden. Ebenso zeigt die Konzentration an Dicamba im Einzelabbauversuch über einen Zeitraum von 56 Tagen keine signifikante Abnahme.

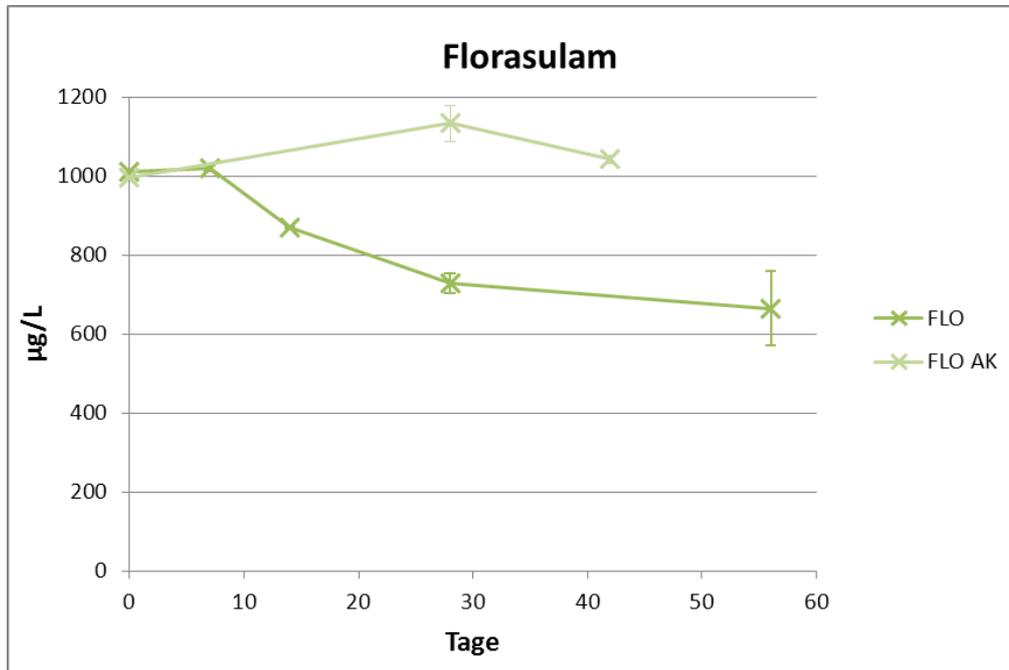


Abbildung 1.7: Abbaulverlauf von Florasulam (FLO) inklusive abiotischer Kontrolle (AK). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung, n=3.

Zusammenfassung Abbaulversuche mit einzelnen Pestiziden

Für drei der untersuchten Pestizide (Thiamethoxam, Florasulam und Clopyralid) konnte eine Abnahme der Pestizidkonzentration im Verlauf von zwei Monaten beobachtet werden. Für Florasulam und Thiamethoxam besteht ein deutlicher Unterschied zur abiotischen Kontrolle, was auf einen mikrobiellen Abbau der Pestizide hinweist. Für Clopyralid konnte ein Unterschied zur vergifteten Kontrolle nicht bestätigt werden, weshalb hier nicht gesichert von einem biologischen Abbau gesprochen werden kann. Für Flumetsulam und Dicamba konnte keine Abnahme der Pestizidkonzentration festgestellt werden.

Die Ergebnisse des Chlorpyrifos-Abbaulversuchs wurden nicht dargestellt, da dieses Pestizid bereits nach sieben Tagen in der Wasserphase nicht mehr in nennenswerten Konzentrationen nachweisbar war. Es wird davon ausgegangen, dass diese Substanz aufgrund ihres Verteilungsverhaltens an Feststoffe sorbiert und deshalb in der Wasserphase nicht mehr auffindbar ist (WHO 2004).

Die nachfolgend dargestellte Tabelle 1.11 gibt einen Überblick über den Abbau der einzelnen Pestizide. Hervorzuheben ist die Abnahme von Flumetsulam in der abiotischen Kontrolle. Dies wurde auch in weiteren abiotischen Versuchsansätzen festgestellt, in denen $HgCl_2$ zur Unterdrückung des mikrobiellen Wachstums eingesetzt wurde. Ein Zusammenhang einer beobachteten Fällungsreaktion mit der Konzentrationsabnahme kann nicht ausgeschlossen werden (siehe dazu auch „Abbaulversuche in Bioreaktoren“).



Tabelle 1.11: Pestizidkonzentrationen zu Beginn des Abbaueversuchs (d0 biot.) und der abiotischen Kontrolle (d0 AK) sowie prozentuelle Abnahme an Tag 56 des Abbaueversuchs (% Abn. biot. d56) und Tag 42 der abiotischen Kontrolle (% Abn. AK d42)

Abbau einzelne Pestizide					
	Einheit	d0 biot.	% Abn. biot. d56	d0 AK	% Abn. AK d42
Thiamethoxam	µg/L	1040	59	1011	-*
Clopyralid	µg/L	1038	34	1005	12
Flumetsulam	µg/L	987	-	964	24
Florasulam	µg/L	1011	34	997	-
Dicamba	µg/L	1159	2	953	-
*) - keine Abnahme					

Abbaueversuche mit Pestiziden im Gemisch

Zusätzlich zum Abbaueverhalten für einzelne Pestizide sollte ermittelt werden, ob die gleichzeitige Vorlage mehrerer Pestizide einen präferentiellen Abbau einzelner Substanzen nach sich zieht.

Der Versuch erfolgte über einen Zeitraum von 61 Tagen unter aeroben Bedingungen in abgedunkelten 1 L Erlenmeyerkolben (Probenvolumen 300 mL) mit den vier Zielsubstanzen Thiamethoxam, Clopyralid, Flumetsulam und Florasulam. Die jeweiligen Konzentrationen zu Beginn des Versuchs sind in Tabelle 1.12 dargestellt. Es wurde Mineralmedium vorgelegt sowie 5 mL Klärschlamm (Trockensubstanz 1%) und 5 g Modell-Boden zur Beimpfung zugegeben. Der Überstand wurde kontinuierlich beprobt und die Pestizidkonzentrationen mittels LC-MS/MS bestimmt.

Im Verlauf des Experiments konnte nur für Thiamethoxam eine Abnahme der Konzentration um etwa 20% beobachtet werden. Gleichzeitig kam es zu einem Anstieg des Thiamethoxam-Metaboliten CGA 355190 auf eine Konzentration von 56,7 µg/L. Für Clopyralid, Flumetsulam und Florasulam konnte keine Abnahme der Konzentration im Versuchszeitraum beobachtet werden (Tabelle 1.12). Ungleich zu weiteren Experimenten, nimmt die Florasulam-Konzentration in diesem Versuchsansatz nicht ab. Auch der Reduktionsgrad für Thiamethoxam in der Pestizid-Mischung ist geringer als jener, der für die Einzelsubstanz ermittelt wurde. Ob es sich hier um einen generellen Trend handelt, wurde in den Experimenten mit Grundwasser des kontaminierten Standortes überprüft.

Tabelle 1.12: Abbau im Gemisch: Pestizidgehalte zu Beginn (d1) und prozentuelle Abnahme bei gleichzeitiger Vorlage von vier Pestiziden im Testansatz

Abbau Pestizide im Gemisch			
	Einheit	d1	% Abnahme
Thiamethoxam	µg/L	203	21.1
Clopyralid	µg/L	265	-*
Flumetsulam	µg/L	173	-
Florasulam	µg/L	29.2	-
*) - keine Abnahme			

Optimierung der Abbauprozesse

Im Rahmen dieser Versuchsansätze wurden verschiedene Verfahren und Möglichkeiten hinsichtlich ihrer Wirksamkeit zur Beschleunigung des mikrobiellen Abbaus sowie zur Erhöhung des Abbaugrades untersucht. Dies ist vor allem in Hinblick auf eine technische Anwendung mikrobieller Abbauprozesse zur Dekontamination von Grundwasserkörpern von Bedeutung.

Es wurde sowohl die Persistenz einzelner Pestizide unter harschen physikalisch-chemischen Bedingungen geprüft, als auch Zusätze und Bedingungen getestet, die eine gezielte Lenkung des mikrobiologischen Stoffwechsels ermöglichen.

Folgende Zusätze und Methoden wurden erprobt:

- chemische Reagenzien
 - Oxidations- und Reduktionsreaktionen
 - Starke Säure bzw. Lauge
- Zusatz von Co-Substraten
- Inokula-Zusatz
- Einsatz von Redox-Mediatoren
- Änderung des Redox-Potentials
- Enzymatische Behandlung

Zusätzlich zu den genannten Methoden wurde im Zuge der Sterilisation von Grundwasserproben die Stabilität der Zielpestizide bei thermischer Belastung sowie ionisierender Bestrahlung geprüft.

Versuche zum Abbau von Clopyralid mit chemischen Reagenzien

Mit diesen Versuchsansätzen wurde überprüft, ob Clopyralid in wässriger Lösung unter bestimmten Bedingungen chemische Reaktionen eingehen kann. Mit dieser Vorgehensweise sind einerseits Rückschlüsse auf die Stabilität der Substanz möglich, andererseits können damit Reaktionsmechanismen identifiziert werden, die ein Aufbrechen der chemischen Struktur ermöglichen. Dies liefert wertvolle Hinweise für die Ausrichtung mikrobieller Degradationsprozesse. Clopyralid wurde als Zielsubstanz gewählt, da diese Substanz als hinlänglich stabil gilt und sie darüber hinaus im Grundwasser des kontaminierten Standorts prominent vertreten ist.

Folgende Mechanismen wurden in Modellansätzen untersucht:

1. Anwesenheit eines starken Oxidationsmittels
2. Anwesenheit eines starken Reduktionsmittels
3. Radikalische Oxidation (Fenton-Chemie)
4. Hydrolyse



Chemische Oxidation

Der Konventionsparameter „Permanganat-Index“ wird nach dem Normverfahren EN ISO 8467:1995 (DEV H3) ermittelt. Er dient zur Bestimmung der Konzentration von oxidierbaren Stoffen in Wasser und wird häufig zur Beurteilung von Trink- und Rohwasser eingesetzt. In der Norm wird darauf hingewiesen, dass der Permanganat-Index kein Maß für den theoretischen Sauerstoffbedarf ist und viele organische Verbindungen nach dem Verfahren unvollständig oxidiert werden. Bei dem Normverfahren werden 25 mL Wasserprobe bei pH 0,2 und einer Temperatur von knapp unter 100°C 10 Minuten lang mit 10 µmol KMnO₄ umgesetzt. Das Ergebnis wird bezogen auf Sauerstoff angegeben. Der Arbeitsbereich der Methode liegt zwischen 0,5 mg/L O₂ und 10 mg/L O₂.

Das Experiment wurde mit einer Lösung von 5 mg/L Clopyralid in reinem Wasser durchgeführt. Die Vergleichslösung enthielt 5 mg/L Natriumsalicylat in Wasser. Der theoretische Sauerstoffbedarf (angenommen wird vollständige Oxidation zu Wasser, Kohlendioxid sowie Chlor und Nitrat) betrug 5,83 mg/L O₂ (Clopyralid-Lösung) und 7,00 mg/L O₂ (Salizylat-Lösung). Die gemessenen Werte lagen bei 0,03 mg/L O₂ (Clopyralid-Lösung) und 6,02 mg/L O₂ (Salizylat-Lösung). Clopyralid wurde also unter diesen Bedingungen nicht messbar oxidiert, die Oxidierbarkeit entsprach den Blindwert-Lösungen (reines Laborwasser).

Chemische Reduktion

Für die Reduktionsversuche wurden in 50-mL-Ansätzen Lösungen mit jeweils 1 mg/L Clopyralid (5,2 µmol/L) und 10 mmol/L Reduktionsmittel hergestellt, dicht verschlossen und bei Raumtemperatur gelagert. Durch den Überschuss an Reduktionsmittel sollte gewährleistet werden, dass der gelöste Sauerstoff sicher entfernt wird. Nach zwei Wochen Reaktionszeit wurde Clopyralid in den reduzierenden Lösungen sowie in der Vergleichslösung mit reinem Wasser mit LC-MS/MS quantifiziert. Die Lösungen enthielten folgende starke Reduktionsmittel: Natriumsulfit (pH 8,1), Phosphonsäure bzw. deren Natriumsalze (pH 1,9; pH 4,7 und pH 9,9), Hydraziniumsulfat (pH 2,0) sowie Natriumborhydrid (pH 10,6; setzt Wasserstoff frei).

Die Messergebnisse sind in Abbildung 1.8 dargestellt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei diesen Experimenten keine messbare Reduktion von Clopyralid festgestellt werden konnte.

Verhalten von Clopyralid in sauren und basischen wässrigen Lösungen

Die chemische Struktur von Clopyralid lässt keinen Abbau durch saure oder basische Hydrolyse erwarten. Um das zu überprüfen, wurden Lösungen von 1 mg/L Clopyralid mit Natronlauge auf pH 13,0 und mit Schwefelsäure auf pH 0,5 gebracht (50 mL Ansätze). Nach zwei Wochen wurden die Lösungen neutralisiert, 1:20 verdünnt und gegen eine Lösung, die Natriumsulfat in der gleichen Konzentration enthielt, sowie gegen eine wässrige Lösung von 50 µg/L Clopyralid gemessen. Die Messwerte unterschieden sich um weniger als 2 % voneinander. Man kann somit davon ausgehen, dass tatsächlich keine Hydrolyse unter den gegebenen Bedingungen stattfindet.

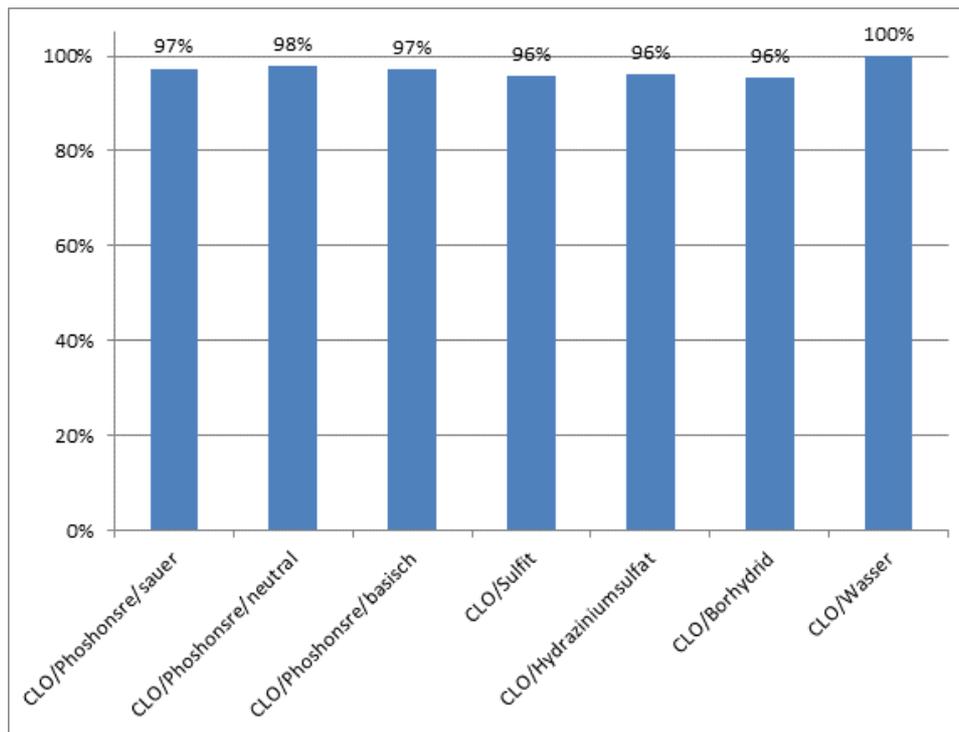


Abbildung 1.8: Chemische Reduktion von Clopyralid (CLO) mittels verschiedener Reduktionsmittel im Vergleich zu Clopyralid in reinem Wasser (Ordinate zeigt prozentuelle Abnahme).

Fenton-Chemie

Die Oxidation von organischen Verbindungen mit Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Fe(II)-Salzen ist seit etwa 120 Jahren bekannt und wird seit einem halben Jahrhundert in der Umwelttechnik mit Erfolg eingesetzt. Die zugrundeliegenden Reaktionsmechanismen (über radikalische und ionische Zwischenstufen) sind vielfältig und werden kontrovers diskutiert (Barbusinski, 2009). Mit einem Experiment sollte überprüft werden, ob mit Fenton-Reagenz eine Entfernung von Clopyralid in Wasser möglich ist. Die Versuche wurden in 50 mL Ansätzen durchgeführt. Die Lösungen enthielten jeweils 2 mg/L Clopyralid (10,4 $\mu\text{mol/L}$ entspricht 0,75 mg/L DOC), 5 mmol/L H_2O_2 und 5 mmol/L FeSO_4 bei einem pH-Wert von 2,5. Die Vergleichslösungen enthielten ausschließlich Fenton-Reagenz bzw. nur Clopyralid in den gleichen Konzentrationen. Die Bestimmung von Clopyralid in den sauren, eisenhaltigen und heterogenen Lösungen – während der Reaktion entsteht ein Eisenhydroxid-Niederschlag – erwies sich als schwierig. DOC-Messungen ergaben keine eindeutigen Resultate, mit LC-MS/MS konnte nach vier Wochen kein Clopyralid in den Lösungen nachgewiesen werden. In einem weiteren Ansatz ohne H_2O_2 konnte widerlegt werden, dass Clopyralid am Eisenhydroxid-Niederschlag adsorbiert bzw. mitgefällt wird. Die Entfernung von Clopyralid aus der Lösung durch einfache Flockung war also nicht möglich. Das legte den Schluss nahe, dass Clopyralid tatsächlich durch Fenton-Reagenz angegriffen wird. In einer kürzlich erschienen Arbeit wurde diese Abbaumöglichkeit sehr genau untersucht und bestätigt (Westphal et al., 2013). Eine praktische Anwendung zur Sanierung von Grundwässern scheint gegenwärtig allerdings wenig realistisch, da die Reaktionen nur bei niedrigen pH-Werten, das Optimum liegt zwischen pH 3 und pH 4, mit ausreichender Effizienz ablaufen.



Stabilität bei erhöhter Temperatur sowie Strahlungsexposition

Grundwasserproben wurden im Autoklaven für 45 min einer Temperatur von 120°C und einem Druck von 100 kPa ausgesetzt. Dabei wurde Thiamethoxam vollständig zerstört bzw. in Metaboliten, hauptsächlich CGA 355190, überführt. Florasulam ist thermisch ebenfalls nicht stabil und wurde um 83% reduziert (siehe dazu Tabelle 1.17).

Gamma-Strahlung (25 kGray einer Co₆₀ Quelle) führte zu einer vollständigen Entfernung der Zielpestizide Thiamethoxam, Flumetsulam und Florasulam sowie der Metaboliten CGA 353968 und CGA 355190. Der Gehalt an Clopyralid wurde um 97% reduziert.

Anwendung von zusätzlichen Wachstumssubstraten

Co-Metabolismus umfasst die Umsetzung eines nicht-Wachstumssubstrates während Mikroorganismen auf einer nutzbaren Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen. Ein solcher co-metabolischer Abbau von organischen Substanzen in der Umwelt ist bereits seit langem bekannt (Horvarth, 1972). Er wurde nicht nur für aliphatische sowie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (Haritash and Kaushik, 2009) sondern vor allem auch für halogenierte organische Verbindungen beschrieben (USEPA, 2000).

Im Rahmen des Forschungsprojektes sollte überprüft werden, ob der Zusatz von rasch metabolisierbaren Wachstumssubstraten unspezifisch Energie zum Abbau der Zielsubstanz (nicht-Wachstumssubstrat) bereit stellen und so zur Verbesserung des mikrobiologischen Abbaus beitragen kann. Zusätzlich sollten strukturanaloge Co-Substrate getestet werden, da sie eine Induktion katabolischer Enzyme bewirken können und diese im Falle eingeschränkter Substratspezifität den Abbau der Zielsubstanz initiieren können.

Versuchsansätze wurden mit folgenden Substraten durchgeführt:

- (1) Pyridin
- (2) Phenol
- (3) Laktose
- (4) Klärschlamm

Pyridin und Phenol werden den strukturellen Analoga zugerechnet. Mikroorganismen sind in der Lage, Phenol als Kohlenstoffquelle bei Konzentrationen von über 100 mg/L zu verwerten (Lettner, 1993). Laktose stellt ein leicht verwertbares Substrat dar, das häufig im Bereich der reduktiven Dechlorierung eingesetzt wird (Scherr et al., 2011) während Klärschlamm nicht nur verschiedene Nährstoffe und Substrate sondern auch an Abwasserinhaltsstoffe adaptierte Mikroorganismen enthält.

Alle Versuche wurden unter aeroben Bedingungen im 1 L Erlenmeyerkolben (300 mL Probevolumen) mit Clopyralid im Bereich von 1 mg/L in wässriger Lösung durchgeführt, wobei der Versuchszeitraum zwischen zwei und drei Monaten lag. Clopyralid wurde gewählt, da dieses Pestizid in der höchsten Konzentration am kontaminierten Standort vorzufinden ist und es sich in den Abbauversuchen als weitgehend persistent erwiesen hat. Zu den Versuchen wurde jeweils Mineralmedium sowie 1,2 g Modellboden zugegeben, der als Support für das Zellwachstum dient und zusätzlich ein bodenbürtiges mikrobielles Konsortium zur Verfügung stellt. Die Substrate wurden in folgenden Mengen zugegeben: (1) Pyridin 1 mL/L, (2) Phenol 15 mg/L, (3) Laktose 1 mg/L und (4) Klärschlamm 10 mL (Trockensubstanz 1%). Die Ansätze wurden unter Lichtschutz geschüttelt und kontinuierlich beprobt. Der Clopyralid-Gehalt im Überstand wurden mittels LC-MS/MS ermittelt.

Tabelle 1.13: Clopyralid-Gehalte zu Versuchsbeginn (Start) sowie prozentuelle Abnahme.

Clopyralidgehalte Abbau mit zusätzlichen Substraten			
	Einheit	Start	% Abnahme
CLO / PYR	µg/L	1.138	14
CLO / PHE	µg/L	1.138	19
CLO / LAK	µg/L	1.134	21
CLO / KS	µg/L	1.134	23
CLO = Clopyralid PYR = Pyridin, PHE = Phenol, LAK = Laktose, KS = Klärschlamm			

Nach einer anfänglichen Adaptierungsphase konnte in allen Versuchsansätzen eine geringe Abnahme der Clopyralid-Konzentration festgestellt werden, wobei mit Laktose bzw. Klärschlamm höhere Reduktionsraten erzielt wurden (Tabelle 1.13). Dieses Ausmaß des Konzentrationsrückganges liegt im Bereich der übrigen Versuche, eine gezielte Verstärkung des mikrobiologischen Pestizidabbaus durch zusätzliche Substrate lässt sich daraus nicht ableiten.

Inokulation mit adaptierten Mikroorganismen

Inokula umfassen einzelne Kulturen oder Konsortien von Mikroorganismen, die eine Zielsubstanz metabolisieren können. Durch Vorlage von Inokula in einem Abbauersuch wird eine potentielle Abbaulimitierung umgangen, die sich aus dem Fehlen von degradativen Mikroorganismen ergeben kann.

Inokula können durch gezielte Anreicherung von Mikroorganismen hergestellt werden, die in der Lage sind Pestizide abzubauen (siehe dazu Kapitel „Anreicherung von Pestizid-abbauenden Mikroorganismen“). Zur Beimpfung können aber auch Materialien eingesetzt werden, in denen es bereits zu einer Anreicherung von Mikroorganismen mit Abbaupotential gekommen ist. Das umfasst generell Habitate und Medien, die mit den Zielsubstanzen in Kontakt waren bzw. für die eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass sie bereits Pestiziden oder ähnlichen Verbindungen exponiert waren.

Zur Überprüfung auf Abbaunterstützung durch adaptierte Mikroorganismen wurden Versuche mit Feststoff aus dem Aquifer des kontaminierten Standortes (Aquifermaterial) durchgeführt. Dieses Material war bereits längere Zeit mit Pestiziden in Kontakt und dieser Selektionsdruck legt eine Anreicherung von resistenten bzw. zum Abbau befähigten Populationen nahe. Grundwasser vom kontaminierten Standort (25 mL) wurde in 100 mL Schikanenkolben mit Mineralmedium und 5 g Aquifermaterial versetzt und unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand der einzelnen Kolben wurde beprobt, der Rest der Probe verworfen. Die Pestizidkonzentrationen wurden mittels LC-MS/MS ermittelt.

Im gegebenen Zeitrahmen von 42 Tagen konnte für Thiamethoxam ein nahezu vollständiger Abbau unter gleichzeitiger Zunahme der Hauptmetaboliten CGA 355190 und CGA 353986 festgestellt werden. Die Florasulam-Konzentration konnte um nahezu 20% reduziert werden. Für Clopyralid und Flumetsulam wurde kein relevanter Abbau festgestellt (Tabelle 1.14). Aus dem Vergleich mit weiteren Abbauersuchen lässt sich schließen, dass die Erhöhung des Aquifermaterialanteils im Versuchsansatz die Abbauleistung nicht wesentlich verbessert.



Tabelle 1.14: Versuchsansatz mit erhöhtem Gehalt an Aquifermaterial als Inokulum. Pestizidgehalte zu Beginn (Start) sowie prozentuelle Abnahme.

Pestizidgehalte Abbau mit Aquifermaterial			
	Einheit	Start	% Abnahme
Thiamethoxam	µg/kg	3,9	97
CGA 355190	µg/kg	5,9	-*
CGA 353968	µg/kg	0,75	-
Clopyralid	µg/kg	64	-
Flumetsulam	µg/kg	1,5	2,3
Florasulam	µg/kg	1,3	18
*) - keine Abnahme			

Die Konzentrationen von Dicamba, Chlorpyrifos und Clothianidin lagen im Versuchszeitraum unter 0,1 µg/L.

Ein weiterer aerober Versuchsansatz wurde unter Zugabe von PAK-kontaminiertem Boden im 1 L Erlenmeyerkolben (300 mL Probevolumen) bei einer Clopyralid-Konzentration von 2,178 mg/L in wässriger Lösung durchgeführt. Dem Mineralmedium wurden 50 g PAK-kontaminierter Boden zugesetzt. Für diesen Boden wird eine hohe mikrobielle Aktivität durch einen PAK-Abbau von 94% in 56 Tagen bestätigt (Summe USEPA PAK). Es sollte überprüft werden, ob dieses mikrobielle Konsortium, das stabile Substanzen wie hochmolekulare PAK metabolisiert, in der Lage ist, Clopyralid zu transformieren. Der Ansatz wurde unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur geschüttelt und kontinuierlich beprobt. Der Clopyralid-Gehalt im Überstand wurden mittels LC-MS/MS ermittelt.

Im Untersuchungszeitraum von 77 Tagen konnte im Rahmen dieses Versuchsansatzes keine Abnahme der Clopyralid-Konzentration festgestellt werden. Dies legt den Schluss nahe, dass Pestizide wie Clopyralid unterschiedliche Abbaumechanismen erfordern und dass Enzymsysteme (Oxygenasen und Dehydrogenasen) die sehr effizient eine ganze Gruppe von polyzyklischen aromatischen Substanzen degradieren können (Haritash and Kaushik, 2009), nicht in der Lage sind, dihalogenierte Pyridincarbonsäure-Strukturen zu transformieren.

Einsatz eines Redox-Mediators

Extrazelluläre Elektronenshuttles (Redox-Shuttles, Redox-Mediatoren) haben die Fähigkeit, den Elektronentransport zwischen Elektronenakzeptoren (z. B. O₂, Nitrat, Eisen(III)oxid) und den zu oxidierenden Substraten (z. B. organische Schadstoffe) zu erleichtern. Somit können ausgewählte Mediatoren eine Beschleunigung des Abbaus von unerwünschten Substanzen ermöglichen. Diese Reaktionen sind allerdings substratspezifisch und ein Mediator muss auf seine Wirkung für eine spezielle Substratgruppe getestet werden.

Der Redoxmediator Anthrachinon-2,6-Disulfonat (AQDS – C₁₄H₆Na₂O₈S₂) ist in der Lage, als transienter oder terminaler Elektronenakzeptor zu agieren und kann so einen Einfluss auf den mikrobiellen Abbau von organischen Verbindungen wie PAK nehmen (Ma et al., 2011). Dem Bioreaktorversuch GW/N/B wurde AQDS in einer Konzentration von 100 µM/L zugesetzt (Tag 70 des Abbaubversuchs) und der Ansatz hinsichtlich einer Verstärkung des Abbaus der Zielpestizide untersucht. Allerdings konnte nach Zugabe von AQDS keine beschleunigte und weiterführende Reduktion der Pestizidkonzentrationen beobachtet werden.

Änderung des Redox-Potenzials

Viele Schadstoffe können sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen (d.h. unter Ausschluss von molekularem Sauerstoff) abgebaut werden, einzelne Schadstoffe wie hoch-chlorierte organische Lösungsmittel werden nur in Abwesenheit von Luftsauerstoff metabolisiert. Bekannt ist zum Beispiel die Möglichkeit des anaeroben Abbaus von Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen unter Nitrat-reduzierenden oder Sulfat-reduzierenden Bedingungen (Bamforth und Singleton, 2005) sowie der Einsatz einer reduktiven Dechlorierung für chlorierte Kohlenwasserstoffe (Scherr et al., 2010). Durch Zusatz von z.B. Nitrat oder Sulfat wird der jeweils gewünschte Elektronenakzeptor bei entsprechendem Redox-Potential vorgelegt. Weiters ist im Falle einer reduktiven Dechlorierung der Zusatz von Elektronendonatoren (z. B. einfache organische Säuren oder Zucker) erforderlich.

Da es sich bei den im Rahmen des Projektes untersuchten Pestiziden um halogenierte Substanzen bzw. um Moleküle mit aromatischen Strukturen handelt, wurden diese auf ihre Metabolisierbarkeit unter anaeroben Bedingungen untersucht.

Folgende Versuchsansätze wurden zur Überprüfung eines möglichen Pestizidabbaus unter anaeroben Bedingungen gewählt:

- (1) Nitrat-reduzierende Bedingungen
- (2) Sulfat-reduzierende Bedingungen
- (3) reduktive Dechlorierung

Die Versuche wurden in Duplikaten in 600 mL Reaktoren, die über eine Schleuse anaerob beprobt werden können, durchgeführt (siehe Abbildung 1.9). Zum Einsatz kam eine Mischung der Zielpestizide. Allen Versuchen wurden Nährmedium (Hasinger et al., 2012, Scherr et al., 2011) und jeweils 500 mg/L Nitrat, Sulfat bzw. Laktose zugesetzt. Dem Ansatz der reduktiven Dechlorierung wurde zusätzlich AQDS (100 µmol/L) als Redox-Mediator zugesetzt. Jedem der Versuche wurde Boden, der unter den entsprechenden Bedingungen gelagert war, zur Beimpfung zugegeben. Alle Versuche wurden abgedunkelt über einen Zeitraum von 56 Tagen durchgeführt und kontinuierlich beprobt. Die Pestizidkonzentrationen im Überstand wurden mittels LC-MS/MS ermittelt.

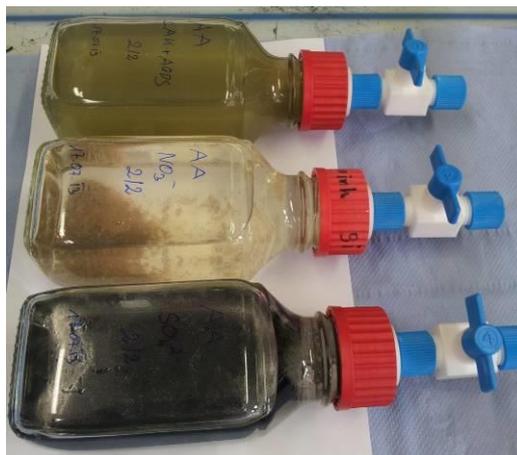


Abbildung 1.9: Versuchsansätze zum Abbau von Pestiziden unter Abwesenheit von molekularem Sauerstoff: Reduktive Dechlorierung sowie Abbau unter Nitrat- und Sulfat-reduzierenden Bedingungen (von oben nach unten).



Eine Zusammenfassung der Ergebnisse für alle getesteten Pestizide findet sich in Tabelle 1.15. Für Thiamethoxam konnte unter Nitrat-reduzierenden Bedingungen ein sehr rascher Abbau erzielt werden; bereits nach zwei Wochen waren nur mehr 5% der Ausgangskonzentration nachweisbar, nach 35 Tagen wurde eine Konzentration von 0,1 µg/L unterschritten. Auch unter Sulfat-reduzierenden Bedingungen ist ein deutlicher Abbau zu erkennen: nach 56 Tagen waren nur noch 9% der Ausgangskonzentration auffindbar. Im Versuchsansatz zur reduktiven Dechlorierung konnte im Versuchszeitraum von 56 Tagen kein Rückgang der Thiamethoxam-Konzentration festgestellt werden.

Tabelle 1.15: Abbau von Pestiziden: Nitrat- und Sulfat-reduzierende Bedingungen, reduktive Dechlorierung (RD), Konzentrationen zu Beginn (d0) sowie prozentuelle Abnahme (% Abn.)

Pestizidgehalte anaerober Abbau							
		Nitrat		Sulfat		RD	
		d0	% Abn.	d0	% Abn.	d0	% Abn.
Thiamethoxam	µg/L	100	99,9	95	91	93	0
Clopyralid	µg/L	155	23	164	28	161	29
Flumetsulam	µg/L	144	3.7	138	0.5	147	13
Florasulam	µg/L	158	49	155	28	157*	18
* Tag14							

Für Clopyralid ist ein in allen drei Versuchsansätzen vergleichbarer Konzentrationsrückgang zu beobachten, während Flumetsulam unter allen getesteten Redox-Bedingungen weitgehend stabil bleibt. Die Florasulam-Konzentration nimmt unter Nitrat-reduzierenden Bedingungen am raschesten ab. In diesem Ansatz konnte nach 56 Tagen eine Reduktion der Konzentration auf etwa die Hälfte erreicht werden. Im Ansatz unter Sulfat-reduzierenden Bedingungen sowie bei reduktiver Dechlorierung war der Konzentrationsrückgang deutlich geringer (Tabelle 1.15).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass für die Pestizide Thiamethoxam, Clopyralid und Florasulam eine Abnahme der Konzentration im Versuchszeitraum von zwei Monaten beobachtet werden konnte. Während bei Clopyralid kein Unterschied zwischen den verschiedenen Ansätzen zu verzeichnen war, wurden Thiamethoxam und Florasulam jeweils unter Nitrat-reduzierenden Bedingungen rascher abgebaut als unter Sulfat-reduzierenden Bedingungen. Da parallel zu diesen Versuchsansätzen keine abiotischen Kontrollen geführt wurden, kann nicht mit Sicherheit geschlossen werden, dass die beobachteten Konzentrationsabnahmen vollständig auf mikrobielle Abbauprozesse zurückzuführen sind.

Einsatz von Enzymen

Mit diesem Versuchsansatz sollte überprüft werden, ob Pestizide mit Hilfe eines spezifischen Enzyms prinzipiell angreifbar sind, um daraus Rückschlüsse auf die in einen potentiellen Abbau involvierten Reaktionsmechanismen ziehen zu können.

Enzyme sind Moleküle, zumeist Proteine, die biochemische Umsetzungen katalysieren können. Im Rahmen des Projekts wurde Laccase eingesetzt. Es handelt sich dabei um ein Enzym, welches natürlich in Pflanzen,

Bakterien und Pilzen vorkommt. Laccase findet zur Zellstoffbleiche oder in der Textilindustrie sowie der Produktion von Chemikalien Verwendung. Weiters wird das Enzym zur Umsetzung von Xenobiotika und phenolischen Substanzen beispielsweise in der Wein-Produktion eingesetzt. Laccasen zählen zu den kupferhaltigen Oxidasen und können – bei gleichzeitiger Reduktion molekularen Sauerstoffs – hydroxylierte aromatische Systeme unter Entfernung eines Elektrons in freie Radikale umwandeln, die wiederum unspezifisch mit weiteren Molekülen interagieren können (Thurston, 1994; Hahn und Schauer, 2009; Cañas und Camarero, 2010). Im Versuchsansatz wurde die Umsetzung von Clopyralid in wässriger Lösung bei unterschiedlichen Laccase-Mengen überprüft. Die Laccase (1760 Units/mL; Novozymes, Dänemark) stammt aus *Myceliophthora thermophila*; es wurde ein Kaliumphosphat- Puffer (50 mM, pH 7) eingesetzt.

Folgende Ansätze wurden gewählt (Probenvolumen 1800 µL):

- (1) Zugabe von 2x 100 µL Laccase
- (2) Zugabe von 2x 100 µL Puffer
- (3) Zugabe von 2x 200 µL Laccase
- (4) Zugabe von 2x 200 µL Puffer

Nach 3 sowie 24 Stunden Inkubationszeit wurde die Clopyralid-Konzentration mittels LC-MS/MS ermittelt. Während der Reaktionszeit wurde der Verlauf der Sauerstoffkonzentration aufgezeichnet.

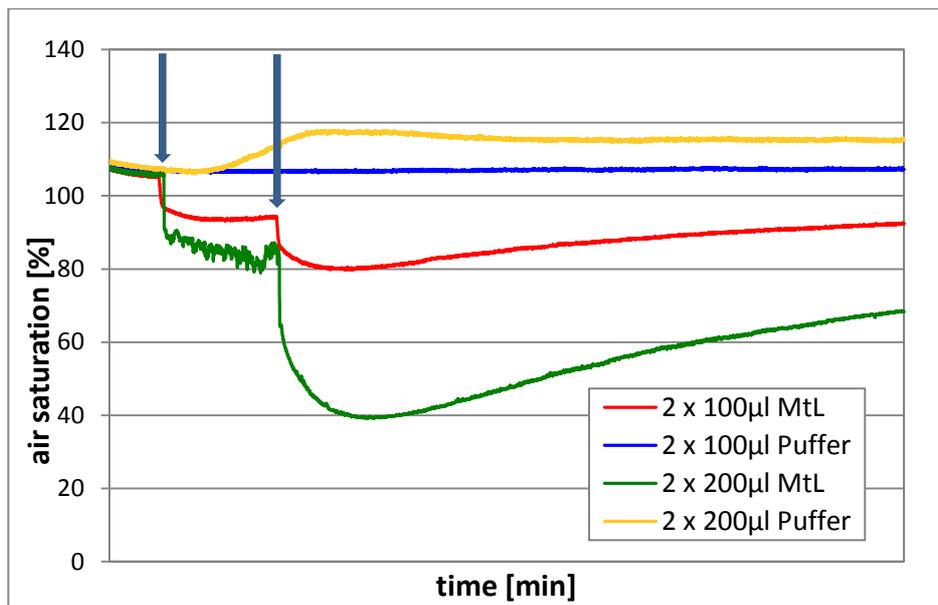


Abbildung 1.10: Messung des Sauerstoffverbrauchs während der Pestizid-Oxidation mittels Laccase; die Pfeile markieren jeweils die Zeitpunkte, zu denen Laccase (MtL) bzw. Puffer zugegeben wurde.

Im Vergleich zu den Kontrollansätzen (Puffer) ist in beiden Ansätzen mit Laccase eine Abnahme der Sauerstoffkonzentration erkennbar. Dies zeigt eine Substratoxidation an. Allerdings ist zu beobachten, dass nach initialer Sauerstoffzehrung die Sauerstoff-Kurve wieder zu steigen beginnt. Daraus folgt, dass die Reaktion nach einer teilweisen Umsetzung des Substrats stoppt, was auf eine Limitierung oder Inhibierung hinweisen könnte.



Tabelle 1.16: Clopyralid-Konzentration 3 bzw. 24 Stunden nach Zugabe von Laccase; prozentuelle Abnahme bezogen auf Kontrolle (Puffer) bei jeweiliger Inkubationszeit

Clopyralidgehalte Oxidation mit Laccase					
Exposition	Einheit	200µL	% Abn.*	400µL	% Abn.
3h	µg/kg	573	31	518	25
24h	µg/kg	593	23	401	49

*) prozentuelle Abnahme der Clopyralid-Konzentration

Die analytisch ermittelten Werte für Clopyralid nach Enzymbehandlung bestätigen eine Abnahme der Clopyralid-Konzentration durch Laccase-Behandlung in Vergleich zur Kontrolle mit Puffer ohne Enzym (Tabelle 1.16). Bei der Zugabe von 200 µL Laccase konnte eine Abnahme der Konzentration zwischen 23 und 31% beobachtet werden, bei Zugabe von 400 µL Laccase eine Abnahme zwischen 25 und 49%. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Clopyralid in Form einer biochemisch initiierten radikalischen Reaktion umgesetzt werden kann. Bestätigung findet diese Schlussfolgerung auch durch die Ergebnisse des Versuchsansatzes mit Fenton-Reagenz. Die Resultate dieser Versuche deuten darauf hin, dass eine Oxidation von sehr stabilen Pestiziden wie Clopyralid grundsätzlich möglich ist. Die Reaktion, die eine Umsetzung herbeiführen kann, sollte demzufolge über freie Radikale ablaufen. Eine potentielle technische Anwendung dieser prinzipiellen Behandlungsmöglichkeit unter *in situ* Bedingungen wirft jedoch zahlreiche weitere Fragen auf und bedarf vorab einer umgehenden Prüfung.

Abbauversuche mit Grundwasser des kontaminierten Standortes

Die Überprüfung des Abbauverhaltens unter realitätsnahen Bedingungen erfolgte in zwei Versuchsreihen, wobei eine in Bioreaktoren und eine in Aquifersäulen ausgeführt wurde. Die Abbauversuche wurden mit Grundwasser beschickt, das am kontaminierten Standort einem höher belasteten Bereich des Aquifers (Hotspot 2/HF05) entnommen wurde. Da diesen experimentellen Ansätzen eine große Aussagekraft zum Abbauverhalten der Pestizide im Zielmedium Grundwasser zugerechnet wird, sind die Ergebnisse nachfolgend auch graphisch umfangreich dargestellt.

Abbauversuche in Bioreaktoren

Zur Ermittlung des am Standort vorhandenen Abbaupotentials für Pestizide wurde ein aerober Abbauversuch in Bioreaktoren durchgeführt. Die Versuchsreaktoren wurden jeweils mit 5 L Grundwasser der Messstelle HF05 (erhöhte Pestizidkontamination) der Probenahme vom 8. April 2013 beschickt (Pestizidkonzentrationen siehe Tabelle 1.4). Alle Reaktoren wurden bei 20°C betrieben. Um einen potentiellen photolytischen Abbau der Pestizide zu vermeiden, wurden die Versuche unter Lichtausschluss durchgeführt.

Zur Untersuchung verschiedener Einflussfaktoren auf den biologischen Abbau wurden vier Ansätze gewählt:

- (1) Grundwasser (GW), Nährstoffe (N), Belüftung (B)
- (2) Grundwasser (GW), Aquifermaterial (A), Nährstoffe (N), Belüftung (B), HgCl₂ (abiotische Kontrolle)
- (3) Grundwasser (GW), Aquifermaterial (A), Nährstoffe (N), Belüftung (B)
- (4) Grundwasser (GW), Aquifermaterial (A)



Abbildung 1.11: Abbaueversuch in Bioreaktoren zur Ermittlung des Abbaupotentials am Standort. Versuchsansätze GW/N/B, GW/A/N/B/AK, GW/A/N/B, GW/A (von links nach rechts).

Drei Versuchsansätzen wurden zur Beimpfung jeweils 10 g Aquifermaterial vom kontaminierten Standort zugegeben. Ebenfalls wurden drei der Versuche mit Nährstoffen (Mineralmedium) versetzt. Drei der Versuchsreaktoren wurden mittels Druckluft über Edelstahlsonden aktiv belüftet. Alle Versuche wurden mittels Magnetrührer einer permanenten Durchmischung unterzogen. Die Experimente wurden regelmäßig beprobt, die Messung der Pestizidkonzentrationen erfolgte mittels LC-MS/MS. Alle Messdaten wurden auf entnommene Probemengen korrigiert.

Für folgende Pestizide und Metaboliten wurde das Abbauverhalten untersucht:

- (1) Thiamethoxam
- (2) TMX-Metabolit CGA 355190
- (3) TMX-Metabolit CGA 353968
- (4) Clopyralid
- (5) Flumetsulam
- (6) Florasulam

Für Dicamba, Chlorpyrifos und Clothianidin lagen die gemessenen Werte im Versuchszeitraum jeweils unter 0,1 µg/L, weshalb sie in diesen Experimenten keine Berücksichtigung fanden.



Nachfolgend sind die Abbaukurven der Zielpestizide dargestellt. Aus Gründen der Übersicht wird nur jeweils ein Versuchsansatz (GW/N/B) für das jeweilige Pestizid dargestellt. Die Daten der weiteren Versuchsansätze finden sich in Tabelle 1.18 und Tabelle 1.20. Zur Berechnung der Abbaurrate (k) wurde ein exponentielles Modell ($c_t = c_0 e^{-kt}$) herangezogen. Diese Wahl begründet sich in der Tatsache, dass die Substratzehrung nach Monod bei sehr geringen Substratkonzentrationen ($S \ll K_S$) durch eine Reaktion erster Ordnung formal angenähert werden kann (Okpokwasili und Nweke, 2005).

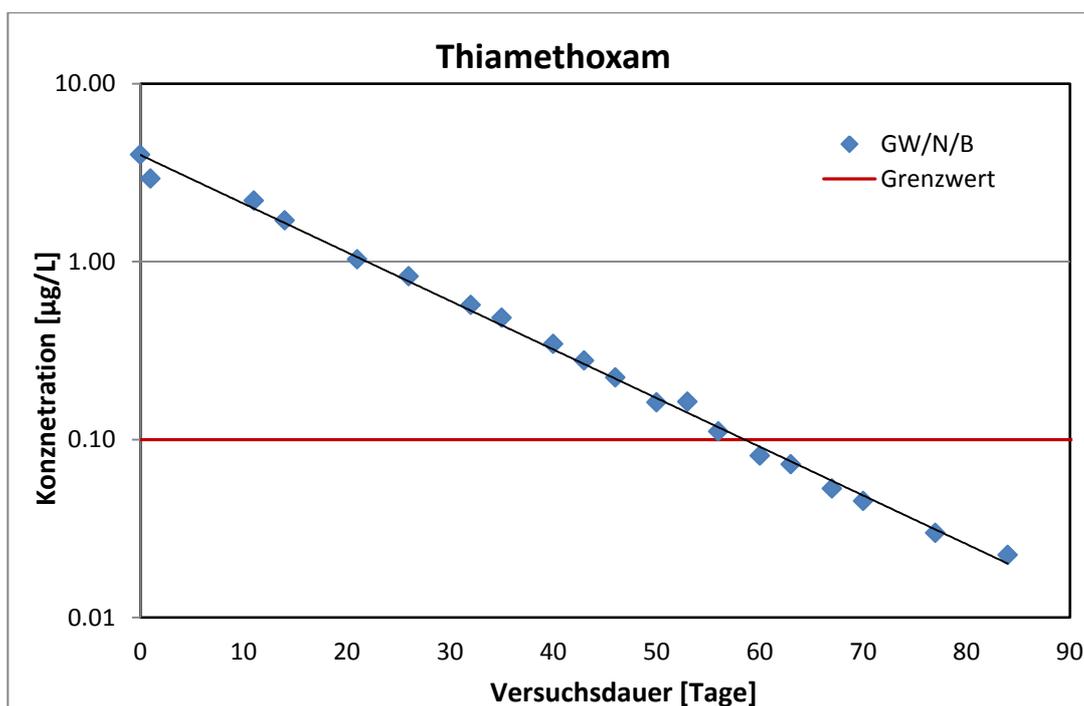


Abbildung 1.12: Bioreaktorversuch – Abbau von Thiamethoxam in Grundwasser; Versuchsansatz mit Nährstoffzusatz und Belüftung (GW/N/B). Die Abnahmerate ($0,063 \pm 0,002$) unterscheidet sich signifikant von null.

