

Band 61

Schriftenreihe des Lehrstuhls für
Wasserchemie und Wassertechnologie
und der DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

**Anaerobe Metabolite organischer Schadstoffe im
Grundwasser - Analytik, Bildung und Nutzung als
Indikatoren**

Carsten Jobelius

Herausgeber
Harald Horn

Karlsruhe 2014

Carsten Jobelius

Anaerobe Metabolite organischer Schadstoffe im Grundwasser - Analytik, Bildung und Nutzung als Indikatoren

Herausgeber: Harald Horn

Band 61

Schriftenreihe des Lehrstuhls für Wasserchemie und Wassertechnologie und der DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
Karlsruhe 2014

ISSN: 2195-2973

Lehrstuhl für Wasserchemie und Wassertechnologie und DVGW-Forschungsstelle
am Engler-Bunte-Institut des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

Engler-Bunte-Ring 1

D-76131 Karlsruhe

Tel.: +49-(0)721-608-42581

Fax: +49-(0)721-608-46497

E-mail: ursula.schaefer@kit.edu

<http://wasserchemie.ebi.kit.edu/>

Titelbild: Schematische Darstellung des mikrobiologischen Abbaus von organischen Schadstoffen und der Bildung von Redoxzonen in einem kontaminierten Aquifer (nach Lovley 2001)

Dieses Werk wird durch das deutsche Urheberrechtsgesetz und internationale Verträge urheberrechtlich geschützt. © 2014 Prof. Dr. H. Horn. Alle Rechte vorbehalten. All rights reserved.

Anaerobe Metabolite organischer Schadstoffe im Grundwasser - Analytik, Bildung und Nutzung als Indikatoren

zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN (Dr.-Ing.)

der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik des
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Umweltwissenschaftler

Carsten Jobelius

aus Wuppertal

Referent:	Prof. Dr. Christian Zwiener
Korreferent:	Prof. Dr. Christoph Syldatk
Tag der mündlichen Prüfung:	16.07.2014

*So eine Arbeit wird eigentlich nie fertig,
man muss sie für fertig erklären,
wenn man nach der Zeit und den Umständen
das Möglichste getan hat.*

Johann Wolfgang von Goethe

Meiner Familie

Vorwort und Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit vom Mai 2006 bis September 2010 am Lehrstuhl für Wasserchemie des Engler-Bunte-Instituts am Karlsruher Institut für Technologie (KIT). Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung, Motivation und Ideen zahlreicher Menschen wohl nie zu einem erfolgreichen Ende gekommen. Ich bedanke mich an dieser Stelle bei allen, die dazu beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn *Prof. Dr. Christian Zwiener* für die Betreuung meiner Arbeit, die Unterstützung und die vielen fachlichen Diskussionen.

Herrn *Prof. Dr. Fritz Frimmel* danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die vielen wertvollen fachlichen Anregungen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn *Prof. Dr. Christoph Syldatk* für das Interesse an meiner Arbeit und die Übernahme des Korreferats.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Engler-Bunte-Instituts im Bereich Wasserchemie mit denen ich zusammenarbeiten durfte danke ich für die vielen Hilfestellungen, die angenehme Arbeitsatmosphäre und die fachlichen Diskussionen. Insbesondere vielen Dank an *Elly Karle* und *Raphael Peschke* (HPLC-MS/MS, Probenvorbereitung), *Axel Heidt* (GC, Huminstoffanreicherungen) und *Matthias Weber* (LC-UV/DOC) für die verschiedenen Messungen und Anreicherungen sowie *Christina Schmalz* für die angenehme Arbeitsatmosphäre im gemeinsamen Labor. Frau *Dr. Gudrun Abbt-Braun*, *Ursula Schäfer* und *Sylvia Heck* danke ich recht herzlich für die Hilfe bei bürokratischen Problemen im Rahmen des institutionellen Alltags.

Meinem langjährigem Bürokollegen *Heiko Schwegmann* danke ich für die vielen (fachlichen) Gespräche, für die "Nachhilfe" bei mikrobiologischen Themen und seine "Blutgrätschen" bei diversen Fußballspielen.

Weiterhin gilt mein Dank den Studenten, die im Rahmen von Studien- und Diplomarbeiten sowie als HiWis durch ihre Ideen und ihren Arbeitsaufwand entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Herausheben möchte ich in diesem Zusammenhang *Lilith Henes*, *Felix Götz*, *Sandra Deutsch*, *Floris Dahl* und *Angela Vives Escriva*.

Ein ganz besonderer Dank gilt auch folgenden Personen, die sich bereit erklärt haben meine Doktorarbeit in den unterschiedlichen Phasen der Fertigstellung Korrektur zu lesen: *Eike ter Haseborg*, *Markus Ziegmann*, *Heiko Schwegmann*, *Christina Schmalz*, *Markus Delay* und meinen *Eltern*.

Allen Mitgliedern der Forschungsgruppe "Electron transfer processes in anoxic aquifers (etrap)" danke ich für die Unterstützung und die vielen intensiven Diskussionen bei den zahlreichen Treffen: *Prof. Dr. Rainer Meckenstock* *Prof. Dr. Andreas Kappler*, *Prof. Dr. Stefan Haderlein*, *PD Dr. Hans-Herrman Richnow*, *Iris Bauer*, *Anke Buchholz*, *Katrin Hellige*, *Stefan Feisthauer* und *Rita Kleemann*. Insbesondere Herrn *Prof. Dr. Rainer*

Meckenstock danke ich für die Möglichkeit anaerobe mikrobielle Arbeitstechniken an seinem Institut zu erlernen. In diesem Zusammenhang möchte ich auch ganz besonderes der *Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG)* für die finanzielle Unterstützung im Rahmen dieses Forschungsprojektes danken.

Ich danke Herrn *Dr. Wolfgang Schulz* und *Dr. Alexander Müller* vom Zweckverband Landeswasserversorgung für die Messungen am LC-QTOF-MS und für die Hilfestellungen bei der Auswertung der Daten.

Meinen Eltern *Brigitta* und *Walter Jobelius* gilt besonderer Dank für die finanzielle und stets liebevolle Unterstützung. Ihr habt immer an mich und die Promotion geglaubt, auch wenn ich es selber nicht mehr getan habe.

Mein letzter und ganz herzlicher Dank gilt meiner Frau *Anna*. Danke für deine Geduld, Unterstützung und Liebe, die mich auch an schlechten Tagen wieder aufgerichtet hat. Obwohl die Doktorarbeit selten zur guten Stimmung innerhalb der Familie beigetragen hat, hast du sie mit mir gemeinsam durchgestanden.

Durch die Geburten unserer Kinder *Simon* und *Clara* hast du mich sehr glücklich gemacht. Die beiden haben zwar nicht unbedingt die Fertigstellung der Doktorarbeit beschleunigt, aber unser Leben unglaublich bereichert.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Problemstellung und Motivation	1
1.2 Zielsetzung und Arbeitsschritte	3
2. Stand des Wissens.....	7
2.1 Kontamination von Grundwässern	7
2.1.1 Natürliche Schadstoffminderungsprozesse (<i>Natural Attenuation</i>).....	9
2.1.2 Schadstoffabbau im Grundwasser	12
2.1.3 Ehemalige Gaswerksstandorte.....	15
2.2 Anaerober mikrobieller Abbau aromatischer und heterozyklischer Schadstoffe	16
2.2.1 Anaerobe mikrobielle Abbauwege	16
2.2.1.1 Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylol-Isomere (BTEX).....	17
2.2.1.2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK).....	20
2.2.1.3 Heterozyklen	22
2.2.2 Methoden zum Nachweis von Abbauprozessen im Aquifer	23
2.2.3 Zonen hoher mikrobieller Abbauproduktivität (<i>Plume Fringe Concept</i>)	26
2.3 Auftreten und Rolle aromatischer und heterozyklischer Metabolite	27
2.3.1 Identifizierte Metabolite	29
2.3.2 Metabolite als Indikatoren für mikrobiologischen Abbau.....	32
2.3.2.1 Qualitative Indikatorfunktion.....	32
2.3.2.2 Quantitative Indikatorfunktion.....	34
2.4 Analytische Methoden zur Bestimmung von Metaboliten	35
2.4.1 GC-MS	36
2.4.2 LC-MS	37
2.4.2.1 LC-MS/MS.....	40
2.4.2.2 LC-QTOF-MS	42
2.4.3 Einzelstoffanalytik.....	44
2.4.4 Screening und Identifizierung	45
2.5 Anthropogener Anteil am gelösten organischen Kohlenstoff (DOC).....	50
2.5.1 Isolierung von Huminstoffen.....	52
2.5.2 Charakterisierung mit Größenausschlusschromatographie (LC-UV/DOC).....	53
2.5.3 Charakterisierung mit massenspektrometrischen Methoden.....	55

3. Materialien und Methoden	57
3.1 Feldstandorte und Probenahmen	57
3.1.1 Düsseldorf	57
3.1.2 Stuttgart („Testfeld Süd“)	60
3.1.3 Weißandt-Göolzau	62
3.1.4 Hohlohsee.....	64
3.2 Anaerobe Abbauxperimente	64
3.2.1 Bakterienkultur <i>Geobacter toluenoxydans</i> TMJ1	64
3.2.2 Batch-Experimente.....	65
3.2.2.1 Ansatz der Batch-Experimente	65
3.2.2.2 Durchführung der Probenahmen.....	68
3.3 Analytische Methoden.....	68
3.3.1 LC-ESI-MS/MS	68
3.3.1.1 Neutral-Loss-Scans (NLS).....	69
3.3.1.2 Product-Ion-Scans (PIS)	70
3.3.1.3 Multiple-Reaction-Monitoring (MRM).....	71
3.3.2 LC-ESI-QTOF-MS	73
3.3.2.1 Bestimmung von Summenformeln (MS-only)	73
3.3.2.2 Ermittlung von hochaufgelösten Fragmentspektren (Targeted MS-MS) ...	77
3.3.3 GC-MS	78
3.3.3.1 Messung von Toluol	79
3.3.3.2 Derivatisierung und Messung von sauren Metaboliten	79
3.3.4 Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC)	80
3.3.5 LC-UV/DOC	80
3.3.6 UV/VIS-Spektroskopie	82
3.3.7 Anreicherungsverfahren	82
3.3.7.1 Festphasenanreicherung (SPE)	82
3.3.7.2 Flüssig-flüssig-Extraktion.....	83
3.3.7.3 Huminstoffanreicherung	84
4. Ergebnisse und Diskussion	86
4.1 Analytik saurer aromatischer und heterozyklischer Metabolite.....	86
4.1.1 Saure Metabolite in Huminstoff-Isolaten aus dem Aquifer in Stuttgart	86
4.1.1.1 Typische LC-ESI-MS/MS-Fragmentspektren	88
4.1.1.2 Screening mittels Neutral-Loss-Scans (NLS).....	90

4.1.1.3	Identifizierung saurer Metabolite	94
4.1.2	Saure Metabolite in Wasserproben aus dem Aquifer in Düsseldorf	105
4.1.2.1	Suspect-Screening und Identifizierung	107
4.1.2.2	Absicherung durch Fragmentspektren aus GC-MS-Messungen	108
4.1.2.3	Quantifizierung saurer Metabolite	113
4.2	Anaerober Abbau und Metabolitenbildung unter definierten Milieubedingungen..	116
4.2.1	Toluolabbau und Metabolitenbildung unter unterschiedlichen Milieubedingungen	117
4.2.1.1	Einfluss der Temperatur	119
4.2.1.2	Bildung des Metaboliten Benzylbernsteinsäure (BBS).....	120
4.2.1.3	Nutzung des Metaboliten BBS als Substrat	122
4.2.2	Metabolitenbildung und Cometabolismus in Schadstoffgemischen	124
4.2.2.1	Zugabe von Cosubstratmischungen	124
4.2.2.2	Zugabe einzelner Cosubstrate in höheren Konzentrationen.....	131
4.3	Metaboliten als Indikatoren für Schadstoffabbau und mikrobiologische Aktivität.	133
4.3.1	Qualitative Indikatoren des Schadstoffabbaus	133
4.3.2	Quantitative Indikatoren des Schadstoffabbaus	136
4.3.3	Indikatoren für Zonen erhöhter biologischer Aktivität	141
4.3.4	Transport im Aquifer und Nutzung als Elektronendonatoren	146
4.4	Anthropogener Anteil am DOC in kontaminierten Aquiferen	148
4.4.1	Isolierung von natürlichem und anthropogen geprägten DOC.....	148
4.4.2	Charakterisierung des DOC mit LC-UV/DOC.....	153
4.4.2.1	LC-UV/DOC-Chromatogramme der Fulvinsäure-Isolate.....	153
4.4.2.2	Repräsentativität der LC-UV/DOC-Chromatogramme	160
4.4.3	Charakterisierung des DOC mit massenspektrometrischen Techniken	163
5.	Zusammenfassung und Ausblick	172
5.1	Zusammenfassung	172
5.2	Ausblick	176
6.	Summary	179
7.	Literatur	184
8.	Verzeichnis der Symbole und Abkürzungen	206
8.1	Symbole	206
8.2	Abkürzungen.....	206

9. Verzeichnis der Abbildungen	210
10. Verzeichnis der Tabellen	218
A. Anhang.....	221

1. Einleitung

1.1 Problemstellung und Motivation

Die Kontamination von Böden und Grundwässern mit anthropogenen Schadstoffen ist ein weltweites Problem, das eine große Gefahr insbesondere für die Trinkwasserversorgung darstellt. Allein in Deutschland sind 300.000 altlastverdächtige Flächen bekannt, von denen die meisten auch Kontaminationen des Grundwassers aufweisen (LABO 2010). Der Schutz der Qualität der Grundwasserressourcen ist von besonders großer Bedeutung, da in vielen Staaten ein Großteil des Trinkwassers aus Grundwässern gewonnen wird (Thornton et al. 2002). In Deutschland zum Beispiel wird der Trinkwasserbedarf zu über 70% aus Grundwasservorräten gedeckt (BMU 2008). Die große Anzahl an Grundwasserkontaminationen auf der einen Seite, und die Nutzung von Grundwasser zur Trinkwassergewinnung auf der anderen Seite, zeigt eindrucksvoll, wie wichtig die Erforschung des Abbaus und der Ausbreitung von Kontaminanten und deren Abbauprodukten im Grundwasser ist. Der Schutz des Grundwassers vor Verschmutzung und Verschlechterung der Qualität ist ein wichtiges Ziel, das auch innerhalb der EU seit 2006 gesetzlich festgeschrieben ist (EU 2006). Eine ständige Überwachung der Grundwasserqualität ist somit unerlässlich.

Benzol, Toluol, Ethylbenzol und die Xylol-Isomere (BTEX), polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) sowie heterozyklische Verbindungen sind die mit am häufigsten vorkommenden Schadstoffklassen im Grundwasser (LfU 1997). Aufgrund ihrer Toxizität und teilweise guten Wasserlöslichkeit stellen einige dieser Substanzen eine große Gefahr für die Qualität des Grundwassers dar. Dementsprechend ist die Verbreitung und der Abbau dieser Substanzen im Aquifer seit einigen Jahren Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Untersuchungen (z.B. Beller 2000, Chakraborty und Coates 2004, Meckenstock et al. 2004, Beller et al. 2008, Bombach et al. 2010, Meckenstock und Mouttaki 2011).

Aufgrund des begrenzten Angebots an Sauerstoff im Grundwasser wegen geringer Nachlieferung durch den Boden und starker Zehrung durch mikrobielle Abbauprozesse spielt der anaerobe mikrobielle Abbau in stark kontaminierten Aquiferen (hohe organische Fracht) eine viel wichtigere Rolle als der aerobe Abbau (Coates und Anderson 2000, Lovley 2001). Die Aktivierung der reaktionsarmen aromatischen und heterozyklischen Schadstoffstrukturen ist dabei eine entscheidende Voraussetzung für weitere mikrobielle Abbauschritte. Dazu erfolgt häufig ein mikrobieller Einbau von (sauren) funktionellen Gruppen (z.B. Carboxyl- oder Bernsteinsäuregruppen) in die Schadstoffmoleküle (Biegert et al. 1996, Meckenstock et al. 2004, Heider 2007, Foght 2008, Philipp und Schink 2012). Die daraus resultierenden sauren aromatischen und heterozyklischen Metabolite lassen sich häufig als sehr spezifische Indikatoren für den anaeroben Abbau bestimmter Schadstoffe *in situ* verwenden (Beller 2000). Als Beispiel lassen sich aromatische Bernsteinsäurederivate anführen, die beim mikrobiologischen Abbau von Toluol, Xylol oder Methylnaphthalin unter anaeroben Bedingungen gebildet werden (Biegert et al. 1996, Krieger et al. 1999, Meckenstock et al. 2004).

Durch die große Anzahl kontaminierter Standorte und die hohen Kosten aktiver Sanierungsmaßnahmen ist eine komplette aktive Sanierung nahezu unmöglich. Aus diesem Grund wird seit einigen Jahren der passive Ansatz der natürlichen Schadstoffminderungsprozesse (*Natural Attenuation*, NA) in Deutschland diskutiert und getestet (LABO 2011). In den USA wird dieser Ansatz bereits seit einigen Jahren angewendet (Wiedemeier 1999, Christensen et al. 2001). Er basiert auf der Fähigkeit der im Aquifer vorkommenden Mikroorganismen, Schadstoffe *in situ* abzubauen und ist damit relativ kostengünstig und technologiearm. Allerdings bedarf er einer sehr guten Überwachung und Erforschung, um den Erfolg des Schadstoffabbaus zu dokumentieren (Wiedemeier 1999).

Zur Überwachung des Schadstoffabbaus stehen dabei verschiedene Methoden zur Verfügung (z.B. Bestimmung von Elektronenakzeptoren, Isotopenanalytik, Metabolitenanalytik, mikrobiologische und molekulare Methoden). Insbesondere die Metabolitenanalytik ist dafür sehr gut geeignet, da damit sehr spezifisch der mikrobiologische Abbau bestimmter Schadstoffe nachgewiesen und das Ausmaß der Kontamination umfassender dargestellt werden kann. Sie basiert auf der Messung von mikrobiellen Abbauprodukten (Metaboliten), die in spezifischen mikrobiellen Abbaupfaden von Schadstoffen gebildet werden (Beller 2000, Elshahed et al. 2001, Phelps et al. 2002, Meckenstock et al. 2010, Callaghan 2012). Durch die Identifizierung von bisher unbekanntem Metaboliten kann die Metabolitenanalytik aber auch einen wichtigen Beitrag zur Aufdeckung neuer Abbaupfade und/oder dem Abbau weiterer Schadstoffe leisten. Eine wichtige Voraussetzung zum effektiven Einsatz der Metabolitenanalytik ist die Entwicklung von analytischen Methoden mit denen sowohl gezielt Metabolite sensitiv nachgewiesen und quantifiziert werden können als auch eine Suche und anschließende Identifizierung von unbekanntem Metaboliten möglich ist.

Zur gezielten Nutzung der Metaboliten als Indikatoren für den Abbau der Schadstoffe und zum Verständnis ihres Auftretens sind wichtige Grundlagen und Prozesse zu erforschen und insbesondere folgende Fragestellungen zu beantworten:

- Welche Abbaupfade sind im Aquifer aktiv und unter welchen Bedingungen entstehen bestimmte Metabolite?
- Wie lassen sich analytische Messtechniken gezielt anwenden, um Metaboliten zu screenen, zu identifizieren und quantifizieren zu können?
- Lassen sich die Metabolite neben ihrer Funktion als qualitative Indikatoren für stattfindende Abbauprozesse bestimmter Schadstoffe auch als quantitative Indikatoren für den Grad des Abbaus der Schadstoffe, sowie als Indikator für Zonen höchster mikrobiologischer Abbauproduktivität im Aquifer einsetzen?
- Werden Metabolite in Abstrombereiche transportiert und können sie dort, wo die Schadstoffe selbst nicht mehr vorhanden sind, als Elektronendonatoren fungieren?

Zur Beantwortung dieser Fragestellungen sollte diese Arbeit einen wichtigen Beitrag leisten.

1.2 Zielsetzung und Arbeitsschritte

In dieser Arbeit wurde das Auftreten spezifischer saurer Metabolite aromatischer und heterozyklischer Schadstoffe in verschiedenen Aquiferen und unter definierten Milieubedingungen im Laboratorium untersucht. Damit sollte die Bildung und die Rolle dieser Metaboliten sowie deren Indikatorfunktion für den mikrobiologischen Abbau in Aquiferen studiert werden. Um zusätzlich ein umfassenderes Bild der anthropogenen Beeinflussung der Aquifere zu bekommen wurde auch der gesamte gelöste organische Kohlenstoff (*Dissolved Organic Carbon*, DOC) aus verschiedenen Bereichen der Aquifere isoliert und charakterisiert. Die grundlegenden Arbeitsschritte in dieser Arbeit waren:

- I. *Entwicklung, Optimierung und Anwendung massenspektrometrischer Methoden zur Analytik saurer Metaboliten (Screening, Identifizierung und Quantifizierung).*
- II. *Untersuchung der Metabolitenbildung beim anaeroben Abbau von Toluol und des Auftretens von Cometaboliten und Hemmeffekten in Schadstoffgemischen unter definierten Milieubedingungen mit dem eisenreduzierenden Modellorganismus *Geobacter toluenoxydans* TMJI.*
- III. *Erforschung der Eignung spezifischer saurer Metabolite als qualitative und quantitative Indikatoren des Schadstoffabbaus.*
- IV. *Untersuchung des Transports spezifischer saurer Metabolite sowie deren Funktion als Elektronendonatoren.*
- V. *Erforschung des anthropogenen Anteils am DOC in kontaminierten Aquiferen.*

Im Folgenden werden die grundlegenden Arbeitsschritte und die entsprechenden Ziele kurz erläutert sowie Verweise auf die jeweiligen Kapitel in der Arbeit gegeben.

- I. *Entwicklung, Optimierung und Anwendung massenspektrometrischer Methoden zur Analytik saurer Metaboliten (Screening, Identifizierung und Quantifizierung)*

Eine sensitive und selektive Analytik spezifischer saurer aromatischer und heterozyklischer Metabolite in wässrigen Proben (z.B. Grundwasser oder Medium aus Laborversuchen) ist die entscheidende Voraussetzung für weitere Untersuchungen zu deren Bildung, Rolle und Nutzung. Damit können z.B. stattfindende Abbauprozesse bestimmter Schadstoffe nachgewiesen, ihre Indikatorfunktion untersucht sowie Abbauprozesse durch neu identifizierte Metabolite aufgedeckt werden. Ausgewählte Probleme der Metabolitenanalytik sind die Beschränkung auf bestimmte Schadstoffe und Abbauprozesse sowie eine geringe Sensitivität.

Aus diesen Anforderungen und Problemen ergaben sich für diese Arbeit folgende Ziele:

- A. Entwicklung von massenspektrometrischen **Screening-Verfahren** zum Nachweis von (unbekannten) sauren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten. Zu diesem Zweck wurden sowohl Methoden zum gruppenspezifischen Screening (*Neutral-Loss-Scans*) mit Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) als auch Screening-Methoden (*Suspect-Screening*) mit

Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometrie (LC-QTOF-MS) angewendet.

- B. **Identifizierung** von Metaboliten durch Fragmentspektren (LC-MS/MS, LC-QTOF-MS und GC-MS), Summenformeln abgeleitet aus akkuraten Massen (LC-QTOF-MS) sowie durch die Nutzung von chemischen Datenbanken in Verbindung mit in-silico Fragmentierung.
- C. **Quantifizierung** von relevanten sauren Metaboliten mit LC-MS/MS (Multiple-Reaction-Monitoring) zum sensitiven (anreicherungsfreien) Nachweis der Metabolitenbelastung in kontaminierten Bereichen und Abstrombereichen sowie zur Ermittlung von kleinskaligen Konzentrationsunterschieden, die zur Aufklärung der (quantitativen) Indikatorfunktionen der Metabolite im Aquifer dienen.

Informationen zu diesem Thema finden sich in folgenden Kapiteln:

Stand des Wissens:	Kapitel 2.4
Material und Methoden:	Kapitel 3.3.1, 3.3.2 und 3.3.3
Ergebnisse und Diskussion:	Kapitel 4.1

II. Untersuchung der Metabolitenbildung beim anaeroben Abbau von Toluol und des Auftretens von Cometaboliten und Hemmeffekten in Schadstoffgemischen unter definierten Milieubedingungen mit dem eisenreduzierenden Modellorganismus *Geobacter toluenoxydans* TMJ1

Um den Einfluss bestimmter Faktoren auf Abbautätigkeiten und Metabolitenbildung zu untersuchen und um Prozesse besser zu verstehen, bedarf es Experimente unter kontrollierten Bedingungen, bei denen einzelne Faktoren kontrolliert verändert werden können. Die Komplexität der Einflussfaktoren im Feld ist dafür zu groß. Aus diesem Grund wurden anaerobe Batch-Experimente mit der eisenreduzierenden und Toluol-abbauenden Bakterienkultur *Geobacter toluenoxydans* TMJ1 unter definierten Milieubedingungen durchgeführt. Dabei wurden folgende Ziele verfolgt:

- A. Untersuchung des **anaeroben Abbaus** von **Toluol** und der **Metabolitenbildung** unter **unterschiedlichen Milieubedingungen** zur Ermittlung quantitativer Zusammenhänge zwischen abgebautem Schadstoff und Metabolit und der Relevanz unterschiedlicher Einflussfaktoren.
- B. Aufdeckung von **cometabolischen Abbauprozessen** (Bildung von Cometaboliten) sowie **Hemmungen des Abbaus** durch Zugabe von Cosubstraten (anderen Schadstoffen).

Informationen zu diesem Thema finden sich in folgenden Kapiteln:

Stand des Wissens:	Kapitel 2.2.1 und 2.3
Material und Methoden:	Kapitel 3.2 (Durchführung), Kapitel 3.3.1, 3.3.3 und 3.3.6 (Analytik) Kapitel 3.3.7.1 und 3.3.7.2 (Anreicherung)
Ergebnisse und Diskussion:	Kapitel 4.2

III. Erforschung der Eignung spezifischer saurer Metabolite als qualitative und quantitative Indikatoren des Schadstoffabbaus

Die Nutzung spezifischer Metabolite als qualitative Indikatoren für den anaeroben mikrobiellen Abbau bestimmter Schadstoffe ist ein häufig angewendeter und anerkannter Ansatz. Ihre Verwendung als quantitativer Indikator für den Grad des Abbaus des Ausgangsschadstoffs ist jedoch schwierig, da quantitative Zusammenhänge zwischen den Konzentrationen von Metaboliten und deren Ausgangssubstanzen (im Feld) bisher kaum untersucht wurden und die Ergebnisse keine eindeutigen Schlussfolgerungen zulassen. Weiterhin ist die Nutzung der Metabolite als Indikatoren für die Aufdeckung kleinräumiger Zonen hoher mikrobieller Abbauproduktivität im Aquifer, im Gegensatz zu Schadstoffen, Elektronenakzeptoren und metabolische Endprodukten, bisher auch weitgehend unbekannt. Dieser Forschungsbedarf führte in dieser Arbeit zu folgenden Zielen:

- A. **Qualitativer** Nachweis stattfindender **mikrobieller Abbauprozesse** bestimmter Schadstoffe *in situ* durch Detektion und Identifizierung von spezifischen sauren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten in Grundwasserproben sowie Huminstoff-Isolaten aus kontaminierten Aquiferen.
- B. Aufdeckung **quantitativer Zusammenhänge** unterschiedlicher Schadstoff/Metabolit-Paare durch Vergleich beider Konzentrationen in Grundwasserproben zur Ermittlung einer potentiellen quantitativen Indikatorfunktion der Metabolite.
- C. Untersuchung der Eignung von Metaboliten als **Indikatoren für Zonen erhöhter mikrobieller Abbautätigkeit** im Aquifer durch Aufdeckung kleinskaliger Konzentrationsgradienten der Metaboliten in verschiedenen Zonen der Schadstofffahne und Vergleich mit anderen relevanten Parametern (z.B. Schadstoffkonzentrationen, Elektronenakzeptoren). Steile Konzentrationsgradienten geochemischer Parameter sind dabei häufig deutliche Hinweise auf hohe mikrobielle Aktivität. Eine hohe vertikale Auflösung der Probenahme im Aquifer wurde durch die Nutzung eines hochauflösenden Multi-Level-Brunnens gewährleistet.

Informationen zu diesem Thema finden sich in folgenden Kapiteln:

Stand des Wissens:	Kapitel 2.2.1, 2.2.3 und 2.3
Material und Methoden:	Kapitel 3.1.1 und 3.1.2 (Feldstandorte) Kapitel 3.3.1, 3.3.2, und 3.3.3 (Analytik)
Ergebnisse und Diskussion:	Kapitel 4.3

IV. Untersuchung des Transports spezifischer saurer Metabolite sowie deren Funktion als Elektronendonatoren

Über den Transport von sauren Metaboliten aus kontaminierten Bereichen, in dem sie gebildet werden, in Abstrombereiche ist im Vergleich zu den Ausgangsschadstoffen kaum etwas bekannt. Ihre höhere Polarität durch den mikrobiellen Einbau von funktionellen Gruppen (z.B. Carboxyl- oder Bernsteinsäuregruppen) lässt aber einen verbesserten Transport vermuten. Bei einem relevanten Transport könnten sie in Abstrombereichen, wo kein

Schadstoff als Substrat mehr zur Verfügung steht, unter möglicherweise veränderten Redoxbedingungen (z.B. mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor) als Substrat (Elektronendonator) genutzt und dort weiter abgebaut werden.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden **Grundwasserproben** und **Huminstoff-Isolate** aus **Abstrombereichen** verschiedener Feldstandorte auf Metabolite analysiert.

Informationen zu diesem Thema finden sich in folgenden Kapiteln:

Stand des Wissens:	Kapitel 2.3
Material und Methoden:	Siehe I. und III.
Ergebnisse und Diskussion:	Kapitel 4.3.4

V. Erforschung des anthropogenen Anteils am DOC in kontaminierten Aquiferen

Die Analytik von bestimmten Schadstoffen und Metaboliten gibt nur einen Ausschnitt der anthropogenen Belastung von Aquiferen wieder. Um umfassendere Informationen über das Ausmaß des anthropogenen Anteils am DOC zu bekommen, bedarf es Isolierungs- und Charakterisierungstechniken, die den kompletten oder wenigstens einen großen Teil des DOC umfassen. Ein großer Anteil an anthropogenem eingetragenen DOC könnte zusätzlich zum natürlichen DOC Effekte auf geochemische Prozesse haben. Der DOC aus kontaminierten Aquiferen ist bisher kaum untersucht und charakterisiert worden, was zu folgenden Zielen in dieser Arbeit geführt hat:

- A. **Isolierung** von **Huminstoff-Fraktionen** aus unterschiedlichen Bereichen von kontaminierten Aquiferen (Schadstofffahne, Abstrom) sowie anthropogen kaum beeinflussten Gewässern mit anschließendem Vergleich der Kohlenstoffbilanzen.
- B. **Charakterisierung** der verschiedenen Huminstoff-Fraktionen mittels der Kopplung von Flüssigkeitschromatographie mit UV- und DOC-Detektoren (**LC-UV/DOC**) sowie **massenspektrometrischer Techniken**. Der Vergleich der Ergebnisse der Fraktionen aus kontaminierten und anthropogen kaum beeinflussten Bereichen sollte Hinweise auf den anthropogen eingetragenen DOC-Anteil in den Aquiferen geben.

Informationen zu diesem Thema finden sich in folgenden Kapiteln:

Stand des Wissens:	Kapitel 2.5
Material und Methoden:	Kapitel 3.1.2, 3.1.3 und 3.1.4 (Feldstandorte) Kapitel 3.3.2, 3.3.4 und 3.3.5 (Analytik) Kapitel 3.3.7.3 (Anreicherung)
Ergebnisse und Diskussion:	Kapitel 4.4

2. Stand des Wissens

2.1 Kontamination von Grundwässern

Anthropogen in den Untergrund (Böden, Grundwässer) eingetragene organische Schadstoffe stellen ein sehr häufiges Problem für die Umwelt und insbesondere für die Qualität des Grundwassers dar. Ein großer Teil der Grundwasser-Kontaminationen ist auf Altlasten zurückzuführen, bei denen durch frühere menschliche Tätigkeiten Schadstoffe in Umweltkompartimente gelangt sind und von denen heute eine Gefährdung für die Umwelt und die menschliche Gesundheit ausgehen kann. Ein typisches Beispiel für Standorte mit Altlasten sind ehemalige Gaswerksstandorte, an denen Gas für unterschiedliche Nutzungen hergestellt wurde (Kapitel 2.1.3). Die Kontamination von Böden und Grundwässern erfolgte dabei auf vielfältige Weise wie z.B. durch Leckagen, unsachgemäße Entsorgung oder Unfälle. Aufgrund des häufigen Vorkommens und der Toxizität der BTEX und PAK sowie deren relativ hoher Wasserlöslichkeit (vor allem BTEX) steht die Verbreitung und der Abbau dieser Substanzen seit vielen Jahren im Fokus der Wissenschaft (Cerniglia 1992, Beller 2000, Chakraborty und Coates 2004, Meckenstock et al. 2004, Foght 2008, Meckenstock und Mouttaki 2011). In den letzten Jahren ist auch die Stoffgruppe der Heterozyklen immer weiter in den Blickpunkt der Forschung gerückt. Diese Stoffklasse weist aufgrund des heterozyklischen Atoms im aromatischen Ring (O, S, N) in der Regel eine höhere Wasserlöslichkeit auf als die entsprechenden Aromaten (Sabljić et al. 1995). Außerdem zeigen einige Heterozyklen bereits in geringen Konzentrationen genotoxische, mutagene und karzinogene Effekte (Willems et al. 1992, Hartnik et al. 2007). Typische aromatische und heterozyklische Schadstoffe in mit Teeröl kontaminierten Grundwässern und deren Wasserlöslichkeiten sind in Abbildung 2.1 dargestellt.

Die Wasserlöslichkeit der Schadstoffe ist ein wichtiger Faktor, der deren Abbau durch unterschiedliche Mobilität und Bioverfügbarkeit im Aquifer beeinflusst (Grathwohl 1998, Wiedemeier 1999, Reineke 2001). Je nach Wasserlöslichkeit liegen die Schadstoffe oder Schadstoffmischungen, die ins Grundwasser gelangen, entweder gelöst, sorbiert oder als schwerlösliche Phase vor (Grathwohl 1998). Schwerlösliche Phasen stellen Schadstoffreservoirs für die langfristige Freisetzung der Schadstoffe ins Wasser dar. Sie werden in der Literatur als NAPL (*Nonaqueous Phase Liquids*) bezeichnet (Wiedemeier 1999). Je nach Dichte der Schadstoffe in der Phase unterscheidet man LNAPL (*Light Nonaqueous Phase Liquids*) und DNAPL (*Dense Non Aqueous Phase Liquids*).

Bei LNAPL mit Inhaltsstoffen, die eine geringere Dichte als Wasser aufweisen (z.B. BTEX) schwimmt die Phase auf dem Grundwasser auf und verursacht häufig nur wenig mächtige Schadstofffahnen von vertikal 1 bis 2 m. Die DNAPL mit Inhaltsstoffen größerer Dichte (z.B. PAK, Teeröle) sinken häufig in tiefere Zonen eines Aquifers ab und können mächtige vertikale Schadstofffahnen erzeugen. Das Vorhandensein von NAPL kann dafür sorgen, dass trotz stattfindender Abbauprozesse keine abnehmenden Schadstoffkonzentrationen auftreten, da eine ständige Nachlieferung erfolgt (Meckenstock et al. 2010). Dies führt auch dazu, dass

in unmittelbarer Umgebung der Phasen die Sättigungskonzentrationen der Schadstoffe in Wasser erreicht werden und somit auch schwerlösliche Stoffe in relevanten Konzentrationen auftreten können. Durch Herauslösen der Schadstoffe aus den Phasen und Transport mit dem Grundwasserstrom können lange horizontale Schadstoffbahnen entstehen (Grathwohl 1998, Zamfirescu und Grathwohl 2001). Die Ausbildung von Schadstoffbahnen führt zu einer potentiellen Gefährdung der Wassernutzung im Abstrom (z.B. Nutzung als Trinkwasser), wodurch eine Untersuchung des Verbleibs und des Abbaus der Schadstoffe im Aquifer absolut notwendig wird.

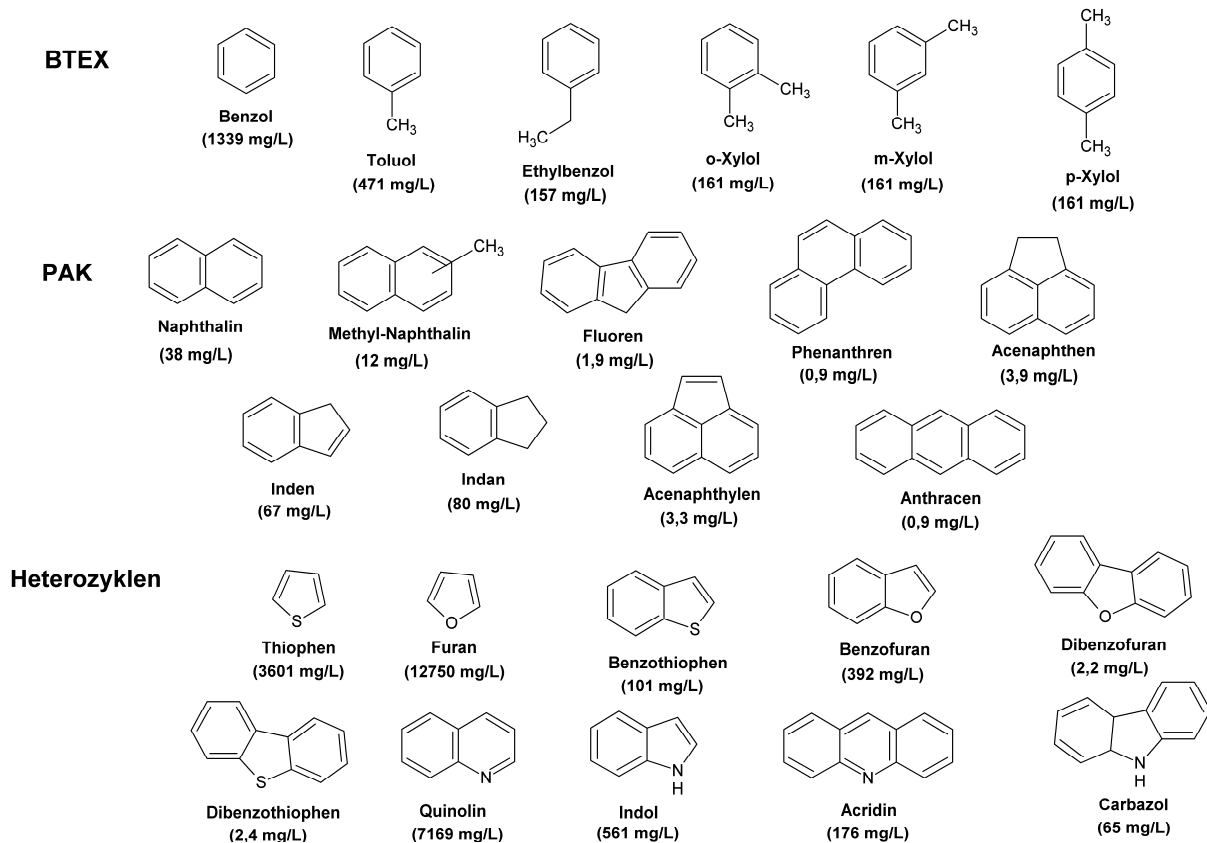


Abbildung 2.1: Typische Schadstoffe an mit Teeröl kontaminierten Standorten und deren Wasserlöslichkeiten (berechnet). Bei PAK und Heterozyklen sind ausgewählte Substanzen dargestellt. Da nicht für alle Verbindungen experimentell ermittelte Wasserlöslichkeiten verfügbar sind, sind hier aus Gründen der Vergleichbarkeit für alle Substanzen berechnete Wasserlöslichkeiten angegeben. Diese sind mit dem Programm WATERNT v1.01 (EPI Suite, US EPA) ermittelt worden, was diese auf Grundlage von Konstanten für molekulare Fragmente berechnet. Ein für die BTEX beispielhaft durchgeführter Vergleich mit Literaturdaten ergab gute Übereinstimmungen (z.B. Mackay und Shiu 1981):
 $\rho(\text{Benzol}) = 1770 \text{ mg/L}$, $\rho(\text{Toluol}) = 515 \text{ mg/L}$, $\rho(\text{Ethylbenzol}) = 152 \text{ mg/L}$, $\rho(\text{Xylole}) = 175\text{-}185 \text{ mg/L}$.

Der grobe Verlauf einer Schadstoffbahn kann durch den Summenparameter DOC aufgezeigt werden. Damit werden u.a. alle (oxidierbaren) organischen Schadstoffe und deren Metabolite erfasst. Eine vollständige Mineralisierung der Schadstoffe führt zu einer teilweisen Verringerung der DOC-Konzentration, da ein Teil des CO_2 ausgast. Durch den Vergleich von DOC-Werten vom Zustrom mit Werten vom kontaminierten Bereich lässt sich der Grad der organischen Belastung abschätzen. In stark belasteten Aquiferen können DOC-Werte von

über $\rho(\text{DOC}) = 100 \text{ mg/L}$ gemessen werden, wo hingegen typische DOC-Werte von unbelasteten Aquiferen nur im Bereich von $\rho(\text{DOC}) = 0,1 \text{ mg/L}$ bis $\rho(\text{DOC}) = 2 \text{ mg/L}$ (Thurman 1985) bzw. bis $\rho(\text{DOC}) = 5 \text{ mg/L}$ (Kunkel et al. 2004) liegen. Die alleinige Messung des DOC hat jedoch entscheidende Nachteile. Er gibt keine Aussage darüber ob die Schadstoffe wirklich abgebaut worden sind, da auch abiotische Prozesse wie z.B. Verdünnung eine Verringerung des DOC hervorrufen können. Außerdem kann der DOC-Gehalt konstant bleiben, obwohl es einen Abbau der Schadstoffe gegeben hat, der aber nicht bis zur vollständigen Mineralisierung gegangen ist. Der Summenparameter DOC kann also zwar Hinweise auf einen stattfindenden Abbau geben, aber nicht die Qualität der organischen Materie berücksichtigen (Frimmel und Abbt-Braun 2011). Er gibt nicht wieder, welche Schadstoffe wie stark abgebaut werden. Das ist aber entscheidend, da die Schadstoffe z.B. stark unterschiedliche Toxizität besitzen. Somit sind neben der Betrachtung des DOC intensivere Untersuchungen der Abbauvorgänge und Abbauprodukte (z.B. Metabolite) unausweichlich.

2.1.1 Natürliche Schadstoffminderungsprozesse (*Natural Attenuation*)

Durch die große Anzahl und Fläche an kontaminierten Standorten und die teilweise hohen Kosten aktiver Sanierungsmaßnahmen ist eine komplette aktive Sanierung vieler Standorte nahezu unmöglich. Zusätzlich bringen die aktiven Sanierungsmaßnahmen teilweise andere Probleme mit sich. Bei der Auskofferung (Erdaushub) kontaminierter Bereiche z.B. wird das Ökosystem geschädigt und das Schadstoffproblem wird nur an die Oberfläche verlagert. Bei so genannten „*Pump and Treat*“-Maßnahmen werden häufig die Schadstoffe nicht ausreichend entfernt. Allerdings sind aufgrund der durch die Kontamination entstehenden Gefährdung von Mensch und Umwelt Sanierungs- und Überwachungsmaßnahmen unabdingbar (BBodSchG 2004).

Aufgrund dieser Nachteile und des Zwangs der Sanierung bzw. der Überwachung wird seit Mitte der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts der passive Ansatz der natürlichen Schadstoffminderungsprozesse (*Natural Attenuation*, NA) diskutiert und angewendet. Dieser Ansatz basiert auf der Fähigkeit der im Aquifer vorkommenden Mikroorganismen Schadstoffe abzubauen. Er ist kostengünstig und technologiearm. Der Erfolg bedarf allerdings einer guten Überwachung und Erforschung. Dieser Ansatz wird in den USA bereits angewendet (Wiedemeier 1999, Christensen et al. 2001). In Europa steht er im Fokus der Forschung (LABO 2011, Declercq et al. 2012), aber er ist in Deutschland als Strategie noch nicht im Bundesbodenschutzgesetz (BBodSchG 2004) verankert. Die gesetzliche Verankerung dieser Sanierungsstrategie in Deutschland wird intensiv diskutiert (LABO 2005, LABO 2011). Einzelne andere europäische Länder wie z.B. Frankreich haben ihn bereits im Gesetz verankert und auch in Deutschland wird erwartet, dass dies mit der nächsten Überarbeitung des BBodSchG passieren wird (Declercq et al. 2012). Die Vor- und Nachteile dieses Ansatzes sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Vor- und Nachteile des Ansatzes der natürlichen Schadstoffminderungsprozesse (NA) (nach Wiedemeier 1999).

Vorteile	Nachteile
- Sehr kostengünstiges Verfahren	- Zeiten für den Abbau können sehr lang sein
- Schadstoffe werden in harmlose Nebenprodukte überführt oder sogar mineralisiert	- NA ist abhängig von hydrogeologischen Bedingungen, die sich schnell ändern können
- Schadstoffe müssen nicht transferiert werden	- NA-Prozesse müssen intensiv überwacht werden

Als NA werden physikalische, chemische und biologische Prozesse bezeichnet, die ohne aktives menschliches Eingreifen zu einer Reduzierung der Masse, der Toxizität, der Mobilität, des Volumens oder der Konzentration eines Stoffes im Boden oder im Grundwasser führen (Wiedemeier 1999, LABO 2011, Abbildung 2.2). Zu diesen Prozessen zählen neben den physikalischen Prozessen wie Sorption, Dispersion, Diffusion und Verflüchtigung auch chemische und biologische Prozesse wie die chemische Transformation und der biologische Abbau (Wiedemeier 1999, LABO 2005). Die Prozesse werden allgemein in destruktive Prozesse (chemische Transformation, biologischer Abbau), und in nicht-destruktive Prozesse (Dispersion, Sorption, Verdünnung, Verflüchtigung) eingeteilt. Die destruktiven Prozesse bewirken einen tatsächlichen Abbau des Schadstoffs, wohingegen die nicht-destruktiven Prozesse lediglich zur Reduktion der Konzentration des Schadstoffs (nahe der Quelle) führen, aber zu keiner Reduktion der Schadstoffmasse im Gesamtsystem. Der (mikro)biologische Abbau ist bei den destruktiven Prozessen der Wichtigste, da er als einziger die Schadstoffe nachhaltig abbaut und im besten Fall vollständig zu CO₂ und H₂O abbaut. Dabei wird die Fähigkeit der Mikroorganismen ausgenutzt, eine Bandbreite von Schadstoffen unter verschiedenen Umweltbedingungen abzubauen zu können.

Der entscheidende Aspekt bei der Verwendung von NA zur Sanierung von kontaminierten Standorten ist die Überwachung des Abbaus der Schadstoffe (*Monitored Natural Attenuation*, MNA) durch qualitative und quantitative Nachweismethoden (siehe Kapitel 2.2.2). Da eine Vielzahl von Faktoren den Verbleib und den Abbau von Schadstoffen im Aquifer beeinflusst, ist es notwendig, den tatsächlich stattfindenden Abbau (Abbauaktivität) *in situ* nachzuweisen. NA kann nur dann als eine adäquate Sanierungsmaßnahme angesehen werden, wenn abnehmende Schadstoffkonzentrationen durch mikrobielle Abbauvorgänge hervorgerufen werden. Der Nachweis stattfindender natürlicher Schadstoffminderungsprozesse erfolgt üblicherweise durch den Ansatz der „3 Lines of Evidence“, der aus den USA stammt (US EPA 1999):

1. Nachweis der Abnahme der Schadstoffkonzentration mit zunehmender Distanz zur Schadstoffquelle und der Veränderungen der Dimension der Schadstofffahne (z.B. Messung der Schadstoffkonzentrationen).
2. Nachweis des Schadstoffabbaus durch chemische und geochemische Messungen *in situ* (z.B. Elektronenakzeptoren, Isotopenfraktionierung, Metabolitenanalyse).

3. Nachweis des Abbau(potential)s durch mikrobiologische Messungen wie z.B. *in situ* oder Laborexperimente mit Mikroorganismen (z.B. mikrobiologische Bestandsaufnahme, Nachweis des Abbaus in Mikrokosmen).

Die Charakteristika sowie Vor- und Nachteile der einzelnen Nachweismethoden werden in Kapitel 2.2.2 eingehend diskutiert.

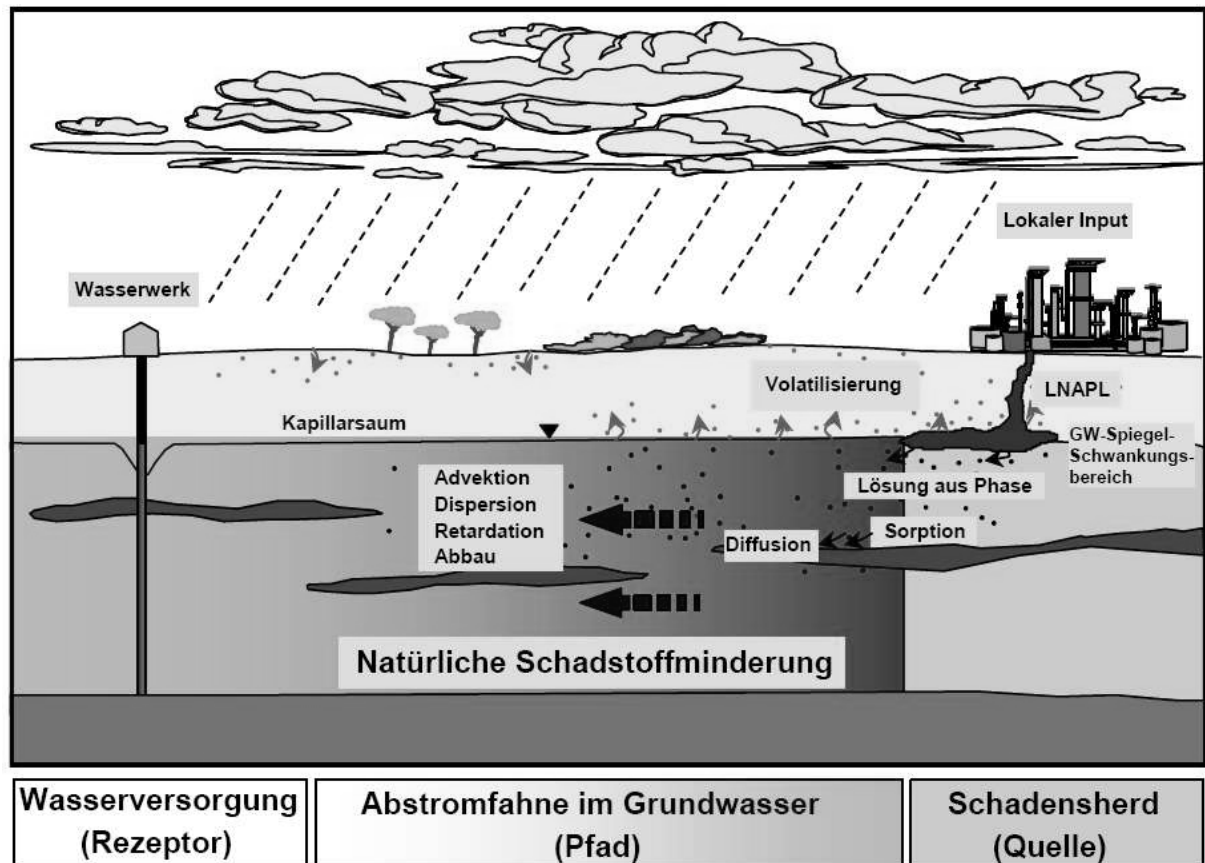


Abbildung 2.2: NA-Prozesse am Beispiel eines mit Mineralöl kontaminierten Standortes (aus: Schüth 1994).

Neben dem „passiven“ Ansatz des NA gibt es auch noch den Ansatz des *Enhanced Natural Attenuation* (ENA), bei dem aktiv auf die stattfindenden Schadstoffminderungsprozesse im Aquifer Einfluss genommen wird (Farhadian et al. 2008, Foght 2008). Das Ziel dieses Ansatzes ist, die Schadstoffminderungsprozesse in ihrer Wirkungsweise zu maximieren. Beispiele für ENA sind die künstliche Einbringung von Sauerstoff oder anderer Elektronenakzeptoren, Einsatz von nanoskaligem Eisen sowie die Zugabe von Methanol oder Ethanol, um die Löslichkeit der Schadstoffe (z.B. BTEX) im Aquifer zu verbessern (Farhadian et al. 2008). Um die richtigen Maßnahmen wählen zu können, müssen aber zunächst die Abbauprozesse im jeweiligen kontaminierten Aquifer umfangreich untersucht worden sein. Grundsätzliche Nachteile dieses Ansatzes sind die erhöhten Kosten und die Tatsache, dass aktiv in das Ökosystem eingegriffen wird. Auf ENA-Prozesse wird im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen.

2.1.2 Schadstoffabbau im Grundwasser

Der Abbau der meisten im Aquifer vorkommenden organischen Schadstoffe ist generell möglich, aber er ist abhängig von vielen Faktoren wie z.B. der Art des Substrats (Schadstoffs), dem Vorhandensein entsprechender Mikroorganismen und den vorliegenden Umweltbedingungen.

Allgemein benötigen Mikroorganismen zum Abbau der organischen Schadstoffe und zum Wachstum neben den Schadstoffen an sich, die beim metabolischen Abbau als Substrat fungieren, terminale Elektronenakzeptoren (O_2 , NO_3^- , SO_4^{2-} , Fe(III), Mn(IV)), Makro-Nährstoffe (Stickstoff, Phosphor), Mikro-Nährstoffe (z.B. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ usw.) sowie spezifische Umweltbedingungen (z.B. Temperatur, pH-Wert) (Field 2002, Farhadian et al. 2008). Generell ist anzumerken, dass die Mikroorganismen, die teilweise sehr schwer nutzbaren Schadstoffe nur dann abbauen, wenn keine anderen einfacher zu nutzenden und energetisch höherwertigen Kohlenstoff- und Energiequellen zur Verfügung stehen.

Der mikrobiologische Abbau von organischen (Schad-)Stoffen erfolgt vorrangig zu CO_2 oder Methan unter Zehrung von terminalen Elektronenakzeptoren (Abbildung 2.3) und unter Bildung von Biomasse.

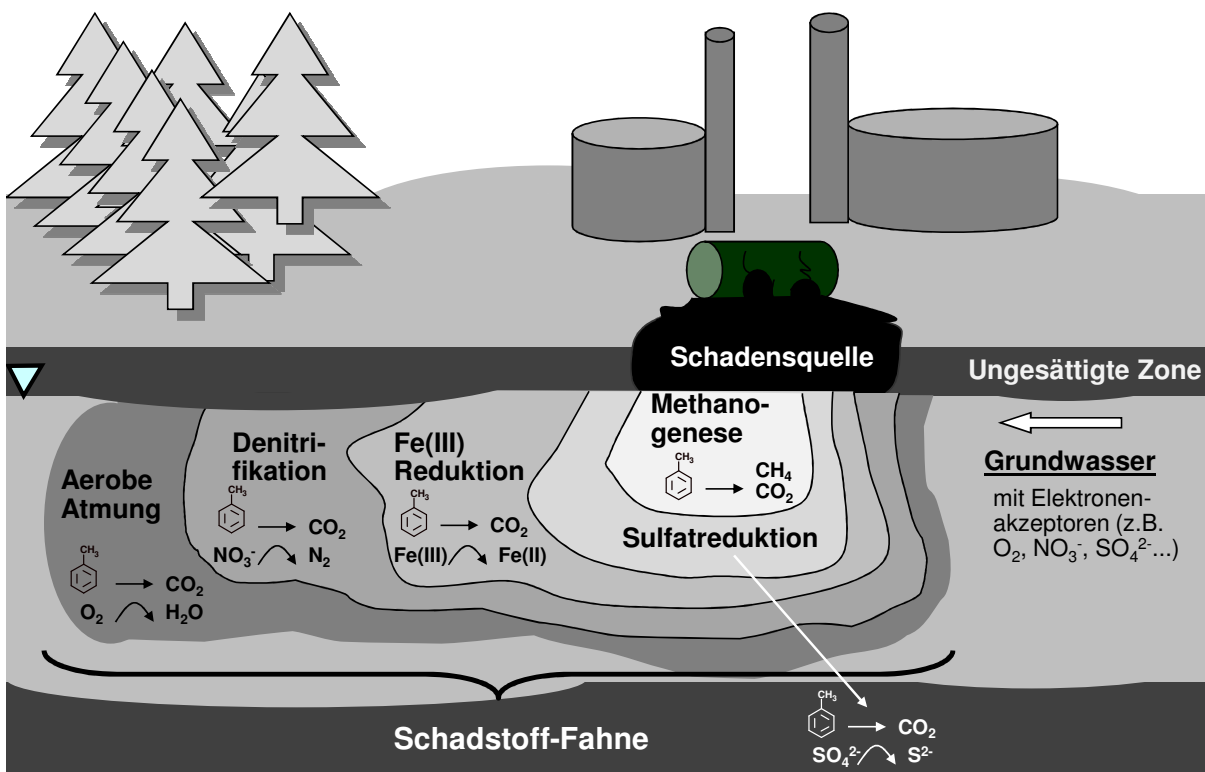


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des mikrobiologischen Abbaus und der Bildung von Redoxzonen in einem kontaminierten Aquifer (nach: Lovley 2001).

Während des Abbaus entsteht eine Vielzahl verschiedener Zwischenprodukte (Metabolite), die teilweise sehr spezifisch für die Abbauwege der jeweiligen Schadstoffe sind (Kapitel 2.2 und 2.3). Beim metabolischen Abbau dient der Schadstoff als Kohlenstoff- und Energiequelle. Neben dem metabolischen Abbau tritt auch cometabolischer Abbau auf. Als Cometabolismus

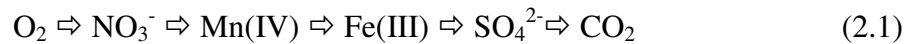
wird die Umsetzung von Stoffen ohne erkennbaren Nutzen für den Energie- oder Biosynthese-Stoffwechsel des Mikroorganismus bezeichnet und er ist meist auf die fehlende Spezifität von Enzymen zurückzuführen. Der cometabolisch abgebaute Schadstoff (Cosubstrat) kann dabei also nicht als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden und wird nur cometabolisch abgebaut, wenn ein Wachstumssubstrat (z.B. anderer Schadstoff) mit ähnlicher Molekülstruktur vorhanden ist. Häufig ist der gebildete Cometabolit ein so genanntes „*Dead-End-Produkt*“, was von den Mikroorganismen energetisch nicht weiter genutzt und abgebaut werden kann und dadurch nach Ausscheidung im umgebenden Milieu akkumuliert (Reineke 2001, Meckenstock et al. 2004).

Im Allgemeinen werden die meisten Schadstoffe (außer die mehrfach chlorierten Verbindungen) unter aeroben Verhältnissen schneller abgebaut als unter anaeroben. In kontaminierten Aquiferen spielen aber beim Abbau von Schadstoffen anaerobe Abbauprozesse häufig eine deutlich größere Rolle als aerobe. Dies ist auf das begrenzte Angebot an Sauerstoff im Grundwasser, auf die geringe Nachlieferung durch den Boden und die starke Zehrung durch mikrobielle Abbauprozesse in kontaminierten Bereichen zurückzuführen (Coates und Anderson 2000, Lovley 2001). Der Abbau von (aromatischen) Kohlenwasserstoffen ist für die Mikroorganismen schwierig, da sie aufgrund des reaktionsträgen Kohlenwasserstoffgerüsts schlecht mikrobiell zu aktivieren sind sowie einige Kohlenwasserstoffe eine geringe Wasserlöslichkeit aufweisen (z.B. PAK). Das Vorhandensein von funktionellen Gruppen am Kohlenstoffgerüst verbessert im Allgemeinen die Abbaubarkeit (Reineke 2001), so dass organische Schadstoffe ohne oder mit sehr wenigen funktionellen Gruppen schlechter abbaubar sind als solche mit einer Vielzahl von funktionellen Gruppen. Höhermolekulare aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) zum Beispiel zeigen häufig eine große Persistenz in der Natur (Philp et al. 2005).

Der mikrobielle Einbau von funktionellen Gruppen (z.B. Hydroxyl-, Carboxyl-, oder Carbonylgruppen) in das Schadstoffmolekül ist ein wichtiger Aktivierungsschritt für den weiteren Abbau dieser Schadstoffe (Reineke 2001, Heider 2007). Mit dem energieaufwändigen Aktivierungsschritt werden weitere Abbauschritte erleichtert und er bestimmt maßgeblich die Kinetik des Abbaus. Eine typische Aktivierungsreaktion beim anaeroben Abbau von BTEX oder Methylnaphthalin ist die Addition von Fumarat an das Schadstoffmolekül unter Bildung von aromatischen Bernsteinsäuren (Biegert et al. 1996, Krieger et al. 1999, Meckenstock et al. 2004). Neben BTEX und PAK werden auch Alkane, C₂- bis C₆-Benzole sowie Cresole anaerob über die Addition von Fumarat aktiviert und anschließend abgebaut (Muller et al. 2001, Gieg und Suflita 2002, Martus und Püttmann 2003, Philipp und Schink 2012). Die in der Literatur bekannten mikrobiellen anaeroben Abbauewege von BTEX, PAK und Heterozyklen und die dabei wichtigen Aktivierungsreaktionen werden in Kapitel 2.2.1 eingehend diskutiert.

Beim metabolischen Abbau werden Elektronen von den Mikroorganismen auf terminale Elektronenakzeptoren übertragen (Tabelle 2.2). Beim Vorhandensein verschiedener Elektronenakzeptoren im Aquifer erfolgt deren Nutzung durch die Mikroorganismen

entsprechend der Energieausbeute der Oxidationsprozesse modellhaft in folgender Reihenfolge (Wiedemeier 1999, Christensen et al. 2001):



Die Elektronenakzeptoren (Tabelle 2.2) können im Aquifer entweder in gelöster Form im Grundwasser (O_2 , NO_3^- , SO_4^{2-}) oder in fester Form an der Oberfläche des Aquifermaterials (FeOOH , MnO_2) vorliegen.

Tabelle 2.2: Wichtige terminale Elektronenakzeptoren (TEA) und Abbauprozesse im Aquifer (nach Reineke 2001).

TEA (oxidierte Form)		TEA (reduzierte Form)	Prozess
O_2	→	H_2O	Aerobe Atmung
NO_3^-	→	N_2	Denitrifikation
Mn (IV)	→	Mn(II)	Manganreduktion
Fe(III)	→	Fe(II)	Eisenreduktion
SO_4^{2-}	→	S^{2-}	Sulfatreduktion
CO_2	→	CH_4	Methanogenese

Für die Nutzung der unterschiedlichen Elektronenakzeptoren zum Abbau der Schadstoffe durch die Mikroorganismen im Grundwasser herrscht das traditionelle Modell der Redoxzonierung vor (Wiedemeier 1999, Lovley 2001), welches in Abbildung 2.3 dargestellt worden ist. Nach diesem Modell wird zuerst der Elektronenakzeptor im Aquifer komplett aufgebraucht, der thermodynamisch die höchste Energieausbeute bietet. Hier gilt es anzumerken, dass der Abbau der Schadstoffe mit verschiedenen Elektronenakzeptoren auch von unterschiedlichen Mikroorganismen durchgeführt wird. Im Bereich der Schadstoffquelle können methanogene Verhältnisse vorherrschen, da alle anderen Elektronenakzeptoren, die einen größeren Energiegewinn für die Mikroorganismen bedeuten würden, bereits aufgezehrt sind. Mit größerer Entfernung von der Schadstoffquelle (in Grundwasserfließrichtung) sind noch andere Elektronenakzeptoren vorhanden, die von den Mikroorganismen genutzt werden (z.B. O_2). Diese Redoxzonierung stellt nur ein vereinfachtes Modell dar. Zum einen sind in den verschiedenen Aquiferen selten alle Elektronenakzeptoren vorhanden. In kontaminierten Aquiferen an ehemaligen Gaswerksstandorten z.B. sind SO_4^{2-} und Fe(III) die dominierenden Elektronenakzeptoren (Lewandowski und Mortimer 2004), da Nitrat meistens nicht in relevanten Konzentrationen auftritt. Zum anderen liegen in der Praxis häufig keine eindeutigen Redoxzonierungen vor, sondern verschiedene Redoxprozesse treten nebeneinander auf. Es kommt zu kleinräumigen Reaktionsräumen (Mikronischen) und steilen geochemischen Gradienten (Thornton et al. 2001, Van Breukelen und Griffioen 2004, Anneser et al. 2008a, Bauer et al. 2008, Bauer et al. 2009, siehe auch Kapitel 2.2.3).

Die gleichzeitige Verfügbarkeit von Elektronenakzeptoren und Schadstoffen (Substrat) im Aquifer ist ein grundsätzlicher Faktor, der den mikrobiellen Abbau der Schadstoffe limitiert. Dies ist besonders bei den an die Aquifermatrix gebundenen und als Metalloxide vorliegenden Elektronenakzeptoren Fe(III) und Mn(IV) der Fall, da sie aufgrund fehlender Mobilität nur begrenzt im Aquifer zur Verfügung stehen. Aber selbst bei Aquiferen, an denen das gleichzeitige Auftreten von bestimmten Schadstoffen und gelösten Elektronenakzeptoren zu beobachten ist und damit theoretisch ein rascher Abbau der Schadstoffe erfolgen müsste, wird dies im Feld häufig nicht beobachtet (z.B. Anneser et al. 2008a). Stattdessen bilden sich dort lange Schadstofffahnen aus. Es müssen also noch andere Faktoren entscheidend sein, die den Abbau limitieren können. Mögliche Faktoren sind (ergänzt nach Meckenstock et al. 2010):

- wechselnde hydraulische Bedingungen oder Grundwassererneuerung und zeitliche Dynamik der Schadstoffverteilung,
- biokinetische Beschränkungen durch eine limitierte Zahl (lokal) an aktiven Bakterien, die zum Abbau befähigt sind,
- Beschränkung der Verfügbarkeit von Substrat und Nährstoffen durch mikroskalige Diffusion,
- Hemmung des Abbaus durch Toxizität der Schadstoffe,
- geringe Bioverfügbarkeit der Schadstoffe aufgrund geringer Wasserlöslichkeit sowie
- Verfügbarkeit von anderen leichter metabolisierbaren C-Quellen.

Der Abbau von organischen Schadstoffen ist ein sehr komplexer Vorgang, der von vielen verschiedenen Faktoren abhängt, deren Einfluss aber noch nicht hinreichend erforscht ist.

2.1.3 Ehemalige Gaswerksstandorte

Ehemalige Gaswerksgebiete stellen ein typisches Beispiel für Standorte mit Altlasten dar. In nahezu jeder größeren Stadt in Deutschland gab es bis zum Beginn des 20. Jahrhunderts Gaswerke, die Gas für die unterschiedlichen Nutzungen (z.B. Beleuchtung, Heizen, Kochen) in der Stadt erzeugten. Durch Leckagen, Zerstörungen während des Zweiten Weltkriegs sowie durch unsachgemäße Entsorgung von Gaswerksabfällen kam es an vielen Stellen auf diesen Geländen zur Kontamination von Böden und Grundwasserleitern mit Teerölen und einzelnen Substanzen z.B. aus den Stoffgruppen der BTEX, PAK und Heterozyklen. Die Anzahl der ehemaligen Gaswerksgebiete mit erheblichen Kontaminationen wird allein in Deutschland auf etwa 500 geschätzt (Schmitt et al. 1998). Teeröle bestehen aus einem komplexen Gemisch von bis zu 200 verschiedenen Substanzen, die sich unterschiedlich gut in Wasser lösen (Meyer et al. 1999, McGregor et al. 2012, Vasilieva et al. 2012, Abbildung 2.1 in Kapitel 2.1). Die Stoffgruppen mit den größten Anteilen in Teerölen sind (Meyer et al. 1999): PAK (85 Gew.-%), Heterozyklen (5 – 13 Gew.-%), Phenole (1 – 10 Gew.-%) und Monoaromaten (1 Gew.-%).

Nach der Kontamination der Aquifere mit Teerölen haben sich mit zunehmender Aufenthaltszeit die hydrophilen Komponenten herausgelöst und die hydrophoberen sind zurückgeblieben (Barranco und Dawson 1999). Je nach Wasserlöslichkeit und Persistenz

haben die Schadstoffe im Teeröl unterschiedliche Relevanz für den Aquifer. Die Heterozyklen zum Beispiel, die in deutlich geringerer Konzentration in Teerölen vorkommen als die PAK, kommen aufgrund ihrer größeren Wasserlöslichkeit (Abbildung 2.1) und dadurch geringeren Sorptionstendenz teilweise stromabwärts jedoch in höheren Konzentration im Wasser vor (Licht et al. 1996, Meyer und Steinhart 2000).

2.2 Anaerober mikrobieller Abbau aromatischer und heterozyklischer Schadstoffe

Der aerobe Abbau von aromatischen und heterozyklischen Kohlenwasserstoffen ist schon längere Zeit Gegenstand der Forschung und entsprechend ist der Wissensstand deutlich größer als beim anaeroben Abbau. Er führt häufig zur Bildung von hydroxylierten Metaboliten, die durch den Einbau von molekularem Sauerstoff in das Schadstoffmolekül mittels Mono- oder Dioxygenase entstehen (Cerniglia 1984, Cerniglia 1992, Reineke 2001). Die Relevanz der aeroben Abbauewege in stark kontaminierten Grundwasserbereichen ist jedoch aufgrund des bereits angesprochenen geringen Sauerstoffgehalts und des hohen Sauerstoffbedarfs durch die Mikroorganismen sehr gering (siehe Kapitel 2.1.1) und sie sind daher nicht Bestandteil dieser Arbeit. Anaerobe Abbauewege hingegen spielen eine deutlich größere Rolle und stehen erst seit den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts im Fokus der Forschung.

Die größten Erkenntnisse über Abbauewege und Metaboliten wurden in Experimenten unter definierten Bedingungen mit reinen Bakterienkulturen gewonnen, die vorher aus kontaminierten Böden oder Grundwässern isoliert wurden. Besonders häufig wurden Batch-Studien und Untersuchungen in Mikrokosmen durchgeführt (zusammengefasst in Meckenstock et al. 2010). Zur Ermittlung wichtiger Einflussfaktoren des Abbaus wurden in den vergangenen Jahren verstärkt auch zweidimensionale Durchflusssysteme verwendet, die Schadstofffahnen besser simulieren können (Bauer et al. 2008, Bauer et al. 2009). Zur Identifizierung von Abbauewegen, Metaboliten und entscheidender Einflussfaktoren sind Versuche unter definierten Bedingungen (z.B. Batch, Mikrokosmen, Durchflusssysteme) bestens geeignet. Die dort identifizierten Abbauewege bedürfen aber auf jeden Fall der Verifizierung im Feld, wozu sich z.B. die Metabolitenanalytik anbietet. Beim Transfer der im Labor gewonnenen Ergebnisse ins Feld muss immer beachtet werden, dass sich der Abbau im Feld viel komplexer darstellt und viele andere Faktoren eine Rolle spielen (z.B. Verfügbarkeit von Elektronenakzeptoren, Elektronendonatoren und Nährstoffen, Temperatur, pH-Wert, Interaktion verschiedener Bakterien).

2.2.1 Anaerobe mikrobielle Abbauewege

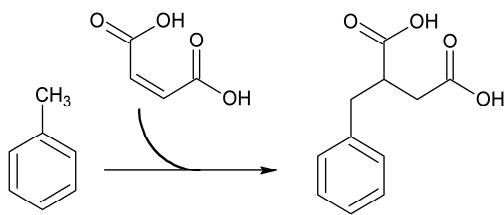
Die Biochemie der anaeroben Abbauewege der meisten BTEX (Toluol, Ethylbenzol, m- und o-Xylol) und ausgewählter PAK (Naphthalin und 2-Methylnaphthalin) ist am besten untersucht. Im Vergleich dazu sind die anaeroben Abbauewege von Heterozyklen noch weitgehend unbekannt.

Grundsätzlich ist die Aktivierung der reaktionsarmen aromatischen und heterozyklischen Schadstoffstrukturen durch den mikrobiellen Einbau von funktionellen Gruppen ein sehr entscheidender Schritt für deren weiteren mikrobiologischen Abbau. Vier wichtige

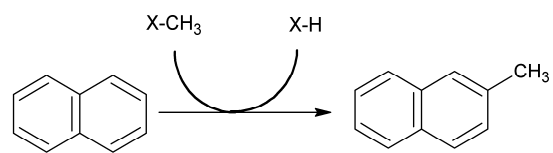
enzymatische Aktivierungsreaktionen sind bekannt (zusammengefasst in Heider 2007, Foght 2008 und Abbildung 2.4):

- 1) Fumarataddition an eine Methylgruppe unter Bildung von aromatischen Bernsteinsäuren (Biegert et al. 1996, Krieger et al. 1999)
- 2) Methylierung von unsubstituierten Aromaten (Safinowski und Meckenstock 2006)
- 3) Hydroxylierung an Alkylsubstituenten (Rabus und Widdel 1995, Johnson et al. 2001)
- 4) Direkte Carboxylierung von Aromaten (Zhang und Young 1997, Davidova et al. 2007)

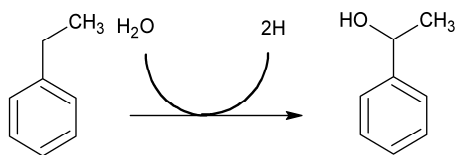
1. Fumarataddition



2. Methylierung



3. Hydroxylierung



4. Carboxylierung

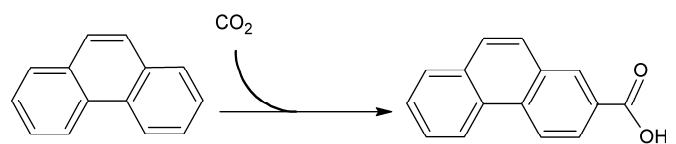


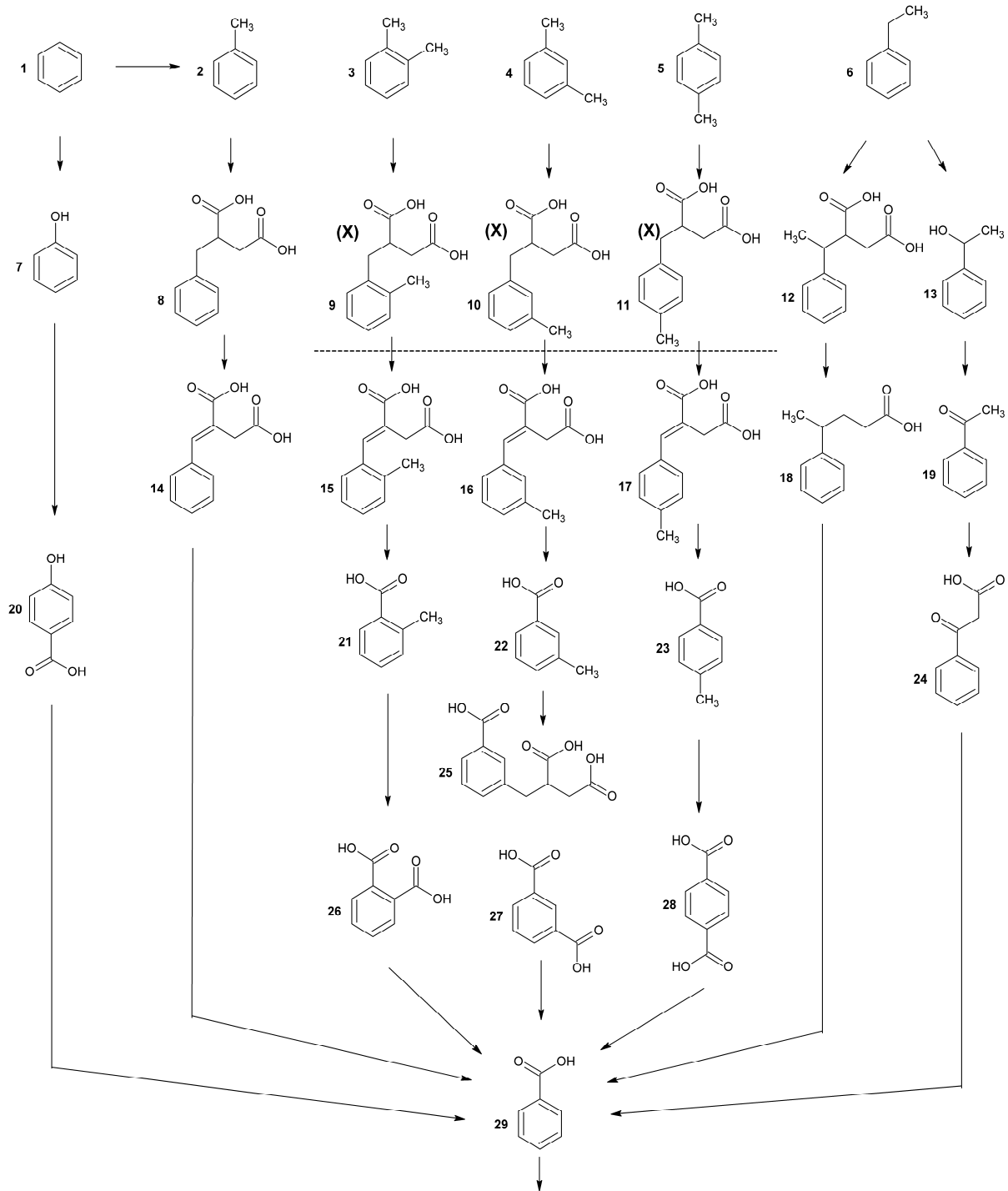
Abbildung 2.4: Wichtige Aktivierungsreaktionen beim anaeroben Abbau von Aromaten (Rabus und Widdel 1995, Biegert et al. 1996, Zhang und Young 1997, Krieger et al. 1999, Johnson et al. 2001, Safinowski und Meckenstock 2006, Davidova et al. 2007).

Viele dieser Aktivierungsreaktionen wurden auch beim anaeroben Abbau von Heterozyklen beobachtet (Safinowski et al. 2006). Die in der Literatur bekannten Abbauwege und Metabolite werden im Folgenden für die einzelnen Stoffgruppen diskutiert.

2.2.1.1 Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylol-Isomere (BTEX)

Die BTEX bestehen aus einem aromatischen Ringsystem, das außer bei Benzol mit Alkylgruppen substituiert ist (siehe oberste Reihe in Abbildung 2.5).

Innerhalb der BTEX nimmt die Wasserlöslichkeit von Benzol über Toluol und Ethylbenzol zu den Xylenen ab (Abbildung 2.1 in Kapitel 2.1). Aufgrund der relativ hohen Wasserlöslichkeit und der damit verbundenen Mobilität im Aquifer sowie der toxischen Eigenschaften (Dean 1985, Snyder 2000) besitzen die BTEX große Relevanz für die Schadstoffüberwachung in kontaminierten Grundwasserleitern. Ihr anaerober Abbau ist mit Ausnahme von Benzol sehr gut untersucht (z.B. Griebler et al. 2004, Chakraborty und Coates 2004, Ulrich et al. 2005, Heider 2007, Foght 2008). Die in der Literatur bekannten Abbauwege sind in Abbildung 2.5 dargestellt.



- 1: Benzol, 2: Toluol, 3: o-Xylol, 4: m-Xylol, 5: p-Xylol, 6: Ethylbenzol, 7: Phenol, 8: Benzylbernsteinsäure, 9: 2-Methylbenzylbernsteinsäure, 10: 3-Methylbenzylbernsteinsäure, 11: 4-Methylbenzylbernsteinsäure, 12: 1-Phenylethylbernsteinsäure, 13: 1-Phenylethanol, 14: Phenylitaconsäure, 15: 2-Methylphenylitaconsäure, 16: 3-Methylphenylitaconsäure, 17: 4-Methylphenylitaconsäure, 18: 4-Phenylitaconsäure, 19: Acetophenon, 20: 4-Hydroxybenzoesäure, 21: o-Toluolsäure, 22: m-Toluolsäure, 23: p-Toluolsäure, 24: Benzoylessigsäure, 25: 3-Carboxybenzylbernsteinsäure, 26: Phthalsäure, 27: Isophthalsäure, 28: Terephthalsäure, 29: Benzoesäure

Abbildung 2.5: Anaerobe mikrobielle Abbauwege der BTEX (Chakraborty und Coates 2004, Griebler et al. 2004, Ulrich et al. 2005, Heider 2007).

Toluol ist die BTEX-Komponente, die anaerob am schnellsten und vollständigsten mikrobiologisch abgebaut wird. Der anaerobe Abbau wird initiiert durch die Addition von

Fumarat an die Methylgruppe, was zur Bildung von Benzylbernsteinsäure (BBS) führt (Biegert et al. 1996, Krieger et al. 1999). Im Detail vollzieht sich diese Reaktion durch die Addition der Doppelbindung des Fumarats zu der Methylgruppe des Toluols durch das Enzym Benzylsuccinat-Synthase (*bssA*) (Leuthner et al. 1998). Diese Aktivierungsreaktion ist sehr typisch für die anaeroben Abbauege der BTEX, PAK und auch der Heterozyklen. Der anaerobe Abbau von Toluol erfolgt weiter über Phenylitaconsäure und Benzoesäure, dem zentralen Metabolit des BTEX-Abbaus, bis zur Mineralisierung. Der Abbau von Toluol konnte unter Nutzung verschiedener Elektronenakzeptoren (O_2 , NO_3^- , $Fe(III)$, SO_4^{2-} , CO_2) nachgewiesen werden (z.B. Beller et al. 1992, Biegert et al. 1996, Jahn et al. 2005, Foght 2008, Fowler et al. 2012). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Toluol auch cometabolisch mit z.B. n-Alkanen als Substrat abgebaut werden kann (Rabus et al. 2011). In Abbildung 2.6 sind beispielhaft für andere Schadstoffe die Redox-Halbreaktionen, die Stöchiometrie und der Energiegewinn des Abbaus von Toluol bei verschiedenen Redoxbedingungen dargestellt.

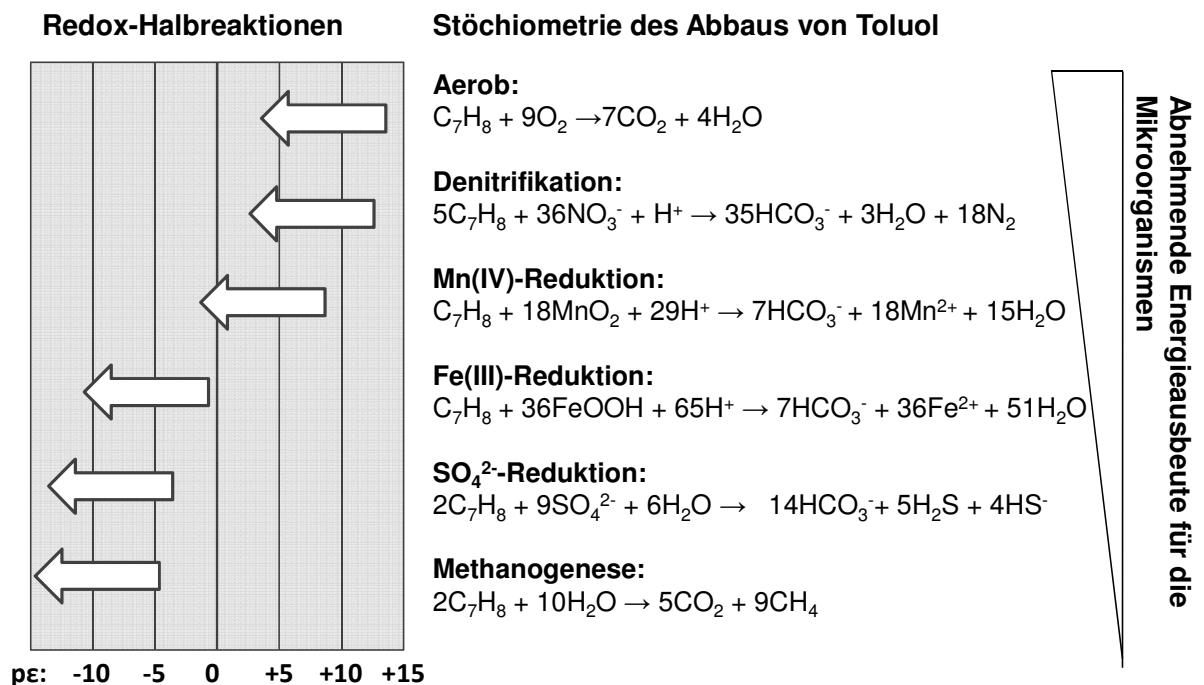


Abbildung 2.6: Stöchiometrie des Abbaus von Toluol unter verschiedenen Redoxbedingungen sowie deren Redox-Halbreaktionen in Beziehung zur Standard-Elektronenaktivität $p\varepsilon$ bei pH 7 (modifiziert von Stumm und Morgan 1996).

Der anaerobe Abbau aller Xylol-Isomere erfolgt analog zum Abbau von Toluol über die Addition von Fumarat, was zur Bildung von Methylbenzylbernsteinsäuren (MBBS) führt (Krieger et al. 1999, Reusser et al. 2002). Er konnte mit verschiedenen Elektronenakzeptoren nachgewiesen werden (z.B. Edwards et al. 1992, Krieger et al. 1999, Chakraborty und Coates 2004, Jahn et al. 2005). Die Abbaubarkeit der verschiedenen Xylol-Isomere ist jedoch unterschiedlich. m-Xylol ist am besten abbaubar und scheint den Abbau der anderen Isomere blockieren zu können (Beller et al. 1995, Meckenstock et al. 2004b). Neben dem metabolischen Abbau ist auch cometabolischer Abbau (mit Toluol als Substrat) der Xylol-

Isomere entdeckt worden, welcher zur Bildung von MBBS als "*Dead-End-Produkt*" führt (Beller 2000).

Für den anaeroben Abbau von Ethylbenzol sind zwei unterschiedliche Abbauewege bekannt. Der eine Weg führt durch die bereits angesprochene Fumarataddition zur Bildung von Ethylbenzylbernsteinsäure (Kniemeyer et al. 2003) und der andere zu 1-Phenylethanol durch Dehydrogenierung und anschließend zu Acetophenon (Spormann und Widdel 2000).

Aus der Stoffgruppe der BTEX ist Benzol die persistenteste Komponente. Dies zeigt sich dadurch, dass in den meisten Schadstofffahnen Benzol am schlechtesten abgebaut wird und sich dadurch im Abstrom im Vergleich zu den anderen Komponenten anreichert (Wiedemeier 1999, Zamfirescu und Grathwohl 2001, Griebler et al. 2004, Cozzarelli et al. 2010). Der anaerobe Abbau ist noch nicht vollständig aufgeklärt, und verschiedene Abbauewege werden diskutiert (Meckenstock und Mouttaki 2011). Die plausibelsten und anerkanntesten Abbauewege sind die Methylierung zu Toluol mit anschließender Fumarataddition (z.B. Coates et al. 2002, Ulrich et al. 2005) oder die Hydroxylierung zu Phenol mit anschließender Carboxylierung zu 4-Hydroxybenzoesäure (z.B. Chakraborty et al. 2005).

2.2.1.2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)

PAK sind zwei- oder mehrkernige aromatische Kohlenwasserstoffe, die auch durch Alkylgruppen substituiert sein können. Je nach molekularer Größe haben sie unterschiedliche Wasserlöslichkeiten und Sorptionseigenschaften (Abbildung 2.1 in Kapitel 2.1). Mit zunehmender Anzahl an Ringen und zunehmendem Alkylierungsgrad nimmt die Wasserlöslichkeit ab. Höherkernige PAK (ab vierkernig) sind so hydrophob, dass sie nahezu komplett sorbiert vorliegen und haben daher nur eine geringe Bedeutung für das Grundwasser, da sie kaum mobil sind. Die relevantesten Vertreter bei Grundwasserkontaminationen sind zweikernige Verbindungen wie Naphthalin und methylierte Naphthaline sowie Acenaphthen, Acenaphthylen und zum Teil auch Fluoren, Anthracen und Phenanthren. Zudem sind auch die bicyklischen Verbindungen Indan und Inden relevant, die streng genommen aber nicht zur Substanzklasse der PAK gehören.

Die in der Literatur bekannten anaeroben Abbauewege der PAK mit verschiedenen Elektronenakzeptoren sind in Abbildung 2.7 aufgeführt und werden im Folgenden kurz beschrieben (Meckenstock et al. 2004, Safinowski und Meckenstock 2006, Davidova et al. 2007, Foght 2008, Kleemann und Meckenstock 2011, Mouttaki et al. 2012, Berdugo-Clavijo et al. 2012).

Der Aktivierungsschritt beim anaeroben Abbau von 2-Methylnaphthalin erfolgt analog zum anaeroben Abbau von Toluol durch die Addition von Fumarat an die Methylgruppe unter Bildung von Naphthyl-2-methylbernsteinsäure (NMBS) (Meckenstock et al. 2004). Dieser Metabolit wird über mehrere Schritte zu 2-Naphthoesäure (2-NS) und anschließend über Reduzierungen des Rings durch Hydrogenierung z.B. zu Decahydro-2-naphthoesäure abgebaut. Schließlich erfolgen die Ringspaltung und der weitere Abbau bis zur Mineralisierung. Beim anaeroben Abbau von 1-Methylnaphthalin wird eine Methylierung an Position 2 mit anschließender Fumarataddition zu 1-Methylnaphthyl-2-methylbernsteinsäure (MNMB) sowie eine direkte Carboxylierung diskutiert (Safinowski et al. 2006, Musat et al. 2009, Meckenstock und Mouttaki 2011).

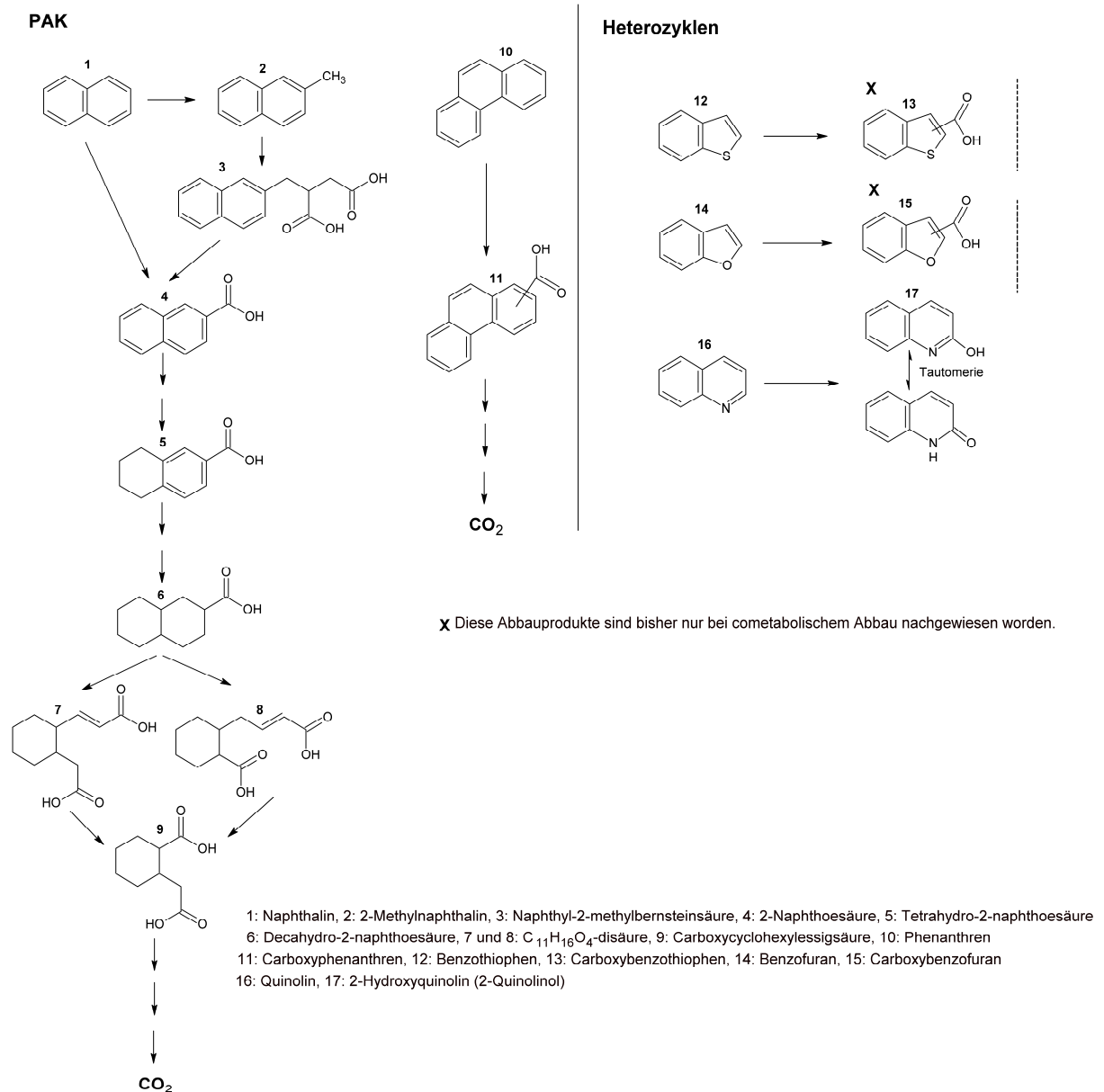


Abbildung 2.7: Anaerobe Abbauwege und Aktivierungsschritte von PAK und Heterozyklen (Johansen et al. 1997, Zhang et al. 2000, Annweiler et al. 2001, Gieg und Suflita 2002, Young und Phelps 2005, Safinowski und Meckenstock 2006, Davidova et al. 2007).

Beim anaeroben Abbau von Naphthalin werden zwei Wege diskutiert. Naphthalin wird entweder durch Carboxylierung zu 2-NS (Phelps et al. 2002, Kleemann und Meckenstock 2011) oder durch Methylierung zu 2-Methylnaphthalin (Safinowski und Meckenstock 2006) aktiviert und entsprechend wie 2-Methylnaphthalin weiter abgebaut.

Über die anaeroben Abbauwege der anderen PAK gibt es sehr wenige belastbare Informationen. Beim anaeroben Abbau von Phenanthren konnte eine Carboxylierung und die Bildung von 2-Carboxyphenanthren nachgewiesen werden (Zhang und Young 1997, Davidova et al. 2007). Bei anderen PAK zeigten verschiedene Abbaustudien unter anaeroben Bedingungen zwar Abnahmen der Ausgangskonzentrationen, aber Metabolite konnten nicht gefunden werden. Bei Batch-Versuchen mit einer Sulfat reduzierenden Bakterienkultur und

Naphthalin oder 2-Methylnaphthalin als Substrat konnte der cometabolische Abbau von Acenaphthen, Acenaphthylen sowie den bicyklischen Verbindungen Indan und Inden zu den entsprechenden Säuren nachgewiesen werden (Safinowski et al. 2006). Diese aromatischen Säuren wurden in derselben Studie auch in einem mit Teeröl kontaminierten Aquifer identifiziert. Zusätzliche Hinweise auf Metabolite von PAK wurden mit Fluorensäure sowie Acenaphthylmethylbernsteinsäure in weiteren Feldproben gefunden (Morasch et al. 2011). Innerhalb der, aufgrund der Wasserlöslichkeit, für das Grundwasser relevanten PAK wird Acenaphthen als die persistenteste Komponente angesehen, da es in kontaminierten Aquiferen auch dort stromabwärts detektiert werden konnte, wo die anderen PAK nicht mehr auftauchten (Zamfirescu und Grathwohl 2001).

2.2.1.3 Heterozyklen

Bei Heterozyklen handelt es sich um zyklische organische Verbindungen, die außer Kohlenstoff noch Stickstoff (N), Schwefel (S) oder Sauerstoff (O) im Ringsystem enthalten (Abbildung 2.7). Durch die Heteroatome sind diese Verbindungen polarer als die vergleichbaren aromatischen Substanzen und stellen durch möglichen Transport erhebliche Gefährdung für das Grundwasser dar. Obwohl sie im Vergleich zu den PAK nur eine relativ kleine Fraktion in Teerölen ausmachen, haben sie häufig einen größeren Anteil an der wasserlöslichen Fraktion (Licht et al. 1996) und einige Heterozyklen zeigen schon in geringen Konzentrationen toxische Wirkungen (genotoxische, mutagene, karzinogene) (Willems et al. 1992). Neben der erhöhten Wasserlöslichkeit weisen sie auch persistente Eigenschaften auf, was zur Ausbildung von sehr langen Schadstofffahnen führen kann (Zamfirescu und Grathwohl 2001).

Über den anaeroben Abbau von Heterozyklen ist im Vergleich zu BTEX nur wenig bekannt. Einige aus der Literatur bekannten (co)metabolische Abbauege bzw. Aktivierungsreaktionen sind in Abbildung 2.7 dargestellt (Johansen et al. 1997, Annweiler et al. 2001, Safinowski et al. 2006). Der anaerobe Abbau von Indol und Chinolin durch Hydroxylierung konnte in Batch-Versuchen und im Feld nachgewiesen werden (Fetzner et al. 1998, Reineke et al. 2007). Bei den S- und O-Heterozyklen konnte bisher nur cometabolischer Abbau bewiesen werden (Annweiler et al. 2001, Safinowski et al. 2006). Dies könnte daran liegen, dass bisher keine Reinkulturen isoliert werden konnten, die Heterozyklen metabolisch abbauen können (Meckenstock et al. 2010).

Der cometabolische Abbau scheint bei Heterozyklen generell eine große Rolle zu spielen. Bei Batch-Versuchen mit einer sulfatreduzierenden Bakterienkultur und Naphthalin oder 2-Methylnaphthalin als Substrat konnte z.B. der cometabolische Abbau von Benzothiophen, Benzofuran und Indol zu den entsprechenden Säuren (alle) und Bernsteinsäuren (nur Benzothiophen und Benzofuran) nachgewiesen werden (Safinowski et al. 2006). Die entsprechenden Säuren wurden in der Studie auch in einem mit Teeröl kontaminierten Aquifer detektiert. Die entsprechenden Bernsteinsäuren konnten in diesem Aquifer jedoch nicht nachgewiesen werden, so dass der Nachweis des anaeroben Abbauewegs von Benzothiophen und Benzofuran über eine Methylierung und anschließende Fumarataddition (analog zu Naphthalin bei den PAK) in Feldproben noch aussteht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Heterozyklen wasserlöslich und persistent sind und, wenn überhaupt, verstärkt cometabolisch abgebaut werden (z.B. Benzothiophen, Benzofuran). Verschiedene Studien haben dabei gezeigt, dass N-Heterozyklen besser abbaubar sind als S- und O-Heterozyklen (Meyer und Steinhart 2000, Reineke 2008). S- und O-Heterozyklen scheinen ähnlich persistent zu sein wie z.B. Acenaphthen aus der Gruppe der PAK und werden stromabwärts verstärkt detektiert (Zamfirescu und Grathwohl 2001).

2.2.2 Methoden zum Nachweis von Abbauprozessen im Aquifer

Der Nachweis von Abbauprozessen von Schadstoffen im Aquifer ist die entscheidende Voraussetzung für die Anwendung des NA-Konzepts (Kapitel 2.1.1) und als Überwachungsmaßnahme laut Bundes-Bodenschutzgesetz (BBodSchG 2004) unabdingbar.

Zum Nachweis des Abbaupotentials und des tatsächlichen stattfindenden Abbaus von Schadstoffen in kontaminierten Aquiferen gibt es einige analytische Methoden, die auf der Messung unterschiedlicher Parameter und Einflussfaktoren basieren und verschiedene Vor- und Nachteile aufweisen. Generell können diese Methoden nach Meckenstock et al. 2010) unterschieden werden in

- Methoden, die das Abbaupotential aufzeigen, aber keinen tatsächlichen Abbau nachweisen können (Kultivierung von Bakterienkulturen, molekularer Nachweis von Organismen und Genen),
- Methoden, die qualitativ den tatsächlichen Abbau anzeigen können (Elektronenakzeptoren, Fingerprints der Schadstoffspektren, Metabolite, Genkopien) sowie
- Methoden, die auch quantitative Hinweise auf den Abbau geben können (eingeschränkt gültig für: Elektronenbilanzen, Isotopenverteilungen).

Im Folgenden werden die effizientesten und am häufigsten angewendeten Methoden diskutiert (Smets und Pritchard 2003, Meckenstock et al. 2010, Bombach et al. 2010, Morasch et al. 2011):

a) Messung der Elektronenakzeptoren und der reduzierten Produkte

Bei diesem Ansatz wird der Verbrauch an gelösten Elektronenakzeptoren (z.B. NO_3^- und SO_4^{2-}) und die Bildung der reduzierten Produkte (z.B. NO_2^- , NH_4^+ , S^{2-}) entlang der Schadstoffbahn gemessen. Dieser Ansatz wird routinemäßig in ehemaligen Gaswerksstandorten eingesetzt. Aus den Ergebnissen lassen sich Aussagen über das biogeochemische Abbaumilieu treffen (Wiedemeier 1999) und qualitative (teilweise auch quantitative) Hinweise für den mikrobiologischen Abbau ermitteln. Wenn sich keine Zehrung der Elektronenakzeptoren messen lässt, kann mikrobieller Abbau generell ausgeschlossen werden. Nachteile dieses Ansatzes sind, dass er sehr unspezifisch ist und nur bei gelösten und nicht bei festen Elektronenakzeptoren angewendet werden kann.

b) Messung von Fingerprints der Schadstoffspektren

Die Abnahme der Konzentration eines Schadstoffs allein ist noch kein eindeutiger Hinweis auf mikrobiologischen Abbau, da auch abiotische Prozesse wie z.B. Verdünnung zu einer

Konzentrationsverringering führen können. Zeitliche Veränderungen der Konzentrationen der verschiedenen Schadstoffe (Fingerprints) zueinander hingegen können Hinweise auf mikrobiologischen Abbau geben, da abiotischen Faktoren wie z.B. Verdünnung für alle Schadstoffe gleich sind. Es ist jedoch zu beachten, dass die Adsorptionstendenz der Schadstoffe natürlich unterschiedlich ist. Mit dieser Methode kann sehr gut ermittelt werden, welche Schadstoffe sich besser in der Fahne abbauen lassen als andere. Zamfirescu und Grathwohl 2001) stellten z.B. in einem ehemaligen Gaswerksgelände fest, dass besonders Acenaphthen und einige Heterozyklen so abbauresistent waren, dass sie auch stromabwärts noch gemessen werden konnten. Größere Probleme beim Einsatz dieser Methode treten bei einer starken Heterogenität der Schadstofffahne oder bei verschiedenen Schadstoffquellen auf. Da dies sehr oft der Fall ist, wird diese Methode nur sehr selten angewendet.

c) Messung der Isotopenverteilungen

Bei der sogenannten Stabile-Isotopenfraktionierungs-Analyse (*Compound Specific Isotope Analysis*, CSIA) wird die Verschiebung der Isotopenverhältnisse (z.B. bei Kohlenstoff) in der verbleibenden Fraktion eines Schadstoffs nach mikrobiologischem Abbau gemessen (Kendall und McDonnell 1998, Meckenstock et al. 2004a, Bergmann et al. 2011, Thullner et al. 2012). Grundlage dafür ist, dass viele organische Schadstoffe beim mikrobiologischen Abbau (und nicht durch abiotische Faktoren) isotopisch unterschieden werden und es dadurch zu einer Verschiebung der stabilen Isotopenverhältnisse im noch nicht abgebauten Restsubstrat kommt. Das liegt daran, dass ^{13}C -Bindungen stärkere molekulare Bindungen erzeugen und die schwächeren ^{12}C -Bindungen von den Mikroorganismen bevorzugt werden. Die schwereren Isotope bleiben im Restsubstrat zurück und können mit der Stabilisotopen-Massenspektrometrie (*GC-Combustion-Isotope Ratio Mass-Spectrometry*, GC-C-IRMS) gemessen werden. Die Vorteile dieser Methode sind, dass sie spezifisch ist und teilweise auch quantitativ für einige Schadstoffe verwendet werden kann (Thullner et al. 2012, Thullner et al. 2013). Voraussetzung für den quantitativen Einsatz ist aber die Kenntnis der spezifischen Isotopen-Fraktionierungsfaktoren, die vom enzymatischen Abbauweg abhängen (Schmidt et al. 2004). Die Methode wird routinemäßig für den (quantitativen) Nachweis des Abbaus monoaromatischer Kohlenwasserstoffe eingesetzt. Die Quantifizierung ist jedoch aufgrund fehlender oder ungenauer isotopischer Anreicherungsfaktoren begrenzt. Die Methode ist außerdem nicht einsetzbar bei verschiedenen Schadstoffquellen mit unterschiedlichen Isotopensignaturen oder bei Schadstoffen mit vielen Kohlenstoffatomen (z.B. PAK mit mehr als 10 Kohlenstoff-Atomen), da isotopische Effekte mit zunehmender Anzahl der entsprechenden Atome schwerer messbar werden (Meckenstock et al. 1999, Elsner 2010). Außerdem ist sie bei geringen Abbauraten recht unempfindlich und liefert dann keine zuverlässigen Ergebnisse.

d) Mikrobiologische und molekulare Methoden

Hier lässt sich unterscheiden zwischen Methoden, die auf der Kultivierung von Mikroorganismen basieren und solchen, die ohne Kultivierung auskommen (Bombach et al. 2010).

Die Ersteren werden in Mikrokosmen oder Batchansätzen durchgeführt und basieren auf der Verwendung von Aquifermaterial oder Grundwasser, welches als Inoculum genutzt wird. Die relevanten Schadstoffe werden zugesetzt und Abnahmen der Konzentration der Schadstoffe werden als Hinweis für das Abbaupotential dieser Schadstoffe im Aquifer angesehen (Strevett et al. 2002). Mit dieser Methode können auch zusätzlich Bakterienstämme isoliert werden, die bestimmte Schadstoffe abbauen können (Madsen 2005). Diese sind anschließend nutzbar, um den Abbau und insbesondere die Abbauwege im Labor unter kontrollierten Bedingungen (z.B. im Batchansatz) zu erforschen. Die Kultivierung von anaeroben Bakterienkulturen ist jedoch deutlich schwieriger als die von aeroben und für viele Schadstoffe (z.B. Heterozyklen) konnten bisher noch keine zum Abbau befähigte Bakterienkulturen isoliert werden (Meckenstock et al. 2010). Die Nachteile der auf Kultivierung beruhenden Methode sind, dass der große Teil der nicht kultivierbaren Bakterienkulturen nicht erfasst wird und die Abbauprobe im Labor bei weitem nicht die Komplexität der Verhältnisse im Aquifer widerspiegeln.

Bei den Methoden, die ohne Kultivierung auskommen, sind besonders die Detektion von speziellen funktionalen Marker-Genen oder die Analyse von "*messenger Ribonucleic Acids*" (mRNA) zu erwähnen. Mit dem Nachweis der funktionalen Marker-Gene lassen sich anhand der funktionellen Gensequenz die für einen Abbaupfad entscheidenden Mikroorganismen im Aquifer identifizieren, auch wenn sie über verschiedene mikrobiologische Stämme verteilt sind (Galvao et al. 2005, Von Netzer et al. 2013). Ein Beispiel für ein funktionales Marker-Gen ist *Benzylsuccinat Synthase* (*bssA*) welches das entscheidende Enzym beim anaeroben Abbau von Toluol und Xylol codiert (Beller et al. 2002, Heider 2007). Die Verteilung dieses Gens wurde z.B. von Winderl et al. 2007) in dem mit Teeröl kontaminierten Grundwasserleiter in Düsseldorf (siehe Kapitel 3.1.1) untersucht und in verschiedenen Populationen gefunden. Ein weiteres Beispiel ist die *Alkylsuccinate Synthase* (*assA*), die ein entscheidendes Enzym beim anaeroben Abbau von Alkanen ist (Callaghan et al. 2010). Der Nachteil dieser Methode ist, dass sie lediglich die Präsenz von Bakterien mit diesem Gen aufzeigt, nicht aber die Aktivität dieser Mikroorganismen im Aquifer. Um die Aktivität aufzuzeigen, muss die mRNA untersucht werden, die die Expression von Genen zeigt. Dieser Ansatz ist aber durch die geringe Ausbeute von mRNA in Umweltproben limitiert.

e) Messung spezifischer Metabolite von Schadstoffen (Metabolitenanalytik)

Die Metabolitenanalytik, die im Fokus dieser Arbeit steht, ist eine sehr spezifische Methode um den mikrobiologischen Abbau von verschiedenen Schadstoffen nachzuweisen (Beller 2000, Elshahed et al. 2001, Phelps et al. 2002, Meckenstock et al. 2010, Callaghan 2012). Bei dieser Methode werden Metabolite gemessen, die für anaerobe Abbaupfade bestimmter Schadstoffe typisch sind. Zur Ermittlung von typischen Metaboliten sind die Isolierung von abbauenden Bakterienkulturen und Abbaustudien in Mikrokosmen sehr hilfreich (Meckenstock et al. 2010). Die bekannten anaeroben Abbaupfade von BTEX, PAK sowie Heterozyklen wurden bereits in Kapitel 2.2.1 eingehend diskutiert. Die typischen spezifischen Metabolite werden in Kapitel 2.3 sowie die unterschiedlichen Messmethoden der Metabolitenanalytik in Kapitel 2.4 detailliert beschrieben.

Durch die Nutzung der Metabolitenanalytik konnte der Nachweis des anaeroben Abbaus von BTEX (z.B. Gieg et al. 1999, Beller 2000, Elshahed et al. 2001, Phelps et al. 2002, Griebler et al. 2004, Beller et al. 2008, Morasch et al. 2011), PAK (z.B. Schmitt et al. 1998, Ohlenbusch et al. 2002, Griebler et al. 2004, Safinowski et al. 2006, Oka et al. 2011) und Heterozyklen (z.B. Safinowski et al. 2006, Reineke et al. 2007, Morasch et al. 2011) in kontaminierten Aquiferen erbracht werden. Die wesentlichen **Vorteile** der Metabolitenanalytik sind:

- Sehr spezifische Methoden, die durch den Nachweis entsprechender Metaboliten den Abbau einzelner bestimmter Schadstoffe nachweisen können.
- Sie bietet die Möglichkeit der Identifizierung von neuen Metaboliten, die Hinweise auf unbekannte Abbauewege liefern können.
- Sie kann im Gegensatz zur CSIA auch für den Nachweis des Abbaus von Schadstoffen mit einer höheren Anzahl von C-Atomen angewendet werden (z.B. PAK mit mehr als 10 C-Atomen).
- Durch den Nachweis spezifischer anaerober Metabolite kann deutlich gezeigt werden, dass es sich um anaeroben und keinen aeroben Abbau handelt.
- Durch die Messung der häufig wasserlöslicheren Metabolite wird zusätzlich zu den Schadstoffen das Ausmaß der anthropogenen Kontamination im Aquifer umfassender gezeigt.

Nachteile, die im Bezug zur Metabolitenanalytik häufig genannt werden, sind die Beschränkung auf bestimmte Schadstoffe und Abbauewege und dass sie nicht als quantitativer Indikator des Abbaus eingesetzt werden kann (Smets und Pritchard 2003, Bombach et al. 2010). Daraus ergaben sich einige Ziele und Forschungsbereiche, die auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden.

Abschließend bleibt anzumerken, dass die Kombination verschiedener Nachweismethoden zum Nachweis von Abbauprozessen im Aquifer die beste Lösung wäre (z.B. Griebler et al. 2004, Beller et al. 2008, Morasch et al. 2011), die aber häufig aus Kosten- und Zeitgründen oder der fehlenden Verfügbarkeit der entsprechenden Messgeräte nicht möglich ist.

