

Leitfaden

Biologische Verfahren zur Bodensanierung

Jochen Michels
Thomas Track
Ulrich Gehrke
Dieter Sell

DECHEMA
Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V.

Dieser Bericht wurde im Auftrag des BMBF erstellt.

Das BMBF war an der Abfassung der Aufgabenstellung und der wesentlichen Randbedingungen beteiligt.

Das BMBF hat das Ergebnis dieses Berichtes nicht beeinflusst; der Auftragnehmer trägt allein die Verantwortung.

Förderkennzeichen: 1491064

Projektträger Abfallwirtschaft und Altlastensanierung
im Umweltbundesamt, Berlin

Herausgeber:

Umweltbundesamt
Fachgebiet III 3.6
Projektträger Abfallwirtschaft und
Altlastensanierung (PT AWAS)
Postfach 33 00 22
14191 Berlin
Tel.: +49 30 8903 3569, Fax 3833

im Auftrag des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF)
53170 Bonn
Tel.: +49 228 57 0

Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei den Autoren.

Der Leitfaden ist nicht für den gewerblichen Vertrieb bestimmt.

Vorwort

Der vorliegende Leitfaden ist das Ergebnis einer langjährigen Forschungsarbeit von Fachleuten aus 14 wissenschaftlichen Einrichtungen und 12 Unternehmen, die im Zeitraum von 1993 bis 2000 mit finanzieller Unterstützung des BMBF und in enger Zusammenarbeit mit den zuständigen Behörden und Länderarbeitskreisen zielgerichtet an der Schaffung eines neuen Standes der Technik bei der biologischen Bodenreinigung gearbeitet haben.

Durch den mit über 30 Mio. DM geförderten Forschungsverbund von insgesamt 42 Einzelprojekten sollten neue Möglichkeiten für eine bessere Anwendung biologischer Bodenreinigungsverfahren im Bereich der sprengstofftypischer Verbindungen aber auch von kohlenwasserstoffbelasteten Böden eröffnet werden.

Es war zu klären, ob und in wieweit diese Verfahren im großtechnischen Maßstab eine bodenschonendere Reinigung ermöglichen, so daß der behandelte Boden ohne weitere Rekultivierungsmaßnahmen unmittelbar weiter verwertet werden kann. Ferner sollten die hierfür einzuhaltenden verfahrenstechnischen, ökotoxikologischen, ökologischen, ökonomischen und juristischen Rahmenbedingungen fixiert und durch praktische Erprobungen nachgewiesen werden.

Eine wesentliche Aufgabe des Forschungsverbundes bestand darin, aufzuzeigen, auf welchem Weg die Schadstoffe zuverlässig biologisch ab- oder in die Humusmatrix eingebaut werden und wie die damit in Verbindung stehenden Prozesse beeinflußt werden können.

Über die vielfältigen und zum Teil überraschenden Ergebnisse des Forschungsverbundes wurde bereits auf den einschlägigen Fachtagungen berichtet. Nunmehr sollen nach einer abschließenden Auswertung die verallgemeinerbaren Erfahrungen und Erkenntnisse in Form des Leitfadens den mit der Altlastensanierung und Bodenreinigung befaßten Behörden und "Altlastensanierern" als allgemeingültige Orientierungshilfe zur Verfügung stehen.

Im Leitfaden werden aber auch die derzeit noch offenen Fragestellungen dargelegt, die weiterer Forschungsarbeiten bedürfen. Sie dienen der Standortbestimmung und weiteren Orientierung.

Hervorzuheben ist ferner das konstruktive Zusammenwirken zwischen Forschungsnehmern und Genehmigungsbehörden auch bei der Lösung komplizierter Fragestellungen der Erfolgskontrolle. Die insbesondere hierbei gewonnenen Erfahrungen sind für alle Beteiligten aufschlußreich und können als beispielhaft gewertet werden.

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, daß unsere Vorstellungen von der Schaffung eines neuen Standes der Technik für die biologische Bodenreinigung erfüllt wurden. Bei Einhaltung definierter Bedingungen und Anforderungen ist es möglich, auch höher mit sprengstofftypischen Verbindungen sowie mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen kontaminierte Böden zuverlässig und kostengünstig zu reinigen.

Wir hoffen, daß der vorliegende Leitfaden die Anwendung biologischer Bodenreinigungsverfahren fördern und vor allem zu einer differenzierteren Wertung ihrer Einsatzmöglichkeiten führen wird.

Volker Franzius

Umweltbundesamt

Inhaltsverzeichnis

Vorwort

1 Einleitung	1
2 Grundlagen der biologischen Bodensanierung (Annette Geller)	5
Einführung	5
Einige mikrobiologische Zusammenhänge und Begriffe	5
Biologische Umsetzungen von Kontaminanten/organischen Substanzen	6
Mikroorganismengruppen, Begriffe und Definitionen	7
Mikroorganismen und ihre Umwelt	8
Begrenzende Faktoren für den Abbau von Kontaminanten	9
Literatur	9
2.1 Beurteilung des Abbauverhaltens von Umweltschadstoffen (Annette Geller)	11
Literatur	11
2.1.1 Mineralölkohlenwasserstoffe (Annette Geller)	13
2.1.1.1 Aliphatische Kohlenwasserstoffe	13
Aerober Abbau der Aliphate	13
Anaerober Abbau der Aliphate	14
2.1.1.2 BTEX-Aromaten	15
Aerober und anaerober Abbau der Aromaten und Metabolite	15
2.1.1.3 Mineralölprodukte	18
2.1.1.4 Biologischer Abbau und Ausgasverluste	21
2.1.1.5 Restkonzentrationen	23
2.1.1.6 Biologisches Selbstreinigungspotential	25
2.1.1.7 Literatur	26
2.1.2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (Annette Geller)	33
2.1.2.1 Allgemeines	33
2.1.2.2 Aerober Abbau	35
Pilze	36
Bakterien	36
Teilabbauprodukte	38
2.1.2.3 Anaerober Abbau	38

2.1.2.4	Der Verbleib von PAK in Böden	39
	Festlegung	39
	Mobilisierung	39
2.1.2.5	Ehemalige Gaswerke, Kokereien und teerölverarbeitende Industrien	40
	Teer und Teeröle	41
	Gaswerksstandorte	41
	Wechselwirkungen der Kontaminanten	42
2.1.2.6	Laboruntersuchungen zur Sanierbarkeit von Gaswerkstandorten	42
2.1.2.7	Sanierungspraxis	44
	Ehemaliges Gaswerk Solingen-Ohligs	44
2.1.2.8	Biologisches Selbstreinigungspotential	45
2.1.2.9	Literatur	46
2.1.3	Leichtflüchtige Chlorkohlenwasserstoffe (LCKW), Überblick	51
	(Annette Geller)	
2.1.3.1	Eigenschaften der LCKW	51
	Bioverfügbarkeit	53
2.1.3.2	Grundmuster des aeroben und des anaeroben Abbaus	53
2.1.3.3	Anaerober Abbau, Grundlagen	56
2.1.3.4	Anaerobe Stoffverwertungskette ("Nahrungskette")	59
2.1.3.5	Aerober Abbau, Grundlagen	61
	Aliphate als Cosubstrate	61
	Aromaten als Cosubstrate (Toluol, Cumol, Phenol)	62
	Ammonium als Cosubstrat	62
2.1.3.6	Literatur	63
2.1.4	Chlorethene	67
	(Annette Geller)	
2.1.4.1	Anaerober Abbau	67
	Methanogene Bedingungen	67
	Nicht-methanogene Bedingungen	68
	Reduktive Dechlorierung in Reinkulturen und in Mischkulturen	70
	Temperaturbedürfnisse	71
	Hemmeffekte	71
	Sanierungsstrategie anaerobe Stoffverwertungskette ("Nahrungskette")	73
2.1.4.2	Aerober Abbau	75
	Abbau durch Aliphate verwertende Bakterien	76
	Abbau durch Aromaten verwertende Bakterien	77
	Konsequenzen für die Sanierungspraxis	78
2.1.4.3	Sanierungspraxis	78
	Versuchsfeld Moffett-Field	78
	Sequentieller anaerob/aerober Abbau von PCE	79
	Sequentieller aerob/anaerob/aerober Abbau einer Mischkontamination	79
	Kombinierte In situ- und On site-Behandlung von Boden, Wasser und Abluft	79
2.1.4.4	Biologisches Selbstreinigungspotential	81
2.1.4.5	Literatur	81

2.1.5 Chlorethane	89
<i>(Annette Geller)</i>	
2.1.5.1 Anaerober Abbau	89
2.1.5.2 Aerober Abbau	90
2.1.5.3 Biologisches Selbstreinigungspotential	91
2.1.5.4 Literatur	91
2.1.6 Chlormethane	93
<i>(Annette Geller)</i>	
2.1.6.1 Abiotische Elimination und biologischer Abbau	93
2.1.6.2 Anaerober Abbau	94
Inhibitorische Wirkungen	94
2.1.6.3 Aerober Abbau	94
Inhibitorische Wirkungen	95
2.1.6.4 Biologisches Selbstreinigungspotential	95
2.1.6.5 Literatur	95
2.1.7 Hexachlorcyclohexane (HCHs)	99
<i>(Annette Geller)</i>	
2.1.7.1 Biologischer Abbau	99
Gamma-HCH (Lindan)	100
Alpha-HCH	100
Beta-HCH	100
2.1.7.2 Sanierungspraxis	101
Lindanproduktion mit Aufarbeitung der HCH-Isomeren	101
Biologischer Abbau von chlorierten Aromaten in Feststoffen	101
Gas/Feststoff-Wirbelschicht-Bioreaktor zur Bodensanierung	102
Zusammenfassung	102
2.1.7.3 Literatur	102
2.1.8 Chloraromaten	105
<i>(Annette Geller)</i>	
2.1.8.1 Chlorbenzole und Chlorphenole	105
Eigenschaften	105
Herkunft	107
Toxizität	108
Anaerober Abbau	108
Aerober Abbau	110
Konsequenzen für die Sanierungspraxis	112
Sanierungspraxis	113
Biologisches Selbstreinigungspotential	114
2.1.8.2 Polychlorierte Biphenyle (PCB)	114
Allgemeines	114
Biologischer Abbau	116
Sanierungspraxis	117
Biologisches Selbstreinigungspotential	119

2.1.8.3 Polychlorierte Dioxine und Furane (PCDD/F)	119
2.1.8.4 Literatur	120
2.1.9 Nitroaromaten (Schwerpunkt: TNT)	127
<i>(Jochen Michels)</i>	
2.1.9.1 Allgemeines	127
TNT-spezifische Rüstungsaltslasten	128
Toxikologie von TNT	130
2.1.9.2 Biologischer Abbau von Nitroaromaten	130
Metabolisierung und Mineralisierung von TNT	132
Immobilisierung und Humifizierung von TNT	134
2.1.9.3 Sanierungspraxis	135
Sanierungsoption: Biologische Verfahren	136
Ausblick	138
2.1.9.4 Biologisches Selbstreinigungspotential	139
2.1.9.5 Literatur	139
2.2 Humifizierung von Schadstoffen	147
<i>(Annette Eschenbach, Heiko Mescher, Reinhard Wienberg, Bernd Mahro)</i>	
2.2.1 Begriffsdefinition und Nachweis von nicht-extrahierbaren Rückständen	149
2.2.1.1 Definitionen von nicht-extrahierbaren Rückständen im Boden	149
2.2.1.2 Methoden zur Ermittlung nicht-extrahierbarer Rückstände	154
Bilanzierungsuntersuchungen mit radioaktiv-markierten Schadstoffen	154
Ermittlung von nicht-extrahierbaren Rückständen mit stabilen Isotopen und NMR-spektroskopische Methoden	156
Bilanzierungsuntersuchungen ohne Einsatz von markierten Schadstoffen	159
Vergleich der Methoden zur Ermittlung nicht-extrahierbarer Rückstände	161
2.2.2 Entstehung von nicht-extrahierbaren Rückständen bei der biologischen Bodensanierung	163
2.2.2.1 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)	163
Sorptive Prozesse	168
Kovalente Bindung	168
Sequestrierung	168
2.2.2.2 Trinitrotoluol (TNT)	169
2.2.2.3 Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände von Pflanzenschutzmitteln und chlororganischen Schadstoffen	175
2.2.2.4 Zusammenfassung	179
2.2.3 Stabilität von nicht-extrahierbaren Rückständen bei der biologischen Bodensanierung	179
2.2.3.1 Notwendigkeit des Nachweises der Stabilität	179
2.2.3.2 Untersuchungsstrategien zum Nachweis der Unbedenklichkeit und Bewertung der Stabilität immobilisierter Schadstoffe	181
2.2.4 Literatur	181

2.3 Parameter und Methoden zur Beurteilung der biologischen Sanierbarkeit von Böden	191
<i>(Mattias Kästner)</i>	
2.3.1 Bodenparameter	192
2.3.1.1 Korngröße, Porenanteil, Aggregation	193
Korngröße	193
Partikeldichte	193
Porenanteil und Permeabilität	194
Aggregation	194
2.3.1.2 Schadstoffmatrices, Begleitkontaminationen	195
2.3.1.3 Bioverfügbarkeit von Schadstoffen in verschiedenen Matrices	196
2.3.1.4 Anthropogene Begleitstoffe	198
Methode zur Charakterisierung von Kohle- und Kokspartikeln	200
2.3.2 Physiko-chemische Parameter	201
2.3.2.1 Temperatur	202
2.3.2.2 pH-Wert	202
Bestimmung des pH-Wertes	203
2.3.2.3 Wasserhaltekapazität, Wasserspannung, Wassergehalt	203
Bestimmung des Wassergehaltes	204
Bestimmung der Wasserhaltekapazität WHK_{max}	205
2.3.2.4 Sauerstoffgehalt	205
2.3.2.5 Redoxpotential	205
2.3.2.6 Nährstoffgehalt (C:N:P-Verhältnis)	207
2.3.2.7 Huminstoffgehalt	208
2.3.3 Biologische Abbaubarkeit der Schadstoffe	209
2.3.4 Biologische Parameter	210
2.3.4.1 Minimalprogramm: Mikrobieller Besatz	211
Quantifizierung aerober und fakultativ anaerober Mikroorganismen	212
2.3.4.2 Minimalprogramm: Mikrobielle Aktivität des Bodens	212
Bewertung der Ergebnisse des Minimalprogramms	213
2.3.4.3 Orientierende Prüfung: Schadstoffabbau durch die Mikroflora	214
Abbauversuche in Suspensionskultur	216
Abbauversuche in Standkultur mit feuchtem Bodenmaterial	216
Bewertung der Ergebnisse	217
2.3.4.4 Orientierende Prüfung: Bioverfügbarkeit der Schadstoffe	217
Bewertung der Ergebnisse	218
2.3.4.5 Weiterführende Abbauversuche zur mikrobiellen Sanierung	218
Abbauversuche in Standgefäßen und Bodenreaktoren unter "Boden-nahen" Bedingungen	219
Abbauversuche im Perkolator/Lysimeter	223
Abbauversuche in überstauten Bodensäulen bei kontinuierlichem Betrieb	227
Abbauversuche in Suspensionsreaktoren	229
2.3.5 Literatur	230

2.4 Maßnahmen zur Steuerung der biologischen Aktivität und ihre Wirkungen	235
<i>(Annette Geller)</i>	
2.4.1 pH-Wert, Wassergehalt und Temperatur	236
2.4.1.1 pH Wert	236
2.4.1.2 Wassergehalt	236
2.4.1.3 Temperatur	237
2.4.2 Sauerstoff und Redoxpotential	238
2.4.2.1 Sauerstoffzehrende Reaktionen und anorganische Fällungsprozesse	238
2.4.2.2 Sauerstoff und Sauerstoffträger	238
Sauerstoff, Wasserstoffperoxid	238
ORC	239
Nitrat	240
Kombination von Nitrat und Sauerstoff	240
Sulfat	240
2.4.2.3 Redoxpotential	241
2.4.3 Nähr- und Zuschlagstoffe	242
2.4.3.1 Mineralsalze	243
2.4.3.2 Organische Nährstoffe	243
Gründe für eine Zugabe organischer Nährstoffe	244
2.4.3.3 Zuschlagstoffe	247
2.4.4 Tenside	248
2.4.4.1 Synthetische Tenside	248
2.4.4.2 Biotenside	249
2.4.4.3 Wirkung von synthetischen Tensiden und Biotensiden	250
2.4.4.4 Praktischer Einsatz von Tensiden	251
Synthetische Tenside	251
Biotenside	252
2.4.5 Mikroorganismenkulturen	252
2.4.5.1 Faktoren, die die Wirkung zugesetzter Kulturen beeinträchtigen	253
2.4.5.2 Erfahrungen und Konsequenzen	253
Konsequenzen	254
2.4.6 Literatur	254
2.5 Parameter und Methoden zur Beurteilung der Qualität sanierter Böden	259
2.5.1 Ökotoxikologische Testverfahren	259
<i>(Susanne Fleischmann)</i>	
2.5.1.1 Einleitung	259
2.5.1.2 Auswahl ökotoxikologischer Testverfahren	260
2.5.1.3 Zusammenstellung einer Testbatterie	261
2.5.1.4 Anwendungsmöglichkeiten für ökotoxikologische Testbatterien im Rahmen der Altlastenerfassung- und Sanierung	262

2.5.2 Langzeitverhalten gebundener Rückstände	263
<i>(Annette Eschenbach, Heiko Mescher, Reinhard Wienberg, Bernd Mahro)</i>	
2.5.2.1 Strukturchemische Untersuchungen	263
2.5.2.2 Laboruntersuchungen zur Langzeitstabilität unter gezielter Simulation von Remobilisierungsmaßnahmen	264
2.5.2.3 Untersuchungen mit ¹⁴ C-markierten Verbindungen im Kubikmetermaßstab in Bioreaktoren und Freilandlysimetern	269
2.5.3 Literatur	270
3 Biologische Sanierungsverfahren	273
<i>(Jürgen Warrelmann)</i>	
3.1 Mietentechnik	273
3.1.1 Grundlagen	273
3.1.1.1 Definition	273
3.1.1.2 Wissenschaftlich-technische Grundlagen	274
3.1.1.3 Bodenvorbehandlung	274
3.1.1.4 Mietenaufbau	274
3.1.1.5 Mietenbelüftung	275
3.1.1.6 Mietenbewässerung	275
3.1.1.7 Mietenbeimpfung	276
3.1.1.8 Struktur- und Zuschlagstoffe	276
3.1.1.9 Nährstoffe	276
3.1.2 Voraussetzungen	278
3.1.2.1 Bodenaushub und Standortverhältnisse	278
3.1.2.2 Bodeneigenschaften	278
3.1.2.3 Schadstoffe	279
3.1.2.4 Hemmfaktoren	279
3.1.3 Technische Anforderungen	280
3.1.3.1 Bodenaushub und -transport	280
3.1.3.2 Anforderungen an Anlagen	281
3.1.3.3 Monitoring des Schadstoffabbaus	281
3.1.3.4 Immissionsschutz	282
3.1.3.5 Arbeitsschutz	282
3.1.3.6 Lärmschutzmaßnahmen	284
3.1.3.7 Nachsorgemaßnahmen	284
3.1.4 Praxiserfahrungen	285
3.1.4.1 Stand und Verbreitung der Technik	285
3.1.4.2 Kostenrelevante Einflußgrößen	286
Zugänglichkeit	286
Transport	286
Anlagenbau und -betrieb	286
Behandlungsdauer	286
Bodenmenge	287
Mietenhöhe	287
Bedarf an Zuschlag- und Nährstoffen	287
Technische Zusatzmaßnahmen	287

3.2 Reaktorverfahren	287
3.2.1 Grundlagen	287
3.2.1.1 Definition	287
3.2.1.2 Wissenschaftlich-technische Grundlagen	288
3.2.1.3 Feststoffreaktoren	289
3.2.1.4 Suspensionsreaktoren	290
3.2.1.5 Betriebsweisen	292
3.2.2 Voraussetzungen	293
3.2.2.1 Standortverhältnisse	293
3.2.2.2 Bodeneigenschaften	293
3.2.2.3 Schadstoffe	294
3.2.2.4 Hemmfaktoren	295
3.2.3 Technische Anforderungen	295
3.2.3.1 Bodenaushub und -transport	295
3.2.3.2 Anforderungen an Anlagen	296
3.2.3.3 Bodenvorbereitung	297
3.2.3.4 Monitoring des Schadstoffabbaus	297
3.2.3.5 Entwässerung	298
3.2.3.6 Immissions-, Arbeits- und Lärmschutz	298
3.2.3.7 Nachsorgemaßnahmen	298
3.2.4 Praxiserfahrungen	299
3.2.4.1 Stand und Verbreitung der Technik	299
3.2.4.2 Kostenrelevante Einflußgrößen	300
Zugänglichkeit und Transport des Bodens	300
Anlagenentwicklung	300
Anlagenbau und -betrieb	300
Gesamtanlage	300
Behandlungsdauer	300
Bodenmenge	301
Platzbedarf	301
Bedarf an Additiven	301
Entwässerung	301
3.3 <i>In situ</i> -Sanierung	301
3.3.1 Grundlagen	301
3.3.1.1 Definition	301
3.3.1.2 Wissenschaftlich-technische Grundlagen	301
3.3.1.3 Infiltrationsverfahren	302
Ungesättigte Bodenzone	303
Gesättigte Bodenzone	304
3.3.1.4 Belüftungsverfahren	305
Ungesättigte Bodenzone	305
Gesättigte Bodenzone	306
3.3.1.5 Phytoremediation	307
3.3.1.6 Natural Attenuation	308

Leitfaden "Biologische Verfahren zur Bodensanierung"

Inhaltsverzeichnis

3.3.2	Voraussetzungen	309
3.3.2.1	Standort- und Untergrundverhältnisse	309
3.3.2.2	Schadstoffe	310
3.3.2.3	Hemmfaktoren	311
3.3.2.4	Erprobung im Pilotmaßstab	311
3.3.3	Überwachungs- und Schutzmaßnahmen	311
3.3.3.1	Anlagentechnik und -betrieb	311
3.3.3.2	Monitoring des Schadstoffabbaus	312
3.3.3.3	Immissions-, Arbeits- und Lärmschutz	312
3.3.3.4	Nachsorgemaßnahmen	313
3.3.4	Praxiserfahrungen	313
3.3.4.1	Stand und Verbreitung der Technik	313
3.3.4.2	Kostenrelevante Einflußgrößen	314
	Untergrundaufbau	314
	Art, Ausmaß und Lage der Kontamination	315
	Anlagenbau und -betrieb	315
	Sanierungsdauer	315
	Bedarf an Additiven	315
	Technische Schutzmaßnahmen	315
3.4	Vergleichende Ökonomische Bewertung	316
	<i>(Eva Wortmann, Kai Steffens)</i>	
3.4.1	Einleitung	316
3.4.2	Gliederung der Projektkosten	317
3.4.2.1	Verfahrensabhängige und verfahrensunabhängige Sanierungskosten	317
3.4.2.2	Zeitliche Gliederung von Projektkosten	319
3.4.3	Wirtschaftlichkeitsbetrachtung	320
3.4.3.1	Systematik	320
3.4.3.2	Kostenvergleichsrechnung	323
	Beispiel für eine Kostenvergleichsrechnung	324
3.4.3.3	Sensitivitätsanalyse	328
3.4.4	Projektbegleitendes Controlling	330
3.4.5	Literatur und Datenbank zum Thema ökonomische Bewertung	332
3.5	Literatur	333
4	Empfohlene Methoden bei der Qualitäts- und Erfolgskontrolle	339
	<i>(André Dahn)</i>	
4.1	Chemische Analytik	341
4.1.1	Probennahme	341
4.1.1.1	Grundsätzliche Arten der Beprobungen	341
4.1.1.2	Erforderliche Mindestinformationen für die Planung	342
4.1.1.3	Grundsätzliche Festlegungen zur Planung	342
	Beprobungsplan	342
	Untersuchungsprogramm einschließlich Analysenplan	342
4.1.1.4	Durchsetzung des Arbeits- und Gesundheitsschutzes	343
4.1.1.5	Zusammenstellung eines repräsentativen Ausgangsmaterials	343
4.1.1.6	Durchführung der Probennahme	345

4.1.2	Probenlagerung und -transport	346
4.1.2.1	Vor-Ort-Behandlung und Lagerung	346
	Physikalische Verfahren zur Probenkonservierung	346
	Chemische Verfahren zur Probenkonservierung (für Wasserproben)	346
	Probentransport	346
4.1.3	Probenaufbereitung	347
4.1.3.1	Analytische Untersuchungen im Labor	347
4.1.3.2	Aufbereitung von Bodenproben	347
4.1.3.3	Aufbereitung von Wasserproben	347
4.1.4	Analysenmethoden, -zuverlässigkeit, -reproduzierbarkeit	348
4.1.5	Dokumentation in der Erfolgskontrolle	348
4.2	Biologische Testverfahren	349
	<i>(Susanne Fleischmann)</i>	
4.2.1	Probennahme, -transport und -vorbehandlung	349
4.2.1.1	Probennahme und Transport von Boden	349
4.2.1.2	Lagerung, Transport, Konservierung von Boden	350
4.2.1.3	Vorbereitung von Bodenproben	350
4.2.1.4	Probennahme von Human- und Luftproben	351
4.2.1.5	Aufbereitung der Human- und Luftproben	351
4.2.2	Ökotoxikologische Tests	351
4.2.2.1	Testdurchführung und Ergebnisbewertung	353
	1. Schritt: Tests mit Bodeneluaten	354
	2. Schritt: Terrestrische Tests zur Lebensraumfunktion	355
4.2.2.2	Hinweise zur Anwendung der untersuchten Testverfahren	358
	Hinweise zu Tests mit Bodeneluaten	358
	Hinweise zu terrestrischen Tests	359
4.2.3	Einsatz in der Erfolgskontrolle von großtechnischen Verfahren	359
4.2.4	Genotoxikologischen Testverfahren	360
4.2.4.1	Probennahme, -transport, -lagerung	360
4.2.4.2	Genotoxikologischen Tests	360
4.1.5	Humantoxikologische Tests und Air-Monitoring	361
4.3	Untersuchungen zur Langzeitstabilität	362
	<i>(Annette Eschenbach)</i>	
4.3.1	Ausgangssituation möglicherweise immobilisierter Schadstoffe	362
4.3.2	Einsatz von Tests zur Langzeitstabilität in der Erfolgskontrolle von großtechnischen Verfahren	363
4.3.3	Auswahl geeigneter Bewertungsverfahren	364
4.3.3.1	Simulation biologischer Freisetzungsprozesse	364
4.3.3.2	Simulation physikalischer Freisetzungsprozesse durch mechanische Zerstörung	365
4.3.3.3	Simulation physikalischer Freisetzungsprozesse durch Klimasimulation	365
4.3.3.4	Simulation chemischer Freisetzungsprozesse durch EDTA	365
4.3.3.5	Simulation chemischer Freisetzungsprozesse durch pH-Änderung	366
4.3.4	Testdurchführung und Bewertung	366

4.4 Qualitätssicherung der Bodenuntersuchungen und Untersuchungsmethoden	367
<i>(André Dahn, Jürgen Thieme, Jelena Karutz)</i>	
4.4.1 Anforderungen an Untersuchungsstellen	367
4.4.1.1 Mindestforderungen an die chemisch-analytischen Labors	367
4.4.1.2 Dokumentation der analytischen Untersuchungen	367
4.4.2 Anforderungen an Gutachter	368
4.4.3 Vergleichsuntersuchungen	368
4.4.3.1 Chemische Analytik	369
4.4.3.2 Vergleichsuntersuchungen bei ökotoxikologischen Tests	369
4.4.4 Dokumentation	370
4.4.5 Nachhaltigkeitsuntersuchungen	370
4.4.6 Einsatz in der Erfolgskontrolle von großtechnischen Verfahren	370
4.5 Humantoxikologische Untersuchungen im Arbeitsschutz	371
<i>(André Dahn)</i>	
4.5.1 Toxizität von Schadstoffen und deren Metaboliten und kontaminierter Stäube	371
4.5.2 Gefährdungspotential durch biologische Arbeitsstoffe	372
4.6 Anlagen	373
4.6.1 Probennahmedokumentation	374
4.6.2 Beprobungsplan	375
4.6.3 Probennahmeprotokoll	378
4.6.4 Probenbegleitschein	380
4.6.5 Analyseplan	382
4.6.6 Prüfbericht	384
4.7 Literatur	386
5 Rechtliche Rahmenbedingungen der biologischen Bodensanierung	391
<i>(Helmut Fouquet)</i>	
5.1 Einleitung	391
5.2 Sanierungspflicht	391
5.2.1 Gefahren und Maßnahmen	392
5.2.1.1 Abzuwehrende Störungen	392
Schädliche Bodenveränderungen	392
Altlasten	393
Maßnahmenwerte	393
5.2.1.2 Sanierungsziele und -maßnahmen	394
5.2.2 Verantwortlichkeit	395
5.2.2.1 Verhaltensverantwortlichkeit	395
Verursacher	395
Rechtsnachfolger	398
5.2.2.2 Zustandsverantwortlichkeit	399
Verpflichtete	399
Verfassungsrechtliche Grenzen der Zustandshaftung	400
5.2.2.3 Inanspruchnahme und Kosten	401
Ermessensentscheidung der Behörde	401
Kosten der Maßnahmen	402
5.2.3 Stilllegung von Abfalldeponien	402

5.3 Abfallrechtliche Einordnung	403
5.3.1 Abfalleigenschaft	403
5.3.2 Abfall zur Verwertung und zur Beseitigung	405
5.3.3 Dauer der Abfalleigenschaft	406
5.4 Anlagenrecht	407
5.4.1 Ortsfeste Anlagen zur Behandlung entnommenen Bodens	407
5.4.1.1 Genehmigungspflicht	407
5.4.1.2 Materielle Voraussetzungen der immissionsschutzrechtlichen Genehmigung	408
Immissionsschutzrechtliche Betreiberpflichten	408
Abfallrechtliche Vorschriften	408
Wasserrechtliche Vorschriften	409
Baurechtliche Vorschriften	409
Belange des Arbeitsschutzes	410
5.4.1.3 Genehmigungsverfahren	412
5.4.1.4 Betrieb	413
5.4.2 Mobile bauliche Anlagen zur Behandlung entnommenen Bodens	413
5.4.2.1 Genehmigungsbedürftigkeit	413
5.4.2.2 Genehmigungsvoraussetzungen	414
5.4.2.3 Genehmigungsverfahren	415
5.4.2.4 Betrieb	415
5.4.3 Sonstige Bodenbehandlungsanlagen	415
5.4.4 Wasserrechtliche Erlaubnis	415
5.4.5 Für verbindlich erklärter Sanierungsplan, Sanierungsverfügung	416
5.5 Wiedereinbau des entnommenen Bodens	417
5.5.1 Allgemeine Anforderungen	417
5.5.2 Einbau als Abfall	417
5.5.2.1 Grundsätze	417
5.5.2.2 Anforderungen an die Verwertung	417
5.5.2.3 Anforderungen an die Beseitigung	419
5.6 Gesetze, Verordnungen, Allgemeine Verwaltungsvorschriften	419
5.7 Anhänge	422
Maßnahmenwerte nach Anhang 2 BBodSchV	422
Testtabelle für die Beurteilung von Konzentrationen verschiedener Stoffe im Boden und Grundwasser für die Nutzungsformen Wohngebiete und Trinkwassergewinnungsgebiete (Niederländische Liste)	423
Orientierungswerte für Bodenbelastungen nach LAWA	426
Zuordnungswerte für Boden nach LAGA, Technische Regeln Verwertung	427
5.8 Literatur	429
6 Schadstoff- und verfahrensbezogene Übersichtsmatrizen	433
<i>(Thomas Track, Ulrich Gehrke, Jochen Michels)</i>	
6.1 Einleitung	433
6.2 Schadstoffbezogene Übersichtsmatrix	433
6.3 Verfahrensbezogene Matrizen	435
6.4 REBB - Referenzliste Erfolgreiche Biologische Bodensanierung	437
6.5 Datenblätter der REBB	443

7 Biologische Bodensanierung in der Praxis. Erfahrungen am Beispiel der maßstabsgerechten Erprobung biologischer Sanierungsverfahren im "Werk Tanne"	445
<i>(André Dahn, Jochen Michels)</i>	
7.1 Einleitung	445
7.2 Anlagen und Verfahren	446
7.2.1 Zentraler Versuchsbereich	446
7.2.2 Anaerob/aerobes Kompostierungsverfahren (Umweltschutz Nord)	447
7.2.3 Dynamisches Beetverfahren (Plambeck ContraCon)	448
7.2.4 Pilzverfahren (AWIA Umwelt (ursprünglich WISSTRANS Umwelt))	449
7.2.5 Haufwerk	450
7.2.6 Bodenbehandlung	450
7.3 Genehmigungsrechtliche Anforderungen	451
7.3.1 Anlagengenehmigung	451
7.3.2 Genehmigung zum Wiedereinbau der sanierten Bodenmaterialien	451
7.3.3 Arbeitsschutz	452
7.4 Konzept für die wissenschaftliche Begleitung (KwB)	453
7.4.1 Einführung	453
7.4.2 Projektbeirat	455
7.4.3 Untersuchungen im Rahmen des wissenschaftlichen Begleitkonzeptes	455
7.4.3.1 Chemisch-analytische Untersuchungen	456
7.4.3.2 Ökotoxikologische Tests	459
7.4.3.3 Bodenphysikalische und -chemische Untersuchungen	460
7.4.3.4 Humantoxikologische Untersuchungen und Raumluftuntersuchungen (Airmonitoring)	461
7.5 Ergebnisse und Schlußfolgerungen	462
7.5.1 Chemische Analytik	462
7.5.1.1 TNT und verwandte Nitroaromaten	463
7.5.1.2 Polare Nitroaromaten	464
7.5.1.3 Schwermetalle	465
7.5.1.4 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	466
7.5.2 Ökotoxikologische Tests	467
7.5.3 Chemisch-physikalische Bodenuntersuchungen	468
7.5.4 Arbeitsschutz	468
7.5.5 Diskussion der Ergebnisse	469
7.5.5.1 Genehmigung der Wiederauslagerung	470
7.5.5.2 Ergebnisse der Verfahrenserprobung	471
7.5.5.3 Ergebnisse der Erfolgskontrolle	471
7.6 Literatur	472
8 Verzeichnisse und Informationsquellen	473
<i>(Jochen Michels, Thomas Track)</i>	
8.1 Autorenverzeichnis (Kapitel 1-8)	473
8.2 Glossar, Abkürzungen	475

8.3 Informationsquellen	487
8.3.1 Zusätzliche Literatur	487
Altlastenfachinformationssystem Baden-Württemberg ALFA-WEB	487
Sächsisches Altlastenfachinformationssystem SALFA-WEB	487
Handbuch der Altlastensanierung	488
Boden schützen, Altlasten sanieren	488
Ökonomische Aspekte der Altlastensanierung	489
8.3.2 Regelwerke	489
Bundesbodenschutzgesetz	489
Länderarbeitsgemeinschaft Abfall - LAGA	489
8.3.3 Öffentliche F+E-Initiativen	490
Modelhafte Sanierung von Altlasten - MOSAL	490
Bilaterale Zusammenarbeit: BMBF - U.S. EPA	490
Sonderforschungsbereich 188 - Reinigung kontaminierter Böden	491
8.3.4 Datenbanken	492
Technologieregister zur Sanierung von Altlasten - TERESA	492
Stoffdatenbank für altlastenrelevante Schadstoffe (STARS)	492

(Kapitel 9 nur auf CD-ROM)

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.1 Verbundvorhaben 1: Kordinierung des Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung" und Entwicklung eines Leitfadens"

9.2 Verbundvorhaben 3: Biologische Sanierung von Rüstungsaltpasten

- 9.2.1 Teilvorhaben 3.1: Entwicklung eines mikrobiologischen Sanierungsverfahrens am Beispiel des ehemaligen Sprengstoffwerkes "Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld
- 9.2.2 Teilvorhaben 3.1.1: Aerob und anaerob-aerobe Behandlung von TNT-kontaminierten Böden vom Standort (Immobilisierung)
- 9.2.3 Teilvorhaben 3.1.2: Anaerobe Extraktion in Perkolationssäulen
- 9.2.4 Teilvorhaben 3.1.3: Naßchemische Behandlung von TNT-belasteten Prozeßwässern
- 9.2.5 Teilvorhaben 3.1.4: Technikumsversuche zur Optimierung und zum scale up der Sanierungsverfahren
- 9.2.6 Teilvorhaben 3.3: Kompostierung von Rüstungsaltpasten mit Weißfäulepilzen - Schadstoffbilanzierung und Qualität des sanierten Bodens -
- 9.2.7 Teilvorhaben 3.4: Bioremediation von TNT-belasteten Böden mit Pilzen; Untersuchungen zur Metabolisierung, Mineralisierung und Humifizierung
- 9.2.8 Teilvorhaben 3.7: Aufnahme von TNT in krautige Pflanzen
- 9.2.9 Teilvorhaben 3.8: Abbau der Sprengstoffe Hexogen und Hexyl durch Pilze

9.3 Verbundvorhaben 4: Ökotoxikologische Testbatterien

- 9.3.1 Teilvorhaben 4.1: Praxiserprobung biologischer Testverfahren
- 9.3.2 Teilvorhaben 4.2.1: Praxiserprobung und Standardisierung von Testmethoden mit terrestrischen Invertebraten
- 9.3.3 Teilvorhaben 4.2.2: Entwicklung und Einsatz eines standardisierten Testsystems mit Bodenprotozoen
- 9.3.4 Teilvorhaben 4.3.1: Gefährdungstestverfahren mit gentechnisch veränderten Reporterbakterien für die Altlastensanierung
- 9.3.5 Teilvorhaben 4.4 Bodenextraktionsverfahren zur Bewertung des ökotoxikologischen Potentials von Böden.
Teil A: Entwicklung und Erprobung eines Verfahrens zur Herstellung von Bodeneluaten für chemische Analytik und ökotoxikologische Tests
Teil B: Validierung des Testes mit *Eisenia fetida*
- 9.3.6 Teilvorhaben 4.5: Entwicklung und Validierung von genotoxikologischen und ökotoxikologischen Tests zur Bewertung der Rückhaltefunktion von Böden
- 9.3.7 Teilvorhaben 4.6: Entwicklung eines chronischen Toxizitätstests mit Pflanzen
- 9.3.8 Teilvorhaben 4.7: Ermittlung optimaler Lagerungsbedingungen für Bodenrückstellproben für toxikologische Untersuchungen in Abhängigkeit von der Schadstoffbelastung

9.4 Verbundvorhaben 5: Langzeit- und Remobilisierungsuntersuchungen

- 9.4.1 Teilvorhaben 5.1: Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von PAK bei der biologischen Bodensanierung
- 9.4.2 Teilvorhaben 5.2: Biologische Bodensanierung – Beurteilung des Langzeitverhaltens / der Remobilisierung festgelegter Schadstoffe (PAK sowie TNT und Metabolite)
- 9.4.3 Teilvorhaben 5.3.1: Dynamisches Beetverfahren: Analyse der Bindungsstrukturen nicht extrahierbarer TNT-Transformationsprodukte
- 9.4.4 Teilvorhaben 5.3.2: Alternierender Anaerob-/Aerob-Prozess: Analyse der Bindungsstruktur von metabolisiertem und humifiziertem TNT im Boden
- 9.4.5 Teilvorhaben 5.3.3: Analyse der Bindungsstrukturen gebundener TNT-Rückstände im Boden nach biologischer Behandlung durch das Weißfäulepilzverfahren und Remobilisierungsversuche

9.5 Verbundvorhaben 6: Maßstabgerechte Erprobung biologischer Verfahren mit Erfolgskontrolle am Standort 'Werk Tanne' bei Clausthal-Zellerfeld

- 9.5.1 Teilvorhaben 6.1: Anaerob/aerobes Kompostierungsverfahren
- 9.5.2 Teilvorhaben 6.2: Dynamisches Beetverfahren
- 9.5.3 Teilvorhaben 6.3: Pilzverfahren

9.6 Verbundvorhaben 7:

- 9.6.1 Teilvorhaben 7.1: Untersuchung zum mikrobiellen in situ Abbau von CKW
- 9.6.2 Teilvorhaben 7.2.1: Untersuchungen zum mikrobiologischen Abbau von Restölfractionen unter Einsatz von fettsäuremodifizierten Aminosäuren
- 9.6.3 Teilvorhaben 7.2.2: Synthese von fettsäuremodifizierten Aminosäuren und Proteinhydrolysaten als Tenside für den mikrobiologischen Abbau von Mineralölen

1 Einleitung

Altlasten sind Relikte einer seit rund 150 Jahren währenden industriell geprägten Entwicklung unserer Gesellschaft. Allein die Existenz von Altlasten ist der Beleg dafür, daß bislang das derzeit favorisierte Credo der Nachhaltigkeit eine eher untergeordnete Rolle gespielt hat und mit der Natur allzu sorglos umgegangen wurde.

Die Problematik der Altlasten, die alle Industrieländer betrifft, stellt sich in der Bundesrepublik Deutschland in Form von 362.689 altlastenverdächtigen Flächen (Altablagerungen und Altstandorte, Stand 10/2000) dar, die oft im Rahmen eines Strukturwandels im Zuge von Flächennutzungsänderungen bekannt geworden sind.

Die große Zahl dieser Verdachtsflächen bringt es mit sich, daß die Behörden in Bund, Ländern und Gemeinden gezwungen sind, sich in zunehmendem Maße in vielfältigen Verantwortungsbereichen mit der Bewertung und ggf. der Behandlung solcher Flächen zu befassen.

Den Handlungsrahmen hierzu stecken das Bundesbodenschutzgesetz (BBodSchG) vom 17.03.1998 und die Verordnung zur Durchführung des Bundes-Bodenschutzgesetzes (Bodenschutz- und Altlastenverordnung, BBodSchV) vom 20.07.1998 ab. In §5 Abs. 2 der BBodSchV werden Sanierungsverfahren angesprochen, die nach der gewählten Begriffsbestimmung dem Stand der Technik entsprechen müssen, wenn sie zur Reinigung von Böden zum Einsatz kommen sollen. Hier heißt es: "... technisch und wirtschaftlich durchführbare Verfahren, die ihre praktische Eignung zur umweltverträglichen Beseitigung oder Verminderung der Schadstoffe gesichert erscheinen lassen ...".