Für Thiamethoxam wurde in allen vier Ansätzen eine rasche Abnahme der Konzentration festgestellt (siehe Tabelle 1.18). Im Ansatz GW/N/B wurde der schnellste Abbau verzeichnet (Abbildung 1.12). So wurde nach 60 Tagen der Grenzwert von $0,1 \mu\text{g/L}$ unterschritten. Nach insgesamt 84 Tagen konnte eine Endkonzentration von $0,02 \mu\text{g/L}$ und somit eine deutliche Unterschreitung des Grenzwertes erzielt werden. Dies entspricht einer Abnahme $> 99\%$ bei einer Abnahmerate von $0,063 \text{ d}^{-1}$. Daraus resultiert für Thiamethoxam eine Halbwertszeit von 11 Tagen, die für diesen Versuchsansatz somit auch unter DT50 Werten der Literatur liegt (IUPAC, 2014).

Für den Versuchsansatz mit Aquifermaterial (GW/A/N/B) unterschritt Thiamethoxam den Grenzwert nach 98 Tagen, eine Endkonzentration von 0,03 µg/L wurde nach 133 Tagen erzielt. Für den Ansatz ohne Nährstoffzugabe wurde eine deutlich höhere Endkonzentration von 0,18 µg/L (144 Tage), die aus einer geringeren Abbaurrate resultiert, beobachtet. Zu Ende des Experiments (144 Tage) wurde für die abiotische Kontrolle (GW/A/N/B/AK) eine wesentlich höhere Thiamethoxam-Konzentration von 0,78 µg/L ermittelt. Die Abbauraten von Thiamethoxam waren in allen Versuchsansätze signifikant höher im Vergleich zur abiotischen Kontrolle und schlagen somit einen erfolgversprechenden biologischen Abbau dieses Pestizids vor (Tabelle 1.18). Eine Zunahme der Thiamethoxam-Metaboliten CGA 355190 und CGA 353968 in der initialen Phase der Versuche bestätigt einen Abbau dieser Zielsubstanz

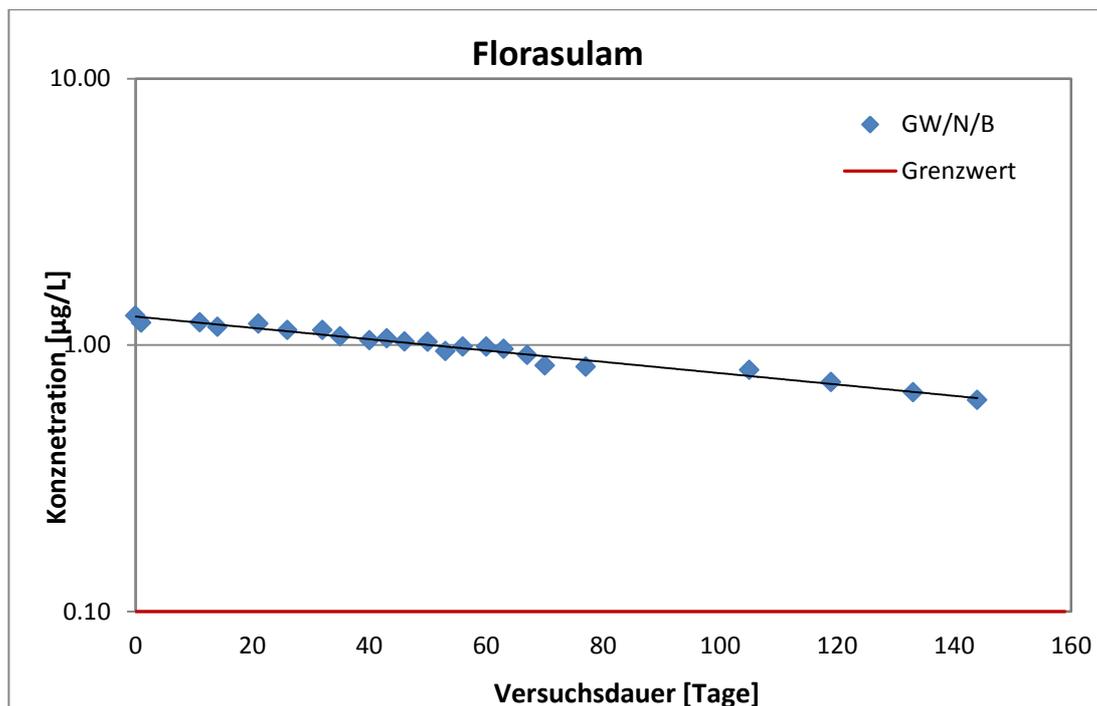


Abbildung 1.13: Bioreaktorversuch – Abbau von Florasulam in Grundwasser; Versuchsansatz mit Nährstoffzusatz und Belüftung (GW/N/B). Die Abnahmerate ($0,0044 \pm 0,005$) unterscheidet sich signifikant von null.

Für Florasulam konnte in allen vier Ansätzen eine signifikante Abnahme der Konzentration beobachtet werden, wobei ein beschleunigter Abbau in den Ansätzen mit Nährstoffzugabe (GW/A/N/B und GW/N/B) stattfand (Tabelle 1.18 und Tabelle 1.20). Im Ansatz ohne Aquifermaterial (GW/N/B) war der rascheste Abbau ($k = 0,0044 \text{ d}^{-1}$) zu beobachten (Abbildung 1.13). Nach einem Versuchszeitraum von 144 Tagen wurde ein Endwert von 0,62 µg/L erzielt, das entspricht einer Abnahme von 52% bei einer Halbwertszeit von 157 Tagen. Es wird angenommen, dass bei einer Verlängerung des Versuchszeitraumes eine Unterschreitung des Wertes von 0,1 µg/L möglich ist.

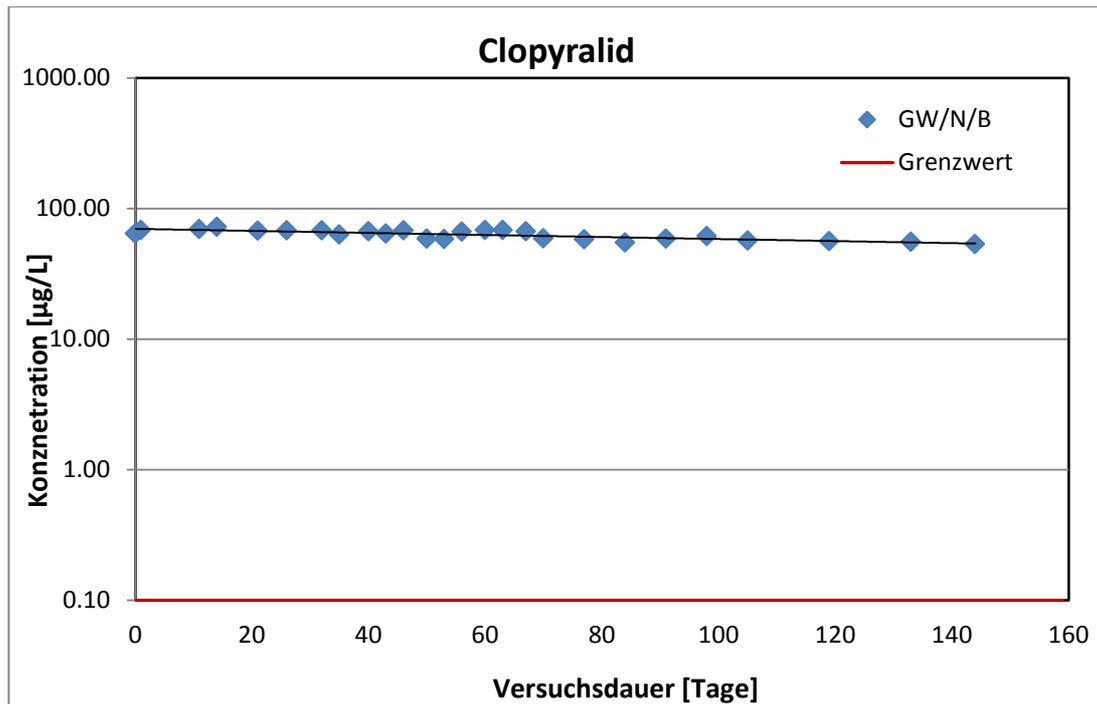


Abbildung 1.14: Bioreaktorversuch – Abbau von Clopyralid in Grundwasser; Versuchsansatz mit Nährstoffzusatz und Belüftung (GW/N/B). Die Abnahmerate ($0,0014 \pm 0,0008$) unterscheidet sich signifikant von null.

Die Clopyralid-Konzentration hat im Versuchszeitraum von 144 Tagen in allen vier Ansätzen signifikant abgenommen (Tabelle 1.18 und Tabelle 1.20). Jedoch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den biotischen Versuchsreihen (GW/A, GW/A/N/B und GW/N/B) und dem abiotischen Ansatz (GW/A/N/B/AK) festgestellt werden (siehe dazu auch Tabelle 1.17 und Erläuterungen im zugehörigen Text). Für den Ansatz ohne Aquifermaterial (GW/N/B) wurde ein Konzentrationsrückgang von 22% bei einer Abnahmerate von $0,0014 \text{ d}^{-1}$ (Halbwertszeit 493 Tage) beobachtet (siehe Abbildung 1.14). Aufgrund der geringen Abnahmerate und der hohen Startkonzentration lag der Endwert mit $53 \mu\text{g/L}$ weit über dem Vorsorge-Grenzwert für Grundwasser.

Ein signifikanter Rückgang der Flumetsulam-Konzentration konnte für die biotischen Ansätze nicht beobachtet werden (Ansatz GW/N/B in Abbildung 1.15 dargestellt). Eine Abnahme war nur in der abiotischen Kontrolle (GW/A/N/B/AK) zu verzeichnen (Tabelle 1.18). Dies könnte auf eine Reaktion des zugesetzten HgCl_2 mit dem Pestizid oder mit Grundwasserinhaltsstoffen zurückzuführen sein. Die Umsetzung ist in Form einer Verfärbung, die mit einer Fällung einher geht, in Abbildung 1.11 erkennbar (zweiter Reaktor von links). Auch Co-Präzipitation des Pestizids oder Adsorption an das Präzipitat könnten für die Abnahme verantwortlich zeichnen. Darüber hinaus kann durch diese Umsetzungen die Konzentration an gelöstem HgCl_2 reduziert werden, wodurch eine vollständige Wachstumshemmung von Pestizid-abbauenden Mikroorganismen nicht mehr gewährleistet ist.

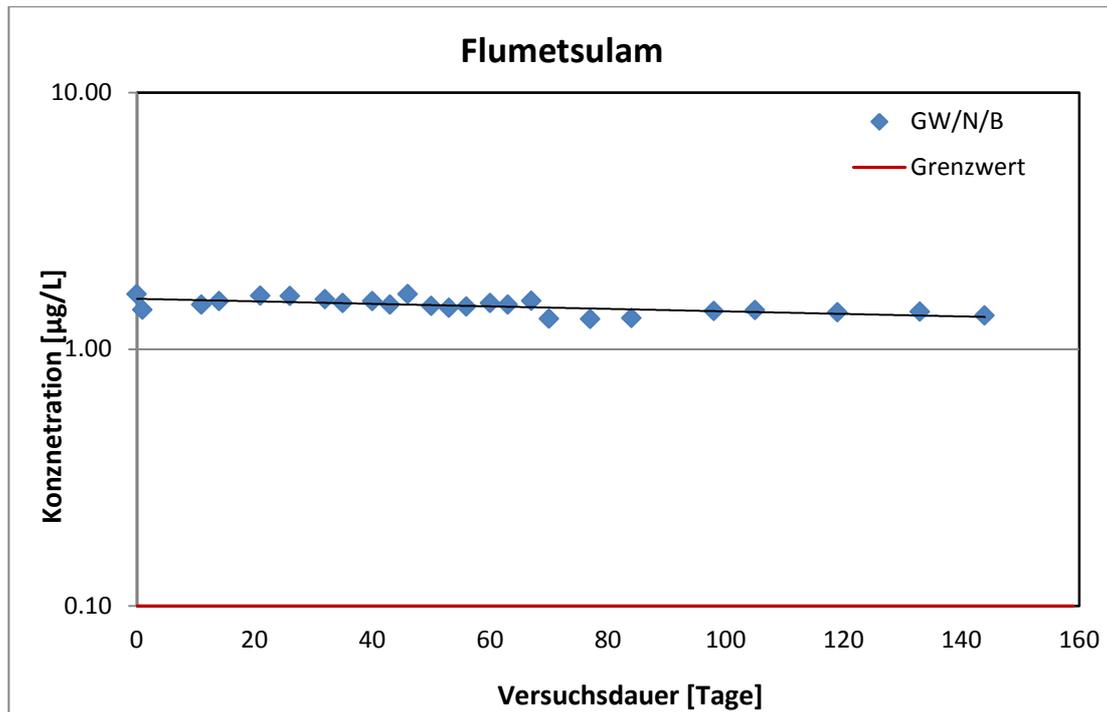


Abbildung 1.15: Bioreaktorversuch – Abbau von Flumetsulam in Grundwasser; Versuchsansatz mit Nährstoffzusatz und Belüftung (GW/N/B). Die Abnahmerate unterscheidet sich nicht signifikant von null.

Ein neuerlicher Versuchsansatz einer abiotischen Kontrolle diente der Überprüfung einer abiotischen Reduktion der Zielpestizide unter den gewählten Versuchsbedingungen. Der Ansatz entsprach dem Bioreaktorversuch (GW/A/N) nach Sterilisation im Autoklaven. Tabelle 1.17 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 1.17: Abiotische Kontrolle – Sterilisation durch Autoklavierung (Konzentrationen in µg/L)

Pestizidgehalte der autoklavierten Kontrolle						
	Thiamethoxam	Clopyralid	CGA 353968	Flumetsulam	CGA 355190	Florasulam
vor Autoklavierung	1,48	26	0,32	0,59	2,4	0,47
AK* Start	< NWG**	30	0,36	0,62	3,8	0,08
AK Ende	< NWG	29	0,36	0,66	3,9	0,06

*) Autoklavierte Kontrolle **) kleiner Nachweisgrenze



Thiamethoxam wurde beim Autoklavieren vollständig zerstört bzw. in Metaboliten, hauptsächlich CGA 355190, überführt. Florasulam ist thermisch ebenfalls nicht stabil und wurde durch Autoklavierung von ohnehin geringen 0,47 auf 0,08 µg/L reduziert. Die Konzentrationsanstiege von Clopyralid und Flumetsulam können durch Aufkonzentrierungseffekte (Flüssigkeitsverluste) während des Autoklaviervorgangs erklärt werden. Die sterile Kontrolle wurde über einen Zeitraum von 35 Tagen abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. In diesem Zeitraum konnte keine relevante Konzentrationsabnahme für die Substanzen Clopyralid, Flumetsulam, CGA 353968 und CGA 355190 verzeichnet werden. Dies legt den Schluss nahe, dass die im Versuchsansatz GW/A/N/B/AK beobachteten Konzentrationsrückgänge zum Teil in Zusammenhang mit der beobachteten Fällung nach HgCl₂-Zusatz stehen dürften.

Tabelle 1.18: Bioreaktorversuche – Exponentielle Abnahmeraten von Pestiziden in Grundwasser

Abnahmeraten Bioreaktoren								
Bioreaktor	Thiamethoxam		Clopyralid		Flumetsulam		Florasulam	
	<i>k</i> (1/d)	VB(95%)	<i>k</i> (1/d)	VB(95%)	<i>k</i> (1/d)	VB(95%)	<i>k</i> (1/d)	VB(95%)
GW/N/B	0,063	± 0,002	0,0014	± 0,0008	0,0002	± 0,0009	0,0044	± 0,0005
GW/A	0,021	± 0,001	0,0012	± 0,0006	0,0005	± 0,0007	0,0016	± 0,0007
GW/A/N/B	0,038	± 0,001	0,0017	± 0,0007	0,0003	± 0,0007	0,0029	± 0,0007
GW/A/N/B/AK	0,011	± 0,001	0,0020	± 0,0007	0,030	± 0,004	0,0025	± 0,0008

k – Abnahmerate, VB(95%) – Vertrauensbereich $p \leq 0,05$
 Abnahmeraten, die sich signifikant von null unterscheiden, sind in Fettschrift dargestellt.

Für die Metaboliten CGA 355190 und CGA 353968 war eine Anpassung des exponentiellen Modells an die Messwerte nicht möglich bzw. nicht sinnvoll, da es durch Thiamethoxam-Abbau zu einer Nachlieferung dieser Substanzen kam und daraus folgend, in der initialen Phase der Versuche ein Konzentrationsanstieg zu beobachten war. In keinem Fall wurde jedoch für CGA 355190 ein Wert von 7,36 µg/L überschritten (CGA 353968 < 0,76 µg/L).

Aus signifikanten Abbauraten wurden Halbwertszeiten errechnet (Tabelle 1.19). Für die abiotische Kontrolle erfolgte aufgrund einer möglichen Interferenz mit der beobachteten Fällungsreaktion keine Berechnung. Im besten Fall kann eine Reduktion der Konzentration um 50% in 11 (Thiamethoxam), 157 (Florasulam) und 405 (Clopyralid) Tagen erzielt werden. Für Flumetsulam wurde im Versuchszeitraum in den biotischen Versuchsansätzen keine signifikante Abnahme der Konzentration beobachtet.

Tabelle 1.19: Halbwertszeiten (Tage) berechnet für Versuchsansätze mit signifikanter Konzentrationsabnahme der Zielsubstanz

Halbwertszeiten Bioreaktoren			
Bioreaktor	Thiamethoxam	Clopyralid	Florasulam
GW/N/B	11	493	157
GW/A/N/B	18	405	239
GW/A	33	555	421

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Zugabe von Nährstoffen zum Grundwasser des kontaminierten Standortes einen positiven Einfluss auf den mikrobiologischen Abbau von Thiamethoxam und Florasulam zeigt. Für Thiamethoxam verkürzte sich die Halbwertszeit im besten Fall um zwei Drittel, für Florasulam um etwas weniger als zwei Drittel. Auch für Clopyralid hat sich die Halbwertszeit bei Nährstoffzugabe um etwa ein Viertel (GW/A/N/B) reduziert.

Bei Zugabe von Aquifermaterial aus Kernbohrungen vom Betriebsgelände wurde für Thiamethoxam und Florasulam ein verzögerter Abbau beobachtet (Tabelle 1.18). Eine Beeinflussung des Abbaus durch im Feststoff enthaltene Pestizide wie z.B. Chlorpyrifos oder eventuelle Zusatzstoffe aus der Formulierung kann nicht ausgeschlossen werden.

Tabelle 1.20: Bioreaktorversuche – Pestizidkonzentrationen (µg/L) zu Versuchsbeginn (Start) und prozentuelle Abnahme (% Abn.)

Pestizidgehalte Abbaubersuch Bioreaktoren									
	Einheit	GW/N/B		GW/A/N/B/AK		GW/A/N/B		GW/A	
		Start	% Abn.	Start	% Abn.	Start	% Abn.	Start	% Abn.
Thiamethoxam	µg/L	2,92	99,7	2,87	72,9	2,82	99,6	3,39	94,8
CGA 355190	µg/L	4,66	-*	4,19	-	4,40	-	4,66	-
CGA 353986	µg/L	0,50	-	0,46	-	0,50	-	0,55	-
Clopyralid	µg/L	68,2	4,50	67,3	11,0	69,3	9,26	67,5	8,18
Flumetsulam	µg/L	1,43	-	1,12	93,7	1,40	-	1,50	-
Florasulam	µg/L	1,21	40,4	1,18	15,3	1,21	21,4	1,24	9,67

GW = Grundwasser, A = Aquifermaterial, N = Nährstoffe, B = Belüftung, AK = abiotische Kontrolle
 *) - keine Abnahme



Abbauversuche in Aquifersäulen

Um das Abbauverhalten der Zielsubstanzen unter möglichst realitätsnahen Bedingungen zu testen, wurden Abbauversuche in Glassäulen, die mit Grundwasser und Aquifermaterial gefüllt waren, durchgeführt. Die Säulen wurden sowohl ohne als auch mit aktiver Belüftung betrieben, um hier gegebenenfalls eine Sauerstoffzufuhr durch Sanierungsmaßnahmen zu berücksichtigen. Der Versuchssäule ohne Belüftung wurden keine Nährstoffe zugesetzt, dadurch sollte das Abbauverhalten der Zielsubstanzen in einem Grundwasserleiter ohne zusätzliche technische Maßnahmen erfasst werden.

Versuchsansätze

N/B: Zusatz von Nährstoffen (N), Belüftung (B)

N/B/I: Zusatz von Nährstoffen (N), Belüftung (B), Inokulation (I)

OZ: ohne Nährstoffzusatz, ohne Belüftung

Feststoff (Aquifermaterial) wurde in Glassäulen eingebaut:

N/B; N/B/I: Durchmesser * Höhe = 12 * 30 cm

OZ: Durchmesser * Höhe = 15 * 37 cm

Die Säulen wurden mit Grundwasser des kontaminierten Standortes versetzt:

N/B; N/B/I: Hotspot 2/HF05, Probenahme vom 18. November 2013

OZ: Hotspot 2/HF05, Probenahme vom 19. August 2013

Grundwasser (Pestizidgehalte sind in Tabelle 1.4 dargestellt) wurde über Schlauchquetschpumpen mit einem Fluss von 5 mL/min im Kreis geführt. Für belüftete Versuchsansätze wurden in den Pumpkreislauf Aerobisierungsflaschen (Sauerstoffversorgung durch kontinuierliche Agitation am Magnetrührer) integriert und Stickstoff und Phosphor gemäß Mineralmedium zugesetzt. Die Versuche wurden abgedunkelt bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach einer Initialisierungsphase von zwei Wochen erfolgte die Inokulation des Ansatzes N/B/I mit einer Mischung der Kulturen, die mit den Zielsubstanzen angereichert wurden. Die Mikroorganismen-Suspension (30 mL) wurde zentrifugiert (Eppendorf 5810; 10 min, 2598 g), die sedimentierte Biomasse in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert und neuerlich zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt, um Reste von Pestiziden oder Metaboliten zu entfernen. Zur Erfassung einer potentiell abbaufördernden Wirkung der Inokulation wurden die Abbauraten für den Ansatz N/B/I mit den ermittelten Pestizid-Konzentrationswerten ab Zusatz des Inokulums berechnet.

Eine Inkubation unter abiotischen Bedingungen war nicht möglich. Von einem Zusatz von HgCl_2 wurde aus den oben beschriebenen Gründen (Fällungsreaktion) Abstand genommen. Für eine Sterilisation durch Autoklavierung waren die Säulenmaterialien (Glas und Kunststoffe) nicht geeignet (Spannungsrisse durch thermische Belastung). Nach Sterilisation einer befüllten Aquifer-Kontrollsäule durch Gamma-Strahlung (25 kGray, Co_{60} – Mediscan GmbH) konnten die Zielsubstanzen Thiamethoxam, CGA 353968, CGA 355190, Flumetsulam und Florasulam im Grundwasser nicht mehr nachgewiesen werden. Der Wert von Clopyralid lag nach Gamma-Bestrahlung bei 0,72 µg/L, dies entspricht einer Reduktion der Konzentration von 97%. Generell werden abiotische Kontrollen für komplexe Versuchsaufbauten kaum durchgeführt. Dies gilt v.a. auch dann, wenn bereits Daten zu abiotischen Konzentrationsänderungen, die z.B. in kleinerem Maßstab ermittelt wurden, vorliegen.

Für folgende Pestizide und Metaboliten wurde das Abbauverhalten in Aquifersäulen untersucht:

- (1) Thiamethoxam
- (2) TMX-Metabolit CGA 355190
- (3) TMX-Metabolit CGA 353968
- (4) Clopyralid
- (5) Flumetsulam
- (6) Florasulam

Für Dicamba, Chlorpyrifos und Clothianidin lagen die gemessenen Werte im Versuchszeitraum jeweils unter 0,1 µg/L, weshalb sie in diesen Experimenten keine Berücksichtigung fanden.

Nachfolgend sind die Daten für den Hauptversuchsansatz mit Nährstoffzusatz und Belüftung (N/B) graphisch dargestellt. Eine Übersicht der Abnahmeraten aller Versuchsansätze ist Tabelle 1.21 zu entnehmen. Bei Nährstoffzugabe konnte für Thiamethoxam (Abbildung 1.16) und Florasulam (Abbildung 1.17) ein signifikanter Konzentrationsrückgang verzeichnet werden, während dies für Clopyralid (Abbildung 1.18) und Flumetsulam (Abbildung 1.19) nicht der Fall war. Eine Inokulation mit einer Mischung der Anreicherungskulturen konnte den Abbau nicht beschleunigen (Tabelle 1.21). In keinem Fall konnte im Versuchszeitraum von 50 Tagen der Grenzwert von 0,1 µg/L unterschritten werden.

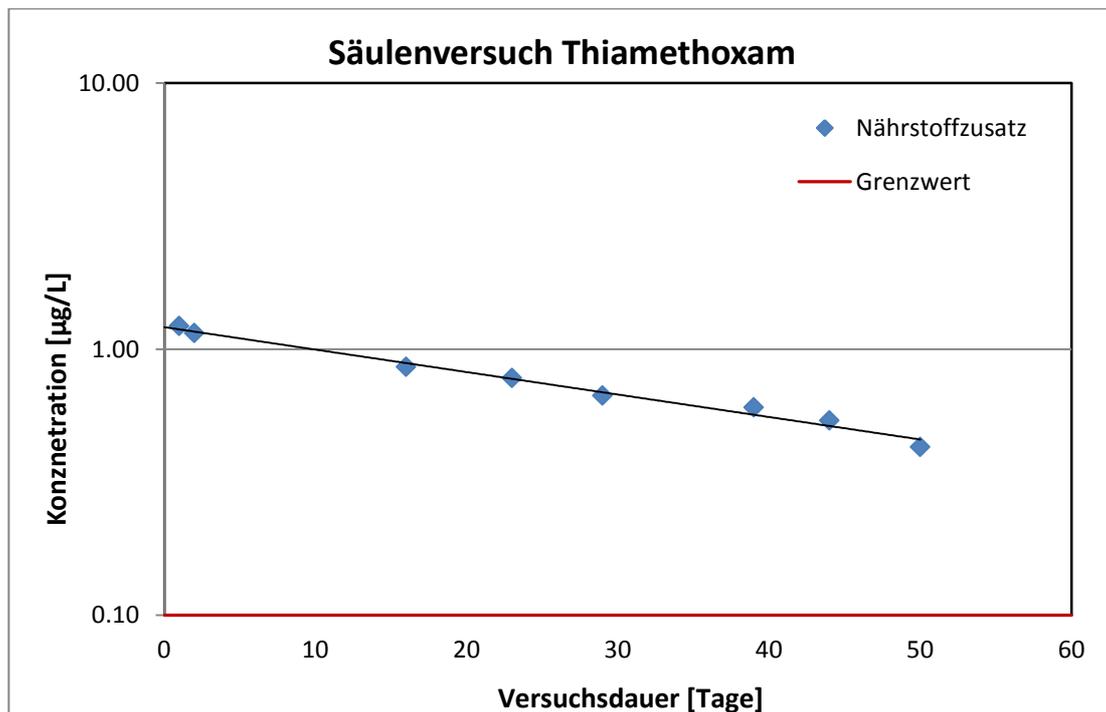


Abbildung 1.16: Säulenversuch – Konzentrationsverlauf von Thiamethoxam; Versuchsansatz mit Nährstoffzusatz und Belüftung (N/B). Die Abnahmerate ($0,019 \pm 0,002$) unterscheidet sich signifikant von null.

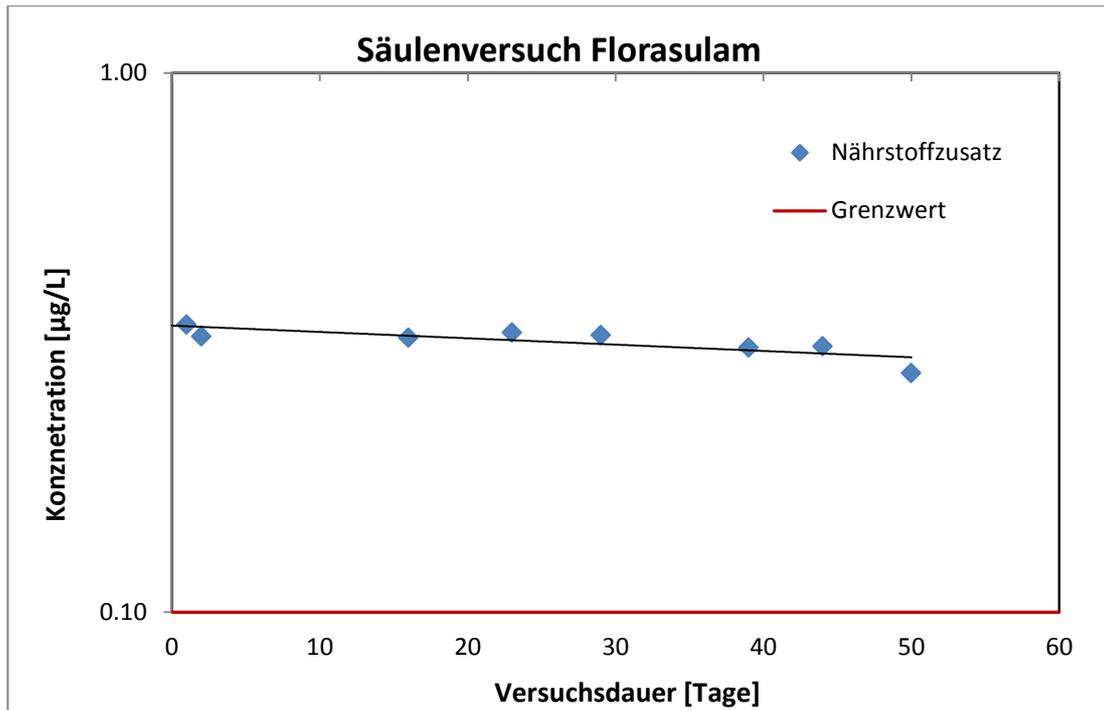


Abbildung 1.17: Säulenversuch – Konzentrationsverlauf von Florasulam; Versuchsansatz mit Nährstoffzusatz und Belüftung (N/B). Die Abnahmerate ($0,003 \pm 0,002$) unterscheidet sich signifikant von null.

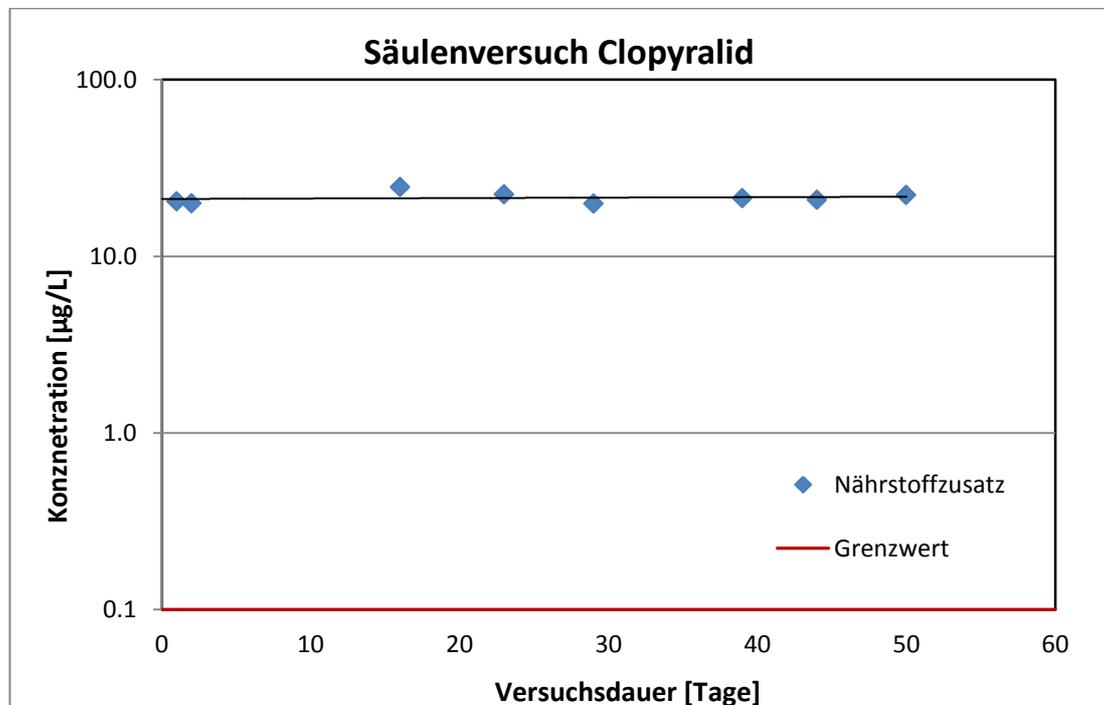


Abbildung 1.18: Säulenversuch – Konzentrationsverlauf von Clopyralid; Versuchsansatz mit Nährstoffzusatz und Belüftung (N/B). Die Abnahmerate unterscheidet sich nicht signifikant von null.

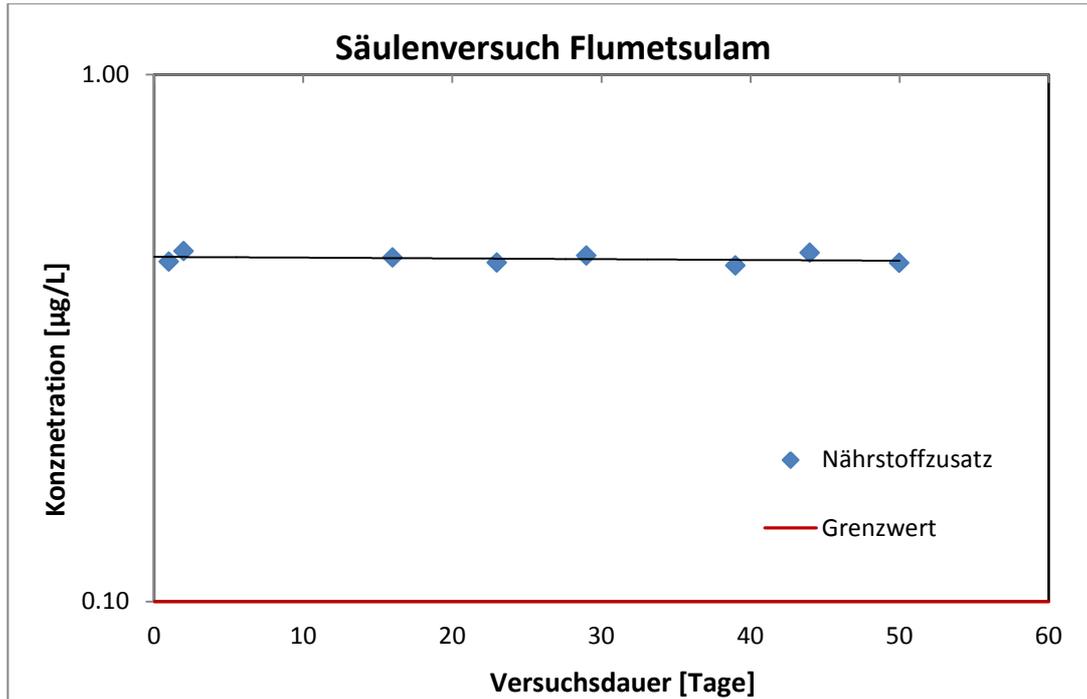


Abbildung 1.19: Säulenversuch – Konzentrationsverlauf von Flumetsulam; Versuchsansatz mit Nährstoffzusatz und Belüftung (N/B). Die Abnahmerate unterscheidet sich nicht signifikant von null.

In der unbelüfteten Säule ohne Nährstoffzusatz (OZ) konnte für Florasulam und für Clopyralid eine signifikante Abnahme festgestellt werden. Dabei ist festzuhalten, dass die Abnahmerate für Clopyralid als sehr gering zu bezeichnen ist. Das Fehlen eines Thiamethoxam-Abbaus im Versuchsansatz OZ dürfte weniger auf den Wegfall der Belüftung als auf einen Nährstoffmangel zurückzuführen sein. In keinem Fall konnte im Versuchszeitraum von 52 Tagen der Grenzwert von 0,1 µg/L unterschritten werden.

Generell zeichnet sich für die Versuche in Aquifersäulen ein ähnliches Abbauverhalten ab wie bereits für die Experimente in Bioreaktoren zu beobachten. Thiamethoxam nimmt bei ausreichender Nährstoffversorgung am schnellsten ab, gefolgt von Florasulam. Flumetsulam und Clopyralid nehmen in ihrer Konzentration nicht oder nur sehr gering ab. Die Abbauraten sind etwas geringer im Vergleich zu den Versuchen in Bioreaktoren.

Tabelle 1.21: Säulenversuche – Exponentielle Abnahmeraten von Pestiziden in Grundwasser

Pestizide Abnahmeraten Aquifersäulen								
Säule	Thiamethoxam		Clopyralid		Flumetsulam		Florasulam	
	<i>k</i> (1/d)	VB(95%)	<i>k</i> (1/d)	VB(95%)	<i>k</i> (1/d)	VB(95%)	<i>k</i> (1/d)	VB(95%)
N/B	0,019	± 0,002	-0,001	± 0,004	0,000	± 0,001	0,003	± 0,002
N/B/I	0,015	± 0,003	-0,003	± 0,009	-0,002	± 0,001	0,002	± 0,002
OZ 2	0,001	± 0,001	0,001	± 0,001	0,000	± 0,001	0,002	± 0,002

k – Abnahmerate, VB(95%) – Vertrauensbereich $p \leq 0,05$
 Abnahmeraten, die sich signifikant von null unterscheiden, sind in Fettschrift dargestellt.
 Gleiche Werte für *k* und VB(95%) im Falle einer Signifikanz ergeben sich aus der Rundung.

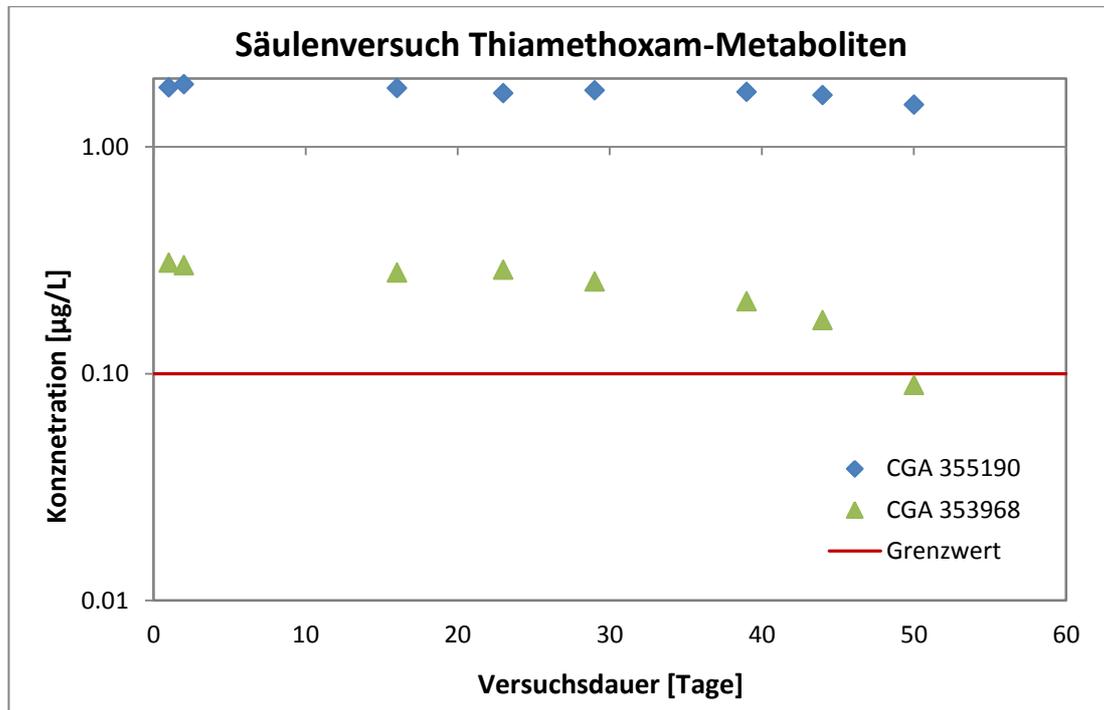


Abbildung 1.20: Säulenversuch – Konzentrationsabnahme der Thiamethoxam-Metaboliten; Versuchsansatz mit Nährstoffzusatz und Belüftung (N/B).

Im Säulenversuch wurde eine Konzentrationsabnahme der Thiamethoxam-Metaboliten CGA 355190 und CGA 353968 beobachtet. Sie ist in Abbildung 1.20 für den Hauptversuchsansatz (N/B) dargestellt, wobei sich der Konzentrationsrückgang gegen Ende des Versuchszeitraums verstärkt.

In Tabelle 1.22 sind die Abbauraten der einzelnen Versuchsansätze zusammengefasst. Dabei ist festzuhalten, dass bei andauerndem Thiamethoxam-Abbau durch Nachlieferung der Metaboliten die Werte durch ein exponentielles Modell einer Reaktion erster Ordnung nicht exakt abgebildet werden. Speziell für das Abbauprodukt CGA 353968 wurde in den belüfteten Versuchsansätzen (N/B sowie N/B/I) gegen Ende des Versuchszeitraums eine Beschleunigung des Konzentrationsrückgangs beobachtet (Abbildung 1.20). Zur Abschätzung der Abbauraten wurden deshalb die Messwerte der letzten Probenahmen der mit Nährstoffen versehenen Ansätze nicht berücksichtigt (Tabelle 1.22), auch wenn eine Unterschätzung der Abbauraten dadurch nicht ausgeschlossen werden kann. Nichts desto trotz legen die Ergebnisse nahe, dass ein Abbau der Thiamethoxam-Metaboliten in Grundwasser möglich ist.

Tabelle 1.22: Säulenversuche – Exponentielle Abnahmeraten von Metaboliten in Grundwasser

Metaboliten Abnahmeraten Aquifersäulen				
Säule	CGA355190		CGA353968	
	k (1/d)	VB(95%)	k (1/d)	VB(95%)
N/B	0,003	± 0,002	0,019*	± 0,012
N/B/I	0,001	± 0,002	0,044**	± 0,034
OZ	0,003	± 0,002	0,023	± 0,004

k – Abnahmerate, VB(95%) – Vertrauensbereich $p \leq 0,05$
 Abnahmeraten, die sich signifikant von null unterscheiden, sind in Fettschrift dargestellt.
 *) Wert von Tag 50 nicht berücksichtigt; **) Werte von Tag 44 & 50 nicht berücksichtigt.

Aus signifikanten Abbauraten wurden Halbwertszeiten errechnet (Tabelle 1.23). Für Thiamethoxam wurde eine Reduktion der Konzentration um 50% zwischen 36 und 45 Tagen bei Zugabe von Nährstoffen und Belüftung erzielt. Damit nimmt die Halbwertszeit im Mittel einen etwa doppelt so hohen Wert im Vergleich zu Bioreaktorexperimenten ein. Der Gehalt an Florasulam nahm in allen Aquifersäulen ab, wobei die Halbwertszeiten im Bereich der Bioreaktorversuche liegen. Für Clopyralid wurde lediglich in dem Ansatz ohne Nährstoffzugabe eine signifikante Konzentrationsabnahme beobachtet, daraus resultiert eine Halbwertszeit von 556 Tagen. Dieser Wert entspricht jenem des Bioreaktoransatzes ohne Nährstoffzugabe. Für Flumetsulam wurde in keiner der Aquifersäulen eine signifikante Abnahme der Konzentration beobachtet. Dies entspricht ebenfalls den mit Bioreaktoren erzielten Ergebnissen.

Tabelle 1.23: Säulenversuche – Halbwertszeiten (Tage) von Pestiziden und Metaboliten in Grundwasser

Halbwertszeiten Aquifersäulen			
Säule	Thiamethoxam	Clopyralid	Florasulam
N/B	36	-*	256
N/B/I	45	-	328
OZ	-	556	434

*) - keine signifikante Konzentrationsabnahme



Zusammenfassung

Ziel des Arbeitspaketes war es, das Abbauverhalten von ausgewählten Pestiziden in Grundwasserkörpern zu untersuchen. Dazu wurden sowohl Versuche mit den jeweiligen Pestiziden, aber auch mit Grundwasser eines kontaminierten Standortes (Korneuburg) durchgeführt. Die Versuchsserien umfassten insgesamt 125 Einzelansätze inklusive der abiotischen Kontrollen. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob durch Optimierungsmaßnahmen eine Beschleunigung des mikrobiellen Pestizidabbaus möglich ist.

Ausgehend von einer umfassenden Charakterisierung von Grundwasser- (drei Entnahmestellen, vier Zeitpunkte) und Feststoffproben (Aquifermaterial, Modell-Boden und Schlammproben) wurden das Abbauverhalten der ausgewählten Pestizide untersucht. Durch Anreicherung von Pestizid-abbauenden Mikroorganismen wurden Mischkulturen zur Inokulation von Abbaueversuchen hergestellt. Eine Mischung der Anreicherungskulturen der einzelnen Pestizide kam als Inokulum zum Einsatz. Das Abbauverhalten der Pestizide wurde einzeln bzw. im Gemisch geprüft, wobei in zwei Versuchsreihen (Bioreaktoren und Aquifersäulen) auch Grundwasser vom kontaminierten Standort zum Einsatz kam.

Abbaueversuche, die mit einzelnen Pestiziden über einen Zeitraum von zwei Monaten durchgeführt wurden, zeigten einen mikrobiellen Abbau von Thiamethoxam und Florasulam, der durch einen signifikanten Konzentrationsunterschied zur abiotischen Kontrolle belegt wird. Für Thiamethoxam wurde der Abbau zusätzlich durch eine stark ausgeprägte Bildung der bekannten Metaboliten CGA 355190 und CGA 353968 bestätigt. Die Abnahme der Konzentration lag für Thiamethoxam bei 59% und für Florasulam bei 34%. Ein Vergleich mit der abiotischen Kontrolle konnte einen biologischen Abbau für Clopyralid, Flumetsulam und Dicamba nicht bestätigen.

Um ein besseres Verständnis für Abbaumechanismen von besonders stabilen Verbindungen wie Clopyralid zu bekommen, wurde dieses Pestizid einer Serie von physikalisch-chemischen Behandlungen unterzogen (Einsatz von Oxidations- und Reduktionsmitteln, Hydrolyse). Hierbei zeigte sich, dass eine Transformation der Substanz nur mit Fenton-Reagenz, d.h. über einen radikalischen Angriff, möglich ist.

Nach thermischer Belastung bei 120°C konnte Thiamethoxam nicht mehr nachgewiesen werden, Florasulam wurde um 83% reduziert. Gamma-Strahlung (25 kGray einer Co₆₀ Quelle) führte zu einer vollständigen Entfernung der Zielpestizide bis auf Clopyralid (97% entfernt). Nähere Untersuchungen dieser Behandlungsverfahren lagen nicht im Fokus des Forschungsvorhabens.

Parallel wurde versucht, durch Zusätze und Änderung von Reaktionsbedingungen den mikrobiellen Abbau von Pestiziden gezielt zu unterstützen und zu beschleunigen. Es wurde das Abbauverhalten bei Zugabe von Inokulationsmaterialien, Co-Substraten, Redox-Mediatoren und Enzymen sowie nach einer Absenkung des Redox-Potentials untersucht.

Zusätze von Pyridin, Phenol, Laktose und Klärschlamm führten zu einer Abnahme von Clopyralid, wobei mit Laktose bzw. Klärschlamm höhere Reduktionsraten erzielt wurden. Das Ausmaß des Konzentrationsrückganges (14-23%) liegt weitgehend im Bereich der übrigen Versuche, eine gezielte Verstärkung des Pestizidabbaus durch die eingesetzten Substrate lässt sich daraus nicht ableiten.

Zur Überprüfung auf Abbaunterstützung durch adaptierte Mikroorganismen wurden Versuche mit kontaminiertem Grundwasser bei Zusatz von Feststoff aus dem Aquifer des kontaminierten Standortes (Aquifermaterial) durchgeführt. Für Thiamethoxam konnte in 42 Tagen ein nahezu vollständiger Abbau unter gleichzeitiger Zunahme der Hauptmetaboliten CGA 355190 und CGA 353986 festgestellt werden. Die Florasulam-Konzentration konnte um nahezu 20% reduziert werden, während für Clopyralid und Flumetsulam kein Abbau zu beobachten war.

