



## Doctoral Thesis

# Using isotope fractionation analysis to assess biodegradation of nitroaromatic contaminants in the field

**Author(s):**

Wijker, Reto S.

**Publication Date:**

2013

**Permanent Link:**

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-010117458> →

**Rights / License:**

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 21410

**USING ISOTOPE FRACTIONATION  
ANALYSIS TO ASSESS BIODEGRADATION  
OF NITROAROMATIC CONTAMINANTS IN  
THE FIELD**

A dissertation submitted to  
ETH ZURICH

for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by  
Reto Simon Wijker  
MSc. ETH Biology

born March 21<sup>th</sup>, 1980

citizen of  
Zürich, Switzerland

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Josef Zeyer, examiner  
PD Dr. Thomas B. Hofstetter, co-examiner  
Prof. Dr. Jan R. van der Meer, co-examiner

2013

# Summary

Contamination of soils and sediments by nitroaromatic contaminants is a world-wide problem caused by their use as explosives, pesticides, dyes, and industrial feedstocks and improper disposal practices as well as abandoned production and military training facilities. For a proper risk assessment and design of appropriate mitigation approaches at contaminated sites, knowledge of the in situ biodegradability is essential. Assessing the fate of nitroaromatic compounds (NACs) in the field is, however, challenging. Contaminants are present in different phases (e.g., bound to soil or sediment matrix or as solid-phase residues) and transformation can take place via several potentially competing pathways over time-scales of decades leading to both complete mineralization as well as to products that exceed the toxicity of the parent compounds. Compound specific isotope analysis (CSIA) offers a new approach to distinguish between the multitude of processes and to assess (bio)degradation processes quantitatively from the analysis of variations in contaminant isotopic compositions. It was the goal of this PhD thesis to develop a novel, CSIA-based procedure for the assessment of NAC biodegradation pathways in contaminated environments. To this end, we (1) elucidated how C, H, and N isotope fractionation trends can be indicative for biological and abiotic degradation pathways of NACs, (2) improved evaluation procedures for interpreting large hydrogen isotope fractionation reliably, and (3) developed analytical protocols, with which we elucidated the natural attenuation processes of di- and trinitrotoluenes at a contaminated site in Switzerland.

In a series of laboratory model systems, we identified the isotope fractionation patterns and studied the  $^{13}\text{C}$ -,  $^2\text{H}$ , and  $^{15}\text{N}$ -kinetic isotope effects (KIEs) of the most important NAC biodegradation pathways. Indicative trends of NAC isotope signatures, that is  $\delta^{15}\text{N}$  vs.  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^2\text{H}$  vs.  $\delta^{13}\text{C}$  were found for pathways initi-

ated via (i) dioxygenation, (ii) (partial) reduction, (iii) CH<sub>3</sub>-group oxidation, and (iv) monooxygenation from batch experiments with pure cultures of NAC degrading microorganisms. Owing to the large <sup>15</sup>N-KIEs and N isotope fractionation associated with NAC reduction,  $\delta^{15}\text{N}$  vs.  $\delta^{13}\text{C}$  trends are key to differentiate between reductive and oxidative pathways. In contrast, the substantial <sup>2</sup>H-KIEs and H isotope fractionation enables one to exploit  $\delta^2\text{H}$  vs.  $\delta^{13}\text{C}$  trends to distinguish degradation initiated via CH<sub>3</sub>-group oxidation from dioxygenation and monooxygenation pathways, respectively.

Due to the abundance and diversity of organisms able to catalyze NAC transformation via monooxygenation, we studied the magnitude and variation of C and N isotope fractionation associated with monooxygenation with four different strains of microorganisms capable of degrading 2- and 4-nitrophenol under a variety of experimental conditions. The magnitude of bulk isotope enrichment factors,  $\epsilon$ , varied considerably and  $\epsilon_C$ -values ranged from  $-0.26 \pm 0.04$  to  $-1.95 \pm 0.24$ ,  $\epsilon_N$  from  $-0.53 \pm 0.09$  to  $-1.98 \pm 0.16$ . Nonetheless, the combined evaluation of C and N isotope signatures enables one to constrain the isotope fractionation behavior to typical  $\delta^{15}\text{N}$  vs.  $\delta^{13}\text{C}$  trends for monooxygenation via the hydroxyquinone ( $0.5 \pm 0.1$ ) and benzoquinone ( $1.4 \pm 0.5$ ) pathway, respectively.