2.2.3 Zonen hoher mikrobieller Abbauaktivität (*Plume Fringe Concept*)

Ein wichtiger Aspekt zum Verständnis von Abbauprozessen in kontaminierten Aquiferen ist die Aufklärung der räumlichen Verteilung der Abbauaktivitäten. Da nicht in allen Bereichen eines Aquifers bzw. einer Schadstofffahne das gleiche Angebot an Nährstoffen, Elektronenakzeptoren und Elektronendonatoren vorliegt (Mikronischen), sind unterschiedliche mikrobielle Abbauaktivitäten zu erwarten. In den meisten porösen Aquiferen dominieren laminare Flüsse, so dass als dominante Mischungsprozesse longitudinale und transversale Dispersion überwiegen. Durch weitgehend fehlende turbulente Strömungen ist die Nachlieferung von durch mikrobielle Abbauaktivität aufgebrauchten Stoffen nur sehr begrenzt (Cirpka et al. 1999). Ein wichtiges Konzept in diesem Zusammenhang ist das "*Plume Fringe Concept*". Diesem Konzept liegen drei grundsätzliche Hypothesen zugrunde (Thornton et al. 2001, Van Breukelen und Griffioen 2004, Anneser et al. 2008a, Bauer et al. 2008):

1. Die höchsten Abbauprodukte in kontaminierten Aquiferen sind nicht in der Mitte der Schadstoffplume, sondern an den Plumerändern zu finden.
2. Die Plumeränder sind durch steile Konzentrationsgradienten unterschiedlicher Parameter charakterisiert.
3. Der mikrobielle Abbau ist mischungskontrolliert, so dass es keine signifikanten Überlappungen von Elektronendonatoren und -akzeptoren gibt.

Das Konzept geht davon aus, dass der größte Teil der mikrobiellen Abbauprodukte dort stattfindet, wo gelöste Elektronenakzeptoren (z.B. NO_3^- , SO_4^{2-} , O_2) und Elektronendonatoren (z.B. organische Schadstoffe) durch hydrodynamische Mischungsprozesse aus verschiedenen Richtungen zusammentreffen (Van Breukelen und Griffioen 2004, Anneser et al. 2008a, Bauer et al. 2008). An den Rändern (besonders am oberen Plumerand) trifft Sauerstoff-freies, kontaminiertes Grundwasser aus der Plume mit nicht kontaminiertem, natürlichem Grundwasser (mit Elektronenakzeptoren wie z.B. Sauerstoff) aus der Umgebung zusammen, was zu ausreichend guten Bedingungen (Vorhandensein von Elektronenakzeptoren, Elektronendonatoren und Nährstoffen) für Schadstoff-abbauende Bakterien führt. Innerhalb der Schadstoffplume hingegen ist zwar der Elektronendonator (Schadstoff) in ausreichender Konzentration vorhanden, aber der Schadstoffabbau ist aufgrund häufig schon aufgezehrter Elektronenakzeptoren oder der Toxizität der Schadstoffe limitiert (Thornton et al. 2001). Eine Nachlieferung der Elektronenakzeptoren in die Plume ist aufgrund geringer Mischungsprozesse und dem Verbrauch an den Plumerändern kaum zu erwarten.

Allgemein zeichnen sich bioaktive Zonen, zu denen nach dem *Plume Fringe Concept* die Plumeränder gehören, durch steile biochemische Gradienten aus (Kappler et al. 2005, Tuxen et al. 2006). Um solche kleinskaligen Gradienten (im Bereich weniger Zentimeter) im Aquifer aufdecken zu können, bedarf es hochauflösender Probenahmemöglichkeiten, die in vielen Studien nicht gegeben sind. Durch die Möglichkeit einer hochauflösenden Probenahme in einem Multi-Level-Brunnen wurden am ehemaligen Gaswerksstandort Düsseldorf (Kapitel 3.1.2) die steilen biochemischen Gradienten für die Plumeränder als abbauproduktive Zonen für ausgewählte Schadstoffe, Elektronenakzeptoren und metabolische Endprodukte wie z.B. Sulfid in der Literatur eindrücklich gezeigt (Anneser et al. 2008b, Anneser et al. 2010). Auch in künstlichen Schadstoffplumen, erzeugt in 2-dimensionalen Durchflusssystemen im Labor konnten diese Gradienten an den Plumerändern nachgewiesen werden (Bauer et al. 2008). Die Bestätigung des *Plume Fringe Concept* durch die Untersuchung von kleinskaligen Gradienten spezifischer Metabolite sowie deren Verwendung als Indikatoren für bioaktive Zonen im Aquifer ist bisher kaum erbracht worden.

2.3 Auftreten und Rolle aromatischer und heterozyklischer Metabolite

Zur Identifizierung von Metaboliten spielen Abbauprodukte im Laboratorium (Maßstab) mit aus kontaminierten Aquiferen isolierten Bakterienkulturen eine wichtige Rolle (Meckenstock et al. 2004). Um jedoch zu überprüfen, ob die im Labor entdeckten Abbauprodukte und Metabolite eine Rolle im kontaminierten Aquifer spielen, sind Felduntersuchungen

unbedingt notwendig. Die Vor- und Nachteile von Studien im Feld und im Laboratorium zur Erforschung von Abbauwegen und der Bildung von Metaboliten sind in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.3: Vor- und Nachteile von Studien im Laboratorium und im Feld zur Untersuchung von Abbauwegen und Metabolitenbildung.

Studien im Laboratorium (z.B. Batch oder Mikrokosmen)	
Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> - Kontrollierbare Randbedingungen (z.B. optimale Wachstumsbedingungen) - Untersuchung von Abbauwegen mit isolierten Bakterienkulturen - Auftreten der Metabolite in höheren Konzentrationen als im Feld - Anzeige von Abbaupotentialen - Unterscheidung zwischen Metabolismus und Cometabolismus 	<ul style="list-style-type: none"> - Nicht naturnah, bestenfalls gute Näherung - Fehlende Komplexität des Aquifers mit den verschiedenen Einflussfaktoren - Fehlender Nachweis des tatsächlichen Abbaus im Aquifer
Studien im Feld (z.B. Feldproben)	
Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> - Hinweise auf Abbauwege durch neu identifizierte Metabolite - Nachweis der Relevanz von im Labor identifizierten Metaboliten im Aquifer - Möglichkeit der Isolation neuer Bakterienkulturen 	<ul style="list-style-type: none"> - Fehlende Möglichkeit der Aufdeckung vollständiger Abbaupfade - Keine Unterscheidung zwischen Metaboliten und Cometaboliten

Eine Grundvoraussetzung zur guten Messbarkeit der Metabolite ist, dass sie extrazellulär vorliegen. Metabolite, die innerhalb der Zellen vorkommen, sind ohne vorherigen Aufschluss (z.B. Zugabe von Chemikalien oder Verwendung von Ultraschall) für die analytischen Methoden nicht zugänglich. In diesem Zusammenhang stellen sich folgende grundsätzliche Fragen:

1. Warum scheiden Mikroorganismen überhaupt Metabolite aus, die von ihnen als potentielle Wachstumssubstrate verwendet werden könnten und durch teilweise energieaufwendige Aktivierungsreaktionen von ihnen gebildet wurden?
2. Welchen Nutzen ziehen die Mikroorganismen daraus?
3. Wie hoch ist der Anteil der Metabolite, die außerhalb der Zellen vorkommen?

Diese Fragen sind bisher wissenschaftlich noch nicht abschließend geklärt worden. In verschiedenen Studien wurde festgestellt, dass Metabolite (z.B. BBS oder Benzoessäure (BS)) die extrazellulär vorliegen gar nicht oder nur schlecht wieder aufgenommen und verwendet werden konnten (Beller et al. 1992, Phelps und Young 2001). Dies könnte unter anderem daran liegen, dass die Metabolite durch ihre größere Polarität die Zellwand nicht mehr

passieren können. Safinowski und Meckenstock (2006) stellten bei Abbaustudien im Batchansatz eine kontinuierliche Akkumulation des Metaboliten NMBS im Medium fest, was sie auch auf eine kontinuierliche Ausscheidung und fehlende Fähigkeit der Wiederaufnahme durch die Mikroorganismen zurückführten. Griebler (persönliche Mitteilung, 2011) untersuchte das quantitative Verhältnis zwischen den Ausgangsschadstoffen Naphthalin und Methylnaphthalin und deren Metaboliten 2-NS und NMBS in Batch-Experimenten mit einer Sulfat-reduzierenden Bakterienkultur. Er fand dabei heraus, dass fast 99% (nachdem die Biomasse abzentrifugiert war) der Metabolite im System im wässrigen Überstand also außerhalb der Zellen vorkamen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass sehr große Anteile der Metabolite durch die Mikroorganismen „produziert“ und anschließend in das umgebende Medium abgegeben werden. Eine weitere Erklärung dafür wäre der schnelle weitere Abbau der Metabolite 2-NS und NMBS innerhalb der Zellen, so dass dort keine höheren Konzentrationen auftreten können. Im umgebenden Medium hingegen akkumulieren diese Metabolite, da sie dort nicht abgebaut und aufgrund des abgeschlossenen Systems nicht abtransportiert werden.

Der Grund für die Ausscheidung der Metabolite ist weitgehend ungeklärt. Aber die Tatsache, dass die Metabolite in größeren Mengen ausgeschieden werden und schlecht wieder aufgenommen werden können, ist ein großer Vorteil für die Metabolitenanalytik. Es erhöht die Wahrscheinlichkeit, die Metabolite im Wasser messen zu können. Zusätzlich ist auch noch der im Wasser vorkommende Anteil der Metabolite im Vergleich zum sorbierten Anteil größer als bei den Ausgangssubstanzen, was auf die erhöhte Polarität der Metabolite durch den Einbau von funktionellen Gruppen (durch die Mikroorganismen) zurückzuführen ist (Reineke 2001). Diese Faktoren begünstigen die Messbarkeit der Metabolite in Wasser und somit deren Verwendung als Indikatoren für den mikrobiologischen Abbau.

Die Toxizität der Metabolite im Vergleich zu den Ausgangsschadstoffen und ihre Rolle als Elektronendonatoren im Aquifer ist bisher kaum untersucht worden. Die höhere Polarität lässt aber einen verbesserten Transport und eine bessere Bioverfügbarkeit im Vergleich zu den (Ausgangs)Schadstoffen vermuten. Im Falle eines relevanten Transports der Metabolite in stromabwärts liegende Gebiete des Aquifers, könnten die Metabolite dort als Elektronendonatoren fungieren. Modellhaft würden sie also im Bereich der Kontamination unter bestimmten Redoxbedingungen gebildet, in Abstrombereiche transportiert und könnten dort unter anderen Redoxbedingungen (z.B. mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor) als Substrat (Elektronendonator) genutzt und weiter abgebaut werden.

2.3.1 Identifizierte Metabolite

Die in der Literatur bekannten sauren Metabolite von aromatischen und heterozyklischen Schadstoffen, die in Labor- und/oder Felduntersuchungen nachgewiesen wurden, sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Wie bereits in Kapitel 2.2.1 diskutiert wurde, sind die anaeroben Abbauege der BTEX am besten untersucht und dadurch auch viele Metabolite bekannt. Neben aromatischen Bernsteinsäuren wie z.B. BBS oder MBBS sind auch die entsprechenden Monocarbonsäuren relevant (z.B. Benzoesäure, Toluolsäure).

Tabelle 2.4: Anaerobe saure Metabolite, die in Batch-Experimenten im Laboratorium sowie im Feld identifiziert werden konnten. Bei der Detektion der Metabolite im Feld kann nicht bei allen sicher ausgeschlossen werden, dass sie auch aerob gebildet wurden.

Metabolit	Formel	(Potentielle) Ausgangsstoffe	Batch (B)/ Feld (F)	Literatur (Beispiele)
von Monoaromaten (z.B. BTEX)				
Benzoessäure (BS)	$C_7H_6O_2$	z.B. BTEX	(B), (F)	Beller et al. 1992, Gieg et al. 1999, Elshahed et al. 2001, Griebler et al. 2004, Morasch et al. 2011
Benzylbernsteinsäure (BBS)	$C_{11}H_{12}O_4$	Toluol	(B), (F)	Beller et al. 1995, Biegert et al. 1996, Beller 2000, Elshahed et al. 2001, Chakraborty und Coates 2004, Morasch et al. 2011
Benzylfumarsäure	$C_{11}H_{10}O_4$	Toluol	(B), (F)	Beller et al. 1995
Methylbenzylbernsteinsäure (MBBS)	$C_{12}H_{14}O_4$	Xylole	(B), (F)	Beller et al. 1995, Krieger et al. 1999, Elshahed et al. 2001, Beller et al. 2008, Morasch et al. 2011
Methylbenzylfumarsäure	$C_{12}H_{12}O_4$	Xylole	(F)	Beller et al. 1995
Methylbenzoessäure (MBS)	$C_8H_8O_2$	Xylole	(F)	Martus und Püttmann 2003, Morasch et al. 2011
Toluolsäuren	$C_9H_{10}O_2$	Xylole	(B), (F)	Cozzarelli et al. 1995, Gieg et al. 1999, Elshahed et al. 2001, Griebler et al. 2004
Phthalsäure (Dibenzoessäure)	$C_8H_6O_4$	Xylole	(F)	Elshahed et al. 2001
Phenylethylbernsteinsäure	$C_{12}H_{14}O$	Ethylbenzol	(B)	Chakraborty und Coates 2004
Carboxybenzylbernsteinsäure	$C_{12}H_{12}O_6$	Cresol	(B)	Elshahed et al. 2001
Trimethylbenzoensäuren	$C_{10}H_{12}O_2$	Tetramethylbenzole	(F)	Cozzarelli et al. 1995, Martus und Püttmann 2003, Namocatcat et al. 2003, Martus und Püttmann 2003
C ₄ - bis C ₆ -Benzoensäuren	$C_{11}H_{14}O_2$... $C_{13}H_{18}O_2$	C ₅ - bis C ₇ -Benzole	(F)	Martus und Püttmann 2003
C ₂ - bis C ₅ -Benzylbernsteinsäuren	$C_{13}H_{16}O_4$... $C_{16}H_{22}O_4$	C ₃ - bis C ₆ -Benzole	(F)	Martus und Püttmann 2003, Alumbaugh et al. 2004
Methylphenylelessigsäure	$C_9H_{10}O_2$		(F)	Cozzarelli et al. 1995
von PAK (und bityklischen Verbindungen)				
Naphthyl-2-methylbernsteinsäure (NMBS)	$C_{15}H_{14}O_4$	Naphthalin, 2-Methylnaphthalin	(B), (F)	Annweiler et al. 2000, Ohlenbusch et al. 2002, Griebler et al. 2004, Meckenstock et al. 2004,
Naphthoesäure (NS)	$C_{11}H_8O_2$	Naphthalin, Methylnaphthalin	(B), (F)	Zhang und Young 1997, Annweiler et al. 2000, Ohlenbusch et al. 2002, Griebler et al. 2004, Morasch et al. 2011, Kleemann und Meckenstock 2011
Naphthyl-2-methylenbernsteinsäure (NMeBS)	$C_{15}H_{12}O_4$	Naphthalin, 2-Methylnaphthalin	(B), (F)	Meckenstock et al. 2004, Safinowski et al. 2006
Tetra-, Hexa-, Octa- und Decahydronaphthoesäuren	$C_{11}H_{12}O_2$... $C_{11}H_{18}O_2$	Naphthalin, 2-Methylnaphthalin	(B), (F)	Zhang et al. 2000, Annweiler et al. 2002, Griebler et al. 2004, Oka et al. 2011, Morasch et al. 2011
Carboxycyclohexylelessigsäure	$C_9H_{14}O_4$	Naphthalin, 2-Methylnaphthalin	(B)	Annweiler et al. 2002
Methylnaphthoesäuren (MNS)	$C_{12}H_{10}O_2$	2-Methylnaphthalin	(B), (F)	Sullivan et al. 2001, Gieg und Suflita 2002, Phelps et al. 2002, Griebler et al. 2004, Oka et al. 2011, Morasch et al. 2011
1-Methylnaphthyl-2-methylbernsteinsäure (MNMBS)	$C_{16}H_{16}O_4$	1-Methylnaphthalin	(B) ^C	Safinowski et al. 2006, Morasch et al. 2011

Fortsetzung von Tabelle 2.4

Metabolit	Formel	(Potentielle) Ausgangsstoffe	Batch (B)/ Feld (F)	Literatur (Beispiele)
Naphthylessigsäure	C ₁₂ H ₁₀ O ₂	Naphthaline	(F)	Ohlenbusch et al. 2002
Hydroxynaphthoesäure	C ₁₁ H ₈ O ₃	Naphthaline	(F)	Ohlenbusch et al. 2002
Dimethylnaphthoesäure	C ₁₃ H ₁₂ O ₂		(B)	Gieg und Suflita 2002
Acenaphthensäure (AS)	C ₁₃ H ₁₀ O ₂	Acenaphthen	(B)	Mihelcic und Luthy 1988, Safinowski et al. 2006, Morasch et al. 2011
Acenaphthylmethylbernstein- säure	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	Acenaphthen	(B)	Morasch et al. 2011
Acenaphthylensäure	C ₁₃ H ₈ O ₂	Acenaphthylen	(B)	Safinowski et al. 2006
Phenanthrensäure	C ₁₅ H ₁₀ O ₂	Phenanthren	(B)	Zhang und Young 1997
Fluorensäure	C ₁₄ H ₁₀ O ₂	Fluoren	(F)	Morasch et al. 2011
Indansäure (IS)	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	Indan	(B) ^C , (F)	Safinowski et al. 2006, Morasch et al. 2011
Indensäure	C ₁₀ H ₈ O ₂	Inden	(B) ^C , (F)	Safinowski et al. 2006, Morasch et al. 2011
von Heterozyklen				
Benzothiophensäure (BTS)	C ₉ H ₆ O ₂ S	Benzothiophen	(B) ^C , (F)	Annweiler et al. 2001, Griebler et al. 2004, Safinowski et al. 2006, Morasch et al. 2011
Dihydrobenzothiophensäure	C ₉ H ₈ O ₂ S	Benzothiophen	(F)	Annweiler et al. 2001, Griebler et al. 2004
Benzothiophenmethylbern- steinsäure (BTMBS)	C ₁₃ H ₁₂ O ₄ S	Benzothiophen	(B) ^C , (F)	Safinowski et al. 2006
Benzothiophenmethylenbern- steinsäure	C ₁₃ H ₁₀ O ₄ S	Benzothiophen	(B) ^C	Safinowski et al. 2006
Benzofuransäure (BFS)	C ₉ H ₆ O ₃	Benzofuran	(B) ^C , (F)	Safinowski et al. 2006, Morasch et al. 2011
Benzofuranmethylbernstein- säure (BFMBS)	C ₁₃ H ₁₂ O ₅	Benzofuran	(B) ^C	Safinowski et al. 2006
Benzofuranmethylenbernstein- säure	C ₁₃ H ₁₀ O ₅	Benzofuran	(B) ^C	Safinowski et al. 2006

(B) In Batch-Experimenten nachgewiesen (B)^C Nur cometabolischer Abbau in Batch-Experimenten beobachtet
(F) In Feldproben nachgewiesen

Beim anaeroben Abbau der PAK wurden die entsprechenden Monocarbonsäuren als die dominanten Abbauprodukte gefunden (Zhang und Young 1997, Meckenstock et al. 2000, Phelps et al. 2002, Meckenstock et al. 2004, Davidova et al. 2007). Neben Naphthoesäuren wurden auch Tetra-, Hexa-, Octa- und Decahydronaphthoesäuren als Metabolite des (Methyl)Naphthalin-Abbaus sowie Phenanthrensäure, Acenaphthensäure, Acenaphthylensäure und Fluorensäure als Metabolite der höherkernigen PAK identifiziert (Zhang und Young 1997, Safinowski und Meckenstock 2006, Morasch et al. 2011). Zusätzlich zu NMBS als typischen Metabolit des anaeroben Abbaus von 2-Methylnaphthalin (und Naphthalin) (Annweiler et al. 2000, Safinowski et al. 2006) wurden mit MNMBS und Acenaphthylmethylbernsteinsäure (Safinowski und Meckenstock 2006, Morasch et al. 2011) weitere aromatischen Bernsteinsäuren als Metabolite von PAK nachgewiesen.

Typische Metabolite für den anaeroben Abbau von Heterozyklen sind hingegen kaum bekannt. Hydroxylierte Chinoline konnten als anaerobe Abbauprodukte der Chinoline identifiziert werden (Johansen et al. 1997, Reineke et al. 2007). Als Cometabolite konnten im Batch-Ansatz Monocarbonsäuren und die methylierten Bernsteinsäuren des Benzofurans und

des Benzothiophens identifiziert werden. Die jeweiligen Säuren konnten auch in einem mit Teeröl kontaminierten Aquifer nachgewiesen werden, bisher jedoch nicht die Bernsteinsäuren (Annweiler et al. 2001, Safinowski et al. 2006).

2.3.2 Metabolite als Indikatoren für mikrobiologischen Abbau

Die Nutzung von spezifischen Metaboliten als qualitative Indikatoren des mikrobiologischen Abbaus in Aquiferen ist eine weit verbreitete Methode (siehe Kapitel 2.2.2 sowie Beller 2000, Elshahed et al. 2001, Smets und Pritchard 2003, Bombach et al. 2010). Die Verwendung als quantitative Indikatoren ist jedoch umstritten, da eindeutige quantitative Zusammenhänge zwischen den Konzentrationen der Metabolite und den entsprechenden Ausgangsschadstoffen bisher kaum gefunden wurden. Die Nutzung der Metabolite als Indikatoren für die Aufdeckung kleinräumiger Zonen hoher mikrobieller Abbauaktivität im Aquifer (siehe Kapitel 2.2.3) ist bisher noch gar nicht untersucht worden.

2.3.2.1 Qualitative Indikatorfunktion

Als qualitative Indikatoren für den mikrobiologischen Abbau eignen sich nicht alle Metabolite. Ideale qualitative Indikatoren (Metabolite) für den anaeroben Abbau sollten folgende Eigenschaften besitzen (ergänzt nach Beller 2000):

- Eindeutiges biochemisches Verhältnis zum Ausgangsschadstoff:
Bei der Detektion des Metaboliten im Aquifer soll eindeutig auf den mikrobiologischen Abbau möglichst nur eines bestimmten Schadstoffs geschlossen werden können.
- Keine industrielle oder kommerzielle Nutzung:
Anthropogene Einträge der Metabolite würden deren Indikatorfunktion stark einschränken. Wenn die Metabolite z.B. schon Teil des Ausgangsschadstoffgemischs wären, könnte ihre Präsenz nicht mehr als eindeutiger Indikator für stattfindende Abbauprozesse angesehen werden.
- Biologische und chemische Stabilität:
Eine hohe Stabilität der Metabolite erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass sie mit den gängigen analytischen Methoden (Kapitel 2.4) gemessen werden können.
- Gute Wasserlöslichkeit:
Die Metabolite sollten eine gewisse Wasserlöslichkeit aufweisen, da sie sonst fast ausschließlich an der Aquifermatrix sorbiert vorliegen würden.
- Extrazelluläres Vorkommen:
Nur Metabolite, die von den Zellen in das umgebende Medium (Wasser) ausgeschieden werden und außerhalb der Bakterien vorkommen, können mit den gängigen analytischen Methoden (Kapitel 2.4) ohne aufwändige Aufschlussmethoden detektiert werden.
- (Möglichst) Metabolite und keine Cometabolite:
Das Vorkommen eines Zwischenprodukts (Metabolit) kann auf den Vorgang der kompletten Mineralisierung hindeuten, wo hingegen Cometabolite häufig Endprodukte sind, die keinen kompletten Abbau anzeigen.

Aromatische und heterozyklische Bernsteinsäuren

Bernsteinsäuren als Metabolite von BTEX und ausgewählter PAK (und Alkanen) erfüllen diese Anforderungen am besten. Sie kommen nicht in den Schadstoffgemischen vor, werden nicht industriell hergestellt, kommen vorwiegend extrazellulär vor und haben ein eindeutiges spezifisches Verhältnis zum Ausgangsstoff, da sie der erste Schritt im anaeroben Abbauweg sind (Beller 2000, Elshahed et al. 2001, Meckenstock et al. 2004). Zusätzlich sind Bernsteinsäuren durch die zwei Carboxylgruppen am Bernsteinsäurerest gut wasserlöslich, sie sind überwiegend Zwischenprodukte und selten Cometabolite und sie kommen ausschließlich beim anaeroben und nicht beim aeroben Abbau vor. Als Beispiele lassen sich BBS und MBBS als anaerobe Abbauprodukte von Toluol und Xylole sowie NMBS als anaerober Metabolit von 2-Methylnaphthalin nennen (Beller 2000, Meckenstock et al. 2004). Bei den MBBS ist jedoch zu beachten, dass sie abhängig von den beteiligten Bakterienkulturen sowohl als metabolisch als auch cometabolisch gebildet werden können (Beller et al. 1995).

Aromatische und heterozyklische Carboxylsäuren

Die entsprechenden einfach carboxylierten aromatischen und heterozyklischen Säuren erfüllen die Anforderungen an die idealen Indikatoren hingegen meistens nicht so gut. Dies lässt sich sehr gut am Beispiel der Benzoesäure darstellen (Foght 2008). Sie hat zum einen keine eindeutige biochemische Beziehung zu einer Ausgangssubstanz, da sie auf vielen verschiedenen Wegen anaerob beim Abbau von BTEX (Abbildung 2.5 in Kapitel 2.2.1.1) und aromatischen Aminosäuren als auch aerob gebildet werden kann (Meckenstock et al. 2004). Zum anderen wird sie auch kommerziell hergestellt und eingesetzt. Die einfach carboxylierten anaeroben Abbauprodukte von Naphthalin und 2-Methylnaphthalin mit reduziertem Ring (z.B. Tetrahydro-, Hexahydro- und Decahydronaphthoesäure (Abbildung 2.7 in Kapitel 2.2.1.2) sind als qualitative Indikatoren etwas besser geeignet, da sie nicht industriell eingesetzt werden und in keinem aeroben Abbauweg entstehen (Zhang et al. 2000, Phelps et al. 2002). Sie wurden aber bisher nur in wenigen Studien als qualitative Indikatoren eingesetzt (Phelps et al. 2002, Griebler et al. 2004).

Weiterhin werden Trimethylbenzoesäuren als Abbauidikatoren vorgeschlagen und eingesetzt (Beller 2000, Namocatcat et al. 2003). Sie sind Abbauprodukte von Tetramethylbenzolen. Es konnten Korrelationen zwischen den Trimethylbenzoesäuren und den (geringer methylierten) Benzoesäuren (Benzoesäure, Methylbenzoesäuren, Toluolsäuren) nachgewiesen werden. Da die Trimethylbenzoesäuren aber persistenter und dadurch besser messbar sowie spezifischer sind, werden sie als qualitative Indikatoren für das Auftreten von allen monoaromatischen Benzoesäuren vorgeschlagen (Namocatcat et al. 2003). Da sie aber sowohl aerob als auch anaerob gebildet werden können, sind sie keine eindeutigen Indikatoren des anaeroben Abbaus.

Niedermolekulare aliphatische Säuren

Als summarischer Indikator für den Abbau der Gesamtheit der organischen Schadstoffe wird die Messung von niedermolekularen aliphatischen Säuren (z.B. Essigsäure, Propansäure, Butansäure) von Cozzarelli et al. (1995) vorgeschlagen. Diese Säuren stehen bei vielen

Abbauwegen am Ende des Abbaupfads. Sie sind daher nicht sehr spezifisch aber in der Gesamtheit ein guter Indikator für einen Abbau bis fast zur Mineralisierung.

Generell sind Metabolite deutlich spezifischer, wenn noch ein großer Anteil des Ausgangsschadstoffs vorhanden ist. Dies ist häufig der Fall für Metabolite, die zu Beginn des Abbaus der Ausgangsschadstoffe entstehen (z.B. Bernsteinsäuren nach Aktivierung mit Fumarat). Bei fortgeschrittenem Abbau sind die Metabolite unspezifischer, können aber zur Charakterisierung des Abbaus der Gesamtheit der organischen Schadstoffe herangezogen werden (extremes Beispiel: CO₂).

Zur Nutzung von Metaboliten als qualitative Indikatoren des Abbaus ist noch ein wichtiger Aspekt anzuführen. Die Abwesenheit bestimmter Metabolite bedeutet nicht automatisch, dass der entsprechende Schadstoff nicht abgebaut wird. Die Metabolite könnten z.B. bereits weiter abgebaut worden sein oder deren Konzentrationen liegen unterhalb der Nachweisgrenze der verwendeten analytischen Methoden. Entscheidend ist jedoch, dass der positive Nachweis eines spezifischen Metaboliten ein sicherer Indikator für den Abbau des jeweiligen Schadstoffs ist.

2.3.2.2 Quantitative Indikatorfunktion

Quantitative Zusammenhänge zwischen den Konzentrationen von Metaboliten und deren Ausgangssubstanzen (im Feld) sind bisher relativ schlecht untersucht. Verschiedene Studien konnten aber erste quantitative Zusammenhänge liefern. Generell kommen die Metabolite in deutlich (meist um Größenordnungen) geringeren Konzentrationen vor als die Ausgangsstoffe.

Für die Schadstoffgruppe der BTEX untersuchten Elshahed et al. (2001) die anaeroben Metabolite der Alkylbenzole in Batch- und in Feldversuchen. Die Konzentrationen der Metabolite waren in Laborversuchen ein bis drei Größenordnungen und im Feld drei bis vier Größenordnungen kleiner als die der Ausgangssubstanzen. Er begründete die größeren Verhältnisse von Metaboliten zu Ausgangssubstanzen in den Batch-Experimenten im Vergleich zum Feld durch die im Batch-Ansatz fehlenden abiotischen Einflussfaktoren wie z.B. Dispersion und Verdünnung. Eine andere Studie wies im Feld mit $\rho(\text{BBS}) = 0,3 \mu\text{g/L}$ sehr geringe Konzentrationen von BBS im Bereich der Nachweisgrenze der angewandten Messmethode nach, obwohl der Ausgangsschadstoff in hohen Konzentrationen von etwa $\rho(\text{Toluol}) = 20 \text{ mg/L}$ vorlag (Beller 2002). Die Konzentrationen an MBBS hingegen waren in dieser Studie generell höher als die der BBS, lagen aber immer noch drei bis vier Größenordnungen unter denen der Xylol-Isomere. In dieser Studie konnte aber ein linearer quantitativer Zusammenhang zwischen den zum selben Zeitpunkt gemessenen Konzentrationen an MBBS und der Xylol-Isomere gefunden werden. Allgemein waren in den verschiedenen Studien die Konzentrationen von BBS und MBBS gering im Vergleich zu den Konzentrationen der Ausgangsstoffe (Beller et al. 1995, Beller 2000, Beller et al. 2008). Die Konzentrationen der MBBS waren aber fast immer größer als die der BBS, obwohl von den Ausgangsstoffen Toluol immer in höheren oder ähnlichen Konzentrationen vorlag als die Xylol-Isomere. Dies könnte ein Hinweis auf Unterschiede in der Abbaubarkeit dieser Metabolite sein. BBS scheint besser weiter abgebaut zu werden als MBBS.

Toluolsäuren als Abbauprodukte der Xylole wurden in den meisten kontaminierten Aquiferen in Konzentrationen um zwei bis drei Größenordnungen niedriger gefunden als die Ausgangssubstanzen (Elshahed et al. 2001, Martus und Püttmann (2003). In einem mit Teeröl kontaminierten Aquifer waren die Konzentration jedoch nur um eine Größenordnung kleiner (Griebler et al. 2004). Dies könnte für eine cometabolische Bildung und daraus folgende Akkumulation in diesem Aquifer sprechen. Martus und Püttmann 2003) analysierten methylierte Benzoesäuren (MBS) sowie MBBS und bildeten das Verhältnis zwischen der Konzentration aller MBS zur Konzentration aller MBBS. Das Ergebnis zeigte, dass die MBS in höherer Konzentration auftraten als die MBBS (ein bis zwei Größenordnungen). Dies wurde neben einem schnelleren Abbau der MBBS auch damit begründet, dass die MBS aus verschiedenen Ausgangssubstanzen und auch aerob gebildet werden können.

Bei den anaeroben Metaboliten der PAK wurden in zwei Studien in mit Teeröl kontaminierten Aquiferen Konzentrationen der NS sowie NMBS gefunden, die um 2 bis 3 Größenordnungen unter den Konzentrationen der Ausgangssubstanzen Naphthalin und Methylnaphthalin lagen (Phelps et al. 2002, Griebler et al. 2004). Zusätzlich konnten große Variationen der quantitativen Verhältnisse zwischen dem Metabolit NMBS und dem Ausgangsschadstoff 2-Methylnaphthalin nachgewiesen werden. Sie schwankten um 3 Größenordnungen zwischen 3,7 und 453 (Griebler et al. 2004).

Für heterozyklische Metabolite sind solche Zusammenhänge kaum untersucht. Griebler et al. (2004) zeigten, dass Benzothiophensäuren (BTS) als Metaboliten von Benzothiophen die Konzentrationen des Ausgangsschadstoffs überschreiten können. Dies führten sie auf eine cometabolische Bildung und anschließende Akkumulation zurück. Reineke et al. (2007) bildeten zum Nachweis von Abbauprozessen im Feld die Verhältnisse der Konzentrationen des Schadstoffes Chinolin zu den hydroxylierten Chinolinen, welche die ersten Metabolite beim anaeroben Abbau sind. Sie konnten Verschiebungen der Konzentrationsverhältnisse zu höheren Anteilen der Metabolite feststellen, was sie als Hinweise für stattfindende Abbauprozesse ansahen. Die alleinige Detektion hydroxylierter Chinoline ist damit nicht aussagekräftig, da diese auch in den Schadstoffquellen (Teerölen) vorkommen.

Die unterschiedlichen Untersuchungen zu quantitativen Zusammenhängen zwischen Metabolitenbildung und Grad des Schadstoffabbaus führen zu keinen eindeutigen Schlussfolgerungen, sondern spiegeln die komplexen Zusammenhänge im Aquifer wieder. Dies zeigt deutlich den bestehenden Forschungsbedarf.

2.4 Analytische Methoden zur Bestimmung von Metaboliten

Zur Analytik von polaren (sauren) aromatischen und heterozyklischen Metaboliten werden weitgehend massenspektrometrische Methoden mit einer vorgeschalteten chromatographischen Trennung verwendet. Neben der Kopplung der Gaschromatographie mit der Massenspektrometrie (GC-MS, Kapitel 2.4.1) spielt die Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit der Massenspektrometrie (LC-MS, Kapitel 2.4.2) eine entscheidende Rolle bei der Analytik dieser Metabolite (Beller et al. 1995, Elshahed et al.

2001, Beller 2002, Ohlenbusch et al. 2002, Reineke et al. 2007). Die Verwendung der UV-Detektion (Meyer et al. 1999, Müller et al. 1999) ist heutzutage sehr selten, da die massenspektrometrische Detektion aufgrund der erheblich größeren Sensitivität und Selektivität deutlich besser geeignet ist.

Die Analytik (Identifizierung und Quantifizierung) der sauren Metabolite von aromatischen und heterozyklischen Substanzen ist aus folgenden Gründen oftmals eine Herausforderung:

- Mittels GC-MS-Methoden werden unpolare Ausgangsprodukte, wie z.B. aromatische und heterozyklische Ausgangsstoffe gemessen. Jedoch können deren Metabolite oftmals aufgrund ihres polaren Charakters (durch den Einbau von funktionellen Gruppen während des mikrobiellen Abbaus) nur nach zeitaufwändigen Anreicherungs- (z.B. Flüssig-flüssig Extraktion) und Derivatisierungsmaßnahmen (z.B. Methylierung oder Syllierung) mit dieser Analysetechnik detektiert werden.
- Bei polaren Substanzen kommen meistens LC-MS-Methoden zum Einsatz. Jedoch fehlt es bei der LC-MS bzw. der Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandemmassenspektrometrie (LC-MS/MS) an geeigneten massenspektrometrischen Substanzbibliotheken, wie z.B. der NIST-Datenbank (*National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA*) bei der GC-MS, mit denen ermittelte Spektren von Metaboliten abgeglichen werden können. Zudem wird bei der LC-MS durch die Wahl der Ionisierungstechnik schon der Bereich der detektierbaren Metabolite eingegrenzt. Die am häufigsten und auch in dieser Arbeit verwendete Elektrospray-Ionisierung (ESI) ist für polare Metabolite sehr gut geeignet, wo hingegen weniger polare Analyte viel schlechter oder gar nicht ionisiert und damit nicht detektiert werden können.
- Viele anaerobe Abbauewege von Schadstoffen sind noch unbekannt, so dass eine gezielte Analytik nach deren Metaboliten nicht möglich ist. Außerdem ist bei im Labor erforschten anaeroben Abbauewegen und Metaboliten nicht immer gesichert, dass diese Metabolite auch im Feld vorkommen, da die Komplexität der Einflussfaktoren dort deutlich größer ist als bei den Abbaustudien im Laboratorium.
- Für viele Metabolite sind keine analytischen Standards verfügbar, was sowohl die Quantifizierung von bekannten Metaboliten, als auch die Absicherung der Identifizierung von unbekanntem Metaboliten stark erschwert.
- Aufgrund von häufig sehr geringen Metaboliten-Konzentrationen werden vielfach vor der eigentlichen Messung unterschiedliche Anreicherungstechniken (Flüssig-Flüssig-Extraktion, Festphasenextraktion) benötigt.

Generell wird in der Metabolitenanalytik zwischen gezielter Einzelstoffanalytik (Kapitel 2.4.3) zum Nachweis und zur Quantifizierung von bekannten Metaboliten und dem Screening nach unbekanntem Metaboliten sowie deren Identifizierung unterschieden (Kapitel 2.4.4)

2.4.1 GC-MS

Die Kopplung GC-MS ist im Vergleich zur LC-MS eine sehr etablierte Kopplungstechnik, die zur Messung von unpolaren und verdampfbaren Analyten eingesetzt wird. Um auch polare

Analyten der GC-MS zugänglich zu machen müssen zunächst Derivatisierungen durchgeführt werden.

Bei der GC-MS werden die Analyte aufgrund ihres Siedepunktes und ihrer Polarität auf einer chromatographischen Kapillarsäule getrennt, anschließend ionisiert und im Massenspektrometer anhand ihres Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) detektiert.

Die Elektronenstoß-Ionisierung (EI) ist dabei die am häufigsten genutzte Ionisierungsmethode. Dabei werden Elektronen an elektrisch geheizten Glühkathoden gebildet und durch eine angelegte Spannung auf die gewünschte kinetische Energie gebracht. Die gasförmigen Moleküle werden mit diesen Elektronen beschossen und dadurch ionisiert. Die Ionisierung erfolgt durch den Verlust eines Elektrons und ein ungepaartes Elektron bleibt dadurch im Molekül zurück. Es entstehen Ionen mit einer ungeraden Anzahl an Elektronen. Als Standardeinstellungen bei der GC-MS mit EI werden Massenspektren bei einer kinetischen Energie von 70 eV erzeugt. In diesem Elektronenvoltbereich liegt die maximale Ionenausbeute und die vorhandene Überschussenergie verursacht Fragmentierungsreaktionen der Ionen. Die Vorteile dieser standardisierten Methode liegen zum einen in der Erzeugung von reproduzierbaren Massenspektren die nahezu geräteunabhängig sind. Die Massenspektren werden in Datenbanken (z.B. NIST) gesammelt und gemessene Massenspektren können mit Hilfe von Datenbanksuchen zugeordnet werden. Zum anderen entstehen durch die hohe Ionenausbeute charakteristische Massenspektren mit vielen Fragmenten, die zur Strukturermittlung von unbekanntem Analyten gut geeignet sind. Nachteile dieser Technik sind die häufig fehlenden oder nur in sehr geringer Intensität vorkommenden Molekülpeaks (nicht fragmentierte Ausgangssubstanz), die aufgrund der hohen Überschussenergie häufig komplett fragmentiert werden. Diese Molekülpeaks können aber wichtige Informationen zur Identifizierung von Analyten liefern.

Um nicht fragmentierte Molekülpeaks in größerer Intensität zu erzeugen, würde sich eine „weichere“ Ionisierung wie die chemische Ionisierung (CI) anbieten. Dabei reagiert zugeführtes und mit EI ionisiertes Reaktand-Gas mit den gasförmigen Molekülen und ionisiert diese. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die EI verwendet, so dass auf die CI nicht detaillierter eingegangen wird.

Weitergehende Informationen zur GC-MS und den Fragmentierungsreaktionen sind z.B. in Gross (2004) oder Hübschmann (2008) zu finden.

2.4.2 LC-MS

Die LC-MS ist im Vergleich zur GC-MS eine relativ neue Technik, die seit Mitte der achtziger Jahre des 20. Jahrhunderts entwickelt wurde. Eine sehr große Motivation zur Entwicklung dieser Kopplung lag darin, Substanzen identifizieren und quantifizieren zu können, die mit der GC-MS nicht oder nur schwierig messbar sind (z.B. thermolabile, polare und nicht flüchtige Substanzen). Schnellere, sensitivere und günstigere quantitative Analysemethoden (ohne Anreicherung oder Derivatisierung wie bei der GC-MS) sollten damit geschaffen werden (Reemtsma 2001, McMaster 2005).

Es mussten aber zunächst grundsätzliche Probleme überwunden werden (Niessen 2006):

- Inkompatibilität der hohen Flussraten der HPLC mit dem Hochvakuum des Massenspektrometers.
- Unvereinbarkeit von Ionisierungstechniken, die auf Sprayverfahren basieren mit HPLC-Eluenten bestimmter Zusammensetzung (z.B. nicht-flüchtige Puffer).
- Ionisierung von nicht-flüchtigen und neutralen Analyten.

Der Durchbruch gelang mit der Entwicklung von Ionisierungstechniken bei Atmosphärendruck, die unter anderem von John Fenn und Mitarbeitern etabliert wurde (Yamashita und Fenn 1984a, Yamashita und Fenn 1984b, Fenn et al. 1989). Dabei handelt es sich um Sprayverfahren, bei denen mit hohen Spannungen unter Atmosphärendruck Ionen erzeugt werden. Neben der Elektrospray-Ionisierung (ESI) ist die Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck (*Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*, APCI) eine häufig genutzte Ionisierungsmethode. Speziell in der Wasseranalytik wird meist die ESI angewendet, da sie für im Wasser häufig auftretende polare und ionische Moleküle gut geeignet ist (Reemtsma 2003, Zwiener und Frimmel 2004a). Da bei den in dieser Arbeit zugrundeliegenden Analysen ausschließlich die ESI zum Einsatz kam, wird die APCI im Folgenden nicht näher beschrieben.

Elektrospray-Ionisierung (ESI)

Das Funktionsprinzip der ESI wird im Folgenden kurz dargestellt (Fenn et al. 1989, Kebarle und Tang 1993).

Bei der ESI werden die Analyte mit dem Eluenten unter Atmosphärendruck aus einer Stahlkapillare versprüht. An die Spitze der Kapillare wird eine hohe Spannung von $U = 3\text{--}5\text{ kV}$ angelegt. Dadurch bildet sich an der Spitze ein Überschuss gleich geladener Tröpfchen, die sich abstoßen. Je nachdem ob positive oder negative Spannung angelegt wird, bilden sich positiv oder negativ geladene Tröpfchen. Ein Taylor-Konus bildet sich aus und kleine Tröpfchen mit einer hohen Oberflächenladung treten aus der Kapillare aus. Durch die Verwendung eines heißen neutralen Gases wird das Lösungsmittel verdampft, der Radius der Tropfen wird kleiner und die Oberflächenladung wird größer. Sobald diese Ladung zu groß wird, kommt es ab einem kritischen Punkt zu einer „Coulomb Explosion“ und es bilden sich noch kleinere Tröpfchen. Dies geschieht mehrfach. Die Entstehung der vollständig desolvatisierten freien (Analyt-)Ionen in der Gas-Phase ist nicht abschließend geklärt. Es gibt aber unterschiedliche Modelle wie z.B. das "*Charge Residue Model*" (Dole et al. 1968) oder das "*Ion Emission Model*" (Iribane und Thomson 1976). Bei letzterem Modell wird die Ladung von dem Tropfen auf die Analyte übertragen und die entstandenen Analyt-Ionen werden von der Oberfläche des Tropfens emittiert. Die Analyt-Ionen werden dann aufgrund der Potentialdifferenz zwischen der Stahlkapillare und Einlass des Massenspektrometers (MS) in das Vakuum des MS gelenkt. Je nachdem ob positive oder negative Spannung angelegt wird, werden entsprechend geladene Ionen im Überschuss erzeugt. In Abbildung 2.8 ist die ESI im positiven Modus dargestellt.

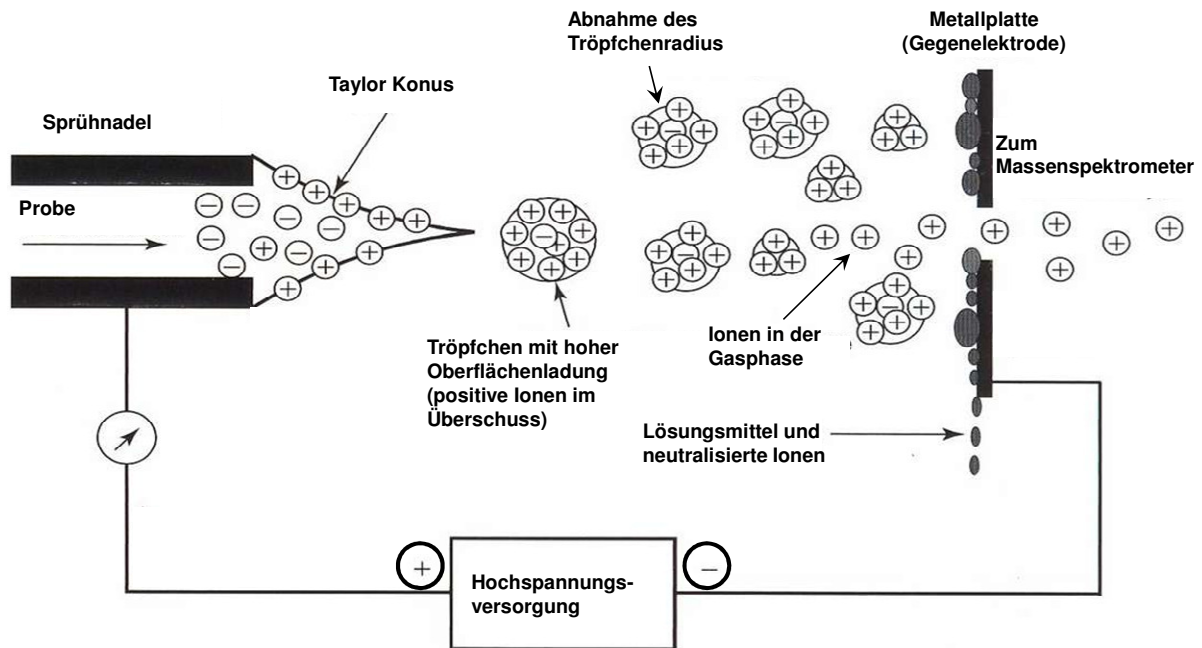


Abbildung 2.8: Schema der ESI im positiven Modus (nach Budzikiewicz und Schäfer 2005 und Gross et al. 2007).

Die ESI wird als „weiche“ Ionisationstechnik bezeichnet, die in der Regel Quasimolekülionen und kaum Fragmentierungen erzeugt. Sie ist besonders geeignet für polare und ionische Analyte. Mit der Art der Spannung an der Stahlkapillare können positiv (z.B. $[M+H]^+$) oder negativ (z.B. $[M-H]^-$) geladene Quasimolekülionen erzeugt werden. Es sind Ionen mit einer geraden Anzahl an Elektronen. Je nach Zusammensetzung der Probe und des Eluenten können auch Addukt-Ionen wie z.B. $(M+NH_4)^+$ oder $(M+Cl)^-$ entstehen. Die Nachweisempfindlichkeit bei der ESI ist stark von der Ionisierbarkeit des Analyten und von Matrixeffekten abhängig. Die ESI wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl bei den LC-MS/MS als auch bei den LC-QTOF-MS-Messungen zur Ionisierung der Analyte eingesetzt.

Matrixeffekte

Ein generelles Phänomen der LC-MS-Analytik sind Matrixeffekte, die die Sensitivität von Messungen stark beeinflussen können. Matrixeffekte können durch co-eluierende ionische oder ionisierbare Probenbestandteile in komplexen Matrices entstehen (Choi et al. 2001, Zwiener und Frimmel 2004a, Niessen et al. 2006). Sie werden vor allem durch Substanzen hervorgerufen, die einen Einfluss auf die Bildung der Tropfen und auf die Ladungsübertragung haben. Dabei kommt es häufig zu einer Ionensuppression, die durch Konkurrenzeffekte zwischen Analyt- und Matrix-Ionen zum Zugang zur Oberfläche der einzelnen Tropfen bzw. den dort vorhandenen Ladungen hervorgerufen wird. Dadurch können weniger Analyt-Ionen in die Gas-Phase emittiert werden, was zu einer geringeren Ionisierungsausbeute führt (Kebarle und Tang 1993). Diese Effekte können sowohl durch anorganische Salze als auch durch organische Komponenten hervorgerufen werden (Constantopoulos et al. 1999, Ohlenbusch et al. 2002, Niessen et al. 2006). Matrixeffekte führen bei der Messung von Analyten in komplizierten Matrices teilweise zu geringeren

Signalintensitäten im Vergleich zur Messung derselben Analyten in anderen Matrices wie z.B. Reinstwasser. Sie müssen bei LC-MS-Messungen beachtet sowie gegebenenfalls durch entsprechende Maßnahmen (z.B. Probenaufreinigung, internen Standards, Standardaddition) kompensiert oder minimiert werden (Matuszewski et al. 2003, Stüber und Reemtsma 2004). Die weitgehende Abtrennung der Matrix durch Probenaufreinigung in Form einer Festphasenanreicherung (SPE) ist dabei eine mögliche Maßnahme.

2.4.2.1 LC-MS/MS

In der Umwelt-Analytik wird meist nach der chromatographischen Trennung und der Ionisierung (z.B. durch ESI) statt eines einfachen Massenspektrometers ein Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) verwendet. Bei MS/MS-Systemen sind zwei Massenanalysatoren hintereinander geschaltet, wobei zwischen den beiden eine Kollisionszelle sitzt (Abbildung 2.9). Häufig kommen LC-MS/MS-Systeme bei denen drei Quadrupol-Massenanalysatoren in Reihe gekoppelt sind (sogenannte "Triple-Quad") zum Einsatz. Die Funktionsweise eines Quadrupols und die möglichen Messmethoden eines LC-TripleQuad (LC-MS/MS) werden im Folgenden kurz erläutert.

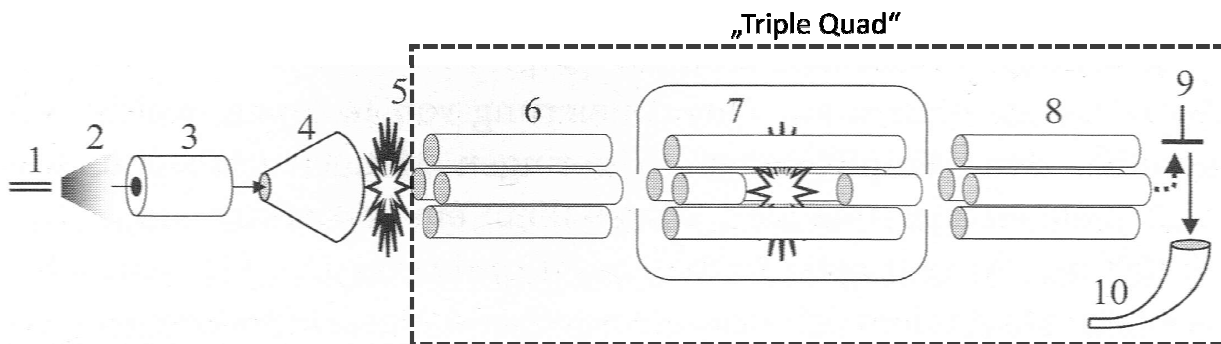


Abbildung 2.9: Schematischer Aufbau eines Tandem Massenspektrometers ("Triple-Quad") mit ESI (aus Budzikiewicz und Schäfer 2005). 1. ESI-Kapillare, 2. ESI-Spray, 3. geheizte Transferkapillare, 4. Skimmer, 5. Skimmer-CID-Region, 6. erster Quadrupol, 7. Quadrupol, der als Kollisionszelle fungiert, 8. dritter Quadrupol, 9. Ablenkelektrode und Konversionsdynode, 10. Detektion mit einem Sekundärelektronenvervielfacher.

Ein Quadrupol besteht aus vier Stäben, an die paarweise eine einer Gleichspannung (außer bei der Kollisionszelle) überlagerte Wechselspannung so angelegt wird, dass sich nur für Ionen bestimmter m/z stabile Flugbahnen ergeben (Massenfilter).

Der mittlere Quadrupol wird bei MS/MS-Systemen nur mit einer Wechselspannung betrieben und hat keine Funktion als Massenfilter, sondern als Kollisionszelle. Nach gezielter Stoßaktivierung durch kollisionsinduzierte Fragmentierung (*Collision Induced Dissociation*, CID) in der Kollisionszelle können Strukturinformationen über Analyten aus Fragmentspektren erhalten werden. Die Fragmentierung erfolgt durch Kollision der Analyt-Ionen mit Gasmolekülen (z.B. N_2), die sich in der Kollisionszelle befinden. Durch Veränderung der Kollisionsenergie am MS/MS-System lassen sich die Geschwindigkeiten der Analyt-Ionen in der Kollisionszelle variieren und dadurch die Fragmentierungsintensitäten der Ionen beeinflussen. Je höher die Geschwindigkeiten umso stärker die Fragmentierung. Die

Vorteile eines MS/MS-Systems im Vergleich zu Systemen mit nur einem Massenspektrometer liegen in einer selektiveren und sensitiveren Messung (z.B. durch geringeres Hintergrundsignal) und in der Vielseitigkeit, die sich durch der Möglichkeit der Durchführung verschiedenster Mess-Experimente zeigt (Abbildung 2.10).

Bei **Product-Ion-Scans (PIS)** werden nur Ionen mit bestimmten m/z im ersten Quadrupol (Q1) selektiert, von denen nach Fragmentierung im zweiten Quadrupol (Q2) die Fragmentspektren im dritten Quadrupol (Q3) im Scan aufgezeichnet werden. Mit Hilfe der PIS lassen sich Struktur-Informationen über Analyten ermitteln. Dies gelingt, da bestimmte Strukturelemente in den Analyten nach Fragmentierung in der Kollisionszelle charakteristische Fragmente erzeugen.

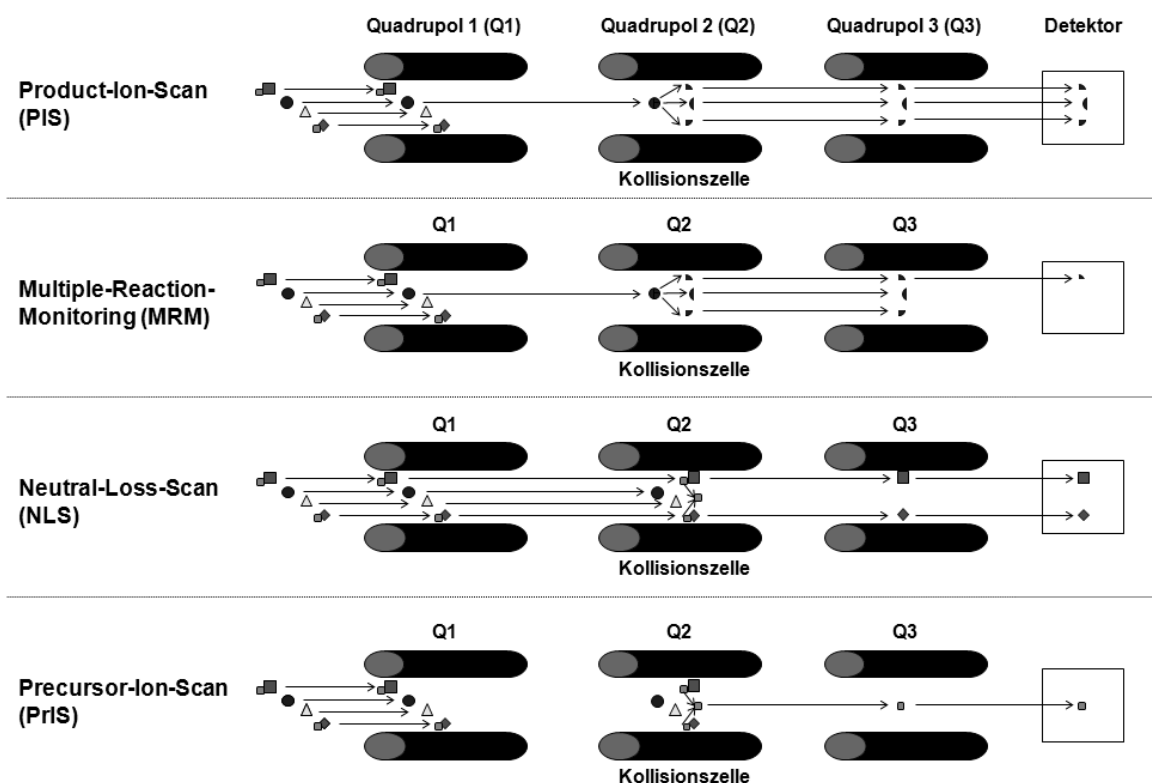


Abbildung 2.10: Die wichtigsten Experimente, die mit einem Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) durchgeführt werden können.

Im **Multiple-Reaction-Monitoring (MRM)** werden im Q1 Ionen mit bestimmten m/z selektiert (Precursor), diese im Q2 fragmentiert und im Q3 werden nur die für den Precursor spezifischen Fragmente detektiert. Es ist ein sehr selektives und sensitives Experiment das zur Quantifizierung von ausgewählten Analyten (insbesondere von Spurenstoffen) besonders in komplexen Matrices eingesetzt wird. Normalerweise werden die Massenübergänge der zwei empfindlichsten Fragmente für eine quantitative Methode (*Quantifier* und *Qualifier*) detektiert. Das Verhältnis der Intensitäten der beiden Fragmente zueinander ist für eine Substanz bei einer Messmethode unabhängig von der Matrix konstant und kann somit zur weiteren Absicherung der Identität dieser Substanz herangezogen werden.

Mit **Neutral-Loss-Scans (NLS)** und **Precursor-Ion-Scans (PrIS)** lassen sich Stoffgruppen mit bestimmten gemeinsamen funktionellen Gruppen detektieren. Bei NLS werden im Q1 Analyt-Ionen mit bestimmtem m/z selektiert, in Q2 fragmentiert und in Q3 werden nur die Ionen detektiert, die bei der Fragmentierung einen bestimmten vorher festgelegten Neutralverlust (ungeladenes Fragment) zum Analyt-Ion (Q1) gezeigt haben (Tabelle 2.5). Diese Neutralverluste sind starke Hinweise auf bestimmte Strukturelemente (vor allem funktionelle Gruppen) im Vorläufer-Ion.

PrIS funktionieren ähnlich wie NLS mit dem Unterschied, dass im Q3 nur Ionen selektiert werden, die bei der Fragmentierung ein bestimmtes geladenes Fragment-Ion (m/z) erzeugt haben, was anschließend detektiert wird (Tabelle 2.5).

Tabelle 2.5: Beispielhafte Funktionsweise (Massenschaltungen) bei den Mess-Experimenten NLS und PrIS. In Q2 erfolgt die kollisionsinduzierte Fragmentierung (CID).

NLS (z.B. Neutralverlust $\Delta m/z = 44$)			PrIS (z.B. geladenes Fragment-Ion $m/z = 44$)		
Q1 (m/z)	Q2	Q3 (m/z)	Q1 (m/z)	Q2	Q3 (m/z)
200	→	→ 156	200	→	→ 44
199	→	→ 155	199	→	→ 44
198	→	→ 154	198	→	→ 44
197	→ (CID)	→ 153	197	→ (CID)	→ 44
usw.	→	→ usw.	usw.	→	→ usw.

2.4.2.2 LC-QTOF-MS

Neben Quadrupol-Massenanalysatoren ist die Verwendung der Flugzeit-Massenspektrometrie (*Time-of-Flight-Mass-Spectrometry*, TOF-MS) eine oft genutzte Technik, die vorwiegend zum Screening und zur Identifizierung von Metaboliten eingesetzt wird.

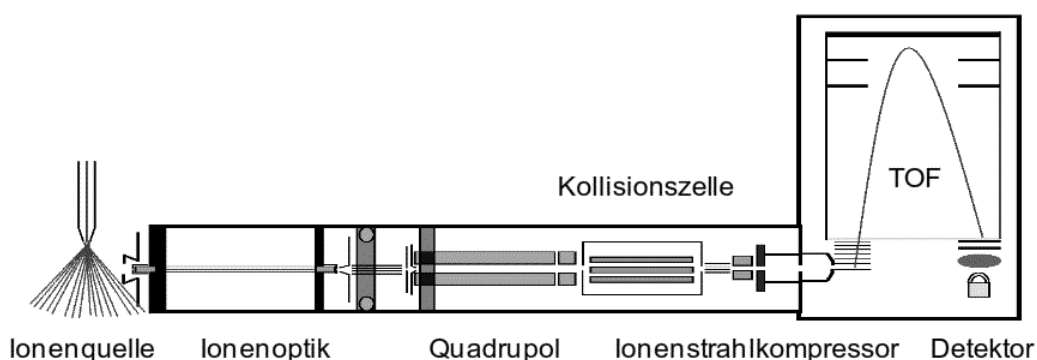


Abbildung 2.11: Aufbau eines Quadrupole-Time-of-Flight-Massenspektrometers (QTOF-MS) der Firma Agilent (Abbildung aus Produktbroschüre der Firma Agilent des QTOF-MS-Modells 6530).

Die Funktionsweise des TOF-MS basiert auf der Trennung von Ionen aufgrund ihrer unterschiedlich langen Flugzeit im Flugrohr nach Beschleunigung in einem definierten

elektrischen Feld (Niessen 2006, De Hoffmann und Stroobant 2007). Die Flugzeit der Ionen ist dabei eine Funktion des m/z der Ionen. Dieser Zusammenhang wird anhand der Formel (2.2) deutlich, da die neben dem m/z vorhandenen anderen Faktoren d (Länge des Flugrohrs), e (Elementarladung) und U (Spannung) in einem System konstant sind (De Hoffmann und Stroobant 2007):

$$\frac{m}{z} = \left(\frac{2eU}{s^2} \right) t^2 \quad (2.2)$$

m = Masse, z = Ladungszahl, e = Elementarladung, s = Länge des Flugrohrs, U = Spannung, t = Flugzeit

Bei der TOF-MS werden die in einer Ionenquelle (z.B. ESI) erzeugten Ionen zu einer gewissen Startzeit durch einen elektrischen Impuls in Richtung des Detektors beschleunigt. Hierbei wird die elektrische Energie in kinetische Energie umgewandelt. Aufgrund des Energieerhaltungsgesetzes werden Ionen mit verschiedenen m/z auf unterschiedliche Geschwindigkeiten beschleunigt. Deshalb benötigen sie für die Strecke vom Startpunkt (Impuls) bis zum Detektor unterschiedlich lange, was zu einer Auftrennung gemäß ihrer m/z führt.

In den meisten Geräten werden Reflektoren benutzt, die die Flugphase der Ionen verlängern indem schnellere Ionen etwas tiefer in das Reflektorfeld eindringen als langsamere. Dadurch wird sowohl das Auflösungsvermögen verbessert als auch die unterschiedlichen kinetischen Energien von Ionen gleichen m/z korrigiert. Beim TOF-MS werden alle Ionen in Richtung des Detektors beschleunigt und dort detektiert so dass mit diesen Systemen ausschließlich *Full-Scan* Daten aufgenommen werden können.

Die Massenauflösung R ist ein wichtiger Parameter, da sie angibt wie gut Ionen mit gleicher Ladungszahl und ähnlichen Massen bzw. Flugzeiten voneinander getrennt detektiert werden können. Die Massenauflösung beim TOF-MS ist stark von der Flugzeit abhängig und liegt meist im Bereich von etwa $R = 20000-60000$. Je länger die Flugzeit, umso besser die Auflösung. Ein weiterer wichtiger Faktor ist die hohe Massengenauigkeit der TOF-MS-Geräte. Um stets eine hohe Massengenauigkeit zu gewährleisten, werden Verschiebungen der Massenachse (z.B. durch thermische Effekte) über die Zugabe von Standards (Referenzmassen) kompensiert. Etwaige Massenabweichungen werden bei den Massenspektren der Standards erkannt und dann entsprechend bei den Proben berücksichtigt (Jiang und Moini 2000).

Grundsätzliche Vorteile der TOF-MS-Geräte sind die hohe Auflösung, der große Massenbereich und die schnelle Aufnahme von Spektren. Durch die hohe Massengenauigkeit und Auflösung werden sie zur Bestimmung akkurater Massen von Analyten und damit zur Ermittlung der Elementarzusammensetzung (Summenformel) unbekannter Stoffe eingesetzt.

QTOF-MS sind Hybridgeräte aus einem vorgeschalteten Quadrupol, das an ein TOF-MS gekoppelt wird (Niessen 2006) (siehe Abbildung 2.11). Sie sind im Prinzip ähnlich wie Triple-Quadrupole (siehe Kapitel 2.4.2.1), aber mit dem entscheidenden Unterschied, dass der

letzte Quadrupol durch ein TOF-MS ersetzt wird. Sie vereinen damit die Vorteile der TOF-MS und der Tandem-Massenspektrometrie (Chernushevich et al. 2001). Die Kollisionszelle besteht bei QTOF-MS-Geräten häufig aus einem Hexapol. Sie können im MS- und im MS/MS-Modus verwendet werden. Beim MS-Modus haben der Quadrupol und die Kollisionszelle ausschließlich die Aufgabe, die erzeugten Ionen ins TOF-MS zu leiten. Beim MS/MS-Modus hingegen können im Prinzip Fragmentierungs-Experimente wie beim Triple-Quad durchgeführt werden. Nach Fragmentierungsreaktionen in der Kollisionszelle können auch hier Fragmentspektren im TOF-MS aufgenommen werden. Es gibt jedoch zwei Unterschiede zum Triple-Quad:

1. Es können keine einzelnen Ionen im (Q)TOF-MS gemessen werden, da das (Q)TOF-MS immer Spektren (*Full-Scan* Daten) aufnimmt. Einzelne Ionenspuren können also erst nach der Messung aus den Daten selektiert werden.
2. Durch die hohe Auflösung beim QTOF-MS können akkurate Massen der Fragment-Ionen bestimmt werden, was zu hochaufgelösten Fragmentspektren führt. Dafür reicht die Auflösung im Triple-Quad nicht aus.

LC-TOF-MS sowie LC-QTOF-MS-Geräte werden hauptsächlich zum Screening und für die qualitative Analytik (Identifizierungen) verwendet. Sie bieten aber auch die Möglichkeit der Quantifizierung, jedoch sind LC-MS/MS-Geräte mit MRM-Experimenten aufgrund ihrer besseren Empfindlichkeit und ihres größeren linearen Bereiches dafür deutlich besser geeignet. Weiterführende Informationen zur QTOF-MS-Analytik sind z.B. in Adrey (2003) oder De Hoffmann und Stroobant (2007) zu finden.

2.4.3 Einzelstoffanalytik

Bei der Einzelstoffanalytik werden gezielt ausgewählte Analyte analysiert und quantifiziert. Bei der Analytik von polaren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten sind dabei die GC-MS und die LC-MS/MS die wichtigsten Messmethoden (siehe Tabelle 2.6).

LC-MS/MS-Methoden kommen ohne die zeitaufwendigen Derivatisierungsreaktionen aus, die der GC-MS Analytik vorgeschaltet sein müssen. Je nach Wassermatrix und Konzentration der Metabolite können sie auch ohne Anreicherungsschritte angewendet werden. Zusätzlich sind sie durch die Verwendung von MRM-Experimenten sehr selektiv und sensitiv. Diese Vorteile machen die LC-MS/MS zur Methode der Wahl für die Einzelstoffanalytik von polaren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten. Als Ionisierungstechnik findet nahezu ausschließlich die ESI Verwendung. Die in der Literatur angewendeten Mess- und Anreicherungsmethoden zur quantitativen Analytik (Einzelstoffanalytik) von polaren sauren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten sind in Tabelle 2.6 aufgelistet

Tabelle 2.6: Ausgewählte quantitative analytische Messmethoden zur Analytik von polaren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten in Feldproben (kontaminiertes Grundwasser).

	Metaboliten von	Anreicherung	Derivatisierung	Literatur
GC-MS	BTEX	Flüssig-Flüssig mit Diethylether	Methylierung	z.B. Beller et al. 1995
	BTEX, Naphthalin, Methylnaphthalin	Flüssig-Flüssig mit Ethylacetat	Sylilierung	z.B. Gieg et al. 1999, Elshahed et al. 2001, Gieg und Suflita 2002
	BTEX und höher methylierte Benzole	Flüssig-Flüssig mit Diethylether	Sylilierung	z.B. Martus und Püttmann 2003
	BTEX	Festphasenextraktion	Methylierung	z.B. Reusser und Field 2002, Ledin et al. 2005
	BTEX, PAK, Heterozyklen	Flüssig-Flüssig mit Dichlormethan	Methylierung	z.B. Morasch et al. 2011
	PAK, Heterozyklen	Flüssig-Flüssig mit Diethylether	Methylierung	z.B. Safinowski et al. 2006
	Naphthalin, Methylnaphthalin	Flüssig-Flüssig mit Dichlormethan	Sylilierung	z.B. Phelps et al. 2002, Oka et al. 2011
	Metaboliten von	Anreicherung	Eluent (organisch)	Literatur
LC-MS/MS^x	BTEX	Keine	Methanol + 10 mM Ameisensäure	z.B. Beller 2002
	Naphthalin, Methylnaphthalin	Keine	Acetonitril + 0.1% Essigsäure	z.B. Ohlenbusch et al. 2002, Kleemann und Meckenstock 2011
	BTEX	SPE	Methanol + 1mM Ammoniumacetat	z.B. Alumbaugh et al. 2004
	Chinolin	SPE	Acetonitril + 2 mM Ammoniumacetat	z.B. Reineke et al. 2007

^xBei allen LC-MS/MS-Methoden wurde die ESI als Ionisierungsmethode verwendet

2.4.4 Screening und Identifizierung

Neben der Einzelstoffanalytik für bestimmte bekannte Metabolite spielen analytische Screening- und Identifizierungs-Methoden sowohl zur simultanen Detektion von einer Vielzahl von bekannten Metaboliten als auch zur Ermittlung von unbekanntem Metaboliten eine entscheidende Rolle.

Screening-Methoden nach organischen Schadstoffen (z.B. Pestiziden, Arzneimittelrückständen) sowie deren Metaboliten in wässrigen Matrices sind weit verbreitet (z.B. Ibanez et al. 2008, Kosjek und Heath 2008, Hogenboom et al. 2009, Krauss et al. 2010, Richardson 2010, Richardson und Ternes 2011, Aguera et al. 2013). Spezifische Screening-Methoden für saure aromatische und heterozyklische Metabolite hingegen sind jedoch nach bestem Wissen nicht bekannt.

Allgemein werden zum Screenen nach Schadstoffen und Metaboliten LC-MS Techniken verwendet. Fast ausschließlich werden dabei hochauflösende Massenspektrometer für das Screening (z.B. LC-(Q)TOF-MS) genutzt. Anschließend werden häufig Fragmentspektren zur Ermittlung der entsprechenden Strukturformeln mit LC-QTOF-MS oder LC-MS/MS erzeugt (Garcia-Reyes et al. 2007, Pico und Barcelo 2008, Kern et al. 2009, Gomez et al. 2010, Krauss et al. 2010). Dabei haben die Fragmentspektren die mit hochauflösenden

Massenspektrometern wie LC-QTOF-MS erzeugt wurden den großen Vorteil, dass nicht nur die nominellen Massen (wie bei LC-MS/MS) sondern die akkuraten Massen der Fragmente zur Verfügung stehen.

Die entsprechenden hochauflösenden Massenspektrometer, die heutzutage im Einsatz sind, haben folgende gute Voraussetzungen, um ein erfolgreiches Screening zu gewährleisten (Krauss et al. 2010, Kind und Fiehn 2010, Zedda und Zwiener 2012):

1. Eine gute Massenauflösung um Analyte mit ähnlichem m/z vernünftig voneinander trennen zu können. Eine Massenauflösung von $R = 20000$ bis 60000 ist notwendig für die meisten polaren Schad- bzw. Spurenstoffe wobei bei kleineren Molekülen (< 300 Da) etwas niedrigere Massenauflösungen ausreichen würden (Kind und Fiehn 2007, Krauss et al. 2010).
2. Eine gute Massengenauigkeit von < 1 ppm sowie eine entsprechend hohe Genauigkeit bei der Messung der Isotopenverhältnisse (3-20%).
3. Eine hohe Empfindlichkeit um auch Spurenstoffe messen zu können, die im sehr niedrigen Konzentrationsbereich (picomolar bis femtomolar) vorkommen

Die Screening-Methoden werden häufig in *Non-Target-Screening* und *Suspect-Screening* unterschieden. Beim *Suspect-Screening* stehen Informationen zur Verfügung, die die Zusammenstellung einer Liste von potentiell in einer Probe vorkommenden Stoffen ("Suspects") möglich macht. Diese Informationen können z.B. auf Literatur-Ergebnissen, Erfahrungen oder bereits gefundenen Substanzen in vergleichbaren Proben basieren. Für diese "Suspects" lassen sich Substanz-spezifische Informationen wie z.B. die Summen- und Strukturformeln ermitteln, die zum Screening und zur Identifizierung genutzt werden können (Krauss et al. 2010). Beim *Non-Target-Screening* hingegen stehen überhaupt keine Informationen über die in einer Probe vorkommenden Stoffe zur Verfügung. In der Praxis ist jedoch eine strikte Trennung der beiden Screening-Ansätze kaum möglich, da z.B. fast für jede Probe gewisse Informationen zur Verfügung stehen oder in Proben sowohl nach *Suspects* gesucht als auch unbekannte Stoffe ermittelt werden sollen.

Die in der Literatur typischen Schritte vom Screening bis zur Identifizierung von Substanzen werden im Folgenden diskutiert und sind in Abbildung 2.12 zusammengefasst (Garcia-Reyes et al. 2007, Ibanez et al. 2008, Kern et al. 2009, Hogenboom et al. 2009, Krauss et al. 2010, Kind und Fiehn 2010, Zedda und Zwiener 2012, Aguera et al. 2013).

Das Screening beginnt mit der Messung von Proben und Blindproben mit Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit hochauflösender Massenspektrometrie (z.B. LC-(Q)TOF-MS). Aus den Messungen werden *Full-Scan* Daten erhalten. Um möglichst Rausch- und Hintergrund-freie Massenspektren der Proben zu bekommen werden die Spektren z.B. durch Elimination des Rauschens und/oder durch den Abzug von gemessenen Blindproben bearbeitet. In den *Full-Scan* Daten der Proben werden anschließend die relevanten (intensiven) Peaks durch automatische Massenfilterung (*Non-Target-Screening*) oder über eine vorher zusammengestellte Liste potentiell vorkommender Stoffe (*Suspect-Screening*) gesucht und deren gemessene akkurate Massen ermittelt. Anschließend werden auf Grundlage der akkuraten Massen der Elemente und deren Isotopenverhältnisse (Loss 2003) automatisch

Summenformeln für diese Peaks berechnet. Zur Abschätzung der Güte der ermittelten Summenformeln und zur Auswahl der wahrscheinlichsten Summenformeln sollten folgende Aspekte beachtet werden:

- Vergleich der tatsächlich gemessenen akkuraten Masse mit der theoretischen (berechneten) akkuraten Masse der entsprechenden Summenformel. Bei zu großen Abweichungen sind die generierten Summenformeln zu unsicher. Generell werden in der Literatur Massenabweichungen von < 5 ppm als ausreichend akzeptiert (Ibanez et al. 2008, Kern et al. 2009, Martinez Bueno et al. 2012).
- Prüfung ob die gemessenen Isotopenmuster (z.B. Verteilung der Kohlenstoffisotope ^{13}C und ^{14}C) im Massenspektrum im richtigen Verhältnis vorhanden sind.
- Prüfkriterien der Plausibilität der Summenformeln wie z.B. die "*Seven Golden Rules*" von Kind und Fiehn (2007). Dabei werden u.a. die maximal sinnvollen Verhältnisse von Kohlenstoff zu Wasserstoff miteinbezogen.

Die Abweichung der gemessenen zur theoretischen Masse und die Qualität der Isotopenmuster werden häufig zusammengefasst (in unterschiedlicher Gewichtung) in einem Wert (z.B. Score) angegeben, der die Güte der ermittelten Summenformel beschreibt (siehe z.B. Müller et al. 2010).

Die Summenformeln reichen aber nie aus, um die Substanzen identifizieren zu können, da es eine Vielzahl von Strukturformeln gibt, die zu bestimmten Summenformeln passen. Dies wird deutlich wenn die Summenformeln in chemische Datenbanken wie z.B. PubChem (Bolton et al. 2008) oder ChemSpider (Williams 2008, Pence und Williams 2010) eingegeben werden. Zum Beispiel führt die Eingabe der Summenformel des Metaboliten BBS ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$) zu 2047 (PubChem) und 1155 (ChemSpider) Strukturvorschlägen. Ein zusätzliches Problem besteht darin, dass die richtige Strukturformel trotz der Vielzahl an Strukturvorschlägen teilweise gar nicht gefunden werden kann, da sie nicht in der Datenbank vorhanden ist. Dies ist insbesondere auch bei aromatischen und heterozyklischen Metaboliten der Fall (Zedda und Zwiener 2012). Zusätzliche Informationen über die Strukturen (z.B. über funktionelle Gruppen) der Substanzen sind also notwendig und lassen sich z.B. über Fragmentspektren aus LC-QTOF-MS oder LC-MS/MS-Messungen ermitteln.

Von den Substanzen mit den wahrscheinlichsten Summenformeln werden Fragmentspektren erzeugt, die zur weiteren Identifizierung der Substanzen verwendet werden. Optimal sind verschiedene Fragmentspektren bei unterschiedlichen Kollisionsenergien, da sie häufig mehr Informationen über die Struktureinheiten der Moleküle liefern. Mit den ermittelten Fragmentspektren lassen sich dann verschiedene Suchvorgänge und Abgleiche durchführen. Zunächst kann eine Suche mit den gemessenen Fragmentspektren nach Substanzen mit entsprechenden Spektren in MS/MS-Datenbanken oder Bibliotheken ausgeführt werden.

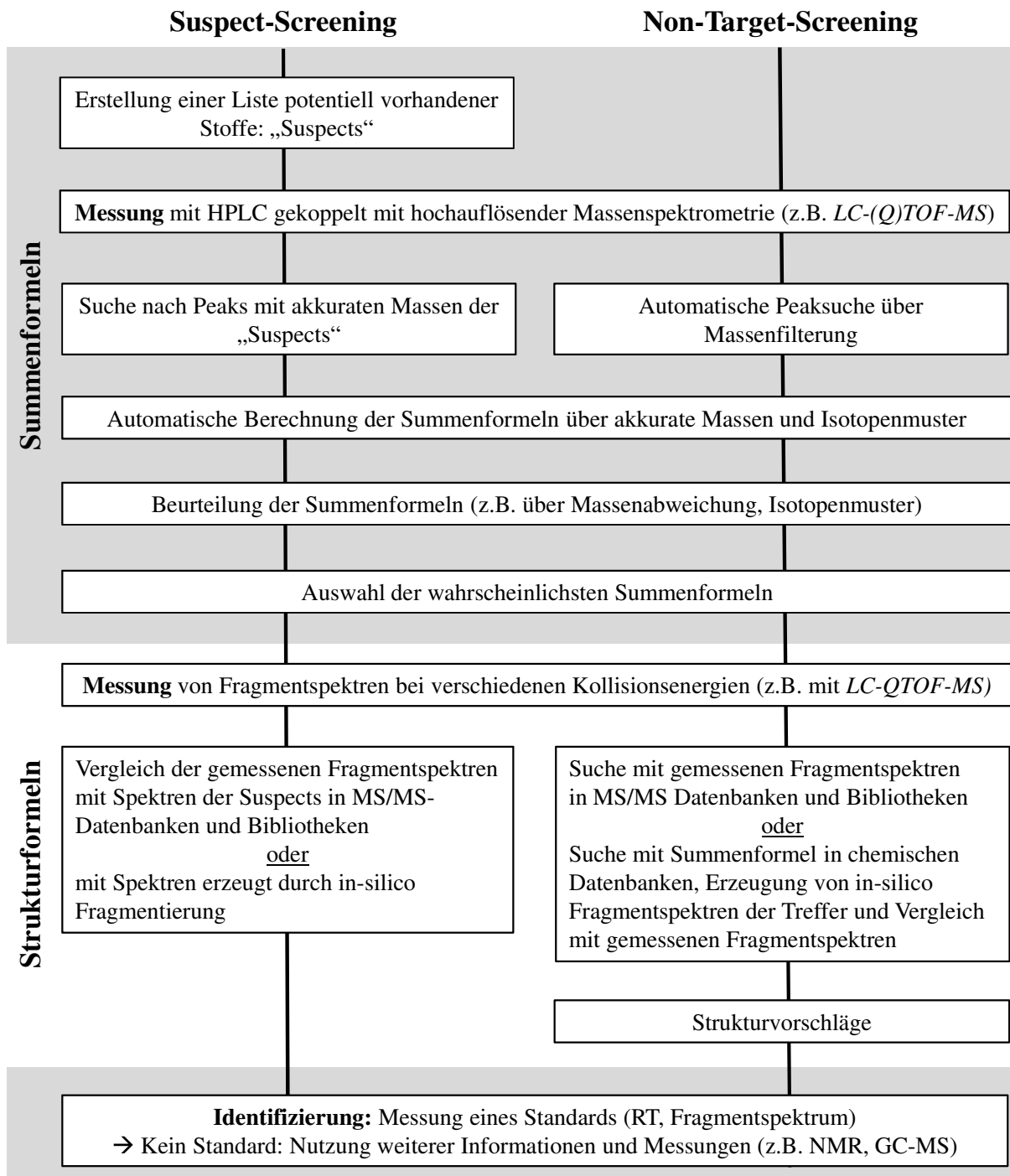


Abbildung 2.12: Typische Schritte vom Screening (Suspect-Screening und Non-Target-Screening) bis zur Identifizierung von Substanzen (nach Krauss et al. 2010, Martinez Bueno et al. 2012, Zedda und Zwiener 2012).

Dabei kann es sich um externe Datenbanken und Bibliotheken handeln, oder um selbst angelegte, die im Laufe der Zeit mit den Informationen und Fragmentspektren relevanter Stoffe erstellt wurden. Unter den externen sind z.B. METLIN, MassBank oder DAIOS zu nennen (Kind und Fiehn 2010, Neumann und Böcker 2010, Zedda und Zwiener 2012). Insbesondere DAIOS ist eine spezielle Datenbank für Schadstoffe im Wasser, die zwar noch relativ wenig Einträge besitzt, aber von jedem registrierten User erweitert werden kann (Müller et al. 2011). Die Retentionszeit kann in die Suche miteinbezogen werden und erhöht

die Selektivität der Suche deutlich. Entscheidend ist dabei, dass immer unter den gleichen chromatographischen Bedingungen (z.B. HPLC-Säule, Eluent, Gradient) gemessen wird. Dies ist bei externen Datenbanken kaum möglich, jedoch aber bei selbst angelegten.

Wenn die Suche mit Fragmentspektren in MS/MS-Datenbanken und Bibliotheken keinen Erfolg bringt, kann die Suche nach möglichen Strukturformeln in chemischen Datenbanken wie z.B. PubChem oder ChemSpider erfolgen. Da die Suche in diesen Datenbanken nur auf der Summenformel basiert, bringt sie, wie bereits diskutiert, meistens zu viele Strukturvorschläge. Eine zusätzliche Möglichkeit ist dann die Nutzung von Programmen, die die Fragmentierung von Stoffen "in-silico" (im Computer, ohne Messung) berechnen können (Kind und Fiehn 2010, Zedda und Zwiener 2012). Ein Beispiel dafür ist das Programm MetFrag (Wolf et al. 2010, Neumann und Böcker 2010). Es berechnet die möglichen Fragmente von Strukturvorschlägen aus chemischen Datenbanken auf Basis verschiedener Fragmentierungsregeln und vergleicht diese mit dem gemessenen Fragmentspektrum. Daraus wird eine Liste der wahrscheinlichsten Strukturen ermittelt. Die Funktionsweise ist detailliert in Wolf et al. 2010) beschrieben. Ein Problem dieser Programme ist häufig aber die Berechnung der Intensitäten der Fragmente.

Die vorher beschriebenen Möglichkeiten führen zu Vorschlägen von Strukturformeln, die einer Absicherung bedürfen. Eine eindeutige Identifizierung ist dabei nur über die Messung eines Standards (über RT und Fragmentspektrum) möglich. Wenn keine Standards zur Verfügung stehen, was bei Metaboliten häufig der Fall ist, bedarf es weiterer Maßnahmen zur Plausibilitätsprüfung, Auswahl und Absicherung der Strukturformeln. Dabei gibt es folgende Ansätze (Kind und Fiehn 2007, Kern et al. 2009, Hogenboom et al. 2009, Krauss et al. 2010, Zedda und Zwiener 2012):

- Vergleich der gemessenen Retentionszeit mit einer über die Strukturformel, z.B. über den Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizient (K_{OW}), berechneten Retentionszeit.
- Plausibilitätsprüfung der Ionisierung: Kann die ermittelte Substanz mit dieser Strukturformel überhaupt positiv oder negativ mit ESI ionisiert werden.
- Messung mit weiteren strukturaufklärenden analytischen Techniken wie z.B. mit *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* (NMR).
- Einbeziehung von Hintergrundinformationen (wenn verfügbar) über die gemessene Probe. Bei Metaboliten z.B. kann die Prüfung der Anwesenheit möglicher Ausgangsstoffe hilfreich sein.

Eine Grundfrage bei der Identifizierung von Substanzen ist, ab wann von einer gesicherten Identifizierung einer Substanz ausgegangen werden kann. In der Lebensmittelanalytik wurden gesetzliche Kriterien zur Identifizierung und Quantifizierung von organischen Rückständen aufgestellt (EU 2002). Für die Identifizierung von Substanzen werden dort Identifizierungspunkte festgelegt, die durch unterschiedliche Messmethoden (z.B. GC-MS, LC-MS, LC-MS/MS, LC-QTOF-MS, NMR) in verschiedener Anzahl (je nach Qualität der Messmethode) gewonnen werden können. Für eine Identifizierung von unbekanntem Substanzen werden 4 Identifizierungspunkte benötigt. Zum Beispiel würde die Bestimmung des Vorläufer-Ions und eines Produkt-Ions mit der hochauflösenden Massenspektrometrie

($R > 20000$) die nötigen 4 Punkte erzeugen wo hingegen die niedrig auflösenden Tandem-Massenspektrometrie nur 2,5 Punkte liefern würde. Die fehlenden 1,5 Punkte könnten darüber hinaus mit der Messung eines weiteren Produkt-Ions erreicht werden. Dieses Punktesystem wird teilweise für die Umweltanalytik übernommen, ist aber in diesem Bereich nicht gesetzlich verankert.

Die Nutzung der LC-QTOF-MS zum Screenen nach Metaboliten ist ein viel versprechender und häufig genutzter Ansatz. Ein gruppenspezifisches Screening jedoch, insbesondere nach bestimmten Metaboliten-Familien mit gleichen funktionellen Gruppen (z.B. saure Metabolite von Aromaten und Heterozyklen), ist mit der LC-QTOF-MS nicht möglich, da immer *Full-Scan* Daten generiert werden. Die entsprechenden Metaboliten müssen nachträglich aus sehr großen Datenmengen herausgefiltert werden. Ein anderer, bisher seltener genutzter Ansatz ist ein gruppenspezifisches Screening durch NLS (Abbildung 2.10 in Kapitel 2.4.2.1) mit LC-MS/MS (Zwiener und Frimmel 2004a, Gentili et al. 2008). Mit NLS lassen sich gemeinsame Stoffgruppen mit bestimmten funktionellen Gruppen detektieren, die einen bestimmten Neutralverlust durchmachen. Die NLS wurden in der Literatur z.B. zum Screenen nach Triazin-Herbiziden mit einem Neutralverlust von $\Delta m/z = 42$ (Propylen Gruppe) angewendet (Steen et al. 2001). In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal NLS zum gruppenspezifischen Screening nach sauren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten eingesetzt.

Neben LC-MS Techniken wird die GC-MS zum Screenen nach polaren Metaboliten relativ selten eingesetzt. Gelegentlich wird sie aber als Werkzeug zur Absicherung von mit LC-QTOF-MS identifizierten Signalen verwendet, da die Fragmentspektren bei der GC-MS teilweise aussagekräftiger sind als bei der LC-MS/MS (Kind und Fiehn 2007). Außerdem stehen speziell für viele identifizierte aromatische und heterozyklische Metaboliten in der Literatur teilweise ausschließlich GC-MS-Fragmentspektren (nach Derivatisierung) zum Vergleich zur Verfügung (siehe z.B. Beller et al. 1992, Beller et al. 1995, Elshahed et al. 2001, Safinowski et al. 2006, Morasch et al. 2011).

2.5 Anthropogener Anteil am gelösten organischen Kohlenstoff (DOC)

DOC ist eine komplexe Mischung aus Biopolymeren und deren Abbauprodukten und kommt in allen aquatischen Systemen (z.B. Seen, Flüssen, Grundwässer) vor. Es sind Mischungen von verschiedenen organischen Materialien sowie Molekülgrößen und sie können sowohl natürliche als auch anthropogene Stoffe enthalten. Der größte Anteil des DOC in aquatischen Systemen ist natürlichen Ursprungs und wird durch Huminstoffe geprägt (Frimmel 2001).

Die Konzentration sowie die Zusammensetzung des DOC variiert zwischen den aquatischen Systemen sehr stark (Leenheer und Croué 2003). Die Konzentration an DOC in natürlichen Systemen ist typischerweise im Bereich von $\rho(\text{DOC}) = 0,1 \text{ mg/L}$ bis 2 mg/L für Grund- und Meerwässer, $\rho(\text{DOC}) = 1 \text{ mg/L}$ bis 10 mg/L für Fließgewässer und kann maximale Gehalte von bis zu $\rho(\text{DOC}) = 50 \text{ mg/L}$ für stehende Gewässer entwickeln (Thurman 1985). Kunkel et al. (2004) weisen darauf hin, dass die DOC-Gehalte in aeroben anthropogen unbelasteten Aquiferen in Deutschland selten über $\rho(\text{DOC}) = 2,5 \text{ mg/L}$ liegen, wo hingegen in reduzierten Grundwässern die DOC-Konzentrationen bei $\rho(\text{DOC}) = 5 \text{ mg/L}$ und höher liegen können.

Zum Verständnis des Einflusses und der Rolle von DOC in aquatischen Systemen ist es entscheidend, dessen Zusammensetzung (chemische Strukturen, funktionellen Gruppen) und Molekülgrößenverteilung zu untersuchen. Insbesondere in kontaminierten aquatischen Systemen (z.B. Grundwässern) kann die Zusammensetzung und Molekülgrößenverteilung der Huminstoffe eine entscheidende Rolle beim Abbau, der Bioverfügbarkeit und dem Transport von Schadstoffen spielen.

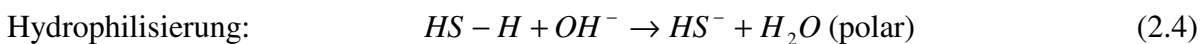
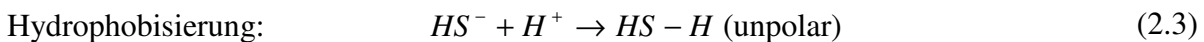
Huminstoffe machen den größten Anteil am DOC in natürlichen Gewässern aus und werden als ein komplexes Gemisch aus unterschiedlichen natürlichen organischen Substanzen biogenen Ursprungs bezeichnet (Swift und Posner 1999, Frimmel 2001). Die wichtigsten natürlichen Strukturelemente sind Polysaccharide (z.B. Chitin oder Zellulose), Lignine, Tannine und Isoprenoide (Lankes 2001, Leenheer und Croué 2003, Frimmel et al. 2005, Lankes et al. 2008). Die Mineralisation und der Abbau von organischer Substanz vollzieht sich selten komplett, so dass organisches Material in Form von Huminstoffen akkumuliert. Das Ausmaß der Akkumulation hängt von vielen Faktoren wie z.B. Zeit, Klima, Vegetation, mineralischem Material oder Topographie (Tipping 2002). Die Entstehung von Huminstoffen beruht nicht auf kontrollierten Reaktionen, sondern verschiedenste Reaktionen ergeben Gemische aus den unterschiedlichsten komplexen organischen Komponenten. Diese Reaktionen können chemisch oder aber auch mikrobiologisch sein. Während der Genese der Huminstoffe reichern sich schwer abbaubare Stoffe an, was den refraktären Charakter der Huminstoffe erklärt. Die Bezeichnung Huminstoffe ist operationell definiert und begründet sich auf dem Isolierungsprozess (siehe Kapitel 2.5.1). Die genaue Struktur ist aufgrund der Komplexität unbekannt. Die Größe und Konformation der Huminstoffe hängt von der Struktur der Moleküle sowie von anderen Faktoren wie pH-Wert und Ionenstärke der wässrigen Lösung ab. Man geht allgemein von einer Größe von 1 nm bis 2 nm der Huminstoffmoleküle aus (Avena und Wilkinson 2002), aber durch Aggregation kann sich die Ausdehnung deutlich vergrößern. Huminstoffe besitzen zahlreiche funktionelle Gruppen und sind nicht inert (insbesondere deren Chinone) sondern können z.B. als terminale Elektronenakzeptoren für die anaerobe Mineralisation von aromatischen Schadstoffen dienen (Cervantes et al. 2001, Field 2002).

Huminstoffe spielen eine wichtige Rolle in aquatischen Systemen, da sie Wechselwirkungen mit anderen Stoffen wie z.B. organischen Schadstoffen, Metallen, Kolloiden oder Nanopartikeln eingehen (Hassett und Anderson 1979, Specht 2002, Schmitt 2002, Delay und Frimmel 2012). Die starke Sorption von hydrophoben organischen Schadstoffen an Huminstoffen z.B. wurde in verschiedenen Studien eindrücklich dargestellt (Karickhoff et al. 1979, Kleineidam et al. 1999). Die Sorption kann die Bioverfügbarkeit der Schadstoffe verringern, da an Huminstoffe adsorbierte Schadstoffe aufgrund der Größe des Komplexes nicht mehr die Membranen von Mikroorganismen passieren können. Es erhöht aber auch deren Mobilität in aquatischen Systemen, da sie mit den Huminstoffen transportiert werden (Hassett und Anderson 1979, Enfield et al. 1989). In besonderer Weise hat auch die Größe und chemische Zusammensetzung der Huminstoffe beim Bioabbau und Transport von Schadstoffen und bei der Aufbereitung von Wässern Bedeutung (Chin et al. 1997, Frimmel 2001, Schmitt 2002).

2.5.1 Isolierung von Huminstoffen

Huminstoffe werden aufgrund ihrer großen strukturellen Variabilität nicht nach ihrer molekularen Struktur sondern nach ihrem Löslichkeitsverhalten bei verschiedenen pH-Werten eingeteilt. Dabei sind Humine generell nicht löslich, Huminsäuren (HS) oberhalb eines pH-Wertes von 2 bis 3 und Fulvinsäuren (FS) bei jedem pH-Wert. Neben der Wasserlöslichkeit verändert sich z.B. auch das Molekulargewicht oder die molekulare Zusammensetzung zwischen den Fraktionen.

Die am häufigsten genutzte Technik zur Isolierung von Huminstoffen ist die Anreicherung mittels XAD-Harzen bei denen es sich um hydrophobe aromatische Methylmethacrylat-Copolymere handelt. Die Isolierung beruht dabei auf den unterschiedlichen Adsorptions- und Desorptionstendenzen der Huminstoff-Fraktionen am XAD-Harz bei verschiedenen pH-Werten (Mantoura und Riley 1975). Die Adsorption erfolgt bei niedrigen pH-Werten ($\text{pH} \leq 2$) und die Desorption bei hohen die relativ polar sind. Die Veränderung des pH-Wertes kann diese Polarität beeinflussen. Bei pH-Werten ($\text{pH} \geq 12$). Das beruht darauf, dass Huminstoffe viele funktionelle Gruppen besitzen, Absenkung in den sauren Bereich werden die funktionellen Gruppen (meist Hydroxyl- und Carboxylgruppen) von der anionischen in die saure Form gebracht was zu einer Hydrophobisierung führt (Formel (2.3)). Wird der pH-Wert wieder angehoben, so geben die Carboxylgruppen die Protonen ab und die Huminstoffe werden wieder hydrophiler (Formel (2.4)).



Bei der Isolierung mit XAD-Harzen werden also drei Fraktionen erhalten, die operationell definiert sind und auf deren hydrophilem und hydrophobem Charakter basieren:

Fulvinsäuren (FS), Huminsäuren (HS) und Nicht-Huminstoffe (NHS).

Die unlöslichen Humine werden bei dieser Anreicherungstechnik nicht berücksichtigt, da der Anreicherung ein Filtration ($0,45 \mu\text{m}$) vorgeschaltet ist. Bei anthropogen weitgehend unbelasteten Wässern wird angenommen, dass die bei der XAD-Anreicherung gewonnenen Fraktionen FS und HS die hydrophobe Fraktion und die NHS die hydrophile Fraktion der Originalprobe ausmachen. Die XAD-Anreicherung ist besonders gut geeignet für die Isolierung von Huminstoffen in wässrigen Proben, die einem relativ hohen Gehalt an Substanzen mit Doppelbindungen beinhalten (Frimmel et al. 2002). In natürlichen Wässern resultiert die Isolierung häufig in Wiederfindungsraten des DOC von 60%, wo hingegen anthropogen stark beeinflusste Wässer wie z.B. Abwässer Wiederfindungsraten von nur 20% zeigen (Frimmel et al. 1998). Als Gründe werden der geringe Humifizierungsgrad und eine geringere Hydrophobizität der organischen Substanzen in Abwasser angeführt. Die Wiederfindungsraten des DOC bei der Isolierung von Huminstoffen aus einem mit Teeröl kontaminierten Grundwasser waren mit 16% für den kontaminierten Bereich und 51% für den Abstrombereich besonders für den kontaminierten Bereich sehr niedrig (Zwiener et al.

1999). Dies wurde mit dem hohen Gehalt an apolaren organischen Schadstoffen aus der Teerölphase sowie deren Metaboliten begründet, die irreversibel am XAD-Harz adsorbierten und mit NaOH nicht wieder eluiert werden konnten. Grundsätzliche Probleme, die neben geringen Wiederfindungsraten bei dieser Art der Anreicherung von Huminstoffen auftreten können, sind z.B. irreversible Veränderungen der Huminstoffe durch Wechsel der pH-Werte (z.B. Oxidation) oder die Veränderung der Metallgehalte im Vergleich zur Originalprobe (Abbt-Braun 1987, Abbt-Braun et al. 2004).

2.5.2 Charakterisierung mit Größenausschlusschromatographie (LC-UV/DOC)

Zur Ermittlung des gesamten gelösten organischen Kohlenstoffs in wässrigen Proben wird der Summenparameter DOC bestimmt. Dieser Parameter liefert jedoch keine Informationen über chemischen Strukturen sowie die Molekülgrößenverteilung der organischen Materie.

Für die weitere Charakterisierung von DOC in wässrigen Proben oder Isolaten (FS, HS, NHS) werden neben der Elementaranalyse, spektroskopischen Methoden (UV, NMR, MS, Fluoreszenz) zur Strukturaufklärung sowie chromatographische Methoden (z.B. LC) zur Bestimmung der Größenverteilung eingesetzt (Baldock et al. 1992, Leenheer und Croué 2003, Lankes et al. 2008).

Da DOC sich aus einer komplexen Mischung verschiedener Einzelsubstanzen unterschiedlichster Molekülgrößen zusammensetzt, wird zur Aufklärung der Struktur häufig eine Fraktionierungsmethode mit einer analytischen Technik gekoppelt. Beispiele dafür sind die Kopplung der Flüssigkeitschromatographie mit UV- und DOC-Detektoren (LC-UV/DOC) (Huber und Frimmel 1991, Specht 2002) sowie mit der Massenspektrometrie (Reemtsma und These 2003). Der Vorteil der Kopplung ist, dass neben der Fraktionierung an sich auch DOC-Gehalte und strukturelle Informationen über die einzelnen Fraktionen gesammelt werden können. Die Charakterisierung des natürlichen DOC (z.B. Huminstoffen) in aquatischen Systemen mittels LC-UV/DOC ist ein leistungsfähiges Verfahren. (Huber und Frimmel 1994, Frimmel et al. 2002, Müller 2004). Hierfür wird ein spezielles Verfahren der Flüssigkeitschromatographie, die Größenausschlusschromatographie (*Size Exclusion Chromatography*, SEC) verwendet. SEC ist die allgemeine Bezeichnung für chromatographische Methoden, die verschiedene Komponenten beim Durchströmen einer porösen gelartigen Säulenpackung aufgrund ihres hydrodynamischen Volumens auftrennen. Dabei dringen die Moleküle je nach Größe unterschiedlich tief in die Poren ein. Moleküle die den Porenraum aufgrund ihrer Größe nicht nutzen können, werden ausgeschlossen und eluieren deshalb am Ausschlussvolumen (V_0). Kleine Moleküle hingegen können in die Poren eindringen und legen dadurch einen längeren Weg zurück. Sie eluieren zwischen Ausschluss- und Permeationsvolumen (V_p) (siehe auch Kapitel 3.3.5).

Das Prinzip der SEC beruht darauf, dass organische Moleküle aufgrund ihres hydrodynamischen Radius getrennt werden und größere Moleküle früher eluieren als kleinere. Neben der reinen Größentrennung spielen jedoch noch eine ganze Reihe weiterer wie z.B. hydrophober oder elektrostatischer (ionische) Wechselwirkungen eine wichtige Rolle und müssen beachtet werden (Perminova et al. 1998, Specht und Frimmel 2000, Müller et al. 2000). Diese Wechselwirkungen können die reine Größentrennung stark beeinflussen. Die

Untersuchung von Modellstoffen mit LC-UV/DOC zeigten, dass für Alkohole und Monocarbonsäuren das Elutionsvolumen mit zunehmendem Kohlenstoffgehalt stark anstieg und dass aromatische Komponenten stark mit der Säule in Wechselwirkung traten (Specht und Frimmel 2000). Das Ausmaß der Wechselwirkungen war abhängig von Art und Anzahl der funktionellen Gruppen (Carboxyl- und Hydroxylgruppen), was insbesondere bei Aromaten eine große Rolle spielte. Bei Huminstoff-Fractionen zeigen nur geringe Anteile so starke (irreversible) Wechselwirkungen mit der Trennsäule, dass sie nicht wieder eluiert und damit nicht näher charakterisiert werden konnten (Müller et al. 2000).

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der SEC ist das Elutionsverhalten von Stoffen, die durch Ionenstärkedifferenzen zwischen Probe und Eluenten beeinflusst werden. Sie werden als „Aussalzeffekte“ bezeichnet und stellen methodische Artefakte dar (Mori und Barth 1999, Müller 2004). Dabei werden organische Substanzen zu einem scharfen Peak im Bereich des Permeationsvolumens zusammengeschoben, obgleich sie eigentlich über einen wesentlich größeren Retentionsbereich verteilt eluieren müssten. Diese Aussalzeffekte sind bei der Analytik von Huminstoffen von großer Bedeutung, da Huminstoffe aus einem breiten Größenspektrum bestehen, welches durch diese Effekte nicht im SEC-Chromatogramm adäquat dargestellt wird (Artefakt).

Bei der DOC-Messung und Bilanzierung müssen weitere Aspekte und Probleme beachtet werden. Aiken et al. (2002) untersuchte die Oxidierbarkeit von organischen Modellsubstanzen und Huminstoffen mit den gängigen Oxidationsmethoden, die für die DOC Quantifizierung Verwendung finden (z.B. nasschemischen Oxidation, thermische Oxidation). Dabei wurden große Unterschiede in der Oxidierbarkeit der verschiedenen Substanzen mit den unterschiedlichen Methoden festgestellt. Der leicht zu oxidierende Stoff Kaliumhydrogenphthalat, der zur Kalibrierung der Systeme eingesetzt wird, ist für Moleküle, die schwerer oxidierbar sind, nur bedingt als Standard geeignet. Bei der großen Variabilität an Substanzen die in natürlichem DOC vorkommen, fällt die Wahl eines geeigneten Standards schwer. Lankes et al. (2009) untersuchten inwieweit der bei LC-UV/DOC Messungen ermittelte Kohlenstoffgehalt den tatsächlichen Kohlenstoffgehalt der Originalprobe widerspiegelt. Sie konnten zeigen, dass bis zu 70% des Kohlenstoffgehalts bei manchen Fraktionen nicht detektierbar waren.

Typische LC-UV/DOC-Chromatogramme von DOC aus anthropogen unbelasteten aquatischen Systemen (z.B. dem Braunwassersee Hohlohsee) weisen oftmals zwei voneinander unterscheidbare Fraktionen auf (Frimmel et al. 2002, Abbildung 2.13).

Während HS und FS in einem breiten Hauptpeak, der ca. 70 bis 85% des gesamten DOC repräsentiert, eluieren, werden niedermolekulare organische Säuren und amphiphile Substanzen oftmals als separate Fraktion detektiert, welche auch als „Salzpeak“ bezeichnet wird (siehe oben). Die UV- und DOC-Spur zeigt einen ähnlichen Verlauf. Bei Huminstoff-Fractionen von anthropogen unbelasteten aquatischen Systemen eluiert der komplette DOC zwischen V_0 und V_p . Die Fraktionierung in diesem Trennbereich sollte überwiegend auf molekularen Größenunterschieden und nicht auf anderen Trennmechanismen wie z.B. hydrophoben Wechselwirkungen beruhen (Posner 1963).

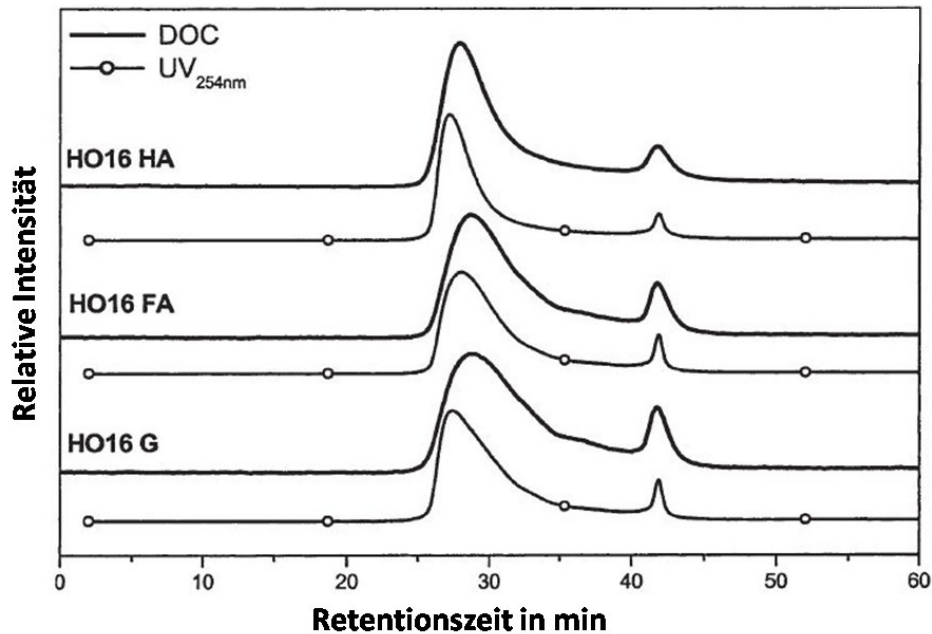


Abbildung 2.13: LC-UV/DOC-Chromatogramme der unterschiedlichen Huminstoff-Fractionen aus dem Hohlohsee (HO16 HA: Huminsäuren, HO16 FA: Fulvinsäuren) sowie des Seewassers (HO16 G) der Probenahme HO16. (Frimmel et al. 2002).

Die LC-UV/DOC wurde zur Charakterisierung von Huminstoff-Fractionen aus stark kontaminierten Grundwässern bisher kaum angewendet. Lediglich Zwiener et al. (1999) untersuchten die Huminstoff-Fractionen in dem mit Teeröl kontaminierten Grundwasser in Stuttgart (siehe Kapitel 3.1.2). Dabei traten in der FS-Fraktion aus dem kontaminierten Bereich mehrere Peaks nach dem Permeationsvolumen auf, die deutliche UV-Signale zeigten. Nachdem die Probe mit Hexan ausgeschüttelt, und die wässrige Phase erneut mit LC-UV/DOC charakterisiert wurde, waren Peaks nach dem Permeationsvolumen nicht mehr detektierbar. Die späte Elution und die Entfernung mit Hexan deuten auf apolare organische Schadstoffe und Metabolite hin die starke hydrophobe Wechselwirkungen mit der SEC Säule zeigen.

2.5.3 Charakterisierung mit massenspektrometrischen Methoden

Mit der LC-UV/DOC können keine einzelnen Moleküle in Huminstoffen erfasst werden, sondern nur Eigenschaften des kompletten Huminstoffgemisches oder einzelner Fraktionen. Eine gute Methode zur Charakterisierung von unbekanntem Molekülgruppen in FS-Gemischen ist die (ultra)hochauflösende Massenspektrometrie mit ESI als Ionisierungsmethode (Stenson et al. 2003, Kim et al. 2003, Reemtsma et al. 2006, Hertkorn et al. 2008). Oft wird die ultrahochauflösende *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry (FTICR-MS)* zur Analytik von DOC verwendet, da sie extrem hohe Auflösungen von bis zu $R = 1000000$ (Kind und Fiehn 2010) gewährleisten kann, die zur Identifikation von Molekülen aus komplexen Gemischen wie DOC häufig benötigt werden (Stenson et al. 2003, Hertkorn et al. 2008, Reemtsma 2010). Als Ionisierungsmethode für die Analytik von FS ist die ESI gut geeignet, da sie erstens polare Stoffe wie FS sehr gut

ionisieren kann und zweitens als weiche Ionisationsmethode vorwiegend intakte FS-Moleküle erzeugt (Reemtsma 2001). Die Ionisierung von HS hingegen ist aufgrund ihres unpolaren Charakters deutlich schwieriger. Mit der FT-CIR-Massenspektrometrie konnten eine Vielzahl von Substanzen (etwa 4500) mit unterschiedlichen Summenformeln in FS-Isolaten ermittelt werden (Stenson et al. 2003, Reemtsma et al. 2006). Die Massenspektren zeigen allgemein zwei Auffälligkeiten:

- Die intensivsten Signale sind im Abstand von 2 Da zu erkennen. Dies ist damit zu erklären, dass FS überwiegend aus C, H und O bestehen und dadurch nur gerade nominelle Massen haben.
- Eine wellenartige Intensitätsverteilung mit Maxima bei jeder 14. Masse. Das deutet auf Homologe mit zusätzlichen Methylgruppen hin.

Durchgeführte MS/MS-Experimente von FS zeigten die typischen sukzessiven Wasserabspaltungen (-18 amu), Abspaltungen von CO₂ (-44 amu) und in geringerem Maße Abspaltungen von CO (-28 amu) (McIntyre et al. 1997, Plancque et al. 2001, These 2005). Aufgrund der Vielzahl an Substanzen mit unterschiedlichen Summenformeln in FS ist es wichtig, diese zu systematisieren. Eine gute graphische Möglichkeit komplexe Stoffgemische zu charakterisieren und Systematiken (z.B. homologe Reihen) herauszufinden ist die Verwendung von Van-Krevelen-Diagrammen (Van Krevelen 1950, Kim et al. 2003, Herzprung et al. 2012). Diese Diagrammart wurde ursprünglich zur Ermittlung der Herkunft von Kohle und Ölproben verwendet (z.B. Van Krevelen 1950) aber in der letzten Zeit auch erfolgreich zur Charakterisierung von natürlichen FS sowie deren Transformationsprodukten eingesetzt (z.B. Kim et al. 2003, Reemtsma et al. 2006). Grundlage für die Nutzung des Diagramms ist die Kenntnis der Summenformeln der unterschiedlichen Peaks, die mit hochauflösenden massenspektrometrischen Techniken ermittelt werden können. Die aus den Summenformeln ermittelten O/C- (x-Achse) und H/C-Verhältnisse (y-Achse) der unterschiedlichen Substanzen werden beim Van-Krevelen-Diagramm gegeneinander aufgetragen. Trends von strukturellen Ähnlichkeiten von Substanzen zeigen sich im Diagramm durch das Auftreten der Substanzen entlang von Linien. Zusätzlich kann das Diagramm zur Sortierung von Substanzen mit ähnlichen strukturellen Einheiten verwendet werden. Mit Hilfe der Van-Krevelen-Diagramme konnte unter anderem verdeutlicht werden, dass FS-Isolate hauptsächlich die folgenden drei homologen Reihen zeigen, die auf die Präsenz von Hydroxyl-, Carbonyl- und Carboxylgruppen in den Molekülen hindeuten (Kim et al. 2003, Zwiener und Frimmel 2004b, These 2005, Reemtsma et al. 2006): H₂-Homologe, Alkyl-Homologe und Oxidations-Homologe. Durch Schadstoffe und Metabolite stark anthropogen beeinflusste FS-Fractionen wurden mit der Massenspektrometrie bisher kaum charakterisiert.