Eine Zugabe des Redox-Mediators Anthrachinon-2,6-Disulfonat (AQDS – $C_{14}H_6Na_2O_8S_2$) zu einem Bioreaktorversuch mit kontaminiertem Grundwasser konnte keine beschleunigte oder weiterführende Reduktion der Pestizidkonzentrationen bewirken.

Eine Absenkung des Redox-Potentials auf Nitrat- bzw. Sulfat-Reduktion führte im Versuchszeitraum von zwei Monaten zu einer Konzentrationsabnahme von Thiamethoxam, Clopyralid und Florasulam, wobei für Thiamethoxam bereits nach 35 Tagen der Grenzwert von $0,1 \mu\text{g/L}$ unterschritten wurde. Auch wenn diese Abnahmewerte vielversprechend sind, muss im Einzelfall entschieden werden, ob eine Absenkung des Redoxpotentials eines Grundwasserleiters möglich und die Einbringung von Nitrat zielführend ist.

Der Zusatz von Laccase, ein Enzym, das bei gleichzeitiger Reduktion molekularen Sauerstoffs freie Radikale produzieren kann, führte zu einer Abnahme der Clopyralid-Konzentration von maximal 49%. In Zusammenhang mit den Ergebnissen der Behandlung mit Fenton-Reagenz, deutet dies darauf hin, dass Mikroorganismen, die zur Produktion von Laccasen oder vergleichbaren Enzymen befähigt sind, stabile Pestizide wie Clopyralid potentiell umsetzen können.

Abbauversuche in Bioreaktoren mit Grundwasser des kontaminierten Standortes zeigten einen raschen Abbau von Thiamethoxam, hier konnte in 60 Tagen eine Konzentration von $0,1 \mu\text{g/L}$ unterschritten werden. Für Florasulam wurde nach einem Versuchszeitraum von 144 Tagen ein Endwert von $0,62 \mu\text{g/L}$ erreicht, wobei eine anhaltende Konzentrationsabnahme bei erweitertem Beobachtungszeitraum erwartet wird. Für Flumetsulam wurde in den biotisch betriebenen Bioreaktoren keine signifikante Abnahme festgestellt. Die Clopyralid-Konzentration hat in allen Bioreaktoren abgenommen. Die Abnahmeraten unterscheiden sich allerdings nicht signifikant von der abiotischen Kontrolle. Ein neuerlicher Ansatz der abiotischen Kontrolle, diesmal erfolgte die Unterbindung von mikrobiellem Wachstum durch Autoklavierung, zeigte, dass die Clopyralid-Konzentration unter sterilen Bedingungen nicht abnimmt. Eine gezielte Zuordnung der Abnahme der Clopyralid-Konzentration zu biotischen und abiotischen Prozessen ist allerdings nicht möglich.

Während eine Beimpfung mit Aquifermaterial den Abbau nicht beschleunigen konnte, hatte die Zugabe von Nährstoffen einen positiven Einfluss auf den mikrobiologischen Abbau von Thiamethoxam und Florasulam im Bioreaktor. Für Thiamethoxam verkürzte sich die Halbwertszeit im besten Fall auf 11 Tage, für Florasulam auf 157 Tage.



Die Abbauprobungen in Aquifersäulen kommen den Bedingungen, wie sie in Grundwasserleitern vorzufinden sind, am nächsten. Sie zeigen ein ähnliches Bild wie bereits für die Versuchsreihe in Bioreaktoren zu beobachten. Thiamethoxam nimmt bei ausreichender Nährstoffversorgung am schnellsten ab, die geringste Halbwertszeit von 36 Tagen wurde bei Nährstoffzusatz und Belüftung erzielt. Für Florasulam wurde der geringste Wert (256 Tage) ebenfalls bei Nährstoffzusatz und Belüftung erzielt. Das Fehlen eines Thiamethoxam-Abbaus in der Aquifersäule ohne Zusätze (OZ) dürfte weniger auf den Wegfall der Belüftung als auf einen Nährstoffmangel zurückzuführen sein. Flumetsulam und Clopyralid nehmen in ihrer Konzentration nicht oder nur sehr gering ab. Generell sind die Abbauraten etwas geringer im Vergleich zu den Versuchen in Bioreaktoren. Hervorzuheben ist auch, dass im Versuch mit Aquifersäulen auch eine signifikante Konzentrationsabnahme der Thiamethoxam-Metaboliten CGA 355190 und CGA 353968 nachgewiesen werden konnte.

Im Abbauprobung mit Aquifersäulen wurde 3,6-Dichloro-2-Pyridinol in Spuren nachgewiesen. Dabei handelt es sich ein Abbauprodukt von Clopyralid, das üblicherweise das Ergebnis eines radikalischen Angriffs bei starker UV Beleuchtung unter TiO_2 Katalyse ist (Sojic et al., 2009). Das Auftreten dieser Substanz in Aquifersäulen, die unter Lichtausschluss im Labor betrieben wurden, deutet darauf hin, dass ein radikalischer mikrobieller Abbau von Clopyralid auch in Grundwasserleitern grundsätzlich möglich ist, der Abbau aber äußerst langsam vor sich geht.

Literaturverzeichnis

Bamforth, S. M. and Singleton, I. (2005): Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80: 723-736. doi: 10.1002/jctb.1276

Barbusinski, K., (2009): Fenton reaction - controversy concerning the chemistry. *Ecological Chemistry and Engineering S* 16, 3, 347-358.

Cañas, A. Camarero, S. (2010): Laccases and their natural mediators: biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnol Adv.* 28 (6):694-705. doi: 10.1016/j.biotechadv.2010.05.002.

EFSA (2005): Conclusion on the peer review of clopyralid. Scientific Report 50, 1–65.

Haritash, A.K. and Kaushik, C.P. (2009): Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials* 169, 1-3, 1-15

Hasinger, M. and Scherr, K.E., Lundaa, T., Bräuer, L., Zach C., Loibner, A.P. (2012): Changes in iso- and n-alkane distribution during biodegradation of crude oil under nitrate and sulphate reducing conditions. *Journal of Biotechnology* 157 (4):490-498.

Horvarth, R.S. (1972): Microbial Co-Metabolism and Degradation of Organic Compounds in Nature. *Bacteriological Reviews* 36, 2, 146-155.

IUPAC (2014): Pesticides Properties Database, <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/>; Zugriff Jänner 2014.

Lettner, H.P. (1993): Mikrobiologie der Abluftreinigung in der Mineralfaserindustrie. Dissertation, eingereicht an der Universität für Bodenkultur, Wien.

Ma Chen & Yueqiang Wang & Li Zhuang & Deyin Huang & Shungui Zhou & Fangbai Li (2011): Anaerobic degradation of phenanthrene by a newly isolated humus-reducing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* strain PAH-1. *J Soils Sediments*; DOI 10.1007/s11368-011-0368-x.

Okpokwasili, G.C. and Nweke, C.O. (2005): Microbial growth and substrate utilization kinetics. *African Journal of Biotechnology* 5 (4), 305-317.

Scherr, K.E., Nahold, M.M., Lantschbauer, W. and Loibner, A.P. (2011): Sequential application of electron donors and humic acids for the anaerobic bioremediation of chlorinated aliphatic hydrocarbons. *New Biotechnology* 29 (1):116-125.

Scherr, K.E., Nahold, M., Loibner, A.P. (2010): A novel two-step treatment for the in situ bioremediation of chlorinated aliphatic hydrocarbons. *Journal of Biotechnology* 150: S47-S47.

Sojic, D.F., Vesna B. Anderluh, Dejan Z. Orcic, Biljana F. Abramovic (2009): Photodegradation of clopyralid in TiO₂ suspensions: Identification of intermediates and reaction pathways. *Journal of Hazardous Materials* 168, 94-101.

Thurston, C.F. (1994): The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140, 19-26.

Westphal, K., Saliger, R., Jäger, D., Teevs, L., and Prüße, U. (2013): Degradation of Clopyralid by the Fenton Reaction. dx.doi.org/10.1021/ie302769p | *Ind. Eng. Chem. Res.* 52, 13924-13929.

WHO (2004): Chlorpyrifos in Drinking-water, Background document for development of WHO *Guidelines for Drinking-water Quality*, WHO/SDE/WSH/03.04/87.

Widdel, F., Pfennig, N. (1981): Studies on dissimilatory sulphate-reducing bacteria that decompose fatty acids. *Archives of Microbiology* 129, 395-400.



Arbeitspaket 2

Untersuchung auf potentielle Anreicherung von Metaboliten mit chemisch-analytischen Methoden

Zielsetzung im Arbeitspaket

Die im Projektantrag definierten Aufgabenstellungen waren

- Methodenentwicklung für relevante Pestizide
- Durchführung der Pestizidanalytik für Abbauprobversuche
- Screening auf Anreicherung von Metaboliten

Um diese Fragestellungen adäquat behandeln zu können, wurden zwei massenspektrometrische Ansätze gewählt: Für die Pestizide selbst sowie für Metaboliten, die als Referenzsubstanzen erhältlich sind, wurde eine quantitative HPLC-MS/MS (Hochdruckflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie) Methode erstellt, welche auch für die analytische Begleitung der Abbauprobversuche verwendet wurde. Die Suche nach (unbekannten) Metaboliten wurde mit HPLC-HRMS (Hochdruckflüssigkeitschromatographie gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie) durchgeführt.

Materialien und Methodik

LC-MS/MS Multi-Target Methode zur Quantifizierung primärer Zielsubstanzen und ausgewählter Metaboliten

Standards

Die Thiamethoxam-Metaboliten CGA 355190, CGA 353968, NOA 459602 und SYN 501406 wurden von Syngenta zur Verfügung gestellt. 3,6 Dichlorsalicylsäure wurde von AliChem bezogen, die restlichen analytischen Standards wurden von Sigma bezogen.

Methodenparameter

Für die chromatographische Methode wurde ein generischer Ansatz basierend auf einem angesäuerten Wasser/Methanolgradienten und einer Standard C18-RP-Säule adaptiert, der am Analytikzentrum fast kontinuierlich für die Mykotoxinanalytik eingesetzt wird. Die allgemeinen Parameter der Methode lauten wie folgt:

HPLC:	Agilent 1290 UPLC
LC-Säule:	Phenomenex Gemini C18, 150 x 4,6 mm, 5 µm Partikel, mit Gemini Guard Cartridge (3 x 4,6 mm)
Eluenten:	Methanol/Wasser/Eisessig 10/89/1 (Eluent A) bzw. 97/2/1 (Eluent B), jeweils mit 5mM Ammoniumacetat
Gradient:	100% A (0-2 min), linearer Anstieg auf 50% B (2-5 min), linearer Anstieg auf 100% B (5-14 min), 100% B (14-18 min), Rückkehr zu 100 % A (18–18,1 min), Reequilibrierung mit 100% A (18,1-20.5 min); Flußrate 1mL/min
Ofentemperatur:	25 °C
Injektionsvolumen:	20 µl
MS/MS:	QTrap 5500 (AB Sciex)
Quellenparameter:	Temperatur: 550 °C; Curtain Gas: 30 psi; Gas 1 und 2: 80 psi; Ion Spray Voltage: 5500 V (positiver Modus) bzw. -4500 V (negativer Modus);
Kollisionszelle:	CAD Gas: medium; Entrance Potential: 10 V bzw. -10V
MS/MS Modus:	scheduled Multiple Reaction Monitoring (positiv); Cycle time: 1 sec. MRM detection window: 108 sec. Multiple Reaction Monitoring (negativ); Dwell Time: 25 msec

Für die Ermittlung der MS/MS Parameter wurden die Analyten mit dem entsprechenden Träger-Lösungsmittel auf eine geeignete Konzentration (20-1000 µg/L) verdünnt und mittels einer Spritzenpumpe mit einem Fluß von 10 µl/min direkt in die Ionenquelle des Massenspektrometers infundiert. Die entsprechenden Parameter (Masse der Vorläufer- und Produktionen, Declustering Potential, Collision Energy, Cell Exit Potential) wurden automatisch mit der „Compound Optimization“ Funktion optimiert. Die auf diese Weise ermittelten Werte wurden zur Bestimmung der Retentionszeiten der Substanzen benutzt. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die optimierten Werte der LC-MS/MS Parameter.



Tabelle 2.1: LC-MS/MS Parameter der in der Targetmethode inkludierten Analyten

LC-MS/MS Parameter						
Analyt	m/z Q1 (amu)	m/z Q3 (amu)	Retentionszeit (min)	Declustering potential (V)	Collision Energy (V)	Cell Exit Potential (V)
Thiamethoxam	291,9	211,1/181	6,4	66	19/31	8/12
Clopyralid	191,8	145,9/109,9	6,5	66	31/49	8/8
CGA 353968	205,8	174,9/131,9	6,8	91	25/25	8/8
Imidacloprid	256	175,1/209,1	6,9	56	29/25	8/8
Flumetsulam	326	129/109	7	91	39/75	8/8
Desmethylthiamethoxam	277,9	131,9/167	7,1	61	27/31	6/8
Clothianidin	249,9	169,1/131,9	7,3	56	19/27	8/6
CGA 355190	247,8	174,9/131,9	7,4	91	25/25	8/8
Florasulam	360	129/108,9	7,8	111	45/81	10/8
Clomazon	240	125/89	10,5	91	33/65	8/8
Chlorpyrifos_Methyl	322	124,9/289,8	13,4	56	27/23	8/12
Chlorpyrifos	349,8	96,9/197,9	14,5	91	47/29	8/8
NOA 459602	335,9	204,9/292,1	3,8	-85	-26/-16	-9/-11
SYN 501406	293,9	193/191	5,3	-55	-26/-34	-7/-9
Picloram	240,9	196,9/125	7,3	-45	-16/-30	-9/-7
Dicamba	218,9	174,9	9,1	-35	-12	-7
D3-Dicamba	222	177,9	9,1	-35	-12	-7
3,6 Dichlorosalicylsäure	204,9	160,9/124,9	10,4	-35	-18/-28	-7/-11
2,4 Dichlorphenoxyessigsäure	219	160,9/125	11,1	-40	-22/-38	-7/-7
MCPA	199	141/155	11,1	-45	-20/-16	-7/-5
Trichlorpyridinol	196	196	11,2	-70	-10	-11
Triclopyr	253,8	195,9/217,9	11,6	-50	-20/-10	-9/-9
Mecoprop	213	141	11,7	-70	-20	-11

Ermittlung der Bestimmungsgrenzen

Positiver Modus

Zur Ermittlung der analytischen Kenndaten wurden Kalibrationskurven im Bereich von 0,05 – 5 µg/L bzw. von 10 – 1000 µg/L (für relativ unempfindliche Analyten) aufgenommen. Ziel war es, eine Bestimmungsgrenze unterhalb des Grenzwertes von 0,1 µg/L sowohl nach dem S/N-Kriterium (das Verhältnis Signal : Rauschen muss größer 10 sein) als auch nach dem RSD-Kriterium (Standardabweichung der Wiederholinjektionen muß kleiner als 20% sein) zu erreichen.

Die folgende Tabelle fasst die ermittelten Kenndaten zusammen:

Tabelle 2.2: Kenndaten der im positiven Ionisationsmodus mittels Direktinjektion gemessenen Analyten
*) die für Clopyralid angegebenen Werte beziehen sich auf den Konzentrationslevel von 0.15 µg/L; da für diese Komponente somit nicht die geforderte Nachweisgrenze erreicht wurde, wurde für sie die im nächsten Abschnitt dargestellte Methode zur Anreicherung angewandt und eine Wiederfindung von 92% erreicht. Da alle gemessenen Proben viel höhere Konzentrationen an Clopyralid aufgewiesen haben, wurde die Direktinjektion als für dieses Projekt ausreichend angesehen.

Instrumentelle Kenndaten				
Analyt	S/N @ 0.05 µg/L	RSD (%) @ 0.05 µg/L (n=3)	Aus S/N abgeschätzte Nachweisgrenze [µg/L]	R ²
Thiamethoxam	25	7,1	0,007	0,99966
CGA 355190	33	8,7	0,005	0,99949
CGA 353968	23	3,8	0,007	0,99953
Desmethyl-TMX	10	2,4	0,02	0,99917
Clothianidin	8	12,1	0,02	0,99912
Florasulam	27	1,9	0,006	0,99992
Flumetsulam	20	8,0	0,009	0,99963
Clopyralid	3*	8,4*	0,15	0,99917
Chlorpyrifos	8	10,1	0,02	0,99811
Imidacloprid	15	2,6	0,01	0,99972
Clomazon	15	0,8	0,01	0,99999
Chlorpyrifos-Methyl	12	5,5	0,015	0,99952

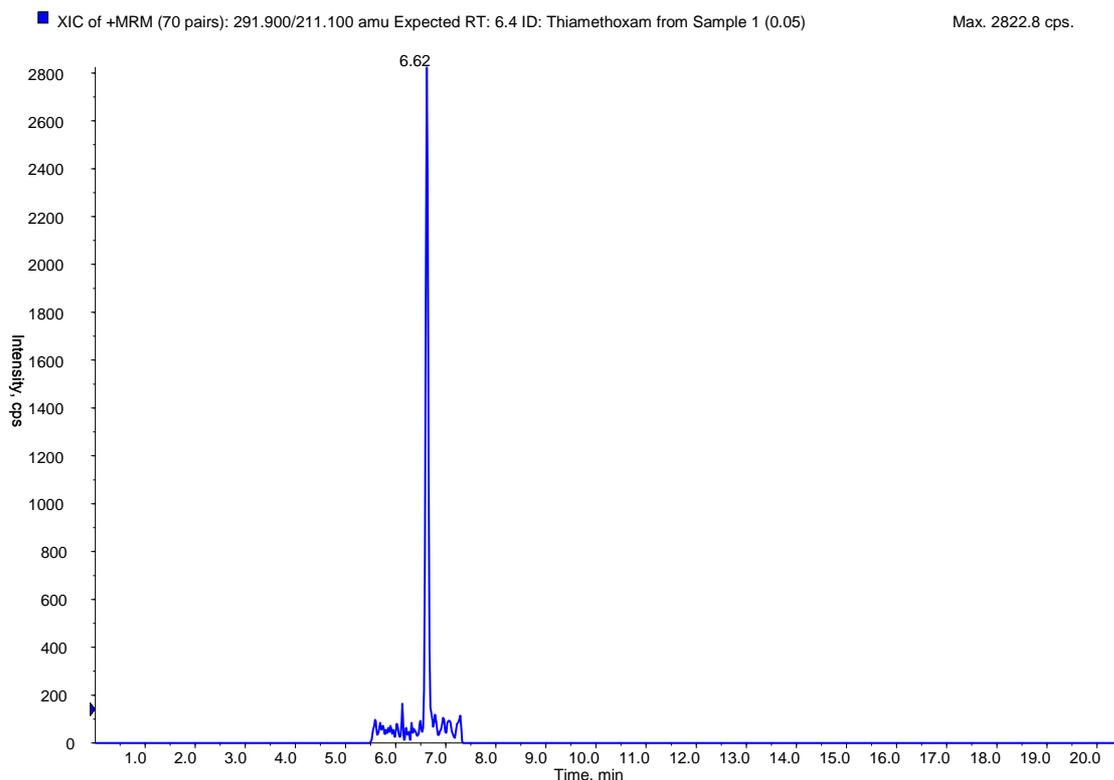


Abbildung 2.1: Extracted Ion Chromatogramm des sMRM Übergangs 291,9/211,0 von Thiamethoxam bei der Direktinjektion des Multikomponentenstandards mit 0,05 µg/L.

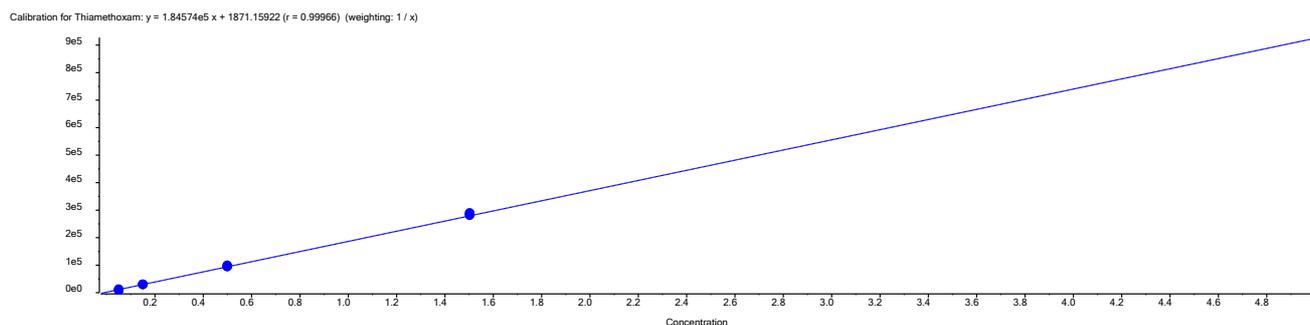


Abbildung 2.2: Kalibrationskurve für Thiamethoxam im Bereich von 0,05 – 5 µg/L.

Negativer Modus

Da im negativen Modus bei Direktinjektion die Bestimmungsgrenzen für fast alle Substanzen oberhalb von 0,1 µg/L liegen, werden alle Proben mittels Festphasenextraktion um einen Faktor 500 angereichert. Das zugehörige Protokoll lautet wie folgt:

Vorbereitung:

Probe:

Zugabe von 0,2 g NaCl auf 100 mL Probe
pH-Wert mit HCl (1:10 verdünnt) auf pH 2,2

Aufarbeitung:

Extraktion:

SPE Säulen OASIS HLB 60 mg
Konditionieren mit 1x Ethylacetat/Acetonitril, 2x Methanol, 2x H₂O pH 2,0, mit H₂O pH 2,0 füllen
Proben durch Anlegen von Vakuum durchsaugen
Flaschen mit Tripel-Dest. Wasser pH 2,0 spülen und durchsaugen
Säulchen mit Tripel-Dest. Wasser pH 2,0 spülen und durchsaugen
SPE Säulchen 8 Minuten einzeln trockensaugen

Eluieren:

4 ml Methanol, dann 2 ml Ethylacetat/Acetonitril (50:50) in 2 ml Vial
zwischen durch immer wieder einengen mit Stickstoff (bis ca. 200 µl)
am Ende mit Stickstoff bis zur Trockene abdampfen
in 200 µl Laufmittel aufnehmen
Dreimal 10 s vortexen
in Vial mit Mikroinsert überführen

Diese Prozedur wurde für einige der Substanzen mit Standards im Bereich von 0,05 – 5 µg/l durchgeführt um die Wiederholbarkeit zu testen und um – mittels Vergleich mit Direktinjektion von Standards im Bereich 10 – 1000 µg/L – die Wiederfindung zu berechnen.

Tabelle 2.3: Kenndaten für die im negativen Modus gemessenen Analyten

LC-MS/MS Parameter						
Analyt	Mit Anreicherung 0,05-5 µg/L				Direktinjektion 10-1000 µg/L	
	S/N bei 0.05 µg/L	RSD bei 0.05 µg/L (%)	R ²	Wiederfindung (%)	S/N bei 10 µg/L	LOD aus S/N
Dicamba	10,2	7,8	0,9951	86	12	2,5
Mecoprop	141	4,5	0,9976	76	315	0,1
2,4 Dichlorphenoxy-essigsäure	408	6,3	0,998	80	249	0,15
MCPA	344	5,2	0,9974	73	254	0,15
Triclopyr	217	12,4	0,9989	107	125	0,3
Trichlorpyridinol	134	2,5	0,9992	n.d.	528	0,07
Picloram	19	14,2	0,9992	n.d.	35	1
NOA 459602	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	192	0,2
3,6						
Dichlorosalicylsäure	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	253	0,15
SYN 501406	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

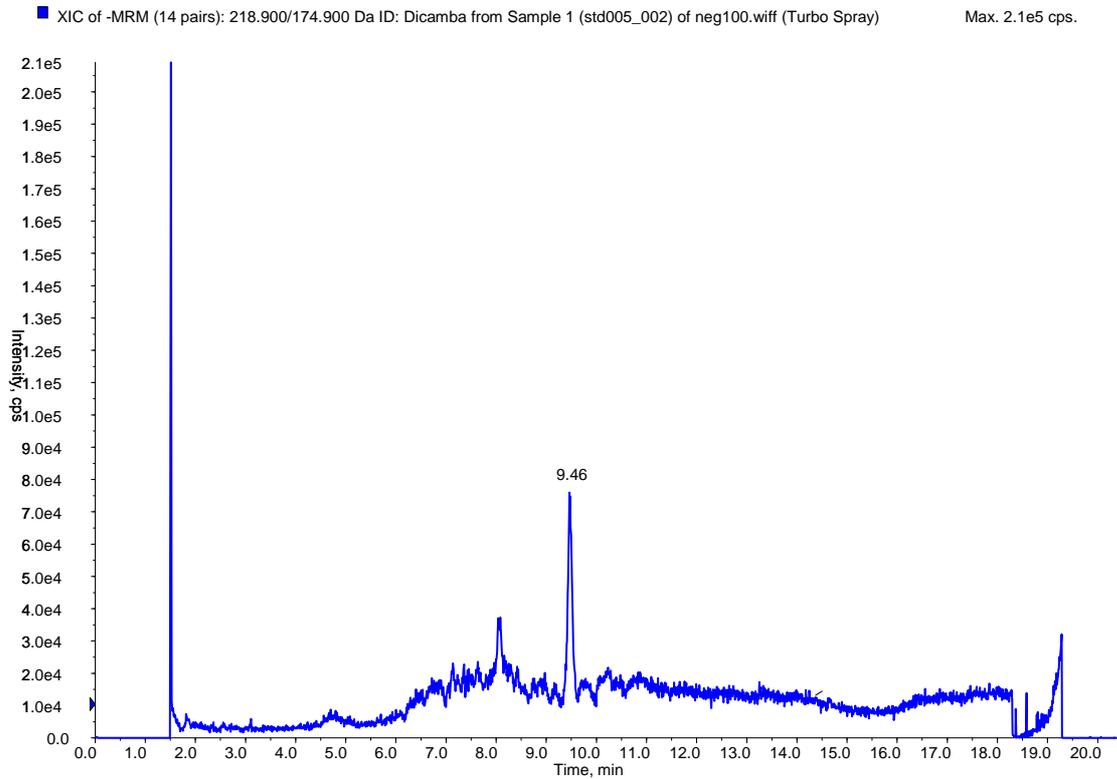


Abbildung 2.3: Extracted Ion Chromatogramm des sMRM Übergangs von Dicamba bei Injektion des mit Festphasenextraktion angereicherten Multikomponentenstandards mit 0,05 µg/L.

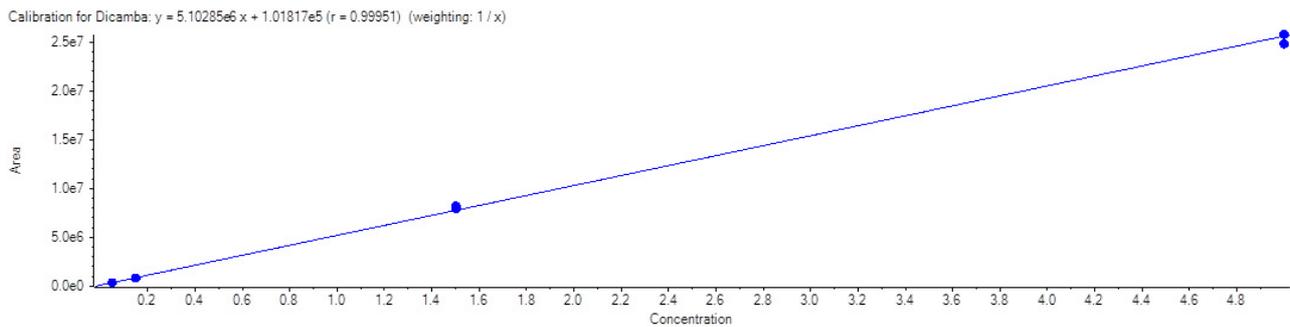


Abbildung 2.4: Kalibrationskurve für Dicamba im Bereich von 0,05 – 5 µg/L nach Anreicherung mit Festphasenextraktion.

Ermittlung der Messunsicherheit für die in den Realproben identifizierten Primärsubstanzen

Zur Bestimmung der Intra-day Precision wurden die Wiederfindungen aller Standards und Kontrollstandards innerhalb aller 30 während des Projektzeitraums gemessenen Sequenzen statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 2.4: Übersicht über die für die Primäranalyten erzielte Intra-day Precision

Intra-day Precision		
Analyt	Konzentrationsbereich (µg/L)	RSD (%)
Thiamethoxam	0,05 – 5	8,0 (n=322)
CGA 355190	0,05 – 5	6,7 (n=263)
CGA 353168	0,05 – 5	10,9 (n=263)
Clopyralid	0,5 – 5	10,2 (n=189)
Florasulam	0,05 – 5	9,3 (n=305)
Flumetsulam	0,05 – 5	7,9 (n=302)

Zur weiteren Überprüfung der Präzision der Methode unter realen Bedingungen wurden vier Proben aus der Versuchsreihe „Abbau in Bioreaktoren“ (siehe Arbeitspaket 1) an drei verschiedenen Tagen jeweils in Doppelbestimmung gemessen.

Tabelle 2.5: Übersicht über die für die Primäranalyten erzielte intermediate precision

Intermediate precision		
Analyt	Konzentration (µg/L)	RSD (%)
Thiamethoxam	0,3 – 1,8	2,1 – 5,7
CGA 355190	4,9 – 6,5	2,2 – 4,6
CGA 353168	0,54 – 0,66	5,2 – 8,2
Clopyralid	56 - 63	1,3 – 3,8
Florasulam	0,92 – 1,11	1,8 – 2,5
Flumetsulam	0,44 – 1,46	1,4 - 2,8

Im Vergleich zur Intra-day Precision sind die Standardabweichungen niedriger, da die gemessenen Konzentrationen im oberen Bereich bzw. im Fall von Clopyralid über den in Tabelle 2.4 betrachteten Bereich liegen.

Um eventuell vorhandene Matrixeffekte (darunter versteht man einen Einfluß der Probenmatrix auf die Signalintensität und damit die Genauigkeit der Methode) aufzudecken, wurden 3 Replikate einer unbelasteten Grundwasserprobe auf 5 µg/L aufgestockt und gemessen.



Tabelle 2.6: Gemessene Konzentrationen in der mit 5 µg/L aufgestockten Probe

Matrixeffekte	
Analyt	Gemessene Konzentration [µg/L]
Thiamethoxam	5,12±0,06
CGA 355190	5,04±0,13
CGA 353168	4,81±0,07
Clopyralid	5,26±0,15
Florasulam	5,13±0,02
Flumetsulam	5,21±0,09
Clothianidin	5,06±0,03
Chlorpyrifos	5,27±0,05

Die Grundwassermatrix verursachte keinen signifikanten Matrixeffekt.

Abschätzung der Messunsicherheit: Den größten Beitrag zur Meßunsicherheit liefern Empfindlichkeitsschwankungen, die durch den komplexen Ionisationsprozeß in der Ionenquelle des Massenspektrometers bedingt sind. Mit einem Erweiterungsfaktor (coverage factor) von 2 ergibt sich für die in den Realproben quantifizierten Primärsubstanzen eine erweiterte Messunsicherheit von ca. 20%.

LC-MS Methoden zur Identifizierung von Metaboliten der Zielsubstanzen

Eines der für dieses Arbeitspaket definierten Ziele war die Identifizierung von möglicherweise im Grundwasser vorhandenen bzw. während der Abbaubersuche gebildeten Metaboliten der primären Zielverbindungen. Die besondere Schwierigkeit liegt dabei, neben der prinzipiellen Herausforderung einer ungerichteten Analyse von Realproben, die mehrere tausend auf natürlichem Wege entstehende Substanzen enthalten können, in den extrem niedrigen Konzentrationen (da nicht zu erwarten ist, dass ein potentieller Metabolit in signifikant höheren Konzentrationen auftritt als die Vorläufersubstanz) nachzuweisen. Um dem Rechnung zu tragen, wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt: Einerseits wurde mittels LC-MS/MS Produktionenscans gezielt nach Massen von in der Literatur dokumentierten Metaboliten (Frear et al., 1993; Jackson et al., 2000; Krieger et al., 2000; Sojic et al., 2009) gesucht, andererseits wurde mit hochauflösender Massenspektrometrie und entsprechender Datenverarbeitung ungerichtet nach Metaboliten gesucht, indem aus den gemessenen akkuraten Massen mögliche Summen- bzw. Strukturformeln generiert wurden.

Suche nach bekannten Metaboliten mittels LC-MS/MS

Die hierfür verwendete chromatographische Methode ist ident mit der für die quantitative Targetanalytik beschriebenen. Für den „Enhanced Product Ion Scan“ läßt der erste Quadrupol des QTrap 5500 Massenspektrometers nur Ionen mit der Masse des vorhergesagten Metaboliten passieren, diese werden in der Kollisionszelle fragmentiert und gelangen in den dritten Quadrupol, der als lineare Ionenfalle benutzt wird. Das Massenspektrum des so gesammelten Ionenpakets wird dann sequentiell ausgelesen und kann mit Literaturspektren verglichen werden. Die relevanten MS-Parameter wurden wie folgt eingestellt:

Declustering potential: 90 bzw. -90 V

Collision energy: 20, 35 und 50V bzw. Collision Energy Spread 35 ± 15 V; analog im negative Modus

Trap Fill Time: Dynamic fill time

Nach folgenden Metaboliten wurde gesucht:

Clopyralid: Hydroxy- bzw. Decarbonylclopyralid, Clopyralid-Dimer

Flumetsulam: Mono- und Dihydroxyflumetsulam

Florasulam: Demethylflorasulam, Aminosulfonyltriazolopyrimidin, Difluorophenyl aminosulfonyltriazolo carboxylic acid, Difluorphenyl-Triazolsulfonamid

Thiamethoxam: CGA 309335, NOA 404617

Aufgrund der niedrigen Konzentrationen wurden die Proben von Hotspot 2 sowohl direkt als auch nach Anreicherung mittels Festphasenextraktion untersucht. In der aufkonzentrierten Probe ergab die Suche nach Demethylflorasulam einen mutmaßlichen Treffer.

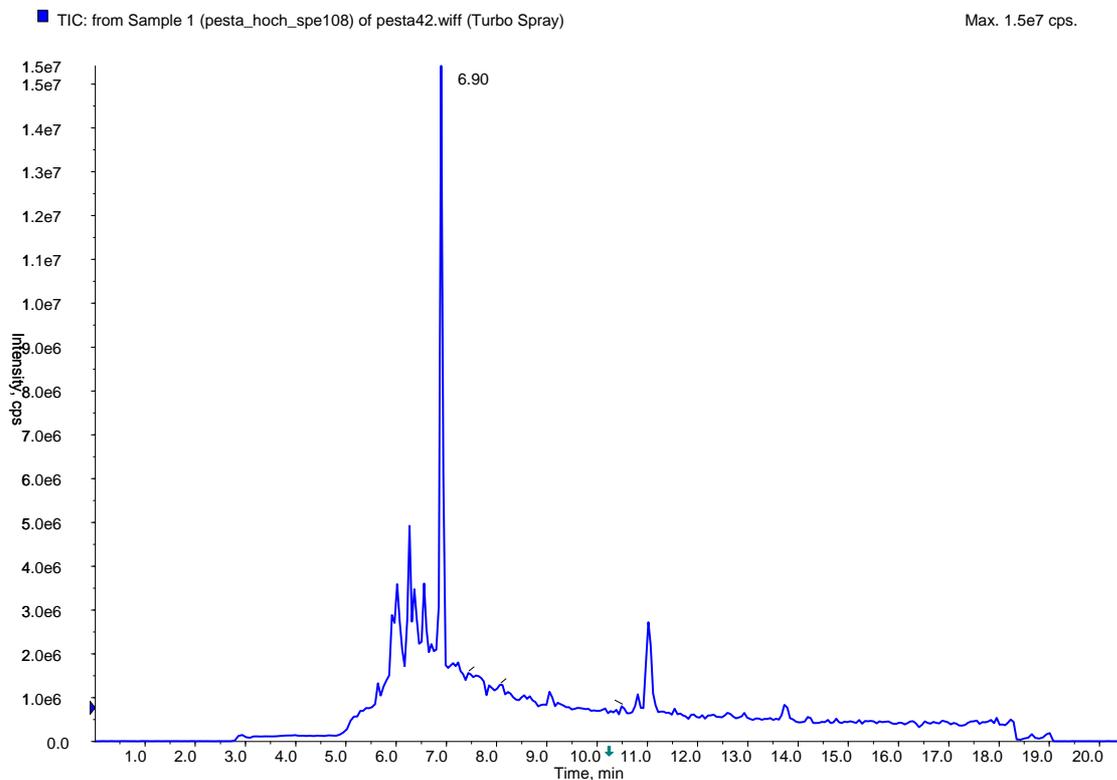


Abbildung 2.5: Enhanced Product Ion Scan nach der Masse 346 (protonierte Spezies von Demethylflorasulam) in der mittels Festphasenextraktion angereicherten Probe aus Hotspot 2.

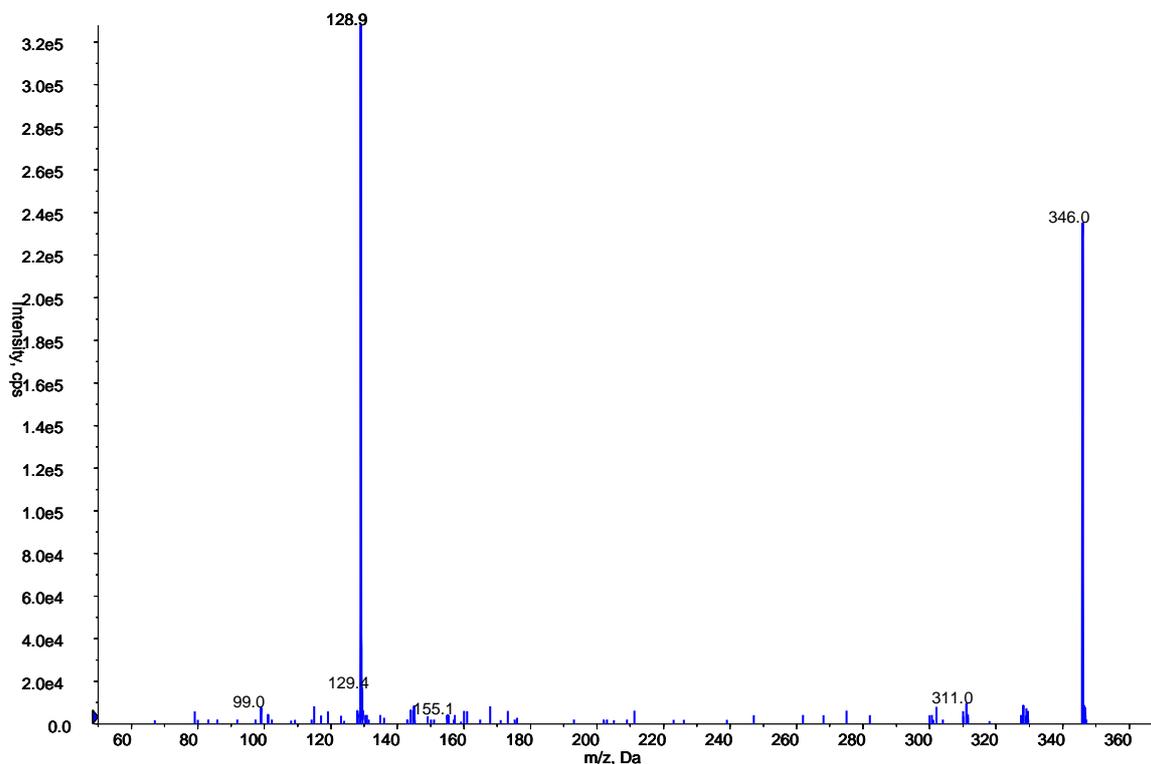


Abbildung 2.6: Produktionenspektrum des Peaks bei 6.90 min.

Die Identifikation von Demethylflorasulam erscheint aus zwei Gründen plausibel: Zum einen liegt die Retentionszeit des intensiven Peaks bei 6.9 min im Produktionenscan um ca. 0.8 min vor der Muttersubstanz, was mit der etwas höheren Polarität des Metaboliten (Hydroxy- anstatt Methoxygruppe) im Einklang steht. Zum anderen ähnelt das Produktionenspektrum demjenigen von Florasulam, das ebenfalls ein extrem dominantes Ion bei einem Verhältnis von Masse zu Ladung von 129 sowie bei höheren Kollisionsenergien ein weiteres Fragment von $m/z=109$ zeigt.

In den aufkonzentrierten Proben, die am Ende der Versuchsreihen „Abbau in Bioreaktoren“ bzw. „Abbau in Aquifersäulen“ gezogen wurden, wurde ein Peak gefunden, dessen Produktionenspektrum den entsprechenden Literaturdaten (Sojic et al., 2009) des Clopyralid-Metaboliten 3,6-Dichlor-2-pyridinol entspricht.

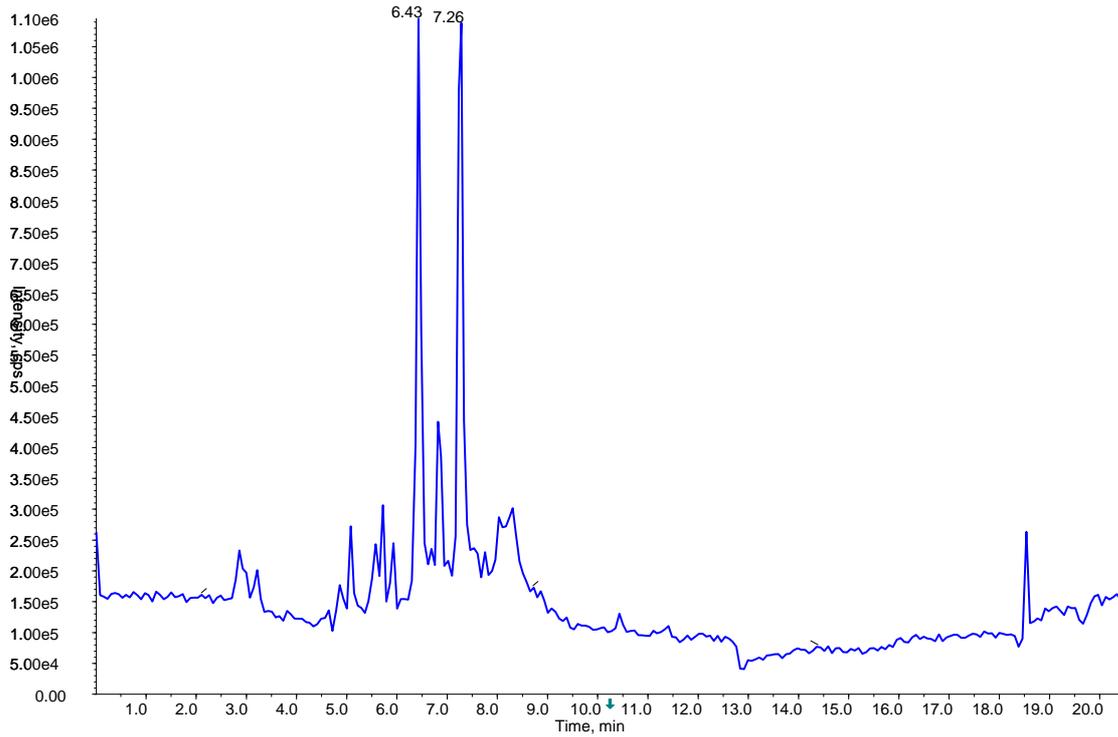


Abbildung 2.7: Enhanced Product Ion Scan nach der Masse 164 (protonierte Spezies von 3,6-Dichlor-2-Pyridinol) in der Probe aus Säule 2 (N/B/I) aus dem Versuch „Abbau in Aquifersäulen“.

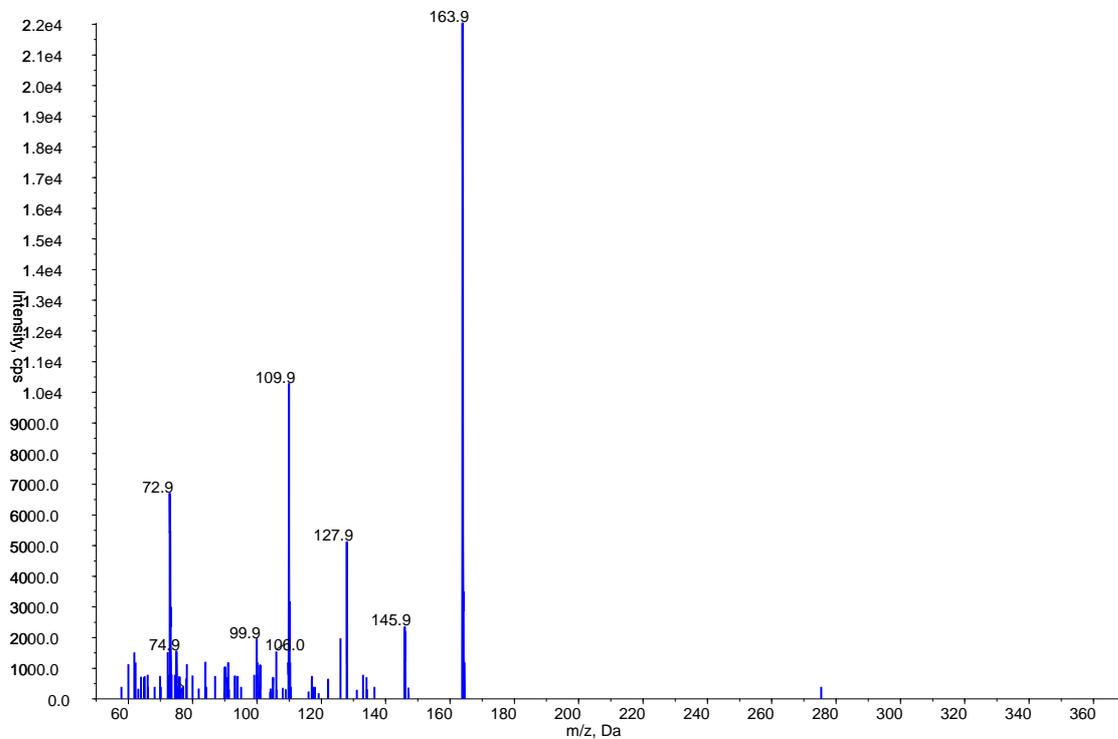


Abbildung 2.8: Produktionenspektrum des Peaks bei 6.43 min aus Abbildung 2.7.



Sämtliche in der Literatur für 3,6-Dichlor-2-Pyridinol angegebene Hauptfragmente bei den Massen 73, 75, 100, 110, 128 und 146 stimmen mit dem gefundenen Spektrum überein. Der Peak eluiert unter den gewählten LC-Bedingungen um ca. 0,1 min vor Clopyralid, was ein wenig von der Literatur abweicht. Dort eluiert der Metabolit ca. 0,3 min nach Clopyralid, allerdings wurden dort eine andere HPLC-Säule bzw. ein anderer organischer Modifizier und ein anderer pH-Wert der mobilen Phase angewandt.

In den aufkonzentrierten Proben, die am Ende des Versuchs „Abbau in Bioreaktoren“ gezogen wurden, konnte ein weiterer Peak identifiziert werden, der aufgrund MS/MS Fragmentierungsmusters und der Retentionszeit mit hoher Wahrscheinlichkeit als der Florasulam-Metabolit N-2,6-difluorphenyl-1,2,4-triazolsulfonamid (DFP-TSA) identifiziert wurde.