Diese praktische Eignung biologischer Verfahren zu demonstrieren und zu dokumentieren war Ziel des BMBF-Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung". In den Jahren 1996 – 2000 wurden hier insgesamt 42 Forschungsvorhaben in Kooperation von Forschungseinrichtungen und Industrie bearbeitet, die in einer maßstabsgerechten Erprobung von biologischen Verfahren zur Behandlung von TNT-kontaminierten Böden gipfelten, da für dieses Gebiet eine wissenschaftlich begleitete und validierte Machbarkeitsuntersuchung noch ausstand. Durch intensive Grundlagenforschung zur Entwicklung biologischer Sanierungsverfahren konnten in den vergangenen Jahren die Bedingungen ermittelt werden, unter denen der Abbau von Schadstoffen im Boden effizient möglich ist. Die Verfahrensentwicklungen im Forschungsverbund sind mittlerweile abgeschlossen. Drei Ansätze zur Sanierung TNT-kontaminierter Böden sind maßstabsgerecht erprobt und mit dem Ziel intensiv wissenschaftlich begleitet worden, den Erfolg und die Nachhaltigkeit biologischer Sanierungsverfahren durch neue Wege der Gefährdungsabschätzung zu belegen.

Auf Basis des Erkenntniszuwachses im Forschungsverbund und im weiteren Bereich der biologischen Bodensanierungen ist dieser Leitfaden "Biologische Verfahren zur Bodensanierung" zusammengestellt worden. Es wird den Leitfaden als Buchform und auf CD-ROM geben. Die Buchform beinhaltet die Kapitel 1 bis 8, die CD-ROM zusätzlich das Kapitel 9 mit den Kurzvorstellungen der Projekte im Forschungsverbund.

Im Kapitel 2 "Grundlagen der biologischen Bodensanierung" werden theoretische Aspekte zum Abbau und zur Humifizierung von Umweltschadstoffen dargestellt. Praktische Anleitungen zur Beurteilung der biologischen Sanierbarkeit von Böden, zur Steuerung der Abbauprozesse und schließlich zur Beurteilung der Qualität sanierter Böden runden dieses Kapitel ab.

Das Kapitel 2.1 "Beurteilung des Abbauverhaltens von Umweltschadstoffen" gibt einen informativen, aber auch bewußt kritischen Überblick über die Theorie des biologischen Abbaus ausgewählter Schadstoffe ohne die Kapitel mit Detailinformation zu überfrachten. Es werden regelmäßig Bezüge zu dokumentierten Praxisbeispielen hergestellt und damit bildlich die heutigen Möglichkeiten der Anwendung der Biologie in der Bodensanierung aufgezeigt. Den Bogen schließt die Autorin, Frau Dr. Geller, jeweils mit einem Ausblick auf Natural Attenuation, also den natürlichen Rückhalt und Abbau der Schadstoffe.

Im Kapitel 2.2 werden Parameter und Methoden zur Beurteilung der Humifizierbarkeit von Schadstoffen vorgestellt. Das Autorenteam Frau Dr. Annette Eschenbach et al. geht anschaulich auf die Bildung von nicht extrahierbaren Rückständen im Boden ein. Der Nachweis und die immer feineren Methoden zur Charakterisierung dieser schadstoffbürtigen Rückstände haben einen Paradigmenwechsel in der Akzeptanz der biologischen Bodensanierung ausgelöst: Nicht alleine die Mineralisierung ist heute das Ziel der Eliminierung von Schadstoffen aus Boden, sondern auch die Humifizierung, die als natürlicherweise ablaufender Prozeß die Schadstoffe durch Umwandlung in der Bodenmatrix festlegt. Im Kapitel wird auf die Definitionen, auf Methoden zur Ermittlung, auf Grundlagen der Entstehung aus verschiedenen Schadstoffen und auf die Stabilität von nicht-extrahierbaren Rückständen bei biologischer Bodensanierungen ausführlich eingegangen.

Auf Parameter und Methoden zur Beurteilung der biologischen Sanierbarkeit von Böden wird in Kapitel 2.3 eingegangen. Der Autor, Dr. Matthias Kästner, hat bereits an der DECHEMA-Methodensammlung "Labormethoden zur Beurteilung der biologischen Bodensanierung" mitgewirkt, das seit 1992 quasi den Standard zur Beurteilung der biologischen Sanierbarkeit von Böden markiert. Dabei wurde die Urfassung überarbeitet und aktualisiert. Neu hinzugekommen sind Methoden zur Bestimmung von bodenkundlichen und physikochemischen Bodenparametern, deren Einfluß auf die biologische Sanierbarkeit eingehend diskutiert wird.

Frau Dr. Geller stellt in dem Kapitel 2.4 "Maßnahmen zur Steuerung der biologischen Aktivität und ihre Wirkungen" gängige Maßnahmen zur Steuerung der biologischen Aktivität bei der Bodensanierung vor. Der Inhalt baut unmittelbar auf den vorangegangenen Kapiteln auf. Über "einfache" Möglichkeiten der Einflußnahme wie: pH-Wert, Wassergehalt und Temperatur, über die Beeinflussung des Redoxpotentials und die Zugabe von Nähr- und Zuschlagstoffen bis hin zu den kontrovers diskutierten Methoden der Tensidzugabe und dem Zusatz von Mikroorganismen wird das gesamte Spektrum übersichtlich und kritisch dargestellt.

Schließlich kann die Qualitätsbeurteilung sanierter Böden nicht alleine durch chemisch-analytische Ergebnisse abgesichert werden, zusätzlich werden auch Methoden benötigt, die die Nachhaltigkeit der biologischen Bodensanierung belegen. Deshalb werden von den Autoren Frau Dipl.-Geoök. Susanne Fleischmann und Frau Dr. Annette Eschenbach (und Co-Autoren) in Kapitel 2.5 Parameter und Methoden zur Beurteilung der Qualität sanierter Böden vorgestellt, die auf ökotoxikologischen Testsystemen und Tests zur Langzeitstabilität gebundener Rückstände beruhen.

Das Kapitel 3 "Biologische Sanierungsverfahren" von Dr. Jürgen Warrelmann beschreibt die zur Zeit in Deutschland eingesetzten biologischen Sanierungstechniken sowie Verfahren, die nach derzeitigem Kenntnisstand in den nächsten Jahren verstärkt Eingang in die Sanierungspraxis finden werden. Es werden *ex situ*-Techniken (mit Bodenaushub) und *in situ*-Techniken (ohne Bodenaushub) behandelt, wobei *ex situ*-Sanierungen je nach Ort der Behandlungs-

anlage als *on site*- (am Sanierungsort) oder *off site*-Verfahren (außerhalb des Sanierungsortes) unterschieden werden. Zu den *ex situ*-Techniken gehören die Mietentechnik, Reaktorverfahren sowie Kombinationsverfahren. Zu den *in situ*-Techniken zählen Infiltrations- und Belüftungsverfahren, sowie Verfahren der Bioremediation mit deren Hilfe Schadstoffe in der gesättigten und ungesättigten Bodenzone biologisch abgebaut werden. Der Autor geht dabei jeweils auf die Grundlagen, Voraussetzungen, Überwachungs- und Schutzmaßnahmen, sowie Praxiserfahrungen ein. Das Kapitel wird durch einen Beitrag zur vergleichenden ökonomischen Bewertung von biologischen Sanierungsverfahren durch die Autoren Eva Wortmann und Dipl. Geol. Kai Steffens ergänzt.

Das Kapitel 4 "Empfohlene Methoden bei der Qualitäts- und Erfolgskontrolle" beschreibt die Erfahrungen bei der Qualitäts- und Erfolgskontrolle, wie sie bei der maßstabsgerechten Erprobung von biologischen Sanierungsverfahren am Standort "Werk Tanne" für TNT-belastetes Bodenmaterial durchgeführt wurden. Eine Erfolgskontrolle setzt eine reibungslose Zusammenarbeit der Projektbeteiligten und eine einheitliche Vorgehensweise voraus, die einen reproduzierbaren Ablauf der Erprobung von drei Sanierungsverfahren ermöglicht. Darüber hinaus haben die Autoren, Dipl.-Ing. André Dahn, Dr. Annette Eschenbach und Dipl.-Geoök. Susanne Fleischmann das Ziel verfolgt, die Maßnahmen der wissenschaftlichen Begleitung von der Probennahme bis zur Ergebnisbewertung einschließlich Berichterstellung entsprechend den gültigen Regelwerken bzw. den internen Projektfestlegungen nachvollziehbar zu dokumentieren.

Die Sanierung des kontaminierten Bodens wirft eine Reihe von Rechtsfragen auf, auf die in Kapitel 5 "Rechtliche Rahmenbedingungen der biologischen Sanierung" eingegangen wird. Sie betreffen zunächst die Entscheidung über die Durchführung der Sanierung, insbesondere das Bestehen und die Reichweite von Sanierungspflichten. Diese ist vor allem durch das BBodSchG geregelt. Weiter enthält das KrW-/AbfG bedeutsame Vorschriften für den Umgang mit dem kontaminierten Material. Vorschriften über die Errichtung und den Betrieb von Bodenbehandlungsanlagen finden ihre Grundlage primär im BImSchG, den Landes-Bauordnungen sowie dem WHG in Verbindung mit den Landes-Wassergesetzen. Der Autor, Dr. Helmut Fouquet geht im einzelnen auf die Pflicht zur Bodensanierung, die abfallrechtliche Einordnung kontaminierten Bodens, das Anlagenrecht sowie den Wiedereinbau des entnommenen Bodens ein.

Im Kapitel 6 finden sich Übersichtsmatrizen, die die Navigation im vorliegenden Leitfaden erleichtern. Als weitere Hilfestellung werden die Ergebnisse einer Firmenbefragung vorgestellt, die in die Referenzdatenbank Erfolgreicher Biologischer Bodensanierungen (REBB) eingeflossen sind. Die Datenblätter befinden sich – des Umfanges wegen – nur auf der CD-ROM.

Im Rahmen des Verbundvorhabens "Maßstabsgerechte Erprobung von biologischen Verfahren mit Erfolgskontrolle am Standort 'Werk Tanne' bei Clausthal-Zellerfeld" wurden drei biologische Verfahren beispielhaft an mit Nitroaromaten belasteten Böden erprobt. Der Autor, Dipl.-Ing André Dahn erläutert in dem Kapitel 7 "Praxisbeispiel 'Werk Tanne' (maßstabsgerechte Erprobung)" das Konzept für die wissenschaftliche Begleitung, die das Ziel hatte, die Vorgehensweise bei der Verfahrenserprobung zu beschreiben sowie die Maßnahmen für die Qualitäts-/Erfolgskontrolle der drei zu erprobenden Verfahren nachvollziehbar darzustellen. Das erarbeitete Konzept für die wissenschaftliche Begleitung der Verfahrenserprobung liefert

einen grundlegenden Beitrag zur Schaffung einheitlicher Bewertungskriterien und somit für die Erhöhung behördlicher und öffentlicher Akzeptanz von biologischen Sanierungsverfahren.

Kapitel 8 bietet neben dem Autorenverzeichnis ein Glossar und Hinweise auf weitere Informationsquellen.

Die einzelnen Projekte des Forschungsverbundes haben in dem umfangreichen Kapitel 9 "Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes" Ihre Ergebnisse in übersichtlicher Form dargestellt. Diese Ergebnisse sind in weiten Teilen die Grundlage des vorliegenden Leitfadens. Insbesondere die Arbeiten zu Rüstungsaltslasten und der maßstabsgerechten Erprobung, deren Erfolgskontrolle durch ökotoxikologische Testbatterien und die Charakterisierung gebundener Rückstände werden ausführlich dargestellt. Dadurch ist eine beeindruckende Zusammenstellung von Ergebnissen aus vier Jahren erfolgreicher und zielgerichteter Forschungsarbeit dokumentiert.

Mit dem Leitfaden "Biologische Verfahren zur Bodensanierung" hoffen wir die Basis für die Akzeptanz und den Erfolg biologischer Sanierungsverfahren am Markt geschaffen zu haben. Behörden und Unternehmen wird damit eine Entscheidungshilfe bei der Suche und Auswahl nachhaltiger biologischer Sanierungsverfahren für die Wiedernutzbarmachung wirtschaftlich attraktiver Standorte zur Verfügung gestellt. Mögen die in diesem Werk niedergelegten Fakten dazu beitragen, die Entscheidung für ein Verfahren zur biologischen Bodensanierung künftig auf abgesicherter Grundlage treffen zu können.

Es ist den an diesem Leitfaden Beteiligten bewußt, daß der Einsatz biologischer Sanierungen nicht nur eine Frage der Akzeptanz ist, sondern auch eine Frage der Finanzierung. Hier hoffen wir auf die zur Zeit laufenden Aktivitäten zum Flächenrecycling. Wir stellen mit diesem Leitfaden ein Werkzeug zur Verfügung, das die Nachhaltigkeit von Bodensanierungen belegen kann, wie sie das Bundesbodenschutzgesetz fordert.

An dieser Stelle möchten wir uns bei allen Mitwirkenden und Autoren für ihre Mitarbeit und ihr Engagement bedanken, ohne die der Leitfaden nicht zu einem guten und aktuellen Nachschlagewerk zur biologischen Bodensanierung geworden wäre.

Frankfurt am Main, im Mai 2001

Jochen Michels, Thomas Track, Ulrich Gehrke, Dieter Sell

DECHEMA e.V.

2 Grundlagen der biologischen Bodensanierung

Annette Geller

Einführung

Der Einsatz von biologischen Sanierungsverfahren ist immer dann angezeigt, wenn die Schadstoffe in nicht zu hohen Konzentrationen vorliegen und nicht-biologische Verfahren wie z.B. Abschöpfen von Ölphasen, Auskoffern oder Strippen von flüchtigen Kontaminanten nicht mehr effizient sind (Entfernen der Schadstoffe versus zeitlicher und finanzieller Aufwand). Des Weiteren können Biologie und nicht-biologische Verfahren kombiniert werden. Beispiele sind die Sanierung des Pintsch-Geländes, Hanau (ehem. Altölraffinerie, s. Kap. 9.6.1, Literatur in Kap. 2.1.1) und die Reinigung von Aktivkohleabluftfiltern durch biologische Abbau von Kontaminanten, z.B. LCKW [1]. Die biologische Sanierung ist interdisziplinär, da sie auf der Anwendung von geologischen, chemischen, mikrobiologischen und ingenieurwissenschaftlichen bzw. verfahrenstechnischen Kenntnissen beruht. Sie erfordert die Zusammenarbeit von Spezialisten und das Verständnis von Zusammenhängen in den einzelnen Fachgebieten von den beteiligten "Nicht-Spezialisten".

In diesem Kapitel 2 werden Themen mit direktem Bezug zur Biologie behandelt: das Abbauverhalten von Umweltschadstoffen (Kap. 2.1), die Humifizierung von Schadstoffen als Möglichkeit der biologischen Behandlung von nicht vollständig abbaubaren, persistenten Kontaminanten (Kap. 2.2), Grundvoraussetzungen und Parameter für die biologische Sanierbarkeit von Böden (Kap. 2.3), Maßnahmen zur Stimulation des biologischen Abbaus bei Sanierungen, ihre Wirkungen und Nebenwirkungen (Kap. 2.4) und toxikologische und andere Testverfahren zur Beurteilung der Qualität sanierter Böden (Kap. 2.5).

In den einzelnen Kapiteln wird auf den aktuellen Kenntnisstand, die bestehenden Möglichkeiten aber auch auf die Grenzen von biologischen Sanierungen eingegangen. Dagegen werden nicht-biologische Verfahren normalerweise nicht in dieser selbstkritischen Weise analysiert, so daß sie auf den ersten Blick "besser abschneiden", obwohl die Realität dem nicht immer entspricht. Daher sollte das Aufzeigen kritischer Punkte nicht zu einer Ablehnung von biologischen Verfahren führen, sondern einen überlegten und sinnvollen Einsatz auch bei Verfahren ermöglichen, die noch nicht "Stand der Technik" sind. Voraussetzung sind immer auf dem aktuellen Kenntnisstand basierende, gründliche Voruntersuchungen, d.h. Machbarkeitsstudien, um Mißerfolge durch konzeptionelle Fehler, und damit finanzielle Einbußen, im Vorfeld auszuschließen.

Einige mikrobiologische Zusammenhänge und Begriffe

Das Verständnis der biologischen Vorgänge bei der Bodensanierung wird durch Grundkenntnisse der Mikrobiologie und der mikrobiellen Ökologie erleichtert. Daher wird hier kurz auf einige generelle, in Hinblick auf biologische Sanierungen wichtige Zusammenhänge und Begriffe eingegangen. Einzelheiten werden, da wo es erforderlich ist, in den einzelnen Unterkapiteln zum Abbauverhalten der Schadstoffe behandelt.

I. Biologische Umsetzungen von Kontaminanten/organischen Substanzen

Abbau: Kontaminanten können vollständig (Mineralisierung) oder unvollständig (Teilabbau) mit Energiegewinn umgesetzt oder ohne Energiegewinn (Cometabolismus) teilabgebaut und umgebaut werden. Da oft nur die Abnahme von Ausgangskonzentrationen der Kontaminanten gemessen wird, bzw. gemessen werden kann, und der Grad des Abbaus unbekannt bleibt, werden als Hilfskonstruktion die unspezifischen Begriffe "biologisch umgesetzt" und "biologisch angegriffen" verwendet. Wenn nicht unterschieden werden kann zwischen biologischem Abbau und abiotischer Elimination, z.B. bei flüchtigen Kontaminanten, wird der neutrale Begriff "Abreicherung" für Abnahmen von Kontaminanten verwendet.

Mineralisierung: Abbau eines organischen Stoffes mit CO_2 , H_2O und ggf. Salzen als Endprodukte. Wenn eine organische Substanz als Wachstumssubstrat (Kohlenstoff- und Energiequelle = C + E) dient, wird ein Teil des organischen Kohlenstoffs zur Bildung von Biomasse benutzt und als Exkrete ausgeschieden.

- Bei der Mineralisierung leicht abbaubarer Stoffe entstehen in etwa 50 % CO_2 und es werden rund 50% biogener organischer Kohlenstoff (Biomasse inklusive Speicherstoffe und Exkrete) gebildet.
- Höhere CO_2 Werte können auf längerfristigem Nährstoffmangel beruhen, wie Abbauuntersuchungen mit ^{14}C markierten Schadstoffen zeigen. In Speicherstoffe und Exkrete eingebautes ^{14}C und während des Wachstums in Zellbestandteile eingebautes ^{14}C (tote Biomasse nach dem Absterben von Zellen) werden bei Nährstoffmangel nach dem "Recycling"-Prinzip weiter genutzt und dabei zu $^{14}\text{CO}_2$ veratmet.
- In nährstoffreichen Medien, wie sie in der klassischen Mikrobiologie und auch z.T. bei der Anzucht von "Spezialkulturen" verwendet werden, ist der Anteil der Exkrete hoch "luxury consumption". In naturnäheren, nährstoffarmen Medien, <20 mg C/l, liegt er bei etwa 10 % des abbaubaren organischen Kohlenstoffs.

Cometabolismus: Abhängigkeit der Umsetzung eines Stoffes (z.B. Schadstoff) von der Gegenwart eines anderen Stoffes (Cosubstrat).

- Bei cometabolischen Umsetzungen gewinnen die Mikroorganismen keine Energie. Daher benötigen sie immer zusätzliche organische Nährstoffe zur Erhaltung ihrer Lebensfunktionen (Stoffwechsel und Wachstum). In der Regel ist das Cosubstrat gleichzeitig auch Wachstumssubstrat.
- Cometabolische Umsetzungen sind zufällig: nicht streng substratspezifische Enzyme, die eine bestimmte Reaktion beim Abbau von Cosubstraten katalysieren, katalysieren die gleiche Reaktion auch bei strukturverwandten Verbindungen. Der cometabolische Abbau ist normalerweise unvollständig (Transformation, Teilabbau, Umbau). Eine Ausnahme bilden Pilze, die cometabolisch auch CO_2 freisetzen können, z.B. aus PAK und TNT.
- Cometabolisch gebildete, ausgeschiedene Transformationsprodukte können von anderen Bakterien u.U. als Wachstumssubstrate genutzt werden.

Cosubstrate: Können erstens die **cometabolische Umsetzung** von sonst nicht angreifbaren Kontaminanten ermöglichen. Zweitens können **Cosubstrate als Substrate** bei schwerer bis schwer-abbaubaren/mineralisierbaren Kontaminanten:

- als unspezifische C + E Quelle dienen und das Wachstum und die Vermehrung schadstoffabbauender Bakterien ermöglichen;
- aufgrund ihrer Struktur oder mangelnder Bioverfügbarkeit schwer-abbaubare Schadstoffe, speziell höhermolekulare PAK, trotz unzureichender Energieausbeute, in Gegenwart von gut verwertbaren Cosubstraten angegriffen und zumindest teilweise mineralisiert werden;
- Cosubstrate können als "Initialzündler" die nötige Energie für die Synthese spezifischer Abbauenzyme liefern, oder bei ähnlicher Grundstruktur die Synthese von Enzymen induzieren, die zum Abbau von Kontaminanten benötigt werden;
- Cosubstrate können aber auch, als besser verwertbare Substrate, den Abbau von Kontaminanten verhindern bzw. verzögern, z.B. [7].

Schwellenwerte für den Abbau: Unter einer Grenzkonzentration ("threshold concentration") kann auch ein mineralisierbarer Stoff nicht mehr abgebaut werden,

- wenn der Energiegewinn für das Aufrechterhalten des Stoffwechsels oder
- wenn die Konzentration für eine Induktion der Synthese von zum Abbau benötigten Enzymen nicht ausreicht oder
- wenn die Zahl der abbauenden Bakterien zu niedrig und damit die Chance des Aufeinandertreffens eines Bakteriums und eines Schadstoffmoleküls im Raum zu gering ist, z.B [5].

Für klassische Nährstoffe wie Glucose und für Xenobiotika wurden Schwellenwerte für den Abbau zwischen 0,1 $\mu\text{g/l}$ und 2 mg/l gefunden [3; 4]. Bei der cometabolischen Transformation gibt es theoretisch keinen Schwellenwert für den Abbau.

II. Mikroorganismengruppen, Begriffe und Definitionen

Kontaminanten werden schwerpunktmäßig von Bakterien, höheren Pilzen aber auch von Hefen umgesetzt.

Bakterien: Man unterscheidet nach Herkunft und Stoffwechseltypen:

- standorteigene (autochthone, indigene) und standortfremde (allochthone) Bakterien,
- aerobe Bakterien, die Sauerstoff zum Überleben benötigen (Sauerstoffatmung), fakultativ anaerobe Bakterien, die beim Fehlen von Sauerstoff andere Sauerstoffträger zur Atmung benutzen oder auf Gärungen umschalten können (Redox-Reaktionen) und strikt anaerobe Bakterien (Einzelheiten [2]; Kap. 2.1.3.2 – 2.1.3.5, LCKW; Kap. 2.4.2, Maßnahmen),
- aerobe und anaerobe Bakterien unterteilen sich in heterotrophe Bakterien, die organische Substanzen als Kohlenstoff- und Energiequelle (C + E) zum Wachstum benutzen und autotrophe Bakterien, die CO_2 als Kohlenstoffquelle verwenden (Kap. 2.1.3, LCKW).

Bei den heterotrophen Bakterien wird unterschieden zwischen:

- zymogenen Bakterien, die bei hohen Konzentrationen organischer Nährstoffe dominieren,
- oligotrophen Bakterien, die mit sehr niedrigen Nährstoffkonzentrationen wachsen und durch hohe Substratkonzentrationen "vergiftet" werden (*In der für die Sanierungspraxis relevanten Wirklichkeit können die meisten Bakterien - abhängig vom Nährstoffangebot beides, sowohl bei niedrigen (oligotroph) als auch bei hohen (zymogen) Nährstoffkonzentrationen wachsen*) und
- oligocarbohilinen Bakterien, die nur wenige, spezielle organische Substanzen (z.B. aliphatische Gase) umsetzen können (s. Kap. 2.1.3.5, LCKW).

Höhere Pilze sind heterotroph und wachsen normalerweise aerob. Sie bauen Kontaminanten cometabolisch ab (s. Kap. 2.1.2, PAK; 2.1.9, TNT).

Hefen sind einzellige Pilze, deren möglicher Bedeutung beim Abbau von Kontaminanten bisher kaum Beachtung geschenkt wurde.

III. Mikroorganismen und ihre Umwelt

Die aufgeführten physiologischen und taxonomischen Gruppen von Mikroorganismen stellen bestimmte Ansprüche an abiotische Umweltfaktoren (Milieubedingungen), die bei der biologischen Sanierung von Schadensfällen für die unterschiedlichen Stoffklassen durch entsprechende Maßnahmen eingestellt werden können. (s. Kap. 2.1.1 - 2.1.9, Kap. 2.3, Kap. 2.4). Zusätzlich gibt es biologische Faktoren und Mechanismen, die das Zusammenleben und Überleben von Mikroorganismen in ihrer Umwelt (Habitat, Biotop, Ökosystem) regulieren. Für die Sanierungspraxis wichtig sind:

- Synergismus, d.h. die Zusammenarbeit mehrerer Gruppen von Mikroorganismen bei Abbau eines (Schad-)Stoffs, z.B. einige MKW und hochchlorierte LCKW, und Konkurrenz um leicht verwertbare organische Nährstoffe/Kontaminanten, z.B. verschiedene MKW.
- Der horizontale Gentransfer, d.h. die Weitergabe von Eigenschaften (s. Kap. 2.4.5 Maßnahmen) über Artgrenzen hinweg.
- Die Fähigkeit zur Bildung von Dauerformen, wie z.B. Sporen und Zwergformen mit reduziertem Stoffwechsel, wenn die Milieubedingungen ungünstig sind.
- Das sogenannte "grazing", bei dem Bakterien von Bakterien konsumierenden Organismen, wie z.B. Ciliaten und Flagellaten (Einzeller = Protozoen, z.B. [6]), ab einer Dichte von etwa $>5 \times 10^7$ Bakterien/ml bzw. pro cm^3 so lange gefressen werden, bis ihre Zelldichte zu gering wird, um das Überleben der Räuber zu gewährleisten. Die Räuber sterben ab, bzw. bilden Dauerformen aus, die Bakterien vermehren sich wieder, und ein neuer Zyklus kann beginnen.

IV. Begrenzende Faktoren für den Abbau von Kontaminanten

Der Abbau von Kontaminanten kann durch verschiedene Faktoren, die auf der Struktur und den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Stoffe sowie den konzentrationsabhängigen toxischen Wirkungen beruhen, limitiert werden. Des weiteren sind Bodentyp, Korngrößenverteilung, Zusammensetzung der Böden, Bodengefüge und Alter des Schadensfalls wichtig. Die stoffspezifischen und bodenspezifischen Faktoren wirken sich auf die grundsätzliche Sanierbarkeit und auf die Wahl der Sanierungsstrategien aus (s. hierzu Kap. 2.1.1 - 2.1.9, 2.3 und 2.4).

Das Ziel biologischer Sanierungen ist es, durch geeignete Maßnahmen (Kap. 2.3) und Verfahrenssteuerung (Kap. 3) eine ausreichenden Zahl von Mikroorganismen anzureichern und aufrechtzuerhalten, die eine Umwandlung der Kontaminanten in nicht mehr bedenkliche Produkte in vertretbaren Zeiträumen gewährleisten (Kap. 2.5). Aus biologischem Blickwinkel lassen die für eine biologische Sanierung erforderlichen Randbedingungen und Limitierungen in einem vereinfachten Schema darstellen.

Zellzahlen abbauender Bakterien			
zu niedrig	ausreichend	Verringerung durch "Grazing"	Zu niedrig durch Inaktivierung / Absterben
kein Abbau	Abbaugeschwindigkeit		kein Abbau
	nimmt zu mit Zellzahlen	nimmt ab	
< Schwellen konzentration	ausreichende Konzentration		zu hohe Konzentration inhibitorischer Kontaminanten
Bioverfügbare Kontaminanten			

Literatur

1. **Böckle, K. und P. Werner.** 1997. Biologischer Abbau der leichtflüchtigen chlorierten Kohlenwasserstoffe (LCKW) Perchlorethylen, Trichlorethylen, cis-1,2-Dichlorethylen und Vinylchlorid. Abschlußbericht Forschungsvorhaben „Biologische Regeneration von Aktivkohlen unter Einsatz von Spezialkulturen“, FKZ 1450736B.
2. **Fritsche, W.** 1998. Umwelt-Mikrobiologie: Grundlagen und Anwendungen. G. Fischer Verlag Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm, 252 Seiten.
3. **Haider, K.** 1996. Biochemie des Bodens. Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 174 Seiten.

4. **LFU, Materialien zur Altlastensanierung.** 1991. Handbuch Mikrobiologische Bodenreinigung. Bearbeiter Geller, A., Brauch, H.J., Werner, P., Berberich, G., (Hrsg.)Landesanstalt für Umweltschutz Baden Württemberg, Karlsruhe, 233 Seiten.
5. **Ramadan, M. A., El-Tayeb, O. M., and M. Alexander.** 1990. Inoculum size as a factor limiting success of inoculation for biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1392-1396.
6. **Sinclair, J. L., Kampbell, D. H., Cook, M. L., and J. T. Wilson.** 1993. Protozoa in subsurface sediments from sites contaminated with aviation gasoline or jet fuel. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:467-472.
7. **Swindoll, C. M., Aelion, C. M., and F. K. Pfaender.** 1988. Influence of inorganic and organic nutrients on aerobic biodegradation and on the adaptation response of subsurface microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:212-217.

2.1 Beurteilung des Abbauverhaltens von Umweltschadstoffen

Annette Geller

In den Jahren zwischen etwa 1985 und 2001 sind eine Vielzahl von Publikationen zum Abbauverhalten verschiedener, als nicht oder schwer-abbaubar geltender Schadstoffe erschienen. Ein 2001 publizierter Review [1] gibt eine detaillierte Übersicht mit Schwerpunkt auf den nachgewiesenen Abbauwegen. Der Fokus praxisbezogener Forschungs- bzw. F+E-Projekte lag auf PAKs, Chlorethenen und in neuerer Zeit oder in geringerem Umfang auf Chloraromaten, HCHs und TNT. Die folgenden Kapitel geben einen Überblick zum Erkenntnisfortschritt und über den aktuellen Wissensstand unter Laborbedingungen und – soweit untersucht – Bedingungen der Praxis(-nähe). Die Bedeutung der Laborergebnisse wird in Hinblick auf die biologische Sanierbarkeit der Vertreter der einzelnen Stoffklassen kritisch analysiert. Bestehende Grenzen, offene Fragen und Probleme werden angesprochen und durch Fallbeispiele ergänzt.

Das Verhalten der Schadstoffe, ihre biologische Abbaubarkeit und abiotischen Eliminationspfade hängen von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Stoffe ab. Ihre Kenntnis ist Grundvoraussetzung für das Verständnis mikrobiologischer und möglicher konkurrierender abiotischer Prozesse. Die folgenden Kapitel enthalten weder "Gebrauchsanleitungen (Kochrezepte)" noch eine rein Grundlagen-orientierte Auflistung der verschiedensten nachgewiesenen Abbauewege.

Ziel des Textes ist es, dem Praktiker, auch dem Nicht-Biologen, das Verständnis für die als Grundlage von biologischen Sanierungen wichtigen mikrobiologischen Prozesse zu vermitteln und sie von abiotischem Abbau abzugrenzen. Es sollen Denkanstöße gegeben werden in Hinblick auf die Wahl von Sanierungsverfahren und die verschiedenen Möglichkeiten der Prozeßsteuerung. Obwohl zumindest die Sanierung von Schadensfällen mit MKW "Stand der Technik" ist, gibt es sogar hier noch Möglichkeiten der Optimierung durch gezieltes Ausnutzen von stofflichen Eigenschaften und noch ungelöste Probleme (s. Kap. 2.1.1.3).

Literatur

1. **Reineke, W.** 2001. Aerobic and anaerobic biodegradation potentials of microorganisms. In: The handbook of environmental Chemistry. Vol 2, Part K., B. Beek (ed.) Biodegradation and Persistence. Springer Berlin Heidelberg, Chapter 1, pp 1-161.

2.1.1 Mineralölkohlenwasserstoffe

Annette Geller

Mineralölkohlenwasserstoffe (**MKW**) sind Raffinationsprodukte von Rohölen, die aliphatische und aromatische Kohlenwasserstoffe enthalten. Ihre biologische Abbaubarkeit unterscheidet sich aufgrund ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften und ihrer Toxizität. Die physikalischen Eigenschaften wirken sich besonders bei den Aliphaten aus, deren Aggregatzustände von gasförmig bis fest reichen.

2.1.1.1 Aliphatische Kohlenwasserstoffe

Die Aliphate gliedern sich in:

- unverzweigte und verzweigte gesättigte Kohlenwasserstoffe (n- und iso-Alkane = Paraffine),
- ungesättigte Kohlenwasserstoffe mit einer oder mehreren Doppelbindungen (Alkene = Olefine) und mit Dreifachbindungen (Alkine = Acetylene),
- cyclische (Cyclo-) Alkane aus einem bis mehreren Ringen, die fünf und mehr Kohlenstoffatome enthalten.

Aerober Abbau der Aliphate

Für die Sanierungspraxis ist der aerobe Abbau der Aliphate von übergeordneter Bedeutung. Aliphate dienen als Wachstumssubstrate, d.h. als Kohlenstoff- und Energiequelle (C+E-Quelle). Im einfachsten Fall (β -Oxidation) wird die Kohlenstoffkette der **n-Alkane** mit Sauerstoff über einen Alkohol als Zwischenprodukt unter Bildung von Fettsäuren oxidiert und um zwei Kohlenstoffatome verkürzt. Durch wiederholte Abspaltung entstehen solange immer kürzerkettige Fettsäuren, bis der Kohlenwasserstoff vollständig abgebaut ist oder eine weitere Abspaltung von C_2 -Einheiten durch die Struktur des Restes verhindert wird, bzw. nicht mehr möglich ist. Die abgespaltenen C_2 -Einheiten werden unter Bildung von CO_2 und Biomasse als C+E-Quelle genutzt. Da der Energiegewinn beim aeroben Abbau von Fettsäuren hoch ist, können sich die Mikroorganismen schnell vermehren. Bei der Sanierung stagniert der Abbau unter ungünstigen Milieubedingungen wie Sauerstoffmangel auf der Stufe der teiloxidierten Produkte. Allgemein sind neben CO_2 organische Säuren, Ester und in geringerem Maß Asphaltene nachweisbare Produkte der biologischen Umsetzung.

Der Abbau der **Isoalkane** und **Alkene** verläuft nach dem gleichen Prinzip. Sie sind jedoch bedeutend schlechter abbaubar als die n-Alkane, da ihre Verzweigungen bzw. Doppelbindungen den Abbau behindern. Je höher die Zahl der Verzweigungen der Isoalkane ist, desto persistenter sind die Verbindungen. In KW-Gemischen werden sie erst angegriffen, wenn die $C_{10} - C_{18}$ n-Alkane weitgehend eliminiert sind. Die **Cycloalkane** werden am schwersten und häufig nur unvollständig abgebaut. Normalerweise sind für ihre Umsetzung die Zusammenarbeit verschiedener Bakterienarten, die sich ergänzende Enzyme besitzen (Synergismus), und Cosubstrate nötig. Die monozyklischen Alkane können, wie die entsprechenden n-Alkane, abhängig von ihrer Konzentration toxisch für Mikroorganismen sein.

Kettenlänge und aerober Abbau der Alkane

Die biologische Abbaubarkeit der Alkane wird eingegrenzt durch Flüchtigkeit, Toxizität und Bioverfügbarkeit, die von der Kettenlänge der Moleküle abhängen.

- Methan bis Butan (C_1 bis C_4) sind bei 20°C gasförmig und können nur durch einige Spezialisten abgebaut werden.
- Pentan bis Nonan (C_5 bis C_9) sind zwar bei 20°C schon flüssig, aber noch hochflüchtig und für viele KW-abbauende Bakterien toxisch.
- **Decan bis Hexadecan (C_{10} bis C_{16}) sind** bei 20°C flüssig, bez. noch flüssig und **am besten abbaubar**. Die Flüchtigkeit nimmt mit zunehmender Kettenlänge ab und Hexadecan ist schon unter 18°C fest.
- Die höheren Paraffine ab C_{17} sind bei 20°C fest. Die Schmelzpunkte steigen mit der Zahl der C-Atome; sie betragen z.B. für Octadecan (C_{18}) 28°C und für Eicosan (C_{20}) 36°C . In Gemischen wird die Abbaubarkeit der Alkane zwischen C_{18} und C_{24} aufgrund von verbleibenden Restbelastungen bei Schadensfällen noch als "gut" eingestuft.

Die Voraussetzung für den Abbau der Alkane ist die Aufnahme in die Zelle, in der sich die Enzyme befinden, die Aliphate oxidieren (Endoenzyme). In die Zelle aufgenommen werden nur bioverfügbare, d.h. gelöste Stoffe. Die Wasserlöslichkeit der in den MKW enthaltenen Alkane ist gering und nimmt mit zunehmender Kettenlänge ab. Sie liegt z.B. für Hexan (C_6) im mg/l und schon für Octan (C_8) nur noch im $\mu\text{g/l}$ Bereich. Aufgrund ihrer minimalen Wasserlöslichkeit sollten die am besten abbaubaren Alkane (C_{10} bis C_{16}), die in Wasser Ölfilme oder Tropfen bilden, kaum abgebaut werden. KW-abbauende Bakterien können dieses Hindernis jedoch durch die Bildung von **Biotensiden** umgehen die entweder die KW so emulgieren, daß Aufnahme und Abbau rentabel werden ("Majonnaisebildung") oder sie heften sich mit lipophilen Oberflächenstrukturen an Ölfilme und nehmen die KW so in direktem Kontakt auf (s. Maßnahmen: Kap. 2.4.4.2, 2.4.4.3). Ab einer gewissen Festigkeit der KW versagen diese Mechanismen und die Stoffe sind nicht mehr abbaubar. (Verwendete Literatur [8; 20; 32; 51; 59]).

Anaerober Abbau der Aliphate

Man hielt Aliphate für anaerob nicht angreifbar, bis in neuerer Zeit unter **denitrifizierenden Bedingungen** der Abbau von $C_5 - C_{12}$ Alkanen durch aggregatbildende Bakterien, die an der Rohölschicht haften und sie emulgieren [63] und von Pristan [13] nachgewiesen wurde. Von größerer praktischer Bedeutung ist jedoch der anaerobe Abbau der aerob bei der Oxidation der Alkane gebildeten Fettsäuren, die schneller umgesetzt werden als die Aliphate. Bei Sauerstoffmangel kann dieses für einen sequentiellen aerob/anaerob (Sauerstoffdosierung/Nitratdosierung) Abbau [17] bei Sanierungsmaßnahmen (Kap. 2.4.2), genutzt werden.

In den letzten Jahren wurde auch die Umsetzung von Alkanen und 1- Alkenen mit **Sulfat** als Elektronenakzeptor in Proben aus langfristig mit Kohlenwasserstoffen belasteten Sedimenten nachgewiesen. Dabei werden anscheinend Fettsäuren als Zwischenprodukte gebildet. Isolierte, sulfatreduzierende Bakterienstämme wuchsen, wenn auch langsam, mit $C_{12} - C_{20}$ Alkanen, und aus ^{14}C -Hexadecan wurde $^{14}\text{CO}_2$ freigesetzt [1; 2; 16; 18; 79]. Ein mit einem Isolat durchgeführter Vergleich zeigte, daß das Wachstum mit $C_4 - C_{16}$ Fettsäuren in diesem Fall vier mal schneller war als mit $C_{13} - C_{18}$ Alkanen [79]. In welchem Ausmaß der Abbau von

Aliphaten unter sulfatreduzierenden Bedingungen zu Selbstreinigungsprozessen beitragen kann, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

2.1.1.2 BTEX-Aromaten

Die in Produkten der Mineralölkohlenwasserstoffe enthaltenen Aromaten sind "bedeutend" **wasserlöslicher** als die Aliphate. Der Schwerpunkt liegt um 100 – 200 mg/l bei Raumtemperatur mit Benzol (1,76 g/l) und Trimethylbenzol (20 mg/l), dessen Wasserlöslichkeit der des Naphthalins entspricht, als Extremwerten [68]. Die Angaben zu den für Bakterien **toxischen Konzentrationen** der Aromaten schwanken. Im aeroben Milieu tolerieren die Bakterien anscheinend höhere Konzentrationen, > 100 mg/l, als im Anaeroben, < 100 mg/l.

Aerober und anaerober Abbau der Aromaten und Metabolite

Der **aerobe Abbau** wird mit der Oxidation des aromatischen Ringes durch Sauerstoff zu polaren Produkten eingeleitet. Zentrales Zwischenprodukt sind Brenzcatechine (Phenolderivate mit zwei benachbarten Hydroxylgruppen (Catechole)), aus denen durch Ringspaltung offenkettige Carbonsäuren entstehen, die zu CO₂ und Biomasse verstoffwechselt werden (Abbauweg I). Alkylbenzole (T, E, X) können statt dessen auch als erstes an der Seitenkette oxidiert werden (Abbauweg II). Der **anaerobe Abbau** der BTEX-Aromaten wurde mit Nitrat, Eisen (Fe³⁺) und Sulfat als Elektronenakzeptoren und unter methanogenen Bedingungen nachgewiesen. Der anaerobe Abbau von Toluol und Xylol mit Nitrat wird wie bei dem aeroben Abbauweg II durch die Oxidation der Methylgruppe eingeleitet [20; 32; 51; 78].

Metabolite: Beim aeroben Abbau können sich bei Sanierungen unter ungünstigen Bedingungen weiter verwertbare Teilabbauprodukte wie aromatische Aldehyde, Phenole und Säuren, z.B. Benzoesäure anreichern. Daneben können auch sogenannte "**dead-end**" **Metabolite** (wie "dead end street" = Sackgasse) ausgeschieden werden, die zumindest für die Bakterien, die sie bilden, nicht weiter abbaubar sind. Nachgewiesen wurden für p-Xylol (aerob) 3,6-Dimethylcatechol und für o-Xylol (anaerob) Methylbenzylbernstein- und -fumarsäure. Auch bei der Mineralisierung von Toluol (anaerob mit Nitrat bzw. mit Sulfat als Elektronenakzeptor) können ähnliche Produkte (Benzylbernstein- und -fumarsäure) in geringen Mengen gebildet werden [10; 26; 34; 76; 77; 78; 83].