3. Materialien und Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle A.1 im Anhang aufgeführt.

3.1 Feldstandorte und Probenahmen

Im Rahmen dieser Arbeit sind Proben aus verschiedenen (kontaminierten) Feldstandorten untersucht worden. Einen Überblick über die verschiedenen Standorte und die durchgeführten Messungen gibt Tabelle A.2 im Anhang.

3.1.1 Düsseldorf

Der Probenahmestandort ist ein ehemaliges Gaswerksgelände, in dem vom Ende des 19. Jahrhunderts bis 1967 Gas, Benzole, Koks und andere Teerölkomponenten hergestellt wurden. Er liegt im Rheintal im dicht bebauten Innenstadtbereich von Düsseldorf-Flingern. Der 15 bis 20 m mächtige Porengrundwasserleiter besteht weitgehend aus quaternären Sanden und Kiesen (Abbildung 3.1).

Die Fließgeschwindigkeiten des Grundwassers liegen im Bereich von 0,5 bis 2 m/Tag, und der Schwankungsbereich des Grundwasserspiegels erstreckt sich über etwa einen Meter. Durch Zerstörungen während des zweiten Weltkriegs, unsachgemäße Handhabung und durch Unfälle gelangte vor allem Teeröl in den Boden und das Grundwasser. Dies führte zu einer starken Kontamination mit BTEX (vor allem Toluol), PAK (vor allem Naphthalin) und heterozyklischen Schadstoffen. Aufgrund der jahrzehntelangen Eintragszeit und der geringen Fließgeschwindigkeit hatte die 100 m breite Schadstofffahne in den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts eine Länge von rund 600 m erreicht. Diese relativ kurze Länge wurde als ein Hinweis für natürliche Abbauprozesse im Untergrund gewertet (Wisotzky und Eckert 1997). Durch hydraulische Sanierung mit Sanierungsbrunnen Mitte der 90er Jahre des 20. Jahrhunderts konnte die Schadstofffahne im Grundwasser etwas verkürzt werden.

Auf diesem Probenahmestandort lassen sich bis zu 70 Grundwasserbrunnen beproben. Eine Besonderheit dieses Probenahmegebietes ist der installierte hochauflösende Multi-Level Brunnen (*High Resolution-Multi Level Well*, HR-MLW), der vom Institut für Grundwasserökologie (Prof. Meckenstock, Dr. Griebler) vom Helmholtz-Zentrum in München installiert und betrieben wurde. Er ermöglicht Probenahmen mit einer vertikalen Auflösung von bis zu 3 cm (Tabelle 3.1, Anneser et al. 2008a, Anneser et al. 2008b). Dieser Brunnen ist im stark kontaminierten Bereich des Aquifers installiert worden und besitzt vertikale Probenahmemöglichkeiten vom Grundwasserspiegel, durch die Schadstofffahne bis zu tieferen unkontaminierten Bereichen (Abbildung 3.1). Die vertikale Auflösung lag in besonders stark kontaminierten Bereichen bei 3 cm und in weniger kontaminierten bei 10 bis 30 cm. Diese hohe Auflösung ist in kaum einem anderen Brunnen zu finden und ermöglicht die Aufdeckung sehr kleinskaliger Konzentrationsgradienten verschiedener Parameter. Die Untersuchung dieser Gradienten ist notwendig, um kleine Zonen hoher mikrobieller Aktivität im Aquifer lokalisieren zu können (siehe Kapitel 2.2.3).

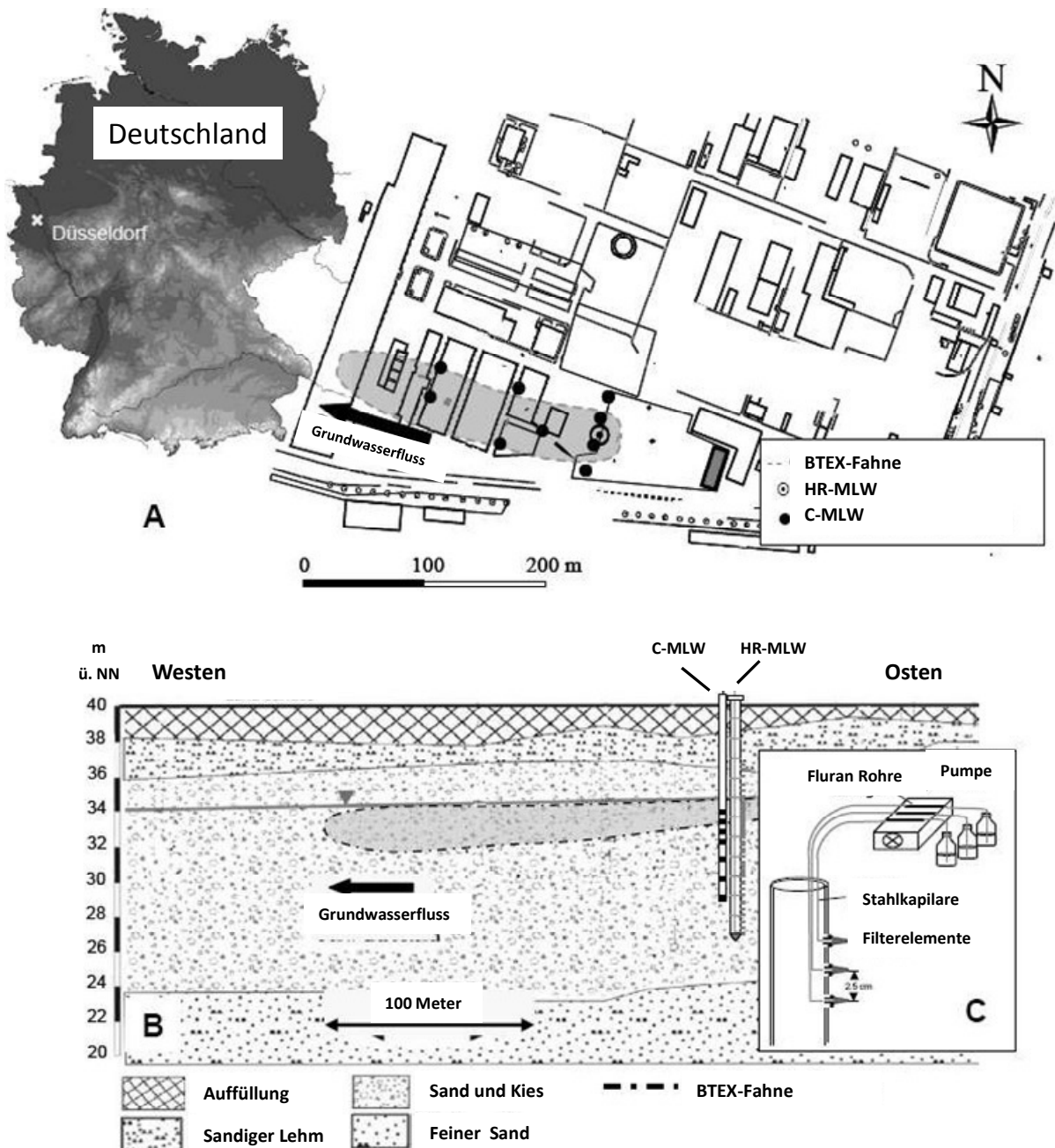


Abbildung 3.1: A: Schematischer Überblick über das Probenahmegebiet im ehemaligen Gaswerksstandort Düsseldorf-Flingern. B: Vertikaler Querschnitt des Aquifers und Lage des hochauflösenden Multi-Level Brunnens (HR-MLW). C: Detaillierte Ansicht des Probenahmesystems (nach: Anneser et al. 2008b).

Eine detaillierte Beschreibung des ehemaligen Gaswerksstandortes und des HR-MLW ist in der Literatur zu finden (z.B. Wisotzky und Eckert 1997, Anneser et al. 2008a, Anneser et al. 2008b, Börke et al. 2008).

An diesem Probenahmestandort und insbesondere am HR-MLW sind unterschiedliche Studien und Messungen durchgeführt worden, so dass er als sehr gut charakterisiert angesehen werden kann. Neben den Konzentrationsprofilen von aromatischen sowie heterozyklischen Schadstoffen im Grundwasser und im Sediment (z.B. BTEX, PAK, Heterozyklen), wurden chemisch- physikalische Parameter untersucht (z.B. Redoxpotential,

elektr. Leitfähigkeit, Sulfat, DOC), Isotopenuntersuchungen (CSIA) durchgeführt sowie Bakterienverteilungen gemessen (Anneser et al. 2008a, Reineke 2008, Winderl et al. 2008, Prommer et al. 2009, Anneser et al. 2010).

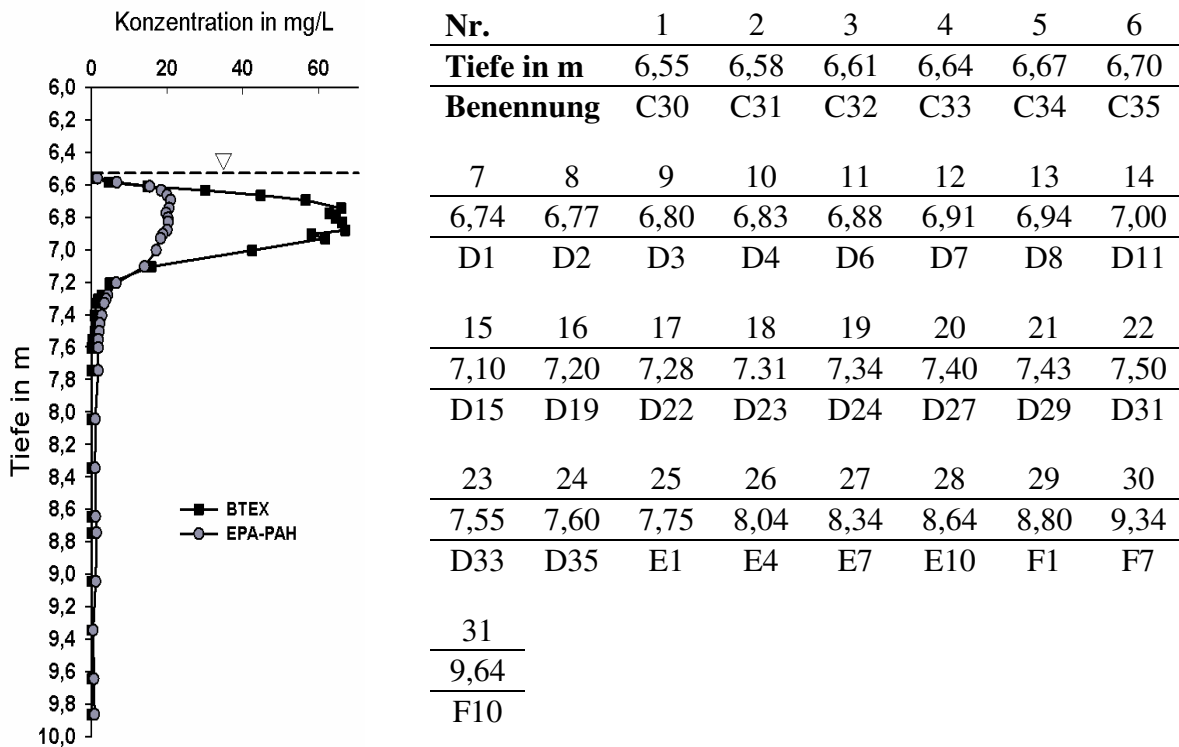
Die vertikalen Verteilungen der geochemischen Parameter und des DOC sind in Abbildung A.1 im Anhang illustriert und die wichtigsten Schlussfolgerungen im Folgenden zusammengefasst:

- Das Redoxpotential bewegt sich im Bereich von $E_H = 101$ mV bis $E_H = -81$ mV und zeigt anoxische Bedingungen im gesamten Aquifer und besonders im Bereich der BTEX-Schadstofffahne an. Nur am oberen Fahnenrand ist ein hoher Wert von $E_H = 300$ mV zu verzeichnen, der dort auf oxische Bedingungen hinweist. Dies wird durch Sauerstoff verursacht, der durch den Kapillarsaum von oben eingetragen wird.
- Die Verteilung des DOC deutet auf hohe Konzentrationen organischer Schadstoffe und deren Abbauprodukte im Bereich der BTEX Kontamination hin.
- Die vertikale Sulfatverteilung zeigt die deutlich geringsten Konzentrationen im Bereich der BTEX-Schadstofffahne mit einem starken Abfall von $\rho(\text{SO}_4^{2-}) = 425$ mg/L auf $\rho(\text{SO}_4^{2-}) = 51$ mg/L im oberen Rand der Fahne. Dies ist ein deutliches Zeichen für die Verwendung von Sulfat als Elektronenakzeptor in diesem Aquifer. In früheren Studien konnte schon gezeigt werden, dass Sulfat- und Eisen-Reduktion die vorrangigen Prozesse im Rahmen des Schadstoffabbaus an diesem Standort sind, wobei die Sulfatreduktion der dominierende Prozess ist (Wisotzky und Eckert 1997, Anneser et al. 2008a).

Die Kontamination im ehemaligen Gaswerksstandort Düsseldorf besteht vorrangig aus BTEX, Naphthalin, Acenaphthen, Fluoren sowie heterozyklischen Komponenten (z.B. Benzothiophen, Benzofuran). Die vertikalen Schadstoffverteilungen werden in Kapitel 4.3.2 eingehend diskutiert.

Die Konzentrationsverteilung der Metabolite als wichtiger Indikator des Schadstoffabbaus ist bisher nicht untersucht worden. In dieser Arbeit konnten mit Hilfe der hochauflösenden Probenahme im HR-MLW kleinskalige Konzentrationsgradienten der Metabolite untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden im Februar 2007 vom Institut für Grundwasserökologie (Prof. Meckenstock) vom Helmholtz-Zentrum in München 31 Proben aus dem HR-MLW in verschiedenen Tiefen aus dem Aquifer entnommen (siehe Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Entnahmetiefen der Proben aus dem HR-MLW im Aquifer in Düsseldorf bei der Probenahme im Februar 2007. Zum besseren Überblick ist die vertikale Schadstoffverteilung der BTEX und EPA-PAH (16 PAK, die von der amerikanischen Umweltbehörde (EPA) als prioritär ausgewählt wurden) auch dargestellt (links).



Der Verlust von Schadstoffen und Metaboliten durch Sorption wurde durch die Verwendung von Stahlkapillaren und vorher auf Sorption getesteten Fluran Schläuchen verhindert (Anneser et al. 2008a). Die 32 Proben aus den verschiedenen Tiefen wurden gleichzeitig mit einer Pump-Rate von nur 1,5 mL/min genommen um eine Vermischung der Proben und hydraulische Probleme zu verhindern. Zunächst wurde eine Zeit lang Wasser aus dem Brunnen gepumpt ohne es zu verwenden, um nicht das im Brunnen gestaute Wasser zu untersuchen. Zusätzlich zu den Proben aus dem HR-MLW wurden Proben aus verschiedenen Brunnen aus Abstrom-Bereichen genommen um die Entwicklung und den Transport der Metabolite zu untersuchen.

Von den verschiedenen Proben wurden jeweils 10 mL zur Metabolitenanalytik verwendet. Diese wurden zur Konservierung mit HCl auf einen pH-Wert von 2 angesäuert, 0,45 µm filtriert und mit den verschiedenen massenspektrometrischen Methoden gemessen.

3.1.2 Stuttgart („Testfeld Süd“)

Bei diesem Probenahmegebiet ("Testfeld Süd") handelt es sich um einen ehemaligen Gaswerksstandort im süddeutschen Raum, der in Stuttgart im Neckartal gelegen ist. Das Gelände liegt in der Nähe einer Mineralwasseraufstiegszone (Schutzgebiet von Heilquellen). Von 1875 bis 1969 wurde auf diesem Gelände ein Gaswerk betrieben, an dem vornehmlich Stadtgas durch Steinkohleentgasung gewonnen wurde. In den späteren Jahren der Nutzung wurde Gas auch aus Schweröl und leichten Mineralöl gewonnen. Während dieser Zeit kam es

aus Rohteergruben und zahlreiche Leckagen in Produktionsanlagen zu einer starken Kontamination des Grundwasserleiters mit Teeröl (Börke et al. 2008).

Der circa drei bis vier Meter mächtige quaternäre Grundwasserleiter ist sehr heterogen und besteht vornehmlich aus Kies und Sand. Die Heterogenität ist teilweise auf anthropogene Baumaßnahmen zurückzuführen.

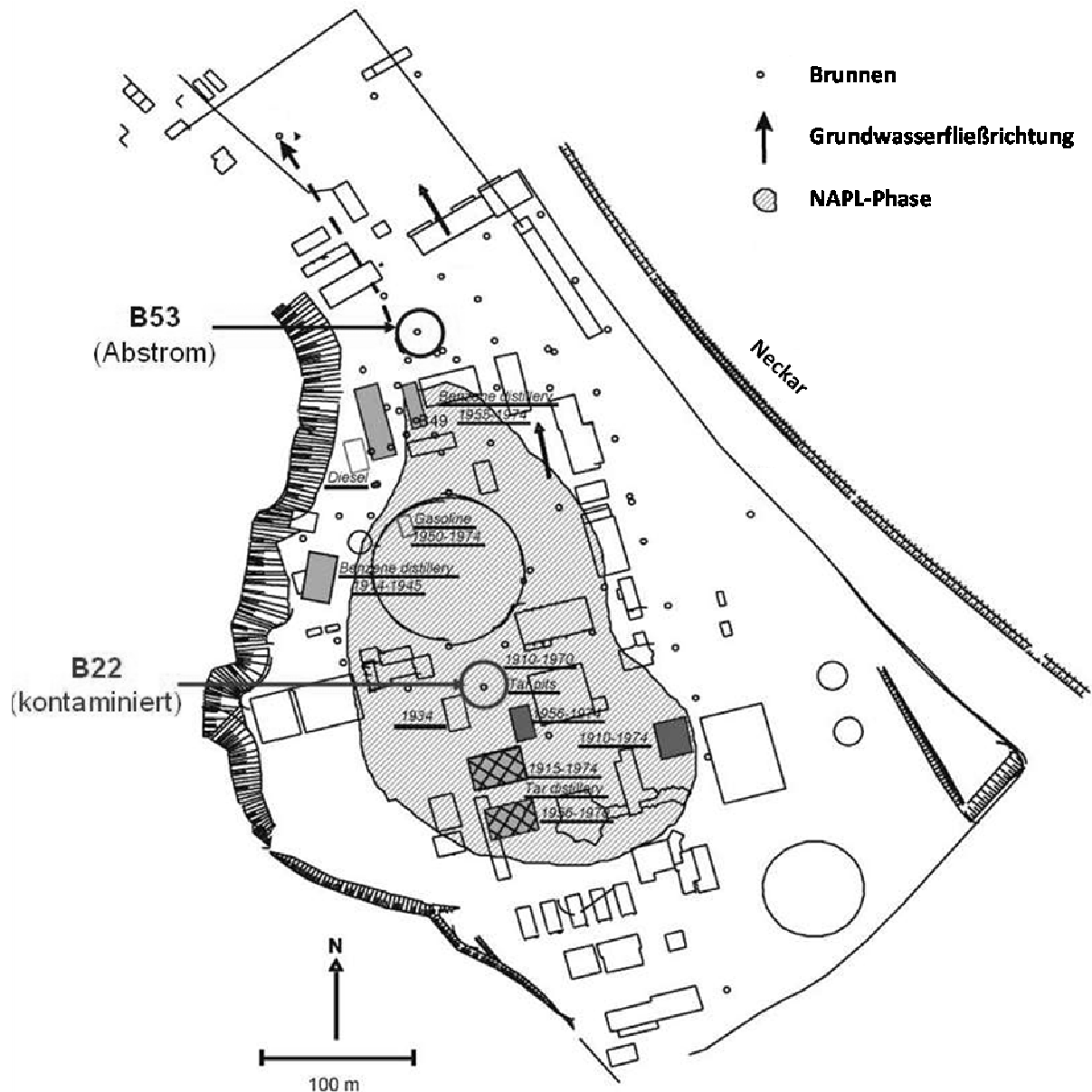


Abbildung 3.2: Schematischer Überblick über den ehemaligen Gaswerksstandort Stuttgart mit Probenahmebrunnen, wichtigsten Schadensherden und Lage der Teerölphase (grauer Bereich). B22 und B53 zeigen die Lage der Probenahmebrunnen aus denen die Proben für die Huminstoffanreicherung genommen wurden (nach Zamfirescu und Grathwohl 2001).

Die Kontamination der ungesättigten Bodenzone wird durch PAK (bis 21 mg/kg) und monoaromatische Kohlenwasserstoffe (bis 0,9 mg/kg) dominiert. Grundwasseranalysen wiesen starke Kontaminationen durch PAK (bis $\rho(\text{PAK}) = 10,43$ mg/L, vor allem Naphthalin), BTEX (bis $\rho(\text{BTEX}) = 11,51$ mg/L) sowie Phenolen (bis $\rho(\text{Phenole}) = 19,7$ mg/L) auf (Börke

et al. 2008). Neben den aromatischen Komponenten wurden auch heterozyklische Schadstoffe wie z.B. Benzofuran, Dibenzofuran oder Benzothiophen im Aquifer gefunden (Zamfirescu und Grathwohl 2001). Im Schadenszentrum ist außerdem großflächig Mineral- und Teerölphase zu finden. Im gesamten Probenahmebereich stehen etwa 40 Brunnen für Probenahmen zur Verfügung. Einen Überblick über den Probenahmestandort gibt Abbildung 3.2. Detaillierte Informationen über den ehemaligen Gaswerksstandort und die dort vorhandene Kontamination sind in der Literatur zu finden (Herfort et al. 1998, Zwiener und Frimmel 1998, Zwiener et al. 1999, Zamfirescu und Grathwohl 2001, Börke et al. 2008).

An diesem Standort wurden in einer früheren Studie vom Institut für Wasserchemie am Karlsruher Institut für Technologie (Probennehmer: Prof. Zwiener, Fr. Karle) jeweils 100 L Grundwasser aus einem Brunnen im kontaminierten Bereich (B22) und einem Brunnen im Abstrombereich (B53) genommen (Zwiener et al. 1999). B53 liegt etwa 200 m stromabwärts von B22. Aus diesen 100 L wurden in dieser Studie jeweils Huminstoffe (wie in Kapitel 3.3.7.3 beschrieben) angereichert. Die Huminstoff-Fractionen wurden gekühlt und im Dunkeln gelagert. Diese Fractionen wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Die bisher gewonnenen Ergebnisse mit diesen Huminstoff-Isolaten sind in Kumke et al. (1999) und Zwiener et al. (1999) zu finden.

Für die verschiedenen massenspektrometrischen Messungen, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden jeweils 5 mg der Fractionen (FS und HS) in 500 mL Acetonitril/MilliQ (20 Vol.-% /80 Vol.-%) gelöst. Diese Lösungen mit jeweils einer Konzentration von $\rho = 10 \text{ mg/L}$ HS bzw. FS wurden filtriert (0,45 μm) und für die verschiedenen massenspektrometrischen Messungen verwendet. Für die LC-UV/DOC-Messungen wurden 5 mg der Fractionen in 250 mL MilliQ gelöst und filtriert (0,45 μm).

3.1.3 Weißandt-Görlau

Der Probenahmestandort Weißandt-Görlau liegt ca. 25 km nordöstlich von Halle a.d. Saale in Sachsen-Anhalt. Neben der Verarbeitung von Kohle (seit 1928) erfolgte seit 1936 die Veredelung von Kohle zu Benzin, Heizöl, Paraffin sowie Spezialölen und seit 1956 die Verarbeitung von Erdöl. Seit Anfang der 60er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde der Standort als Industriepark für Sondermaschinenbau und Kunststoffproduktion genutzt. Seit den 90er Jahren wird der Standort im Rahmen von Altlastenerkundungen auf Kontaminationen des Bodens und des Grundwassers erkundet. Die hydrogeologischen Charakteristika des Standortes sind durch mehrere Grundwasserstockwerke gekennzeichnet. Es sind zwei Hauptaquifere vorzufinden. Unter dem durch Geschiebemergel abgeschlossenen quartärer Aquifer liegt ein aus Glimmersanden bestehender tertiärer Aquifer (Rügner et al. 2008). In dieser Arbeit wurden nur Proben aus dem quartären Aquifer genommen, so dass auf den tertiären Aquifer nicht weiter eingegangen wird.

Das Probenahmegebiet ist durch weiträumige Verunreinigungen mit Mineralölkohlenwasserstoffen, BTEX, Phenolen und PAK mit ausgedehnten Schadstoffahnen geprägt. Im Abstrom der Kontaminationsquellen haben sich deutliche BTEX-Kontaminationsahnen gebildet. Der Grundwasserleiter ist durchgehend anoxisch und anaerobe Prozesse haben zu einer Akkumulation von Methan im Grundwasser geführt. Die

Sulfatreduktion ist der bedeutendste Abbauprozess am Standort, wo hingegen die Eisenreduktion nur eine untergeordnete Rolle spielt (Rügner et al. 2008).

An diesem Standort sind verschiedene isotopebiogeochemische Untersuchungen sowie Pumpversuche zu Frachtbestimmungen durchgeführt worden (Rügner et al. 2008, Wange 2008).

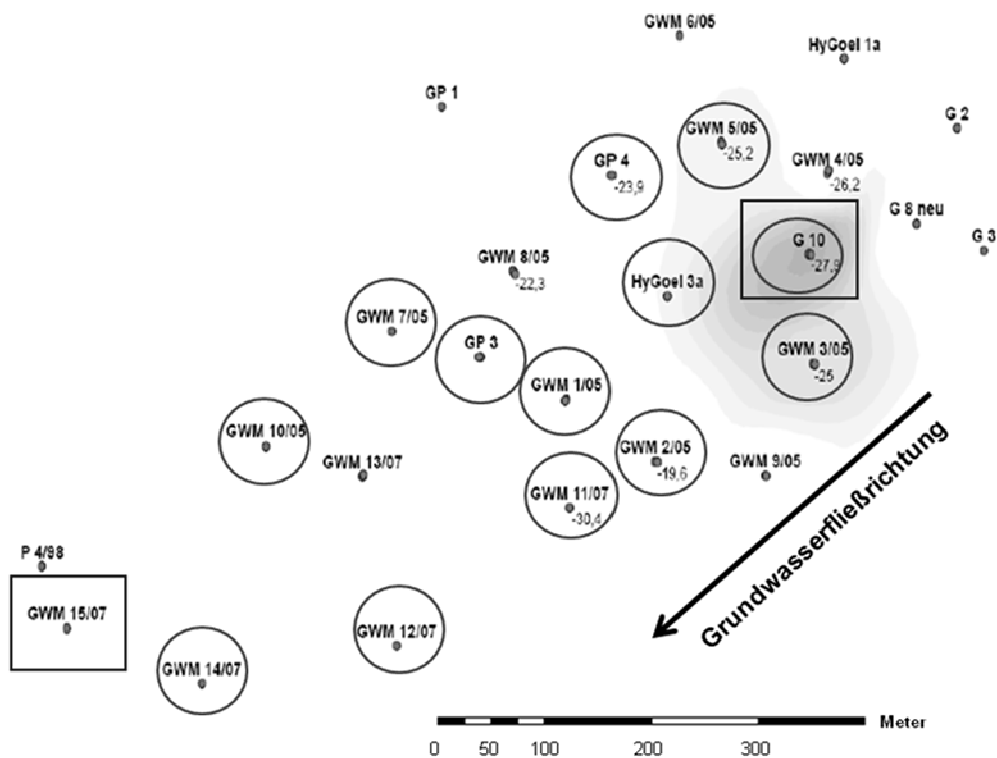


Abbildung 3.3: Lage der Probenahmebrunnen auf dem Untersuchungsgebiet Weißandt-Göلزau (quaternärer Grundwasserleiter). Die viereckig umrandeten Probenahmebrunnen wurden zur Probenahme von jeweils 100 L Grundwasser zur Huminstoffanreicherung genutzt. An den eingekreisten Probenahmebrunnen wurden jeweils 250 mL Grundwasser zur Metabolitenanalytik entnommen. Der graue Bereich zeigt die Kontamination des Grundwassers mit Toluol an.

In diesem Probenahmegebiet standen verschiedene Probenahmebrunnen zur Verfügung (Abbildung 3.3) und im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Probenahmen durchgeführt.

Zum einen wurden aus den Probenahmebrunnen G10 (kontaminierter Bereich) und GWM15 (Abstrombereich) im Dezember 2009 jeweils 100 L Grundwasser zur Huminstoffanreicherung entnommen. Die Probenahme erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Department Isotopebiogeochemie (Dr. Feisthauer, PD Dr. Richnow) vom Helmholtz Zentrum für Umweltforschung (UFZ) in Leipzig. Die Huminstoffe wurden wie in Kapitel 3.3.7.3 beschrieben angereichert. Für die LC-UV/DOC-Messungen wurden 5 mg der Fraktionen in 250 mL MilliQ gelöst und filtriert (0,45 µm).

Zum anderen wurden vom Department Isotopebiogeochemie (Dr. Bombach, PD Dr. Richnow) am Helmholtz Zentrum für Umweltforschung (UFZ) in Leipzig aus verschiedenen horizontal verteilten Brunnen jeweils 250 mL Grundwasser zur Metabolitenanalytik

genommen. Die Proben wurden zur Konservierung mit HCl auf einen pH-Wert von 2 eingestellt, 0,45 µm filtriert und für die massenspektrometrischen Messungen verwendet.

3.1.4 Hohlohsee

Zur Anreicherung von anthropogen kaum beeinflussten, „naturnahen“ Huminstoffen wurde der Hohlohsee ausgewählt. Der Hohlohsee liegt auf 984 m über NN in einem Naturschutzgebiet im Nordschwarzwald in der Nähe von Kaltenbronn. Er ist naturbelassen und anthropogen kaum beeinflusst. Es ist ein „Braunwasser“-See (Moor-See) mit einem DOC-Gehalt von ca. $\rho(\text{DOC}) = 20 \text{ mg/L}$. Die Huminstoff-Isolate aus dem Hohlohsee sind durch verschiedene Untersuchungsmethoden (z.B. NMR, LC-UV/DOC, Elementaranalyse) gut charakterisiert (z.B. Lankes 2001, Frimmel et al. 2002, Müller 2004) und eignen sich dadurch sehr gut als Referenzsubstanz für „naturnahen“ DOC.

Für die Huminstoffanreicherung wurden im September 2009 1000 L Wasserprobe aus dem Hohlohsee entnommen. Die Huminstoffe in der Wasserprobe wurden gemäß der in Kapitel 3.3.7.2 beschriebenen Anreicherungsprozedur angereichert. Für die massenspektrometrischen Messungen (NLS) wurde 5 mg der FS-Fraktion in 500 mL Acetonitril/MilliQ (20 Vol.-% / 80 Vol.-%) gelöst. Für die LC-UV/DOC-Messungen wurden 5 mg der Fraktionen in 250 mL MilliQ gelöst und filtriert (0,45 µm).

3.2 Anaerobe Abbauxperimente

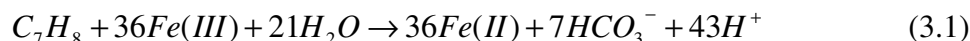
Zur Untersuchung der Metabolitenbildung beim anaeroben Abbau von Toluol unter verschiedenen Bedingungen sowie cometabolischer Abbauprozesse in Schadstoffgemischen unter kontrollierten und definierten Bedingungen wurden Batch-Experimente mit dem eisenreduzierenden Bakterienstamm *Geobacter toluenoxydans* TMJ1 durchgeführt. Neben dem anaeroben Abbau von Toluol und cometabolischen Abbauprozessen standen vor allem auch die quantitative Bildung von Metaboliten und das Auftreten von Cometaboliten im Vordergrund.

3.2.1 Bakterienkultur *Geobacter toluenoxydans* TMJ1

Geobacter toluenoxydans TMJ1 ist ein obligat anaerober eisenreduzierender Bakterienstamm und gehört zur Gattung der Geobacter, die häufig in unterirdischen Umweltsystemen (z.B. Boden, Grundwasser) vorkommen (Kunapuli et al. 2010, Zhang et al. 2012). Diese Gattung gehört zum Stamm der Proteobakterien und ist dafür bekannt, dass sie Fe(III) als alleinigen Elektronenakzeptor nutzen kann. Dabei wird Fe(III) zu Fe(II) oxidiert. Die Einordnung von *G. toluenoxydans* TMJ1 in die phylogenetische Klassifikation der Gattung Geobacter ist im Anhang in Abbildung A.2 dargestellt.

Der Bakterienstamm wurde vom Institut für Grundwasserökologie (Prof. Meckenstock) am Helmholtz-Zentrum in München isoliert und zur Verfügung gestellt. Die Isolierung erfolgte aus Sediment, das aus dem kontaminierten Grundwasserleiter in Stuttgart (Kapitel 3.1.2) stammt. Mit Hilfe von Elektronenbilanzen in Batch-Versuchen konnte dort nachgewiesen werden, dass *G. toluenoxydans* TMJ1 Toluol als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzt und vollständig zu CO₂ oxidieren kann (Kunapuli et al. 2010). Zur kompletten Mineralisierung

eines Toluol-Moleküls werden nach Gleichung (3.1) 36 Eisen(III)-Atome benötigt (Cunningham et al. 2001).



Neben Toluol konnte *G. toluenoxydans* TMJ1 in Batch-Versuchen z.B. die monoaromatischen Stoffe Phenol, p-Cresol, m-Cresol oder Benzoesäure als Elektronendonator nutzen, nicht aber Xylol, Ethylbenzol oder die polyaromatischen Stoffe Naphthalin, Methylnaphthalin oder Phenanthren (Kunapuli et al. 2010). Eine detaillierte Beschreibung des Bakterienstammes, der Isolation und der Kultivierung ist in Kunapuli et al. (2010) zu finden und wichtige Eigenschaften sind in Tabelle 3.2 aufgeführt

Tabelle 3.2: Ausgewählte Eigenschaften des Bakterienstammes *G. toluenoxydans* TMJ1 (aus: Kunapuli et al. 2010).

Gram Färbung:	Gram negativ
Form:	Stäbchenförmig
Größe:	2,1-3,8 µm lang und 0,4 µm breit
Energiestoffwechsel:	Obligat anaerob
Optimale Wachstumstemperatur:	25-32 °C
pH-Wert-Bereich fürs Wachstum:	6,6-7,5 (Optimal: 6,6-7,0)
Nutzbare Elektronenakzeptoren:	Fe(III)
Nutzbare Elektronendonatoren: (ausgewählte)	Toluol, Benzylalkohol, Benzaldehyd, Phenol, m- und p-Cresol, Benzoesäure

3.2.2 Batch-Experimente

3.2.2.1 Ansatz der Batch-Experimente

In den durchgeführten Batch-Experimenten wurden bestmögliche Wachstumsbedingungen für *G. toluenoxydans* TMJ1 durch eine optimale zusammengesetzte Nährlösung, anaerobe Bedingungen, ausreichend Elektronenakzeptoren und Zugabe von Substrat geschaffen.

Zur Durchführung der Batch-Experimente wurden 120 mL Batch-Gefäße aus Glas verwendet. Nachdem die leeren Flaschen autoklaviert wurden, wurde sie mit sterilem anaeroben Medium (Zusammensetzung und Herstellung siehe Widdel und Bak 1992) bis zur Hälfte gefüllt (etwa 60 mL) und mit vorher autoklavierten Viton-Stopfen luftdicht verschlossen (Kunapuli et al. 2010).

In diese Batch-Gefäße wurde zunächst das entsprechende Substrat (Schadstoff bzw. Schadstoffmischung) gefüllt. Es wurden immer drei Gefäße parallel mit derselben Substrat- bzw. Cosubstratlösung angesetzt. Zur Einfüllung des Substrats wurde eine Mikroliterspritze zunächst mit Aceton, dann mit dem Substrat gespült und anschließend damit gefüllt. Die Spitze der Mikroliterspritze wurde ausgeglüht und das Substrat durch ein mit einer frisch

geöffneten sterilen Spritze vorgestochenes Loch im Viton-Stopfen eingefüllt. Nach dem Einfüllen des Substrats wurden die Bakterien (Inoculum), die sich in einem Batch-Gefäß in der stationären Phase befanden, in die Batch-Gefäße überführt. Dafür wurden alle Batch-Gefäße durch Anzünden von auf die Stopfen gegebenen Ethanol sterilisiert. Eine frische, sterile Spritze wurde 2-mal mit einem N_2/CO_2 -Gasgemisch (20 Vol.-%/80 Vol.-%) gespült und anschließend damit gefüllt. Die Batch-Gefäße wurden auf den Kopf gedreht, die Spritze von unten durch den Viton-Stopfen hineingedrückt und die Gasmenge in das Gefäß entlassen. Die Spritze wurde mit der entsprechenden Menge an Bakterienkultur (meist 5 mL) gefüllt und langsam aus dem Batch-Gefäß herausgezogen. Sofort danach wurde die Spritze durch den Stopfen des neuen Batch-Gefäßes gedrückt und die Bakterienkultur dort eingefüllt. Zusätzlich wurden auch immer Kontrollproben (ohne Bakterienkultur, ohne Substrat, autoklaviert) angesetzt, um etwaige Veränderungen durch Verunreinigungen oder Kontaminationen auszuschließen und sterile Bedingungen nachzuweisen. Nach Befüllung aller Batch-Gefäße wurden diese in den Brutschrank bei 30 °C gestellt. Bei einem Experiment wurde die Temperatur 10 °C gewählt um den Abbau bei grundwasserähnlichen Temperaturen zu untersuchen.

Die Experimente wurden mit verschiedenen Substraten (meist Toluol) und Cosubstraten (Aromaten und Heterozyklen) in unterschiedlichen Mengen durchgeführt. Als Cosubstrate wurden Substanzen ausgesucht, die zum einen eine Relevanz als Kontamination für Aquifere besitzen. Zum anderen sollten sie in ihrer Struktur dem Substrat Toluol ähneln und somit die Möglichkeit besteht, dass sie enzymatisch mit abgebaut werden (Cometabolismus).

Toluolabbau und Metabolitenbildung unter unterschiedlichen Milieubedingungen

Bei diesen Experimenten wurden in die bis zur Hälfte mit Medium (50 bis 60 mL) gefüllten Batch-Gefäße soviel Toluol (ca. 3 μ L) eingefüllt das eine Konzentration von etwa $c(\text{Toluol}) = 0,4$ bis 0,5 mmol/L im Medium erreicht wurde.

In einem Experiment wurde statt Toluol BBS als Substrat eingefüllt. Es sollte untersucht werden, ob die Mikroorganismen diesen Metaboliten als Substrat nutzen können, wenn er extrazellulär vorliegt. Dabei wurde aus einer in MilliQ angesetzten BBS-Lösung ($c(\text{BBS}) = 5$ mmol/L) 5 mL in die Flaschen gefüllt so dass eine Konzentration an BBS von etwa $c(\text{BBS}) = 0,5$ mmol/L im Medium vorlag. Die Ergebnisse dieser Experimente werden in Kapitel 4.2.1 diskutiert.

Metabolitenbildung und Cometabolismus in Schadstoffgemischen

Bei diesen Experimenten wurden in die bis zur Hälfte mit Medium (50 bis 60 mL) gefüllten Batch-Gefäße neben etwa 3 μ L des Substrats Toluol zusätzlich weitere Cosubstrate zugegeben. Es wurden 2 unterschiedliche Experimenterserien durchgeführt in denen die Cosubstrate entweder gelöst in 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan (HMN) (1. Experimentserie) oder ungelöst (2. Experimentserie) zugegeben wurden. Die Ergebnisse dieser Experimente werden in Kapitel 4.2.2 diskutiert.

1. Experimentserie

Die unterschiedliche Cosubstrate wurden in HMN gelöst und in verschiedenen Mischungen zusammengestellt (Tabelle 3.3) Dabei wurden Konzentrationen von

$c(\text{Cosubstrat}) = 6 \text{ mmol/L}$ je Cosubstrat in den verschiedenen Mischungen erreicht. Diese Mischungen wurden dann in die verschiedenen Batch-Gefäße zugegeben (Tabelle 3.4). In einige Batch-Gefäße wurde statt den Cosubstrat-Mischungen Teerölphase zugegeben, die aus dem Gaswerksstandort in Stuttgart (Kapitel 3.1.2) stammt.

Tabelle 3.3: Cosubstrat-Mischungen (CM) der 1. Experimentserie. Die Konzentration jedes Cosubstrats lag bei etwa $c(\text{Cosubstrat}) = 6 \text{ mmol/L}$ in den Mischungen.

Mischungen	Cosubstrate
CM 1	Naphthalin, Ethylbenzol, o-Xylol, m-Xylol, p-Xylol, Benzol, Thiophen, Furan, Pyrrol und Pyridin
CM 2	Naphthalin, Ethylbenzol, o-Xylol, m-Xylol, p-Xylol
CM 3	Thiophen, Furan, Pyrrol sowie Pyridin

Tabelle 3.4: Ansätze der 1. Experimentserie.

Ansatz	Toluol	Inoculum	Cosubstrat-Mischungen	Autoklaviert
1	ca. 3 μL	1 mL	-	-
2	ca. 3 μL	1 mL	-	ja
3	-	1 mL	5 mL CM 1	-
4	ca. 3 μL	1 mL	5 mL CM 2	-
5	ca. 3 μL	1 mL	5 mL CM 3	-
6	ca. 3 μL	1 mL	5 mL CM 1	-
7	ca. 3 μL	1 mL	1 mL Teerölphase	-

2. Experimentserie

Die gleichen Cosubstrate wie in den Cosubstrat-Mischungen der 1. Experimentserie wurden jeweils einzeln zugegeben ohne sie vorher in HMN zu lösen (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Ansätze der 2. Experimentserie.

Ansatz	Toluol	Inoculum	Cosubstrate
1	ca. 3 μL	1 mL	ohne
2	ca. 3 μL	1 mL	ca. 3 μL Furan
3	ca. 3 μL	1 mL	ca. 3 μL Thiophen
4	ca. 3 μL	1 mL	ca. 3 μL Pyridin
5	ca. 3 μL	1 mL	ca. 3 μL Pyrrol
6	ca. 3 μL	1 mL	ca. 3 μL Benzol
7	ca. 3 μL	1 mL	ca. 3 μL Ethylbenzol
8	ca. 3 μL	1 mL	ca. 3 μL m-Xylol
9	ca. 3 μL	1 mL	ca. 3 μL p-Xylol
10	ca. 3 μL	1 mL	ca. 3 μL o-Xylol

3.2.2.2 Durchführung der Probenahmen

Zur Probenahme wurden die jeweiligen Batch-Gefäße aus dem Brutschrank genommen und die Stopfen durch Abflammen von Ethanol sterilisiert. Eine frisch geöffnete sterile Spritze (je nach Probenahme mit 1, 2 oder 6 mL Volumen) wurde 2-mal mit einem N₂/CO₂ (20:80 v/v) Gasgemisch gespült und anschließend damit gefüllt. Die Batch-Gefäße wurden auf den Kopf gedreht, die Spritze von unten durch den Viton-Stopfen hineingedrückt und die Gasmenge in das Gefäß entlassen. Die Spritze wurde dann mit der entsprechenden Probenmenge gefüllt und langsam aus der Serumflasche herausgezogen. Die Probenmenge wurde je nach durchgeführten Messungen unterschiedlich aufgeteilt (Abbildung 3.4). Zum Nachweis des Wachstums der Bakterien und des Abbaus der Schadstoffe wurde routinemäßig die Konzentration an Fe(II) in den Batch-Gefäßen gemessen (Kapitel 3.3.6). Zusätzlich wurde bei einigen Experimenten die Konzentration des Substrats Toluol mit GC-MS (Kapitel 3.3.3.1) nach vorgeschalteter flüssig-flüssig Extraktion (Kapitel 3.3.7.2) und die (Co)Metaboliten mit LC-ESI-MS/MS (Kapitel 3.3.1) nach vorheriger Festphasenextraktion (Kapitel 3.3.7.1) gemessen.

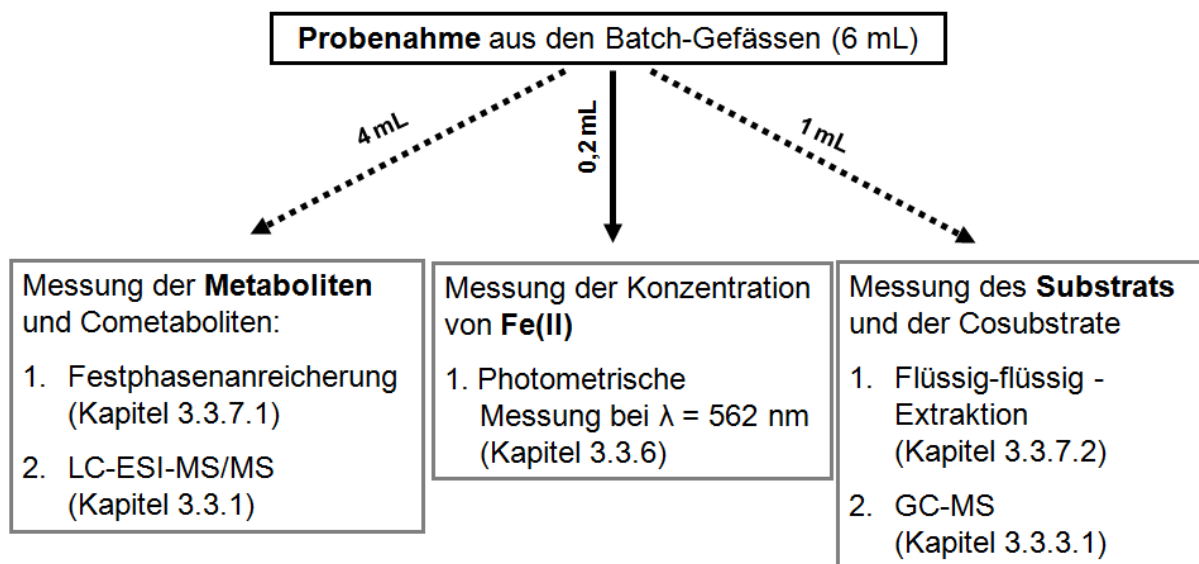


Abbildung 3.4: Schematische Aufteilung des Probevolumens zu den einzelnen Messungen bei einer Probenahme von 6 mL aus den Batch-Gefäßen.

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 LC-ESI-MS/MS

Die LC-ESI-MS/MS wurde in dieser Arbeit sowohl zur Quantifizierung und Identifizierung von Metaboliten als auch zum Screening eingesetzt. Folgende unterschiedliche Experimente wurden durchgeführt (siehe auch Abbildung 2.10 in Kapitel 2.4.2.1):

- a) Neutral-Loss-Scans (NLS) zum Screening nach sauren Metaboliten (Kapitel 3.3.1.1)

- b) Product-Ion-Scans (PIS) zur Ermittlung von Fragmentspektren zur Identifizierung von sauren Metaboliten (Kapitel 3.3.1.2)
- c) Multiple-Reaction-Monitoring (MRM) zur Quantifizierung von Metaboliten (Kapitel 3.3.1.3)

Das verwendete LC-ESI-MS/MS-System bestand aus einer HPLC (Agilent 1100, Waldbronn, Deutschland) mit einer binären Pumpe, einem Degaser, einem Säulenofen und einem Autosampler (automatischer Probengeber) was an ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer (API 3000, Applied Biosystem Sciex, Darmstadt, Deutschland) gekoppelt war. Zur Ionisierung wurde eine Elektrospray-Ionenquelle (TurbolonSpray, Applied Biosystem Sciex) genutzt. Zur Optimierung der HPLC-Trennbedingungen für die Messmethoden wurden verschiedene Trennsäulen, unterschiedliche Eluenten (z.B. Methanol, Acetonitril) und verschiedene Gradientenprogramme getestet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Analyst 1.4.1 (Applied Biosystem Sciex).

3.3.1.1 Neutral-Loss-Scans (NLS)

Es sind NLS mit zwei unterschiedlichen Neutralverlusten durchgeführt worden:

- a) $\Delta m/z = 44$ ($-\text{CO}_2$): Dieser Neutralverlust zeigt die Abspaltung einer Säuregruppe von einem stabilen (z.B. aromatischen oder heterozyklischen) Rest an.
- b) $\Delta m/z = 116$ ($-\text{C}_2\text{H}_4(\text{CO}_2)_2$): Dieser Neutralverlust zeigt die Abspaltung der vollständigen Bernsteinsäuregruppe von einem stabilen (z.B. aromatischen oder heterozyklischen) Rest an.

Diese Neutralverluste wurden ausgewählt, da PIS von Standards typischer Vertreter der sauren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten diese typischen Abspaltungen zeigten (Kapitel 4.1.1.1). Da die Parameter für ESI und MS/MS für alle in den Proben vorkommenden sauren aromatischen und heterozyklischen Metabolite gelten mussten und unbekannt war, welche Metabolite in den Proben vorhanden waren, konnten die Parameter nicht für jeden Metaboliten optimiert werden. Stattdessen wurden die Parameter so gewählt, dass möglichst viele Metaboliten damit erfasst werden würden (Tabelle 3.6). Es wurden mittlere optimierte ESI- und MS/MS-Einstellungen von verfügbaren Referenzstandards ermittelt und verwendet (siehe MRM-Methode). Mit dieser Methode wurde sowohl Proben aus dem ehemaligen Gaswerksgelände in Stuttgart (Kapitel 4.1.1.2) als auch Proben aus den Batch-Experimenten (Kapitel 4.2.2) gemessen.

Tabelle 3.6: Parameter der LC-ESI-MS/MS-Methode (NLS) zum Screening nach sauren Metaboliten von Aromaten und Heterozyklen in den Proben aus dem ehemaligen Gaswerksstandort Stuttgart und den Proben aus den Batch-Experimenten.

HPLC	Säule:	Nucleodur C18 Pyramid (250 mm x 3 mm, 5 µm Partikel)					
	Säulenofen:	35 °C					
	Fluss:	0,5 mL/min					
	Eluent:	A: MilliQ + 0,1% Essigsäure, B: Acetonitril + 0,1% Essigsäure					
	Injektionsvolumen:	50 µL					
	Gradientenprogramm:	In 35 min von 20% B auf 90% B Post-Time: 10 min mit 20% B					
ESI	Ionisierungsspannung:	-5500 V					
	Zerstäuber-Gasfluss:	1,5 mL/min					
	Turbo-Gasfluss:	6 L/min					
	Gastemperatur:	450 °C					
	Curtain-Gasfluss:	1,6 L/min					
	Modus	Negativ					
MS/MS	Kollisionsgasdichte:	2,9 x 10 ¹⁷ Moleküle (N ₂)/mL					
	Scan-Rate	0,71 Spektren/Sekunde					
Messung	Neutralverlust	Massenbereich	DP	FP	EP	CE	CXP
		[m/z]	[V]	[V]	[V]	[eV]	[V]
1	Δm/z = 44	140-200	-30	-130	-8	-20	-4
2	Δm/z = 44	200-260	-30	-130	-8	-20	-4
3	Δm/z = 44	260-340	-30	-130	-8	-20	-4
4	Δm/z = 44	340-400	-30	-130	-8	-20	-4
5	Δm/z =116	140-200	-30	-130	-8	-20	-4
6	Δm/z =116	200-260	-30	-130	-8	-20	-4
7	Δm/z =116	260-340	-30	-130	-8	-20	-4
8	Δm/z =116	340-400	-30	-130	-8	-20	-4

DP: Declustering Potential, FP: Focusing Potential, EP: Entrance Potential, CE: Collision Energy, CXP: Collision Cell Exit Potential

3.3.1.2 Product-Ion-Scans (PIS)

PIS wurden durchgeführt, um strukturelle Informationen über Metabolite zu bekommen. Die PIS wurden bei unterschiedlichen Kollisionsenergien (*Collision Energy*, CE) ausgeführt, um unterschiedlich starke Fragmentierungen zu erhalten. Es wurden mit PIS sowohl Standards als auch Proben gemessen.

(a) PIS von Standards

Das Ziel dieser Messungen war die Ermittlung von typischen Fragmentspektren von aromatischen und heterozyklischen Säuren und Bernsteinsäuren (Kapitel 4.1.1.1). Die PIS von Standards wurden sowohl über Spritzeninfusion ohne vorherige HPLC-Trennung, als

auch über die Pumpe und vorheriger HPLC-Trennung durchgeführt. Bei Spritzeninfusion ohne vorherige HPLC Trennung wurde die Standardlösung in einer Mikroliter Spritze (1 mL, Hamilton) über eine Spritzenpumpe (Harvard Apparatus, Pump 11) in dem Massenspektrometer unter Verwendung der ESI-Quelle mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ gepumpt. Zuerst wurden die unterschiedlichen quellenspezifischen und substanzspezifischen Parameter optimiert und anschließend Fragmentspektren bei verschiedenen CE aufgenommen (CE = 10, 20, 30, 40 eV). Dabei wurden immer 10 Fragmentspektren aufaddiert. Die optimierten Parameter sind in die MRM-Methode eingegangen (siehe Kapitel 3.3.1.3).

Bei der Messung mit Pumpe und HPLC-Trennung wurde die jeweilige Standardlösung in Vials abgefüllt, mittels Injektionssystem injiziert und vor der Messung auf der HPLC-Säule getrennt. Die Einstellungen sind in Tabelle A.3 im Anhang aufgelistet.

(b) PIS von Proben

Mit diesen PIS sollten Hinweise zur Identifizierung von Metaboliten in Proben durch Fragmentspektren ermittelt werden. Es wurden Huminstoff-Isolate aus dem ehemaligen Gaswerksstandort in Stuttgart, ausgewählte Proben aus den Batch-Experimenten und Proben aus dem Aquifer in Düsseldorf mit PIS untersucht. Dabei wurden von den intensivsten Signalen, die bei NLS mit Neutralverlust $\Delta m/z = 44$ ($-\text{CO}_2$) und $\Delta m/z = 116$ ($-\text{C}_2\text{H}_4(\text{CO}_2)_2$) auftraten, PIS von den Vorläufer-Ionen durchgeführt. Die PIS erfolgten nach vorheriger HPLC-Trennung. Die genauen Einstellungen der PIS sind in Tabelle A.4 im Anhang aufgelistet.

3.3.1.3 Multiple-Reaction-Monitoring (MRM)

Zur Erstellung einer empfindlichen und selektiven quantitativen Messmethode sind verschiedene Schritte durchgeführt worden. Zunächst wurde eine Standardlösung der zu messenden Analyte in einer Konzentration von $\rho(\text{Analyt}) = 1 \text{ mg/L}$ bis 10 mg/L in einem Acetonitril/Wasser Gemisch (50 Vol.-%/50 Vol.-%) hergestellt. Zur Verbesserung der Ionisierung wurde Ammoniumacetat zugefügt ($c(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 10 \text{ mmol/L}$). Diese Lösung wurde in eine Mikroliter Spritze (1 mL, Hamilton) gefüllt und über eine Spritzenpumpe (Harvard Apparatus, Pump 1 L) in das MS/MS-System unter Verwendung der ESI-Quelle mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ gepumpt. Dies erfolgte ohne vorgeschaltete chromatographische Trennung. Über den Scan-Modus im ersten Quadrupol (Q1) wurde zunächst die Ionenmasse ermittelt und anschließend das Declustering potential (DP) sowie die Spannungen für die Beschleunigung der Ionen und die Spannungen der elektronischen Linsen (FP, EP) optimiert. Durch die PIS aus der Molekülionenmasse nach CID wurden die Massen (m/z) der empfindlichsten Fragmente ermittelt. Dann wurden die analytspezifischen Parameter der einzelnen Fragmente optimiert (CE, CXP) und in die MRM-Methode übertragen. Abschließend wurden die HPLC-Trennbedingungen optimiert in dem die Standardlösung unter Variation von chromatographischen Säulen, Eluenten und Gradientenprogrammen am MS/MS mit der MRM Methode gemessen wurden.

Signifikante Matrixeffekte konnten für diese Methode und die gemessenen Proben nicht beobachtet werden. Dies wurde mit Standardadditionen überprüft und ist in guter Übereinstimmung mit der Studie von Ohlenbusch et al. (2002), die den Einfluss von

Matrixkomponenten auf die Messung von polaren Naphthalin-Derivaten in kontaminierten Grundwässern des früheren Gaswerksgeländes in Stuttgart untersucht haben. Bei der Standardaddition wurden Standards (5-Acennaphthensäure (5-AS), 2-Benzofuransäure (2-BFS), 2-Benzothiophensäure (2-BTS), BBS, 2-NS und NMBS) unterschiedlicher Konzentrationen zu einer Probe aus der BTEX-Fahne (6,77 m) und einer Probe aus dem Fahnenrand (6,58 m) gegeben. Die Ergebnisse der Standardaddition im Vergleich zur direkten Messung der gleichen Proben ergaben Abweichungen von maximal 6% für alle Stoffe, was als nicht relevant angesehen werden kann.

Mit MRM wurden verschiedene Metabolite in Grundwasserproben aus den Feldstandorten (vor allem Düsseldorf) (a) und der Metabolit BBS in den Batch-Experimenten (b) quantifiziert.

(a) Quantifizierung von Metaboliten in Grundwasserproben (Kapitel 4.1.2.3)

Die Einstellungen und Parameter der LC-ESI-MS/MS-Methode wurden nach obigem Schema optimiert. Für die Quantifizierung der Metabolite wurden folgende ausgewählte Standards verwendet: 5-AS, 2-BFS, 2-BTS, BBS, 2-NS und NMBS. Bei Substanzen, für die keine Standards erhältlich waren, wurden die empfindlichsten Fragmente und die optimierten Parameter mit entsprechenden Anpassungen ("Massenshifts") von Substanzen übernommen, die als Standards erhältlich waren:

- Für MBBS wurden die Parameter von BBS mit einem „Massenshift“ von $m/z = 14$ übernommen. Dasselbe gilt für die Paare MNMBS und NMBS sowie MNS und NS.
- Für NMeBS wurden die Parameter von NMBS mit einem Massenshift von $m/z = 2$ verwendet.
- Für BTMBS und BFMBBS wurden die Einstellungen von NMBS mit einem Massenshift von $m/z = 8$ bzw. $m/z = -10$ genutzt.

Die optimierten Parameter zur Quantifizierung der Metabolite in den Proben aus dem Feldstandort Düsseldorf (Kapitel 4.3.2) sind in Tabelle A.5 im Anhang aufgelistet. Die Metabolite, für die keine Standards erhältlich waren, wurden über die Response von Substanzen mit Standards quantifiziert, die ähnliche Strukturen und gleiche funktionelle Gruppen haben. Für MBBS über BBS, Methylbenzothiophensäuren (MBTS) über BTS, MNMBS über NMBS und MNS über 2-NS. Die quantitativen Ergebnisse dieser Substanzen können aus diesem Grund nur als Abschätzungen gesehen werden, die auf der Annahme beruhen, dass ähnliche Response-Verhalten vorhanden sind.

Der lineare Kalibrierbereich lag zwischen $\rho(\text{Analyt}) = 1 \mu\text{g/L}$ und $\rho(\text{Analyt}) = 500 \mu\text{g/L}$ und der lineare Regressionskoeffizient war typischerweise $\geq 0,99$. Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenzen (BG) wurden Standards mit niedrigen Konzentrationen hergestellt: $\rho(\text{Analyt}) = 0,75 \mu\text{g/L}$, $0,5 \mu\text{g/L}$, $0,25 \mu\text{g/L}$ und $0,1 \mu\text{g/L}$. Diese wurden jeweils dreimal gemessen und der Mittelwert des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses (S/N) berechnet. S/N unter 10 wurden nicht mehr berücksichtigt. Die ermittelten BG lagen im Bereich von $\rho(\text{Analyt}) = 0,25$ bis $0,5 \mu\text{g/L}$ (Tabelle A.5 im Anhang). Um die Richtigkeit der Kalibrierung zu gewährleisten und Verschleppungseffekte zu erkennen und zu verhindern, wurden in

längeren Probenserien regelmäßig Blanks (MilliQ) und Qualitätskontrollen (Standards) mit gemessen. Die Reproduzierbarkeit der Messmethode wurde überprüft indem der niedrigste Standard (1 µg/L) achtmal gemessen und die Standardabweichung des Signals berechnet wurde. Diese bewegten sich im Bereich von 8,2% (NMBS) bis 21% (BFS). Bei höheren Konzentrationen waren die Standardabweichungen deutlich geringer.

(b) Quantifizierung von BBS in Batch-Experimenten (Kapitel 4.1)

Nach der Probenahme aus den Batch-Gefäßen (Kapitel 3.2.2) wurde eine Festphasenanreicherung (Kapitel 3.3.7.1) durchgeführt, die aufgrund des sehr salz- und eisenhaltigen Mediums zwingend notwendig war. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde als interner Standard Benzoessäure-d5 (BS-d5) zugegeben, der von *G. toluenoxidans* TMJ1 nicht gebildet werden kann. Der angereicherte Extrakt wurde anschließend mittels LC-ESI-MS/MS gemessen. Unter Berücksichtigung des Anreicherungsfaktors und der Wiederfindungsrate des internen Standards NMBS wurde die Konzentration des Metaboliten BBS in den Batchkulturen berechnet. Die Parameter der LC-ESI-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von BBS sind in Tabelle A.6 im Anhang aufgelistet.

3.3.2 LC-ESI-QTOF-MS

3.3.2.1 Bestimmung von Summenformeln (MS-only)

Die Messungen konnten dankenswerterweise an einem LC-ESI-QTOF-MS beim Zweckverband Landeswasserversorgung (LW, Dr. Schulz, Dr. Weber, Dr. Müller) im Betriebs- und Forschungslaboratorium in Langenau (Deutschland) durchgeführt werden. Zusätzlich konnten zu einem späteren Zeitpunkt Summenformeln sowie hochaufgelöste Fragmentspektren ausgewählter Proben (Huminstoff-Isolate aus Stuttgart) auch noch an einem anderen neueren LC-ESI-QTOF-MS-System ermittelt werden (Gerät und Einstellungen siehe Kapitel 3.3.2.2).

Das HPLC System beim Zweckverband Landeswasserversorgung (Agilent 1200, Waldbronn, Deutschland) bestand aus einer binären Pumpe, einem Degaser, einem Säulenofen und einem Autosampler und wurde über eine ESI an ein QTOF-MS (6520 QTOF-MS, Agilent, Waldbronn, Deutschland) gekoppelt. Die Messungen wurden im negativen Ionisierungs-Modus durchgeführt. Die Massenauflösung lag bei maximal $R = 20000$. Die genauen Einstellungen sind in Tabelle 3.7 aufgelistet. Die Auswertung der Daten und die Generierung der Summenformeln aus den ermittelten akkuraten Massen erfolgte mit der Agilent MassHunter Qualitative Analysis Software (Agilent 1200, Waldbronn, Deutschland), die eine Option zur Erzeugung von Formeln aus akkuraten Massen beinhaltet. Die folgenden chemischen Elemente wurden für die Erzeugung der Formeln zugelassen: C ($n = 3-30$), H ($n = 0-120$), N ($n = 0-30$), O ($n = 0-30$), S ($n = 0-5$), Cl ($n = 0-3$).

Mit diesem System wurden verschiedene Standards (z.B. BBS, NMBS, 2-NS, 2-BTS, 2-BFS, 5-AS und 2-IS) sowie folgende Proben aus zwei unterschiedlichen Feldstandorten gemessen:

- Huminstoff-Isolate (B22 FS, B53 FS, B22 HS) aus dem ehemaligen Gaswerksstandort Stuttgart (Kapitel 3.1.2).
- Grundwasserproben aus dem ehemaligen Gaswerksstandort in Düsseldorf (Kapitel 3.1.1). Es wurde jeweils eine Probe aus dem oberen (C33, Tiefe = 6,64 m) und unteren (D19, Tiefe = 7,72 m) Rand der BTEX-Schadstofffahne, aus dessen Zentrum (D2, Tiefe = 6,77 m) sowie eine von unterhalb der Fahne (E1, Tiefe = 7,75 m) gemessen. Außerdem wurden auch einige Abstromproben gemessen um mögliche Transportphänomene der Metabolite zu untersuchen.

Tabelle 3.7: Einstellungen der LC-ESI-QTOF-MS-Messungen (MS-only).

HPLC	Säule:	Nucleodur C18 Pyramid (250 mm x 3 mm, 5 µm Partikel)
	Säulenofen	35 °C
	Fluss:	0,5 mL/min
	Eluent:	A: MilliQ + 0,1% Essigsäure B: Acetonitril + 0,1% Essigsäure
	Injektionsvolumen:	10 µL
	Gradientprogramm:	In 20 min von 20% B auf 70% B In 8 min von 70% B auf 95% B 11 min mit 95% B Post-Time: 11 min mit 20% B
ESI	Elektrospraymodus:	Negativ
	Trocknungsgas:	5 L/min
	Trocknungstemperatur:	300 °C
QTOF	Kapillarspannung:	3650 V
	Fragmentor-Spannung:	150 V
	Skimmer-Spannung:	65 V
	Modus:	MS-only
	Scanbereich:	30 – 1050 m/z
	Scan-Rate:	1,4 Spektren/Sekunde
	Referenzmassen:	ESI: 119,03632 und 980,01375

Nach den Messungen wurden die Daten auf zwei unterschiedliche Arten ausgewertet um auf der eine Seite die Summenformeln potentieller Metabolite zu ermitteln und auf der anderen Seite die Summenformeln der intensivsten Peaks in einer Probe zu bekommen.

Summenformeln potentieller Metabolite

a) Summenformeln der intensivsten Peaks aus den NLS $\Delta m/z = 44$

Für die mit NLS $\Delta m/z = 44$ ermittelten (Kapitel 3.3.1.1) intensivsten Peaks (potentielle saure Metabolite) in den Huminstoff-Isolaten aus dem ehemaligen Gaswerksstandort in Stuttgart wurden die akkuraten Massen und damit die Summenformeln ermittelt. Die durchgeführten Schritte der Datenanalyse sind in im Folgenden aufgelistet und in Abbildung 3.5 an einem Beispiel veranschaulicht.

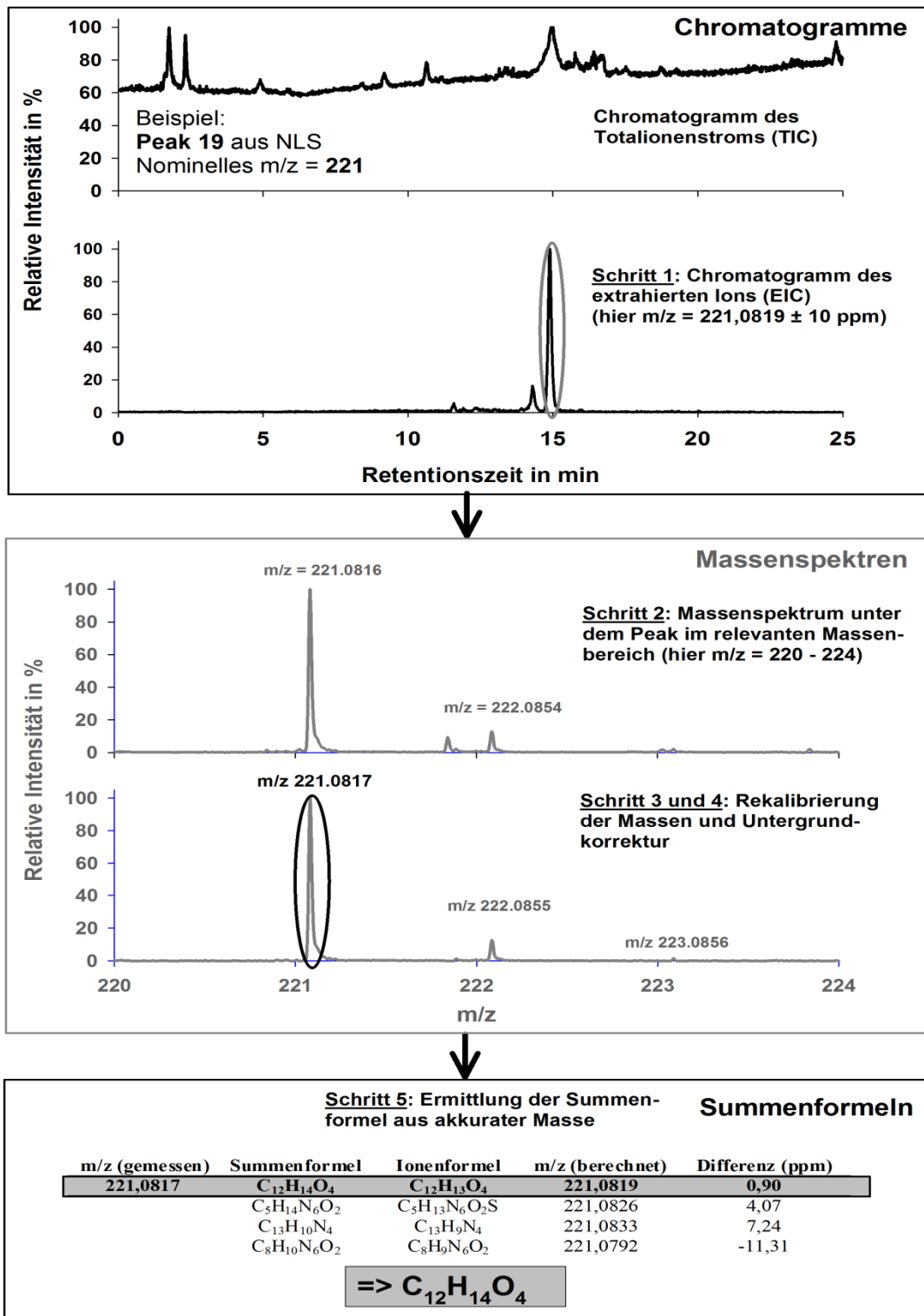


Abbildung 3.5: Darstellung der durchgeführten Schritte zur Ermittlung der Summenformeln der intensivsten Peaks aus den NLS am Beispiel von Peak 19 aus den Daten des Totalionenstroms (TIC) der LC-ESI-QTOF-MS-Messungen (MS-only) von B22 FS.

1. Nach der Messung einer Probe wurden aus dem *Total Ion Chromatogramm* (TIC) die relevanten Massenspuren extrahiert (*Extracted Ion Chromatogramm*, EIC). Dabei wurden nach der nominellen Masse (m/z) aus den NLS $\Delta m/z = 44$ gesucht. Da nur die nominelle Masse als Grundlage vorhanden war wurde ein relativ großer Massenbereich gewählt (Massenbereich: Nominelle Masse $\pm 0,5$ m/z).

2. Unter den auftretenden Peaks wurden Massenspektren im relevanten Massenbereich ermittelt. Der relevante Massenbereich erstreckte sich mindestens über den Bereich des Molekülions (M-H)⁺ plus der Kohlenstoffisotope.
3. Das Massenspektrum wurde im relevanten Massenbereich über die kontinuierlich zugegebenen Referenzmassen rekaliert.
4. Durch Subtraktion des Massenspektrums des Untergrundes vom relevanten Massenspektrum wurden Untergrundkorrekturen durchgeführt.
5. Die Summenformeln wurden aus den akkuraten Massen der Molekülionen (M-H)⁺ generiert. Dabei wurden die folgenden chemischen Elemente für die Erzeugung der Formeln zugelassen: C (n = 3-30), H (n = 0-120), N (n = 0-30), O (n = 0-30), S (n = 0-5), Cl (n = 0-3).

Die Güte der generierten Summenformel wurde aus der Differenz (ppm) zwischen theoretischer und gemessener akkurater Masse (Massenabweichung) ermittelt. Je geringer die Differenz umso sicherer ist die generierte Summenformel. Zusätzlich wurde zur Absicherung der Summenformeln der sogenannte "Score" berechnet, der sich neben der bereits angesprochenen Massenabweichung (*Mass Match*) zusätzlich aus den Isotopenverhältnissen (*Abundance* und *Spacing Match*) zusammensetzt (Müller et al. 2010). Summenformeln, die einen Score unter 80 besaßen wurden aussortiert.

b) Suspect Screening in Grundwasserproben

Zunächst wurde eine Liste potentieller Metabolite (*Suspects*) zusammengestellt (Tabelle A.7 im Anhang), die auf nachgewiesenen Metaboliten in der Literatur (Tabelle 2.4 in Kapitel 2.3.1) und in anderen Aquiferen basierte. In den Grundwasserproben aus dem Aquifer in Düsseldorf wurde basierend auf den akkuraten Massen (m/z) der Suspects von dieser Liste nach diesen Metaboliten gesucht (*Suspect Screening*). Nach der Messung einer Probe wurden aus dem Total-Ionen-Chromatogramm (TIC) die relevanten Massenspuren extrahiert (Extracted Ion Chromatogramm, EIC). Dabei wurden die akkuraten Massen (m/z) der Suspects mit einem relativ kleinen Massenbereich gesucht (Massenbereich: Akkurate Masse ± 10 ppm). Die weiteren Schritte der Datenanalyse erfolgten analog der Ermittlung der Summenformeln der intensivsten Peaks aus den NLS $\Delta m/z = 44$ (siehe a)

Summenformeln der intensivsten Peaks in einer Probe

Zusätzlich zu der Bestimmung von Summenformeln zur Identifizierung bestimmter Metabolite wurden von allen Proben die Summenformeln der intensivsten Peaks in der jeweiligen Probe ermittelt. Mit den elementaren Zusammensetzungen wurden Van-Krevelen-Diagramme erzeugt und diese für die Proben aus verschiedenen Bereichen eines Aquifers (z.B. kontaminierter Bereich und Abstrombereich) miteinander verglichen. Damit sollte die anthropogene Beeinflussung des DOC (z.B. durch Metabolite) in verschiedenen Bereichen der Aquifere untersucht werden (Kapitel 4.4.3).

Die Ermittlung der intensivsten Peaks ist über das Softwaretool Molecular Feature Extractor (MFE) in der Software MassHunter Qualitative Analysis (Fa. Agilent) möglich. Es erkennt chromatographische Peaks im TIC der Probe auf Basis der Massenspektren, extrahiert die

entsprechenden Ionenspuren (EIC) und generiert die Summenformeln automatisch. Die Einstellungen des MFE sind in Tabelle 3.8 aufgeführt. Die folgenden chemischen Elemente wurden für die Erzeugung der Formeln zugelassen: C (n = 3-30), H (n = 0-120), N (n = 0-30), O (n = 0-30), S (n = 0-5), Cl (n = 0-3). Aus Gründen der Vergleichbarkeit zwischen den Proben wurde eine bestimmte Anzahl an Peaks (n = 100) festgelegt (*Compound filter: Limit to the largest 100 Peaks*, Tabelle 3.8). Aus diesen mit MFE ermittelten 100 höchsten Peaks in einer Probe wurden solche aussortiert, die folgende festgelegte Qualitätskriterien nicht erfüllten: Massenabweichung < 3 ppm und Score > 80. Zusätzlich wurden unplausible Summenformeln eliminiert. Die Summenformeln der restlichen Peaks bildeten die Grundlage der Van-Krevelen-Diagramme (Kapitel 4.4.3).

Tabelle 3.8: Einstellungen des Molecular Feature Extractor (MFE) in der Software MassHunter Qualitative Analysis der Fa. Agilent zur Berechnung der akkuraten Massen und Summenformeln der intensivsten Peaks in einer Probe.

Extraction	Target data type:	Small molecules
	Restrict RT to:	4 - 30 min
	Restrict m/z to:	100 - 600
	Use peaks with height:	< 100 counts
Ion species:	Negative Ions:	[M-H] ⁻ , [M+Cl] ⁻ , [M+CH ₃ COO] ⁻
Charge state:	Peak spacing tolerance:	0,0025 m/z plus 5,0 ppm
	Maximum:	1
Compound filter:	Limit to the largest:	100

3.3.2.2 Ermittlung von hochaufgelösten Fragmentspektren (Targeted MS-MS)

Zur Aufklärung von unbekanntem Strukturen wurden zusätzlich hochaufgelöste Fragmentspektren mit LC-ESI-QTOF-MS (Targeted MS-MS) aufgenommen. Da das dafür verwendete Gerät erst am Ende dieser Arbeit zur Verfügung stand, konnten nur noch für ausgewählte Proben (Huminstoff-Isolate aus dem Gaswerksstandort Stuttgart, siehe Kapitel 3.1.2) hochaufgelöste Fragmentspektren ermittelt werden.

Das LC-ESI-QTOF-MS System bestand aus einer HPLC (Agilent 1260 Infinity, Waldbronn, Deutschland), die über eine ESI an ein QTOF-MS (6550 iFunnel QTOF-MS, Agilent, Waldbronn, Deutschland) gekoppelt war. Die genauen Einstellungen der Messungen sind in Tabelle 3.9 aufgelistet. Die Auswertung der Daten und die Generierung der Summenformeln aus den ermittelten akkuraten Massen erfolgte mit der Agilent MassHunter Qualitative Analysis Software.

Um die Vergleichbarkeit zu den Messungen am LC-ESI-QTOF-MS System beim Zweckverband Landeswasserversorgung zu prüfen wurden auch hier zunächst die Summenformeln (MS-only) der potentiellen Metabolite der intensivsten Peaks aus den NLS $\Delta m/z = 44$ ermittelt. Die daraus gewonnenen akkuraten Massen sowie akkurate Massen von Metaboliten aus einem Literaturabgleich bildeten die Vorläufer-Ionen (*Targeted Masses*) für die Erzeugung der Fragmentspektren. Neben den Huminstoff-Isolaten aus dem ehemaligen Gaswerksstandort Stuttgart wurden auch folgende Standards gemessen: BBS, NMBS, 2-NS,

2-BTS, 2-BFS 2-IS, 4-Hydroxy-3-methylbenzoesäure, 2-Hydroxy-3,5-dimethylbenzoesäure, 3-(4-Hydroxyphenyl)butansäure, 3-(4-Hydroxy-phenyl)propionsäure, 4-Hydroxy-3,5-dimethylbenzoesäure, 4-Hydroxyphenylessigsäure, 4-Methylsalicylsäure und 5-Methylisophthalsäure.

Tabelle 3.9: Einstellungen der LC-ESI-QTOF-MS-Messungen (MS-only und Targeted MS-MS).

HPLC	Säule:	UltraSep ES PHARM RP 18 (150 mm x 3 mm, 5 µm Partikel)
	Säulenofen	35 °C
	Fluss:	0,3 mL/min
	Eluent:	A: MilliQ + 0,1% Essigsäure B: Acetonitril + 0,1% Essigsäure
	Injektionsvolumen:	20 µL
	Gradientprogramm:	In 20 min von 20% B auf 70% B In 5 min von 70% B auf 100% B 5 min mit 100% B Post-Time: 10 min mit 20% B
ESI	Elektrospraymodus:	Negativ
	Trocknungsgas:	11 L/min
	Trocknungstemperatur:	225 °C
	Sheatgas:	12 L/min
	Sheatgastemperatur:	350°C
QTOF	<u>MS-only und Targeted MS-MS</u>	
	Kapillarspannung:	3500 V
	Fragmentor-Spannung:	165 V
	Skimmer-Spannung:	65 V
	Scanbereich:	100 – 10000 m/z
	Scan-Rate:	3 Spektren/Sekunde
	Referenzmassen:	ESI: 119,03632 und 966,00072
	<u>Targeted MS-MS</u>	
	MS/MS Scan-Rate	3 Spektren/Sekunde
	CE:	10, 20 und 40 eV
Targeted masses:	Akkurate Massen (m/z) der intensivsten Peaks aus den NLS $\Delta m/z = 44$ und von Standards	

3.3.3 GC-MS

Das in dieser Arbeit verwendete GC-MS-System bestand aus einem Gas-Chromatographen (HP 7890A, Agilent), einem Massendetektor (HP 5975C inert XL EI/CI MSD mit Triple Axis Detector, Agilent) und einem Autosampler (Multipurposesampler MPS2-Twister, Gerstel).

3.3.3.1 Messung von Toluol

Toluol wurde in den Batch-Experimenten (Kapitel 3.2.2) bestimmt, wo es als Substrat für die Bakterienkultur *G. toluenoydans* TMJ1 diente. Bevor die Toluol-Konzentration in den

Proben am GC-MS gemessen werden konnte, musste zunächst eine Flüssig-flüssig-Extraktion durchgeführt werden. Dabei wurde das Toluol aus der wässrigen Phase in die Hexan-Phase überführt und dort angereichert (Kapitel 3.3.7.2). Um die Wiederfindungsraten des Toluols zu bestimmen, wurde deuteriertes Toluol (Toluol-d8) als interner Standard zugesetzt. Die Einstellungen der Messungen sind in Tabelle 3.10 aufgelistet.

Tabelle 3.10: Einstellungen der GC-MS zur Messung von Toluol.

GC	Säule:	DB-5MS, Länge: 30 m, Filmdicke: 0,25 µm, Innendurchmesser: 0,25 mm, Hersteller: Agilent				
	Carrier-Gas:	Helium				
	Gas-Fluss:	1,4 L/min				
	Split:	1:10				
	Injektionsvolumen:	1 µL				
	Temperaturprogramm:	Für 7 min bei 40 °C Mit 7 °C/min auf 140 °C Für 1 min bei 140 °C				
MS	Solvent Delay:	3 min				
	Temperatur:	230 °C				
	Modus:	SIM				
			<u>Toluol:</u>		<u>Toluol-d8</u>	
	Masse:	m/z 91,1	m/z 92,1	m/z 99,2	m/z 100,2	
	Dwell Time:	100 ms	100 ms	100 ms	100 ms	

3.3.3.2 Derivatisierung und Messung von sauren Metaboliten

Zur Absicherung der Identifizierung von sauren Metaboliten, die mit den verschiedenen LC-MS-Messungen gefunden wurden, und für die kein Standard zur eindeutigen Identifizierung zur Verfügung stand, wurden GC-MS-Fragmentspektren aufgenommen.

Dabei wurde 5 mL der mit HCl auf einen pH-Wert von 2 angesäuerten Proben dreimal mit jeweils 1 mL Diethylether extrahiert. Dafür wurden sie nach Zugabe des Diethylethers für 1 min auf den Schüttler (Vortex) gestellt. Nach dem Schütteln wurde jeweils der Diethylether-Extrakt abgezogen und in ein weiteres Gefäß gefüllt. Die zusammengeführten Extrakte wurden anschließend unter einem moderaten N₂-Strom auf ca. 500 µL eingengt. Anschließend wurde 3 mL Methanol sowie einige Tropfen H₂SO₄ (98%) zugefügt und die aromatischen und heterozyklischen Carbon- bzw. Bernsteinsäuren (Metabolite) für 1 Stunde bei 50 °C derivatisiert (Säuremethylester). Die Lösung wurde dann dreimal mit jeweils 1 mL Hexan extrahiert, die Extrakte jeweils abgezogen und zusammengeführt und abschließend unter einem schonenden N₂-Strom auf ca. 10 µL eingengt. Die methylierten aromatischen und heterozyklischen Metabolite wurden anschließend mit GC-MS gemessen (Tabelle 3.11).

Tabelle 3.11: Einstellungen der GC-MS zur Messung von derivatisierten sauren Metaboliten.

GC	Säule:	DB-5MS, Länge: 30 m, Filmdicke: 0,25 μm , Innendurchmesser: 0,25 mm, Hersteller: Agilent
	Carrier-Gas:	Helium
	Gas-Fluss:	1,4 L/min
	Split:	Splitlos
	Injektionsvolumen:	2 μL (manuell)
	Temperaturprogramm:	Für 1 min bei 59 °C Mit 4 °C/min auf 250 °C
MS	Solvent Delay:	3 min
	Temperatur:	315 °C
	Modus:	Scan
	Massenbereich:	m/z 60 - 310
	Scan Rate:	0,8 Spektren/Sekunde

3.3.4 Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC)

Die Bestimmung des DOC in den verschiedenen Proben erfolgte je nach Konzentration entweder nach dem nasschemischen oder dem thermisch-katalytischen Prinzip. Vor der Messung wurden alle Proben einer Filtration (0,45 μm) unterzogen, um nur den DOC und nicht den TOC zu erfassen. Um anorganische Kohlenstoffverbindungen vor der Messung zu entfernen, wurden die Proben bei beiden Verfahren angesäuert und das dabei entstehende Kohlenstoffdioxid durch Ausgasung abgetrennt. Bei beiden Verfahren wurde der organische Kohlenstoffgehalt mit Kaliumhydrogenphthalat kalibriert.

Proben mit DOC-Konzentrationen, die unter $\rho(\text{DOC}) = 1 \text{ mg/L}$ lagen wurde der Shimadzu TOC-Analyzer (Modell TOC-V CSN) verwendet, dem die thermo-katalytische Oxidation zugrunde liegt. Dabei werden die organischen Verbindungen an einem Katalysator aus Platin bei 680 °C im Sauerstoffstrom zu Kohlendioxid verbrannt. Das entstandene Kohlendioxid wird mittels Infrarotspektrometrie detektiert und quantifiziert.

Proben mit DOC-Konzentrationen größer als $\rho(\text{DOC}) = 1 \text{ mg/L}$ wurden mit dem Sievers 820 TOC Analyzer analysiert, der auf dem nasschemischen Oxidationsverfahren basiert. Dabei werden organische Verbindungen durch Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat und unter Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda_1 = 186 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 254 \text{ nm}$) oxidiert. Die hierbei erzeugten OH-Radikale stellen das tatsächliche Oxidationsmittel dar. Das entstandene CO_2 wird, nach der Unterdrückung der Hintergrundleitfähigkeit durch Abtrennung der Ionen über eine semipermeable Membran (permeabel für Gase aber nicht für Ionen), über elektrische Leitfähigkeit quantifiziert.

3.3.5 LC-UV/DOC

Die filtrierten (0,45 μm) Proben wurden mithilfe eines Autosamplers (Modell 231 Bio Sample Injector, Gilson Abimed) injiziert. Als Eluent wurde ein Phosphatpuffer verwendet, der nach der Entgasung mittels einer HPLC-Pumpe isokratisch mit 1 mL/min durch die SEC-Säule gepumpt wurde. Nach der chromatographischen Trennung der organischen Komponenten

wurde die UV-Absorption bei $\lambda = 254$ nm (LCD 500, GAT Gamma Analysen Technik) und die Fluoreszenz bei $\lambda_{\text{ex}} = 254$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 430$ nm (HP 1046A, Hewlett Packard) kontinuierlich gemessen. Im Anschluss wurde die elektrische Leitfähigkeit über eine Durchflusszelle bestimmt (LDM/s, WTW) und der DOC gemessen. Der DOC wurde in einem Grätzel-Dünnschichtreaktor (Huber und Frimmel 1991) durch photochemische Oxidation der organischen Stoffe und anschließender CO_2 -Detektion durch Infrarotspektroskopie bestimmt. Simultan wird dabei der anorganische Kohlenstoffanteil der Probe kontinuierlich im oberen Teil des Reaktors entfernt. Tabelle 3.12 zeigt die wichtigsten Parameter des LC-UV/DOC Systems und der verwendeten Trennsäule.

Tabelle 3.12: Parameter der durchgeführten LC-UV/DOC Messungen.

Trennsäule:	TSK HW 50 S von Tosoh Bioscience
Säulenmaterial:	Copolymer aus Ethylenglykol und Methacrylsäure
Porengröße des Säulenmaterials:	12,5 nm
Partikelgröße des Säulenmaterials:	20 – 40 μm
Trennbereich:	500 – 20000 Da (Dextrane) 100 – 18000 Da (Polyethylenglykole) 500 – 80000 Da (globuläre Proteine)
Dimensionen der Säule:	250 x 20 mm (Länge x Durchmesser)
Ausschlussvolumen (V_0):	29,8 mL (bestimmt mit Dextran Blau)
Permeationsvolumen (V_p):	70 mL (bestimmt mit Methanol)
Eluent:	Phosphatpuffer bestehend aus: $\rho(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 2,5$ g/L; $\rho(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 1,5$ g/L pH = 6,8
Ansäuern zum Austreiben des anorg. Kohlenstoffs	Zugabe von 0,5 mL/min H_3PO_4 -Lösung (5 mL $\text{H}_3\text{PO}_4(\text{konz.})/\text{L}$) nach der SEC-Trennsäule
Injektionsvolumina	Säule: 500 μL Bypass: 50 μL
Detektoren	DOC, UV ($\lambda = 254$ nm), Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex}} = 254$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 430$ nm), elektrische Leitfähigkeit

Um den chromatographierbaren Anteil des DOC (cDOC) zu bestimmen, wurden die Proben zusätzlich im Bypass gemessen. Dabei wurden sie ohne vorherige chromatographische Auftrennung im Grätzel-Dünnschichtreaktor oxidiert. Die Differenz des DOC der Bypass-Messung und des gesamten DOC der Säulenmessung ergab den cDOC.

Zur Bestimmung des Ausschlussvolumens V_0 wurde Dextran Blau (Molmasse: 20000 g/mol) verwendet, das aufgrund seiner Größe nicht in die Poren eindringen kann. Das Permeationsvolumen V_p wurde mit Methanol (DOC-Detektion) bestimmt, das in jede Pore eindringen und somit den intrapartikulären Porenraum vollständig ausnutzen kann.

Zur Messung der verschiedenen FS-Fractionen wurden jeweils 5 mg der Fractionen in 250 mL MilliQ gelöst und anschließend filtriert (0,45 μm). Davon wurden 500 μl auf die SEC-Säule und 50 μl in den Bypass injiziert.

3.3.6 UV/VIS-Spektroskopie

Die UV/VIS-Spektroskopie wurde eingesetzt, um die Fe(II)-Konzentration bei den Wachstums- und Abbauxperimenten (Batch-Experimenten) mit der eisenreduzierenden Bakterienkultur *G. toluenoxydans* TMJ1 zu messen und damit Hinweise auf das Wachstum der Kultur und den Abbau der Schadstoffe zu erhalten (Kapitel 3.2).

Es wurde das UV/VIS-Spektralphotometer Cary 50 der Firma Varian (Darmstadt) verwendet. Die Fe(II)-Konzentration wurde photometrisch bei $\lambda = 562$ nm nach der Zugabe von Ferrozin zu den angesäuerten Proben gemessen (Stookey 1970). Ferrozin reagiert ausschließlich mit dem zweiwertigen Eisen und bildet einen stabilen magentafarbenen Komplex.

Zur Messung der Fe(II)-Konzentration wurden folgende Lösungen hergestellt:

- HCl: $c(\text{HCl}) = 0,1$ mol/L in MilliQ
- Ammoniumacetat: $\rho(\text{CH}_3\text{COONH}_4) = 5$ g/L in MilliQ
- Ferrozin: $\rho(\text{Ferrozin}) = 5$ mg/L in obiger Ammoniumacetat-Lösung.

Kalibrierung

Zur Kalibrierung wurden Fe(II)-Standardlösungen aus Eisen(II)chlorid-Tetrahydrat mit folgenden Konzentrationen an Fe(II) hergestellt: $c(\text{Fe(II)}) = 0,1$ mmol/L, 0,25 mmol/L, 0,5 mmol/L, 1,0 mmol/L, 1,5 mmol/L, 2 mmol/L und eine Blindprobe. Die Lösungen wurden in 0,1 molarer HCl und erst kurz vor der Messung angesetzt um das Ausfallen von Eisenspezies und das Auftreten von Oxidationsprozessen zu verhindern. 75 μL der Standardlösungen wurden mit 2,925 mL der Ferrozin-Lösung vermischt und in Vollküvetten gegeben. Diese Lösungen wurden am Photometer bei $\lambda = 562$ nm gemessen.

Messung der Proben

0,2 mL der aus den Batch-Gefäßen genommenen Proben wurden mit 1,8 mL HCl Lösung ($c(\text{HCl}) = 0,1$ mol/L) gemischt (Verdünnung 1 zu 10). Davon wurde 75 μL zu 2,925 mL der Ferrozin-Lösung in Vollküvetten gegeben. Diese Lösung wurde am Photometer bei $\lambda = 562$ nm gemessen.

3.3.7 Anreicherungsverfahren

3.3.7.1 Festphasenanreicherung (SPE)

Die Durchführung einer Festphasenanreicherung der Proben aus den Batch-Experimenten mit *G. toluenoxydans* TMJ1 war aus zwei Gründen notwendig:

1. Die Matrix der Proben war sehr salz- und eisenhaltig (Nährlösung der Bakterien), was ohne Abtrennung durch Festphasenanreicherung Probleme bei der Messung mit LC-ESI-MS/MS gegeben hätte (Ionensuppression).
2. Die Metabolite (BBS) und Cometabolite lagen teilweise nur in sehr niedrigen Konzentrationen vor und ohne Anreicherung unter der Nachweisgrenze der LC-ESI-MS/MS-Methode (Kapitel 3.3.1).

Da das Probenvolumen bei den einzelnen Probenahmen aus den Batch-Experimenten sehr begrenzt war (6 mL) und teilweise verschiedenen Messungen durchgeführt wurden (siehe

Kapitel 3.2.2.2) konnte nur 4 mL für die Festphasenanreicherung verwendet werden. Daraus ergab sich ein Anreicherungsfaktor von 4. Der Ablauf der Anreicherung wird in Abbildung 3.6 beschrieben.

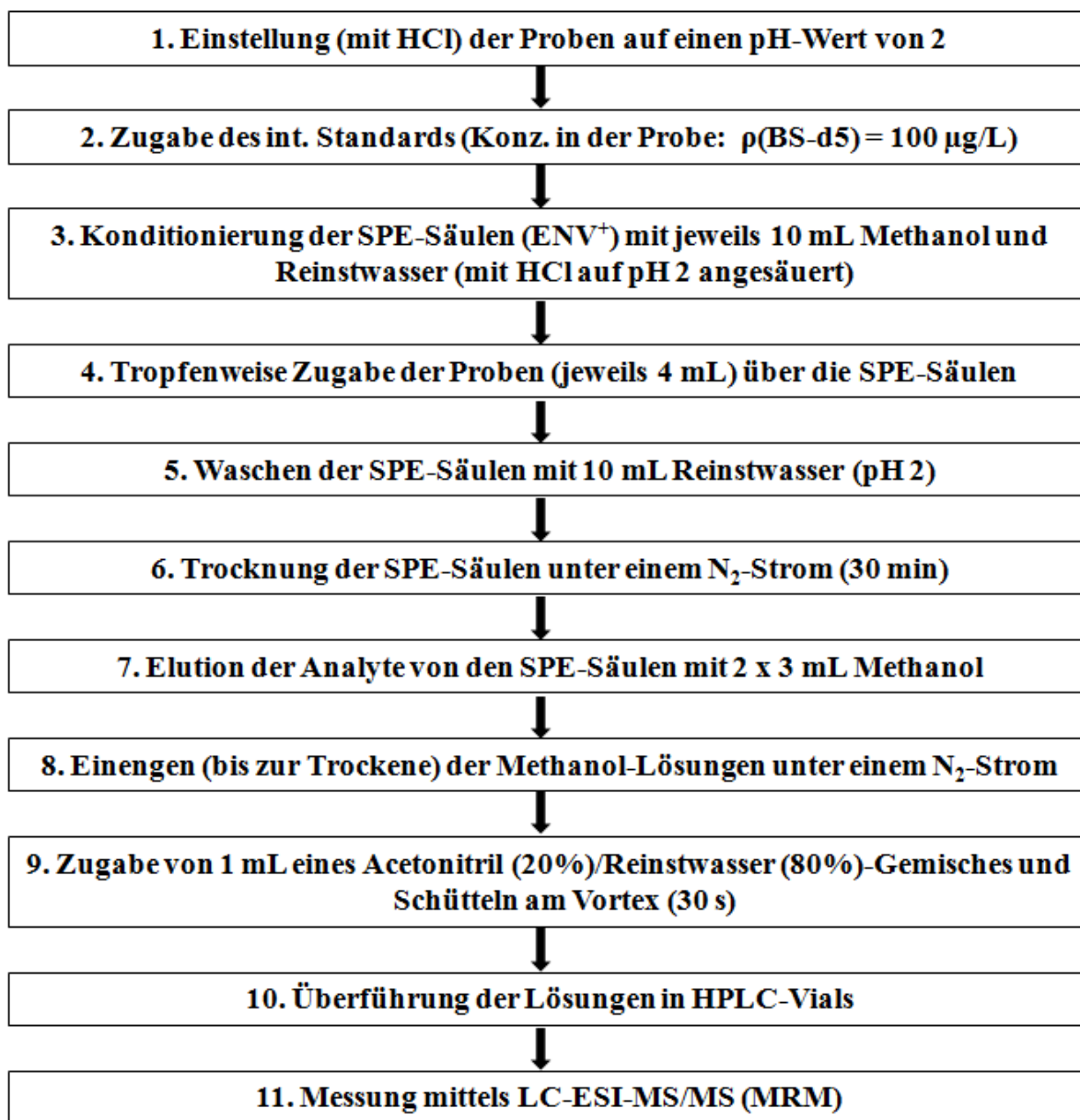


Abbildung 3.6: Ablauf der SPE-Anreicherung.

Zur Messung des Metaboliten BBS wurde als interner Standard Benzoessäure-d5 (BS-d5) zugegeben, um trotz der weitgehenden Abtrennung der Matrix möglicherweise auftretende Matrixeffekte zu erkennen und rechnerisch zu korrigieren. Als SPE-Anreicherungskartuschen wurden Isololute ENV+ Kartuschen der Firma Biotage verwendet.

3.3.7.2 Flüssig-flüssig-Extraktion

Die Flüssig-flüssig-Extraktion wurde genutzt, um Toluol aus der wässrigen Phase in eine organische Phase zu überführen, dort anzureichern und anschließend am GC/MS-System zu messen. Da die wässrige Phase nicht direkt in das GC-MS System eingespritzt werden kann, war dies ein notwendiger Schritt.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten des Toluols wurde Toluol-d8 als interner Standard verwendet. Zu diesem Zweck wurde eine Hexan-Lösung mit einer bekannten Toluol-d8 Konzentration versetzt. Danach wurde 1 mL der Probe aus den Probenahmen der Batch-Experimente (Kapitel 3.2) mit 1 mL der hergestellten Hexan-Lösung (mit Toluol-d8) in einem 4 mL Vial vermischt und 1 Stunde geschüttelt. Anschließend wurde die Hexan-Phase mit einer Pasteurpipette abgezogen, in ein HPLC-Vial gefüllt und am GC-MS gemessen (Kapitel 3.3.3.2).

3.3.7.3 Huminstoffanreicherung

Die Huminstoffanreicherung wurde an einem XAD8-Harz durchgeführt. Diese Prozedur wurde zuerst bei Mantoura und Riley (1975) und etwas abgeändert bei Abbt-Braun et al. (1991) beschrieben. Das XAD8-Harz besteht aus hydrophobem, aromatischem Methylmethacrylat Copolymer der Firma Merck (Amberlite Harz). Die einzelnen Schritte der Anreicherung werden kurz erläutert und sind in Abbildung 3.7 dargestellt.

Die Proben wurden zunächst durch Celluloseacetatfilter (0,65 μm und 0,45 μm) filtriert, so dass nur noch der gelöste Anteil der Huminstoffe vorlag. Anschließend wurde die Probe mit konzentrierter HCl auf einen pH-Wert von 2 eingestellt und über die XAD8-Säule gepumpt (Pumpe: LKB P-6000, Fa Pharmacia). Die Huminstoffe wurden dabei auf dem Harz adsorbiert und der Nichthuminstoffanteil (NHS) lief durch die Säule durch. Während dieses Vorgangs wurden kontinuierlich Proben im Abstrom genommen, um den DOC-Gehalt zu kontrollieren. Danach wurden die Huminstoffe mittels NaOH mit $c(\text{NaOH}) = 0,2 \text{ mol/L}$ wieder von der XAD8-Säule desorbiert, gesammelt und die Lösung ($V = 7 \text{ L}$) sofort wieder mit HCl (37%) auf einen pH-Wert von 2 eingestellt. Dabei fielen die größeren, hydrophoberen und schwerer löslicheren HS aus. Die ausgefallenen HS wurden mit Hilfe von 10 minütiger Zentrifugation bei 8000 U/min (ROTANTA 460RS, Fa Hettich) mit anschließendem Dekantieren sowie Filtration von den FS abgetrennt. Anschließend wurden sie gefriergetrocknet (Gefriertrocknungsanlage: Alpha 2-4 LDC-1M, Fa Christ), mit dem Mörser homogenisiert und gewogen. Das Filtrat mit den FS wurde wieder auf die XAD8-Säule gepumpt und die FS adsorbierten wiederum am XAD8-Harz. Nachdem die Säule mit demineralisiertem Wasser chlorid-frei gespült wurde, wurden die FS mittels NaOH mit $c(\text{NaOH}) = 0,2 \text{ mol/L}$ wieder desorbiert und direkt über einen Kationentauscher in H^+ -Form (Dowex 50 WX 8, Fa Roth) gegeben. Dadurch wurde der durch die NaOH-Lösung eingetragene hohe Natriumanteil aus der Lösung mit den FS durch Ionenaustausch entfernt. Dieser Schritt war notwendig, damit nicht während der anschließenden Gefriertrocknung der FS hohe Mengen an NaCl auskristallisierten. Die FS-Lösung wurde mittels des Shell-freezing Verfahrens bei ca. $-30 \text{ }^\circ\text{C}$ im Ethanol-Kältebad (K-40 FDC-1, Fa Christ) schichtweise eingefroren. Abschließend wurden die FS gefriergetrocknet, mit dem Mörser homogenisiert und ausgewogen. Das Ergebnis der Huminstoffanreicherung waren zwei Feststoff-Fractionen: FS-Fraktion und HS-Fraktion. Diese wurden gekühlt und im Dunkeln gelagert.

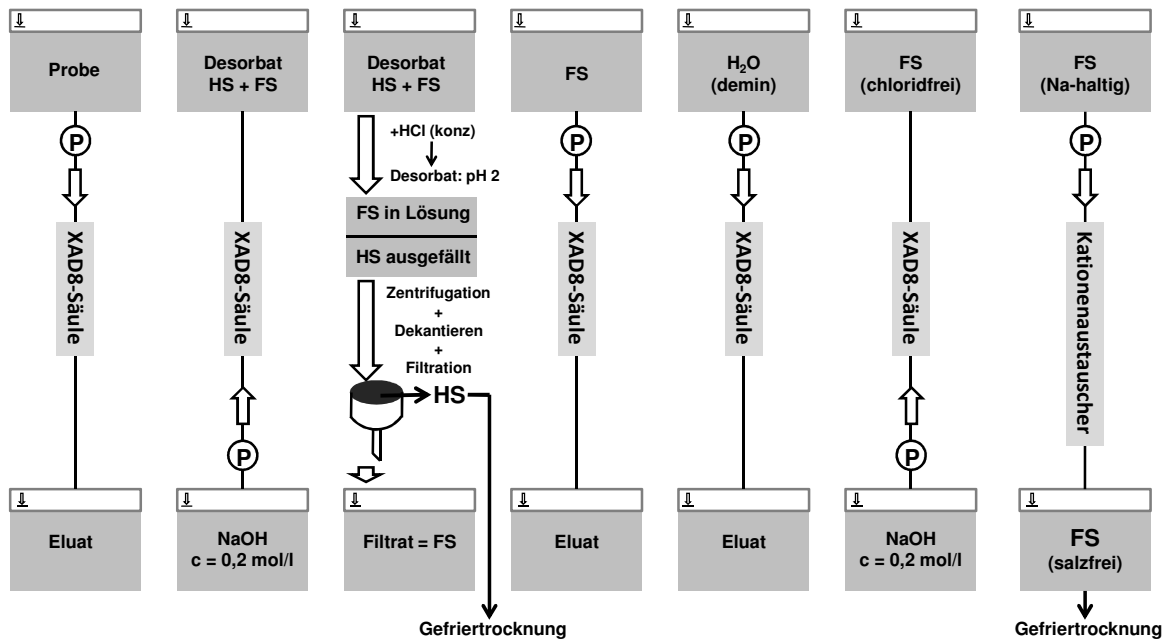


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Huminstoffanreicherung.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1 Analytik saurer aromatischer und heterozyklischer Metabolite

Zum Screening, zur Identifizierung und zur Quantifizierung von aromatischen und heterozyklischen Metaboliten sind verschiedene analytische Messtechniken und Methoden genutzt worden. Die Ergebnisse sowie die Vor- und Nachteile dieser Methoden werden in den folgenden Kapiteln an zwei unterschiedlichen Probenarten demonstriert:

1. Huminstoff-Isolate aus dem ehemaligen Gaswerksstandort in Stuttgart (Kapitel 4.1.1)
2. Grundwasserproben aus dem HR-MLW des ehemaligen Gaswerksstandortes in Düsseldorf (Kapitel 4.1.2)

4.1.1 Saure Metabolite in Huminstoff-Isolaten aus dem Aquifer in Stuttgart

Die Schritte, die zum Screening und zur Identifizierung von sauren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten in den Huminstoff-Isolaten aus dem Aquifer in Stuttgart (siehe Kapitel 3.1.2) durchgeführt wurden, sind in Abbildung 4.1 schematisch dargestellt.

Der erste Schritt war ein spezifisches Screening nach sauren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten in den Huminstoff-Fractionen durch Neutral-Loss-Scans (NLS) mittels LC-ESI-MS/MS. Bei NLS werden strukturelle Charakteristika von Substanzen ausgenutzt (z.B. funktionelle Gruppen), die gleiche Fragmente erzeugen (siehe Kapitel 2.4.2.1). Als Neutralverluste wurden $\Delta m/z = 44$ und $\Delta m/z = 116$ ausgewählt, die typisch für Säure- bzw. Bernsteinsäuregruppen sind. Um aufzuzeigen warum diese Neutralverluste besonders geeignet sind und ausgewählt wurden, werden in Kapitel 4.1.1.1 typische Fragmentspektren aromatischer und heterozyklischer Säuren und Bernsteinsäuren eingehend diskutiert. Dieser außergewöhnliche Screening-Ansatz durch NLS mittels LC-ESI-MS/MS unterscheidet sich deutlich zu den meisten anderen Screening-Studien nach polaren Metaboliten von organischen Schadstoffen in wässrigen Proben. Dort wird ausschließlich die LC-ESI-QTOF-MS zum Screening eingesetzt (z.B. Kern et al. 2009, Krauss et al. 2010, Aguera et al. 2013).

Zur Identifizierung der intensivsten Signale aus dem Screening mit NLS wurden in den nächsten Schritten LC-ESI-QTOF-MS-Messungen (MS-only und Targeted MS-MS) durchgeführt um deren Summenformeln und hochaufgelöste Fragmentspektren zu ermitteln. Die Summenformeln wurden anschließend mit einer Liste mit Summenformeln von potentiellen Metaboliten verglichen um Strukturvorschläge (potentielle Metabolite) zu ermitteln. Diese Liste basierte auf einer Literatursuche nach sauren Metaboliten von aromatischen, polyaromatischen, bipyklischen und heterozyklischen Metaboliten, die in Batch-Experimenten und/oder in Feldproben nachgewiesen wurden (siehe Tabelle 2.4 in Kapitel 2.3.1).

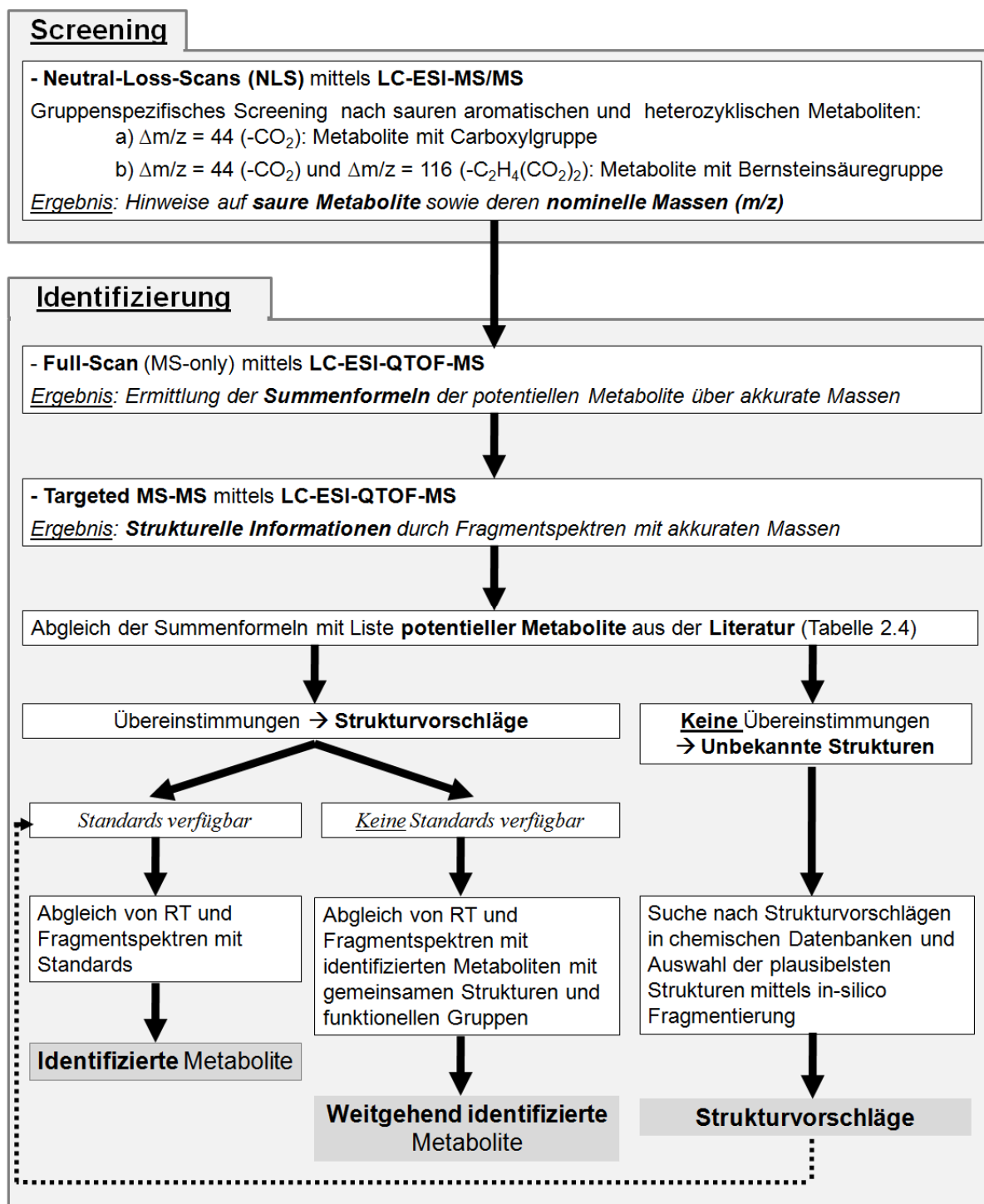


Abbildung 4.1: Ansatz zum Screening und zur Identifizierung von sauren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten in den Huminstoff-Isolaten aus dem Aquifer in Stuttgart.

Über den Vergleich von RT und Fragmentspektren mit entsprechenden Standards konnte eine eindeutige Identifizierung von einigen Metaboliten erreicht werden. Für die potentiellen Strukturformeln aus dem Literaturabgleich für die keine Standards zur Verfügung standen, konnte über den Vergleich von RT und Fragmentenspektrum mit identifizierten Metaboliten, die gemeinsamen Strukturen und funktionellen Gruppen aufwiesen, eine weitgehende Identifizierung erfolgen.