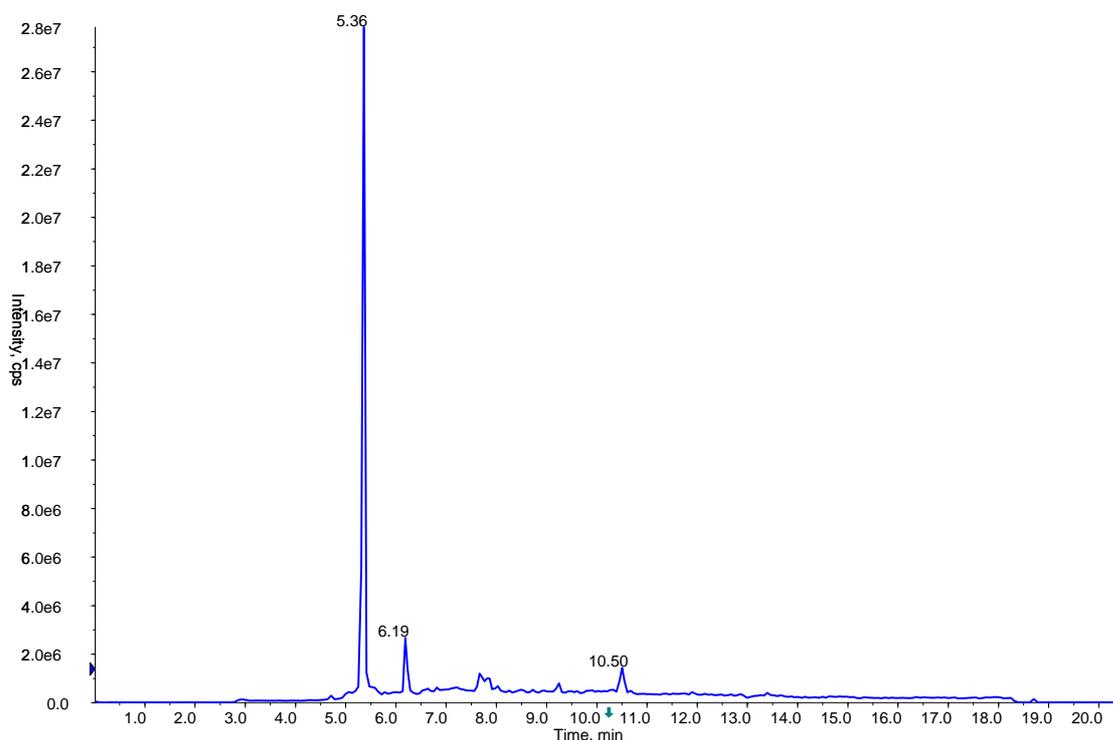


Abbildung 2.9: Enhanced Product Ion Scan nach der Masse 261 (protonierte Spezies von DFP-TSA) in der aufkonzentrierten Probe aus dem Abbaueversuch im Bioreaktor (GW/N/B).

Der betreffende Peak eluiert unter den gewählten Bedingungen ca. 1,6 Minuten vor Florasulam und weist die für Florasulam typischen Fragmente von m/z 109 und 129 auf.

Für die restlichen in der Literatur beschriebenen Metaboliten konnte kein Peak mit einem entsprechenden Fragmentierungsspektrum gefunden werden.

Die Konzentrationen der drei aufgefundenen Metaboliten können nicht quantifiziert werden, da das Massenspektrometer im „Enhanced Product Ion Scan“ mit einer dynamischen Füllzeit der Ionenfalle arbeitet, d.h. die Ionenfalle sammelt bei niedrigeren Konzentrationen für eine längere Zeit, um aussagekräftige Fragmentierungsspektren generieren zu können. Da alle drei aufgefundenen Substanzen jedoch nur in den um den Faktor 500 angereicherten Proben identifiziert werden konnten, sind die tatsächlichen Konzentrationen gegenüber den Ausgangssubstanzen vermutlich vernachlässigbar.

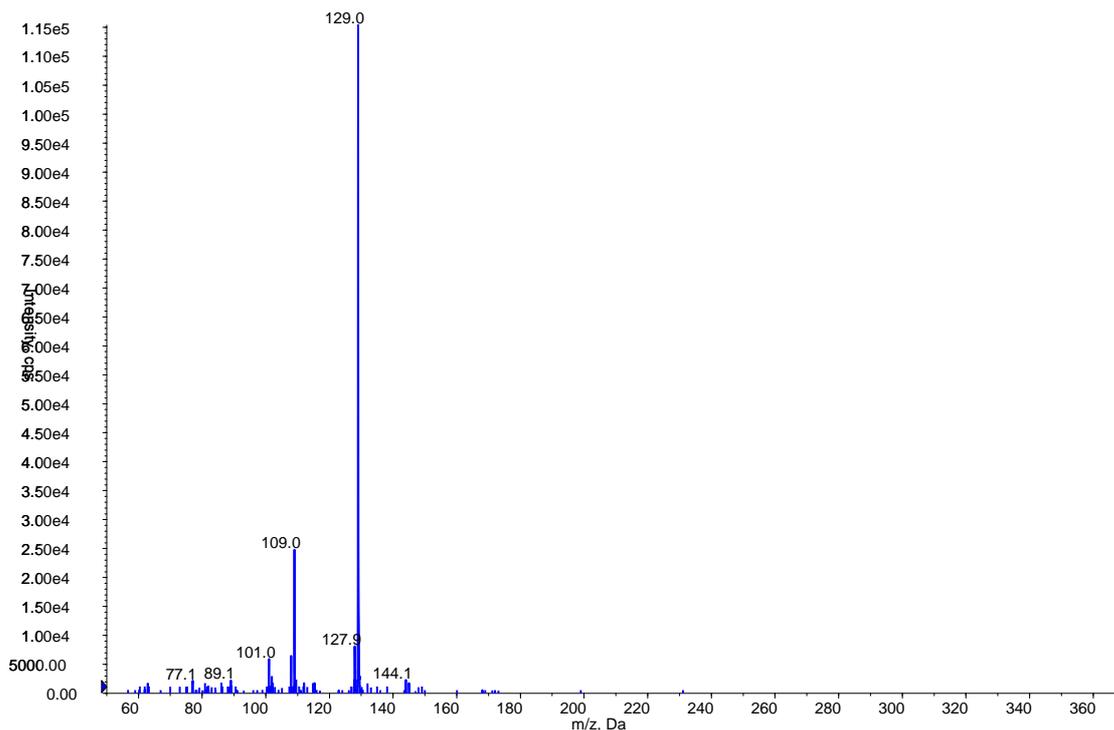


Abbildung 2.10: Produktionenspektrum des Peaks bei 6.19 min aus Abbildung 2.9.

Ungerichtete Suche nach Metaboliten mittels hochauflösender Massenspektrometrie

LC-HR-MS Messungen wurden auf einer LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) mit einer Electrospray Ionisation (ESI) Quelle durchgeführt, welche an ein UHPLC System (Accela, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) gekoppelt ist. Die analytische Säule war eine reversed-phase XBridge C₁₈, 150x2,1 mm i.d., 3,5 µm Partikeldurchmesser (Waters, Milford, MA, USA), mit einer C₁₈ 4x3 mm i.d. Vorsäulen-Disk (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Die Säulentemperatur wurde auf 25 °C gehalten. Eluent A war Wasser, Eluent B war Methanol, beides mit einem Zusatz von 0.1% Ameisensäure. Der Gradient startete mit einer isokratischen Phase bei 10% B für 2 Minuten, danach wurde der Anteil von B zwischen Minute 2 und 30 linear auf 100% erhöht. Diese Bedingungen wurden für 5 Minuten gehalten und anschließend die Säule für 8 Minuten bei den Startbedingungen reequilbriert. Die Flußrate betrug 250 µL min⁻¹ und das Injektionsvolumen war 10 µL.

Die Electrospray Ionisationsquelle arbeitete bei folgenden Bedingungen: Sheath Gas: 60 arbiträre Einheiten, Auxiliary Gas: 15 arbiträre Einheiten, Sweep Gas: 5 arbiträre Einheiten, Kapillarspannung: 4 kV, Kapillartemperatur: 300°C. Alle anderen Quellenparameter wurden automatisch getuned mittels einer 10 mg L⁻¹ Lösung von Reserpin (Sigma Aldrich). Die Automatic gain control der LTQ Orbitrap wurden auf einen Zielwert von 3x10⁵ eingestellt und eine Injektionszeit von 500 ms gewählt. Das Massenspektrometer wurde in einem Massenbereich m/z von 100-1000 mit einer Auflösung von 100.000 FWHM bei m/z 400 betrieben. Die Datenaufzeichnung erfolgte mit Xcalibur 2.1.0 (Thermo Fisher Scientific).

Das grundlegende Problem der ungerichteten Analytik soll mit den beiden folgenden Abbildungen illustriert werden. Die Rohdaten bestehen aus einem dreidimensionalen Datensatz, bei dem zunächst die Intensität des Totalionenstroms aller in der Probe enthaltener ionisierbaren Verbindungen gegen die Retentionszeit aufgetragen ist.

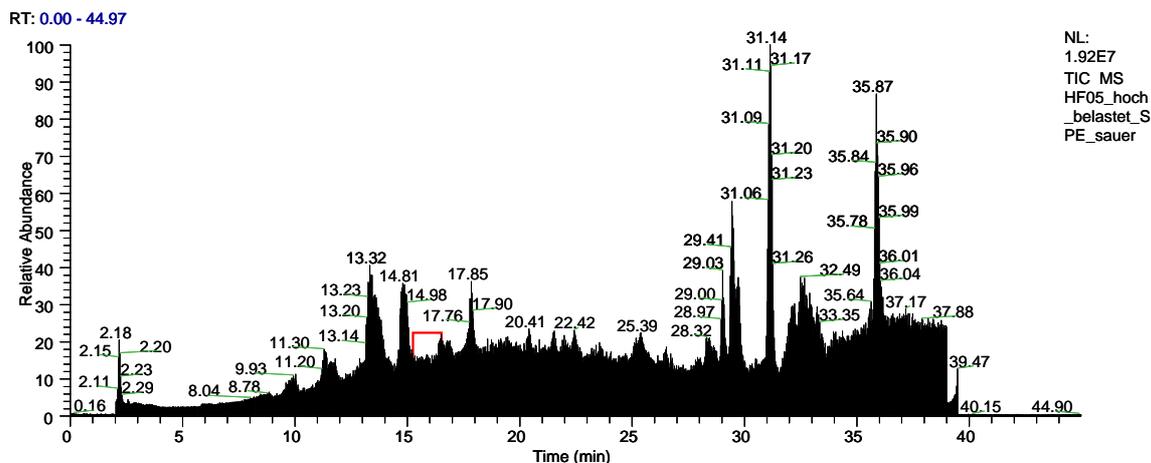


Abbildung 2.11: Totalionenstromchromatogramm der mittels Festphasenextraktion angereicherten Probe aus dem Hotspot 2.

Zu jedem Messpunkt existiert ein komplettes Massenspektrum, das aber eine Überlagerung der Ionen sämtlicher zu diesem Zeitpunkt von der LC eluierender Substanzen ist. Das Spektrum wird durch die Bildung von Addukten bzw. Fragmenten weiter verkompliziert:

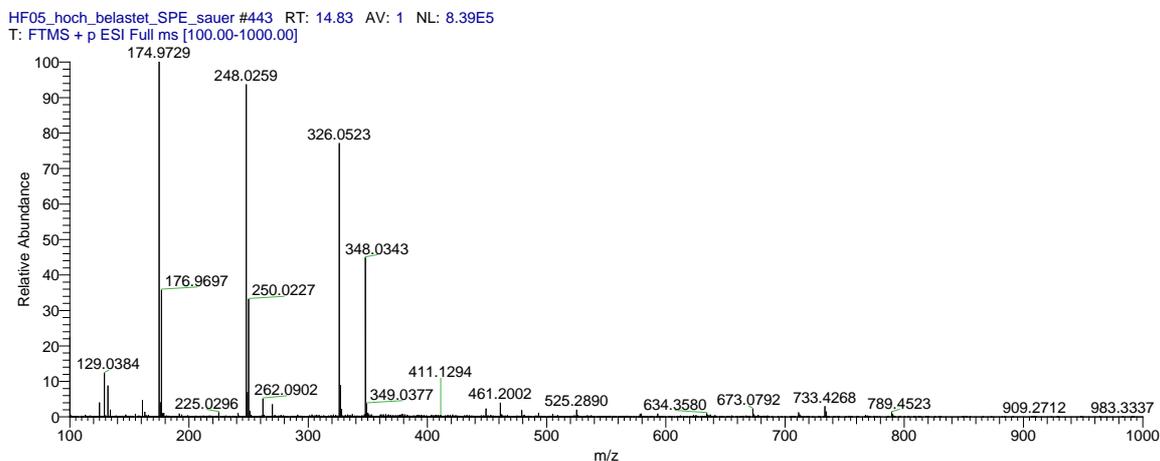


Abbildung 2.12: Aus dem Totalionenstrom von Abbildung 2.11 extrahiertes Massenspektrum bei 14,83 Minuten.

Folgende Ionen sind in dem Massenspektrum sichtbar: (1) Protonierte Spezies des Thiamethoxam-Metaboliten CGA 355190 (m/z 248,0259) bzw. eines in der Ionenquelle des Massenspektrums entstehendes Fragments der Verbindung (m/z 174,9729); (2) die zugehörigen ^{37}Cl -Isotopen bei m/z 250,0227 und 176,9697 (3) die protonierte Spezies von Flumetsulam bei m/z 326,0523 und das zugehörige Natrium-Addukt bei m/z 348,0343. Darüber hinaus sind weitere Ionen im Bereich von m/z über 400 sichtbar, die von unbekanntem, in der Probe ebenfalls vorkommenden Verbindungen stammen.

All diese Signale können zwar prinzipiell durch Retentionszeit-Matching bzw. durch Algorithmen, die auf typischen Massendifferenzen (z.B. zwischen den protonierten Spezies und den zugehörigen Natrium-Addukten) aufbauen, zu mehreren definierten chromatographischen Features zusammengefasst werden. In komplexen Realproben ist deren Anzahl jedoch erfahrungsgemäß im Bereich von einigen Tausenden bis Zehntausenden, was eine manuelle Auswertung unmöglich macht. Es ist auch nicht sinnvoll, einfach die intensivsten Signale manuell auszuwerten, da die Ionisierungseffizienzen der verschiedenen Substanzen über mehrere Größenordnungen schwanken können und die relevanten Informationen damit meist im Totalionenstrom nicht sichtbar sind – viele intensive Signale sind analytische Artefakte wie etwa Lösungsmittelverunreinigungen oder Komponenten aus den verwendeten Labormaterialien.

Zur weiteren Datenreduktion wurden aus der Fragestellung (Identifizierung potentieller Metaboliten der Primäranalyten) folgende Kriterien angewandt: (1) Die Masse eines potentiellen Metaboliten darf in den Kontrollproben gar nicht auftreten oder muß zumindest um einen Faktor 10 niedriger intensiv als in der hoch belasteten Probe sein. (2) Da die meisten der Primärschubstanzen mindestens ein Chloratom enthalten, muß ein Signal eines potentiellen Metaboliten mit einer exakten Massendifferenz von 1,9970 (entspricht der Differenz zwischen ^{35}Cl und ^{37}Cl) und einer relativen Intensität von 33% (entspricht der natürlichen Häufigkeitsverteilung) vorhanden sein. Da die beiden Verbindungen Flumetsulam und Florasulam kein Chloratom enthalten, wurden die Daten mit einem zweiten Algorithmus bearbeitet, der analog auf dem Verhältnis und der Massendifferenz der Schwefelisotopen $^{32}\text{S}/^{34}\text{S}$ beruht.

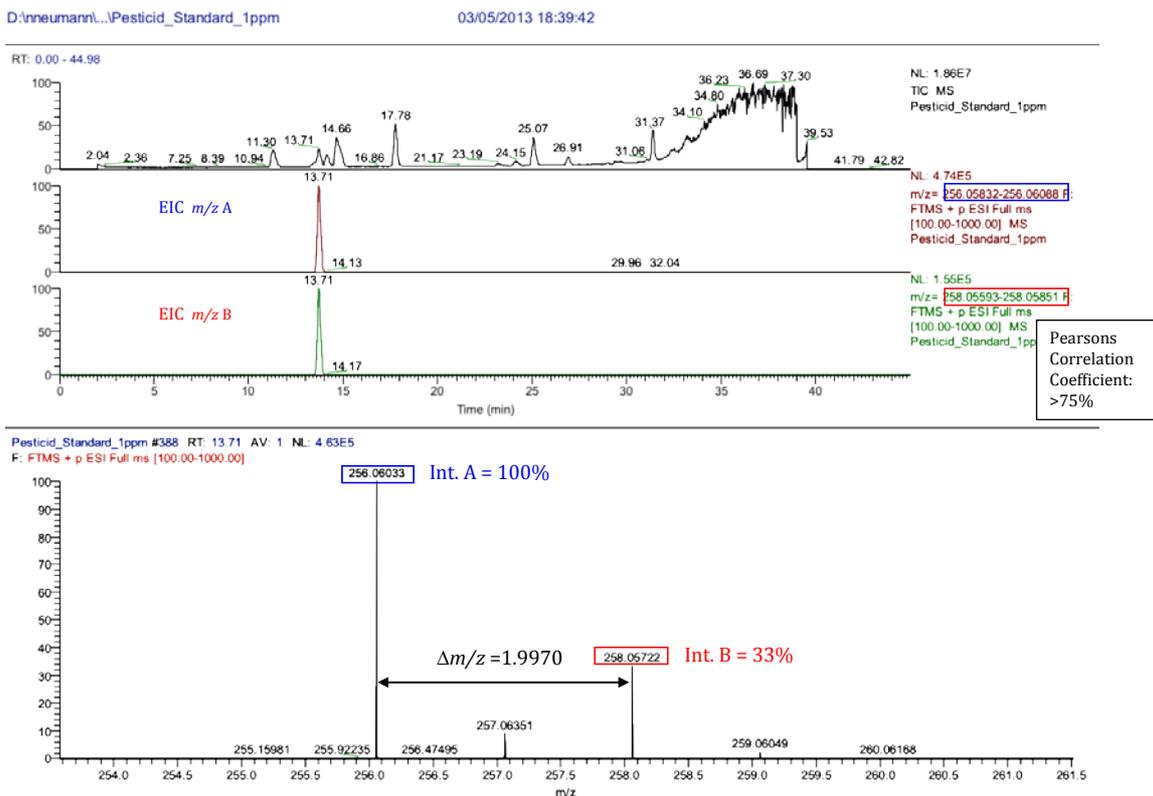


Abbildung 2.13: Darstellung des auf der $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$ Isotopenverteilung basierenden Algorithmus zur Datenreduktion.



Auf diese Weise konnte die Anzahl der in Frage kommenden Massen auf 24 (für 1 Cl-Atom im Molekül) bzw. 9 (für 2 Atome im Molekül) eingengt werden. Aus den gemessenen akkuraten Massen wurden mittels des „Formular Calculators“ mögliche Summenformeln generiert. Die aufgefundenen Summenformeln wurden bei ChemSpider (www.chemspider.com) auf mögliche Datenbankeinträge untersucht.

Gemessene exakte Masse (amu)

Berechnete Summenformeln mit Abweichung von der theoretischen Masse

Idx	Formula	RDB	Delta p
1	C ₈ H ₁₁ O ₃ N ₆ ClS	5.5	2.147
2	C ₈ H ₁₆ O ₄ N ₃ ClPS	0.5	-3.515
3	C ₈ H ₁₈ O ₂ NClS ₃	-0.5	3.752

Erlaubte Abweichung der gemessenen Masse von der theoretischen Masse

Erlaubte Elemente in der Summenformel

Isotope	Min	Max	DB eq.	Mass
14 N	0	10	0.5	14.003
16 O	0	15	0.0	15.995
12 C	0	30	1.0	12.000
1 H	0	60	-0.5	1.008
35 Cl	1	1	-0.5	34.969

Abbildung 2.14: Einstellungen bei der Generierung von Summenformeln aus den gemessenen exakten Massen (in der Abbildung nicht sichtbar: Schwefel, Phosphor und Natrium (letztere aufgrund von möglicher Adduktbildung in der Ionenquelle des Massenspektrometers) wurden ebenfalls zugelassen)

Tabelle 2.7: Verzeichnis der mit den Ausschlusskriterien für ein Chloratom im Molekül identifizierten Massen sowie den zugehörigen Kandidaten für Summenformeln

Identifizierte Massen mit einem Chloratom im Molekül		
m/z (amu)	Retentionszeit (min)	Vorgeschlagene Summenformel
131,9669	11,36	C ₄ H ₃ NCIS (Fragment von TMX)
146,0004	13,29	C ₅ H ₅ O ₂ NCl (Rt wie Clopyralid)
160,016	13,76	C ₆ H ₆ O ₂ NCl (Rt hinter Clopyralid); 92 Strukturvorschläge, darunter Monochlorclopyralid oder 2-Chloro-6-(hydroxymethyl)-3-pyridinol
160,9935	15,04	C ₅ H ₅ N ₂ CIS (RT wie CGA 355190)
163,9666	14,39	C ₄ H ₃ O ₂ NCIP kein Strukturvorschlag (möglicherweise in der Ionenquelle entstandenes Fragmentation)
164,9698	13,38	Keine Summenformel gefunden (möglicherweise in der Ionenquelle entstandenes Fragmentation)
174,0541	22,57	C ₅ H ₈ N ₅ Cl (?); 18 Strukturvorschläge, darunter Desisopropylatrazin
174,9728	14,95	C ₅ H ₃ ON ₂ CIS Fragment von CGA 355190
192,9648	13,62	C ₅ H ₅ N ₂ CIS ₂ 1 Strukturvorschlag 1-(4-Chloro-3-thienyl)thioharnstoff
205,9771	14,09	C ₆ H ₅ O ₃ NCIP kein Strukturvorschlag (möglicherweise in der Ionenquelle entstandenes Fragmentation)
216,1012	22,39	C ₈ H ₁₄ N ₅ Cl 18 Strukturvorschläge, darunter Atrazin
248,0258	14,95	CGA355190 (1.4 ppm Differenz von der theoretischen Masse)
251,0004	25,42	C ₆ H ₇ O ₃ N ₄ CIS; 4 Strukturvorschläge
252,1153	26,72	C ₁₄ H ₁₈ ONCl; 595 Strukturvorschläge
256,0286	20,47	C ₁₁ H ₁₁ O ₂ NCIP (keine Struktur gefunden) oder C ₈ H ₁₂ ON ₃ CIS (Na Addukt; 53 Strukturvorschläge)
286,9586	20,58	C ₇ H ₁₃ O ₄ N ₂ CIS, 3 Strukturvorschläge
292,0272	11,30	Thiamethoxam (2.1 ppm Differenz von der theoretischen Masse)
304,0097	23,75	mehrere Kandidaten für die Summenformel; 7 Strukturvorschläge
306,1235	26,78	C ₁₅ H ₂₂ ONCl (Na Addukt); 696 Strukturvorschläge
338,0156	18,69	mehrere Kandidaten für die Summenformel, 26 Strukturvorschläge
344,0025	23,54	mehrere Kandidaten für die Summenformel, 11 Strukturvorschläge
350,9874	25,39	mehrere Kandidaten für die Summenformel, kein Strukturvorschlag (möglicherweise in der Ionenquelle entstandenes Fragmentation)
351,9907	25,47	Isotopenpeak der Masse 350.9874
366,0024	28,82	mehrere Kandidaten für die Summenformel, 47 Strukturvorschläge

Die grün unterlegten Massen entsprechen den Primärverbindungen Thiamethoxam sowie dessen Metaboliten CGA 355190 (bzw. entsprechender in der Ionenquelle des Massenspektrometers entstehenden Fragmente), deren Auftreten in der Probe mit der quantitativen Targetmethode bestätigt wurde bzw. deren Retentionszeiten bei der LC-HRMS Methode mit Hilfe von Flüssigstandards überprüft wurde. Dies zeigt, dass der gewählte Ansatz zur Datenreduktion valid ist.



Die Massen, deren Retentionszeiten in rot angegeben sind, sind mit großer Wahrscheinlichkeit keine Metaboliten, da sie viel später als die Primärsubstanzen eluieren (Metaboliten sind üblicherweise polarer als die Muttersubstanz und eluieren in der reversed Phase HPLC folglich früher). Es verbleiben daher 5 Massen, für die mit einer Ausnahme eine sinnvolle Summenformel zugeordnet werden konnte. Die Summenformeln wurden in der ChemSpider Datenbank abgefragt und ergaben bis zu 696 Substanzvorschläge. Jene Massen, für die mehrere plausible Summenformeln generiert wurden, wurden direkt in der Datenbank abgefragt.

Tabelle 2.8: Verzeichnis der mit den Ausschlußkriterien für zwei Chloratome im Molekül identifizierten Massen sowie den zugehörigen Kandidaten für Summenformeln

Identifizierte Massen mit zwei Chloratomen im Molekül		
m/z (amu)	Retentionszeit (min)	Vorgeschlagene Summenformel
163,9666	13,41	C ₅ H ₃ ONCl ₂ (Clopyralid Fragment)
177,9821	13,37	C ₆ H ₅ ONCl ₂ (Clopyralid Fragment)
191,9615	13,32	Clopyralid 0.738 ppm Differenz zur theoretischen Masse
205,9771	13,32	C ₇ H ₆ O ₂ N ₂ Cl ₂ 101 eingetragene Strukturen, darunter Clopyralid-Methylester
222,9638	20,38	C ₉ H ₆ OCl ₂ 53 Strukturvorschläge
251,0003	25,56	C ₆ H ₁₃ O ₄ Cl ₂ P 3 Strukturvorschläge
272,9824	26,39	C ₁₀ H ₆ O ₃ N ₂ Cl ₂ 53 Strukturvorschläge
348,9903	25,67	C ₁₂ H ₁₁ O ₄ N ₂ Cl ₂ P Kein Strukturvorschlag (möglicherweise in der Ionenquelle entstandenes Fragmention)
384,0131	26,73	C ₁₄ H ₁₇ N ₃ Cl ₂ S ₂ Kein Strukturvorschlag (möglicherweise in der Ionenquelle entstandenes Fragmention)

Die aufgefundenen Massen mit zwei Chloratomen sind entweder massenspektrometrische Fragmente von Clopyralid oder stammen von Verbindungen, die viel später als die Primärsubstanzen eluieren (Tabelle 2.8). Die Masse 205,9771 entspricht dem Methyl-Analog (z.B. Methylester) von Clopyralid, das aber eigentlich signifikant später von der LC-Säule eluieren müsste als Clopyralid. Gegen das Vorhandensein eines in der Ionenquelle des Massenspektrometers entstehenden Addukts (z.B. Bildung des Methanol-Addukts und anschließender Wasserabspaltung) spricht die weiter unten beschriebene Anreicherung der zu dieser Masse gehörenden Verbindung während der Abbauprobe.

Bei der Anwendung des auf den Schwefelisotopen basierenden Algorithmus mussten die gemessenen Massen direkt in der ChemSpider Datenbank abgefragt werden, ohne mögliche Summenformeln als Zwischenschritt zu generieren. Der Grund dafür liegt darin, dass es durch die Aufnahme von bis zu 3 Fluoratomen als erlaubtes Element (Florasulam und Flumetsulam enthalten Fluor) zu viele Permutationsmöglichkeiten gibt, um plausible Summenformeln mit der gemessenen Masse zu generieren.

Tabelle 2.9: Verzeichnis der mit den Ausschlusskriterien für ein Schwefelatom im Molekül identifizierten Massen

Identifizierte Massen mit einem Schwefelatom im Molekül		
m/z (amu)	Retentionszeit (min)	Vorgeschlagene Summenformel
211,0651	11,36	Thiamethoxam Fragment
250,0226	15,07	38 Strukturvorschläge
326,0521	14,75	Flumetsulam
348,0373	14,75	Na Addukt Flumetsulam
352,9846	25,42	84 Strukturvorschläge
382,0194	17,73	Na-Addukt von Florasulam
386,0101	28,73	96 Strukturvorschläge
407,9920	28,79	110 Strukturvorschläge
673,0785	14,75	Na-Addukt des in der Ionenquelle entstehenden Flumetsulam-Dimers

Neben den Primärsubstanzen lieferte der Algorithmus einige Massen, die aufgrund der zugehörigen Retentionszeit mit ziemlicher Sicherheit nicht auf Metaboliten der Zielsubstanzen zurückgeführt werden können. Für all diese Massen liefert die Suche mit der ChemSpider Datenbank eine Vielzahl von möglichen Strukturen.

Anreicherung von Metaboliten während der Abbauprobe

Um eine mögliche Anreicherung von Metaboliten der Primärsubstanzen während der Abbauprobe weiter zu untersuchen, wurden beim Versuch „Abbau in Säulen“ Proben vom Versuchsbeginn und vom Versuchsende mit dem entwickelten Ansatz gemessen. Als Kriterium für eine Anreicherung wurde dabei eine Zunahme der Signalintensität um einen Faktor 2 angesetzt.

Tabelle 2.10: Verzeichnis der zu den am Versuchsende erhöhten Signalen zugehörigen Massen mit einem Chloratom

Am Versuchsende intensivere Massen mit einem Chloratom im Molekül		
m/z (amu)	Retentionszeit (min)	Vorgeschlagene Summenformel
160,9762	20,59	Keine plausible Summen- oder Strukturformel – Möglicherweise in der Ionenquelle entstehendes Fragment.; Anreicherung während des Abbauprobe: ca. Faktor 3
286,9580	20,59	3 Strukturvorschläge ; Anreicherung ca. Faktor 3
308,9400	20,54	Zur Masse 286.9580 zugehöriges Natrium Addukt
325,0496	15,91	41 eingetragene Strukturformeln; Masse in den am Versuchsbeginn gezogenen Proben nicht nachweisbar
341,089	19,87	239 eingetragene Strukturformeln; Masse in den am Versuchsbeginn gezogenen Proben nicht nachweisbar
350,987	25,70	129 eingetragene Strukturformeln, allerdings keine mit nur einem Chloratom; Anreicherung ca. Faktor 3
615,1389	37,35	2 eingetragene Strukturformeln; Masse in den am Versuchsbeginn gezogenen Proben nicht nachweisbar



Tabelle 2.11: Verzeichnis der zu den am Versuchsende erhöhten Signalen zugehörigen Massen mit zwei Chloratomen

Am Versuchsende intensivere Massen mit zwei Chloratomen im Molekül		
m/z (amu)	Retentionszeit (min)	Vorgeschlagene Summenformel
205,9768	14,93	<chem>C7H6O2N2Cl2</chem> 101 eingetragene Strukturen, darunter Clopyralid-Methylester; Anreicherung um einen Faktor 2
222,9686	20,59	<chem>C9H6OCl2</chem> 53 eingetragene Strukturen; Anreicherung um einen Faktor 3
284,9610	20,53	14 eingetragene Strukturen, allerdings keine mit 2 Chloratomen; möglicherweise in der Ionenquelle entstehendes Fragment Anreicherung um einen Faktor 2
304,0095	24,59	5 eingetragene Strukturen; Masse in den am Versuchsbeginn gezogenen Proben nicht nachweisbar
348,9898	25,59	48 eingetragene Strukturen, allerdings keine mit 2 Chloratomen; möglicherweise in der Ionenquelle entstehendes Fragment; Anreicherung um einen Faktor 2
405,9946	30,45	4 eingetragene Strukturen; Anreicherung um einen Faktor 3

Tabelle 2.12: Verzeichnis der zu den am Versuchsende erhöhten Signalen zugehörigen Massen mit einem Schwefelatom

Am Versuchsende intensivere Massen mit einem Schwefelatom im Molekül		
m/z (amu)	Retentionszeit (min)	Vorgeschlagene Summenformel
224,9658	20,59	<chem>C6H6Cl2N2OS</chem> 4 Strukturen, 2 davon auf dichlor-substituiertem Pyridin basierend; Masse in den am Versuchsbeginn gezogenen Proben nicht nachweisbar
360,0374	18,04	3 Strukturen; Masse in den am Versuchsbeginn gezogenen Proben nicht nachweisbar

Nach Datenfilterung durch den auf den Chlor- bzw. Schwefelisotopen basierenden Algorithmus verblieben nur einige wenige Signale, die in den Proben vom Versuchsende signifikant erhöht waren. Die Anreicherung betrug für die Mehrzahl der aufgefundenen Massen einen Faktor 2-3, nur 6 Signale konnten in den Proben vom Versuchsende, jedoch nicht in den Proben vom Versuchsbeginn nachgewiesen werden.

Die meisten der Massen, die zu den in den am Versuchsende gezogenen Proben erhöhten Signalen zugeordnet werden konnten, wiesen gegenüber den Primärsubstanzen eine erhöhte Retentionszeit auf. Wie bereits erwähnt, spricht dies gegen das Entstehen von Metaboliten, da diese meist polarer sind und daher früher von der LC-Säule eluieren müssten. Die Datenbanksuche der aufgefundenen Massen ergab größtenteils ebenfalls keine Hinweise auf das Vorhandensein von Metaboliten, da die verzeichneten Strukturen keine Ähnlichkeit zu den Ausgangssubstanzen aufwiesen. Die Ausnahme stellt die Masse 205,9739 dar, für die der Methylester von Clopyralid (3,6-Dichlornicotinsäuremethylester) einen möglichen Kandidaten für die Strukturformel darstellt. Es sei an dieser Stelle aber noch einmal festgehalten, dass die entsprechende Masse bereits im angereicherten Grundwasser aus dem Hotspot 2 nachgewiesen wurde.

Hinsichtlich einer Anreicherung von Metaboliten der Primärsubstanzen während der Abbauprobe kann also folgendermaßen zusammengefasst werden: (1) Der Abbau von Thiamethoxam verbunden mit dem Anstieg des Metaboliten CGA 355190 konnte durch das Vorhandensein eines Standards quantitativ beschrieben werden; diese Abbaureaktion scheint auch bereits im Grundwasser stattzufinden. (2) Für Florasulam bzw. Clopyralid weisen gerichtete MS/MS scans bzw. ungerichtete HR-MS scans auf das

Vorhandensein bzw. des Entstehen folgender Metaboliten hin: Demethylflorasulam, Diflourphenyltriazol-sulfonsäureamid, 3,6-Dichlorpyridinol und 3,6-Dichlornicotinsäuremethylester. Da die entsprechenden Peaks nur in den um einen Faktor 500 aufkonzentrierten Proben nachgewiesen werden konnten, sind die entsprechenden Konzentrationen vermutlich signifikant niedriger, aber mit einiger Sicherheit nicht höher als die der Primärsubstanzen. Dies konnte mangels Verfügbarkeit entsprechender Standards nicht verifiziert werden.

Eine Bewertung der Vielzahl der anderen mit dem „General Unknown Screening“ generierten Massen bzw. dazugehörigen Substanzen gestaltet sich aufgrund der enormen Anzahl der Kandidaten für die Summen- bzw. Strukturformeln schwierig. Diese Anzahl an sich kann nicht als Anzeichen für ein etwaiges Gefährdungspotential, das von den Proben ausgeht, angesehen werden, da im Grundwasser auch eine Vielzahl an Substanzen, die auf natürlichem Wege entstehen, gelöst sein können. Ein Beispiel sind Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, die in Drainagen von Getreidefeldern und in den umgebenden Flüssen nachgewiesen wurden (Schenzel et al., 2012). Die Anwesenheit von chlorierten (halogenierten) organischen Verbindungen bedeutet ebenfalls nicht notwendigerweise, dass es sich um synthetische Verbindungen oder deren Reaktionsprodukte handelt. In der Fachliteratur wurden bisher einige tausend natürlich vorkommende halogenierte organische Verbindungen beschrieben (Gribble, 2003), welche zum größeren Teil von Meereslebewesen, aber auch von Landpflanzen, Bakterien, Pilzen, Flechten, Insekten und sogar Wirbeltieren gebildet werden. Im Hinblick auf schwefel- und vor allem chlorhaltige Verbindungen in den untersuchten Grundwasserproben bleibt jedenfalls festzuhalten daß die intensivsten Signale, die durch die angewandten Algorithmen aus den Rohdaten gefiltert wurden, stets von den Primärverbindungen bzw. im Fall von Thiamethoxam vom Metaboliten CGA 355190 stammten. Es ist daher eher nicht davon auszugehen, dass in den Proben eine entsprechende schwefel- oder chlorhaltige anthropogene Kontamination existiert, deren Konzentration wesentlich über den mit der quantitativen Target-Methode erfassten Primärsubstanzen liegt.

Zusammenfassung

Die Erstellung der quantitativen Methode für die Primärsubstanzen bzw. für einige weitere Pestizide und Metaboliten, für die Referenzstandards erhältlich sind, konnte erfolgreich abgeschlossen werden. Für einige Analyten (z.B. Dicamba) war allerdings eine vorherige Anreicherung mittels Festphasenextraktion notwendig, um Konzentrationen, die um den Grenzwert von 0,1 µg/L liegen, erfassen zu können. Die entwickelte Methode wurde zur Messung von knapp 1600 Proben, die im Rahmen dieses Projektes entnommen wurden, eingesetzt.

Die Suche nach auf Grund von Literaturdaten vorhergesagten Metaboliten ergab drei Treffer (Demethylflorasulam, 3,6-Dichlor-2-pyridinol und N-2,6-diflourphenyl-1,2,4 triazolsulfonamid). Für die Auffindung von unbekanntem Metaboliten wurde ein Workflow erarbeitet, der die Datenreduktion mittels gezielter Suche nach der Massendifferenz $^{35}\text{Chlor}/^{37}\text{Chlor}$ bzw. $^{32}\text{Schwefel}/^{34}\text{Schwefel}$ beinhaltet. Dadurch konnten in einigen Fällen den entsprechenden LC-Peaks eine Summenformel zugeordnet werden. Selbst in diesen Fällen ergab eine Datenbankabfrage eine Vielzahl (bis zu ca. 700) an möglichen Kandidaten für die Strukturformel. Unter diesen Vorschlägen war jedoch bis auf das Methylanalog von Clopyralid keine Struktur, deren Entstehen / Vorkommen plausibel durch eine typische Metabolisierungsreaktion der Primärsubstanzen erklärt werden könnte.



Literaturverzeichnis

Frear, D.S., Swanson, H.R., Tanaka, F.S. (1993): Metabolism of Flumetsulam (DE-498) in Wheat, Corn, and Barley. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 45, 178-192.

Gribble, G.W. (2003): The diversity of naturally produced organohalogens, *Chemosphere* 52, 289-297.

Jackson, R., Dipankar Ghosh and Glen Paterson (2000): The soil degradation of the herbicide Florasulam. *Pest Management Science* 56, 1065-1072.

Krieger, M.S., Robin N. Yoder, Richard Gibson (2000): Photolytic Degradation of Florasulam on Soil and in Water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 3710-3717.

Schenzel, J., Forrer, H.-R., Vogelgsang, S., Hungerbühler, K., Bucheli, T.D. (2012): Mycotoxins in the environment: I. Production and emission from an agricultural test field. *Environmental Science and Technology* 48, 13067-13075.

Sojic, D.F., Vesna B. Anderluh, Dejan Z. Orcic, Biljana F. Abramovic (2009): Photodegradation of clopyralid in TiO₂ suspensions: Identification of intermediates and reaction pathways. *Journal of Hazardous Materials* 168, 94-101.

Arbeitspaket 3

Ökotoxikologische und mikrobiologische Untersuchungen

Zielsetzung im Arbeitspaket

Der Einsatz der Biotests zielt auf die wirkungsbezogene Analytik von Umweltverunreinigungen in ihrer Gesamtheit ab. Eine analytische Kontrolle der Einhaltung bzw. Überschreitung von Grenzwerten ist grundsätzlich niemals das Ziel einer ökotoxikologischen Untersuchung. Im Arbeitspaket sollten Hemmungen und toxische Wirkungen der das Grundwasser kontaminierenden Pestizide erfasst werden, dies inkludiert auch kombinierte Wirkungen, die sich aus dem gemeinsamen Auftreten mehrerer Pestizide sowie aus Wechselwirkungen mit den nativen Inhaltsstoffen des Grundwassers ergeben können. Hinzu kommen auch Effekte der aus theoretischen Modellen eher nicht mehr einschätzbaren Wirkungen der allenfalls im Untergrund im Zuge der natürlich ablaufenden mikrobiellen Umsetzungsvorgänge entstandenen Zwischen- und Endprodukte.

Die Testbatterie umfasste Organismen aus verschiedenen trophischen Ebenen, die für die bekannten Pestizide potentielle Target- bzw. Modellorganismen darstellen: Leuchtbakterien EN ISO 11348-3 (*Vibrio fischeri*), Grünalgen OECD 201 (*Raphidocelis subcapitata*), Wasserfloh OECD 202 (*Daphnia magna*), Wasserlinse OECD 221 (*Lemna minor*).

Es erschien zweckdienlich, die am Abbau beteiligten Mikroorganismen mit molekularbiologischen Methoden zu erfassen. Selektive Anreicherungen oder Unterdrückungen von Mikroorganismengruppen werden aus dem Vergleich kontaminierter mit nicht kontaminierten Wasserproben, bzw. im zeitlichen Ablauf eines Abbauprozesses erkannt und können zur Optimierung des Abbauprozesses dienen. Chlorierte, heterozyklische organische Verbindungen, wie die am Schadensort vorgefundenen Kontaminanten, unterliegen komplexen biologischen Abbauprozessen. Sie setzen der biologischen Metabolisierung Widerstand entgegen und sind für Mikroorganismen aufgrund der Aussicht auf geringen Energiegewinn wenig attraktiv. Der Abbau solcher Verbindungen erfolgt daher meist durch Spezialisten, die auf diese Weise eine trophische Nische besetzen, oder aber durch Induktion des Fremdstoffmetabolismus in jenen Organismen, die eine selektive Hemmung erfahren. Ausgeführt wurden demzufolge ein Monitoring der prokaryotischen Gesamtkeimzahlen (KBE), sowie ein molekularbiologisches Screening durch DGGE und eine genauere Analyse des Metagenoms mittels Pyrosequenzierung.

Übersicht durchgeführter Arbeiten

Es wurden Biotests mit insgesamt vier Testorganismen (*Vibrio fischeri*, *Raphidocelis subcapitata*, *Daphnia magna* STRAUSS und *Lemna minor*) aus Grundwasserproben zu drei Probenahmezeitpunkten, Proben aus zwei verschiedenen Abbauprozessen zu je zwei Probenahmezeitpunkten durchgeführt. Zusätzlich wurden vollständige Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von insgesamt acht Pestiziden (darunter ein Metabolit) aufgenommen. Der ursprünglich im Projektantrag vorgeschlagene Biotest mit Nematoden entfiel, da keine festen Proben (Bodenproben) zu untersuchen waren.

Nach konventioneller Methode durchgeführte Bakterien-Keimzahlbestimmungen erfolgten aus allen Grundwasserproben, aus allen Proben der Abbauprozesse sowie aus den Endproben der Anreicherungsversuche. Keimzahlen von Pilzen und Algen waren nicht zu bestimmen, da weder Oberflächenwasser noch Bodenproben Ziel der Untersuchungen waren.

Molekularbiologische Untersuchungen, hier vor allem Metagenomanalysen mittels DGGE (denaturierender Gradienten-Gelelektrophorese) erfolgten aus allen Grundwasserproben, aus den Proben der Bohrkerne und zweier Schlämme aus Abwassergruben sowie aus den Abbauversuchen mit Grundwasserproben in Bioreaktoren. Zusätzlich wurden Sequenzierungen von isolierbaren Keimen aus der Keimzahlbestimmung der Grundwasserproben durchgeführt. Ein Durchgang mit insgesamt acht Grundwasserproben wurde für die Pyrosequenzierung (detaillierte Metagenomanalyse) in Subauftrag vergeben.

Methodik

Biotest mit Leuchtbakterien

Zur Testdurchführung wurde *Vibrio fischeri* im handelsüblichen Fertigtest LumisTox (Dr. Lange, Nr.: LCK 486) verwendet, welcher der Standardmethode EN ISO 11348-3 entspricht.

Alle Wasserproben wurden ohne weitere Vorbehandlung eingesetzt, sie waren ohne Trübung und farblos, und die pH-Werte lagen generell im Bereich 6-8. Trübe Proben aus Abbau- und Anreicherungskulturen wurden für 20 Minuten bei ca. 4000 g zentrifugiert und der klare Überstand verwendet. Alle Proben wurden durch Zugabe von 2% (m/v) festem NaCl aufgesalzen. Gleichermaßen als Blindwert und als Verdünnungslösung wurde 2% (m/v) NaCl-Lösung verwendet. Eine Verdünnungsreihe wurde vorab hergestellt und alle Lösungen im Thermoblock auf 15°C temperiert. Je 500 µL Bakteriensuspension (*Vibrio fischeri*) wurden in den dafür vorgesehenen Küvetten vorgelegt, ca. 15 min lang temperiert und die Leuchtintensität (I_0) gemessen. Anschließend wurden die Probenlösungen hinzu pipettiert, für 30 min bei 15°C inkubiert und erneut die Leuchtintensität (I_{30}) gemessen. Das Luminometer gab für alle Messwerte relative Leuchtintensitäten als dimensionslose Zahlen aus. Alle Ansätze erfolgten in Doppelbestimmung.

Nach Berechnung eines Korrekturfaktors, der die Änderung der Leuchtintensität des Blindwertes berücksichtigt, konnten die relativen Änderungen der Leuchtintensitäten der Proben berechnet werden. In Bezug auf ihren jeweiligen Anfangswert konnten diese Änderungen direkt als Hemmungen in Prozent angegeben werden.

$$I_{TH30} = I_0 \cdot I_{BW30} / I_{BW0}$$

I_{TH30} Theoretische Leuchtintensität im Probenansatz nach 30 min Kontaktzeit, korrigiert durch die Änderung der Leuchtintensität des Blindwertes, der gesichert die Testorganismen nicht hemmt und somit der Bezugswert (100%) für die Berechnung der Hemmung der Probenansätze ist

I_0 Leuchtintensität des Probenansatzes zu Testbeginn

I_{BW0} Leuchtintensität des Blindwerts zu Testbeginn

I_{BW30} Leuchtintensität des Blindwerts nach 30 min

Das Verhältnis I_{BW30} / I_{BW0} spiegelt den physiologischen Zustand der Testorganismen wieder und sollte zwischen 0,6 und 1,3 liegen.

$$\% \text{ Hemmung} = (I_{TH30} - I_{30}) \cdot 100 / I_{TH30}$$

I_{30} Gemessene Leuchtintensität des Probenansatzes nach 30 min

Die Messwerte der unverdünnten Proben (methodisch bedingt zumindest 1:2 verdünnt) wurden separat erfasst und als Screeningergebnisse direkt in Prozent Hemmung ausgewiesen. Aus den Messwerten der Verdünnungsreihen wurden Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen graphisch dargestellt und durch iterative Regressionsanalyse mittels der Software SigmaPlot 11 (Systat Software Inc.) der Funktion nach Weibull angepasst. Siehe dazu das Kapitel Endpunkte.

Biotest mit Grünalgen

Die Durchführung erfolgte als akuter Wachstumshemmtest in Anlehnung an die OECD 201 mit der Algenspezies *Raphidocelis subcapitata* (Süßwasseralge), Stamm ATCC 22662. Die Abweichung von der OECD Vorschrift betraf den Maßstab der Versuche, so wurde hier in 24-Well-Titerplatten mit einem Gesamtvolumen von 2 mL gearbeitet.

Drei Tage vor dem geplanten Testbeginn wurde ein Inokulum durch steriles Überimpfen aus der Stammhaltung in 50 mL Algenmedium (ATCC Nr. 625) hergestellt und bei 22°C am beleuchteten Schüttler inkubiert (ca. 6000 Lux). Nach 72 Stunden waren die Algen in der exponentiellen Wachstumsphase und zeigten die geforderte, zumindest 30 fache Zellvermehrungsrate im Biotest. Der Testansatz wurde auf genau $2 \cdot 10^4$ Zellen/mL eingestellt.

Trübe Wasserproben (Abbauversuche, Anreicherungskulturen) wurden 20 Minuten bei ca. 4000 g zentrifugiert, klare Wasserproben wurden ohne weitere Behandlung im Biotest verwendet. Verdünnungen wurden mit dest. Wasser hergestellt. Parallel zu den Proben wurden Ansätze als Blindwert (Wasser anstelle der Probe) und Referenzansätze mit Kaliumdichromat (0,2 mg/L und 0,75 mg/L $K_2Cr_2O_7$) mit jeder Versuchsserie in zumindest Dreifachbestimmung je Titerplatte mitgeführt. Zu jedem Näpfchen des Testansatzes (2 mL) wurden 50 µL Mediumkonzentrat zupipettiert, um die erwünschte Endkonzentration der mineralischen Nährstoffe zu erhalten.