Vergleich der aeroben und anaeroben Abbaubarkeit der Aromaten

Die monozyklischen Aromaten und Naphthalin als Bestandteile von MKW sind unter aeroben und anaeroben Milieubedingungen unterschiedlich "gut" bzw. "schnell" abbaubar, wobei sich die Abbaubarkeit der einzelnen Aromaten im gleichen Milieu, z.B. aerob, unterscheidet von der Abbaubarkeit eines Aromaten unter verschiedenen Milieubedingungen. Die Einordnung der Abbaubarkeit ergibt sich in beiden Fällen aus den Ergebnissen der Fragen:

1. Kann ein Aromat unter den gegebenen Milieubedingungen überhaupt angegriffen werden?
2. Kann der Aromat als Wachstumssubstrat genutzt und vollständig abgebaut werden?
3. Wie groß ist der Energiegewinn und damit die Geschwindigkeit der Vermehrung (Teilungsrate = Zahl der Zellteilungen pro Zeiteinheit)?
4. Wieviel Bakterienarten können den Aromaten mineralisieren?

Da für MKW eine möglichst schnelle **Mineralisierung** der Schadstoffe das angestrebte Ziel biologischer Verfahren ist, sind die drei letzten Fragen von entscheidender Bedeutung für die Sanierungspraxis. Daher sind in Tab. 2.1 für einen Vergleich der Abbaubarkeiten nur die Ergebnisse von Arbeiten aufgeführt, in denen die Mineralisierung mit radioaktiv markierten Aromaten und/oder Wachstum mit Aromaten als einziger organischer Kohlenstoffquelle nachgewiesen wurde. Durch diese Eingrenzung wird der **cometabolische Abbau** nicht erfasst, der aerob bei den Xylole (speziell o-Xylol) wichtig ist.

Tab. 2.1: Mineralisierung von Aromaten ($^{14}\text{CO}_2$ oder Wachstum als einzige organische Kohlenstoffquelle) unter aeroben, denitrifizierenden, eisenreduzierenden, sulfatreduzierenden und methanogenen Bedingungen

Aromat	Mineralisierung				
	aerob	anaerob	anaerob		
	Terminale Elektronenakzeptoren				
	O_2	NO_3^-	Fe^{3+}	SO_4^{2-}	CH_4
Benzol	+(+)	(+*)	+	+/-	+/-
Toluol	+++	+++	+	+	+
Ethylbenzol	++	+	n.d.	n.d.	-
o-Xylol	+	(+*)	n.d.	+	+
m-Xylol	+	+	n.d.	+	-
p-Xylol	+	-	n.d.	+	-
Trimethylbenzol	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Naphthalin	+	(+*)	n.d.	+	-

O_2 und NO_3^- : +++ Wachstum gut, bzw. mineralisierende Bakterien häufig, ++ Wachstum mittel, bzw. mineralisierende Bakterien weniger häufig, + Wachstum schlecht, bzw. mineralisierende Bakterien selten, - keine Mineralisierung, (+*) Mineralisierung nur in einer Arbeit nachgewiesen.

Fe^{3+} , SO_4^- und methanogen: + Mineralisierung, - keine Mineralisierung, +/- beides gefunden; n.d.: nicht untersucht.

Literatur: O_2 [7; 30; 31; 36; 50; 65; 69; 83], NO_3^- [15; 27; 31; 43; 49; 61; 71; 89], Fe^{3+} [53; 55; 57; 74], SO_4^- [9; 18; 23; 25; 33; 38; 54; 62], methanogen [24; 87]

Die relativ große Zahl der Vergleiche der Mineralisierung von mehreren Aromaten durch Bakterienstämme und natürliche Bakteriengemeinschaften unter aeroben und denitrifizierenden Bedingungen ermöglicht eine differenzierte Klassifizierung der Abbaubarkeit:

Aerob wurde Toluol gefolgt von Ethylbenzol am besten abgebaut, während die Xylole bedeutend schlechter bzw. selten mineralisiert wurden. Benzol nimmt eine Mittelstellung ein (Tab. 2.1). In Gemischen können sich Aromaten wechselseitig sowohl positiv als auch negativ beeinflussen, indem der Abbau einzelner KW, z. B. Benzol + Toluol fallweise gefördert oder

gehemmt werden kann. Ein Sonderfall der Förderung ist die cometabolische Umsetzung von o-Xylol mit Toluol als Cosubstrat. Wechselwirkungen können also den Abbau von Aromaten in Gemischen zusätzlich beeinflussen [4; 6; 7; 30; 31; 36; 50; 65; 69; 83].

Anaerob mit **Nitrat** als Elektronenakzeptor wurde Toluol ebenfalls am leichtesten mineralisiert, während Ethylbenzol selten, o- und p-Xylol nicht, bzw. nur vereinzelt und Benzol mit einer Ausnahme nicht mineralisiert wurde. Erstmalig wurde auch die teilweise Mineralisierung von Naphthalin (hier als MKW-Bestandteil) nachgewiesen [71]. Bei m-Xylol variierten die Ergebnisse: Es wurde nicht, kaum oder sehr schnell mineralisiert [15; 27; 29; 31; 39; 43; 44; 49; 61; 77; 81; 89]. In den letzten Jahren wurde nachgewiesen, daß einzelne Aromaten anaerob auch bei niedrigerem Redoxpotential mineralisiert werden können: So wurden Benzol und Toluol mit **oxidiertem Eisen (Fe^{3+})** als Elektronenakzeptor [53; 55; 57; 74], Benzol, Toluol, o-, m-, p-Xylol und Naphthalin mit **Sulfat** als Elektronenakzeptor [9; 18; 23; 25; 33; 38; 54; 62; 86] und Benzol, Toluol und o-Xylol **unter methanogenen Bedingungen** (s. Tab. 2.1) [24; 87] mineralisiert.

Die Geschwindigkeit des Abbaus von Aromaten nimmt ab in der Reihenfolge:
aerob > anaerob-denitrifizierend > anaerob-sulfatreduzierend > methanogen

Ursache ist das stufenweise Absinken des Energiegewinns vom aeroben bis zum strikt anaeroben, methanogenen Abbau. Denn je geringer der Energiegewinn ist, desto langsamer vermehren sich die Bakterien. Je geringer die Zahl ihrer Zellen ist, desto langsamer ist der Abbau pro Zeiteinheit, obwohl eine einzelne Zelle zunehmend mehr Moleküle umsetzen muß, um überhaupt wachsen zu können.

Für *In situ*-Sanierungen kann der anaerobe Abbau von Aromaten unter sulfatreduzierenden und methanogenen Bedingungen wichtig sein, da es dadurch zu einer sehr langsamen Selbstreinigung kommen kann, auch wenn Sauerstoff und Nitrat verbraucht sind.

Auch die Häufigkeit des Vorkommens abbauender Bakterienstämme bestimmt die Geschwindigkeit der Umsetzung. Arten, die Aromaten aerob als C+E-Quelle nutzen, sind häufiger als Arten, die Aromaten anaerob verwerten können. Von 13 aus einem BTEX-kontaminierten Aquifer isolierten Stämmen wuchs nur ein Teil anaerob mit Nitrat als Elektronenakzeptor. Das Verhältnis der Anzahl der Bakterienarten, die mit Benzol, Toluol und Ethylbenzol wuchsen, lag jeweils bei 3 : 1 (aerob : anaerob mit Nitrat) [50]. Bakterien, die Aromaten unter sulfatreduzierenden und methanogenen Bedingungen verwerten können, wurden bisher nur vereinzelt nachgewiesen.

In einer an der Sanierungspraxis orientierten Untersuchung wurden die Wirkungen von Sauerstoff und Nitratzugabe auf den Abbau von Aromaten (Abnahme der Ausgangssubstanzen) mit unbelastetem Aquifermaterial verglichen [43]. Die Ergebnisse belegen klar, wie bei Hexadecan [17], daß die Zugabe von Nitrat allein weniger sinnvoll ist als die Kombination mit Sauerstoff:

- **Aerob** waren Benzol, Toluol, Ethylbenzol, o- und m-Xylol und Trimethylbenzol nach einer Woche nicht mehr nachweisbar.
- **Semiaerob**, d.h. unter Sauerstofflimitierung, stagnierte der Abbau nach einer Woche aufgrund von Sauerstoffmangel.

- **Semiaerob mit Nitrat** waren Toluol, Ethylbenzol nach 2 Wochen, m-Xylol und Trimethylbenzol nach 4 bzw. 7 Wochen nicht mehr nachweisbar. Die Konzentrationen von Benzol und o-Xylol sanken nie unter die Nachweisgrenze.
- **Anaerob mit Nitrat** wurde Benzol nicht abgebaut. Toluol, Ethylbenzol, m-Xylol und Trimethylbenzol waren nach 3 Wochen nicht mehr nachweisbar; von o-Xylol verblieben Restkonzentrationen.
- **Anaerob** wurde nur Toluol langsam umgesetzt.

Das o.g. Aquifermaterial wurde 8 Monate anaerob mit BTEX und Nitrat inkubiert und die Mineralisierung der ^{14}C -markierten Aromaten vorher und nachher verglichen, um den Einfluß der **Adaptation** (Anpassung) an den Aromaten-Abbau unter denitrifizierenden Bedingungen zu prüfen [44]. Vor der Adaptation wurden nur Toluol und m-Xylol mineralisiert. Nach den acht Monaten Kontaktzeit wurde auch o-Xylol mineralisiert, und die Benzolkonzentration nahm ab. In einer anderen Untersuchung mit BTEX kontaminiertem Aquifermaterial gingen die Konzentrationen von Benzol, o-, m- und p-Xylol anaerob bei Nitratzugabe erst nach einer Adaptationszeit von sechs Monaten zurück, während Toluol und Ethylbenzol schon nach einem Monat nicht mehr nachweisbar waren [82].

Die exemplarisch zitierten Untersuchungen zeigen, daß eine deutliche Abnahme von weniger gut abbaubaren Aromaten mit zeitlicher Verzögerung nach einer sogenannten Adaptationszeit einsetzen kann. Voraussetzung ist, daß die abbauenden Bakterien für eine Sanierung ausreichend hohe Zellzahlen erreicht haben. Bei älteren Schadensfällen erhöht sich die Chance, daß schon an die Kontaminanten adaptierte Bakteriengemeinschaften vorhanden sind und sich dadurch die zeitliche Verzögerung verringert.

2.1.1.3 Mineralölprodukte

Schadensfälle mit Mineralölprodukten machen den Großteil der biologischen Sanierungen aus. Die erfolgreiche *Ex situ*-Behandlung von MKW kontaminierten Böden ist inzwischen "Stand der Technik". Auf noch verbliebene, kritische Punkte wird im folgenden eingegangen.

Schadensfälle mit Mineralölprodukten, Destillaten von Rohölen wie Benzin, Dieselkraftstoff, leichtes und schweres Heizöl, Kerosin und Schmieröle sind aufgrund ihrer chemischen Zusammensetzung **Mischkontaminationen**. Die Rohöle, deren Zusammensetzungen sich nach ihrer Herkunft unterscheiden (s. Tab. 2.2), können in drei Gruppen unterteilt werden, in

1. paraffinbasierte (n- und iso-Alkane dominieren),
2. naphthenbasierte (Cycloalkane dominieren) und in
3. gemischtbasierte Rohöle (etwa gleiche Teile der beiden Gruppen).

Die physikalischen Eigenschaften und die chemische Zusammensetzung der daraus gewonnenen Raffinationsprodukte hängen von der Destillationstemperatur (Benzinfraktion; Mitteldestillate: Kerosin, Dieselöl, leichtes u. schweres Heizöl; Rückstandsöl (s. Tab. 2.3)) ab, sowie von dem verwendeten Rohöl und dem Raffinationsprozeß. Letztere wirken sich auf die Gehalte an Paraffinen, Naphthenen, Aromaten und Heterozyklen aus. Olefine (Alkene) entstehen erst bei der Raffination.

Tab. 2.2: Schwankungsbreiten der Kohlenwasserstoffe in Rohölen [58].

Stoffgruppe	Zusammensetzung	ca. Anteil [%]
Paraffine	n- und iso-Alkane	10 – 70
Naphthene	mono- u. polyzyklische Alkane	30 – 80
Olefine	Alkene	(nicht in Rohölen)
Aromaten	mono- u. polyzyklische Aromaten	20 – 30
Heterozyklische Kohlenwasserstoffe	O-, S-, N-haltige Stoffe	≤ 18

Mit steigender Destillationstemperatur verschiebt sich die Verteilung der Kohlenwasserstoffe in den höher- bis hochmolekularen Bereich, und die Wasserlöslichkeit nimmt ab (Tab. 2.3). Für Handelsprodukte werden in der Regel nur physikalische und chemische Kenngrößen angegeben die einfacher zu bestimmen sind, da eine Aufschlüsselung der Einzelstoffe in den Produkten zu aufwendig bzw. schwierig ist [3; 19; 40; 72; 73]. Eine differenzierte Einzelanalyse der Stoffe, ihrer Konzentrationen und Summenkonzentrationen und MTBE-Gehalte liegen für Ottokraftstoffe vor (Tab. 2.4). Die vom Gesetzgeber auf maximal 5 % begrenzte Benzolkonzentration lag in den analysierten Kraftstoffen unter diesem Wert [19].

Tab. 2.3: Molekülgrößen und Wasserlöslichkeiten von MKW-Produkten in Erdölfractionen [3; 19; 40]

Erdölfractionen (Destillationstemp.)	Benzinfraktion (≤ 150° C)	Mitteldestillate (150 – 370° C)	Rückstandsöl (≥ 370° C)
Produkte	Benzine	Dieselöl, Heizöl El	Schmieröle
Alkane gesamt	C ₄ – C ₁₀	C ₈ – C _{≥29}	C ₁₉ – C ₄₄
Aromaten gesamt	C ₆ – C ₁₀	C ₇ – C _{≥20}	Abhängig von der Siedelage
Gesamtwasserlöslichkeit [mg/l]	ca. 100 – 250	5 – 20	"unlöslich"

Methyltertiärbutylether (MTBE) wird den Kraftstoffen zugesetzt, um die Oktanzahl zu erhöhen und die CO₂-Emission zu verringern. MTBE ist mit rd. 50 g/l gut wasserlöslich und biologisch schwer abbaubar, auch wenn die Mineralisierbarkeit nachgewiesen wurde [37]. MTBE verursacht im Wasser schon in einem Konzentrationsbereich von 20 – 40 µg/l einen unangenehmen Geruch und Geschmack. Die toxikologische Wirkung ist nur unzureichend untersucht. Aufgrund seiner Merkmalskombinationen wird MTBE als potentieller Problemstoff für das Grundwasser angesehen, der bisher in Europa kaum berücksichtigt wurde [75].

Tab. 2.4: Typische Zusammensetzung (KW und MTBE) von Ottokraftstoffen [19]. Richtwerte, da die Zusammensetzung der Kraftstoffe in Abhängigkeit von Rohölen/Raffinerieausstattung schwankt.

Ottokraftstoff (bleifrei)	Normal	Super	Super plus
Kohlenwasserstoffe [Massen %]			
Summe Alkane C₄ – C₁₀	50 – 65	40 – 60	35 – 55
Summe Alkene C₄ – C₁₀	0 – 35	0 – 25	0 – 5
Summe Aromaten C₆ – C₁₀	23 – 35	35 – 55	38 – 55
Methyltertiärbutylether [Vol. %]			
Sommer 1992* (Mittelwerte)	0 – 7,9 (1,1)	0 – 9,9 (2,2)	0,1 – 16,6 (9,2)
Winter 1992/93* (Mittelwerte)	0 – 4,1 (0,5)	0 – 9,0 (1,1)	0 – 14,2 (8,4)

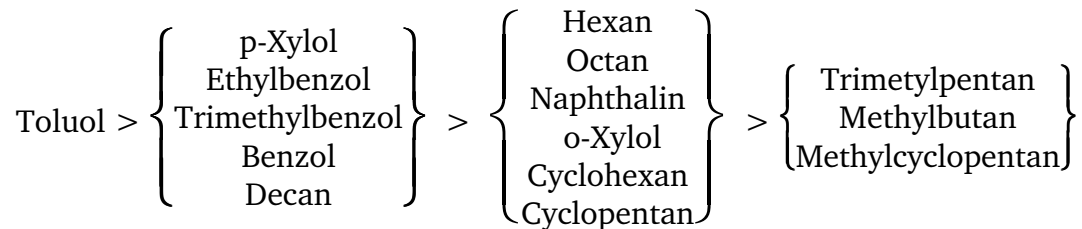
* Bundesrepublik Deutschland

Ein Problem bei der biologischen Sanierung von Schadensfällen mit Mineralölprodukten sind **Restkonzentrationen** die häufig dem Erreichen des Sanierungszieles entgegenstehen. Auf die verschiedenen Erklärungen wird am Ende dieses Kapitels eingegangen. Eine Grundfrage, die nur begrenzt angesprochen wird, ist die Frage nach den Restkonzentrationen *von was?* Der Raffinationsprozeß und die unterschiedliche Zusammensetzung der Rohöle spiegeln sich in den Produkten wieder, wie das Beispiel der Ottokraftstoffe zeigt. Über ihre Abbaubarkeit tragen die Verteilung der Molekülgrößen und die Anteile von biologisch besser und schlechter abbaubaren Kohlenwasserstoffe und die Zusätze zu den Restkonzentrationen bei.

Dieselöl enthält neben n-Alkanen, von denen die anteilmäßig dominierenden C₁₀ – C₁₄-Alkane schnell abgebaut werden, auch unterschiedlich stark verzweigte Isoalkane und ein breites Spektrum von Aromaten, die z. T. schwer abbaubar sind [19; 41]. Der Schwerpunkt von Einzelstoffbestimmungen liegt bei Schadensfällen aus analytischen und Kostengründen normalerweise auf Angaben zur Verteilung der Kettenlängen der n-Alkane und den Gehalten an Isoalkanen als Gewichtsprozent der Summe der Einzelstoffe vorher und nachher. Da sich das Verteilungsmuster der Alkane durch Abbau verschiebt, kommt es im Verlauf von Sanierungen und bei älteren Schadensfällen zu einer relativen Anreicherung (scheinbare Zunahme) von Isoalkanen. Die Isoalkane **Pristan** (2,6,10,14-Tetramethylpentadecan) und **Phytan** (2,6,10,14-Tetramethylhexadecan) werden oft sogar als "interne Standards" benutzt, da sie am schlechtesten abgebaut werden; z.B. nahmen die Phytan- und Pristangehalte in rund neun Monaten um 35 % ab, während sich die Hexadecankonzentration in derselben Zeit um 60 % verringerte [21; 22].

2.1.1.4 Biologischer Abbau und Ausgasverluste

Aus einem **über 6 Jahre mit Benzin kontaminierten Aquifer** wurden mit einzelnen Bestandteilen des Benzins als Substrat 300 Bakterienstämme isoliert, von denen die Majorität mit Toluol (70 %), aber nur 30 – 40 % mit anderen Aromaten als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen konnten [65]. Der prozentuale Anteil der abbauenden Stämme verringerte sich in nachfolgender Reihenfolge der Substrate, wobei sich diese zu Blöcken zusammenfassen lassen:



Diese Reihenfolge kann sich bei Schadensfällen verschieben. Außerdem ist verstärkt ein stufenweiser Abbau durch unterschiedliche Bakterienarten anstelle einer direkter Mineralisierung zu erwarten, wobei sich an den jeweiligen Schadenstyp adaptierte Gemeinschaften in ihren Leistungen ergänzen können. Da MKW-Schadensfälle Mischkontaminationen sind, können sich die einzelnen Stoffe in ihrem Abbauverhalten wechselseitig beeinflussen, wie die Beispiele beim aeroben Abbau der Aromaten zeigen (s. Kap. 2.1.1.2). Des weiteren können die Kontaminanten unterschiedlich stark inhibitorisch auf die Mikroorganismengemeinschaften wirken und damit einen Selektionsdruck hin zu resistenten Arten ausüben [42; 45].

Ausgasverluste: Die niedriger molekularen Kohlenwasserstoffe sind flüchtig und lassen sich durch Ausgasen abreichern, so daß inhibitorische bzw. toxische und gut bis schwer abbaubare Bestandteile von Mineralölprodukten, wie z.B. Trimethylcyclohexan [60] eliminiert werden können (Tab. 2.5). Benzin weist die höchsten Anteile an flüchtigen Stoffen auf, während Dieselöl etwa 20 % flüchtige Komponenten enthält, die schnell ausgasen [11; 52]; Kerosin nimmt eine Mittelstellung ein (Tab. 2.6). Mit abnehmender Flüchtigkeit der MKW nimmt die Bedeutung ihrer biologischen Abbaubarkeit zu. Die Geschwindigkeit des Ausgasens ist in gewissem Ausmaß temperaturabhängig (Tab. 2.6). Die Größenordnung des **Temperatur-effektes** bei Benzin zeigt der Vergleich der Abnahmen bei 17° C, 27° C und 37° C. Die Erhöhung der Temperatur um jeweils 10° C steigerte die Ausgasung um rund 10 % [81].

Die Flüchtigkeit von Bestandteilen der MKW kann gezielt zur Beschleunigung der biologischen Sanierung genutzt werden. In einem Schadensfall mit Kerosin wurden die flüchtigen Kohlenwasserstoffe *on site* in einer Halle mit Luftabsaugung durch häufiges Wenden des Bodens gestrippt und die Abluft über Aktivkohlefilter geleitet. Durch diese Verfahrenskombination wurde der Boden in 2 Monaten bis auf eine Restkonzentration von 2 – 4 % gereinigt, wobei der biologische Abbau einen Anteil von 38 – 40 % hatte [70]. Für *In situ*-Sanierungen wurde eine Verfahrenskombination von Belüftung des Untergrundes mit Druckluft und Luftabsaugung mit angeschlossenem Biofilter beschrieben. In vier Wochen wurde der MKW- Gehalt von Kraftstoffen im Boden von 5 – 8 g/kg auf 1,5 g/kg abgesenkt. Die Temperatur des Untergrundes stieg durch erhöhte biologische Aktivität von 15° C auf 30° C an [5].

Tab. 2.5: Ausgasverluste einiger aliphatischer und aromatischer Kohlenwasserstoffe

Stoffe	Abnahme [%]	Zeit	Bedingungen	Lit.
C ₉ – C ₁₂ Aliphate	50	ca. 1 h	feuchte, sandige Böden	[12]
C ₉ – C ₁₉ Aliphate Alkylbenzole	50	12–13 h		
C ₈ – C ₉ Alkane	100	< 2,5 h	Vorbereitung von Dieselöl für die Analyse	[14]
Pentan, Benzol, Toluol	100	7 d	Untersuchung des zeitlichen Verlaufs des Abbaus von Altöl in belüfteten Bodensäulen: Kohlenwasserstoffe in der über Aktivkohlefilter geleiteten Abluft.	[69]
Hexan, Heptan, Octan, Cyclohexan, m- und p-Xylol	70–80	7 d		
o-Xylol, Isopropylbenzol	< 40	7 d		
Hexen-1, Ethylbenzol, Trimethylbenzol	< 20	7 d		

Zusammenfassung: In Hinblick auf die vorrangigen Eliminationsprozesse bei Verfahren in denen Ausgasverluste unumgänglich sind, wie Mietenverfahren, Spülkreisläufe und u. U. bei Zwangsbelüftung des Bodens, können die Kohlenwasserstoffe in drei Gruppen unterteilt werden:

1. **Flüchtigkeit > Abbau:** Die Abreicherung der KW wird durch Ausgasen dominiert, auch wenn die Stoffe biologisch gut abbaubar sind.
2. **Flüchtigkeit und biologischer Abbau konkurrieren:** Aufgrund der geringeren Flüchtigkeit können die Bakterien die Stoffe angreifen.
3. **Flüchtigkeit < Abbau:** Die Geschwindigkeit der Abnahme wird durch die biologische Abbaubarkeit und Bioverfügbarkeit bestimmt.

Die Bedeutung der einzelnen Gruppen für einen Schadensfall hängt von der chemischen Zusammensetzung der Handelsprodukte ab. Die Befunde zeigen, daß sich *In situ*- und *Ex situ*-ein **kontrolliertes Strippen und Förderung der biologischen Aktivität** bei Sanierungen als Verfahrenskombination anbietet. Unter anderem können für einen biologischen Abbau problematischere Stoffe dabei zumindest zum Teil über den Luftpfad eliminiert werden.

Tab. 2.6: Ausgasverluste bei Mineralölprodukten

MKW-Produkt	Abnahme [%]	Zeit	Temperatur [°C]	Bedingungen	Lit.
bleifreies Benzin	50	2,2 d	17	50 g Benzin/kg Lehmboden (TS), offen	[81]
	50	2 d	27		
	50	1,8 d	37		
Kerosin	42	2 Wo	27	Laborversuche mit Bodensäulen	
Kerosin	58	4 Wo	Hallentemp.	Wendebeet in Halle	[70]
Dieselöl	rd. 20	12 Wo	Raumtemp.	Boden, Labor	[11]
Dieselöl	rd. 20	3,5 d	30	Bodenreaktor	[52]
Dieselöl	16–23	20 d	10	5 alpine Böden, Erlenmeyerkolben mit Sterilstopfen	[56]
Dieselöl	10–20	3 Wo	27	Laborversuche mit Bodensäulen	[81]
Heizöl	14	3 Wo			

2.1.1.5 Restkonzentrationen

Bei Sanierungen verlangsamt sich die Abreicherung der Kontaminanten, bis sie asymptotisch und eine weitere Abnahme des verbliebenen Restes vernachlässigbar wird. In dieser Phase der Stagnation lassen sich Restkonzentrationen durch Verlängerung der Sanierungsdauer kaum weiter verringern. Faktoren die sich auf die Höhe der Restkonzentration auswirken, Art des kontaminierten Materials, Art und Menge der Mineralölprodukte, sind in Tab. 2.7 zusammen mit dem biologischem Abbau und den Ausgasverlusten aufgeführt. Die Tabelle enthält überwiegend Ergebnisse von Modelluntersuchungen, da nur in Ausnahmefällen entsprechend aufgeschlüsselte Ergebnisse von Sanierungen veröffentlicht wurden.

Die drei häufigsten Ursachen für Restkonzentrationen

- Schwer abbaubare KW und Teilabbauprodukte bleiben übrig
- Verringerung der Bioverfügbarkeit durch Bindung
- Verringerung der Bioverfügbarkeit durch Porenräume und Diffusionsbarrieren

sind bei biologischen Sanierungen in ihrer Wichtung abhängig vom Schadensfall, Schadenstyp und der Art der Sanierungsmaßnahmen.

Tab. 2.7: Verhältnis von Ausgasverlusten (V) zu biologischem Abbau (A) und verbleibenden Restkonzentrationen (R) bei MKW-Produkten.

Produkt	V:A:R [%:%:%]	Bedingungen			Lit.	
		Zeit [Wo]	Kontam. [g/kg TS]	Behand- lungsart		Bodenart
Bleifreies Benzin	83:11:06	0,5	47	Bodensäule	Lehm	[81]
Kerosin	60:12:28	3	50	Bodensäule	lehmiger Ton	[81]
Kerosin	58:39:03	3	∅ 4	Wendebeet ²	Sandboden + bindiges Erdreich	[70]
"MKW" (Dieselöl)	34:42:24	2	4	Airliftreaktor		[64]
Dieselöl	37:18:45	4,5	100	Bodensäule	Lehm	[81]
Heizöl	25:50:25	4,5	140	Bodensäule		[81]
Altöl	15:48:37	6,5	23,5	Fermenter ³		[69]
Bunker C Öl ¹	02:12:86	12	50		Sandboden	[81]

¹ rd. 90 % Schweröl: 53 % höhere Alkane, 35 % Aromaten, 12 % Heterocyclen; Abbau nur in den ersten zwei Monaten.

² in Halle mit Luftabsaugung

³ Flüssigkultur

Schwer abbaubare KW und Teilabbauprodukte bleiben übrig: Die verbleibenden Stoffe sind schwer mineralisierbar oder werden kaum angegriffen. **Apolare Rückstände** sind kürzerkettige [66] und langkettige, hochverzweigte Isoalkane (>C₂₀) [84; 85], höher kondensierte Cycloalkane, langkettige n-Alkane, Asphaltene und alkylierte, niedrig kondensierte Aromaten. Bei der Einzelstoffanalyse wurden die Aliphate im sogenannten "Ölberg" z.T. als Hauptkomponenten nachgewiesen. Daneben sind **polare Rückstände**, Teilabbauprodukte wie organische Säuren, Alkylphenole und Ester u.a. nachweisbar [34; 40; 66; 67; 69; 84; 85].

Verringerung der Bioverfügbarkeit durch Bindung: Kohlenwasserstoffe und ihre Teilabbauprodukte können durch im Boden enthaltene oder bei der Sanierung gebildete Huminstoffe gebunden werden. Dabei werden primär gebildete, labile Huminstoffe nach dem Recycling-Prinzip so lange als Nahrungsquelle genutzt, bis nur noch nicht mehr angreifbare, stabile Huminstoffe verbleiben. Bei Bindung an diesen Humus sind die Rückstände kaum bis nicht mehr bioverfügbar. Der an Huminstoffe gebundene Anteil stieg bei Alkylaromaten in sandigem Lehm mit der Zahl der Methyl-Gruppen an, und ihr Umsatz nahm in der Reihenfolge Toluol > Xylol > Trimethylbenzol ab [80]. In einer Laborstudie wurde die Abhängigkeit der Sorption von Toluol vom organischen Kohlenstoffgehalt des Bodens (C_{org.}) untersucht: Bei zunehmenden Gehalten von 1,4 %, 2,2 % und 11,2 % C_{org.} wurden 18 %, 22 % und 91 % ¹⁴C-Toluol sorbiert [28].

Die Bilanzierung des Abbaus von Dieselöl aus O_2 , CO_2 , TOC_{Abluft} und KW (DEV H 18) Messungen ergab in einem künstlich kontaminierten Boden eine **Bilanzlücke** von 8 %. Mit Kompost als Zuschlagstoff wurden 35 % des Kohlenstoffs nicht erfasst [52]. Die Lücke in der Bilanz wurde zum einen auf die unzureichende Analytik zurückgeführt, denn mit der DEV H 18 Methode werden keine polaren Metabolite erfasst, oder sollten zumindest nicht erfasst werden (s. kritische Untersuchung des BAM [48]). Als weiteres wurde angenommen, daß Huminstoffe des Komposts und/oder Biomasse Kohlenwasserstoffe so binden, daß sie nicht mehr nachweisbar sind ("**bound residues**", s. Kap. 2.2). In einer weiteren Untersuchung mit dotiertem ^{14}C -Hexadecan lagen nach rund drei Monaten 15,5 % des [^{14}C] ohne, und 26,7 % mit Kompost als gebundene, nicht extrahierbare Rückstände vor [47].

Verringerung der Bioverfügbarkeit durch Porenräume und Diffusionsbarrieren: Last but not least können die Kohlenwasserstoffe an und in der Bodenmatrix so festgelegt werden, daß sie nur schwer oder nicht mehr verfügbar sind. Sichtbar wird das in der Praxis bei der Anreicherung von Schadstoffen an der Feinkornfraktion (z.B. bei der Bodenwäsche [64]) oder auch bei der unterschiedlichen Abbaugeschwindigkeit des gleichen Stoffes in einem alten und einem frischen Schadensfall. Der Einsatz von Tensiden (Kap. 2.4) kann u.U. einen weiteren Abbau bewirken. Die Rest-MKW, die als **Restphasen** (pendulare Residualsättigung) meist weniger als 20% des Porenraumes füllen, sind kaum zugänglich. Eine Abnahme ist möglich durch die sehr langsamen Prozesse des Verdunstens in die Bodenluft und der Filmdiffusion, wobei das Öl an der Kontaktschicht in das Porenwasser diffundiert [35].

Des weiteren kann die Bioverfügbarkeit von Öl durch Verhärtung an der Grenzschicht Öl/Wasser beeinträchtigt werden. Dieselöl ist flüssig obwohl es feste Alkane ($C_{\geq 17}$) enthält, da die kürzerkettigen Alkane als Lösemittel für die langkettigen Alkane dienen. Durch Ausgasen und biologischen Abbau verringert sich ihr Anteil und das verbleibende Öl wird zähflüssiger; in Mieten waren z.B. C_{12} – C_{16} -Alkane nach 12 – 18 Monaten nicht mehr nachweisbar [85]. Dieser Effekt ist naturgemäß an der Außenfläche eines Ölfilms oder Öltropfens am stärksten und kann so zu der Bildung einer verhärteten Grenzschicht führen, die einem mikrobiellen Abbau entgegensteht.

2.1.1.6 Biologisches Selbstreinigungspotential

Die Stoffgruppe der MKW zeichnet sich innerhalb der verschiedenen Gruppen von Kontaminanten durch ein hohes Selbstreinigungspotential aus. Anzeichen für einen biologischen Abbau, Transformation und/oder Mineralisierung, während der Selbstreinigung sind

- Temperaturanstieg nach einem Schadensfall,
- Zehrung von Nitrat und Sulfat,
- das Auftreten von Teilabbauprodukten wie organische Säuren und
- das Vorhandensein von MKW abbauenden Mikroorganismen.

In einer Zusammenstellung der "Lebensdauer von Mineralölkontaminationen in porösen Medien, Erkenntnisse aus Feldbeobachtungen" [46] gab es ab 1945 nur in einem von acht Schadensfällen mit Mineralölprodukten kein Anzeichen für eine Selbstreinigung. In den übrigen Fällen waren spätestens nach 20 – 30 Jahren keine Kontaminanten mehr nachweisbar. In Hinblick auf eine praktische Nutzung finden Selbstreinigungsprozesse wieder

verstärkte Beachtung (s. Kap. 3.3.1.6). Dabei kann das Verhältnis der natürlich vorkommenden Isotope ^{12}C und ^{13}C in Kohlenwasserstoffen als Meßparameter für eine biologische Selbstreinigung dienen. Verbindungen mit leichten Kohlenstoffisotopen [^{12}C] werden biologisch schneller abgebaut als Verbindungen mit schweren [^{13}C]. Damit verändern sich die Anteile von [^{12}C] zu [^{13}C] in den Verbindungen, wie z.B. für Toluol gezeigt wurde [57; 88].

Da Sauerstoff bei MKW-Schadensfällen schnell gezehrt wird, gewinnt der anaerobe Abbau (Kap. 2.1.1.1, 2.1.1.2) für die biologische Selbstreinigung an Bedeutung obwohl es ein langsamer Prozess ist (z.B. sulfatreduzierend [76]). Einen Eindruck der zu betrachtenden Zeiträume gibt ein seit 50 Jahren mit Erdöl kontaminiertes, methanogenes Aquifer, das als Hauptkontaminante Benzol enthält. In dem Sediment hatten sich Bakterien angereichert die im Laborversuch unter optimalen Bedingungen innerhalb von 16 Tagen ^{14}C -Benzol methanogen zu 25 % $^{14}\text{CH}_4$ und 25 % $^{14}\text{CO}_2$ abbauten. Als Zwischenprodukte wurden Phenol, Acetat und Propionat nachgewiesen [87].

2.1.1.7 Literatur

1. **Aeckersberg, F., F. Bak, and F. Widdel.** 1991. Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO_2 by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* **156**:5-14.
2. **Aeckersberg, F., F. A. Rainey, and F. Widdel.** 1998. Growth, natural relationships, cellular fatty acids, and metabolic adaption of sulfate-reducing bacteria that utilize long-chain alkanes under anoxic conditions. *Arch. Microbiol.* **170**:361-369.
3. **Altmann, B.-R.** 1993. Mobilitäts- und Transportverhalten von Mineralölen in Böden. In: 10. DECHEMA-Fachgespräch Umweltschutz: Bewertung und Sanierung mineralöl-kontaminierter Böden. Seite 516-522.
4. **Alvarez, P. J. J., and T. Vogel.** 1991. Substrate interactions of benzene, toluene, and para-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2981-2985.
5. **Angeli, R.** 1995. Das-Bio-Puster-Verfahren. In: Praxis der mikrobiologischen Bodensanierung. Hrsg. R. Margesin, M. Schneider und F. Schinner. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. Seite 187-198.
6. **Arvin, E., B. K. Jensen, and A. T. Gundersen.** 1989. Substrate interactions during aerobic biodegradation of benzene. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:3221-3225.
7. **Baggi, G., P. Barbieri, E. Galli, and S. Tollari.** 1987. Isolation of a *Pseudomonas stutzeri* strain that degrades o-xylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2129-2132.
8. **Bartha, R.** 1986. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *Microb. Ecol.* **12**:155 – 290.
9. **Beller, H. R., D. Grbic-Galic, and M. Reinhard.** 1992. Microbial degradation of toluene under sulfate-reducing conditions and the influence of iron on the process. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:786-793.
10. **Beller, H. R., M. Reinhard, and D. Grbic-Galic.** 1992. Metabolic by-products of anaerobic toluene degradation by sulfate-reducing enrichment cultures. **58**:3192-3195.

11. **Blank-Huber, M., E. Huber, S. Huber, J. Hutter, and R. Heiß.** 1992. Development of a mobile soil cleaning plant for mineral oil contaminated soil material, combining mechanical washing with sewage sanitation and biological waste degradation. In: Soil decontamination Using Biological Processes. Int. Sympos. Karlsruhe/D, 6-9 December. pp. 713-718.
12. **Blume H.-P.** 1992. Handbuch des Bodenschutzes. Bodenökologie und-belastung Vorbeugende und Abwehrende Schutzmaßnahmen. ECOMED Verlag, 2. Auflage.
13. **Bregnard, T. P. A., A. Häner, P. Höhener, and J. Zeyer.** 1997. Anaerobic degradation of pristane in nitrate-reducing microcosms and enrichment cultures. Appl. Environ. Microbiol. **63**:2077-2081.
14. **Brinkmann, D., J. Röhrs und K. Schügerl.** 1998. Mikrobiologische Sanierung eines mit Dieselmotorenkontaminierten Bodens im Drehrohrreaktor- Teil I: Einfluß der Sauerstoffsättigung. Chem. Ing. Techn. **70**:155-158.
15. **Burland, S. M., and E. A. Edwards.** 1999. Anaerobic benzene degradation linked to nitrate reduction. Appl. Environ. Microbiol. **65**:529-533.
16. **Caldwell, M. E., R. M. Garrett, R. C. Prince, and J. M. Suflita.** 1998. Anaerobic biodegradation of long-chain n-alkanes under sulfate-reducing conditions. Environ. Sci. Technol. **32**:2191-2195.
17. **Chayabutra, Ch., and Lu-Kwang Ju.** 2000. Degradation of n-Hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and anaerobic denitrifying conditions. Appl. Environ. Microbiol. **66**:493-498.
18. **Coates, J. D., J. Woodward, J. Allen, P. Philip, and D. R. Lovley.** 1997. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. Appl. Environ. Microbiol. **63**:3589-3593.
19. **DGMK-Forschungsbericht 409.** 1993. Chemisch-physikalische Daten von Otto- und Dieselmotorenkontaminanten. Bearbeiter Wenck, H. und Schnieder, Ch.
20. **DGMK-Forschungsbericht 461-01.** 1991. Mikrobieller Abbau von Kohlenwasserstoffen und Kohlenwasserstoffverbindungen. Bearbeiter Witt, D. 95 Seiten.
21. **Dippell, G., G. Holleederer, and Z. Filip.** 1992. Resistance of groundwater bacteria to organic chemicals. In: Soil decontamination Using Biological Processes. Int. Sympos. Karlsruhe/D, 6-9 December. pp. 681-688.
22. **Dott, W. und M. Steiof.** 1995. Vom Reagenzglasversuch zur biologischen Bodensanierung-Probleme des Scaling-up and-down. In: Praxis der mikrobiologischen Bodensanierung. Hrsg. R. Margesin, M. Schneider und F. Schinner. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. Seite 25-42.
23. **Edwards E. A., and D. Grbic-Galic.** 1992. Complete mineralization of benzene by aquifer microorganisms under strictly anerobic conditions. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 2663-2666.
24. **Edwards, E. A., and D. Grbic-Galic.** 1994. Anaerobic degradation of toluene and o-xylene by a methanogenic consortium. Appl. Environ. Microbiol. **60**:313-322.

25. **Edwards, E. A., L. E. Wills, M. Reinhard, and D. Grbic-Galic.** 1992. Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:794-800.
26. **Evans, P. J., W. Ling, B. Goldschmidt, E. R. Ritter, and L. Y. Young.** 1992. Metabolites formed during anaerobic transformation of toluene and *o*-xylene and their proposed relationship to the initial steps of toluene mineralization. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:496-501.
27. **Evans, P. J., D. T. Mang, and L. Y. Young.** 1991. Degradation of toluene and *m*-xylene and transformation of *o*-xylene by denitrifying enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:450-454.
28. **Fan, S., and K. M. Scow.** 1993. Biodegradation of trichloroethylene and toluene by indigenous microbial populations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1911-1918.
29. **Frazer, A. C., W. Ling, and L. Y. Young.** 1993. Substrate induction and metabolite accumulation during anaerobic toluene utilization by the denitrifying strain T1. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3157-3160.
30. **Fredrickson, J. K., F. J. Brockman, D. J. Workman, S. W. Li, and T. O. Stevens.** 1991. Isolation and characterization of a subsurface bacterium capable of growth on toluene, naphthalene, and other aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:796-803.
31. **Fries, M. R., J. Zhou, J. C. Sanford, and J. M. Tiedje.** 1994. Isolation, characterization, and distribution of denitrifying toluene degraders from a variety of habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2802-2810.
32. **Fritsche, W.** 1998. *Umwelt-Mikrobiologie*. G. Fischer Verlag, Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm, 252 Seiten.
33. **Galushko, A., D. Minz, B. Schink, and F. Widdel.** 1999. Anaerobic degradation of naphthalene by a pure culture of a novel type of marine sulfate-reducing bacterium. *Environ. Microbiol.* **1**:415-420.
34. **Goßel, W. und W. Püttmann.** 1991. Untersuchungen zum mikrobiologischen Abbau von Kohlenwasserstoffen im Grundwasserbereich. *Wasser, Abwasser* **132**:126-131.
35. **Grathwohl, P.** 1997. Auswirkung der Lösungs- und Desorptionskinetik auf die Bioverfügbarkeit organischer Schadstoffe. In: *Mikrobieller Schadstoffabbau, ein interdisziplinärer Ansatz*. Hrsg. Ch. Knorr, T. von Schell. Vieweg Verlag. Seite 15-33.
36. **Haigler, B. E., C. A. Pettigrew, and J. C. Spain.** 1992. Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. strain JS 150. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2237-2244.
37. **Hanson, J. R., C. E. Ackerman, and K. M. Scow.** 1999. Biodegradation of methyl-tert-butyl ether by a bacterial pure culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4788-4792.
38. **Harms, G., K. Zengler, R. Rabus, F. Aeckersberg, D. Minz, R. Rosselló-Mora, and F. Widdel.** 1999. Anaerobic oxidation of *o*-xylene, *m*-xylene, and homologous alkylbenzenes by newtypes of sulfate-reducing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:999-1004.
39. **Hess, A., B. Zarda, D. Hahn, A. Häner, D. Stax, P. Höhener, and J. Zeyer.** 1997. In situ analysis of denitrifying toluene- and *m*-Xylene-degrading bacteria in a diesel fuel-contaminated laboratory aquifer column. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2136-2141.