Bei den Peaks für die der Abgleich mit der Literatur keine potentiellen Strukturformeln hervorbrachte, wurden plausible Strukturvorschläge mit Hilfe des Programms MetFrag (Wolf et al. 2010, Neumann und Böcker 2010, Zedda und Zwiener 2012) ermittelt, was folgende Schritte durchführt:

- Suche nach Strukturvorschlägen in den chemischen Datenbanken KEGG (Kanehisa und Goto 2000), PubChem (Bolton et al. 2008) und ChemSpider (Pence und Williams 2010) basierend auf den ermittelten Summenformeln.
- Erzeugung von in-silico Fragmentierungen der entsprechenden Strukturvorschläge.
- Abgleich der in-silico erzeugten theoretischen Fragmente der Strukturvorschläge mit den gemessenen Fragmenten der hochaufgelösten Spektren. Dies führt zu einer Rangfolge der plausibelsten Strukturvorschläge.

Diese Schritte erfolgten nach Eingabe der entsprechenden Summenformel, der Polarität der Ionisierung (hier: negativ), des Suchfensters von 10 ppm und den entsprechenden gemessenen hochaufgelösten Fragmentspektren. Es wurden jeweils hintereinander Suchen mit den Fragmentspektren aller drei gemessenen Kollisionsenergien (CE = 10, 20 und 40 eV) durchgeführt. Die Nutzung der in-silico Fragmentierung war zwingend notwendig, da eine alleinige Suche mit der Summenformel in chemischen Datenbanken eine zu große Anzahl an Vorschlägen hervorbrachte. Für die plausibelsten Strukturen wurden anschließend Standards erworben um über die RT und das Fragmentspektrum die genaue Struktur zuzuordnen. Aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit einiger Standards und der Vielzahl möglicher Isomere konnten nicht für alle plausiblen Strukturen Standards erhalten werden.

Die Ergebnisse der einzelnen Schritte werden in den Kapiteln 4.1.1.2 und 4.1.1.3 eingehend diskutiert.

4.1.1.1 Typische LC-ESI-MS/MS-Fragmentspektren

Anhand von Fragmentspektren von Standards saurer aromatischer und heterozyklischer Metaboliten werden zunächst beispielhaft deren typische Fragmentierungsmuster bei der LC-ESI-MS/MS gezeigt (Abbildung 4.2) sowie die Limitierungen in der Aussagekraft dieser Spektren dargestellt. Dabei wird deutlich, warum NLS eine geeignete Methode zum Screening nach dieser Substanzklasse ist und wie die in dieser Arbeit genutzten Neutralverluste ausgewählt wurden.

Da die ESI eine "weiche" Ionisierungstechnik ist, ist in allen Fragmentspektren bei moderaten Kollisionsenergien der Molekül-Peak ($M-H$) zu erkennen (Abbildung 4.2). Der Neutralverlust einer Carboxylgruppe ($-CO_2$, $\Delta m/z = 44$) ist das einzige intensive Fragment für aromatische und heterozyklische Säuren was auf die Stabilität des aromatischen bzw. heterozyklischen Ringes zurückzuführen ist. Die wird zum Beispiel deutlich bei 2-Naphthoesäure (2-NS) (Abbildung 4.2 A) und 2-Benzothiophensäure (2-BTS) (Abbildung 4.2 D). Außer des negativ ionisierten intakten Naphthalin- ($m/z = 127,0$) sowie Benzothiophen-Rings ($m/z = 133,0$) ist bei moderaten Kollisionsenergien (hier: CE = 20 eV) kein weiteres intensives Fragment vorhanden. Das Auftreten von nur einem intensiven Neutralverlust ($-CO_2$) bei negativ ionisierten aromatischen Carboxylsäuren wird auch von der Studie von Levsen et al. (2007)

unterstützt, die Fragmentierungen (Neutralverluste) von 121 Modellstoffen (hauptsächlich Aromaten) mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen mittels ESI-MS/MS untersuchten.

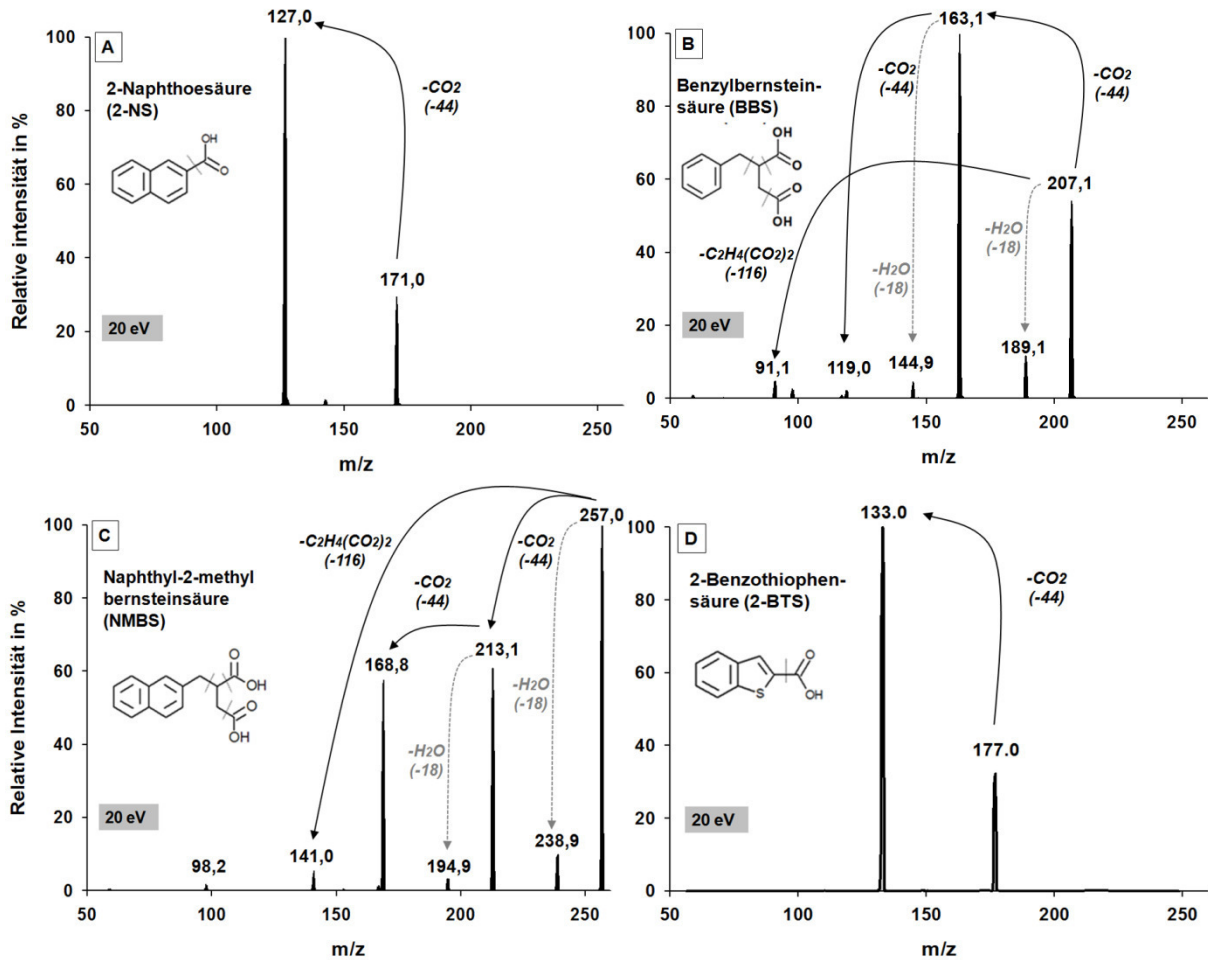


Abbildung 4.2: Typische LC-ESI-MS/MS-Fragmentspektren (Product-Ion-Scans bei einer Kollisionsenergie von $CE = 20$ eV) von Standards aromatischer (A) und heterozyklischer Säuren (D) sowie aromatischer Bernsteinsäuren (B, C) am Beispiel von 2-NS (A), BBS (B), NMBS (C) und 2-BTS (D). In den Strukturformeln ist die Fragmentierung angedeutet (gepunktete Linie).

Die Fragmentspektren der aromatischen und heterozyklischen Bernsteinsäuren hingegen zeigen mehr charakteristische Neutralverluste, die aber auch ausschließlich auf die saure funktionelle Gruppe (Bernsteinsäure) zurückzuführen sind (Abbildung 4.2 B,C). Sie sind charakterisiert durch die Neutralverluste von zwei Carboxylgruppen (jeweils -CO₂, $\Delta m/z = 44$) sowie der gesamten Bernsteinsäuregruppe (-C₂H₄(CO₂)₂, $\Delta m/z = 116$). Die zusätzlich auftretenden Neutralverluste von -H₂O ($\Delta m/z = 18$) stammen auch von den Carboxylgruppen. Es stehen also zwei charakteristische Neutralverluste zur Verfügung ($\Delta m/z = 44$ und $\Delta m/z = 116$), die zwangsläufig beide vorhanden sein müssen, wenn es sich um eine Bernsteinsäure handelt. Das bringt einen großen Vorteil. Denn mit der Anwendung eines NLS mit $\Delta m/z = 116$ lassen sich aromatische sowie heterozyklische Bernsteinsäuren eindeutig von den entsprechenden Carboxylsäuren unterscheiden. Es ist aber deutlich in Abbildung 4.2 B,C zu erkennen, dass die Neutralverluste von -CO₂ intensivere Signale zeigen

als die Abspaltung der gesamten Bernsteinsäuregruppe $-C_2H_4(CO_2)_2$. NLS mit $\Delta m/z = 116$ werden also etwas unempfindlicher sein als solche mit $\Delta m/z = 44$.

Die Anwendung höherer Kollisionsenergien (z.B. von CE = 30 eV oder 40 eV) ergibt überwiegend keine weiteren charakteristischen Fragmente bei aromatischen und heterozyklischen Säuren und Bernsteinsäuren. Meist resultieren sie in Fragmentspektren mit vielen nicht charakteristischen Fragmenten geringerer Intensität, die auf unspezifischen Fragmentierungen der aromatischen oder heterozyklischen Ringe beruhen. Diese sind häufig nicht spezifisch genug um als charakteristisch für den jeweiligen stabilen Rest herangezogen zu werden.

Obwohl die Fragmentierung fast ausschließlich von den funktionellen Gruppen herrührt, sind die relativen Intensitäten der Fragmente zueinander bei gleichen funktionellen Gruppen aber verschiedenen stabilen Resten unterschiedlich. Dies wird beispielsweise bei den gemessenen aromatischen Bernsteinsäuren deutlich. BBS (Abbildung 4.2 B) zeigt ganz andere Intensitäten der durch die Neutralverluste erzeugten Fragmente als NMBS (Abbildung 4.2 C). Der entscheidende Faktor für die Intensitäten der Fragmente zueinander ist also die Struktur und Größe des stabilen Restes. Somit können die Intensitäten der Fragmente zueinander zur Identifizierung von Metaboliten verwendet werden.

Zusammengefasst haben die LC-ESI-MS/MS-Fragmentspektren ausgewählter Substanzen saurer aromatischer und heterozyklischer Metabolite Folgendes gezeigt:

- Aromatische und heterozyklische Säuren können gut von den entsprechenden Bernsteinsäuren unterschieden werden, da sich die Monocarbonsäuren durch einen Neutralverlust ($-CO_2$, $\Delta m/z = 44$), jedoch die entsprechenden Bernsteinsäuren durch zwei Neutralverluste ($-CO_2$, $\Delta m/z = 44$ und $-C_2H_4(CO_2)_2$, $\Delta m/z = 116$) auszeichnen. Somit können NLS mittels LC-ESI-MS/MS mit diesen Neutralverlusten sehr gut zum Screening dieser Verbindungen verwendet werden.
- Die Fragmentspektren werden nahezu ausschließlich durch die funktionellen sauren Gruppen bestimmt (Abspaltung von CO_2 bzw. $C_2H_4(CO_2)_2$). Es kommt häufig zu keinen spezifischen Fragmenten des stabilen aromatischen und heterozyklischen Restes. Die relative Intensität der Fragmente zueinander bei gleicher funktioneller Gruppe und CE ist jedoch stark abhängig vom stabilen Rest (aromatischer bzw. heterozyklischer Ring), was zur Identifizierung von Metaboliten genutzt werden kann.

4.1.1.2 Screening mittels Neutral-Loss-Scans (NLS)

Die Ergebnisse der NLS $\Delta m/z = 44$ und $\Delta m/z = 116$ der FS-Fractionen B22 FS und B53 FS sind in Abbildung 4.3 dargestellt und in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

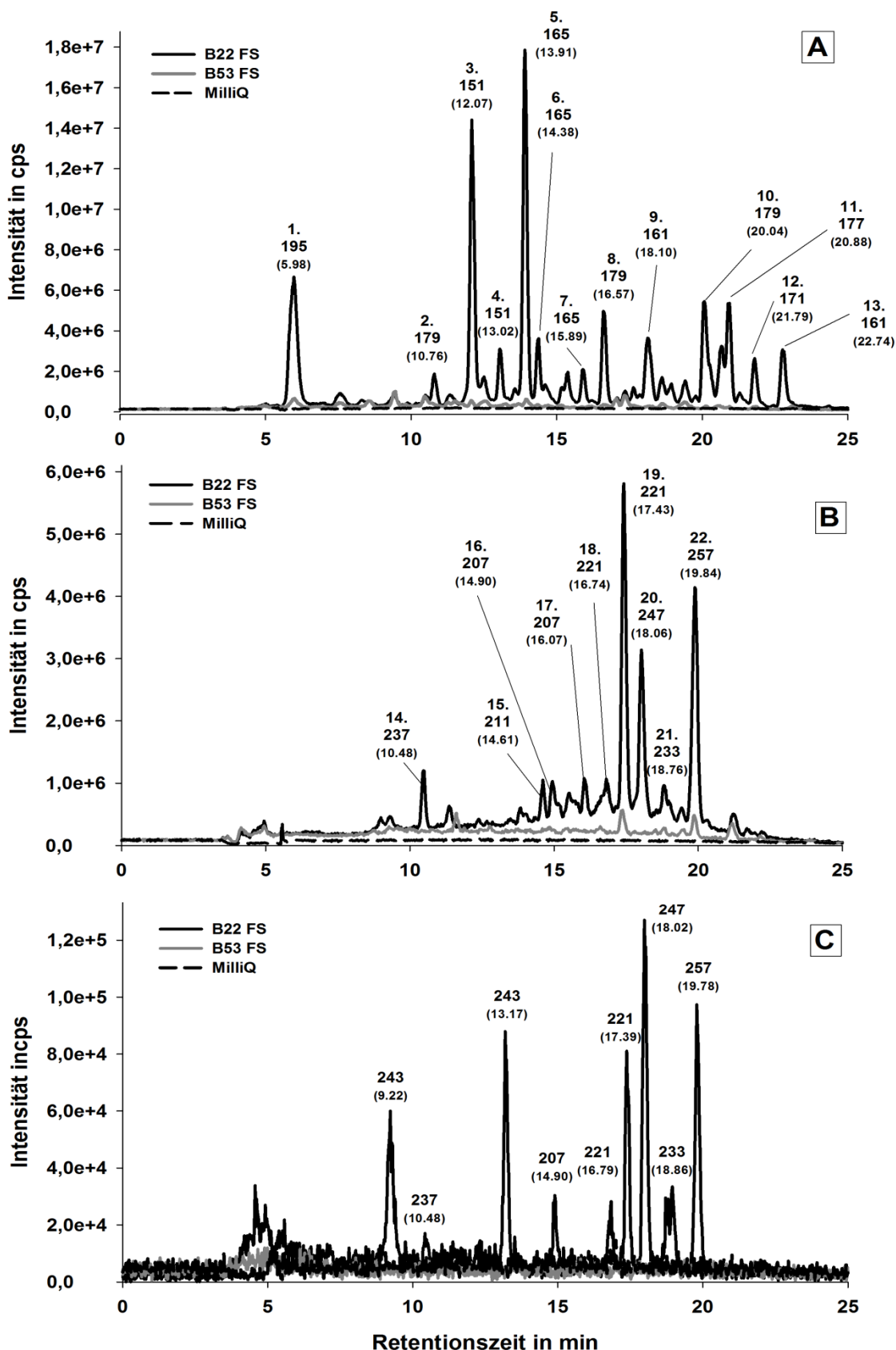


Abbildung 4.3: Chromatogramme der NLS $\Delta m/z = 44$ (A und B) und $\Delta m/z = 116$ (C) der unterschiedlichen FS-Fractionen aus dem Aquifer in Stuttgart (Probenahmestellen: B22 und B53) und MilliQ. Scan-Bereiche: $m/z = 140-200$ (A) und $m/z = 200-260$ (B und C). Die intensivsten Peaks sind durchnummeriert (A und B) und über den Peaks die Masse (m/z) der jeweiligen Vorläufer-Ionen sowie die Retentionszeit (in Klammern) angegeben (A, B und C).

Vor der detaillierten Betrachtung der Ergebnisse der NLS noch einige Anmerkungen:

- Die NLS wurden in relativ engen Scan-Bereichen von $m/z = 60$ (z.B. $m/z = 140 - 200$) durchgeführt, um eine gute Empfindlichkeit beim Screening zu erzielen. Peaks tauchten nahezu ausschließlich in den Bereichen $m/z = 140 - 200$ und $m/z = 200 - 260$ auf, so dass im Rahmen dieser Arbeit nur auf diese eingegangen wird.
- Obwohl NLS nicht sehr selektive Methoden sind konnte durch einen relativ langsam ansteigenden Anteil des organischen Eluenten während des chromatographischen Laufes (Kapitel 3.3.1.1) eine gute Trennung der Peaks erreicht werden.

Die meisten Peaks mit den höchsten Intensitäten sind in den Chromatogrammen der FS-Fraktion aus dem kontaminierten Bereich (B22 FS) zu finden (Abbildung 4.3 A,B). Beispiele dafür sind die Peaks 1 - 13 im Massenbereich $m/z = 140 - 200$ und die Peaks 14 - 22 im Massenbereich $m/z = 200 - 260$. Beim Vergleich der Intensitäten der Peaks im NLS $\Delta m/z = 44$ in den verschiedenen Massenbereichen (Abbildung 4.3 A,B) sind im Mittel höhere Intensitäten im unteren Massenbereich von $m/z = 140 - 200$ zu finden. Das lässt auf höhere Konzentrationen der Metabolite in diesem Bereich schließen. Diese Abschätzungen sind jedoch nur unter Vorbehalt zu sehen, da

- die Metabolite mit ESI unterschiedlich gut ionisiert werden und somit gleiche Konzentrationen verschiedener Metabolite deutlich unterschiedliche Intensitäten im Chromatogramm erzeugen können,
- die Neutralverluste von $\Delta m/z = 44$ und $\Delta m/z = 116$ unterschiedlich intensiv sind je nach Größe und Struktur des Restes und
- die Metabolite während des Prozesses der Huminstoffanreicherung unterschiedlich stark aufkonzentriert wurden und die Wiederfindungsraten nicht bekannt sind.

Zur Differenzierung welche Peaks aromatischen oder heterozyklischen Bernsteinsäuren zugeordnet werden können wurden zusätzlich NLS mit $\Delta m/z = 116$ in denselben Massenbereichen durchgeführt. Abbildung 4.3 C zeigt, dass einige Peaks der Probe B22 FS im Massenbereich $m/z = 200 - 260$ auch im NLS $\Delta m/z = 116$ auftreten. Sie zeigen die gleiche Masse (m/z) des Vorläufer-Ions und vergleichbare Retentionszeiten. Das ist ein klarer Hinweis, dass die Peaks 14, 16 und 18-22 durch aromatische oder heterozyklische Bernsteinsäuren hervorgerufen werden. Diese Peaks beinhalten die intensivsten Signale in diesem Massenbereich. Die anderen Peaks aus den NLS $\Delta m/z = 44$ können aufgrund von fehlenden Peaks in den NLS $\Delta m/z = 116$ nicht durch Bernsteinsäuren verursacht worden sein. Im Massenbereich $m/z = 200 - 260$ traten keine Signale im NLS $\Delta m/z = 116$ auf, da möglicherweise dieser Massenbereich zu gering für aromatische und heterozyklische Bernsteinsäuren ist.

Im Vergleich zum NLS $\Delta m/z = 44$ sind die Intensitäten der Peaks im NLS $\Delta m/z = 116$ geringer, da wie bereits gezeigt die Abspaltung des Bernsteinsäurerest (-116) im Massenspektrum häufig deutlich unempfindlicher ist als die Abspaltung der Carboxylreste (-44) (siehe Abbildung 4.2 in Kapitel 4.1.1.1). Die Peaks mit $m/z = 243$ und den Retentionszeiten 9,22 min und 13,17 min im NLS $\Delta m/z = 116$ (Abbildung 4.3 C) können

weder aromatische und heterozyklische Säuren noch Bernsteinsäuren sein, da es keine entsprechenden Peaks im NLS $\Delta m/z = 44$ gibt (Abbildung 4.3 B). Dieses Beispiel zeigt den Vorteil von Substanzen für die zwei empfindliche Neutralverluste zur Verfügung stehen (wie hier bei den aromatischen und heterozyklischen Bernsteinsäuren). Ohne die Absicherung des NLS $\Delta m/z = 44$ hätte der positive Befund in den NLS $\Delta m/z = 116$ ein falsch positives Ergebnis geliefert.

Grundsätzlich stellt sich bei der Anwendung der NLS zum Screening nach sauren Metaboliten in FS-Isolaten die Frage, ob bei anthropogen kaum beeinflussten FS-Isolaten nicht auch deutliche Signale in den NLS $\Delta m/z = 44$ und $\Delta m/z = 116$ auftreten müssten? Wenn dies der Fall wäre, würde es die Nutzung dieser NLS zum selektiven Screening nach sauren Metaboliten stark einschränken. "Natürliche" FS weisen wie aromatische und heterozyklische Metabolite stabile Strukturen mit Carboxylgruppen auf und zeigen neben sukzessiven Wasserabspaltungen ($-H_2O$, $\Delta m/z = 18$) vor allem auch Abspaltungen von $-CO_2$ ($\Delta m/z = 44$) (McIntyre et al. 1997, Plancque et al. 2001, These 2005, Reemtsma et al. 2006, Kapitel 2.5.3). Diese "natürlichen" FS bestehen jedoch aus einer Mischung von vielen tausend Verbindungen unterschiedlicher Molekulargewichte bei denen jede einzelne nur in sehr geringen Konzentrationen vorkommt (Frimmel et al. 2002, Reemtsma et al. 2006, Hertkorn et al. 2008). Somit ist im NLS $\Delta m/z = 44$ ein gleichmäßiges Signal ohne deutliche Peaks zu vermuten. Dies konnte beispielhaft durch die Messung eines FS-Isolat aus dem Hohlohsee (HO27 FS) bestätigt werden (Abbildung A.4 A,B im Anhang). FS-Fractionen aus dem Hohlohsee sind sehr gut charakterisiert und werden häufig als Referenzmaterial für "natürliche" anthropogen kaum beeinflusste FS verwendet (Frimmel et al. 2002). Die Metabolite der Aromaten und Heterozyklen hingegen sind zwar in ihrer Anzahl deutlich geringer, treten aber aufgrund der Bildung in typischen Abbaupfaden jeweils in höheren Konzentrationen auf. Dadurch erzeugen sie deutliche Peaks in den NLS $\Delta m/z = 44$ und $\Delta m/z = 116$, die sich vom "natürlichen" FS-Hintergrund abheben (siehe Abbildung 4.3).

Die NLS mit $\Delta m/z = 116$ von HO27 FS zeigen ein viel geringeres Hintergrundsignal (Abbildung A.4 C im Anhang), da die Abspaltung von $\Delta m/z = -116$ aufgrund fehlender Bernsteinsäuregruppen in "natürlichen" FS nicht typisch ist.

Neben der Betrachtung der intensiven Peaks in dem FS-Isolat aus dem kontaminierten Bereich (B22 FS) war auch der Vergleich mit dem FS-Isolat aus dem Abstrombereich interessant (B53 FS), um mögliche Transportprozesse der sauren Metabolite zu ermitteln. Die NLS dieser FS zeigen viel weniger Peaks in deutlich geringeren Intensitäten (Abbildung 4.3 A-C). Dieser Vergleich deutet stark auf hohe Konzentrationen an sauren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten ausschließlich im kontaminierten Bereich (B22 FS) dieses Aquifers und kaum auf Transportprozesse in den Abstrom hin. Diese Thematik wird in Kapitel 4.3.4 eingehender diskutiert. Zusätzlich wurde auch die HS-Fraktion des kontaminierten Bereichs (B22 HS) gemessen, um zu ermitteln, ob sich die Metabolite auch in dieser Fraktion zeigen. Die NLS zeigen an einigen Stellen ein ähnliches Peak-Muster (ähnliche RT und gleiche m/z der Vorläufer-Ionen) wie B22 FS, aber mit deutlich niedrigeren Intensitäten (Abbildung A.3 im Anhang). Das deutet darauf hin, dass sich ein kleiner Teil der

Metabolite, die in der FS-Fraktion vorhanden sind, auch in geringeren Konzentrationen in der HS-Fraktion wiederfinden. Da die Metabolite aber in der FS-Fraktion in deutlich höheren Intensitäten auftreten, wird bezüglich der Identifizierung der Metabolite im Folgenden ausschließlich diese Fraktion diskutiert.

Zusammengefasst war die Anwendung der NLS $\Delta m/z = 44$ und $\Delta m/z = 116$ zum selektiven Screening nach aromatischen und heterozyklischen Metaboliten (Säuren und Bernsteinsäuren) sehr erfolgreich und ergab deutliche Hinweise auf Metabolite in B22 FS sowie deren nominelle Massen (m/z). Diese Ergebnisse waren entscheidende Ansatzpunkte für die weiteren analytische Identifizierungsschritte (Kapitel 4.1.1.3).

4.1.1.3 Identifizierung saurer Metabolite

Die weiteren Schritte zur Identifizierung der sauren Metabolite hinter den intensivsten Signalen aus den NLS $\Delta m/z = 44$ sind in Abbildung 4.1 in Kapitel 4.1.1 dargestellt.

Eine generelle Frage an dieser Stelle ist, wann eine Identifizierung eines Metaboliten als abgesichert angesehen werden kann. Eine vollständige Identifizierung ist nur mit der Messung eines entsprechenden Referenzstandards und dem Vergleich der RT, der Fragmentspektren bzw. der Summenformeln zu erreichen. Die grundsätzliche Problematik besteht jedoch darin, dass es für viele Metabolite keine Referenzstandards gibt bzw. diese nicht zur Verfügung standen, was zur Festlegung folgender Begrifflichkeiten geführt hat:

- **identifiziert**, wenn die analytischen Messungen (z.B. Fragmentspektren, Summenformel) darauf hindeuten und die Identifizierung mit der Messung eines Referenzstandards (Abgleich von Fragmentspektren und RT) abgesichert werden konnte.
- weitgehend identifiziert, wenn die analytischen Messungen (z.B. Fragmentspektren, Summenformel) darauf hindeuten, aber keine Identifizierung mit der Messung eines Referenzstandards möglich war. Durch den Vergleich mit Fragmentspektren von strukturähnlichen identifizierten Metaboliten oder mit Spektren aus der Literatur konnte aber eine weitgehende Identifizierung erreicht werden.
- Strukturvorschlag, wenn die analytischen Messungen (Fragmentspektren, Summenformel) darauf hindeuten, aber keine Identifizierung mit der Messung eines Referenzstandards und kein Vergleich der Fragmentspektren mit strukturähnlichen identifizierten Metaboliten oder aus der Literatur möglich war.

Zur Identifizierung der potentiellen Metabolite in B22 FS wurden im nächsten Schritt für die intensivsten Peaks aus den NLS $\Delta m/z = 44$ die akkuraten Massen (m/z) mittels LC-ESI-QTOF-MS-Messungen (MS-only) gemessen und die jeweiligen Summenformeln ermittelt (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: RT und nominelle Massen (M-H) der Vorläuferionen aus den NLS $\Delta m/z = 44$ und $\Delta m/z = 116$ (LC-ESI-MS-MS) von B22 FS sowie akkurate Massen mit berechneten Summenformeln aus LC-ESI-QTOF-MS Messungen (MS-only). Die Strukturvorschläge stammen aus dem Abgleich der Summenformeln mit den Summenformeln in der Liste potentieller Metabolite aus der Literatur (Tabelle 2.4 in Kapitel 2.3.1).

	LC-ESI-MS/MS (NLS)		LC-ESI-QTOF-MS (MS-only)			Literaturabgleich	
	NLS 44 RT (min)	NLS 116 m/z (M-H) ⁻	RT (min)	Gemessene Masse (M-H) ⁻	Berechnete Formel		Abw. (ppm)
Massenbereich (m/z = 140 - 200)							
1	5,98	195	-	195,0121	C ₉ H ₈ O ₃ S	0,0	-
2	10,76	179	-	179,0349	C ₉ H ₈ O ₄	0,6	-
3	12,07	151	-	151,0401	C ₈ H ₈ O ₃	0,0	-
4	13,02	151	-	151,0400	C ₈ H ₈ O ₃	0,7	-
5	13,91	165	-	165,0557	C ₉ H ₁₀ O ₃	0,0	-
6	14,38	165	-	165,0557	C ₉ H ₁₀ O ₃	0,0	-
7	15,89	165	-	165,0557	C ₉ H ₁₀ O ₃	0,0	-
8	16,57	179	-	179,0717	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	-1,7	-
9	18,10	161	-	161,0606	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	1,2	Indansäure
10	20,04	179	-	179,0169	C ₉ H ₈ O ₂ S	1,7	Dihydrobenzothiophen- säure
11	20,88	177	-	177,0014	C ₉ H ₆ O ₂ S	1,1	Benzothiophensäure
12	21,79	171	-	171,0452	C ₁₁ H ₈ O ₂	0,0	Naphthoesäure
13	22,74	161	-	161,0606	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	1,2	Indansäure
Massenbereich (m/z = 200 - 260)							
14	10,48	237	10,48	237,0768	C ₁₂ H ₁₄ O ₅	0,0	-
15	14,61	211	-	-	-	-	-
16	14,90	207	14,90	207,0664	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	-0,5	Benzylbernsteinsäure
17	16,07	207	-	207,0664	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	-0,5	-*
18	16,74	221	16,79	221,0818	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	0,5	Methylbenzylbernstein- säure
19	17,43	221	17,39	221,0817	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	0,9	Methylbenzylbernstein- säure
20	18,06	247	18,02	247,0608	C ₁₃ H ₁₂ O ₅	1,6	Benzofuranmethyl- bernsteinsäure
21	18,76	233	18,86	233,0812	C ₁₃ H ₁₄ O ₄	3,0	-
22	19,84	257	19,78	257,0818	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	0,4	Naphthyl-2-methyl- bernsteinsäure

-*: Bei diesem Peak würde die Summenformel zu Benzylbernsteinsäure passen, jedoch ist kein Peak im NLS $\Delta m/z = 116$ vorhanden (Abbildung 4.3 C), was eine Bernsteinsäure ausschließt.

Ein wichtige Faktor zur Abschätzung der Genauigkeit der ermittelten Summenformel ist dabei die berechnete Abweichung (in ppm) der ermittelten akkuraten Masse zu der aus der Summenformel berechneten theoretischen akkuraten Masse. Die ermittelten Summenformeln

haben alle geringe Abweichungen von weniger als 3 ppm wobei die meisten sogar zwischen 0 ppm und 2 ppm liegen (Tabelle 4.1). Das sind sehr gute Werte, da in der Literatur generell Massenabweichungen von < 5 ppm als ausreichend akzeptiert werden (Ibanez et al. 2008, Kern et al. 2009, Martinez Bueno et al. 2012).

Im nächsten Schritt wurden hochaufgelöste Fragmentspektren der intensivsten Peaks aus den NLS $\Delta m/z = 44$ bei verschiedenen Kollisionsenergien mittels LC-ESI-QTOF-MS (Targeted MS-MS) gemessen. Die Fragmentspektren aller 22 intensivsten Peaks sind in Abbildung A.5 und Abbildung A.6 im Anhang exemplarisch bei einer CE = 10 eV dargestellt. Ausgewählte Spektren werden im Folgenden diskutiert. Allgemein sind sie charakterisiert durch die bekannten Neutralverluste von $-\text{CO}_2$ (-43,9898) und $-\text{H}_2\text{O}$ (-18,0106) sowie zusätzlich von $-\text{C}_2\text{H}_4(\text{CO}_2)_2$ (-116,0110) im Falle von Bernsteinsäuren. Die Fragmentspektren konnten überwiegend bei ausreichend hohen Signalintensitäten (Massensignal $> 5 \times 10^3$ cps bei $S/N > 40$) mit Massenabweichungen zwischen 0 ppm und 10 ppm gemessen werden. Bei geringen Metabolit-Konzentrationen sind vereinzelt auch Massenabweichungen bis 14 ppm zu verzeichnen gewesen. Das ist insbesondere bei Fragmentspektren, die mit sehr hohen CE (z.B. CE = 40 eV) aufgenommen worden sind der Fall, da dort viele Fragmente mit jeweils geringen Intensitäten auftauchten.

Die mit LC-ESI-QTOF-MS ermittelten Summenformeln der intensivsten Peaks wurden im nächsten Schritt mit der Liste der Summenformeln potentieller saurer Metabolite aus der Literatur (Tabelle 2.4 in Kapitel 2.3.1) verglichen. Der Abgleich ergab Strukturvorschläge (Metabolite) für einige Peaks (Tabelle 4.1). Hochaufgelöste Fragmentspektren entsprechender Standards (soweit verfügbar) dieser Strukturvorschläge wurden anschließend mittels LC-ESI-QTOF-MS (Targeted MS-MS) ermittelt. Die hochaufgelösten Fragmentspektren der intensivsten Peaks und der Standards wurden für weitere Identifizierungsschritte verwendet.

Anzumerken ist an dieser Stelle noch, dass aufgrund der nicht immer gegebenen Verfügbarkeit eines LC-ESI-QTOF-MS-Systems während dieser Arbeit zunächst LC-ESI-MS/MS-Fragmentspektren bei verschiedenen CE (CE = 10 eV, 20 eV und 40 eV) zur (weitgehenden) Identifizierung der Metabolite hinter den intensivsten Peaks aus den NLS $\Delta m/z = 44$ erzeugt wurden. Die damit erzeugten Fragmentspektren (exemplarisch bei CE = 20 eV, Abbildung A.7 und Abbildung A.8 im Anhang) zeigen, wie zu erwarten, dieselben Fragmentierungsmuster ($-\text{CO}_2$, $-\text{H}_2\text{O}$ und $-\text{C}_2\text{H}_4(\text{CO}_2)_2$) wie die mit LC-ESI-QTOF-MS aufgenommenen hochaufgelösten Fragmentspektren (Abbildung A.5 und Abbildung A.6 im Anhang). Allerdings sind die Intensitäten der Fragmente bei gleichen CE deutlich unterschiedlich, was auf die unterschiedlichen Gerätearten und Hersteller der Geräte (Agilent, ABSciex) und die damit verbundenen verschiedenen Bauweisen (z.B. Geometrie der Kollisionszelle) zurückgeführt werden kann. Die ähnlichsten Fragmentierungsmuster zeigen die Geräte bei verschiedenen Kollisionsenergien (LC-ESI-MS/MS: CE = 20 eV, LC-ESI-QTOF-MS: CE = 10 eV) so dass diese Spektren in den Abbildungen im Anhang dargestellt sind. Im Folgenden wird die Identifizierung der Metabolite aber ausschließlich anhand der hochaufgelösten Fragmentspektren diskutiert.

Absicherung der Strukturvorschläge aus dem Literaturabgleich

Für die in Tabelle 4.1 aufgeführten Strukturvorschläge aus dem Literaturabgleich standen für 5 Metaboliten Standards zur Verfügung. Über den Vergleich der Fragmentspektren und der RT konnten damit folgende Metabolite in B22 FS eindeutig identifiziert werden:

- Peak 9: **2-Indansäure** (2-IS) (Abbildung 4.4 A)
- Peak 11: **2-Benzothiophensäure** (2-BTS) (Abbildung 4.4 B)
- Peak 12: **2-Naphthoesäure** (2-NS) (Abbildung 4.4 C)
- Peak 16: **Benzylbernsteinsäure** (BBS) (Abbildung 4.4 D)
- Peak 22: **Naphthyl-2-methylbernsteinsäure** (NMBS) (Abbildung 4.4 E)

Diese Metabolite sind typische anaerobe Abbauprodukte von Toluol, Naphthalin, 2-Methylnaphthalin, Indan und Benzothiophen (Beller et al. 1995, Biegert et al. 1996, Annweiler et al. 2001, Chakraborty und Coates 2004, Griebler et al. 2004, Meckenstock et al. 2004, Safinowski et al. 2006). Peak 13, für den Indansäure als Strukturvorschlag vorlag, zeigt ein anderes Fragmentspektrum (Abbildung A.7 im Anhang) und eine spätere RT als der Standard 2-IS. Möglicherweise handelt sich um ein Isomer von 2-IS wie z.B. 5-Indansäure. Der Vergleich ihrer Fragmentspektren zeigt eine deutlich stärkere Abspaltung von CO₂ bei Peak 13 (Abbildung A.7 im Anhang), was durch eine weniger starke Bindung der Carboxyl-Gruppe an den aromatischen Teil der Molekülstruktur bei 5-Indansäure als an den zyklischen Teil der Struktur bei 2-IS hervorgerufen werden könnte.

Für die weiteren in Tabelle 4.1 aufgeführten Strukturvorschläge aus dem Literaturabgleich standen keine Standards zur Verfügung, so dass eine eindeutige Identifizierung und insbesondere die Unterscheidung von Isomeren nicht möglich waren. Dennoch konnte über den Vergleich von Fragmentspektren (Abbildung 4.5), Summenformeln und RT (Tabelle 4.1) mit identifizierten Metaboliten mit gleichen Strukturen und funktionellen Gruppen eine weitgehende Identifizierung von einigen Metaboliten erreicht werden:

- Peak 10: Dihydrobenzothiophensäure (DHBTS)
Im Vergleich zu 2-BTS (Peak 11, C₉H₆O₂S) zeigte diese Substanz mit C₉H₈O₂S 2 H-Atome mehr in der Summenformel, was auf einen höheren Sättigungsgrad durch z.B. eine Einfachbindung statt einer Doppelbindung hindeutet (Tabelle 4.1). Die Fragmentspektren (Abbildung 4.5 A) sind ausschließlich geprägt durch die Abspaltungen von CO₂ (-43,9898) und nahezu identische Fragmentintensitäten, was auf sehr stabile Reste hindeutet. Die Differenz von 2 Masseneinheiten (-2,0176) zwischen Peak 10 (m/z = 135,0274) und Peak 11 (m/z = 133,0107) passt sehr gut zum Unterschied von 2 Wasserstoff-Atomen. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte Peak 10 als Dihydrobenzothiophensäure (DHBTS) weitgehend identifiziert werden. DHBTS sind typische (cometabolische) Abbauprodukte von Benzothiophen und wurden auch in anderen Aquiferen nachgewiesen (Annweiler et al. 2001, Griebler et al. 2004, Safinowski et al. 2006). Das gleichzeitige Auftreten von 2-BTS und DHBTS ist sehr plausibel, da DHBTS als Abbauprodukte von BTS gelten.

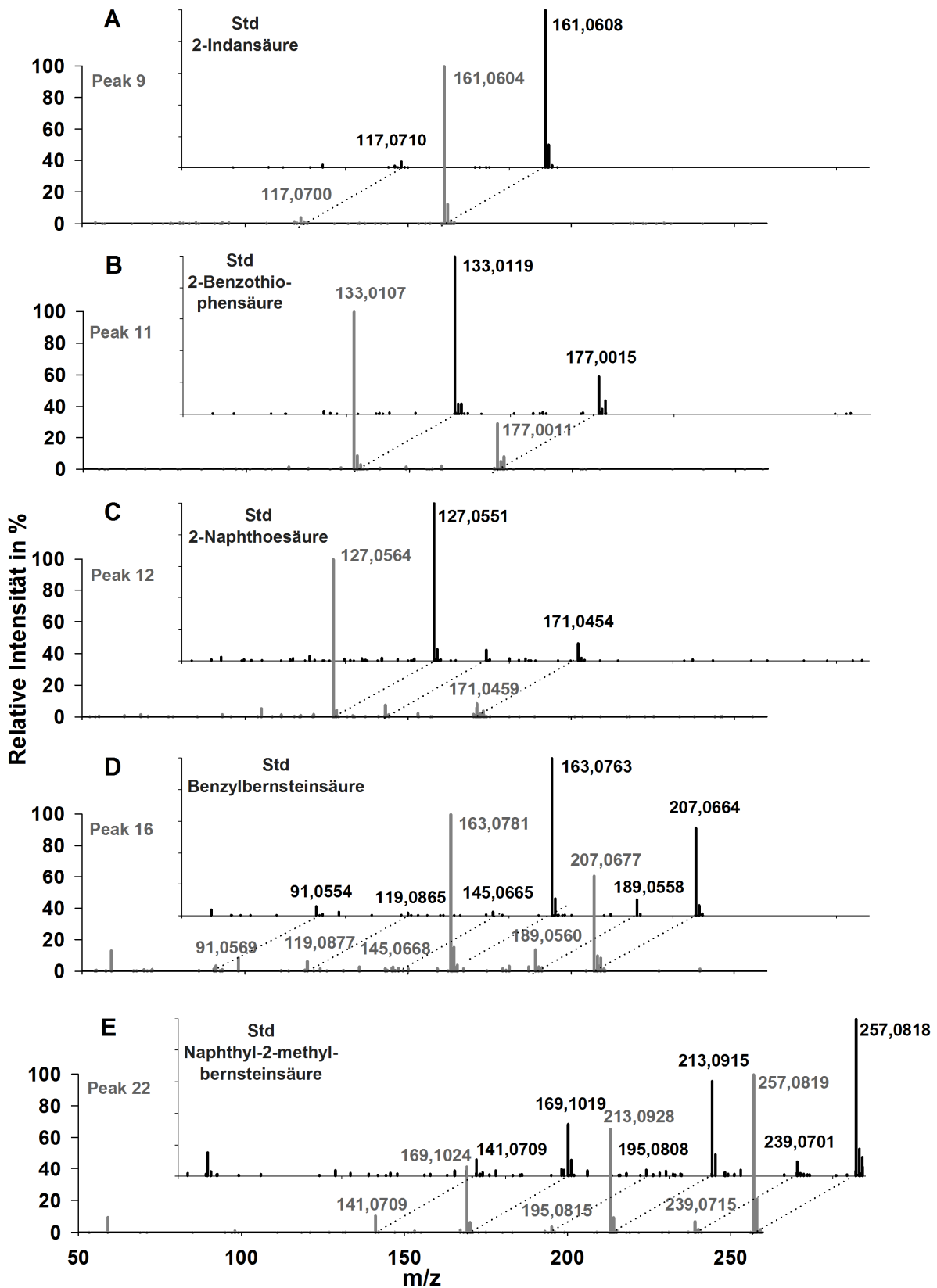


Abbildung 4.4: Identifizierung von Metaboliten in B22 FS durch den Vergleich ihrer LC-ESI-QTOF-MS Fragmentspektren (grau) mit den Spektren von entsprechenden Standards (schwarz) (beispielhaft bei einer CE = 10 eV).

- Peak 18 und 19: Methylbenzylbernsteinsäuren (MBBS)

Im Vergleich zu BBS (Peak 16, $C_{11}H_{12}O_4$) zeigen diese Substanzen mit der Summenformel $C_{12}H_{14}O_4$ einen Unterschied von CH_2 , was auf eine zusätzliche Methylgruppe hindeutet, sowie etwas spätere RT (Tabelle 4.1). Das Auftreten dieser Peaks in den NLS $\Delta m/z = 116$ zeigt das Vorhandensein einer Bernsteinsäuregruppe an (Abbildung 4.3 C). Die Fragmentspektren von Peak 18 und 19 zeigen ähnliche Fragmente wie BBS, die sich durch einen Massenunterschied von $m/z = 14,0157$ auszeichnen (Abbildung 4.5 B,C). Auch die Fragmentintensitäten sind vergleichbar, was auch ein starker Hinweis auf ähnlich strukturierte stabile Reste ist. Zusammengefasst konnten Peak 18 und Peak 19, wie durch den Literaturabgleich vorgeschlagen, als Methylbenzylbernsteinsäuren (MBBS) weitgehend identifiziert werden. Sie sind als anaerobe Metabolite der Xylole bekannt und tauchen je nach abgebautem Xylol als unterschiedliche Isomere auf (Beller et al. 1995, Krieger et al. 1999, Beller 2000).

- Peak 20: Benzofuranmethylbernsteinsäure (BFMBS)

Peak 20 mit einer Summenformel von $C_{13}H_{12}O_5$ und einem Peak im NLS $\Delta m/z = 116$ (Tabelle 4.1) zeigt ein ähnliches Fragmentierungsmuster wie der identifizierte Metabolit NMBS mit einem Massenunterschied von $m/z = -10,0208$ (Abbildung 4.5 E). Nach Abzug der Atome des Bernsteinsäurerestes bleibt die Summenformel C_9H_8O , die auf Methyl-Benzofuran als stabilem Rest hindeutet. Diese Erkenntnisse in Kombination mit der Präsenz des Schadstoffs Benzofuran im Aquifer deuten auf BFMBS als Metabolit hin. Als zusätzliche Absicherung erwies sich auch der Vergleich des GC-MS-Massenspektrums dieser Substanz mit Massenspektren aus der Literatur als sehr hilfreich. Dies wird in Kapitel 4.1.2 beim Nachweis dieses Metaboliten in den Grundwasserproben des ehemaligen Gaswerksstandortes in Düsseldorf ausführlich dargestellt. BFMBS gilt als ein anaerober Metabolit von Benzofuran, der bisher nur in Batch-Experimenten und nicht im Feld gefunden wurde (Safinowski et al. 2006).

Die (weitgehende) Identifizierung der Metabolite steht in guter Übereinstimmung mit der Anwesenheit der entsprechenden Schadstoffe Toluol, Xylol, (2-Methyl)Naphthalin, Indan Benzofuran, und Benzothiophen (siehe Kapitel 3.1.2) im Aquifer und zeigt eindeutig deren dortigen mikrobiellen Abbau an.

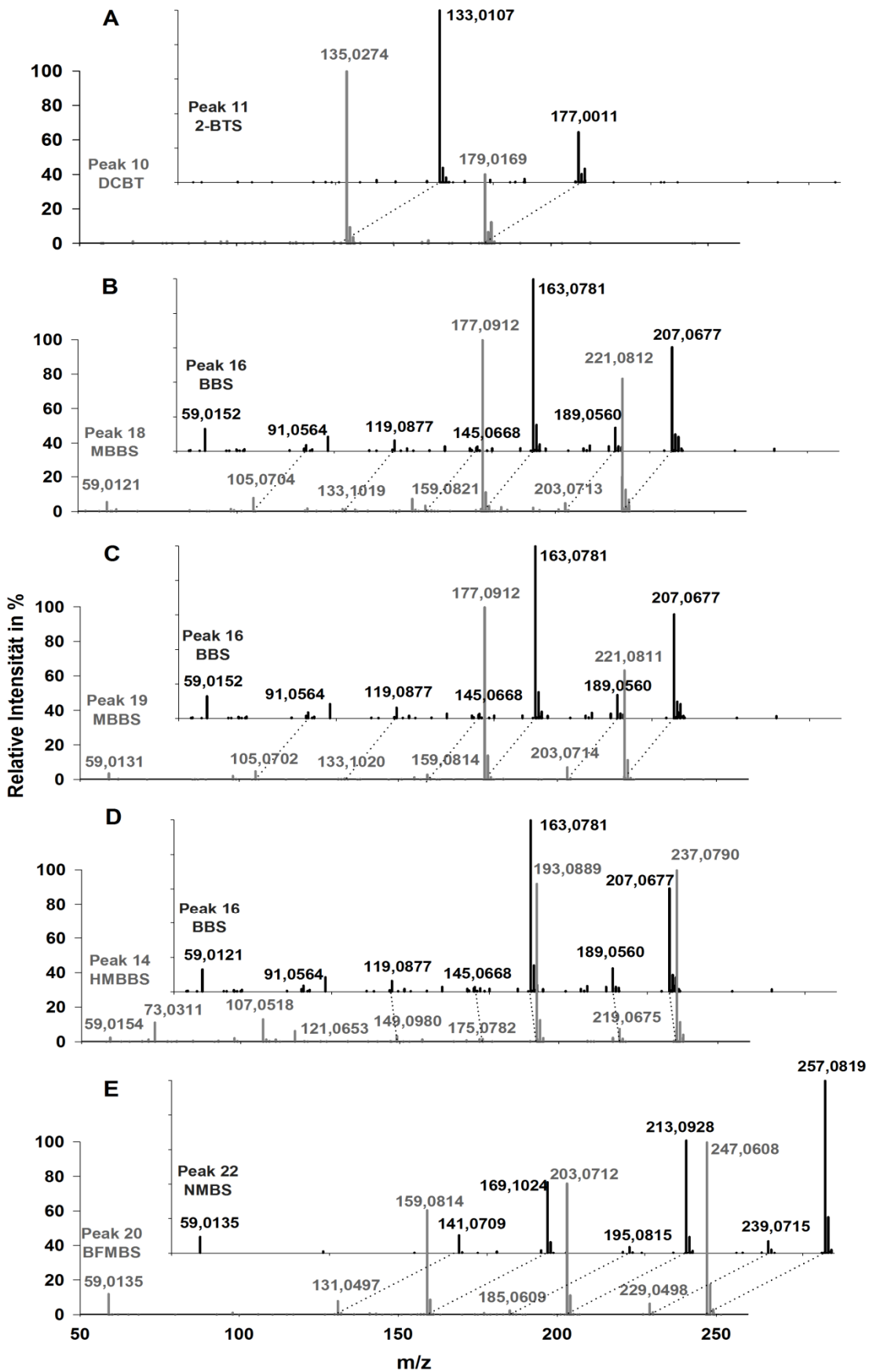


Abbildung 4.5: Vergleich der LC-ESI-QTOF-MS Fragmentspektren (beispielhaft bei einer $CE = 10$ eV) von potentiellen Metaboliten (grau) mit strukturähnlichen (mit Standards) identifizierten Metaboliten (schwarz) in B22 FS.

Ermittlung von Strukturvorschlägen für unbekannte Strukturen

Bei den verbliebenen Peaks aus den NLS $\Delta m/z = 44$ des FS-Isolats B22 konnte trotz Abgleich der Summenformeln mit der Liste potentieller aromatischer und heterozyklischer Metabolite kein Strukturvorschlag zugeordnet werden (siehe Tabelle 4.1).

Für diese Peaks wurden plausible Strukturvorschläge, wie bereits beschrieben, über die Suche in chemischen Datenbanken in Verbindung mit in-silico Fragmentierung mit dem Programm MetFrag ermittelt. Dabei ist zu beachten, dass trotz der millionenfachen Substanzeinträge in den chemischen Datenbanken die exakte Struktur von speziellen anaeroben Metaboliten manchmal nicht vorhanden ist (Zedda und Zwiener 2012). Dennoch geben die von MetFrag ermittelten ähnlichen Strukturvorschläge in diesen Fällen einen guten Hinweis auf Struktureinheiten der tatsächlichen Substanz. Die aus MetFrag resultierenden plausibelsten Strukturvorschläge wurden auf Basis folgender Kriterien weiter selektiert:

- Das Auftreten von Peaks in den NLS $\Delta m/z = 44$ und $\Delta m/z = 116$ zeigt eindeutig das Vorhandensein von Carboxyl- oder Bernsteinsäuregruppen an einem stabilen Rest an. Von MetFrag vorgeschlagene Strukturen ohne diese Gruppen wurden folglich aussortiert.
- Die Kontamination des Aquifers (Kapitel 3.1.2) zeigt mögliche Ausgangsstoffe der Metaboliten an.

Zur eindeutigen Identifizierung der entsprechenden Metaboliten wurden Standards (soweit verfügbar) der ausgewählten Strukturvorschläge bezogen und deren Fragmentspektren und RT mit LC-ESI-QTOF-MS bestimmt.

Der in dieser Arbeit genutzte Ansatz zur Ermittlung von unbekanntem Strukturen wird im Folgenden an einigen Beispielen diskutiert.

Peak 3 zeigt das typische Fragmentierungsmuster von aromatischen und heterozyklischen Carboxylsäuren mit dem Hauptfragment bei $m/z = 107,0515$, das durch die Abspaltung von CO_2 (-43,9898) vom negativ ionisierten Molekül-Ion ($m/z = 151,0413$) gebildet wird (Abbildung 4.6 A). Die plausibelsten Strukturvorschläge von MetFrag umfassten vor allem unterschiedliche Isomere von Hydroxymethylbenzoesäuren und Hydroxyphenyllessigsäuren. Eine alleinige Abfrage mit der Summenformel in chemischen Datenbanken hätte zu vielen Vorschlägen (z.B. mehr als 500 bei PubChem) geführt, was noch einmal die Nutzung der Fragmentspektren als Auswahlkriterium unterstreicht. Fragmentspektren von Standards von Stellvertretern aus diesen Stoffgruppen wurden erzeugt. Über die Fragmentspektren (Abbildung A.9 im Anhang) und die RT konnte Peak 3 dann eindeutig als 4-Hydroxy-3-methylbenzoesäure (4-HMBS) identifiziert werden. Diese Substanz wird als anaerober Metabolit von o-Cresol diskutiert (Philipp und Schink 2012). Peak 4 mit der gleichen Summenformel, einer etwas späteren RT und einem ähnlichen Fragmentspektrum wie Peak 3 (mit einem zusätzlichen Peak bei $m/z = 92,0275$, Abbildung 4.6 B) scheint ein Isomer von Peak 3 zu sein. Möglicherweise handelt es sich um 4-Hydroxy-2-methylbenzoesäure und somit einem potentiellen Metaboliten von m-Cresol (Philipp und Schink 2012).

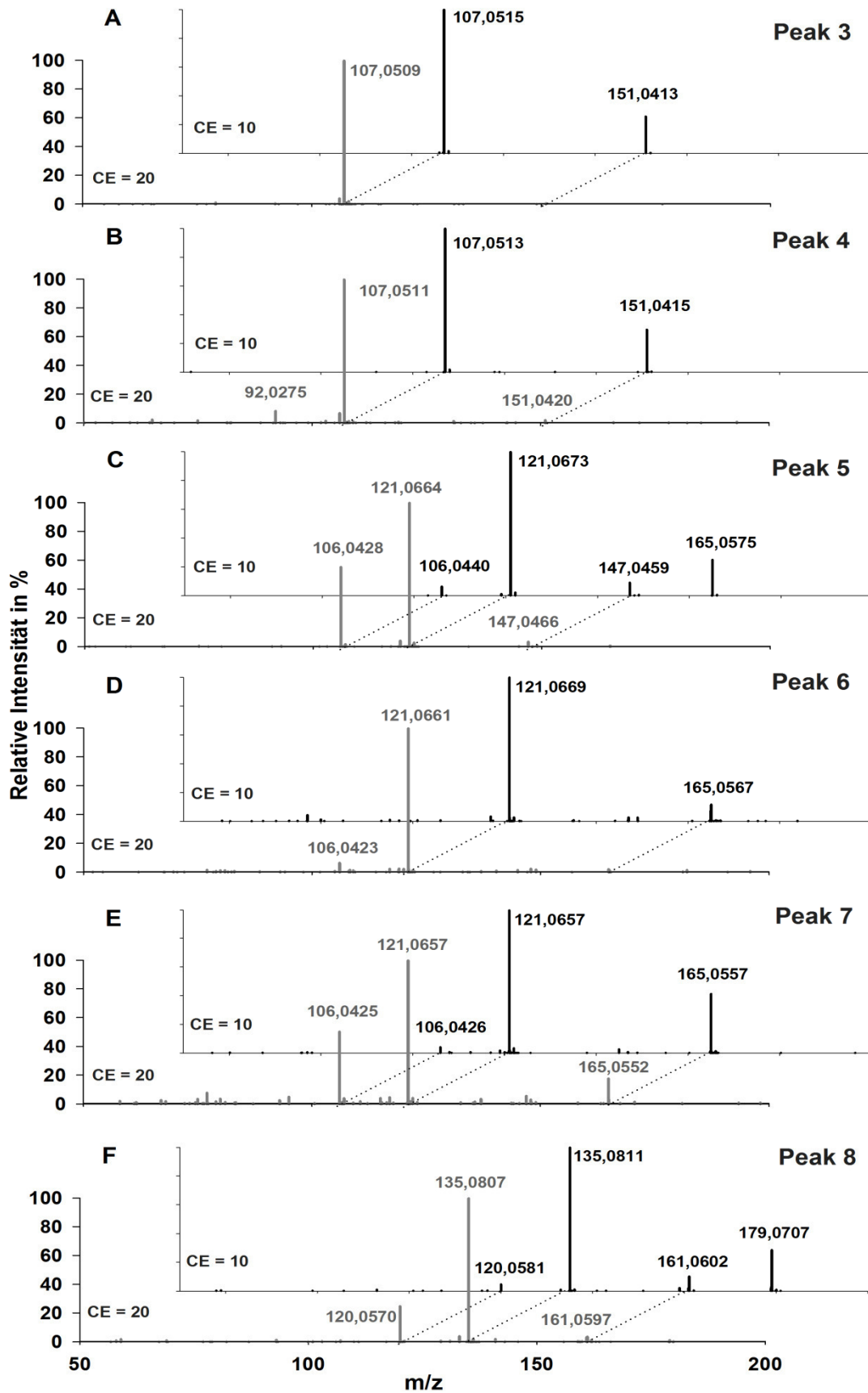


Abbildung 4.6: LC-ESI-QTOF-MS-Fragmentspektren (CE = 10 eV und CE = 20 eV) der Peaks 3 (A), 4 (B), 5 (C), 6 (D), 7 (E) und 8 (F), die auf eine homologe Reihe aus alkylierten und hydroxylierten Benzoesäuren hindeuten.

Eine genauere Betrachtung der Peaks 3-8 deutet auf eine homologe Reihe an hydroxylierten aromatischen Carboxylsäuren mit unterschiedlicher Anzahl an Methylgruppen bzw. Länge des Alkylrestes hin. Deren Summenformeln (Tabelle 4.1) und Fragmente (Abbildung 4.6) sind gleich oder unterscheiden sich in CH_2 . Die RT steigen an mit zunehmender Masse (m/z). Alle Fragmentspektren (Abbildung 4.6) zeigen die typische Abspaltung von CO_2 (-43,9898). Das teilweise Auftreten und die unterschiedlichen Intensitäten der Abspaltungen von H_2O (-18,0106) und CH_3 (-15,0235) werden sehr wahrscheinlich durch die unterschiedlichen Stellungen der funktionellen Gruppen (Carboxyl-, Hydroxyl- und Alkylgruppen) verursacht. Die plausiblen Strukturvorschläge von MetFrag für die Peaks 5-7 umfassten u.a. Hydroxyphenylpropansäuren oder Hydroxydimethylbenzoesäuren. Die gemessenen Fragmentspektren von ausgewählten Standards aus diesen Gruppen wiesen auf Hydroxydimethylbenzoesäuren als wahrscheinlichste Strukturen hin (Abbildung A.10 im Anhang). Eine eindeutige Identifizierung der Peaks 5-8 konnte aufgrund der Vielzahl der möglichen Isomere und der Schwierigkeit der Verfügbarkeit aller entsprechenden Standards nicht erreicht werden. Folglich wurden diese Substanzen als C_2 - und C_3 -Hydroxybenzoesäuren (C_2 -HBS und C_3 -HBS) bezeichnet. Diese Substanzen könnten analog der identifizierten 4-Hydroxy-3-methylbenzoesäure (anaerober Metabolit von o-Cresol) anaerobe Metabolite mehrfach methylierter phenolischer Schadstoffe sein.

Peak 14 zeigt das spezifische Fragmentierungsmuster von aromatischen Bernsteinsäuren mit den typischen Abspaltungen von CO_2 (-43,9898), H_2O (-18,0106) und $\text{C}_2\text{H}_2(\text{CO}_2)_2$ (-116,0110) (Abbildung 4.5 D). Der plausibelste Strukturvorschlag von MetFrag war Methoxymethylbenzylbernsteinsäure. Das Vorhandensein von Methoxy-Gruppen ist jedoch eher unwahrscheinlich, da zum einen eine Kontamination durch methoxylierte Schadstoffe nicht bekannt ist und zum anderen Methoxylierung kein typischer Abbauschritt in anaeroben mikrobiellen Abbauwegen ist (siehe Kapitel 2.2). Weitaus wahrscheinlicher ist die Struktur einer hydroxylierten Methylbenzylbernsteinsäure, da strukturähnliche Metaboliten (z.B. 4-Hydroxybenzylbernsteinsäure) aus den anaeroben Abbauwegen von phenolischen Schadstoffen bekannt sind (Philipp und Schink 2012). Aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit eines entsprechenden Standards konnte eine eindeutige Identifizierung nicht erreicht werden. Der Vergleich der Fragmentspektren von Peak 14 mit dem identifizierten Metaboliten BBS (Peak 16) zeigt ähnliche Fragmentierungsmuster mit einer Massendifferenz von $m/z = 30,0106$ (Abbildung 4.5 D). Diese Differenz kann durch eine zusätzliche Methyl- und Hydroxylgruppe verursacht werden. Die relativ frühe RT von Peak 14 kann durch die Existenz und Stellung der Hydroxylgruppe erklärt werden. Der weitgehende Nachweis von Hydroxymethylbenzylbernsteinsäuren (HMBBS) passt sehr gut zum Auftreten der bereits diskutierten alkylierten Hydroxybenzoesäuren, da auch sie anaerobe Metabolite von methylierten Phenolen sein könnten.

Für die verbleibenden Peaks konnten nur Strukturvorschläge ermittelt werden, da eine (weitgehende) Identifizierung aufgrund fehlender adäquater Standards nicht durchgeführt werden konnte. Für Peak 21 zum Beispiel schlägt MetFrag u.a. verschiedene Strukturen mit Indan als stabilem Rest vor. Zusätzlich deutet das Vorhandensein einer Bernsteinsäuregruppe durch einen Peak in den NLS $\Delta m/z = 116$ (Tabelle 4.1), das typische Fragmentmuster einer

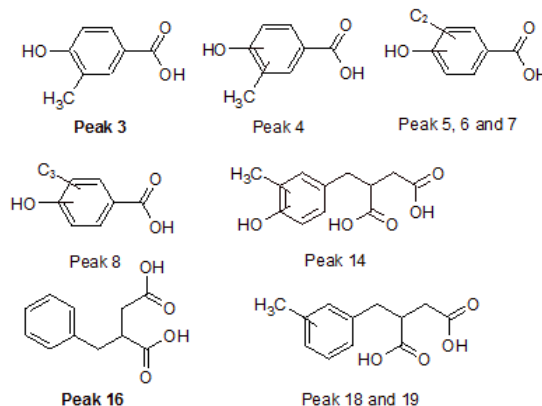
aromatischen Bernsteinsäure (Abbildung A.6 im Anhang), sowie das Auftreten des Schadstoffs Indan und entsprechender anderer Metabolite (z.B. 2-IS) im Aquifer auf den Strukturvorschlag Indanbernsteinsäure hin. Eine der Fumarataddition vorhergehende mikrobielle Methylierung, wie sie bei den anaeroben Abbauwegen von z.B. Toluol, den Xylol-Isomeren oder (2-Methyl)Naphthalin bekannt ist, würde hier fehlen. Dies könnte damit erklärt werden, dass die Mikroorganismen die Fumarataddition nicht am aromatischen Teil sondern am zyklischen Teil des Indanmoleküls vollziehen.

Die (weitgehend) identifizierten Metabolite in der FS-Fraktion aus dem kontaminierten Bereich des Aquifers in Stuttgart (B22 FS) sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst dargestellt.

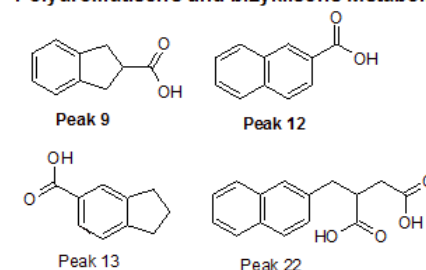
Tabelle 4.2: Identifizierte und weitgehend identifizierte Metabolite in der FS-Fraktion aus dem kontaminierten Bereich des Aquifers in Stuttgart (B22 FS). Bei einigen Peaks sind Strukturvorschläge angegeben, da eine weitergehende Identifizierung aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit adäquater Standards nicht möglich war.

Formel	Metabolite	Strukturformeln
1	$C_9H_8O_3S$	-
2	$C_9H_8O_4$	Methyldicarboxybenzol
3	$C_8H_8O_3$	4-Hydroxy-3-methylbenzoesäure
4	$C_8H_8O_3$	Hydroxymethylbenzoesäure
5	$C_9H_{10}O_3$	C_2 -Hydroxybenzoesäure
6	$C_9H_{10}O_3$	C_2 -Hydroxybenzoesäure
7	$C_9H_{10}O_3$	C_2 -Hydroxybenzoesäure
8	$C_{10}H_{12}O_3$	C_3 -Hydroxybenzoesäure
9	$C_{10}H_{10}O_2$	2-Indansäure
10	$C_9H_8O_2S$	Dihydrobenzothiophensäure
11	$C_9H_6O_2S$	2-Benzothiophensäure
12	$C_{11}H_8O_2$	2-Naphthoesäure
13	$C_{10}H_{10}O_2$	5-Indansäure
14	$C_{12}H_{14}O_5$	Hydroxymethylbenzylbernsteinsäure
15	-	-
16	$C_{11}H_{12}O_4$	Benzylbernsteinsäure
17	$C_{11}H_{12}O_4$	-
18	$C_{12}H_{14}O_4$	Methylbenzylbernsteinsäure
19	$C_{12}H_{14}O_4$	Methylbenzylbernsteinsäure
20	$C_{13}H_{12}O_5$	Benzofuranmethylbernsteinsäure
21	$C_{13}H_{14}O_4$	Indanbernsteinsäure
22	$C_{15}H_{14}O_4$	Naphthyl-2-methylbernsteinsäure

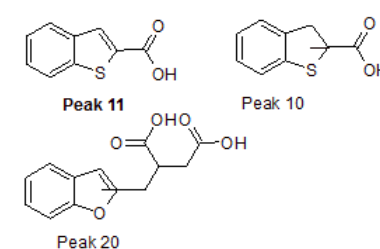
Monoaromatische Metabolite



Polyaromatische und bicyclische Metabolite



Heterozyklische Metabolite



Der angewandte analytische Ansatz (Screening, Identifizierung) erbrachte somit einem erfolgreichen Nachweis saurer Metabolite von aromatischen, polyaromatischen, heterozyklischen und phenolischen Schadstoffen und somit den Beweis für deren anaeroben

mikrobiellen Abbau im Aquifer. Obwohl es bei einigen Peaks nicht möglich war eine Struktur eindeutig zuzuordnen, deutete deren Auftreten in den NLS sowie deren Fragmentspektren auf saure aromatische und heterozyklische Strukturen und folglich auf potentielle Metabolite hin.

4.1.2 Saure Metabolite in Wasserproben aus dem Aquifer in Düsseldorf

Zum Screening und zur Identifizierung von sauren Metaboliten in den Grundwasserproben aus dem ehemaligen Gaswerksgelände in Düsseldorf wurde ein etwas anderer analytischer Ansatz verwendet. Das hatte u.a. folgende Gründe:

- Dem eher selten genutzten Screening-Ansatz mit NLS (siehe Kapitel 4.1.1) sollte hier der in der Literatur häufiger genutzte Ansatz des *Suspect-Screenings* mittels LC-ESI-QTOF-MS (MS-only) zum Vergleich gegenübergestellt werden.
- Da es sich um nicht angereicherte Grundwasserproben handelte wäre ein Screening mit NLS teilweise zu unempfindlich gewesen.
- Da die Möglichkeit zur Messung von hochaufgelösten Fragmentspektren zu diesem Zeitpunkt nicht gegeben war, war eine Aufklärung unbekannter Strukturen über MetFrag (basiert auf hochaufgelösten Fragmentspektren) nicht möglich.
- Die Potentiale von GC-MS-Fragmentspektren zur (Absicherung der) Identifizierung von Metaboliten sollten in diesem Zusammenhang aufgezeigt werden.

Neben dem Screening und der Identifizierung stand vor allem auch die Entwicklung und Anwendung einer Quantifizierungsmethode mittels LC-ESI-MS/MS (MRM) im Vordergrund (Kapitel 4.1.2.3), um relevante Metabolite in diesen Proben sensitiv bestimmen und Konzentrationsgradienten (Kapitel 4.3) aufdecken zu können.

Die Schritte des Screenings, der Identifizierung und der Quantifizierung sind in Abbildung 4.7 dargestellt und werden im Folgenden kurz erläutert. Der erste Schritt war die Durchführung eines *Suspect-Screenings* (Kapitel 4.1.2.1) mittels LC-ESI-QTOF-MS (MS-only). Grundlage des Screenings war eine Liste potentieller Metabolite (*Suspects*) (siehe Tabelle A.7 im Anhang). Diese Liste basierte auf nachgewiesenen Metaboliten in der Literatur (Tabelle 2.4 in Kapitel 2.3.1) und in anderen Aquiferen. Durch Fragmentspektren mit nominellen Massen aus LC-ESI-MS/MS-Messungen (PIS) konnten im nächsten Schritt strukturelle Informationen ermittelt werden. Bei verfügbaren Standards wurden die Metabolite über den Abgleich der Summenformel, der RT und der Fragmentspektren eindeutig identifiziert. Bei fehlender Verfügbarkeit wurden Summenformel, RT und Fragmentspektren mit identifizierten Metaboliten mit gemeinsamen Strukturen und funktionellen Gruppen verglichen. Dieses Verfahren erfolgte analog zu der bereits beschriebenen weitgehenden Identifizierung von Metaboliten in den Huminstoff-Isolaten aus Stuttgart (Kapitel 4.1.1.3). Der Unterschied war jedoch, dass dort hochaufgelöste Fragmentspektren aus LC-ESI-QTOF-MS-Messungen (Targeted MS-MS) zur Verfügung standen. Da es sich hier aber um Fragmentspektren mit "lediglich" nominellen Massen aus LC-ESI-MS/MS-Messungen handelte, wurde eine weitere Absicherung durch die Ermittlung von entsprechenden GC-MS-Fragmentspektren der derivatisierten Metabolite angeschlossen

(Kapitel 4.1.2.2). Durch den Vergleich dieser Spektren mit z.B. entsprechenden Spektren aus der Literatur konnte die (weitgehende) Identifizierung von einigen Metaboliten abgesichert bzw. erreicht werden.

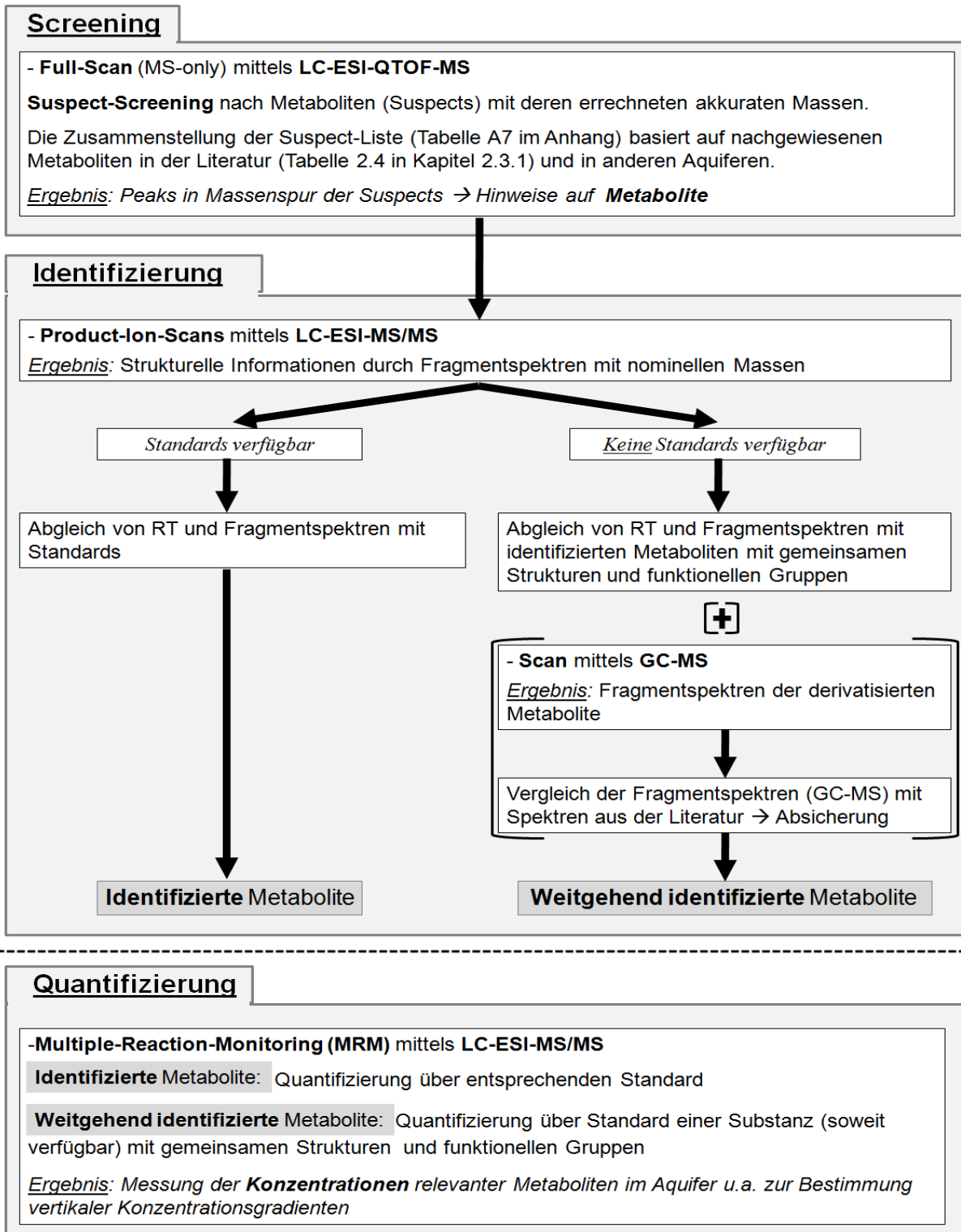


Abbildung 4.7: Ansatz zum Screening, zur Identifizierung und zur Quantifizierung von sauren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten in den Grundwasserproben aus dem Aquifer in Düsseldorf.

Der Vergleich mit Literaturspektren ist meist nur mit GC-MS-Spektren möglich, da publizierte LC-MS-Spektren von aromatischen und heterozyklischen Metaboliten äußerst selten sind. Die Absicherung über GC-MS-Fragmentspektren wäre nicht zwingend notwendig gewesen, aber für Metaboliten, die selten oder noch nie im Aquifer nachgewiesen wurden, war es eine gute zusätzliche Bestätigung.

4.1.2.1 Suspect-Screening und Identifizierung

Die *Suspect-Screenings* wurden in Proben aus verschiedenen Tiefen des HR-MLW im Aquifer in Düsseldorf durchgeführt und zusätzlich wurden verschiedene Standards aromatischer und heterozyklischer Metabolite gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

Tabelle 4.3: Identifizierte und weitgehend identifizierte Metabolite in den Grundwasserproben aus dem HR-MLW im Aquifer in Düsseldorf. Die Abweichung der Massengenauigkeit ist immer von der Messung der Probe mit der geringsten Massenabweichung angegeben.

Metabolit	LC-ESI-QTOF-MS			
	Formel	m/z [M-H] ⁻	Abw. [ppm]	RT [min]
von Monoaromaten (z.B. BTEX)				
Benzylnbernsteinsäure (BBS)	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	207,0663	0,0	12,34
Methylbenzylnbernsteinsäure (MBBS)	C ₁₂ H ₁₂ O ₄	221,0816	1,4	14,24
		221,0820	-0,5	14,92
C ₂ -Benzylnbernsteinsäure (C ₂ -BBS)	C ₁₃ H ₁₆ O ₄	235,0972	1,7	17,17
von PAK (und bizyklischen Verbindungen)				
2-Indansäure (2-IS)	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	161,0607	0,6	16,22
Naphthyl-2-methylbernsteinsäure (NMBS)	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	257,0820	-0,4	17,51
2-Naphthoesäure (2-NS)	C ₁₁ H ₈ O ₂	171,0450	1,2	18,20
Tetrahydronaphthoesäure (THNS)	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	175,0764	0,6	18,72
Methylnaphthyl-2-methylbernsteinsäure (MNMBBS)	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	271,0975	0,4	19,42
Methylnaphthoesäure (MNS)	C ₁₂ H ₁₀ O ₂	185,0608	0,0	21,17
5-Acenaphthensäure (5-AS)	C ₁₃ H ₁₀ O ₂	197,0606	1,0	21,74
von Heterozyklen				
2-Benzofuransäure (2-BFS)	C ₉ H ₆ O ₃	161,0240	2,5	14,69
Benzofuranmethylbernsteinsäure (BFMBS)	C ₁₃ H ₁₁ O ₅	247,0615	-1,2	15,79
Benzothiophenmethylbernsteinsäure (BTMBS)	C ₁₃ H ₁₂ O ₄ S	263,0383	0,4	16,45
Dihydrobenzothiophensäure (DHBTS)	C ₉ H ₈ O ₂ S	179,0168	2,2	16,62
2-Benzothiophensäure (2-BTS)	C ₉ H ₆ O ₂ S	177,0015	0,6	17,43
Methylbenzothiophensäure (MBTS)	C ₁₀ H ₈ O ₂ S	191,0172	0,0	19,98

Mit Hilfe von entsprechenden Standards konnten folgende Metabolite eindeutig identifiziert werden: **BBS**, **2-IS**, **2-NS**, **5-AS**, **NMBS**, **2-BFS** und **2-BTS**. Die meisten dieser Metabolite konnten auch schon im FS-Isolat B22 FS aus dem Aquifer in Stuttgart nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.1.1) und zeigen eindeutig den mikrobiellen anaeroben Abbau der Schadstoffe Toluol, Indan, (Methyl)Naphthalin, Acenaphthen, Benzofuran und Benzothiophen an

Die *Suspect-Screenings* ergaben weitere Hinweise auf Metabolite für die aber keine Standards zur eindeutigen Identifizierung zur Verfügung standen (Tabelle 4.3). Die Metaboliten MBBS, Methyl-Naphthoesäure (MNS), Methyl-naphthyl-2-methylbernsteinsäure (MNMBBS) und Methylbenzothiophensäure (MBTS) konnten durch den Vergleich (RT, Summenformel, Fragmentspektren) mit bereits durch Standards identifizierte nicht methylierte Metabolite (BBS, 2-NS, NMBS, 2-BTS) weitgehend identifiziert werden. Das Prinzip der Nutzung von LC-MS-Fragmentspektren zur weitgehenden Identifizierung von Metaboliten ist in Kapitel 4.1.1.3 eingehend bei den Huminstoff-Isolaten beschrieben und wird deshalb an dieser Stelle nicht weiter erläutert. Zur Absicherung dieser Nachweise sowie zur weitgehenden Identifizierung weiterer Metabolite wurden zusätzlich GC-MS-Fragmentspektren der derivatisierten Metabolite erzeugt.

4.1.2.2 Absicherung durch Fragmentspektren aus GC-MS-Messungen

In diesem Kapitel soll deutlich werden inwieweit auch GC-MS-Fragmentspektren einen wichtigen Beitrag zur Identifizierung von Metaboliten beitragen können und welche Vor- und Nachteile sie haben. Dies wird an einigen Metaboliten in den Grundwasserproben aus dem Aquifer in Düsseldorf gezeigt. Allgemein ist bei der Nutzung von GC-MS-Fragmentspektren Folgendes zu beachten:

- Bei der EI, bei der standardmäßig mit 70 eV ionisiert wird, zeigen die Massenspektren (meist) deutlich mehr Fragmente als bei der ESI (LC-MS), die zusätzliche Aussagen über den stabilen aromatischen bzw. heterozyklischen Rest zulassen können. Aufgrund der geringen Ionisierungsenergie der Aromaten und Heterozyklen ist der Molekülpeak bei diesen Substanzen jedoch immer noch gut zu sehen.
- Durch die standardisierte Ionisierung lassen sich ermittelte Fragmentspektren mit Datenbanken und mit Fragmentspektren aus der Literatur abgleichen. Vor allem der Vergleich mit Fragmentspektren aus der Literatur ist hilfreich, da für die meisten identifizierten Metaboliten GC-MS-Fragmentspektren und keine LC-ESI-MS/MS- oder LC-ESI-QTOF-MS-Spektren in der Literatur vorliegen. Für die Nutzung von Datenbanken gilt einschränkend, dass für viele dieser Metabolite keine Einträge vorhanden sind.

Um die sauren aromatischen und heterozyklischen Metabolite der GC-MS überhaupt erst zugänglich zu machen, mussten sie vorher derivatisiert werden. Das erfolgte durch Veresterung der Säuregruppen (Kapitel 3.3.3.2). Die Fragmentspektren der Metabolite und insbesondere der Säure- bzw. Bernsteinsäuregruppen unterschieden sich bei der GC-MS und der LC-MS, was vor allem auf 2 Ursachen zurückzuführen ist:

1. Durch die bereits angesprochene Veresterung der Säuregruppen entstehen bei der GC-MS Fragmente der Säure- und Bernsteinsäurereste mit höheren Massen (m/z).
2. Durch die unterschiedlichen Ionisierungsmethoden (EI bei der GC-MS und ESI bei der LC-ESI-MS/MS) werden die Ionen teilweise unterschiedlich erzeugt und fragmentiert.

Typische Fragmente aromatischer Säuren und Bernsteinsäuren sind in Abbildung 4.8 beispielhaft an den mit Standard identifizierten Metaboliten 2-NS und NMBS gezeigt.

Dabei ist deutlich zu erkennen, dass die GC-MS-Spektren teilweise mehr Fragmente zeigen als die entsprechenden LC-MS-Spektren von denen viele aber auch von den veresterten Säure- oder Bernsteinsäuregruppen stammen.

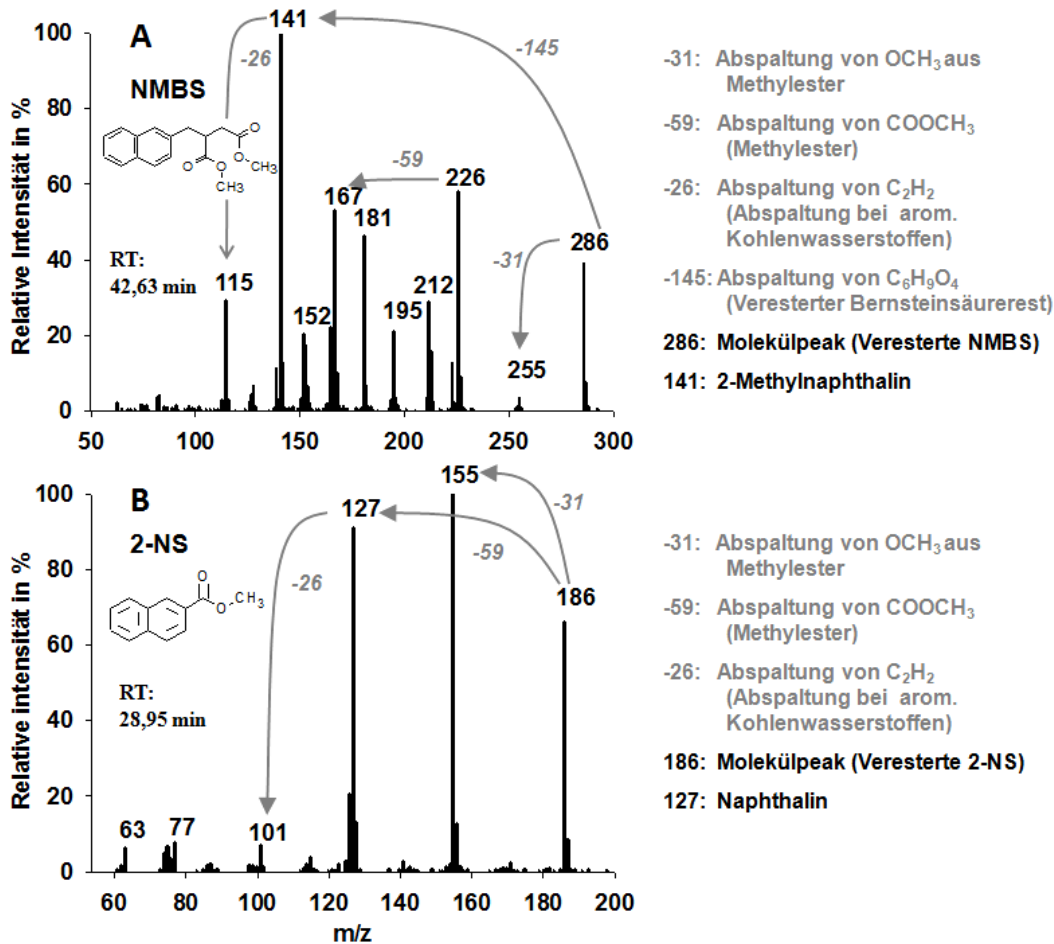


Abbildung 4.8: Darstellung typischer Fragmentspektren aromatischer Säuren und Bernsteinsäuren am Beispiel der im Aquifer in Düsseldorf identifizierten Metabolite 2-NS und NMBS. Die Metabolite wurden vorher derivatisiert (Säuremethylester).

Abgleich mit Spektren aus der Literatur

Die GC-MS-Fragmentspektren ausgewählter derivatisierter Metabolite in den Grundwasserproben aus Düsseldorf sind in Abbildung 4.9 dargestellt.

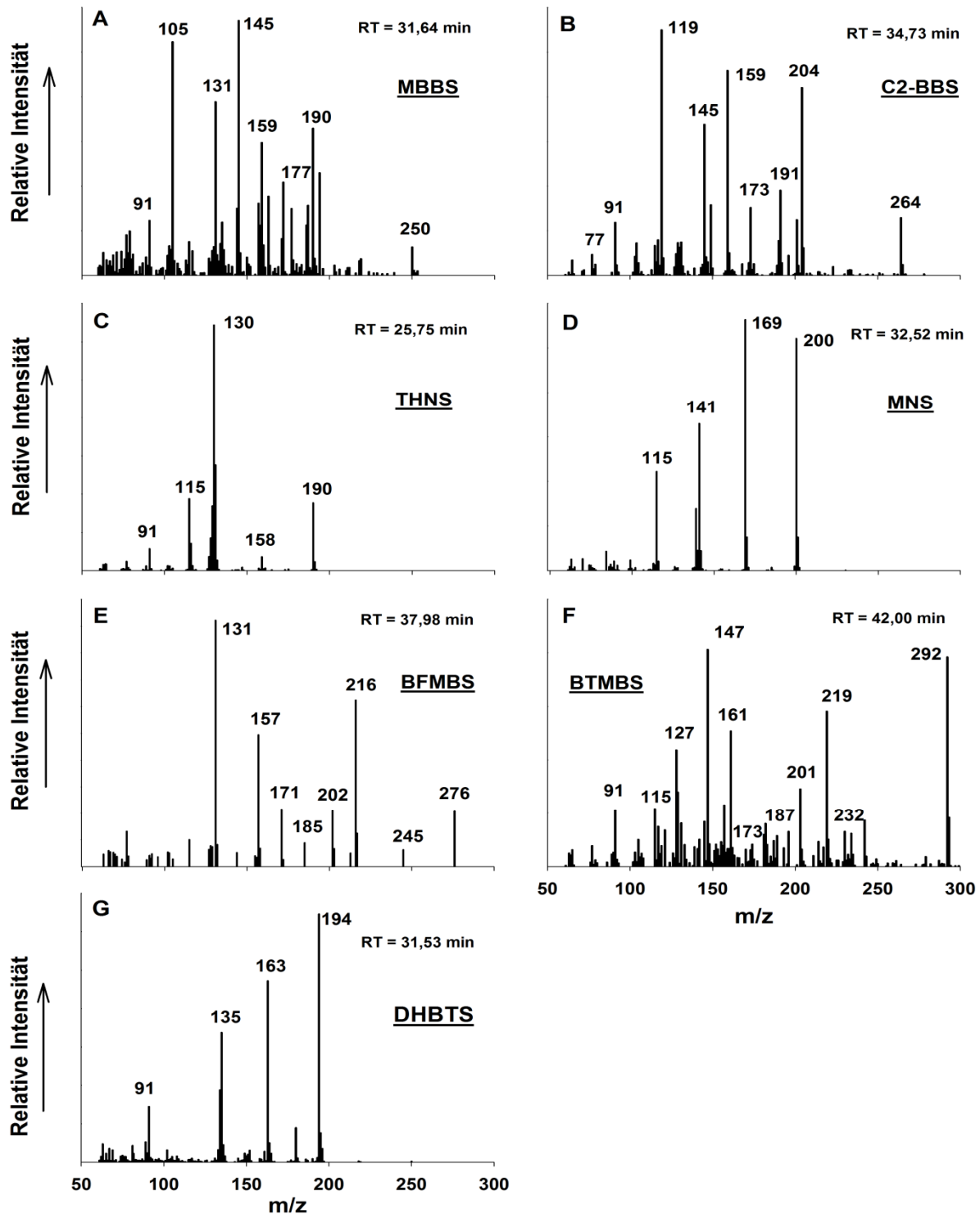


Abbildung 4.9: GC-MS Fragmentspektren saurer veresterter Metabolite aus dem Aquifer in Düsseldorf. A: MBBS, B: C₂-BBS, C: THNS, D: MNS, E: BFMBS, F: BTMBS, G: DHBTS.

Durch den Vergleich dieser Spektren mit Fragmentspektren der jeweiligen Metabolite aus der Literatur (Abbildung A.11 im Anhang, Beller et al. 1995, Annweiler et al. 2001, Annweiler et al. 2002, Martus und Püttmann 2003, Safinowski et al. 2006) konnte die weitgehende Identifizierung folgender Metabolite erreicht bzw. bestätigt werden: MBBS, C₂-BBS, THNS, MNS, BFMBS, BTMBS und DHBTS. Beim Vergleich wurde vor allem auf die Präsenz der

charakteristischen Fragmente geachtet. Die Intensitäten der Fragmente zueinander können durchaus etwas variieren, da die Stellungen der funktionellen Gruppen (z.B. Carboxylgruppe) in den hier gemessenen Metaboliten nicht bekannt sind und zu den Metaboliten aus Literatur abweichen können. Die unterschiedliche Stellung dieser Gruppen kann aber Einfluss auf die Fragmentverhältnisse haben.

Spektrenvergleich mit strukturähnlichen identifizierten Metaboliten

Analog zur LC-MS (siehe Kapitel 4.1.1.3) lässt sich eine weitgehende Identifizierung von Metaboliten auch bei der GC-MS durch den Vergleich der Fragmentspektren von potentiellen Metaboliten ohne Standard mit identifizierten Metaboliten mit gleichen Strukturen und funktionellen Gruppen erreichen. Beispielhaft sind in Abbildung 4.10 die Spektren von folgenden methylierten (ohne Standard) mit identifizierten nicht methylierten Metaboliten dargestellt: MNS und 2-NS, NMBS und MNMBS und 2-BTS und MBTS. Bei den Fragmentspektren wird vor allem der Unterschied von $m/z = 14$ bei den wichtigsten Fragmenten zwischen den nicht methylierten und den entsprechenden methylierten Metaboliten deutlich. Dieser Unterschied zeigt die zusätzliche Methylgruppe an, welche auch durch die etwas höheren RT bei den methylierten Substanzen unterstützt wird.

Limitierungen der Identifizierung von Metaboliten mit GC-MS-Fragmentspektren

Wie in den GC-MS-Fragmentspektren in Abbildung 4.9 und Abbildung 4.10 beispielhaft zu erkennen war, ist die Identifizierung von Metaboliten mit GC-MS auch mit einigen Problemen behaftet. Neben den zeitaufwändigen Derivatisierungsschritten ist im Scan-Modus häufig auch das Problem überlagerter Massenspektren aufgrund coeluerender Substanzen zu beobachten. Mit einem sehr langsam steigenden Temperaturgradienten (hier: 4 °C/min) oder der Verwendung einer GC-Säule mit anderer Selektivität lässt sich das Problem zwar verringern, aber insbesondere in kontaminierten Proben mit einer Vielzahl an organischen Komponenten ist es nicht auszuschließen. Insbesondere bei Metaboliten, die nur in sehr geringen Konzentrationen im Aquifer vorliegen, spielen die Störungen durch coeluerende Substanzen eine große Rolle, da die Messempfindlichkeit im Scan-Modus ohnehin relativ gering ist. Ein gutes Beispiel ist BTMBS (Abbildung 4.9 F). Die charakteristischen Fragmente sind vorhanden jedoch verursachen coeluerende Substanzen trotz Subtraktion des Hintergrunds viele störende Signale. Ein weiteres Problem beim Vergleich von ermittelten Fragmentspektren mit Spektren aus der Literatur sind Unterschiede in den Intensitätsverhältnissen der charakteristischen Fragmente, was die Vergleichbarkeit etwas erschwert. Das ist z.B. auf verschiedene Stellungen der funktionellen Gruppen (z.B. Carboxylgruppe) bei den Metaboliten zurückzuführen. Bei einigen Fragmentspektren in der Literatur wird aufgrund von fehlenden Standards keine genaue Stellung der funktionellen Gruppen angegeben. Der Vergleich von gemessenem Fragmentspektrum mit Angaben in der Literatur muss also häufig hauptsächlich auf den charakteristischen Fragmenten und nicht auf den Fragmentverhältnissen basieren.

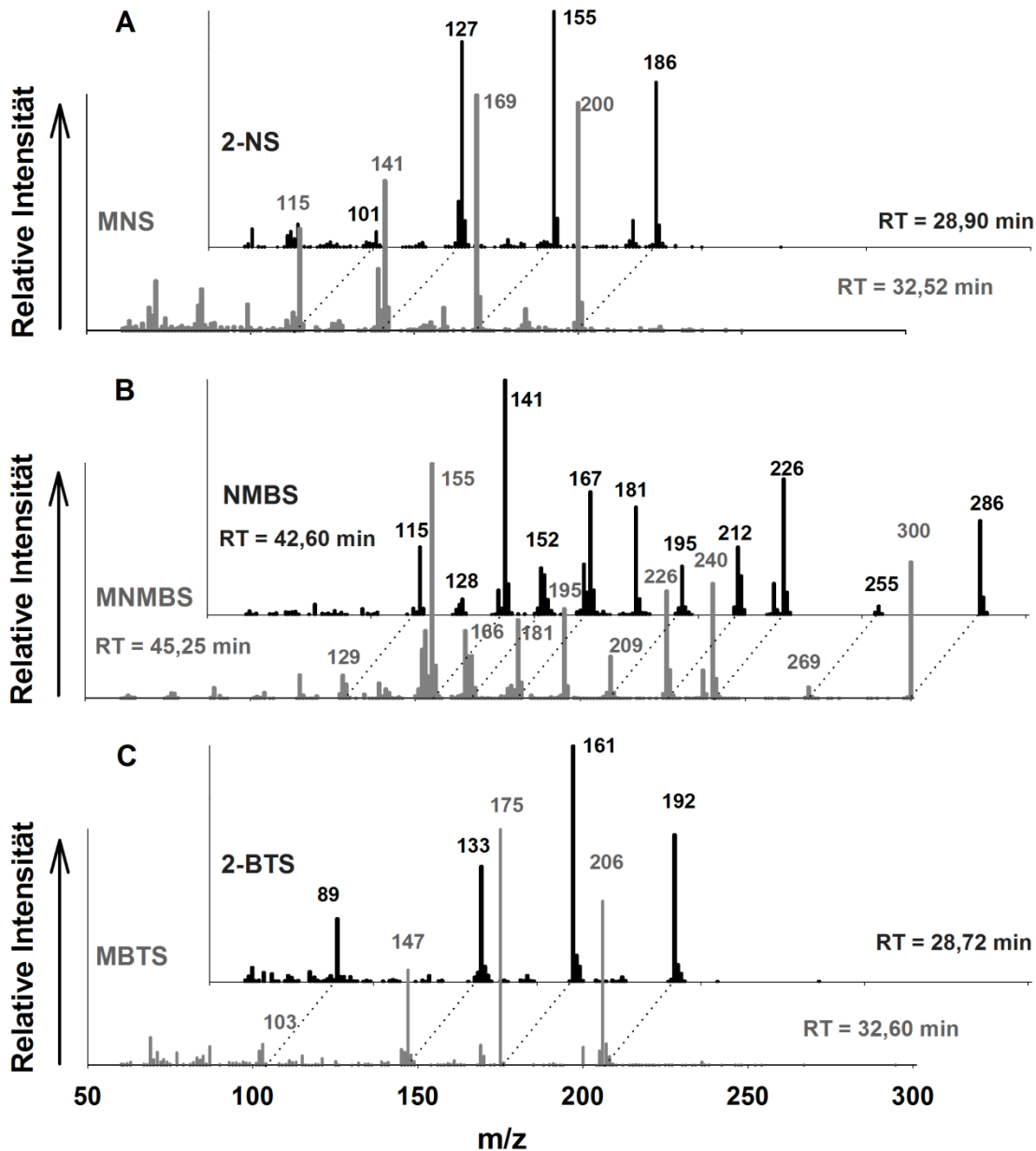


Abbildung 4.10: Vergleich von GC-MS Fragmentspektren zwischen mit Standards identifizierten Metaboliten (2-NS, NMBS, 2-BTS) und entsprechenden methylierten Verbindungen (MNS, MNMBS, MBTS) aus Proben aus dem Aquifer in Düsseldorf. A: 2-NS und MNS. B: NMBS und MNMBS C: 2-BTS und MBTS

Zusammengefasst konnte eine Vielzahl von sauren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten mit dem hier angewandten analytischen Ansatz identifiziert (mit Standard) und weitgehend identifiziert (ohne Standard) werden und somit ein anaerober Abbau der entsprechenden (Ausgangs)Schadstoffe im Aquifer in Düsseldorf nachgewiesen werden (Tabelle 4.3). Dabei wurde deutlich, dass neben LC-MS-Methoden (LC-ESI-MS/MS, LC-ESI-QTOF-MS) auch die GC-MS einen wichtigen Beitrag zur Absicherung der Identifizierung von sauren Metaboliten leisten kann. Dennoch ist die LC-MS-Analytik für saure aromatische und heterozyklische Metabolite die Methode der Wahl, da sie aufgrund der

Polarität der Metabolite ohne Derivatisierungsschritte auskommt und eine sehr schnelle sensitive und selektive Analytik bietet.

4.1.2.3 Quantifizierung saurer Metabolite

Zur Quantifizierung wurde eine MRM-Messmethode mittels LC-ESI-MS/MS entwickelt mit der horizontale und vertikale Konzentrationsverteilungen ausgewählter saurer aromatischer und heterozyklischer Metabolite in Grundwasserproben ermittelt wurden. Insbesondere die kleinskaligen Konzentrationsunterschiede der Metabolite in Grundwasserproben aus den verschiedenen Tiefen aus dem HR-MLW am Standort in Düsseldorf waren entscheidend, um die Indikatorfunktionen der Metabolite eingehender studieren zu können (siehe Kapitel 4.3). Die Einstellungen der Messmethode sind in Kapitel 3.3.1.3 eingehend beschrieben.

Für die ausgewählten Metabolite wurden zunächst die intensivsten Fragmente ermittelt sowie die Parameter für Vorläufer-Ionen und Fragmente optimiert. Die Metabolite wurden über Standards quantifiziert. Metabolite, für die keine Standards erhältlich waren, wurden (wenn möglich) über die Response von Substanzen mit Standards quantifiziert, die ähnliche Strukturen und gleiche funktionelle Gruppen haben (z.B. MBBS über BBS). Für einige Metabolite (z.B. BTMBS, BFMBBS) konnte aufgrund von fehlenden geeigneten Standards keine Quantifizierung durchgeführt werden. Die ermittelten Bestimmungsgrenzen (BG) im Bereich von 0,25 bis 0,5 µg/L (Tabelle A.5 im Anhang) gewährleisteten eine empfindliche Messung der Metaboliten in den nicht angereicherten Grundwasserproben.

Abbildung 4.11 zeigt beispielhaft die Chromatogramme (empfindlichster Massenübergang) der verschiedenen quantifizierten Metabolite in den Grundwasserproben aus Düsseldorf.

Bei jedem Metaboliten ist das Chromatogramm der Probe gezeigt, in dem die maximale Konzentration des jeweiligen Metaboliten nachgewiesen werden konnte. Bei einigen Chromatogrammen sind mehrere Peaks mit dem gleichen Massenübergang und mit ähnlicher Retentionszeit zu erkennen, was ein deutlicher Hinweis auf die Präsenz von Isomeren mit unterschiedlicher Stellung der Methyl- bzw. Carboxylgruppen ist (Abbildung 4.11 B,G,H,J). Bei BFS und BTS konnten über die Messung von Standards 2-BTS (7,58 min, Abbildung 4.11 G) und 2-BFS (7,49 min, Abbildung 4.11 J) eindeutig zugeordnet werden. Im Chromatogramm von MBTS konnten jedoch die Peaks aufgrund von fehlenden Standards nicht zugeordnet werden. Beide Peaks wurden einzeln über 2-BTS als Standard quantifiziert und dann die Konzentration als Summe angegeben.

Mit dieser Quantifizierungsmethode konnten die verschiedenen Metabolite ohne vorgeschaltete zeitaufwändige Anreicherungs-schritte sensitiv und selektiv gemessen werden.

Die Ergebnisse der Quantifizierung der Grundwasserproben aus den unterschiedlichen Tiefen des HR-MLW in Düsseldorf werden in den Kapiteln 4.3.2 und 4.3.3 eingehend diskutiert.

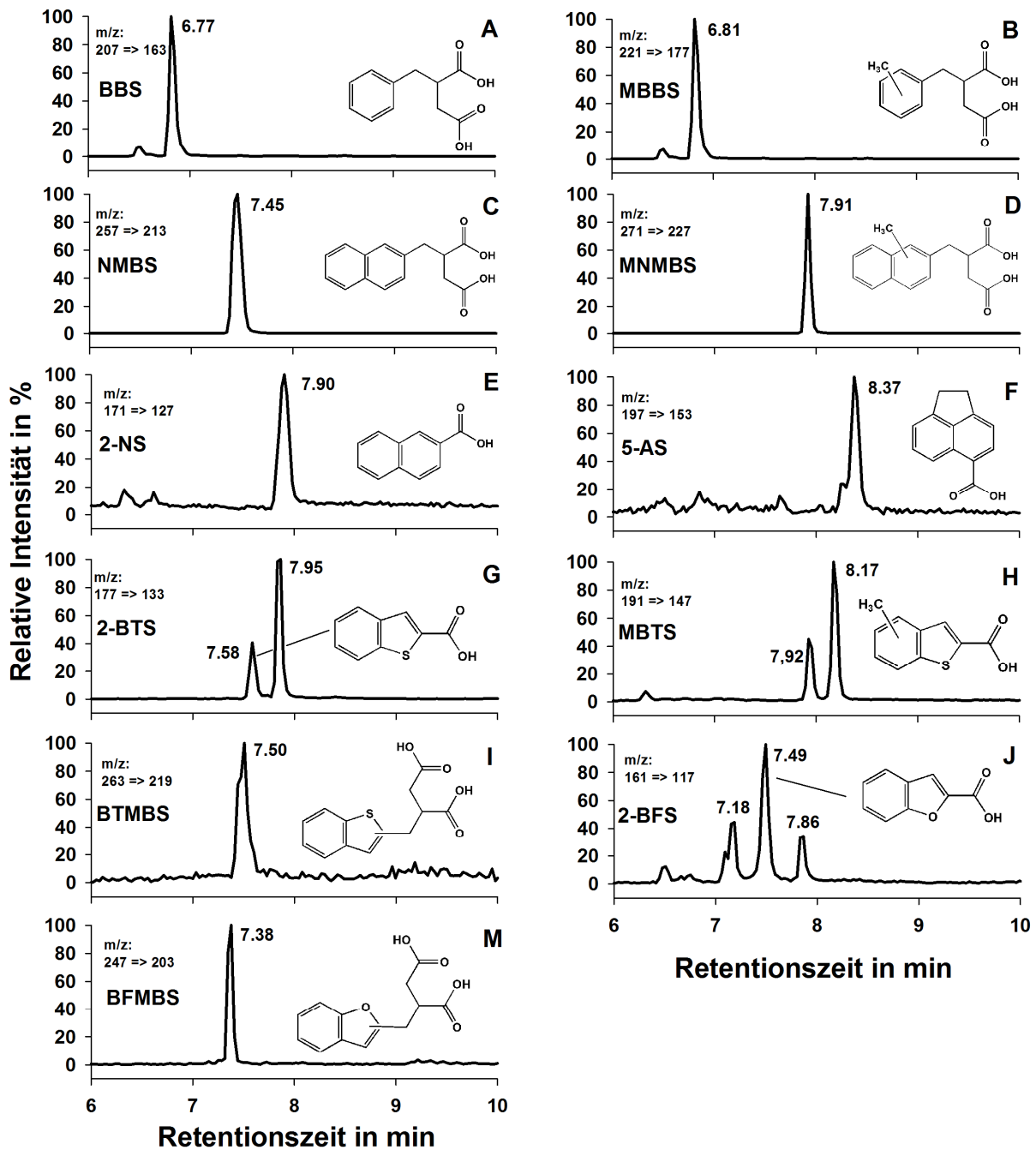


Abbildung 4.11: Chromatogramme der Metabolite aus dem Gaswerksstandort Düsseldorf in der MRM Methode. Die Chromatogramme stammen von der jeweiligen Probe aus dem Aquifer mit der höchsten Konzentration des jeweiligen Metaboliten.

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen (Kapitel 4.1)

- Mit der Anwendung unterschiedlicher Screening-Ansätze (NLS mittels LC-ESI-MS/MS sowie *Suspect-Screening* mittels LC-ESI-QTOF-MS) konnten erfolgreich Hinweise auf saure aromatische, phenolische, bicyclische und heterozyklische Metabolite in 2 Probenarten (Huminstoff-Isolate, Wasserproben) aus verschiedenen Aquiferen ermittelt werden. Dabei gewährleistete insbesondere das zum ersten Mal für

diese Metabolite angewendete gruppenspezifische Screening mit NLS ($\Delta m/z = 44$ und $\Delta m/z = 116$) eine sehr selektive Suche.

- Durch Summenformeln aus akkuraten Massen (LC-ESI-QTOF-MS) sowie Fragmentspektren aus LC-ESI-QTOF-MS (hochaufgelöst), LC-ESI-MS/MS- und auch GC-MS-Messungen sowie anschließendem Abgleich mit (strukturähnlichen) Standards konnten verschiedene saure Metabolite von mono- und polyaromatischen, bizyklischen sowie heterozyklischen Schadstoffen **identifiziert** oder weitgehend identifiziert werden. Beispiele dafür sind **BBS**, **MBBS**, **NMBS**, **MNMBS**, **4-HMBS**, **2-NS**, **5-AS**, **2-IS**, **2-BFS** oder **2-BTS**. Die Metabolite **4-HMBS**, **MBTS**, **BFMBS** und **BTMBS** konnten (nach bestem Wissen) zum ersten Mal in mit Teerölen kontaminierten Aquiferen nachgewiesen werden.
- Die in dieser Arbeit ermittelten hochaufgelösten Fragmentspektren stellen einen ersten Schritt zur Nutzung von LC-ESI-QTOF-MS-Spektren zur Identifizierung von sauren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten in Zukunft dar. Die in der Literatur publizierten Fragmentspektren basieren immer noch weitgehend auf GC-MS Messungen obwohl die LC-MS die deutlich geeignetere Messtechnik für diese Substanzen ist.
- Bei der Suche nach Strukturvorschlägen für unbekannte Metabolite zeigte sich die Nutzung von in-silico Fragmentspektren (mit dem Program MetFrag) als sehr hilfreich, um die aus chemischen Datenbanken auf Basis von Summenformeln erhaltenen Strukturvorschläge auf die Plausibelsten zu selektieren.
- Die Übereinstimmung des Nachweises vieler Metabolite in zwei Aquiferen mit unterschiedlichen Probenarten (Grundwasserproben aus Düsseldorf und FS-Isolate aus Stuttgart) unterstreicht die Plausibilität der Identifizierungsergebnisse und zeigt, dass der Prozess der Huminstoffanreicherung scheinbar zu keinen entscheidenden Veränderungen der Strukturen der Metabolite führt.
- Die entwickelte LC-ESI-MS/MS-Methode (MRM) ließ eine sensitive und selektive Quantifizierung ausgewählter relevanter Metaboliten ohne vorgeschaltete Anreicherungsschritte in Grundwasser zu. Sie bildete vor allem die Grundlage zur Aufdeckung der kleinskaligen Konzentrationsunterschiede in den Proben aus dem HR-MLW in Düsseldorf zur Aufklärung der (quantitativen) Indikatorfunktionen der Metabolite (Kapitel 4.3.2 und 4.3.3).

4.2 Anaerober Abbau und Metabolitenbildung unter definierten Milieubedingungen

Batch-Experimente wurden unter definierten anaeroben Bedingungen mit der eisenreduzierenden Bakterienkultur *G. toluenoxydans* TMJ1 und dem Schadstoff Toluol als Substrat sowie teilweise unter Zugabe von Cosubstraten durchgeführt. Dabei sollten insbesondere quantitative Zusammenhänge zwischen dem Abbau des Schadstoffs Toluol und der Bildung des Metaboliten BBS, sowie der (cometabolische) Abbau in Schadstoffgemischen mit etwaigen Hemmeffekten und dem Auftreten von Cometaboliten erforscht werden. Studien im Batch-Ansatz sind dabei wichtig, um unter kontrollierten Bedingungen einzelne Einflussfaktoren zu untersuchen und z.B. Massenbilanzen zwischen abgebautem Schadstoff und gebildetem Metaboliten aufstellen zu können. Die Komplexität der Bedingungen und der Kontaminationen im Feld lässt dies nicht zu.

Die Stöchiometrie und die Redoxverhältnisse des Toluol-Abbaus unter Eisenreduktion sind in Abbildung 2.6 in Kapitel 2.2.1.1 dargestellt. Folgende Aspekte führten zur Auswahl der Bakterienkultur, des Substrats sowie der Experimente:

- Die Bakterienkultur *G. toluenoxydans* TMJ1 wurde ausgewählt, da sie zum einen in der Lage ist im anaeroben Milieu unter Nutzung von Fe(III) als Elektronenakzeptor (siehe Formel (3.1) in Kapitel 3.2.1) monoaromatische Schadstoffe wie z.B. Toluol abzubauen (Kapitel 3.2.2). Zum anderen wurde sie aus dem in dieser Arbeit untersuchten kontaminierten Grundwasserleiter in Stuttgart (Kapitel 3.1.2) isoliert (siehe Kapitel 3.1.2 und Kunapuli et al. 2010).
- Der Prozess der Eisenreduktion wurde untersucht, da er als einer der entscheidenden Prozesse beim anaeroben Abbau von Schadstoffen in kontaminierten Grundwassersystemen angesehen wird (z.B. Christensen et al. 2001), und auch in den in dieser Arbeit untersuchten Feldstandorten eine Rolle spielt (siehe Kapitel 3.1.1 und 3.1.2).
- Toluol wurde in den Experimenten als Modellschadstoff verwendet, da es sich um einen sehr häufig vorkommenden Schadstoff insbesondere in mit Teeröl kontaminierten Grundwässern handelt (siehe Kapitel 3.1.1 und 3.1.2).
- Neben metabolischen wurden auch cometabolische Abbauprozesse in Schadstoffgemischen untersucht, da Kontaminationen in Aquiferen meistens nicht durch einzelne Schadstoffe sondern durch Gemische (z.B. Teeröle) verursacht werden und cometabolische Abbauprozesse sowie gegenseitige Hemmungen des Abbaus dort relevant sein können (Annweiler et al. 2001, Safinowski et al. 2006).

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Arten an Experimentserien durchgeführt:

- 1) Toluolabbau und Metabolitenbildung unter unterschiedlichen Milieubedingungen (Kapitel 4.2.1)

Durch Zugabe von Toluol als Substrat und ohne Cosubstrate wurde der metabolische Abbau von Toluol und die quantitative Metabolitenbildung unter verschiedenen Milieubedingungen untersucht.

- 2) Metabolitenbildung und Cometabolismus in Schadstoffgemischen (Kapitel 4.2.2)
Neben Toluol als Substrat wurden zusätzliche Cosubstrate zugegeben, um sowohl den Abbau von Toluol und die Metabolitenbildung unter Anwesenheit von aromatischen und heterozyklischen Schadstoffgemischen als auch cometabolische Abbauprozesse zu untersuchen.