Es wurde 72 Stunden bei 22°C und im Tag-Nacht-Zyklus von 16/8 Stunden inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Absorptionsmessung bei 485 nm (Plattenreader Tecan mit Monochromator) zu den Zeiten 0, 24, 48 und 72 Stunden.

$$A_1 = (M_1 - M_0) \cdot t_1 / 2$$

$$A_2 = (M_1 + M_2 - (2 \cdot M_0)) \cdot (t_2 - t_1) / 2$$

$$A_3 = (M_2 + M_3 - (2 \cdot M_0)) \cdot (t_3 - t_2) / 2$$

$$A = A_1 + A_2 + A_3$$

M_n Ergebnis der Zellzahlbestimmung bzw. Messwert einer indirekten Auswertemethode (z.B. Extinktion) nach n Stunden Testdauer

t_n Auswertezeit: n Stunden nach Versuchsbeginn

A Fläche unter der Wachstumskurve, relative Zahl, die Größenordnung der Werte ist von der Auswertemethode (Zellzahl lt. Thoma-Kammer bzw. photometrische Extinktion) und der Einheit der Zeitangabe (Stunden oder Tage) abhängig, innerhalb eines Tests sind immer das gleiche Auswerteverfahren und gleiche Zeiteinheiten anzuwenden

$$\% \text{ Hemmung} = (A_{BW} - A_{Pr}) \cdot 100 / A_{BW}$$

A_{BW} Fläche unter der Wachstumskurve im Blindwert

A_{Pr} Fläche unter der Wachstumskurve in der Probe

Die Messwerte der unverdünnten Proben wurden separat erfasst und als Screeningergebnisse direkt in Prozent Hemmung ausgewiesen. Aus den Messwerten der Verdünnungsreihen wurden Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen graphisch dargestellt und durch iterative Regressionsanalyse mittels der Software SigmaPlot 11 (Systat Software Inc.) der Funktion nach Weibull angepasst. Siehe dazu das Kapitel Endpunkte.

Biotest mit Daphnien

Der Daphnientest wurde als akuter Ökotoxizitätstest in Anlehnung an die Richtlinien OECD 202 und die DIN 38412 L30 unter Verwendung von *Daphnia magna* STRAUSS durchgeführt.

Trübe Wasserproben (Abbauversuche, Anreicherungskulturen) wurden 20 Minuten bei ca. 4000 g zentrifugiert, klare Wasserproben wurden ohne weitere Behandlung im Biotest verwendet. Verdünnungen wurden mit synthetischem Verdünnungswasser (einer Mischung aus gleichen Teilen Leitungswasser des IFA-Tulln und entionisiertem Wasser) hergestellt. Als Blindwerte wurde dieselbe Wassermischung verwendet. Allfällige Reste der Trinkwasserentkeimungsmittel wurden mittels Aktivkohlefilter aus dem IFA-Tulln Leitungswasser entfernt.

In Makro-Titerplatten (6 wells) wurden 9 mL der jeweiligen Probe bzw. Verdünnung vorgelegt und 3 Daphnien (im Alter zwischen 4 und 24 Stunden) pro Well eingesetzt. Die Selektion der Jungtiere erfolgte durch behutsames Sieben durch ein Kunststoffsieb (Artemiasieb, Maschenweite 1,5 mm), wobei ausschließlich erwachsene Tiere sorgfältig in ein Zuchtbecken mit vorbereitetem Aquarienwasser und Futteralgen (Mischung aus *P. subcapitata* und *Chlorella sp.*) eingesetzt wurden. Nach 20 Stunden wurden diese erneut gesiebt (1,5 mm und zusätzlich 0,5 mm), wodurch alle Tiere in der Größe zwischen 0,5 und 1,5 mm (Jungtiere im Alter zwischen 0 und 20 Stunden) abgetrennt wurden. Nach weiteren 4 Stunden ohne Fütterung wurden die Tiere einzeln in die Testansätze transferiert. Die Zugabe der Jungtiere erfolgte mittels präparierter Pasteurpipette, wobei je Tier nicht mehr als ein Tropfen Wasser in die Ansätze gelangte. Die gewählten Testbedingungen waren: Testdauer 48 Stunden, Temperatur 22°C im 16/8 Stunden Tag/Nacht-Zyklus mit diffuser Beleuchtung. Während der Testdauer wurden die Daphnien nicht gefüttert. Alle Ansätze wurden in Sechsfachbestimmung, dementsprechend mit insgesamt 18 Daphnien je Verdünnungsstufe, durchgeführt.

Sowohl nach 24 Stunden (Endwert nach DIN, Kontrollwert nach OECD) als auch zu Testende (nach 48 Stunden lt. OECD) wurden die Gesamtzahl und die Zahl der beweglichen Daphnien gezählt. Die Hemmung in Prozent unbeweglicher Individuen relativ zur Zahl der überlebenden Daphnien der Blindwertansätze ergibt sich aus:

$$\% \text{ Hemmung} = (N_{\text{BW}} - N_{\text{P}}) \cdot 100 / N_{\text{BW}}$$

N_{BW} Anzahl schwimmfähige Daphnien im Blindwertansatz

N_{P} Anzahl schwimmfähige Daphnien in den Probenansätzen

Die Messwerte der unverdünnten Proben wurden separat erfasst und als Screeningergebnisse direkt in Prozent Hemmung ausgewiesen. Aus den Messwerten der Verdünnungsreihen wurden Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen graphisch dargestellt und durch iterative Regressionsanalyse mittels der Software SigmaPlot 11 (Systat Software Inc.) der Funktion nach Weibull angepasst. Siehe dazu das Kapitel Endpunkte.

Biotest mit Wasserlinsen

Die Durchführung erfolgte entsprechend der OECD Richtlinie 221 unter Verwendung von *Lemna minor*. Die Dauerkultur der Pflanzen erfolgte unter Testbedingungen bei 22°C und 50% relativer Luftfeuchte und bei einem Beleuchtungszyklus von 16 Stunden Tag zu 8 Stunden Nacht bei ca. 6000 Lux.

Sowohl trübe (Abbauversuche, Anreicherungskulturen) als auch klare Wasserproben wurden ohne weitere Behandlung im Biotest verwendet. Als Medium für Verdünnungen und als Blindwert diente modifiziertes Steinbergmedium (nach ISO/DIS 20079).

Die Durchführung erfolgte in 150 mL Bechergläsern, das Probenvolumen betrug jeweils 100 mL. Jeweils 12 Fronds (3 Fronds je Kolonie) wurden von der Stammhaltung in die Probegefäße überführt. Parallel dazu erfolgte eine Frischgewichtsbestimmung zu Teststart, indem jeweils 12 Fronds in vierfacher Wiederholung auf 0,1 mg ausgewogen wurden.

Kultivierung und Tests erfolgten in der Klimakammer bei 22°C, ca. 4500 Lux Beleuchtung mit einem Tag/Nacht Zyklus von 16/8 Stunden. Alle Gefäße wurden zum Schutz vor übermäßiger Verdunstung mit perforierter Frischhaltefolie bedeckt. Um äußere Einflüsse (ungleichmäßig verteilte Lichtverhältnisse usw.) zu vermeiden, wurden die Positionen der Testgefäße an jedem Kontrolltag (Tag 3 und 5) zufällig gewechselt. Die Auswertung erfolgte am Tag 7 durch Zählen der je Ansatz erhaltenen Fronds, anschließend durch Entnahme und Wägung der Pflanzen (samt Wurzeln). Die Berechnung der Hemmungen erfolgte über Vergleich der Wachstumsraten zwischen Proben und Blindwert.

$$\% \text{Hemmung} = (\ln \text{BM}_{\text{BWEnd}} - \ln \text{BM}_{\text{Pr.End}}) * 100 / (\ln \text{BM}_{\text{BWEnd}} - \ln \text{BM}_{\text{BWStart}})$$

BM_{BWStart} Biomasse der zu Beginn eingesetzten Fronds
 BM_{BWEnd} Mittelwert Biomasse in Blindwerten nach 7 Tagen
 BM_{Pr.End} Mittelwert Biomasse in Probenansätzen nach 7 Tagen

Die Messwerte der unverdünnten Proben wurden separat erfasst und als Screeningergebnisse direkt in Prozent Hemmung ausgewiesen. Aus den Messwerten der Verdünnungsreihen wurden Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen graphisch dargestellt und durch iterative Regressionsanalyse mittels der Software SigmaPlot 11 (Systat Software Inc.) der Funktion nach Weibull angepasst. Siehe dazu das Kapitel Endpunkte.



Abbildung 3.1: Organismen und Biotestanordnungen für Grünalgen (links, Vitalkultur der Stammhaltung), Daphnien (Mitte, Testansatz in 6-Well-Titerplatte) und Wasserlinsen (rechts, Testansatz im Becherglas).

Berechnung der Endpunkte

Die Messwerte der unverdünnten (im Falle des Leuchtbakterientests der 1:2 verdünnten) Proben wurden als Screeningwerte direkt in Prozent Hemmung angegeben. Im Fall der Tests der Reinsubstanzen entsprach dieses Hemmergebnis der Konzentration 1000 µg/L.

Während Screeningergebnisse einfach und rasch erhalten werden, sind EC₅₀-Werte über Dosis-Wirkungs-Beziehungen zu berechnen. Hierfür wurden mehrere Verdünnungen im Verhältnis 1:2 (falls notwendig 1:1,5) angesetzt, so dass zumindest fünf Messwerte im Bereich zwischen 10 und 90% Hemmung lagen. In einigen Fällen, vor allem beim Daphnientest war auch das nicht immer möglich. Aus regelkonformen Datenreihen konnten Kurvenanpassungen berechnet, graphische Darstellungen der Dosis-Wirkungs-Beziehungen erstellt und letztlich EC₅₀-Werte abgeleitet werden. Nachfolgend sind die entsprechenden mathematischen Gleichungen zur Kurvenanpassung nach Weibull und zur Berechnung eines EC₅₀-Wertes angegeben (Christensen & Nyholm, 1984).

$$\text{Eff} [\%] = 100 * (a + (1-a) * (1-\exp(-\text{Konz} / b))^c)$$

$$\text{EC}_{50} = b * \ln 2^{1/c}$$

Eff Effekt, z.B. Hemmung in Prozent

a, b, c Variable der sigmoiden Dosis-Wirkungs-Beziehung, aus der Kurvenanpassung nach Weibull

Konz Konzentration der Probe, bei Verdünnungen ausgedrückt als Bruchzahl (unverdünnt = 1; 1:2 = 0,5; 1:10 = 0,1 usw.)

EC₅₀ Konzentration der Probe, die genau 50% Hemmung verursacht

Wiederholt wurden, vor allem beim Daphnientest, mit unverdünnten Proben hohe Hemmungen gemessen, während die nächste Verdünnungsstufe keine oder nur niedrige Messwerte zeigte. Somit wurden oft nur zwei oder sogar noch weniger Datenpunkte mit Hemmungen zwischen 10 und 90% erhalten. In diesen Fällen konnte die Formel zur EC₅₀-Berechnung nicht angewandt werden. Näherungsweise wurde der EC₅₀-Wert dann graphisch abgelesen, indem in der halblogarithmischen Darstellung eine gerade Linie zwischen den beiden zur 50% Hemmung nächsten Datenpunkten gezogen und deren Schnittpunkt mit 50% Hemmung abgelesen wurde.

Die EC₅₀-Werte für die Pestizide sind direkt in µg/L angegeben.

Die Konzentrationsangaben bei berechneten EC₅₀-Werten können bei Wasserproben beliebige Zahlenwerte kleiner oder gleich 1 annehmen. Eins bedeutet dabei die unverdünnte Probe, je kleiner der Zahlenwert des EC₅₀, desto stärker ist die ökotoxische Wirkung auf den jeweiligen Organismus. Die Angabe >1 ist nicht das Ergebnis einer Berechnung, sie drückt vielmehr aus, dass die unverdünnte Probe weniger als 50% Hemmung aufwies und damit die Ermittlung eines exakten Wertes weder möglich noch sinnvoll war.

Die iterative Regressionsanalyse lieferte Standardabweichungen für alle drei Koeffizienten der Weibull-Funktion. Entsprechend des Fehlerfortpflanzungsgesetzes wurde daraus die Standardabweichung für den EC₅₀-Wert berechnet. Diese Werte sind in der Ergebnistabelle für die Reinsubstanzen angegeben.

Allgemeine Keimzahlbestimmung

Zur Bestimmung der lebenden, vermehrungsfähigen Keime wurden Wasserproben oder deren Verdünnungen in steriler physiologischer Kochsalzlösung auf der Oberfläche von Plate Count Agar (Merck, Nr. 1054630500) ausplattiert. Parallelansätze wurden entsprechend der Österr. Trinkwasserverordnung (BGBl. II Nr. 304/2001) bei 22°C und bei 37°C für 72 bzw. 48 Stunden bebrütet. Alle Bestimmungen erfolgten in dreifacher Wiederholung. Die Angabe der Ergebnisse erfolgte als KBE/mL (koloniebildende Einheiten). Wuchsen keine Kolonien an, wurde als Ergebnis der Wert <10/mL angegeben.

Probenaufbereitung für die Molekularbiologie

200 mL der klaren Wasserproben wurden durch einen Sterilfilter mit 0,22 µm Porengröße filtriert und der Filtrerrückstand, der die Mikroorganismenzellen enthielt, in der Kugelmühle mechanisch und enzymatisch aufgeschlossen. Die freigesetzte DNA wurde manuell mittels der Phenol-Chloroform-SDS-Methode nach Van Elsas & Smalla (1995) isoliert und aufgereinigt.

Die DNA aus Proben mit Feststoffanteil und aus der Schlammprobe wurde mit Hilfe des handelsüblichen DNA-Extraktionskits für Bodenproben (PowerSoil MO BIO Laboratories, Inc.) entsprechend beigelegtem Protokoll extrahiert.

DNA aus den vereinzelt Kolonien auf Plate Count Agar wurde ohne Zellaufschluss direkt in der PCR amplifiziert (colony-PCR).

DNA Amplifikation mittels PCR

Alle PCR-Ansätze erfolgten nach gleichem Schema: 1x PCR Buffer, 1.5mM MgCl₂ (beide Fermentas #EP0071), je 0.2mM dNTPs (Fermentas #R0241), 0.25 µM Primer und 0.02 units/µL Taq DNA Polymerase (Fermentas #EP0071).

Das Amplifikationsprotokoll der PCR enthielt die folgenden Schritte und Bedingungen: Start mit Denaturierung für 4 min bei 95°C, gefolgt von 14 Zyklen zu je 30 s bei 95°C und 30 s bei 58°C mit Temperaturreduktion um 0,5°C pro Zyklus und dann 72°C für 45 s, daraufhin weitere 21 Zyklen mit 95°C für 30 s, 55°C für 30 s, 72°C für 45 s und einem Abschluss für 10 min bei 72°C, entsprechend Muyzer et. al. (2001).

Zur Erfolgskontrolle wurden je 5 µL der Amplifikate mittels Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Färbung mit Sybr Safe (Invitrogen S33102) und UV Beleuchtung getrennt, visualisiert und fotodokumentiert. Für die Sequenzierung, für die DGGE und für die Pyrosequenzierung wurde einheitlich das Primerpaar 27f und 534r (variable Regionen V1-V3 der 16S-rDNA) verwendet. Wo die Trennung nicht mit der erhofften Signifikanz erfolgte, kam in einigen Fällen auch das Primerpaar 341f und 907r (V3-V5) für die DGGE zum Einsatz. Für die DGGE wurden in allen Fällen fluoreszenzmarkierte Primer (FAM und HEX) verwendet. (Muyzer et.al., 1993, Diez et.al., 2001).

Sequenzierung und Identifikation

Die PCR Produkte der Kolonien vom Plate Count Agar wurden als Fremdvergabe von AGOWA GmbH sequenziert. Erhalten wurden Textdateien mit den Sequenzen, deren Identifikation über das Internetportal NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) erfolgte. Es wurden nur Übereinstimmungsraten größer oder gleich 99,9% herangezogen.

Metagenomanalyse mittels DGGE

Die Denaturierende Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) der PCR-Amplifikate wurde mit einem DDGE-System (Bio-Rad Laboratories, Hercules) durchgeführt. Es wurden einheitlich 6%ige Acrylamidgele mit einem Gradienten von 35% bis 60% TEMED Quervernetzung verwendet. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Temperatur von 60 °C bei 100 V für 9-10 h durchgeführt. Nach dem Lauf wurden die Gele mit einem Thyphoon TRIO laser gescannt und in einigen Fällen mit dem Programm GelCompar II v. 4.50 (Applied Maths) als Elektropherogramme ausgewertet.

Metagenomanalyse mittels Pyrosequenzierung

Extrahierte und aufgereinigte DNA der Metagenome aus Wasser-, Schlamm- und Aquifermaterialproben wurden ohne weitere Vorbehandlung und ohne PCR Amplifikation an GATC Biotech AG zur Pyrosequenzierung versandt.

Datenauswertung Molekularbiologie

Mit der Auswertung der Rohdaten wurde GATC Biotech AG beauftragt. Der Arbeitsablauf enthielt folgende Punkte: PCR Amplifikation (Primerpaar V1-V3) – Pyrosequenzierung – Entfernen redundanter Amplifikate – Test auf Chimären und Entfernung – OTU Assignment – Filter und Konsolidierung – Zusammenfassung zum Report.

Ergebnisse

Die Ergebnisse gliedern sich in die Untersuchungen der Wasserproben, Aufnahme von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen von Reinsubstanzen und Substanzmischungen, sowie Kontrolluntersuchungen zum Abschluss der Abbaubersuche und der Anreicherungskulturen.

Ökotoxizität von Grundwasserproben

Die drei Proben FB01, HF05 und KS06 wurden jeweils dreimal, im Abstand von etwa 2 Monaten beprobt. Mit allen Proben wurden die vier Biotests, wie oben genannt, durchgeführt. Sofern notwendig, wurden die Proben verdünnt, um allenfalls Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen berechnen zu können. Dies war allerdings nur dort zielführend, wo die Hemmung der unverdünnten Probe zumindest annähernd 50% oder mehr betragen hat. Wo eine Regressionsanalyse nicht möglich war, wurden die EC₅₀-Werte nach der graphischen Methode ermittelt. In den anderen Fällen wurde berechnet.

Die Ergebnisse sind in den nachfolgenden Tabellen aufgelistet.

Tabelle 3.1: Ökotoxikologische Untersuchungen und konventionelle Mikrobiologie der Wasserproben vom 8. April 2013. %H = Hemmung der unverdünnten Wasserprobe in Prozent; EC₅₀ [Konz.] = Konzentration der Wasserprobe für 50% Hemmwirkung. Nennenswerte Hemmungen sind durch Fettschrift hervorgehoben.

Ökotoxikologische Untersuchungen der Wasserproben vom 8. April 2013				
Test	Einheit	FB01	HF05	KS06
Leuchtbakterien (30 min)	% H	0	0	0
Algen (72 h)	% H	0	0	0
Daphnien (48 h)	% H	0	25	19
	EC50 [Konz.]	-	> 1	> 1
Wasserlinsen (7 d)	% H	27	67	29
	EC50 [Konz.]	> 1	0,5	> 1
Keimzahl 22°C	KBE / mL	< 10	243	< 10
Keimzahl 37°C	KBE / mL	< 10	< 10	< 10

Tabelle 3.2: Ökotoxikologische Untersuchungen und konventionelle Mikrobiologie der Wasserproben vom 3. Juni 2013. Erklärung wie in Tabelle 3.1, oben.

Ökotoxikologische Untersuchungen der Wasserproben vom 3. Juni 2013				
Test	Einheit	FB01	HF05	KS06
Leuchtbakterien (30 min)	% H	0	0	0
Algen (72 h)	% H	0	0	0
Daphnien (48 h)	% H	0	0	0
	EC50 [Konz.]	-	-	-
Wasserlinsen (7 d)	% H	54	100	58
	EC50 [Konz.]	1	0,5	ca. 1
Keimzahl 22°C	KBE / mL	420	10	< 10
Keimzahl 37°C	KBE / mL	68.000	97	187

Tabelle 3.3: Ökotoxikologische Untersuchungen und konventionelle Mikrobiologie der Wasserproben vom 19. August 2013. Erklärung wie in Tabelle 3.1, oben.

Ökotoxikologische Untersuchungen der Wasserproben vom 19. August 2013				
Test	Einheit	FB01	HF05	KS06
Leuchtbakterien (30 min)	% H	0	0	0
Algen (72 h)	% H	0	0	0
Daphnien (48 h)	% H	35	41	47
	EC50 [Konz.]	> 1	> 1	ca. 1
Wasserlinsen (7 d)	% H	61	58	55
	EC50 [Konz.]	0,8	ca. 1	ca. 1
Keimzahl 22°C	KBE / mL	< 10	< 10	20
Keimzahl 37°C	KBE / mL	20	17	< 10

Die Keimzahlen waren zum Probenahmezeitpunkt 3. Juni 2013 auffällig gegenüber den anderen Zeitpunkten erhöht. Dies ist erklärlich aus den sehr starken Regenfällen während der Probenahme und der unvermeidlichen Einmischung von Oberflächenabfluss in die Entnahmeschächte.

Alle drei Wasserproben wiesen sowohl im Leuchtbakterien- als auch im Algentest zu allen drei Probenahmezeitpunkten keine von Null unterscheidbare Hemmung auf.

Im Daphnientest zeigten sich geringe Hemmwirkungen bei den Proben HF05 und KS06 bei der Probenahme am 8. April, sowie bei der Probe FB01 am 19. August, während alle drei Proben aus der Entnahme im Juni keine Hemmwirkung zeigten. Signifikante Hemmungen wiesen die Proben HF05 und KS06 erneut im August auf.

Im Lemnatest ergaben sich in allen Proben zu allen Probenahmezeiten eindeutige Hemmungen, signifikant und erwähnenswert darunter sind vor allem die Proben HF05 zu allen drei Entnahmezeitpunkten sowie FB01 und KS06 im Juni und im August.

Mit nur drei Probenahmen ist kein eindeutiger zeitlicher Trend abzuleiten. In welcher Art die Proben durch die sehr starken Regenfälle und durch Veränderungen im Grundwasser aufgrund der Hochwassersituation im Juni 2013 beeinflusst wurden, kann aus den Analysendaten nicht abgelesen werden. Jedoch ist auffällig, dass die Proben der Augustprobenahme, also nach dem Hochwasserereignis, generell höhere, auf jeden Fall häufiger auffällige Hemmungen im Daphnien- und im Wasserlinsentest aufwiesen.

Ökotoxizität der Reinsubstanzen

Die Ökotoxizitäten der Pestizide Clopyralid, Flumetsulam, Florasulam, Dicamba, Thiamethoxam, seines Metaboliten CGA 355190, Clothianidin und Chlorpyrifos wurden in allen vier Biotests untersucht. Dazu wurden Stammlösungen der Pestizide mit exakt 100 mg/L hergestellt und daraus mit dem für den jeweiligen Test üblichen Verdünnungsmedium verdünnt. Die Verdünnungsreihen enthielten zumindest die Stufen 1:1,5, 1:2, 1:3, 1:4, 1:6, 1:8 und 1:12. Wo erforderlich, wurde in binären Schritten weiter verdünnt, bis eine Konzentration erreicht war, in der die Testorganismen keine von Null unterscheidbare Hemmung mehr aufwiesen. Die Ergebnisse der Messreihen dienen als Grundlage zur Erstellung von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen, wie in den Abbildungen 3.2 bis 3.9 nachfolgend graphisch dargestellt. Die graphische Auswertung umfasst jeweils alle Einzelmesswerte von Hemmungen in Abhängigkeit von der Konzentration sowie, wo sinnvoll und mathematisch möglich, auch die aus der Regressionsanalyse erstellten Funktionen der Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen. Die Farben von Messpunkten und Regressionskurven wurden dabei je Testorganismus gleich gehalten: Blau für Leuchtbakterien, Grün für Algen, Gelbbraun für Daphnien und Violett für Wasserlinsen.

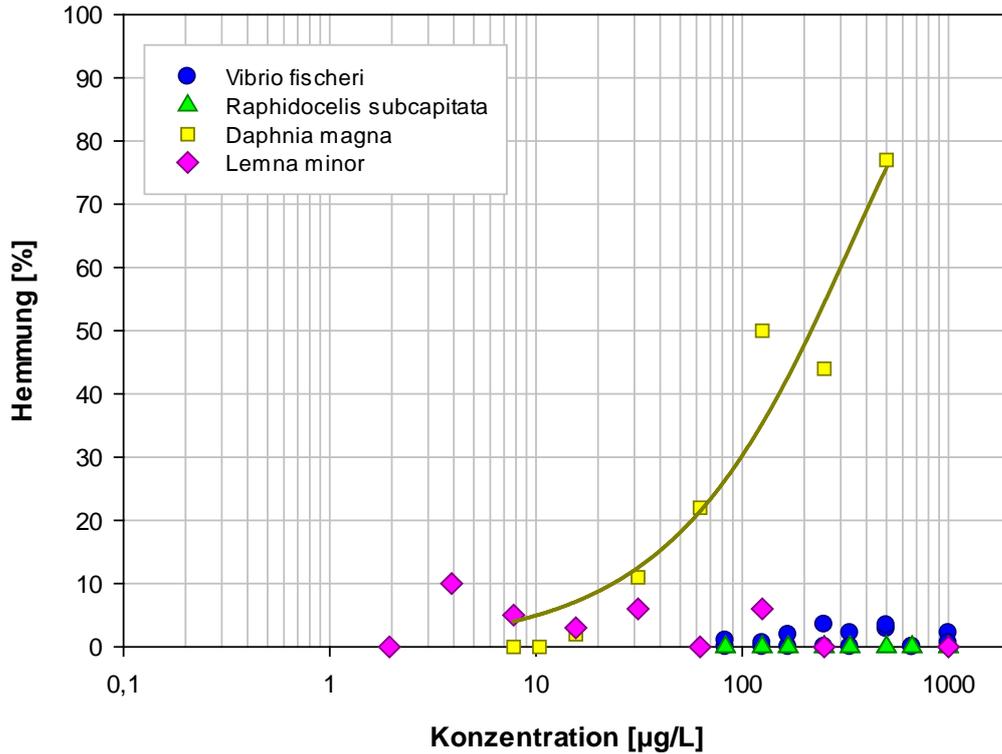


Abbildung 3.2: Darstellung der konzentrationsabhängigen Messwerte aus den vier Biotests für das Pestizid Clopyralid. Eine Regressionsanalyse war für den Daphnientest möglich.

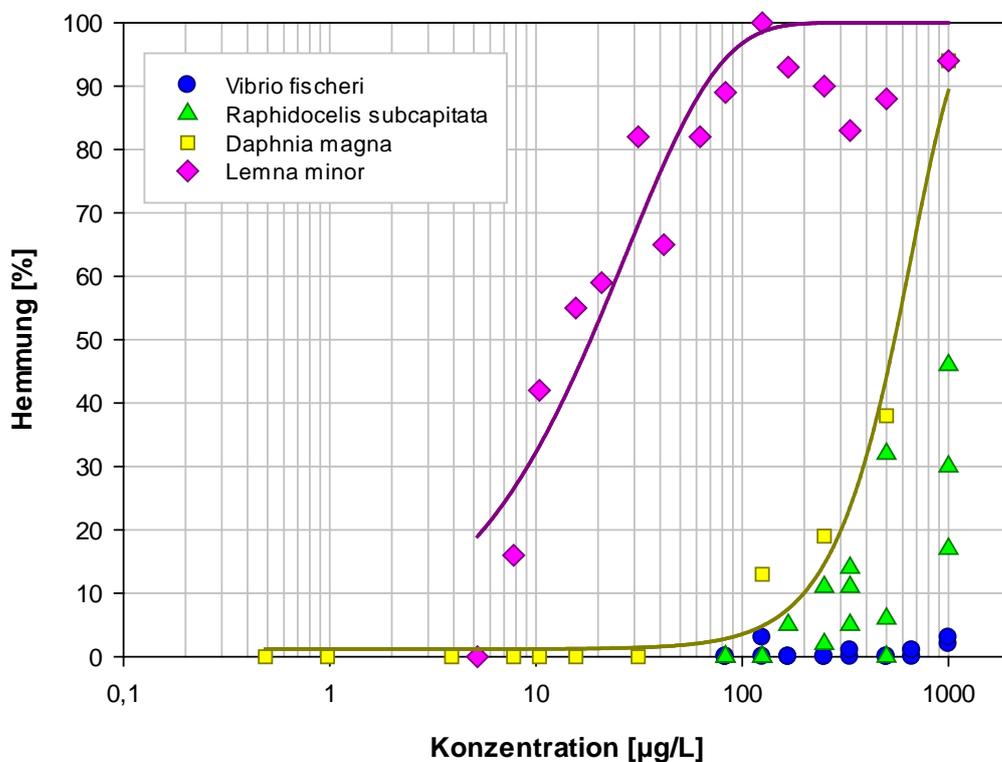


Abbildung 3.3: Darstellung der konzentrationsabhängigen Messwerte aus den vier Biotests für das Pestizid Florasulam. Regressionsanalysen waren für den Daphnien- und für den Wasserlinsentest möglich.

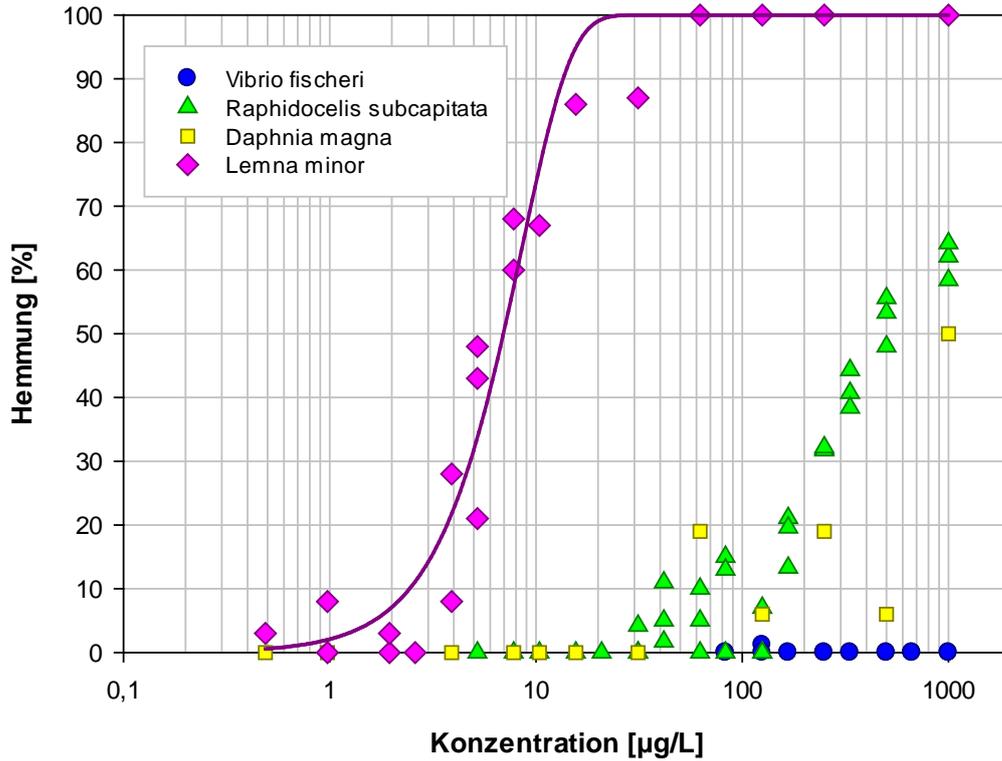


Abbildung 3.4: Darstellung der konzentrationsabhängigen Messwerte aus den vier Biotests für das Pestizid Flumetsulam. Eine Regressionsanalyse war für den Wasserlinsentest möglich.

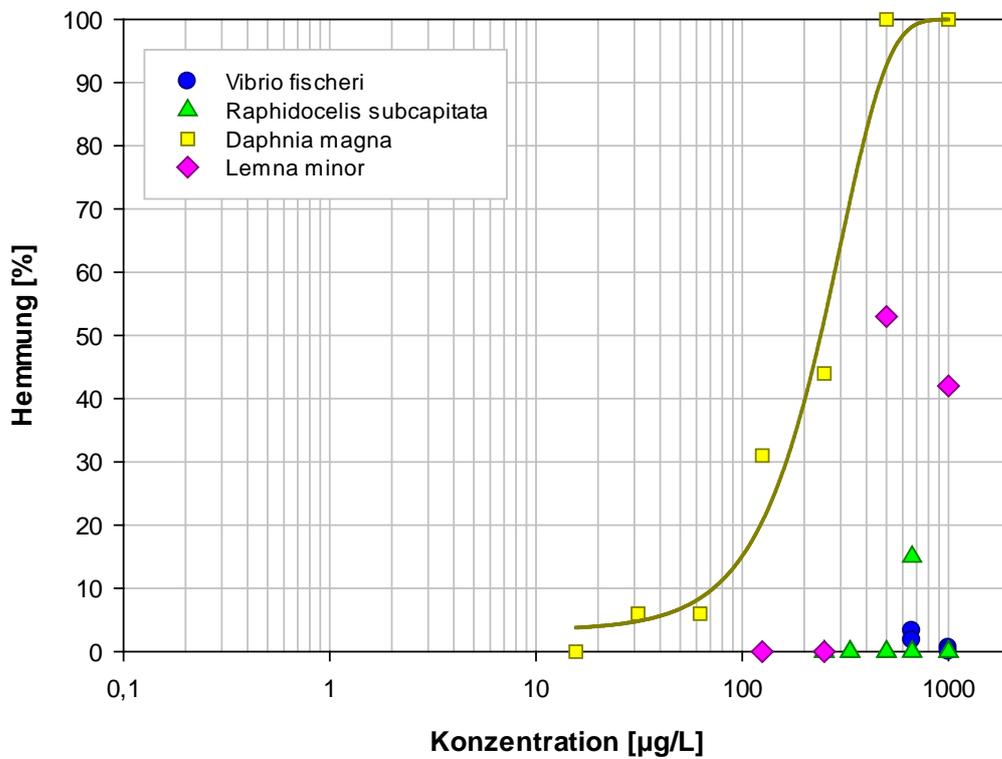


Abbildung 3.5: Darstellung der konzentrationsabhängigen Messwerte aus den vier Biotests für das Pestizid Dicamba. Eine Regressionsanalyse war für den Daphnientest möglich.

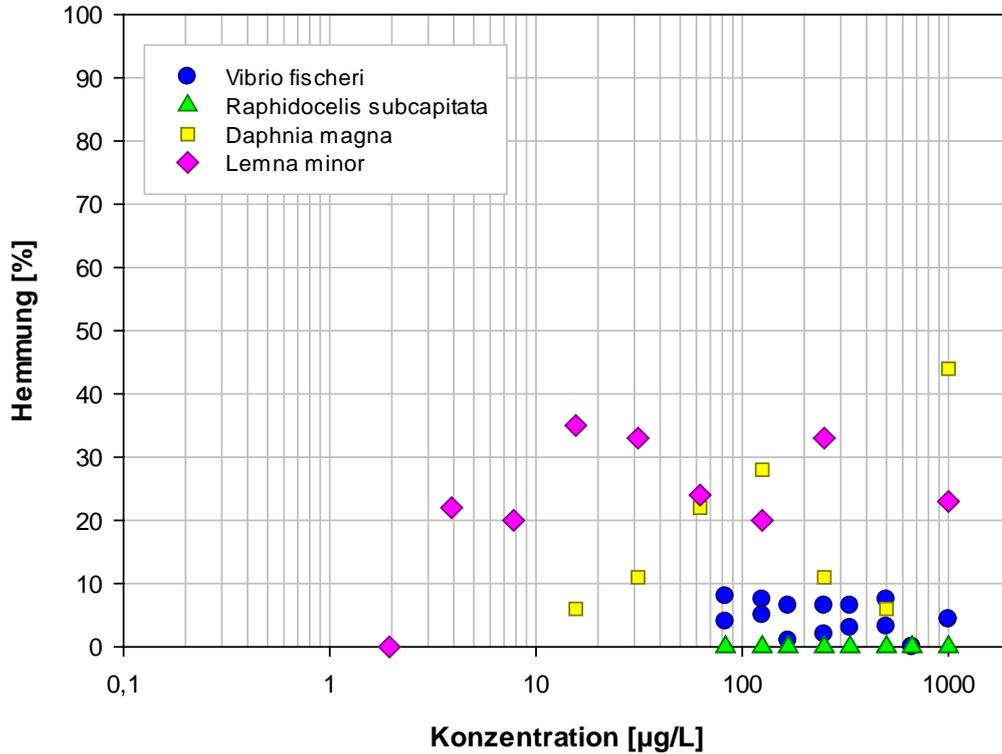


Abbildung 3.6: Darstellung der konzentrationsabhängigen Messwerte aus den vier Biotests für das Pestizid Thiamethoxam. Keine der Messserien erlaubte eine Regressionsanalyse zur Berechnung von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen.

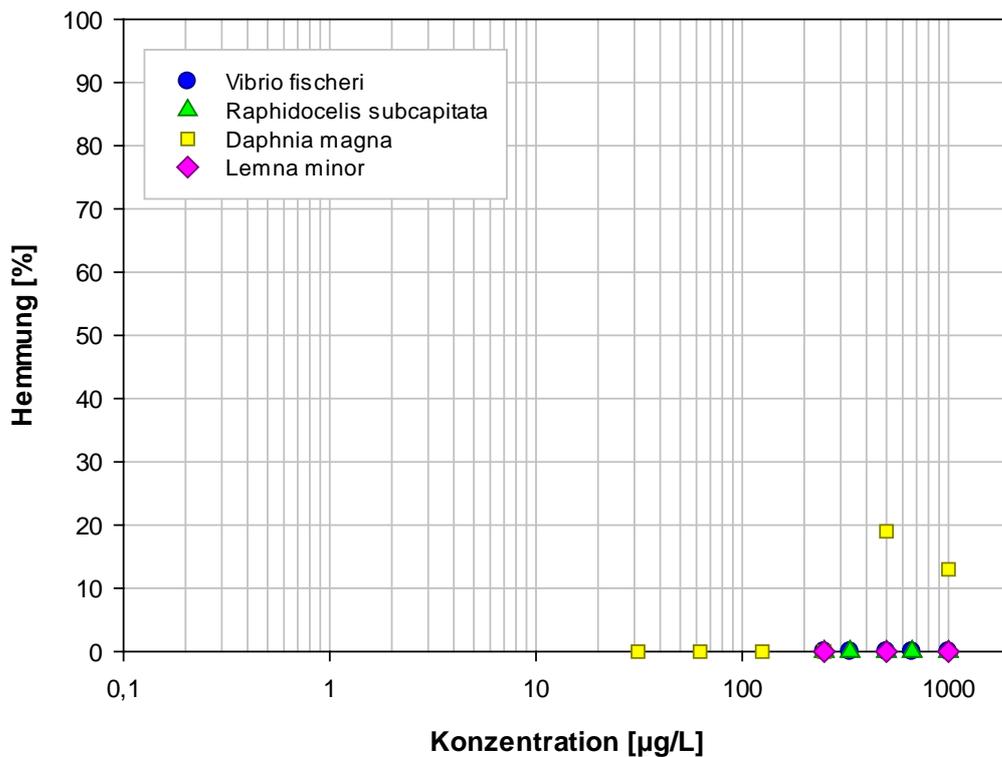


Abbildung 3.7: Darstellung der konzentrationsabhängigen Messwerte aus den vier Biotests für das Pestizid CGA 355190 (Metabolit von Thiamethoxam). Keine der Messserien erlaubte eine Regressionsanalyse zur Berechnung von Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen.

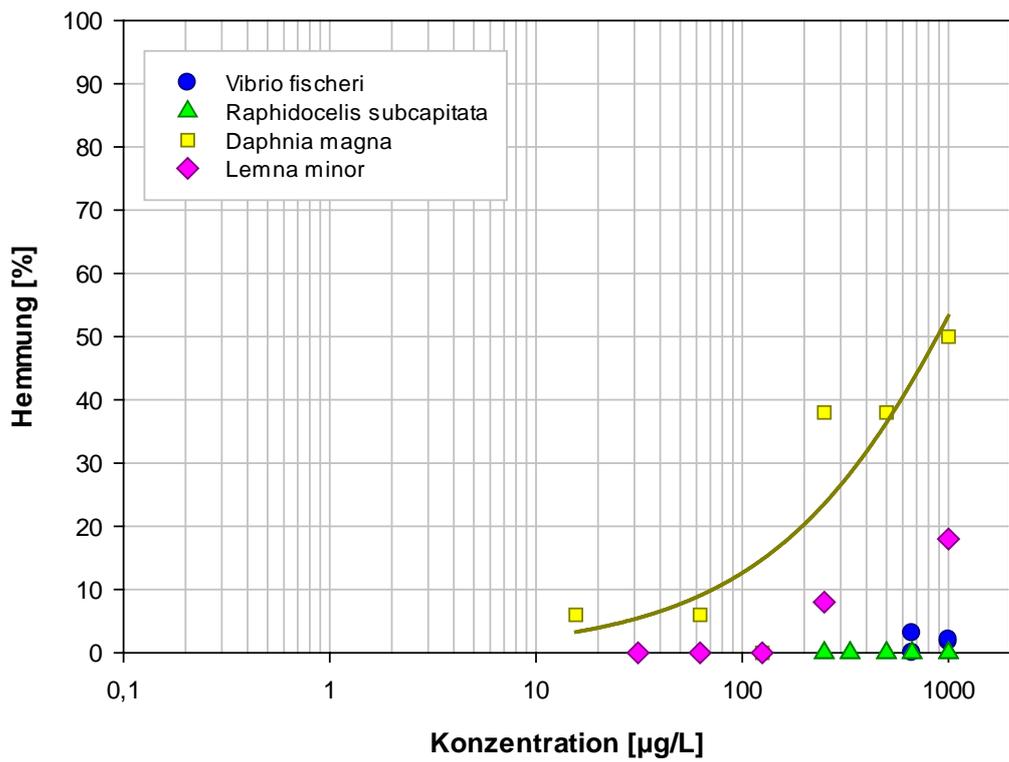


Abbildung 3.8: Darstellung der konzentrationsabhängigen Messwerte aus den vier Biotests für das Pestizid Clothianidin. Eine Regressionsanalyse war für den Daphnientest möglich.

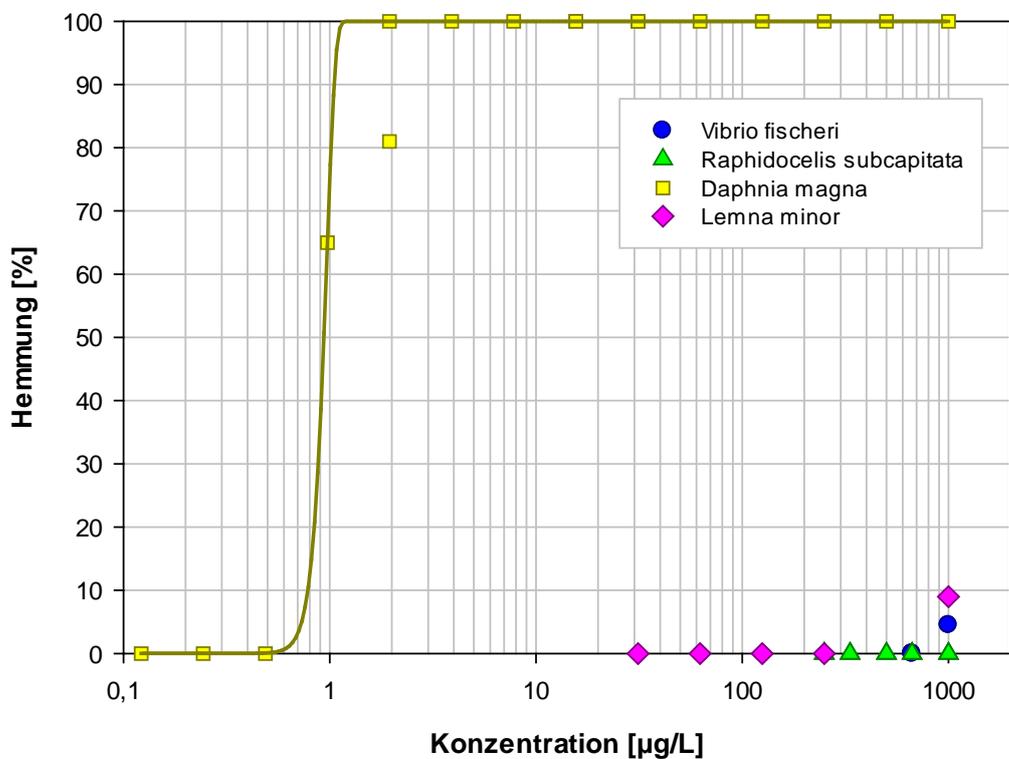


Abbildung 3.9: Darstellung der konzentrationsabhängigen Messwerte aus den vier Biotests für das Pestizid Chlorpyrifos. Eine Regressionsanalyse war für den Daphnientest möglich.

In der Tabelle 3.4a sind nachfolgend die EC₅₀-Werte der Pestizide für jeweils alle vier Biotests zusammengefasst. Dabei gilt, dass EC₅₀-Werte nur dann mit einem konkreten Zahlenwert angegeben sind, wenn eine Regressionsanalyse, und als Werte in Kursivschrift, wenn lediglich die graphische Ablesung aus den Diagrammen möglich war.

Tabelle 3.4b enthält die EC/LC₅₀-Werte aus der Literatur in gleicher Anordnung. Dazu ist jedoch generell anzumerken, dass die verfügbaren Daten eine sehr große Schwankungsbreite aufweisen. Am Beispiel Clopyralid sind die Ökotoxizitätsdaten vergleichend aus zwei Literaturstellen gegenübergestellt. Die Unterschiede betragen bis zu drei Zehnerpotenzen.

Tabelle 3.4a: Zusammenfassung der Ergebnisse der ökotoxischen Wirkungen der Pestizide aus den vier Biotests mit den Einzelsubstanzen. Erklärungen: das Symbol „größer als“ (>) steht für einen EC₅₀-Wert von größer 1.000 µg/L; die Zahlenwerte nach ± stellen die aus der Regressionsrechnung ermittelte Standardabweichung (s) des EC₅₀-wertes dar. Werte ohne Angabe von s wurden aus dem Kurvenverlauf graphisch ermittelt. Die der Regression zugrunde liegende Anzahl Datenpaare (n) variiert von 18 bis 66.

Ökotoxikologische Beurteilung der Pestizide, alle Zahlenwerte als EC ₅₀ in µg/L ± s					
Substanz / Test	Leuchtbakt.	Grünalgen	Daphnien 24h	Daphnien 48h	Wasserlinsen
Clopyralid	>	>	>	216 ± 47	>
Flumetsulam	>	500	>	1.000	6,9 ± 0,5
Florasulam	>	1.000	1.000	552 ± 32	18 ± 9
Dicamba	>	>	600	247 ± 28	500
Thiamethoxam	>	>	>	>	>
CGA 355190	>	>	>	>	>
Clothianidin	>	>	>	882 ± 460	>
Chlorpyrifos	>	>	1,9	0,94 ± 0,05	>

Tabelle 3.4b: Literaturwerte der ökotoxischen Wirkungen der Zielpestizide zu den vier Biotests.