40. **Hollerbach, A.** 1993. Herkunft und Hintergrundbelastung von Kohlenwasserstoffen in der Umwelt. In: 10. DECHEMA-Fachgespräch Umweltschutz: Bewertung und Sanierung mineralöl-kontaminierter Böden. Seite 555-565.
41. **Hopfstock, H.** 1993. Möglichkeiten zur verbesserten Bestimmung von Mineralölkohlenwasserstoffen (MKW) in Böden. In: 10. DECHEMA-Fachgespräch Umweltschutz: Bewertung und Sanierung mineralöl-kontaminierter Böden. Seite 574-583.
42. **Hubert, C., Y. Shen, and G. Voordouw.** 1999. Composition of toluene-degrading microbial communities from soil at different concentrations of toluene. Appl. Environ. Microbiol. **65**:3064-3070.
43. **Hutchins, S. R.** 1991. Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons by microorganisms using oxygen, nitrate, or nitrous oxide as the terminal electron acceptor. Appl. Environ. Microbiol. **57**:2403-2407.
44. **Hutchins, S. R.** 1992. Biotransformation and mineralization of benzene, toluene and xylenes under denitrifying and microaerophilic conditions. 3rd. Int. Conf. on Ground Water Quality Research, Dallas, Texas, June 21- 24. Abstracts pp. 110-112.
45. **Isken, S., A. Derks, P. F. G. Wolffs, and J. A. M. de Bont.** 1999. Effect of organic solvents on the yield of solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12. Appl. Environ. Microbiol. **65**:2631-2635.
46. **Käss, W. und F. Schwille.** 1993. Die "Lebensdauer" von Mineralöl-Kontaminationen in porösen Medien: Erkenntnisse aus Feldbeobachtungen. In: 10. DECHEMA-Fachgespräch Umweltschutz: Bewertung und Sanierung mineralöl-kontaminierter Böden. Seite 533-554.
47. **Kästner, M., S. Lotter, J. Heerenklage, M. Breuer-Jammali, R. Stegmann, and B. Mahro.** 1995. Fate of ¹⁴C-labeled anthracene and hexadecane in compost manured soil. Appl. Microbiol. Biotechnol. **43**:1128-1135.
48. **Koch, M., S. Wachholz, T. Win und I. Nehls.** 1998. Analytik von Mineralölkohlenwasserstoffen: Die Problematik der Probenaufbereitung. Z. Umweltchem. Ökotox. **10**:265-270.
49. **Kuhn, E. P., J. Zeyer, P. Eicher, and R. Schwarzenbach.** 1988. Anaerobic degradation of alkylated benzenes in denitrifying laboratory aquifer columns. Appl. Environ. Microbiol. **54**:490-496.
50. **Kukor, J. J., and R. H. Olsen.** 1990. Diversity of toluene degradation following long term exposure to BTEX in situ. In: Advances in Applied Biotechnology Series Vol. 4: Biotechnology and Biodegradation, D. Kamely, A. Chakrabarty and G. S. Omenn Eds. Gulf publishing Company Houston, Texas, pp. 405-421.
51. **LFU, Materialien zur Altlastensanierung.** 1991. Handbuch Mikrobiologische Bodenreinigung. Bearbeiter Geller, A., Brauch, H.J., Werner, P., Berberich, G., (Hrsg.)Landesanstalt für Umweltschutz Baden Württemberg, Karlsruhe, 233 Seiten.
52. **Lotter, S., R. Stegman und J. Heerenklage.** 1990. Grundlegende Untersuchungen zur Optimierung der biologischen Reinigung ölkontaminierter Böden. In: Altlastensanierung '90', 3. Int. KfK/TNO Kongr. über Altlastensanierung, 10.-14.Dezember 1990, Karlsruhe, BRD. Hrsg. F. Arendt, M. Hinsenveld, W. J. van den Brink. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. Bd. II Seite 1071-1078.

53. **Lovley, D. R., and Lonergan, D. J.** 1990. Anaerobic oxidation of toluene, phenol, and p-cresol by the dissimilatory iron-reducing organism, GS 15. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1858-1864.
54. **Lovley, D. R., J. D. Coates, J. C. Woodward, and E. J. P. Phillips.** 1995. Benzene oxidation coupled to sulfate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:953-958.
55. **Lovley, D. R., J. C. Woodward, and F. H. Chapelle.** 1996. Rapid anaerobic benzene oxidation with a variety of chelated Fe(III) forms. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:288-291.
56. **Margesin, R., and F. Schinner.** 1997. Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2660-2664.
57. **Meckenstock, R. U., B. Morasch, R. Warthmann, B. Schink, E. Annweiler, W. Michaelis, and H. H. Richnow.** 1999. $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotope fractionation of aromatic hydrocarbons during microbial degradation. *Environ. Microbiol.* **1**:409-414.
58. **Metzner, D.** 1985. Vorkommen und Verhalten von Mineralölen in Gewässern. In: Schadstoffbelastung und Ökosystemschutz im aquatischen Bereich. Hrsg. Bayr. Landesanstalt für Umweltschutz, Oldenbourg Verlag, München, Wien. Seite 93-113.
59. **Miller, R. M., and R. Bartha.** 1989. Evidence from liposome encapsulation for transport-limited microbial metabolism of solid alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:269 – 274.
60. **Oberbremer, A., and R. Hüller-Hurtig.** 1989. Aerobic stepwise hydrocarbon degradation and formation of biosurfactants by an original soil population in a stirred reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**:528-586.
61. **Rabus, R., and F. Widdel.** 1996. Utilization of alkylbenzenes during anaerobic growth of pure cultures of denitrifying bacteria on crude oil. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1238-1241.
62. **Rabus, R., R. Nordhaus, W. Ludwig, and F. Widdel.** 1993. Complete oxidation of toluene under strictly anoxic conditions by a new sulfate-reducing bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1444-1451.
63. **Rabus, R., H. Wilkes, A. Schramm, G. Harms, A. Behrends, R. Amann, and F. Widdel.** 1999: Anaerobic utilization of alkylbenzenes and n-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the β -subclass of *Proteobacteria*. *Environ. Microbiol.* **1**:145-157.
64. **Reinert, G., E. Schuster und D. Bryniok.** 1995. Abbau von Mineralölkohlenwasserstoffen (MKW) in Feinkornsuspensionen der Bodenwäsche. In: DECHEMA-Jahrestagungen '95, Bd. II Umwelttechnik, Kurzfassungen, 30. 05.- 1.06. 1995 in Wiesbaden. Seite 118-119.
65. **Ridgway, H. F., J. Safarik, D. Phipps, P. Carl, and D. Clark.** 1990. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3565-3575.
66. **Riis, V., D. Miethé, and M. Möder.** 1996. Analytical characterization of the persistent residues after microbial degradation of mineral oils. *Fresenius J. Anal. Chem.* **356**:378-384.
67. **Riis, V., D. Miethé und W. Babel.** 1998. Grenzen der Sanierbarkeit von Mineralölschäden. *Altlasten Spektrum* **4**:214-218.
68. **Rippen, G.** Handbuch Umweltchemikalien. Loseblattsammlung, ecomed Verlag, Landsberg/Lech.

69. **Ripper, J.** 1995. Untersuchungen zur Optimierung des mikrobiellen Ölabbau unter Verwendung verschieden Maßstäblicher Versuchssysteme. Dissertation D83 TU Berlin, 195 Seiten.
70. **Riss, A.** 1993. Sanierungskonzept Flugplatz Ramstein. In: 10. DECHEMA-Fachgespräch Umweltschutz: Bewertung und Sanierung mineralöl-kontaminierter Böden. Seite 235-244.
71. **Rockne, K. J., J. C. Chee-Sanford, R. A. Sanford, B. P. Hedlund, J. T. Staley, and S. E. Strand.** 2000. Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1595-1601.
72. **Römpp Chemie Lexikon.** 1993. Hrsg. J. Falbe und M. Regitz. Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 8. Aufl.
73. **Römpp Lexikon Umwelt.** 1993. Hrsg. H. Hulpke. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
74. **Rooney-Varga, J. N., R. T. Anderson, J. L. Fraga, D. Ringelberg, and D. R. Lovley.** 1999. Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3056-3063.
75. **Schirmer, M.** 1999. Das Verhalten des Benzininhalstoffes Methyltertiärbutyläther (MTBE) in Grundwasser. *Grundwass. Z. Fachsekt. Hydrogeol.* **3**:95-102. .
76. **Schmitt, R., H.-R. Langguth und W. Püttmann.** 1998. Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe und Metabolitenbildung im Grundwasserleiter eines eines ehemaligen Gaswerkstandorts. *Grundwasser* **2**:78-86.
77. **Schmitt, R., H.-R. Langguth, W. Püttmann, H. P. Rohns, P. Eckert, and J. Schubert.** 1996. Biodegradation of aromatic hydrocarbons under anoxic conditions in a shallow sand and gravel aquifer of the lower rhine valley, Germany. *Org. Geochem.* **25**:41-50.
78. **Seyfried, B., G. Glod, R. Schocher, A. Tschech, and J. Zeyer.** 1994. Initial reactions in the anaerobic oxidation of toluene and m-xylene by denitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:4047-4052.
79. **So, C. M., and L. Y. Young.** 1999. Isolation and characterization of a sulfate-reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2969-2976.
80. **Song, H. G., and R. Bartha.** 1990. Effects of jet fuel spills on the microbial community in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:646-651.
81. **Song, H. G., X. Wang, and R. Bartha.** 1990. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:652-656.
82. **Stieber, M.** 1997. Erfahrungen zum biologischen *In situ*-Abbau von Kohlenwasserstoffen in Grundwässern. In: 12. DECHEMA-Fachgespräch Umweltschutz: Möglichkeiten und Grenzen der Reinigung kontaminierter Grundwässer. Seite 387-399.
83. **Tsao, C.-W, H.-G. Song, and R. Bartha.** 1998: Metabolism of benzene, toluene, and xylene hydrocarbons in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4924-4929.
84. **Wanior, J., and J. Ripper.** 1993. GC, ¹³C-NMR and IR study of a mixture of waste oil from the old refinery site Pintsch-Oil GmbH i. L. in Hanau, Germany. *Fresenius J. Anal. Chem.* **347**:423-429.

85. **Wanior, J., T. Held, and U. Schlitt.** 1995. Chromatographic and spectroscopic studies on biodegradation of residual waste oil from a former refinery site. *Toxicol. Environ. Chem.* **48**:245-254.
86. **Weiner, J. M., and D. R. Lovley.** 1998. Anaerobic benzene degradation in petroleum-contaminated aquifer sediments after inoculation with a benzene-oxidizing enrichment. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:775-778.
87. **Weiner, J. M., and D. R. Lovley.** 1998. Rapid benzene degradation in methanogenic sediments from a petroleum-contaminated aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1937-1939.
88. **Zeyer, J., C. Bolliger, S. Bernasconi und M. Schroth.** 1999. Intrinsische Bioremediation von Mineralölkontaminationen im Grundwasser: Fallstudie Studen. In: *Initiativen zum Umweltschutz, Bd. 12: Biotechnologie im Umweltschutz. Bioremediation: Entwicklungsstand- Anwendungen- Perspektiven.* Hrsg. S. Heiden, R. Erb, J. Warrelmann, R. Dierstein. Seite 132-138.
89. **Zeyer, J., E. P. Kuhn, and R. Schwarzenbach.** 1986. Rapid microbial mineralization of toluene and dimethylbenzene in the absence of molecular oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:944-947.

2.1.2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

Annette Geller

2.1.2.1 Allgemeines

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) sind eine Stoffgruppe, deren Grundgerüst eine unterschiedliche Zahl von kondensierten Ringen enthält. Durch Anzahl und räumliche Anordnung der Ringe und durch Substituenten, meist Methylgruppen, gibt es eine Vielzahl möglicher Verbindungen, von denen mehrere hundert bekannt sind. PAK sind u.a. in Teer, Rohöl und in Mineralölprodukten enthalten. Neu entstehen sie bei der unvollständigen Verbrennung und der thermischen Zersetzung organischer Materialien. Sie sind als **Grundbelastung** ubiquitär nachweisbar, da sie mit Rauch, Flugstaub und Rußpartikeln über den Luftpfad verbreitet werden. Die Verbrennungsprozesse können natürlichen (z.B. Waldbrände) oder anthropogenen (z.B. Heizen, Verkehr, Abfallverbrennung) Ursprungs sein. **Lokale Verunreinigungen** des Untergrundes mit PAK sind auf Kohleverwertungsbetriebe zurückzuführen. Die Rückstände auf Kokerei- und Gaswerksgebieten gehören zu den problematischen Altlasten [32; 41; 43; 46].

PAK sind bei Raumtemperatur feste, kristalline Verbindungen, deren Wasserlöslichkeit so gering ist, daß schon das "gut" wasserlösliche Naphthalin unter die chemische Kategorie "wasserunlöslich" fällt. Ihre Wasserlöslichkeit nimmt mit steigender Zahl der Ringe von milli- (10^{-3}) über mikro- (10^{-6}) auf nano- (10^{-9}) -gramm pro Liter ab (s. Tab. 2.8). Die niedrig kondensierten 2- bis 3-Ring-PAK können noch ausgasen und Phenanthren wird als "semi-flüchtig" bezeichnet. Gelöste PAK lagern sich in Filmen an Oberflächen an, und die Sorptionskonstanten [10] nehmen mit steigender Ringzahl zu, wie die daraus berechneten Verhältniszahlen veranschaulichen. Gleichzeitig nimmt ihre Desorbierbarkeit ab.

Verhältnis der Sorptionskonstanten nach Freundlich [10]						
Naphthalin	:	Phenanthren	:	Anthracen	:	Pyren
1		14		30		72

Um 90 % der verbliebenen PAK nach einer Bodenwäsche von mit Teeröl kontaminiertem Sand unter Zuhilfenahme von Tensiden auszuspülen, sind folgende, aus Meßdaten berechnete Zeiträume nötig [22]:

Zeitbedarf für 90 % Desorption [22]				
PAK	Fluoren	Phenanthren	Fluoranthen	Benzo[k]fluoranthen
Jahre	0,5	2,5	10	>100

PAK sind wie die aliphatischen Kohlenwasserstoffe hydrophob und lösen sich gut in organischen Lösemitteln. Der Octanol-Wasser Verteilungskoeffizient ist ein Maß für die Lipophilie und ergibt sich aus dem Verhältnis der Konzentration eines PAK in jeder der beiden Phasen nach gründlichem Durchmischen.

Tab. 2.8: EPA- und TVO-PAK: Molekulargewichte, Wasserlöslichkeiten bei 20°C [29] und davon anteilmäßig wichtige in Teer [35] und Teeröl [48]

Stoff	MW [g/mol]	Wasserlöslichkeit [µg/l]	Teer [%]	Teeröl [%]
Naphthalin	128	30.000	7,0	13
Acenaphthylen	152	16.100		
Acenaphthen	154	3.470	1,2	4
Fluoren	166	1.800	1,5	8
Phenanthren	178	1.290	5,0	13
Anthracen	178	73	1,8	13
Fluoranthen*	202	260	2,2	4
Pyren	202	135	0,6	2
Benzo[a]anthracen	228	14		
Chrysen	228	0,6	1,5	2
Benzo[b]fluoranthen*	252	1,2		
Benzo[k]fluoranthen*	252	0,55		
Benzo[a]pyren*	252	3,8		1
Dibenzo[a,h]anthracen	278	0,5		
Benzo[g,h,i]perylen*	276	0,26		
Indeno[1,2,3-cd]pyren*	276	62		

*TVO-PAK [52]

Die PAK können mit der Atemluft und über Lebensmittel aufgenommen werden; ca. 95 % der vom Menschen aufgenommenen PAK stammen aus der Nahrung, 1 % aus dem Trinkwasser und 1 % aus der Luft. PAK sind schwer wasserlöslich und schwer biologisch abbaubar. Sie werden über Nahrungsketten angereichert, weil sie durch Sorption an Organismen und durch Speicherung in Fett und Fettgewebe akkumulieren. Die Stoffgruppe der PAK enthält human-toxikologisch bedenkliche Verbindungen mit karzinogenem und mutagenem Potential. Aufgrund ihres häufigen Vorkommens in der Umwelt, ihrer relativ einfachen Nachweisbarkeit und des Gefährdungspotentials hat die Umweltbehörde der USA (US-EPA) aus der Vielzahl der Verbindungen 16 nicht substituierte PAK als Leitsubstanzen für die Untersuchung von

PAK-Belastungen ausgewählt (s. Abb. 2.1). Davon werden sechs PAK in der deutschen Trinkwasserverordnung (TVO) als Einzelsubstanzen aufgeführt, und die Gesamtbelastung darf den Grenzwert von $0,2 \mu\text{g}/\text{l}$ nicht überschreiten [19; 32; 36; 41; 43; 52].

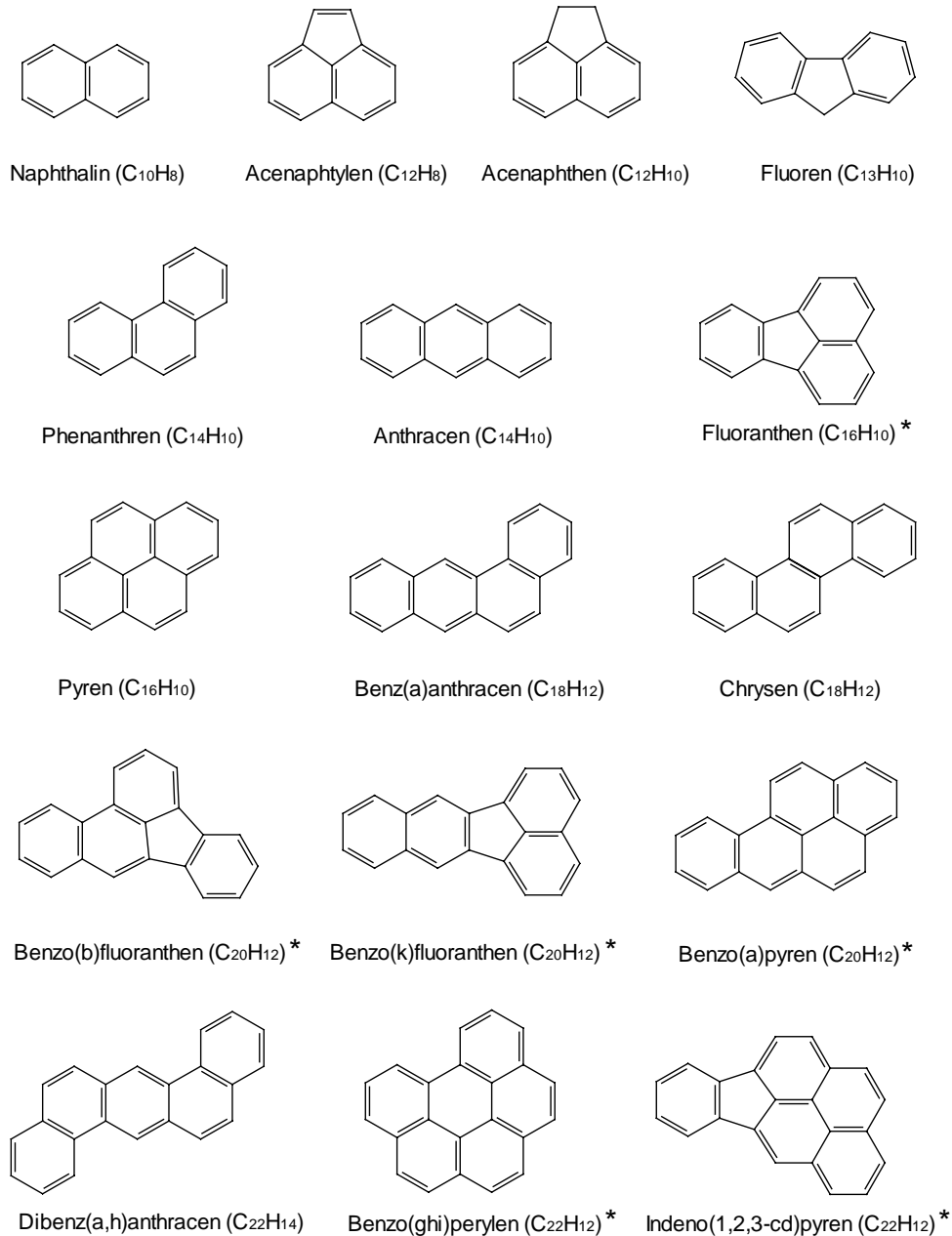


Abb. 2.1: Strukturformeln der 16 EPA-PAK. TVO-PAK sind mit * gekennzeichnet.

2.1.2.2 Aerober Abbau

PAK werden aerob von Bakterien, Hefen und höheren Pilzen umgesetzt. Aus mit PAK kontaminierten marinen Sedimenten wurden außerdem Hefen isoliert, die Naphthalin, Phenanthren und Anthracen abbauten [37]. Der Schwerpunkt der Untersuchungen zur Metabolisierung von PAK durch Bakterien lag auf Naphthalin, Phenanthren und Pyren. Bei Pilzen wurden schwerpunktmäßig Phenanthren, Pyren und Benzo[a]pyren untersucht. Bakterien können

PAK mineralisieren und damit als C+E-Quelle verwerten (Schlüsselenzyme: Dioxygenasen) oder cometabolisch umsetzen. Pilze bauen PAK dagegen nur cometabolisch ab. Da der cometabolische Abbau unspezifisch ist, besteht keine Beziehung zu der Größe der Moleküle, und ein breites PAK-Spektrum kann transformiert werden (Definitionen Mineralisierung, Cometabolismus, Hefen, höhere Pilze s. Kap. 2 und Kap. 2.1, Einführung).

Pilze

Pilze bauen PAK, abhängig von ihrer Enzymausstattung, cometabolisch auf unterschiedlichen Wegen ab. Mit ligninolytischen **Laccasen, Lignin- und Manganperoxidasen** ausgestattete Pilze, die auf verrottendem Holz wachsen, oxidieren PAK ohne Aufnahme in die Zellen durch eine unspezifische radikalische Reaktion zu Chinonen, die weiter umgesetzt werden können. Als Endstufen wurden Teiloxidationsprodukte und durch radikalische Reaktionen gebildete, geringe Mengen $<10\%$, $^{14}\text{CO}_2$ nachgewiesen. Die reaktiven Chinone und hydroxylierten Metabolite können durch Humifizierungsprozesse festgelegt und so entgiftet werden (s. Kap. 2.2). Ligninolytische **Monooxygenasen** greifen eine Doppelbindung unter Bildung von Epoxiden an. Biologisch werden daraus *trans*-Dihydrodirole gebildet; abiotisch können Phenole entstehen. Vorläufige Endstufen der Transformation durch Pilze sind hydroxylierte Teilabbau-Produkte von denen die *trans*-Dihydrodirole ein mutagenes bzw. carcinogenes Potential aufweisen. Außerdem können PAK auch hier cometabolisch zu CO_2 ($< 20\%$) teiloxidiert werden [4; 5; 6; 12; 28; 29; 39; 44; 45; 51].

In Mischkulturen aus Bakterien und Pilzen verwerteten Bakterien Teilabbau-Produkte der Pilze weiter [8; 9; 29; 34]. Eine praktische Nutzung der Zusammenarbeit von Bakterien und Pilzen beim Abbau von PAK setzt voraus, daß Milieubedingungen gewährleistet sind, in denen Pilze und Bakterien co-existieren können, ohne daß eine Gruppe benachteiligt ist. Die vorliegenden praktischen Erfahrungen mit dem Einsatz von Pilzen bei der Bodensanierung zeigen, daß vor allem das Aufrechterhalten der Stoffwechselaktivität in zugemischten, pilzhaltigen Substraten problematisch ist.

Bakterien

Der Abbau von 2- bis 4-Ring-EPA-PAK wird, wie bei Benzol, in den meisten Fällen durch Dioxygenasen, unter Bildung von toxikologisch unbedenklichen *cis*-Dihydrodiolen, eingeleitet. Nach der Ringspaltung werden unter Abspaltung von C_2 -, C_3 - und C_1 -Teilstücken Hydroxycarbonsäuren gebildet, und nach Decarboxylierung kann der nächste Ring angegriffen werden. Auf diese Weise ist ein **vollständiger Abbau/Mineralisierung** von PAK möglich. Die Mineralisierung von Naphthalin und Phenanthren durch Bakterien wurde in Laboruntersuchungen häufig und schon relativ früh nachgewiesen [21]. Der Nachweis der Mineralisierung von 4-Ring-PAK gelang erst später. Aus zwei mit Teeröl verunreinigten Böden wurden neben Naphthalin, Fluoren, Phenanthren und Anthracen abbauenden Bakterienstämmen auch 16 Stämme isoliert, die mit Pyren als einziger organischer Kohlenstoffquelle wuchsen [30; 31]. Hydroxycarboxylsäuren, Zwischenprodukte des sequentiellen Abbaus der einzelnen Ringe der PAK, können jedoch auch akkumulieren (Abbauwege und Einzelheiten s. Übersichtsartikel [11; 21]).

Der Abbau von PAK durch Bakterien in **Wasser** wird bestimmt durch:

- die Anzahl der Ringe
- die Struktur der Moleküle und
- die durch ihre Wasserlöslichkeit bedingte Bioverfügbarkeit

Im **Boden** wird die Bioverfügbarkeit zusätzlich durch Sorption an Partikel verringert. Je höher kondensiert die PAK sind, desto stärker werden sie von Bodenpartikeln festgelegt (s. Kap. 2.1.2.1). Mangelnde Bioverfügbarkeit ist das Hauptproblem bei der biologischen Sanierung von Schadensfällen mit PAK (s. Kap. 2.1.2.6 und 2.1.2.7, Kap. 2.2 und Kap. 2.3).

Mit zunehmender **Zahl der Ringe** sinkt die Wahrscheinlichkeit eines vollständigen Abbaus/Mineralisierung. Der Anteil von gebildetem $^{14}\text{CO}_2$ nahm in der Reihe von ^{14}C -markiertem Naphthalin bis ^{14}C -Pyren ab und Teilabbauprodukte (niedriger kondensierte Metabolite mit polaren Hydroxyl- und Säuregruppen) nahmen zu. Schon in Laborversuchen wurde von den EPA-PAK nur Naphthalin durch Bakterien zuverlässig und vollständig mineralisiert. Auch das Vorhandensein eines C_5 -Ringes (s. Abb. 2.1, Cyclopentadien) wirkt sich erschwerend auf den Abbau aus. Fluoren und Fluoranthren wurden nach den vorliegenden Untersuchungen schlechter abgebaut, als die PAK mit der gleichen Zahl an Benzolringen [2; 13; 14; 23; 26; 50].

Die **Wasserlöslichkeit** der PAK limitiert die Geschwindigkeit ihrer Umsetzung. Mit Naphthalin- [18] und Phenanthrenkristallen [10] in Wasser wurden die Geschwindigkeiten der CO_2 -Produktion und des Wachstums der Bakterien durch die Geschwindigkeiten des Nachlösens der Kristalle bestimmt. Die Geschwindigkeit der Mineralisierung der PAK nimmt in der Reihenfolge Naphthalin > Phenanthren > Anthracen > Pyren ab. Die höher kondensierten PAK sind schlechte bis keine Wachstumssubstrate, auch wenn einzelne Ringe mineralisiert werden [7; 10; 27].

Grundsätzlich kann auch ein mineralisierbarer Stoff unter einer Grenzkonzentration nicht mehr abgebaut werden, wenn kein anderes Wachstumssubstrat zur Verfügung steht und der Energiegewinn nicht für das Aufrechterhalten des Stoffwechsels und für die Induktion der Synthese zum Abbau benötigter Enzyme ausreicht. Für Xenobiotika und für klassische Nährstoffe wie Glucose wurden **Schwellenwerte für den Abbau** zwischen $0,1 \mu\text{g/l}$ und 2 mg/l gefunden [25; 36]. In einer Untersuchung, in der sogar die "Mineralisierung" von Benzo[a]pyren nachgewiesen werden konnte, lagen die Prozentsätze nur zwischen 0 und 25 % $^{14}\text{CO}_2$ und es mußten Hefeextrakt, Pepton und Stärke als "Starternährstoffe" zugegeben werden [47].

Schon unter optimalen Bedingungen, im Labor, ergibt sich eine abgestufte Verwertbarkeit der PAK für Bakterien:

- 2- bis 3-Ring-PAK und Pyren können zur Aufrechterhaltung des Stoffwechsels und zum Wachstum genutzt werden.
- Komplexer zusammengesetzte PAK können teilmineralisiert werden und zumindest die Aufrechterhaltung des Stoffwechsels gewährleisten, wobei Teilabbauprodukte dominieren
- Im Konzentrationsbereich des Schwellenwerts für den Abbau kann die Zugabe von Nährstoffen als Cosubstrate eine Teil-Mineralisierung von > 4-Ring-PAK ermöglichen.

Teilabbauprodukte

Die physikalischen Eigenschaften der Produkte des Teilabbaus durch Bakterien und Pilze hängen von der verbliebenen Zahl der Ringe ab. Sie verschieben sich mit zunehmender Molekülgröße von mobilen, flüchtigen, wasserlöslichen zu immobilen, hydrophoben, praktisch wasserunlöslichen Verbindungen. Parallel nehmen Bioverfügbarkeit und Abbaubarkeit ab. Auf die Abbausequenzen und auf die Vielzahl der z.T. toxikologisch bedenklichen Metabolite wird in diesem Rahmen nicht eingegangen. Eine ausführliche Darstellung findet sich bei [11]. Die aerob von Bakterien und Pilzen produzierten Metabolite der PAK sind reaktiver als die Ausgangssubstanzen, da sie durch Oxidation funktionelle Gruppen (Phenolischen Hydroxy- und Säuregruppen) tragen. Sie können durch Polymerisierung Huminstoff-ähnliche Assoziationen bilden und in die Humusmatrix eingebunden werden (s. Kap. 2.2.2).

Der Festlegung der Metabolite in der Humusmatrix und der Stabilität der nicht-extrahierbaren Rückstände ("bound residues") kommt als Eliminierungs- und Entgiftungsprozess besondere Bedeutung zu, da der Teilabbau bei der Umsetzung von höher kondensierten PAK dominiert (s. auch Kap. 2.5). In einer vergleichenden Untersuchung mit vier Böden aus Gaswerksstandorten ließen sich die PAK proportional zu ihren Wasserlöslichkeiten eluieren. Nach dreimonatigen Abbauprobversuchen konnten die PAK auf diese Weise nicht mehr mobilisiert werden und das wässrige Eluat war nicht mehr genotoxisch [24].

Aus der gestaffelten Abbaubarkeit ergeben sich zwei Zielrichtungen für die biologische Behandlung von Schadensfällen mit bioverfügbaren PAK:

1. Eliminierung niedrig molekularer PAK durch Mineralisierung und
2. Abreicherung durch kontrollierte Humifizierung.

Eine irreversible Festlegung der Teilabbauprodukte, bzw. der schwer-abbaubaren PAK selbst, muß bei der gezielten Humifizierung gewährleistet sein. Die Sanierungsstrategie der Humifizierung von Schadstoffen und die Stabilität der Produkte werden gesondert in Kap. 2.2 behandelt.

2.1.2.3 Anaerober Abbau

PAK können anaerob durch Bakterien abgebaut werden. Am häufigsten nachgewiesen wurde die Mineralisierung von Naphthalin unter denitrifizierenden Bedingungen. Auch Acenaphthen wurde unter diesen Bedingungen mineralisiert [1; 17; 21; 49]. In neueren Untersuchungen wurde die Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ unter sulfatreduzierenden Bedingungen in Proben unterschiedlicher Herkunft nachgewiesen. Zum Beispiel bauten Bakteriengemeinschaften aus PAK-belasteten, marinen Sedimentproben Naphthalin, Methylnaphthalin, Phenanthren, Fluoren und Fluoranthren ab [15; 16; 56], während Pyren und Benzo[a]pyren nicht angegriffen wurden [16]. Naphthalin wurde auch unter methanogenen Bedingungen mineralisiert [20; 38].

2.1.2.4 Der Verbleib von PAK in Böden

Festlegung

PAK und ihre Metabolite können festgelegt werden als:

- **reversibel** an Huminstoffe gebundene Molekülassoziationen,
- **praktisch irreversibel** an Huminstoffe, Kohlepartikel und andere Bodenbeimengungen gebundene, wenig bis nicht bioverfügbare Molekülassoziationen,
- **kovalent** an Huminstoffe gebundene, nicht bioverfügbare höher- und hochmolekulare Produkte,
- **eingeschlossen** in Mikroporen als nicht bioverfügbare Phase analog der Residualsättigung bei Mineralölkohlenwasserstoffen.

Jegliche Art der Festlegung erschwert bzw. verhindert zwar die biologische Umsetzung der PAK oder den weiteren Abbau von Teilabbauprodukten. Die Festlegung ist jedoch gleichzeitig auch ein Mechanismus der Entgiftung.

Genese, Mechanismen und Stabilität gebundener Aromaten und die toxikologischen Konsequenzen werden in [11; 28], sowie in den Kap. 2.2 und 2.5 detailliert behandelt. Für die Festlegung von PAK in Böden, Adsorption und Einbindung in die Bodenmatrix sind Bodenart (Korngröße, Huminstoffgehalt u.a.) und Beimengungen wie Kohle, Koks, Schlacke und andere Partikel wichtig, da sie die Sanierbarkeit von Böden beeinflussen (s. Kap. 2.3.1.4). Im Feinkornanteil von Böden werden Schadstoffe durch Sorption aufgrund der im Verhältnis zum Volumen großen Oberfläche stärker angereichert als in grobkörnigeren Bodenfraktionen und fester gebunden.

Die in Böden von Standorten der kohleverarbeitenden Industrie enthaltenen Kohle-, Koks- und Schlackepartikel und als Bindemittel zugegebene Braunkohleasche wirken, wie Aktivkohle, als PAK-Fänger und können den Korngrößeneffekt beeinflussen (s. auch Kap. 2.3.1.4). Im Bodenaushub auf dem Gelände einer ehemaligen Teerölraffinerie waren in der Siebkornfraktion < 0,125 mm doppelt so viel 4- und 5-Ring-PAK festgelegt, wie in der Kornfraktion von 1 - 2 mm. Sie wurden in den einzelnen Kornfraktionen (< 0,125 mm : 0,125 - 2 mm : > 2 mm) in einem Verhältnis von 4 : 2 : 1 festgelegt. Die Klassierung der Bodenmatrix zeigte, daß die PAK im wesentlichen von Steinkohlenkoks-, Kohle- und Schlackepartikeln angereichert wurden [53]. In einem anderen Fall war der an Kohle-, Koks- und Holzpartikel adsorbierte, nicht bioverfügbare Anteil der PAK zehnmal höher als die Belastung der Gesamtproben [48].

Mobilisierung

PAK können durch Lösen in organischen Co-Kontaminanten (s. Kap. 2.1.2.5) und durch Assoziation mit gelösten Huminstoffen mobilisiert werden. Auf ehemaligen Gaswerksgeländen sind Kontaminationen des Grundwassers mit PAK auf Transport in der organischen Phase und anschließendes Lösen in Wasser zurückzuführen [55]. Die Verlagerung von PAK aus humusreichem Oberboden in tiefere Bodenschichten wird dagegen auf Mobilisierung durch gelöste Huminstoffe und Co-Transport im Sickerwasser zurückgeführt [33]. Auch Kompost als Zuschlagstoff in Mietenverfahren kann diesen Effekt bewirken (s. Kap. 2.2.2.1).

Das Bodenwasser (Poren oder Kapillarwasser) enthält abhängig von der Bodenart unterschiedliche Mengen an kolloidal gelösten, makromolekularen und niedriger molekularen Huminstoffen (DOM). Sie funktionieren als Sorbentien und "lösen" die PAK über ihre Wasserlöslichkeit hinaus (Solubilisierung). Durch die Solubilisierung kann die Mobilität der PAK, speziell der nur im $\mu\text{g}/\text{l}$ löslichen Verbindungen (s. Tab. 2.8), erhöht werden. Von niedriger molekularen Huminstoffen sorbierte PAK können, sozusagen im "Huckepack-Verfahren", in Konzentrationen über ihrer Wasserlöslichkeit mit dem Sickerwasser transportiert werden (Co-Transport). Auch durch Sorption an gelöste makromolekulare Huminstoffe werden PAK solubilisiert. Diese Makromoleküle können jedoch ihrerseits in der Bodenmatrix festgelegt werden und damit die solubilisierten PAK wieder immobilisieren [33; 40].

2.1.2.5 Ehemalige Gaswerke, Kokereien und teerölverarbeitende Industrien

Kontaminationen des Bodens an Standorten ehemaliger kohleverarbeitender Industrien sind Mischkontaminationen mit Grundwassergefährdungspotential, da das Spektrum der Schadstoffe in nicht geringem Umfang wasserlösliche, mobile Verbindungen enthält. Für ehemalige Gaswerke und Kokereien sind die in Tab. 2.9 aufgelisteten Stoffe charakteristisch, die das Risiko maßgeblich bestimmen können [41]. Von den Einzelstoffen wirken sich abhängig von ihrer Konzentration vor allem Schwermetalle, Phenol und Kresole und BTEX-Aromaten negativ auf die mikrobielle Aktivität aus - wobei Phenole kondensieren und so ihre bakterizide Wirkung verlieren können. Der Einfluß von Störfaktoren wird in Kap. 2.3, Beurteilung der Sanierbarkeit von Böden, behandelt.

Tab. 2.9: Charakteristische Stoffe für ehemalige Gaswerksstandorte und Kokereien, die maßgeblich das Risiko bestimmen können [41].

Schwermetalle und andere	Monozyklische Aromaten	Polyzyklische Aromaten	Großgruppen
Ammonium	Benzol	Naphthalin	allgem. PAK
Arsen	Ethylbenzol	Fluoren	Teeröle
Blei	Toluol	Anthracen	Mineralöl
Chrom	Xylol	Benzo[a]pyren	Säuren/Basen
Cyanide	Trimethylbenzol		
Thiocyanate	Phenol		
	Kresole		

Teer und Teeröle

Mit Teer und Teeröl belastete Bodenbereiche sind für eine biologische Sanierung problematisch. Bei der Gewinnung von Gas aus Koks fallen relativ große Mengen Rohteer an, der zu etwa 50 % aus Pech besteht und nach Schätzungen über 10.000 Verbindungen enthält, von denen bisher einige hundert identifiziert wurden. Dieser Teer diente als Ausgangsmaterial für verschiedene Teeröle, zur Konservierung von Holz und beim Straßenbau [35]. Im Boden verhält sich Teeröl im Prinzip wie eingesickertes Mineralöl. Es umschließt die Bodenpartikel als residuale Phase, liegt im Porenraum als pendulare Restsättigung vor und bildet im Bodenwasser Teeröltropfen aus (s. Kap. 2.3.1.3). Für die Wahl von Sanierungsverfahren ist wichtig, ob das Teeröl in Phase, als Restsättigung, an Kohlepartikel adsorbiert oder als Teerölklumpen vorliegt. Die Toxizität von Teerölverunreinigungen wird in entscheidender Weise durch die Bioverfügbarkeit bestimmt; z.B. entsprach das Eluat eines mit 1 g/kg PAK belasteten Bodens in seiner Toxizität einem unbelasteten Gartenboden [21].

Gaswerksstandorte

Vier mit Steinkohlenteer belastete Böden von Gaswerksstandorten enthielten rd. 40 % EPA-PAK, die 5 % des gesamten organischen Kohlenstoffs ausmachten (TOC = Gesamtbelastung + natürliche organische Substanz). Die anteilmäßig dominierenden, nicht-EPA-PAK setzten sich aus einer Vielzahl von, meist substituierten, PAK zusammen, die in geringen Konzentrationen vorlagen [24]. Wichtige EPA-PAK im Teer und nicht-EPA-PAK in Teeröl sind in Tab. 2.8 und in Tab. 2.10 aufgeführt.

Tab. 2.10: Anteilmäßig wichtige nicht EPA- und TVO-PAK in Teeröl [48]

nicht EPA- und TVO-PAK	Anteil [%]
1-Methylnaphthalin	8
2-Methylnaphthalin	13
2,3-Dimethylnaphthalin	4
2,6-Dimethylnaphthalin	4
2-Methylanthracen	1
2,3-Benzo[b]fluoren	1

Außerdem fielen bei der Erzeugung von Rohgas und der Aufbereitung zu Stadtgas Nebenprodukte an, die bei unsachgemäßer Handhabung in den Boden gelangten und in das Grundwasser transportiert wurden. Für Gaswerke typische Kontaminanten sind Ammonium*, Cyanide, Sulfat, BTEX-Aromaten*, Phenole*, Naphthalin* und sonstige PAK*. Die Verteilung der Stoffe ist heterogen und hängt von den Betriebsbereichen eines Gaswerks ab [35; 55]. Die mit einem Stern (*) gekennzeichneten Stoffe fielen bei der Reinigung von Rohgas an.

Da ein mengenmäßig großer Anteil der Kontaminanten im Vergleich zu den PAK gut wasserlöslich ist, sind Bodenkontaminationen auf Gaswerksgeländen mit Grundwasserbelastungen

verbunden. An einem ehemaligen Gaswerksstandort war das Grundwasser durch Produkte der Kohleentgasung und der Teerdestillation belastet. Es enthielt in hohen Konzentrationen Aliphate, BTEX, PAK, Phenole, Biphenyle, Benzofurane und Thiophene [1]. Die Verteilung der PAK in Boden und Grundwasser in Tab. 2.11 spiegelt ihre Wasserlöslichkeiten wieder.