4.2.1 Toluolabbau und Metabolitenbildung unter unterschiedlichen Milieubedingungen

Zunächst wurde das Wachstum der Bakterienkultur *G. toluenoxydans* TMJ1 und der anaerobe Abbau von Toluol unter optimalen Bedingungen für die Bakterienkultur untersucht (z.B. optimale Temperatur, keine Zugabe weiterer Schadstoffe).

Abbildung 4.12 zeigt einen deutlichen Anstieg der Fe(II)-Konzentration ausschließlich in den Proben mit Bakterienkultur und Substrat. Diese Beobachtung ist ein starker Indikator für Abbautätigkeiten und Wachstum der Mikroorganismen, da sie das im Medium vorhandene Fe(III) als Elektronenakzeptor beim Abbau von organischem Substrat unter Bildung von Fe(II) nutzen. Es ist eine kurze lag-Phase von ein bis zwei Tagen zu erkennen, die die überführte Bakterienkultur (Inoculum) benötigt, um sich an das neue Medium zu adaptieren und zu wachsen. Die lag-Phase ist von vielen Einflussgrößen abhängig, wie z.B. dem Volumen der überführten Bakterienkultur, den Umgebungsbedingungen (z.B. Temperatur), dem Nährstoffangebot sowie der Wachstumsphase aus der die überführte Bakterienkultur (Inoculum) entnommen wurde. Allgemein ist eine genaue zeitliche Abgrenzung der lag-Phase sehr schwierig, da die Aktivität der Mikroorganismen am Beginn des Experimentes aufgrund der geringen Population von den Messunsicherheiten der Messmethode überlagert wird. In allen durchgeführten Experimenten wurden als Inoculum Mikroorganismen aus der stationären Phase überführt.

Nach einer kurzen log-Phase ist nach etwa 3 bis 4 Tagen kaum noch eine Zunahme der Fe(II)-Konzentration zu erkennen, was darauf hindeutet, dass keine signifikante Abbautätigkeit mehr stattfindet, da kein Substrat mehr zur Verfügung steht. Die Mikroorganismen sterben wohl teilweise ab und ein kleiner Anteil geht in eine Art Ruhestadium mit nur geringem Erhaltungsstoffwechsel über. Diese lassen sich dann bei der Überführung in Medien mit neuem Substrat wieder aktivieren.

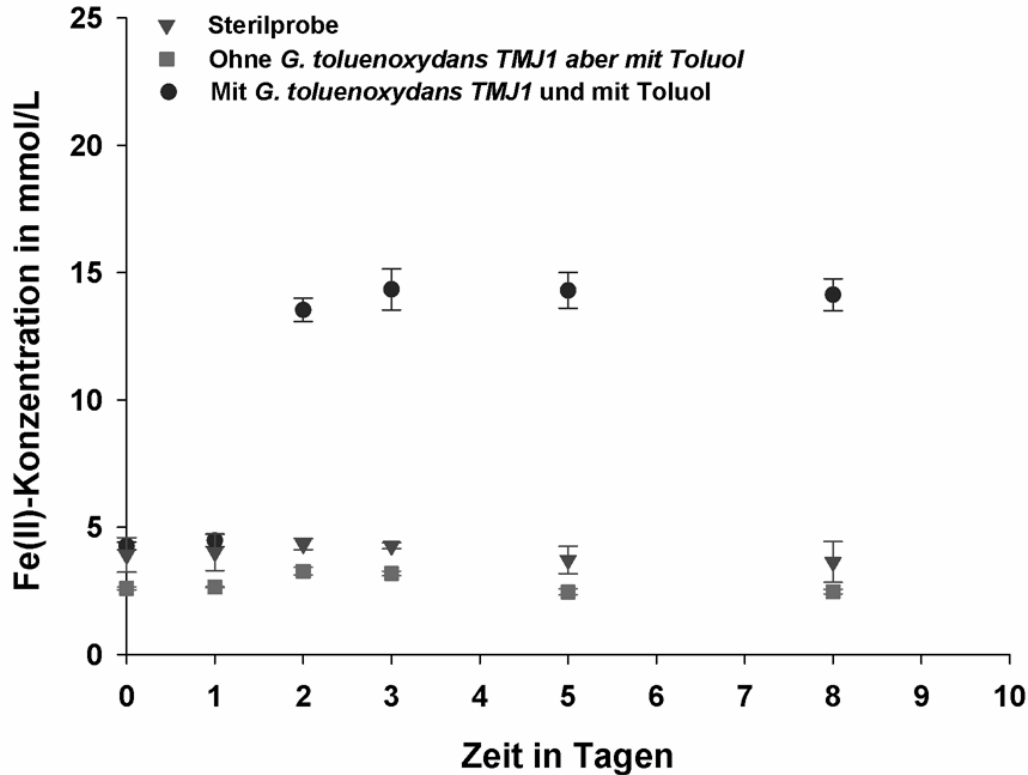


Abbildung 4.12: Verlauf der Fe(II)-Konzentration bei anaeroben Abbauversuchen mit Toluol als Substrat und der eisenreduzierenden Bakterienkultur *G. toluenoxydans* TMJ1. Bedingungen: Überführung von 5 mL Bakterienkultur als Inoculum, keine Zugabe von Cometaboliten, Verwendung von Toluol als Substrat und Inkubation bei 30 °C im Dunkeln.

Bei den Sterilproben, die nach Zugabe der Bakterienkultur (Inoculum) autoklaviert wurden und den Proben zu denen keine Bakterienkultur zugesetzt wurde, ist kein Anstieg der Fe(II)-Konzentration, also kein Wachstum der Kultur zu erkennen. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass wichtige Voraussetzungen zur erfolgreichen Durchführung der Versuche zum anaeroben Abbau unter definierten Bedingungen erfüllt waren:

1. Durch die Zunahme der Fe(II) Konzentration konnte eine erfolgreiche Adaption der Bakterienkultur *G. toluenoxydans* TMJ1 an das Medium und deren Wachstum gezeigt werden.
2. Da es sich bei *G. toluenoxydans* TMJ1 um eine obligat anaerobe Bakterienkultur handelt, zeigt das Wachstum, dass die getroffenen Maßnahmen zum anaeroben Arbeiten zielführend waren.
3. Die fehlende Zunahme der Fe(II)-Konzentration in den autoklavierten Proben und den Proben ohne Inoculum schließt die Relevanz abiotischer Faktoren und anderer Mikroorganismen auf den anaeroben Abbau von Toluol unter eisenreduzierenden Bedingungen in den durchgeführten Batch-Experimenten aus.

4.2.1.1 Einfluss der Temperatur

In weiteren Experimenten wurde getestet, wie sich eine Änderung der Temperatur von 30 °C auf 10 °C (Abbildung 4.13) auf das Wachstum der Bakterien bzw. den Abbau von Toluol auswirken. Diese Bedingungen kommen den natürlichen Bedingungen im Aquifer deutlich näher, da z.B. 10 °C eine typische Wassertemperatur in Aquiferen ist (Griebler und Mösslacher 2003). Für *G. toluenoxydans* TMJ1 ist eine Temperatur von 10 °C nicht mehr als ideal zu bezeichnen, da dessen optimale Wachstumstemperatur bei etwa 30 °C liegt (siehe Tabelle 3.2 in Kapitel 3.2.1 und Kunapuli et al. 2010).

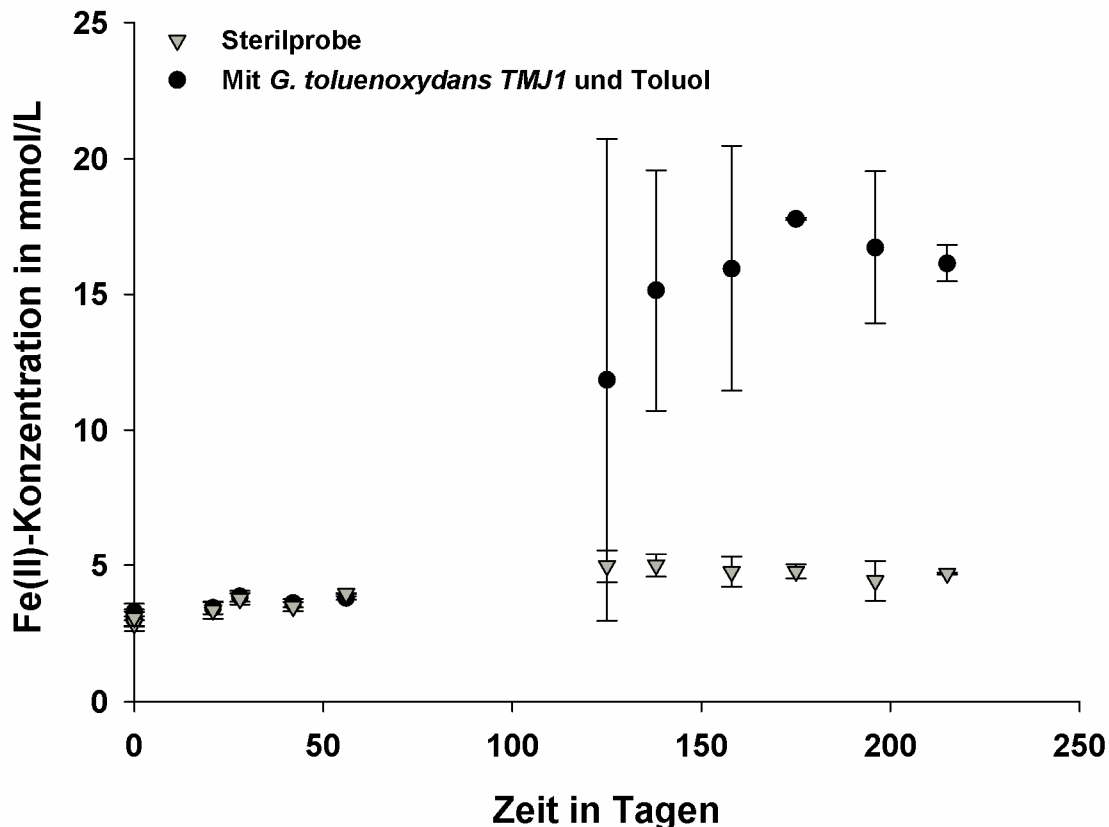


Abbildung 4.13: Verlauf der Fe(II)-Konzentration bei anaeroben Abbaueversuchen mit Toluol als Substrat und der eisenreduzierenden Bakterienkultur *G. toluenoxydans* TMJ1 unter Variation der Temperatur. Bedingungen: Überführung von 5 mL Bakterienkultur als Inoculum, keine Zugabe von Cometaboliten, Verwendung von Toluol als Substrat und Inkubation bei 10 °C im Dunkeln.

Der Abbau bei einer Umgebungstemperatur von 10 °C zeigt eine erheblich verlängerte lag-Phase von über 50 Tagen und einen deutlich langsameren Anstieg der Fe(II)-Konzentration (Abbildung 4.13). Der Beginn des Anstiegs der Fe(II)-Konzentration erfolgt in der Zeit nach 56 Tagen bis 125 Tagen und erreicht ein Plateau nach 150 Tagen. Zusätzlich ist auch eine größere Standardabweichung zu beobachten, die durch unterschiedlich schnelles Wachstum der Bakterienkultur in den 3 Parallelansätzen zu begründen ist.

Dieses Experiment zeigt deutlich, dass bei ähnlich niedrigen Temperaturen wie im Aquifer von etwa 10 °C der Abbau von Schadstoffen durch die geringere Temperatur deutlich langsamer läuft als bei den Bedingungen von 30 °C im Brutschrank im Laboratorium. Die

niedrigere Temperatur ist aber immer noch ausreichend um nachweisliche Abbauaktivität zu entwickeln. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, aber für einen kontaminierten Aquifer bedeutet dies, dass allein durch den Faktor Temperatur ein sehr langsamer Abbau zu erwarten ist. Eine Erhöhung der Wassertemperatur zur Stimulation des Abbaus der Schadstoffe im Aquifer lässt sich aber natürlich mit vertretbarem logistischen und finanziellen Aufwand nicht durchführen. Ein Vorteil des Grundwassers ist in diesem Zusammenhang aber die relativ konstante Wassertemperatur (ohne jahreszeitliche Schwankungen), die keine Adaption der Mikroorganismen an wechselnde Temperaturen erfordert. Neben der Wassertemperatur spielen natürlich noch viele andere Faktoren, wie z.B. die Verfügbarkeit von Substrat, Nährstoffen und Elektronenakzeptoren eine wichtige Rolle, die aufgrund der konstanten Temperatur im Grundwasser als die entscheidenden Faktoren für die Geschwindigkeit des Abbaus angesehen werden können (siehe Kapitel 2.1.2).

4.2.1.2 Bildung des Metaboliten Benzylbernsteinsäure (BBS)

Neben der Verwendung der Fe(II)-Konzentration als Indikator für Wachstum und Abbautätigkeit der Bakterien wurde in weiteren Experimenten die Bildung des Metaboliten BBS quantifiziert. Er ist ein wichtiger Indikator des anaeroben Abbaus von Toluol, denn der Abbau wird durch die Addition von Fumarat an die Methylgruppe initiiert, was zur Bildung von BBS führt (Abbildung 2.4 in Kapitel 2.2.1.1 sowie. Biegert et al. 1996, Krieger et al. 1999).

In Abbildung 4.14 ist deutlich zu erkennen, dass der Konzentrationsverlauf des Metaboliten BBS sehr gut mit dem Anstieg der Fe(II)-Konzentration nach 2 Tagen korreliert. Der Anstieg der Fe(II)-Konzentrationen zwischen dem 2. und 3. Tag spiegelt sich jedoch nicht in einer weiteren Veränderung der BBS-Konzentration wider. Sie erreicht nach 2 Tagen ein relativ konstantes Konzentrationsniveau von etwa $c(\text{BBS}) = 0,3 \mu\text{mol/L}$. Kleinere Veränderungen der BBS-Konzentrationen sind durch unterschiedlich schnelles Wachstum in den drei parallel angesetzten Proben zu begründen. Der Anstieg der BBS-Konzentration in den Sterilproben vom Beginn der Experimente bis zum 2. Tag lässt sich auf Messunsicherheiten zurückführen (siehe Standardabweichung in Abbildung 4.14). Ein Anstieg der BBS-Konzentration, der durch Wachstum und Abbautätigkeit begründet wäre, müsste sich auch in Veränderungen der Fe(II)-Konzentration widerspiegeln, was aber nicht der Fall ist. Die bereits vorhandene Konzentration an BBS am Anfang des Versuchs (0 Tage) stammt aus der Überführung des Inoculums. Die Fe(II)-Konzentration erreicht erst 1 Tag später als BBS ein konstantes Niveau von etwa $17 \mu\text{mol/L}$. Sie bleibt konstant, so dass nach 3 Tagen kein relevanter weiterer Abbau mehr stattzufinden scheint.

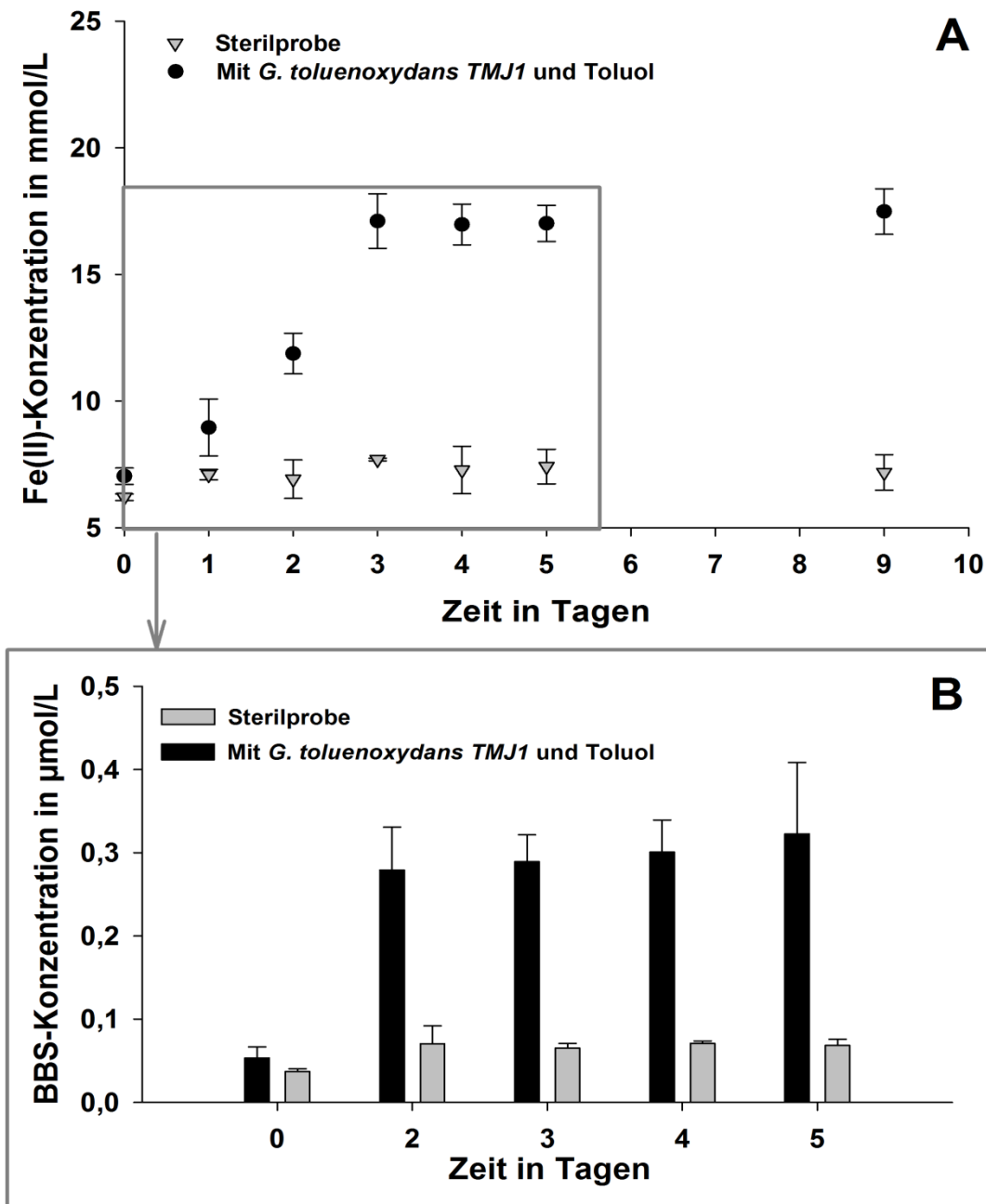


Abbildung 4.14: Verlauf der Fe(II)-Konzentration (A) und der Konzentration an BBS an ausgewählten Zeitpunkten (B) bei anaeroben Abbauversuchen mit Toluol als Substrat und der eisenreduzierenden Bakterienkultur *G. toluenoxydans* TMJ1. Bedingungen: Überführung von 5 mL Bakterienkultur als Inoculum, keine Zugabe von Cometaboliten, Verwendung von Toluol als Substrat und Inkubation bei 30 °C im Dunkeln.

Das Auftreten des anaeroben Metaboliten BBS in den Batch-Experimenten zeigt deutlich, dass der spezifische Abbauweg der Fumarataddition an die Methylgruppe des Toluol-Moleküls in den Experimenten aktiv ist. Dieser Abbauweg konnte auch schon von Kunapuli et al. (2010) für *G. toluenoxydans* TMJ1 nachgewiesen werden und ist bisher bei jedem Toluol-abbauenden Mikroorganismus unter anaeroben Bedingungen beobachtet worden (z.B. Biegert et al. 1996, Krieger et al. 1999, Chakraborty et al. 2004). Das Konzentrationsverhältnis an gebildetem BBS und umgesetzter Menge an Toluol ist sehr gering. Es beträgt z.B. am Tag 5 etwa 0,1%, unter der Annahme, dass die eingesetzte Menge

an Toluol komplett aufgezehrt war. Diese Annahme wurde durch Messungen von Toluol zum selben Zeitpunkt bestätigt (nicht gezeigt). Auch Kunapuli et al. (2010) stellten in ihrer Arbeit mit *G. toluenoxydans* TMJ1 eine komplette Aufzehrung des Toluols fest, aber quantitative Verhältnisse konnten aufgrund einer lediglich qualitativen Bestimmung von BBS nicht gebildet werden. Was aber sind die entscheidenden Gründe für dieses geringe Verhältnis? Mögliche Ursachen wie z.B. geringes Ausscheiden von BBS aus den Bakterienzellen in das Medium und/oder schneller weiterer Abbau des Metaboliten werden in Kapitel 4.3.2 eingehender diskutiert.

4.2.1.3 Nutzung des Metaboliten BBS als Substrat

Neben der Nutzung von Toluol als eigentlichem Substrat wurde zusätzlich getestet, ob *G. toluenoxydans* TMJ1 den Metaboliten BBS auch als Substrat nutzen kann, den sie selber beim anaeroben Abbau von Toluol bildet. Kann die Bakterienkultur also den Metaboliten, der extrazellulär vorliegt, in die Zelle aufnehmen und anstelle des eigentlichen Substrats Toluol als Kohlenstoff- und Energiequelle verwenden?

Diese Frage hat eine große Relevanz für kontaminierte Aquifere und insbesondere für deren Bereiche, die im Abstrom liegen. Falls der Metabolit, der im Allgemeinen polarer und dadurch mobiler ist als das Ausgangssubstrat, im Aquifer transportiert und von den Mikroorganismen genutzt werden könnte, würde er eine wichtige Substratquelle in abströmigen Bereichen darstellen in denen die primären Substrate (Schadstoffe) nicht mehr vorhanden sind.

Die Experimente mit BBS als Substrat anstatt Toluol zeigen keinen signifikanten Anstieg der Fe(II)-Konzentration über einen Zeitraum von 100 Tagen (Abbildung 4.15). Die Vergleichsproben mit Toluol als Substrat hingegen zeigen einen deutlichen Anstieg in den ersten Tagen des Experiments. Das ist ein eindeutiger Indikator dafür, dass BBS, wenn es extrazellulär vorliegt, von *G. toluenoxydans* TMJ1 nicht wieder in die Zelle aufgenommen und/oder nicht als Kohlenstoff- und Energiequelle anstelle von z.B. Toluol genutzt werden kann. Diese fehlende Nutzung von BBS wurde auch von Beller et al. (1992) bei einer sulfatreduzierenden Toluol-abbauenden Bakterienkultur nachgewiesen. Die Ursachen dafür konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Möglicherweise kann der Metabolit aufgrund der höheren Polarität durch die Bernsteinsäure-Gruppe die Zellwand im Gegensatz zum unpolaren Ausgangsprodukt Toluol nicht mehr passieren.

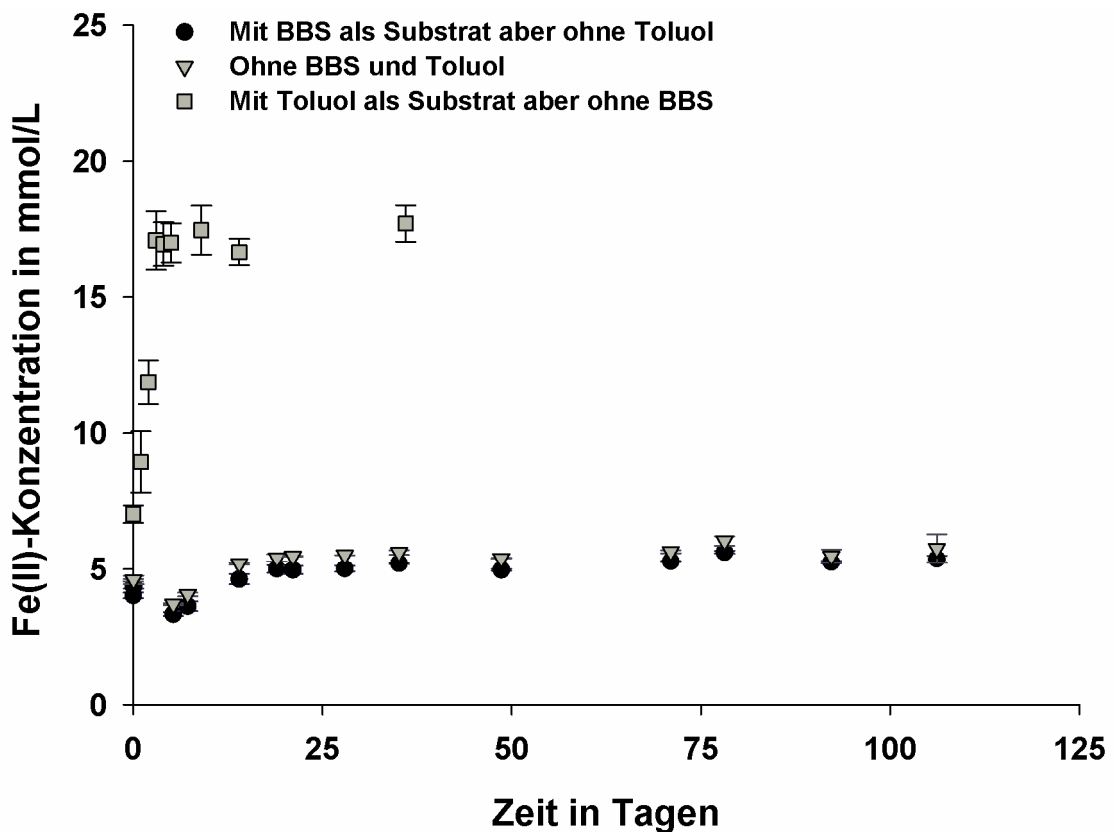


Abbildung 4.15: Verlauf der Fe(II)-Konzentration bei anaeroben Abbauprobungen mit BBS oder Toluol als Substrat und der eisenreduzierenden Bakterienkultur *G. toluenoxydans* TMJ1. Bedingungen: Überführung von 5 mL Bakterienkultur als Inokulum, keine Zugabe von Cometaboliten, Inkubation bei 30 °C im Dunkeln.

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen (Kapitel 4.2.1)

- Das Wachstum der Mikroorganismen und der Abbau des Substrats Toluols konnte nachgewiesen werden und war reproduzierbar.
- Die Bildung des Metaboliten BBS und damit die Fumarataddition als Aktivierungsschritt beim anaeroben Abbau des Toluols konnte nachgewiesen werden. Zusätzlich korrelierte der Anstieg der Fe(II) Konzentration gut mit dem Anstieg des BBS-Gehaltes. Das Konzentrationsverhältnis an gebildetem BBS und umgesetzter Menge an Toluol war mit maximal 0,1% sehr gering, was auf geringes Ausscheiden von BBS aus den Bakterienzellen in das Medium und/oder schnellen weiteren Abbau hindeutet.
- Die Abbautätigkeit der Mikroorganismen war in den Batch-Experimenten durch die eingeschränkte Verfügbarkeit des Substrats Toluols limitiert, was durch das Erreichen eines Plateaus der Fe(II)-Konzentration in allen Experimenten zu beobachten war. Die Aufzehrung des Substrats ist in kontaminierten Aquiferen jedoch häufig nicht der limitierende Faktor, da häufig durch die Grundwasserstörung kontinuierlich Substrat aus Schadstoffquellen nachgeliefert wird.
- Experimente bei ähnlichen Temperaturen wie im Aquifer (ca. 10 °C) zeigten eine verlangsamte Abbaugeschwindigkeit. Dies zeigt deutlich, dass sich relevante

Abbauprozesse im Untergrund nur über längere Zeiträume (Jahre bis Jahrzehnte) vollziehen können.

- Der von den Mikroorganismen beim Abbau von Toluol gebildete Metabolit BBS konnte nicht als Substrat anstelle von Toluol genutzt werden. Dieses Phänomen würde für Abstrombereiche von kontaminierten Aquiferen bedeuten, dass BBS, einen relevanten Transport vorausgesetzt, von den Mikroorganismen im Abstrom (wo Toluol nicht mehr vorhanden ist) nicht als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden könnte.

4.2.2 Metabolitenbildung und Cometabolismus in Schadstoffgemischen

Die Experimente unter Zugabe von Cosubstraten wurden durchgeführt, um den Abbau von Toluol unter Anwesenheit von aromatischen und heterozyklischen Schadstoffgemischen zu studieren, die häufig in kontaminierten Aquiferen anzutreffen sind. Neben möglichen Hemmungen des Abbaus von Toluol durch die (toxischen) Schadstoffgemische wurden auch cometabolische Abbauprozesse untersucht. Es wurden als Cosubstrate Substanzen ausgewählt, die zum einen eine gewisse Relevanz als Kontamination für Aquifere besitzen und zum anderen aufgrund ihrer Struktur dem Substrat Toluol ähneln. Die Ähnlichkeit der Struktur ist eine wichtige Voraussetzung für cometabolische Abbauprozesse, da die abbauenden Enzyme zwar etwas unspezifisch sind, was Cometabolismus überhaupt erst möglich macht, aber eine gewisse Strukturähnlichkeit zum eigentlichen Substrat gegeben sein muss (relative Substratspezifität). Daher wurden monoaromatische Substanzen wie Benzol, Xylol und Ethylbenzol sowie heterozyklische Substanzen wie Furan, Thiophen, Pyridin und Pyrrol ausgewählt (Kapitel 3.2.2.1).

4.2.2.1 Zugabe von Cosubstratmischungen

In einer ersten Experimentserie wurden die Schadstoffgemische in 2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan (HMN) angesetzt und in die entsprechenden Batch-Gefäße zugegeben (Kapitel 3.2.2). Die Konzentration der Schadstoffe in der wässrigen Phase sollte auf diese Weise relativ niedrig gehalten und eine regelmäßige Nachlieferung der Schadstoffe aus der oben aufschwimmenden HMN-Phase in die wässrige Phase gewährleistet werden. Zwischen beiden Phasen stellt sich ein Konzentrations-Gleichgewicht der Schadstoffe entsprechend ihrer Polarität ein, welches bei einem Verbrauch durch die Mikroorganismen in der wässrigen Phase verändert wird. Durch Nachlieferung der Schadstoffe aus der HMN-Phase wird das Gleichgewicht wieder eingestellt. Dabei kann aber das HMN selber von den Mikroorganismen nicht als Substrat verwendet werden.

Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.16 und Abbildung 4.17 dargestellt. Neben der Fe(II)-Konzentration wurden auch die Konzentrationen an Toluol und BBS zu jedem Probenahmezeitpunkt ermittelt.

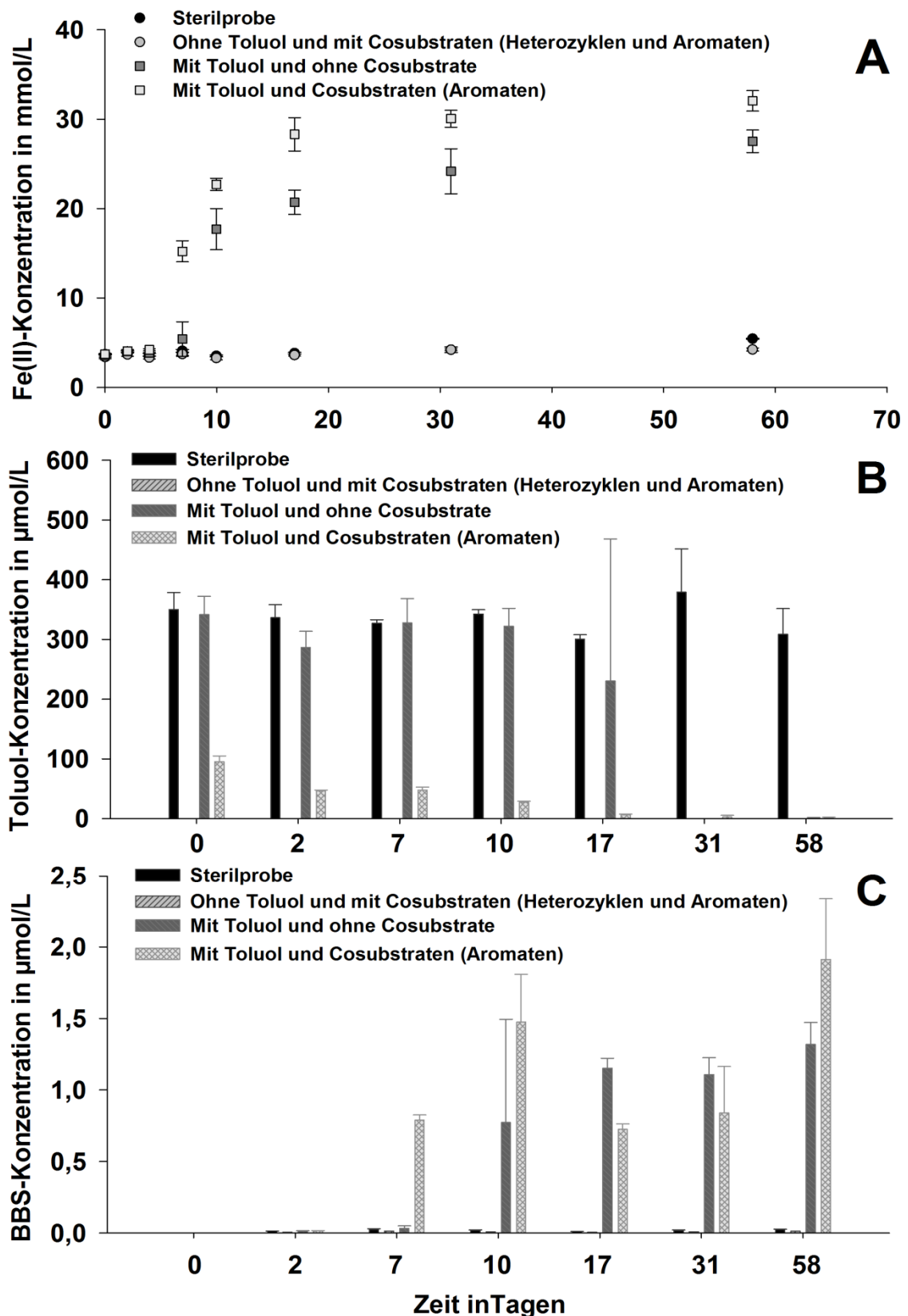


Abbildung 4.16: Verlauf der Fe(II)-Konzentration (A) der Toluol-Konzentration (B) und der Konzentration an BBS (C) bei anaeroben Abbauprobungen mit Toluol als Substrat und der eisenreduzierenden Bakterienkultur *G. toluenoxidans* TMJ1 unter Zugabe von verschiedenen organischen Schadstoffmischungen gelöst in HMN. Bedingungen: Überführung von 1 mL Bakterienkultur als Inoculum, Verwendung von Toluol als Substrat und Inkubation bei 30 °C im Dunkeln: Weitere Ergebnisse und Anmerkungen siehe Abbildung 4.17.

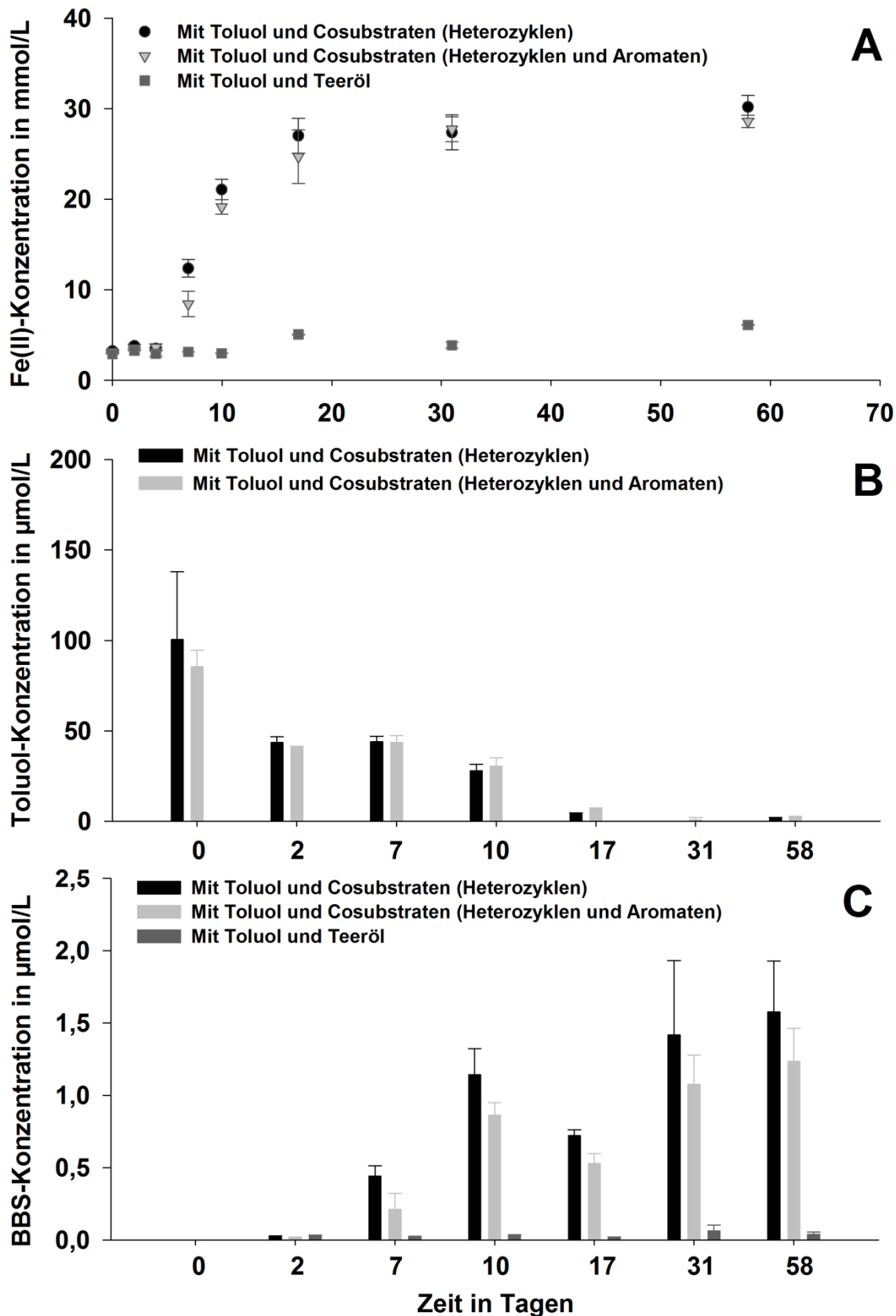


Abbildung 4.17: Verlauf der Fe(II)-Konzentration (A), der Toluol-Konzentration (B) und der Konzentration an BBS (C) bei anaeroben Abbauversuchen mit Toluol als Substrat und der eisenreduzierenden Bakterienkultur *G. toluenoxydans* TMJ1 unter Zugabe von verschiedenen organischen Schadstoffmischungen gelöst in HMN. Bedingungen: Überführung von 1 mL Bakterienkultur als Inoculum, Verwendung von Toluol als Substrat und Inkubation bei 30 °C im Dunkeln.

Anmerkungen:

Zu Abbildung 4.16 C und Abbildung 4.17 C: Der Zeitpunkt 0 beschreibt das Medium nach Zugabe von Substrat bzw. Cosubstratlösungen aber noch ohne Inoculum. Die höhere Konzentration an BBS zum Zeitpunkt 2 lässt sich also nicht auf eine Produktion durch die Bakterien zurückführen sondern auf mit dem Inoculum überführtes BBS.

Zu Abbildung 4.17 B: Die Toluol-Konzentrationen konnte in der Probe mit Teeröl nicht bestimmt werden, da die Teerölphase, die in kleinen Tröpfchen im Medium vorhanden war, bei der Probenvorbereitung (flüssig-flüssig Extraktion mit Hexan; siehe Kapitel 3.3.7.2) mit extrahiert wurde und erhebliche Probleme bei der GC-MS-Messung verursacht hat.

Die Sterilproben zeigen sowohl bei der Fe(II)-Konzentration als auch bei der BBS- und Toluol-Konzentration im Verlauf des Experimentes keine signifikanten Veränderungen (Abbildung 4.16). Die Proben, in die nur die Cosubstrate und kein Toluol als Substrat gegeben wurden, zeigen weder eine Zunahme der Fe(II)-Konzentration noch eine Zunahme der BBS-Konzentration was ein Zeichen für ausbleibende Abbautätigkeit und fehlendes Wachstum ist (Abbildung 4.16 A und C). *G. toluenoxydans* TMJ1 ist demnach nicht in der Lage, eines der zugebenen Schadstoffe (Cosubstrate) als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle, also als Substrat, zu nutzen. Ohne die Zugabe von Toluol findet kein Wachstum statt. Alle weiteren Abbauprozesse (außer von Toluol) müssten also auf cometabolische Prozesse zurückgeführt werden. Dieses Phänomen deckt sich sehr gut mit Literaturergebnissen aus Batch-Experimenten zum anaeroben Abbau von Aromaten und insbesondere Heterozyklen (z.B. Beller 2000, Annweiler et al. 2001, Safinowski et al. 2006).

Die Vergleichsproben, in denen nur Toluol als Substrat und keine Cosubstrate zugegeben wurden, zeigten wiederum eine gute Korrelation zwischen der Zunahme der Fe(II)- (Abbildung 4.16 A) und der BBS-Konzentration (Abbildung 4.16 C), die nach etwa 5 bis 7 Tagen beginnt. Es ist eine etwas längere lag-Phase als bei den vorherigen Experimenten (siehe Kapitel 4.2.1) zu beobachten. Dies lässt sich zum Teil über das geringere Volumen des überführten Inoculums erklären (1 mL statt 5 mL bei den meisten Experimenten in Kapitel 4.2.1). Die Abnahme der Toluol-Konzentration nach etwa 10 Tagen korreliert insgesamt gut mit der Zunahme von Fe(II) und BBS (Abbildung 4.16 B).

Außer bei den Proben mit Teeröl zeigte der Verlauf der Fe(II)-Konzentration bei allen Proben mit Toluol sowie Toluol und Cosubstraten eine deutliche Zunahme im Zeitraum zwischen dem 7. und 10. Tag des Experimentes (Abbildung 4.16 A und Abbildung 4.17 A). Das lässt sich gut mit der Zunahme der BBS-Konzentration (Abbildung 4.16 C und Abbildung 4.17 C) und auch größtenteils mit der Abnahme der Toluol-Konzentration im selben Zeitraum korrelieren (Abbildung 4.16 B und Abbildung 4.17 B). Bei den Toluol-Konzentrationen ist jedoch zu beachten, dass die Proben, zu denen Cosubstrat-Lösungen zugegeben wurden, mit HMN eine zusätzliche organische Phase beinhalten. Die Folge ist, dass ein großer Teil des zugesetzten Toluols bei diesen Proben in die HMN-Phase übergeht und nicht gelöst im wässrigen Medium vorliegt. Bei den Toluol-Messungen wird aber nur der im wässrigen Medium gelöste Anteil erfasst, so dass diese Proben eine geringere Anfangskonzentration an gelöstem Toluol aufweisen als die Proben ohne Cosubstrate. Die gelöste Toluol-Konzentration verringert sich in den Proben mit Cosubstraten vom Beginn des Experimentes

bis zum 2. Tag, da sich in dieser Zeit erst ein Gleichgewicht des Toluols zwischen HMN-Phase und wässriger Phase einstellt.

Hemmeffekte

Bei allen zugegebenen Schadstoffmischungen (außer bei Teeröl) sind keine (deutlichen) Verzögerungen des Wachstums (z.B. Zunahme der Fe(II)-Konzentrationen) zu beobachten, was auf fehlende Hemmeffekte durch die zugegebenen Schadstoffe beim Abbau von Toluol schließen lässt. Dies steht in guter Übereinstimmung mit anderen Studien wie z.B. von Safinowski et al. 2006), die in Batch-Experimenten mit einer ebenfalls aus dem Aquifer in Stuttgart isolierten sulfatreduzierenden Bakterienkultur und Naphthalin und 2-Methylnaphthalin als Substrat, weitgehend keine Hemmung des Wachstums unter Anwesenheit unterschiedlicher aromatischer und heterozyklischer Cosubstrate beobachten konnten. Gewisse Verzögerungen des Wachstums waren nur bei den Cosubstraten Inden und Acenaphthylen zu verzeichnen.

Eine Ausnahme stellen jedoch die Proben dar zu denen Teeröl als Cosubstrat zugegeben wurde (Abbildung 4.17 A-C). Dort war kaum eine Zunahme der Fe(II)- und der BBS-Konzentration zu messen, was auf ein hohes Hemmpotential des Teeröls auf das Wachstum und die Abbautätigkeit der Bakterienkultur *G. toluenoxidans* TMJ schließen lässt. Diese Beobachtung lässt sich mit der Vielzahl an verschiedenen Chemikalien in Teeröl erklären, die teilweise toxisches Potential besitzen (z.B. Meyer et al. 1999). Es deutet darauf hin, dass ein Abbau der Teerölphase selbst sehr schwierig für die abbauende Bakterien ist, wo hingegen aus der Phase herausgelöste und in wässriger Lösung befindliche Einzel-Schadstoffe einfacher zu nutzen sind. Anzumerken ist, dass die Toluol-Konzentrationen in diesen Proben nicht bestimmt werden konnte, da die Teerölphase, die in kleinen Tröpfchen im Medium vorhanden waren, bei der Probenvorbereitung (flüssig-flüssig Extraktion mit Hexan, siehe Kapitel 3.3.7.2) mit extrahiert wurden und erhebliche Probleme bei der GC-MS-Messung verursacht haben.

Um zu testen, ob höhere Konzentrationen einzelner Schadstoffe zu Hemmeffekten führen, wurde eine 2. Experimentserie mit höher konzentrierten einzelnen aromatischen und heterozyklischen Schadstoffen durchgeführt (Kapitel 4.2.2.2).

Verhältnis von Toluol und BBS

Die Ansätze, in denen ein Wachstum der Bakterienkultur zu beobachten war (mit Toluol, mit Toluol und Cosubstraten), zeigten einen nahezu kompletten Verbrauch des Substrats Toluol (siehe Abbildung 4.16 B und Abbildung 4.17 B). Der Metabolit BBS aber trat nur in maximalen Konzentrationen von etwa 2 $\mu\text{mol/L}$ auf, was maximal 0,4% des abgebauten Toluols (ca. 500 $\mu\text{mol/L}$) ausmacht. Diese Verhältnisse sind zwar etwas höher als in Kapitel 4.2.1 (Abbildung 4.14), deuten aber auch darauf hin, dass BBS entweder ein Zwischenprodukt ist, das nicht sehr stark akkumuliert, sondern weiter abgebaut wird oder nicht sehr stark von den Zellen ins umgebende Medium abgegeben wird. Überraschend sind auch die teilweise großen Schwankungen der BBS-Konzentrationen in den Proben mit Cosubstraten (Abbildung 4.16 C und Abbildung 4.17 C), die nicht mit Zu- oder Abnahmen der Fe(II)- bzw. Toluolkonzentration korrelieren.

Cometabolite

Screening-Analysen mittels NLS (LC-ESI-MS/MS) mit $\Delta m/z = 44$ und $\Delta m/z = 116$ (siehe Kapitel 3.3.1.1 und 4.1.1.2) nach Cometaboliten zeigten eindeutige Hinweise auf die Existenz des Abbauproduktes MBBS. Abbildung 4.18 zeigt die Ergebnisse des NLS $\Delta m/z = 116$ in den unterschiedlichen Batch-Experimenten.

Fast in allen Batch-Experimenten (Abbildung 4.18 A,C-F) außer in denen ohne Toluol als Substrat (Abbildung 4.18 B) ist ein Peak bei etwa $RT = 14,99$ min mit einer Masse (m/z) von 207 des Vorläuferions zu erkennen. Dabei handelt es sich um BBS, den anaeroben Metaboliten des Toluolabbaus (Abbildung 4.18 F). Diese Nachweise zeigen, dass die Verwendung der NLS zum Screening nach sauren (Co)Metaboliten in diesen Proben funktioniert hat, da BBS in diesen Batch-Experimenten vorhanden sein muss und bereits mit einer anderen Methode (siehe Abbildung 4.16 A und Abbildung 4.17 A) dort quantifiziert wurde. Zusätzlich ist aber ausschließlich bei den Batch-Experimenten mit aromatischen Cosubstraten (Abbildung 4.18 C,E) ein Peak bei etwa $RT = 16,95$ min und einer Masse (m/z) von 221 des Vorläuferions zu erkennen, was zu folgende Schlussfolgerungen führt:

- Der Metabolit kann nur aus den aromatischen Cosubstraten (Naphthalin, Ethylbenzol, Xylole) gebildet worden sein, da der Peak in den Batch-Experimenten mit heterozyklischen Cosubstraten (Abbildung 4.18 D) fehlt.
- Das Fehlen des Peaks in den Experimenten mit Toluol und ohne Cosubstrate (Abbildung 4.18 A) sowie ohne Toluol und mit Cosubstraten (Abbildung 4.18 B) zeigt, dass es sich um eine cometabolische Bildung handeln muss, die nur abläuft wenn als eigentliches Substrat Toluol vorhanden ist.
- Die deutlich höhere Intensität des Peaks bei der RT von etwa 16,95 min im Vergleich zum Peak bei einer RT von etwa 14,99 min deutet darauf hin, dass der Cometabolit ($RT = 16,95$ min, $m/z = 221$) akkumuliert und nicht wie der Metabolit BBS ($RT = 14,99$ min, $m/z = 207$) schnell weiter abgebaut wird.

Mit Hilfe des Vergleichs von Fragmentspektren der Substanz bei $RT = 16,95$ min mit einem Standard von BBS (wie in Kapitel 4.1.1.3) konnte die Substanz MBBS weitgehend identifiziert werden. Da *G. toluenoxidans* TMJ nicht auf Xylole als Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen kann (Kunapuli et al. 2010) und MBBS ausschließlich in den Kulturen mit Aromaten als Cosubstraten gefunden wurde, lässt sich die Bildung von MBBS also nur auf cometabolische Abbauprozesse von Xylole durch die Bakterienkultur zurückführen. Die Identifizierung von MBBS als cometabolischem Abbauprodukt der Xylole ist in guter Übereinstimmung mit Beobachtungen aus der Literatur (z.B. Beller et al. 1995, Beller 2000).

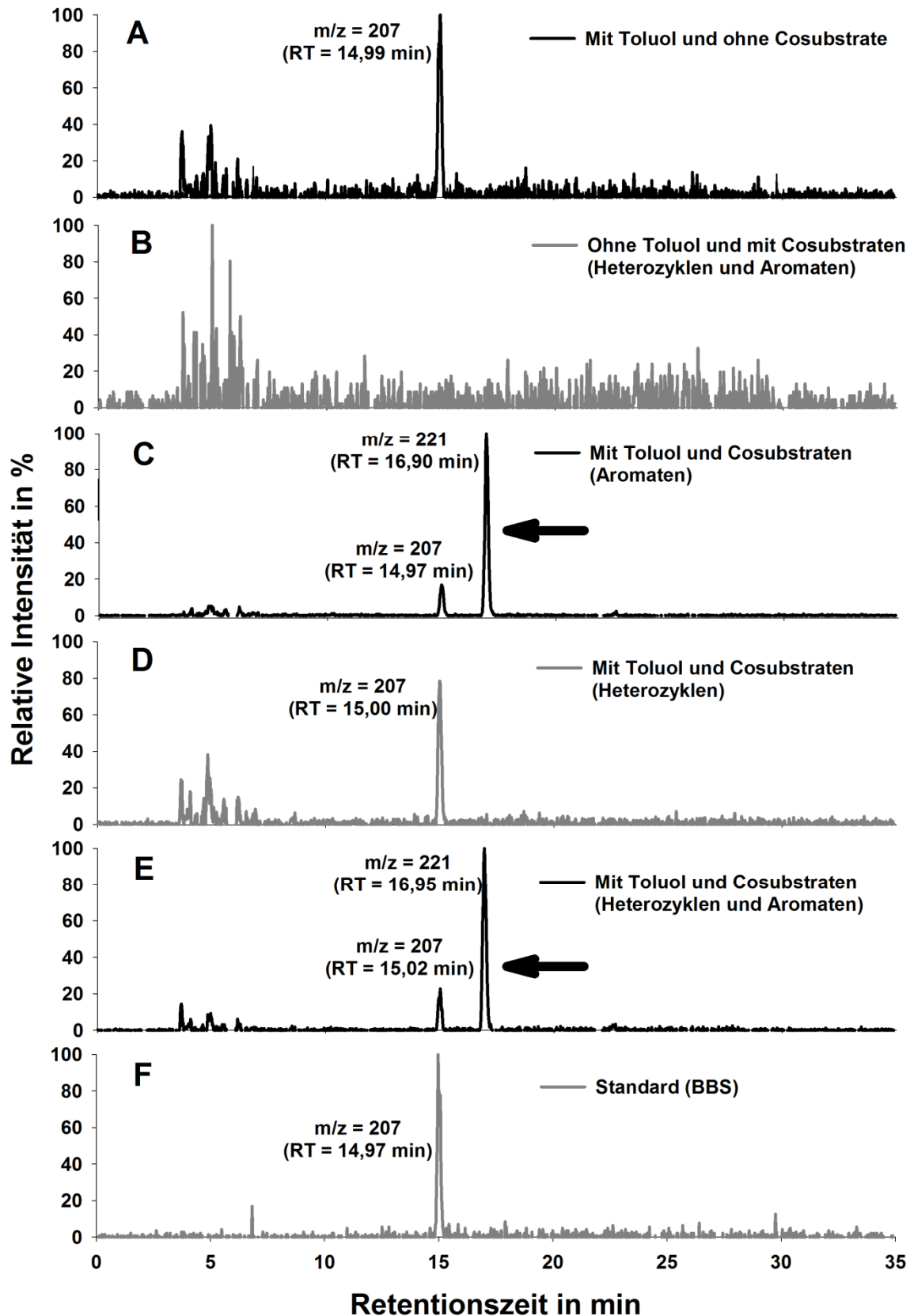


Abbildung 4.18: Chromatogramme der NLS $\Delta m/z = 116$ der verschiedenen Batch-Experimente der 1. Cometabolismusserie. Es wurden die Proben der Probenahme 10 Tage nach Beginn des Experimentes gemessen. Neben den Peaks ist die Masse (m/z) des Vorläufer-Ions und die Retentionszeit (min) in Klammern angegeben.

4.2.2.2 Zugabe einzelner Cosubstrate in höheren Konzentrationen

In einer zweiten Experimenterserie wurden einzelne Cosubstrate in die entsprechenden Batch-Gefäße gegeben, die nicht vorher in HMN gelöst wurden (siehe Kapitel 3.2.2). Die Konzentration der Cosubstrate waren ähnlich hoch wie die des Substrats Toluol (etwa 500 $\mu\text{mol/L}$). Zur Ermittlung der mikrobiellen Abbauprodukte wurde die Veränderung der Fe(II)-Konzentration gemessen. Es sollte getestet werden, ob höhere Konzentrationen einzelner Schadstoffe zu Hemmeffekten führen.

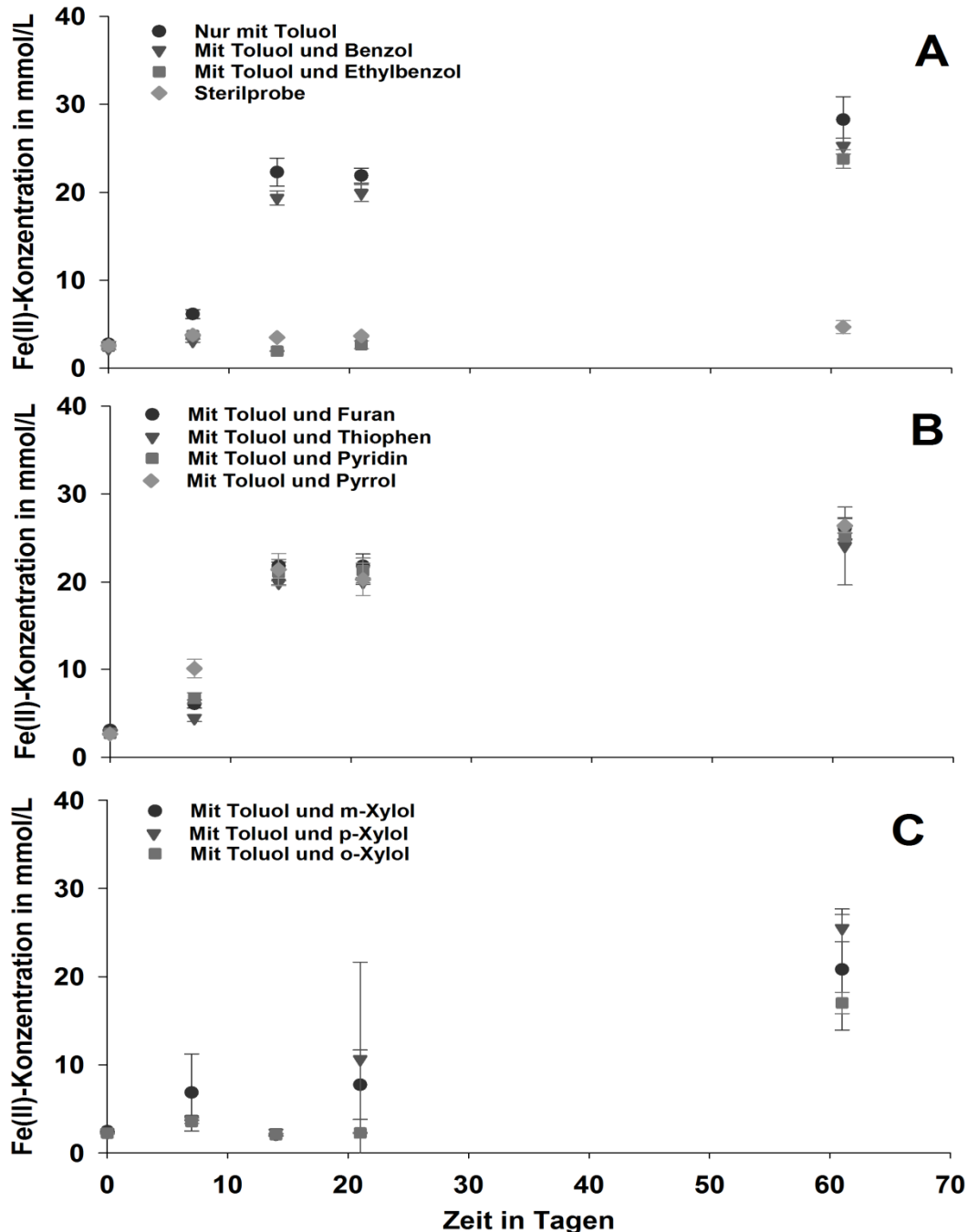


Abbildung 4.19: Verlauf der Fe(II)-Konzentrationen bei anaeroben Abbauprobungen mit Toluol als Substrat und der eisenreduzierenden Bakterienkultur *G. toluenoxidans* TMJ1 unter Zugabe von verschiedenen einzelnen aromatischen und heterozyklischen Schadstoffen. Bedingungen: Überführung von 1 mL Bakterienkultur als Inoculum, Verwendung von Toluol als Substrat und Inkubation bei 30 °C im Dunkeln.

In diesen Experimenten konnten geringe aber keine nachhaltigen Hemmeffekte auf die mikrobielle Aktivität beobachtet werden, obwohl die Cosubstrate in ähnlich hohen Konzentrationen wie das Substrat Toluol vorlagen (Abbildung 4.19 A-C). Der Anstieg der Fe(II)-Konzentrationen bei den Proben mit Ethylbenzol und den verschiedenen Xylol-Isomeren (insbesondere o-Xylol) zeigte eine zeitliche Verzögerung. Auch in den maximal erreichten Fe(II)-Konzentrationen unterschieden sich die Proben der verschiedenen Xylol-Isomere. Dies lässt möglicherweise auf einen etwas verlangsamten Abbau schließen. Hemmeffekte beim anaeroben Abbau von Toluol und Xylolen sind auch aus der Literatur bekannt. Beller et al. (1995) zeigten das die Präsenz von m-Xylol den Abbau der anderen Xylol-Isomere blockieren kann und Meckenstock et al. (2004b) wiesen Hemmungen des Abbaus von o-Xylol in der Anwesenheit von Toluol nach. Diese Ergebnisse zeigen, dass Hemmeffekte in Schadstoffgemischen möglich sind, jedoch wohl stark von Faktoren wie z.B. Konzentrationen der Stoffe oder den abbauenden Mikroorganismen abhängen.

Insgesamt aber zeigen die Experimente in dieser Arbeit, dass auch höhere Konzentrationen einzelner strukturähnlicher Stoffe (Cosubstrate) keine nachhaltigen Hemmeffekte auf die Abbaubarkeit des Toluols mit *G. toluenoxidans* TMJ1 zu haben scheinen.

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen (Kapitel 4.2.2)

- Die Zugabe der Schadstoffmischungen hatte keine relevanten Hemmeffekte auf die mikrobielle Aktivität bzw. den Abbau des Schadstoffs Toluol. Selbst die Zugabe hoher Konzentrationen einzelner Cosubstrate führte nur zu kurzen Verzögerungen der mikrobiellen Abbautätigkeit, aber zu keiner nachhaltigen Hemmung. Allein die Zugabe von Teerölphase zeigte deutliche toxische Effekte. Es zeigt, dass auch in Schadstoffgemischen ein Abbau bestimmter Schadstoffe möglich ist, jedoch die Teerölphase selber nur schwierig mikrobiologisch abbaubar ist.
- Der Abbau begann bei allen Proben mit Cosubstrat (außer bei Teeröl) nach einer lag-Phase von etwa 5 Tagen. Es konnte Korrelationen zwischen dem Auftreten von BBS, dem Anstieg der Fe(II)-Konzentration und der Abnahme der Toluol-Konzentration festgestellt werden. Dies sind klare Indikatoren für den anaeroben biochemischen Abbau von Toluol unter Anwesenheit von Cosubstraten über die Addition von Fumarat unter eisenreduzierenden Bedingungen.
- Das Substrat wurde bei den Experimenten (außer mit Teerölphase) komplett aufgebraucht. Der Metabolit BBS trat im Konzentrationsbereich von weniger als 1% des verbrauchten Toluols auf und war in diesem Bereich etwa konstant. Das deutet darauf hin, dass BBS ein Metabolit ist, der nicht stark akkumuliert und/oder schnell weiter abgebaut wird. Quantitative Verhältnisse zwischen Schadstoff und Metabolit wurden in dieser Arbeit auch im Feld analysiert und die möglichen Ursachen werden dort eingehend diskutiert (siehe Kapitel 4.3.2).
- Durch den Nachweis von MBBS, des spezifischen anaeroben Abbauproduktes der Xylole, konnten eindeutige Hinweise für den cometabolischen Abbau dieser Schadstoffe gefunden werden.

4.3 Metaboliten als Indikatoren für Schadstoffabbau und mikrobiologische Aktivität

Neben der Nutzung der Metabolite als spezifische qualitative Indikatoren (Kapitel 4.3.1) für den anaeroben Abbau aromatischer und heterozyklischer Schadstoffe werden in diesem Kapitel folgende weitere Fragestellungen bezüglich der Funktion und Nutzung der Metabolite als Indikatoren untersucht:

- 1) Lassen sich Metabolite als quantitative Indikatoren für den Grad des Abbaus des Ausgangsschadstoffs nutzen (Kapitel 4.3.2)?
- 2) Können Metabolite als Indikatoren für Zonen erhöhter biologischer Aktivität im Aquifer eingesetzt werden (Kapitel 4.3.3)?
- 3) Werden Metabolite in Abstrombereiche transportiert und stehen sie dort als Elektronendonatoren zur Verfügung (Kapitel 4.3.4)?

Zur Untersuchung der ersten beiden Fragestellungen ist der HR-MLW im ehemaligen Gaswerksstandort Düsseldorf (Kapitel 3.1.1) besonders gut geeignet, da durch die hohe vertikale Auflösung der Probenahme (bis 3 cm) kleinskalige Veränderungen sowohl der Schadstoffe, als auch der Metabolite aufgedeckt und miteinander verglichen werden können.

4.3.1 Qualitative Indikatoren des Schadstoffabbaus

Eine Vielzahl an Metaboliten unterschiedlicher Schadstoffe konnte durch den Einsatz von Screening-Methoden und unterschiedlichen Identifizierungsschritten in den verschiedenen Gaswerksgebieten nachgewiesen werden. Die (weitgehende) Identifizierung der Metabolite wurde in Kapitel 4.1.1 (Huminstoff-Isolate aus Stuttgart) und Kapitel 4.1.2 (Grundwasserproben aus Düsseldorf) ausführlich dargestellt und die Metabolite sind in Abbildung 4.20 noch einmal zusammengefasst.

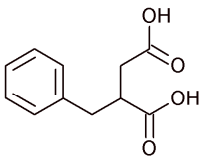
In welchem Maße können diese (weitgehend) identifizierten Metabolite als qualitative Indikatoren für stattfindende Abbauprozesse von Schadstoffen in den Aquiferen herangezogen werden? Im Folgenden wird dies für verschiedene Schadstoffklassen diskutiert.

Metabolite von monoaromatischen Schadstoffen (z.B. BTEX)

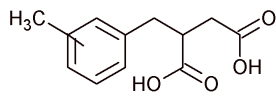
Für die Stoffklasse der BTEX konnten in beiden Aquiferen die spezifischen anaeroben Metabolite BBS identifiziert und MBBS weitgehend identifiziert werden. Eine vollständige Identifizierung von MBBS und die Differenzierung von unterschiedlichen Isomeren (Stellung der Methylgruppen) waren aufgrund fehlender Verfügbarkeit von Standards nicht möglich. Beide Metabolite werden nicht kommerziell hergestellt, tauchen auch nicht in Abbauwegen anderer Schadstoffe auf (sehr spezifisch) und werden ausschließlich anaerob gebildet. Das macht sie zu ausgezeichneten qualitativen Indikatoren des anaeroben Abbaus von Toluol und der Xylole. Der Nachweis von BBS und MBBS in den kontaminierten Bereichen des Aquifers in Stuttgart und in Düsseldorf zeigt also eindeutig mikrobielle Abbauprozesse dieser beiden Schadstoffe an. Diese Nachweise stehen in guter Übereinstimmung mit Literaturergebnissen (z.B. Beller et al. 1995, Beller 2002, Gieg und Suflita 2002, Griebler et al. 2004, Morasch et

al. 2011) und zeigen die gute Eignung dieser Metabolite als spezifische Indikatoren des Abbaus *in situ*. Bei MBBS ist jedoch zu bedenken, dass es sowohl metabolisch als auch cometabolisch gebildet werden kann (Kapitel 4.2.2 und Beller 2000). Eine cometabolische Bildung würde die Indikatorfunktion etwas einschränken, da der Nachweis zwar auf einen stattfindenden Abbau hinweist, dieser aber wohlmöglich aufgrund der cometabolischen Bildung an diesem Punkt stagniert. Es findet dann kein vollständiger Abbau bis zur Mineralisation statt, sondern der (Co)Metabolit ("Dead-End-Produkt") reichert sich an und wird nicht weiter abgebaut. Er kann damit nicht mehr als Indikator für aktive Abbauprozesse angesehen werden.

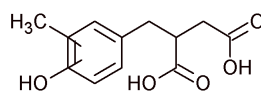
Monoaromatische Metaboliten



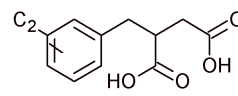
Benzylbernsteinsäure (BBS)



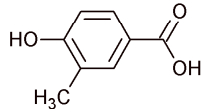
Methylbenzylbernsteinsäure (MBBS)



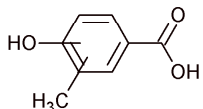
Hydroxymethylbenzylbernsteinsäure (HMBBS)



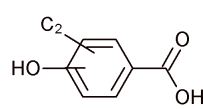
C₂-Benzylbernsteinsäure (C₂-BBS)



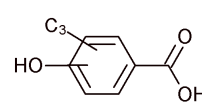
4-Hydroxy-3-methylbenzoesäure (4-HMBS)



Hydroxymethylbenzoesäure (HMBS)

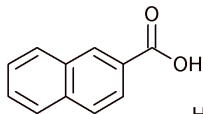


C₂-Hydroxybenzoesäure (C₂-HBS)

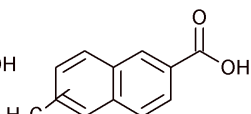


C₃-Hydroxybenzoesäure (C₃-HBS)

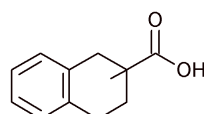
Polyaromatische und bicyklische Metaboliten



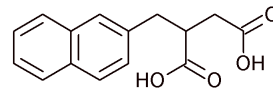
2-Naphthoesäure (2-NS)



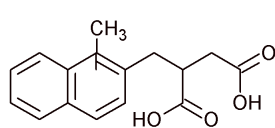
Methylnaphthoesäure (MNS)



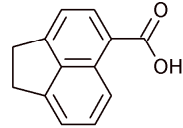
Tetrahydronaphthoesäure (THNS)



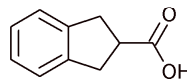
Naphthyl-2-methylbernsteinsäure (NMBS)



Methyl-naphthyl-2-methylbernsteinsäure (MNMBBS)

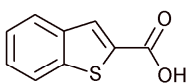


5-Acenaphthensäure (5-AS)

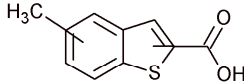


2-Indansäure (2-IS)

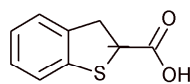
Heterozyklische Metaboliten



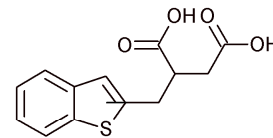
2-Benzothiophensäure (2-BTS)



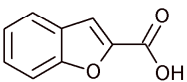
Methylbenzothiophensäure (MBTS)



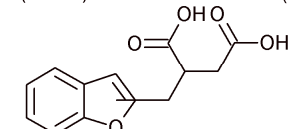
Dihydrobenzothiophensäure (DHBTS)



Benzothiophenmethylbernsteinsäure (BTMBS)



2-Benzofuransäure (2-BFS)



Benzofuranmethylbernsteinsäure (BFMBS)

Abbildung 4.20: Identifizierte und weitgehend identifizierte Metabolite in den Huminstoff-Isolaten aus dem Aquifer in Stuttgart und den Grundwasserproben aus dem Aquifer in Düsseldorf.

Im Aquifer in Düsseldorf konnte zusätzlich noch C₂-BBS weitgehend identifiziert werden, was ein Metabolit von Trimethylbenzolen ist (Martus und Püttmann 2003) und somit deren anaeroben Abbau anzeigt.

Im Aquifer in Stuttgart konnten außerdem mikrobiologische Abbauprozesse von phenolischen Schadstoffen durch die (weitgehende) Identifizierung verschiedener Metabolite nachgewiesen werden. Insbesondere der identifizierte Metabolit 4-HMBS zeigt den anaeroben Abbau von o-Cresol an (Philipp und Schink 2012). Weitere Hinweise auf hydroxylierte aromatische Carboxylsäuren mit unterschiedlicher Anzahl an Methylgruppen bzw. verschiedener Länge des Alkylrestes deuten auf den anaeroben Abbau mehrfach methylierter Phenole hin.

Metabolite von PAK und bizyklischen Verbindungen

Qualitative Nachweise des anaeroben Abbaus verschiedener PAK konnten in den Aquiferen über die Identifizierung von NMBS, 2-NS, 5-AS sowie die weitgehende Identifizierung von MNMBS, MNS und THNS erbracht werden.

NMBS und 2-NS sind spezifische anaerobe Metabolite von 2-Methylnaphthalin und Naphthalin. Dabei wird 2-Methylnaphthalin durch die Addition von Fumarat an die Methylgruppe aktiviert und dann über verschiedene Schritte weiter zu 2-NS abgebaut (Annweiler et al. 2002, Meckenstock et al. 2004). Zusätzlich sind diese Metabolite auch Abbauprodukte von Naphthalin, da durch Methylierung 2-Methylnaphthalin entstehen kann, was dann entsprechend weiter abgebaut wird (Safinowski und Meckenstock 2006, Meckenstock und Mouttaki 2011). Der Nachweis des qualitativen Abbaus von 1-Methylnaphthalin wurde über die weitgehende Identifizierung von MNMBS erreicht. Dieser Metabolit entsteht über die Methylierung an Position 2 am aromatischen Ring und anschließender Fumarat-Addition an dieser Methylgruppe entsprechend dem Abbau von 2-Methylnaphthalin (Safinowski et al. 2006). Außerdem konnten MNS weitgehend identifiziert werden. Dabei handelt es sich um einen Metaboliten von 1,2-Dimethylnaphthalin oder 1-Methylnaphthalin (Safinowski et al. 2006).

Ein Hinweis auf die durch Reduzierung des Rings entstehenden sauren Metabolite von Naphthalin und 2-Methylnaphthalin (siehe Meckenstock et al. 2004) konnte mit THNS auch gefunden werden. Diese einfach carboxylierten anaeroben Metabolite mit reduziertem Ring sind als spezifische qualitative Indikatoren gut geeignet, da sie nicht industriell eingesetzt werden und in keinem aeroben Abbauweg entstehen (Zhang et al. 2000, Phelps et al. 2002).

Bei den mehrkernigen PAK konnte mit dem Metaboliten 5-AS der Abbau von Acenaphthen nachgewiesen werden. Dieser Nachweis passt sehr gut zu den Ergebnissen von Mihelcic und Luthy (1988), Safinowski et al. (2006) und Morasch et al. (2011), die Acenaphthensäuren in Batchkulturen und Feldproben identifizierten. Der fehlende Nachweis von sauren Metaboliten anderer mehrkerniger PAK, obwohl sie im Aquifer durchaus vorkommen (z.B. Fluoren; siehe Abbildung 4.21 in Kapitel 4.3.2), lässt auf ihre größere Persistenz gegenüber mikrobiellem Abbau oder andere Abbauege schließen. Zusätzlich besitzen sie aufgrund ihrer geringeren Polarität bzw. geringeren Wasserlöslichkeit (siehe Abbildung 2.1 in Kapitel 2.1) eine viel

größere Tendenz am festen Aquifermaterial zu adsorbieren als z.B. die BTEX oder Naphthalin.

Für die bicyklische Verbindung Indan konnte mit 2-IS in den Aquiferen in Düsseldorf und Stuttgart ein deutlicher Nachweis für dessen Abbau geliefert werden. Dieser Metabolit ist auch in anderen Aquiferen gefunden worden (Safinowski et al. 2006, Morasch et al. 2011) und eignet sich somit sehr gut als Indikator für den anaeroben Abbau dieser Substanzklasse.

Metabolite von Heterozyklen

Neben dem anaeroben Abbau der Aromaten konnte auch der Abbau von Heterozyklen durch die Identifizierung einiger Metabolite qualitativ aufgezeigt werden. Die (weitgehende) Identifizierung verschiedener Säuren von Benzothiophen (2-BTS, DHBTS) und Benzofuran (2-BFS) zeigt deutlich den anaeroben Abbau dieser Schadstoffe im Aquifer. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen in der Literatur (Annweiler et al. 2001, Safinowski et al. 2006, Morasch et al. 2011), wo auf den cometabolischem Abbau dieser Heterozyklen hingewiesen wird. Zusätzlich konnte mit der weitgehenden Identifizierung von MBTS ein Hinweis auf den anaeroben Abbau methylierter Benzothiophene gefunden werden. Mit dem Nachweis von BTMBS und BFMBMS konnte im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal der Beweis im Feld erbracht werden, dass die Fumarataddition auch ein wichtiger Aktivierungsschritt beim anaeroben Abbau von Heterozyklen im Aquifer ist. Diese Metabolite konnten bisher nur in Batch-Experimenten im Labor gefunden werden, der Nachweis im Feld stand noch aus (Safinowski et al. 2006). Zur Bildung dieser Metabolite muss der Fumarataddition eine Methylierung der Heterozyklen vorgeschaltet sein.

Saure Metabolite anderer Heterozyklen wie z.B. von Dibenzofuran konnten nicht gefunden werden. Dies lässt sich wahrscheinlich wie bei den mehrkernigen PAK durch erhöhte Persistenz und/oder erhöhte Adsorptionstendenz sowie durch andere Abbauewege erklären.

Zusammengefasst konnte durch die Identifizierung der Metabolite in dieser Arbeit, der mikrobielle Abbau verschiedener aromatischer, polyaromatischer und heterozyklischer Schadstoffe im Aquifer qualitativ nachgewiesen werden. Insbesondere die Analytik der aromatischen und heterozyklischen Bernsteinsäuren zum qualitativen Nachweis des anaeroben Abbaus der Schadstoffe *in situ* ist ein sehr vielversprechender Ansatz, da diese Metabolite häufig spezifischer für den anaeroben Abbau und die jeweiligen Schadstoffe sowie besser wasserlöslich sind als die entsprechenden Säuren.

Die Nachweise des anaeroben Abbaus von Heterozyklen sind von großer Bedeutung, da auf diese Substanzklasse aufgrund ihrer erhöhten Wasserlöslichkeit (im Vergleich zu den PAK) und Toxizität immer größere Aufmerksamkeit im Rahmen von Studien zum NA gelegt wird.

4.3.2 Quantitative Indikatoren des Schadstoffabbaus

Vertikale Verteilung von Schadstoffen und Metaboliten

Um eine Vergleichsgrundlage zu den Konzentrationsverteilungen der Metaboliten im ehemaligen Gaswerksstandort Düsseldorf zu haben, wird zunächst auf die vertikalen Verteilungen der (Ausgangs)-Schadstoffe eingegangen (Abbildung 4.21).

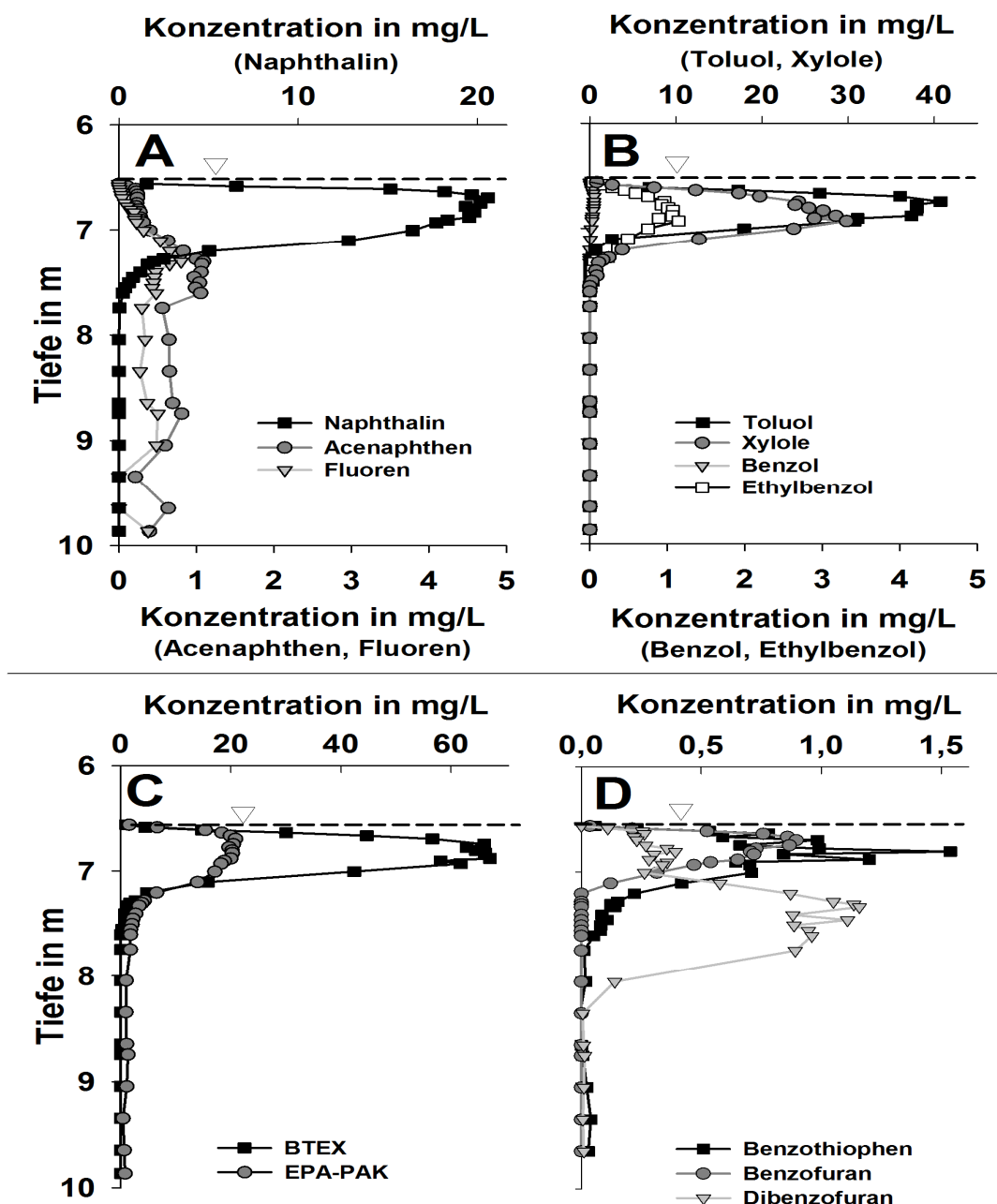


Abbildung 4.21: Vertikale Konzentrationsprofile von ausgewählten PAK (A), BTEX-Komponenten (B), den summarischen Parametern EPA-PAK (16 PAK, die von der amerikanischen Umweltbehörde (EPA) als prioritär ausgewählt wurden) und BTEX (C), sowie Heterozyklen (D) in den Proben aus dem HR-MLW aus dem Aquifer in Düsseldorf. Die Messdaten wurden dankenswerterweise vom Institut für Grundwasserökologie in München (Prof. Meckenstock) und vom Institute for Environmental Chemistry der EAWAG in Dübendorf (Prof. Hollender) zur Verfügung gestellt.

Die Kontamination besteht vorrangig aus BTEX, Naphthalin, Acenaphthen, Fluoren sowie heterozyklischen Komponenten (z.B. Benzothiophen, Benzofuran). Die gesamte Konzentration an BTEX im Aquifer beläuft sich auf $\rho(\text{BTEX}) = 67 \text{ mg/L}$, wobei Toluol mit $\rho(\text{Toluol}) = 40,7 \text{ mg/L}$ der Kontaminant mit der höchsten Konzentration ist. Naphthalin ist mit $\rho(\text{Naphthalin}) = 20,5 \text{ mg/L}$ der dominierende Vertreter der PAK und zeigt eine ähnliche vertikale Verteilung wie die BTEX. Die PAK mit höherer molekularer Masse (z.B.

Acenaphthen oder Fluoren) zeigen im Gegensatz dazu die höchsten Konzentration im Bereich des unteren Fahnenrandes und noch darunter, aber mit $\rho(\text{Acenaphthen}) = 1,1 \text{ mg/L}$ und $\rho(\text{Fluoren}) = 0,9 \text{ mg/L}$ deutlich niedrigere Konzentrationen. Ebenso zeigen die analysierten Heterozyklen Benzothiophen, Benzofuran und Dibenzothiophen mit $\rho(\text{Benzothiophen}) = 1,5 \text{ mg/L}$, $\rho(\text{Benzofuran}) = 0,9 \text{ mg/L}$ und $\rho(\text{Dibenzothiophen}) = 1,2 \text{ mg/L}$ deutliche niedrigere Konzentrationen als die BTEX und Naphthalin.

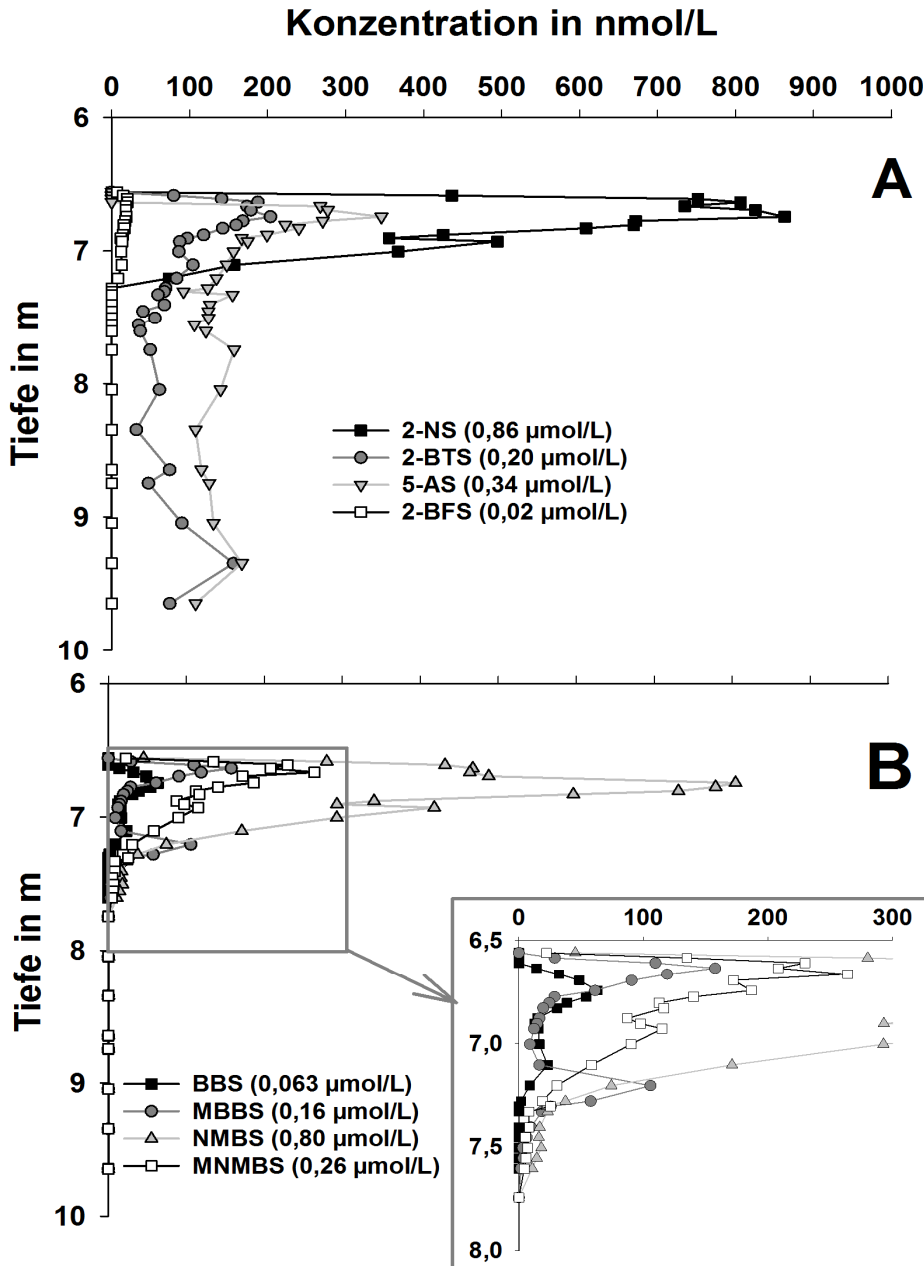


Abbildung 4.22: Vertikale Konzentrationsprofile ausgewählter Metabolite. A: aromatische und heterozyklische Säuren; B: aromatische Bernsteinsäuren. Die maximalen Konzentrationen sind in Klammern angegeben.

Die Kontamination kann in zwei Zonen mit vermutlich verschiedenen Quellen eingeteilt werden. Zum einen die Zone mit BTEX und Naphthalin, die sich vom Grundwasserspiegel

weniger als 1 m vertikal in die Tiefe erstreckt und zum anderen die Zone der PAK mit höherem Molekulargewicht als Naphthalin (Acenaphthen, Fluoren) sowie einiger heterozyklischen Komponenten, die tiefer in den Aquifer verläuft (Anneser et al. 2008a, Anneser et al. 2010). Diese zweite Schadstofffahne scheint von einer zweiten viel kleineren Schadstoffquelle gespeist zu werden, die eine andere Zusammensetzung und Geschichte besitzt (Prommer et al. 2009).

Die vertikalen Konzentrationsverteilungen und die maximalen Konzentrationen der Metabolite im HR-MLW im Aquifer in Düsseldorf sind in Abbildung 4.22 dargestellt. Überraschenderweise zeigt dabei BBS fast die niedrigsten Konzentrationen ($c(\text{BBS}) = 0,063 \mu\text{mol/L}$) aller Metabolite, obwohl dessen Ausgangsschadstoff Toluol mit Abstand der Kontaminant mit der höchsten Konzentration im Aquifer ist. Deutlich höhere Konzentrationen zeigen die Metabolite der PAK: $c(\text{NMBS}) = 0,80 \mu\text{mol/L}$, $c(\text{MNMBS}) = 0,26 \mu\text{mol/L}$, $c(2\text{-NS}) = 0,86 \mu\text{mol/L}$ und $c(5\text{-AS}) = 0,43 \mu\text{mol/L}$.

Die vertikalen Konzentrationsverläufe der Metabolite zeigen deutlich unterschiedliche Fahnenbreiten (Abbildung 4.22). Die vertikalen Fahnenbreiten der aromatischen Bernsteinsäuren (BBS, MBBS, NMBS und MNMBS) sowie von 2-NS und 2-BFS sind relativ schmal im Vergleich zu den Fahnenbreiten von 5-AS und 2-BTS, die vertikal nahezu über den gesamten Aquifer zu detektieren sind.

Molare Konzentrationsverhältnisse zwischen Schadstoff und Metabolit

Um die Konzentrationen der Metabolite mit denen der Ausgangsschadstoffe besser vergleichen zu können, wurden die molaren Konzentrationsverhältnisse für jeden vertikalen Probenahmepunkt der HR-MLW berechnet und in Abbildung 4.23 als Boxplots dargestellt. Generell wäre es von Vorteil, wenn die Konzentration des Metaboliten nicht mit der des entsprechenden Schadstoffs ins Verhältnis gesetzt würde, sondern mit dessen abgebauten Anteil. Dieses Verhältnis lässt sich aber nur unter kontrollierten Bedingungen (wie z.B. bei Batch-Experimenten im Laboratorium, siehe Kapitel 4.2) bilden, da dort Massenbilanzen aufgestellt werden können. Im Feld ist es nicht möglich den Gehalt an abgebautem Schadstoff zu bestimmen, da zu viele Faktoren auf die Veränderung der Schadstoffkonzentration (z.B. Verdünnung, Adsorption...) einwirken.

Die molaren Konzentrationsverhältnisse der anaeroben Metabolite der BTEX sind sehr gering: BBS und Toluol (0,0037 - 0,125%), MBBS und Xylol (0,004 - 0,298%). Es stellt sich die Frage, wodurch diese niedrigen Konzentrationen der Metabolite zustande kommen, obwohl der jeweilige Ausgangsschadstoff in hoher Konzentration im Aquifer auftritt?

Eine Möglichkeit wäre fehlender Abbau bzw. die Abwesenheit entsprechend spezialisierter Bakterienkulturen, die diese Schadstoffe im anaeroben Milieu abbauen können. Dies kann jedoch ausgeschlossen werden, da in früheren Studien der Abbau von Toluol über CSIA (Prommer et al. 2009) als auch das deutliche Vorkommen von *bssA*-Genen (Winderl et al. 2008) in diesem Aquifer nachgewiesen werden konnte (siehe auch Kapitel 4.3.3). Bss-ähnliche Enzyme sind die Schlüsselenzyme beim anaeroben Abbau von z.B. Toluol oder m-Xylol (Biegert et al. 1996, Krieger et al. 1999, Winderl et al. 2008). Die relativ niedrigen Konzentrationen dieser Metabolite werden eher dadurch verursacht, dass sie schnell weiter

abgebaut wurden. Diese Vermutung wird durch zwei weitere Studien unterstützt. Beller et al (2002) fanden in einem kontaminierten Aquifer ähnliche Konzentrationen an BBS und MBBS wie in dieser Studie. BBS zeigte auch dort deutlich niedrigere Konzentrationen als MBBS, obwohl Toluol in deutlich höheren Konzentrationen vorkam als die Xylole. Auch Elshahed et al. (2001) fanden Metabolite von Alkylbenzolen in Konzentrationen, die 3 bis 4 Größenordnungen kleiner waren als die Ausgangssubstanzen.

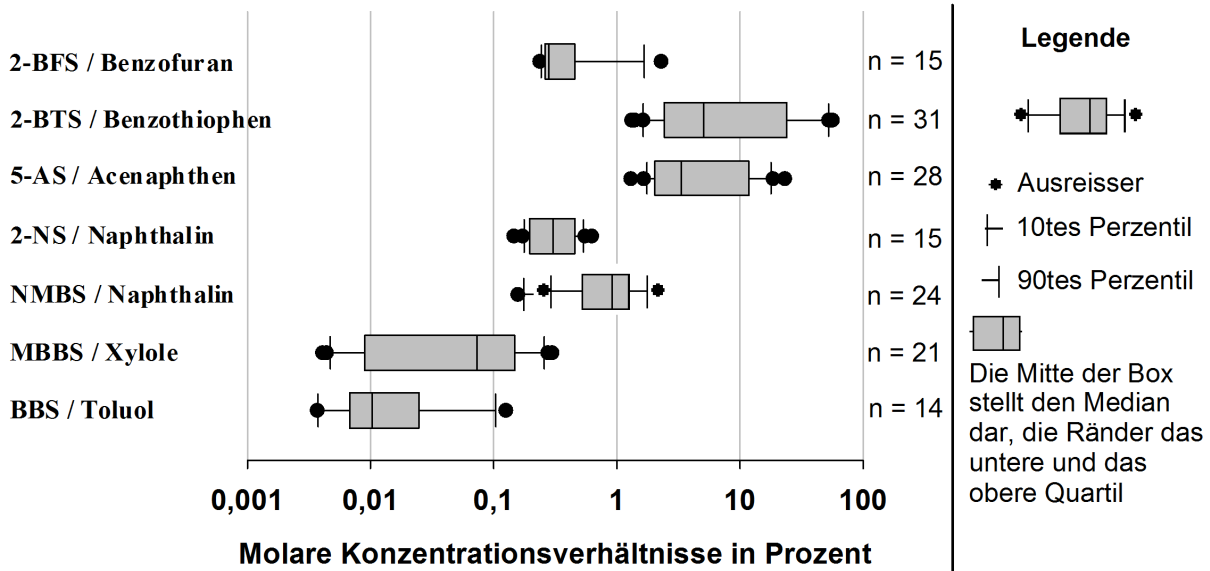


Abbildung 4.23: Boxplots der molaren Konzentrationsverhältnisse (in Prozent) ausgewählter Metabolite mit deren jeweiligen Ausgangsschadstoffen der Proben aus dem HR-MLW in Düsseldorf. Die Berechnung erfolgte für jeden vertikalen Probenahmepunkt.

Die Metabolite der PAK Naphthalin und Methylnaphthalin zeigen hingegen etwas höhere und untereinander ähnlichere molare Konzentrationsverhältnisse als die der BTEX (Abbildung 4.23): 2-NS und Naphthalin (0,15 – 0,85%), NMBS und Naphthalin (0,15 – 0,62%). Diese Beobachtungen werden auch durch andere Studien in kontaminierten Aquiferen unterstützt, bei denen NS in 100-fach bis 1000-fach niedrigeren Konzentrationen als deren Ausgangssubstanz (Griebler et al. 2004) bzw. 2-NS in Konzentrationen unter 1% des gelösten Naphthalins (Young und Phelps 2005) gefunden wurde.

Die höchsten molaren Konzentrationsverhältnisse für den in dieser Arbeit untersuchten Aquifer wurden bei 2-BTS und Benzothiophen (1,31 - 56,2%) sowie bei 5-AS und Acenaphthen (1,29 - 23,2%) nachgewiesen. Dies ist ein deutlicher Hinweis für die Stabilität dieser Metabolite gegenüber weiteren Abbauschritten. Es steht in guter Übereinstimmung mit verschiedenen Studien in denen BTS und AS als „Dead-End-Produkte“ des cometabolischen Abbaus von Benzothiophen und Acenaphthen angesehen werden (Selifonov et al. 1998, Annweiler et al. 2001, Safinowski et al. 2006). Weiterhin konnte 5-AS als einziger Metabolit in diesem Aquifer in Abstromproben nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.3.4), was zusätzlich dessen Stabilität unterstreicht.

Generell zeigen die molaren Konzentrationsverhältnisse in diesem Aquifer, dass quantitative Aussagen über den abgebauten Schadstoff basierend auf der Konzentration des entsprechenden Metabolit nicht zuverlässig sind. Die Schwankungsbreiten der molaren Konzentrationsverhältnisse innerhalb der verschiedenen Metaboliten/Schadstoff-Paare sind sehr groß (Abbildung 4.23). Für MBBS und die Xylole z.B. variieren die Verhältnisse über 2 Größenordnungen zwischen den verschiedenen vertikalen Probenahmestellen. Diese Schwankungsbreite ist zu hoch, um zuverlässige quantitative Aussagen treffen zu können. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Schadstoff/Metaboliten-Paaren sind indes noch größer (bis zu 4 Größenordnungen). Diese enormen Variationen werden durch eine Vielzahl an Faktoren hervorgerufen, wie z.B. durch:

- verschieden starkes Ausscheiden der Metabolite aus den Bakterienzellen in das Grundwasser,
- unterschiedliche Aktivität der Mikroorganismen,
- weiteren Abbau der Metaboliten oder Bildung von "*Dead-End-Produkten*",
- limitierende Schritte in den Abbaukinetiken,
- Hemmung der Abbautätigkeit durch Toxizität der verschiedenen Schadstoffe,
- zeitliche Dynamik der physikalisch-chemischen und hydraulischen Bedingungen im Aquifer.

Zusammengefasst zeigen die großen Unterschiede in den molaren Konzentrationsverhältnissen innerhalb und zwischen den Metaboliten/Schadstoff-Paaren, dass die Metabolite nicht als quantitative Indikatoren des Schadstoffabbaus zu verwenden sind, aber Hinweise auf die Stabilität der Metabolite bzw. die Bildung von „*Dead-End-Produkten*“ geben können. Die höchsten molaren Konzentrationsverhältnisse sind für die Metabolite gefunden worden (z.B. 2-BTS, 5-AS), die als sehr stabil gelten und möglicherweise cometabolisch gebildet werden.

4.3.3 Indikatoren für Zonen erhöhter biologischer Aktivität

Die Zonen hoher mikrobieller Abbauaktivität in kontaminierten Aquiferen werden an den Schadstofffahnenrändern vermutet (*Plume Fringe Concept*), an denen Elektronenakzeptoren und Elektronendonatoren in ausreichender Menge zur Verfügung stehen (siehe Kapitel 2.2.3). Aufgrund der großen Anzahl an Probenahmestellen mit hoher vertikaler Auflösung im HR-MLW konnten hochaufgelöste vertikale Konzentrationsprofile von Schadstoffen und Metaboliten aufgenommen werden, die die Aufdeckung von kleinskaligen Konzentrationsgradienten gewährleisteten. Diese sind typisch für Zonen höchster biologischer Aktivität (Kappler et al. 2005, Tuxen et al. 2006). Dadurch konnten „hot spots“ mikrobieller Abbauaktivität im Aquifer nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde aufgrund der hohen vertikalen Auflösung der Probenahme angenommen, dass Konzentrationsunterschiede der Metabolite an benachbarten Probenahmestellen im Aquifer durch Abbautätigkeiten hervorgerufen werden und nicht durch abiotische Prozesse wie Dispersion und Verdünnung. Die vertikalen Verteilungen der Schadstoffe (Abbildung 4.21) und Metaboliten (Abbildung 4.22) wurden in Kapitel 4.3.2 dargestellt. Zum besseren Vergleich der vertikalen

Konzentrationsverläufe der Metabolite mit deren Ausgangsschadstoffen werden diese in Abbildung 4.24 und Abbildung 4.25 gegenübergestellt.

Metabolite von BTEX

Die vertikalen Konzentrationsverläufe der Metabolite BBS und MBBS zeigen eine ähnliche vertikale Fahnenbreite wie deren Ausgangsschadstoffe Toluol und Xylol, aber im Gegensatz zu den Schadstoffen sind die Maxima dieser Metabolite an den Fahnenrändern zu finden (Abbildung 4.24 A,B). Die höchste Konzentration an BBS liegt am oberen Fahnenrand der Toluol-Fahne und das Minimum im Kern der Fahne. Dieses Phänomen ist für MBBS noch viel deutlicher ausgeprägt. Die beiden Maxima von MBBS treten sehr deutlich an den Rändern der Xylol-Fahne auf (Abbildung 4.24 B). Diese vertikalen Profile sind deutliche Hinweise darauf, dass die höchsten Abbauaktivitäten von Toluol und der Xylol tatsächlich an den Rändern der BTEX-Fahne zu finden sind, wie es das *Plume Fringe Concept* postuliert. In diesem Bereich stehen der gelöste Elektronenakzeptor Sulfat und die Elektronendonatoren (Schadstoffe) in ausreichender Menge zur Verfügung (Anneser et al. 2008a).

Zusätzlich wird das Tiefenprofil von BBS und MBBS durch zwei andere Studien unterstützt, die im selben Aquifer durchgeführt wurden. Zum einen untersuchte Winderl et al. (2008) die vertikalen Verteilungen der mikrobiellen Gemeinschaften im Aquifer und insbesondere das Auftreten von *bssA*-Genen bei den Mikroorganismen. Das ist ein funktionales Marker-Gen welches das entscheidende Enzym beim anaeroben Abbau von Toluol und Xylol codiert (Beller et al. 2002, Heider 2007). Sie fanden dabei heraus, dass das Maximum des Verhältnisses von *bssA*-Genkopien und 16S rRNA-Genkopien im unteren Rand der BTEX Fahne am höchsten war. Sogar jede zweite Bakterienzelle in diesem Bereich besaß Gene zum anaeroben Abbau von alkylierten aromatischen Kohlenwasserstoffen. Zum anderen untersuchten Prommer et al. (2009) mit CSIA die Verschiebung im $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis von Toluol im gleichen Brunnen wie in dieser Arbeit. Sie konnten eine signifikante Verschiebung im substanzspezifischen $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Isotopenverhältnis von Toluol an den Fahnenrändern feststellen, was wiederum auf die größte Abbautätigkeit in diesen Bereichen hindeutet. Zusammengefasst unterstützt die in dieser Arbeit untersuchte Metabolitenverteilung sowie CSIA und die Verteilung von *bssA*-Genen aus anderen Studien eindrucklich das *Plume Fringe Concept* mit den höchsten Abbauaktivitäten an den Schadstoffrändern. Dies resultiert in schmalen steilen Gradienten von Elektronenakzeptoren, deren reduzierten Produkten (z.B. Sulfid) sowie Schadstoffen und Metaboliten an den Fahnenrändern (Tuxen et al. 2006, Bauer et al. 2008, Meckenstock et al. 2010).

Es stellt sich nun die Frage, ob das *Plume Fringe Concept* auch für andere Schadstoffe gilt, die persistenter sind, langsamer abgebaut werden und/oder in geringerer Konzentration im Aquifer auftreten.

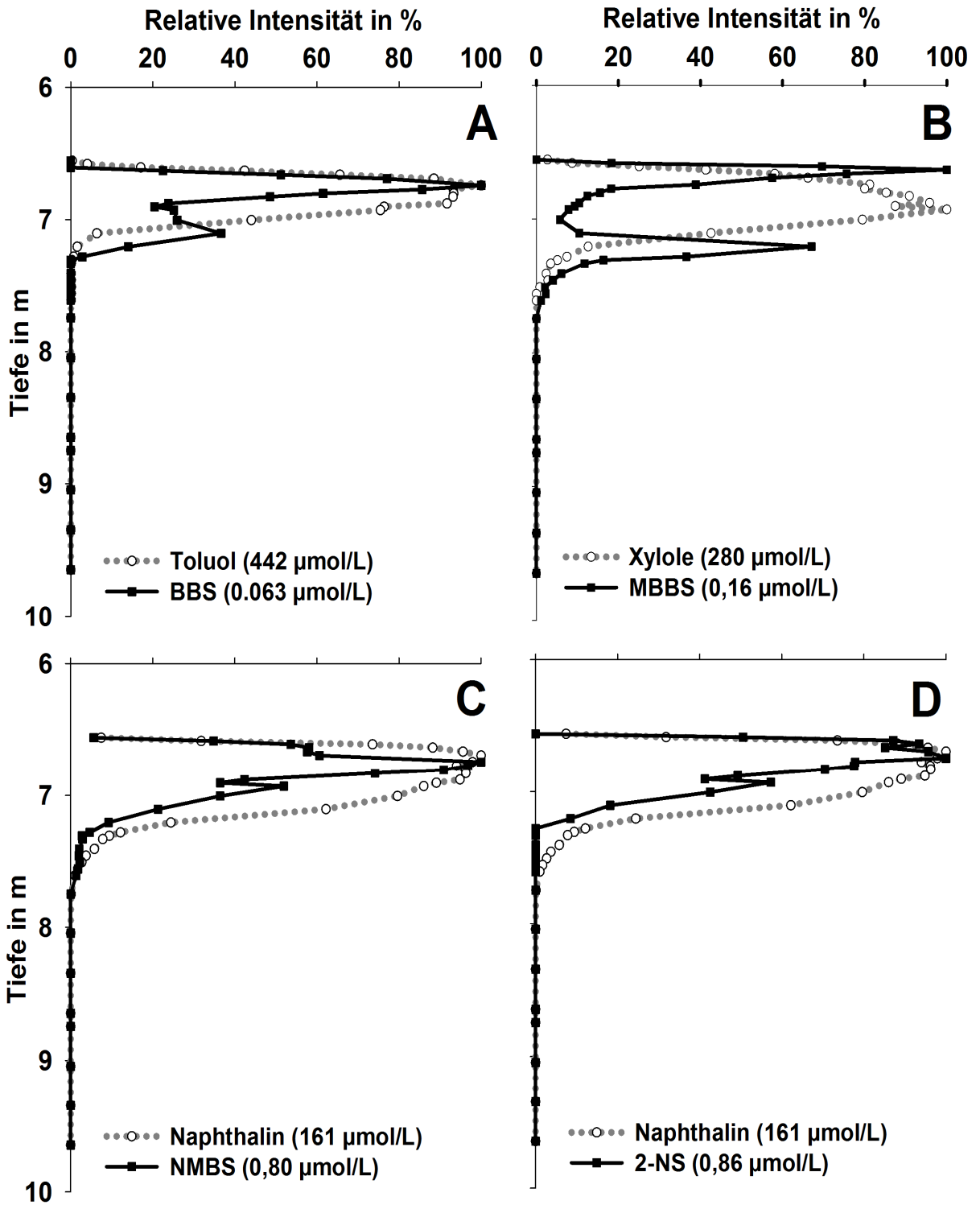


Abbildung 4.24: Vergleich der vertikalen Konzentrationsprofile ausgewählter Metabolite mit deren Ausgangsschadstoffen in den Proben aus dem HR-MLW in Düsseldorf. Die maximalen Konzentrationen sind in Klammern angegeben.

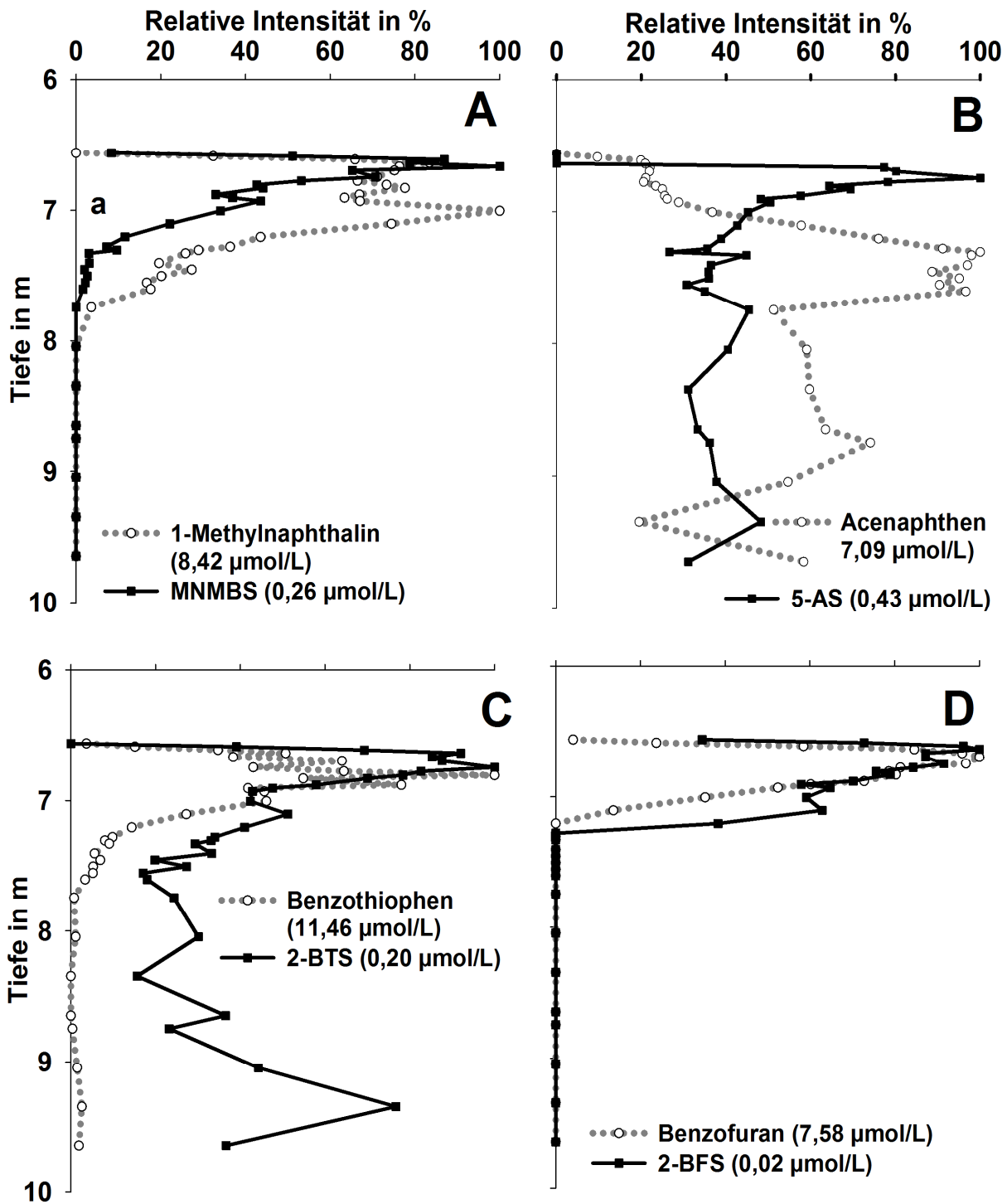


Abbildung 4.25: Vergleich der vertikalen Konzentrationsprofile ausgewählter Metabolite mit deren Ausgangsschadstoffen in den Proben aus dem HR-MLW in Düsseldorf. Die maximalen Konzentrationen sind in Klammern angegeben.

Metabolite von PAK und Heterozyklen

Die vertikalen Profile der Metabolite von Naphthalin und Methylnaphthalin weisen ein etwas anderes Bild auf als die von Toluol und Xylol (Abbildung 4.24 C,D, Abbildung 4.25 A).

Die Metabolite NMBS und 2-NS zeigen ihre maximalen Konzentrationen nicht an den Fahnenrändern, sondern ihre Maxima liegen im Maximum des vermutlichen

Ausgangsschadstoffs Naphthalin (Abbildung 4.24 C,D). Nur MNMBS zeigt ein leichtes Maximum am oberen Fahnenrand des vermutlichen Ausgangsschadstoffs 1-Methylnaphthalin (Abbildung 4.25 A). Diese Profile deuten in gewisser Weise darauf hin, dass die höchsten Abbauaktivitäten von Naphthalin im Fahneninneren und nicht an den Rändern auftreten. Für diese Beobachtung gibt es keine einfache Erklärung, da das *Plume Fringe Concept* auch für den Abbau der Naphthaline gelten müsste. Einige mögliche Ursachen werden kurz aufgeführt:

- Sedimentanalysen im selben Aquifer (direkt neben dem HR-MLW) haben ergeben, dass die am Sediment adsorbierten Gehalte an Naphthalin 6- bis 7-mal größer waren als die gelösten im Grundwasser (Anneser et al. 2010). Für die BTEX hingegen sind keine relevanten adsorbierten Konzentrationen gefunden worden. Das deutet darauf hin, dass das im Wasser gemessene Naphthalin und auch dessen Metabolite nicht das komplette Bild der vertikalen Verteilungen wiedergeben.
- Stabile Isotopenuntersuchungen des Schwefels gaben Hinweise darauf, dass relativ hohe Raten der Sulfatreduktion auch im Fahnenkern möglich waren (solange Sulfat detektierbar ist) (Anneser et al. 2008a, Prommer et al. 2009).
- Wechsel der dynamisch hydraulischen Bedingungen (Veränderungen des Grundwasserspiegels).