Literaturdaten zur Ökotoxizität der Pestizide (Algen: LC ₅₀ , andere: EC ₅₀)					
Substanz / Test	Leuchtbakt.	Grünalgen	Daphnien 48h	Wasserlinsen	Referenz
Clopyralid	> ¹⁾	255 µg/L ¹⁾	449 µg/L ¹⁾	89 µg/L ¹⁾	¹⁾ USFS 2004
		99 mg/L ²⁾	30 mg/L ²⁾	89 mg/L ²⁾	²⁾ IUPAC 2014
Flumetsulam	> ¹⁾	> ¹⁾	254 mg/L ²⁾	2,1 µg/L ²⁾	¹⁾ hdcchem.com ²⁾ IUPAC 2014
		-	292 µg/L	9 µg/L	1,2 µg/L
Dicamba	-	41 mg/L	450 µg/L	1,8 mg/L	IUPAC 2014
Thiamethoxam	-	83 µg/L	120 µg/L	>	EC Report 2006
CGA 355190	-	100 µg/L	100 µg/L	-	EC Report 2006
Clothianidin	-	40 mg/L	55 mg/L	121 mg/L	IUPAC 2014
Chlorpyrifos	-	0,1 µg/L	480 µg/L	-	IUPAC 2014

Monitoring der Abbauprobungen in Bioreaktoren

Die vier Versuchsansätze, wie in Arbeitspaket 1 beschrieben (Abbauprobungen mit kontaminiertem Grundwasser in Bioreaktoren), wurden zu Versuchsende auf ihre ökotoxische Wirkung auf drei der vier Biotestorganismen untersucht. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Keimzahlen und eine Metagenomanalyse mittels DGGE. Der Leuchtbakterientest wurde weggelassen, zumal *Vibrio fischeri* von keinem der Pestizide und von keiner der bis dahin untersuchten Grundwasserproben jemals gehemmt wurde.

Die Ergebnisse der Biotests sind in der Tabelle 3.5 dargestellt. Es wurden die unverdünnten Proben sowie die 1:2 Verdünnungen gemessen. Die Keimzahlen sind jeweils für die unverdünnte Probe angegeben. Das Ergebnis der Metagenomanalyse mittels DGGE ist aus Abbildung 3.10 ersichtlich.

Tabelle 3.5: Keimzahlbestimmungen und Hemmungen der Proben aus den Abbauprobungen in Bioreaktoren im Vergleich zur Wasserprobe und zum Mineralmedium. Hemmungen nahe an oder größer als 50% sind in Fettschrift, alle Messwerte des mit HgCl₂ vergifteten Ansatzes in kursiver Schrift dargestellt. GW = Wasserprobe (HF05); A = Zugabe von Aquifermaterial (Feststoff); N = Nährstoffzugabe; B = Belüftung.

Ökotoxikologische Untersuchungen zu Bioreaktoren, alle Zahlenwerte in % Hemmung								
Test	Verd.	GW/N/B	GW/A/N/B	GW/A/N/B	GW/A	GW (HF05)	Mineralmedium	
		+ HgCl ₂				8.4.2013	unbelüftet	belüftet
Grünalgen (72 h)	unverd.	56	<i>100</i>	98	0	0	0	11
	1:2	49	<i>71</i>	45	0	0	0	0
Daphnien (24 h)	unverd.	35	<i>100</i>	18	24	0	0	50
	1:2	0	<i>100</i>	0	0	0	0	17
Daphnien (48 h)	unverd.	50	<i>100</i>	69	38	25	3	65
	1:2	0	<i>100</i>	0	0	0	2	31
Wasserlinsen (7 d)	unverd.	21	<i>100</i>	23	17	67	41	0
	1:2	0	<i>100</i>	14	0	53	0	0
Keimzahl 22°C	KBE / mL	11.100	< 10	29.700	11.300	2.430	-	-
Keimzahl 37°C	KBE / mL	16.700	< 10	45.000	4.040	< 10	-	-

Den vergifteten Ansatz (Zusatz von HgCl₂) gänzlich zur Seite stellend, lässt sich zusammenfassend aussagen, dass die Hemmung von Grünalgen in den aktiv belüfteten Ansätzen generell höher war, als in der für diesen Abbauprobung verwendeten Wasserprobe (HF05), während dieser Effekt in im nicht belüfteten aber trotzdem aeroben Ansatz nicht auftrat. Eine ähnlich gerichtete, jedoch deutlich schwächer ausgeprägte Zunahme der Hemmwirkung war auch aus den Daphnientests zu erkennen. Die ökotoxische Wirkung für Wasserlinsen nahm in allen Versuchsvarianten ab.

Über alle drei Biotests zeigte der unbelüftete Abbauprobung (GW/A) zu Versuchsende die geringsten Hemmwirkungen. Die gleichartige Tendenz war auch im Mineralmedium (ohne Pestizid- oder Grundwasserzusätze) messbar.

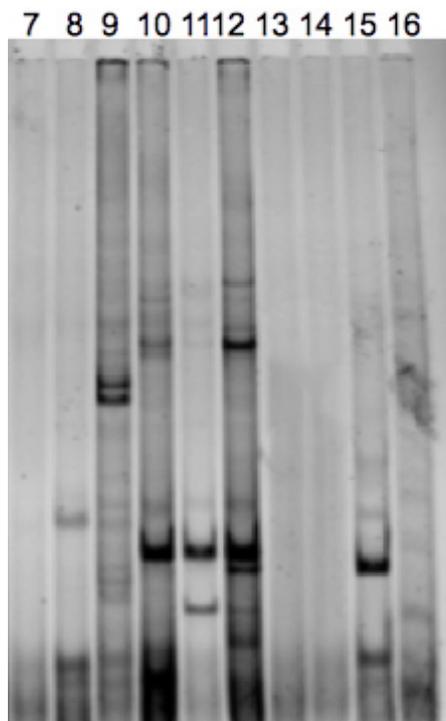


Abbildung 3.10: DGGE Scan der Proben (drei Probenahmen) aus dem Abbaueversuch. Von links nach rechts: 7,8,9 = Abbaueversuch „Eva“, chronologisch; 10,11,12 = Abbaueversuch „Kerstin“, chronologisch; 13,14,15 = Abbaueversuch „Marion“, chronologisch; 16 = Abbaueversuch „Andi“ zu Versuchsende. Weitere Erklärung im Text.

Der vergiftete Ansatz (Zusatz von HgCl_2) führte bei allen Testorganismen erwartungsgemäß zu vollständigen Hemmungen und wies darüber hinaus auch keine kultivierbaren Mikroorganismen auf. Die Keimzahlen der anderen Ansätze zeigen unerwartet hohe Werte für die Probe ohne Zusatz von Aquifermaterial (GW/N/B), da die Wasserprobe zu Versuchsbeginn etwa 2.400 KBE/mL bei 22°C und weniger als 10 KBE/mL bei 37°C enthielt. Im unbelüfteten, aber mit Aquifermaterial versetzten Ansatz (GW/A) war die Keimzahl bei 37°C sehr niedrig, sonst jedoch unauffällig. Die höchsten Keimzahlen wurden für die Probe GW/A/N/B ermittelt.

Es liegt der Schluss nahe, dass durch die Belüftung z.B. Keime, als auch ökotoxisch auf Algen und Daphnien wirkende Substanzen eingebracht wurden. Dies war vorab nicht absehbar, zumal die Druckluftherzeugung durch technische Installationen gefiltert und ölfrei sein sollte.

Die Ergebnisse der Metagenomanalyse (DGGE) zeigen kaum Ähnlichkeiten zwischen den Proben und sogar einige Unterschiede in den Bandenmustern der selben Abbaueversuche zu verschiedenen Probenahmezeitpunkten. Es ist zu bedenken, dass die Intensität der Banden der DGGE kein exakt quantitatives Signal darstellt. Aus dem mit HgCl_2 vergifteten Ansatz war jedenfalls bei der ersten und zweiten Probenahme keine DNA isolierbar, wohl aber bei der abschließenden Probenahme. Dass es hier zu einer neuerlichen Kontamination als Folge der Belüftung kam, kann nicht ausgeschlossen werden, aber auch nicht, dass Keime in Stasis (Sporen, Konidien, Dauerstadien) zu einem späteren Zeitpunkt neu auskeimten. Das ist insbesondere in Hinblick auf eine Fällungsreaktion von Bedeutung, die nur in dem mit HgCl_2 versetzten Ansatz zu beobachten war (siehe dazu auch Arbeitspaket 1). In den Abbauegefäßen vorhandene oder eventuell eingetragene DNA kann erfahrungsgemäß insbesondere dann noch einige Zeit später daraus wieder isoliert werden, wenn die gesamte mikrobielle Aktivität gering ist.

Monitoring der Abbauprobungen in Aquifersäulen

Für die Abbauprobungen wurde die Grundwasserprobe HF05 der Probenahme vom 18. November 2013 verwendet. Um Einflüsse aus der Druckluftversorgung auszuschließen, wurden die Säulen über Aerobisierungsflaschen durch Röhren belüftet (Details in Arbeitspaket 1). Die Versuche wurden eine Woche nach der Grundwasserprobenahme gestartet, beide Säulen wurden belüftet und mit Nährstoffen versehen. Säule 2 wurde zusätzlich nach einer Initialisierungsphase von zwei Wochen mit einer Anreicherungskultur inokuliert. Eine Beprobung des Hauptversuchs (Säule 1) erfolgte zu Beginn und zu Versuchsende. Zusätzlich zum Hauptversuch wurde Proben von Säule 2 mit ausgewählten Tests beurteilt. Die Ergebnisse der Ökotoxikologie sind in Tabelle 3.6 dargestellt.

Tabelle 3.6: Keimzahlbestimmungen und Hemmungen der Proben aus den Abbauprobungen in Aquifersäulen im Vergleich zur Wasserprobe HF05. Hemmungen nahe an oder größer als 50% sind in Fettschrift dargestellt.

Ökotoxikologische Untersuchungen zu Aquifersäulen, alle Zahlenwerte in % Hemmung						
Test	Verd.	HF05	Säule 1 (N/B)		Säule 2 (N/B/I)	
		18.11.2013	Beginn	Ende	Inokulation	Ende
Daphnien (24 h)	unverd.	17	0	0	0	0
	1:2	6	0	0	0	0
Daphnien (48 h)	unverd.	59	59	17	0	6
	1:2	24	12	17	0	0
Wasserlinsen (7 d)	unverd.	61	29	71	85	-*
	1:2	37	25	36	26	-
*) - nicht gemessen						

Ähnlich wie bei den vorhergehenden Entnahmen zeigte die Grundwasserprobe HF05 vom 18. November 2013 nennenswerte Hemmungen im Daphnien- und im Wasserlinsentest. Die nach Befüllung der Säule zu Beginn des Versuches entnommene Probe zeigte bereits eine deutlich verringerte Hemmwirkung gegen Wasserlinsen der Startprobe aus Säule 1. Auch die Hemmwirkung gegen Daphnien nach Inokulation von Säule 2 war reduziert, wobei die Hemmung der Wasserlinsen nach Inokulation nur in der unverdünnten Probe einen höheren Wert einnahm. Das könnte möglicherweise durch Pestizidreste im Inokulum hervorgerufen worden sein. Aus beiden Säulenversuchen nahmen die Hemmungen gegen Daphnien bis Versuchsende deutlich (Säule 1) bzw. merklich (Säule 2) ab, während die Hemmung gegen Wasserlinsen in Säule 1 zu Versuchsende wieder den anfänglichen Wert erreichte.

Identifizierung kultivierbarer Bakterien aus der Wasserprobe HF05

Nach Ausplattieren der Wasserprobe HF05 aus der Probenahme vom 8. April auf Plate Count Agar und 72 h Bebrüten bei 22°C wurden insgesamt 12 Kolonien mit unterschiedlichem visuellem Erscheinungsbild entnommen. Durch direkte PCR (colony-PCR) wurde deren 16S-rDNA isoliert und amplifiziert. Diese DNA wurde parallel mittels DGGE aufgetrennt (Ergebnis siehe Abbildung 3.11) und über Fremdvergabe sequenziert. Aus den Sequenzen wurden mittels BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) die Bakterien identifiziert (siehe Tabelle 3.7).

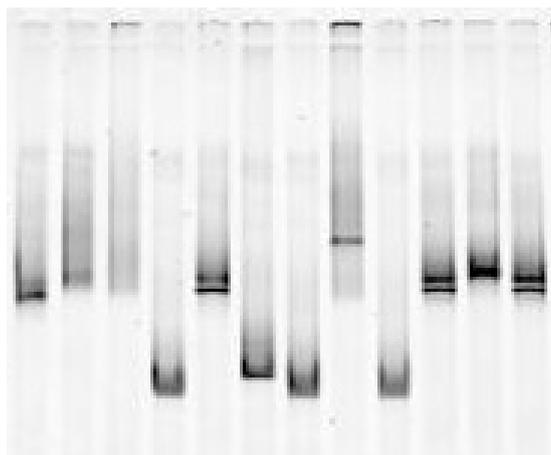


Abbildung 3.11: Scan des DGGE Gels von 12 Kolonien der bei 22°C bebrüteten Wasserprobe HF05. Erweiterte Informationen im nachfolgenden Text.

Tabelle 3.7: Identifizierung der Bakterien aus den 16S-rDNA Sequenzen (V3-V5). Die Nummern entsprechen den Reihen aus Abbildung 3.11, von links nach rechts.

Keimidentifikationen aus der kultivierten Wasserprobe HF05					
Nr. 1 <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Paenibacillus amylolyticus</i>	Nr. 2 ©-Proteobact. F3 Bacterium PJ-35	Nr. 3 <i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	Nr. 4 <i>Rhodococcus erythropolis</i> <i>Idiomarina sp.</i> Bacterium KR	Nr. 5 <i>Acidovorax facilis</i> Bacterium A11	Nr. 6 <i>Microbacterium murale</i> Glacial Ice Bact. G1 Actinobacterium CH12i
Nr. 7 ident to 4	Nr. 8 <i>Pseudomonas sp.</i> Bacterium KB 27	Nr. 9 ident to 4	Nr. 10 ident to 5	Nr. 11 <i>Dyadobacter alkalitolerans</i> Rhizosphere soil bacterium	Nr. 12 ident to 5

Reinkulturen, aus deren DNA eindeutige Sequenzierungen erhalten wurden, ergaben in der DGGE in drei Fällen dennoch Doppelbanden (Lanes 5, 10 und 12), was auf das mehrfache Vorhandensein ribosomaler DNA in diesem Organismus schließen lässt. Die BLAST Identifizierung lieferte für fast alle Proben mehrere Organismennamen mit jeweils 100% Übereinstimmung (die Bezeichnung "unidentified bacterium" wurde in der Tabelle jedoch generell weggelassen), was auf eine vermutlich nicht optimale Wahl der Primerpaare hindeutet. Im Sinne der Vergleichbarkeit zwischen der Sequenzierung von Reinkulturen, den DGGE-Analysen und der Pyrosequenzierung stehen derzeit jedoch keine besseren Varianten zur Verfügung.

Aus den Identifizierungen lässt sich vorerst nicht mit Sicherheit ableiten, ob sich im Grundwasser spezifische, mit der Pestizidkontamination in Verbindung stehende Spezies angereichert haben. Es sind sowohl die erwartungsgemäß typischen Boden- und Grundwasserorganismen darunter (Lanes 1, 2, 3, 5, 8 und 11), als auch Exoten ohne konkreten Hinweis auf den Grund ihrer Anwesenheit (*Idiomarina sp.* (4) - ein Tiefseebakterium an Hydrothermalquellen, Glacial Ice Bacterium (6) und Bacterium KB27 (8)).

Der wiederholte Nachweis bestimmter Stämme im selben Grundwasserteilstrom oder in Verbindung mit gleichartiger Pestizidbelastung kann im Zuge künftiger Untersuchungen zu einem Hinweis auf die ökologische Funktion der Organismen führen.

Metagenomanalyse aus den Grundwasserproben und der Schlammprobe

Die DNA der festen Proben aus den Bohrkernen B1, B7 und B9 und auch der Mischung der drei Teile, wie in den Abbaubersuchen verwendet, sowie die DNA aus den beiden Schlammproben A1 (nahe B1) und A3 wurde mittels PowerSoil Kit extrahiert, aufgereinigt, amplifiziert und mittels DGGE getrennt. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.12 zu sehen. Die ribosomale DNA aus den Kolonien der Keimzahlbestimmung des rosa Schlammes wurde sequenziert und mittels NCBI BLAST identifiziert.

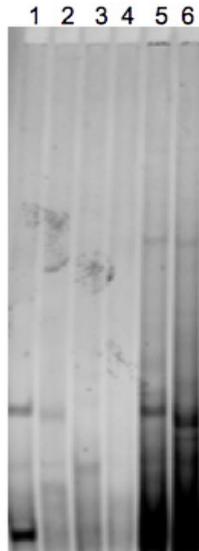


Abbildung 3.12: DGGE der Metagenome aus Aquifermaterialen und aus dem rosa Schlamm. Von links nach rechts: 1 = Aquifermaterial (gemischt); 2 = Aquifer B1; 3 = Aquifer B7; 4 = Aquifer B9; 5 = Schlamm A1; 6 = Schlamm A3. Erklärung im Text.

Die Interpretation der aus der DGGE erhaltenen, generell jedoch schwach ausgeprägten Banden ist nur unter Vorbehalt möglich. Die Probe aus dem Bohrkern B1 (Position 2 in Abbildung 3.12), dessen Entnahmeposition sich nahe an den Abwassersammelstellen befand, wies eine dominante Bande im unteren Drittel des DGGE Gels auf. Banden mit gleicher Position fanden sich auch in der Mischprobe (drei Bohrkern) und in der Schlammprobe A1 (Position 5 in Abbildung 3.12). Auch wenn die dominante Bande der Position 6 (Schlamm A3) etwas tiefer lag als die der Positionen 1, 2 und 5, so handelte es sich dennoch in allen Fällen um *Pseudomonas sp.*, wie die später durchgeführte Sequenzierung ergab.

Die Identifikation aller 15 Kolonien aus der Schlammprobe A3 ergab einheitlich *Pseudomonas fluorescens* bzw. *Pseudomonas brenneri*, der auch schon früher in einigen der Grundwasserproben gefunden wurde (vergleiche Tabelle 3.7). Die einzige auf Platecount Agar angewachsene Kolonie aus der Keimzahlbestimmung der Schlammprobe A1 konnte als *Bacillus simplex* identifiziert werden.

Zwei methodisch verschiedene DGGE-Analysen der Wasserproben über alle Probenahmezeitpunkte sind in Abbildung 3.13 dargestellt. Der Unterschied liegt in den verwendeten Primerpaaren für die PCR Amplifikation (links Primer V3-V5, rechts V1-V3).

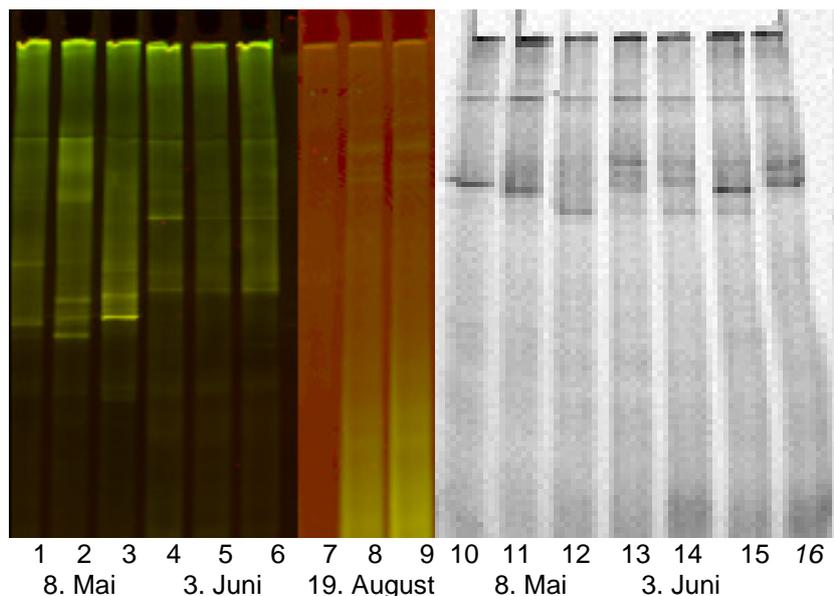


Abbildung 3.13: DGGE Gelscans der Wasserproben HF05, KS06 und FB01. Linke Seite: PCR Amplifikation mit dem Primerpaar V3-V5; rechte Seite: mit dem Primerpaar V1-V3. 1, 4, 7, 10, 13 = HF05; 2, 5, 8, 11, 14 = KS06; 3, 6, 9, 12, 15 = FB01; 17 = Grundwasser-Vergleichsprobe. Die DGGE Trennung für die Probenahme 19. August (linke Seite) erfolgte mit einem anderen Gel.

Die Metagenome der Wasserproben stellen sich in der DGGE als sehr heterogen heraus, unabhängig davon, welche Primerpaare für die PCR Amplifikation verwendet wurden. Die isolierbaren DNA-Mengen waren in allen Fällen gering, bei der Probenahme vom 19. August 2013 jedoch so außerordentlich klein, dass die DGGE Auswertung über V3-V5 (linke Seite in Abbildung 3.13) kaum möglich ist und für V1-V3 (rechts in Abbildung 3.13) nicht genug Amplifikat für eine Trennung erhalten wurde. Auffällig ist, dass die Proben des Datums 3. Juni 2013 für beide Primerpaare ein sehr ähnliches Bandenmuster ergaben, während die leider nur sehr schwachen Bandenmuster der Probenahme 19. August, denjenigen der ersten Probenahme wieder mehr ähnelten. Das könnte daraus resultiert sein, dass es im Juni 2013 zu besonders starken Regenfällen (Hochwasser) und damit zum Einwaschen von Mikroorganismen aus dem Oberflächenabfluss gekommen ist (vergleiche mit den Keimzahlen in den Tabellen 3.1 bis 3.3). Die DGGE Analysen aus den V1-V3 Amplifikaten zeigten knapp unterhalb der Auftrageposition in allen Proben (inkl. Vergleichsprobe) eine gleichartige Bande, die wiederum als *Pseudomonas sp.* identifiziert werden konnte.

Mittels Pyrosequenzierung wurden aus den insgesamt acht Proben in Summe 291.943 Sequenzierungen (mit 150.003.400 Basenpaaren) erhalten. Nach Entfernen redundanter Amplifikate und Chimären wurden alle verbliebenen Sequenzen mittels NCBI BLAST identifiziert. Die Sequenzqualitäten waren unterschiedlich, reichten teilweise bis zu den Spezies und teilweise nur bis zu den Familien. Um einheitliches Datenmaterial zu erhalten, wurden bezüglich Diversitäten und Verteilungen nur die Familien ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.8 und für die Proben HF05 vergleichend in Abbildung 3.14 dargestellt, wobei alle Identifikationen mit einer relativen Abundanz kleiner 1% nicht gelistet sind. Dies begründet sich auch aus der Arbeitsweise der Pyrosequenzierung, die häufige Sequenzen stärker amplifiziert als seltene und somit, vor allem im Häufigkeitsbereich kleiner 5%, nicht mehr exakt repräsentative Quantitäten ausgibt.

Tabelle 3.8: Identifikationen aus der Pyrosequenzierung der drei Wasserproben aus zwei Probenahmezeitpunkten. Angeführt sind die prozentuellen Häufigkeiten von Organismenordnungen und -familien. Die Summe ergibt nicht 100%, da alle Sequenzen mit einer Abundanz kleiner 1% nicht aufsummiert wurden. Weitere Details und Erklärungen im Text.

Probe	April 2013				Juni 2013			
	rel.H. [%]	Ordnung	rel.H. [%]	Familie	rel.H. [%]	Ordnung	rel.H. [%]	Familie
FB01	35,40	<i>Sphingomonadales</i>	35,40	<i>Sphingomonadaceae</i>	39,85	<i>Pseudomonadales</i>	39,85	<i>Pseudomonadaceae</i>
	23,01	<i>Xanthomonadales</i>	23,01	<i>Xanthomonadaceae</i>	33,33	<i>Burkholderiales</i>	33,33	<i>Oxalobacteraceae</i>
	12,39	<i>Rhizobiales</i>	7,08	<i>Bruceellaceae</i>	5,36	<i>Sphingobacteriales</i>	5,36	<i>Sphingobacteriaceae</i>
	6,19	<i>Actinomycetales</i>	5,31	<i>Phyllobacteriaceae</i>	1,92	<i>Xanthomonadales</i>	1,92	<i>Xanthomonadaceae</i>
			5,31	<i>Micrococcaceae</i>	1,92	<i>Flavobacteriales</i>	1,92	<i>Flavobacteriaceae</i>
	5,31	<i>Caulobacterales</i>	0,88	<i>Nocardiaceae</i>				
			5,31	<i>Caulobacteraceae</i>				
3,54	<i>Burkholderiales</i>	3,54	<i>Oxalobacteraceae</i>					
HF05	38,26	<i>Pseudomonadales</i>	26,24	<i>Pseudomonadaceae</i>	67,42	<i>Pseudomonadales</i>	62,64	<i>Pseudomonadaceae</i>
			12,02	<i>Moraxellaceae</i>			4,78	<i>Moraxellaceae</i>
	18,58	<i>Xanthomonadales</i>	18,58	<i>Xanthomonadaceae</i>	12,36	<i>Burkholderiales</i>	12,36	<i>Oxalobacteraceae</i>
	9,02	<i>Burkholderiales</i>	6,83	<i>Comamonadaceae</i>	2,81	<i>Xanthomonadales</i>	2,81	<i>Xanthomonadaceae</i>
			2,19	<i>Oxalobacteraceae</i>				
	5,74	<i>Actinomycetales</i>	3,01	<i>Bravibacteriaceae</i>				
	5,74	<i>Actinomycetales</i>	2,73	<i>Microbacteriaceae</i>				
1,64	<i>Bacillales</i>	1,64	<i>Bacillaceae</i>					
KS06	73,96	<i>Bacillales</i>	73,96	<i>Bacillaceae</i>	48,53	<i>Pseudomonadales</i>	48,53	<i>Pseudomonadaceae</i>
	16,14	<i>Actinomycetales</i>	16,14	<i>Nocardiaceae</i>	29,60	<i>Burkholderiales</i>	29,60	<i>Oxalobacteraceae</i>
	3,12	<i>Pseudomonadales</i>	3,12	<i>Pseudomonadaceae</i>				
NOEL17					29,12	<i>Burkholderiales</i>	29,12	<i>Oxalobacteraceae</i>
					18,46	<i>Pseudomonadales</i>	6,22	<i>Moraxellaceae</i>
							12,24	<i>Pseudomonadaceae</i>
					16,06	<i>Enterobacteriales</i>	16,06	<i>Enterobacteriaceae</i>
					12,45	<i>Sphingobacteriales</i>	12,45	<i>Sphingobacteriaceae</i>
					1,41	<i>Xanthomonadales</i>	1,41	<i>Xanthomonadaceae</i>
KS18					43,04	<i>Xanthomonadales</i>	43,04	<i>Xanthomonadaceae</i>
					17,72	<i>Caulobacterales</i>	17,72	<i>Caulobacteraceae</i>
					17,09	<i>Bacillales</i>	17,09	<i>Bacillaceae</i>
					4,43	<i>Actinomycetales</i>	3,16	<i>Micrococcaceae</i>
							1,27	<i>Microbacteriaceae</i>
					3,16	<i>Burkholderiales</i>	3,16	<i>Comamonadaceae</i>

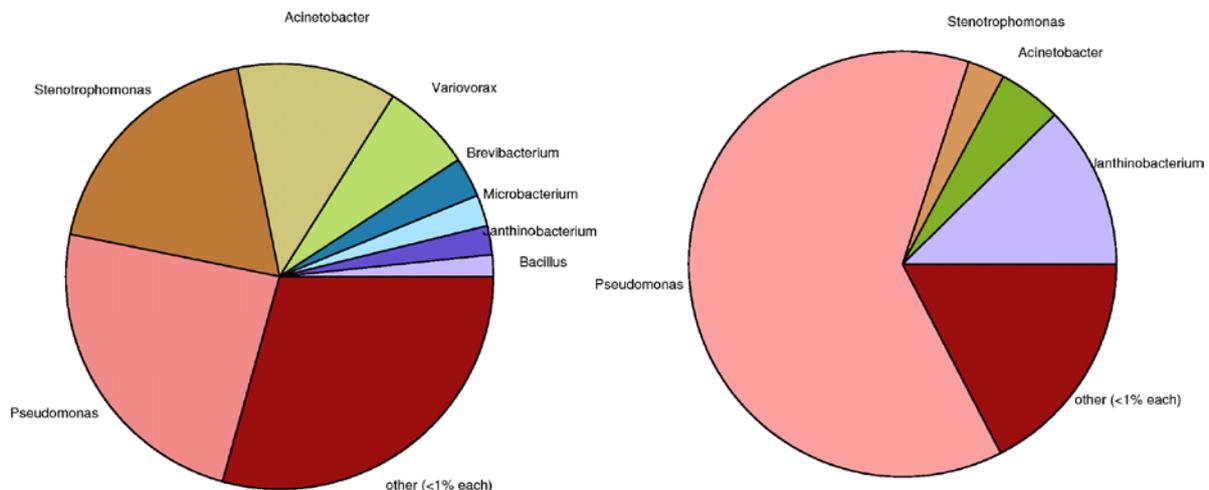


Abbildung 3.14: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse der Pyrosequenzierung der Wasserprobe HF05 zu den zwei Probenahmezeitpunkten April (links) und Juni 2013 (rechts). Die Auswertung erfolgte auf Ebene der Gattungen.

Aus den Ergebnissen lassen sich mehrere direkte Aussagen ableiten, nämlich

- dass die Probe HF05 von Pseudomonaden und Xanthomonaden (siehe Tabelle 3.8) dominiert wurde,
- dass die Diversitäten in allen drei Grundwasserproben aus der Kontaminationsfahne (FB01, HF05 und KS06) in der Juniprobe gegenüber April reduziert waren (vergl. mit Abb. 3.15) und
- dass die Diversitäten der Proben aus der Kontaminationsfahne geringer waren als jene der oberstromigen Grundwasserproben.

Eine Beeinflussung der Keimzusammensetzung als Folge der Kontamination ist mit dieser orientierenden Untersuchung nicht gesichert, aber doch wahrscheinlich anzunehmen. Das gehäufte Auftreten von Pseudomonaden und Xanthomonaden ist als Hinweis für eine Anpassung des natürlich vorhandenen, diversen mikrobiellen Konsortiums als Reaktion auf einen Substanzeintrag am kontaminierten Standort zu sehen. Die Besiedelung der Schlammprobe aus der Abwassergrube mit Pseudomonaden weist ebenfalls darauf hin, dass Vertreter dieser Familie sich in Gegenwart von Organochlor- oder Organophosphorpestiziden anreichern können. Der biologische Abbau dieser Substanzen durch Bakterien der Gattung *Pseudomonas* wird in vielen Literaturstellen beschrieben, als Beispiele seien auszugsweise genannt: Namab et al. (2003), Aislabie & Lloyd-Jones (1995).

Mikrobiologie aus den Anreicherungskulturen

Aus den Anreicherungskulturen wurden zu Versuchsende die Keimzahlen auf Plate Count Agar bei 22°C und 37°C Bebrütungstemperatur bestimmt, sowie eine Metagenomanalyse zur geplanten Auswertung mittels DGGE vorbereitet. Der Untersuchung der Grundwasserproben wurde Priorität eingeräumt, die verfügbaren Ergebnisse sind in Tabelle 3.9 dargestellt.

Tabelle 3.9: Keimzahlbestimmungen aus den Anreicherungskulturen.

Keimzahlen der Anreicherungskulturen, alle Werte als KBE / mL						
Temp.	Clopyralid	Flumetsulam	Florasulam	Dicamba	Thiamethoxam	Chlorpyrifos
22°C	54.000	134.000	65.000	57.000	28.000	80.000
37°C	40.000	45.000	52.000	42.000	30.000	29.000

Nachdem die Anreicherungsversuche bei Raumtemperatur (ca. 20-21°C) inkubiert wurden, sind die Keimzahlen für 37°C erwartungsgemäß tendenziell niedriger als die bei 22°C. Die Keimzahlen waren im Anreicherungsansatz mit Thiamethoxam deutlich niedriger als in den anderen Ansätzen. Inwieweit die erhöhte 22°C-Keimzahl des Ansatzes mit Flumetsulam auf eine Anreicherung zurückzuführen ist, muss bis auf Weiteres unbeantwortet bleiben.

Zusammenfassung

Es wurden Grundwasserproben, Reinsubstanzen und Proben aus Versuchsansätzen zum biologischen Pestizidabbau untersucht. Zum Einsatz kamen Biotests mit insgesamt vier Testorganismen (alle Probentypen), konventionelle mikrobiologische Untersuchungen (Grundwasser und Versuchsansätze) und molekularbiologische Untersuchungen (Grundwasser, Abbauansätze).

Über die drei Probenahmezeitpunkte zwischen April - August 2013 zeigten die drei **Grundwasserproben** zwar leicht unterschiedliche, aber tendenziell geringe bis mäßige Hemmwirkungen für Daphnien und mäßige bis erhöhte hemmende Effekte für Wasserlinsen. Die Messwerte können zum Teil aus den Pestizidgehalten der Proben und zum Teil aus den gelösten Mineralstoffen (Wasserhärte) erklärt werden (vergleiche mit Arbeitspaket 1, Charakterisierung der Grundwasserproben). Eine ökotoxische Wirkung für Leuchtbakterien oder Grünalgen konnte nicht gemessen werden. Die während einer Starkregenperiode entnommenen Proben zeigten erhöhte Keimzahlen, zu den beiden anderen Zeitpunkten waren sie unauffällig. Eine ähnliche, einmalige Abweichung im Juni zeigten die Metagenomanalysen mittels DGGE. Aus der Pyrosequenzierung kann eine veränderte Verteilung von Keimgruppen abgelesen werden, voraussichtlich in Anpassung an die Situation im kontaminierten Grundwasserkörper. Die natürlich im Wasser vorkommenden Keimgattungen *Xanthomonas* und *Pseudomonas* waren mit großer Wahrscheinlichkeit maßgeblich an biologischen Abbauvorgängen beteiligt, was sich im Auftreten der Abbaumetaboliten widerspiegelt. Eine in gleicher Richtung erfolgte Anpassung (*Pseudomonas*) war im Schlamm der Abwassergrube erkennbar. Die Hoffnung auf einen natürlichen biologischen Abbau der als Kontamination eingetragenen Inhaltsstoffe liegt bei den *Pseudomonaden*.

Von den **Reinsubstanzen** wurden durchgehend Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen bis zur maximalen Konzentration von 1 mg/L mit allen vier Testorganismen erstellt. Nennenswerte Toxizitäten zeigten erwartungsgemäß Flumetsulam und Florasulam für Wasserlinsen sowie Clopyralid, Dicamba und Chlorpyrifos für Daphnien.

Aus den **Abbauversuchen** ergaben sich keine Auffälligkeiten in den Biotests, abgesehen von einer leicht erhöhten Hemmwirkung gegen Grünalgen sowie etwas erhöhten Keimzahlen zu Versuchsende der belüfteten Bioreaktorversuche. Dies konnte für Versuche in Aquifersäulen, die nicht mit Druckluft aerobisiert wurden, nicht beobachtet werden. Die Metagenome der Proben zu Ende der Bioreaktorversuche waren deutlich unterschiedlich, abgesehen vom wiederholten Auftreten von Bakterien der Gattung *Pseudomonas*. Die Keimzahlanalysen aus den **Anreicherungskulturen** ergaben keinen eindeutigen Trend und keinen gesicherten Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen möglicher biologischer Abbaubarkeit eines Pestizids und einer Zunahme von im Labor auf Platecount Agar kultivierbaren Keimen.

Literaturverzeichnis

Aislabie J. & Lloyd-Jones G., (1995): A Review of Bacterial Degradation of Pesticides. *Australian Journal of Soil Research*, 33, 925-942.

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.

Christensen E.R. & Nyholm N., (1984): Ecotoxicological Assays with Algae: Weibull Dose-Response Curves. *Environ. Sci. Technol.* 18(9), 713-718.

Cole J.R., Wang Q., Cardenas E., Fish J., Chai B., Farris R.J., Kulam-Syed-Mohideen A.S., McGarrell D.M., Marsh T., Garrity G.M., Tiedje J.M., (2009): The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic acids research*, 37, D141-D145.

Diez B., Pedros-Alio C., Marsh T.L., Massana R., (2001): Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) To Study the Diversity of Marine Picoeukaryotic Assemblages and Comparison of DGGE with Other Molecular Techniques, *Applied Environmental Microbiology*, 67, 2942-2951.

EC, Health & Consumer Protection Directorate-General, (2006): Report – Thiamethoxam, SANCO / 10390 / 2002 - rev. final 14 July 2006.

Edgar R.C., Haas B.J., Clemente J.C., Quince C., Knight R., (2011): UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27, 16:2194-2200.

EN ISO 11348-3, (2009): Water quality - Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) - Part 3: Method using freeze-dried bacteria. ASI, Vienna.

IUPAC, (2014): IUPAC - global availability of information on agrochemicals. Verfügbar am 31. 1. 2014: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/>.

Handling of Chemicals, (2013): <http://www.hdcchem.com/index.html>; Verfügbar am 25. 2. 2013.

Li W. & Godzik. A., (2006): A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22(13), 1658-1659.

Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G., (1993): Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (3), 695-700.

Nawab A., Aleem A., Malik A., (2003). Determination of organochlorine pesticides in agricultural soil with special reference to γ -HCH degradation by *Pseudomonas* strains. *Bioresearch Technology*, 88, 41-46.

OECD 201, (2011): Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*. Paris.

OECD 202, (2004): *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*. Paris.

OECD 221, (2006): *Lemna* sp. Growth Inhibition Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*. Paris.

Federhen S., (2012): The NCBI Taxonomy database. *Nucleic acids research*, 40, D136-D143.

R Development Core Team (2010): R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

The Human Microbiome Project Consortium, (2012): A framework for human microbiome research. *Nature*, 486 (7402), 215-221.

Tomlin CDS (ed.), 2002: The e-Pesticide Manual. Version 2.2, British Crop Protection Council. Verfügbar am 31. 1. 2014: <http://www.bcpbookshop.co.uk>.

USFS, 2004: Clopyralid Human Health and Ecological Risk Assessment Final Report. Prepared for the US Forest Service by Syracuse Environmental Research Associates, Inc. Report No. SERA TR 04-43-17-03c. Verfügbar über: <http://www.fs.fed.us/foresthealth/pesticide/risk.shtml>.

Van Elsas J.D. & Smalla K., (1995): Extraction of microbial community DNA from soils. *Molecular microbial ecology manual*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.



Arbeitspaket 4

Wirkungsbezogene Bewertung mittels Zellkulturtests

Zielsetzung im Arbeitspaket

In diesem Arbeitspaket wurde eine Testbatterie basierend auf humanen Zellkulturen verwendet, um mögliche toxische Wirkungen der das Grundwasser kontaminierenden Pestizide zu erfassen. Wie schon im Arbeitspaket 3 „Ökotoxikologie und Mikrobiologie“ erwähnt, war dabei nicht eine analytische Kontrolle der Einhaltung bzw. Überschreitung von Grenzwerten die Zielsetzung, sondern die Ergründung von möglichen toxischen Wirkungen der Umweltverunreinigung in ihrer Gesamtheit als komplexe Proben. Zusätzlich wurde auch eine Toxizitätsanalyse der einzelnen Pestizide mit Verdünnungsreihen der Reinsubstanzen durchgeführt, da kaum Daten über deren Toxizität auf humane Zellkulturen bekannt sind.

Die dabei zum Einsatz kommende Testbatterie umfasste zwei humane Tumorzelllinien, HepG2 und MCF-7, die in einer Vielzahl an toxikologischen Untersuchungen als „klassische“ Modellsysteme für Leber und Brustepithel eingesetzt werden. Zusätzlich wurden zwei Zelllinien verwendet, die in unserem Labor durch Einbringen der katalytischen Untereinheit humaner Telomerase immortalisiert und charakterisiert wurden. Obwohl diese beiden Zelllinien kontinuierliches Wachstum zeigen und damit als standardisierbares Testsystem zur Verfügung stehen, sind ihre Schlüsselcharakteristika unverändert – diese Zellen bleiben also so nah als möglich an jenem Verhalten, das diese Zellen auch *in vivo* im Menschen haben. Diese beiden Zelllinien sind proximale Tubulusepithelzellen aus der Niere (RPTEC/TERT1) als Modell für Nierentoxizität und Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (HUVEC/TERT7) als Modell für das Gefäßsystem.

Um mögliche adverse Wirkungen festzustellen, wurden Grundwasserproben vom kontaminierten Standort sowie Proben der Abbauprobe in diesen Zellsystemen auf ihre wachstumshemmende, DNA schädigende und stressinduzierende Wirkung untersucht. Um die endokrin disruptierende Wirkung zu untersuchen, wurde das CALUX System verwendet. Dabei handelt es sich um Reporterzellen, die auf endokrine Disruptoren mit leicht detektierbaren fluoreszenten Signalen reagieren.

Materialien und Methodik

Zellkultur – Zelllinien

RPTEC/TERT1 Zellen (Evercyte GmbH) werden in ProxUp Medium (Evercyte GmbH) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zum Passagieren wird das Medium zunächst entfernt und der Zellrasen zweimal mit Phosphatpuffer (PBS, PAA) gewaschen. Danach werden 0,5 mL 0,25% Trypsin (Invitrogen) + 0,02% EDTA (Sigma Aldrich) per T25 Kulturflasche beigegeben und die Zellen bei 37°C inkubiert. Nach vollständiger Ablösung (ca. 5 Minuten) werden 0,25 mL Trypsininhibitor (Sigma) beigegeben, die Zellen in 5 mL PBS aufgenommen und für 5 Minuten bei 170 g zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt, das Pellet wird in frischem Medium resuspendiert und die resultierende Zellsuspension in neue Kulturflaschen oder Well-Platten überführt. Routinemäßig werden die Zellen zweimal wöchentlich in einem Passage-Verhältnis von 1:3 passagiert. Abbildung 4.1 A zeigt die typische epitheliale Morphologie konfluenten RPTEC/TERT1 Zellen.

HUVEC/TERT7 Zellen (Evercyte GmbH) werden in EndoUp-2 Medium (Evercyte GmbH) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Für die Adhäsion der Zellen werden die Kulturflaschen mit Gelatine vorbehandelt. Dafür werden die Kulturflaschen mit 1 mL Gelatinelösung (1% ig) per T25 cm² für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wird die überschüssige Gelatinelösung entfernt und die Kulturflaschen einmal mit PBS gewaschen. Zum Passagieren wird das Medium zunächst entfernt und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen. Danach werden 0,5 mL 0,1% Trypsin + 0,02% EDTA per T25 Kulturflasche beigegeben und bei 37°C inkubiert. Nach kompletter Ablösung (ca. 5 Minuten) werden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und die Zellsuspension in neue Kulturflaschen oder Well-Platten eingesät. Das Passage-Verhältnis beträgt zweimal in der Woche 1:4. Abbildung 4.1 B zeigt die typische epitheliale Morphologie von HUVEC/TERT7 Zellen.

MCF-7 Zellen werden in MEM Earls Salt (Biochrom) mit 2 mM L-Glutamin (Biochrom), 1 mM Na-Pyruvat (Biochrom), 1 x Nichtessentielle Aminosäuren (Biochrom), 0,01 mg/mL Insulin (Sigma Aldrich) und 10% FCS (PAA) kultiviert. Zum Passagieren wird das Medium zunächst entfernt und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen. Danach werden 0,5 mL 0,25% Trypsin + 0,02% EDTA per T25 Kulturflasche beigegeben und die Zellen bei 37°C inkubiert. Nach kompletter Ablösung (ca. 5 Minuten) werden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und in neue Kulturflaschen oder Well-Platten eingesät. Das Passage-Verhältnis beträgt zweimal in der Woche 1:3. Abbildung 4.1 C zeigt die typische Morphologie von MCF-7 Zellen.

HepG2 Zellen werden in DMEM/HAM's F12 (Biochrom) mit 4mM L-Glutamin und 10% FCS in mit Collagen (Sigma Aldrich) beschichteten Kulturflaschen (1 mL / 25 cm² 1:60 verdünnt; inkubiert für mindestens 1 h, dann entfernt vor dem Einsäen der Zellen) kultiviert. Zum Passagieren wird das Medium zunächst entfernt und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen. Danach werden 0,5 mL 0,25% Trypsin + 0,02% EDTA per T25 Kulturflasche beigegeben und die Zellen bei 37°C inkubiert. Nach kompletter Ablösung (ca. 5 Minuten) werden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und in neuen Kulturflaschen oder Well-Platten eingesät. Das Passage-Verhältnis beträgt zweimal in der Woche 1:3. Abbildung 4.1 D zeigt die typische Morphologie von HepG2 Zellen.

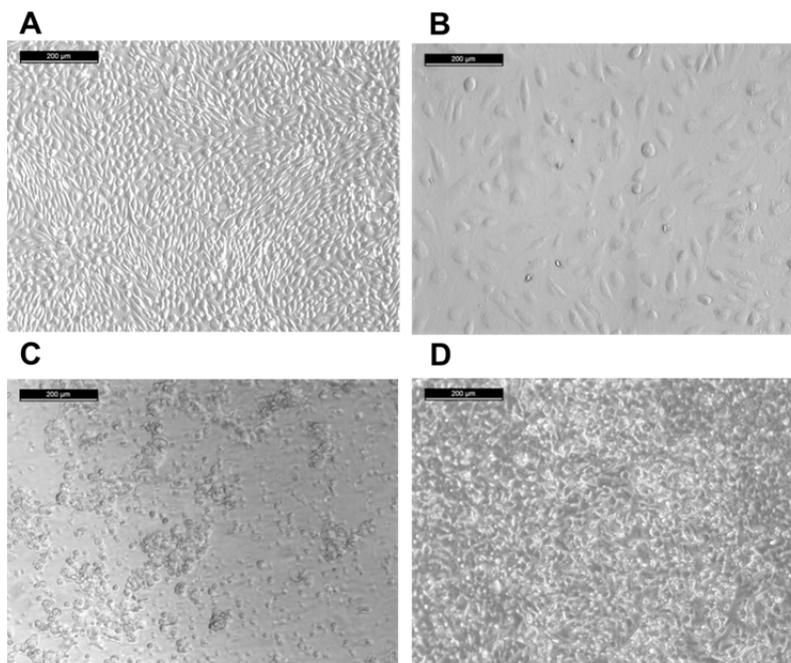


Abbildung 4.1: Typische Morphologien der in dieser Studie verwendeten Humanzellkulturen. (A) RPTEC/TERT1, (B) HUVEC/TERT7, (C) MCF-7 und (D) HepG2.

Untersuchte Grundwasserproben

Wasserproben wurden aus insgesamt drei Messstellen des kontaminierten Standortes entnommen (siehe dazu Arbeitspaket 1). Diese haben einen breiten Bereich an Pestizidbelastung umfasst:

- MK-FB01 („niedrig belastet“)
- MK-KS06 („mittel belastet“)
- MK-HF05 („hoch belastet“)

Die Messstellen wurden nach der am jeweiligen Standort vorliegenden Pestizidbelastung ausgewählt. In der am höchsten belasteten Probe MK-HF05 wurden folgende Konzentrationen der sechs untersuchten Pestizide gemessen (Tabelle 4.1):

Tabelle 4.1: Gemessene Konzentrationen der im Grundwasser enthaltenen Pestizide.

Konzentration der Pestizide in MK-HF05			
Substanz	Molare Masse [g/mol]	Gemessene Konz. [µg/L]	Gemessene Konz. [µM]
Clopyralid	192	64,2	0,3
Dicamba	221	< NWG*	< NWG
Florasulam	359	1,29	0,004
Flumetsulam	325	1,64	0,005
Thiamethoxam	292	3,99	0,014
Chlorpyrifos	351	< NWG	< NWG
*) Nachweisgrenze			

Wasserproben wurden zu vier verschiedenen Zeitpunkten entnommen und untersucht: 8. April, 5. Juni, 19. August und 18. November 2013.

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte auf zwei Arten:

Sterilfiltration der Wasserproben (SF)

Dabei wurden die Proben zunächst mit 0,955 g PBS (MERCK) per 100 mL Wasserprobe isotoniert. Diese wurden dann mithilfe eines Filters mit Porengröße 0,22 µm sterilfiltriert. Die so verarbeiteten Wasserproben wurden lichtgeschützt bei 4°C gelagert und für weitere Experimente verwendet.

Beigabe von Antibiotika (AB)

Die Proben wurden zunächst mit 0,955 g PBS (MERCK) per 100 mL Wasserprobe isotoniert. Die Wasserproben wurden dann lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Beim Einsetzen in Experimenten wurde den Proben 100 Units Penicillin und 0,1 mg/mL Streptomycin als Antibiotika zugesetzt.