Tab. 2.11: Ehem. Gaswerksstandort: Verteilung von PAK in Boden und Grundwasser [1]

Kontaminaten	Boden [mg/kg]	Wasser [µg/l]
Naphthalin	17	46
Methylnaphthalin	125	25
Inden	1	150
Acenaphthen	150	283
Fluoren	300	42
Dibenzofuran	167	33

Wechselwirkungen der Kontaminanten

Gaswerksstandorte werden mit PAK als Leitsubstanzen assoziiert, da sie die für die biologische Sanierung problematischste Stoffgruppe sind. In Hinblick auf Grundwasserbelastungen sind die BTEX-Aromaten die wichtigsten Begleitstoffe. Ihre Konzentration kann bis zu fünfmal höher sein als die der PAK [55]. Wie sich die unterschiedlichen Kontaminanten auf die biologische Sanierung eines Gaswerksstandortes auswirken können, hängt von ihrer Zusammensetzung, ihren Konzentrationen und der Beschaffenheit des Untergrundes ab. Als Co-Kontaminanten können die BTEX-Aromaten mehrere Funktionen haben:

- Als **Lösungsvermittler** können sie PAK mobilisieren,
- als **Cosubstrate** können sie die Vermehrung von Bakterien ermöglichen, die PAK umsetzen,
- als **konkurrierende Substrate** können besser abbaubare Aromaten den Abbau von PAK verzögern (Diauxie) und
- als **Inhibitoren** können BTEX, wie auch ein großer Teil der in Tab. 2.9 aufgelisteten Stoffe, Mikroorganismen hemmen.

2.1.2.6 Laboruntersuchungen zur Sanierbarkeit von Gaswerkstandorten

Die Ergebnisse von Untersuchungen zum Abbau von PAK in real kontaminierten Böden werden durch die Versuchsdurchführung beeinflusst. In Aufschlammungen von vier mit Steinkohlenteer belasteten Böden [24] wurden gleichsinnige Ergebnisse erhalten: 2- bis 3-

Ring-PAK wurden zu 80 - 100 % eliminiert, mit Ausnahme von Acenaphthen, das in zwei Böden nur zu etwa der Hälfte abgebaut wurde. Die Konzentrationen der 4-Ring-PAK nahmen um 40 - 70 % ab, während die 5- bis 6-Ring-PAK mit Abnahmen ≤ 20 % persistierten. In mit Steinkohlenteer bzw. Teeröl belasteten Böden zeigte sich der gleiche Trend [3; 54]. Die Variationsbreite der Ergebnisse war jedoch aufgrund des Einflusses der Bodenstruktur bedeutend größer. Naphthalin nahm zwischen 60 % und 100 % ab, während die Eliminationsraten der EPA-PAK von Fluoren bis Chrysen (s. Tab. 2.8, Abb. 2.1) sich zwischen 0 % und 100 % bewegten. Bei den 5-Ring-PAK waren die maximalen Abnahmen deutlich niedriger. In den Untersuchungen wurden die Konzentrationen der Ausgangssubstanzen gemessen, so daß eine Unterscheidung zwischen Mineralisierung und Teilabbau nicht möglich ist.

Der Verbleib von Kontaminanten kann mit Hilfe von Isotopen aufgeschlüsselt werden. Dabei ist zu beachten, daß frisch zugegebene Schadstoffe bioverfügbarer sind als die in einer Altlast enthaltenen (s. Kap. 2.2.1.2). In Verbindung mit der Sanierung eines Gaswerksgeländes wurde der Abbau von dotiertem ^{14}C -Pyren und ^{14}C -Benzo[a]pyren in mit PAK belasteten Bodenproben und in unbelasteten Kontrollböden des Geländes verglichen [23]. Beide PAK wurden auch in den Kontrollböden zumindest teilweise mineralisiert (s. Tab. 2.12). Neben der extrahierbaren Fraktion wurden z.T. beträchtliche Mengen nicht-extrahierbare Rückstände gebildet.

Tab. 2.12: Laborversuche zur Umsetzung von dotiertem ^{14}C -Pyren und ^{14}C -Benzo[a]pyren in mit PAK belasteten Böden und Kontrollböden eines ehemaligen Gaswerksgeländes; ^{14}C -Pyren $9 \mu\text{g}/\text{kg}$, ^{14}C -Benzo[a]pyren $84 \mu\text{g}/\text{kg}$ [23]

Abbauprodukte [%]	Bodenmaterial					
	Sanierungsbereich			Kontrollböden		
	1	2	3	1	2	3
aus ^{14}C-Pyren						
$^{14}\text{CO}_2$	52	44	27	35	17	16
^{14}C -extrahierbar	15	14	9	27	28	56
^{14}C -nicht extrahierbar	33	42	64	38	55	28
aus ^{14}C-Benzo[a]pyren						
$^{14}\text{CO}_2$	25	4	3	7	4	
^{14}C -extrahierbar	62	32	13	70	88	
^{14}C -nicht extrahierbar	13	64	84	23	8	

2.1.2.7 Sanierungspraxis

Mietenverfahren gehören zu den etablierten und gängigsten Verfahren der biologischen Bodensanierung. Daher wird hier exemplarisch ein Beispiel zum Einsatz von Mietenverfahren bei der Sanierung von PAK belasteten Böden aufgeführt, das gut dokumentiert ist.

Ehemaliges Gaswerk Solingen-Ohligs

In einem Feldversuch mit gering belasteten Böden aus dem Randbereich des Gaswerkes wurden vier Mietenverfahren verglichen [48]. Der Boden, schluffig-lehmiger Sand, war mit < 200 mg/kg TS EPA-PAK belastet. BTEX und LCKW waren nicht nachweisbar, und der Boden enthielt keine inhibitorischen Konzentrationen von Schwermetallen und weiteren Begleitstoffen. Der pH-Wert lag im neutralen bis schwach basischen Bereich. Fünf Mieten wurden aufgeschichtet:

1. Nicht überdachte, ca. 0,6 m hohe Miete: der Boden wurde mit ca. 30 Vol.% **Kompost aus Grünschnitt und Biomüll** vermischt und mit tiefwurzelndem Klee bepflanzt. Die Miete wurde während der 17-monatigen Versuchsdauer einmal gewendet.
2. Nicht überdachte, ca. 0,8 m hohe Miete: der Boden wurde mit ca. 2,5 % Strukturmaterial versetzt (im wesentlichen **Kiefernborke**), wöchentlich gelockert und pulsweise mit Sauerstoff begast.
3. Mit Folientunnel überdachte, ca. 1 m hohe Miete: Der Boden wurde mit ca. 13 Gew.% **Stroh/Pilzsubstrat** versetzt, mit Rindenmulch überdeckt, mit einem Saugzuggebläse belüftet und die Abluft über einen Aktivkohlefilter geleitet.
4. Mit einem Zelt überdachte, ca. 1,5 m hohe Miete: Der Boden wurde homogenisiert, mit ca. 10 % Strukturmaterial (hauptsächlich **Rindenmulch**) versetzt und durch Wenden mit einem speziellen Wendegerät belüftet.
5. Nicht überdachte, ca. 0,6 m hohe Kontrollmiete.

Für die Dauer der Sanierung waren 17 Monate, zwei Vegetationsperioden, vorgesehen. Die beteiligten Firmen setzten die Arbeit ein weiteres Jahr bis November 1991 fort, um das Ergebnis zu verbessern. Das Sanierungsziel, 10 mg/kg TS Σ EPA-PAK und/oder 1 mg/kg TS Benzo[a]pyren wurde in keiner der Mieten erreicht, obwohl der Boden zumindest Naphthalinverwertende-Bakterien enthielt, und die mikrobielle Gesamtaktivität durch die ergriffenen Maßnahmen gesteigert wurde. Das Auftreten von Teilabbauprodukten in Bodeneluatn zeigte, daß PAK umgesetzt wurden. Die Metabolite wurden aufgrund ihrer komplexen Zusammensetzung analytisch nur Großgruppen zugeordnet. Nachgewiesen wurden Oxidationsprodukte der PAK: Ketone, Methylketone, Chinone und stickstoffhaltige PAK.

Der Boden enthielt Kohle-, Koks- und Holzpartikel, die PAK absorbierten. Der PAK Gehalt der Partikel betrug ein zehnfaches der Konzentration des Gesamtbodens. Die Autoren [48] kommen zu dem Ergebnis, daß der Boden aufgrund der unzureichenden Bioverfügbarkeit der PAK für eine biologische Sanierung ungeeignet war. Sie weisen darauf hin, daß im Labor abbaubare 4-Ring-PAK in der Praxis wohl kaum abbaubar sind. Das gleiche Ergebnis, kein Abbau von 4- und 5-Ring-PAK, wurde später in Versuchsmieten mit Boden einer Altölraffinerie erhalten [42]. Auch die dargestellten Ergebnisse der Laboruntersuchungen zur Sanierbarkeit

sind gleichsinnig, so daß in der Praxis davon auszugehen ist, daß ≥ 4 -Ring-PAK persistieren oder nur marginal umgesetzt werden.

Die Autoren betonen abschließend, daß für eine Abschätzung der biologischen Sanierbarkeit eines mit PAK belasteten Bodens gründliche Voruntersuchungen unter den Bedingungen vor Ort nötig sind. Für diese Untersuchungen ist ein Zeitraum von mindestens zwei bis drei Monaten anzusetzen. Auf die Zugabe von Tensiden als eine Möglichkeit zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit wird im Kapitel Maßnahmen (s. Kap. 2.4.3) eingegangen.

2.1.2.8 Biologisches Selbstreinigungspotential

In **Böden** ist der Nachweis von PAK abbauenden Mikroorganismen (direkt über Isolate oder $^{14}\text{CO}_2$ aus markierten PAK) ein Indikator für das Vorhandensein eines biologischen Abbaupotentials. Inwieweit ein solches Potential praktisch genutzt werden kann, hängt von der Beschaffenheit des Bodens, der Bioverfügbarkeit der PAK und der Sauerstoffversorgung ab.

Das natürliche Abbaupotential im **Grundwasser** läßt sich am Beispiel eines ehemaligen Gaswerksstandortes veranschaulichen, der durch Produkte der Kohleentgasung und der Teerdestillation bis in das Grundwasser verunreinigt war [1]. Das Grundwasser enthielt in hohen Konzentrationen Aliphate, BTEX Aromaten, PAK, Phenole, Biphenyle, Benzofurane und Thiophene. Bei den PAK dominierten Inden, Naphthalin und Acenaphthen (s. Abb. 2.1, Tab. 2.11). Im anaeroben Bereich der Schadstofffahne wurden die niedermolekularen Aromaten, speziell Ethylbenzol und Naphthalin, abgebaut. Acenaphthen wurde dagegen erst im aeroben Bereich der Fahne angegriffen, und die Konzentration sank unter die Nachweisgrenze. Die Selbstreinigung in der Grundwasserfahne war das Ergebnis mehrerer Prozesse:

- Verdünnung durch Zustrom von unbelastetem Grundwasser,
- anaerobem Abbau (BTEX),
- Sorption und
- aerobem Abbau

In neueren Untersuchungen wurde auch eine Mineralisierung von PAK unter sulfat-reduzierenden Bedingungen in **anaeroben Sedimenten** festgestellt, die über lange Zeit mit PAK belastet waren und ausreichend Sulfat enthielten [15; 16; 56]. D.h., daß dieser Prozeß wie bei den MKW (s. Kap. 2.1.1.3) im Rahmen einer Selbstreinigung langfristig eine Rolle spielen könnte, solange die Sulfatversorgung gesichert ist. Für eine biologische Sanierung ist der Nutzen des anaeroben Abbaus der PAK sehr begrenzt. Denn ein Großteil der PAK ist schon aerob sehr viel schlechter abbaubar als die monocyclische Aromaten, die aerob bedeutend schneller abgebaut werden als anaerob (s. Kap. 2.1.1.2).

2.1.2.9 Literatur

1. **Annweiler, E., M. Eiswirth, H. Hötzl, B. Reichert, H. H. Richnow, B. Schäfle, R. Seifert und W. Michaelis.** 1997. Organische Kontaminationen im Grundwasserbereich eines ehemaligen Gaswerkstandortes. In: 12. DEHEMA-Fachgespräch Umweltschutz: Möglichkeiten und Grenzen der Reinigung kontaminierter Grundwässer. Seite 549-556.
2. **Bauer, J. E., and D. G. Capone.** 1988. Effects of co-occurring aromatic hydrocarbons on degradation of individual polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1649-1655.
3. **Beyer, M., M. van Afferden und J. Klein.** 1991. Möglichkeiten und Grenzen des mikrobiellen PAK-Abbaus in kontaminierten Böden und Konsequenzen für die Praxis der mikrobiologischen Bodensanierung. In 15. Mülltechnisches Seminar, Berichte aus Wassergüte- und Abfallwirtschaft, TU München. Nr. 108.
4. **Bezalel, L., Y. Hadar, P. P. Fu, J. P. Freeman, and C. E. Cerniglia.** 1996. Metabolism of phenanthrene by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2547-2553.
5. **Bezalel, L., Y. Hadar, P. P. Fu, J. P. Freeman, and C. E. Cerniglia.** 1996. Initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2554-2559.
6. **Bezalel, L., Y. Hadar, and C. E. Cerniglia.** 1996. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:292-295.
7. **Boldrin, B., A. Tiehm, and Ch. Fritzsche.** 1993. Degradation of phenanthrene, fluorene, fluoranthene, and pyrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1927-1930.
8. **Boonchan, S., M. L. Britz, and G. A. Stanley.** 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1007-1019.
9. **Brodkorb, T. S., and R. L. Legge.** 1992. Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soils supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3117-3121.
10. **Bryniok, D.** 1997. Kommentar zu limitierenden Faktoren des PAK-Abbaus. In: Mikrobieller Schadstoffabbau. Ein interdisziplinärer Ansatz. Ch. Knorr, and T. von Schell Hrsg. Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, Seite 166-170.
11. **Bryniok, D.** 1997. PAK-Abbau und Freisetzung von Metaboliten. In: Mikrobieller Schadstoffabbau. Ein interdisziplinärer Ansatz. Ch. Knorr, and T. von Schell Hrsg. Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, Seite 118-130.
12. **Bumpus, J. A.** 1989. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:154-158.

13. **Casellas, M., M. Grifoll, J. M. Bayona, and A. M. Solanas.** 1997. New metabolites in the degradation of fluorene by *Arthrobacter* sp. strain F101. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:819-826.
14. **Churchill, S. A., J. P. Harper, and P. F. Churchill.** 1999. Isolation and characterization of a *Mycobacterium* species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:549-552.
15. **Coates, J. D., R. T. Anderson, and D. R. Lovley.** 1996. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1099-1101.
16. **Coates, J. D., J. Woodward, J. Allen, P. Philip and D. R. Lovley.** 1997. Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and alkanes in petroleum-contaminated marine harbor sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:3589-3593.
17. **DGMK-Forschungsbericht 461-01.** 1991. Mikrobieller Abbau von Kohlenwasserstoffen und Kohlenwasserstoffverbindungen. Bearbeiter Witt, D., 95 Seiten.
18. **Fredrickson, J. K., F. J. Brockman, D. J. Workman, S. W. Li and T. O. Stevens.** 1991. Isolation and characterization of a subsurface bacterium capable of growth on toluene, naphthalene, and other aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:796-803.
19. **Fritsche, W.** 1998. Umwelt-Mikrobiologie: Grundlagen und Anwendungen. G. Fischer Verlag. Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm. 252 Seiten.
20. **Genthner, B. R. S., G. T. Townsend, S. E. Lantz, and J. G. Mueller.** 1997. Persistence of polycyclic aromatic hydrocarbon components of creosote under anaerobic enrichment conditions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **32**:99-105.
21. **Gleim, D.** 1994. Abbauverhalten altlastenrelevanter (Schad-) Stoffe. Abschlußbericht zum Forschungsprojekt 14807430 des BMFT. Hrsg. DECHEMA Frankfurt a. M.
22. **Grathwohl, P.** 1997. Auswirkung der Lösungs- und Desorptionskinetik auf die Bioverfügbarkeit von Schadstoffen. In: Mikrobieller Schadstoffabbau. Ein interdisziplinärer Ansatz. Ch. Knorr, and T. von Schell Hrsg. Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden. Seite 15-33.
23. **Grosser, R., D. Warshawsky, and J. R. Vestal.** 1991. Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo[a]pyrene, and carbazole in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:3462-3469.
24. **Haeseler, F., D. Blanchet, V. Druelle, P. Werner, and J.-P. Vandecasteele.** 1999. Ecotoxicological assessment of soils of former manufactured gas plant sites: Bioremediation potential and pollutant mobility. *Environ. Sci. Technol.* **24**:4379-4384.
25. **Haider, K.** 1996. Biochemie des Bodens. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart. 174 Seiten.
26. **Heitkamp, M. A., W. Franklin, and C. E. Cerniglia.** 1988. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: isolation and characterization of a pyrene-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2549-2555.

27. **Heitkamp, M. A., J. P. Freeman, D. W. Miller, and C. E. Cerniglia.** 1988. Pyrene degradation by a *Mycobacterium* sp.: identification of ring oxidation and ring fission products. Appl. Environ. Microbiol. **54**:2556-2565.
28. **Kästner, M.** 2000. "Humification" process or formation of refractory soil organic matter. In: Biotechnology, Vol. 11b: Environmental processes II, J. Klein Ed. Wiley-VCH, Weinheim. Chap. 4, pp. 90-125.
29. **Kästner, M.** 2000. Degradation of aromatic and polyaromatic compounds. In: Biotechnology, Vol. 11b: Environmental processes II, J. Klein Ed. Wiley-VCH, Weinheim. Chap. 9, pp. 90-125.
30. **Kästner, M., M. Breuer und B. Mahro.** 1991. Bakterien-Isolate aus unterschiedlichen Altlast-Standorten zeigen ein vergleichbares Abbau-Profil für PAK und Ölkomponenten. GWF **132**:253-255.
31. **Kästner, M., M. Breuer-Jammali, and B. Mahro.** 1994. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl. Microbiol. Biotechnol. **41**:267-273.
32. **Kästner, M., B. Mahro und R. Wienberg.** 1993. Biologischer Schadstoffabbau in kontaminierten Böden unter besonderer Berücksichtigung der Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffe. Economia Verlag Bonn, 180 Seiten.
33. **Kögel-Knabner, I., B. Raber und K. U. Totsche.** 1998. Einfluß gelöster Huminstoffe auf die Mobilität hydrophober Schadstoffe im Boden. FET & WW, Hrsg. Band 6 Wirtschaft, Wissenschaft und Umwelt, Fortschr. Ber. VDI Reihe 15 Nr. 206. VDI Verlag Düsseldorf, Seite 68-87.
34. **Kotterman, M. J. J., E. H. Vis, and J. A. Field.** 1998. Successive mineralization and detoxification of benzo[a]pyrene by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 and indigenous microflora. Appl. Environ. Microbiol. **64**:2853-2858.
35. **Lauer, K.-H.** 1990. Herkunft von Boden- und Grundwasser belastenden Stoffen bei der Stadtgas erzeugung. In: Altlasten auf ehemaligen Gaswerksgeländen. DVGW-Schriftenreihe Gas Nr. 45. DVGW Hrsg. Vertrieb Wirtschafts- und Verlagsgesellschaft Gas und Wasser mbH, Bonn, pp 62-82
36. **LFU, Materialien zur Altlastensanierung** 1991: Handbuch Mikrobiologische Bodenreinigung. Bearbeiter Geller, A., Brauch, H.J., Werner, P., Berberich, G. Hrsg. Landesanstalt für Umweltschutz Baden Württemberg, Karlsruhe, 233 Seiten.
37. **MacGillivray, A. R., and M. P. Shiaris.** 1993. Biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons by yeasts isolated from coastal sediments. Appl. Environ. Microbiol. **59**:1613-1618.
38. **Parker, W. J.** 1995. Fate of polynuclear hydrocarbons during anaerobic digestion of municipal wastewater sludges. Water Environ. Res. **67**:1052.
39. **Pothuluri, J. V., J. P. Freeman, J. E. Evans, and C. E. Cerniglia.** 1992. Fungal metabolism of acenaphthene by *Cunninghamella elegans*. Appl. Environ. Microbiol. **58**:3654-3659.

40. **Raber, B.** 1996. Verteilungsverhalten von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) und deren Desorption aus Böden unter dem Einfluß von gelöster organischer Substanz (DOM) unterschiedlicher Herkunft. Dissertation, Fakultät für Geowissenschaften, Universität Bochum, 145 Seiten.
41. **Rat von Sachverständigen für Umweltfragen.** 1989. Altlasten. Sondergutachten. Metzler-Poeschel Verlag, Stuttgart. 304 Seiten.
42. **Ripper, J.** 1995. Untersuchungen zur Optimierung des mikrobiellen Ölabbaus unter Verwendung verschieden maßstäblicher Versuchssysteme. Dissertation D83 TU Berlin 195 Seiten.
43. **Römpp Lexikon Umwelt.** 1993. Hrsg. H. Hulpke. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
44. **Sack, U., T. M. Heinze, J. Deck, C. E. Cerniglia, M. C. Cazau, and W. Fritsche.** 1997. Novel metabolites in phenanthrene and pyrene transformation by *Aspergillus niger*. Appl. Environ. Microbiol. **63**:2906-2909.
45. **Sack, U., Heinze, T. M., J. Deck, C. E. Cerniglia, R. Martens, F. Zadrazil, and W. Fritsche.** 1997. Comparison of phenanthrene and pyrene degradation by different wood-decaying fungi. Appl. Environ. Microbiol. **63**:3919-3925.
46. **Scheffer/Schachtschabel.** 1989. Lehrbuch der Bodenkunde. 12., neu bearbeitete Auflage von Schachtschabel, P., Blume, H.P., Brümmer, G., Hartge, K.-H., and U. Schwertmann. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 491 Seiten.
47. **Schneider, J., R. Grosser, K. Jayasimhulu, W. Xue, and D. Warshawsky.** 1996. Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. Appl. Environ. Microbiol. **62**:13-19.
48. **Steilen, N., T. Heinkele, and W. Reinecke.** 1995. Feldversuche zur mikrobiologischen Sanierung eines PAK-belasteten Bodens (ehemaliger Gaswerkstandort) in Solingen-Ohligs. In: Praxis der mikrobiologischen Bodensanierung. Hrsg. R. Margesin, M. Schneider und F. Schinner. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Seite 81-106.
49. **Stieber, M.** 1997. Erfahrungen zum biologischen in-situ-Abbau von Kohlenwasserstoffen in Grundwässern. In: 12. DECHEMA-Fachgespräch Umweltschutz: Möglichkeiten und Grenzen der Reinigung kontaminierter Grundwässer. Seite 387-399.
50. **Stringfellow, W. T., and M. D. Aitken.** 1995. Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalenes, and fluorene by phenanthrene-degrading *Pseudomonads*. Appl. Environ. Microbiol. **61**:357-362.
51. **Sutherland, J. B., A. L. Selby, J. P. Freeman, F. E. Evans, and C. E. Cerniglia.** 1991. Metabolism of phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. **57**:3310-3316.
52. **Trinkwasserverordnung IX-4 (TVO).** 1991. Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe, zuletzt geändert am 1. April 1998, BGBl.

53. **Weißenfels, W. D., H.-J. Klewer und F. Berger.** 1993. Mikrobielle Abbaubarkeit und Biotoxizität von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) in Böden. *Bioengineering* **9**:29-34.
54. **Weißenfels, W. D., H.-J. Klewer, and J. Langhoff.** 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**:689-696.
55. **Werner, P. und W. Kühn.** 1990. Nutzungsbezogene Qualitätsziele im Grundwasserbereich. In: Altlasten auf ehemaligen Gaswerksgeländen. DVGW-Schriftenreihe Gas Nr. 45. DVGW Hrsg. Vertrieb Wirtschafts- und Verlagsgesellschaft Gas und Wasser mbH, Bonn, Seite 47-61.
56. **Zhang, X., and L. Y. Young.** 1997. Carboxylation as an initial reaction in the anaerobic metabolism of naphthalene and phenanthrene by sulfidogenic consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4759-4764.

2.1.3 Leichtflüchtige Chlorkohlenwasserstoffe (LCKW), Überblick

Annette Geller

Die unter dem Begriff LCKW zusammengefassten Stoffgruppen Chlorethene, Chlorethane, Chlormethane und die höheren, chlorierten Aliphate, auf die hier nicht eingegangen wird, enthalten eine überschaubare Anzahl von Verbindungen. Das Grundgerüst der C₂- bzw. C₁-Aliphate ist mono- bis vollständig chlosubstituiert. Da die Molekulargewichte der Grundbausteine der LCKW, Kohlenstoff (12 g/mol), Wasserstoff (1 g/mol) und Chlor (35,5 g/mol) stark voneinander abweichen, ermöglichen die in der Praxis üblichen Gewichtsangaben, wie mg/kg, keinen Vergleich der Konzentrationen und der Abbaugeschwindigkeiten der LCKW (s. Tab. 2.13). Auch die Bilanzierung bei der anaeroben, schrittweisen reduktiven Dechlorierung führt so zu irreführenden Ergebnissen.

Neben den Gewichtsangaben sollten daher auch die molaren, d. h. auf die Zahl der Moleküle bezogenen, Konzentrationen angegeben werden, um die Vergleichbarkeit von Meßergebnissen zu gewährleisten.

LCKW werden in den verschiedensten Industriezweigen verwendet und dienen der Herstellung von Farben und Lacken bis zu Speiseölen und Fetten. Aufgrund ihrer Eigenschaften werden bzw. wurden sie bevorzugt als Löse-, Entfettungs- und Extraktionsmittel verwendet und in der Metall- und Elektroindustrie, chemischen Reinigungen und der Tierkörperbeseitigung/Verwertung eingesetzt [13; 32; 35].

Die **humantoxikologische** Wirkung der LCKW beruht auf der Bildung von toxischen Epoxiden in den Zellen. Sie werden aufgrund ihrer Lipophilie leicht resorbiert und können langfristig Leber- und Nierenschäden hervorrufen. In hohen Konzentrationen wirken sie auf das Zentralnervensystem und bei einigen LCKW besteht begründeter Verdacht auf Karzinogenität. Das auch ohne Sanierungsmaßnahmen in Grundwasserfahnen gebildete Vinylchlorid ist eindeutig karzinogen. Auf **Mikroorganismen** wirken LCKW in erhöhten Konzentrationen toxisch. Die Hemmkonzentrationen hängen von der Art des Stoffes und der Art der Bakterien ab [34]. Daher sollten Hemmschwellen individuell, d.h. fallbezogen bestimmt werden.

2.1.3.1 Eigenschaften der LCKW

Die meisten LCKW sind schwerer als Wasser, gut wasserlöslich und flüchtig (Tab. 2.13). Wasserlöslichkeit und Flüchtigkeit steigen mit abnehmender Zahl der Chloratome. Die Monochlor-Verbindungen Vinylchlorid, Monochlorethan und Monochlormethan sind bei 25 °C gasförmig und dementsprechend wieder weniger wasserlöslich. Die LCKW verteilen sich entsprechend ihren Eigenschaften in charakteristischer Weise in Boden, Wasser und (Boden-)Luft [38]. Aufgrund ihrer Mobilität bilden sie ein Gefahrenpotential für das Grundwasser. In den Bundesländern Baden Württemberg, Nordrhein-Westfalen und Niedersachsen dominierten Schadensfälle mit LCKW bei Grundwasserkontaminationen [13]. Entsprechend der Häufigkeit ihres Einsatzes sind PCE, TCE, 1,1,1-TCA und DCM die wichtigsten Kontaminanten (Nomenklatur s. Tab. 2.13). TC und CF sind dagegen von untergeordneter Bedeutung [39]. In der TVO [40] ist für PCE, TCE, 1,1,1-TCA und DCM ein Grenzwert von insgesamt 10 µg/l und für TC als Einzelstoff ein Grenzwert von 3 µg/l vorgeschrieben.

Tab. 2.13: Einige physikalisch-chemische Eigenschaften von leichtflüchtigen Chlor-kohlenwasserstoffen (LCKW).

Name	Abk.	Formel	Molekulargewicht [g/mol]	Wasserlöslichkeit [g/l]	Dampfdruck ² [kPa]	Dichte [g/cm ³]
Chlorethene						
Tetrarchlorethen	<u>PCE</u>	Cl ₂ C=CCl ₂	165,8	0,14	1,9	1,62
Trichlorethen	<u>TCE</u>	ClHC=CCl ₂	131,4	1,1	7,8	1,46
1,2-Dichlorethen	<i>cis</i> -DCE	ClHC=CHCl	96,9	5,1	22	1,28
	<i>trans</i> -DCE	HCIC=CHCl	96,9	6,3	34	1,26
Vinylidenchlorid (1,1-Dichlorethen)	VDC	H ₂ C=CCl ₂	96,9	2,5	67	1,22
Vinylchlorid	VC	H ₂ C=CHCl	62,5	16	333	0,91
Chlorethane						
1,1,2,2-Tetrachlorethan	-	Cl ₂ H ₂ C-CH ₂ Cl ₂	167,9	3,3	0,7	1,6
1,1,1-Trichlorethan	<u>1,1,1-TCA</u>	Cl ₃ C-CH ₃	133,4	0,87	13,3	1,34
1,1-Dichlorethan	1,1-DCA	Cl ₂ HC-CH ₃	99,0	5,1	24	1,18
1,2-Dichlorethan	1,2-DCA	ClH ₂ C-CH ₂ Cl	99,0	8,5	8,5	1,25
Chlorethan¹	CA	H ₃ C-CH ₂ Cl	62,4	4,5		0,9
Chlormethane						
Tetrachlor-kohlenstoff	<u>TC</u>	CCl ₄	153,8	0,81	11,8	1,59
Chloroform	CF	HCCl ₃	119,4	8,3	20	1,48
Dichlormethan	<u>DCM</u>	H ₂ CCl ₂	84,9	17,0	47	1,33
Chlormethan¹	CM	H ₃ CCl	49,4	7,2	50,1	0,92

TVO-LCKW [40]; Wasserlöslichkeiten, Dampfdruck und Dichte bei 20 °C [34],

¹ [37]² zum Vergleich: Dampfdruck von Wasser bei 20 °C = 2,3 kPa.

Bioverfügbarkeit

In Bodenwasser gelöste LCKW werden sorbiert, wenn der Boden ausreichend organische Substanzen wie Huminstoffe, fossiles Holz, Braunkohle, Wachs-, Harz- und Fettfraktionen enthält. Der Vergleich von drei Böden mit unterschiedlichen Gehalten an organischer Substanz zeigt den Einfluß auf die Sorption von TCE. Bei Gehalten von 11,2 %, 2,2 % und 1,4 % organischem Kohlenstoff wurden 71 %, 45 %, und 39 % TCE sorbiert [8]. Die Festlegung ist reversibel und normalerweise können die LCKW leicht remobilisiert werden.

Bei älteren Schadensfällen und in Langzeitversuchen mit Bodensäulen kann die Geschwindigkeit einer biologischen Umsetzung jedoch durch eine verminderte Verfügbarkeit eingeschränkt sein, auch wenn die Randbedingungen für eine biologische Sanierung gut sind [2; 7; 26; 29]. Bei Residualsättigungen in denen die Desorption im Porenraum erschwert ist, scheint ein Einsatz von Tensiden zur Mobilisierung von LCKW erforderlich zu sein [21]. In kontaminiertem Grundwasser bewirkt die reversible Adsorption einen Chromatographieeffekt, so daß die verschiedenen Stoffe in der Grundwasserfahne unterschiedlich weit transportiert werden [26].

2.1.3.2 Grundmuster des aeroben und des anaeroben Abbaus

Chlorethene sind relativ stabil, und damit sind **abiotisch katalysierte Prozesse** für die Elimination der Stoffe von untergeordneter Bedeutung [34]. Bei den Chlorethanen und den Chlormethanen können abiotische und biologische Prozesse zusammenwirken (s. Kap. 2.1.5 und 2.1.6). Hauptursache für "unerklärliche" Abnahmen während einer biologischen Sanierung ist ein Austrag in den Luftraum. Die während des **biologischen Abbaus** der LCKW bei Dechlorierungsprozessen gebildeten Produkte werden auch als Transformationsprodukte bezeichnet. Die Umsetzungen der LCKW bis hin zu chlorfreien Produkten können unter Abspaltung von HCl auf vier Wegen verlaufen [5; 18; 37] (s. Tab. 2.14):

1. Bei der **reduktiven Dechlorierung** wird cometabolisch oder durch Dehalorespiration (Kap. 2.1.3.3) aus Chlorethenen, Chlorethanen und Chlormethanen anaerob schrittweise Cl abgespalten. Die chlorfreien Endprodukte werden zu CH₄ und/oder CO₂ veratmet.
2. Die **Dehydrodehalogenierung** ist auf Chlorethane beschränkt. Durch biologisch oder abiotisch katalysierte Abspaltung von H⁺ und Cl⁻ im anaeroben Milieu entsteht eine Doppelbindung. Die gebildeten Chlorethene können reduktiv weiter dechloriert werden.
3. Bei der **hydrolytischen Dechlorierung**, die ebenfalls biologisch und abiotisch katalysiert werden kann, werden Chlorethane und Chlormethane durch Anlagerung von Wasser und Abspaltung von HCl zu Alkoholen oxidiert. Dabei können die niedriger chlorierten Verbindungen als Wachstumssubstrate genutzt werden.
4. Bei der **oxidativen Dechlorierung**, die nur aerob und biologisch katalysiert wird, werden die Vertreter aller drei Stoffgruppen - Chlorethene, Chlorethane und Chlormethane - umgesetzt, die nicht vollständig chloriert sind. Dabei unterscheidet sich der einleitende Schritt (Tab. 2.14 und Kap. 2.1.3.5). Aus den Chlorethenen wird ein Epoxid gebildet das spontan zerfällt.

Die für die biologische Sanierung wichtigsten Abbaumechanismen sind im allgemeinen die **anaerobe, schrittweise reduktive** und die **aerobe, oxidative Dechlorierung** (Ab-

weichungen s. Kap. 2.1.5, Chlorethane und Kap. 2.1.6, Chlormethane). Für die anaerobe reduktive Dechlorierung und die aerobe Oxidation der LCKW benötigen die Bakterien spezifische Cosubstrate. Typische Cosubstrate sind in Tab. 2.14 aufgeführt. Die vollständig chlorierten LCKW wie PCE (C_2Cl_2) und TC (CCl_4) werden nur **anaerob** angegriffen (Abb. 2.2), während die Dichlor-Verbindungen **aerob** schneller abgebaut werden als anaerob. Bei der biologischen Sanierung von Schadensfällen mit hochchlorierten LCKW wird daher meist zweistufig, anaerob/aerob, vorgegangen.

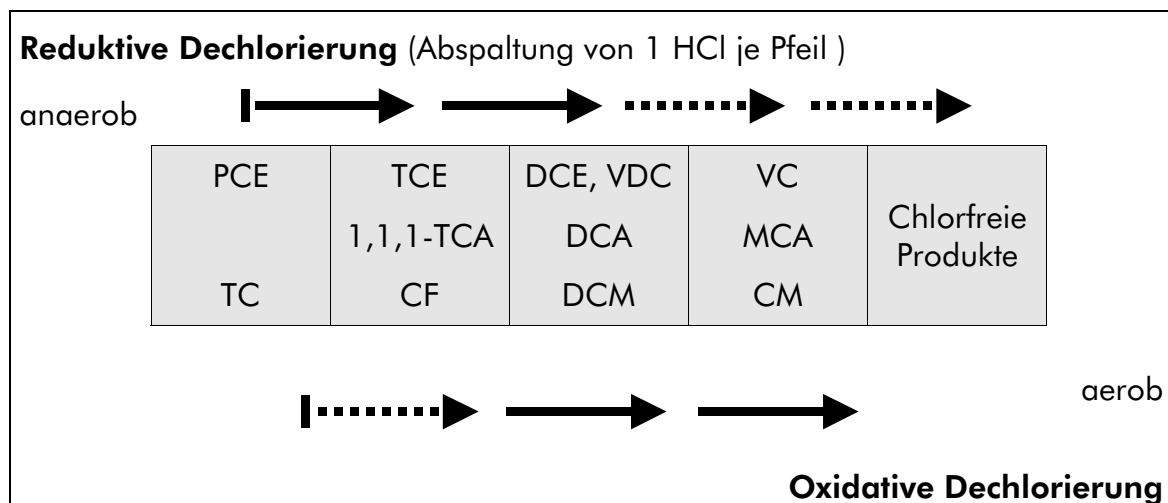
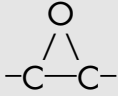


Abb. 2.2: Beziehung zwischen Chlorierungsgrad und den Geschwindigkeiten der Transformation der Chlorethene, Chlorethane und Chlormethane [5; 18; 37].

Anaerob sind bei den Chlorethenen und Chlorethanen Ethen und Ethan Endprodukte der reduktiven Dechlorierung. Sie können weiter zu Methan und CO_2 abgebaut werden. Bei den Chlormethanen ist Methan das erste chlorfreie Produkt. Die reduktive Dechlorierung der hochchlorierten LCKW zu chlorfreien Produkten erfordert normalerweise die Zusammenarbeit von mehreren Bakterienarten, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Stoffwechselleistungen aufeinander angewiesen sind. Ihre Aktivität wird durch den Grad der Anaerobiose, das Angebot an oxidierten Anionen, wie Nitrat und Sulfat, und das Redoxpotential gesteuert.

Aerob werden die meisten LCKW cometabolisch durch Bakterienarten dechloriert, die Enzyme (unspezifische Oxygenasen) besitzen, die gasförmige Alkane, Isopren oder BTEX-Aromaten, aber auch LCKW oxidieren (Beispiele in Kap. 2.1.4.2). DCM und 1,2-DCA können auch als Wachstumssubstrate genutzt werden.

Tab. 2.14: Grundmuster des biologischen Abbaus der Chlorethene, Chlorethane und Chlormethane [5; 18; 37].

Abbaumechanismen					
Reaktionstyp	Reduktive Dechlorierung	Dehydrodehalogenierung	Hydrolytische Dechlorierung	Oxidative Dechlorierung	
		$C-Cl + 2 [H]$ \downarrow $C-H + HCl$	$ClC-CH$ \downarrow $C=C + HCl$	$C-Cl + H_2O$ \downarrow $C-OH + HCl$	$C=C + \frac{1}{2} O_2$ \downarrow 
anaerob	+	+	+	-	
aerob	-	-	+	+	
Stoffe und chlorfreie Produkte	PCE $\rightarrow \rightarrow$ Ethen TCA $\rightarrow \rightarrow$ Ethan TC $\rightarrow \rightarrow$ Methan	— DCA $\rightarrow \rightarrow$ Ethen (+VC)	— DCA $\rightarrow \rightarrow$ CO ₂ TC $\rightarrow \rightarrow$ CO ₂	TCE $\rightarrow \rightarrow$ CO ₂ — —	— TCA $\rightarrow \rightarrow$ CO ₂ CF $\rightarrow \rightarrow$ CO ₂
Cosubstratbedürftigkeit	+	+, -	+, -	+	
Cosubstrate					
Reduktive Dechlorierung	Kohlenhydrate, Aminosäuren, anaerob gebildete Säuren und Alkohole (Lactat, Pyruvat, Fumarat, Ethanol, Methanol, Acetat, Formiat) und H ₂				
Oxidative Dechlorierung	Methanotrophe Bakterien (Schlüsselenzyme: Monooxygenasen) Methan, Ethan, Erdgas, Pentan, Propan, Ethen, Propen, Isopren, Methanol		Aromaten abbauende Bakterien Ammonium-Oxidierer (Schlüsselenzyme: Dioxygenasen) Toluol, Phenol, Isopropylbenzol, Ammonium		

Die Umsetzungen der LCKW können limitiert werden durch:

- die Konzentration von Begleitkontaminanten, z. B. Aromaten (inhibitorische bis toxische Konzentration),
- die Konzentration der LCKW (inhibitorische bis toxische Konzentrationen),
- LCKW in Mischkontaminationen verhindern die Umsetzung anderer LCKW (z.B. PCE/DCM, s. Kap. 2.1.4.1: Hemmeffekte),
- zu niedrige Anzahl der erforderlichen Bakterien (Spezialisten),
- inadäquate Milieubedingungen (Redoxpotential oder Sauerstoffkonzentration),
- qualitativ und/oder quantitativ unzureichendes Angebot an Cosubstraten,
- zu hohe Konzentration inhibitorischer Transformationsprodukte (speziell aerob Chlorethene),
- die Geschwindigkeit des Nachlösens aus der Gasphase: z.B. waren im Gleichgewichtszustand bei einem Verhältnis von wässriger zu Gasphase von 1:9 nur 35 % des cis-DCE und 5,3 % des VC gelöst und damit bioverfügbar [15].

Das gezielte Nutzen der Aktivitäten der Bakterien im Rahmen der Prozeßsteuerung bei der biologischen Sanierung von Schadensfällen mit LCKW (s. Kap. 2.1.4.3, 2.1.5 und 2.1.6, Chlorethene, Chlorethane, Chlormethane) erfordert ein Verständnis der mikrobiologischen Zusammenhänge auf der Basis der im folgenden dargestellten Grundlagen.

2.1.3.3 Anaerober Abbau, Grundlagen

Anaerobe reduktive Dechlorierung der LCKW: LCKW werden im Zuge der anaeroben Atmung reduktiv dechloriert, wobei die Dechlorierung auf zwei Prozessen beruhen kann:

1. **Cometabolische reduktive Dechlorierung:** LCKW werden bei der anaeroben Atmung an Stelle der angestammten Elektronenakzeptoren (Nitrat, Sulfat) als sogenannte "Notelektronenakzeptoren" benutzt.
2. **Dehalorespiration:** LCKW sind hier die angestammten Elektronenakzeptoren für die anaerobe Atmung. Diese durch spezifische Enzyme katalysierte Atmung wurde erst vor kurzem, etwa ab 1995, für mehrere Bakterienarten zweifelsfrei nachgewiesen.