Aufgrund der unterschiedlichen Sorptionstendenzen gekoppelt mit z.B. dynamischen hydraulischen Bedingungen (Veränderungen des Grundwasserspiegels) können wohl auch andere vertikale Konzentrationsgradienten (Schadstoff/Metabolit) als bei BTEX auftreten (wie z.B. bei Naphthalinen).

Für die vertikale Konzentrationsverteilung (fast über die komplette Tiefe des Aquifers) des PAK-Metaboliten 5-AS gilt dies wohl auch (Abbildung 4.25 B). Aufgrund des höheren Molekulargewichts und der größeren Apolarität des Ausgangsschadstoffs Acenaphthen und des Metaboliten ist eine noch größere Sorptionstendenz vorhanden. Zusätzlich ist wahrscheinlich auch eine weitere Schadstoffquelle für dessen vertikale Verteilung verantwortlich (Prommer et al. 2009, Anneser et al. 2010). Diese Gründe scheinen auch für die vertikale Konzentrationsverteilung des heterozyklischen Metaboliten 2-BTS verantwortlich zu sein, der nahezu über die komplette Tiefe des Aquifers zu finden ist (Abbildung 4.25 C). Die vertikale Konzentrationsverteilung des Metaboliten von Benzofuran (2-BFS) scheint jedoch wieder dem *Plume Fringe Concept* mit erhöhten Werten an den Fahnenrändern zu entsprechen (Abbildung 4.25 D).

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Konzentrationsprofile der Metabolite der Hauptschadstoffe Toluol und der Xylole, BBS und MBBS, deutlich das *Plume Fringe Concept* unterstützen, dass die höchsten mikrobiellen Abbauaktivitäten an den Schadstoffrändern erwartet. Diese Ergebnisse konnten durch unabhängige Messmethoden (Genmarker (bssA), Isotopenmethoden (CSIA)) abgesichert und verschieden hohen mikrobiellen Abbauaktivitäten zugerechnet werden. Metabolite von PAK und Heterozyklen zeigen hingegen in ihrer vertikalen Konzentrationsverteilung teilweise ihre Maxima an den Fahnenrändern, aber auch im Fahnenzentrum und in anderen Tiefen. Diese Verteilungen werden wohl durch unterschiedliche Sorptionstendenzen, hydraulische Fluktuationen und eine

zusätzliche Schadstoffquelle hervorgerufen. In diesen Fällen reicht das limitierte Wissen über die komplexe Situation *in situ* noch nicht aus um zufriedenstellende Erklärungen für alle Konzentrationsprofile der Metabolite zu finden. Hier besteht noch großer Forschungsbedarf.

4.3.4 Transport im Aquifer und Nutzung als Elektronendonatoren

Zusätzlich zu den unterschiedlichen Indikatorfunktionen der Metabolite sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob Metabolite im Abstrom von kontaminierten Aquiferen eine Funktion als Elektronendonator übernehmen können. Die grundlegende Voraussetzung für die Nutzung der Metabolite als Elektronendonatoren im Abstrombereich wäre ein stattfindender relevanter Transport dieser Metabolite aus dem kontaminierten Bereich, wo sie gebildet werden, in Regionen im Abstrom. Dieser Transport ist theoretisch möglich, da sie durch die sauren funktionellen Gruppen eine deutlich verbesserte Wasserlöslichkeit als die Ausgangsschadstoffe besitzen. Modellhaft würden sie also im Bereich der Kontamination unter bestimmten Redoxbedingungen gebildet und aufgrund ihrer Polarität in Abstrombereiche transportiert. Dort könnten sie unter anderen Redoxbedingungen (z.B. mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor) als Substrat (Elektronendonator) von Mikroorganismen genutzt und weiter abgebaut werden.

Die Analysen verschiedener Abstromproben in dieser Arbeit auf aromatische und heterozyklische Säuren und Bernsteinsäuren konnten diese Hypothese jedoch nicht unterstützen.

Die durchgeführten NLS des FS-Isolats aus dem Abstrombereich des Aquifers in Stuttgart (B53 FS) zeigten im Gegensatz zum kontaminierten Bereich (B22 FS) deutlich weniger Signale mit deutlich geringeren Intensitäten, die auf saure Metabolite hinwiesen (Abbildung 4.3 in Kapitel 4.1.1.2). Die im folgenden Kapitel 4.4 durchgeführten massenspektrometrischen und LC-UV/DOC-Analysen von B53 FS zeigen keine Hinweise auf eine relevante anthropogene Beeinflussung des DOC im Abstrom auf. Diese Beobachtungen werden auch durch frühere Studien in diesem Aquifer (Kumke et al. 1999, Zwiener et al. 1999) unterstützt bei denen sowohl deutlich höhere Konzentrationen des DOC in den Wasserproben von B22 ($\rho(\text{DOC}) = 22,8 \text{ mg/L}$) gegenüber B53 ($\rho(\text{DOC}) = 4,6 \text{ mg/L}$) als auch dominante Fluoreszenz-Signale ausschließlich in B22 FS gefunden wurden. Das alles deutet auf hohe Gehalte an Schadstoffen und Metaboliten ausschließlich im kontaminierten Bereich sowie kompletter Mineralisierung in der Nähe der Schadstoffquelle hin, da bei nicht vollständiger Mineralisierung der DOC nicht abnehmen würde.

Die Messungen von unterschiedlichen Wasserproben aus dem Abstrombereich des Aquifers in Düsseldorf mit der in Kapitel 4.1.2.3 dargestellten quantitativen Methode und durchgeführte *Suspect-Screenings* konnten ausschließlich 5-AS als Metaboliten nachweisen. Keine weiteren spezifischen Metabolite konnten detektiert werden. Das Auftreten dieses Metaboliten in Abstrombereichen wurde auch schon in anderen Studien nachgewiesen (z.B. Zamfirescu und Grathwohl 2001). Die ausschließlich cometabolische Bildung (Mihelcic und Luthy 1988, Safinowski et al. 2006) führt zu einem persistenten "*Dead-End-Produkt*", das von

den Mikroorganismen scheinbar nicht gut weiter abgebaut werden kann und in den Abstrom transportiert wird.

Insgesamt scheinen die sauren Metabolite von aromatischen und heterozyklischen Schadstoffen keinen relevanten Transport in den untersuchten Aquiferen zu zeigen, bzw. im Bereich ihrer Bildung direkt weiter umgewandelt zu werden. Somit ist auch deren Funktion als Elektronendonatoren in Abstrombereichen zu vernachlässigen.

In kontaminierten Bereichen hingegen konnten eine Vielzahl an sauren Metaboliten gefunden werden (Kapitel 4.1), die wohl auch einen relevanten Anteil am DOC ausmachen können (siehe Kapitel 4.4). Damit könnten sie dort als Elektronendonator fungieren, jedoch lassen die deutlich höheren Konzentrationen der Schadstoffe selber (Kapitel 4.3.2) eher eine untergeordnete Rolle der Metabolite als Elektronendonatoren vermuten.

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen (Kapitel 4.3)

- Durch den Nachweis verschiedener Metabolite konnten stattfindende Abbauprozesse unterschiedlicher aromatischer, bityklischer und heterozyklischer Schadstoffe in den Aquiferen in Stuttgart und Düsseldorf qualitativ nachgewiesen werden. Insbesondere die aromatischen und heterozyklischen Bernsteinsäuren wie z.B. BBS, MBBS, NMBS, BFMBBS oder BTMBBS eignen sich dabei als exzellente qualitative Indikatoren des anaeroben Abbaus der entsprechenden Schadstoffe.
- Mit der (weitgehenden) Identifizierung von BTMBBS und BFMBBS konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal der Beweis *in situ* erbracht werden, dass die Fumarataddition auch ein wichtiger Aktivierungsschritt beim anaeroben Abbau von Heterozyklen im Aquifer ist.
- Die großen Unterschiede in den molaren Konzentrationsverhältnissen innerhalb und zwischen den Metaboliten/Schadstoff-Paaren zeigten, dass eine quantitative Indikatorfunktion der Metabolite für den Abbau des Ausgangsschadstoffs kaum möglich ist. Die Konzentrationsverhältnisse können aber Hinweise auf die Stabilität der Metabolite und die (cometabolische) Bildung von „*Dead-End-Produkten*“ (z.B. 2-BTS, 5-AS) geben.
- Die vertikalen Konzentrationsprofile der Metabolite BBS und MBBS zeigten die deutlich höchsten Konzentrationen und steile Gradienten an den Fahnenrändern ihrer Ausgangsschadstoffe Toluol und der Xylole (Hauptkontaminanten im Aquifer). Damit wird eindeutig das *Plume Fringe Concept* unterstützt, das die höchsten mikrobiellen Abbauprodukte an den Schadstoffrändern erwartet, wo gelöste Elektronendonatoren und Elektronenakzeptoren durch hydrodynamische Mischungsprozesse aus verschiedenen Richtungen zusammentreffen.
- Die Metabolite der PAK und Heterozyklen zeigen in ihrer vertikalen Konzentrationsverteilung ihre Maxima kaum an den Fahnenrändern sondern vor allem im Fahnenzentrum. Diese Verteilungen werden vermutlich durch andere Einflussfaktoren wie höhere Sorptionstendenzen der Schadstoffe sowie eine zusätzliche Schadstoffquelle hervorgerufen. Die Komplexität der Einflussfaktoren bedarf intensiver Forschungen.

- Die Analysen von unterschiedlichen Abstromproben zeigten keine relevanten Hinweise auf saure Metabolite in diesem Bereich. Relevante Transporte der sauren Metabolite in den Abstrombereich und somit eine entscheidende Funktion der Metabolite als Elektronendonatoren kann dort also weitgehend ausgeschlossen werden.

4.4 Anthropogener Anteil am DOC in kontaminierten Aquiferen

In diesem Kapitel wird der Frage nachgegangen inwieweit der gesamte DOC in kontaminierten Bereichen und im Abstrom von Aquiferen durch anthropogenen Einfluss (Schadstoffe, Metabolite) geprägt ist. Können Metabolite und Schadstoffe einen relevanten Anteil an dem DOC in kontaminierten Aquiferen ausmachen? Wenn ja, wie lässt sich dieser Unterschied aufgrund der großen Komplexität von DOC darstellen?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- Isolierung von Huminstoff-Fractionen aus einem natürlichen Gewässer sowie aus dem kontaminierten Bereich und dem Abstrombereich eines kontaminierten Aquifers mit anschließendem Vergleich der Kohlenstoffbilanzen (Kapitel 4.4.1).
- Charakterisierung und Vergleich unterschiedlicher FS-Isolate (natürlich, anthropogen geprägt) mit LC-UV/DOC (Kapitel 4.4.2) und massenspektrometrischen Techniken (Kapitel 4.4.3).

Da Huminstoffe in aquatischen Systemen (z.B. Grundwässern) den größten Teil des DOC ausmachen (Frimmel 2001), wurden in dieser Arbeit Methoden zur Charakterisierung des DOC verwendet, die aus der Huminstoffchemie stammen oder dort häufig verwendet werden. Neben der klassischen Huminstoffanreicherung an XAD8-Harz zur Isolierung der Huminstoff-Fractionen nach Mantoura und Riley (1975) wurden zur anschließenden Charakterisierung sowohl hochauflösende massenspektrometrische Techniken als auch die LC-UV/DOC eingesetzt. Insbesondere die LC-UV/DOC ist ein typisches Verfahren zur Charakterisierung von Huminstoffen, da sie eine Trennmethode (LC) mit der analytischen Technik der DOC- und UV-Messung koppelt (Huber und Frimmel 1994, Frimmel et al. 2002).

4.4.1 Isolierung von natürlichem und anthropogen geprägten DOC

Erste Hinweise auf die Art der Zusammensetzung des DOC geben die Kohlenstoffbilanzen der Huminstoffanreicherungen. Die Kohlenstoffbilanzen der in dieser Arbeit durchgeführten Anreicherungen sind in Abbildung 4.26 und Abbildung 4.27 dargestellt.

Zum besseren Verständnis werden zunächst eine paar allgemeine Anmerkungen und Auffälligkeiten angesprochen:

- Bei der Anreicherung werden folgende 3 Fractionen erhalten, die aufgrund ihres Löslichkeitsverhaltens bei verschiedenen pH-Werten getrennt werden: HS, FS und

NHS. Eine detaillierte Beschreibung der Huminstoffanreicherung findet sich in Kapitel 3.3.7.3.

- Der DOC-Anteil der Ausgangslösung, der sich nicht in den obigen 3 Fraktionen widerfindet wird als Verlust bezeichnet. Er lässt sich bei dieser Art von Anreicherung im Allgemeinen durch folgende Arbeitsschritte und Prozesse erklären:
 - Anreicherungsschritte wie z.B. Umfüllen, Ausfällen, Waschen usw.,
 - Mörsern der Feststoffe der einzelnen Fraktionen,
 - irreversible Adsorption eines Teils des DOC am XAD8-Harz.

Beim sorgfältigen Arbeiten ist die irreversible Adsorption am Harz die mit Abstand größte Verlustquelle. Dabei handelt es sich um sehr hydrophobe organische Stoffe, die trotz einer Elution mittels NaOH mit $c(\text{NaOH}) = 0,2 \text{ mol/L}$ nicht vom Harz desorbiert werden können.

- Bei der Trennung von FS und HS spielt Aggregation und Desaggregation die entscheidende Rolle. Dabei sind diese dynamischen Prozesse von verschiedenen Faktoren wie z.B. der Standzeit, der Temperatur oder dem Verhältnis zwischen DOC-Gehalt und Volumen an Flüssigkeit abhängig. Es wurde versucht, diese Faktoren bei den verschiedenen Anreicherungen konstant zu halten. Dies lässt sich aber zum Beispiel beim Verhältnis zwischen DOC-Gehalt und Volumen der Flüssigkeit nicht gewährleisten, da die DOC-Gehalte der Wässer natürlich unterschiedlich sind.

Hohlohsee (HO27)

Die Huminstoffanreicherung des Wassers aus dem Hohlohsee (HO27) repräsentiert eine Anreicherung eines natürlichen Gewässers (siehe Frimmel und Abbt Braun 1999 und Zwiener et al. 1999). Die Kohlenstoffbilanz (Abbildung 4.26) zeigt die typische Verteilung früherer Anreicherungen (Frimmel et al. 2002) dieses anthropogen weitgehend unbelasteten Gewässers. Den größten Anteil am DOC machen FS (42,9%) und NHS (34,9%) aus. Der Anteil an HS an der Kohlenstoffbilanz beträgt 12,9% und die Verluste 9,3%. Die Summe aus HS und FS von etwa 56% ist ein typischer Wert, da die Huminstoffanreicherung in natürlichen Wässern häufig in Wiederfindungsraten des DOC von ca. 60% resultiert (Frimmel et al. 1998, Abbt-Braun et al. 2004).

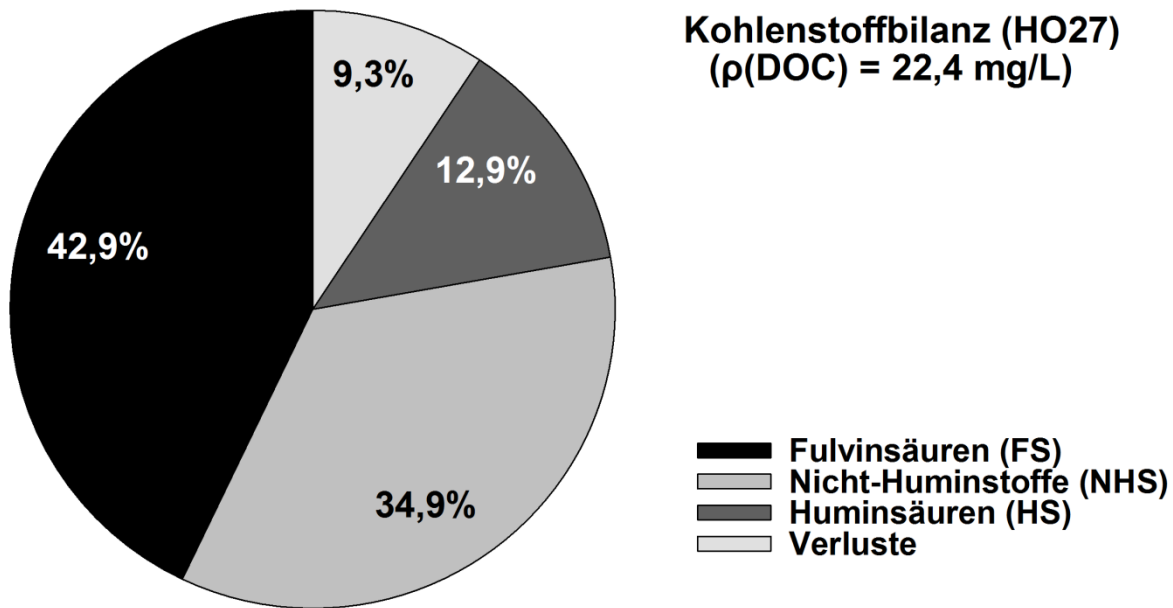


Abbildung 4.26: Prozentuale Verteilung des gesamten Kohlenstoffgehaltes auf die unterschiedlichen Huminstoff-Fractionen (Kohlenstoffbilanz) bei der Huminstoffanreicherung des Wassers aus dem Hohlohsee (HO27). Die DOC-Konzentration der Ausgangslösung ist in Klammern angegeben.

Weißandt-Görlau

Die Kohlenstoffbilanz der Huminstoffanreicherung der Abstromprobe aus dem kontaminierten Grundwasserleiter in Weißandt-Görlau (GWM15) zeigt folgende Verteilung (Abbildung 4.27 A): FS: 62,8%, NHS: 22,4%, HS: 1,1%, Verluste: 13,7%.

Deutlich zu erkennen ist ein erhöhter Anteil an FS gegenüber einem deutlich niedrigeren Anteil an HS. Ein vergleichbar niedriger Anteil an HS (2%) wurde auch bei anderen Anreicherungen von Grundwasser, z.B. beim Grundwasserleiter in Fuhrberg, beobachtet und scheint für Grundwässer typisch zu sein (Frimmel et al. 2002). Es unterstreicht die Annahme, dass in Aquiferen FS den deutlich größten Anteil am DOC ausmachen und HS nur eine untergeordnete Rolle spielen. Unter anderem deswegen wurden in dieser Arbeit vornehmlich die FS-Isolate eingehender untersucht und charakterisiert (Kapitel 4.4.2 und 4.4.3).

Ein deutlich anderes Verhältnis zeigt die Kohlenstoffbilanz der Huminstoffanreicherung der Probe aus dem kontaminierten Bereich des Grundwasserleiters in Weißandt-Görlau (G10) (Abbildung 4.27 B): FS: 11,1%, NHS: 5,4%, HS: 31,3%, Verluste: 52,2%.

Es ist ein deutlich höherer Anteil an Verlusten und HS sowie ein niedrigerer Anteil an FS zu beobachten. Zum Anteil der HS ist zu bemerken, dass während der Anreicherung die HS-Fraktion trotz mehrfacher Gefriertrocknung über einen längeren Zeitraum hinweg nicht fest wurde. Stattdessen erhielt man ein zähflüssiges Öl. Dies könnte dadurch verursacht worden sein, dass in der angereicherten Wasserphase so viele anthropogen eingetragene organische Stoffe enthalten waren, dass die physikalischen Eigenschaften der wässrigen Phase deutlich verändert waren. Möglicherweise wurden aber auch geringe Anteile (winzige Tröpfchen) der Teerölphase bei der Huminstoffanreicherung mit isoliert. Die für die Kohlenstoffbilanz

verwendete Masse der HS konnte in diesem Fall nicht über die Auswaage der festen Fraktion ermittelt werden sondern wurde über den gemessenen DOC-Gehalt der HS-Lösung berechnet. Infolgedessen ist es fraglich ob dieser Anteil streng genommen überhaupt als HS bezeichnet werden kann.

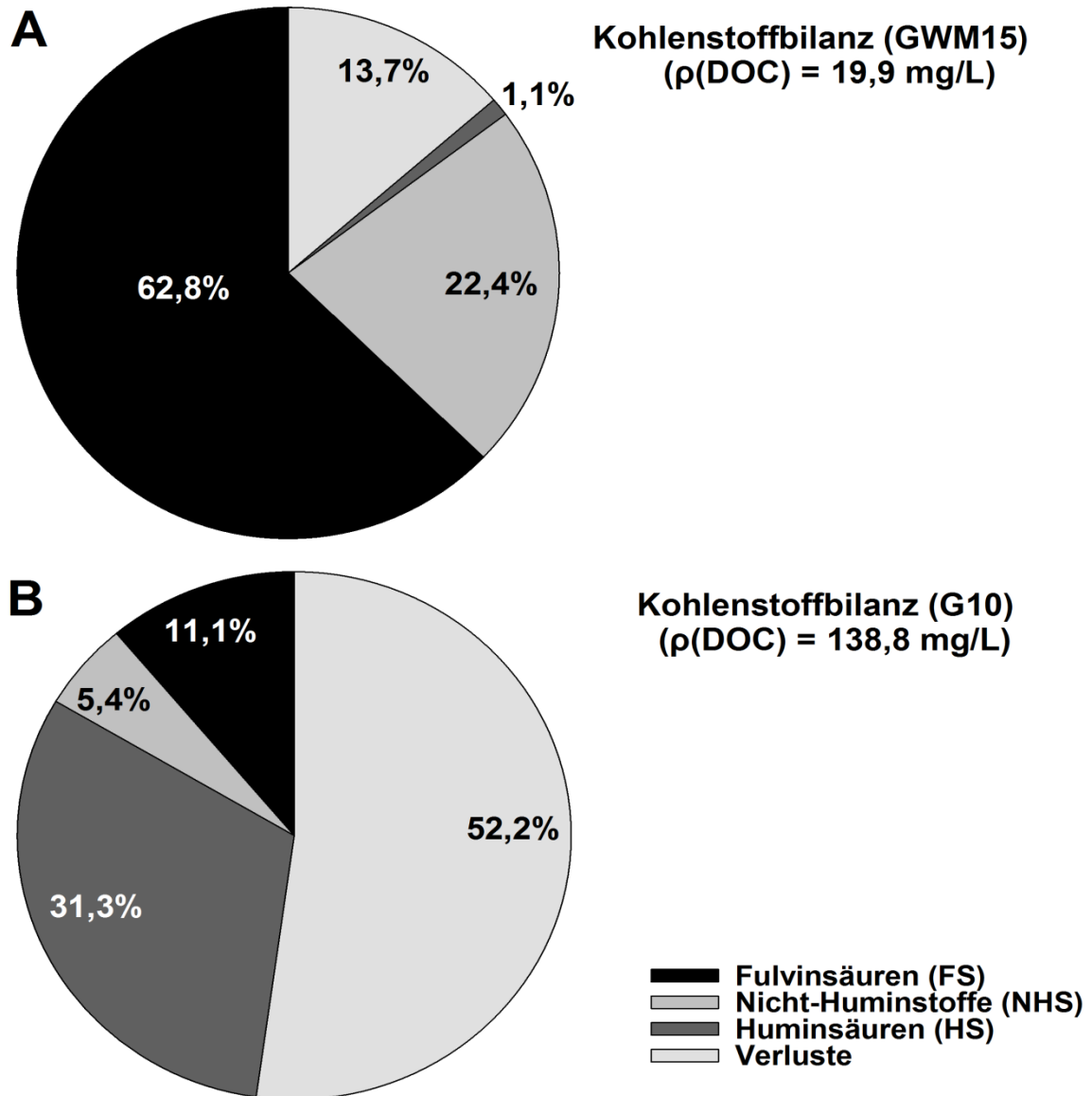


Abbildung 4.27: Prozentuale Verteilung des gesamten Kohlenstoffgehaltes auf die unterschiedlichen Huminstoff-Fractionen (Kohlenstoffbilanz) bei der Huminstoffanreicherung der unterschiedlichen Wässer des Aquifers in Gölzau. A: GWM15 (Abstrombereich). B: G10 (kontaminierter Bereich). Die DOC-Konzentrationen der Ausgangslösungen sind in Klammern angegeben.

Der sehr hohe Anteil an Verlusten von über 50% des gesamten Kohlenstoffs zeigt, dass ein sehr großer organischer Anteil in dieser Probe irreversibel am XAD8-Harz adsorbiert worden ist. Die irreversible Adsorption bezieht sich auf die während der Huminstoffanreicherung zur Desorption angewendete wässrige NaOH-Lösung ($c(\text{NaOH}) = 0,2 \text{ mol/L}$). Während einer anschließend durchgeführten Soxhlet-Extraktion mit Hexan konnte ein großer Anteil des

organischen Materials wieder vom XAD8-Harz desorbiert werden. Dieser "irreversibel" adsorbierte DOC-Anteil wird wahrscheinlich aus sehr hydrophoben organischen Strukturen bestehen, wie z.B. in Schadstoffen mit aromatischen oder heterozyklischen Strukturelementen. Diese konnten von Zwiener et al. (1999) auch im kontaminierten Aquifer in Stuttgart im "irreversibel" adsorbierten DOC-Anteil nachgewiesen werden. Diese Strukturelemente sind zwar bei "natürlichen" Huminstoffen auch vorhanden, sie sind dort aber aufgrund des hohen Humifizierungsgrads durch funktionelle Einheiten wie z.B. aliphatischen und sauren Gruppen gut abgeschirmt, was zu einer geringeren Hydrophobizität der "natürlichen Huminstoffe" führt (Engebretsen und Wandruszka 1994, Wershaw 1998).

Der Vergleich der Kohlenstoffbilanzen zwischen kontaminiertem Bereich (G10) und Abstrombereich (GWM15) gibt deutliche Hinweise darauf, dass es sich beim DOC in G10 nicht um "natürlichen" DOC handelt, welcher in unbelasteten Gewässern hauptsächlich durch Huminstoffe dargestellt wird. Ein deutlicher anthropogener Einfluss ist erkennbar. Auch der deutlich höhere DOC-Gehalt der Ausgangslösungen von $\rho(\text{DOC}) = 138,8 \text{ mg/L}$ (G10) im Vergleich zu $\rho(\text{DOC}) = 19,88 \text{ mg/L}$ im Abstrom (GWM15) lässt schon auf einen deutlichen anthropogenen Einfluss durch Kontamination mit organischen Schadstoffen und Metaboliten in G10 schließen. Allerdings ist der DOC-Gehalt im Abstrom auch verhältnismäßig hoch, da Aquifere typischerweise Gehalte im unteren mg/L-Bereich aufweisen (Thurman 1985, Kunkel et al. 2004).

Vergleich der kontaminierten Aquifere Weißandt-Göhlau und Stuttgart

Ähnliche Kohlenstoffbilanzen wie bei Weißandt-Göhlau zeigten die Bilanzen der Huminstoffanreicherungen der Grundwasserproben aus dem kontaminierten Aquifer in Stuttgart, die von Zwiener et al. (1999) durchgeführt wurden. Beim Vergleich der Bilanzen dieser beiden kontaminierten Aquifere fällt Folgendes auf:

- In Stuttgart im kontaminierten Bereich (B22) konnte mit 51% ein ähnlich großer Anteil an Verlusten durch "irreversible" Adsorption beobachtet werden wie bei G10 in Weißandt-Göhlau. Der Abstrombereich (B53) zeigte mit 15% im Gegensatz dazu wieder Verluste im Bereich anthropogen unbeeinflusster Gewässer.
- Die Proben aus den kontaminierten Bereichen in beiden Aquiferen zeigen mit 14% (B22) und 11% (G10) einen ähnlichen Anteil an FS. Der Anteil der HS ist mit 2% (B22) und 31% (G10) jedoch deutlich unterschiedlich, was aber auf die bereits angesprochene Problematik bei der Gefriertrocknung der HS-Fraktion von G10 zurückgeführt werden könnte.
- Die hohen Anteile der FS (62% in B22 und 63% in GWM15) und die niedrigen Anteile an HS (0% in B53 und 1% in GWM15) in den Abstromproben zeigen nahezu identische und für Aquifere typische Werte

Die hohen Verluste des DOC von teilweise über 50% zeigen ein grundsätzliches Phänomen der Huminstoffanreicherung von anthropogen stark geprägten Gewässern (z.B. kontaminierten Aquiferen):

- Die hohe Hydrophobizität der anthropogen eingetragenen Stoffe (vor allem der Schadstoffe) durch die große Anzahl an nicht abgeschirmten aromatischen Strukturelementen in mit aromatischen Schadstoffgemischen kontaminierten Aquiferen (wie in dieser Arbeit) führt zu geringen Wiederfindungsraten des DOC bei der Anreicherung. Ein sehr großer Anteil des DOC lässt sich mit der verwendeten NaOH-Lösung ($c(\text{NaOH}) = 0,2 \text{ mol/L}$) nicht vom XAD8-Material desorbieren.
- Noch niedrigere DOC-Wiederfindungsraten von nur 9% bis 18% sind auch bei einem anderen stark anthropogen beeinflussten Gewässertyp, den Abwässern, gefunden worden (Frimmel et al. 1998). Dort scheint aber ein gegensätzlicher Grund eine Rolle zu spielen. Der geringe Humifizierungsgrad und die niedrige Hydrophobizität der organischen Substanzen führen dazu, dass ein Großteil des DOC gar nicht erst am XAD8-Material adsorbiert und als NHS-Anteil bilanziert wird.

Geringe Wiederfindungsraten des DOC bei der Huminstoffanreicherung können also ein deutliches Zeichen für einen starken anthropogenen eingebrachten DOC-Anteil sein. Bei Aquiferen, die mit hydrophoben organischen Schadstoffen (z.B. Teerölen) kontaminiert sind, werden diese geringen Wiederfindungsraten, wie gezeigt, durch "irreversibel" am XAD-8 Harz adsorbierte Stoffe hervorgerufen.

4.4.2 Charakterisierung des DOC mit LC-UV/DOC

Zum weiteren Vergleich des DOC aus verschiedenen (Grund)Wässern wurden die in dieser Arbeit angereicherten FS-Isolate vom Hohlohsee (HO27), dem kontaminierten Aquifer in Weißandt-Görlau (GWM15 und G10) sowie die von Zwiener et al. (1999) angereicherten FS-Isolate aus dem kontaminierten Aquifer in Stuttgart (B22 FS und B53 FS) mit LC-UV/DOC charakterisiert. Zusätzlich wurden folgende FS-Isolate als Referenzmaterial für DOC aus anthropogen weitgehend unbeeinflussten Aquiferen verwendet:

- Fuhrberg: Dieses FS-Isolat wurde im Rahmen des Projektes ROSIG ("Refraktäre organische Säuren im Gewässer") aus Grundwasser ($\rho(\text{DOC}) = 8,1 \text{ mg/L}$) des Aquifers in Fuhrberg in der Nähe von Hannover (Niedersachsen) isoliert (Frimmel et al. 2002). Es handelt sich um einen 25 m bis 35 m mächtigen anthropogen weitgehend unbeeinflussten Grundwasserleiter. Detaillierte Informationen zum Aquifer, der Probenahme und der Isolierung sind in Frimmel und Abbt Braun (1999) und Frimmel et al. (2002) zu finden.
- Bocholt: Dieses FS-Isolat wurde aus Grundwasser ($\rho(\text{DOC}) = 4,0 \text{ mg/L}$) aus einer Tiefe von 17,5 m (mittels Multi-Level Brunnen) aus einem anthropogen weitgehend unbeeinflussten Aquifer in Bocholt (Nordrhein-Westfalen) angereichert. Weitergehende Informationen finden sich in Abbt-Braun (1987) und Matthes et al. (1992).

4.4.2.1 LC-UV/DOC-Chromatogramme der Fulvinsäure-Isolate

Um eine gute (quantitative) Vergleichbarkeit der LC-UV/DOC-Chromatogramme der verschiedenen FS-Isolate zu gewährleisten und eine Überladung der Trennsäule zu verhindern, wurden jeweils 5 mg der Isolate in 250 mL MilliQ gelöst, filtriert ($0,45 \mu\text{m}$) und

immer das gleiche Volumen auf die SEC-Säule und in den Bypass injiziert (siehe Kapitel 3.3.5). Die im Bypass gemessenen DOC-Konzentrationen, sind in Tabelle 4.4 aufgelistet. Dabei zeigen sich Unterschiede, die von $\rho(\text{GWM15}) = 6,0 \text{ mg/L}$ bis $\rho(\text{Bocholt}) = 9,8 \text{ mg/L}$ reichen. Diese lassen sich durch unterschiedlich hohe Kohlenstoffanteile in den FS und/oder durch verschieden hohe Oxidationsausbeuten bei den DOC-Messungen (siehe Kapitel 4.4.2.2) erklären.

Tabelle 4.4: Gemessene (im Bypass) DOC-Konzentrationen der verschiedenen gelösten FS-Isolate bei den LC-UV/DOC-Messungen.

FS-Isolat	HO27	Fuhrberg	Bocholt	B22	B53	G10	GWM15
DOC (mg/L)	9,5	9,0	9,8	8,6	7,5	9,4	6,0

Anthropogen weitgehend unbeeinflusste (Grund)Wässer

Das LC-UV/DOC-Chromatogramm von HO27 (Abbildung 4.28) zeigt eine typische Verteilung, wie sie bei anthropogen unbelasteten FS-Fractionen zu beobachten ist (siehe Abbildung 2.13 in Kapitel 2.5.2 und Frimmel et al. 2002):

- Das DOC-Signal zeigt einen breiten Peak, der sich fast vom Elutionsvolumen (V_R) von circa 31 mL bis etwa 53 mL erstreckt. Die Breite des Peaks lässt sich über die große Molekülgrößenverteilung in FS erklären.
- Der zweite Peak bei etwa 55 mL kommt durch die Ionenstärkedifferenzen zwischen Eluent und Probe zustande, was sehr deutlich am zeitgleichen Abfall der Leitfähigkeit zu erkennen ist. Dieser Peak wird als "Salzpeak" bezeichnet und wird durch niedermolekulare Säuren verursacht, die durch Ionenstärkedifferenzen stark beeinflusst werden (Mori und Barth 1999, Müller 2004).
- Nahezu der komplette DOC (98%) dieses FS-Isolats eluiert zwischen dem Ausschlussvolumen ($V_0 = 29,8 \text{ mL}$) und dem Permeationsvolumen ($V_P = 70 \text{ mL}$). Das deutet darauf hin, dass neben der reinen Größentrennung keine weiteren Mechanismen wie z.B. hydrophobe Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle spielen. Wie bereits in Kapitel 4.4.1 angesprochen lassen sich bei "natürlichen" Huminstoffen die geringeren hydrophoben Wechselwirkungen durch den hohen Humifizierungsgrad der Substanzen erklären, bei dem die stark hydrophoben (z.B. aromatische) Strukturen durch funktionelle Einheiten wie z.B. aliphatische und saure Gruppen gut abgeschirmt sind (Engebretsen und Wandruszka 1994, Wershaw 1998).
- Das UV-Signal zeigt einen vergleichbaren Verlauf wie das DOC-Signal, was typisch für Huminstoffe ist (Frimmel et al. 2002). Die große Intensität deutet auf eine Vielzahl UV-absorbierender organischer Stoffe über den gesamten Molekülgrößenbereich hin.

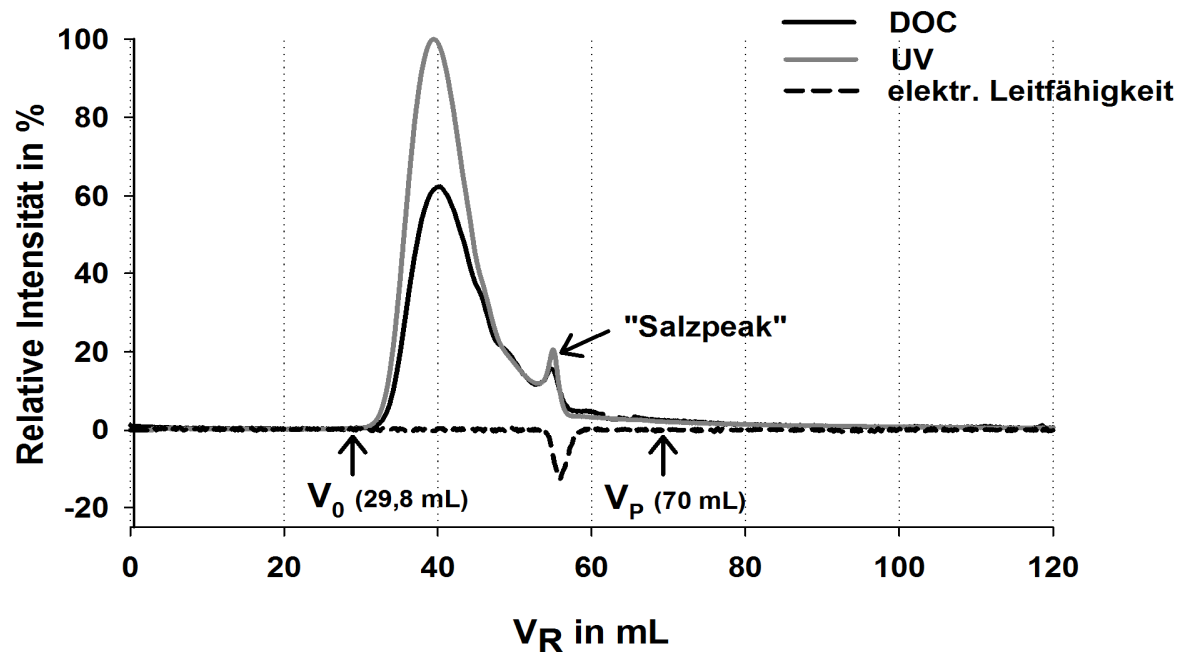


Abbildung 4.28: LC-UV/DOC-Chromatogramm der FS-Fraktion aus dem Hohlohsee (HO27).

Die LC-UV/DOC-Chromatogramme der FS-Fractionen aus den anthropogen weitgehend unbelasteten Aquiferen in Fuhrberg und Bocholt (Abbildung 4.29) zeigen einige Gemeinsamkeiten aber auch Unterschiede zum Chromatogramm vom Hohlohsee (HO27). Nahezu der gesamte DOC (Fuhrberg: 95%; Bocholt: 96%) eluiert auch hier vor V_P , ein deutlicher Salzpeak ist zu erkennen und das Chromatogramm wird durch einen breiten Peak dominiert, der sich von 35 mL bis 54 mL erstreckt. Innerhalb des breiten Peaks, zeichnet sich aber eine zusätzliche Fraktion bei etwa 50 mL ab (deutlicher bei Fuhrberg), die bei HO27 nicht zu erkennen war. Der breite Peak beginnt im Vergleich zu HO27 (32 mL) auch erst bei 35 mL, was auf das Fehlen von hochmolekularen Substanzen (z.B. Biopolymeren) in Aquiferen hindeutet. Außerdem ist das UV-Signal im Verhältnis zum DOC-Signal geringer als bei HO27, was auf weniger UV-aktive Strukturen im DOC der FS-Fraktion aus Fuhrberg und Bocholt hindeutet.

Wie hier gezeigt, sind bei den FS-Fractionen aus anthropogen unbelasteten Aquiferen kaum DOC-Signale nach V_P zu verzeichnen. Es sind also kaum organische Substanzen vorhanden, die so starke Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial der SEC-Säule (Copolymer aus Ethylenglykol und Methacrylsäure) eingehen, dass sie erst stark verzögert wieder von der Säule eluiert werden. Auch Müller et al. (2000) zeigten, dass bei "natürlichen" Huminstoff-Fractionen nur sehr geringe organische Anteile so stark mit der Trennsäule wechselwirken, dass sie nicht wieder eluiert werden. Der vorrangige Mechanismus scheint also die reine Größentrennung zu sein und hydrophobe Wechselwirkungen spielen kaum eine Rolle.

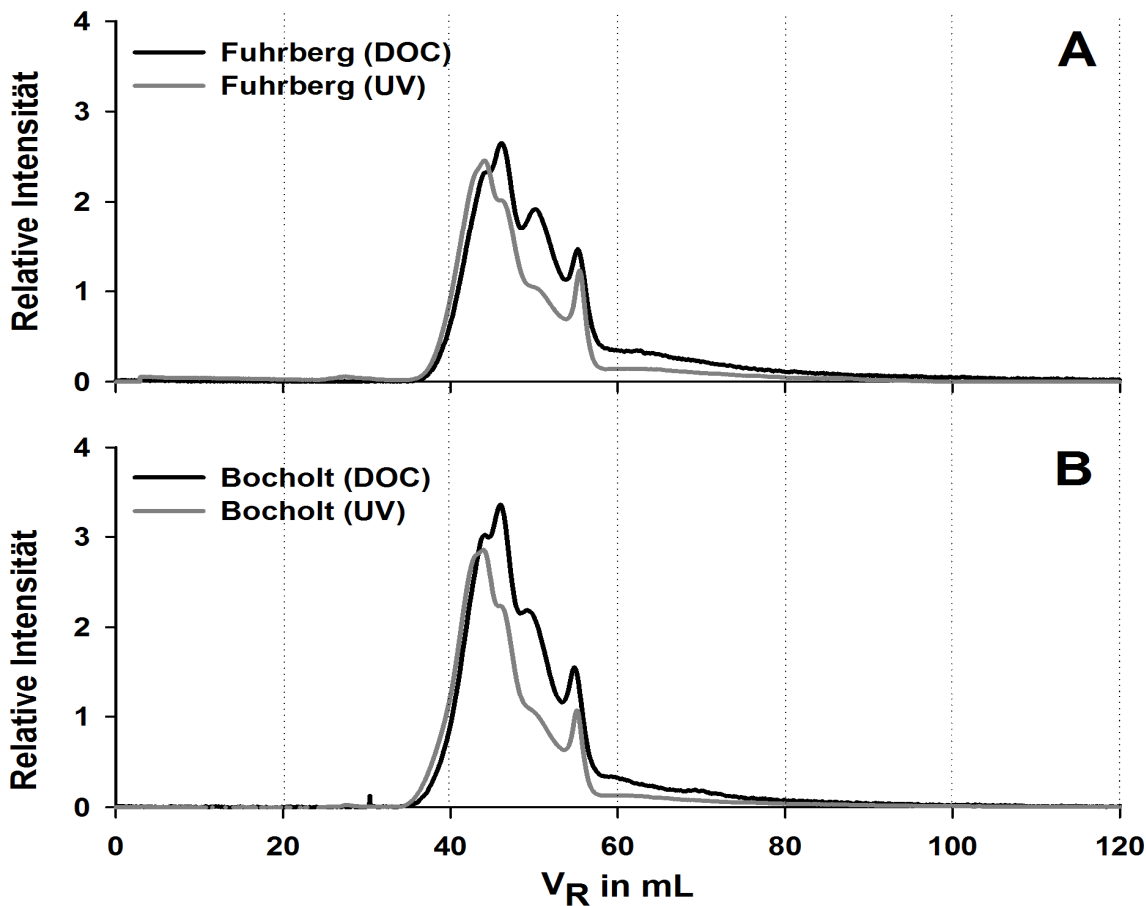


Abbildung 4.29: LC-UV/DOC-Chromatogramme der FS-Fractionen aus den Aquifer in Fuhrberg (A) und Bocholt (B).

Anthropogen stark beeinflusste Grundwässer

Ein deutlich anderes Bild zeigen anthropogen stark beeinflusste Grundwässer wie zum Beispiel die FS-Fraktion aus dem kontaminierten Bereich (B22 FS) des Aquifers in Stuttgart (Abbildung 4.30 A). Ein Großteil des DOC (41%) eluiert dort deutlich nach V_p und diese DOC-Peaks werden teilweise durch zeitgleiche intensive UV-Signale begleitet. Insbesondere der große DOC-Peak bei etwa 135 mL zeigt ein sehr starkes UV-Signal. Diese DOC-Peaks mit intensiven UV-Signalen wurden auch schon von Kumke et al. (1999) und Zwiener et al. (1999) in dieser Fraktion nachgewiesen. Sie deuten auf sehr hydrophobe organische Moleküle hin, die stark mit dem XAD8-Material der Säule wechselwirken und hohe UV-Aktivität zeigen. In den oben genannten Studien konnte gezeigt werden, dass es sich bei diesen Signalen um Strukturen wie bei sauren aromatischen Verbindungen (z.B. Salizylsäure) handeln muss, die typische Metabolite von aromatischen Schadstoffen sind. Einige dieser Metabolite konnten in dieser Arbeit auch bereits erfolgreich in dieser FS-Fraktion identifiziert werden (Kapitel 4.1.1).

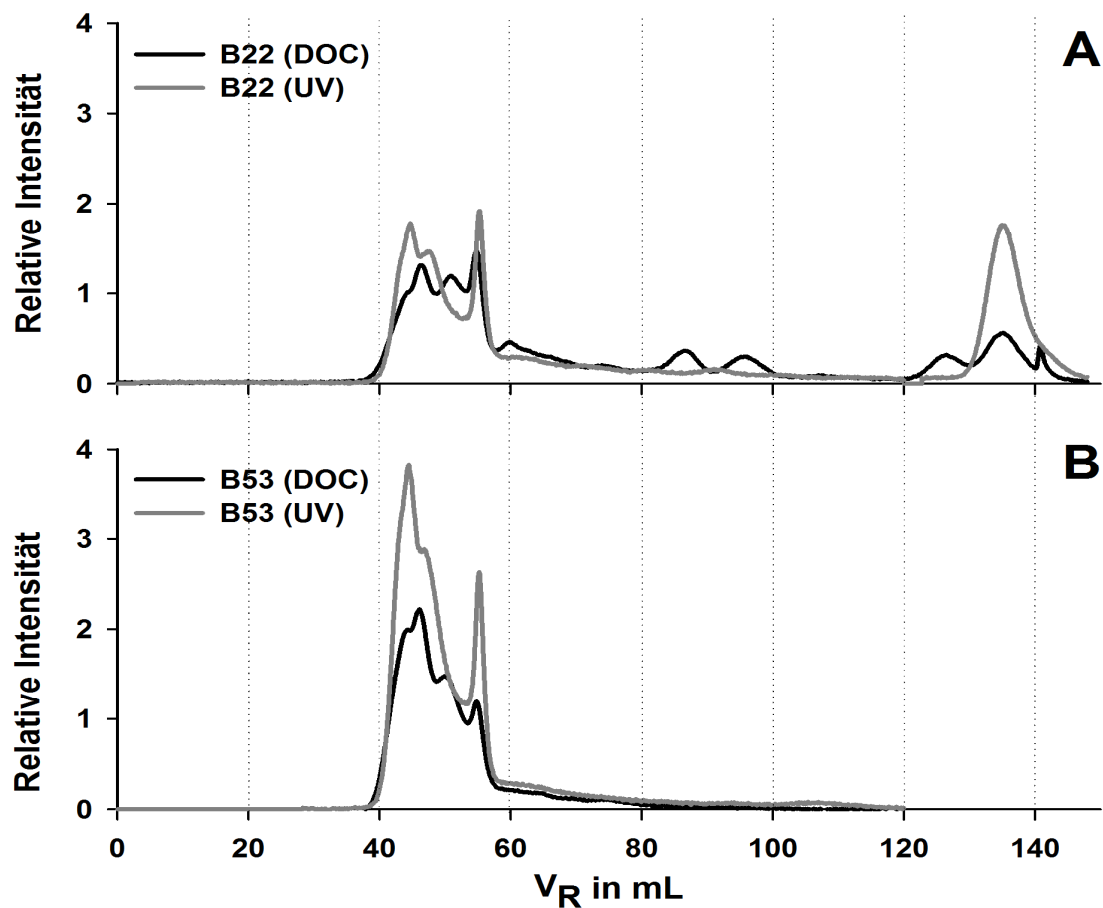


Abbildung 4.30: LC-UV/DOC-Chromatogramme der FS-Fractionen aus dem kontaminierten Aquifer in Stuttgart. A: B22 FS (kontaminierter Bereich), B: B53 FS (Abstrombereich).

Starke Wechselwirkungen von aromatischen Komponenten mit der SEC-Säule konnten auch in anderen Studien wie z.B. von Specht und Frimmel (2000) festgestellt werden. Sie konnten zeigen, dass das Ausmaß der Wechselwirkungen von aromatischen Stoffen maßgeblich von Art und Anzahl der funktionellen Gruppen abhängt. Das bedeutet für die in dieser Arbeit untersuchten kontaminierten Aquifere, dass die aromatischen Schadstoffe aufgrund fehlender funktioneller Gruppen so stark mit der Säule wechselwirken, dass sie größtenteils gar nicht mehr eluiert werden. Die sauren Metabolite hingegen sind durch den Einbau von funktionellen Gruppen in die Schadstoffmoleküle während des mikrobiellen Abbaus etwas polarer. Sie zeigen dadurch zwar etwas geringere hydrophobe Wechselwirkungen als die Schadstoffe, aber immer noch so stark, dass es zu verzögertem Elutionsverhalten führt (siehe Abbildung 4.30 A). Dieser Aspekt wird im Rahmen des chromatographierbaren Anteils des DOC (cDOC) in Kapitel 4.4.2.2 noch eingehender diskutiert. Das LC-UV/DOC-Chromatogramm von B22 FS wird somit durch hydrophobe Wechselwirkungen dominiert, so dass die reine Größentrennung für die die LC-DOC-Chromatographie entwickelt wurde, teilweise nur noch eine untergeordnete Rolle spielt. Das DOC-Signal der "natürlichen" FS wird in B22 FS durch den anthropogen eingetragenen DOC (vermutlich Metabolite) also deutlich überlagert.

Das LC-UV/DOC-Chromatogramm der FS-Fraktion des Abstrombereichs (B53 FS) des Aquifers in Stuttgart (Abbildung 4.30 B) hingegen zeigt wieder einen ähnlichen Verlauf, wie es in "natürlichen" Aquiferen zu beobachten ist (siehe Fuhrberg und Bocholt in Abbildung 4.29). Es sind z.B. kaum DOC-Anteile (nur 5%) zu erkennen, die nach V_P eluieren. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die deutliche anthropogene Beeinflussung durch hydrophobe Stoffe (z.B. aromatische und heterozyklische Schadstoffe und deren Metabolite) nicht bis in den Abstrom reicht.

Im Gegensatz zum bereits diskutierten Aquifer in Stuttgart sind deutliche DOC-Signale in Form von Peaks nach V_P im LC-UV/DOC-Chromatogramm des kontaminierten Bereichs (G10) des Aquifers in Gölzau nicht zu beobachten gewesen (Abbildung 4.31 A).

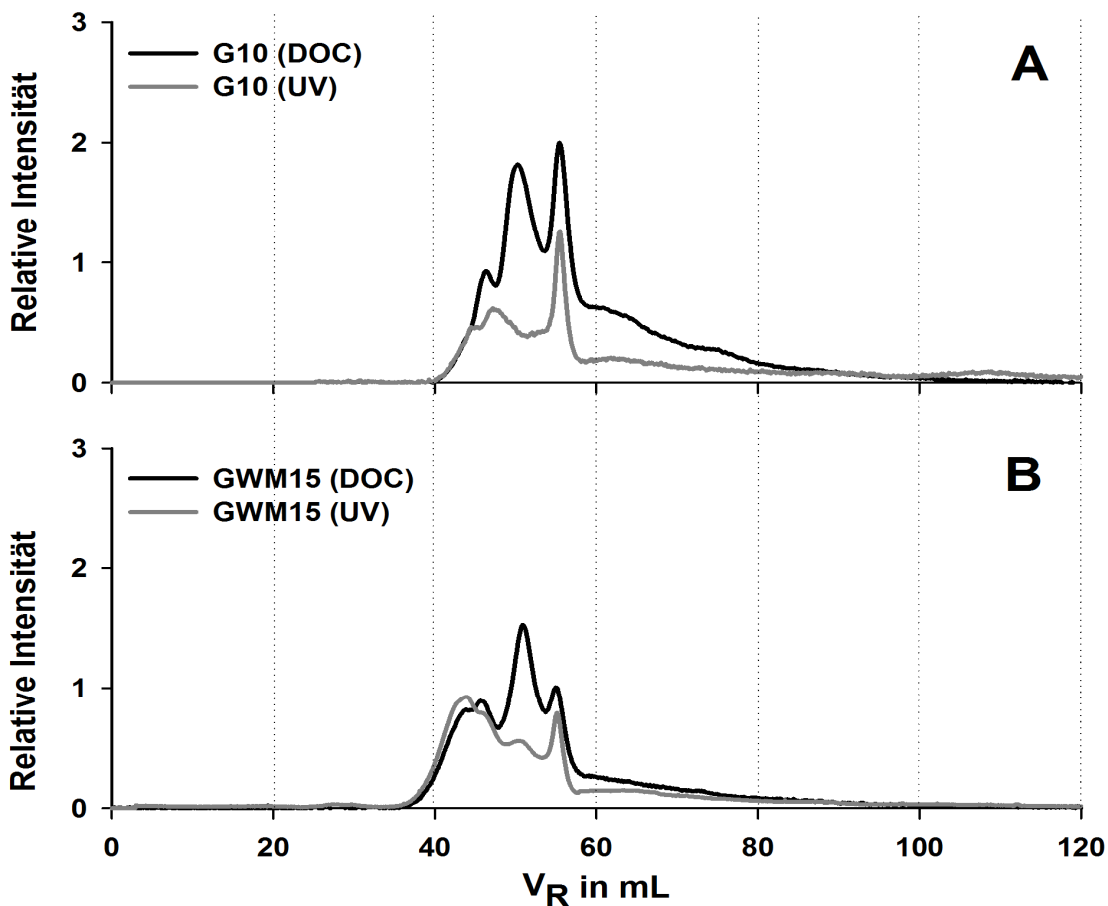


Abbildung 4.31: LC-UV/DOC-Chromatogramme der FS-Fractionen aus dem kontaminierten Aquifer in Gölzau. A: G10 (kontaminiertes Gebiet), B: GWM15 (Abstrombereich).

Das DOC-Signal zeigt jedoch ein breites abnehmendes Signal nach V_P , was etwa 20% des DOC ausmacht und nur durch geringe UV-Signale begleitet wird. Insgesamt ist das UV- im Vergleich zum DOC-Signal deutlich geringer als im bereits diskutierten Chromatogramm aus dem kontaminierten Bereich in Stuttgart (B22 FS). Die eher geringen UV-Signale sind ein Zeichen dafür, dass es sich größtenteils um aliphatische Kontaminanten und Metabolite handelt, die im Gegensatz zu Aromaten keine UV-Absorption zeigen. Dieses DOC-Signal ist in etwas abgeschwächter Intensität auch im Abstrombereich (GWM15) zu erkennen, jedoch

macht es dort nur 7% des DOC aus (Abbildung 4.31 B). Insgesamt sind die Unterschiede in den LC-UV/DOC-Chromatogrammen zwischen kontaminiertem Bereich und Abstrombereich beim Aquifer in Gölzau nicht so groß wie im bereits diskutierten Aquifer in Stuttgart. Die organische Fraktion, die sich im sogenannten "Salzpeak" widerspiegelt, ist bei G10 jedoch deutlich größer.

Vergleich aller FS-Fraktionen

Zum besseren Vergleich der DOC-Signale aller Proben sind in Abbildung 4.32 die relativen Intensitäten der DOC-Signale der in dieser Arbeit untersuchten FS-Fraktionen zusammengefasst.

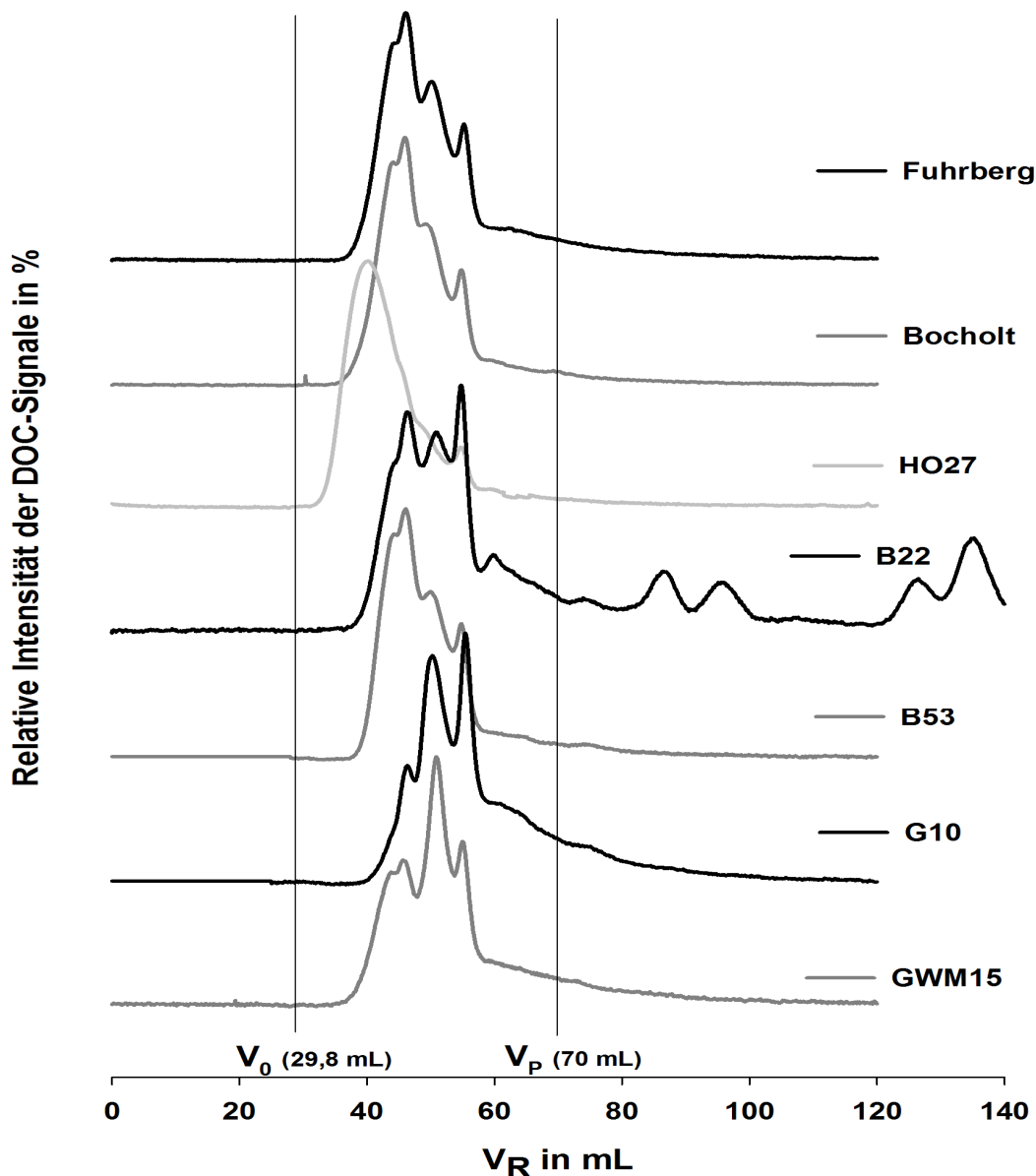


Abbildung 4.32: LC-DOC-Chromatogramme (relative Intensität der DOC-Signale) aller in dieser Arbeit untersuchten FS-Fraktionen. Das maximale DOC-Signal in jeder Probe ist jeweils auf 100% gesetzt worden. Da immer die gleiche Menge an FS-Isolat gelöst wurde sind die DOC-Konzentration der verschiedenen FS-Lösungen (siehe Tabelle 4.4) und der absolute Gehalt an DOC auf der SEC-Säule bei allen Messungen ähnlich hoch.

Da immer die gleiche Menge an FS-Isolat gelöst wurde und dadurch die DOC-Konzentration der verschiedenen FS-Lösungen ähnlich hoch sind (siehe Tabelle 4.4), ist der absolute auf die SEC-Säule injizierte Gehalt an DOC bei allen Messungen ähnlich groß. Das gewährleistet eine gute Vergleichbarkeit der verschiedenen DOC-Verteilungen in den Chromatogrammen. Hierbei wird noch einmal deutlich, wie groß der DOC-Anteil von B22 ist, der im Vergleich zu den anderen FS-Fraktionen deutlich nach V_P eluiert. Weiterhin ist auffällig, dass der breite Peak bei allen FS-Fraktionen der Grundwässer mit etwa 35 mL im Vergleich zum Braunwassersee H0 27 mit 31 mL etwas später beginnt, was auf weniger hochmolekulares Material in den Aquiferen (z.B. Biopolymere) schließen lässt.

4.4.2.2 Repräsentativität der LC-UV/DOC-Chromatogramme

Generell stellt sich bei der Interpretation von LC-UV/DOC-Chromatogrammen die Frage, wie repräsentativ die gemessenen Signale für den tatsächlichen DOC in der Probe sind. Dabei gilt es zwei wichtige Aspekte zu beachten:

- Wie hoch ist der chromatographierbare Anteil des injizierten DOC (cDOC)?
Inwieweit entspricht der DOC, der das DOC-Signal nach der SEC-Säule erzeugt, überhaupt in der Zusammensetzung dem DOC, der auf die Säule injiziert wurde. Ein möglicher Einflussfaktor sind dabei organische Anteile in der Probe, die so stark mit dem Säulenmaterial der SEC-Säule wechselwirken, dass sie unter den gegebenen Messbedingungen mit dem Eluenten nicht wieder eluiert werden können. Zur Ermittlung dieses Verlustes wird der chromatographierbare Anteil des DOC (cDOC) bestimmt.
- Wie gut ist die Oxidierbarkeit des injizierten DOC?
Dabei stellt sich die Frage wie effektiv sich die verschiedenen organischen Inhaltsstoffe in den FS-Isolaten bei der DOC-Messung oxidieren lassen. Wie hoch sind also die Oxidationsausbeuten im Vergleich zum verwendeten DOC-Standard und wie vergleichbar sind sie?

Chromatographierbarer Anteil des DOC (cDOC)

Zur Ermittlung des cDOC der Huminstoff-Isolate wurden in dieser Arbeit jeweils die Flächen unter den DOC-Signal im jeweiligen LC-UV/DOC-Chromatogramm integriert, aufsummiert und über die Kalibrierung der absolute DOC-Gehalt nach der Säule ermittelt. Dieser wurde dann mit dem DOC-Gehalt ins Verhältnis gesetzt, der durch eine Messung ohne SEC-Säule (Bypass-Messung) bestimmt wurde. Die Bypass-Messung gibt den maximal möglichen DOC-Gehalt (100%) vor, da dort keine Verluste durch starke (irreversible) Wechselwirkungen von organischen Anteilen in der Probe mit dem Säulenmaterial der SEC-Säule auftreten können.

Die cDOC der in dieser Arbeit mit LC-UV/DOC gemessenen FS-Isolate sind in Abbildung 4.33 dargestellt. Zum Vergleich sind auch die cDOC der HS-Isolate (soweit verfügbar) gegenübergestellt. Die cDOC-Anteile zeigen sowohl deutliche Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Huminstoff-Fraktionen (FS und HS) einer Probe als auch innerhalb einer Fraktion zwischen den Proben.

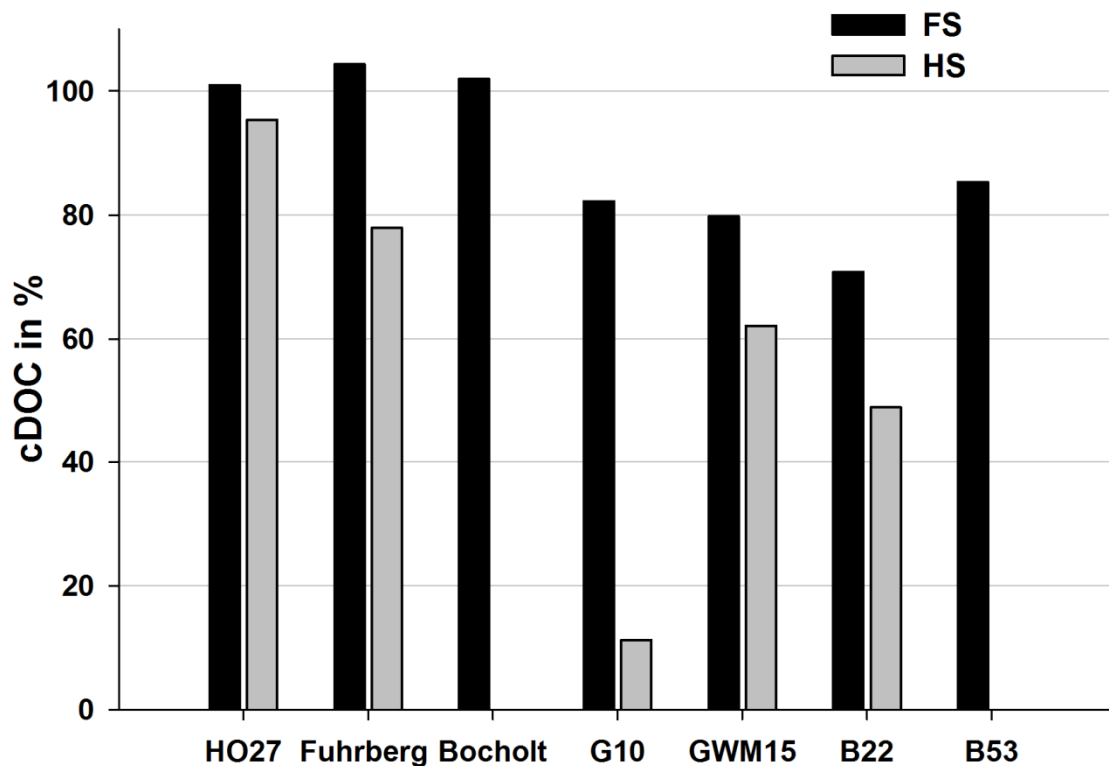


Abbildung 4.33: cDOC (in %) bei den in dieser Arbeit mit LC-UV/DOC gemessenen FS- und HS-Isolaten. Für das Grundwasser aus Bocholt und die Abstromprobe aus dem Aquifer in Stuttgart (B53) standen keine HS-Isolate zur Verfügung.

Die Wiederfindungsraten des DOC (cDOC in %) der FS-Isolate der anthropogen weitgehend unbelasteten (Grund)Wässer sind mit 101% (HO27), 104% (Fuhrberg) und 102% (Bocholt) sehr gut. Das LC-UV/DOC-Chromatogramm gibt in dieser Hinsicht ein repräsentatives Bild des injizierten DOC der Proben wieder. Die FS-Isolate aus den kontaminierten Bereichen und aus dem Abstrom der kontaminierten Aquifere zeigen etwas geringere Wiederfindungsraten zwischen 71% und 85% (G10: 82%, GWM15: 80%, B22: 71%, B53: 85%). Die dabei geringste Wiederfindungsrate beim FS-Isolat aus dem kontaminierten Bereich des Aquifers in Stuttgart (B22 FS) war zu erwarten, da schon das LC-UV/DOC Chromatogramm auf stark hydrophobe Substanzen hingewiesen hat (siehe Abbildung 4.30 A in Kapitel 4.4.2.1). Trotz der Verluste von bis zu 30% geben die LC-UV/DOC-Chromatogramme der FS-Isolate aus den kontaminierten Aquiferen aber immer noch ein recht repräsentatives Bild des injizierten DOC wieder.

Ganz anders sieht es zum Vergleich bei den HS-Fractionen aus (Abbildung 4.33). Dort sind mit Wiederfindungsraten von 62% (GWM15), 12% (G10) und 49% (B22) sehr große Verluste zu erkennen. Bei den drastisch niedrigen Wiederfindungsraten bei G10 ist zu vermuten, dass es sich dabei um sehr hydrophobe organische Stoffe aus der Teerölphase selber handelt. Diese sind wohl bei der Huminstoffanreicherung mit angereichert worden und dann ist ein großer Teil mit der HS-Fraktion ausgefallen (siehe Kapitel 4.4.1). Generell sind im Vergleich zwischen FS- und HS-Fractionen die größeren Verluste eher in den HS-Fraktion

zu erwarten, da diese aufgrund der operationellen Definition bei der Huminstoffanreicherung unpolarer ist und größere Molekulargewichte aufweist (siehe Kapitel 2.5).

Was bedeuten die Ergebnisse für die Untersuchung von Huminstoff-Isolaten aus kontaminierten Aquiferen?

Von den anthropogen in den Aquifer eingetragenen Schadstoffen scheint ein Teil schon bei der Huminstoffanreicherung durch irreversible Adsorption an der XAD8-Säule verloren zu gehen (siehe Abbildung 4.26) und ein anderer Teil reichert sich in der HS-Fraktion an. Dieser Teil führt dann zu den extrem niedrigen Wiederfindungsraten bei den LC-UV/DOC-Messungen in der HS-Fraktion durch irreversible Adsorption an der SEC-Säule. In der FS-Fraktion hingegen reichern sich neben den natürlichen FS wohl eher die Metabolite an, die aufgrund ihrer höheren Polarität sowohl weniger irreversible Wechselwirkungen mit der XAD8-Säule bei der Anreicherung als auch mit der SEC-Säule bei den LC-UV/DOC-Messungen eingehen. Dies spiegelt sich in deutlich höheren Wiederfindungsraten wieder (Abbildung 4.33). Die Ergebnisse zeigen, dass LC-UV/DOC-Chromatogramme von FS aus kontaminierten Aquiferen ein repräsentatives Bild des injizierten DOC wiedergeben, wo hingegen Chromatogramme von HS-Fraktionen teilweise nur noch einen Bruchteil des DOC zeigen.

Oxidierbarkeit des DOC

Zusätzlich zu dem bereits diskutierten DOC-Verlusten durch "irreversible" Adsorption von DOC-Anteilen an der SEC-Säule spielen auch die Oxidationsausbeuten des DOC im Gräntzel-Dünnschichtreaktor im Hinblick auf die Repräsentativität des bei der LC-UV/DOC gemessenen DOC eine Rolle.

Schlechte Oxidierbarkeit von organischen Inhaltsstoffen lässt sich generell als zusätzlicher Verlust des tatsächlichen DOC in einer Probe nicht vernachlässigen. Dies konnte z.B. von Lankes et al. (2009) deutlich gezeigt werden, die bei unterschiedlichen Fraktionen von Oberflächengewässern Verluste des DOC bei LC-UV/DOC-Messungen von bis zu 70% aufgrund geringer Oxidationseffizienz nachwiesen. Mit dem gemessenen DOC des Bypasses lassen sich zwar, wie bereits diskutiert, DOC-Verluste durch irreversible Wechselwirkungen abschätzen, der Anteil nicht oxidiertes DOC-Komponenten ist aber damit nicht zu ermitteln. Besonders da zur Kalibrierung des DOC Kaliumhydrogenphthalat als Standard verwendet wird, das sehr leicht zu oxidieren ist. Dieser Stoff ist für schwer oxidierbare Moleküle mit größerer innerer Bindungsenergie nur bedingt als Standard geeignet (Aiken et al. 2002). Eine mögliche Alternative wäre die Verwendung eines anderen Standards, dessen Oxidationsausbeute in der Größenordnung der entsprechenden organischen Substanzen liegt. Bei der großen Variabilität an Substanzen die in natürlichem und anthropogenem DOC vorkommen, ist die Wahl eines geeigneten Standards allerdings unmöglich. Für ausgewählte FS-Isolate durchgeführte Vergleichsmessungen des DOC mit der Oxidationsmethode, die auf thermo-katalytische Oxidation beruht (siehe Kapitel 3.3.4), zeigten jedoch ähnliche DOC-Konzentrationen wie bei der LC-UV/DOC (im Bypass) mit photochemischer Oxidation. Das deutet darauf hin, dass die Oxidationsausbeute bei den LC-UV/DOC-Messungen der FS-Isolate recht gut war und ein repräsentatives Bild des injizierten DOC zeigen.

4.4.3 Charakterisierung des DOC mit massenspektrometrischen Techniken

Da es sich beim DOC um ein komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Substanzen handelt, sind massenspektrometrische Screening-Methoden deutlich besser zur Charakterisierung geeignet als die Einzelstoffanalytik. Im Rahmen der Arbeit wurden folgende Probenarten untersucht:

- FS-Isolate aus dem kontaminierten Aquifer in Stuttgart
- Wasserproben aus dem kontaminierten Aquifer in Düsseldorf

Bei den Huminstoff-Isolaten lag der Fokus auf der Analytik der FS-Isolate, da sie sich mit der eingesetzten ESI durch ihr geringeres Molekulargewicht und ihre höhere Polarität besser ionisieren lassen als HS-Isolate. Da die ESI eine "sanfte" Ionisierungsmethode ist, die vorwiegend die Bildung von Molekül-Ionen begünstigt, können damit die intakten Moleküle in den Huminstoff-Isolaten auf molekularer Ebene untersucht werden (These 2005).

Allgemein stand der Vergleich von Proben aus kontaminierten und nicht kontaminierten Bereichen der Aquifere im Vordergrund der Arbeit. Die massenspektrometrische Charakterisierung von natürlichem anthropogen kaum beeinflusstem DOC mittels hochauflösender Massenspektrometrie hingegen ist in anderen Arbeiten bereits eingehend durchgeführt worden (siehe Kapitel 2.5.3 sowie Stenson et al. 2003, These 2005, Hertkorn et al. 2008).

Die bereits in Kapitel 4.1.1.2 diskutierten tandem-massenspektrometrischen Messungen mittels NLS der FS-Isolate aus dem Aquifer in Stuttgart (Kapitel 4.1.1.2) zeigten intensive Signale im kontaminierten Bereich (B22 FS) und kaum Signale im Abstrombereich (B53 FS). Die Signale in B22 FS konnten größtenteils sauren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten zugeordnet werden (Kapitel 4.1.1.3). Die durchgeführten NLS zeigen aber nur ein eingeschränktes Bild der gesamten anthropogenen Beeinflussung der Isolate, da durch die Auswahl der NLS ($\Delta m/z = 44$ und $\Delta m/z = 116$) ausschließlich nach sauren Metaboliten mit Säure- und/oder Bernsteinsäuregruppen an einem stabilen Rest gescreent wurde. Metabolite mit anderen Strukturen (z.B. mit Hydroxyl-Gruppen) sowie die ursprünglichen Schadstoffe wurden nicht erfasst. Die Stärke dieses Screenings zur Ermittlung von strukturähnlichen Metaboliten-Familien ist in diesem Fall zur Untersuchung der gesamten anthropogenen Beeinflussung des DOC eine Einschränkung.

Zur Ermittlung eines etwas umfassenderen Bildes des DOC der Proben wurden sie mit hochauflösender LC-ESI-QTOF-MS gemessen (siehe Kapitel 3.3.2) und über die akkuraten Massen die Summenformeln der intensivsten Peaks ermittelt (siehe Kapitel 3.3.2.1). Da es aufgrund der Vielzahl der organischen Moleküle im DOC nahezu unmöglich ist die Molekülstrukturen aller Substanzen zu ermitteln, wurden die Ergebnisse mittels Van-Krevelen-Diagramme miteinander verglichen. Diese stellen eine gute graphische Möglichkeit dar, komplexe Stoffgemische zu charakterisieren und Systematiken (z.B. homologe Reihen) herauszufinden (Van Krevelen 1950, Kim et al. 2003).

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass die Messungen zwar einen deutlich umfassenderen Einblick in die Zusammensetzung des DOC als z.B. NLS geben, aber immer noch nur ein Teil des DOC in der Probe widerspiegeln. Zum einen geht ein Teil dadurch

verloren, dass er sich nicht mit ESI ionisieren lässt. Einige DOC-Anteile wie z.B. aromatische Schadstoffe (z.B. BTEX oder PAK) werden mit der ESI nicht erfasst. Zum anderen schränken natürlich die zur Extraktion der Summenformeln getroffenen Einstellungen die Ergebnisse etwas ein (z.B. Massenbereich, zugelassene Elemente, siehe Kapitel 3.3.2.1).

Um die für diese Arbeit interessanten Bereiche im Van-Krevelen-Diagramm herauszufinden, die die anthropogene Beeinflussung des DOC zeigen, wurden zunächst typische aromatische und heterozyklische Schadstoffe in Teerölen (siehe Abbildung 2.1 in Kapitel 2.1) und potentielle saure Metabolite (siehe Tabelle A.7 im Anhang) in einem Diagramm aufgetragen (Abbildung 4.34). Dabei wurde Folgendes deutlich:

- Die aromatischen und heterozyklischen Schadstoffe liegen alle bei H/C-Verhältnissen zwischen 0,67 und 1,25 und überwiegend bei O/C-Verhältnissen von 0. Lediglich die sauerstoffhaltigen heterozyklischen Verbindungen wie Benzofuran und Dibenzofuran zeigen höhere O/C-Werte. Dies ist nicht verwunderlich, da es sich bei den aromatischen Schadstoffen (z.B. BTEX und PAK) um stark ungesättigte aromatische Strukturen ohne funktionelle Gruppen handelt, die ausschließlich aus den Atomen Kohlenstoff und Wasserstoff aufgebaut sind. Dabei ist zu bemerken, dass es sich nur um theoretische Ergebnisse handelt, da die aromatischen Schadstoffe bei tatsächlich gemessenen Proben im Van-Krevelen-Diagrammen gar nicht auftauchen würden, da (wie bereits angesprochen) sie mit ESI gar nicht ionisiert werden würden. Deutlich wichtiger für diese Arbeit sind deren Metabolite.
- Der typische Bereich der aromatischen und heterozyklischen Metabolite liegt bei folgenden Verhältnissen (siehe grau markierter Bereich in Abbildung 4.34): H/C: 0,60-1,40, O/C: 0,15-0,40. Dabei zeigen die Metabolite durch den mikrobiellen Einbau von funktionellen Gruppen (z.B. Säure- und Bernsteinsäure-Gruppen) höhere O/C-Werte als die Schadstoffe. Die H/C-Verhältnisse sind jedoch ähnlich, da die aromatischen und heterozyklischen (ungesättigten) Strukturen der Schadstoffe in diesen Metaboliten erhalten geblieben sind. Denn hierbei handelt sich um sehr spezifische Metabolite, die weitgehend am Beginn des Abbaupfades der jeweiligen Schadstoffe stehen und somit noch sehr viel von deren ursprünglicher Struktur aufweisen (siehe Kapitel 2.3.2.1).

Die Auftragung der potentiellen Metabolite führte somit zur Ermittlung eines typischen Bereiches für aromatische und heterozyklische Metabolite im Van-Krevelen-Diagramm, der die Suche nach diesen Abbauprodukten in Zukunft erleichtern kann.

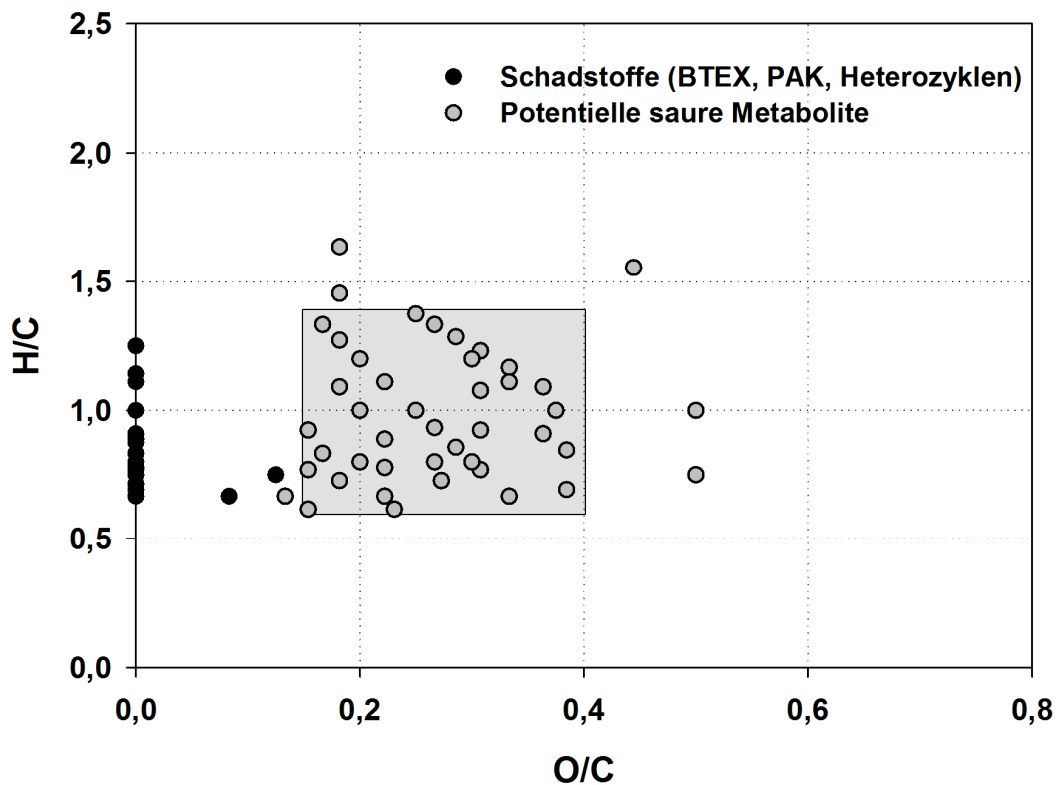


Abbildung 4.34: Van-Krevelen-Diagramm mit typischen aromatischen und heterozyklischen Schadstoffen in Teeröl (siehe Abbildung 2.1 in Kapitel 2.1) und potentiellen sauren Metaboliten (Suspects, siehe Tabelle A.7 im Anhang). Die graue Fläche markiert den ermittelten typischen Bereich für saure aromatische und heterozyklische Metabolite im Van-Krevelen-Diagramm.

Bevor detailliert auf die Van-Krevelen-Diagramme der FS-Isolate aus dem kontaminierten Aquifer in Stuttgart und der Wasserproben aus dem kontaminierten Aquifer in Düsseldorf eingegangen wird, werden noch wichtige Festlegungen und Beobachtungen angesprochen:

- Es sind nicht alle der ursprünglich mit MFE ermittelten 100 intensivsten Peaks in die Abbildungen eingegangen, da
 - einige die festgelegten Qualitätskriterien (Kapitel 3.3.2.1) nicht erfüllt haben (Massenabweichung < 3 ppm und Score > 80), unplausible Summenformeln aufwiesen oder
 - die Software für einige Peaks keine Summenformeln generieren konnte. Das könnte daran liegen, dass bei diesen Substanzen die Auflösung des Gerätes nicht ausreichte, um zuverlässige Summenformeln zu erzeugen.
- Einige Summenformeln sind mehrfach (mit verschiedenen RT) ermittelt worden, was für Substanzen mit gleicher Summenformel, aber unterschiedliche Strukturen spricht (z.B. Isomere). Aufgrund der identischen Summenformel tauchen diese Substanzen im Van-Krevelen-Diagramm natürlich nur als ein Punkt auf.

FS-Fractionen aus dem kontaminierten Aquifer in Stuttgart

Abbildung 4.35 zeigt den Vergleich der Summenformeln der intensivsten Peaks der FS-Fractionen aus dem kontaminierten Bereich (B22 FS) und dem Abstrom (B53 FS) aus dem Aquifer in Stuttgart. Eine detaillierte Auflistung der in die Abbildung 4.35 eingegangenen Summenformeln ist im Anhang zu finden (Tabelle A.8 und Tabelle A.9).

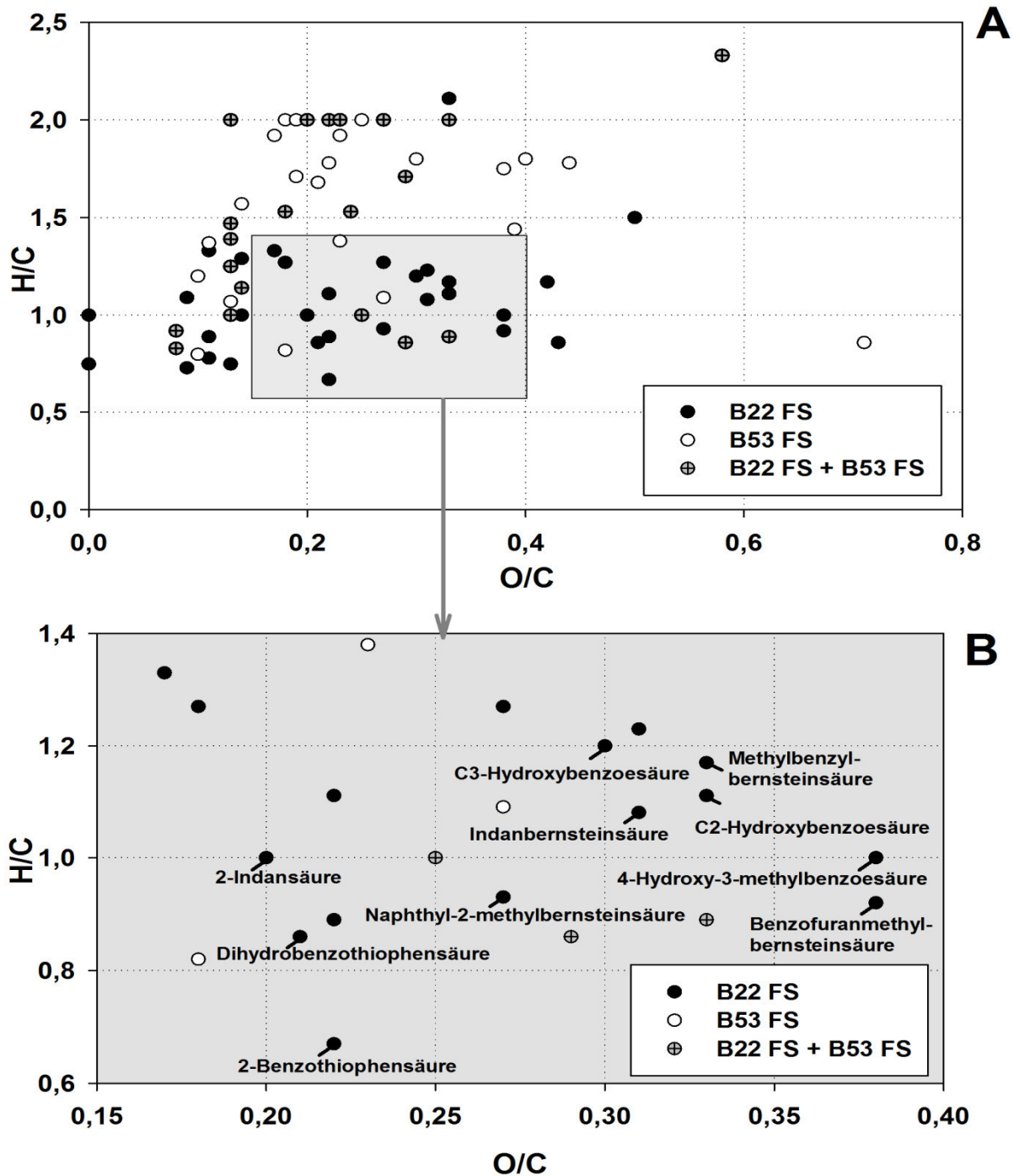


Abbildung 4.35: Van-Krevelen-Diagramme der intensivsten Peaks (LC-ESI-QTOF-MS-Messungen) in den FS-Isolaten aus dem kontaminierten Aquifer in Stuttgart: B22 FS: kontaminiertes Gebiet, B53 FS: Abstrombereich, B22 FS + B53 FS: Peaks die in beiden Bereichen vorkommen. Teil B zeigt den typischen Bereich für saure aromatische und heterozyklische Metabolite (siehe Abbildung 4.34) in dem die (weitgehend) identifizierten Metabolite in B22 FS (siehe Kapitel 4.1.1.3) den jeweiligen Punkten im Diagramm zugeordnet worden sind.

Die Verteilung der Substanzen im Van-Krevelen-Diagramm des Aquifers in Stuttgart zeigt deutliche Unterschiede zwischen der FS-Fraktion des kontaminierten Bereiches (B22 FS) und der des Abstrombereichs (B53 FS) (Abbildung 4.35 A). Die Verteilung der Punkte bei B53 FS liegt deutlich bei höheren H/C-Werten als bei B22 FS, wohingegen die O/C-Verhältnisse ähnlich sind. Das ist ein klarer Hinweis für Substanzen mit verstärkt aliphatischen Strukturen (eher H/C von 1,5 bis 2) im Abstrombereich und stärker ungesättigten aromatischen und heterozyklischen Strukturen (eher H/C von 0,6 bis 1,4) im kontaminierten Bereich. Diese Strukturen im kontaminierten Bereich sind wohl aus folgenden Gründen vor allem auf die Metabolite der Schadstoffe und nicht auf die anthropogen eingebrachten aromatischen und heterozyklischen Schadstoffe selber zurückzuführen:

- Während des Prozesses der Huminstoffanreicherung werden die unpolaren Schadstoffe (z.B. PAK) überwiegend "irreversibel" am XAD8-Harz adsorbiert oder sie finden sich in der HS-Fraktion wieder. Die polareren Metabolite hingegen reichern sich eher in der hier gemessenen FS-Fraktion an (siehe Kapitel 4.4.1).
- Wie bereits erwähnt lässt sich ein großer Teil der Schadstoffe (z.B. BTEX, PAK, Aliphaten) mit der ESI nicht ionisieren, so dass sie natürlich auch nicht im Van-Krevelen-Diagramm auftauchen können. Einzelne heterozyklische Verbindungen (z.B. Benzothiophen) konnten aber gefunden werden.

Ein detaillierte Untersuchung des für aromatische und heterozyklische Metaboliten ermittelten typischen Bereichs von $H/C = 0,60-1,40$ und $O/C = 0,15-0,40$ zeigt das Auftreten von Peaks vornehmlich in B22 FS in diesem Bereich (siehe Abbildung 4.35 B). Einige dieser Peaks konnten typischen Metaboliten zugeordnet werden, die im Rahmen dieser Arbeit bereits (weitgehend) identifiziert worden sind (siehe Kapitel 4.1.1.3). Im FS-Isolat des Abstrombereichs (B53 FS) hingegen konnten in diesem Bereich deutlich weniger Peaks gefunden werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass saure aromatische und heterozyklische Metabolite unter den intensivsten Peaks des kontaminierten Bereichs zahlreich zu finden sind und somit ein Einfluss dieser Metabolite auf die Verteilung der Peaks im Van-Krevelen-Diagramm bzw. auf die Zusammensetzung des DOC dieser FS-Isolate zur erkennen ist.

Wie bereits angesprochen wird der Abstrombereich (B53 FS) eher durch aliphatischere Strukturen geprägt, was sich durch die Summenformeln im H/C-Bereich von 1,5 bis 2,0 (bei einem O/C von 0 bis 0,45) widerspiegelt (siehe Abbildung 4.35 A). Es handelt sich um Substanzen, die vorwiegend aus den Atomen Kohlenstoff, Wasserstoff und Sauerstoff aufgebaut sind (Tabelle A.9 im Anhang). Die eher aliphatischeren Strukturen deuten auf einen "natürlichen" Background an FS hin, der sich durch einen geringeren Anteil an ungesättigten aromatischen Strukturen im Vergleich zu den angesprochenen Schadstoffen und Metaboliten auszeichnen (z.B. Leenheer et al. 2001, These 2005, Reemtsma et al. 2006). Dies führt zu etwas höheren H/C-Verhältnissen. Zur Absicherung der Hypothese, dass es sich um einen Background an "natürlichen" FS handelt, wäre die Messung eines FS-Isolats aus dem Zustrom des Aquifers notwendig, was aber nicht zur Verfügung stand. Somit kann ein anthropogener Ursprung dieser aliphatischen Strukturen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Aliphatische niedermolekulare Säuren (wie z.B. Essigsäure, Propansäure etc.), die z.B. am

Ende der mikrobiellen Abbaupfade von aromatischen und heterozyklischen Schadstoffen stehen (McMahon und Chapelle 1990, Cozzarelli et al. 1994, Reineke 2001) könnten es aber nicht sein. Die genaue Betrachtung der entsprechenden Summenformeln in diesem Bereich (H/C-Bereich von 1,5 bis 2) zeigt, dass es sich vorwiegend um höhere Molekulargewichte handelt die eine mittlere Masse (m/z) von etwa 240 aufweisen.

Wasserproben aus dem kontaminierten Aquifer in Düsseldorf

Die Ergebnisse des Aquifers Stuttgart zeigen auch nur einen Ausschnitt des DOC der Ausgangsprobe, da hier isolierte FS-Fractionen gemessen wurden. Vorteil dieser Fractionen ist aber, dass die Substanzen im DOC in dieser Fraction durch die Huminstoffanreicherung stark angereichert sind und sich die sauren Metabolite eher in dieser Fraction als in der HS-Fraction wiederfinden werden. Im Gegensatz dazu wurden vom Aquifer in Düsseldorf Grundwasserproben gemessen, die nicht vorher angereichert oder fraktioniert wurden. Damit sollte die Zusammensetzung des kompletten unbehandelten DOC analysiert werden. Abbildung 4.36 zeigt beispielhaft den Vergleich einer Probe aus dem oberen Rand (C33, 6,63 m Tiefe) und unterhalb (E1, 7,74 m Tiefe) der BTEX-Schadstofffahne aus dem HR-MLW. Die Auflistung der der Abbildung 4.36 zugrundeliegenden intensiven Peaks ist im Anhang in Tabelle A.10 und Tabelle A.11 zu finden.

Im kontaminierten Bereich (C33) sind wieder (wie bei B22 FS aus Stuttgart) verstärkt Substanzen mit H/C-Verhältnissen von 0,6 bis 1,4 zu finden, was auf stärker ungesättigte aromatische und heterozyklische Strukturen wie Metaboliten von Aromaten und Heterozyklen hinweist. Dort konnten auch wieder zahlreiche dieser Metabolite in dem für aromatische und heterozyklische Metabolite typischen Bereich (H/C = 0,60-1,40 und O/C = 0,15-0,40) zugeordnet werden (Abbildung 4.37 B).

Bei der Probe aus dem weitgehend unkontaminierten Bereich unterhalb der BTEX-Schadstofffahne (E1) fällt auf, dass nur relativ wenige der ursprünglich ermittelten 100 intensivsten Peaks in die Abbildung 4.37 eingegangen sind (Tabelle A.7 im Anhang). Viele Peaks erfüllten die festgelegten Qualitätskriterien nicht und zeigten Massenabweichungen deutlich über 3 ppm und Scores deutlich unter 80. Dies lässt sich auf die niedrigen Intensitäten der Peaks zurückführen, die höhere Massenabweichungen und Probleme bei der Messung der Isotopenverhältnisse (niedriger Score) zur Folge hatte. Weiterhin wird in Abbildung 4.37 deutlich, dass die restlichen intensiven Peaks von E1 weitgehend H/C-Verhältnisse zwischen 1,5 und 2,0 zeigen was (wie bei B53 aus Stuttgart) verstärkt auf gesättigtere aliphatische Strukturen hinweist. Auffällig ist, dass ein Großteil dieser Peaks auch in C33 vorkommt, was auf einen "natürlichen" FS-Hintergrund hindeuten könnte.

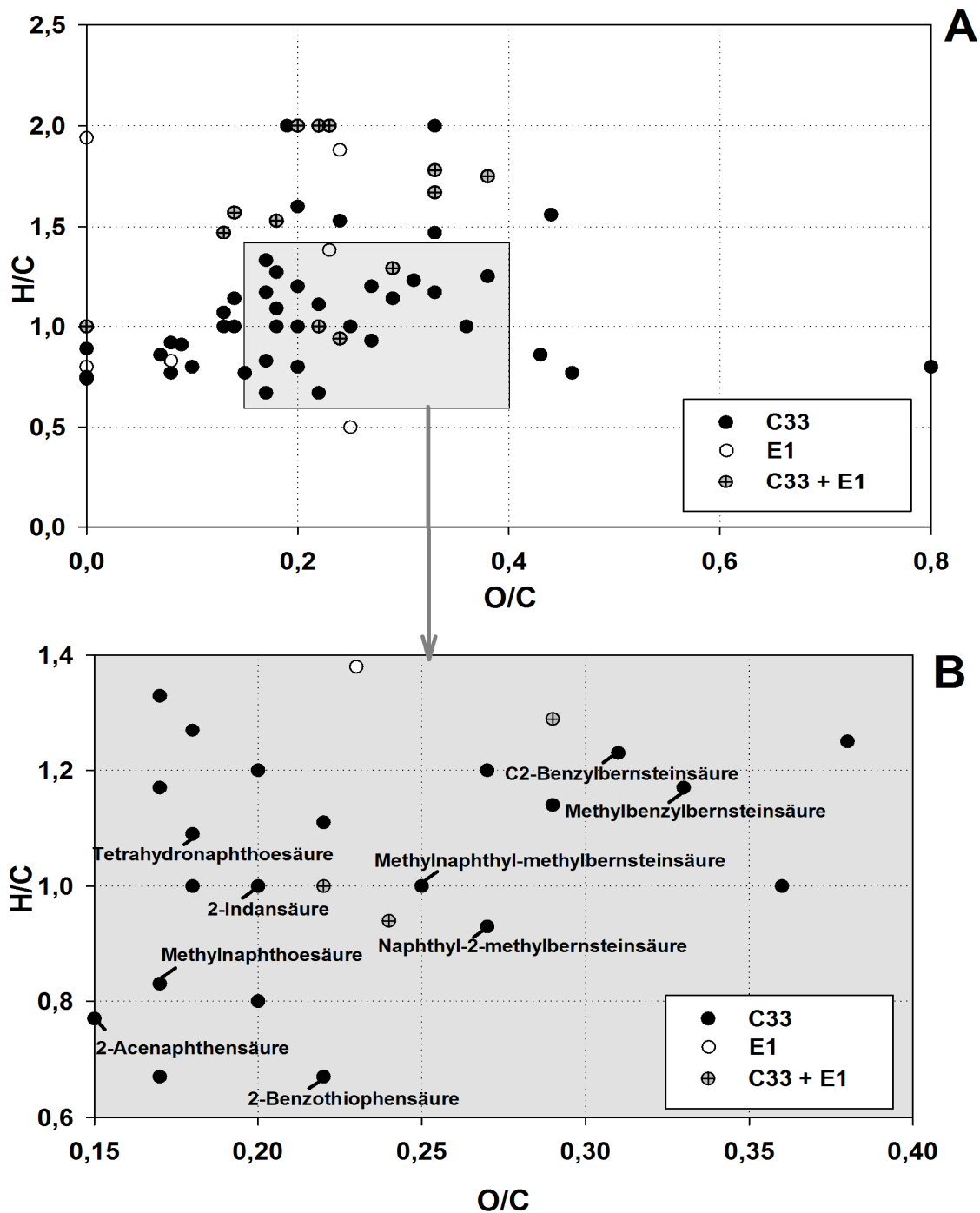


Abbildung 4.36: Van-Krevelen-Diagramme der intensivsten Peaks (LC-ESI-QTOF-MS-Messungen) in Grundwasserproben aus dem kontaminierten Aquifer in Düsseldorf: C33: Oberer Rand der Schadstofffahne, E1: Unterhalb der Schadstofffahne, C33 + E1: Peaks, die in beiden Proben gefunden wurden. Teil B zeigt den typischen Bereich für saure aromatische und heterozyklische Metabolite in dem die in Kapitel 4.1.2 (weitgehend) identifizierten Metabolite in C33 den Punkten im Diagramm zugeordnet worden sind.

Zusammengefasst führten die in diesem Kapitel diskutierte Charakterisierung des DOC aus kontaminierten Aquiferen (FS-Isolate und Grundwasserproben) mit massenspektrometrischen Techniken zu folgenden Ergebnissen und Schlussfolgerungen:

- Die hochaufgelösten massenspektrometrischen Messungen des DOC aus Aquiferen und die Auftragung der Summenformeln in Van-Krevelen-Diagrammen ergab klare

Unterschiede in der Verteilung der Peaks, also in der Zusammensetzung des DOC, zwischen kontaminierten und weitgehend unkontaminierten (Abstrom)Bereichen. Dies beruht darauf, dass die anthropogen eingetragenen aromatischen und heterozyklischen Schadstoffe und insbesondere ihre Metabolite durch ihre ungesättigteren gesättigten Strukturen weitgehend geringere H/C-Verhältnisse aufweisen als die Substanzen im "natürlichen" DOC (vor allem FS). Diese geringeren H/C-Verhältnisse dominieren die kontaminierten Bereiche. Die Unterschiede konnten in 2 verschiedenen Probenarten (FS-Isolate und Grundwasserproben) und Aquiferen (Stuttgart und Düsseldorf) nachgewiesen werden.

- Die Auftragung der in der Literatur bekannten saurer Metaboliten von Aromaten und Heterozyklen ergab einen typischen Bereich für sie im Van-Krevelen-Diagramm (H/C-Verhältnisse von 0,60-1,40 und O/C-Verhältnissen von 0,15-0,40). In diesem Bereich konnte eine Vielzahl von den in Kapitel 4.1 (weitgehend) identifizierten Metaboliten in Proben aus kontaminierten Bereichen (B22 FS, C 33) Punkten im Diagramm zugeordnet werden. Die Analyse dieses Bereiches ist somit sehr gut geeignet, um gezielt nach sauren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten in zukünftigen Analysen zu suchen.

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen (Kapitel 4.4)

- Der DOC aus kontaminierten Bereichen in Aquiferen zeigt eine deutliche anthropogene Beeinflussung, die sowohl bei der Kohlenstoffbilanz der Huminstoffanreicherung als auch bei der Charakterisierung durch LC-UV/DOC und (hochauflösende) massenspektrometrische Messungen zu erkennen war:
 - Die Kohlenstoffbilanz war charakterisiert durch deutliche Verluste des DOC, der sich durch irreversible Adsorption von sehr unpolaren Substanzen an der XAD8-Säule erklären lässt. Die Verluste werden überwiegend durch die sehr unpolaren Schadstoffe (z.B. BTEX, PAK) verursacht worden sein, da die Metabolite durch ihre funktionellen Gruppen eine höhere Polarität aufweisen.
 - Die LC-UV/DOC-Messungen zeigten einen großen Anteil des DOC mit stark hydrophoben Wechselwirkungen an, der sich in irreversibler Adsorption an (vor allem HS-Fractionen) oder verspäteter Elution (nach V_P) von (vor allem FS-Fractionen) der SEC-Säule widerspiegelten. Der DOC mit verspäteter Elution wird wohl vor allem durch aromatische und heterozyklische Metabolite gebildet, die zwar polarer sind als die (Ausgangs)Schadstoffe, aber immer noch einen großen Anteil hydrophober (ungesättigter) Strukturen besitzen.
 - Die Van-Krevelen-Diagramme der intensivsten Peaks aus den (hochauflösenden) massenspektrometrischen Messungen der Proben aus den kontaminierten Bereichen wiesen ein verstärktes Auftreten von Summenformeln mit geringeren H/C-Verhältnissen auf von denen viele sauren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten zugeordnet werden konnten.

Die Anwendung der speziellen analytischen Techniken (LC-UV/DOC, Massenspektrometrie) konnte somit erfolgreich die anthropogene Beeinflussung des DOC in kontaminierten Bereichen qualitativ nachweisen.

- Im DOC aus weitgehend unkontaminierten (Abstrom)Bereichen konnte keine anthropogene Beeinflussung durch hydrophobe Schadstoffe und deren Metabolite nachgewiesen werden. Es zeigten sich weder hohe Verluste bei den Kohlenstoffbilanzen noch starke hydrophobe Wechselwirkungen bei den LC-UV/DOC-Messungen. Auch die Van-Krevelen-Diagramme zeigten Verteilungen mit stärker aliphatischen Strukturen wie sie von "natürlichen" FS zu erwarten sind. Von einer relevanten Beeinflussung des DOC durch z.B. saure Metaboliten im Abstrombereich ist somit nicht auszugehen.
- Mit dem ermittelten charakteristischen Bereich für saure aromatische und heterozyklische Metabolite im Van-Krevelen-Diagramm konnte in den Proben gezielt und erfolgreich nach Metaboliten in den Daten der massenspektrometrischen Messungen gesucht werden. Die Verwendung dieses Bereiches kann in zukünftigen hochaufgelösten massenspektrometrischen Messungen die Suche nach (unbekannten) Metaboliten deutlich erleichtern.

5. Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Die Verschmutzung des Grundwassers mit organischen Schadstoffen (z.B. Aromaten und Heterozyklen) und die daraus resultierende Gefährdung der Trinkwasserressourcen ist ein häufiges und weltweites Problem. Eine aktive Sanierung der Schadensbereiche ist aufgrund der Anzahl und Fläche logistisch und finanziell nicht möglich, so dass verstärkt der passive Ansatz der natürlichen Schadstoffminderungsprozesse (*Natural Attenuation*, NA) diskutiert und angewendet wird. Er basiert auf der Fähigkeit der im Aquifer vorkommenden Mikroorganismen, Schadstoffe *in situ* abzubauen. Aufgrund des begrenzten Angebots an Sauerstoff im Grundwasser wegen geringer Nachlieferung durch den Boden und starker Zehrung durch mikrobielle Abbauprozesse spielt dabei insbesondere der anaerobe mikrobielle Abbau eine wichtige Rolle. Die Anwendung des NA-Ansatzes bedarf einer sehr guten Überwachung und Erforschung, um den Erfolg des Schadstoffabbaus zu dokumentieren. Die Analytik spezifischer mikrobieller Abbauprodukte (Metabolite) ist dafür sehr gut geeignet, da sehr selektiv der Abbau bestimmter Schadstoffe zuverlässig nachgewiesen werden kann. Grundlage dieses Ansatzes ist, dass bestimmte biochemische und cometabolische Wege des anaeroben mikrobiellen Abbaus spezifische Metabolite bilden. Die Aktivierung von reaktionsarmen aromatischen und heterozyklischen Schadstoffstrukturen erfolgt dabei häufig durch den mikrobiellen Einbau von (sauren) funktionellen Gruppen (z.B. Carboxyl- oder Bernsteinsäuregruppen). Die Kenntnis dieser mikrobiellen Abbauprozesse und der dabei entstehenden Metabolite sowie sensitive und selektive analytische Messmethoden sind entscheidend für eine erfolgreiche Anwendung der Metabolitenanalytik. Durch die Identifizierung von bisher unbekanntem Metaboliten kann sie aber auch einen wichtigen Beitrag zur Aufdeckung neuer Abbauprozesse und/oder dem Abbau weiterer Schadstoffe leisten. Zur gezielten Nutzung der Metaboliten als Indikatoren des Schadstoffabbaus bedarf es der intensiven Erforschung ihres Auftretens, der (quantitativen) Zusammenhänge zum Ausgangsschadstoff sowie ihrer Rolle im Grundwasser.

Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Auftretens spezifischer saurer Metabolite aromatischer und heterozyklischer Schadstoffe im Aquifer und unter definierten Milieubedingungen im Laboratorium. Der Schwerpunkt lag dabei auf den entsprechenden Carbon- und Bernsteinsäuren, die typische Abbauprodukte des anaeroben mikrobiologischen Abbaus sind. Daher sollten verschiedene massenspektrometrische Messtechniken optimiert und angewendet werden, um eine gezielte Analytik zur Suche, Identifizierung und zur Quantifizierung dieser Metabolite zu gewährleisten. In Labor-Experimenten mit einer eisenreduzierenden Bakterienkultur sollte beim anaeroben Abbau von Toluol die quantitative Bildung von Metaboliten unter definierten Bedingungen untersucht sowie (cometabolische) Abbau- und Hemmprozesse in Schadstoffgemischen erforscht werden.

Die Analyse von verschiedenen Grundwässern aus kontaminierten Aquiferen hatte das Ziel, Metaboliten zu identifizieren sowie deren räumliche Verteilung quantitativ aufzudecken. Damit sollte die Eignung der Metaboliten als qualitative und quantitative Indikatoren des Schadstoffabbaus sowie für mikrobiologisch aktive Zonen im Aquifer untersucht werden. Um einen umfassenden Überblick über die anthropogene Beeinflussung von Aquiferen durch Schadstoffe und Metabolite zu bekommen sollte der gesamte gelöste organische Kohlenstoff aus Grundwässern isoliert und charakterisiert werden.

Zur Erreichung der angesprochenen Ziele wurden folgende grundlegende Arbeitsschritte durchgeführt:

- I. Entwicklung, Optimierung und Anwendung massenspektrometrischer Methoden zur Analytik saurer Metaboliten (Screening, Identifizierung und Quantifizierung).
- II. Untersuchung der Metabolitenbildung beim anaeroben Abbau von Toluol und dem Auftreten von Cometaboliten und Hemmeffekten in Schadstoffgemischen unter definierten Milieubedingungen mit dem eisenreduzierenden Modellorganismus *Geobacter toluenoxydans* TMJ1.
- III. Erforschung der Eignung spezifischer saurer Metabolite als qualitative und quantitative Indikatoren des Schadstoffabbaus.
- IV. Untersuchung des Transports spezifischer saurer Metabolite in den Abstrom sowie deren Funktion als Elektronendonatoren.
- V. Erforschung des anthropogenen Anteils am gelösten organischen Kohlenstoff (DOC) in kontaminierten Aquiferen.

Die Ergebnisse dieser Arbeitsschritte werden im Folgenden dargestellt.

Ergebnisse

I. Analytik saurer aromatischer und heterozyklischer Metabolite

Durch die Kombination verschiedener massenspektrometrische Messtechniken (LC-ESI-MS/MS, LC-ESI-QTOF-MS) konnte erfolgreich nach sauren aromatischen, bityklischen und heterozyklischen Metaboliten in verschiedenen Aquiferen und Probenarten (Grundwasser, Huminstoffe) gesucht und eine Vielzahl identifiziert werden. Insbesondere das gruppenspezifische Screening mittels Neutral-Loss-Scans (LC-ESI-MS/MS) gewährleistete dabei zum ersten Mal eine sehr selektive Suche nach sauren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten mit Carboxyl- (mit $\Delta m/z = 44$) oder Bernsteinsäuregruppe (mit $\Delta m/z = 116$). Zur Identifizierung der Metaboliten spielten neben den Summenformeln aus gemessenen akkuraten Massen vor allem Fragmentspektren aus LC-ESI-QTOF-MS- (hochaufgelöste Spektren), LC-ESI-MS/MS- und auch GC-MS-Messungen sowie der anschließende Abgleich mit (strukturähnlichen) Standards und die Nutzung von in-silico Fragmentierung eine entscheidende Rolle.

Neben den anaeroben Metaboliten der BTEX, PAK und Heterozyklen wie z.B. Benzylbernsteinsäure, Naphthyl-2-methylbernsteinsäure, 2-Naphthoesäure, 5-Acenaphthensäure, 2-Benzofuransäure oder 2-Benzothiophensäure wurden mit 4-Hydroxy-3-

methylbenzoesäure und 2-Indansäure auch spezifische Metabolite von bicyklischen und phenolischen Schadstoffen eindeutig identifiziert. Zusätzlich konnten mit der weitgehenden Identifizierung von Methylnaphthyl-2-methylbernsteinsäure, Benzofuranmethylbernsteinsäure, Benzothiophenmethylbernsteinsäure und Methylbenzothiophensäure bisher kaum oder überhaupt noch nicht im Feld gefundene Metabolite im Aquifer nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit ermittelten hochaufgelösten Fragmentspektren stellen einen wichtigen Schritt für die Nutzung von LC-ESI-QTOF-MS-Spektren zur Identifizierung von sauren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten in zukünftigen Studien dar. Die in der Literatur publizierten Fragmentspektren basieren immer noch weitgehend auf GC-MS-Messungen obwohl die LC-MS die deutlich geeignetere Messtechnik für diese Substanzen ist. Die Entwicklung einer LC-ESI-MS/MS-Methode (Multiple Reaction Monitoring) gewährleistete eine sensitive und selektive Quantifizierung relevanter saurer Metabolite in Grundwasserproben. Damit konnten räumliche Konzentrationsunterschiede im Aquifer aufgedeckt und die (quantitative) Indikatorfunktion der Metabolite untersucht werden.

Die entwickelten analytischen Messmethoden bildeten eine entscheidende Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführten weiteren Untersuchungen zur Bildung, dem Auftreten und der Indikatorfunktion der Metabolite.

II. Anaerober Abbau und Metabolitenbildung unter definierten Milieubedingungen

Die Untersuchung des anaeroben Abbaus von Toluol unter definierten Milieubedingungen in Batch-Experimenten zeigte einen reproduzierbaren Abbau des Schadstoffs unter eisenreduzierenden Bedingungen durch die Bakterienkultur *Geobacter toluenoxydans* TMJ1. Durch die Detektion des Metaboliten Benzylbernsteinsäure (BBS) konnte die Fumarataddition als Aktivierungsschritt beim anaeroben Abbau des Toluols unter den gegebenen Bedingungen mit dieser Bakterienkultur nachgewiesen werden.