Vor Verwendung wurden die Wasserproben im Verhältnis 1:1 mit dem entsprechenden Zellkulturmedium vermischt und die Zellen damit behandelt.

Zusätzlich wurden die Wasserproben der zweiten Probenahme 5000-fach durch Solid Phase Extraktion aufkonzentriert (durchgeführt am Österreichisches Forschungsinstitut für Chemie und Technik / OFI), die Extrakte in DMSO aufgenommen und mittels MTT-Assay auf Zytotoxizität untersucht.

Untersuchung der Abbauersuche

Um Veränderungen der Hemmwirkung auf humane Zelllinien durch Pestizidabbau zu erfassen, wurden Proben der Versuchsansätze „Abbau in Bioreaktoren“ und „Abbau in Aquifersäulen“ (siehe Arbeitspaket 1) untersucht.

Für folgende Abbauersuche in Bioreaktoren wurden Tests mit humanen Zellkulturen durchgeführt:

- GW/N/B (Grundwasser HF05, Nährstoffe, belüftet)
- GW/A/N/B (Grundwasser HF05, Nährstoffe, Aquifermaterial, belüftet)
- GW/A (Grundwasser HF05, Aquifermaterial)
- GW/A/N/B/AK (Grundwasser HF05, Aquifermaterial, Nährstoffe, belüftet, HgCl₂)

Hierfür wurden Aliquots der vier Proben isotoniert, Antibiotika beigegeben und dann mittels MTT-Assay untersucht.

Für folgende Abbauersuche in Aquifersäulen wurden Tests mit humanen Zellkulturen durchgeführt:

- N/B: Zusatz von Nährstoffen (N), Belüftung (B)
- N/B/I: Zusatz von Nährstoffen (N), Belüftung (B), Inokulation (I)



Dazu wurde der Hauptversuch (Säule 1, N/B) bei Start und Ende des Experiments getestet, sowie eine potentielle Beeinflussung von humanen Zellkulturen durch Inokulation (Säule 2, N/B/I) untersucht:

- Probe 1: Säule 1 (N/B) Start
- Probe 2: Säule 1 (N/B) Ende
- Probe 3: Säule 2 (N/B/I) nach Inokulation

Hierfür wurden Aliquote der Proben sterilfiltriert und dann mittels MTT-Test und Comet-Test untersucht.

Untersuchte Pestizide

Die einzelnen Substanzen wurden als Reinsubstanzen von Sigma Aldrich bezogen und mit DMSO eine Stammlösung mit 100 mM hergestellt. Eine Verdünnungsreihe in 1:2 Verdünnungsschritten von 512 µM bis 4 µM wurde in den Zellkulturtests gemessen, wobei als Kontrolle (Vehikel) DMSO in jener Konzentration eingesetzt wurde, in welcher es auch im höchstkonzentrierten Ansatz (512 µM) vorkam. Zusätzlich wurde eine Mischung der Einzelsubstanzen Clopyralid, Florasulam und Flumetsulam auf einen möglichen synergistischen Effekt untersucht, wobei ein Gemisch von 512 µM Clopyralid, 8 µM Florasulam und 9 µM Flumetsulam eingesetzt wurde. Diese Mischung wurde in 1:2 Verdünnungsstufen bis auf eine Konzentration von 4 µM (Clopyralid), 0,06 µM (Florasulam) und 0,07 µM (Flumetsulam) verdünnt und im Zellkulturtest eingesetzt. Zusätzlich wurde die wachstumshemmende Wirkung des Thiamethoxam Metaboliten CGA 355190 im MTT-Test bestimmt.

Zu den einzelnen Pestiziden wurde im Vorfeld eine Literaturrecherche durchgeführt, um eventuell bereits vorliegende Informationen über toxikologische Wirkungen in Zellkulturen zu erfassen. Nachfolgend sind auch die vorgefundenen Konzentrationen des jeweiligen Pestizids angegeben (Probenahme vom 8. April 2013).

Clopyralid

Es wurde keine Literatur zur Wirkung von Clopyralid auf Zellkulturen vorgefunden, mit Ausnahme einer Bewertung als Substanz, die wahrscheinlich keine Kanzerogenität aufweist (USEPA, 2006). Clopyralid wurde in der Messstelle MK-HF05 mit einer Konzentration von 64,2 µg/L nachgewiesen.

Dicamba

Dicamba wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen auf seine Wirkung auf Zellkulturen untersucht. Dabei konnte eine Gentoxizität auf humane Lymphozyten (González et al., 2006; Perocco et al., 1990) und Chinese Hamster Ovary Zellen (CHO) (Sorensen et al., 2005) nachgewiesen werden. Dicamba konnte in der Messstelle MK-HF05 nicht nachgewiesen werden.

Florasulam

Für Florasulam konnte in Lymphozyten von Ratten keine Gentoxizität nachgewiesen werden (USEPA, 2007a). Florasulam wurde in der Messstelle MK-HF05 mit einer Konzentration von 1,29 µg/L nachgewiesen.

Flumetsulam

Für Flumetsulam konnte keine Literatur bezüglich toxikologischer Untersuchungen auf Zellkulturen gefunden werden. Flumetsulam wurde in der Messstelle MK-HF05 mit einer Konzentration von 1,64 µg/L nachgewiesen.

Thiamethoxam

Thiamethoxam wies in Ratten-Hepatocyten keine Gentoxizität auf (CEP Agency, 2008) und führt auch zu keiner Chromosomenveränderung in CCL61 Zellen (CEP Agency, 2008). Für den Thiamethoxam-Metaboliten CGA 330050 wurde Lebertoxizität und Leberkarzinogenität beschrieben (Green et al., 2005). Dieser Metabolit wird mit der quantitativen Messmethode erfasst, er wurde jedoch in den im Rahmen dieses Forschungsprojektes durchgeführten Analysen nie nachgewiesen. Thiamethoxam wurde in der Messstelle MK-HF05 mit einer Konzentration von 3,99 µg/L nachgewiesen.

Chlorpyrifos

Chlorpyrifos wurde bereits eingehend hinsichtlich seiner Wirkung auf Zellkulturen untersucht und in der Literatur vielfach beschrieben. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass Chlorpyrifos beim Menschen durch Inhibition der Acetylcholinesterase Übelkeit, Schwindelgefühl bis zu Atembeschwerden induziert und sogar tödlich sein kann (Foxenberg et al., 2007; USEPA, 2007b; Won et al., 2001). Außerdem induziert Chlorpyrifos bei menschlichen U937 Zellen programmierten Zelltod (Apoptose) (Nakadai et al., 2006). Zusätzlich konnte auch eine endokrine Wirkung nachgewiesen werden (Grünfeld et al., 2004; Ventura et al., 2012; Vinggaard et al., 2000). Gentoxische Effekte konnten bis jetzt nicht nachgewiesen werden (CEP Agency, 2007; Cui et al., 2006; Muscarella et al., 1984). Chlorpyrifos konnte in der Messstelle MK-HF05 nicht nachgewiesen werden.

MTT-Test – Untersuchung von Zellwachstum

Der MTT-Test (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird eingesetzt, um die metabolische Aktivität von Zellen über NAD(P)H-abhängige Enzyme zu bestimmen, kann aber auch eingesetzt werden, um Zytotoxizität und den Einfluss von Substanzen auf Zellproliferation zu messen. Dabei wird das gelbe, wasserlösliche MTT von den Zellen aufgenommen und in metabolisch aktiven Zellen zu blauem, wasserunlöslichen Formazan reduziert, welches nach Lösen der Kristalle photometrisch gemessen werden kann. Da die Anzahl metabolisch aktiver Zellen mit der Farbintensität des gemessenen Formazans korreliert, kann man konzentrationsabhängige, proliferative oder zytotoxische Effekte von Testsubstanzen auf Zellen bestimmen.

Die Zellen wurden in den inneren Wells einer 96-Well Platte eingesät. Die äußeren Wells wurden mit 200 µL PBS aufgefüllt, um Verdunstungseffekte auszuschließen. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 70-90% erreichten, wurden sie mit Testmedium (Zellkulturmedium mit Einzelsubstanzen oder Wasserproben) behandelt und für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurde das Medium auf 100 µL per Well reduziert (falls die Zellen mit einem höheren Volumen als 100 µL eingesät wurden) und dann 10 µL MTT-Lösung (2 µg/µL Promega) per Well hinzugefügt. Die Zellen wurden dann für weitere 4 h inkubiert. Danach wurden 100 µL einer 10% SDS-Lösung in 0,01 M HCl per Well beigegeben. Die Platte wurde dann für weitere 20 h inkubiert und nachfolgend mittels Infinite[®] M200 Microplatereader (Tecan) die Absorption bei 570 nm gemessen (690 nm als Referenz). Der Referenzwert, welcher bei 690 nm gemessen wurde, wurde von den bei 570 nm gemessenen Werten abgezogen. Die Werte wurden schließlich in Prozent der 100%-igen Viabilität angegeben. Die statistische Beurteilung wurde mittels ANOVA durchgeführt. IC₅₀ Werte wurden nicht kalkuliert, da dazu sehr hohe Konzentrationen an Pestiziden erforderlich gewesen wären, die weit über den am kontaminierten Standort vorliegenden Konzentrationen liegen.



Comet-Test – Untersuchung auf DNA Schädigung

Beim Comet-Test (Einzelzellgelelektrophorese) handelt es sich um eine Methode, mit der man eine Vielzahl von DNA Schäden in Einzelzellen nachweisen kann. Der Test beruht auf dem Prinzip, dass lysierte Zellen in einem Agarosegel eingebettet werden und die im elektrischen Feld negativ geladene DNA zum Pluspol wandert. Je kleiner die DNA Fragmente sind, also je mehr DNA Strangbrüche vorhanden sind, desto weitere Strecken können zurückgelegt werden. Während also chromosomale, intakte DNA aufgrund ihrer Größe nicht im Agarosegel wandern kann, wird geschädigte DNA, welche den Zellkern verlassen kann, nach Anfärben mit fluoreszierenden DNA Farbstoffen, als Schweif aus DNA Bruchstücken sichtbar. Abbildung 4.2 zeigt DNA von intakten bzw. geschädigten Zellen nach Wanderung im elektrischen Feld (von links nach rechts). Dieses sensitive Testsystem kann sehr hohen Schwankungen unterliegen, was eine vorsichtige Interpretation der erhaltenen Daten voraussetzt.

Mit Substanzen / Wasserproben behandelte Zellen wurden von den Zellkulturgefäßen abgelöst und in PBS resuspendiert, um eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/mL zu ergeben. 40 μL dieser Zellsuspension wurden mit 400 μL Low Melting Point Agarose (0,5% in PBS) gemischt. 100 μL dieser Mischung wurden per Slide verwendet, welche zuvor mit High Melting Point Agarose beschichtet wurden (1% in H_2O), womit letztendlich eine Endkonzentration von ungefähr 20.000 Zellen pro Slide erreicht wird. Anschließend wurde eine Zelllyse mit einer über 1 h auf 4°C vorgekühlten Lysislösung (2,5 M NaCl, 100 mM Natrium EDTA, 10 mM Tris-HCl; pH von 10 eingestellt, 1% Triton X-100, 10% DMSO) durchgeführt. Nach der Lyse wurden die Slides für 20 Minuten in frischen, vorgekühlten Elektrophoresepuffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA pH >12.6) getaucht. Die Elektrophorese wurde dann bei 300 mA (~25 V) für 20 Minuten durchgeführt. Daraufhin wurden die Slides für 20 Minuten mit einem Neutralisationspuffer gewaschen (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5), gefolgt von einem Waschschrift mit destilliertem Wasser und einer Fixierung der Zellen mit 80%-igem Ethanol. Die Slides wurden daraufhin getrocknet und nach dem Protokoll von Trevigen (Comet Assay Silver Staining Kit[®]) gefärbt. Nach dem Färben und Trocknen der Slides wurden mikroskopisch mindestens 50 Zellen pro Probe aufgrund der Länge und Größe des Kometenschweifs klassifiziert (shorttail/undamaged, mediumtail/damaged, longtail/destroyed). Die Angabe des DNA Schadens erfolgt in Prozent der ausgezählten Zellen.

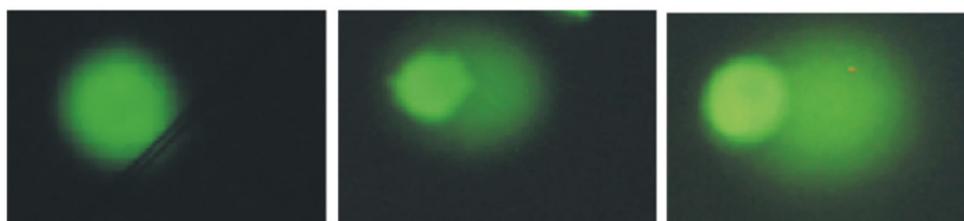


Abbildung 4.2: Typische Bilder von DNA intakter, nicht-geschädigter (undamaged) sowie geschädigter (damaged) und stark geschädigter (destroyed) Zellen (von links nach rechts).

Zusätzliche Untersuchungen auf Gentoxizität (Ames-Test, Mikrokerntest) wurden am Umweltbundesamt in Bad Elster, Deutschland, mit Grundwasserproben vor und nach mikrobieller Abbaubehandlung in Aquifersäulen durchgeführt.

Änderungen im mRNA Expressionslevel

Aufgrund der Behandlung der Zellen mit den jeweiligen Substanzen bzw. Proben, kann es zu Änderungen im Expressionslevel von bestimmten mRNAs kommen. Für die Analyse wurden die Zellen in Kultivierungsgefäßen behandelt und anschließend die RNA isoliert. Die isolierte und aufgereinigte RNA wurde daraufhin in cDNA umgeschrieben, welche dann für quantitative PCR (polymerase chain reaction) eingesetzt werden kann. So können, nach einer Normalisierung gegen ein konstitutiv exprimiertes Gen wie GAPDH, Änderungen im mRNA Expressionslevel bestimmt werden. Im Zuge dieser Studie wurde der Expressionslevel des Tumorsuppressorgens p53, eines wichtigen Regulators des Zellzykluses und der Viabilität der Zellen, untersucht.

RNA-Isolation

Nach Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen bzw. den Wasserproben für 24 Stunden, wurden diese von der Kulturschale abgelöst, zentrifugiert und mit 0,5 mL Trizol (Sigma Aldrich) vermischt. Die Probe wurde dann für 15 Sekunden gut gemischt, 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und erneut gemischt. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proben bei minus 80°C gelagert.

Zur Isolierung der RNA wurden 0,2 mL Chloroform (Merck) per 1 mL Trizol beigegeben, für 15 Sekunden gut gemischt, gefolgt von einer Inkubation bei Raumtemperatur für 3 Minuten. Nach Zentrifugation (12.000 g für 15 Minuten bei 4°C) wurde die wässrige Phase in ein frisches RNase-freies Röhrchen überführt, welche mit 0,5 mL Isopropanol pro 1 mL Trizol Reagenz versetzt und gut gemischt wurde. Die Proben wurden dann bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert, gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 Minuten bei 12000 g bei 4°C). Anschließend wurde das Pellet mit 75%-igem Ethanol (1 mL pro 1 mL Trizol) gewaschen, die Probe sanft per Hand geschüttelt und nochmals bei 7500 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet für etwa 10 Minuten an der Luft getrocknet. Danach wurde die RNA in 20-40 µL NF-Wasser aufgelöst, gemischt, für 10 Minuten bei 55-60°C inkubiert und anschließend bei minus 80°C gelagert. Die RNA-Konzentration wurde mittels Nanodrop (Thermo Scientific) gemessen.

cDNA-Synthese

RNA wurde zu 500 ng in 7 µL verdünnt und mit 13 µL Dynamo cDNA Kit master mix (1 µL Random Hexamers, 2 µL reverse Transkriptase, 10 µL Reaktionspuffer) vermischt. Die Proben wurden daraufhin mittels eines Thermocyclers umgeschrieben. Folgende Bedingungen wurden zum Umschreiben verwendet: 25°C für 10 Minuten; 37°C für 30 Minuten; 85°C für 5 Minuten; 15°C Pause. Die fertige cDNA wurde dann bei minus 20°C gelagert.

qPCR

Die eingesetzten Standards (GAPDH und p53 amplifiziert aus HUVECs) wurden frisch von einer 10^9 copies/µL Stocklösung verdünnt, indem jeweils 5 µL mit 45 µL NF-Wasser vermischt und gut gemixt wurden. So wurden Standardverdünnungen in einer Reihe von 10^8 bis 10^3 copies/µL erstellt. Die qPCR wird daraufhin unter Verwendung des EvaGreen HOT FIRE Reaktionsmix (Solis BioDyne) nach Herstellerangaben durchgeführt. Jeder Standard wird in Zweifach-, jede Probe in Vierfachbestimmung durchgeführt. Zusätzlich wird NF-Wasser als NTC (No Template Control) eingesetzt. In Tabelle 4.2 sind die verwendeten Primersequenzen aufgelistet.



Tabelle 4.2: Sequenzen der Primer welche zur Analyse der mRNA Expressionen (qPCR) verwendet wurden.

Primersequenzen			
Description	Antisense primer	Sense primer	Length [bp]
GAPDH	CGACCACTTTGTCAAGCTCA	TGTGAGGAGGGGAGATTCAG	210.0
p53	GCTCGACGCTAGGATCTGAC	GCTTCCACGACGGTGAC	97.0

Die im Zuge dieser Studie erhaltenen Daten unterlagen jedoch großen Schwankungen, die eine zuverlässige Interpretation erschweren. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um aussagekräftige Daten zu generieren.

Untersuchung endokriner Wirkungen

Diese Untersuchung wurde extern am Österreichischen Forschungsinstitut für Chemie und Technik (OFI) durchgeführt. Dabei wurden die Proben im Vergleich mit Leitungswasser mittels CALUX System (U2OS Knochenkrebszellen) auf Östrogenwirkung untersucht. Dazu wurden je 1 Liter der Wasserproben mittels Solid Phase Extraktion auf das 5000-fache aufkonzentriert und im Testsystem eingesetzt.

Für die Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde eine definierte Menge an Östrogen zugesetzt und im Bioassay analog zu den Proben gemessen. Die Wiederfindungsrate beschreibt, wie viel der zugegebenen Östrogenmenge bei der Analyse wieder gefunden wurden, und wird folgendermaßen berechnet.

$$\text{Wiederfindung [\%]} = \frac{\text{Östrogenaktivität der mit 8 pmol/L Estradiol dotierten Probe}}{\text{Östrogenaktivität des mit 8 pmol/L Estradiol dotierten Blanks}} * 100\%$$

Die Bestimmung der Wiederfindungsrate ist zur Qualitätssicherung wichtig, um zu überprüfen, ob der Bioassay durch Probenbestandteile gestört wird, die z.B. als Östrogenantagonisten wirken oder die Luciferase-Reaktion stören. Bedingt durch die Schwankungen des Testsystems ist natürlich nicht immer eine Wiederfindungsrate von exakt 100% zu erwarten, eine Wiederfindung zwischen 80 und 120% zeigt bereits, dass die Analyse durch die Probenmatrix nicht wesentlich gestört wird. Bei positiven Proben ist naturgemäß mit einer höheren Wiederfindung zu rechnen, da hier zusätzlich zur Aktivität des dotierten Östrogens noch die Aktivität durch die Probe selbst hinzukommt.

Als Positivkontrolle wurde eine Standardreihe mit sechs Standards im linearen Bereich des Responses auf 17-β-Estradiol (1-10 pmol/L), als Negativkontrolle reines DMSO, sowie der wie die Proben behandelte Blindwert (Leitungswasser) eingesetzt.

Ergebnisse und Diskussion

Untersuchung der einzelnen Pestizide

Um Einblicke in die wachstumshemmenden Wirkungen der einzelnen Zielsubstanzen auf die in dieser Studie zum Einsatz kommenden Humanzellkulturen zu bekommen, wurden Wachstumstests (MTT-Tests) durchgeführt. Dabei wurde eine Verdünnungsreihe der jeweiligen Zielsubstanz (4-512 μM) getestet. Die Ergebnisse werden als Prozentangaben gegenüber einer 100%-igen Viabilität (Wachstum der Zellen in Zellkulturmedium ohne Zugabe von Probe oder Vehikel) angegeben. Abbildung 4.3 zeigt die Ergebnisse der MTT-Tests von HUVEC/TERT7 nach Behandlung mit den einzelnen Pestiziden.

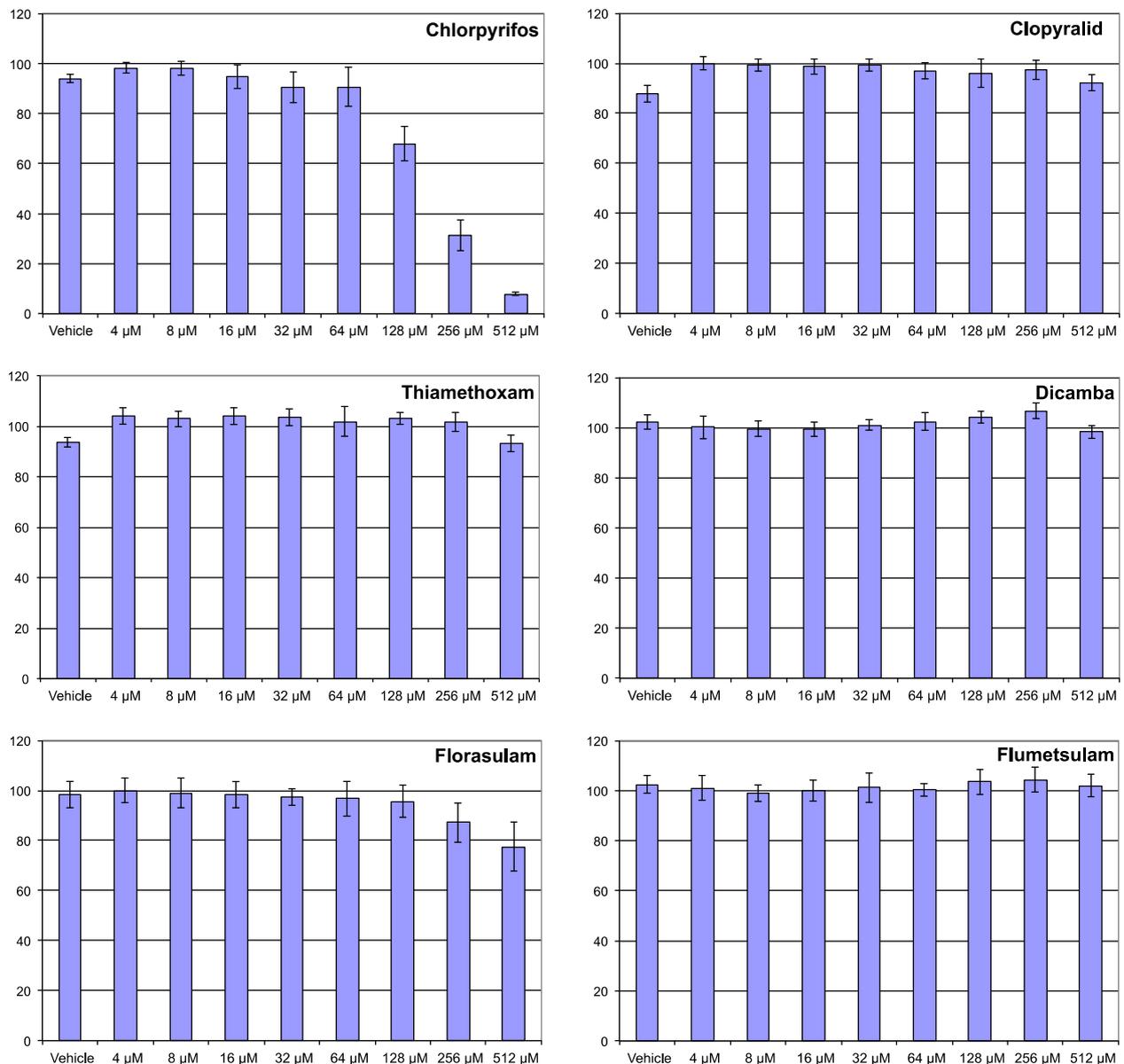


Abbildung 4.3: Ergebnisse der MTT-Tests von HUVEC/TERT7 nach Behandlung mit Chlorpyrifos, Clopyralid, Thiamethoxam, Dicamba, Florasulam und Flumetsulam (X-Achse: eingesetzte Konzentrationen der Einzelsubstanzen, Y-Achse: % Viabilität). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (n=6).



In Abbildung 4.4 sind die Daten der Ergebnisse von RPTEC/TERT1 Zellen nach Behandlung mit den Reinsubstanzen dargestellt.

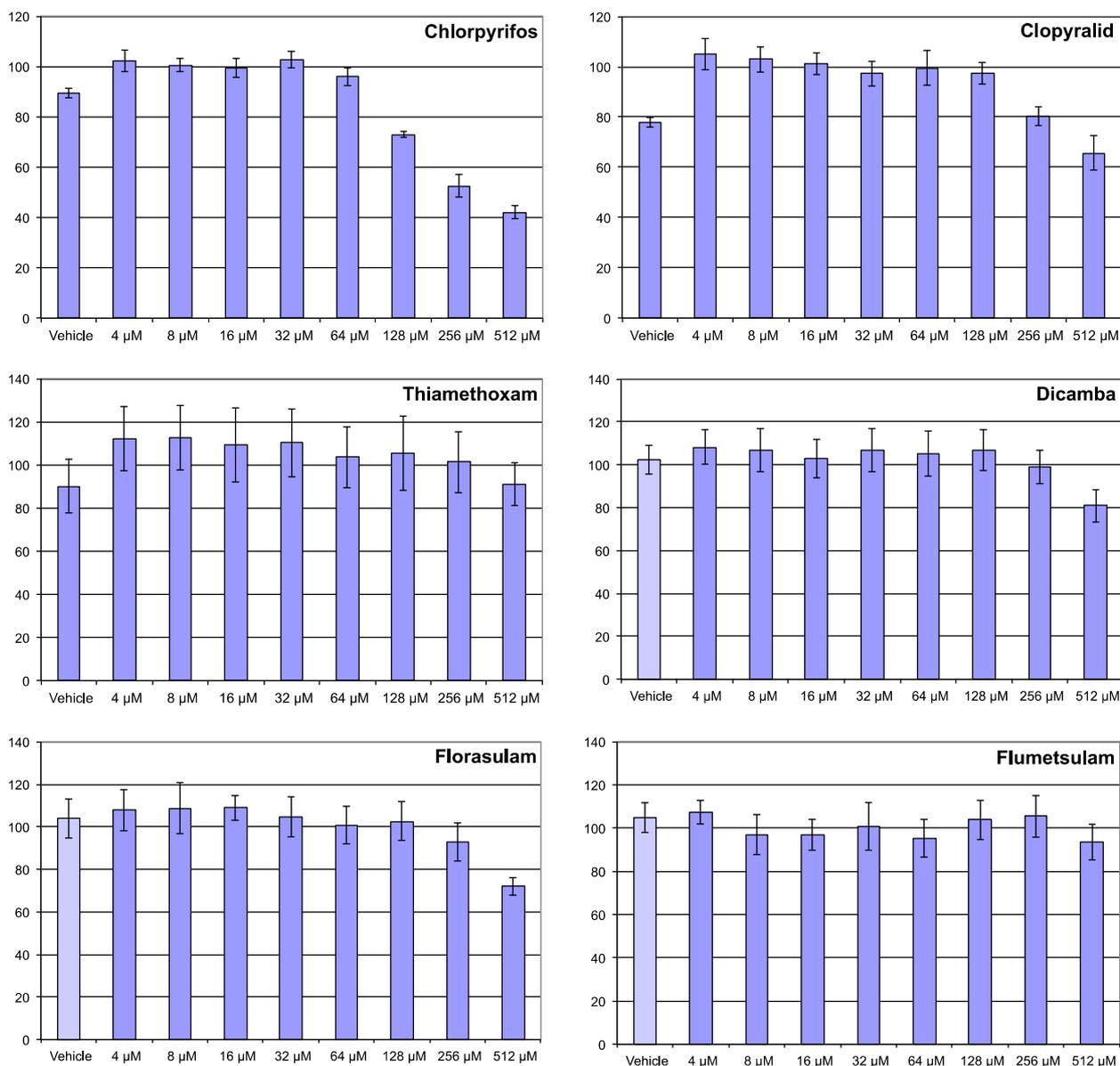


Abbildung 4.4: Ergebnisse der MTT-Tests von RPTEC/TERT1 Zellen nach Behandlung mit Chlorpyrifos, Clopyralid, Thiamethoxam, Dicamba, Florasulam und Flumetsulam (X-Achse: eingesetzte Konzentrationen der Einzelsubstanzen, Y-Achse: % Viabilität). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (n=6).

In Abbildung 4.5 sind die Daten der Ergebnisse von HepG2 Zellen nach Behandlung mit den Reinsubstanzen dargestellt.

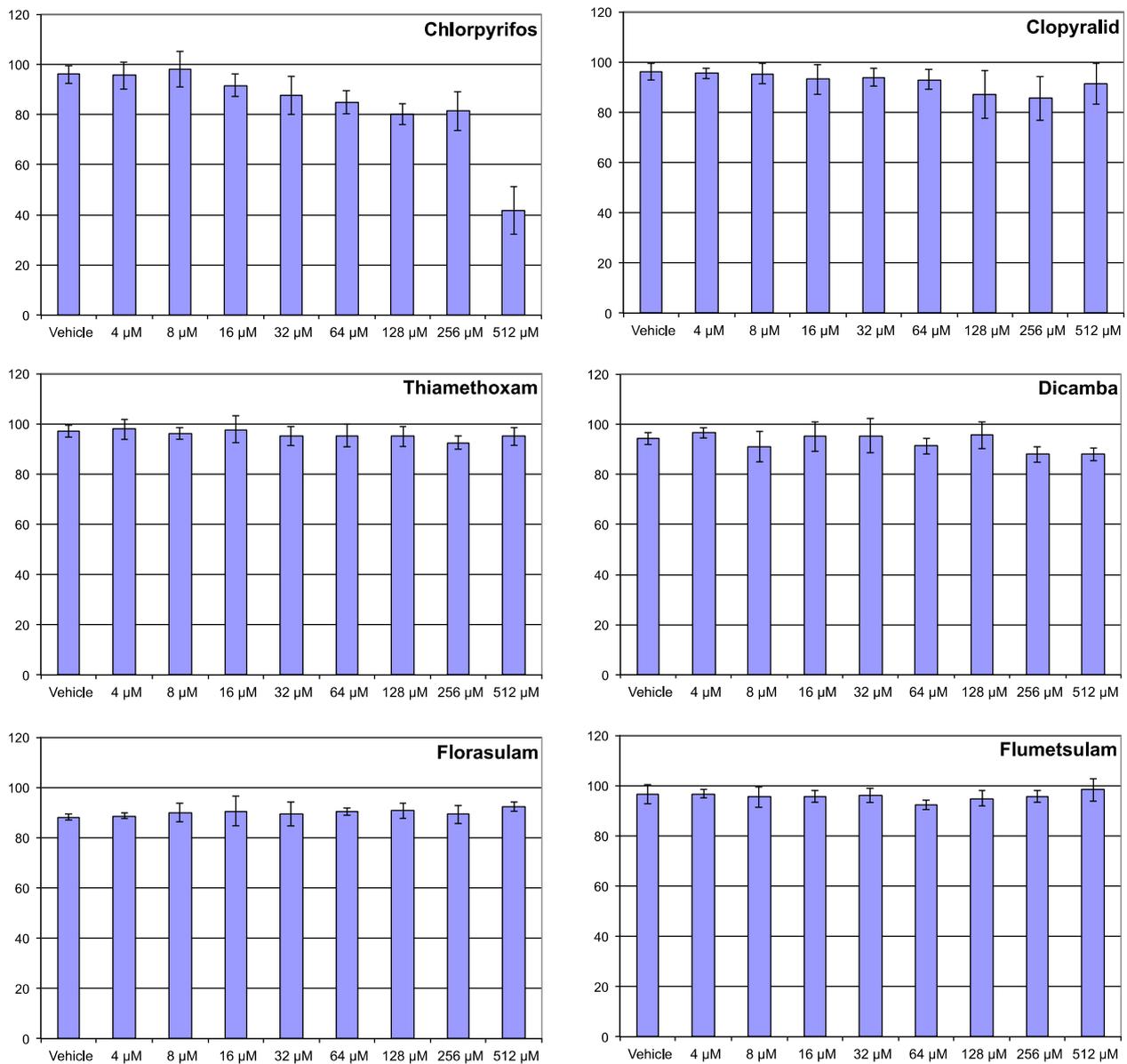


Abbildung 4.5: Ergebnisse der MTT-Tests von HepG2 Zellen nach Behandlung mit Chlorpyrifos, Clopyralid, Thiamethoxam, Dicamba, Florasulam und Flumetsulam (X-Achse: eingesetzte Konzentrationen der Einzelsubstanzen, Y-Achse: % Viabilität). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (n=6).



In Abbildung 4.6 sind die Daten der Ergebnisse von MCF-7 Zellen nach Behandlung mit den Reinsubstanzen dargestellt.

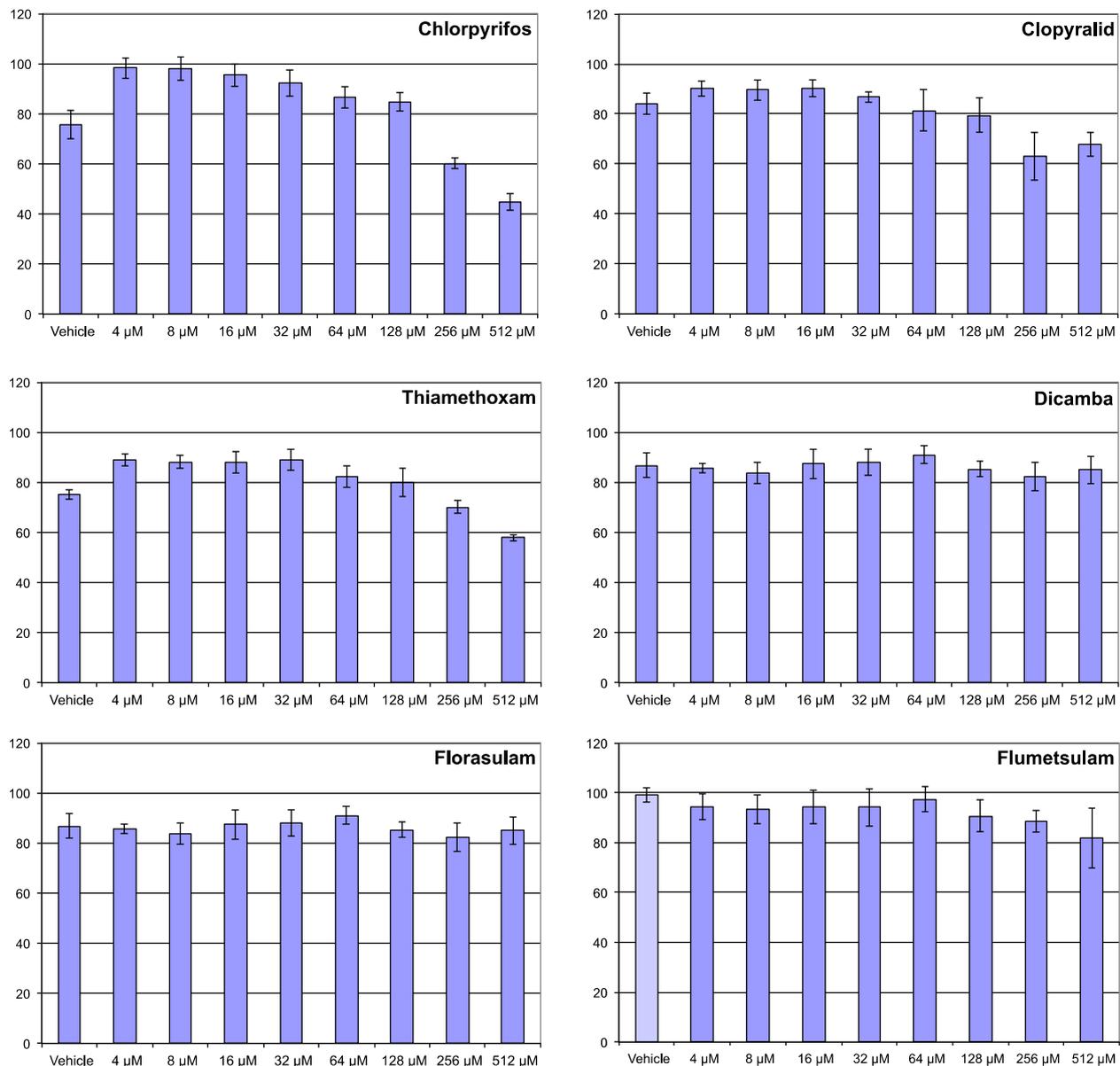


Abbildung 4.6: Ergebnisse der MTT-Tests von MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Chlorpyrifos, Clopyralid, Thiamethoxam, Dicamba, Florasulam und Flumetsulam (X-Achse: eingesetzte Konzentrationen der Einzelsubstanzen, Y-Achse: % Viabilität). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (n=6).

In Tabelle 4.3 sind die Ergebnisse der Wachstumshemmung durch Pestizide auf die humanen Zelllinien HUVEC/TERT7, RPTEC/TERT1, MCF-7 bzw. HepG2 dargestellt. Für jedes einzelne Pestizid wurde die jeweils niedrigste Konzentrationsstufe des Testansatzes aufgelistet, bei der in dem jeweiligen Zellmodell eine signifikante Beeinträchtigung der Zellproliferation erzielt wurde.

Tabelle 4.3: Wachstumshemmung von humanen Zelllinien durch Pestizide, ermittelt mit dem MTT-Test. Angabe der niedrigsten Konzentration, die eine Reduktion des Zellwachstums induziert.

Wachstumshemmung von humanen Zelllinien durch Pestizide				
Substanz	MCF-7	HepG2	RPTEC/TERT1	HUVEC/TERT7
Chlorpyrifos	256 µM	32 µM	128 µM	128 µM
Clopyralid	256 µM	-*	512 µM	-
Thiamethoxam	256 µM	-	-	-
Dicamba	-	256 µM	512 µM	-
Florasulam	-	-	512 µM	256 µM
Flumetsulam	128 µM	-	-	-
*) keine signifikante Hemmwirkung im getesteten Konzentrationsbereich				

Aus den Ergebnissen ist ersichtlich, dass die Einzelsubstanzen eine sehr schwache toxische Wirkung auf die Zellen haben. Eine Wirkung ist erst ab einer Konzentration festzustellen, die sehr viel höher ist (800-fach und mehr) als die in der hoch belasteten Wasserprobe (MK-HF05) festgestellten Konzentrationen der Pestizide. Dabei muss festgehalten werden, dass im getesteten Konzentrationsbereich ein Zusammenhang von Dosis und Wirkung nur bei Chlorpyrifos für die drei Zelllinien HUVEC/TERT7, RPTEC/TERT1 und MCF-7 feststellbar war. Es ist ersichtlich, dass die einzelnen Pestizide unterschiedlich starke Wirkungen auf die eingesetzten Zellkulturen haben.

Zusätzlich zu den Untersuchungen der Einzelsubstanzen wurde in einem Ansatz auch der Effekt einer Mischung von Clopyralid (Startkonzentration 512 µM), Florasulam (Startkonzentration 8 µM) und Flumetsulam (Startkonzentration 9 µM) getestet. In 1:2 Verdünnungsstufen wurde bis auf eine Konzentration von 4 µM (Clopyralid), 0,06 µM (Florasulam) und 0,07 µM (Flumetsulam) verdünnt. Abbildung 4.7 zeigt die Ergebnisse der MTT-Tests nach Behandlung der unterschiedlichen Zellen mit dem Pestizidgemisch, wobei keine signifikanten Hemmeffekte festgestellt wurden.

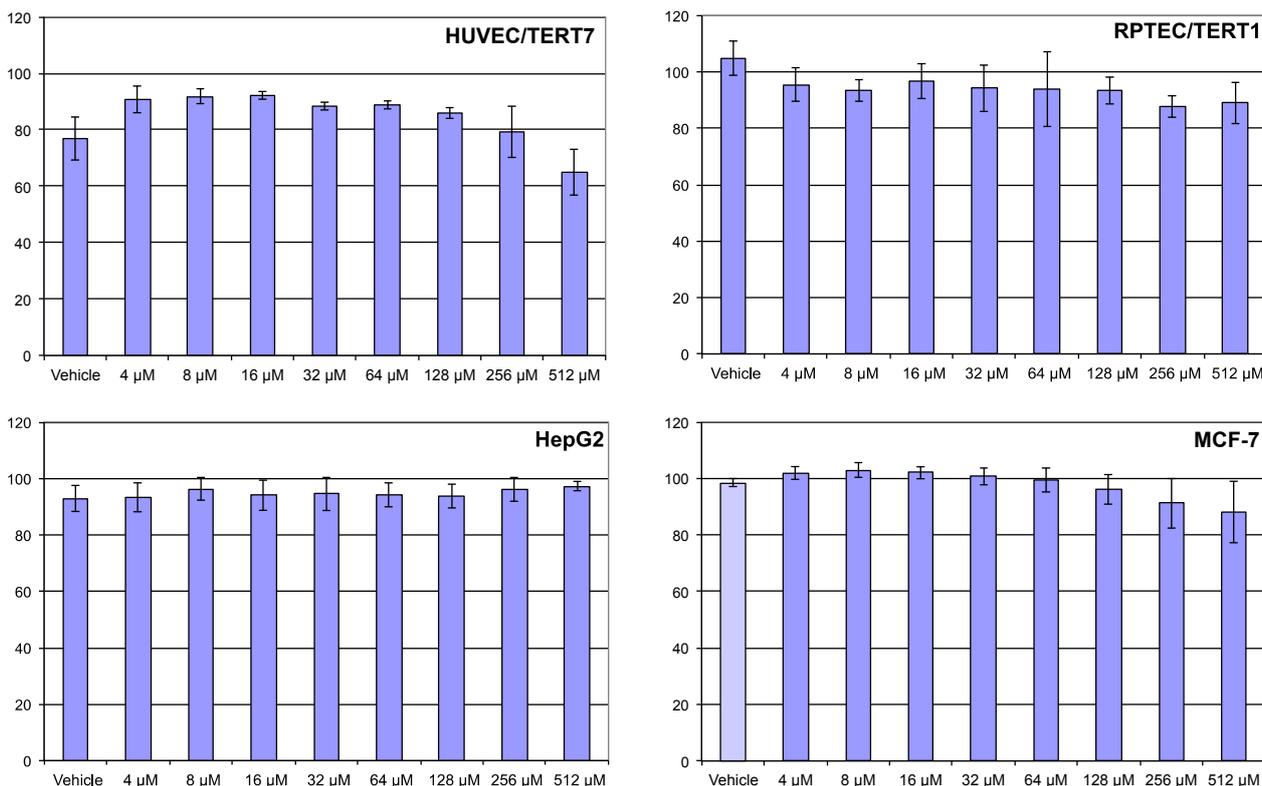


Abbildung 4.7: Ergebnisse der MTT-Tests von HUVEC/TERT7, RPTEC/TERT1, MCF-7 und HepG2 Zellen nach Behandlung mit einer Mischung aus Clopyralid, Florasulam und Flumetsulam (X-Achse: eingesetzte Konzentrationen der Einzelsubstanzen bezogen auf die Konzentration von Clopyralid, Y-Achse: % Viabilität). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (n=6).

Die Ergebnisse der Überprüfung des Thiamethoxam-Metaboliten CGA 355190 auf wachstumshemmende Wirkung auf RPTEC/TERT1 und HUVEC/TERT7 Zellen sind in Abbildung 4.8 dargestellt. Der Metabolit zeigt keine wachstumshemmende Wirkung auf die verwendeten Zellkulturen.

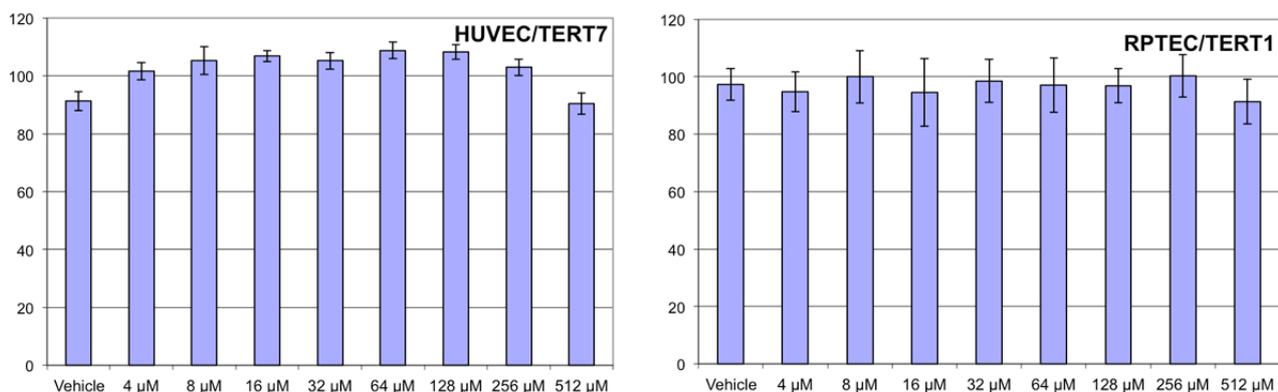


Abbildung 4.8: Ergebnisse der MTT-Tests von HUVEC/TERT7 und RPTEC/TERT1 nach Behandlung mit dem Thiamethoxam Metaboliten CGA 355190. (X-Achse: eingesetzte Konzentrationen von CGA 355190, Y-Achse: % Viabilität). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (n=6).

Analyse der Grundwasserproben

Die Wasserproben wurden auf wachstumshemmende Wirkung, Genotoxizität, Stresseinwirkung (Expression von p53) und endokrine Wirkung mittels verschiedener relevanter humaner Zellkulturen untersucht.

Untersuchung auf Wachstumshemmung

Nach Behandlung der Zellen mit den Grundwasserproben wurde mittels MTT-Test der Einfluss auf das Wachstum von humanen Zellen gemessen. Die Ergebnisse werden relativ zur 100%-igen Viabilität (Wachstum der Zellen im Zellkulturmedium ohne Zugabe von Probe oder Vehikel/PBS) angegeben. Die teilweise erhaltene niedrige Viabilität in diesen Versuchen ist darauf zurückzuführen, dass die Ergebnisse auf das Wachstum der Zellen in Vollmedium bezogen werden. Da das Zellkulturmedium 1:1 mit den isotonisierten Wasserproben vermengt ist, wird der Anteil der Nährstoffe und Wachstumsfaktoren wesentlich reduziert. Dieser Umstand hat ein schlechteres Zellwachstum sowohl bei Probezusatz als auch im Kontrollansatz zur Folge.

Abbildung 4.9 zeigt die Ergebnisse der MTT-Tests von HUVEC/TERT7 und RPTEC/TERT1 Zellen nach Behandlung mit Grundwasserproben vom 8. April 2013 (MK-FB01, MK-HF05, MK-KS06). Die Proben wurden vor Behandlung der Zellen sterilfiltriert.

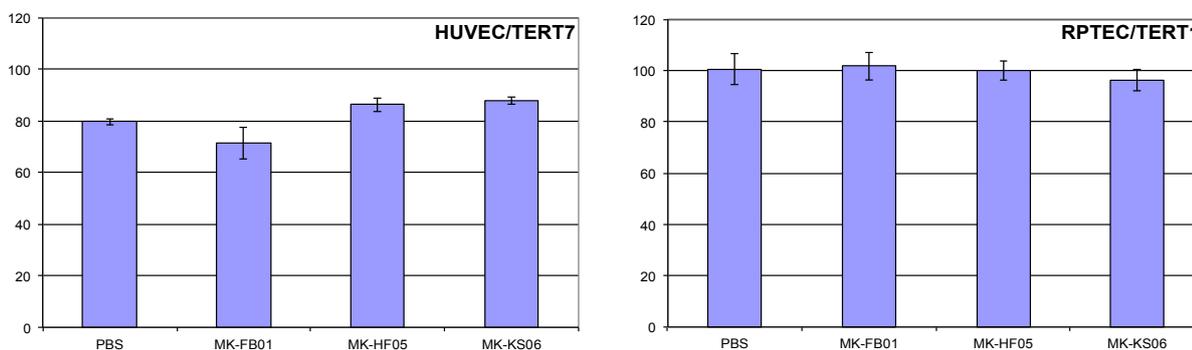


Abbildung 4.9: Ergebnisse der MTT-Tests von HUVEC/TERT7 und RPTEC/TERT1 Zellen nach Behandlung mit MK-FB01, MK-HF05 und MK-KS06 (Probenahme vom 8. April 2013) (X-Achse: Wasserproben, Y-Achse: % Viabilität). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (n=6).