Beide Prozesse sind mit dem Abbau von organischen Substanzen, Cosubstraten, gekoppelt und/oder benötigen Wasserstoff (H_2). Der Wasserstoff wird während des Abbaus von Cosubstraten oder als Folgeprodukt in der anaeroben Stoffwertungskette (s. Kap. 2.1.3.4) gebildet. Er kann aber auch direkt als Gas zudosiert werden. Da bei der Dehalorespiration die LCKW die einzigen Energielieferanten sind, werden durch die dazu befähigten Bakterien mehr LCKW umgesetzt als bei der cometabolischen reduktiven Dechlorierung.

Aerobe und anaerobe Bakterien unterscheiden sich in ihrem Stoffwechsel: Während **aerobe Mikroorganismen** eine organische Substanz gleichzeitig als Kohlenstoff- und Energie-Quelle (C+E) für ihr Wachstum nutzen, können anaerobe Mikroorganismen nicht immer die gleiche organische Substanz als C- und als E-Quelle benutzen. **Obligate und strikt anaerobe Bakterien** benötigen eine organische Substanz oder CO_2 als C-Quelle für ihren Biomasse-

Kohlenstoff, während die Energie für den Stoffwechsel und die Synthese der Biomasse davon unabhängig bei der Energiekonservierung durch Elektronentransfer in gekoppelten Redoxreaktionen geliefert wird.

In der Regel sind bei diesen gekoppelten Redoxreaktionen (s. Abb. 2.3) organische Substanzen Elektronendonoren (e^- -Donor = $\boxed{\text{AH}}$). Als Elektronenakzeptoren (e^- -Akzeptor = $\boxed{\text{B}}$) werden, abhängig vom Redoxpotential, Nitrat, Mangan, Eisen, Sulfat, Fumarat, CO_2 bzw. Carbonat und LCKW benutzt. Die Energie wird durch die Übertragung von Elektronen von $\boxed{\text{AH}}$ auf $\boxed{\text{B}}$ erhalten, indem $\boxed{\text{AH}}$ zu $\boxed{\text{A}}$ oxidiert und $\boxed{\text{B}}$ zu $\boxed{\text{BH}}$ reduziert wird. Zum Beispiel wird PCE ($\boxed{\text{B}}$) unter Abspaltung von Chlor zu TCE ($\boxed{\text{BH}}$) reduziert, wobei andere organische Substanzen als C-Quellen und/oder als Elektronendonoren ($\boxed{\text{AH}}$) benutzt werden. Dieser Prozeß der Energiekonservierung durch Elektronentransfer ($[\text{H}] \rightarrow \text{H}^+ + e^-$), der schematisch in Abb. 2.3 dargestellt ist, wird als **anaerobe Atmung** bezeichnet. Die anaeroben Atmungen werden nach den Elektronenakzeptoren benannt, wie z.B. Nitratatmung, Sulfatatmung, Carbonatatmung, Fumaratatmung und Dehalorespiration.



Redoxpaar 1 wird benötigt	$\boxed{\text{AH}}$ Reduziert $[\text{H}]/e^-$ Donor	+	$\boxed{\text{B}}$ Oxidiert $[\text{H}]/e^-$ Akzeptor
	$-\text{[H]}$ 	\searrow $[\text{H}] \rightarrow \text{H}^+ + e^-$ Energiekonservierung* durch Übertragung von e^- \searrow	$+\text{[H]}$ 
Redoxpaar 2 wird gebildet	$\boxed{\text{A}}$ Oxidiert	+	$\boxed{\text{BH}}$ Reduziert

Abb. 2.3: Grundschemata der Energiekonservierung durch Elektronentransfer bei der Atmung in gekoppelten Redoxreaktionen. *Energiekonservierung während der Weitergabe von Elektronen (e^-) über Zellinhaltsstoffe (Redoxsysteme).

Beteiligte Bakteriengruppen: Die an den Umsetzungen der organischen Nährstoffe beteiligten Bakterien werden nach den bei den Redoxprozessen gebildeten Produkten (Abb. 2.3, Tab. 2.15) unterschieden in

- **Acidogene** (säurebildende) Bakterien ($\boxed{\text{A}}$ bzw. $\boxed{\text{BH}}$), die unterteilt werden in gärende (fermentative) und essigsäurebildende (acetogene) Bakterien (nicht zu verwechseln mit den aeroben Essigsäurebildnern!),
- **Sulfidogene** (sulfatreduzierende = sulfidbildende) Bakterien und
- **Methanogene** (methanbildende) Bakterien

Tab. 2.15: Übersicht über die bei der anaeroben Atmung benutzten und gebildeten Redoxpaare [6; 11; 17; 36].

Bakterien- gruppen	benötigen		bilden		und
	Redoxpaar 1		Redoxpaar 2		
	AH ([H]/e ⁻ Donor)	B ([H]/e ⁻ Akzeptor)	A oxidiert	BH reduziert	
Gärende Bakterien	Zucker, Aminosäuren, Fettsäuren (nach intramolekularer Spaltung)	Zucker, Aminosäuren, Fettsäuren	Alkohole, Säuren, CO ₂	red. C _{org.}	H ₂ O H ₂
	Gärungs- produkte	Fumarat, u.a., CO ₂ , HCO ₃ ⁻	Alkohole, Säuren, CO ₂	red. C _{org.} , Succinat	H ₂ O H ₂
Sulfidogene Bakterien autotroph ²	Fettsäuren, Gärungsprod. H ₂	SO ₄ ²⁻ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S SO ₄ ²⁻	Acetat, CO ₂ H ₂ O	S ²⁻ S ²⁻	H ₂
	Acetogene Bakterien autotroph	Hexosen-[H]	CO ₂ , HCO ₃ ⁻	Acetat	Acetat
Fettsäuren, Gärungsprod.		CO ₂ , HCO ₃ ⁻	Acetat		H ₂ O H ₂
H ₂ , Formiat		CO ₂ , HCO ₃ ⁻	H ₂ O	Acetat	
Methanogene Bakterien autotroph	Acetat, Methanol	CO ₂ , HCO ₃ ⁻	CO ₂	Methan	H ₂ O
	H ₂ , Formiat	CO ₂ , HCO ₃ ⁻	H ₂ O	Methan	

red. C_{org.} reduzierte organische Verbindungen

autotroph: Substrate für autotrophe Bakterien; Formiat: HCOOH → H₂ (**AH**) + CO₂ (**B**);

Wasserstoffbildung: 2H⁺ + 2e⁻ → H₂

Die **gärenden Bakterien** oxidieren Zucker, Amino- und Fettsäuren (**AH**) zu unterschiedlichen Produkten. Die dabei freigesetzten Elektronen (e⁻) werden auf H⁺ übertragen und Wasserstoff wird gebildet (2e⁻ + 2H⁺ → H₂). Nach den Haupt-Endprodukten unterscheidet man folgende Gärungen:

- Gemischte Säuregärung (verschiedene Säuren, fakultativ anaerobe Bakterien)
- Alkoholische Gärung (**Ethanol**)
- Butandiolgärung (**Butandiol + Aceton**)
- Milchsäuregärung (**Lactat**)
- Bernsteinsäuregärung (**Succinat**)

- Buttersäuregärung (**Butyrat**)
- Propionsäuregärung (**Propionat**)
- Essigsäuregärung (**Acetat**)
- Homoacetatgärung (**Acetat ohne Nebenprodukte**)
- Ameisensäuregärung (**Formiat**)
- Methangärung (**Methan**)

Neben den aufgeführten Säureanionen sind im Stoffwechsel noch wichtig:

- **Pyruvat** (Brenztraubensäure) und **Fumarat** (Fumarsäure)

Ein Teil der acidogenen Bakterien ist fakultativ anaerob; d.h. ihr Stoffwechsel ist aerob, solange ausreichend Sauerstoff vorhanden ist. Die sulfidogenen (sulfatreduzierenden) und die methanogenen Bakterien sind dagegen nur anaerob stoffwechselaktiv. Sulfidogene Bakterien benötigen ein Redoxpotential von $E_h < -100$ mV. Bei niedrigen Redoxpotentialen, ab etwa < -300 mV, können Vertreter aller drei Stoffwechselgruppen aktiv sein (s. Kap. 2.4.2.3).

2.1.3.4 Anaerobe Stoffverwertungskette ("Nahrungskette")

Die anaeroben Mikroorganismen sind über die sogenannte "anaerobe Nahrungskette" miteinander verbunden. Dabei werden organische Substanzen in einer **Stoffverwertungskette** (Nomenklatur Prof. SCHINK, Konstanz, mdl. Mitt.) durch die verschiedenen stoffwechselphysiologischen Bakteriengruppen schrittweise abgebaut und dabei als Energiequelle benutzt (Abb. 2.4). Voraussetzung ist eine eingespielte Bakteriengemeinschaft, in der die Bakterien die von ihren Vorgängern als Stoffwechselendprodukte ausgeschiedenen Säuren, Alkohole und H_2 in einer Kaskade so lange als Elektronendonoren (**AH**) nutzen bis die organischen Substanzen zu CH_4 , CO_2 und H_2O abgebaut sind.

Der Begriff der "**Nahrungskette**" wurde in der Mikrobiologie sinntestellend aus der **Ökologie übernommen**. Dort beschreibt er eine Kette sich fressender Organismen, die u.a. zu einer verstärkten Anreicherung von lipophilen Schadstoffen in Topkonsumenten führt.

Am Anfang der Stoffverwertungskette stehen fakultativ anaerobe Bakterien, die eine gemischte Säuregärung oder eine Butandiolgärung durchführen. Sie nutzen die höhermolekularen organischen Substanzen, Kohlenhydrate, Proteine und Fette nach Spaltung in kleinere Untereinheiten als C+E-Quelle. Als Energiequelle werden die Umwandlungsprodukte der organischen Substrate gleichzeitig als [H]- bzw. e^- -Donor (**AH**) und als [H]- bzw. e^- -Akzeptor (**B**) benutzt (Disproportionierung in der Zelle, $[H] \rightarrow H^+ + e^-$). Die nächste Stufe bilden mit abnehmendem Redoxpotential anaerobe, acetogene Bakterien die bei den Gärungen gebildete Alkohole und Säuren (jetzt als **AH**) zu Acetat (**A**) oxidieren. In der letzten Stufe wird das gebildete Acetat (jetzt **AH**) durch methanogene Bakterien zu Methan (**A**) reduziert.

Einige acetogene Bakterien starten schon am Anfang der Stoffverwertungskette: homoacetogene Bakterien können direkt aus Zuckern Acetat als einziges Produkt bilden. Andere acetogene Bakterien oxidieren geradzahlige Fettsäuren direkt zu Acetat bzw. ungeradzahlige zu Acetat und CO_2 (nicht in Abb. 2.4 aufgelistet). Sulfatreduzierende Bakterien können z.T. ein breites Substratspektrum, u.a. Fettsäuren, umsetzen. Als unvollständige Oxidierer bezeichnete Arten oxidieren die organischen Substanzen unter Bildung von H_2 höchstens zu Acetat während die vollständigen Oxidierer als Endprodukt CO_2 bilden. Außerdem können

acetogene, sulfidogene und methanogene Bakterien H_2 als e^- Donor (**AH**) benutzen. Je nach Gruppe werden CO_2 (autotroph), Acetat und/oder Pyruvat (heterotroph) als C-Quellen benutzt (Tab. 2.15).

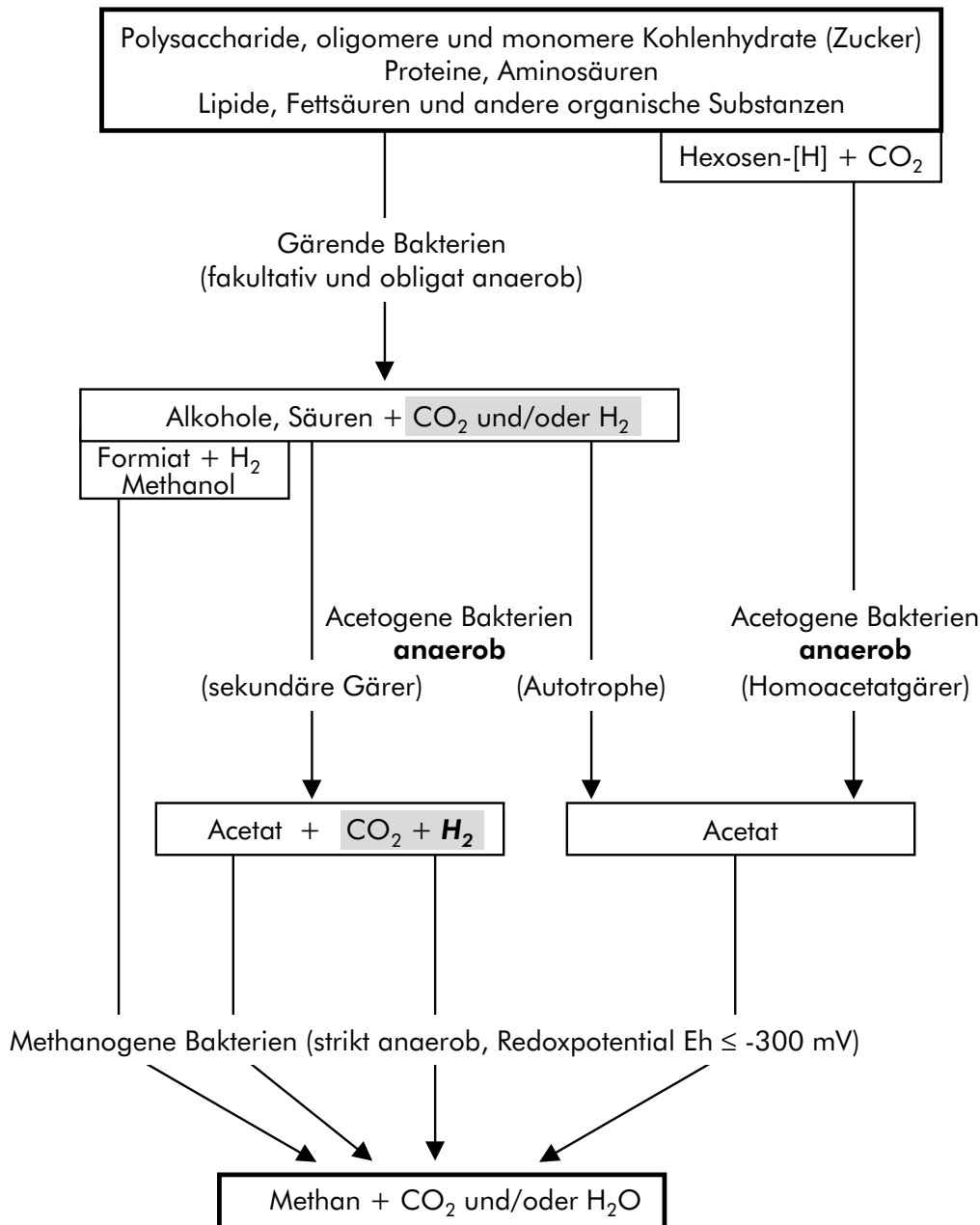


Abb. 2.4: Schema der anaeroben Substratverwertungskette ("Nahrungskette"). Acetogene Bakterien: Essigsäurebildner; **grau unterlegt:** Substrate für autotrophe Bakterien; **H_2 :** muß sofort von anderen Bakterien weiter verwertet werden, da sonst der Abbau der Säuren und Alkohole unterbleibt (Hemmung durch H_2).

Abhängig von den Milieubedingungen konkurrieren die Vertreter dieser Gruppen mehr oder weniger erfolgreich um das produzierte H_2 . Acetogene H_2 -Produzenten und H_2 -konsumierende methanogene Bakterienarten (H_2 , Tab. 2.15) bilden dabei so enge syntrophe (sich gemeinsam ernährende) Bakteriengemeinschaften, daß eine Auftrennung in Reinkulturen für Stoffwechseluntersuchungen sehr schwierig ist. Die sulfidogenen Bakterien sind gegenüber den autotrophen acetogenen und den methanogenen Bakterien im Konkurrenzkampf um H_2 überlegen, da sie eine höhere Affinität zu Wasserstoff haben. Beim Vorhandensein von ausreichenden Mengen Sulfat wird die Methanbildung unterdrückt [6; 11; 16; 17; 20; 36].

Bakterien, die **LCKW** (**B**) anaerob cometabolisch oder durch Dehalorespiration reduktiv dechlorieren können, sind in verschiedenen Stufen der anaeroben Stoffwertungskette angesiedelt. Sie benötigen die Umsetzungsprodukte ihrer Vorgänger als e^- Donoren (**AH**). Bakterien, die andere e^- -Akzeptoren (**B**) als LCKW benutzen, konkurrieren mit den LCKW-cometabolisch-dechlorierenden Bakterien oder den durch Dehalorespiration dechlorierenden Bakterien um die Cosubstrate (**AH**).

Daher müssen bei Sanierungen mehr Cosubstrate dosiert werden, als die für die stöchiometrische Umsetzung der LCKW erforderliche Menge (Abb. 2.4 und Tab. 2.15).

2.1.3.5 Aerober Abbau, Grundlagen

Die nicht vollständig chlorierten LCKW können cometabolisch durch Aliphate, Aromaten und Ammonium oxidierende Bakterien abgebaut werden (Cosubstrate in Tab. 2.14). Die Chlorethene werden aerob, nach dem heutigen Kenntnisstand, bis auf VC [12; 30], nur cometabolisch umgesetzt (s. Kap. 2.1.4.2), während einzelne Chlorethane (s. Kap. 2.1.5.2) und Chlormethane (s. Kap. 2.1.6.3) auch als Wachstumssubstrate genutzt werden.

Aliphate als Cosubstrate

Aliphate verwertende Bakterien sind sehr verbreitet. Isoliert wurden z.B: *Pseudomonas* spp., *Arthrobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Brevibacterium* spp., *Nocardia* spp., Corynebakterien [14] und *Xanthobacter* sp. [33]. Sie besitzen Monooxygenasen und wachsen mit Methan, Bestandteilen von Erdgas (z.B. Ethan, Propan, Butan, Hexan) und Alkenen (Ethen, Propen, 1-Buten, 1,3-Butadien, 1-Penten und Isopren u.a.). Die Monooxygenasen katalysieren dabei den ersten Schritt des Abbaus der LCKW.

Chlorethane und Chlormethane werden mit Sauerstoff zu Alkoholen umgesetzt. Bei Chlorethenen wird als erstes die Doppelbindung unter Bildung eines Epoxids (Chloroxirane) gespalten (Tab. 2.14). **Das Epoxid ist für die meisten Bakterien toxisch**, obwohl es nicht stabil ist. Als Halbwertszeiten für den Zerfall werden 12 sec [14], 21 sec und 77 sec [43] angegeben. Aus dem Epoxid entstehen auf zwei Wegen die chlorierten Analoga der beim Abbau von Ethen [14] gebildeten Produkte, wie hier exemplarisch für TCE gezeigt wird [9; 12; 19; 27; 28; 42]:

- Durch Umlagerung und Oxidation wird aus dem Epoxid Trichloressigsäure gebildet, die zu Trichlorethanol reduziert wird und in Ameisensäure und CF zerfällt.
- Durch Umlagerung entsteht Trichloracetaldehyd, aus dem durch Anlagerung von Wasser Chloralhydrat oder durch Oxidation Glyoxylsäure gebildet wird.

Eine physiologische Gruppe der Aliphate verwertenden Bakterien sind die methylotrophen Bakterien, die nur mit C₁-Aliphaten wachsen. Eine Untergruppe, methanotrophe Bakterien, benutzen ausschließlich Methan und Methanol als C+E-Quelle [4; 17]. **Methanotrophe Bakterien** besitzen zwei Arten von Monooxygenasen [14; 28]:

1. **Lösliche Monooxygenasen (s-MMO)**, die ein breites Spektrum von LCKW oxidieren. Die Geschwindigkeit der Umsetzungen ist unterschiedlich bei den einzelnen LCKW-Gruppen und nimmt innerhalb einer Gruppe mit zunehmendem Chlorierungsgrad ab, wie die Reihenfolge DCM > VC > *cis*- und *trans*-DCE > VDC > TCE > CF und 1,2-DCA zeigt [43].
2. **Partikuläre Monooxygenasen (p-MMO)**, die membrangebunden sind und nur ein eingeschränktes LCKW-Spektrum angreifen. Ein Literaturvergleich zeigte, daß die Umsatzgeschwindigkeiten (V_{\max}) von TCE bei p-MMO und s-MMO in einem Verhältnis von etwa 1:1000 stehen [22]. Eine Ausnahme bilden VC und *trans*-DCE, die in einer methanotrophen Mischkultur durch p-MMO 20mal schneller umgesetzt wurden [1].

Manche Bakterienarten bilden nur p-MMO aus. Andere Arten synthetisieren in kupferarmen Medien s-MMO und in kupferreicheren Medien p-MMO. Für einen typischen Vertreter dieser Gruppe, *Methylosinus trichosporium* OB 3b, ein Modellbakterium für Untersuchungen des Stoffwechsels und des Spektrums der umgesetzten LCKW, wurden als Schwellenwerte < 1,6 mg Cu²⁺/l [41] und 160 µg Cu²⁺/l gefunden [22]. In nicht mit Schwermetallen belastetem Grundwasser können die Cu²⁺ Konzentrationen zwischen 10 µg/l und 200 µg/l liegen [22]. Aus Grundwasser, das mit PCE und TCE belastet war, wurden mit Methan als Substrat 25 methanotrophe Stämme isoliert, von denen die meisten s-MMO Aktivität aufwiesen [3].

Da Schadensfälle häufig mit Schwermetallbelastungen verbunden sind, muß die Kupferkonzentration des Probenmaterials und - im kritischen Bereich - ihr Einfluß auf die Umsetzung der LCKW geprüft werden, wenn der Einsatz von Methan als Sanierungsmaßnahme erwogen wird.

Aromaten als Cosubstrate (Toluol, Cumol, Phenol)

Die Kopplung von aerobem LCKW- und Aromatenabbau wurde 1986/1987 erstmalig festgestellt. Aus einer mit TCE belasteten Grundwasserprobe wurde ein strikt aerobes Bakterium isoliert, das 60 % des ¹⁴C-TCE mit Phenol zu ¹⁴CO₂ abbaute [24; 25]. Bei dieser Art des aeroben Abbaus von LCKW dienen die Aromaten als Wachstumssubstrate. Die zur initialen Oxidation der Aromaten gebildeten Mono- oder Dioxygenasen können auch LCKW oxidieren. Allerdings ist die Fähigkeit zum Abbau von Phenol oder Toluol nicht automatisch mit einer cometabolischen Umsetzung von TCE gekoppelt, wie für TCE gezeigt wurde. Von 273 isolierten Bakterienstämmen, die Toluol und/oder Phenol verwerteten, oxidierten nur rd. 60 % auch TCE [10].

Ammonium als Cosubstrat

Autotrophe, nitrifizierende Bakterien gewinnen ihre Energie bei der Oxidation von Ammonium zu Nitrit durch Ammonium-Monooxygenasen (**AMMO**). Die AMMO des typischen Vertreters dieser Gruppe, *Nitrosomonas europaea*, oxidiert auch TCE, *cis*-DCE, VC, 1,1,1-TCA, 1,1,2-TCA und CF, aber kein DCM [44]. Nach ihren Reaktionen mit AMMOs lassen sich die LCKW in drei Gruppen unterteilen [31]:

1. LCKW, die nicht umgesetzt werden (PCE, TC),
2. LCKW, bei denen die Zellen in Abhängigkeit von der umgesetzten Menge inaktiviert werden und
3. LCKW, die nicht bzw. kaum inhibitorisch wirken (MCA, DCA, CM).

Anscheinend sind nitrifizierende Bakterien den methanotrophen Bakterien nur bei niedrigeren Temperaturen überlegen. Mit Methan als Cosubstrat wurden bei 24 °C 53 % und bei 12 °C nur 5 % des TCE mineralisiert ($^{14}\text{CO}_2$), während mit Ammonium 63 % und 12 % des TCE mineralisiert wurden [23]. Nitrifizierer vermehren sich nur langsam und sind normalerweise keine besonders geeigneten Kandidaten für biologische Sanierungen von Schadensfällen mit LCKW.

2.1.3.6 Literatur

1. **Anderson, J. E., and P. L. McCarty.** 1997. Transformation yields of chlorinated ethenes by a methanotrophic mixed culture expressing particulate methane monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:687-693.
2. **Böckle, K.** 1998. Praxisorientierte Untersuchungen zur mikrobiellen reduktiven Dechlorierung von leichtflüchtigen chlorierten Kohlenwasserstoffen (LCKW). Dissertation, TU Dresden, 140 Seiten.
3. **Bowman, J. P., L. Jimenez, I. Rosario, T. C. Hazen, and G. S. Sayler.** 1993. Characterization of the methanotrophic bacterial community present in a trichloroethylene-contaminated subsurface groundwater site. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2380-2387.
4. **Brock, T. D.** 1997. *Biology of microorganisms*. 8. ed. M. T. Madigan, J. M. Martinko, and J. Parker Eds. pp. 666-670.
5. **DGMK-Forschungsbericht 461-01.** 1991. Mikrobieller Abbau von Kohlenwasserstoffen und Kohlenwasserstoffverbindungen. Bearbeiter Witt, D. 95 Seiten.
6. **Diekert, G.** 1997. Grundmechanismen des Stoffwechsels und der Energiegewinnung. In: *Umweltbiotechnologie*. J., C., G. Ottow und W. Bidlingmaier Hrsg. G. Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm pp. 1-38.
7. **Einsele, G., G. Eisele und P. Grathwohl.** 1988. Verteilung und Ausbreitung von leichtflüchtigen chlorierten Kohlenwasserstoffen (LCKW) im System Boden-Wasser-Luft. *DGM* **32**:102-107.
8. **Fan, S., and K. M. Scow.** 1993. Biodegradation of trichloroethylene and toluene by indigenous microbial populations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1911-1918.
9. **Fogel, M. M., A. R. Taddeo, and S. Fogel.** 1986. Biodegradation of chlorinated ethenes by a methane-utilizing mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**:720-724.
10. **Fries, M. R., L. J. Forney, and J. M. Tiedje.** 1997. Phenol and toluene-degrading microbial populations from an aquifer in which successful trichloroethene cometabolism occurred. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1523-1530.

11. **Gottschalk, G.** 1986. Bacterial metabolism. 2. ed. Springer, New. York, 359 pp.
12. **Hartmans, S., and J. A. M. de Bont.** 1992. Aerobic vinyl chloride metabolism in *Mycobacterium aurum* L. Appl. Environ. Microbiol. **58**:1220-1226.
13. **Hettler, A. und W. Stahl.** 1997. Grundwasserschadensfälle in den alten Bundesländern. In: 12. DECHEMA-Fachgespräch Umweltschutz: Möglichkeiten und Grenzen der Reinigung kontaminierter Grundwässer, Seite 71-78.
14. **Hou, C. T., P. Patel, A. Laskin, N. Barnabe, and I. Barist.** 1983. Epoxidations of short-chain alkenes by resting-cell suspensions of propane-grown bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **46**:171-177.
15. **Koziollek, P., D. Bryniok, and H.-J. Knackmuss.** 1999. Ethene as an auxiliary substrate for the cooxidation of cis-1,2-dichloroethene and vinylchloride. Arch. Microbiol. **172**: 240-246.
16. **Krumholz, L. R., S. H. Harris, S. T. Tay, and J. M. Suflita.** 1999. Characterization of two subsurface H₂-utilizing bacteria, *Desulfomicrobium hypogeium* sp. nov. and *Acetobacterium psammolithicum* sp. nov., and their ecological roles. Appl. Environ. Microbiol. **65**:2300-2306.
17. **Lexikon der Biochemie.** 1995. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
18. **LFU, Materialien zur Altlastensanierung.** 1991. Handbuch Mikrobiologische Bodenreinigung. Bearbeiter Geller, A., Brauch, H. J., Werner, P., Berberich, G. Hrsg. Landesanstalt für Umweltschutz Baden Württemberg, Karlsruhe, 233 Seiten.
19. **Little, C. D., A. V. Palumbo, S. E. Herbes, M. E. Lidstrom, R. L. Tyndall, and P. J. Gilmer.** 1988. Trichloroethylene biodegradation by a methane-oxidizing bacterium. Appl. Environ. Microbiol. **54**:951-956.
20. **Löffler, F. E, J. M. Tiedje, and R. A. Sanford.** 1999. Fraction of electrons consumed in electron acceptor reduction and hydrogen thresholds as indicators of halorespiratory physiology. Appl. Environ. Microbiol. **65**:4049-4056.
21. **Löffler, F. E, J. M. Tiedje, B. Z. Fathepure, K. F. Hayes, L. M. Abriola, K. D. Pennell, and P. Adriaens.** 1998. Remediation of chlorinated solvents at the Bachman road site using innovative technologies. In: Workshop "Abbau chlorierter Kohlenwasserstoffe", 28. Und 29 Sept. Fraunhofer-Institutszentrum Stuttgart, Nr. 14, pp. 1-6.
22. **Lontoh, S., and J. D. Semrau.** 1998. Methane and trichloroethylene degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing particulate methane monooxygenase. Appl. Environ. Microbiol. **64**:1106-1114.
23. **Moran, B. N., and W. J. Hickey.** 1997. Trichloroethylene biodegradation by mesophilic and psychrophilic ammonia oxidizers and methanotrophs in groundwater microcosms. Appl. Environ. Microbiol. **63**:3866-3871.
24. **Nelson, M. J. K., S. O. Montgomery, W. R. Mahaffey, and P. H. Pritchard.** 1987. Biodegradation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradative pathway. Appl. Environ. Microbiol. **53**:949-954.

25. **Nelson, M. J. K., S. O. Montgomery, E. J. O'Neill, and P. H. Pritchard.** 1986. Aerobic metabolism of trichloroethylene by a bacterial isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:383-384.
26. **Nerger, M.** 1990. Leichtflüchtige Chlorkohlenwasserstoffe im Grundwasser pleistozäner Lockersedimente. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene Nr. 84, Hrsg. R. Leschber und E. Lahmann, 173 Seiten.
27. **Newman, L. M., and L. P. Wackett.** 1991. Fate of 2,2,2-trichloroacetaldehyde (chloral hydrate) produced during trichloroethylene oxidation by methanotrophs. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2399-2402.
28. **Oldenhuis, R., R. L. J. M. Vink, D. B. Janssen, and B. Witholt.** 1989. Degradation of chlorinated hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing soluble methane monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2819-2826.
29. **Pavlostathis, S. G., and Ping Zuhuang.** 1993. Reductive dechlorination of chloroalkenes in microcosms developed with a field contaminated soil. *Chemosphere* **27**:585-595.
30. **Phelps, T. J., K. Malachowsky, R. M. Schram, and D. C. White.** 1991. Aerobic mineralization of vinyl chloride by a bacterium of the order Actinomycetales. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1252-1254.
31. **Rasche, M. E., M. R. Hyman, and D. J. Arp.** 1991. Factors limiting aliphatic chlorocarbon degradation by *Nitrosomonas europaea*: Cometabolic inactivation of ammonia monooxygenase and substrate specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2986-2994.
32. **Rat von Sachverständigen für Umweltfragen.** 1989. Altlasten. Sondergutachten. Metzler-Poeschel Verlag Stuttgart, 304 Seiten.
33. **Reij, M. W., J. Kieboom, J. A. M. de Bont, and S. Hartmans.** 1995. Continuous degradation of trichloroethylene by *Xanthobacter* sp. strain Py2 during growth on propene. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2936-2942.
34. **Rippen, G.** Handbuch Umweltchemikalien. Loseblattsammlung, ecomed Verlag, Landsberg/Lech.
35. **Römpf Lexikon Umwelt.** 1993. Hrsg. H. Hulpke. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
36. **Schlegel, H. G.** 1993. Allgemeine Mikrobiologie. 7te Aufl., Thieme Verlag Stuttgart, New York, 571 Seiten.
37. **Schmidt, B.** 1988. Leichtflüchtige Chlorkohlenwasserstoffe im Untergrund. Literaturstudie, 2. Aufl., Lehrstuhl für angewandte Geologie, Universität Karlsruhe, 117 Seiten.
38. **Schwille, F.** 1984. Leichtflüchtige Kohlenwasserstoffe in porösen und klüftigen Medien - Modellversuche -. Bes. Mitt. Dt. gewässerkdl. Jb. **46**, Koblenz, 72 Seiten.
39. **Toussaint, B.** 1989. Möglichkeiten und Grenzen der Aussagefähigkeit von Boden-, Bodenluft- und Grundwasserproben im Zusammenhang mit CKW-Schadensfällen. DGM **33**:150-160.
40. **Trinkwasserverordnung IX-4 (TVO).** 1991. Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe, zuletzt geändert am 1. April 1998, BGBl.

41. **Tsien, H-C, G. A. Brusseau, R. S. Hanson, and L. P. Wackett.** 1989. Degradation of trichloroethylene by *Methylosinus trichosporium* OB3b. Appl. Environ. Microbiol. **55**:3155-3161.
42. **Uchiyama, H., T. Nakajima, O. Yagi, and T. Nakahara** 1992. Role of heterotrophic bacteria in complete mineralization of trichloroethylene by *Methylocystis* sp. strain M. Appl. Environ. Microbiol. **58**:3067-3071.
43. **van Hylckama Vlieg, J. E. T., W. de Koning, and D. B. Janssen.** 1996. Transformation kinetics of chlorinated ethenes by *Methylosinus trichosporium* OB3b and detection of unstable epoxides by on-line gas chromatography. Appl. Environ. Microbiol. **62**:3304-3312.
44. **Vannelli, T., M. Logan, D. M. Arciero, and A. B. Hooper.** 1990. Degradation of halogenated aliphatic compounds by the ammonia-oxidizing bacterium *Nitrosomonas europaea*. Appl. Environ. Microbiol. **56**:1169-1171.

2.1.4 Chlorethene

Annette Geller

Die Bedingungen für den anaeroben und den aeroben Abbau der Chlorethene mit ihren Möglichkeiten und Grenzen wurden in den letzten 10 Jahren in Hinblick auf die praktische Nutzung der Prozesse verstärkt untersucht. Auch in der Sanierungspraxis bildete diese Stoffgruppe einen Schwerpunkt bei Pilot- und F+E-Projekten. Es wurden Reinkulturen isoliert die PCE, das nur anaerob angegriffen wird, zu *cis*-DCE dechlorieren und Mischkulturen angereichert, die PCE vollständig dechlorieren. Aerob nahm die Zahl der Untersuchungen zu, die mit TCE als Modellsubstanz zeigten, daß der oxidative Abbau der Chlorethene mit verschiedenen Handicaps verbunden ist, die eine praktische Umsetzung erschweren können.

2.1.4.1 Anaerober Abbau

Anaerob werden die Chlorethene von Bakterien als Elektronenakzeptoren (e^- -Akzeptor **[B]**, s. Kap. 2.1.3.3) benutzt und durch schrittweise, reduktive Abspaltung von Chloratomen transformiert ($[B]-Cl_x \rightarrow [BH]-Cl_{x-1} + Cl^- \rightarrow$ usw.). Dabei können sie entweder neben anderen oxidierten Substanzen als "Notelektronenakzeptoren" dienen, oder sie sind die einzigen benutzbaren Elektronenakzeptoren (Dehalorespiration). Die Dehalorespiration ist der effizientere Prozeß, da sie gezielt abläuft. In beiden Fällen wird ein e^- -Donor (**[AH]**) benötigt, der durch Zugabe eines Cosubstrates geliefert wird. Die anaerobe, reduktive Dechlorierung der Chlorethene ist unter verschiedenen Milieubedingungen und mit unterschiedlichen Cosubstraten möglich (s. Tab. 2.16, 2.17 und 2.18). Während der biologischen Transformation werden u.U. aus TCE abiotisch kleine Mengen *trans*-DCE und VDC gebildet [31; 32; 41; 57] (Abkürzungen s. Tab. 2.13, Kap. 2.1.3).

Methanogene Bedingungen

Aufgrund der Ergebnisse erster Untersuchungen der anaeroben Dechlorierung der Chlorethene unter definierten Bedingungen nahm man bis etwa 1988 an, daß nur strikt anaerobe Bakterien unter methanogenen Bedingungen, d.h. bei einem Redoxpotential $E_h < -300$ mV PCE zu TCE oder *cis*-DCE dechlorieren können. Dabei wurde impliziert, daß die Methanbildung die Voraussetzung für die **reduktive Dechlorierung** ist. Als Endprodukte wurden TCE, *cis*-DCE, VC und Ethen nachgewiesen (Tab. 2.16). Untersuchungen mit einem methanogenen Bakterien-Stamm (*Methanosarcina sp.*) zeigten 1988, daß PCE statt CO_2 als e^- Akzeptor benutzt werden kann und unter Abspaltung von Cl^- reduktiv dechloriert wird [15]. Daraus wurde gefolgert, daß PCE und TCE unter methanogenen Bedingungen als "Notelektronenakzeptoren" dienen. Weitere Untersuchungen ergaben, daß LCKW auch unter nicht-methanogenen Bedingungen als e^- -Akzeptoren dienen können.

Tab. 2.16: Reduktive Dechlorierung der Chlorethene unter methanogenen Bedingungen

Untersuchungs-material	Temp. [°C]	Cosubstrat	Umsetzung	CO ₂ [%]	CH ₄	Lit.
Belebtschlamm	30-35	Acetat	PCE: Abnahme	n.b.	n.b.	[8]
<i>daraus:</i> Mischkultur	22	Acetat	PCE → TCE + <i>cis</i> + VC	12-24	n.b.	[78]
Methanogenes Consortium	37	Acetat, Methanol	PCE → TCE + n.b.	n.b.	n.b.	[16]
<i>daraus:</i> <i>Methanosarcina sp.</i>	37	Acetat, Methanol	PCE → TCE	n.b.	+	[15]
Belebtschlamm aus Tierkörperbeseitigung	21	BSB	PCE* → 0,2 % VC + 99 % Cl-freie Prod.	n.b.	n.b.	[57]
Anreicherungskultur Stufe 1	20	Saccharose	PCE* → <i>cis</i> → ETH		+	[6]
Stufe 2	26		PCE → ETH		+	
Belebtschlamm	35	Glucose	PCE → 90 % VC + 10 % ETH	+	+	[20]
		Methanol	PCE → 50 % VC + 50 % ETH	+	+	
		H ₂	PCE → 90 % VC + 4 % ETH	n.b.	n.b.	

Cosubstrat: Energiequelle (Elektronendonator) und/oder Kohlenstoff-Quelle;

* PCE wurde schnell zu *cis*-DCE dechloriert, das erst später weiter transformiert wurde.

ETH: Ethen; n.b.: nicht bestimmt; *cis*: *cis*-DCE; BSB: als biologischer Sauerstoffbedarf (BSB) bestimmte organische Substanz.

Nicht-methanogene Bedingungen

In frühen, schlecht definierten Untersuchungen mit sog. "Mikrokosmen" wurde unter nicht methanogenen Ausgangsbedingungen die Dechlorierung von TCE zu *cis*-DCE [5; 17; 63] bzw. VC [5; 33] festgestellt (Tab. 2.17). Ab 1990 nahm die Zahl der Untersuchungen zu, in denen die nicht mit Methanbildung verbundene, reduktive Dechlorierung von PCE zu *cis*-DCE, VC oder chlorfreien Produkten, Ethen und Ethan, nachgewiesen wurde. Aus Mischkulturen wurden später Bakterienstämme isoliert, die PCE zu *cis*-DCE dechlorieren, und es konnten Enzyme isoliert werden, die diese Reaktion katalysieren. Dabei wurde die Fähigkeit zur **Dehalorespiration** für einige Bakterienstämme zweifelsfrei bewiesen. Die in Tabelle 2.18 aufgeführten Cosubstrate zeigen das Spektrum der in den Untersuchungen verwendeten Elektronendonoren.

Bedingungen: PCE wird unter sulfatreduzierenden Bedingungen reduktiv dechloriert. In Mischkulturen waren *cis*-DCE oder Ethen Endprodukte (Tab. 2.17, Teil A). Auch Bakteriengemeinschaften aus aerobem, LCKW kontaminiertem Milieu dechlorierten PCE zu *cis*-DCE

nach Sauerstoffzehrung parallel mit dem Einsetzen der Sulfatreduktion bzw. nach Sauerstoff- und Nitratzehrung, ohne daß Methan produziert wurde (Tab. 2.17, Teil B). Diese Ergebnisse lassen sich durch das Zusammenwirken der aeroben bzw. fakultativ anaeroben und der obligat anaeroben Mikroorganismen im Untersuchungsmaterial erklären, die nacheinander das für die dechlorierenden Bakterien erforderliche Milieu schaffen (s., Kap. 2.1.3.4: Anaerobe Stoffverwertungskette = "Nahrungskette").

Tab. 2.17: Reduktive Dechlorierung der Chlorethene unter nicht-methanogenen Bedingungen

Untersuchungs- material	Cosubstrat	Umsetzung	Bemerkungen	Lit.
A: unter sulfatreduzierenden Bedingungen				
Sulfidogene Kultur	Lactat	PCE → <i>cis</i>	BES inhibierte die Umsetzung (s.u.: Hemmeffekte)	[4]
Mischkultur aus Sediment	Benzoat	PCE→ETH	Anreicherungskultur mit SO ₄ ²⁻	[74]
Mischkultur aus Bodenprobe	Ethanol + Hefeextrakt	PCE → <i>cis</i>		[6]
<i>Desulfobacterium</i> sp.	H ₂ , Lactat	PCE→TCE		[14]
B: bei Versuchsbeginn aerob (nach Zehrung von Sauerstoff und Nitrat)				
Anreicherungskultur aus Belebtschlamm	CSB	PCE → <i>cis</i>	<u>Einsetzen der red. Dechlor.:</u> ab Eh -150 mV, SO ₄ ²⁻ → S ²⁻ (CH ₄ nicht nachweisbar)	[31] [33]
Mischkultur aus kontaminiertem Grundwasser	Acetat Lactat Ethanol Glycerin	PCE → <i>cis</i>	<u>Einsetzen der red. Dechlor.:</u> nach Zehrung von O ₂ , NO ₃ ⁻ (S ²⁻ , CH ₄ nicht nachweisbar)	[30]
fakultativ anaerober <i>Enterobacter</i> sp. aus Sediment unter sulfatreduzierenden Bedingungen	Formiat Acetat Lactat Pyruvat Glucose Aminosäuren Hefeextrakt	PCE → <i>cis</i>	<u>Einsetzen der red. Dechlor.:</u> nach Zehrung von O ₂ , NO ₃ ⁻ und den hohen Startkonzentrationen von Glucose und Aminosäuren	[74]

Cosubstrat: Energiequelle (Elektronendonator) und/oder Kohlenstoff-Quelle; *cis*: *cis*-DCE;
CSB: organische Belastung bestimmt als chemischer Sauerstoffbedarf (CSB);

Ein Bakterien-Stamm kann dieses Pensum auch allein bewältigen, wie Untersuchungen mit einem fakultativ anaeroben *Enterobacter sp.* zeigen (Tab. 2.17, Teil B), der sich flexibel an das Nährstoffangebot anpaßt: Solange Sauerstoff und Nitrat vorhanden waren, veratmete der Stamm Glucose und Aminosäuren. Danach ging er zu der weniger Energie liefernden Gärung über. Die Gärungsprodukte nutzte er weiter als e^- -Donoren und dechlorierte PCE zu *cis*-DCE.