Die Zugabe von Mischungen strukturähnlicher aromatischer und heterozyklischer Schadstoffe (z.B. Xylole, Furan) hatte keine relevanten Hemmeffekte auf die mikrobielle Aktivität bzw. den Abbau des Schadstoffs Toluol. Selbst hohe Konzentrationen einzelner strukturähnlicher Stoffe führten nur zu einer verzögerten mikrobiellen Abbautätigkeit, aber zu keiner nachhaltigen Hemmung. Allein die Zugabe einer Teerölphase zeigte deutliche toxische Effekte, was auf die Vielzahl unterschiedlicher toxischer Substanzen in der Phase zurückzuführen ist. Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass auch in Schadstoffgemischen, die in kontaminierten Aquiferen häufig auftreten, ein anaerober biochemischer Abbau bestimmter Schadstoffe möglich ist. Eindeutige Hinweise für cometabolische Abbauprozesse konnten dabei über den Nachweis von Methylbenzylbernsteinsäure (MBBS), eines spezifischen anaeroben Abbauproduktes der Xylole, erbracht werden.

Die in den verschiedenen Batch-Experimenten aufgestellten Massenbilanzen zwischen dem anaeroben Metaboliten BBS und dessen Substrat Toluol zeigten einheitlich, dass BBS nur in geringen Konzentrationen von weniger als 1% des verbrauchten Toluols auftrat. Diese geringen Konzentrationen weisen auf eine geringe Akkumulation des Metaboliten durch z.B. geringes Ausscheiden aus den Bakterienzellen und/oder einen schnellen weiteren Abbau hin.

Die durchgeführten Batch-Experimente waren entscheidend in dieser Arbeit um cometabolische Abbauprozesse nachzuweisen und die quantitative Bildung des Metaboliten BBS im Verhältnis zum abgebauten Anteil des Schadstoffs zu untersuchen. Dies ist im Feld aufgrund der Komplexität der Einflussfaktoren und der Vielzahl an Bakterienkulturen nicht möglich.

III. Metabolite als Indikatoren für Abbau und mikrobiologische Aktivität

Mit dem Nachweis von unterschiedlichen Metaboliten aromatischer, bicyklischer und heterozyklischer Schadstoffe konnte in zwei Aquiferen mit verschiedenen Probenarten (Grundwasserproben und Huminstoff-Isolate) der mikrobielle Abbau dieser Schadstoffe qualitativ eindeutig gezeigt werden. Insbesondere die entsprechenden aromatischen und heterozyklischen Bernsteinsäuren eigneten sich dabei als exzellente spezifische qualitative Indikatoren des anaeroben Abbaus von z.B. Toluol, Xylol, (Methyl)Naphthalin, Benzothiophen oder Benzofuran. Mit der (weitgehenden) Identifizierung von Benzothiophenmethylbernsteinsäure und Benzofuranmethylbernsteinsäure konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal der Beweis *in situ* erbracht werden, dass die Fumarataddition auch ein wichtiger Aktivierungsschritt beim anaeroben Abbau von Heterozyklen im Aquifer ist. Eine Verwendung dieser Metabolite als Indikatoren des anaeroben Abbaus der Heterozyklen im Messprogramm zukünftiger Studien ist zu empfehlen.

Quantitative Zusammenhänge zwischen Metaboliten- und Schadstoffkonzentrationen konnten durch die Messung von sehr kleinräumigen Konzentrationsunterschieden durch eine hochaufgelöste Probenahme in einem Multi-Level-Brunnen untersucht werden. Die großen Unterschiede in den molaren Konzentrationsverhältnissen bei den verschiedenen Proben innerhalb (2 Größenordnungen) und zwischen den Metaboliten/Schadstoff-Paaren (4 Größenordnungen) zeigten jedoch, dass ein zuverlässiger Hinweis über den Grad des Abbaus des Schadstoffs über die Konzentrationen der jeweiligen Metabolite nicht möglich ist. Hohe Konzentrationsverhältnisse können aber Hinweise auf die Stabilität/Akkumulation der Metabolite bzw. auf (cometabolisch) gebildete "*Dead-End-Produkte*" liefern (z.B. 2-Benzothiophensäure, 5-Acenaphthensäure).

Die vertikalen Konzentrationsprofile der Metabolite BBS und MBBS zeigten die deutlich höchsten Konzentrationen und steile Gradienten an den Fahnenrändern ihrer Ausgangsschadstoffe Toluol und der Xylole. Diese Nachweise unterstützen eindeutig das *Plume Fringe Concept* was höchste mikrobielle Abbauaktivitäten an den Schadstoffrändern erwartet, wo gelöste Elektronendonatoren und Elektronenakzeptoren zusammentreffen. Sie konnten durch den Vergleich mit Ergebnissen von unabhängigen Messmethoden (Genmarker, Isotopenmethoden) aus anderen Studien abgesichert werden. Profile der Metabolite der PAK und Heterozyklen zeigten hingegen ihre Maxima weitgehend nicht an den Fahnenrändern (eher im Fahnenzentrum), was vermutlich auf höhere Sorptionstendenzen, zusätzliche Schadstoffquellen und andere komplexe Faktoren zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass die Nutzung der Metabolite als qualitative Indikatoren des Schadstoffabbaus im Feld ein exzellenter zuverlässiger Ansatz ist. Die Nutzung der Metabolite als quantitative Indikatoren für den Grad des Schadstoffabbaus sowie für Zonen höchster mikrobieller Abbautätigkeit ist aufgrund der Komplexität der

Einflussfaktoren sehr schwierig und scheint stark abhängig von den verschiedenen Schadstoffen und den Gegebenheiten im jeweiligen Aquifer zu sein. Hier besteht noch großer Forschungsbedarf.

IV. Transport saurer Metabolite und Nutzung als Elektronendonator

Die unterschiedlichen Messungen von Grundwasserproben und Fulvinsäure-Isolaten, die im Abstrom der Kontaminationen lagen, zeigten keine Hinweise auf relevante Konzentrationen an sauren Metaboliten von aromatischen und heterozyklischen Schadstoffen. Insgesamt scheinen diese Metabolite keinen relevanten Transport zu zeigen, bzw. sie werden im Bereich ihrer Bildung direkt weiter umgewandelt. Eine potentielle "Gefährdung" der Abstrombereiche durch diese Metabolite konnte also nicht nachgewiesen werden. Somit konnte auch die Hypothese, dass Metabolite aufgrund ihrer Polarität in größerem Umfang in Abstrombereiche transportiert und dort unter anderen Redoxbedingungen als Substrat (Elektronendonator) von Mikroorganismen genutzt werden können, nicht bestätigt werden.

V. Anthropogener Anteil am DOC

Um ein umfassenderes Bild der anthropogenen Beeinflussung zu bekommen, wurde der gesamte DOC von kontaminierten und Abstrombereichen aus Aquiferen angereichert (Huminstoffanreicherung) und charakterisiert. Der DOC aus kontaminierten Bereichen zeigte dabei eine deutliche anthropogene Beeinflussung, die sowohl bei der Kohlenstoffbilanz der Huminstoffanreicherung als auch bei der Charakterisierung der Fulvinsäure-Isolate durch Flüssigkeitschromatographie mit UV- und DOC-Detektoren (LC-UV/DOC) sowie mit hochauflösender Massenspektrometrie zu erkennen war. Die Kohlenstoffbilanzen zeigten sehr hohe Verluste des DOC durch irreversible Adsorption am XAD-Harz, die überwiegend auf die sehr unpolaren Schadstoffe wie z.B. die polyaromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) zurückzuführen sind. Bei den LC-UV/DOC Analysen der Fulvinsäure-Isolate waren verspätete Elutionen (nach dem Permeationsvolumen V_p) großer DOC-Anteile zu beobachten gewesen. Diese wurden vermutlich vor allem durch saure aromatische und heterozyklische Metabolite verursacht, die zwar polarer sind als die (Ausgangs)Schadstoffe, aber immer noch einen so großen Anteil hydrophober (ungesättigter) Strukturen besitzen, dass starke Wechselwirkungen mit der chromatographischen Säule erzeugt werden. Die Messungen mit hochauflösender Massenspektrometrie und die Auftragung der Peaks (Summenformeln) in Van-Krevelen-Diagrammen zeigten das Auftreten einer Vielzahl von Metaboliten unter den intensivsten Peaks. Zusätzlich konnte ein spezifischer Bereich für saure aromatische und heterozyklische Metabolite im Van-Krevelen-Diagramm ermittelt werden, der zukünftige Suchen nach diesen Metaboliten in hochaufgelösten massenspektrometrischen Daten erleichtern kann.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse einen hohen Anteil an anthropogen eingetragenen aromatischen und heterozyklischen Schadstoffen und deren Metaboliten am gesamten DOC ausschließlich in kontaminierten Bereichen an. Dieser anthropogene Anteil könnte in diesen Bereichen einen relevanten Einfluss auf die Redoxchemie im Aquifer haben, wenn die sauren Metaboliten z.B. als Liganden Eisenspezies komplexieren würden.

5.2 Ausblick

Die Untersuchungen und Ergebnisse dieser Arbeit führten zur verschiedenen Fragestellungen und Forschungsthemen, die in zukünftigen Studien zu untersuchen sind:

- **Optimierung der Metabolitenanalytik:** Die erfolgreiche Kombination der verschiedenen massenspektrometrischen Messtechniken lieferte eine wichtige Voraussetzung zum (quantitativen) Nachweis und zur Identifizierung der Metaboliten. Die Optimierung und Erweiterung der Screening- und Identifizierungsmethoden durch z.B. den Aufbau einer Datenbank mit hochaufgelösten Fragmentspektren relevanter Metabolite sowie die Nutzung von NMR (*Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*) zur weiteren Strukturaufklärung ist anzustreben.
- **Untersuchung der Metabolitenbildung im Durchfluss:** Die Erforschung der Metabolitenbildung unter definierten Bedingungen in Batch-Experimenten spiegelt nicht die Komplexität der Einflussfaktoren im Aquifer wider. Die Verwendung von 2-Durchflusssystemen im Laboratorium wäre eine realitätsnähere Variante, die z.B. eine ständige Nachlieferung der Schadstoffe wie im Aquifer gewährleisten kann.
- **Nutzung der Metabolite als Indikatoren:** Die Nutzung spezifischer Metabolite als qualitative Indikatoren des Abbaus bestimmter Schadstoffe ist ein anerkannter Ansatz. Was ist aber mit deren Nutzung als quantitative Indikatoren des Schadstoffabbaus und für räumlich unterschiedliche Abbauaktivitäten (*Plume Fringe Concept*)? Sowohl die Untersuchungen zu quantitativen Konzentrationsverhältnissen zwischen Schadstoff und entsprechendem Metabolit als auch die vertikalen Schadstoff/Metabolit-Verteilungen in dieser Arbeit zeigten keine eindeutigen Zusammenhänge. Um aber die Metabolitenkonzentrationen in Zukunft auch zuverlässig als quantitative und räumliche Indikatoren nutzen zu können bedarf es der Erforschung grundsätzlicher Fragen und Einflussfaktoren:
 - Warum geben die Bakterien die Metabolite, die sie in energieaufwändigen Aktivierungsreaktionen gebildet haben, überhaupt ins umgebende Medium ab?
 - Sind die Metabolite toxisch für die Mikroorganismen?
 - Welche Faktoren führen dazu, dass die Variationen der molaren Konzentrationsverhältnisse bei den Schadstoff-Metaboliten-Paaren so groß sind?
 - Warum entspricht die vertikale Verteilung mancher Metabolit/Schadstoff-Paare dem *Plume Fringe Concept* und andere wiederum nicht? Was sind die entscheidenden Faktoren (z.B. Sorptionstendenzen, hydraulische Fluktuationen...)?
- **Einfluss von Metaboliten auf die Redoxchemie im Aquifer:** Die Untersuchungen in dieser Arbeit haben gezeigt, dass in kontaminierten Bereichen mit hoher mikrobieller Abbautätigkeit relevante Konzentrationen an Metaboliten auftreten können und auch die Gesamtheit des DOC anthropogen beeinflusst ist. Welche Folgen haben hohe Konzentrationen an Metaboliten für den Aquifer? Können die Metabolite z.B. als

Liganden fungieren und Eisen komplexieren so dass die Bioverfügbarkeit des Eisens verändert wird?

- **Kombination verschiedener Nachweismethoden:** Bei der Anwendung des Konzepts *Natural Attenuation* ist eine zuverlässige Überwachung des Schadstoffabbaus unausweichlich. Nur durch die Kombination verschiedener Nachweismethoden bei dem die spezifische Metabolitenanalytik eine sehr wichtige Rolle spielen sollte lässt sich der tatsächlich stattfindende Abbau (Abbauaktivität) *in situ* zuverlässig und umfangreich nachweisen. Die Anwendung und Erforschung des Zusammenspiels der verschiedenen Methoden ist ein sehr wichtiger Forschungsbereich der Zukunft.

6. Summary

The contamination of groundwater systems with organic contaminants like aromatic and heterocyclic compounds and their hazardous potential for drinking water resources is a prevalent problem around the world. Due to the enormous quantity and area of these sites is an active remediation financially and logistically not feasible. It results in an intensive discussion and application of the passive remediation approach called natural attenuation. It is based on the capability of the naturally occurring microorganisms to degrade organic contaminants. Due to the limited availability and the high microbial consumption of oxygen especially anaerobic degradation processes play a pivotal role in contaminated aquifers. However, the approach of natural attenuation is subject of intensive research and needs monitoring activities. The chemical analysis of specific microbial degradation products (metabolites) is very suitable for that since it can prove very selectively and reliably the degradation of specific contaminants. The knowledge of the microbial degradation pathways and the occurring specific metabolites as well as sensitive and selective analytical measuring methods are important requirements for that. For an effective use of metabolites as indicators for anaerobic microbial degradation processes an intensive research of their occurrence, in particular of their (quantitative) relationships to the parent contaminants, and role in groundwater systems is necessary.

Objective

The aim of this work was the investigation of the occurrence of specific acidic metabolites of aromatic and heterocyclic contaminants in contaminated aquifer systems and under defined conditions in the laboratory. Thereby the main focus was to study the corresponding carboxylic and succinic acids, which are typical anaerobic degradation products of microbial degradation. For that purpose different analytical mass spectrometric techniques should be applied and optimized to provide a specific chemical analysis for screening, identification and quantification of these metabolites. In laboratory experiments with an iron reducing bacterial culture the quantitative formation of metabolites during the anaerobic degradation of toluene as well as (cometabolic) degradation and inhibition processes in contaminant mixtures should be investigated. The analysis of different groundwaters from contaminated aquifers was performed with the objective to identify metabolites and elucidate quantitatively their spatial occurrence. Thereby the applicability of these metabolites as qualitative and quantitative indicators for microbial degradation processes and for zones of major biodegradation activities in aquifers should be studied. Additionally to get a more comprehensive impression of the anthropogenic impact of groundwater systems by contaminants and their degradation products their whole dissolved organic carbon (DOC) should be isolated and characterized.

Global workflow

- I. Development, optimization and application of mass spectrometric methods to screen for acidic metabolites as well as their identification and quantification.
- II. Investigation of metabolite formation during the anaerobic degradation of toluene and occurrence of cometabolites and inhibition effects in contaminant mixtures under defined conditions with the iron reducing bacterial strain *Geobacter toluenoxidans* TMJ1.
- III. Research of the ability of specific acidic metabolites as qualitative and quantitative indicators of contaminant degradation.
- IV. Investigation of the transport of specific acidic metabolites in downstream regions and their role as electron donors.
- V. Exploration of the anthropogenic impact of dissolved organic carbon (DOC) in contaminated aquifers.

Results

I. Chemical analysis of acidic aromatic and heterocyclic metabolites

With the combination of different mass spectrometric measurement techniques (LC-ESI-MS/MS, LC-ESI-QTOF-MS) a successful screening for acidic aromatic, bicyclic and heterocyclic metabolites in different aquifers and matrices (groundwater, humics) was performed and a plenty of them could be identified. Especially the group specific screening with neutral-loss-scans (LC-ESI-MS/MS) provided for the first time a selective screening for acidic metabolites of aromatic and heterocyclic contaminants with carboxylic (with $\Delta m/z = 44$) or succinic acid groups (with $\Delta m/z = 116$). In addition to sum formulae from accurate mass measurements mainly the fragmentation spectra from LC-ESI-QTOF-MS, LC-ESI-MS/MS and GC-MS measurements and the subsequent comparison with (similarly) structured reference standards were crucial for identifying the metabolites. Examples for identified metabolites of (poly)aromatic, phenolic or heterocyclic contaminants are benzy succinic acid, naphthyl-2-methylsuccinic acid, 2-naphthoic acid, acenaphthene-5-carboxylic acid, indane-2-carboxylic acid, 2-carboxybenzofuran, 2-carboxybenzothiophen or 4-hydroxy-3-methylbenzoic acid. With the tentative identification of methylnaphthyl-2-methylsuccinic acid, benzofuranmethylsuccinic acid, benzothiophenemethylsuccinic acid and methylcarboxybenzothiophene rarely or never identified metabolites in the field could be proved.

The high resolution mass fragmentation data published in this work can be an important step forward a more extensive use of LC-ESI-QTOF-MS spectra for the identification of acidic aromatic and heterocyclic metabolites in future studies. The current mass spectra of these metabolites published in the literature are unfortunately still based on GC-MS measurements although LC-MS is more suitable for these compounds.

The developing of a LC-ESI-MS/MS method (multiple reaction monitoring) provided a very sensitive and selective quantification of relevant metabolites. Thereby spatial differences in

metabolite concentrations could be revealed and the use of metabolites as (quantitative) indicators could be investigated.

The developed analytical methods formed the basis for the investigations in this study about the formation and occurrence of metabolites their function as indicators.

II. Anaerobic degradation and formation of metabolites under defined conditions

The study of anaerobic degradation of toluene under defined conditions in batch experiments revealed a reproducible degradation of toluene under iron reducing conditions with the bacterial strain *Geobacter toluenoxydans* TMJ1. The determination of the metabolite benzylsuccinic acid (BBS) showed that the fumarate addition pathway is the main activation step during the degradation of toluene under the prevailing conditions with this strain. However, mass balances pointed out that BBS occurred only in very low concentrations of lower than 1% of the degraded toluene.

The addition of mixtures of similarly structured aromatic and heterocyclic contaminants (e.g. xylenes, furan) had no relevant inhibition effects on the degradation of toluene and the microbial activity respectively. Even higher concentrations of individual similarly structured compounds led only to a delayed microbial degradation activity, but not to a lasting inhibition. Only the addition of tar oil showed distinct toxic effects, which can be attributed to the multiplicity of toxic compounds in this phase. These results show clearly that even in compound mixtures, which often occur in contaminated aquifers, an anaerobic biochemical degradation is possible for certain contaminants. Clear evidences for cometabolic degradation processes were found by the detection of methylbenzylsuccinic acid which is a specific anaerobic degradation product of xylenes. Even in these experiments BBS, as the metabolite of the substrate, occurred in concentrations lower than 1% of the degraded toluene. These low concentrations in all batch-experiments indicate only a little accumulation of this metabolite caused e.g. by low excretion out of the bacterial cells and/or a fast further degradation.

The batch experiments were crucial in this work to identify cometabolic degradation processes and the quantitative formation of the metabolite BBS in comparison to the degraded fraction of the contaminant. This is not possible in the field due to the complexity of influencing factors and the multiplicity of bacterial strains.

III. Metabolites as indicators for degradation and microbiological activity

By the detection of different metabolites of aromatic, bicyclic and heterocyclic contaminants in two different aquifers and matrices (groundwater and fulvic acid) ongoing degradation processes could be indicated. In particular the proven aromatic and heterocyclic succinic acids were well suited as excellent specific qualitative indicators for the anaerobic degradation of e.g. toluene, xylenes, (methylated) naphthalenes, benzothiophen or benzofuran. With the (tentatively) identification of benzothiophenmethylsuccinic acid and benzofuranmethylsuccinic it could be proved *in situ* for the first time that the fumarate addition pathway is an important activation step for the anaerobic degradation of heterocyclic compounds in aquifers. A use of these specific metabolites in monitoring programs of future studies can be recommended.

Quantitative relationships of metabolites and corresponding contaminants could be investigated with small scale differences in their concentrations by the use of high resolution sampling in a multi-level well. The big differences in the molar concentration ratios within (2 orders of magnitude) and between (4 orders of magnitude) the metabolite and parent compound pairs found clearly indicated that these metabolites cannot be used as reliable quantitative indicators for the extent of the degradation of the parent compound. However, high concentration ratios can reveal implications for the stability/accumulation of metabolites and for (cometabolically formed) dead-end products (e.g. 2-carboxybenzothiophene, acenaphthene-5-carboxylic acid) respectively.

Vertical concentration profiles of benzylsuccinic acid and methylbenzylsuccinic acid showed distinct peaks at the fringes of the plume of their parent compounds toluene and xylene indicating the plume fringe concept. This concept postulates hot spots of biodegradation activity at the fringes of contaminant plumes where dissolved electron donors and electron acceptors are present simultaneously. These results could be confirmed by independent measuring methods (compound specific stable isotope analysis, gene marker analysis) in other studies. The metabolite profiles of polyaromatic and heterocyclic compounds in contrast showed their maxima rather in the plume centers which can be explained by higher sorption tendencies, additional contaminant sources and other complex factors.

The results in this study showed that the use of metabolites as qualitative indicators of contaminant degradation in the field is an excellent reliable approach. The application of metabolites as quantitative indicators and for zones of high microbial degradation activity is difficult due to the complexity of the influencing factors and seems to be strongly dependent from the different contaminants and environmental conditions in the aquifers.

IV. Transport of acidic metabolites and use as electron donors

The different measurements of groundwater and fulvic acid samples, which were located downstream from contaminant plumes, showed no hints for relevant concentrations of acidic metabolites of aromatic and heterocyclic contaminants. Overall these metabolites showed no relevant transport or rather they were further degraded in the vicinity of their formation. A threat of downstream regions by these metabolites could then not be proved. Therefore the hypothesis that these acidic metabolites, due to their polarity, get transported in relevant amounts into downstream regions of aquifers and are used there under different redox conditions as substrates (electron donors) by the microorganisms could not be confirmed.

V. Anthropogenic impact of the DOC

To get a more complete picture of the anthropogenic impact, the whole DOC from contaminated and downstream regions from aquifers was enriched (isolation of humic substances) and characterized. Thereby the DOC from contaminated regions showed a distinct anthropogenic impact which was evident both at the carbon balance of the humic isolation and at the characterization of the fulvic acid isolates by LC-UV/DOC and by high resolution mass spectrometry (HRMS). The carbon balances revealed high carbon losses caused by irreversible adsorption at the XAD8-resin which can be mainly attributed to the very nonpolar contaminants itself like e.g. polyaromatic hydrocarbons (PAH). The LC-UV/DOC

measurements showed delayed elutions (after the permeation volume V_p) of main DOC contents. They were caused presumably prior by acidic aromatic and heterocyclic metabolites which are indeed more polar than their parent contaminants but still have a big fraction of hydrophobic (saturated) structures. By plotting the peaks (chemical formulae) from the analysis by HRMS in van-Krevelen diagrams the occurrence of several metabolites were found within the most intensive signals. Additionally a characteristic region for acidic aromatic and heterocyclic metabolites in the van-Krevelen diagram could be identified which can facilitate the future searches for these metabolites in data from HRMS-measurements.

Altogether the results revealed a high content of anthropogenically introduced aromatic and heterocyclic contaminants and their metabolites on the whole DOC solely in the contaminated regions. This content can have a relevant influence on the redox chemistry in this regions of the aquifer if e.g. the acidic metabolites act as ligands and form complexes with iron species.

7. Literatur

- Abbt-Braun, G. (1987): Untersuchungen zur Struktur isolierter Huminstoffe. Allgemeine Charakterisierung und massenspektrometrische Bestimmung. Dissertation. Universität München (TU), München.
- Abbt-Braun, G., Frimmel, F.H., Lipp, P. (1991): Isolation of organic substances from aquatic and terrestrial systems: comparison of some methods. *Zeitschrift für Wasser- und Abwasser-Forschung*, **24**: 285-292.
- Abbt-Braun, G., Lankes, U., Frimmel, F.H. (2004): Structural characterization of aquatic humic substances - The need for a multiple method approach. *Aquatic Sciences*, **66**: 151-170.
- Adrey, R.E. (2003): Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction. 1. Auflage. John Wiley & Sons, Chichester.
- Aguera, A., Martinez Bueno, M.J., Fernandez-Alba, A.R. (2013) New trends in the analytical determination of emerging contaminants and their transformation products in environmental waters. *Environmental Science and Pollution Research*, **20**: 3946-3515.
- Aiken, G., Kaplan, L.A., Weishaar, J. (2002): Assessment of relative accuracy in the determination of organic matter concentrations in aquatic systems. *Journal of Environmental Monitoring*, **4**: 70-74.
- Alumbaugh, R.E., Gieg, L.M., Field, J.A. (2004): Determination of alkylbenzene metabolites in groundwater by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1042**: 89-97.
- Anneser, B., Einsiedl, F., Meckenstock, R.U., Richters, L., Wisotzky, F., Griebler, C. (2008a): High-resolution monitoring of biogeochemical gradients in a tar oil-contaminated aquifer. *Applied Geochemistry*, **23**: 1715-1730.
- Anneser, B., Richters, L., Griebler, C. (2008b): Application of high resolution groundwater sampling in a tar oil contaminated sandy aquifer. Studies on small scale abiotic gradients. In: Candela, L., Vadillo, I., Elorza, F.J. (Hrsg.) Advances in subsurface pollution of porous media: indicators, processes and modeling. 107-122. Taylor & Francis.
- Anneser, B., Pilloni, G., Bayer, A., Lueders, T., Griebler, C., Einsiedl, F., Richters, L. (2010): High resolution analysis of contaminated aquifer sediments and groundwater-What can be learned in terms of natural attenuation? *Geomicrobiology*, **27**: 130-142.

- Annweiler, E., Materna, A., Safinowski, M., Kappler, A., Richnow, H.H., Michaelis, W., Meckenstock, R.U. (2000): Anaerobic degradation of 2-methylnaphtalene by a sulfate-reducing enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 5329-5333.
- Annweiler, E., Michaelis, W., Meckenstock, R.U. (2001): Anaerobic cometabolic conversion of benzothiophene by a sulfate-reducing enrichment culture and in a tar-oil-contaminated aquifer. *Environmental Microbiology and Biodegradation*, **67**: 5077-5083.
- Annweiler, E., Michaelis, W., Meckenstock, R.U. (2002): Identical ring cleavage products during anaerobic degradation of naphthalene, 2-methylnaphtalene, and tetralin indicate a new metabolic pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 852-858.
- Avena, J.M., Wilkinson, K.J. (2002): Disaggregation kinetics of a peat humic acid: mechanisms and pH effects. *Environmental Science & Technology*, **36**: 5100-5105.
- Baldock, J.A., Oades, J.M., Waters, A.G., Peng, X., Vasallo, A.M., Wilson, M.A. (1992): Aspects of chemical structure of soil organic materials as revealed by solid state ¹³C NMR spectroscopy. *Biogeochemistry*, **16**: 1-42.
- Barranco, F.T., Dawson, H.E. (1999): Influence of aqueous pH on the interfacial properties of coal tar. *Environmental Science & Technology*, **33**: 1598-1603.
- Bauer, R.D., Maloszewski, P., Zhang, Y., Meckenstock, R.U., Griebler, C. (2008): Mixing-controlled biodegradation in a toluene plume - Results from two-dimensional laboratory experiments. *Journal of Contaminant Hydrology*, **96**: 150-168.
- Bauer, R.D., Rolle, M., Bauer, S., Eberhardt, C., Grathwohl, P., Kolditz, O., Meckenstock, R.U., Griebler, C. (2009): Enhanced biodegradation by hydraulic heterogeneities in petroleum hydrocarbon plumes. *Journal of Contaminant Hydrology*, **105**: 56-68.
- BBodSchG (2004): Gesetz zum Schutz vor schädlichen Bodenveränderungen und zur Sanierung von Altlasten (Bundes-Bodenschutzgesetz, BBodSchG) vom 17. März 1998 (BGBl. I S. 502, geändert durch Gesetz vom 9. Dezember 2004, BGBl. I S. 314).
- Beller, H.R., Reinhard, M.G., Grbic-Galic, D. (1992): Metabolic by-products of anaerobic toluene degradation by sulfate-reducing enrichment cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 3192-3195.
- Beller, H., Ding, W.H., Reinhard, M. (1995): Byproducts of anaerobic alkylbenzene metabolism useful as indicators of in situ bioremediation. *Environmental Science & Technology*, **29**: 2864-2870.
- Beller, H.R. (2000) Metabolic indicators for detecting in situ anaerobic alkylbenzene degradation. *Biodegradation*, **11**: 125-139.

- Beller, H.R., Kane, S.R., Legler, T.C., Alvarez, P.J. (2002): A real-time Polymerase Chain Reaction method for monitoring anaerobic, hydrocarbon-degrading bacteria based on a catabolic gene. *Environmental Science & Technology*, **36**: 3977-3984.
- Beller, H.R. (2002): Analysis of benzylsuccinates in groundwater by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its use for monitoring in situ BTEX biodegradation. *Environmental Science & Technology*, **36**: 2724-2728.
- Beller, H.R., Kane, S.R., Legler, T.C., McKelvie, J.R., Sherwood-Lollar, B., Pearson, F., Balsler, L., Mackay, D.M. (2008): Comparative assessments of benzene, toluene, and xylene natural attenuation by quantitative Polymerase Chain Reaction analysis of a catabolic gene, signature metabolites, and compound-specific isotope analysis. *Environmental Science & Technology*, **42**: 6065-6072.
- Berdugo-Clavijo, C., Dong, X., Soh, J., Sensen, C.W., Gieg, L.M. (2012): Methanogenic biodegradation of two-ringed polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology*, **81**: 124-133.
- Bergmann, F.D., Abu Laban, N.M., Meyer, A.H., Elsner, M., Meckenstock, R.U. (2011): Dual (C, H) isotope fractionation in anaerobic low molecular weight (poly)aromatic hydrocarbon (PAH) degradation: Potential for field studies and mechanistic implications. *Environmental Science & Technology*, **45**: 6947-6953.
- Biegert, T., Fuchs, G., Heider, J. (1996): Evidence that anaerobic oxidation of toluene in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* is initiated by formation of benzylsuccinate from toluene and fumarate. *European Journal of Biochemistry*, **238**: 661-668.
- Börke, P., Hüßers, N., Werner, P. (2008): Leitfaden: Natürliche Schadstoffminderung bei Teeröfaltlasten. BMBF-Förderschwerpunkt "Kontrollierter natürlicher Rückhalt und Abbau von Schadstoffen bei der Sanierung kontaminierter Grundwässer und Böden (KORA)". Schriftenreihe des Instituts für Abfallwirtschaft und Altlasten. Technische Universität Dresden. Band 58.
- Bolton, E.E., Wang, Y., Thiessen, P.A., Bryant, S.H., Wheeler, R.A., Spellmeyer, D.C. (2008): Chapter 12: PubChem: integrated platform of small molecules and biological activities. In: *Annual reports in computational chemistry* **4**:217-241.
- Bombach, P., Richnow, H., Kästner, M., Fischer, A. (2010): Current approaches for the assessment of in situ biodegradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **86**: 839-852.
- Budzikiewicz, H., Schäfer, M. (2005): Massenspektrometrie: eine Einführung. 5. Auflage. Wiley-VCH Verlag.
- Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) (2008): Grundwasser in Deutschland. Reihe Umweltpolitik. Berlin. August 2008.

- Callaghan, A.V., Davidova, I.A., Savage-Ashlock, K., Parisi, V.A., Gieg, L.M., Suflita, J.M., Kukor, J.J., Wawrik, B. (2010): Diversity of benzyl- and alkylsuccinate synthase genes in hydrocarbon-impacted environments and enrichment cultures. *Environmental Science & Technology*, **44**: 7287-7294.
- Callaghan, A.V. (2012): Metabolomic investigations of anaerobic hydrocarbon-impacted environments. *Currant opinion in Biotechnology*, **24**: 506-515.
- Cerniglia, C.E (1984): Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Advances in Applied Microbiology*, **30**: 31-71.
- Cerniglia, C.E (1992): Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, **3**: 351-368.
- Chakraborty, R., Coates, J.D. (2004): Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **64**: 437-446.
- Chakraborty, R., O'Connor, S.M., Chan, E., Coates, J.D. (2005): Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene compounds by Dechloromonas Strain RCB. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 8649-8655.
- Chernushevich, I.V., Loboda, A.V., Thomson, B.A. (2001): An introduction to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, **36**: 849-865.
- Chin, Y.P., Aiken, G.R., Danielsen, K.M. (1997): Binding of pyrene to aquatic and commercial humic substances: the role of molecular weight and aromaticity. *Environmental Science & Technology*, **31**: 1630-1635.
- Choi, B.K., Hercules, D.M., Gusev, A.I. (2001): LC-MS/MS signal suppression effects in the analysis of pesticides in complex environmental matrices. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **369**: 370-377.
- Christensen, T.H., Kjeldsen, P., Bjerg, P.L., Jensen, D.L., Christensen, J.B., Baun, A. (2001): Biogeochemistry of landfill leachate plumes. *Applied Geochemistry*, **16**: 659-718.
- Cervantes, F.J., Dijksma, W., Duong-Dac, T., Ivanova, A., Lettinga, G., Field, J.A. (2001): Anaerobic mineralization of toluene by enriched sediments with quinones and humus as terminal electron acceptors. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 4471-4478.
- Cirpka, O.A., Frind, E.O., Helmig, R. (1999): Numerical simulation of biodegradation controlled by transverse mixing. *Journal of Contaminant Hydrology*, **40**: 159-182.
- Coates, J.D., Anderson, R.T. (2000): Emerging techniques for anaerobic bioremediation of contaminated environments. *Trends in Biotechnology*, **18**: 408-412.

- Coates, J.D., Chakraborty, R., McInerney, M.J. (2002): Anaerobic benzene degradation: a new era. *Research in Microbiology*, **153**: 621-628.
- Constantopoulos, T.L., Jackson, G.S., Enke, C.G. (1999): Effects of salt concentration on analyte response using electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **10**: 625-634.
- Cozzarelli, I.M., Baedecker, M.J., Eganhouse, R.P., Goerlitz, D.F. (1994): The geochemical evolution of low-molecular-weight organic acids derived from the degradation of petroleum contaminants in groundwater. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **58**: 863-877.
- Cozzarelli, I.M., Herman, J.S., Baedecker, M.J. (1995): Fate of microbial metabolites of hydrocarbons in a coastal plain aquifer: The role of electron acceptors. *Environmental Science & Technology*, **29**: 458-469.
- Cozzarelli, I.M., Bekins, B.A., Eganhouse, R.P., Warren, E., Essaid, H.I. (2010): In situ measurements of volatile aromatic hydrocarbon biodegradation rates in groundwater. *Journal of Contaminant Hydrology*, **111**: 48-64.
- Cunningham, J.A., Rahme, H., Hopkins, G.D., Lebron, C., Reinhard, M. (2001): Enhanced in situ bioremediation of BTEX-contaminated groundwater by combined injection of nitrate and sulfate. *Environmental Science & Technology*, **35**: 1663-1670.
- Davidova, I.A., Gieg, L.M., Duncan, K.E., Suflita, J.M. (2007): Anaerobic phenanthrene mineralization by a carboxylating sulfate-reducing bacterial enrichment. *ISME Journal*, **1**: 436-442.
- Dean, B.J. (1985): Recent findings on the genetic toxicology of benzene, toluene, xylenes and phenols. *Mutation Research*, **154**: 153-181.
- Declercq, I., Cappuyns, V., Duclos, Y (2012): Monitored natural attenuation of contaminated soils. State of the art in Europe - a critical evaluation. *Science of the Total Environment*, **426**: 393-405.
- De Hoffmann, E., Stroobant, V. (2007): *Mass Spectrometry Principles and Applications*. 3. Auflage. John Wiley & Sons, Chichester.
- Delay, M., Frimmel, F.H. (2012): Nanoparticles in aquatic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **202**: 583-592.
- Dole M., Mack L.L., Hines R.L., Mobley R.C., Ferguson L.D., Alice M.B. (1968): Molecular beams of macroions. *Journal of Chemical Physics*, **49**: 2240-2249.
- Edwards, E.A., Wills, L.E., Reinhard, M., Grbic-Galic, D. (1992): Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 794-800.

- Elshahed, M.S., Gieg, L.M., McInerney, M.J., Suflita, J.M. (2001): Signature metabolites attesting to the in situ attenuation of alkylbenzenes in anaerobic environments. *Environmental Science & Technology*, **35**: 682-689.
- Elsner, M. (2010): Stable isotope fractionation to investigate natural transformation mechanisms of organic contaminants: principles, prospects and limitations. *Journal of Environmental Monitoring*, **12**: 2005-2031.
- Enfield, C.G., Bengtsson, G., Lindquist, R. (1989): Influence of macromolecules on chemical transport. *Environmental Science & Technology*, **23**: 1278-1286.
- Engebretson, R.R., Wandruszka, R. (1994): Micro-organization in dissolved humic acids. *Environmental Science & Technology*, **28**: 1934-1941.
- Europäische Union (2002): Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen. Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG. 2002/657/EG. 12. August 2002.
- Europäische Union (2006): Richtlinie zum Schutz des Grundwassers vor Verschmutzung und Verschlechterung. Richtlinie 2006/118/EG. 12. Dezember 2006.
- Farhadian, M., Vachelard, C., Duchez, D., Larroche, C. (2008): In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: A review. *Bioresource Technology*, **99**: 5296-5308.
- Fenn, J., Mann, M., Meng, C., Wong, S., Whitehouse, C. (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **246**: 64-71.
- Fetzner, S. (1998): Bacterial degradation of pyridine, indole, quinoline, and their derivatives under different redox conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **49**: 237-250.
- Field, J.A. (2002): Limits of anaerobic biodegradation. *Water Science & Technology*, **45**: 9-18.
- Foght, J. (2008): Anaerobic biodegradation of aromatic hydrocarbons: Pathways and prospects. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **15**: 93-120.
- Fowler, S.J., Dong, X., Sensen, C.W., Suflita, J.M., Gieg, L.M. (2012): Methanogenic toluene metabolism: community structure and intermediates. *Environmental Microbiology*, **14**: 754-764.
- Frimmel, F.H., Jahnel, J., Hesse, S. (1998): Characterization of biogenic organic matter (BOM). *Water Science & Technology*, **37**: 97-103.
- Frimmel, F.H., Abbt-Braun, G. (1999): Basic characterization of reference NOM from Central Europe - Similarities and differences. *Environment International*, **25**: 191-207.

- Frimmel, F.H. (2001): Aquatic humic substances. In: Steinbüchel, A., Hofrichter, M. (Hrsg.), *Biopolymers*, 301-324. Wiley-VCH, Weinheim.
- Frimmel, F.H., Abbt-Braun, G., Heumann, K.G., Hock, B., Lüdemann, D.D., Spiteller, M. (2002): *Refractory organic substances in the environment*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Frimmel, F.H., Lankes, U., Lüdemann, H.D., Müller, M.B. (2005): Structural characterization of humic substances from waste water. In: Ghabbour, E.A., Davies, G. (Eds.): *Humic Substances-Molecular details and applications in land and water conservation*. 3-22. Taylor & Francis, New York.
- Frimmel, F.H., Abbt-Braun, G. (2011): Sum parameters: potential and limitations. *Water Science*, **3**: 3-29.
- Galvao, T.C., Mohn, W.W, de Lorenzo, V. (2005): Exploring the microbial biodegradation and biotransformation gene pool. *Trends in Biotechnology*, **23**: 497-506.
- Garcia-Reyes, J.F., Hernando, M.D., Molina-Diaz, A., Fernandez-Alba, A.R. (2007): Comprehensive screening of target, non-target and unknown pesticides in food by LC-TOF-MS. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **26**: 828-841.
- Gentili, A., Marchese, S., Perret, D. (2008): MS techniques for analyzing phenols, their metabolites and transformation products of environmental interest. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **27**: 888-903.
- Gieg, L.M., Kolhatkar, R.V., Mc Inerney, R.S., Tanner, R.S., Harris, S.H., Sublette, K.L., Suflita, J.M. (1999): Intrinsic bioremediation of petroleum hydrocarbons in a gas condensate-contaminated aquifer. *Environmental Science & Technology*, **33**: 2550-2560.
- Gieg, L.M., Suflita, J.M. (2002): Detection of anaerobic metabolites of saturated and aromatic hydrocarbons in petroleum-contaminated aquifers. *Environmental Science & Technology*, **36**: 3755-3762.
- Gomez, M.J., Gomez-Ramos, M.M., Malato, O., Mezcuca, M., Fernandez-Alba, A.R. (2010): Rapid automated screening, identification and quantification of organic micro-contaminants and their main transformation products in wastewater and river waters using liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry with an accurate-mass database. *Journal of Chromatography A*, **1217**: 7038-7054.
- Grathwohl, P. (1998): *Diffusion in natural porous media. Contaminant transport, sorption/desorption and dissolution kinetics*. 1. Auflage. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Griebler, C., Mösslacher, F. (2003): *Grundwasserökologie*. UTB, Stuttgart.

- Griebler, C., Safinowski, M., Vieth, A., Richnow H.H., Meckenstock, R.U. (2004): Combined application of stable carbon isotope analysis and specific metabolites determination for assessing in situ degradation of hydrocarbons in a tar-oil-contaminated aquifer. *Environmental Science & Technology*, **38**: 617-631.
- Gross, J.H. (2004): Mass spectrometry a textbook. 1. Auflage. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Gross, M.L., Caprioli, R.M, Niessen, W. (2007): The encyclopedia of mass spectrometry, Volume 8: Hyphenated methods. Elsevier Science & Technology.
- Hartnik, T., Norli, H.R., Eggen, T., Breedveld, G.D. (2007): Bioassay-directed identification of toxic organic compounds in creosote contaminated groundwater. *Chemosphere*, **66**: 435-443.
- Hassett, J.P., Anderson, M.A. (1979): Association of hydrophobic organic-compounds with dissolved organic matter in aquatic systems. *Environmental Science & Technology*, **13**: 1526-1529.
- Heider, J. (2007): Adding handles to unhandy substrates: Anaerobic hydrocarbon activation mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, **11**: 188-194.
- Herfort, M., Ptak, T., Hümmer, O., Teutsch, G., Dahmke, A. (1998): Testfeld Süd: Einrichtung der Testfeldinfrastruktur und Erkundung hydraulisch-hydrogeochemischer Parameter des Grundwasserleiters. *Grundwasser*, **4**: 159-166.
- Hertkorn, N., Frommberger, M., Witt, M., Koch, B.P., Schmitt-Kopplin, P., Perdue, E.M. (2008): Natural organic matter and the event horizon of mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **80**: 8908-8919.
- Herzprung, P., von Tümpling, W., Hertkorn, N., Harir, M., Büttner, O., Bravidor, J., Friese, K., Schmitt-Kopplin, P. (2012): Variations of DOM quality in inflows of drinking water reservoir: linking of van-Krevelen diagrams with EEMF spectra by rank correlation. *Environmental Science & Technology*, **46**: 5511-5518.
- Hogenboom, A., van Leerdam, J., de Voogt, P. (2009): Accurate mass screening and identification of emerging contaminants in environmental samples by liquid chromatography-hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1216**: 510-519.
- Huber, S.A., Frimmel, F.H. (1991): Flow injection analysis for organic and inorganic carbon in the low-ppb range. *Analytical Chemistry*, **63**: 2122-2130.
- Huber, S.A., Frimmel, F.H. (1994): Direct gel chromatographic characterization and quantification of marine dissolved organic carbon using high-sensitivity DOC detection. *Environmental Science & Technology*, **28**: 1194-1197.

- Hübschmann, H.J. (2008): Handbook of GC/MS: Fundamentals and Applications. 2. Auflage. Wiley-VCH. Weinheim.
- Ibanez, M., Sancho, J.V., Hernandez, F., McMillan, D., Rao, R. (2008): Rapid non-target screening of organic pollutants in water by ultraperformance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **27**: 481-489.
- Iribarne, J.V., Thomson, B.A. (1976): On the evaporation of small ions from charged droplets. *Journal of Chemical Physics*, **64**: 2287-2294.
- Jahn, M.K., Haderlein, S.B., Meckenstock, R.U. (2005): Anaerobic degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and o-xylene in sediment-free iron-reducing enrichment cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 3355-3358.
- Jiang, L.F., Moini, M. (2000): Development of multi-ESI-sprayer, multi-atmospheric-pressure-inlet mass spectrometry and its application to accurate mass measurement using time-of-flight mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **72**: 20-24.
- Johansen, S.S., Licht, D., Arvin, E., Mosbaek, H., Hansen, A.B. (1997): Metabolic pathways of quinoline, indole and their methylated analogs by *Desulfobacterium indolicum* (DSM 3383). *Applied Microbiology and Biotechnology*, **47**: 292-300.
- Johnson, H.A., Pelletier, D.A., Spormann, A.M. (2001): Isolation and characterization of anaerobic ethylbenzene dehydrogenase, a novel Mo-Fe-S enzyme. *Journal of Bacteriology*, **183**: 4536-4542.
- Kanehisa, M., Goto, S. (2000) Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, **28**: 27-30.
- Kappler, A., Emerson, D., Edwards, K., Amend, J.P., Gralnick, J.A., Grathwohl, P., Hoehler, T., Straub, K.L. (2005): Microbial activity in biogeochemical gradients - new aspects of research. *Geobiology*, **3**: 229-233.
- Karickhoff, S.W., Brown, D.S., Scott, T.A. (1979): Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Research*, **3**: 241-248.
- Kebarle, P., Tang, L. (1993): From ions in solution to ions in the gas phase - the mechanism of electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **65**: 972A-986A.
- Kendall, C., McDonnell, J.J. (1998): Isotope tracers in catchment hydrology. 1. Auflage. Elsevier, Amsterdam.
- Kern, S., Fenner, K., Singer, H.P., Schwarzenbach, R.P., Hollender, J. (2009): Identification of transformation products of organic contaminants in natural waters by computer-aided prediction and high-resolution mass spectrometry. *Environmental Science & Technology*, **43**: 7039-7046.

- Kim, S., Kramer, R.W., Hatcher, P.G. (2003): Graphical method for analysis of ultrahigh-resolution broadband mass spectra of natural organic matter, the van Krevelen diagram. *Analytical Chemistry*, **75**: 5336-5344.
- Kind, T., Fiehn, O. (2007): Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics*, **8**: 105-125.
- Kind, T., Fiehn, O. (2010): Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanalytical Reviews*, **2**: 23-60.
- Kleemann, R., Meckenstock, R.U. (2011): Anaerobic naphthalene degradation by Gram-positive iron reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, **78**: 488-496.
- Kleineidam, S., Rügner, H., Ligouis, B., Grathwohl, P. (1999): Organic matter facies and equilibrium sorption of phenanthrene. *Environmental Science & Technology*, **33**: 1637-1644.
- Kniemeyer, O., Fischer, T., Wilkes, H., Glockner, F.O., Widdel, F. (2003): Anaerobic degradation of ethylbenzene by a new type of marine sulfate-reducing bacterium, *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 760-768.
- Kosjek, T., Heath, E. (2008): Applications of mass spectrometry to identifying pharmaceutical transformation products in water treatment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **27**: 807-820.
- Krauss, M., Singer, H., Hollender, J. (2010): LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **397**: 943-951.
- Krieger, C.J., Beller, H.R., Reinhard, M., Spormann, A.M. (1999): Initial reactions in anaerobic oxidation of m-xylene by the denitrifying bacterium *Azoarcus* sp. *Strain T*. *Journal of Bacteriology*, **181**: 6403-6410.
- Kumke, M.U., Zwiener, C., Abbt-Braun, G., Frimmel, F.H. (1999): Spectroscopic characterization of fulvic acid fractions of a contaminated groundwater. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, **27**: 409-415.
- Kunapuli, U., Jahn, M.K., Lueders, T., Geyer, R., Heipieper, H.J., Meckenstock, R.U. (2010): *Desulfitobacterium aromaticivorans* sp. nov. and *Geobacter toluenoxidans* sp. nov., iron-reducing bacteria capable of anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **60**: 686-695.
- Kunkel, R., Voigt, H.J., Wendland, F., Hannappel, S. (2004): Die natürliche ubiquitär überprägte Grundwasserbeschaffenheit in Deutschland. Forschungszentrum Jülich

- LABO: Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Bodenschutz - Ständiger Ausschuss Altlasten (2005): Positionspapier: Berücksichtigung natürlicher Schadstoffminderungsprozesse bei der Altlastenbearbeitung. Stand: 01.05.2005.
- LABO: Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Bodenschutz - Ständiger Ausschuss Altlasten (2010): Bericht: Bundesweite Kennzahlen zur Altlastenstatistik. Stand: 30.07.2010.
- LABO: Bund/Länder-Arbeitsgemeinschaft Bodenschutz - Ständiger Ausschuss Altlasten. (2011) Consideration of natural attenuation in remediating contaminated sites. Stand: 10.12.2009.
- Lankes, U. (2001): Festkörper-NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung von refraktären organischen Säuren in Gewässern. Dissertation. Universität Regensburg, Regensburg.
- Lankes, U., Lüdemann, H.D., Frimmel, F.H. (2008): Search for basic relationships between "molecular size" and "chemical structure" of aquatic natural organic matter-Answers from ^{13}C and ^{15}N CPMAS NMR spectroscopy. *Water Research*, **42**: 1051-1060.
- Lankes, U., Müller, M.B., Weber, M., Frimmel, F.H. (2009): Reconsidering the quantitative analysis of organic carbon concentrations in size exclusion chromatography. *Water Research*, **43**: 915-924.
- Ledin, A., Reitzel, L.A., Bjerg, P.L. (2005): Quantitative determination of toluene, ethylbenzene, and xylene degradation products in contaminated groundwater by solid-phase extraction and in-vial derivatization. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **85**: 1075-1087.
- Leenheer, J.A., Rostad, C.E., Gates, P.M., Furlong, E.T., Ferrer, I. (2001): Molecular resolution and fragmentation of fulvic acid by electrospray ionisation/multistage tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **73**: 1461-1471.
- Leenheer, J.A., Croué, J.P. (2003): Characterizing aquatic dissolved organic matter. *Environmental Science & Technology*, **37**: 18A-26A.
- Leuthner, B., Leutwein, C., Schulz, H., Horth, P., Haehnel, W., Schiltz, E., Schagger, H., Heider, J. (1998): Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glyceryl radical enzyme catalysing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Molecular Microbiology*, **28**: 615-628.
- Levsen, K., Schiebel, H.M., Terlouw, J.K., Jobst, K.J., Elend, M., Preiß, A., Thiele, H., Ingendoh, A. (2007): Even-electron ions: a systematic study of the neutral species lost in the dissociation of quasi-molecular ions. *Journal of Mass Spectrometry*, **42**: 1024-1044.
- Lewandowski, G., Mortimer, G. (2004): Estimation of anaerobic biodegradation rate constants at MGP Sites. *Groundwater*, **42**: 433-437.

- Landesamt für Umweltschutz (LfU) Baden-Württemberg (1997): Handbuch Altlasten und Grundwasserschadensfälle: Literaturstudie zum natürlichen Rückhalt/Abbau von Schadstoffen im Grundwasser. Karlsruhe.
- Licht, D., Ahring, B.K., Arvin, E. (1996): Effects of electron acceptors, reducing agents and toxic metabolites on anaerobic degradation of heterocyclic compounds. *Biodegradation*, **7**: 83-90.
- Loss, R.D. (2003): Atomic weights of the elements 2001. *Pure and Applied Chemistry*, **75**: 1107-1122.
- Lovley, D.R. (2001): Bioremediation: Anaerobes to the Rescue. *Science*, **293**: 1444-1446.
- Mackay, D., Shiu, W.Y. (1981): A critical review of Henry's law constants for chemicals of environmental interest. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, **4**: 1176-1199.
- Madsen, E.L. (2005): Identifying microorganisms responsible for ecologically significant biogeochemical processes. *Nature Reviews Microbiology*, **3**: 439-446.
- McMahon, P.B., Chapelle, F.H. (1990): Microbial production of organic acids in aquitard sediments and its role in aquifer geochemistry. *Nature*, **349**: 233-235.
- Mantoura, R.F.C., Riley, J.P. (1975): The analytical concentration of humic substances from natural waters. *Analytica Chimica Acta*, **76**: 97-106.
- Martinez Bueno, M.J., Ulaszewska, M.M., Gomez, M.J., Hernando, M.D., Fernandez-Alba, A.R. (2012): Simultaneous measurement in mass and mass/mass mode for accurate qualitative and quantitative screening analysis of pharmaceuticals in river water. *Journal of Chromatography A*, **1256**: 80-88.
- Martus, P., Püttmann, W. (2003): Formation of alkylated aromatic acids in groundwater by anaerobic degradation of alkylbenzenes. *The Science of the Total Environment*. **307**: 19-33.
- Matthess, G., Frimmel, F., Hirsch, P., Schulz, H.D., Usdowski, H.-E (1992): Progress in hydrogeochemistry. 1. Auflage. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Matuszewski, B., Constanzer, M., Chavez-Eng, C. (2003): Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, **75**: 3019-3030.
- McGregor, L.A., Gauchotte-Lindsay, C., Daeid, N.N., Thomas, R., Kalin, R.M. (2012): Multivariate statistical methods for the environmental forensic classification of coal tars from former manufactured gas plants. *Environmental Science & Technology*, **46**: 3744-3752.

- McIntyre, C., Batts, B.D., Jardine, D.R. (1997): Electrospray mass spectrometry of groundwater organic acids. *Journal of mass spectrometry, JMS Letters*, **32**: 328-330.
- McMaster (2005): LC/MS: a practical user`s guide. 1. Auflage. John Wiley & Sons.
- Meckenstock, R.U., Morasch, B., Warthmann, R., Schink, B., Annweiler, E., Michaelis, W., Richnow, H.H. (1999): $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope fractionation of aromatic hydrocarbons during microbial degradation. *Environmental Microbiology*, **1**: 409-414.
- Meckenstock, R.U., Annweiler, E., Michaelis, W., Richnow, H.H., Schink, B. (2000): Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**: 2743-2747.
- Meckenstock, R.U., Safinowski, M., Griebler, C. (2004): Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology*, **49**: 27-36.
- Meckenstock, R.U., Morasch, B., Griebler, C., Richnow, H.H. (2004a): Stable isotope fractionation analysis as a tool to monitor biodegradation in contaminated aquifers. *Journal of Contaminant Hydrology*, **75**: 215-255.
- Meckenstock, R.U., Warthmann, R.J., Schäfer, W. (2004b): Inhibition of anaerobic microbial o-xylene degradation by toluene in sulfidogenic sediment columns and pure cultures. *FEMS Microbiology Ecology*, **47**: 381-386.
- Meckenstock, R.U., Lueders, T., Griebler, C., Selesi, D. (2010): Microbial hydrocarbon degradation at coal gasification plants. In: Timmis, K.N. (Hrsg.): Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Meckenstock, R.U., Mouttaki, H. (2011): Anaerobic degradation of non-substituted aromatic hydrocarbons. *Current Opinion in Biotechnology*, **22**: 406-414.
- Meyer, S., Cartellieri, S., Steinhart, H. (1999): Simultaneous determination of PAHs, hetero-PAHs (N, S, O), and their degradation products in creosote contaminated soils. Method development, validation, and application to hazardous waste sites. *Analytical Chemistry*, **71**: 4023-4029.
- Meyer, S., Steinhart, H. (2000): Effects of heterocyclic PAHs (N, S, O) on the biodegradation of typical tar oil PAHs in a soil/compost mixture. *Chemosphere*, **40**: 359-367.
- Mihelcic, J.R., Luthy, R.G. (1988): Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds under various redox conditions in soil-water systems. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**: 1182-1187.
- Morasch, B, Hunkeler, D., Zopfi, J., Temime, B., Höhener, P. (2011): Intrinsic biodegradation potential of aromatic hydrocarbons in an alluvial aquifer - potentials and limits of signature metabolite analysis and two isotope-based techniques. *Water Research*, **45**: 4459-4469.

- Mori, S., Barth, H.G. (1999): Size exclusion chromatography. 1. Auflage. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York
- Moultaki, H., Johannes, J., Meckenstock, R.U. (2012): Identification of naphthalene carboxylase as a prototype for the anaerobic activation of non-substituted aromatic hydrocarbons. *Environmental Microbiology*, **14**: 2770-2774.
- Muller, J.A., Galushko, A.S., Kappler, A., Schink, B. (2001): Initiation of anaerobic degradation of p-cresol by formation of 4-hydroxybenzylsuccinate in *Desulfobacterium cetonicum*. *Journal of Bacteriology*, **183**: 752-757.
- Müller, M.B., Zwiener, C., Frimmel, F.H. (1999): Sample cleanup and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of polar aromatic compounds in groundwater samples from a former gas plant. *Journal of Chromatography A*, **862**: 137-145.
- Müller, M.B., Schmitt, D., Frimmel, F.H. (2000): Fractionation of natural organic matter by size exclusion chromatography - properties and stability of fractions. *Environmental Science & Technology*, **34**: 4867-4872.
- Müller, M.B. (2004): Bewertung von Anreicherungs- und Fraktionierungsverfahren für die strukturelle Charakterisierung der gelösten organischen Substanz in Wasser. Dissertation. Universität Karlsruhe (TH), Karlsruhe.
- Müller, A., Weiss, S.C., Schulz, W., Seitz, W. (2010): Combination of different liquid chromatography/mass spectrometry technologies for the identification of transformation products of rhodamine B in groundwater. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **24**: 659-666.
- Müller, A., Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H. (2011): A new approach to data evaluation in the non-target screening of organic trace substances in water analysis. *Chemosphere*, **85**: 1211-1219.
- Musat, F., Galushko, A., Jacob, J., Widdel, F., Kube, M., Reinhardt, R., Wilkes, H., Schink, B., Rabus, R. (2009): Anaerobic degradation of naphthalene and 2-methylnaphthalene by strains of marine sulfate-reducing bacteria. *Environmental Microbiology*. **11**: 209-219.
- Namocatcat, J.A., Fang, J., Barcelona, M.J., Quibuyen, A.T.O., Abrajano, T.A. (2003): Trimethylbenzoic acids as metabolite signatures in the biogeochemical evolution of an aquifer contaminated with jet fuel hydrocarbons. *Journal of Contaminant Hydrology*, **67**: 177-194.
- Neumann, S., Böcker, S. (2010): Computational mass spectrometry for metabolomics: identification of metabolites and small molecules. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **398**: 2779-2788.

- Niessen, W.M.A., Manini, P., Andreoli, R. (2006): Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, **25**: 881-899.
- Niessen, M.A. (2006): Liquid Chromatography-mass spectrometry. 3. Auflage. Taylor & Francis, New York.
- Ohlenbusch, G., Zwiener, C., Meckenstock, R.U., Frimmel, F.H. (2002): Identification and quantification of polar naphthalene derivatives in contaminated groundwater of a former gas plant site by liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **967**: 201-207.
- Oka, A.R., Phelps, C.D., Zhu, X., Saber, D.L., Young, L.Y. (2011): Dual biomarkers of anaerobic hydrocarbon degradation in historically contaminated groundwater. *Environmental Science & Technology*, **45**: 3407-3414.
- Pence, H.E., Williams, A. (2010): Chemspider: an online chemical information resource. *Journal of Chemical Education*, **87**: 1123-1124.
- Perminova, I.V., Frimmel, F.H., Kovalevskii, D.V., Abbt-Braun, G., Kudryavtsev, A.V., Hesse, S. (1998): Development of a predictive model for calculation of molecular weight of humic substances. *Water Research*, **32**: 872-881.
- Phelps, C.D., Young, L.Y. (2001): Biodegradation of BTEX under anaerobic conditions: a review. *Advances in Agronomy*, **70**: 329-357.
- Phelps, C.D., Battistelli, J., Young, L.Y. (2002): Metabolic biomarkers for monitoring anaerobic naphthalene biodegradation in situ. *Environmental Microbiology*, **4**: 532-537.
- Philipp, B., Schink, B. (2012) Different strategies in anaerobic biodegradation of aromatic compounds: nitrate reducers versus strict anaerobes. *Environmental Microbiology Reports*, **4**: 469-478.
- Philp, J., Bamforth, S.M., Singleton, I., Atlas, R.M. (2005): Environmental pollution and restoration: a role for bioremediation. In: Atlas, R.M., Philp, J. (Hrsg.): Bioremediation. ASM press, Washington DC.
- Pico, Y., Barcelo, D. (2008): The expanding role of LC-MS in analyzing metabolites and degradation products of food contaminants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **27**: 821-835.
- Plancque, G., Amekraz, B., Moulin, V., Toulhoat, P., Moulin, C. (2001): Molecular structure of fulvic acids by electrospray with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **15**: 827-835.

- Posner, A.M. (1963): Importance of electrolyte in the determination of molecular weights by 'Sephadex' gel filtration, with especial reference to humic acid. *Nature*, **198**: 1161-1163.
- Prommer, H., Anneser, B., Rolle, M., Einsiedl, F., Griebler, C. (2009): Biogeochemical and isotopic gradients in a BTEX/PAH contaminant plume: model-based interpretation of a high-resolution field data set. *Environmental Science & Technology*, **43**: 8206-8212.
- Rabus, R., Widdel, F. (1995): Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Archives of Microbiology*, **163**: 96-103.
- Rabus, R., Jarling, R., Lahme, S., Kühner, S., Heider, J., Widdel, F., Wilkes, H. (2011): Co-metabolic conversion of toluene in anaerobic n-alkane degrading bacteria. *Environmental Microbiology*, **13**: 2576-2586.
- Reemtsma, T. (2001): The use of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in water analysis - Part I: Achievements. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **20**: 500-517.
- Reemtsma, T., These, A. (2003): On-line coupling of size exclusion chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry for the analysis of aquatic fulvic and humic acids. *Analytical Chemistry*, **75**: 1500-1507.
- Reemtsma, T. (2003): Liquid chromatography-mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants. *Journal of Chromatography A*, **1000**: 477-501.
- Reemtsma, T., These, A., Springer, A., Linscheid, M. (2006): Fulvic acids as transition state of organic matter: indications from high resolution mass spectrometry. *Environmental Science & Technology*, **40**: 5839-8845.
- Reemtsma, T. (2010): The carbon versus mass diagram to visualize and exploit FTICR-MS data of natural organic matter. *Journal of Mass Spectrometry*, **45**: 382-390.
- Reineke, W. (2001): Aerobic and anaerobic degradation potentials of microorganisms. In: Beek, B. (Hrsg.) Biodegradation and persistence; Hutzinger, O. (Hrsg.) The handbook of environmental chemistry. 1-161, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Reineke, A.K., Goen, T., Preiss, A., Hollender, J. (2007): Quinoline and derivatives at a tar oil contaminated site: hydroxylated products as indicator for natural attenuation? *Environmental Science & Technology*, **41**: 5314-5322.
- Reineke, A.K., Preiss, A., Elend, M., Hollender, J. (2008): Detection of methylquinoline transformation products in microcosm experiments and in tar oil contaminated groundwater using LC-NMR. *Chemosphere*, **70**: 2118-2126.

- Reusser, D.E., Istok, J.D., Beller, H.R., Field, J.A. (2002): In situ transformation of deuterated toluene and xylene to benzylsuccinic acid analogues in BTEX-contaminated aquifers. *Environmental Science & Technology*, **36**: 4127-4134.
- Reusser, D.E., Field, J. (2002): Determination of benzylsuccinic acid in gasoline-contaminated groundwater by solid-phase extraction coupled with gas chromatography – mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **953**: 215-225.
- Richardson, S.D. (2010): Environmental Mass Spectrometry: Emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, **82**: 4742-4774.
- Richardson, S.D., Ternes, T.A. (2011): Water analysis: Emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, **83**: 4614-4648.
- Rügner, H., Holder, T., Richnow, H.H., Feisthauer, S., Groß, M., Bleicher A. (2008): Abschlussbericht: SAFIRA II Aktivitäten am Standort Weißandt-Görlitz. Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ). Department Grundwassersanierung (28.11.2008). Leipzig.
- Sabljić, A., Güsten, H., Verhaar, H., Hermens, J. (1995): QSAR modelling of soil sorption. Improvements and systematics of log KOC vs. log KOW correlations. *Chemosphere*, **31**: 4489-4514.
- Safinowski, M., Griebler, C., Meckenstock, R.U. (2006): Anaerobic cometabolic transformation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons: evidence from laboratory and field studies. *Environmental Science & Technology*, **40**: 4165-4173.
- Safinowski, M., Meckenstock, R.U. (2006): Methylation is the initial reaction in anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. *Environmental Microbiology*, **8**: 347-352.
- Schmidt, T.C., Zwank, L., Elsner, M., Berg, M., Meckenstock, R.U., Haderlein, S.B. (2004): Compound-specific stable isotope analysis of organic contaminants in natural environments: a critical review of the state of the art, prospects and future challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **378**: 283-300.
- Schmitt, R., Langguth, H.R., Püttmann, W. (1998): Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe und Metabolitenbildung im Grundwasserleiter eines ehemaligen Gaswerkstandorts. *Grundwasser*, **2**: 78-86.
- Schmitt, D. (2002): Charakterisierung der Bindung von Metallionen an natürliche organische Substanzen und deren Auswirkungen auf Adsorption und Transport. Dissertation. Universität Karlsruhe (TH), Karlsruhe.
- Schüth, C. (1994): Sorptionskinetik und Transportverhalten von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) im Grundwasser - Laborversuche. Dissertation. Universität Tübingen, Tübingen.

- Selifonov, S.A., Chapman, P.J., Akkerman, S.B., Gurst, J.E., Bortiatynski, J.M., Nanny, M.A., Hatcher, P.G. (1998): Use of ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance to assess fossil fuel biodegradation: Fate of $[1-^{13}\text{C}]$ acenaphthene in creosote polycyclic aromatic compound mixtures degraded by bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 1447-1453.
- Smets, B.F., Pritchard, P.H. (2003): Elucidating the microbial component of natural attenuation. *Current Opinion in Biotechnology*, **14**: 283-288.
- Snyder, R. (2000): Overview of the toxicology of benzene. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, **61**: 339-346.
- Specht, C., Frimmel, F.H. (2000): Specific interactions of organic substances in size-exclusion chromatography. *Environmental Science & Technology*, **34**: 2361-2366.
- Specht, C. (2002): Wechselwirkungen von organischen Substanzen mit mineralischen Festphasen - Untersuchungen mit Hilfe der Größenausschlußchromatographie und der FTIR-Spektroskopie. Dissertation. Universität Karlsruhe (TH), Karlsruhe.
- Steen, R.J.C.A., Bobeldijk, I., Brinkman, U.A.T. (2001): Screening for transformation products of pesticides using tandem mass spectrometric scan modes. *Journal of Chromatography A*, **915**: 129-137.
- Stenson, A.C., Marshall, A.G., Cooper, W.T. (2003): Exact masses and chemical formulas of individual Suwannee River fulvic acids from ultrahigh resolution electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectra. *Analytical Chemistry*, **75**: 1275-1284.
- Stookey, L.L. (1970): Ferrozine-a new spectrophotometric reagent for iron. *Analytical Chemistry*, **42**: 779-781.
- Spormann, A.M., Widdel, F. (2000): Metabolism of alkylbenzenes, alkanes, and other hydrocarbons in anaerobic bacteria. *Biodegradation*, **11**: 85-105.
- Strevett, K., Davidova, I., Suflita, J.M. (2002): A comprehensive review of the screening methodology for anaerobic biodegradability of surfactants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, **1**: 143-167.
- Stüber, M., Reemtsma, T. (2004): Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **378**: 910-916.
- Stumm, W., Morgan, J.J. (1996): Aquatic chemistry. 3. Auflage. John Wiley & Sons, New York.

- Sullivan, E.R., Zhang, X., Phelps, C., Young, L.Y. (2001): Anaerobic mineralization of stable-isotope-labeled 2-methylnaphthalene. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 4353-4357.
- Swift, R.W., Posner, A.M. (1971): Gel chromatography of humic acid. *Journal of Soil Science*, **22**: 237-249.
- These, A. (2005): Strukturelle Charakterisierung von Fulvinsäure-Molekülen mittels LC-MS/MS: Hinweise zu Quellen, Bildung und Reaktivität. Dissertation. Universität Berlin (TU), Berlin.
- Thornton, S.F., Quigley, S., Spence, M.J., Banwart, S.A., Bottrell, S., Lerner, D.N. (2001): Processes controlling the distribution and natural attenuation of dissolved phenolic compounds in a deep sandstone aquifer. *Journal of Contaminant Hydrology*, **53**: 233-267.
- Thornton, S.F., Lerner, D.N., Davison, R.M. (2002): Groundwater monitoring. In: El-Shaarawi, A.H., Piegorsch, W.W. (Hrsg.): *Encyclopedia of environments*. John Wiley & Sons, New York.
- Thullner, M., Centler, F., Richnow, H.H., Fischer, A. (2012): Quantification of organic pollutant degradation in contaminated aquifers using compound specific stable isotope analysis - review of recent developments. *Organic Geochemistry*, **42**: 1440-1460.
- Thullner, M., Fischer, A., Richnow, H.H., Wick, L.Y. (2013): Influence of mass transfer on stable isotope fractionation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**: 441-452.
- Thurman, E.M. (1985): *Organic geochemistry of natural waters*. 1. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Tipping, E. (2002): *Cation binding by humic substances*. 1. Auflage. Cambridge Environmental Chemistry Series. University Press, Cambridge.
- Tuxen, N., Albrechtsen, H.J., Bjerg, P.L. (2006): Identification of a reactive degradation zone at a landfill leachate plume fringe using high resolution sampling and incubation techniques. *Journal of Contaminant Hydrology*, **85**: 179-194.
- Ulrich, A.C., Beller, H.R., Edwards, E.A. (2005): Metabolites detected during biodegradation of ¹³C₆-benzene in nitrate-reducing and methanogenic enrichment cultures. *Environmental Science & Technology*, **39**: 6681-6691.
- United States Environmental Protection Agency (US EPA) (1999): Use of monitored natural attenuation at superfund, RCRA corrective action, and underground storage tank site. OSWER Directive 92000.4-17P. 21. April 1999.

- Van Breukelen, B.M., Griffioen, J. (2004): Biogeochemical processes at the fringe of a landfill leachate pollution plume: potential for dissolved organic carbon, Fe(II), Mn(II), NH₄ and CH₄ oxidation. *Journal of Contaminant Hydrology*, **73**: 181-205.
- Van Krevelen, D.W. (1950): Graphical-statistical method for the study of structure and reaction processes of coal. *Fuel*, **29**: 269-284.
- Vasilieva, V., Scherr, K.E., Edelman, E., Hasinger, M., Loibner, A.P. (2012): Comprehensive GC²/MS for the monitoring of aromatic tar oil constituents during biodegradation in a historically contaminated soil. *Journal of Biotechnology*, **157**: 460-466.
- Von Netzer, F., Pilloni, G., Kleindienst, S., Krüger, M., Knittel, K., Gründger, F. (2013): Enhanced gene detection assays for fumarate-adding enzymes allow uncovering anaerobic hydrocarbon degraders in terrestrial and marine systems. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**: 543-552.
- Wange, M. (2008): Isotopenbiogeochemische Erkundung von methanogenen Prozessen am Standort Gölzau. Master Thesis. Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ). Leipzig.
- Wershaw, R.L. (1998): Molecular aggregation of humic substances. *Soil Science*, **164**: 803-813.
- Widdel, F., Bak, F. (1992): Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. (Hrsg.): *The Prokaryotes*. 3352-3378. 2. Auflage. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Wiedemeier, T.H., Rifai, H.S., Newell, C.J., Wilson, J.T. (1999): Natural attenuation of fuels and chlorinated solvents in subsurface. 1. Auflage. John Wiley & Sons, New York.
- Willems, M.I., Dubois, G., Boyd, D.R., Davies, R.J.H., Hamilton, L., McCullough, J.J., van Bladeren, P.J. (1992): Comparison of the mutagenicity of quinoline and all monohydroxyquinolines with a series of arene oxide, trans-dihydro, diol epoxide, N-oxide and arene hydrate derivatives of quinoline in the Ames/Salmonella microsome test. *Mutation Research*, **278**: 227-236.
- Williams, A.J. (2008): A perspective of publicly accessible/open-access chemistry databases. *Drug Discovery Today*, **13**: 495-501.
- Winderl, C., Schaefer, S., Lueders, T. (2007): Detection of anaerobic toluene and hydrocarbon degraders in contaminated aquifers using benzylsuccinate synthase (bssA) genes as a functional marker. *Environmental Microbiology*, **9**: 1035-1046.

- Winderl, C., Anneser, B., Griebler, C., Meckenstock, R.U., Lueders, T. (2008): Depth-resolved quantification of anaerobic toluene degraders and aquifer microbial community patterns in distinct redox zones of a tar oil contaminant plume. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**: 792-801.
- Wisotzky, F., Eckert, P. (1997): Sulfat-dominiertes BTEX-Abbau im Grundwasser eines ehemaligen Gaswerksstandortes. *Grundwasser*, **2**: 11-20.
- Wolf, S., Schmidt, S., Müller-Hannemann, M., Neumann, S. (2010): In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra. *BMC Bioinformatics*, **11**: 148-150.
- Yamashita, M., Fenn, J.B. (1984a): Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry*, **88**: 4451-4459.
- Yamashita, M., Fenn, J.B. (1984b): Negative ion production with the electrospray ion source. *The Journal of Physical Chemistry*, **88**: 4671-4675.
- Young, L.Y., Phelps, C.D. (2005): Metabolic biomarkers for monitoring in situ anaerobic hydrocarbon degradation. *Environmental Health Perspectives*, **113**: 62-67.
- Zamfirescu, D., Grathwohl, P. (2001): Occurrence and attenuation of specific organic compounds in the groundwater plume at a former gasworks site. *Journal of Contaminant Hydrology*, **53**: 407-427.
- Zedda, M., Zwiener, C. (2012): Is nontarget screening of emerging contaminants by LC-HRMS successful? A plea for compound libraries and computer tools. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **403**: 2493-2502.
- Zhang, X., Young, L.Y. (1997): Carboxylation as the initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 4759-4764.
- Zhang, X., Sullivan, E.R., Young, L.Y. (2000): Evidence for aromatic ring reduction in the biodegradation pathway of carboxylated naphthalene by a sulfate reducing consortium. *Biodegradation*, **11**: 117-124.
- Zhang, T., Bain, T.S., Nevin, K.P., Barlett, M.A., Lovley, D.R. (2012): Anaerobic benzene oxidation by *Geobacter* species. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**: 8304-8310.
- Zwiener, C., Frimmel, F.H. (1998): Application of headspace GC/MS screening and general parameters for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in groundwater samples. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **360**: 820-823.

-
- Zwiener, C., Kumke, M.U., Abbt-Braun, G., Frimmel, F.H. (1999): Adsorbed and bound residues in fulvic acid fractions of a contaminated groundwater - Isolation, chromatographic and spectroscopic characterization. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, **27**: 208-213.
- Zwiener, C., Frimmel, F.H. (2004a): LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment - a critical review. Part I: Instrumentation and general aspects of analysis and detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **378**: 851-861.
- Zwiener, C., Frimmel, F.H. (2004b): LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment technology - a critical review. Part II: Applications for emerging contaminants and related pollutants, microorganisms and humic acids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **378**: 862-874.

8. Verzeichnis der Symbole und Abkürzungen

8.1 Symbole

c	Molare Konzentration in mol/L, mmol/L, $\mu\text{mol/L}$ oder nmol/L
e	Elementarladung
E_{H}	Redoxpotential in mV
K_{OW}	Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizient
m	Masse in kg
R	Massenauflösung
s	Länge des Flugrohrs in m
t	Flugzeit in s
T	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$
U	Spannung in V
V	Volumen in μL , mL oder L
V_0	Ausschlussvolumen in mL
V_{P}	Permeationsvolumen in mL
V_{R}	Elutionsvolumen in mL
z	Ladungszahl
λ	Wellenlänge in nm
λ_{em}	Emissionswellenlänge in nm
λ_{ex}	Extinktionswellenlänge in nm
ρ	Massenkonzentration in mg/L oder $\mu\text{g/L}$
$p\epsilon$	Standard-Elektro negativität
σ	Elektrische Leitfähigkeit in $\mu\text{S/cm}$

8.2 Abkürzungen

5-AS	5-Acenaphthensäure
2-BFS	2-Benzofuransäure
2-BTS	2-Benzothiophensäure
5-BTS	5-Benzothiophensäure
4-HMBS	4-Hydroxy-3-methylbenzoesäure
2-IS	2-Indansäure
2-NS	2-Naphthoesäure
amu	<i>Atomic Mass Unit</i>

APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionisation</i> (Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck)
AS	Acenaphthensäure
assA	<i>Alkylsuccinate Synthase</i>
BBS	Benzylbernsteinsäure
BFMBS	Benzofuranmethylbernsteinsäure
BFS	Benzofuransäure
BS-d5	Benzoessäure-d5
bssA	<i>Benzylsuccinate Synthase</i>
BTEX	Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylol-Isomere
BTMBS	Benzothiophenmethylbernsteinsäure
BTS	Benzothiophensäuren
C ₂ -BBS	C ₂ -Benzylbernsteinsäure
C ₂ -HBS	C ₂ -Hydroxybenzoessäure
C ₃ -HBS	C ₃ -Hydroxybenzoessäure
cDOC	chromatographierbarer Anteil des DOC
CE	<i>Collision Energy</i> (Kollisionsenergie)
CI	<i>Chemical Ionisation</i> (Chemische Ionisierung)
CID	<i>Collision Induced Dissociation</i> (kollisionsinduzierte Fragmentierung)
CL	Cosubstratlösung
C-MLW	<i>Conventional Multi-Level-Well</i> (konventioneller Multi-Level Brunnen mit einer vertikale Auflösung der Probenahme von 0,5 bis 1 m)
CSIA	<i>Compound Specific Isotope Analysis</i> (Stabile-Isotopenfraktionierung-Analyse)
DHBTS	Dihydrobenzothiophensäure
CPS	<i>Counts Per Second</i>
CXP	<i>Collision Cell Exit Potential</i>
DNAPL	<i>Dense Non Aqueous Phase Liquids</i> (Schwerlösliche Schadstoffphasen mit höherer Dichte als Wasser)
DOC	<i>Dissolved Organic Carbon</i> (gelöster organischer Kohlenstoff)
DP	<i>Declustering Potential</i>
EI	<i>Electron Impact Ionisation</i> (Elektronenstoß-Ionisierung)
EIC	<i>Extracted Ion Chromatogram</i>
ENA	<i>Enhanced Natural Attenuation</i> (Stimulierte natürliche Schadstoffminderungsprozesse)
EP	<i>Entrance Potential</i>
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> (Amerikanische Umweltbehörde)
ESI	Elektrospray-Ionisierung (<i>Elektrospray Ionisation</i>)
EU	Europäische Union
FS	Fulvinsäuren
FS-Fraktion	Fulvinsäure-Fraktion
FP	<i>Focusing Potential</i>

FTICR-MS	<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry</i>
GC-C-IRMS	<i>GC-Combustion-Isotope Ratio Mass Spectrometry</i> (Stabilisotopen-Massenspektrometrie)
GC-MS	<i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i> (Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie)
Gew.-%	Gewichtsprozent
HMBBS	Hydroxymethylbenzylbernsteinsäure
HMBS	Hydroxymethylbenzoesäure
HMN	2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HR-MLW	<i>High Resolution-Multi Level Well</i> (hochauflösender Multi-Level Brunnen mit einer maximalen vertikalen Auflösung der Probenahme von nur 3 cm)
HS	Huminsäuren
HS-Fraktion	Huminsäure-Fraktion
IS	Indansäure
LC	<i>Liquid Chromatography</i> (Flüssigkeitschromatographie)
LC-MS	<i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i> (Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie)
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry</i> (Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandemmassenspektrometrie)
LC-QTOF-MS	<i>Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry</i> (Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Quadrupol-Flugzeitmassenspektrometrie)
LC-UV/DOC	<i>Liquid Chromatography-Ultraviolet Absorbance/Organic Carbon Detection</i> (Flüssigkeitschromatographie mit anschließender UV-Detektion und Messung des organischen Kohlenstoffs)
LNAPL	<i>Light Nonaqueous Phase Liquids</i> (Schwerlösliche Schadstoffphasen mit geringer Dichte als Wasser)
MBBS	Methylbenzylbernsteinsäure
MBS	Methylbenzoesäure
MBTS	Methylbenzothiophensäure
MFE	<i>Molecular Feature Extractor</i> (Tool in der Software MassHunter der Fa. Agilent)
MKW	Mineralölkohlenwasserstoffe
MNA	<i>Monitored Natural Attenuation</i> (überwachte natürliche Schadstoffminderungsprozesse)
MNMBS	Methylnaphthyl-2-methylbernsteinsäure
MNS	Methylnaphthoesäure
M	Molekül
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
mRNA	<i>messenger Ribonucleic Acid</i>

MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Massenspektrometrie)
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i> (Tandemmassenspektrometrie)
m/z	Masse zu-Ladungsverhältnis
NA	<i>Natural Attenuation</i> (Natürliche Schadstoffminderungsprozesse)
NAPL	<i>Nonaqueous Phase Liquids</i> (schwerlösliche Schadstoffphasen)
NHS	Nicht-Huminstoffe
NIST	GC-MS Datenbank mit Massenspektren des <i>National Institute of Standards and Technology</i> (Gaithersburg, MD, USA)
NLS	<i>Neutral-Loss-Scans</i>
NMBS	Naphthyl-2-methylbernsteinsäure
NMeBS	Naphthyl-2-methylenbernsteinsäure
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (kernmagnetische Resonanz)
NN	Normalnull
NS	Naphthoesäuren
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PIS	<i>Product-Ion-Scans</i>
ppm	<i>Parts Per Million</i>
PrIS	<i>Precursor-Ion-Scans</i>
ROSIG	Refraktäre organische Säuren im Grundwasser
RT	<i>Retention Time</i> (Retentionszeit)
Q1, Q2, Q3	Quadrupole
QTOF-MS	<i>Quadrupole Time-of-flight Mass Spectrometry</i> (Quadrupol Flugzeit-Massenspektrometrie)
S/N	<i>Signal-to-Noise Ratio</i> (Signal-zu-Rausch Verhältnis)
SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i> (Größenausschlusschromatographie)
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Festphasenanreicherung)
TEA	Terminale Elektronenakzeptoren
THNS	Tetrahydronaphthoesäure
TIC	<i>Total Ion Chromatogram</i>
TOF	<i>Time-of-Flight Mass Spectrometry</i> (Flugzeit-Massenspektrometrie)
UV	Ultraviolett
Vol.-%	Volumenprozent
XAD8	Hydrophobes, aromatisches Methylmethacrylat Copolymer

9. Verzeichnis der Abbildungen

- Abbildung 2.1:** Typische Schadstoffe an mit Teeröl kontaminierten Standorten und deren Wasserlöslichkeiten (berechnet). Bei PAK und Heterozyklen sind ausgewählte Substanzen dargestellt. Da nicht für alle Verbindungen experimentell ermittelte Wasserlöslichkeiten verfügbar sind, sind hier aus Gründen der Vergleichbarkeit für alle Substanzen berechnete Wasserlöslichkeiten angegeben. Diese sind mit dem Programm WATERNT v1.01 (EPI Suite, US EPA) ermittelt worden, was diese auf Grundlage von Konstanten für molekulare Fragmente berechnet. Ein für die BTEX beispielhaft durchgeführter Vergleich mit Literaturdaten ergab gute Übereinstimmungen (z.B. Mackay und Shiu 1981): $\rho(\text{Benzol}) = 1770\text{mg/L}$, $\rho(\text{Toluol}) = 515\text{ mg/L}$, $\rho(\text{Ethylbenzol}) = 152\text{ mg/L}$, $\rho(\text{Xylol}) = 175\text{-}185\text{ mg/L}$ 8
- Abbildung 2.2:** NA-Prozesse am Beispiel eines mit Mineralöl kontaminierten Standortes (aus: Schüth 1994)..... 11
- Abbildung 2.3:** Schematische Darstellung des mikrobiologischen Abbaus und der Bildung von Redoxzonen in einem kontaminierten Aquifer (nach: Lovley 2001)..... 12
- Abbildung 2.4:** Wichtige Aktivierungsreaktionen beim anaeroben Abbau von Aromaten (Rabus und Widdel 1995, Biegert et al. 1996, Zhang und Young 1997, Krieger et al. 1999, Johnson et al. 2001, Safinowski und Meckenstock 2006, Davidova et al. 2007).. 17
- Abbildung 2.5:** Anaerobe mikrobielle Abbauege der BTEX (Chakraborty und Coates 2004, Griebler et al. 2004, Ulrich et al. 2005, Heider 2007)..... 18
- Abbildung 2.6:** Stöchiometrie des Abbaus von Toluol unter verschiedenen Redoxbedingungen sowie deren Redox-Halbreaktionen in Beziehung zur Standard-Elektronenaktivität p_e bei pH 7 (modifiziert von Stumm und Morgan 1996). 19
- Abbildung 2.7:** Anaerobe Abbauege und Aktivierungsschritte von PAK und Heterozyklen (Johansen et al. 1997, Zhang et al. 2000, Annweiler et al. 2001, Gieg und Suflita 2002, Young und Phelps 2005, Safinowski und Meckenstock 2006, Davidova et al. 2007). 21
- Abbildung 2.8:** Schema der ESI im positiven Modus (nach Budzikiewicz und Schäfer 2005 und Gross et al. 2007). 39
- Abbildung 2.9:** Schematischer Aufbau eines Tandem Massenspektrometers ("Triple-Quad") mit ESI (aus Budzikiewicz und Schäfer 2005). 1. ESI-Kapillare, 2. ESI-Spray, 3. geheizte Transferkapillare, 4. Skimmer, 5. Skimmer-CID-Region, 6. erster Quadrupol, 7. Quadrupol, der als Kollisionszelle fungiert, 8. dritter Quadrupol, 9. Ablenkelektrode und Konversionsdynode, 10. Detektion mit einem Sekundärelektronenvervielfacher.... 40

Abbildung 2.10: Die wichtigsten Experimente, die mit einem Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) durchgeführt werden können.....	41
Abbildung 2.11: Aufbau eines Quadrupole-Time-of-Flight-Massenspektrometers (QTOF-MS) der Firma Agilent (Abbildung aus Produktbroschüre der Firma Agilent des QTOF-MS-Modells 6530).....	42
Abbildung 2.12: Typische Schritte vom Screening (Suspect-Screening und Non-Target-Screening) bis zur Identifizierung von Substanzen (nach Krauss et al. 2010, Martinez Bueno et al. 2012, Zedda und Zwiener 2012).	48
Abbildung 2.13: LC-UV/DOC-Chromatogramme der unterschiedlichen Huminstoff-Fractionen aus dem Hohlohsee (HO16 HA: Huminsäuren, HO16 FA: Fulvinsäuren) sowie des Seewassers (HO16 G) der Probenahme HO16. (Frimmel et al. 2002).	55
Abbildung 3.1: A: Schematischer Überblick über das Probenahmegebiet im ehemaligen Gaswerksstandort Düsseldorf-Flingern. B: Vertikaler Querschnitt des Aquifers und Lage des hochauflösenden Multi-Level Brunnens (HR-MLW). C: Detaillierte Ansicht des Probenahmesystems (nach: Anneser et al. 2008b).....	58
Abbildung 3.2: Schematischer Überblick über den ehemaligen Gaswerksstandort Stuttgart mit Probenahmebrunnen, wichtigsten Schadensherden und Lage der Teerölphase (grauer Bereich). B22 und B53 zeigen die Lage der Probenahmebrunnen aus denen die Proben für die Huminstoffanreicherung genommen wurden (nach Zamfirescu und Grathwohl 2001).	61
Abbildung 3.3: Lage der Probenahmebrunnen auf dem Untersuchungs Gelände Weißandt-Gölzau (quaternärer Grundwasserleiter). Die viereckig umrandeten Probenahmebrunnen wurden zur Probenahme von jeweils 100 L Grundwasser zur Huminstoffanreicherung genutzt. An den eingekreisten Probenahmebrunnen wurden jeweils 250 mL Grundwasser zur Metabolitenanalytik entnommen. Der graue Bereich zeigt die Kontamination des Grundwassers mit Toluol an.....	63
Abbildung 3.4: Schematische Aufteilung des Probevolumens zu den einzelnen Messungen bei einer Probenahme von 6 mL aus den Batch-Gefäßen.....	68
Abbildung 3.5: Darstellung der durchgeführten Schritte zur Ermittlung der Summenformeln der intensivsten Peaks aus den NLS am Beispiel von Peak 19 aus den Daten des Totalionenstroms (TIC) der LC-ESI-QTOF-MS-Messungen (MS-only) von B22 FS. ...	75
Abbildung 3.6: Ablauf der SPE-Anreicherung.	83
Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Huminstoffanreicherung.	85
Abbildung 4.1: Ansatz zum Screening und zur Identifizierung von sauren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten in den Huminstoff-Isolaten aus dem Aquifer in Stuttgart.	87

- Abbildung 4.2:** Typische LC-ESI-MS/MS-Fragmentspektren (Product-Ion-Scans bei einer Kollisionsenergie von $CE = 20 \text{ eV}$) von Standards aromatischer (A) und heterozyklischer Säuren (D) sowie aromatischer Bernsteinsäuren (B, C) am Beispiel von 2-NS (A), BBS (B), NMBS (C) und 2-BTS (D). In den Strukturformeln ist die Fragmentierung angedeutet (gepunktete Linie).. 89
- Abbildung 4.3:** Chromatogramme der NLS $\Delta m/z = 44$ (A und B) und $\Delta m/z = 116$ (C) der unterschiedlichen FS-Fractionen aus dem Aquifer in Stuttgart (Probenahmestellen: B22 und B53) und MilliQ. Scan-Bereiche: $m/z = 140-200$ (A) und $m/z = 200-260$ (B und C). Die intensivsten Peaks sind durchnummeriert (A und B) und über den Peaks die Masse (m/z) der jeweiligen Vorläufer-Ionen sowie die Retentionszeit (in Klammern) angegeben (A, B und C). 91
- Abbildung 4.4:** Identifizierung von Metaboliten in B22 FS durch den Vergleich ihrer LC-ESI-QTOF-MS Fragmentspektren (grau) mit den Spektren von entsprechenden Standards (schwarz) (beispielhaft bei einer $CE = 10 \text{ eV}$). 98
- Abbildung 4.5:** Vergleich der LC-ESI-QTOF-MS Fragmentspektren (beispielhaft bei einer $CE = 10 \text{ eV}$) von potentiellen Metaboliten (grau) mit strukturähnlichen (mit Standards) identifizierten Metaboliten (schwarz) in B22 FS. 100
- Abbildung 4.6:** LC-ESI-QTOF-MS-Fragmentspektren ($CE = 10 \text{ eV}$ und $CE = 20 \text{ eV}$) der Peaks 3 (A), 4 (B), 5 (C), 6 (D), 7 (E) und 8 (F), die auf eine homologe Reihe aus alkylierten und hydroxylierten Benzoesäuren hindeuten. 102
- Abbildung 4.7:** Ansatz zum Screening, zur Identifizierung und zur Quantifizierung von sauren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten in den Grundwasserproben aus dem Aquifer in Düsseldorf. 106
- Abbildung 4.8:** Darstellung typischer Fragmentspektren aromatischer Säuren und Bernsteinsäuren am Beispiel der im Aquifer in Düsseldorf identifizierten Metabolite 2-NS und NMBS. Die Metabolite wurden vorher derivatisiert (Säuremethylester). 109
- Abbildung 4.9:** GC-MS Fragmentspektren saurer veresterter Metabolite aus dem Aquifer in Düsseldorf. A: MBBS, B: C2-BBS, C: THNS, D: MNS, E: BFMBS, F: BTMBS, G: DHBTS. 110
- Abbildung 4.10:** Vergleich von GC-MS Fragmentspektren zwischen mit Standards identifizierten Metaboliten (2-NS, NMBS, 2-BTS) und entsprechenden methylierten Verbindungen (MNS, MNMBS, MBTS) aus Proben aus dem Aquifer in Düsseldorf. A: 2-NS und MNS. B: NMBS und MNMBS C: 2-BTS und MBTS 112
- Abbildung 4.11:** Chromatogramme der Metabolite aus dem Gaswerksstandort Düsseldorf in der MRM Methode. Die Chromatogramme stammen von der jeweiligen Probe aus dem Aquifer mit der höchsten Konzentration des jeweiligen Metaboliten. 114

- Abbildung 4.12:** Verlauf der Fe(II)-Konzentration bei anaeroben Abbaupversuchen mit Toluol als Substrat und der eisenreduzierenden Bakterienkultur *G. toluenoxydans* TMJ1. Bedingungen: Überführung von 5 mL Bakterienkultur als Inoculum, keine Zugabe von Cometaboliten, Verwendung von Toluol als Substrat und Inkubation bei 30 °C im Dunkeln..... 118
- Abbildung 4.13:** Verlauf der Fe(II)-Konzentration bei anaeroben Abbaupversuchen mit Toluol als Substrat und der eisenreduzierenden Bakterienkultur *G. toluenoxydans* TMJ1 unter Variation der Temperatur. Bedingungen: Überführung von 5 mL Bakterienkultur als Inoculum, keine Zugabe von Cometaboliten, Verwendung von Toluol als Substrat und Inkubation bei 10 °C im Dunkeln..... 119
- Abbildung 4.14:** Verlauf der Fe(II)-Konzentration (A) und der Konzentration an BBS an ausgewählten Zeitpunkten (B) bei anaeroben Abbaupversuchen mit Toluol als Substrat und der eisenreduzierenden Bakterienkultur *G. toluenoxydans* TMJ1. Bedingungen: Überführung von 5 mL Bakterienkultur als Inoculum, keine Zugabe von Cometaboliten, Verwendung von Toluol als Substrat und Inkubation bei 30 °C im Dunkeln..... 121
- Abbildung 4.15:** Verlauf der Fe(II)-Konzentration bei anaeroben Abbaupversuchen mit BBS oder Toluol als Substrat und der eisenreduzierenden Bakterienkultur *G. toluenoxydans* TMJ1. Bedingungen: Überführung von 5 mL Bakterienkultur als Inoculum, keine Zugabe von Cometaboliten, Inkubation bei 30 °C im Dunkeln. 123
- Abbildung 4.16:** Verlauf der Fe(II)-Konzentration (A) der Toluol-Konzentration (B) und der Konzentration an BBS (C) bei anaeroben Abbaupversuchen mit Toluol als Substrat und der eisenreduzierenden Bakterienkultur *G. toluenoxydans* TMJ1 unter Zugabe von verschiedenen organischen Schadstoffmischungen gelöst in HMN. Bedingungen: Überführung von 1 mL Bakterienkultur als Inoculum, Verwendung von Toluol als Substrat und Inkubation bei 30 °C im Dunkeln: Weitere Ergebnisse und Anmerkungen siehe Abbildung 4.17..... 125
- Abbildung 4.17:** Verlauf der Fe(II)-Konzentration (A,) der Toluol-Konzentration (B) und der Konzentration an BBS (C) bei anaeroben Abbaupversuchen mit Toluol als Substrat und der eisenreduzierenden Bakterienkultur *G. toluenoxydans* TMJ1 unter Zugabe von verschiedenen organischen Schadstoffmischungen gelöst in HMN. Bedingungen: Überführung von 1 mL Bakterienkultur als Inoculum, Verwendung von Toluol als Substrat und Inkubation bei 30 °C im Dunkeln..... 126
- Abbildung 4.18:** Chromatogramme der NLS $\Delta m/z = 116$ der verschiedenen Batch-Experimente der 1. Cometabolismusserie. Es wurden die Proben der Probenahme 10 Tage nach Beginn des Experimentes gemessen. Neben den Peaks ist die Masse (m/z) des Vorläufer-Ions und die Retentionszeit (min) in Klammern angegeben. 130

- Abbildung 4.19:** Verlauf der Fe(II)-Konzentrationen bei anaeroben Abbauprobungen mit Toluol als Substrat und der eisenreduzierenden Bakterienkultur *G. toluenoxydans* TMJ1 unter Zugabe von verschiedenen einzelnen aromatischen und heterozyklischen Schadstoffen. Bedingungen: Überführung von 1 mL Bakterienkultur als Inoculum, Verwendung von Toluol als Substrat und Inkubation bei 30 °C im Dunkeln. 131
- Abbildung 4.20: Identifizierte** und weitgehend identifizierte Metabolite in den Huminstoff-Isolaten aus dem Aquifer in Stuttgart und den Grundwasserproben aus dem Aquifer in Düsseldorf. 134
- Abbildung 4.21:** Vertikale Konzentrationsprofile von ausgewählten PAK (A), BTEX-Komponenten (B), den summarischen Parametern EPA-PAK (16 PAK, die von der amerikanischen Umweltbehörde (EPA) als prioritär ausgewählt wurden) und BTEX (C), sowie Heterozyklen (D) in den Proben aus dem HR-MLW aus dem Aquifer in Düsseldorf. Die Messdaten wurden dankenswerterweise vom Institut für Grundwasserökologie in München (Prof. Meckenstock) und vom Institut für Environmental Chemistry der EAWAG in Dübendorf (Prof. Hollender) zur Verfügung gestellt. 137
- Abbildung 4.22:** Vertikale Konzentrationsprofile ausgewählter Metabolite. A: aromatische und heterozyklische Säuren; B: aromatische Bernsteinsäuren. Die maximalen Konzentrationen sind in Klammern angegeben. 138
- Abbildung 4.23:** Boxplots der molaren Konzentrationsverhältnisse (in Prozent) ausgewählter Metabolite mit deren jeweiligen Ausgangsschadstoffen der Proben aus dem HR-MLW in Düsseldorf. Die Berechnung erfolgte für jeden vertikalen Probenahmepunkt. 140
- Abbildung 4.24:** Vergleich der vertikalen Konzentrationsprofile ausgewählter Metabolite mit deren Ausgangsschadstoffen in den Proben aus dem HR-MLW in Düsseldorf. Die maximalen Konzentrationen sind in Klammern angegeben. 143
- Abbildung 4.25:** Vergleich der vertikalen Konzentrationsprofile ausgewählter Metabolite mit deren Ausgangsschadstoffen in den Proben aus dem HR-MLW in Düsseldorf. Die maximalen Konzentrationen sind in Klammern angegeben. 144
- Abbildung 4.26:** Prozentuale Verteilung des gesamten Kohlenstoffgehaltes auf die unterschiedlichen Huminstoff-Fraktionen (Kohlenstoffbilanz) bei der Huminstoffanreicherung des Wassers aus dem Hohlohsee (HO27). Die DOC-Konzentration der Ausgangslösung ist in Klammern angegeben. 150
- Abbildung 4.27:** Prozentuale Verteilung des gesamten Kohlenstoffgehaltes auf die unterschiedlichen Huminstoff-Fraktionen (Kohlenstoffbilanz) bei der Huminstoffanreicherung der unterschiedlichen Wässer des Aquifers in Gölzau. A: GWM15 (Abstrombereich). B: G10 (kontaminierter Bereich). Die DOC-Konzentrationen der Ausgangslösungen sind in Klammern angegeben. 151

Abbildung 4.28: LC-UV/DOC-Chromatogramm der FS-Fraktion aus dem Hohlohsee (HO27).....	155
Abbildung 4.29: LC-UV/DOC-Chromatogramme der FS-Fraktionen aus den Aquifer in Fuhrberg (A) und Bocholt (B).	156
Abbildung 4.30: LC-UV/DOC-Chromatogramme der FS-Fraktionen aus dem kontaminierten Aquifer in Stuttgart. A: B22 FS (kontaminierter Bereich), B: B53 FS (Abstrombereich).....	157
Abbildung 4.31: LC-UV/DOC-Chromatogramme der FS-Fraktionen aus dem kontaminierten Aquifer in Gölzau. A: G10 (kontaminierter Bereich), B: GWM15 (Abstrombereich).	158
Abbildung 4.32: LC-DOC-Chromatogramme (relative Intensität der DOC-Signale) aller in dieser Arbeit untersuchten FS-Fraktionen. Das maximale DOC-Signal in jeder Probe ist jeweils auf 100% gesetzt worden. Da immer die gleiche Menge an FS-Isolat gelöst wurde sind die DOC-Konzentration der verschiedenen FS-Lösungen (siehe Tabelle 4.4) und der absolute Gehalt an DOC auf der SEC-Säule bei allen Messungen ähnlich hoch.....	159
Abbildung 4.33: cDOC (in %) bei den in dieser Arbeit mit LC-UV/DOC gemessenen FS- und HS-Isolaten. Für das Grundwasser aus Bocholt und die Abstromprobe aus dem Aquifer in Stuttgart (B53) standen keine HS-Isolate zur Verfügung.	161
Abbildung 4.34: Van-Krevelen-Diagramm mit typischen aromatischen und heterozyklischen Schadstoffen in Teeröl (siehe Abbildung 2.1 in Kapitel 2.1) und potentiellen sauren Metaboliten (Suspects, siehe Tabelle A.7 im Anhang). Die graue Fläche markiert den ermittelten typischen Bereich für saure aromatische und heterozyklische Metabolite im Van-Krevelen-Diagramm.	165
Abbildung 4.35: Van-Krevelen-Diagramme der intensivsten Peaks (LC-ESI-QTOF-MS-Messungen) in den FS-Isolaten aus dem kontaminierten Aquifer in Stuttgart: B22 FS: kontaminierter Bereich, B53 FS: Abstrombereich, B22 FS + B53 FS: Peaks die in beiden Bereichen vorkommen. Teil B zeigt den typischen Bereich für saure aromatische und heterozyklische Metabolite (siehe Abbildung 4.34) in dem die (weitgehend) identifizierten Metabolite in B22 FS (siehe Kapitel 4.1.1.3) den jeweiligen Punkten im Diagramm zugeordnet worden sind.....	166
Abbildung 4.36: Van-Krevelen-Diagramme der intensivsten Peaks (LC-ESI-QTOF-MS-Messungen) in Grundwasserproben aus dem kontaminierten Aquifer in Düsseldorf: C33: Oberer Rand der Schadstofffahne, E1: Unterhalb der Schadstofffahne, C33 + E1: Peaks, die in beiden Proben gefunden wurden. Teil B zeigt den typischen Bereich für saure aromatische und heterozyklische Metabolite in dem die in Kapitel 4.1.2 (weitgehend) identifizierten Metabolite in C33 den Punkten im Diagramm zugeordnet worden sind.....	169

- Abbildung A.1:** Vertikale Gradienten von ausgewählten geochemischen Parametern in den Proben aus dem HR-MLW aus dem Aquifer in Düsseldorf. Der graue Bereich zeigt die vertikale Ausdehnung der BTEX-Schadstofffahne an. Die Messdaten wurden dankenswerterweise vom Institut für Grundwasserökologie in München (Prof. Meckenstock) und vom Institut für Environmental Chemistry der EAWAG in Dübendorf (Prof. Hollender) zur Verfügung gestellt. 223
- Abbildung A.2:** Einordnung von *Geobacter toluenoxydans* TMJ1 in die phylogenetische Klassifikation der Gattung *Geobacter* (aus: Kunapuli et al. 2010). Die Zahlen in Klammern geben die Nummern in der GenBank des National Institutes of Health der USA an. Weitere Informationen zur Abbildung sind in Kunapuli et al. (2010) zu finden. 224
- Abbildung A.3:** Chromatogramme der NLS $\Delta m/z = 44$ (A und B) und $\Delta m/z = 116$ (C) der HS-Fraktion aus dem Aquifer in Stuttgart B22. Scan-Bereiche: m/z 140-200 (A) und m/z 200-260 (B und C). Über den Peaks sind die Massen (m/z) der jeweiligen Vorläufer-Ionen sowie die Retentionszeit (in Klammern) angegeben. 229
- Abbildung A.4:** Chromatogramme der NLS $\Delta m/z = 44$ (A und B) und $\Delta m/z = 116$ (C) der FS-Fraktion aus dem Hohlohsee (HO27). Scan-Bereiche: m/z 140-200 (A) und m/z 200-260 (B und C). 230
- Abbildung A.5:** LC-ESI-QTOF-MS-Fragmentspektren (CE = 10 eV) der intensivsten Peaks aus dem NLS $\Delta m/z = 44$ (Scanbereich: $m/z = 140-200$). 231
- Abbildung A.6:** LC-ESI-QTOF-MS-Fragmentspektren (CE = 10 eV) der intensivsten Peaks aus dem NLS $\Delta m/z = 44$ (Scanbereich: $m/z = 200-260$). Anmerkung: Für Peak 15 konnte kein Fragmentspektrum erzeugt werden. 233
- Abbildung A.7:** LC-ESI-MS/MS Fragmentspektren (PIS) (CE = 20 eV) der intensivsten Peaks aus dem NLS $\Delta m/z = 44$ (Scanbereich: $m/z = 140-200$). 234
- Abbildung A.8:** LC-ESI-MS/MS-Fragmentspektren(PIS) (CE = 20 eV) der intensivsten Peaks aus dem NLS $\Delta m/z = 44$ (Scanbereich: $m/z = 200-260$). 236
- Abbildung A.9:** Identifizierung von Peak 3 als 4-Hydroxy-3-methylbenzoesäure durch den Vergleich der LC-ESI-QTOF-MS-Fragmentspektren (grau) mit den Spektren des entsprechenden Standards (schwarz) bei folgenden Kollisionsenergien CE = 10 eV (A), CE = 20 eV (B) und CE = 40 eV (C). 237
- Abbildung A.10:** LC-ESI-QTOF-MS-Fragmentspektren bei verschiedenen Kollisionsenergien (CE = 10 eV und 20 eV) von Standards mit unterschiedlichen potentiellen Metabolitenstrukturen, die alle die gleiche Summenformel $C_9H_{10}O_3$ aufweisen. 2-Hydroxy-3,5-dimethylbenzoesäure (A), 4-Hydroxy-3,5-dimethyl-benzoesäure (B), 3-(4-Hydroxyphenyl)-propansäure (C). 238

Abbildung A.11: GC-MS-Fragmentspektren ausgewählter Metabolite aus der Literatur. A: MBBS) (Beller et al. 1995), B: C2-BBS (Martus und Püttmann 2003), C:THNS (Annweiler et al. 2002), D: MNS (Safinowski et al. 2006), E: BFMBS (Safinowski et al. 2006), F: BTMBS (Safinowski et al. 2006), G: DHBTS (Annweiler et al. 2001)..
.....241

10. Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 2.1: Vor- und Nachteile des Ansatzes der natürlichen Schadstoffminderungsprozesse (NA) (nach Wiedemeier 1999).....	10
Tabelle 2.2: Wichtige terminale Elektronenakzeptoren (TEA) und Abbauprozesse im Aquifer (nach Reineke 2001).....	14
Tabelle 2.3: Vor- und Nachteile von Studien im Laboratorium und im Feld zur Untersuchung von Abbauwegen und Metabolitenbildung.	28
Tabelle 2.4: Anaerobe saure Metabolite, die in Batch-Experimenten im Laboratorium sowie im Feld identifiziert werden konnten. Bei der Detektion der Metabolite im Feld kann nicht bei allen sicher ausgeschlossen werden, dass sie auch aerob gebildet wurden... 30	30
Tabelle 2.5: Beispielhafte Funktionsweise (Massenschaltungen) bei den Mess-Experimenten NLS und PrIS. In Q2 erfolgt die kollisionsinduzierte Fragmentierung (CID).....	42
Tabelle 2.6: Ausgewählte quantitative analytische Messmethoden zur Analytik von polaren aromatischen und heterozyklischen Metaboliten in Feldproben (kontaminiertes Grundwasser).	45
Tabelle 3.1: Entnahmetiefen der Proben aus dem HR-MLW im Aquifer in Düsseldorf bei der Probenahme im Februar 2007. Zum besseren Überblick ist die vertikale Schadstoffverteilung der BTEX und EPA-PAH (16 PAK, die von der amerikanischen Umweltbehörde (EPA) als prioritär ausgewählt wurden) auch dargestellt (links).	60
Tabelle 3.2: Ausgewählte Eigenschaften des Bakterienstammes <i>G. toluenoxydans</i> TMJ1 (aus: Kunapuli et al. 2010).....	65
Tabelle 3.3: Cosubstrat-Mischungen (CM) der 1. Experimentserie. Die Konzentration jedes Cosubstrats lag bei etwa $c(\text{Cosubstrat}) = 6 \text{ mmol/L}$ in den Mischungen.	67
Tabelle 3.4: Ansätze der 1. Experimentserie.	67
Tabelle 3.5: Ansätze der 2. Experimentserie.	67
Tabelle 3.6: Parameter der LC-ESI-MS/MS-Methode (NLS) zum Screening nach sauren Metaboliten von Aromaten und Heterozyklen in den Proben aus dem ehemaligen Gaswerksstandort Stuttgart und den Proben aus den Batch-Experimenten.....	70
Tabelle 3.7: Einstellungen der LC-ESI-QTOF-MS-Messungen (MS-only).....	74
Tabelle 3.8: Einstellungen des Molecular Feature Extractor (MFE) in der Software MassHunter Qualitative Analysis der Fa. Agilent zur Berechnung der akkuraten Massen und Summenformeln der intensivsten Peaks in einer Probe.....	77

Tabelle 3.9: Einstellungen der LC-ESI-QTOF-MS-Messungen (MS-only und Targeted MS-MS).....	78
Tabelle 3.10: Einstellungen der GC-MS zur Messung von Toluol.....	79
Tabelle 3.11: Einstellungen der GC-MS zur Messung von derivatisierten sauren Metaboliten.....	80
Tabelle 3.12: Parameter der durchgeführten LC-UV/DOC Messungen.....	81
Tabelle 4.1: RT und nominelle Massen (M-H) ⁻ der Vorläuferionen aus den NLS $\Delta m/z = 44$ und $\Delta m/z = 116$ (LC-ESI-MS-MS) von B22 FS sowie akkurate Massen mit berechneten Summenformeln aus LC-ESI-QTOF-MS Messungen (MS-only). Die Strukturvorschläge stammen aus dem Abgleich der Summenformeln mit den Summenformeln in der Liste potentieller Metabolite aus der Literatur (Tabelle 2.4 in Kapitel 2.3.1).	95
Tabelle 4.2: Identifizierte und weitgehend identifizierte Metabolite in der FS-Fraktion aus dem kontaminierten Bereich des Aquifers in Stuttgart (B22 FS). Bei einigen Peaks sind Strukturvorschläge angegeben, da eine weitergehende Identifizierung aufgrund der fehlenden Verfügbarkeit adäquater Standards nicht möglich war.....	104
Tabelle 4.3: Identifizierte und weitgehend identifizierte Metabolite in den Grundwasserproben aus dem HR-MLW im Aquifer in Düsseldorf. Die Abweichung der Massengenauigkeit ist immer von der Messung der Probe mit der geringsten Massenabweichung angegeben.....	107
Tabelle 4.4: Gemessene (im Bypass) DOC-Konzentrationen der verschiedenen gelösten FS-Isolate bei den LC-UV/DOC-Messungen.....	154
Tabelle A.1: Verwendete Chemikalien mit Summenformeln und Herstellerangaben.	221
Tabelle A.2: Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Feldstandorte.....	222
Tabelle A.3: Parameter der LC-ESI-MS/MS-Methode (PIS) zur Ermittlung von Fragmentspektren von ausgewählten Standards nach vorheriger HPLC-Trennung.....	225
Tabelle A.4: Parameter der LC-ESI-MS/MS-Methode (PIS) zur Ermittlung von Fragmentspektren von den intensivsten Peaks aus den NLS mit Neutralverlust $\Delta m/z = 44$ (-CO ₂) und $\Delta m/z = 116$ (-C ₂ H ₄ (CO ₂) ₂) in den Proben aus dem ehemaligen Gaswerksstandort Stuttgart und den Proben aus den Batch-Experimenten.....	226
Tabelle A.5: Parameter der LC-ESI-MS/MS-Methode (MRM) zur Quantifizierung von ausgewählten Metaboliten in den Proben aus dem ehemaligen Gaswerksstandort Düsseldorf und dem Feldstandort Weißandt-Gölzau.	227
Tabelle A.6: Parameter der LC-ESI-MS/MS-Methode (MRM) zur Quantifizierung des Metaboliten BBS in den Proben aus den Batch-Experimenten.	228

Tabelle A.7: Potentielle saure Metabolite (Suspects) deren berechnete akkurate Massen beim Suspect Screening in den Grundwasserproben aus Düsseldorf verwendet wurden. Diese Liste basiert auf nachgewiesenen Metaboliten in der Literatur (Tabelle 2.4 in Kapitel 2.3.1) und in anderen Aquiferen. In den einzelnen Substanzklassen sind die potentiellen Metabolite aufsteigend nach dem jeweiligen m/z-Verhältnis sortiert.... 239

Tabelle A.8: Auflistung der Ergebnisse der intensivsten Peaks im FS-Isolat B22 des ehemaligen Gaswerksstandorts in Stuttgart (sortiert nach aufsteigendem H/C-Verhältnis). Von den mit MFE ermittelten 100 höchsten Peaks wurden solche aussortiert, die folgende festgelegte Qualitätskriterien nicht erfüllten (siehe Kapitel 3.3.2.1): Massenabweichung < 3 ppm und Score > 80. Zusätzlich wurden unplausible Summenformeln eliminiert. 242

Tabelle A.9: Auflistung der Ergebnisse der intensivsten Peaks im FS-Isolat B53 des ehemaligen Gaswerksstandorts in Stuttgart (sortiert nach aufsteigendem H/C-Verhältnis). Von den mit MFE ermittelten 100 höchsten Peaks wurden solche aussortiert, die folgende festgelegte Qualitätskriterien nicht erfüllten (siehe Kapitel 3.3.2.1): Massenabweichung < 3 ppm und Score > 80. Zusätzlich wurden unplausible Summenformeln eliminiert. 244

Tabelle A.10: Auflistung der Ergebnisse der intensivsten Peaks in der Grundwasserprobe C33 aus dem ehemaligen Gaswerksstandort in Düsseldorf (sortiert nach aufsteigendem H/C-Verhältnis). Von den mit MFE ermittelten 100 höchsten Peaks wurden solche aussortiert, die folgende festgelegte Qualitätskriterien nicht erfüllten (siehe Kapitel 3.3.2.1): Massenabweichung < 3 ppm und Score > 80. Zusätzlich wurden unplausible Summenformeln eliminiert. 245

Tabelle A.11: Auflistung der Ergebnisse der intensivsten Peaks in der Grundwasserprobe E1 aus dem ehemaligen Gaswerksstandort in Düsseldorf (sortiert nach aufsteigendem H/C-Verhältnis). Von den mit MFE ermittelten 100 höchsten Peaks wurden solche aussortiert, die folgende festgelegte Qualitätskriterien nicht erfüllten (siehe Kapitel 3.3.2.1): Massenabweichung < 3 ppm und Score > 80. Zusätzlich wurden unplausible Summenformeln eliminiert. 247

A. Anhang

Tabelle A.1: Verwendete Chemikalien mit Summenformeln und Herstellerangaben.