Für beide Zelllinien zeigt sich, dass die Wasserproben keine wachstumshemmende Wirkung ausüben. Ähnliche Ergebnisse werden nach Behandlung der Zellen mit PBS als Kontrolle erzielt.



Abbildung 4.10 zeigt die Ergebnisse der MTT-Tests von HUVEC/TERT7, RPTEC/TERT1, HepG2 und MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Grundwasserproben vom 5. Juni 2013 (MK-FB01, MK-HF05, MK-KS06). Die Proben wurden vor Behandlung der Zellen sterilfiltriert.

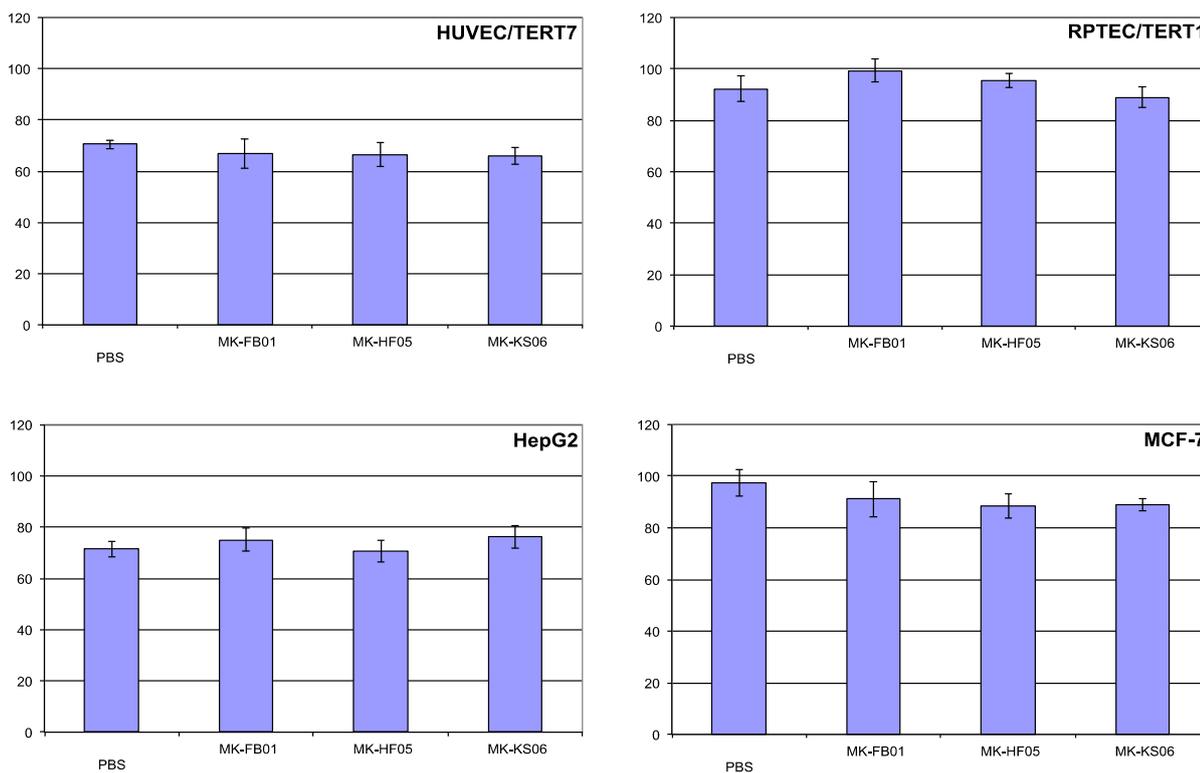


Abbildung 4.10: Ergebnisse der MTT-Tests von HUVEC/TERT7 und RPTEC/TERT1 Zellen nach Behandlung mit MK-FB01, MK-HF05 und MK-KS06 (Probenahme vom 5. Juni 2013) (X-Achse: Wasserproben, Y-Achse: % Viabilität). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (n=6).

Für die vier untersuchten Zelllinien zeigt sich, dass die Wasserproben keine wachstumshemmende Wirkung ausüben. Ähnliche Ergebnisse werden nach Behandlung der Zellen mit PBS als Kontrolle erzielt.

Abbildung 4.11 zeigt die Ergebnisse der MTT-Tests von HUVEC/TERT7, RPTEC/TERT1, HepG2 und MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Grundwasserproben vom 19. August 2013 (MK-FB01, MK-HF05, MK-KS06). Die Proben wurden vor Behandlung der Zellen sterilfiltriert.

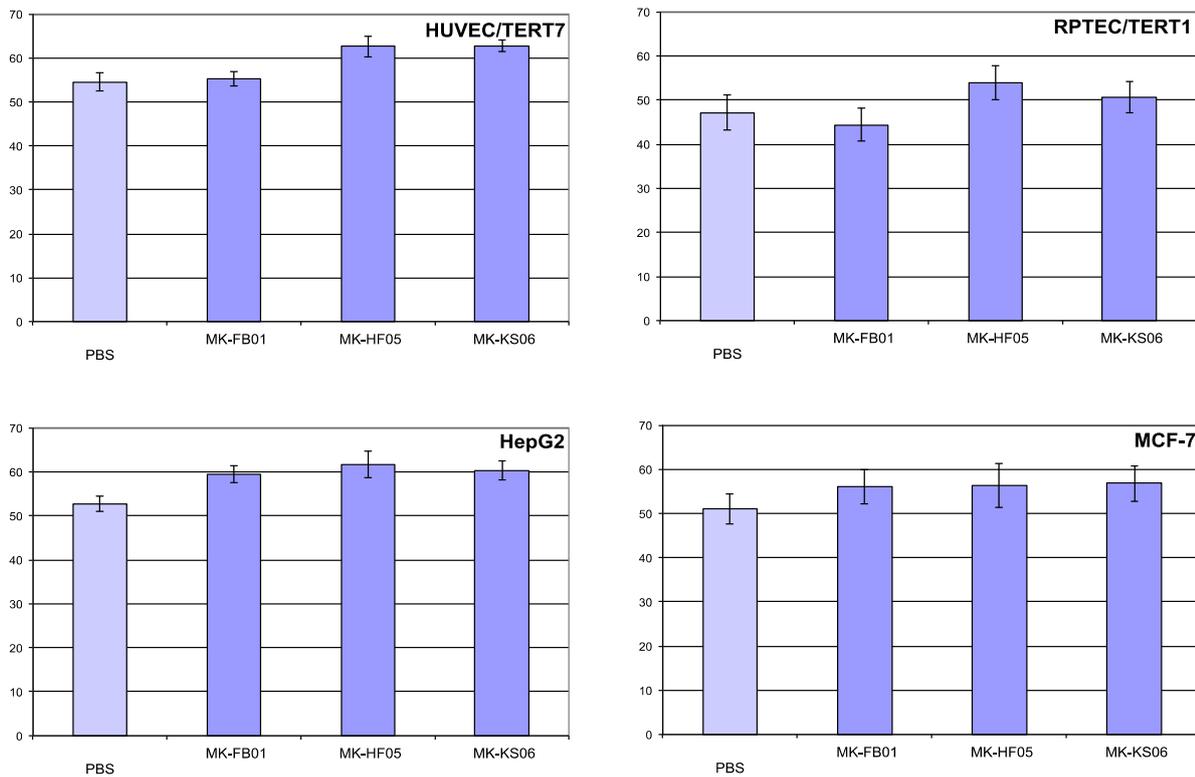


Abbildung 4.11: Ergebnisse der MTT-Tests von HUVEC/TERT7, RPTEC/TERT1, HepG2 und MCF-7 Zellen nach Behandlung mit MK-FB01, MK-HF05 und MK-KS06 (Probenahme vom 19. August 2013) (X-Achse: Wasserproben, Y-Achse: % Viabilität). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (n=6).

Auch die am 19. August 2013 entnommenen Wasserproben zeigen im Vergleich zur PBS-Kontrolle keine Wachstumshemmung auf die verwendeten Zellkulturen. Auch unter den Messstellen selbst sind nur geringfügige Variationen in der zellulären Proliferation feststellbar.



Abbildung 4.12 zeigt die Ergebnisse der MTT-Tests von HUVEC/TERT7 und RPTEC/TERT1 Zellen nach Behandlung mit Grundwasserproben vom 18. November 2013 (MK-HF05). Die Proben wurden vor Behandlung der Zellen sterilfiltriert.

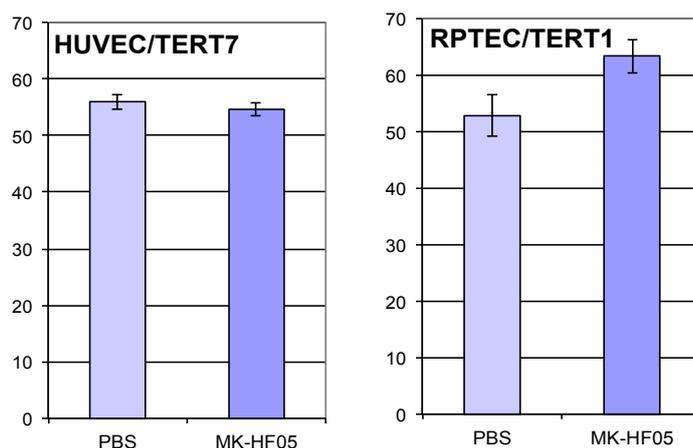


Abbildung 4.12: Ergebnisse der MTT-Tests von HUVEC/TERT7 und RPTEC/TERT1 nach Behandlung mit MK-HF05 (Probenahme vom 18. November 2013) (X-Achse: Wasserproben, Y-Achse: % Viabilität). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (n=6).

Wie bei den vorherigen Versuchen zeigte sich auch bei dieser Grundwasserprobe kein nachteiliger Einfluss auf die Proliferationsrate der untersuchten Zellen. Die geringe Wachstumszunahme bei RPTEC/TERT1 im Vergleich zur Kontrolle konnte im weiteren Versuchsverlauf nicht bestätigt werden (Abbildung 4.18, Startwerte für N/B und N/BI).

Zusätzlich wurde eine 5000-fach aufkonzentrierte Wasserprobe (Anreicherung durchgeführt am OF1, Extrakt in DMSO) von der Messstelle MK-HF05 (Probenahme vom 5. Juni 2013) untersucht. Eine Verdünnungsreihe der konzentrierten Wasserprobe wurde in dem MTT-Test untersucht. Abbildung 4.13 zeigt die Ergebnisse der MTT-Tests von HUVEC/TERT7, RPTEC/TERT1, MCF-7 und HepG2 Zellen nach Behandlung mit dem 1000-fach (5 x aufkonzentrierte Wasserprobe), 500-fach (10 x aufkonzentrierte Wasserprobe) und 250-fach (20 x aufkonzentrierte Wasserprobe) verdünnten Konzentrat. Als Kontrolle (Blind) wurde gleichsam aufkonzentriertes Leitungswasser verwendet.

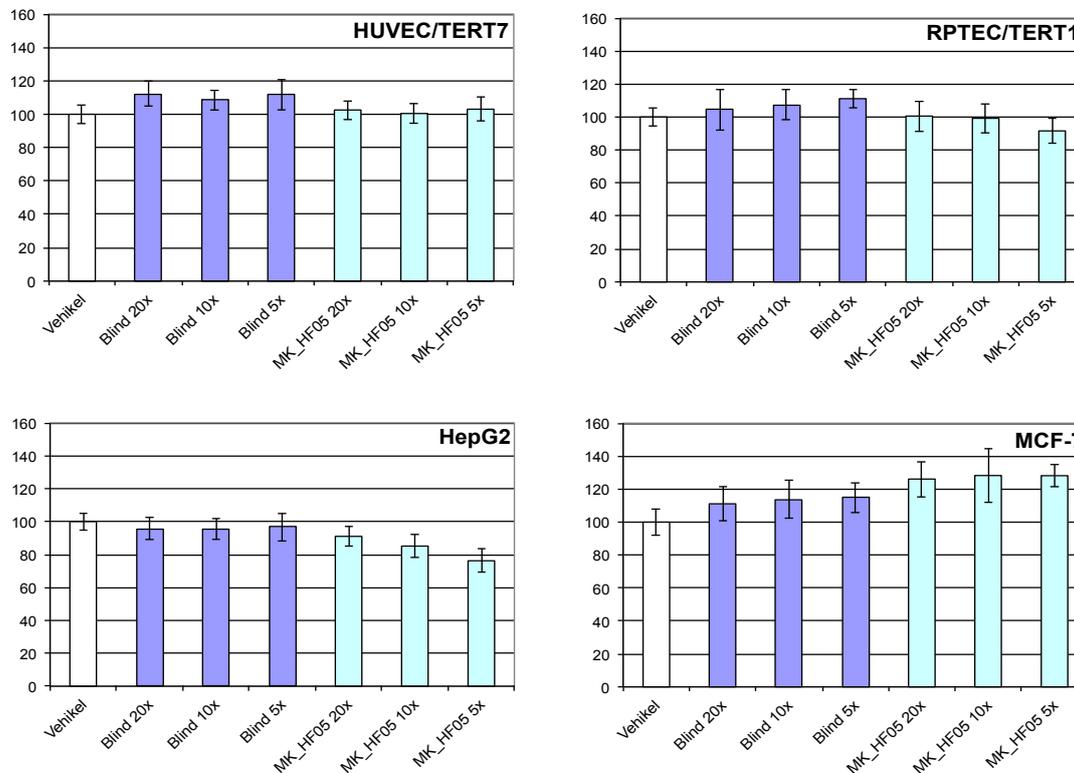


Abbildung 4.13: Ergebnisse der MTT-Tests von HUVEC/TERT7, RPTEC/TERT1, MCF-7 und HepG2 Zellen nach Behandlung mit MK-HF05 (20x, 10x und 5x aufkonzentrierte Wasserprobe) (Probenahme vom 5. Juni 2013) (X-Achse: Wasserproben, Y-Achse: % Viabilität). „Blind“ entspricht der Kontrolle in der jeweiligen Konzentrationsstufe. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (n=6).

Auch bei einer Aufkonzentrierung der Wasserproben auf das 5-, 10- bzw. 20-fache ist keine Wachstumshemmung im MTT-Test mit den eingesetzten Zelllinien messbar. Alleine bei den HepG2 scheint es eine Hemmwirkung zu geben, diese nimmt aber mit abnehmender Konzentration zu, was auf ein mögliches technisches Problem in diesem Test hinweisen könnte.

Untersuchung auf Gentoxizität / DNA Schädigung

RPTEC/TERT1 und HepG2 Zellen wurden mit kontaminiertem Grundwasser (MK-HF05) behandelt und mittels Comet-Test auf induzierte DNA Schäden (DNA Strangbrüche) untersucht. Abbildung 4.14 zeigt die Ergebnisse des Comet-Tests nach Behandlung der Zellen mit der Wasserprobe vom 5. Juni 2013, Abbildung 4.15 die Ergebnisse der Wasserprobe vom 19. August 2013 und Abbildung 4.16 jene vom 18. November 2013. Es konnten für beiden Zelllinien nach Behandlung mit MK-HF05 keine DNA Strangbrüche detektiert werden.

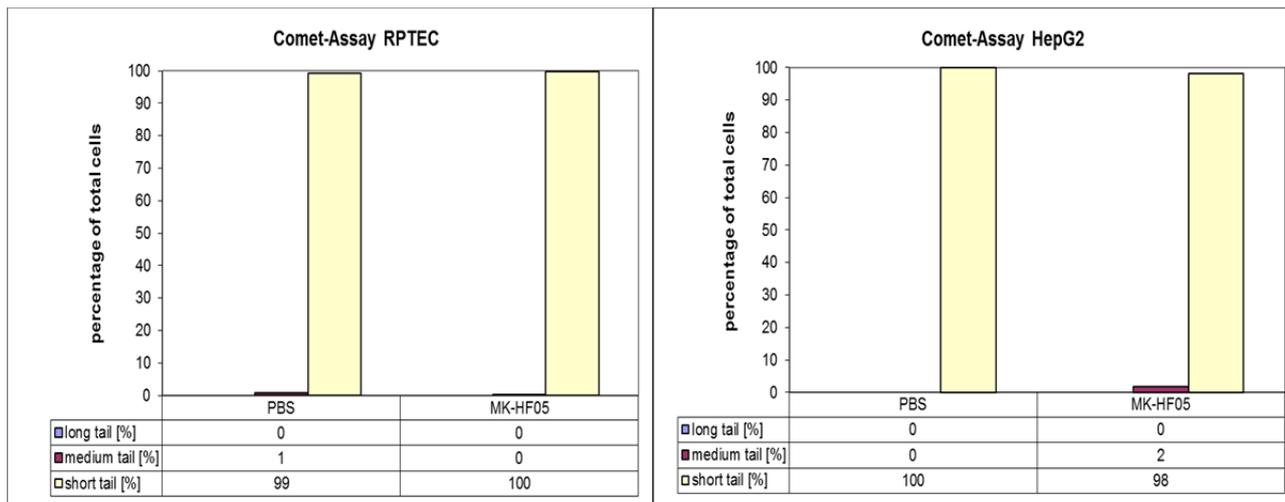


Abbildung 4.14: Ergebnisse des Comet-Tests nach Behandlung von RPTEC/TERT1 und HepG2 Zellen mit MK-HF05 vom 5. Juni 2013.

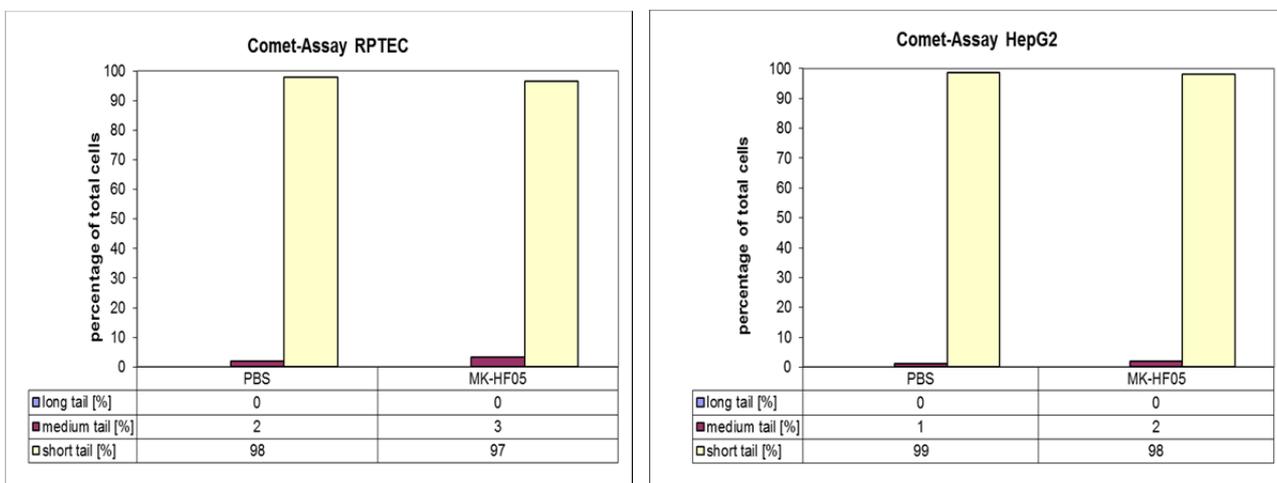


Abbildung 4.15: Ergebnisse des Comet-Tests nach Behandlung von RPTEC/TERT1 und HepG2 Zellen mit MK-HF05 vom 19. August 2013.

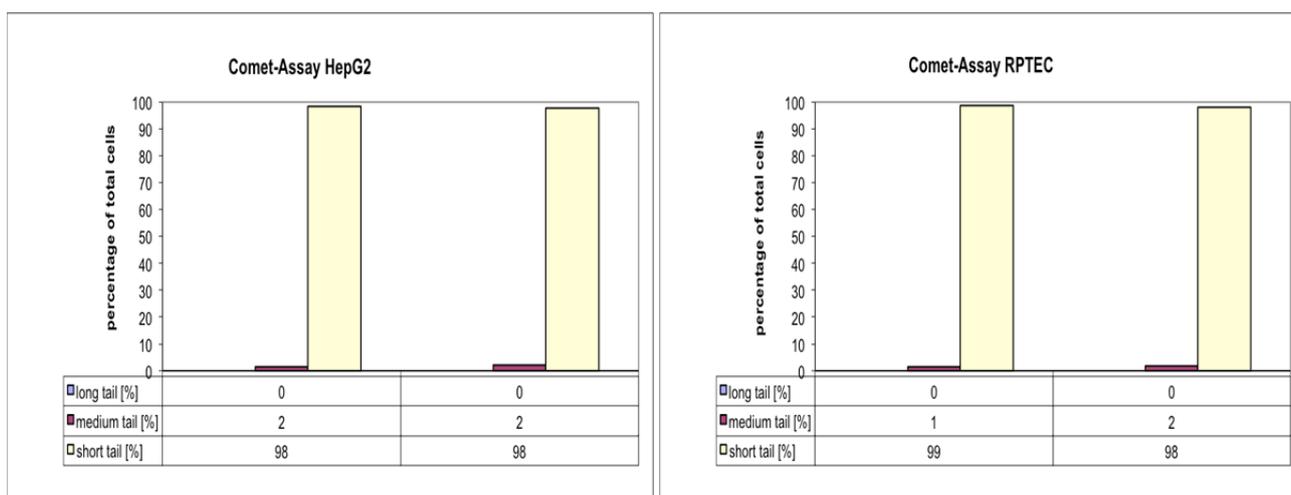


Abbildung 4.16: Ergebnisse des Comet-Tests nach Behandlung von RPTEC/TERT1 und HepG2 Zellen mit MK-HF05 vom 18. November 2013.

Untersuchung auf endokrine Wirkung

Diese Untersuchung wurde extern am OFI durchgeführt. Dabei wurde die hoch belastete Wasserprobe MK-HF05 (Probenahme vom 5. Juni 2013) im Vergleich mit Leitungswasser (Blind) mittels CALUX System (U2OS Knochenkrebszellen) auf Östrogenwirkung untersucht. Dazu wurden in zweifacher Ausführung, je ein Liter der Wasserprobe mittels Solid Phase Extraction auf das 5000-fache aufkonzentriert und im Testsystem eingesetzt („Flasche 1“ und „Flasche 2“ für MK-HF05 in Tabelle 4.4).

Die Ergebnisse der Testung auf mögliche östrogene Wirkungen sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

Tabelle 4.4: Ergebnisse der Testung der Wasserprobe MK-HF05 (Probenahme vom 5. Juni 2013) auf östrogene Wirkung, untersucht mittels CALUX System (Flasche 1 und 2: 5000-fache Aufkonzentrierung der Wasserprobe in zweifacher Ausführung).

Östrogene Wirkung von Grundwasserproben				
	Flasche 1		Flasche 2	
	Aktivität*	Wiederfindung [%]	Aktivität*	Wiederfindung [%]
MK-HF05	<NWG	111 ± 13	<NWG	104 ± 5
Blind	<NWG	103 ± 4	-	-
*) Östrogenaktivität				

Es konnten weder aktivierende, noch inhibierende oder anti-östrogene Effekte festgestellt werden. Es waren auch keine wachstumshemmenden Effekte feststellbar (siehe Abbildung 4.13).



Abbauversuche in Bioreaktoren und Aquifersäulen

Proben der Abbauversuche in Bioreaktoren (siehe Arbeitspaket 1) wurden mittels MTT-Test auf wachstumshemmende Wirkungen untersucht. Die Proben wurden nach Zugabe von Antibiotika getestet (Abbildung 4.17).

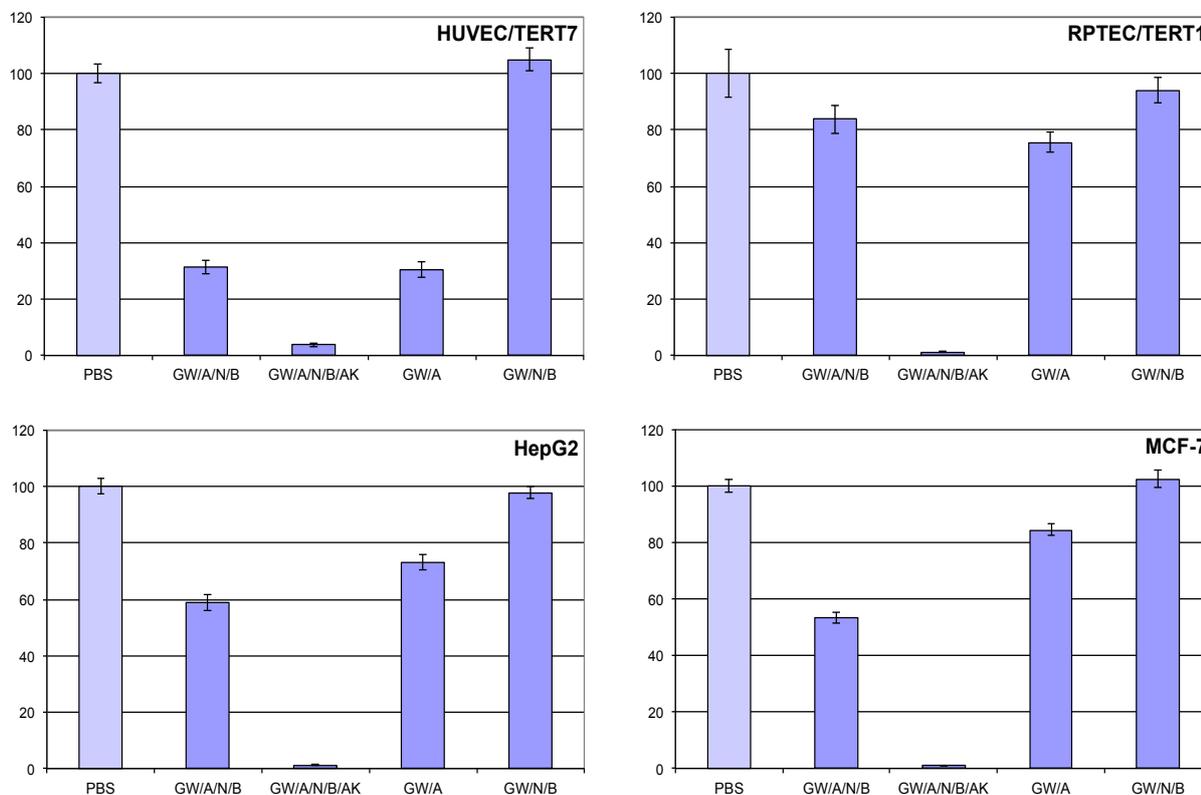


Abbildung 4.17: Ergebnisse der MTT-Tests von HUVEC/TERT7, RPTEC/TERT1, MCF-7 und HepG2 Zellen nach Behandlung mit den Proben des Versuches in Bioreaktoren (X-Achse: Versuchsansatz, Y-Achse: % Viabilität). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (n=6).

Der Versuchsansatz GW/A/N/B/AK (vergiftete Kontrolle des Abbauversuchs) zeigt eine sehr starke zytotoxische Wirkung auf alle verwendeten Zelllinien, was auf die Anwesenheit von Quecksilber(II)chlorid zurückzuführen ist. Die beiden Ansätze GW/A/N/B und GW/A zeigen ebenfalls eine Hemmwirkung auf die eingesetzten Zelllinien. Diese Effekte könnten auf eine Hemmwirkung durch das Aquifermaterial oder dessen Inhaltsstoffe zurückzuführen sein, da im Versuchsansatz ohne Aquifermaterial sowie für Grundwasser vom kontaminierten Standort keine Hemmwirkung beobachtet wurde. Unklar bleibt, ob Partikel im Versuchsansatz (unfiltrierte Proben) oder Inhaltsstoffe des Aquifermaterials wie z.B. Chlorpyrifos diesen Effekt verursacht haben.

Proben des Abbauversuches in Aquifersäulen wurden mittels MTT-Test auf wachstumshemmende Wirkungen (Abbildung 4.18), mittels CALUX System (OFI) auf endokrine Disruption (Tabelle 4.5) und mittels Ames-Test, Mikrokerntest (Umweltbundesamt, Bad Elster) und Comet-Test auf mögliche genotoxische Wirkungen (Abbildung 4.19) untersucht. Zusätzlich zu einem Monitoring der Zytotoxizität im Verlauf des mikrobiellen Pestizidabbaus (Hauptversuch N/B Start bzw. N/B Ende) wurde geprüft, ob der Zusatz von Inokulum (N/B/I) eine negative Wirkung auf das Wachstum von Zellkulturen hat. Wie in Abbildung 4.18 dargestellt, zeigten die untersuchten Proben keine wachstumshemmenden Wirkungen auf HUVEC/TERT7 und RPTEC/TERT1.

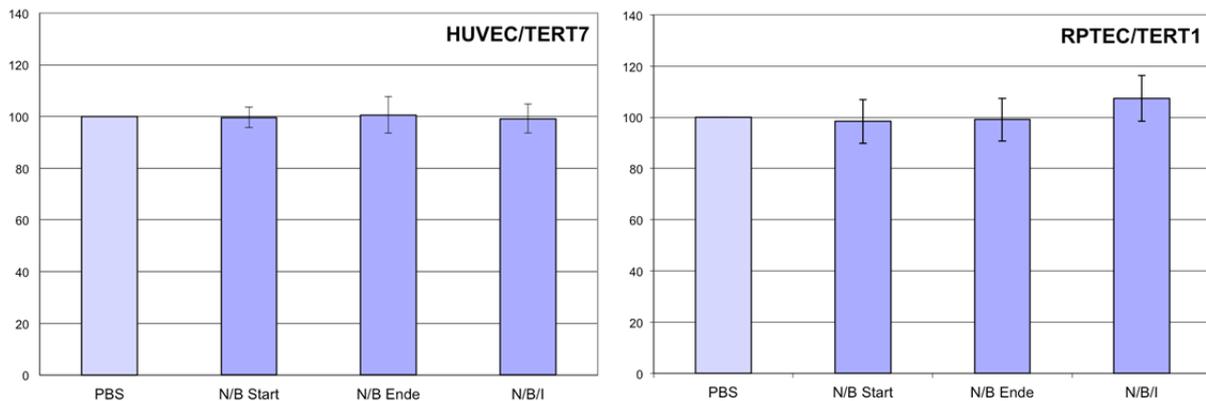


Abbildung 4.18: Ergebnisse der MTT-Tests von HUVEC/TERT7 und RPTEC/TERT1 nach Behandlung mit den Proben des Abbauversuches in Aquifersäulen (X-Achse: Versuchsansatz, Y-Achse: % Viabilität). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (n=6).

Um das Auftreten von möglichen östrogenen Aktivitäten im Zuge des mikrobiellen Abbaus von Pestiziden zu erfassen, wurde mit dem CALUX System ein Monitoring des Abbauversuches in Aquifersäulen durchgeführt. Dazu wurde das im Versuch eingesetzte Grundwasser sowie Proben vom Beginn und Ende des Hauptversuches (Aquifersäule N/B) getestet. Die Nachweisgrenze für diesen Versuchsansatz lag bei 0,02 ng/L EEQ (17-β-Estradiol-Equivalente), die Bestimmungsgrenze (BG) bei 0,03 ng/L EEQ.

Tabelle 4.5: Ergebnisse der Testung der Proben des Abbauversuchs in Aquifersäulen auf östrogene Wirkung, untersucht mittels CALUX System.

Östrogene Wirkung Abbau in Aquifersäulen		
	Aktivität ¹	Wiederfindung [%]
N/B Start	>NWG ² <BG ³	113%
N/B Ende	<NWG	107%
HF05	<NWG	103%
Blind	<NWG	106%

¹) Östrogenaktivität ²) Nachweisgrenze ³) Bestimmungsgrenze

Zu Versuchsbeginn wurde eine minimale Östrogenaktivität festgestellt (Säule „N/B Start“, Tabelle 4.5), die allerdings unter der Bestimmungsgrenze von 0,03 ng/L EEQ lag. Zu Ende des Abbauversuchs lag die Aktivität auch unter der Nachweisgrenze von 0,02 ng/L EEQ. Da auch das im Versuch eingesetzte



Grundwasser vom kontaminierten Standort kein Östrogenaktivität zeigt, wird angenommen, dass dieser äußerst geringe Effekt auf die im Versuchsaufbau eingesetzten Materialien zurückzuführen ist. Darüber hinaus ist festzuhalten, dass dieses Ergebnis für aufkonzentrierte Proben (Faktor 5000) erzielt wurde und für die Probe Säule „N/B Start“ ein Nachweis von Östrogenaktivität in nicht aufkonzentrierter Form nicht zu erwarten ist.

Zudem wurden die Proben des Abbauersuchs in Aquifersäulen (NB) mittels Comet-Test auf mögliche gentoxische Wirkungen mittels RPTEC/TERT1 und HepG2 Zellen untersucht (Abbildung 4.19). Zusätzlich wurde auf mögliche gentoxische Effekte durch Inokulation (Aquifersäule N/B/I) getestet.

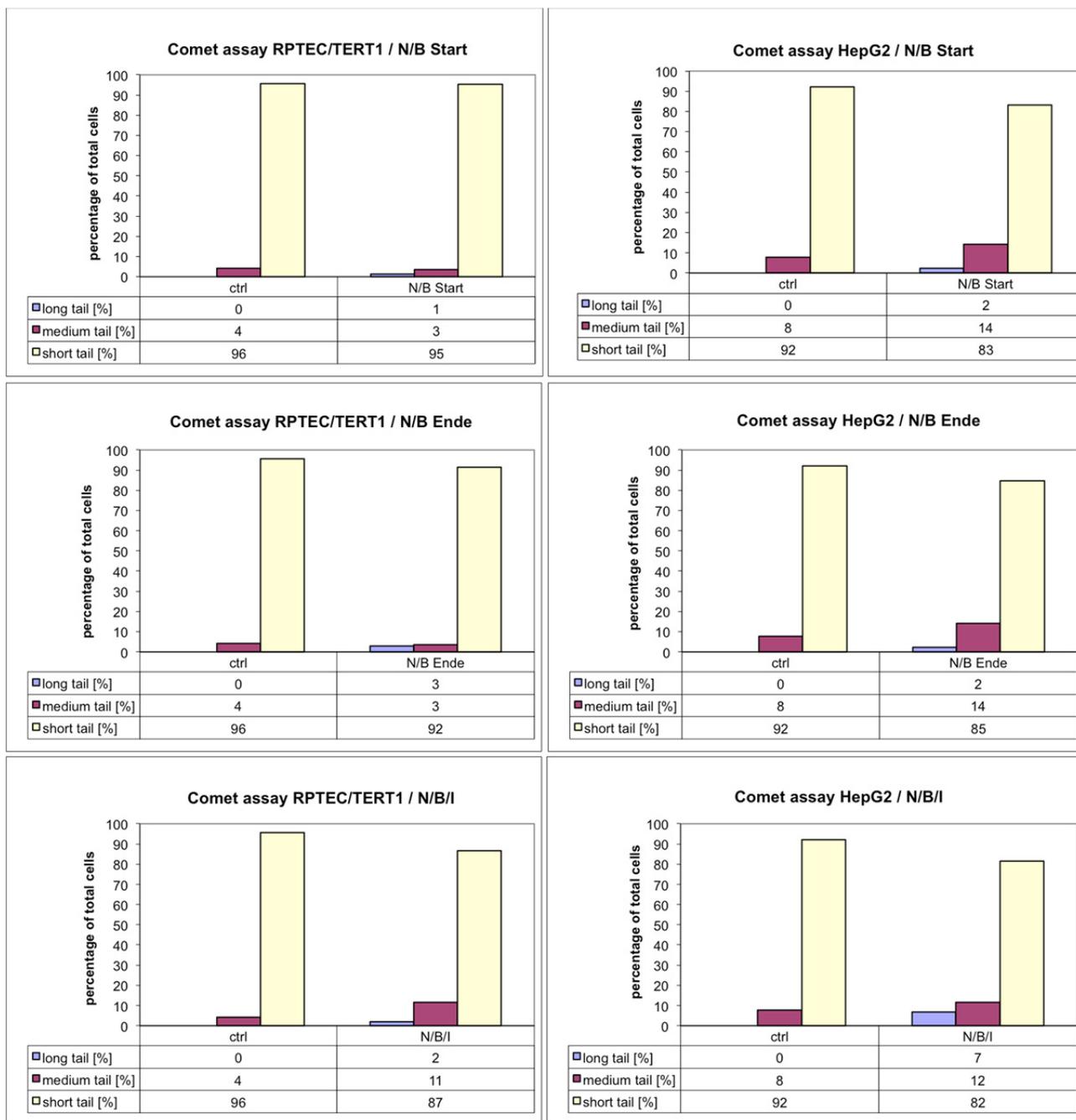


Abbildung 4.19: Ergebnisse des Comet-Tests von RPTEC/TERT1 und HepG2 Zellen nach Behandlung mit den Proben des Abbauersuches in Aquifersäulen.

Es wurden sowohl in den Kontrollzellen nach Behandlung mit PBS als auch in den untersuchten Proben des Abbaubehversuchs vereinzelt Zellen mit DNA Strangbrüchen aufgefunden, welche jedoch auf Schwankungen der Methode zurückgeführt werden können, da das im Versuch eingesetzte Grundwasser keine DNA Schäden im Comet-Test mit HepG2 und RPTEC/TERT1 hervorrief (Abbildung 4.16). Durch die biologische Behandlung von kontaminiertem Grundwasser in Aquifersäulen konnte keine Zunahme von Strangbrüchen festgestellt werden. Auch Untersuchungen durch das Umweltbundesamt in Bad Elster, Deutschland, zeigten, dass im eingesetzten Grundwasser sowie nach mikrobiellem Pestizidabbau bzw. Inokulation keine Gentoxizität (Ames-Test, Mikrokerntest) nachweisbar war.

Zusammenfassung

Im Arbeitspaket 4 „Wirkungsbezogene Bewertung mittels Zellkulturtests“ wurde der Effekt von sechs Pestiziden (Clopyralid, Thiamethoxam, Florasulam, Flumetsulam, Dicamba und Chlorpyrifos), von denen vier im Grundwasser des kontaminierten Standortes aufgefunden wurden, auf ihre Wirkung auf humane Zellkulturen untersucht. Dabei wurde nur in den höchsten Konzentrationsstufen der zum Einsatz gekommenen Verdünnungsreihen der einzelnen Pestizidsubstanzen (4 - 512 μM) eine Wirkung festgestellt, nie aber eine vollständige Inhibition des Wachstums der vier Zelllinien erwirkt. Durch die geringen, im Testansatz mit vier Zelllinien ermittelten Hemmwirkungen, war eine Berechnung von IC_{50} Werten für die einzelnen Pestizide nicht sinnvoll. Daher wurde als Zielgröße die Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) gewählt. Dieser Wert entspricht der niedrigsten Konzentration, für die eine signifikante Hemmung des Zellwachstums im Vergleich zur nicht kontaminierten Kontrolle festgestellt wurde.

Die verwendeten Zellkulturen, welche verschiedene Gewebetypen mit variierenden Sensitivitäten für Toxine repräsentieren, zeigten unterschiedliche Reaktionen auf die einzelnen Pestizide. Diese Tatsache macht die im Rahmen des Forschungsprojektes etablierte Testbatterie an Zellkulturen für toxikologische Untersuchungen generell, aber auch für die Austestung der Wirkungen auf spezifische Organsysteme hochinteressant.

Die Konzentrationen der sechs getesteten Pestizide, die eine zytotoxische Wirkung auf die Zellkulturen ausübten, ist in jedem Fall mindestens um den Faktor 800 höher als die gemessenen Konzentrationen dieser Einzelsubstanzen im Grundwasser des kontaminierten Standortes, wobei Dicamba und Chlorpyrifos in den im Rahmen des Forschungsprojektes untersuchten Grundwasserproben nicht nachgewiesen wurden. Auch ein Gemisch von Clopyralid, Florasulam und Flumetsulam zeigte keine synergistischen Effekte für den im Test geprüften Konzentrationsbereich (Clopyralid max. 512 μM , Florasulam max. 8 μM und Flumetsulam max. 9 μM) auf die vier im Test eingesetzten Zelllinien.

Grundwasserproben wurden zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten am kontaminierten Standort entnommen und mit dem MTT-Test geprüft. In keiner der entnommenen Proben, in Summe 10, konnte eine Wachstumshemmung der humanen Zelllinien festgestellt werden.

Die Untersuchungen auf induzierte DNA Strangbrüche nach Behandlung von Zellen mit Grundwasserproben zeigten keine DNA Schädigungen, auch Ames-Test und Mikrokerntest geben keinen Hinweis auf Gentoxizität.

Um eine Stressreaktion der Zellen zu messen, wurden stressinduzierte p53 mRNAs quantifiziert. Die dabei erhaltenen Werte zeigten eine hohe Variabilität. Weitere Versuche sind nötig, um aussagekräftige Ergebnisse zur Stressinduktion zu erhalten und schlüssige Aussagen treffen zu können.



Die Testung der aufkonzentrierten Wasserprobe MK-HF05 (Proben vom 5. Juni 2013 sowie 18. November 2013) mittels CALUX System zeigte eindeutig keine östrogene Wirkung der Wasserproben. Es konnten weder aktivierende, noch inhibierende oder anti-östrogene Effekte festgestellt werden.

Die Proben der Bioreaktor-Abbauversuche zeigten Hemmwirkungen für vier Zelllinien in den Versuchsansätzen, denen Aquifermaterial zugesetzt wurde. Dieses Ergebnis könnte auf das Aquifermaterial zurückgeführt werden, das diesen Versuchsansätzen zur Beimpfung eingebracht wurde. Im Unterschied dazu zeigten das im Versuch eingesetzte Grundwasser sowie der Versuchsansatz ohne Aquifermaterial keine wachstumshemmende Wirkung. Zudem wurde eine hohe toxische Wirkung für den Versuchsansatz mit HgCl₂-Zusatz (abiotische Kontrolle) beobachtet. Diese Substanz ist für Zellen toxisch und soll das Zellwachstum unterbinden. Somit stellt die in den Zellkulturtests beobachtete Hemmung eine positive Kontrolle zu diesen Tests dar. Proben der Aquifersäulen zeigten keine wachstumshemmende Wirkung auf die zur Prüfung eingesetzten humanen Zelllinien. Eine eindeutige Induktion von DNA Schäden wurde nicht festgestellt. Der mikrobielle Pestizidabbau führte zu keiner Entstehung von gentoxischen Effekten (Ames-Test, Mikrokerntest). Zu Ende des Abbauversuchs in Aquifersäulen konnte keine Östrogenaktivität nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen: (i) eine wachstumshemmende Wirkung der getesteten Pestizide Clopyralid, Thiamethoxam, Florasulam, Flumetsulam, Dicamba und Chlorpyrifos auf vier humane Zelllinien (RPTEC/TERT1, HepG2, HUVEC/TERT7 und MCF-7) ist erst bei sehr hohen Konzentrationen (zumindest 800-fach höher als für das Grundwasser des kontaminierten Standortes gemessen) zu beobachten. (ii) Die nach Sterilfiltration getesteten Grundwasserproben zeigten keine auffälligen Effekte auf das Wachstum der in dieser Studie verwendeten humanen Zellkulturen. (iii) Eine endokrine Wirkung der hoch kontaminierten Grundwasserprobe (HF05) konnte auch bei zweimaliger Beprobung nicht festgestellt werden. (iv) Comet-Test, Ames-Test und Mikrokerntest ergaben keine Hinweise auf Gentoxizität der getesteten Grundwasserproben. (v) Ein Monitoring der Abbauversuche im Grundwassermodellsystem (Aquifersäulen) ergab keine Zunahme einer endokrinen Wirkung (CALUX System) oder Gentoxizität (Comet-Test mit HEPG2 und RPTEC/TERT1, Ames-Test, Mikrokerntest). Es wurde auch keine Wachstumshemmung von humanen Zelllinien (HUVEC/TERT7 und RPTEC/TERT1) beobachtet.

Literaturverzeichnis

CEP Agency (2007). California Environmental Protection Agency Department of Pesticide Regulation; Chlorpyrifos Summary of Toxicological Data (2001) Available from, as of August 24, 2007).

CEP Agency(2008). California Environmental Protection Agency/Department of Pesticide Regulation; Toxicology Data Review Summary for Thiamethoxam (153719-23-4) p.9 (September 4, 2008), September.

Cui, Y., Guo, J., Xu, B., & Chen, Z. (2006). Potential of chlorpyrifos and cypermethrin forming DNA adducts. *Mutation research*, 604(1-2), 36–41. doi:10.1016/j.mrgentox.2005.12.003

- Foxenberg, R. J., McGarrigle, B. P., Knaak, J. B., Kostyniak, P. J., & Olson, J. R. (2007). Short Communication Human Hepatic Cytochrome P450-Specific Metabolism of Parathion and Chlorpyrifos, *35*(2), 189–193. doi:10.1124/dmd.106.012427.and
- González, N. V., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2006). Genotoxicity analysis of the phenoxy herbicide dicamba in mammalian cells in vitro. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, *20*(8), 1481–7. doi:10.1016/j.tiv.2006.05.001
- Grünfeld, H. T., & Bonefeld-Jorgensen, E. C. (2004). Effect of in vitro estrogenic pesticides on human oestrogen receptor alpha and beta mRNA levels. *Toxicology letters*, *151*(3), 467–80. doi:10.1016/j.toxlet.2004.03.021
- Muscarella, D. E., Keown, J. F., & Bloom, S. E. (1984). Evaluation of the genotoxic and embryotoxic potential of chlorpyrifos and its metabolites in vivo and in vitro. *Environmental mutagenesis*, *6*(1), 13–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6198172>
- Nakadai, A., Li, Q., & Kawada, T. (2006). Chlorpyrifos induces apoptosis in human monocyte cell line U937. *Toxicology*, *224*(3), 202–9. doi:10.1016/j.tox.2006.04.055
- Perocco, P., Ancora, G., Rani, P., Valenti, A. M., Mazzullo, M., Colacci, A., & Grilli, S. (1990). Evaluation of genotoxic effects of the herbicide dicamba using in vivo and in vitro test systems. *Environmental and molecular mutagenesis*, *15*(3), 131–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2331981>
- Sorensen, K. C., Stucki, J. W., Warner, R. E., Wagner, E. D., & Plewa, M. J. (2005). Modulation of the genotoxicity of pesticides reacted with redox-modified smectite clay. *Environmental and molecular mutagenesis*, *46*(3), 174–81. doi:10.1002/em.20144
- USEPA. (2006). No Title, *April*.
- USEPA. (2007a). USEPA; Florasulam: Human Health Risk Assessment. Document ID: EPA-HQ-OPP-2006-0993-0004. p.50 (May 31, 2007), *May*.
- USEPA. (2007b). USEPA/Office of Pesticide Programs; Chlorpyrifos Facts EPA738-F-01-006 (February 2002) Available from, as of September 18, 2007), *September*.
- Ventura, C., Núñez, M., Miret, N., Martinel Lamas, D., Randi, A., Venturino, A., Rivera, E., et al. (2012). Differential mechanisms of action are involved in chlorpyrifos effects in estrogen-dependent or -independent breast cancer cells exposed to low or high concentrations of the pesticide. *Toxicology letters*, *213*(2), 184–93. doi:10.1016/j.toxlet.2012.06.017
- Vinggaard, a M., Hnida, C., Breinholt, V., & Larsen, J. C. (2000). Screening of selected pesticides for inhibition of CYP19 aromatase activity in vitro. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, *14*(3), 227–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10806373>
- Won, Y. K., Liu, J., Olivier, K., Zheng, Q., & Pope, C. N. (2001). Age-related effects of chlorpyrifos on acetylcholine release in rat brain. *Neurotoxicology*, *22*(1), 39–48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11307850>