Neueste Untersuchungen zeigen, daß **Huminstoffe** ebenfalls an der anaeroben Dechlorierung von VC beteiligt sein können [9]. Hier ist VC jedoch e^- -Donor und die Huminstoffe dienen als e^- -Akzeptoren (s. Abb. 2.3, Kap. 2.1.3.3). Bei diesem Prozeß, dessen ökologische Bedeutung noch unklar ist, wird VC mit 91 % in 50 d schneller zu CO_2 ($^{14}CO_2$) oxidiert als ohne Huminstoffe (39 % in 50 d).

Reduktive Dechlorierung in Reinkulturen und in Mischkulturen

Reinkulturen dechlorieren PCE als "Notelektronenakzeptor" häufig nur zu TCE, wie ein Vergleich verschiedener Stämme zeigte [74]. Bei Reinkulturen, die PCE bei der Dehalorespiration als Elektronenakzeptor nutzen, ist mit Ausnahme eines Stammes [48] *cis*-DCE das Endprodukt (Tab. 2.18). Durch Consortien (Mischkulturen, Bakteriengemeinschaften) wird PCE normalerweise schneller und/oder weitgehender dechloriert als von daraus isolierten Reinkulturen. Im allgemeinen sind hier unspezifische organische Nährstoffe längerfristig vorteilhafter für die Abbauleistungen als die selektiv auf die Zusammensetzung der Bakteriengemeinschaften wirkenden, spezifischen Cosubstrate Acetat, Formiat und H_2 (s. Tab. 2.16 - 2.18).

In Untersuchungsmaterialien aus über längere bis lange Zeit mit Chlorethenen belasteten Arealen wird PCE relativ schnell umgesetzt, wobei die Dechlorierung in zwei Fällen vorübergehend auf der Stufe des *cis*-DCE stagnierte [6; 57] (Tab. 2.16). Der Schwellenwert für die Transformation von PCE lag bei $74 \mu g/l$ ($0,48 \mu M$) [6]. Labor-Mischkulturen, die PCE vollständig in chlorfreie Produkte umwandeln, stammen meist aus Säulen, die über längere Zeiträume, bis zu Jahren, mit PCE betrieben wurden. Aus einer über mehrere Jahre PCE-adaptierten, anaeroben Mischkultur (Tab. 2.17, Teil A [74]) wurden z.B. mit VC und einem Cocktail aus Acetat, Hefeextrakt, H_2 , CO_2 , HCO_3^{2-} und Na_2S in ihr enthaltene Bakterien angereichert, deren Zellextrakte *cis*-DCE und VC zu Ethen dechlorierten. PCE wurde nicht und TCE nur langsam umgesetzt [69].

Die Bedeutung der Zusammensetzung und des Zusammenspiels von Bakteriengemeinschaften für den Grad der Umsetzung von LCKW zeigen zwei der in Tab. 2.18 aufgeführten Untersuchungen:

1. Aus einem methanogenen Belebtschlamm ("waste activated sludge" [20], Tab. 2.16), der PCE bestenfalls zu 50 % VC und 50 % Ethen dechlorierte, wurde mit Methanol als Cosubstrat eine acetogene Mischkultur angereichert, die PCE quantitativ zu Ethen dechlorierte. Die Mischkultur verlor diese Fähigkeit innerhalb von 40 Tagen, wenn sie nur mit Wasserstoff als Energielieferant inkubiert wurde, und VC war Endprodukt. Zwischen 40 und 90 Tagen verhungerten weitere Bakteriengruppen, und es wurde nur noch TCE gebildet. Wenn die einzig mit Wasserstoff versorgten Bakterien dagegen alle 30 Tage das Kulturfiltrat eines mit Methanol gefütterten Ansatzes erhielten, blieb die Fähigkeit, Ethen zu bilden, erhalten. Das bedeutet, daß die mit Methanol gewachsene, vollständige Gemeinschaft Stoffe produzierte, die von den auf H_2 -Diät gesetzten dechlorierenden Bakterien unbedingt zum Überleben benötigt wurden [13]. Andere Untersuchungen lassen darauf schließen, daß dieses Phänomen keine Ausnahme ist.

- Die Bedeutung der Zusammensetzung von Mischkulturen zeigen auch Untersuchungen mit Klärschlammgranulat und Rheinsediment in einer Festbettsäule. Die in der Säule mit Klärschlammgranulat enthaltenen Bakterien konnten PCE nur zu *cis*-DCE dechlorieren. In der Säule, die nur Rheinsediment enthielt wurden *cis*-DCE und etwas VC gebildet. Im Gemisch von Rheinsediment und Klärschlammgranulat war Ethan das Endprodukt [11]. Aus den Mischkulturen wurden ein Stamm, der PCE durch Dehalorespiration reduktiv zu *cis*-DCE dechloriert und das entsprechende Enzym isoliert (s. Tab. 2.18).

Temperaturbedürfnisse

Die meisten Untersuchungen wurden bei, für die Sanierungspraxis hohen und *in situ* irrelevanten, Standardtemperaturen durchgeführt (s. Tab. 2.18). Für methanogene Bakterien, die die Wärme lieben, liegen diese Temperaturen im Bereich des Optimums. Für die übrigen Gruppen stellt sich die Frage: Wie warm müssen und wie kalt dürfen diese Bakterien es haben, um noch wirkungsvoll agieren zu können? Systematische Untersuchungen zum Einfluß der Temperatur auf die Geschwindigkeit der Umsetzung von Chlorethenen gibt es kaum. Die Befunde in Tab. 2.19 zeigen, daß PCE auch bei niedrigen Temperaturen transformiert werden kann. Die Untergrenze für meßbare Umsetzungen scheint im Bereich von 10 °C zu liegen. Für das Erreichen von max. Umsatzgeschwindigkeiten sind Temperaturen über 20 °C erforderlich.

Da ein Aufheizen bei Sanierungsverfahren die Betriebskosten steigert, sollte die Temperaturabhängigkeit des Abbaus in Hinblick auf die Optimierung des Verhältnisses von Kosten zu Nutzen geprüft werden. Des weiteren ist zu berücksichtigen, daß höhere Temperaturen nicht nur den Stoffwechsel beschleunigen, sondern auch einen Selektionsdruck auf die Bakterien des Standortes ausüben. Dabei besteht die Gefahr, daß für die Umsetzung der Chlorethene wichtige Glieder der Bakteriengemeinschaft (Kap. 2.1.3.4) unterdrückt oder eliminiert werden.

Hemmeffekte

Im Rahmen von Untersuchungen zum Abbau von PCE wurden verschiedene Hemmeffekte festgestellt, die auch bei biologischen Sanierungen wichtig sein können.

- PCE kann in erhöhten Konzentrationen die Methanogenese und damit verbunden eine reduktive Dechlorierung durch methanogene Bakterien hemmen [6; 13].
- VC kann die Transformation von PCE hemmen [12].
- Die Chlormethane TC, CF und DCM und 1,1,1-Trichlorethan können als Co-Kontaminanten, abhängig von ihrer Konzentration, die Dechlorierung von PCE und *cis*-DCE verlangsamten bzw. unterbinden (s. u.a. [72; 74]).
- Toluol und Xylole wirkten als Co-Kontaminanten bei einer Summenkonzentration von 202 mg/l inhibitorisch [6].
- In der anaeroben Nahrungskette unterbleibt die reduktive Dechlorierung nach den vorliegenden Ergebnissen so lange noch Sauerstoff und Nitrat vorhanden sind [30; 31; 74]. Zu hohe anfängliche Sauerstoffkonzentrationen können toxisch wirken, so daß selbst nach Zehrung von Sauerstoff und Nitrat PCE nicht mehr umgesetzt wurde.
- Bromethansulfonat (BES) wird als Inhibitor der Methanogenese benutzt um zu klären, ob PCE durch methanogene oder nicht-methanogene Bakterien transformiert wird (s. u.a. [4; 6]). In neuerer Zeit wurde jedoch gezeigt, daß BES kein zuverlässiger Indikator ist, da es auch die Umsetzung von PCE durch nicht-methanogene Bakterien hemmen kann [43].

Tab. 2.18: Reduktive Dechlorierung der Chlorethene unter anaeroben, nicht-methanogenen Bedingungen

Untersuchungs-material	Temp. [°C]	Cosubstrat	Umsetzung	Bem.	Lit.
Belebtschlamm	(methanogen, siehe Tabelle 2.16)				[20]
daraus: Anreich.-kultur	35	Methanol	PCE → 99 % Cl-freie Prod.	⇒ CH ₄	[12]
daraus: Anreich.-kultur	35	H ₂	PCE → ETH nach 14 d PCE → VC nach 40 d PCE → TCE 41 - 90 d	⇒ CH ₄	[13]
daraus: Dehalococcoides ethenogenes	35	H ₂	PCE → 100 % VC → ETH	Dehalo- respira- tion	[48] [49]
daraus: Enzyme	35	Methanol	PCE/TCE → cis TCE → ETH	Dehalogenase I Dehalogenase II	[44]
Klärschlamm- granulat	20	Lactat	PCE → cis		[11]
+ Rheinsediment	20	Lactat H ₂	PCE → Ethan PCE → Ethan		[11]
daraus: Dehalobacter restrictus	25-35	H ₂ oder Formiat	PCE → cis	Dehalo- respira- tion	[28] [85]
daraus: Enzym			PCE/TCE → cis		[83]
Aquifermaterial aus GW-Schadensfall		Lactat Propionat Ethanol	PCE → cis	Acetat, Metha- nol ⇒	[23]
Aquifermaterial aus GW-Schadensfall		Acetat Lactat	PCE → cis		[42]
Isolat	21-24	Pyruvat Acetat	PCE → cis; altern. e ⁻ -Akzeptor: Fumarat	NO ₃ ⁻ ⇒ SO ₄ ²⁻ ⇒	[37]
Isolat Dehalospirillum multivorans	30	Ethanol Lactat Pyruvat	PCE → cis	Dehalo- respira- tion	[71]
daraus: Enzym		Glycerin	PCE → cis		[59]

Dehalorespiration: Wachstum ausschließlich mit CKW als Elektronenakzeptoren, H₂ oder Formiat dienen als Elektronendonoren und Acetat als C-Quelle;
Cosubstrat: Energiequelle (Elektronendonator) und/oder Kohlenstoff Quelle;
ETH: Ethen; ⇒ keine Umsetzung bzw. Bildung.

Tab. 2.19: Beziehung zwischen Temperatur und Geschwindigkeit der reduktiven Dechlorierung der Chlorethene

Untersuchungs-material	Temp. [°C]	Umsetzung	Bemerkung	Lit.
Belebtschlamm aus Tierkörperbeseitigung	16	PCE → 43 % VC + 57 % Cl-frei	nach 61 d	[57]
	21	PCE → 0,2 % VC + 99 % Cl-frei		
Säule mit Klärschlammgranulat und Rheinsediment	10	PCE → 95 - 98 % Ethan	nach 14 d Adaptation an 10 °C gleiche Leistung wie bei 20 °C	[11]
	20			
<i>daraus:</i> Anreich.-Kultur mit <i>Dehalobacter restrictus</i>	10	PCE ⇏	¹ / ₂ max. Umsatz maximaler Umsatz	[28]
	15	PCE → <i>cis</i> -DCE		
	25-35	PCE → <i>cis</i> -DCE		
<i>Dehalospirillum multivorans</i>	15	PCE → <i>cis</i> -DCE +	Dehalorespiration	[71]
	30	PCE → <i>cis</i> -DCE +++		
	33	PCE → <i>cis</i> -DCE +(+?)		
	37	PCE ⇏		
Mischkultur aus Bodensuspension	5	PCE → 0 % Ethen	Tagesabbauraten	[6]
	10	PCE → 25 % Ethen		
	20	PCE → 55 % Ethen		
	28	PCE → 100 % Ethen		

Cl-frei: Chlor-freie Produkte; ⇏: keine Dechlorierung; Anreich.-Kultur: Anreicherungskultur

Sanierungsstrategie anaerobe Stoffverwertungskette ("Nahrungskette")

Die reduktive Dechlorierung von PCE während der Zusammenarbeit von fakultativ bis obligat anaeroben Mikroorganismen ist eine, nach den Ergebnissen der Laboruntersuchungen vielversprechende Strategie zur Sanierung von PCE und/oder TCE kontaminiertem Wasser und Boden. Die Abfolge der Prozesse in der Stoffverwertungskette (Kap. 2.1.3.4) lässt sich wie folgt zusammenfassen:

1. In der ersten Stufe der anaeroben Stoffverwertungskette stellen fakultativ anaerobe Mikroorganismen durch Metabolisierung von Naturstoffen C+E-Quellen bereit und das Redoxpotential sinkt ab.

2. Ab einem Redoxpotential von ca. Eh -150 mV setzt die reduktive Dechlorierung von PCE ein, wenn die entsprechenden Bakterien vorhanden sind.
3. Unterhalb eines Redoxpotentials von etwa Eh -300 mV können PCE und TCE von gleichzeitig aktiven Vertretern der strikt anaeroben Bakteriengruppen reduktiv dechloriert werden (Kap. 2.1.3.3).

Im Boden und in Bioreaktoren kann sich die Abfolge der Prozesse kleinräumig in Mikrohabitaten, in Biofilmen und in den Zellaggregaten von Klärschlammgranulat [70] ab einer gewissen Schichtdicke abspielen, auch wenn das "Gesamtmilieu" noch nicht die erforderlichen Bedingungen aufweist. Bakterien, die bei ungünstigen Lebensbedingungen Sporen, Cysten oder andere Dauerformen ausbilden können, sind in diesem Zusammenhang wichtig. Sie werden wieder aktiv, wenn sich die Milieubedingungen für sie verbessert haben.

Praxisbeispiel Bioreaktor mit synthetischer Mischkultur: Die anaerobe Stoffverwertungskette läßt sich auch für den Betrieb von Bioreaktoren benutzen, indem Bakterien mit bekannten Leistungen zu einer "Reinigungsfirma" zusammengesetzt werden, mit der ein Reaktor beimpft wird. Die praktische Umsetzung der in Kap. 2.1.3 dargestellten "theoretischen" Prozesse wird am Beispiel der Optimierung eines Wirbelschichtreaktors veranschaulicht.

Der Wirbelschichtreaktor wurde in der ersten Version mit einer für die verwendete künstliche Mischkultur optimalen Kombination von Cosubstraten, **Formiat und H₂**, beschickt. Durch den Betrieb mit Grundwasser, das naturgemäß nicht steril ist, wurden die "Spezialkulturen" von Methan produzierenden Grundwasserbakterien verdrängt, da sie in der Konkurrenz um die Nährstoffe schneller waren (s. Tab. 2.20). In der zweiten Version wurde **Ethanol** als Cosubstrat eingesetzt und der Mischkultur ein weiterer Bakterienstamm hinzugefügt. Dieser setzte Ethanol fermentativ zu Acetat und Wasserstoff um. Der produzierte Wasserstoff wurde sofort innerhalb der Mischkultur weiter verarbeitet, so daß die im Grundwasser enthaltenen Bakterien keine Betriebsstörungen mehr verursachten. Für die vollständige Dechlorierung von 1 g PCE wurden 53 g Ethanol benötigt. Acetat akkumulierte, 2 % des Wasserstoffs wurden für die reduktive Dechlorierung genutzt, 10 % zu Methan oxidiert und der Rest für unbekannte Prozesse verbraucht. Der langsamste Schritt in der Reaktionskette war die Dechlorierung von VC zu Ethen [72]. Inzwischen wird Propionat als effizienteres Cosubstrat verwendet (SCHOLZ-MURAMATSU, mdl. Mitt.).

Tab. 2.20: Wirbelschichtreaktor zur Reinigung von LCKW kontaminiertem Grundwasser mit zugegebenen, sich in ihren Leistungen ergänzenden Bakterienkulturen und Sinterglaskugeln als Aufwuchsfläche [72]

Wirbelschichtreaktor Version 1 Cosubstrate: H ₂ + Formiat		
Mischkultur	Merkmale	Katalysierte Reaktion
<i>Dehalospirillum multivorans</i>	Dechlorierer Stufe 1 (Dehalorespiration)	PCE → <i>cis</i> -DCE
<i>Desulfitobacterium</i> Stamm PCE-S	Dechlorierer Stufe 1	PCE → <i>cis</i> -DCE
TCE-Kultur	Dechlorierer Stufe 2	TCE → Ethen
<u>Ergebnis:</u> Die im zu reinigenden Grundwasser enthaltenen methanogenen Bakterien überwucherten die zugegeben Dechlorierer, so daß PCE nicht umgesetzt werden konnte.		
Wirbelschichtreaktor Version 2 Cosubstrat: Ethanol		
Mischkultur	Merkmale	Katalysierte Reaktion
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	Fermentierer	Ethanol → Acetat + H ₂
<i>Dehalospirillum multivorans</i>	Dechlorierer Stufe 1 (Dehalorespiration)	PCE → <i>cis</i> -DCE
<i>Desulfitobacterium</i> Stamm PCE-S	Dechlorierer Stufe 1	PCE → <i>cis</i> -DCE
TCE-Kultur	Dechlorierer Stufe 2	TCE → Ethen
<u>Ergebnis:</u> Das durch den fermentierenden Stamm gebildete H ₂ wurde sofort von den Dechlorierern verbraucht und es traten keine Störungen durch die im zu reinigenden Grundwasser enthaltenen Bakterien auf.		

2.1.4.2 Aerober Abbau

Für Untersuchungen des aeroben Abbaus und von inhibitorischen Wirkungen der Chlorethene sind zwei Größen wichtig, ihre Gesamtkonzentration und die Konzentration des im Wasser gelösten Anteils. Die in den Gasraum injizierten LCKW und gasförmige Cosubstrate verteilen sich entsprechend ihren physikalischen Eigenschaften zwischen wässriger und Gasphase. Da die Untersuchungen normalerweise in gasdicht verschlossenen Gefäßen mit einem großen Luftraum durchgeführt werden, um die Sauerstoffversorgung sicher zu stellen, sollten beide Größen, wie bei [36], angegeben werden.

Abbau durch Aliphate verwertende Bakterien

Der Abbau der Chlorethene wurde schwerpunktmäßig mit TCE, Methan und methanotrophen Bakterien untersucht. Ein Nachteil für den praktischen Einsatz von Methan als Cosubstrat ist, daß die Synthese des effizienteren Enzyms, s-MMO, durch Cu^{2+} inhibiert wird (s. Kap. 2.1.3.5). Als weitere Cosubstrate wurden Propan, Ethen, Propen und Isopren oder auch Erdgas (Gasgemisch mit Methan als Hauptbestandteil) verwendet. Neben CO_2 und chlorfreien Produkten wurden chlorierte Oxidationsprodukte nachgewiesen [34; 45; 66; 80; 82]. TCE und *cis*-DCE werden nur cometabolisch, d.h. in Anwesenheit einer C+E-Quelle umgesetzt. VC kann in Ausnahmefällen auch als C+E-Quelle genutzt werden [24; 64].

Der Vergleich der Abbaugeschwindigkeiten von TCE, *cis*-DCE und VC mit Methan [77] bzw. Methan-Luftgemisch [10], Erdgas [31] und Propan [45; 80] ergaben übereinstimmende Abnahmen der Umsatzgeschwindigkeiten in der Reihenfolge $\text{VC} > \text{cis-DCE} > \text{TCE}$, wobei *cis*-DCE etwa doppelt so schnell umgesetzt wurde wie TCE. Mischkulturen setzen Chlorethene schneller um als Reinkulturen und tolerierten höhere Ausgangskonzentrationen [36; 45; 76]. Vergleiche mit TCE, Methan und Propan [65] bzw. mit TCE, *cis*-DCE, Methan und Erdgas [31] als Cosubstrate zeigten, daß die LCKW mit Methan allein schlechter abgebaut wurden. Eine mögliche Ursache ist die geringere Zahl der Methan verwertenden Bakteriengattungen.

In einigen Fällen bildete die Konzentration der Cosubstrate ein Problem. Der Abbau von TCE wird kompetitiv gehemmt, wenn die Zellen eine höhere Affinität zu dem Wachstumssubstrat haben [34]. Bei einer Konzentration von 4,5 mg/l **Methan** ($281 \mu\text{M}$) wurde die Umsetzung von TCE gehemmt, während 1,5 mg/l ($94 \mu\text{M}$) noch nicht störten [68]. Auch **Propan** im Luftraum der Versuchsgefäße störte die Umsetzung von TCE [45; 80]. Mit **Propen** als Cosubstrat setzte der Abbau von TCE erst ein, nachdem das Gas fast vollständig verbraucht war [66].

Konzentrationsabhängige Hemmung der Umsetzung von TCE durch TCE selbst: Das einleitend aus Chlorethenen bei der Oxidation der Doppelbindung gebildete Epoxid (Oxiran, s. Kap. 2.1.3.2) ist für die meisten Mikroorganismen und ihre Dauerformen toxisch. Eine Ausnahme bilden Ethen verwertende Bakterien, die Schutzmechanismen besitzen müssen und daher auch höhere Chlorethen-Konzentrationen tolerieren sollten. Die toxische Wirkung des Epoxids beruht auf Reaktionen mit funktionellen Seitenketten von Proteinen und der Deaktivierung von DNA und RNA [7; 40]. Außerdem wirken während des Abbaus von TCE gebildete Zwischenprodukte (s. Kap. 2.1.3, Tab. 2.14) inhibitorisch.

Bei höheren TCE Konzentrationen nehmen die Umsatzgeschwindigkeiten mit **Methan** als Cosubstrat schnell und nicht linear ab, wobei der Leistungsabfall proportional zu der Menge des umgesetzten TCE ist. Die Hemmung wird auf gebildete toxische Zwischenprodukte [3; 10; 26; 27; 60; 62; 64] oder auf eine unspezifische Bindung von Abbauprodukten an Proteine [61] zurückgeführt. Je höher die Ausgangskonzentration des TCE ist, desto stärker ist auch die Selbsthemmung des Abbaus. In den Untersuchungen lagen die TCE Konzentrationen meist unter 3 ppm, um Hemmwirkungen durch gebildete Produkte zu vermeiden.

Die Konzentrationen, ab denen sich die Umsatzgeschwindigkeiten schnell drastisch verringern, sind bei TCE – abhängig von den Bedingungen (Misch- oder Reinkulturen, Art des Cosubstrats) – unterschiedlich. Der Bereich von 10 mg/l ($76 \mu\text{M}$) TCE wird bei einmaliger Dosierung als kritische Grenze angesehen. Bei kontinuierlichen Dosierung ist sie niedriger; für *Methylosinus trichosporium* OB 3b lag die kritische Konzentration bei 0,4 mg/l ($3,1 \mu\text{M}$) [60].

Mit **Propen** wurden höhere TCE-Konzentrationen toleriert. Die Stoffwechselaktivität fiel erst bei 33 mg/l (250 μ M) TCE im Medium um die Hälfte ab [66]. Auch bei der Mineralisierung von VC trat Selbsthemmung auf [24; 64].

Abbau von cis-DCE und VC mit Ethen als Cosubstrat: Unter praktischen Gesichtspunkten wurde Ethen zur Selektionierung von Epoxid-toleranten und cis-DCE abbauenden Bakterien verwendet. Elf von Zwanzig aus der Kläranlage eines Chlorethene produzierenden Betriebes angereicherten Mischkulturen setzten cis-DCE vollständig zu chlorfreien Produkten um. Eine besonders effiziente Mischkultur aus fünf Bakterienstämmen wurde für einen Rieselbettreaktor zur Reinigung von mit cis-DCE belastetem Grundwasser ausgewählt. Die Kultur dechlorierte 39 mg/l (400 μ M) cis-DCE und 6,3 mg/l (100 μ M) VC in der wässrigen Phase mit maximaler Geschwindigkeit; erst 581 mg/l (6 mM) cis-DCE wirkten sich negativ aus [35; 36].

Auch bei Ethen ist die Konzentration des Cosubstrates wichtig. Einige der Mischkulturen bauten cis-DCE erst nach dem vollständigen Verbrauch des Ethens ab. Die seit einem Jahr zur Reinigung des Grundwassers verwendete Mischkultur setzte cis-DCE erst nach dem Absinken der Ethenkonzentration unter 2,8 mg/l (100 μ M) um, während VC bei der eingesetzten, gelösten Konzentration von 7 mg/l Ethen (250 μ M) sofort abgebaut wurde [36].

Abbau durch Aromaten verwertende Bakterien

1986 wurde ein Bakterium (*Pseudomonas cepacia* G4, nach taxonomischer Revision *Burkholderia cepacia* G4) isoliert, das TCE mit Toluol oder Phenol als Cosubstrat abbaute [55; 56]. Die zur Oxidation der Aromaten benötigten Mono- bzw. Dioxygenasen oxidieren auch Chlorethene. Als Produkte des Abbaus von TCE wurden neben nicht-flüchtigen Metaboliten, die weiter dechloriert wurden, Cl⁻ und CO₂ nachgewiesen [46; 54]. Toluol- und Phenolmonoxygenasen setzen TCE drei bis sechsmal schneller um, als Toluoldioxygenasen [21; 39; 75]. Auch in Mischkulturen aus Grundwasserproben wurden mit Phenol als Cosubstrat höhere Umsatzraten für TCE erhalten, als mit Toluol [29; 54]. Wie bei Ethen als Cosubstrat ist die Fähigkeit zur Verwertung von Phenol oder Toluol jedoch nicht automatisch mit dem cometabolischen Abbau von Chlorethenen verbunden [19; 36; 46].

Inhibitorische Wechselwirkungen beim Abbau von TCE und Aromaten: Die Eignung des gekoppelten Chlorethen- (mit Schwerpunkt TCE) und Aromatenabbaus wurde als effizientere Alternative zu dem gekoppelten Chlorethen- und Aliphatenabbau für den praktischen Einsatz geprüft. Dabei zeigte sich auch hier eine von der TCE Konzentration abhängige Abnahme der Umsatzgeschwindigkeiten mit der Zeit, und es wurden sigmoide Abbaukurven erhalten. Der kritische Bereich für eine Selbsthemmung durch TCE liegt zwischen 1 mg/l und 20 mg/l TCE (> 7,6 μ M und < 145 μ M), abhängig von den Versuchsbedingungen [19; 21; 25; 38; 53; 79].

Wenn TCE und Toluol oder Phenol gleichzeitig angeboten werden, verschlechtern sich sowohl das Wachstum der Bakterien als auch der Abbau von TCE zunehmend. Ursachen sind, analog dem cometabolischen Abbau der Chlorethene mit Aliphaten, inhibitorisch/toxisch wirkende Zwischenprodukte des Abbaus oder kompetitive Hemmung, bei der TCE die Oxygenasen so blockiert, daß Toluol und Phenol nicht mehr verwertet werden können, und die Zellen im Extremfall absterben. In beiden Fällen ist beides, die Umsetzung von TCE und das Wachstum der Bakterien, beeinträchtigt [19; 21; 25; 38; 53; 79]. Z. B. nahm die Zahl der lebenden Zellen in einer Mischkultur aus vier Vertretern der Gattung *Pseudomonas*, die über längere Zeit mit einem Sauerstoff/Toluol/TCE-Gemisch begast wurde, stammspezifisch um das 50- bis

1000-fache ab, da TCE (1,7 mg/l entspr. 13 μM) den Abbau von Toluol inhibierte. Schließlich dominierte ein Stamm, der TCE nicht abbaute [47].

Praxisorientierte Ansätze zum Vermeiden der Wachstumshemmung: Zum einen wurde die Anzucht der Bakterien mit Toluol oder Phenol von dem TCE-Abbau getrennt, um ausreichend Biomasse für die Umsetzung erhalten. Schon 1991 wurde dazu ein Zweikammersystem als Vorstufe für einen Bioreaktor entwickelt [18]. Alternativ wurde der Einfluß der Phenoldosierung in mit TCE betriebenen Reaktoren und Belebtschlamm geprüft: 200 ml 2 g/l Phenol-haltiges Medium wurde (1) kontinuierlich, (2) semikontinuierlich und (3) als täglicher Puls dosiert. In den Reaktoren (1) und (2) verschob sich die zu Versuchsbeginn heterogen zusammengesetzte Mikroflora zu Ungunsten der TCE abbauenden Bakterien. Phenol verwertende Mikroorganismen, die TCE nicht umsetzten, verdrängten hier die TCE abbauenden Bakterien vollständig. Nur in dem täglich beschickten Reaktor (3) blieben Bakterien erhalten, die TCE cometabolisch mit Phenol abbauten [75].

Konsequenzen für die Sanierungspraxis

PCE und TCE werden anaerob gut – zumindest bis zur Stufe des *cis*-DCE – dechloriert, so daß ein aerobes Verfahren für die biologische Reinigung bei höheren Belastungen mit TCE nicht sinnvoll ist. Auch bei niedrigeren TCE Belastungen kann es aerob durch die verschiedenen Hemmwirkungen Probleme geben. Wenn bei der anaeroben Dechlorierung *cis*-DCE und VC als Endprodukte auftreten, muß jedoch eine aerobe Reinigungsstufe nachgeschaltet werden.

Obwohl *cis*-DCE und das karzinogene VC die für die Sanierungspraxis relevanten Produkte sind, wurden die Untersuchungen zum aeroben Abbau schwerpunktmäßig mit TCE durchgeführt. Daher sollten die Möglichkeiten und Grenzen des aeroben, cometabolischen Abbaus gezielt mit *cis*-DCE und VC in Hinblick auf ihre Eignung für gekoppelte anaerob-aerob Sanierungen geprüft werden. Des weiteren sollte der Einfluß der, bei einer entsprechenden Mischkontamination, schon vorhandenen aliphatischen und aromatischen Cosubstrate für den aeroben Abbau in (Vor-)Untersuchungen einbezogen werden.

2.1.4.3 Sanierungspraxis

Chlorethene sind für biologische Sanierungen grundsätzlich geeignete Stoffe, und eine biologische Behandlung bietet sich bei Konzentrationsbereichen an, in denen Luftabsaugung und strippen nicht mehr sinnvoll sind. Die bisher entwickelten Sanierungsansätze und Verfahren zur *on site* und *in situ* Sanierung sind jedoch noch relativ neu und bedürfen der weiteren Überprüfung und Verbesserung bzw. Optimierung unter Einbeziehen des aktuellen Kenntnisstandes. Das Risiko von Fehlschlägen ist, besonders bei *in situ* Sanierungen, noch hoch. Die Ergebnisse der folgenden Pilotprojekte zeigen exemplarisch den Stand der Technik.

Versuchsfeld Moffett-Field

Die biologische Sanierbarkeit von LCKW-Schadensfällen *in situ* wurde erstmalig in den USA in einem flachen mit 1,1,1-TCA belasteten Aquifer untersucht. Das Grundwasser wurde mit Chlorethenen kontaminiert und aufgrund der Ergebnisse von Voruntersuchungen mit Sauerstoff und Methan versetzt. Um eine inhibitorische Wirkung zu verhindern, wurde das Methan in Pulsen dosiert. Das Grundwasser enthielt äquimolare Mengen TCE und TCA, rd. 0,7 μM , 1 μM *cis*-DCE und 1,6 μM VC (je ca. 100 $\mu\text{g/l}$). *In situ* konnte VC durch die **Methaninjektion**

vollständig eliminiert werden. Die Abnahmen von *cis*-DCE und TCE lagen bei 50 bzw. 25 Gew. %; TCA persistierte [68]. Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse für TCE und *cis*-DCE wurde in weiteren Voruntersuchungen der aerobe Abbau von 0,3 μM TCE (39 $\mu\text{g/l}$) und 0,15 μM *cis*-DCE (19 $\mu\text{g/l}$) mit den Cosubstraten **Methan, Phenol, Toluol und Ammonium verglichen**. Mit den Aromaten wurden die besten Ergebnisse erzielt.

In einem anschließenden Feldversuch wurde der Abbau von 0,3 und 0,7 μM TCE (45 und 90 $\mu\text{g/l}$) und 0,4 und 0,8 μM *cis*-DCE (40 und 80 $\mu\text{g/l}$) bei Dosierung von **Phenol und Methan** verglichen. TCE wurde zwar auch hier mit Phenol zu höheren Anteilen abgebaut als mit Methan (im Verhältnis 10 : 2). Aber schon bei den geringen eingesetzten TCE Mengen wurde es bei der niedrigeren Konzentration mit 92 % besser umgesetzt als bei der höheren Konzentration (63 % Umsatz) [29]. Im weiteren wurde die Sukzession der Mikroflora im Aquifer nach Dosierung von 1,8 μM TCE (230 $\mu\text{g/l}$) und 12,5 mg/l **Phenol**, gefolgt von **Toluol** (9 mg/l) nach 1,5 Monaten, verfolgt. Wie in den Laboruntersuchungen verringerten sich auch *in situ* das Artenspektrum, und die Geschwindigkeiten des Wachstums der Bakterien und der Umsetzung von TCE nahmen ab [22].

Sequentieller anaerob/aerober Abbau von PCE

In der gesättigten Bodenzone, die nach Bodenluftabsaugung noch maximal 60 μM PCE (10 mg/l) enthielt, wurde in den Niederlanden ein Pilotversuch zur biologischen *in situ* Sanierung durchgeführt. Durch Infiltration von Methanol und Nährsalzen wurde PCE in der **anaeroben Zone** weitgehend reduktiv zu *cis*-DCE dechloriert. Die Konzentrationen betragen in Molprozent: TCE (5), *cis*-DCE (90), VC (5). Im Abstrom der Grundwasserfahne wurden Phenol und Sauerstoff injiziert um den **aeroben Abbau** zu stimulieren. Phenol wurde vollständig abgebaut [1; 2]. Angaben zum Verbleib der LCKW wurden noch nicht publiziert.

Sequentieller aerob/anaerob/aerober Abbau einer Mischkontamination

Das Grundwasser unter dem Gelände einer ehemaligen chemischen Fabrik (Sandhausen) war mit LCKW und KW belastet. Hydraulische Maßnahmen, andere nicht biologische Verfahren, und eine drei-stufige biologischen Behandlung der Restkonzentrationen (≤ 6 mg/l LCKW und ca. 0,3 mg/l BTEX) wurden kombiniert. In einer ersten, **aeroben Phase** wurden Nährsalze und H_2O_2 dosiert, um den Abbau der Aliphate und von *cis*-DCE zu stimulieren. Nach drei Jahren waren die KW nicht mehr nachweisbar. In der anschließenden, zweijährigen **anaeroben Phase** wurde PCE unter Zugabe eines nicht genannten, sauerstoffzehrenden Cosubstrates zu *cis*-DCE als Hauptendprodukt dechloriert. In der letzten, einer halbjährigen zweiten **aeroben Phase** wurden ohne Zugabe von Cosubstraten verbliebene Kontaminanten, vor allem *cis*-DCE, eliminiert. Bei Abschluß der Sanierung, nach sechs Jahren, lag die Konzentration der LCKW unter 10 $\mu\text{g/l}$ und Aromaten waren nicht mehr nachweisbar [81].

Kombinierte *In situ*- und *On site*-Behandlung von Boden, Wasser und Abluft

Das Gelände einer ehemaligen Deponie (Eppelheim), besteht aus heterogen verfüllten Kiesgruben im Einzugsbereich von Wasserwerken, die qualitativ und quantitativ unterschiedlich belastet sind. Das Grundwasser wurde durch LCKW kontaminiert. Ein Teilstück des Geländes, das BTEX- und Alkylaromaten, PCE, TCE, *cis*-DCE und DCM enthielt, wurde als Modellstandort ausgewählt, an dem Verfahren zur biologischen Sanierung von Chlorethenen verglichen und/oder entwickelt werden sollten. Aufgrund von Vorversuchen wurde für die **anaerobe** Transformation von PCE Saccharose als Cosubstrat ausgewählt (s. Kap. Sanierungsstrategie

anaerobe Stoffwertungskette ("Nahrungskette"). **Aerob** sollte der Abbau von TCE und *cis*-DCE durch methanotrophe Bakterien durch Methandosierung stimuliert werden [50; 51; 67; 73].

Wasserbehandlung: Anfallendes Prozeß- und Grundwasser wurde auf 30° C erwärmt und mit Saccharose (Endkonzentration 0,03 %) versetzt. Anschließend wurde es in **drei gekoppelten Reaktoren mit zwischengeschalteten Sandfiltern** gereinigt. In einem exemplarisch publizierten Beispiel enthielt der Zulauf 0,66 mM PCE (109 mg/l), 0,21 mM TCE (27 mg/l), 0,55 mM (53 mg/l) *cis*-DCE, 1,6 mg/l Toluol, 2,3 mg/l *m/p*-Xylol und 0,7 mg/l *o*-Xylol [50].

- In der ersten Stufe, dem **Denitrifikationsreaktor**, wurde durch Verwertung von Saccharose Sauerstoff gezehrt und Nitrat reduziert. Zudem wurden schon hier PCE und TCE zu *cis*-DCE dechloriert. Das Wasser des Ablaufs enthielt nur noch (in Mol%): PCE (8,2) und TCE (48). Der *cis*-DCE Gehalt war auf 290 % des Ausgangswertes angestiegen.
- In der zweiten Stufe, dem **Anaerob-Reaktor**, wurde die verbliebene Saccharose abgebaut, SO_4^{2-} zu S^{2-} reduziert und Methan gebildet. PCE wurde vollständig, TCE weitestgehend und *cis*-DCE geringfügig transformiert.
- Während der Passage eines ersten Sandfilters wurden das restliche TCE und 73 % des *cis*-DCE eliminiert.
- Das in den **Aerob-Reaktor** geleitete Wasser wurde in Pulsen mit einem Methan-Preßluft Gemisch (1 - 2 Vol %) begast. Das Wasser des Ablaufs enthielt kein *cis*-DCE mehr; VC war in keiner der Stufen nachweisbar. Eliminiert wurden: Toluol vollständig, die Xylole weitgehend und S^{2-} wurde wieder zu SO_4^{2-} oxidiert. Versuche mit ^{14}C -Toluol zeigten, daß der Aufwuchs Toluol schnell mineralisiert [51; 52].
- Zur Reinigung von Partikeln wurde das Wasser über einen weiteren Sandfilter mit nachgeschalteten Aktivkohlefiltern als Polzeifilter geleitet.

On site Behandlung des Bodens: Der Boden, der neben den Kontaminanten Bauschutt und Hausmüll enthielt, wurde nach Aussortieren der Grobfraction in einem doppelwandigen, luftdichten Zelt mit Abluftabsaugung in einer Bodenreinigungsanlage in drei Phasen **aerob/anaerob/aerob** behandelt. Bei der Fraktionierung mit dem Rüttelsieb wurde Sauerstoff ein- und Kontaminanten ausgetragen.

In situ Behandlung des Bodens: *In situ* wurden unterschiedlich betriebene Säulen installiert: eine Infiltrationssäule, deren Ergebnisse publiziert sind, eine Perkolationsssäule und eine Hochdruckinjektionssäule. In der Infiltrationssäule wurden die Kontaminanten mit Wasser hydraulisch aus dem Boden gewaschen und das Washwasser in der Wasserbehandlungsanlage biologisch gereinigt. Das Prozeßwasser wurde mit Grundwasser verdünnt, wenn die Konzentration der Kontaminanten für die Biofilme in den Reaktoren zu hoch war. In Laborversuchen mit Bodenproben aus der Hochdruckinjektionssäule wurden bis zu 90 Gew. % PCE zu Ethan als Hauptendprodukt dechloriert [51].

Abluftbehandlung: Die Abluft wurde über Biofilter geleitet, die einen Tropfkörperinsatz mit einem Bett aus gepuffertem Laubrindehumus enthielten, das LCKW und Aromaten adsorbierte. In anaeroben Nischen wurde PCE umgesetzt. Laboruntersuchungen zeigten, daß ^{14}C -Toluol aerob durch die Mikroflora des Aufwuchses abgebaut werden konnte.

Teilbilanzen: Ein Vergleich der vorliegenden Teilbilanzen [67] zeigt die Haupteliminationspfade in den verschiedenen Verfahren (Tab. 2.21).

Tab. 2.21: Modellstandort Eppelheim: Verbleib der Kontaminanten bei der biologischen Boden- und Wasserbehandlung, aus [67].

Behandlung (Angaben in [Gew.%])	Biologischer Abbau		Abluft		Sorption		Infiltration Waschwasser	
	LCKW	BTX	LCKW	BTX	LCKW	BTX	LCKW	BTX
Boden Infiltrationssäule	2,7	0,6	3,0	3,0	0,3	5,4	94	91
Boden On site Verfahren	22	24	76	75	2,1	1,4	–	–
Wasser Aufbereitungsanlage	73	62	15	26	7,0	7,0	–	–

Bei der Infiltrationssäule wird - wie vorgesehen - der überwiegende Teil der Kontaminanten aus dem Boden ausgewaschen und in den angeschlossenen Reaktoren gereinigt. Beim Boden liegt der Schwerpunkt der Behandlung aufgrund der intensiven mechanischen Durchmischung auf der Abreicherung der Kontaminanten durch Verlagerung in das Kompartiment Luft. Die Exhalation der leichtflüchtigen Kontaminanten ist schneller als ein biologischer Abbau, so daß dem Funktionieren der Abluftreinigung bei der Bodenbehandlung die gleiche Bedeutung zukommt, wie der Wasserbehandlung bei der Infiltrationssäule.

2.1.4.4 Biologisches Selbstreinigungspotential

Die Chlorethene besitzen bei älteren Kontaminationen ein nicht zu unterschätzendes natürliches Abbaupotential, wenn der Untergrund, wie bei vielen Schadensfällen, anaerob ist und ausreichend organische Nährstoffe enthält. Das Auftreten von *cis*-DCE und in Folge gebildetes VC sind für die Trinkwasserversorgung unliebsame, aber sichere Indikatoren einer Selbstreinigung durch reduktive Dechlorierung. In der Bundesrepublik Deutschland wurde erstmals 1987, nach Verbesserung der Analytik, auch die Bildung von VC im Abstrom einer Grundwasserfahne in Berlin festgestellt. Einer der lokalisierten Schadensherde war eine Tierkörperverwertung. Die Verschiebungen der Gehalte an PCE und TCE zu *cis*-DCE und VC ließen sich nur durch biologische Transformation in dem 12° C "warmen" Grundwasser erklären [57; 58].