The large <sup>2</sup>H-KIEs associated with the cleavage of aliphatic C–H bonds as in CH<sub>3</sub>-group oxidation pathways makes it difficult, if not impossible to interpret H isotope fractionation. Application of CSIA to infer NAC oxidation reactions can therefore be hampered. We investigated the H (and C) isotope fractionation associated with the transformation of toluene, nitrobenzene, and four substituted nitrotoluenes by an abiotic oxidant (permanganate,  $\text{MnO}_4^-$ ), to propose a refined evaluation procedure for the quantitative distinction of CH<sub>3</sub>-group oxidation and dioxygenation reactions. Based on batch experiments, an isotopomer-specific kinetic model, and density functional theory (DFT) calculations, we successfully derived the large apparent <sup>2</sup>H-KIE of  $4.033 \pm 0.20$  for the CH<sub>3</sub>-group oxidation of toluene from H isotope fractionation exceeding  $> 1300\%$  as well as the corresponding <sup>13</sup>C-KIE ( $1.0324 \pm 0.0011$ ). In addition, consistent branching ratios for the competing CH<sub>3</sub>-group oxidation and dioxygenation of nitrotoluenes by  $\text{MnO}_4^-$  were obtained.

Knowledge on the isotope fractionation behavior associated with NAC biodegra-

dition and a newly developed analytical procedure were finally applied to assess biodegradation and -transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) and two dinitrotoluene isomers (2,4-DNT and 2,6-DNT) in a subsurface profile at a contaminated site in Switzerland. The type and relative contribution of reductive and oxidative degradation of the three contaminants was inferred from the combined evaluation of C, N, and H isotope fractionation. Perturbation of the subsurface from repeated construction activities resulted in concentration and isotope signature depth profiles of 2,4-DNT, 2,6-DNT, and TNT that did not provide conclusive information. The combined evaluation of NAC isotope fractionation ( $\delta^{15}\text{N}$  vs.  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^2\text{H}$  vs.  $\delta^{13}\text{C}$ ) in subsurface materials, however, revealed linear isotope signature trends that pointed towards biological transformation of the contaminants through a combination of processes. Comparison with isotope fractionation studied in the laboratory suggests that in the investigated subsurface profile, 86-89% of 2,4-DNT transformation was due to dioxygenation while TNT was mostly reduced and 2,6-DNT reacted via a combination of reduction and  $\text{CH}_3$ -group oxidation. A tentative interpretation based on information about site operation lead us to postulate biotransformation half-lives in the time-scale of one to two decades.

# Zusammenfassung

Die Umweltverschmutzung mit nitroaromatischen Schadstoffen ist ein weltweites Problem. Der verbreitete Einsatz dieser Chemikalien als Sprengstoffe, Pestizide, Farbstoffe und industrielle Rohstoffe, die unangemessene Entsorgung sowie ehemalige Produktionsstandorte belasten Böden, Sedimente und das Grundwasser. Sowohl die Einschätzung möglicher Risiken als auch die Entwicklung geeigneter Sanierungsstrategien setzen fundierte Kenntnisse über den natürlichen Abbau von nitroaromatischen Verbindungen voraus. Der Nachweis natürlicher Abbauprozesse ist jedoch schwierig, da nitroaromatische Verbindungen oft in verschiedenen Phasen (z.B. gebunden an die organische oder mineralische Bodenmatrix oder als Feststoff) in der Umwelt vorkommen. Zudem können viele nitroaromatische Verbindungen durch verschiedene, u.U. konkurrierende Reaktionen umgesetzt werden. Dies erstreckt sich meist über einen Zeitraum von mehreren Jahrzehnten und führt entweder zur Bildung noch toxischerer Abbauprodukte wie z.B. aromatischen Aminen oder zu komplettem Abbau (Mineralisierung). Ein neuer Ansatz für den Nachweis und die Unterscheidung dieser Abbauprozesse sowie das Ausmass des Abbaus werden mit einem neuen Analyseverfahren, namens Einzelstoff-Isotopenanalyse (Compound-Specific Isotope Analysis, CSIA) möglich. Das Ziel dieser Dissertation war deshalb die Entwicklung eines auf der Einzelstoff-Isotopenanalyse beruhenden Verfahrens, mit welchem Bioabbauprozesse von nitroaromatischen Verbindungen in kontaminierten Lebensräumen identifiziert und quantifiziert werden können. Zu diesem Zweck untersuchten wir erstens wie C-, H- und N-Isotopenfraktionierungstrends als Indikatoren für abiotische und biotische Abbauprozesse von Nitroaromaten verwendet werden können. Zweitens verbesserten wir das Auswertungsverfahren für die Interpretation von großen Wasserstoff-Isotopenfraktionierungen und drittens entwickelten wir eine analytische Methode, mit welcher der biologische Ab-

bau von Di- und Trinitrotoluol an einem verschmutzten Standort in der Schweiz nachgewiesen wurde.

Mit einer Reihe von Modellsystemen im Labor konnten wir die isotopischen Fraktionierungsmuster aufdecken und die kinetischen Isotopeneffekte (KIEs) für C, H und N von den wichtigsten nitroaromatischen Abbauwegen studieren. In Batchversuchen mit Reinkulturen welche nitroaromatische Verbindungen abbauen können, wurden für die Dioxygenierung, partielle Reduktion, Methylgruppenoxidation und Monooxygenierung eindeutige Trends ( $\delta^{15}\text{N}$  vs.  $\delta^{13}\text{C}$  und  $\delta^2\text{H}$  vs.  $\delta^{13}\text{C}$ ) in den NAC Isotopensignaturen gefunden. Aufgrund des großen  $^{15}\text{N}$ -KIE und der entsprechend großen N-Isotopenfraktionierung, welche durch partielle Reduktion hervorgerufen wird, können oxidative und reduktive Abbauprozesse unterschieden werden. Hingegen kann der große  $^2\text{H}$ -KIE und die damit verbundene H-Isotopenfraktionierung der Methylgruppenoxidation genutzt werden um Methylgruppenoxidation von Dioxygenierung und Monooxygenierung zu unterscheiden.