Substanz	Summenformel	Hersteller
2-Hydroxy-3,5-dimethylbenzoesäure	C ₉ H ₁₀ O ₃	Sigma Aldrich
2-Naphthoesäure	C ₁₁ H ₈ O ₂	Fluka
2,2,4,4,6,8,8-Heptamethylnonan	C ₁₆ H ₃₄	Alfa Aesar
3-(4-Hydroxyphenyl)butansäure	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	Sigma Aldrich
3-(4-Hydroxyphenyl)propionsäure	C ₉ H ₁₀ O ₃	Sigma Aldrich
4-Hydroxy-3-methylbenzoesäure	C ₈ H ₈ O ₃	Sigma Aldrich
4-Hydroxy-3,5-dimethylbenzoesäure	C ₉ H ₁₀ O ₃	Sigma Aldrich
4-Hydroxyphenylessigsäure	C ₈ H ₈ O ₃	Sigma Aldrich
4-Methylsalicylsäure	C ₈ H ₈ O ₃	Sigma Aldrich
5-Methylisophthalsäure	C ₉ H ₈ O ₄	Sigma Aldrich
Aceton	C ₃ H ₆ O	Merck
Acetonitril	C ₂ H ₃ N	Merck
5-Acenaphthensäure	C ₁₃ H ₁₀ O ₂	Sigma Aldrich
Ammoniumacetat	CH ₃ COONH ₄	Merck
Benzoessäure	C ₇ H ₆ O ₂	Merck
Benzoessäure-d5	C ₇ HD ₅ O ₂	ISOTEC
Benzol	C ₆ H ₆	Merck
2-Benzofuransäure	C ₉ H ₆ O ₃	Aldrich
2-Benzothiophensäure	C ₉ H ₆ O ₂ S	Aldrich
2-Indansäure	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	Sigma Aldrich
Benzylbernsteinsäure	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	Sigma Aldrich
Diethylether	C ₄ H ₁₀ O	Merck
Eisen(II)chlorid-Tetrahydrat	Cl ₂ Fe*4H ₂ O	Merck
Essigsäure	C ₂ H ₄ O ₂	Merck
Ethanol	C ₂ H ₆ O	Merck
Ethylbenzol	C ₈ H ₁₀	Merck
Ferrozin (Dinatrium-4-[3-pyridin-2-yl-6-(4-sulfonato-phenyl)-1,2,4-triazin-5-yl]benzosulfonat)	C ₂₀ H ₁₂ N ₄ Na ₂ O ₆ S ₂ x H ₂ O	Fluka
Furan	C ₄ H ₄ O	Merck
Hexan	C ₆ H ₁₄	Merck
Methanol	CH ₄ O	Merck
Naphthalin	C ₁₀ H ₈	Fluka
Naphthyl-2-methylbernsteinsäure	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	synthetisiert ^x
Natriumhydroxid	NaOH	Merck
Phosphorsäure	H ₃ PO ₄	Merck
Pyridin	C ₅ H ₅ N	Merck
Pyrrol	C ₄ H ₅ N	Merck
Salzsäure	HCl	Merck
Schwefelsäure	H ₂ SO ₄	Merck
Thiophen	C ₄ H ₄ S	Merck
Toluol	C ₇ H ₈	Merck
Toluol-d8	C ₇ D ₈	Merck
Xylole (m-, o-, p-)	C ₈ H ₁₀	Merck

^xNaphthyl-2-methylbernsteinsäure wurden vom Institut für Grundwasserökologie am Helmholtz-Zentrum München (Prof. Meckenstock) synthetisiert (siehe Annweiler et al. 2000) und zur Verfügung gestellt.

Tabelle A.2: Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Feldstandorte.

	Düsseldorf (Kapitel 3.1.1)	Stuttgart ("Testfeld Süd") (Kapitel 3.1.2)	Weißandt-Gölzau (Kapitel 3.1.3)	Hohlohsee (Kapitel 3.1.4)
Beschreibung	Ehemaliges Gaswerksgelände	Ehemaliges Gaswerksgelände	Ehemaliger Industriestandort	Naturbelassener Braunwassersee
Lage	Rheinthal, Düsseldorf-Flingern, Deutschland.	Neckartal, Stuttgart, Deutschland	25 km nordöstlich von Halle an der Saale, Deutschland.	Kaltenbronn, Schwarzwald, Deutschland
Kontamination	Teeröl, PAK, BTEX, Heterozyklen	Teeröl, PAK, BTEX, Phenole, Heterozyklen	MKW, BTEX, Phenole, PAK	Keine
Probenahme	(a) Jeweils 20 mL aus den unterschiedlichen Tiefen des hoch-auflösenden Multi-Level Brunnens (HR-MLW) aus dem kontaminierten Bereich (Anneser et al 2008) (b) Jeweils 20 mL aus verschiedenen Brunnen im Probenahmegebiet	Jeweils 100 L aus dem kontaminierten Bereich (B22) und dem Abstrombereich (B53) (Zwiener et al 1999)	(a) Jeweils 300 L aus dem kontaminierten Bereich (G10) und dem Abstrombereich (GWM 15) (b) Jeweils 20 ml aus verschiedenen Brunnen im Probenahmegebiet	1000 L oberflächennah
Probenvorbereitung/ Anreicherung	Ansäuern mit HCl auf pH2 (a,b)	Huminstoffanreicherung (Zwiener et al 1999)	(a) Huminstoffanreicherung (Kapitel 3.3.7.3) (b) Ansäuern mit HCl auf pH2	Huminstoffanreicherung (Kapitel 3.3.7.3)
Messungen	LC-MS (Kapitel 3.3.1 und 3.3.2) - Suspect-Screening nach Metaboliten mit LC-ESI-QTOF-MS (a,b) - Identifizierung von Metaboliten mit LC-ESI-MS/MS (PIS) (a,b) - Quantifizierung ausgewählter Metaboliten mit LC-ESI-MS/MS (MRM) (a,b) - Ermittlung der 100 intensivsten Peaks mit LC-ESI-QTOF-MS (a)	LC-MS (Kapitel 3.3.1 und 3.3.2) - Screening nach Metaboliten mit LC-ESI-MS/MS (NLS) - Identifizierung von Metaboliten mit LC-ESI-MS/MS (PIS) und LC-ESI-QTOF-MS - Ermittlung der 100 intensivsten Peaks mit LC-ESI-QTOF-MS	LC-MS (Kapitel 3.4.1) Quantifizierung ausgewählter Metaboliten per LC-ESI-MS/MS (MRM) (b) LC-UV/DOC (Kapitel 3.3.5) - Charakterisierung des DOC der Huminstofffraktionen (a)	LC-MS (Kapitel 3.3.2) - Ermittlung der 100 intensivsten Peaks mit LC-ESI-QTOF-MS LC-UV/DOC (Kapitel 3.3.5) - Charakterisierung des DOC der Huminstofffraktionen
	GC-MS (Kapitel 3.3.3) - Identifizierung der Metabolite über Massenspektren (a,b)	LC-UV/DOC (Kapitel 3.3.5) - Charakterisierung des DOC der Huminstofffraktionen		

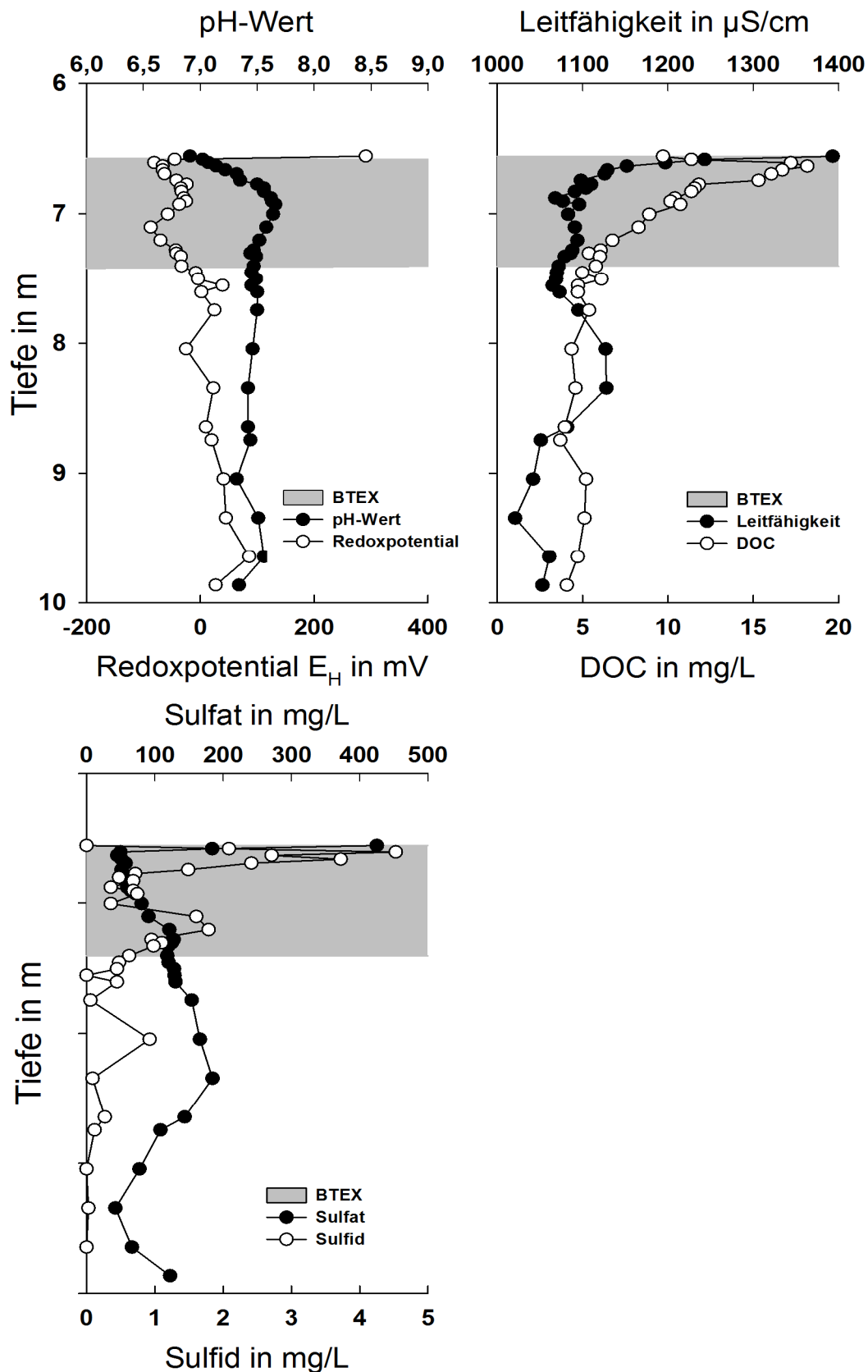


Abbildung A.1: Vertikale Gradienten von ausgewählten geochemischen Parametern in den Proben aus dem HR-MLW aus dem Aquifer in Düsseldorf. Der graue Bereich zeigt die vertikale Ausdehnung der BTEX-Schadstofffahne an. Die Messdaten wurden dankenswerterweise vom Institut für Grundwasserökologie in München (Prof. Meckenstock) und vom Institut für Environmental Chemistry der EAWAG in Dübendorf (Prof. Hollender) zur Verfügung gestellt.

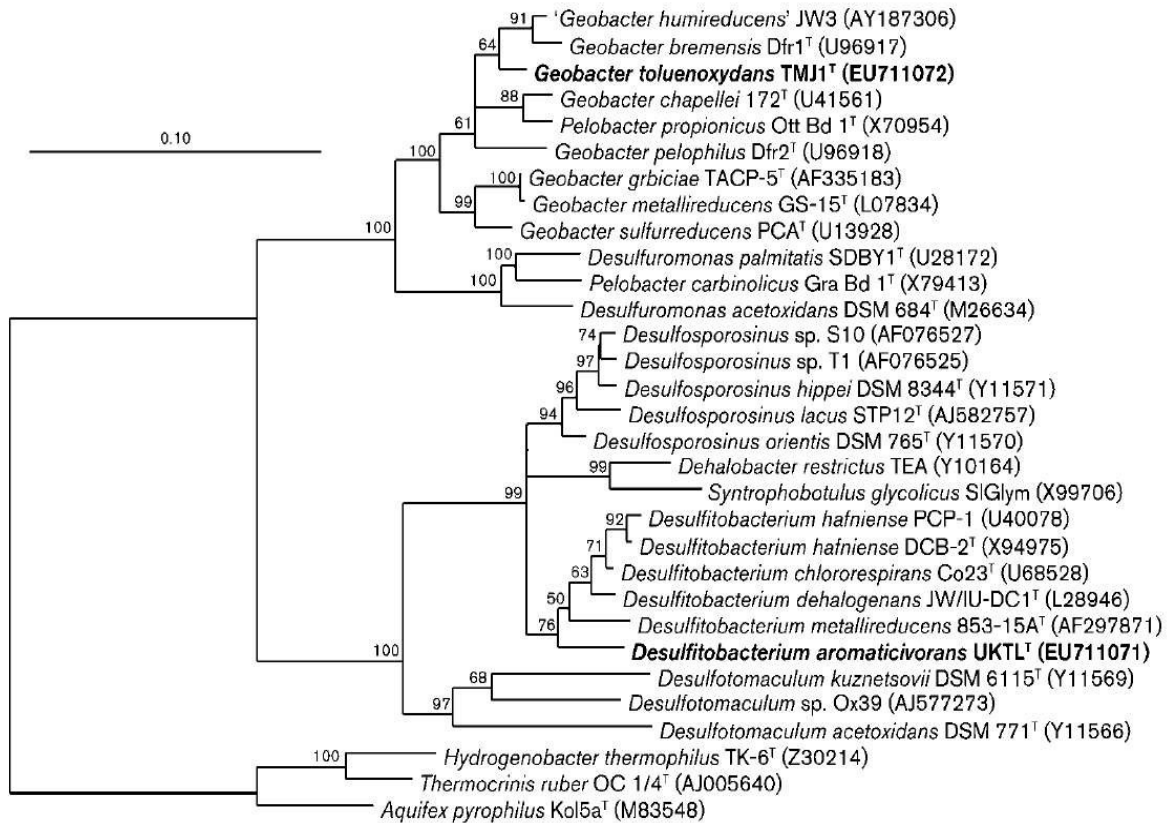


Abbildung A.2: Einordnung von *Geobacter toluenoxydans* TMJ1 in die phylogenetische Klassifikation der Gattung *Geobacter* (aus: Kunapuli et al. 2010). Die Zahlen in Klammern geben die Nummern in der GenBank des National Institutes of Health der USA an. Weitere Informationen zur Abbildung sind in Kunapuli et al. (2010) zu finden.

Tabelle A.3: Parameter der LC-ESI-MS/MS-Methode (PIS) zur Ermittlung von Fragmentspektren von ausgewählten Standards nach vorheriger HPLC-Trennung.

HPLC	Säule:	Nucleodur C18 Pyramid (250 mm x 3 mm, 5 µm Partikel)					
	Säulenofen:	35 °C					
	Fluss:	0,5 mL/min					
	Eluent:	A: MilliQ + 0,1% Essigsäure, B: Acetonitril + 0,1% Essigsäure					
	Injektionsvolumen:	50 µL					
	Gradientenprogramm:	In 35 min von 20% B auf 90% B Post-Time: 10 min mit 20% B					
ESI	Ionisierung-Spannung:	-5500 V					
	Zerstäuber-Gasfluss:	1,5 mL/min					
	Turbo-Gasfluss:	6 L/min					
	Gastemperatur:	450 °C					
	Curtain-Gasfluss:	1.6 L/min					
	Modus:	negativ					
MS/MS	Kollisionsgasdichte:	2,19 x 10 ¹⁷ Moleküle (N ₂)/mL					
	Scan-Rate:	0,71 Spektren/Sekunde					
Analyte	Vorläufer Ion [m/z]	Massenbereich [m/z]	DP [V]	FP [V]	EP [V]	CE [eV]	CXP [V]
2-NS	171,2	50-250	-20	-200	-10		-15
2-BTS	177,1	50-250	-20	-200	-10	Alle mit	-15
5-AS	197,2	50-250	-20	-200	-10	-10	-15
BBS	207,2	50-250	-20	-200	-10	-20	-15
NMBS	257,2	50-260	-20	-200	-10	-30	-15
2-BFS	161,1	50-200	-20	-200	-10	-40	-15
2-IS	161,1	50-200	-20	-200	-10		-15

Tabelle A.4: Parameter der LC-ESI-MS/MS-Methode (PIS) zur Ermittlung von Fragmentspektren von den intensivsten Peaks aus den NLS mit Neutralverlust $\Delta m/z = 44$ ($-\text{CO}_2$) und $\Delta m/z = 116$ ($-\text{C}_2\text{H}_4(\text{CO}_2)_2$) in den Proben aus dem ehemaligen Gaswerksstandort Stuttgart und den Proben aus den Batch-Experimenten.

HPLC	Säule:	Nucleodur C18 Pyramid (250 mm x 3 mm, 5 μm Partikel)					
	Säulenofen:	35 °C					
	Fluss:	0,5 mL/min					
	Eluent:	A: MilliQ + 0,1% Essigsäure, B: Acetonitril + 0,1% Essigsäure					
	Injektionsvolumen:	50 μL					
	Gradientprogramm:	In 35 min von 20% B auf 90% B Post-Time: 10 min mit 20% B					
ESI	Ionisierung-Spannung:	-5500 V					
	Zerstäuber-Gasfluss:	1,5 mL/min					
	Turbo-Gasfluss:	6 L/min					
	Gastemperatur:	450 °C					
	Curtain-Gasfluss:	1,6 L/min					
	Modus	negativ					
MS/MS	Kollisionsgasdichte:	$2,19 \times 10^{17}$ Moleküle (N_2)/mL					
	Scan-Rate:	0,66 Spektren/Sekunde					
	Vorläufer-Ion [m/z]	Massenbereich [m/z]	DP [V]	FP [V]	EP [V]	CE [eV]	CXP [V]
1	m/z der intensivsten Peaks aus dem NLS 44 (Massenbereich m/z = 140-200)	50 - 200	-30	-130	-8	-20	-4
2	m/z der intensivsten Peaks aus dem NLS 44 (Massenbereich m/z = 200-260)	50 - 260	-30	-130	-8	-20	-4

Tabelle A.5: Parameter der LC-ESI-MS/MS-Methode (MRM) zur Quantifizierung von ausgewählten Metaboliten in den Proben aus dem ehemaligen Gaswerksstandort Düsseldorf und dem Feldstandort Weißandt-Gölsau.

HPLC	Säule:	Purospher Star RP-C18 encapped LiChroCart (125 x 2 mm, 5 µm Partikel)							
	Säulenofen	35 °C							
	Fluss:	0,7 mL/min							
	Eluent:	A: MilliQ + 0,1% Essigsäure, B: Acetonitril + 0,1% Essigsäure							
	Injektionsvolumen:	50 µL							
	Gradientenprogramm:	Von 20% A auf 100% in 15 min, Post-Time: 5 min bei 20% A							
ESI	Ionisierung-Spannung:	-4500 V							
	Zerstäuber-Gasfluss:	1,5 mL/min							
	Turbo-Gasfluss:	6 L/min							
	Gastemperatur:	450 °C							
	Curtain-Gasfluss:	1,6 mL/min							
	Modus	negativ							
MS/MS	Kollisionsgasdichte:	2,19 x 10 ¹⁷ Moleküle (N ₂) /mL							
	Dwell time	0,07 s je Massenübergang							
Analyt	Masse	Vorläufer Ion [m/z]	Fragment Ion [m/z]	DP [V]	FP [V]	EP [V]	CE [eV]	CXP [V]	BG [µg/L]
BBS	208,21	207,2	163,2	-20	-200	-5	-20	-8	0,25
			91,1	-20	-200	-5	-28	-7	
MBBS	222,23	221,2	177,2	-20	-200	-5	-20	-8	- ^x
			105,1	-20	-200	-5	-28	-7	
NMBS	258,27	257,2	169,2	-24	-200	-10	-24	-9	0,25
			213,2	-24	-200	-10	-22	-13	
MNMBS	272,29	271,2	227,2	-24	-200	-10	-24	-9	- ^x
			183,2	-24	-200	-10	-22	-13	
NMeBS	256,25	255,2	211,2	-24	-200	-10	-24	-9	- ^x
			167,2	-24	-200	-10	-22	-13	
2-NS	172,19	171,2	127,2	-20	-200	-10	-18	-7	0,25
MNS	186,21	185,2	141,2	-20	-200	-10	-18	-7	- ^x
5-AS	198,22	197,2	153,2	-25	-200	-7	-22	-8	0,50
BTS	178,20	177,1	133,1	-17	-125	-10	-20	-8	0,50
MBTS	192,23	191,1	147,1	-17	-125	-10	-20	-8	- ^x
BTMBS	264,29	263,2	219,2	-24	-200	-10	-22	-13	- ^x
			175,2	-24	-200	-10	-24	-9	
BFS	162,14	161,1	117,1	-11	-105	-10	-15	-6	0,25
BFMBS	248,23	247,2	203,1	-24	-200	-10	-22	-13	- ^x
			159,2	-24	-200	-10	-24	-9	

^xAufgrund fehlender geeigneter Standards konnte die Bestimmungsgrenze (BG) für diese Metabolite nicht bestimmt werden

Tabelle A.6: Parameter der LC-ESI-MS/MS-Methode (MRM) zur Quantifizierung des Metaboliten BBS in den Proben aus den Batch-Experimenten.

HPLC	Säule:	Purospher Star RP-C18 encapped LiChroCart (125 x 2 mm, 5 µm Partikel)							
	Säulenofen	35 °C							
	Fluss:	0,7 mL/min							
	Eluent:	A: MilliQ + 0,1% Essigsäure, B: Acetonitril + 0,1% Essigsäure							
	Injektionsvolumen:	50 µL							
	Gradientenprogramm:	Von 20% A auf 100% in 15 min, Post-Time: 5 min bei 20% A							
ESI	Ionisierung-Spannung:	-4500 V							
	Zerstäuber-Gasfluss:	1,5 mL/min							
	Turbo-Gasfluss:	6 L/min							
	Gastemperatur:	450 °C							
	Curtain-Gasfluss:	1,6 mL/min							
	Modus	negativ							
MS/MS	Kollisionsgasdichte:	2,19 x 10 ¹⁷ Moleküle (N ₂)/mL							
	Dwell time:	0,3 s je Massenübergang							
Analyt	Masse	Vorläufer Ion [m/z]	Fragment Ion [m/z]	DP [V]	FP [V]	EP [V]	CE [eV]	CXP [V]	BG [µg/L]
BBS	208,21	207,2	163,2	-20	-200	-5	-20	-8	0,25
			91,1	-20	-200	-5	-28	-7	
BS-d5	127,12	126,1	82,1	-24	-145	-10	-17	-5	0,50

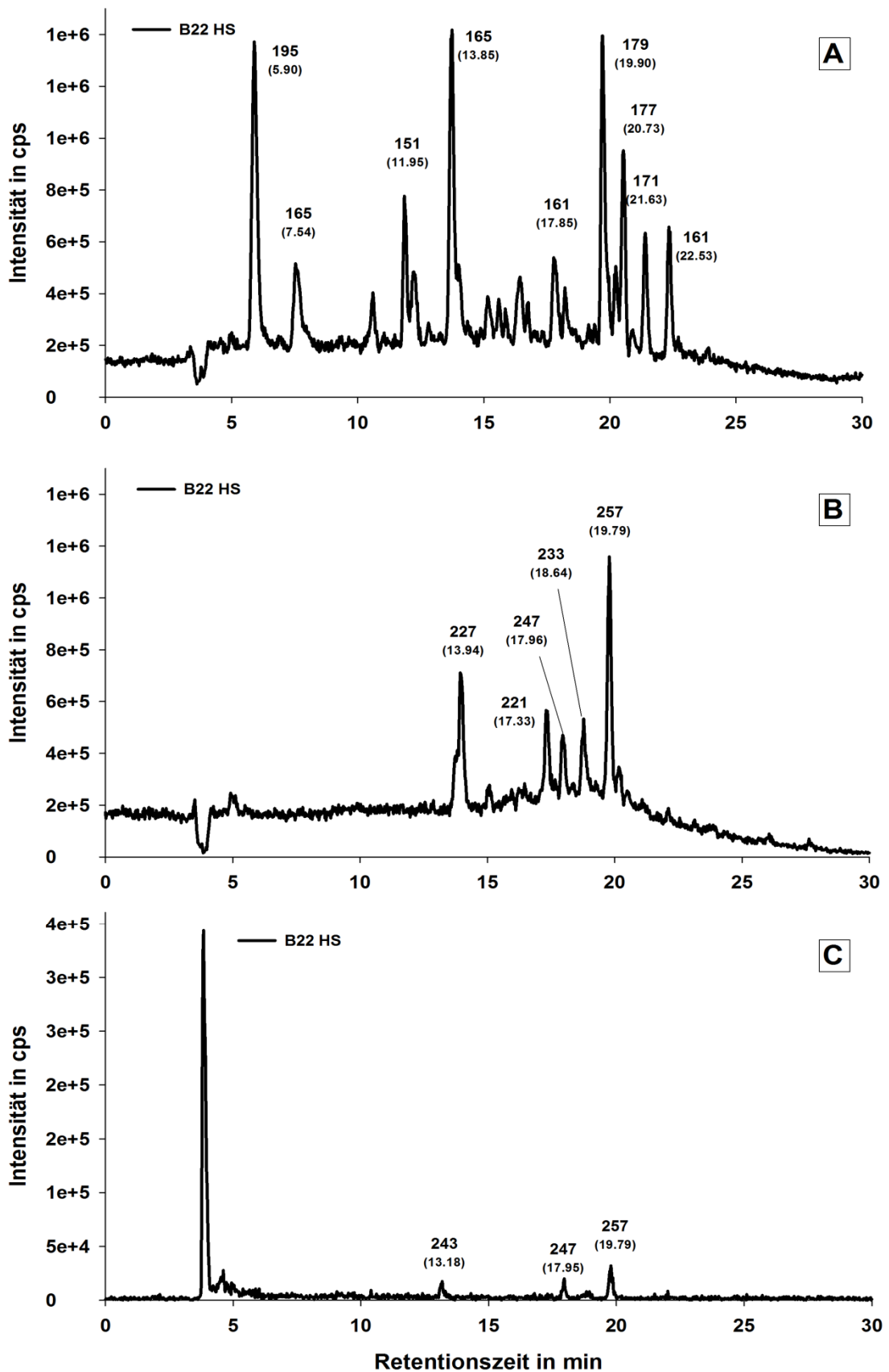


Abbildung A.3: Chromatogramme der NLS $\Delta m/z = 44$ (A und B) und $\Delta m/z = 116$ (C) der HS-Fraktion aus dem Aquifer in Stuttgart B22. Scan-Bereiche: m/z 140-200 (A) und m/z 200-260 (B und C). Über den Peaks sind die Massen (m/z) der jeweiligen Vorläufer-Ionen sowie die Retentionszeit (in Klammern) angegeben.

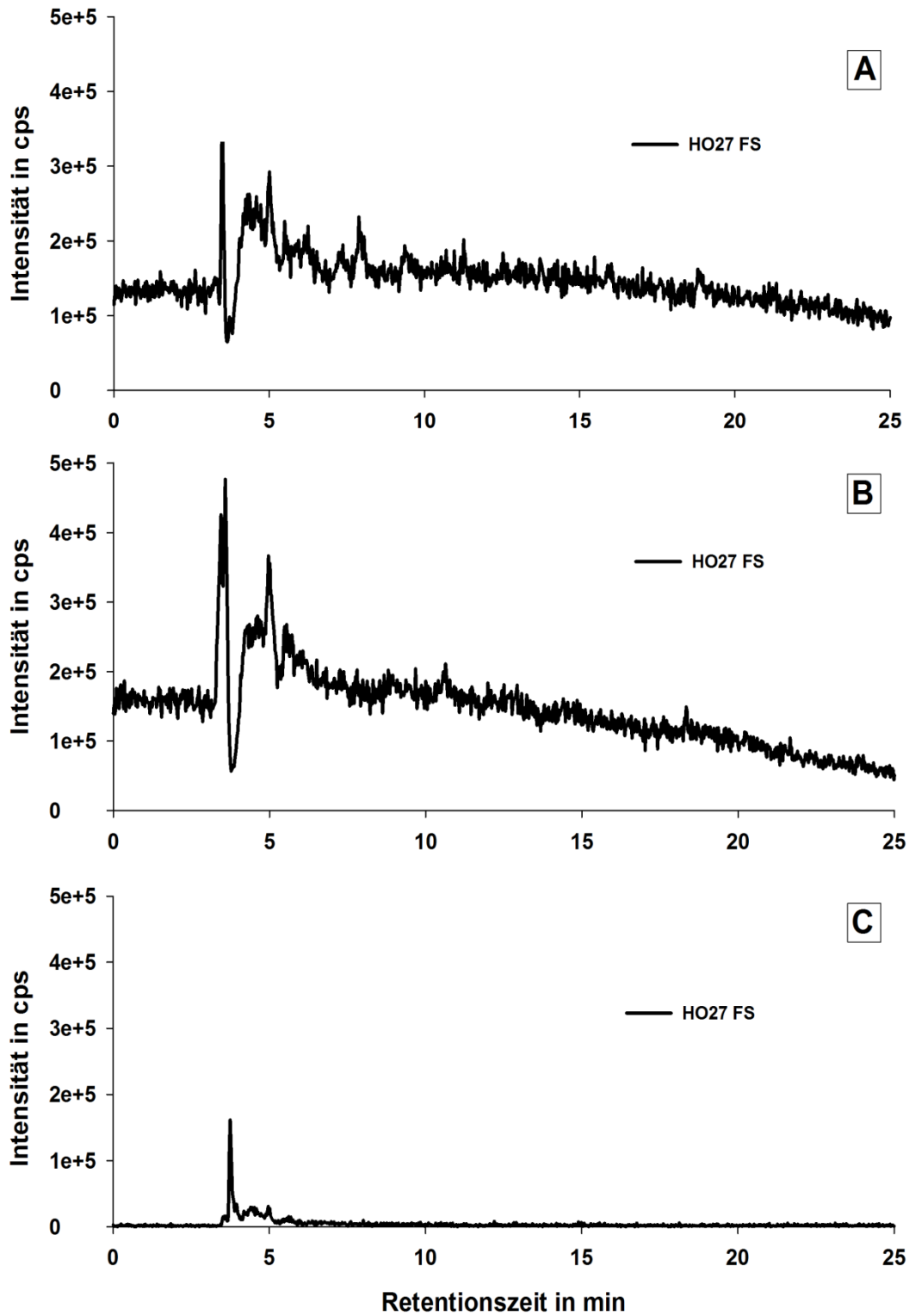


Abbildung A.4: Chromatogramme der NLS $\Delta m/z = 44$ (A und B) und $\Delta m/z = 116$ (C) der FS-Fraktion aus dem Hohlohsee (HO27). Scan-Bereiche: m/z 140-200 (A) und m/z 200-260 (B und C).

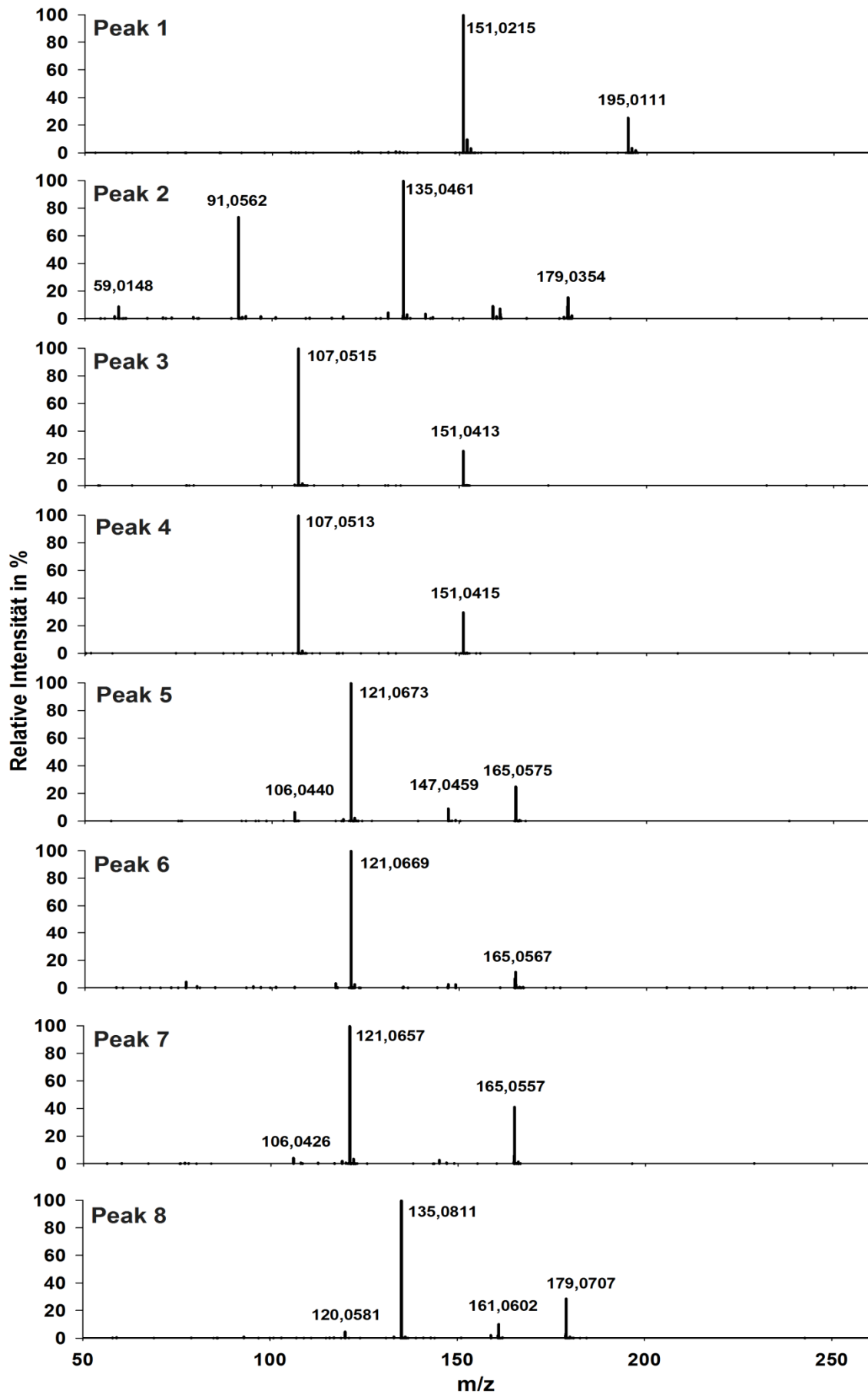
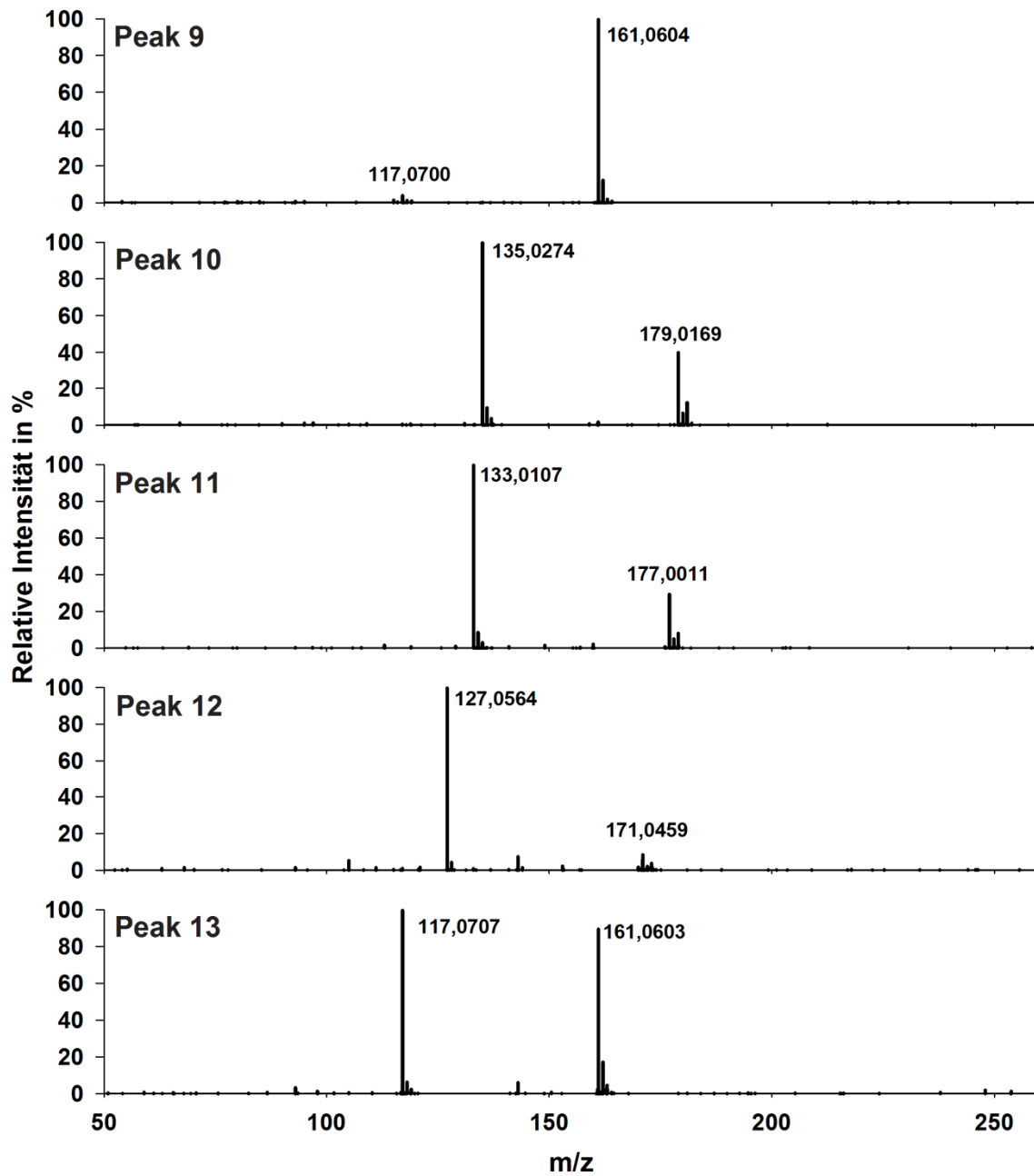


Abbildung A.5: LC-ESI-QTOF-MS-Fragmentspektren ($CE = 10 \text{ eV}$) der intensivsten Peaks aus dem NLS $\Delta m/z = 44$ (Scanbereich: $m/z = 140-200$).



Fortsetzung von Abbildung A.5

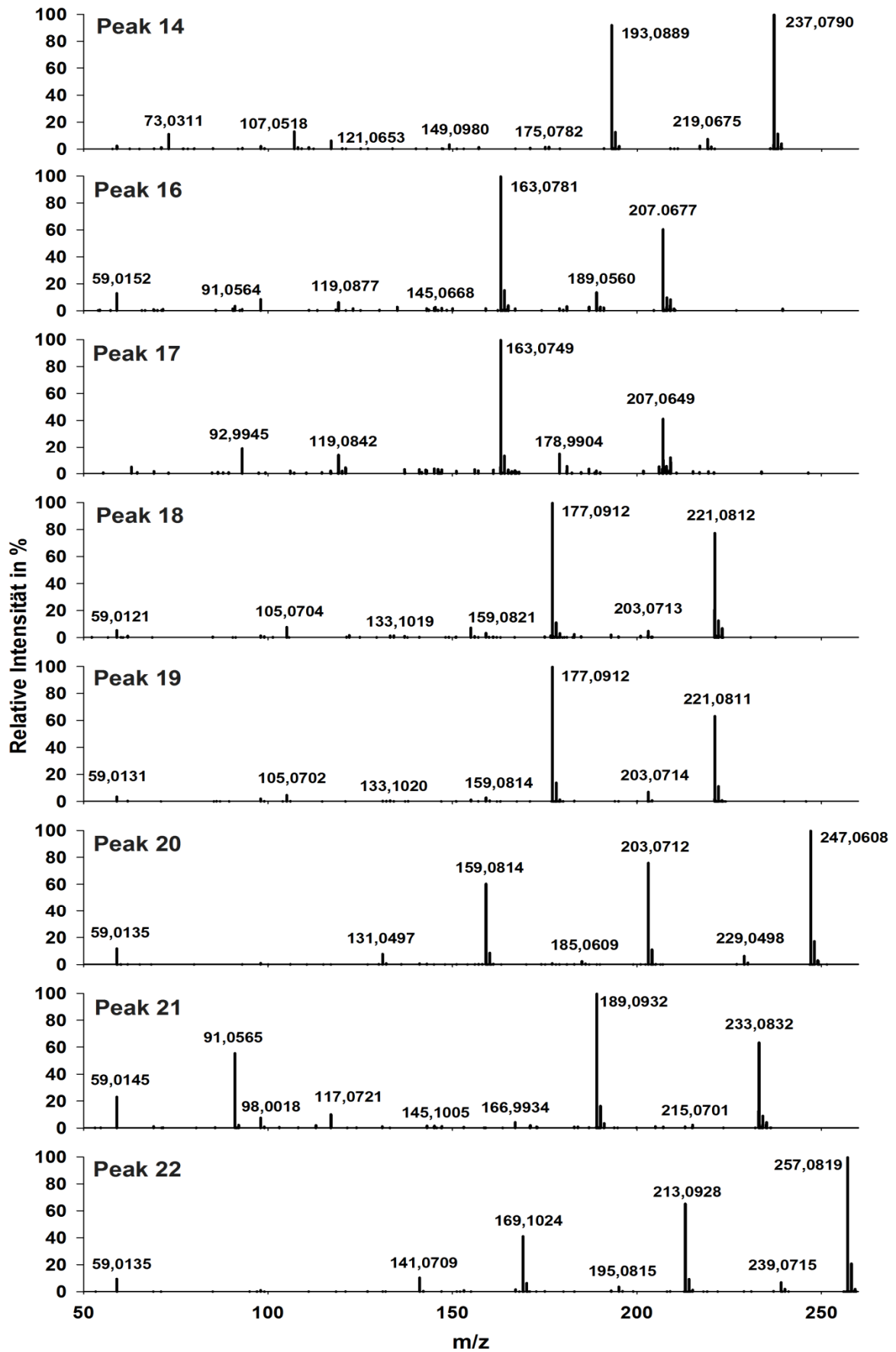


Abbildung A.6: LC-ESI-QTOF-MS-Fragmentspektren ($CE = 10 \text{ eV}$) der intensivsten Peaks aus dem NLS $\Delta m/z = 44$ (Scanbereich: $m/z = 200-260$). Anmerkung: Für Peak 15 konnte kein Fragmentspektrum erzeugt werden.

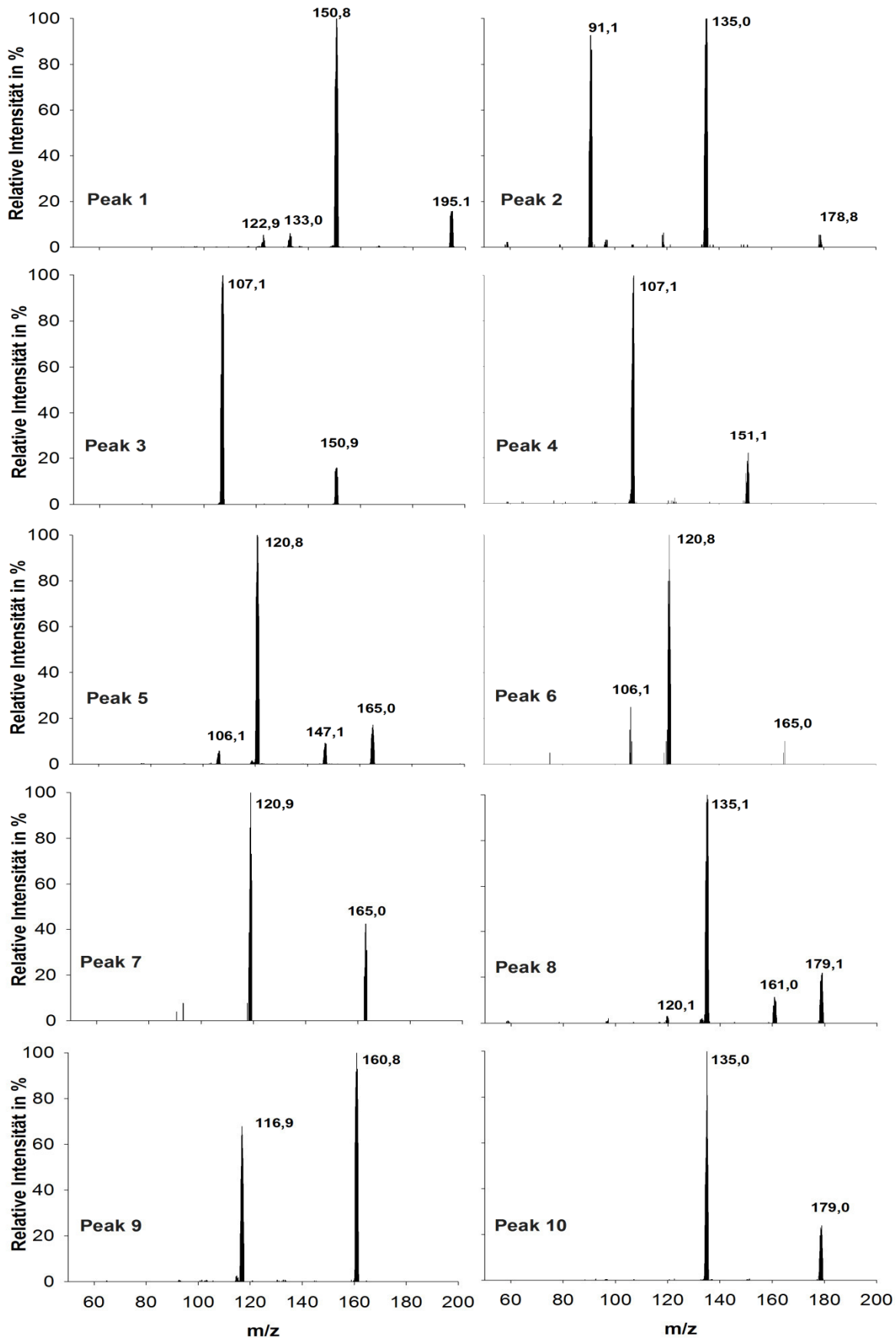
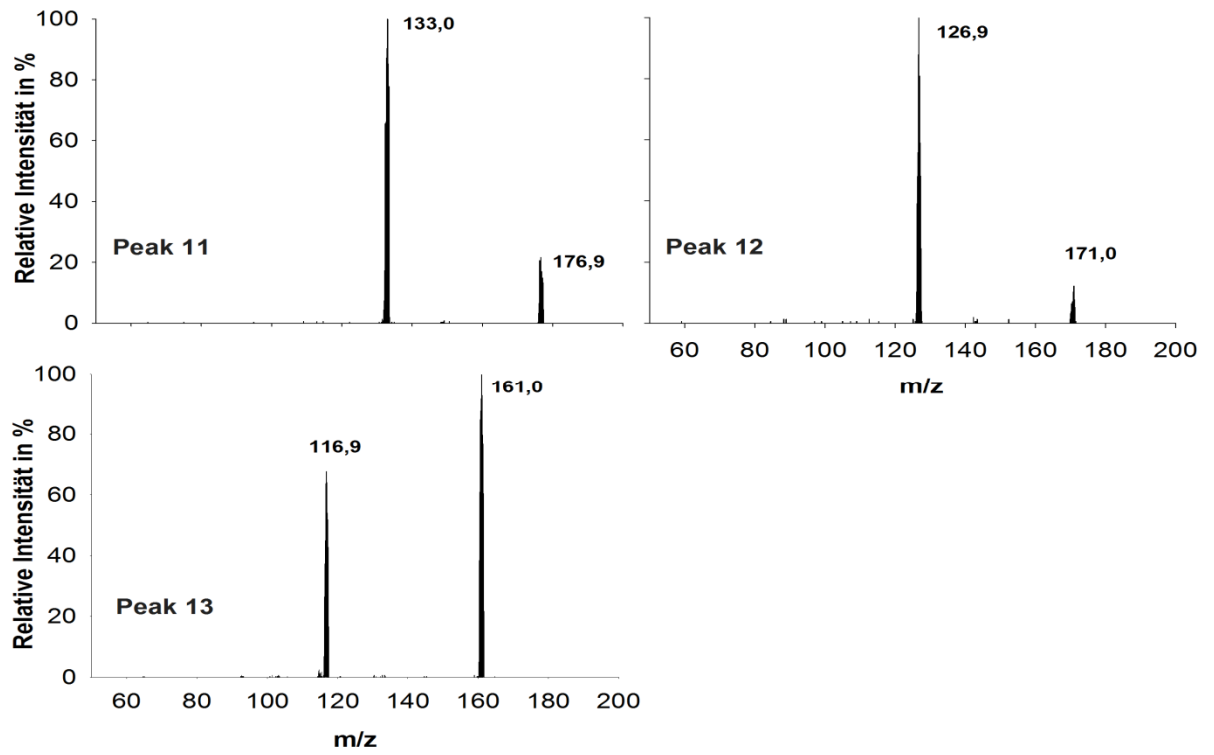


Abbildung A.7: LC-ESI-MS/MS Fragmentspektren (PIS) ($CE = 20 \text{ eV}$) der intensivsten Peaks aus dem NLS $\Delta m/z = 44$ (Scanbereich: $m/z = 140-200$).



Fortsetzung von Abbildung A.7

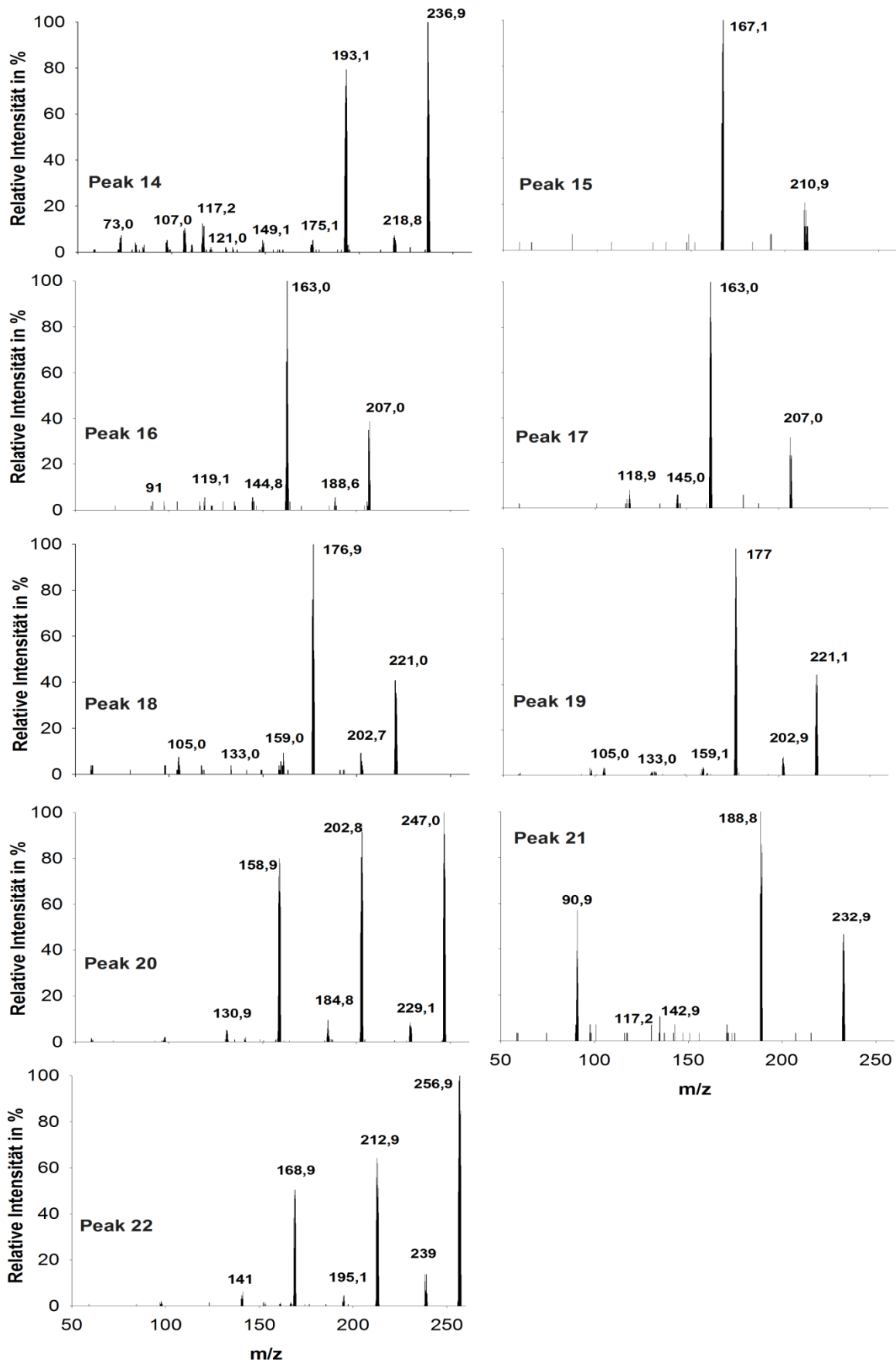


Abbildung A.8: LC-ESI-MS/MS-Fragmentspektren(PIS) ($CE = 20 \text{ eV}$) der intensivsten Peaks aus dem NLS $\Delta m/z = 44$ (Scanbereich: $m/z = 200-260$).

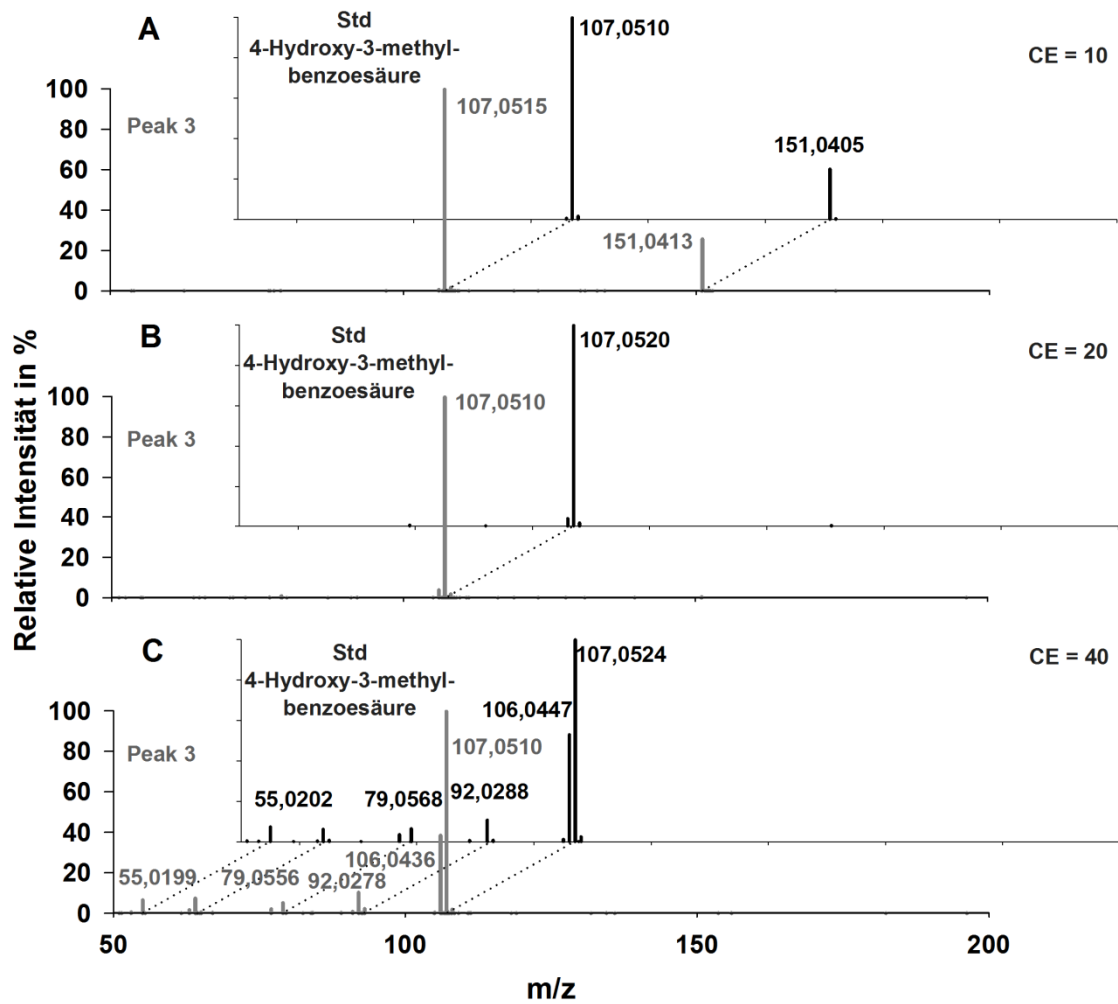


Abbildung A.9: Identifizierung von Peak 3 als 4-Hydroxy-3-methylbenzoesäure durch den Vergleich der LC-ESI-QTOF-MS-Fragmentspektren (grau) mit den Spektren des entsprechenden Standards (schwarz) bei folgenden Kollisionsenergien CE = 10 eV (A), CE = 20 eV (B) und CE = 40 eV (C).

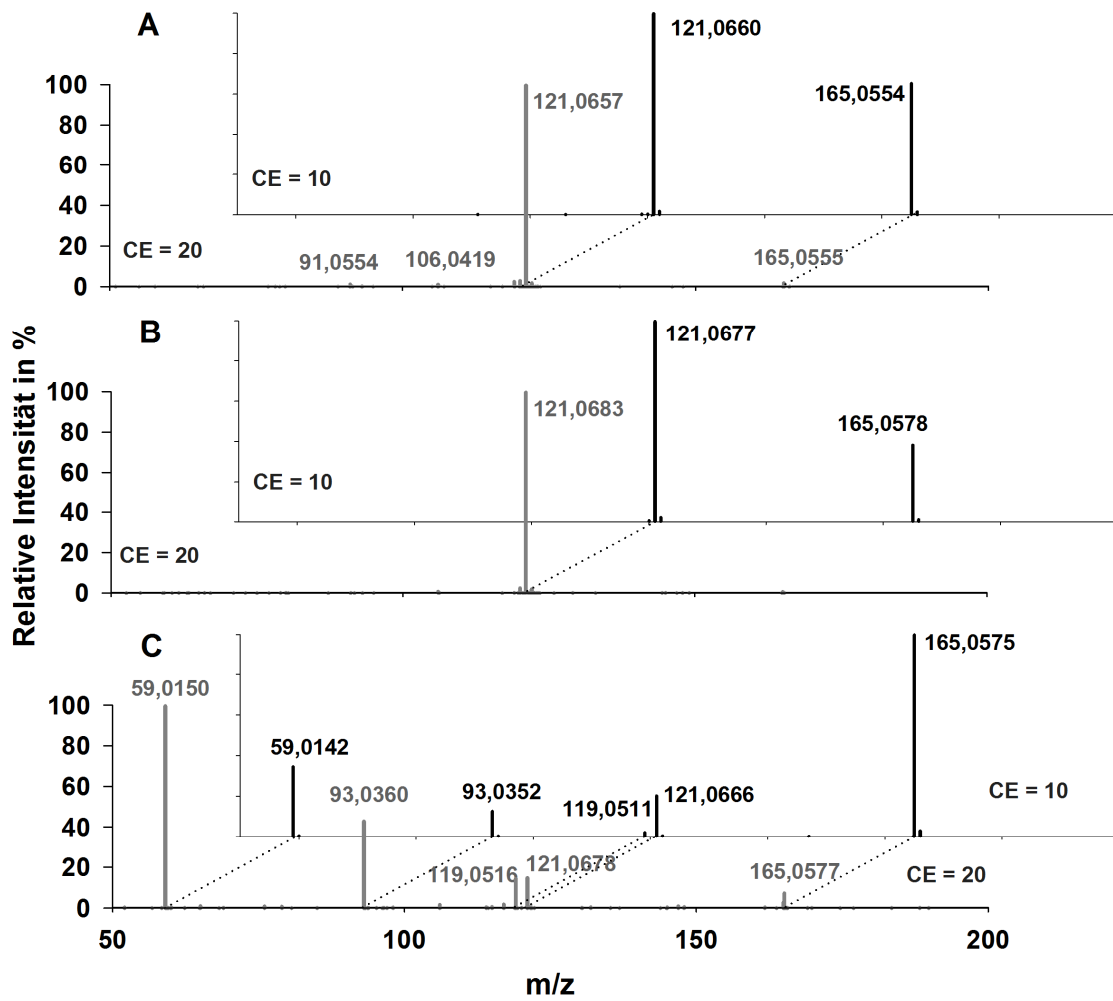


Abbildung A.10: LC-ESI-QTOF-MS-Fragmentspektren bei verschiedenen Kollisionsenergien ($CE = 10$ eV und 20 eV) von Standards mit unterschiedlichen potentiellen Metabolitenstrukturen, die alle die gleiche Summenformel $C_9H_{10}O_3$ aufweisen. 2-Hydroxy-3,5-dimethylbenzoesäure (A), 4-Hydroxy-3,5-dimethyl-benzoesäure (B), 3-(4-Hydroxyphenyl)-propansäure (C).

Tabelle A.7: Potentielle saure Metabolite (Suspects) deren berechnete akkurate Massen beim Suspect Screening in den Grundwasserproben aus Düsseldorf verwendet wurden. Diese Liste basiert auf nachgewiesenen Metaboliten in der Literatur (Tabelle 2.4 in Kapitel 2.3.1) und in anderen Aquiferen. In den einzelnen Substanzklassen sind die potentiellen Metabolite aufsteigend nach dem jeweiligen m/z-Verhältnis sortiert.

Metabolit	(potentielle) Ausgangsstoffe	Formel	H/C	O/C	m/z [M-H] ⁻
von Monoaromaten					
Benzoessäure	z.B BTEX	C ₇ H ₆ O ₂	0,86	0,29	121,0295
Methylbenzoessäure	Xylol	C ₈ H ₈ O ₂	1,00	0,25	135,0452
C ₂ -Benzoessäure	Xylol	C ₉ H ₁₀ O ₂	1,11	0,22	149,0608
Methylphenylelessigsäure		C ₉ H ₁₀ O ₂	1,11	0,22	149,0608
4-Hydroxy-3-methylbenzoessäure	o-Cresol	C ₈ H ₈ O ₃	1,00	0,38	151,0401
C ₃ -Benzoessäuren	Tetramethylbenzol	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	1,20	0,20	163,0765
Phthalsäure (Dibenzoessäure)	Xylol	C ₈ H ₆ O ₄	0,75	0,50	165,0193
C ₂ -Hydroxybenzoessäure	Methylierte Phenole	C ₉ H ₁₀ O ₃	1,11	0,33	165,0557
C ₄ -Benzoessäure	C ₅ -Benzol	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	1,27	0,18	177,0921
C ₃ -Hydroxybenzoessäure	Methylierte Phenole	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	1,20	0,30	179,0714
C ₅ -Benzoessäure	C ₆ -Benzol	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	1,33	0,17	191,1078
Benzylfumarsäure	Toluol	C ₁₁ H ₁₀ O ₄	0,91	0,36	205,0506
Benzylbernsteinsäure	Toluol	C ₁₁ H ₁₂ O ₄	1,09	0,36	207,0663
Methylbenzylbernsteinsäure	Xylol	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	1,17	0,33	221,0819
Phenylethylbernsteinsäure	Ethylbenzol	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	1,17	0,33	221,0819
C ₂ -Benzylbernsteinsäuren	C ₃ -Benzol	C ₁₃ H ₁₆ O ₄	1,23	0,31	235,0975
Hydroxymethylbenzylbernsteinsäure	Methylierte Phenole	C ₁₂ H ₁₄ O ₅	1,16	0,41	237,0768
C ₃ -Benzylbernsteinsäure	C ₄ -Benzol	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	1,29	0,29	249,1132
Carboxybenzylbernsteinsäure	Cresol	C ₁₂ H ₁₂ O ₆	1,00	0,50	251,0561
C ₄ -Benzylbernsteinsäure	C ₅ -Benzol	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	1,33	0,27	263,1289
C ₅ -Benzylbernsteinsäure	C ₆ -Benzol	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	1,38	0,25	277,1445
von PAK (und bizyklischen Verbindungen)					
Indensäure	Inden	C ₁₀ H ₈ O ₂	0,80	0,20	159,0452
Indansäure	Indan	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	1,00	0,20	161,0608
Naphthoesäure	(Methyl)Naphthalin	C ₁₁ H ₈ O ₂	0,73	0,18	171,0452
Tetrahydronaphthoesäure	(Methyl)Naphthalin	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	1,09	0,18	175,0764
Octahydronaphthoesäure	(Methyl)Naphthalin	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	1,45	0,18	179,1077
Decahydronaphthoesäure	(Methyl)Naphthalin	C ₁₁ H ₁₈ O ₂	1,64	0,18	181,1234
Carboxycyclohexylelessigsäure	(Methyl)Naphthalin	C ₉ H ₁₄ O ₄	1,56	0,44	185,0819
Methylnaphthoesäuren	2-Methylnaphthalin	C ₁₂ H ₁₀ O ₂	0,83	0,17	185,0608
Naphthylelessigsäure	Naphthalin	C ₁₂ H ₁₀ O ₂	0,83	0,17	185,0608
Hydroxynaphthoesäure	Naphthalin	C ₁₁ H ₈ O ₃	0,73	0,27	187,0401
Acenaphthylensäure	Acenaphthylen	C ₁₃ H ₈ O ₂	0,62	0,15	195,0451
Acenaphthensäure	Acenaphthen	C ₁₃ H ₁₀ O ₂	0,77	0,15	197,0608
C ₂ -Naphthoesäure	Naphthalin	C ₁₃ H ₁₂ O ₂	0,92	0,31	199,0765
Phenanthrensäure	Phenanthren	C ₁₅ H ₁₀ O ₂	0,67	0,13	221,0608
Indanbernsteinsäure	Indan	C ₁₃ H ₁₄ O ₄	1,08	0,31	233,0819
Naphthyl-2-methylenbernsteinsäure	(Methyl)Naphthalin	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	0,80	0,27	255,0663

Fortsetzung von **Tabelle A.7**

Metabolit	(potentielle) Ausgangsstoffe	Formel	H/C	O/C	m/z [M-H]⁻
Naphthyl-2-methylbernstein- säure	(Methyl)Naphthaline	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	0,93	0,27	257,0819
Methylnaphthyl-2-methyl- bernsteinsäure	1-Methylnaphthalin	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	1,00	0,25	271,0976
von Heterozyklen					
Indolsäure	Indol	C ₉ H ₇ O ₂	0,78	0,22	146,0373
Benzofuransäuren	Benzofuran	C ₉ H ₆ O ₃	0,67	0,33	161,0244
Methylbenzofuransäure	Benzofuran	C ₁₀ H ₈ O ₃	0,80	0,30	175,0401
Benzothiophensäure	Benzothiophen	C ₉ H ₆ O ₂ S	0,67	0,22	177,0016
Dihydrobenzothiophensäure	Benzothiophen	C ₉ H ₈ O ₂ S	0,89	0,22	179,0172
Methylbenzothiophensäure	Benzothiophen	C ₁₀ H ₈ O ₂ S	0,80	0,20	191,0172
Dibenzofuransäure	Dibenzofuran	C ₁₃ H ₈ O ₃	0,62	0,23	211,0401
Benzofuranmethylenbernstein- säure	Benzofuran	C ₁₃ H ₉ O ₅	0,69	0,38	245,0455
Benzofuranmethylbernsteinsäure	Benzofuran	C ₁₃ H ₁₁ O ₅	0,85	0,38	247,0612
Benzothiophenmethylenbernstein- säure	Benzothiophen	C ₁₃ H ₁₀ O ₄ S	0,77	0,31	261,0227
Benzothiophenmethylbernstein- säure	Benzothiophen	C ₁₃ H ₁₂ O ₄ S	0,92	0,31	263,0384

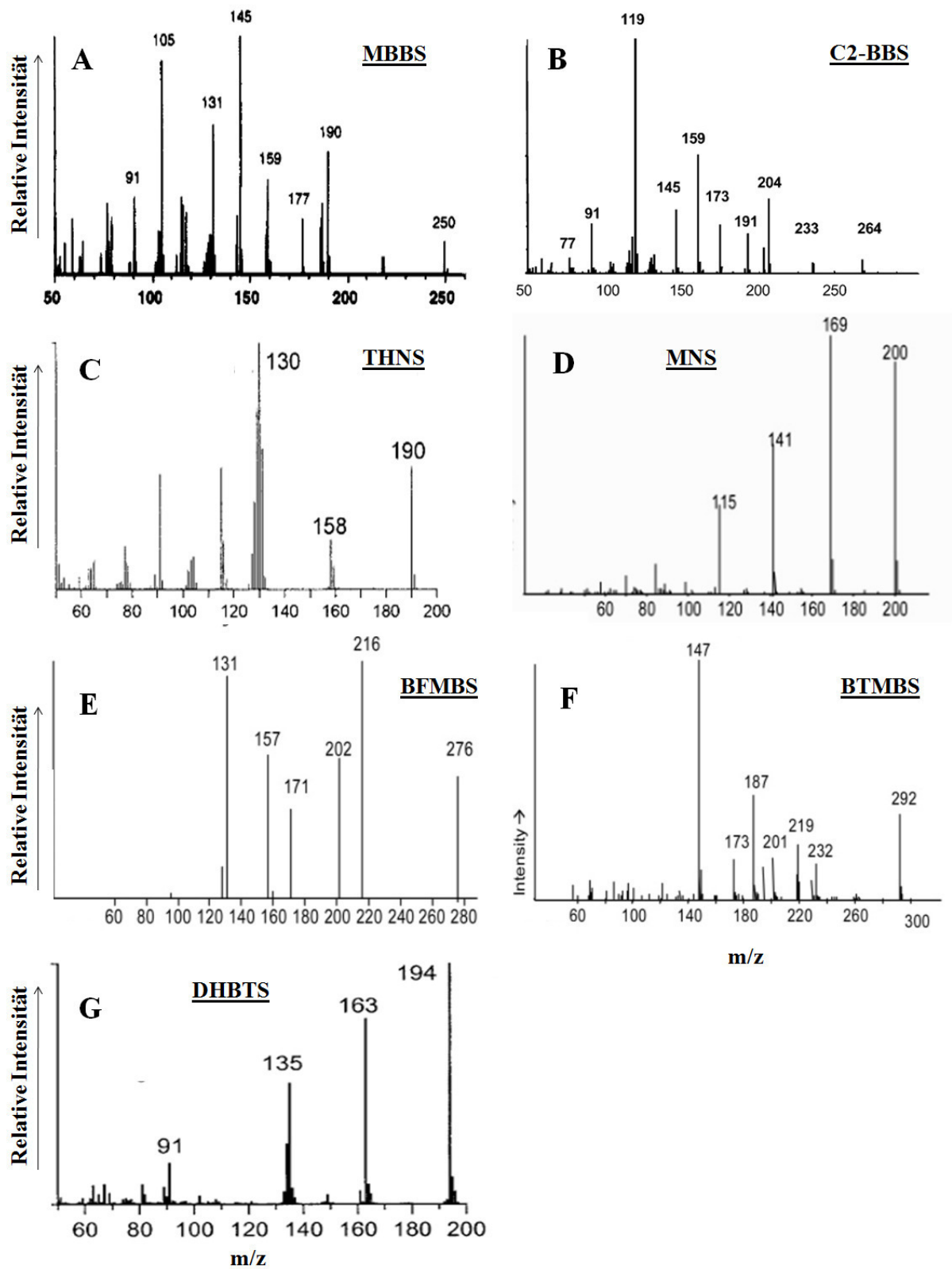


Abbildung A.11: GC-MS-Fragmentspektren ausgewählter Metabolite aus der Literatur. A: MBBS) (Beller et al. 1995), B: C₂-BBS (Martus und Püttmann 2003), C: THNS (Annweiler et al. 2002), D: MNS (Safinowski et al. 2006), E: BFMBS (Safinowski et al. 2006), F: BTMBS (Safinowski et al. 2006), G: DHBTS (Annweiler et al. 2001).

Tabelle A.8: Auflistung der Ergebnisse der intensivsten Peaks im FS-Isolat B22 des ehemaligen Gaswerksstandorts in Stuttgart (sortiert nach aufsteigendem H/C-Verhältnis). Von den mit MFE ermittelten 100 höchsten Peaks wurden solche aussortiert, die folgende festgelegte Qualitätskriterien nicht erfüllten (siehe Kapitel 3.3.2.1): Massenabweichung < 3 ppm und Score > 80. Zusätzlich wurden un plausible Summenformeln eliminiert.

Nr.	RT (min)	m/z (M-H) ⁻	Abw. (ppm)	Score	Intensität (cps)	Formel	H/C	O/C
1	17,45	177,0013	-1,7	97,14	10372	C ₉ H ₆ O ₂ S	0,67	0,22
2	9,91	155,0498	-2,6	97,20	6122	C ₁₁ H ₈ O	0,73	0,09
3	14,75	117,0346	0,0	87,47	20003	C ₈ H ₆ O	0,75	0,13
4	16,22	117,0346	0,0	87,75	8937	C ₈ H ₆ O	0,75	0,13
5	17,20	133,0116	-0,8	93,00	9099	C ₈ H ₆ S	0,75	0,00
6	19,23	133,0117	0,0	99,57	38016	C ₈ H ₆ S	0,75	0,00
7	17,46	133,0118	0,8	99,75	33499	C ₈ H ₆ S	0,75	0,00
8	18,75	345,1110	1,4	95,50	8221	C ₁₈ H ₁₄ N ₆ O ₂	0,78	0,11
9	18,59	143,0499	-2,1	84,71	9338	C ₁₀ H ₈ O	0,80	0,10
10	14,76	169,0656	-1,8	99,47	31118	C ₁₂ H ₁₀ O	0,83	0,08
11	8,35	121,0295	0,0	92,47	9549	C ₇ H ₆ O ₂	0,86	0,29
12	10,40	121,0297	1,7	94,02	6099	C ₇ H ₆ O ₂	0,86	0,29
13	14,96	137,0244	0,0	98,97	97901	C ₇ H ₆ O ₃	0,86	0,43
14	17,16	227,0719	2,2	85,59	6160	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	0,86	0,21
15	15,81	131,0500	-1,5	87,18	6281	C ₉ H ₈ O	0,89	0,11
16	10,64	147,0449	-2,0	87,39	18106	C ₉ H ₈ O ₂	0,89	0,22
17	16,67	179,0171	-0,6	98,07	15501	C ₉ H ₈ O ₂ S	0,89	0,22
18	4,89	195,0120	-0,5	98,34	23341	C ₉ H ₈ O ₃ S	0,89	0,33
19	17,16	183,0813	-1,1	99,34	25571	C ₁₃ H ₁₂ O	0,92	0,08
20	15,81	247,0612	0,0	99,97	51426	C ₁₃ H ₁₂ O ₅	0,92	0,38
21	17,56	257,0820	0,4	99,44	51077	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	0,93	0,27
22	16,67	135,0274	0,0	80,17	52614	C ₈ H ₈ S	1,00	0,00
23	8,97	135,0449	-2,2	86,08	5993	C ₈ H ₈ O ₂	1,00	0,25
24	11,85	135,0449	-2,2	86,06	10090	C ₈ H ₈ O ₂	1,00	0,25
25	12,60	135,0449	-2,2	87,53	5634	C ₈ H ₈ O ₂	1,00	0,25
26	11,10	135,0450	-1,5	86,64	6082	C ₈ H ₈ O ₂	1,00	0,25
27	15,14	135,0450	-1,5	87,26	19616	C ₈ H ₈ O ₂	1,00	0,25
28	9,40	135,0451	-0,7	85,91	5147	C ₈ H ₈ O ₂	1,00	0,25
29	9,91	135,0451	-0,7	85,83	5179	C ₈ H ₈ O ₂	1,00	0,25
30	4,89	151,0221	-1,3	99,57	115431	C ₈ H ₈ OS	1,00	0,13
31	11,14	151,0397	-2,6	96,99	12494	C ₈ H ₈ O ₃	1,00	0,38
32	9,17	151,0398	-2,0	99,54	39747	C ₈ H ₈ O ₃	1,00	0,38
33	10,04	151,0398	-2,0	98,85	11760	C ₈ H ₈ O ₃	1,00	0,38
34	18,75	161,0606	-1,2	99,66	65945	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	1,00	0,20
35	16,25	161,0607	-0,6	98,57	18948	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	1,00	0,20
36	15,81	203,0713	-0,5	99,43	29618	C ₁₂ H ₁₂ O ₃	1,00	0,25
37	17,56	213,0920	-0,5	99,27	23326	C ₁₄ H ₁₄ O ₂	1,00	0,14
38	16,42	233,0818	-0,4	87,27	7664	C ₁₃ H ₁₄ O ₄	1,08	0,31
39	15,80	159,0814	-0,6	99,17	18900	C ₁₁ H ₁₂ O	1,09	0,09
40	12,13	149,0606	-1,3	84,77	5104	C ₉ H ₁₀ O ₂	1,11	0,22
41	10,64	165,0555	-1,2	98,30	42825	C ₉ H ₁₀ O ₃	1,11	0,33
42	8,40	107,0504	1,9	87,64	9231	C ₇ H ₈ O	1,14	0,14
43	9,17	107,0504	1,9	99,60	200020	C ₇ H ₈ O	1,14	0,14
44	10,04	107,0504	1,9	85,90	11984	C ₇ H ₈ O	1,14	0,14
45	18,11	107,0504	1,9	92,91	11268	C ₇ H ₈ O	1,14	0,14
46	19,45	107,0504	1,9	84,59	5576	C ₇ H ₈ O	1,14	0,14
47	11,14	107,0505	2,8	99,47	21496	C ₇ H ₈ O	1,14	0,14
48	14,89	221,0817	-0,9	99,47	22766	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	1,17	0,33

Fortsetzung von *Tabelle A.8*

Nr.	RT (min)	m/z (M-H) ⁻	Abw. (ppm)	Score	Intensität (cps)	Formel	H/C	O/C
49	8,43	237,0767	-0,4	96,49	16755	C ₁₂ H ₁₄ O ₅	1,17	0,42
50	13,33	179,0709	-2,8	97,83	11565	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	1,20	0,30
51	17,18	235,0975	-0,4	86,23	12276	C ₁₃ H ₁₆ O ₄	1,23	0,31
52	12,83	121,0657	-1,7	93,40	5879	C ₈ H ₁₀ O	1,25	0,13
53	11,31	121,0658	-0,8	81,36	8649	C ₈ H ₁₀ O	1,25	0,13
54	12,20	121,0658	-0,8	81,30	5966	C ₈ H ₁₀ O	1,25	0,13
55	10,64	121,0659	0,0	99,52	298762	C ₈ H ₁₀ O	1,25	0,13
56	14,89	177,0920	-0,6	99,68	24651	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	1,27	0,18
57	8,43	193,0869	-0,5	98,63	13179	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	1,27	0,27
58	11,67	122,0610	-0,8	82,78	5368	C ₇ H ₉ NO	1,29	0,14
59	13,33	135,0814	-0,7	99,51	39057	C ₉ H ₁₂ O	1,33	0,11
60	14,27	135,0815	0,0	97,90	6515	C ₉ H ₁₂ O	1,33	0,11
61	17,18	191,1077	-0,5	98,74	7994	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	1,33	0,17
62	29,38	355,2285	1,7	98,17	32482	C ₂₃ H ₃₂ O ₃	1,39	0,13
63	29,08	233,1549	0,9	92,27	6913	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	1,47	0,13
64	14,97	261,8892	-1,9	86,01	5238	C ₄ H ₆ ClNO ₂ S ₄	1,50	0,50
65	26,74	277,1814	1,8	98,24	90880	C ₁₇ H ₂₆ O ₃	1,53	0,18
66	21,91	293,1758	0,0	99,54	10299	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	1,53	0,24
67	17,89	255,1600	-0,8	93,90	8967	C ₁₄ H ₂₄ O ₄	1,71	0,29
68	15,84	127,1128	0,0	87,81	5293	C ₈ H ₁₆ O	2,00	0,13
69	22,04	157,1233	-0,6	99,01	16257	C ₉ H ₁₈ O ₂	2,00	0,22
70	22,29	157,1234	0,0	99,81	10357	C ₉ H ₁₈ O ₂	2,00	0,22
71	27,14	171,1391	0,0	98,45	9636	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	2,00	0,20
72	17,36	173,1180	-1,7	86,99	7474	C ₉ H ₁₈ O ₃	2,00	0,33
73	16,63	173,1181	-1,2	84,72	15702	C ₉ H ₁₈ O ₃	2,00	0,33
74	23,18	201,1496	0,0	97,61	7659	C ₁₁ H ₂₂ O ₃	2,00	0,27
75	24,78	229,1811	0,9	98,73	247122	C ₁₃ H ₂₆ O ₃	2,00	0,23
76	26,95	229,1811	0,9	99,35	13269	C ₁₃ H ₂₆ O ₃	2,00	0,23
77	27,46	229,1813	1,7	97,81	404690	C ₁₃ H ₂₆ O ₃	2,00	0,23
78	15,84	173,1181	-1,2	99,53	26414	C ₉ H ₁₈ O ₃	2,11	0,33
79	14,91	273,0403	1,8	91,46	11592	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₈ S	2,33	1,33
80	27,46	311,1829	1,6	84,99	15131	C ₁₂ H ₂₈ N ₂ O ₇	2,33	0,58

Tabelle A.9: Auflistung der Ergebnisse der intensivsten Peaks im FS-Isolat B53 des ehemaligen Gaswerksstandorts in Stuttgart (sortiert nach aufsteigendem H/C-Verhältnis). Von den mit MFE ermittelten 100 höchsten Peaks wurden solche aussortiert, die folgende festgelegte Qualitätskriterien nicht erfüllten (siehe Kapitel 3.3.2.1): Massenabweichung < 3 ppm und Score > 80. Zusätzlich wurden un plausible Summenformeln eliminiert.

Nr.	RT (min)	m/z (M-H)-	Abw. (ppm)	Score	Intensität (cps)	Formel	H/C	O/C
1	14,08	143,0503	0,7	84,65	3264	C ₁₀ H ₈ O	0,80	0,10
2	26,74	359,1839	0,6	95,98	3966	C ₁₇ H ₂₄ N ₆ O ₃	0,82	0,18
3	14,69	169,0654	-3,0	86,15	4391	C ₁₂ H ₁₀ O	0,83	0,08
4	8,28	121,0297	1,7	84,80	4878	C ₇ H ₆ O ₂	0,86	0,29
5	9,28	200,9861	-1,0	97,91	6701	C ₇ H ₆ O ₅ S	0,86	0,71
6	4,87	195,0117	-2,1	91,50	1805	C ₉ H ₈ O ₃ S	0,89	0,33
7	17,10	183,0816	0,5	98,34	3832	C ₁₃ H ₁₂ O	0,92	0,08
8	8,88	135,0450	-1,5	81,02	1451	C ₈ H ₈ O ₂	1,00	0,25
9	4,87	151,0220	-2,0	98,41	6711	C ₈ H ₈ OS	1,00	0,13
10	19,29	227,1077	-0,4	99,33	13641	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	1,07	0,13
11	10,32	191,0713	-0,5	81,05	1320	C ₁₁ H ₁₂ O ₃	1,09	0,27
12	8,31	107,0500	-1,9	82,88	2530	C ₇ H ₈ O	1,14	0,14
13	18,64	107,0504	1,9	87,54	5585	C ₇ H ₈ O	1,14	0,14
14	16,28	107,0505	2,8	84,48	2177	C ₇ H ₈ O	1,14	0,14
15	13,96	147,0815	0,0	82,44	1670	C ₁₀ H ₁₂ O	1,20	0,10
16	10,93	121,0656	-2,5	81,30	2999	C ₈ H ₁₀ O	1,25	0,13
17	17,14	341,1977	-1,8	83,75	2293	C ₁₉ H ₂₆ N ₄ O ₂	1,37	0,11
18	19,61	221,1184	0,5	81,64	2568	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	1,38	0,23
19	29,38	355,2279	0,0	99,58	26317	C ₂₃ H ₃₂ O ₃	1,39	0,13
20	26,74	381,1661	-1,6	80,01	1374	C ₁₈ H ₂₆ N ₂ O ₇	1,44	0,39
21	29,08	233,1545	-0,9	98,67	6526	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	1,47	0,13
22	26,74	277,1810	0,4	99,59	93316	C ₁₇ H ₂₆ O ₃	1,53	0,18
23	22,89	293,1756	-0,7	80,93	1746	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	1,53	0,24
24	21,89	293,1758	0,0	99,68	9086	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	1,53	0,24
25	24,34	293,1761	1,0	96,43	1734	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	1,53	0,24
26	28,82	221,1545	-0,9	81,34	2946	C ₁₄ H ₂₂ O ₂	1,57	0,14
27	21,90	221,1547	0,0	81,87	2041	C ₁₄ H ₂₂ O ₂	1,57	0,14
28	21,23	323,2221	-2,2	83,71	1346	C ₁₉ H ₃₂ O ₄	1,68	0,21
29	27,85	323,2229	0,3	86,31	1329	C ₁₉ H ₃₂ O ₄	1,68	0,21
30	8,55	127,0763	-1,6	85,69	2151	C ₇ H ₁₂ O ₂	1,71	0,29
31	17,84	255,1603	0,4	99,04	8593	C ₁₄ H ₂₄ O ₄	1,71	0,29
32	23,66	407,2662	-0,5	83,64	1374	C ₂₁ H ₃₆ N ₄ O ₄	1,71	0,19
33	20,07	315,1815	0,6	99,01	3213	C ₁₆ H ₂₈ O ₆	1,75	0,38
34	20,15	155,1078	0,0	87,54	2678	C ₉ H ₁₆ O ₂	1,78	0,22
35	10,86	187,0973	-1,6	80,71	1947	C ₉ H ₁₆ O ₄	1,78	0,44
36	13,15	185,1181	-1,1	96,20	4829	C ₁₀ H ₁₈ O ₃	1,80	0,30
37	13,49	201,1127	-2,5	85,25	1317	C ₁₀ H ₁₈ O ₄	1,80	0,40
38	16,79	242,1760	-0,8	86,86	3876	C ₁₃ H ₂₅ NO ₃	1,92	0,23
39	24,77	481,3508	0,0	81,88	1651	C ₂₄ H ₄₆ N ₆ O ₄	1,92	0,17
40	27,46	481,3515	1,5	98,41	3353	C ₂₄ H ₄₆ N ₆ O ₄	1,92	0,17
41	15,80	127,1127	-0,8	83,96	3494	C ₈ H ₁₆ O	2,00	0,13
42	16,59	127,1128	0,0	86,97	2409	C ₈ H ₁₆ O	2,00	0,13
43	21,47	143,1076	-1,4	87,08	1245	C ₈ H ₁₆ O ₂	2,00	0,25
44	22,27	157,1232	-1,3	86,67	9025	C ₉ H ₁₈ O ₂	2,00	0,22
45	22,01	157,1233	-0,6	87,22	12544	C ₉ H ₁₈ O ₂	2,00	0,22
46	24,42	157,1233	-0,6	87,73	4949	C ₉ H ₁₈ O ₂	2,00	0,22
47	27,13	171,1388	-1,8	99,03	9704	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	2,00	0,20
48	16,58	173,1180	-1,7	86,79	11175	C ₉ H ₁₈ O ₃	2,00	0,33

Fortsetzung von **Tabelle A.9**

Nr.	RT (min)	m/z (M-H)-	Abw. (ppm)	Score	Intensität (cps)	Formel	H/C	O/C
49	15,80	173,1181	-1,2	99,61	16912	C ₉ H ₁₈ O ₃	2,00	0,33
50	29,20	185,1550	1,6	84,46	2219	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	2,00	0,18
51	23,17	201,1494	-1,0	86,68	4718	C ₁₁ H ₂₂ O ₃	2,00	0,27
52	23,39	201,1496	0,0	85,36	3522	C ₁₁ H ₂₂ O ₃	2,00	0,27
53	24,24	201,1497	0,5	86,03	3520	C ₁₁ H ₂₂ O ₃	2,00	0,27
54	24,77	229,1809	0,0	99,20	202457	C ₁₃ H ₂₆ O ₃	2,00	0,23
55	27,46	229,1810	0,4	97,81	348111	C ₁₃ H ₂₆ O ₃	2,00	0,23
56	29,04	269,2124	0,7	80,34	1330	C ₁₆ H ₃₀ O ₃	2,00	0,19
57	27,73	271,2272	-2,6	80,23	1247	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	2,00	0,19
58	29,20	271,2276	-1,1	85,93	3998	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	2,00	0,19
59	27,94	271,2278	-0,4	86,14	1326	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	2,00	0,19
60	28,88	271,2279	0,0	85,95	1570	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	2,00	0,19
61	29,64	271,2279	0,0	84,10	1842	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	2,00	0,19
62	22,57	291,0698	-1,7	83,77	2126	C ₈ H ₁₆ N ₆ O ₂ S ₂	2,00	0,25
63	24,77	311,1821	-1,0	84,94	8276	C ₁₂ H ₂₈ N ₂ O ₇	2,33	0,58
64	27,46	311,1827	1,0	95,08	12368	C ₁₂ H ₂₈ N ₂ O ₇	2,33	0,58

Tabelle A.10: Auflistung der Ergebnisse der intensivsten Peaks in der Grundwasserprobe C33 aus dem ehemaligen Gaswerksstandort in Düsseldorf (sortiert nach aufsteigendem H/C-Verhältnis). Von den mit MFE ermittelten 100 höchsten Peaks wurden solche aussortiert, die folgende festgelegte Qualitätskriterien nicht erfüllten (siehe Kapitel 3.3.2.1): Massenabweichung < 3 ppm und Score > 80. Zusätzlich wurden unplausible Summenformeln eliminiert.

Nr.	RT (min)	m/z (M-H)-	Abw. (ppm)	Score	Intensität (cps)	Formel	H/C	O/C
1	17,40	177,0013	-1,7	96,23	2893	C ₉ H ₆ O ₂ S	0,67	0,22
2	23,14	183,0449	-1,6	86,31	2666	C ₁₂ H ₈ O ₂	0,67	0,17
3	22,10	183,0450	-1,1	99,25	8318	C ₁₂ H ₈ O ₂	0,67	0,17
4	21,16	297,1143	-1,0	83,23	1687	C ₁₉ H ₁₄ N ₄	0,74	0,00
5	17,41	133,0117	0,0	98,29	12705	C ₈ H ₆ S	0,75	0,00
6	19,15	133,0117	0,0	99,56	26488	C ₈ H ₆ S	0,75	0,00
7	22,11	181,0654	-2,8	85,89	3429	C ₁₃ H ₁₀ O	0,77	0,08
8	23,65	181,0654	-2,8	86,13	3916	C ₁₃ H ₁₀ O	0,77	0,08
9	21,73	197,0605	-1,5	85,21	1652	C ₁₃ H ₁₀ O ₂	0,77	0,15
10	24,54	197,0609	0,5	84,66	2110	C ₁₃ H ₁₀ O ₂	0,77	0,15
11	17,52	377,0315	1,3	95,77	5684	C ₁₃ H ₁₀ N ₆ O ₆ S	0,77	0,46
12	19,61	143,0501	-0,7	86,81	8536	C ₁₀ H ₈ O	0,80	0,80
13	18,54	143,0504	1,4	85,93	1367	C ₁₀ H ₈ O	0,80	0,10
14	17,51	239,0713	-0,4	85,91	3537	C ₁₅ H ₁₂ O ₃	0,80	0,20
15	21,19	185,0607	-0,5	87,42	6139	C ₁₂ H ₁₀ O ₂	0,83	0,17
16	17,52	195,0812	-1,5	83,30	1584	C ₁₄ H ₁₂ O	0,86	0,07
17	19,40	391,0470	1,0	94,96	3447	C ₁₄ H ₁₂ N ₆ O ₆ S	0,86	0,43
18	19,98	147,0272	-1,4	99,47	5635	C ₉ H ₈ S	0,89	0,00
19	21,84	147,0273	-0,7	99,45	7661	C ₉ H ₈ S	0,89	0,00
20	14,63	157,0655	-2,5	84,54	3809	C ₁₁ H ₁₀ O	0,91	0,09
21	23,74	183,0813	-1,1	81,72	1745	C ₁₃ H ₁₂ O	0,92	0,08
22	23,96	183,0813	-1,1	99,11	8332	C ₁₃ H ₁₂ O	0,92	0,08
23	17,51	257,0821	0,8	98,97	121533	C ₁₅ H ₁₄ O ₄	0,93	0,27
24	19,96	283,0979	1,1	99,30	23477	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	0,94	0,24

Fortsetzung von **Tabelle A.10**

Nr.	RT (min)	m/z (M-H) ⁻	Abw. (ppm)	Score	Intensität (cps)	Formel	H/C	O/C
25	16,62	135,0273	-0,7	98,77	17675	C ₈ H ₈ S	1,00	0,00
26	16,21	161,0604	-2,5	86,04	3540	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	1,00	0,20
27	18,70	161,0606	-1,2	87,07	2791	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	1,00	0,20
28	17,51	213,0921	0,0	99,94	57038	C ₁₄ H ₁₄ O ₂	1,00	0,14
29	19,96	239,1079	0,4	98,18	6744	C ₁₆ H ₁₆ O ₂	1,00	0,13
30	17,32	261,0764	-1,5	86,79	2317	C ₁₄ H ₁₄ O ₅	1,00	0,36
31	19,40	271,0976	0,0	99,74	55202	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	1,00	0,25
32	26,75	277,1812	1,1	99,55	41892	C ₁₇ H ₂₆ O ₃	1,00	0,18
33	19,40	227,1078	0,0	99,51	16125	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	1,07	0,13
34	18,69	175,0764	-0,6	86,14	1622	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	1,09	0,18
35	19,10	175,0769	2,3	80,85	1863	C ₁₁ H ₁₂ O ₂	1,09	0,18
36	17,31	149,0607	-0,7	85,55	1791	C ₉ H ₁₀ O ₂	1,11	0,22
37	4,55	107,0503	0,9	87,65	4996	C ₇ H ₈ O	1,14	0,14
38	18,03	107,0503	0,9	99,41	5267	C ₇ H ₈ O	1,14	0,14
39	10,51	123,0451	-0,8	87,78	5644	C ₇ H ₈ O ₂	1,14	0,29
40	20,49	189,0920	-0,5	87,38	1683	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	1,17	0,17
41	14,25	221,0818	-0,5	99,04	13879	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	1,17	0,33
42	12,31	163,0763	-1,2	91,87	1763	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	1,20	0,20
43	19,70	261,1133	0,4	86,30	1616	C ₁₅ H ₁₈ O ₄	1,20	0,27
44	17,15	235,0975	-0,4	93,56	2223	C ₁₃ H ₁₆ O ₄	1,23	0,31
45	16,82	235,0980	1,7	90,95	2960	C ₁₃ H ₁₆ O ₄	1,23	0,31
46	4,54	153,0556	-0,7	85,22	2012	C ₈ H ₁₀ O ₃	1,25	0,38
47	16,19	185,0275	-1,6	97,23	1447	C ₈ H ₁₀ O ₃ S	1,25	0,38
48	14,25	177,0918	-1,7	99,36	16104	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	1,27	0,18
49	12,47	177,0921	0,0	83,56	1873	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	1,27	0,18
50	18,63	249,1138	2,4	91,64	1448	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	1,29	0,29
51	17,15	191,1074	-2,1	80,93	1471	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	1,33	0,17
52	16,83	191,1078	0,0	82,46	2110	C ₁₂ H ₁₆ O ₂	1,33	0,17
53	29,09	233,1542	-2,1	84,72	2277	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	1,47	0,13
54	26,75	397,1305	1,3	94,82	1617	C ₁₅ H ₂₂ N ₆ O ₅ S	1,47	0,33
55	21,90	293,1762	1,4	98,89	7737	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	1,53	0,24
56	9,78	185,0819	0,0	88,00	1374	C ₉ H ₁₄ O ₄	1,56	0,44
57	28,83	221,1549	0,9	85,75	1310	C ₁₄ H ₂₂ O ₂	1,57	0,14
58	12,89	167,1076	-1,2	86,15	2488	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	1,60	0,20
59	15,69	227,1283	-2,6	81,69	2245	C ₁₂ H ₂₀ O ₄	1,67	0,33
60	20,08	315,1812	-0,3	84,75	2002	C ₁₆ H ₂₈ O ₆	1,75	0,38
61	23,96	343,2122	-1,2	83,54	1916	C ₁₈ H ₃₂ O ₆	1,78	0,33
62	22,01	157,1232	-1,3	85,42	2542	C ₉ H ₁₈ O ₂	2,00	0,22
63	22,28	157,1234	0,0	87,67	1397	C ₉ H ₁₈ O ₂	2,00	0,22
64	27,15	171,1388	-1,8	86,33	3620	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	2,00	0,20
65	16,65	173,1179	-2,3	84,74	2380	C ₉ H ₁₈ O ₃	2,00	0,33
66	15,86	173,1183	0,0	86,37	4178	C ₉ H ₁₈ O ₃	2,00	0,33
67	24,77	229,1810	0,4	99,75	8622	C ₁₃ H ₂₆ O ₃	2,00	0,23
68	27,47	229,1810	0,4	99,61	14141	C ₁₃ H ₂₆ O ₃	2,00	0,23
69	29,21	271,2282	1,1	84,88	1452	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	2,00	0,19

Tabelle A.11: Auflistung der Ergebnisse der intensivsten Peaks in der Grundwasserprobe E1 aus dem ehemaligen Gaswerksstandort in Düsseldorf (sortiert nach aufsteigendem H/C-Verhältnis). Von den mit MFE ermittelten 100 höchsten Peaks wurden solche aussortiert, die folgende festgelegte Qualitätskriterien nicht erfüllten (siehe Kapitel 3.3.2.1): Massenabweichung < 3 ppm und Score > 80. Zusätzlich wurden unplausible Summenformeln eliminiert.

Nr.	RT (min)	m/z (M-H) ⁻	Abw. (ppm)	Score	Intensität (cps)	Formel	H/C	O/C
1	14,23	197,0244	0,0	84,22	569	C ₁₂ H ₆ O ₃	0,50	0,25
2	8,95	119,0363	0,0	99,20	128590	C ₅ H ₄ N ₄	0,80	0,00
3	14,69	169,0657	-1,2	87,06	3963	C ₁₂ H ₁₀ O	0,83	0,08
4	17,10	183,0817	1,1	83,12	1321	C ₁₃ H ₁₂ O	0,92	0,08
5	20,06	283,0975	-0,4	80,46	840	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	0,94	0,24
6	16,60	135,0273	-0,7	81,44	1369	C ₈ H ₈ S	1,00	0,00
7	22,03	297,1131	-0,3	85,11	2556	C ₁₈ H ₁₈ O ₄	1,00	0,22
8	21,13	297,1134	0,7	81,45	2813	C ₁₈ H ₁₈ O ₄	1,00	0,22
9	18,61	249,1134	0,8	80,57	806	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	1,29	0,29
10	19,59	221,1183	0,0	80,34	620	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	1,38	0,23
11	29,05	233,1544	-1,3	86,30	1157	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	1,47	0,13
12	26,71	277,1808	-0,4	99,18	16475	C ₁₇ H ₂₆ O ₃	1,53	0,18
13	22,86	293,1757	-0,3	80,26	1121	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	1,53	0,24
14	21,86	293,1760	0,7	96,87	5726	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	1,53	0,24
15	24,32	293,1760	0,7	82,34	1443	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	1,53	0,24
16	28,80	221,1549	0,9	84,45	1002	C ₁₄ H ₂₂ O ₂	1,57	0,14
17	15,66	227,1288	-0,4	83,37	643	C ₁₂ H ₂₀ O ₄	1,67	0,33
18	20,06	315,1809	-1,3	80,52	1837	C ₁₆ H ₂₈ O ₆	1,75	0,38
19	23,93	343,2127	0,3	82,48	2011	C ₁₈ H ₃₂ O ₆	1,78	0,33
20	28,56	299,2231	1,0	81,99	759	C ₁₇ H ₃₂ O ₄	1,88	0,24
21	28,18	411,2510	1,2	82,11	617	C ₁₇ H ₃₃ ClN ₁₀	1,94	0,00
22	21,99	157,1235	0,6	80,34	895	C ₉ H ₁₈ O ₂	2,00	0,22
23	27,11	171,1390	-0,6	81,57	1644	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	2,00	0,20
24	27,42	229,1806	-1,3	97,98	4768	C ₁₃ H ₂₆ O ₃	2,00	0,23
25	24,73	229,1808	-0,4	86,68	4086	C ₁₃ H ₂₆ O ₃	2,00	0,23
26	26,70	397,1313	-3,0	81,34	690	C ₁₁ H ₂₂ N ₆ O ₁₀	2,00	0,91

Veröffentlichungen

- Abu Laban, N., Selesi, D., Jobelius, C., Meckenstock, U. (2009): Anaerobic benzene degradation by Gram-positive sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, **68**: 300-311.
- Jobelius, C., Ruth, B., Griebler, C., Meckenstock, R.U., Hollender, J., Reineke, A., Frimmel, F.H., Zwiener, C. (2011): Metabolites indicate hot spots of biodegradation and biogeochemical gradients in a high-resolution monitoring well. *Environmental Science & Technology*, **45**: 474-481.
- Jobelius, C., Frimmel, F.H., Zwiener, C. (2014): Mass spectrometric screening and identification of acidic metabolites in fulvic acid fractions of contaminated groundwater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **406**: 3415-3429.

Vorträge und Posterbeiträge

- Jobelius, C., Frimmel, F.H., Zwiener, C. (2007): Microbial degradation products of organic contaminants in anoxic aquifers: batch experiments with an iron reducing bacterial strain. Poster am Intern. Workshop "Biogeochemical Processes in Groundwater Systems", GSF, München, Deutschland, 10. - 11. September 2007.
- Jobelius, C., Frimmel, F.H., Zwiener, C. (2008): Occurrence of metabolites and cometabolites during the anaerobic degradation of toluene in the presence of cosubstrates: Results from batch experiments and field samples. Poster am AXIOM-VIBE-eTRAP-HIGRADE Workshop "Electron transfer processes at biogeochemical gradients", Leipzig, Deutschland, 4. - 7. März 2008.
- Jobelius, C., Frimmel, F.H., Zwiener, C. (2008): Identifizierung von polaren Metaboliten in Huminstoffisolaten mit tandem-massenspektrometrischen Experimenten. Poster an der Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Fachgruppe der GDCh, Trier, Deutschland, 28. - 30. April 2008.
- Jobelius, C., Frimmel, F.H., Zwiener, C. (2008): Occurrence of polar degradation products in humic fractions of a contaminated aquifer. Poster am Workshop "Natural organic matter in natural and technical processes" der Wasserchemischen Gesellschaft, Fachgruppe der GDCh, Maurach, Deutschland, 29. September - 01. Oktober 2008.
- Jobelius, C., Frimmel, F.H., Müller, A., Schulz, W., Zwiener, C. (2010): Metaboliten-Screening und Identifizierung mit Neutral-Loss-Scans und akkurater Massenbestimmung. Vortrag beim 20. Doktorandenseminar des Arbeitskreises Separation Science der Fachgruppe Analytische Chemie der GDCh, Hohenroda, Deutschland, 09. - 12. Januar 2010.

Schriftenreihe des Lehrstuhls für Wasserchemie und Wassertechnologie und
der DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

Band 35: Symposium on Refractory Organic Substances in the Environment – ROSE, 1997, 248 S., 12,80 €.

Band 36: Symposium on Refractory Organic Substances in the Environment – ROSE II, 2000, 265 S., 12,80 €.

Band 37: Thomas Brinkmann: Alkalischer und solarinduzierter Abbau von natürlicher organischer Materie, 2003, 212 S., 15,00 €.

Band 38: Andreas Gorenflo: Rückhalt und Fouling von natürlichen organischen Substanzen bei der Nano- und Ultrafiltration, 2003, 219 S., 18,00 €.

Band 39: Philip Hörsch: Einfluss der chemischen Oxidation auf das toxische Potenzial und das biologische Abbauverhalten von Industrieabwässern, 2004, 210 S., 20,00 €.

Band 40: Margit B. Müller: Bewertung von Anreicherungs- und Fraktionierungsverfahren für die strukturelle Charakterisierung der gelösten organischen Substanz in Gewässern, 2004, 185 S., 18,00 €.

Band 41: Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun: Praktikum Allgemeine Chemie und Chemie in wässrigen Lösungen – Qualitative und quantitative Bestimmungen, 2004, 158 S., 18,00 €.

Band 42: Tusnelda E. Doll: Photochemischer und photokatalytischer Abbau von Carbamazepin, Clofibrinsäure, lomeprol und Iopromid, 2004, 158 S., 18,00 €.

Band 43: Ayşe B. Değer: Entfernung von organischen Schadstoffen aus Wasser mit Hilfe von Poly(ϵ -caprolacton), 2005, 205 S., 18,00 €.

Band 44: Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun: Wassertechnologisches und wasserchemisches Praktikum, 2005, 201 S., 20,00 €.

Band 45-I, 45-II: Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun (Eds.): Humic Substances – Linking Structure to Functions. Proceedings of the 13th Meeting of the International Humic Substances Society, July 30 to August 4, 2006, Universität Karlsruhe, 2006, 492 S. (45-I), 623 S. (45-II), 50,00 €.

Band 46: Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun: Praktikum Allgemeine Chemie und Chemie in wässrigen Lösungen – Qualitative und quantitative Bestimmungen II, 2. verbesserte und ergänzte Neuauflage 2007, 139 S., 20,00 €.

Band 47: Thomas Glauner: Aufbereitung von Schwimmbeckenwasser – Bildung und Nachweis von Desinfektionsnebenprodukten und ihre Minimierung mit Membran- und Oxidationsverfahren, 2007, 233 S., 20,00 €.

Band 48: George Metreveli: Kolloidale Wechselwirkungen und kolloidgetragener Transport von Metall(oid)en in porösen Medien, 2008, 215 S., 20,00 €.

Band 49: Florencia Saravia: Entfernung von organischen Spurenstoffen und Untersuchung von Foulingprozessen in getauchten Membranen und Hybridverfahren, 2009, 213 S., 20,00 €.

Band 50: Markus Delay: Dynamische versus statische Elutionsversuche – Ein Beitrag zur Beurteilung der Wiederverwertbarkeit von Abfallmaterialien, 2010, 206 S., 20,00 €.

Band 51: Luis A. Tercero Espinoza: Heterogeneous photocatalysis with titanium dioxide suspensions containing bromide and dissolved organic matter, 2010, 172 S., 20,00 €.

Band 52: Ulrich-M. Metzger: Extrazelluläre polymere Substanzen aus Biofilmen – Aufklärung von Strukturen und ihr Einfluss auf die Foulingbildung in Membranbioreaktoren, 2011, 211 S., 20,00 €.

Band 53: Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun: Praktikum Allgemeine Chemie und Chemie in wässrigen Lösungen – Qualitative und quantitative Bestimmungen, 3. überarbeitete Neuauflage 2011, 139 S., 20,00 €.

Band 54: Markus Ziegmann: Beurteilung von Cyanobakterienblüten und Untersuchung geeigneter Verfahrenskombinationen zur Elimination cyanobakterieller Zellen und Toxine, 2011, 191 S., 20,00 €.

Band 55: Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun: Praktikum Allgemeine Chemie und Chemie in wässrigen Lösungen – Qualitative und quantitative Bestimmungen, 4. ergänzte Neuauflage 2012, 137 S., 20,00 €.

Band 56: Angela Klüpfel: Nanofiltration bei der Aufbereitung von Trink- und Schwimmbeckenwasser – Foulingmechanismen und Rückhalt anthropogener Kontaminanten, 2012, 259 S., 20,00 €.

Band 57: Christina Schmalz: Bildung, Phasentransfer und Toxizität halogener Desinfektionsnebenprodukte im Aufbereitungszyklus von Schwimmbeckenwasser – Schwerpunkt stickstoffhaltige Verbindungen, 2012, 195 S., 20,00 €.

Band 58: Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun, Harald Horn: Praktikum Allgemeine Chemie und Chemie in wässrigen Lösungen – Qualitative und quantitative Bestimmungen, 5. ergänzte Neuauflage 2013, 120 S., 20,00 €.

Band 59: Heiko Schwegmann: Wechselwirkungen zwischen anorganischen Nanopartikeln und Mikroorganismen – Nutzung- und Gefährdungspotential, 2013, 149 S., 20,00 €.

Band 60: Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun, Harald Horn: Praktikum Allgemeine Chemie und Chemie in wässrigen Lösungen – Qualitative und quantitative Bestimmungen, 6. überarbeitete Neuauflage 2014, 129 S., 20,00 €.

Band 61: Carsten Jobelius: Anaerobe Metabolite organischer Schadstoffe im Grundwasser - Analytik, Bildung und Nutzung als Indikatoren, 2014, 247 S., 20,00 €.

Preise verstehen sich zzgl. der gesetzlichen Mehrwertsteuer und Versandkosten.

Bestellungen über:

Lehrstuhl für Wasserchemie und Wassertechnologie und DVGW-Forschungsstelle
am Engler-Bunte-Institut des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

Engler-Bunte-Ring 1

D-76131 Karlsruhe

Tel.: +49-(0)721-608-42581

Fax: +49-(0)721-608-46497

E-mail: ursula.schaefer@kit.edu