Aufgrund der starken Verbreitung und der Vielfalt von Mikroorganismen, die nitroaromatische Verbindungen via Monooxygenierung abbauen können, studierten wir das Ausmaß und die Variabilität der C- und N-Isotopenfraktionierung dieser Reaktion. Hierzu wurde der Abbau von 2- und 4-Nitrophenol durch vier verschiedene Bakterienstämme unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen betrachtet. Die Isotopenanreicherungsfaktoren variierten deutlich ( $\epsilon_C$ -Werte zwischen  $-0.26 \pm 0.04$  und  $-1.95 \pm 0.24$ ,  $\epsilon_N$ -Werte zwischen  $-0.53 \pm 0.09$  und  $-1.98 \pm 0.16$ ). Mit der kombinierten Auswertung von C- und N-Isotopensignaturen konnten jedoch eindeutige Trends ( $\delta^{15}\text{N}$  vs.  $\delta^{13}\text{C}$ ) für die Monooxygenierung via Hydroxychinon ( $0.5 \pm 0.1$ ) und via Benzochinon ( $1.4 \pm 0.5$ ) gefunden werden.

Die extrem großen  $^2\text{H}$ -KIEs verbunden mit dem Bruch aliphatischer C–H Bindungen (wie beispielsweise bei Methylgruppenoxidation), macht es schwierig oder gar unmöglich, die H-Isotopenfraktionierung auszuwerten. Die Anwendung von CSIA zum Nachweis von oxidativen Abbauwegen von nitroaromatischen Verbindungen kann deshalb erschwert werden. Aufgrund dessen untersuchten wir die H- (und C-) Isotopenfraktionierung der Oxidation von Toluol, Nitrobenzol und vier Nitrotoluolen mit einem abiotischen Oxidationsmittel (Permanganat,  $\text{MnO}_4^-$ ) und schlugen eine verbesserte Auswertungsmethode für die quantitative Unterscheidung von Methylgruppenoxidation und Dioxygenierung vor. Basierend auf Labor-

experimenten, einem Isotopomer-spezifischen Modell sowie density functional theory (DFT) Berechnungen, konnte ein  $^2\text{H}$ -KIE von  $4.033 \pm 0.20$  ( $^{13}\text{C}$ -KIE= $1.0324 \pm 0.0011$ ) für die Methylgruppenoxidation berechnet werden. Dafür wurden experimentelle Daten von Toluol verwendet, die eine H-Isotopenanreicherung von über 1300‰ aufwiesen. Zudem konnten die relativen Anteile von der gleichzeitig ablaufenden Methylgruppenoxidation und Dioxygenierung für Nitrotoluole bestimmt werden.

Schlußendlich konnten wir das neu gewonnene Wissen über die Isotopenfraktionierungen des Bioabbaus von nitroaromatischen Verbindungen und eine von uns neu entwickelte analytische Methode verwenden, um den Bioabbau von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) und zwei Dinitrotoluolen (2,4-DNT und 2,6-DNT) in einem Bodenprofil an einem kontaminierten Standort in der Schweiz nachzuweisen. Dabei wurden die Art des Bioabbaus sowie der relative Beitrag von oxidativen und reduktiven Abbauwegen für die drei Verbindungen mit kombinierten C-, N- und H-Isotopenfraktionierungen aufgedeckt. Konzentrations- und Isotopensignatur-Tiefenprofile von TNT, 2,4-DNT und 2,6-DNT lieferten keinen eindeutigen Beweis für Bioabbau, da das Bodenprofil aufgrund wiederholter baulicher Maßnahmen immer wieder durchmischt wurde. Trägt man allerdings Isotopensignaturen von zwei Elementen ( $\delta^{15}\text{N}$  vs.  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^2\text{H}$  vs.  $\delta^{13}\text{C}$ ) gegeneinander auf, zeigen sich systematische Isotopentrends, die auf mehrere, gleichzeitig ablaufende biologische Abbauewege hinwiesen. Der Vergleich mit experimentellen Isotopenfraktionierungsdaten (vom Labor) deuteten darauf hin, dass im Bodenprofil 86-89% des 2,4-DNT durch Dioxygenierung eliminiert wurden, während TNT hauptsächlich reduziert wurde. 2,6-DNT wurde durch simultan ablaufende Reduktion und Methylgruppenoxidation gleichzeitig abgebaut. Informationen über den frühern Betrieb des Standorts ermöglichten eine Abschätzung der Halbwertszeiten, die sich auf etwa 1-2 Jahrzehnte belaufen.