2.1.4.5 Literatur

1. **Alphenaar, P. A., E. Marsmann, J. P. Okx, R. Arnz, J. Moers, Gerritse, J., and J. Gottschall.** 1997. *In situ*-Abbau von CKW. In: 12. DECHEMA-Fachgespräch Umweltschutz: Möglichkeiten und Grenzen der Reinigung kontaminierter Grundwässer. Seite 705-715.

2. **Alphenaar, P. A., J. P. Okx, J. M. H. Vijgen, J. Moers, J. Gerritse, and J. Gottschall.** 1996. *In situ*-Abbau von CKW's. In: 11. DECHEMA-Fachgespräch Umweltschutz: *In situ*-Sanierung von Böden. Seite 103-113.
3. **Alvarez-Cohen, L., and P. L. McCarty.** 1991. Product toxicity and cometabolic competitive inhibition modeling of chloroform and trichloroethylene transformation by methanotrophic resting cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1031-1037.
4. **Bagley, D. M., and J. M. Gossett.** 1990. Tetrachloroethene transformation to trichloroethene and cis-1,2-dichloroethene by sulfate-reducing enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2511-2516.
5. **Barrio-Lage, G., F. Z. Parsons, R. S. Nassar, and P. A. Lorenzo.** 1986. Sequential dehalogenation of chlorinated ethenes. *Environ. Sci. Technol.* **20**:96-99.
6. **Böckle, K.** 1998. Praxisorientierte Untersuchungen zur mikrobiellen reduktiven Dechlorierung von leichtflüchtigen chlorierten Kohlenwasserstoffen (LCKW). Dissertation, TU Dresden, 140 Seiten.
7. **Borneff, J. und M. Borneff.** 1991. Hygiene. 5. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 581 Seiten.
8. **Bouwer, E. J., and P. L. McCarty.** 1983. Transformations of 1- and 2-carbonhalogenated aliphatic organic compounds under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:1286-1294.
9. **Bradley, P. M., F. H. Chapelle, and D. R. Lovley.** 1998. Humic acids as electron acceptors for anaerobic microbial oxidation of vinyl chloride and dichloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3102-3105.
10. **Chang, H.-L., and L. Alvarez-Cohen.** 1996. Biodegradation of individual and multiple chlorinated aliphatic hydrocarbons by methane-oxidizing cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3371-3377.
11. **de Bruin, W., P., M. J. J. Kotterman, S. A. Posthumus, G. Schraa, and A. J. B. Zehnder.** 1992. Complete biological reductive transformation of tetrachloroethene to ethane. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1996-2000.
12. **DiStefano, T. D., J. M. Gossett, and S. H. Zinder.** 1991. Reductive dechlorination of high concentrations of tetrachloroethylene to ethene by an anaerobic enrichment culture in the absence of methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2287-2292.
13. **DiStefano, T. D., J. M. Gossett, and S. H. Zinder.** 1992. Hydrogen as an electron donor for dechlorination of tetrachloroethylene by an anaerobic mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3622-3629.
14. **Egli, C., R. Scholtz, A. M. Cook, T. Tschan, and T. Leisinger.** 1987. Anaerobic dechlorination of tetrachloromethane and 1,2-dichloroethane to degradable products by pure cultures of *Desulfobacterium* sp. and *Methanobacterium* sp. *FEMS Microbiol. Lett.* **43**:257-261.

15. **Fathepure, B. Z., and S. A. Boyd.** 1988. Dependence of tetrachloroethylene on methanogenic substrate consumption by *Methanosarcina* sp. strain DCM. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2976-2980.
16. **Fathepure, B. Z., J. P. Nengu, and S. A. Boyd.** 1987. Anaerobic bacteria that dechlorinate perchloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2671-2674.
17. **Fliermans, C. B., T. J. Phelps, D. Ringelberg, A. T. Mikell, and D. C. White.** 1988. Mineralization of trichloroethylene by heterotrophic enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1709-1714.
18. **Folsom, B. R., and P. J. Chapman.** 1991. Performance characterization of a model bioreactor for the biodegradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1602-1608.
19. **Folsom, B. R., P. J. Chapman, and P. H. Pritchard.** 1990. Phenol and trichloroethylene degradation by *Pseudomonas cepacia* G4: kinetics and interactions between substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1279-1285.
20. **Freedman, D. L., and J. M. Gossett.** 1989. Biological reductive dechlorination of tetrachloroethylene to ethylene under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2144-2151.
21. **Fries, M. R., L. J. Forney, and J. M. Tiedje.** 1997. Phenol and toluene-degrading microbial populations from an aquifer in which successful trichloroethene cometabolism occurred. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1523-1530.
22. **Fries, M. R., G. D. Hopkins, P. L. McCarty, L. J. Forney, and J. M. Tiedje.** 1997. Microbial succession during a field evaluation of phenol and toluene as the primary substrates for trichloroethene cometabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1515-1522.
23. **Gibson, S. A., and G. W. Sewell.** 1992. Stimulation of reductive dechlorination of tetrachloroethene in anaerobic aquifer microcosms by addition of short-chain acids or alcohols. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1392-1393.
24. **Hartmans, S., and J. A. M. de Bont.** 1992. Aerobic vinyl chloride metabolism in *Mycobacterium aurum* L. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1220-1226.
25. **Heald, S., and R. O. Jenkins.** 1994. Trichloroethylene removal and oxidation toxicity mediated by toluene dioxygenase of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:4634-4637.
26. **Henry, S. M., and D. Grbic-Galic.** 1991. Influence of endogenous and exogenous electron donors and trichloroethylene oxidation toxicity on trichloroethylene oxidation by methanotrophic cultures from a groundwater aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:236-244.
27. **Henry, S. M., and D. Grbic-Galic.** 1991. Inhibition of trichloroethylene oxidation by the transformation intermediate carbon monoxide. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1770-1776.
28. **Holliger, C., G. Schraa, A. J. M. Stams, and A. J. B. Zehnder.** 1993. A highly purified enrichment culture couples the reductive dechlorination of tetrachloroethene to growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2991-2997.

29. **Hopkins, G. D., L. Semprini, and P. L. McCarty.** 1993. Microcosm and *in situ* field studies of enhanced biotransformation of trichloroethylene by phenol-utilizing microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2277-2285.
30. **Hoppenheidt, K. und H. H. Hanert.** 1989. Simulation einer biologischen Chlorkohlenwasserstofftransformation in Tetrachlorethen-kontaminiertem Grundwasser. *GW-F-Wasser/Abwasser* **130**:706-711.
31. **Kästner, M.** 1989. Anreicherung und Isolierung von Chlorkohlenwasserstoffe abbauenden Mikroorganismen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen- Abbaukinetiken und Test auf technische Nutzbarkeit zur Sanierung kontaminierter Grundwässer Dissertation. TU Braunschweig, 217 Seiten.
32. **Kästner, M.** 1991. Reductive dechlorination of tri- and tetrachloroethylens depends on transition from aerobic to anaerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2039-2046.
33. **Kleopfer, R. D., D. M. Easley, B. B. Haas, T. G. Deihl, D. E. Jackson, and D. E. Wurrey.** 1985. Anaerobic degradation of trichloroethylene in soil. *Environ. Sci. Technol.* **19**: 277-280.
34. **Knackmuss, H.-J.** 1997. Abbau von Natur- und Fremdstoffen. In: *Umweltbiotechnologie*. J., C., G. Ottow und W. Bidlingmaier Hrsg. G. Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm Seite 39-77.
35. **Koziollek, P., D. Bryniok und H.-J. Knackmuss.** 1997. Entwicklung eines aeroben Verfahrens zur mikrobiellen Eliminierung von cis-1,2-Dichlorethen und Vinylchlorid. In: 12. DECHEMA-Fachgespräch Umweltschutz: Möglichkeiten und Grenzen der Reinigung kontaminierter Grundwässer. Seite 691-696.
36. **Koziollek, P., D. Bryniok, and H.-J. Knackmuss.** 1999. Ethene as an auxiliary substrate for the cooxidation of cis-1,2-dichloroethene and vinylchloride. *Arch. Microbiol.* **172**: 240-246.
37. **Krumholz, L. R., R. Sharp, and S. S., Fishbain.** 1996. A freshwater aerobic coupling acetate oxidation to tetrachloroethylene dehalogenation. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4108-4113.
38. **Landa, A. S., E. M. Sipkema, J. Weijma, A. A. C. M. Beenackers, J. Dolfing, and D. B. Janssen.** 1994. Cometabolic degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 in a chemostat with toluene as the primary substrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3368-3374.
39. **Leahy, J. G., A. M. Byrne, and R. H. Olsen.** 1996. Comparison of factors influencing trichloroethylene degradation by toluene-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:825-833.
40. **Lexikon der Biochemie.** 1995. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
41. **LFU, Materialien zur Altlastensanierung.** 1991. Handbuch Mikrobiologische Bodenreinigung. Bearbeiter Geller, A., Brauch, H.J., Werner, P., Berberich, G. Hrsg. Landesanstalt für Umweltschutz Baden Württemberg, Karlsruhe, 233 Seiten.
42. **Löffler, F. E, J. M. Tiedje, B. Z. Fathepure, K. F. Hayes, L. M. Abriola, K. D. Pennell, and P. Adriaens.** 1998. Remediation of chlorinated solvents at the Bachman road site using innovative technologies. In: *Workshop Abbau chlorierter Kohlenwasserstoffe*, 28. und 29. Sept. 1998, Fraunhofer-Institutszentrum Stuttgart, D. Bryniok, P. Koziollek Hrsg. Bezug über Dr. D. Bryniok, Fraunhofer Institut IGB Nobelstr. 12, 70569 Stuttgart. Nr. 14, 6 Seiten.

43. **Löffler, F. E., K. M. Ritalahti, and J. M. Tiedje.** 1997. Dechlorination of chloroethenes is inhibited by 2-bromoethanesulfonate in the absence of methanogens. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4982-4985.
44. **Magnuson, J. K., R. V. Stern, J. M. Gossett, S. H. Zinder, and D. R. Burris.** 1998. Reductive dechlorination of tetrachloroethene to ethene by a two-component enzyme pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1270-1275.
45. **Malachowsky, K. J., T. J. Phelps, A. B. Teboli, D. E. Minnikin, and D. C. White.** 1994. Aerobic mineralization of trichloroethylene, vinyl chloride, and aromatic compounds by *Rhodococcus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:542-548.
46. **Mars, A. E., J. Houwing, J. Dolfing, and D. B. Janssen.** 1996. Degradation of toluene and trichloroethylene by *Burkholderia cepacia* G4 in growth-limited fed-batch culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:886-891.
47. **Mars, A. E., G. T. Prins, P. Wietzes, W. de Koning, and D. B. Janssen.** 1998. Effect of trichloroethylene on the competitive behavior of toluene-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:208-215.
48. **Maymó-Gatell, X., T. Anguish, and S. H. Zinder.** 1999. Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1,2-dichloroethane by "*Dehalococcoides ethenogenes*" 195. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3108-3113.
49. **Maymó-Gatell, X., V. Tandoi, J. M. Gossett, and S. H. Zinder.** 1995. Characterization of a H₂-utilizing enrichment culture that reductively dechlorinates tetrachloroethene to vinyl chloride and ethene in the absence of methanogenesis and acetogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3928-3933.
50. **Meyer, O.** 1998. Pilot plant stage bioremediation of CKW and BTEX-contaminated soil by *in situ* infiltration in combination with *on site* water and air treatment at the model site Eppelheim. In: Workshop, Abbau chlorierter Kohlenwasserstoffe, 28. und 29. Sept. 1998, Fraunhofer-Institutszentrum Stuttgart, D. Bryniok, P. Koziollek Hrsg. Bezug über Dr. D. Bryniok, Fraunhofer Institut IGB Nobelstr. 12, 70569 Stuttgart. Nr. 21, 6 Seiten.
51. **Meyer, O., R. I. Refae, J. Baumann, H. von Reis, M. Langenbach, S. Abu-Issa, J. Warrelmann und W. Kohler.** 1997. Sanierungsverfahren am Modellstandort Eppelheim: biologischer Abbau von leichtflüchtigen Schadstoffen in Wasser, Boden und Luft. In: Mikrobieller Schadstoffabbau, ein interdisziplinärer Ansatz. Hrsg. Ch. Knorr, T. von Schell. Vieweg Verlag. Seite 297-333.
52. **Meyer, O., R. I. Refae, J. Warrelmann und H. von Reis.** 1993. Development of techniques for the bioremediation of soil, air and groundwater polluted with chlorinated hydrocarbons: the demonstration project at the model site in Eppelheim. *Microb. Releases.* **2**:11-22.
53. **Mu, D. Y., and K. M. Scow.** 1994. Effect of trichloroethylene (TCE) and toluene concentrations on TCE and toluene biodegradation and the population density of TCE and toluene degraders in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2661-2665.
54. **Nelson, M. J. K., S. O. Montgomery, and P. H. Pritchard.** 1988. Trichloroethylene metabolism by microorganisms that degrade aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:604-606.

55. **Nelson, M. J. K., S. O. Montgomery, W. R. Mahaffey, and P. H. Pritchard.** 1987. Biodegradation of trichloroethylene and involvement of an aromatic biodegradative pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:949-954.
56. **Nelson, M. J. K., S. O. Montgomery, E. J. O'Neill, and P. H. Pritchard.** 1986. Aerobic metabolism of trichloroethylene by a bacterial isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**:383-384.
57. **Nerger, M.** 1990. Leichtflüchtige Chlorkohlenwasserstoffe im Grundwasser pleistozäner Lockersedimente. Schriftenreihe des Vereins für Wasser-, Boden- und Lufthygiene Nr. 84. Hrsg. R. Leschber und E. Lahmann, 173 Seiten.
58. **Nerger, M. und R. Mergler-Völkl.** 1988. Biologischer Abbau von leichtflüchtigen Chlorkohlenwasserstoffen in Grund- und Abwasser. *Z. Wasser- Abwasser-Forsch.* **21**:16-19.
59. **Neumann, A., G. Wohlfarth, and G. Diekert.** 1996. Purification and characterization of tetrachloroethene reductive dehalogenase from *Dehalospirillum multivorans*. *J. Biol. Chem.* **271**:16515-16519.
60. **Oldenhuis, R., and D. B. Janssen.** 1993. Degradation of trichloroethylene by methanotrophic bacteria. In: *Microbial growth on C₁ compounds*. Intercept. Ltd. PO Box 716, Andover, Hampshire SP 10 1 YG, Uk. pp. 121-133.
61. **Oldenhuis, R., J. Y. Oedzes, J. J. van der Waarde, and D. B. Janssen.** 1991. Kinetics of chlorinated hydrocarbon degradation by *Methylosinus trichosporium* OB3b and toxicity of trichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:7-14.
62. **Oldenhuis, R., R. L. J. M. Vink, D. B. Janssen, and B. Witholt.** 1989. Degradation of chlorinated hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing soluble methane monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2819-2826.
63. **Parsons, F., G. B. Lage, and R. Rice.** 1985. Biotransformation of chlorinated organic solvents in static microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* **4**:739-742.
64. **Phelps, T. J., K. Malachowsky, R. M. Schram, and D. C. White.** 1991. Aerobic mineralization of vinyl chloride by a bacterium of the order Actinomycetales. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1252-1254.
65. **Phelps, T. J., J. J. Niedzielski, R. M. Schram, S. E. Herbes, and D. C. White.** 1990. Biodegradation of trichloroethylene in continuous-recycle expanded-bed reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1702-1709.
66. **Reij, M. W., J. Kieboom, J. A. M. de Bont, and S. Hartmans.** 1995. Continuous degradation of trichloroethylene by *Xanthobacter* sp. strain Py2 during growth on propene. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2936-2942.
67. **Reis, H. von.** 1998. Modellvorhaben Eppelheim, Ergebnisse und Bilanzen. In: Workshop, Abbau chlorierter Kohlenwasserstoffe, 28. und 29. Sept. 1998, Fraunhofer-Institutszentrum Stuttgart, D. Bryniok, P. Koziollek Hrsg. Bezug über Dr. D. Bryniok, Fraunhofer Institut IGB Nobelstr. 12, 70569 Stuttgart. Nr.22, 6 Seiten.

68. **Roberts, P. V., L. Semprini, G. D. Hopkins, D. Grbic-Galic, P. L. McCarty, and M. Reinhard.** 1989. *In situ* aquifer resoration of chlorinated aliphatics by methanotrophic bacteria. EPA-report 600/2-89/033, 214 pp.
69. **Rosner, B. M., P. L. McCarty, and A. M. Spormann.** 1997. In vitro studies on reductive vinyl chloride dehalogenation by an anaerobic mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4139-4144.
70. **Santegoeds, C. M., L. R. Damgaard, G. Hesselink, J. Zopfi, P. Lens, G. Muyzer, and D. de Beer.** 1999. Distribution of sulfate-reducing methanogenic bacteria in anaerobic aggregates determined by microsensor and molecular analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4618-4629.
71. **Scholz-Muramatsu, H., A. Neumann, E. Moore, and G. Diekert.** 1995. Isolation and characterization of *Dehalospirillum multivorans* gen. nov., sp. nov., a tetrachloroethene-utilizing, strictly anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* **163**:48-56.
72. **Scholz-Muramatsu, H., M. Eisenbeis, S. Granzow, C. Windfuhr, U. Schaub und G. Diekert.** 1999. Tetrachlorethen-Abbau in kontaminiertem Grundwasser mit Spezialkulturen. *GWF-Wasser/Abwasser* **140**:417-423.
73. **Schulz-Berendt, V.** 1998. Verfahrenstechnische Lösungen bei Chlorethen-Sanierungen am Beispiel des Modellstandortes Eppelheim . In: Workshop Abbau chlorierter Kohlenwasserstoffe, 28. u. 29. Sept. 1998, Fraunhofer-Institutszentrum Stuttgart, D. Bryniok, P. Koziollek Hrsg. Bezug über Dr. D. Bryniok, Fraunhofer Institut IGB Nobelstr. 12, 70569 Stuttgart. Nr. 20, 6 Seiten.
74. **Sharma, P. K., and P. L. McCarty.** 1996. Isolation and characterization of a facultatively aerobic bacterium that reductively dehalogenates tetrachloroethene to cis-1,2-dichloroethene. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:761-765.
75. **Shih, C., M. E. Davey, J. Zhou, J. M. Tiedje, and C. S. Criddle.** 1996. Effects of phenol feeding pattern on microbial community structure and cometabolism of trichloroethylene. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2953-2960.
76. **Uchiyama, H., T. Nakajima, O. Yagi, and Nakahara, T.** 1992. Role of heterotrophic bacteria in complete mineralization of trichloroethylene by *Methylocystis* sp. strain M. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3067-3071.
77. **van Hylckama Vlieg, J. E. T., W. de Koning, and D. B. Janssen.** 1996. Transformation kinetics of chlorinated ethenes by *Methylosinus trichosporium* OB3b and detection of unstable epoxides by on-line gas chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3304-3312.
78. **Vogel, T. M., and P. L. McCarty.** 1985. Biotransformation of tetrachloroethylene to trichloroethylene, vinyl chloride and carbon dioxide under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:1080-1083.
79. **Wackett, L. P., and S. R. Householder.** 1989. Toxicity of trichloroethylene to *Pseudomonas putida* F1 is mediated by toluene dioxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2723-2725.
80. **Wackett, L. P., and S. R. Householder.** 1989. Survey of microbial oxygenases: trichloroethylene degradation by propane-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2960-2964.

81. **Willershausen, H., E. Kohlmeier, W. Kohler, L. Backhaus und C. Maxin.** 1997. *In situ*-Sanierung eines LCKW-Schadens auf dem Gelände einer ehemaligen chemischen Fabrik. TerraTech. 2/1997, März/April, 4Seiten.
82. **Wilson, J. T., and B. H. Wilson.** 1985. Biotransformation of trichloroethylene in soil. Appl. Environ. Microbiol. **49**:242-243.
83. **Wohlfahrt, G.** 1998. Reduktive Dechlorierung und CKW-Atmung. In: Workshop Abbau chlorierter Kohlenwasserstoffe. 28., 29. Sept. 1998, Fraunhofer-Institutszentrum Stuttgart, D. Bryniok, P. Koziollek Hrsg. Bezug über Dr. D. Bryniok, Fraunhofer Institut IGB Nobelstr. 12, 70569 Stuttgart. Nr. 10, 6 Seiten.

2.1.5 Chlorethane

Annette Geller

Die Mehrzahl der Untersuchungen zum **biologischen Abbau** der Chlorethane wurden mit 1,2-Dichlorethan (1,2-DCA) und in geringerem Umfang mit 1,1,1-Trichlorethan (1,1,1-TCA) durchgeführt. Für die übrigen Verbindungen liegen nur vereinzelte Ergebnisse vor. Ab 1990 erschienen kaum mehr grundlegende Veröffentlichungen.

Abiotisch können Chlorethane langsam in biologisch weiter abbaubare Verbindungen zerfallen. Aus **1,1,1-TCA** wurden abiotisch ca. 1 % 1,1-DCE (Vinylidenchlorid), Spuren von 1,1-DCA und Essigsäure gebildet. Da 1,1,1-TCA nach dem jetzigen Kenntnisstand aerob und anaerob biologisch schwer abbaubar ist, kann eine langsame abiotische Zersetzung langfristig wichtig sein. **Hexachlorethan** wurde in einer autoklavierten Kontrolle schneller eliminiert als in der auf ihre Fähigkeit zur Umsetzung des Stoffes geprüften Mischkultur. Bei **Monochlorethan** (CA) wurde die abiotische Bildung von Ethanol beobachtet [5; 10; 20].

2.1.5.1 Anaerober Abbau

Chlorethane werden anaerob, wie die Chlorethene, cometabolisch durch methanogene und sulfidogene oder als E-Quelle durch Dehalorespiration [13] reduktiv dechloriert (s. Kap. 2.1.3.3). Nachgewiesen wurden folgende Transformationen [1; 2; 11; 20; 21]:

Hexachlorethan → TCA

1,1,2,2-Tetrachlorethan → 1,1,2-TCA

1,1,1-Trichlorethan (TCA) → 1,1-DCA → CA → CO₂ (Endprodukt häufig 1,1-DCA)

1,1,2-Trichlorethan (TCA) → wie 1,1,1-TCA

1,1-Dichlorethan (DCA) → Monochlorethan (CA)

1,2-Dichlorethan (DCA) → CA → Ethanol o. Ethen + VC (Endprodukt häufig CA)

1,1,1-TCA: Nach einer schnellen anfänglichen Abnahme verlangsamte sich die Transformation oder kam zum Stillstand [3; 4]. Neben der Umsatzgeschwindigkeit verringerte sich auch das Wachstum der Bakterien, das jedoch bis 750 µM (100 mg/l) nicht vollständig gehemmt wurde [5]. Die Ursache der Hemmwirkungen blieb unbekannt.

1,2-DCA: In einem 1999 publizierten Vergleich zum Abbau verschiedener LCKW durch *Dehalococcoides ethenogenes*, (Dehalorespiration, Tab. 2.18, Kap. 2.1.4.1) wurden 1,8 mM (240 mg/l) 1,2-DCA als E-Quelle reduktiv zu 99 % Ethen dechloriert, und es wurde 1 % VC gebildet. Das bei der reduktiven Dechlorierung zu erwartende Zwischenprodukt CA war nie nachweisbar. Der Stamm setzte 1,2-DCA schneller um als PCE, TCE und cis-DCE [13].

2.1.5.2 Aerober Abbau

1,1,1-TCA: TCA gehört nicht zu den Wunschkandidaten der biologischen Sanierung, denn es wird aerob nur **cometabolisch**, und dazu noch schlechter als TCE abgebaut. In der Literatur wurde ein methanotropher Stamm [14], zwei Mycobakterien-Stämme [22] und ein Ammonium oxidierender Bakterienstamm [8] beschrieben, die 1,1,1-TCA zu 2,2,2-Trichlor-ethanol als Endprodukt oxidieren konnten. Letzterer wandelt CA in Acetaldehyd und weitere, nicht identifizierte Produkten um [8]. Die Mycobakterien transformierten 2,2,2-Trichlor-ethanol mit Ethan als C+E-Quelle weiter zu unbekanntenen Produkten. Die Abbauprodukte hemmten, analog der **Produkthemmung** bei TCE (Kap. 2.1.4.2), die Umsetzung von TCA. Mit steigender Ausgangskonzentration nahm die Menge des umgesetzten 1,1,1-TCA ab [22]. In vergleichenden Untersuchungen setzten ein Methan [14] und ein Propen verwertender Bakterien-Stamm [12] 1,1,1-TCA nur halb so schnell um wie 1,1-DCA und 1,2-DCA.

1,2-DCA: DCA wird aerob als C+E-Quelle genutzt und ist anscheinend der aerob am besten abbaubare LCKW, wie u.a. die vergleichsweise problemlose Isolation von Stämmen zeigt, die 1,2-DCA mineralisieren. DCA wird auf zwei Wegen abgebaut, durch hydrolytische Dechlorierung, wobei es als C+E-Quelle genutzt wird und – wie die Chlorethene – cometabolisch durch methano- und methylo-trophe Bakterien [12; 19]. Bei der **hydrolytischen Dechlorierung** wird als erstes ein instabiles Zwischenprodukt, 1,2-Chlorethanol, gebildet, das sich unter Abspaltung von Cl⁻ zu dem biologisch abbaubaren Aldehyd umlagert (s. Abb. 2.5).

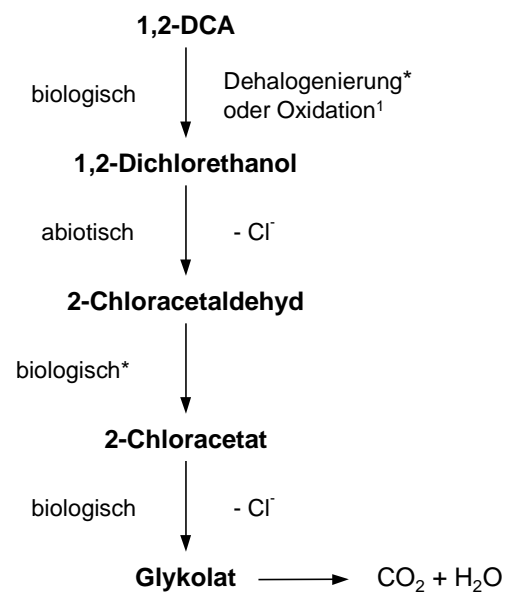


Abb. 2.5: Aerobe, hydrolytische Dechlorierung von 1,2 Dichlorethan. Für die mit einem * versehenen Reaktionen wurden die Enzyme nachgewiesen. ¹) vergleiche Lit. [6]

Die untersuchten, 1,2-DCA durch hydrolytische Dechlorierung abbauenden, Bakterien können autotroph und heterotroph wachsen, so daß sie auch bei Nährstoffmangel überleben können wenn ausreichend Sauerstoff vorhanden ist [9; 10; 16; 17; 18].

2.1.5.3 Biologisches Selbstreinigungspotential

Im Grundwasser des Geländes einer ehemaligen Altö raffinerie persistierte **1,1,1-TCA** (Pintsch, Hanau, s. Kap. 9.6.1) während PCE und TCE reaktiv dechloriert wurden. Auch das im Aquifer des Moffett-Field-Versuchsfeldes (s. Kap. 2.1.4.4) enthaltene 1,1,1-TCA wurde nach Sauerstoff- und Methaneintrag zur Stimulierung der Oxidation durch methanotrophe Bakterien nicht umgesetzt [15]. **1,2-DCA** verursacht dagegen anscheinend keine bleibenden Schadensfälle [10]. 1,2-DCA-haltiges Grundwasser wurde von einer Firma als Kühlwasser entnommen und sauerstoffangereichert mit einer Temperatur von 20 °C in Versickerungsteiche geleitet. Die Prüfung auf Grundwassergefährdung durch das wieder versickerte Kühlwasser ergab, daß 1,2-DCA vor Eintritt in das Grundwasser vollständig eliminiert wurde. Das Sediment der Versickerungsteiche enthielt $10^3\times$ höhere Zahlen 1,2-DCA-verwertender Bakterien als das Wasser des Teiches und der Boden, so daß man hier, analog zum Uferfiltrat, von einem Sedimentfiltrat sprechen könnte [7].

2.1.5.4 Literatur

1. **Bouwer, E. J., and P. L. McCarty.** 1983. Transformations of 1- and 2-carbonhalogenated aliphatic organic compounds under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:1286-1294.
2. **Cook, A. M., R. Scholtz und Th. Leisinger.** 1988. Mikrobieller Abbau von halogenierten aliphatischen Verbindungen. *GWF, Wasser, Abwasser* 129:7- 16.
3. **Egli, C., R. Scholtz, A. M. Cook, T. Tschan, and T. Leisinger.** 1987. Anaerobic dechlorination of tetrachloromethane and 1,2-dichloroethane to degradable products by pure cultures of *Desulfobacterium* sp. and *Methanobacterium* sp. *FEMS Microbiol. Lett.* **43**:257-261.
4. **Gälli, R., and P. L. McCarty.** 1989. Kinetics of biofransformation of 1,1,1-trichloroethane, Trichloromethane and tetrachloromethane by a *Clostridium* sp. . *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:837-844.
5. **Gälli, R., and P. L. McCarty.** 1989. Kinetics of biofransformation of 1,1,1-trichloroethane by *Clostridium* sp. Strain TCA IIB. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:845-851.
6. **Hage, J. C., and S. Hartmans.** 1999. Monooxygenase-mediated 1,2-dichloroethane degradation by *Pseudomonas* sp. strain DCA1. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2466-2470.
7. **Held, T.** 1996. No action Variante: Selbstreinigungskraft der Natur nutzen. *Altlastenspektrum* **5**:176-179.
8. **Hommes, N. G., S. A. Russel, P. J. Bottomley, and D. J. Arp.** 1998. Effects of soil on ammonia, ethylene, Chloroethane and 1,1,1-trichloroethane oxidation by *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1372-1378.
9. **Janssen, D. B., A. Scheper, L. Dijkhuizen, and L. B. Witholt.** 1985. Degradation of halogenated aliphatic compounds by *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:673-677.

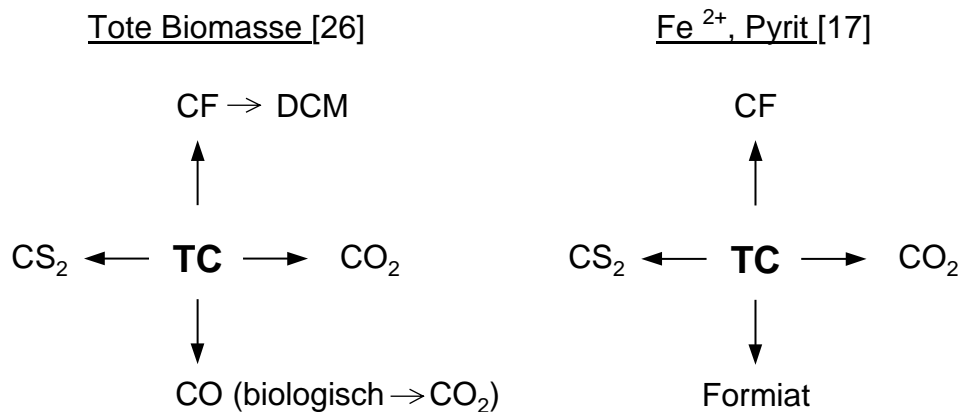
10. **Kästner, M.** 1989. Anreicherung und Isolierung von Chlorkohlenwasserstoffe abbauenden Mikroorganismen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen- Abbaukinetiken und Test auf technische Nutzbarkeit zur Sanierung kontaminierter Grundwässer. Dissertation TU Braunschweig, 217 Seiten.
11. **LFU, Materialien zur Altlastensanierung.** 1991. Handbuch Mikrobiologische Bodenreinigung. Bearbeiter Geller, A., Brauch, H.J., Werner, P., Berberich, G. Hrsg. Landesanstalt für Umweltschutz Baden Württemberg, Karlsruhe, 233 Seiten.
12. **Malachowsky, K. J., T. J. Phelps, A. B. Teboli, D. E. Minnikin, and D. C. White.** 1994. Aerobic mineralization of trichloroethylene, vinyl chloride, and aromatic compounds by *Rhodococcus* species. Appl. Environ. Microbiol. **60**:542-548.
13. **Maymó-Gatell, X., T. Anguish, and S. H. Zinder.** 1999. Reductive dechlorination of chlorinated ethenes and 1,2-dichloroethane by "*Dehalococcoides ethenogenes*" 195. Appl. Environ. Microbiol. **65**:3108-3113.
14. **Oldenhuis, R., R. L. J. M. Vink, D. B. Janssen, and B. Witholt.** 1989. Degradation of chlorinated hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing soluble methane monooxygenase. Appl. Environ. Microbiol. **55**:2819-2826.
15. **Roberts, P. V., L. Semprini, G. D. Hopkins, D. Grbic-Galic, P. L. McCarty, and M. Reinhard.** 1989. In-situ aquifer resoration of chlorinated aliphatics by methanotrophic bacteria. EPA-report 600/2-89/033, 214 pp.
16. **Stucki, G., U. Krebser, and T. Leisinger.** 1983. Bacterial growth on 1,2-dichloroethane. Experientia **39**:1271-1273.
17. **van den Wijngaard, A., K. W. H. J. van der Kamp, J. van der Ploeg, F. Pries, B. Kazemier, and D. B. Janssen.** 1992. Degradation of 1,2-dichloroethane by *Ancylobacter aquaticus* and other facultative methylotrophs. Appl. Environ. Microbiol. **58**:976-983.
18. **van der Ploeg, J., M. P. Smidt, A. S. Landa, and D. B. Janssen.** 1994. Identification of chloroacetaldehyde dehydrogenase involved in 1,2-dichloroethane degradation. Appl. Environ. Microbiol. **60**:1599-1605.
19. **van Hylckama Vlieg, J. E. T., W. de Koning, and D. B. Janssen.** 1996. Transformation kinetics of chlorinated ethenes by *Methylosinus trichosporium* OB3b and detection of unstable epoxides by on-line gas chromatography. Appl. Environ. Microbiol. **62**:3304-3312.
20. **Vogel, T. M., C. S. Criddle, and P. L. McCarty.** 1987. Transformations of halogenated aliphatic compounds. Critical Review. Environ. Sci. Technol. **21**:722-736.
21. **Vogel, T. M., and P. L. McCarty.** 1987. Abiotic and biotic transformations of 1,1,1-trichloroethane under methanogenic conditions. Environ. Sci. Technol. **21**:1208-1213.
22. **Yagi, O., A. Hashimoto, K. Iwasaki, and M. Nakajima.** 1999. Aerobic degradation of 1,1,1-trichloroethane by *Mycobacterium* spp. isolated from soil. Appl. Environ. Microbiol. **65**:4693-4696.

2.1.6 Chlormethane

Annette Geller

2.1.6.1 Abiotische Elimination und biologischer Abbau

Tetrachlormethan (TC) kann, im Gegensatz zu PCE, abiotisch transformiert werden. Endstufen sind CO_2 und das humantoxische Schwefeldioxid (CS_2). Als Katalysatoren dienen Fe^{2+} , Pyrit (FeS_2), in abgestorbener Biomasse (autoklavierte Zellen) enthaltene Bestandteile und anaerob aus Kohlenhydraten, z.B. Fructose, gebildete Säuren wie Acetat und Lactat. Produkte des abiotischen Zerfalls, Chloroform (CF), Dichlormethan (DCM), Formiat und CO , können anaerob bzw. aerob biologisch weiter metabolisiert werden, so daß die Elimination von TC auf dem Zusammenwirken von abiotisch und biologisch katalysierten Einzelschritten beruht [8; 12; 15; 17; 26].



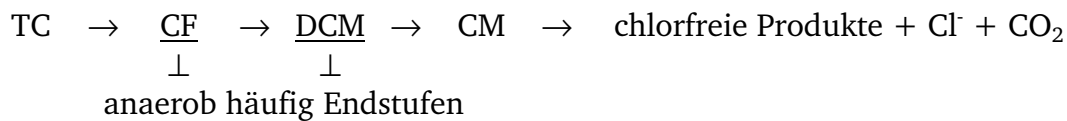
TC wird anaerob nicht nur abiotisch transformiert, sondern auch biologisch reduktiv dechloriert. Die Bildung von CS_2 ist ein Indikator für abiotische Prozesse, die gleichzeitig mit biologisch katalysierten ablaufen können. In einer Feld- und einer anschließenden Laboruntersuchung wurde für die Bildung von CF und CS_2 ein Verhältnis von rd. 2 : 1 gefunden [8]. In autoklaviertem, methanogenem Klärschlamm wurden rd. 80 % des TC abiotisch transformiert, während in lebendem, nicht an TC adaptierten Klärschlamm 65 % des TC reduktiv zu den nachgewiesenen Produkten dechloriert wurde (s. Tab. 2.22) [26]. Biologisch wurden die Produkte des ^{14}C -TC doppelt so schnell gebildet wie abiotisch.

Tab. 2.22: Bilanz des Kohlenstoffs aus ^{14}C -TC nach abiotischer und biotischer Transformation [26]

Verteilung [%]	^{14}C -TC	^{14}C -Produkte				
		Σ CF-CM	CS_2	CO_2	zellgebunden	andere
abiotisch	2	5	51	23	19	0
biologisch	0	6	0	44	15	35

2.1.6.2 Anaerober Abbau

Biologisch wird TC, wie PCE, nur anaerob angegriffen. Methanogene, acetogene, sulfidogene und fakultativ anaerobe Bakterien können die Chlormethane unter methanogenen und nicht-methanogenen Bedingungen reduktiv dechlorieren. Dabei kann TC, wie die Chlorethene, cometabolisch als "Notelektronenakzeptor" oder bei der Dehalorespiration als Energiequelle dienen (Kap. 2.1.3.3). Endstufen der reduktiven Dechlorierung sind CF oder DCM. TC kann aber auch über Monochlormethan (CM) vollständig zu chlorfreien Produkten abgebaut werden.



Als Cosubstrate wurden Methanol, Acetat, Lactat, Fructose und H₂ eingesetzt. Die TC-Konzentrationen in den Versuchen reichten von 7 - 2.000 μM (0,8 - 308 mg/l), während die CF-Konzentrationen mit 0,3 - 10 μM (0,04 - 1,2 mg/l) niedriger waren. TC wurde schneller dechloriert als CF. Während 10 μM (1,5 mg/l) TC in 4 Tagen vollständig transformiert wurden, lag der Zeitbedarf für 10 μM (1,2 mg/l) CF bei 8 Tagen [2; 3; 7; 10; 11; 13; 14; 16; 22; 26; 29].

TC kann auch von denitrifizierenden Bakterien transformiert werden, wobei es sich wohl um eine Ausnahme handelt, denn bei der Prüfung von 6 bzw. 16 Aquiferproben mit Methanol als Cosubstrat wurde nur ein Stamm (*Pseudomonas* sp.) isoliert, der TC unter denitrifizierenden Bedingungen umsetzte [9; 18]. **DCM** und **CM** können im Gegensatz zu *cis*-DCE und VC von strikt anaeroben Bakterien nicht nur als E- sondern auch als C+E-Quelle genutzt werden [2; 4; 19; 20]. **DCM** wurde außerdem bei einer Konzentration von 1 mM (85 mg/l) DCM und 200 mg/l KNO₃ in einer denitrifizierenden Mischkultur aus einem Schadensfall abgebaut und dabei als Wachstumssubstrat genutzt. Bei 2 g/l KNO₃ kam der Abbau zum Stillstand, während Nitrit akkumulierte [16]. Der Frage nach einer (Hemm-) Schwelle von Nitrat für den Abbau von DCM wurde in der späteren Literatur nicht mehr nachgegangen.

Inhibitorische Wirkungen

TC kann sulfidogene und acetogene Bakterien hemmen. **CF** und **DCM** inhibierten methanogene und acetogene Bakterien und die Nitratreduktase in Abhängigkeit von ihrer Konzentration, so daß das Wachstum der Zellen und die Umsetzung der LCKW beeinträchtigt ist [2; 13; 16; 22].

2.1.6.3 Aerober Abbau

Aerob können **CF**, **DCM** und – soweit untersucht – **CM**, wie die Chlorethene, durch Aliphate und Aromaten verwertende Bakterien cometabolisch zu chlorfreien Produkten und CO₂ abgebaut werden. Dabei nimmt die Geschwindigkeit des Abbaus in der Reihenfolge DCM > CF > TCE ab, wie Vergleiche der Einzelsubstanzen zeigten. DCM und CM können zusätzlich oxidativ, hydrolytisch und durch Dehydrodehalogenierung mineralisiert werden (s.

Kap. 2.1.3.2). **DCM** gilt als aerob leicht abbaubar und kann ebenso wie CM und 1,2-DCA als C+E-Quelle genutzt werden. Bei DCM lagen die Konzentrationen in den Versuchen zwischen 0,2 und 10 mM (17 - 850 mg/l) [7; 16; 21; 28; 29].

Inhibitorische Wirkungen

Für **CF** wurde eine Produkthemmung durch Bindung an Zellmaterial festgestellt. Ein weiterer Hinweis auf die Schwierigkeit des Abbaus von CF sind die vergleichsweise niedrigen Konzentrationen von 0,3 - 10 μ M (0,1 - 28 mg/l) in den Versuchen. Beim Vorliegen von Mischkontaminationen kann TCE die Oxidation von CF durch kompetitive Hemmung verhindern [1; 21; 23; 27].

Der Abbau von **DCM** war, bei einer Ausgangskonzentration von 295 μ M (25 mg/l), durch Selbsthemmung (s. Kap. 2.1.4.2, TCE aerob) in einer Mischkultur aus einer Kläranlage ab der Restkonzentration von 12 - 24 μ M (1 - 2 mg/l) DCM verlangsamt [24]. Gehemmt wurde das Wachstum von Bakterien durch Konzentrationen >5 mM (425 mg/l) [5]. 78 mM (6,6 g/l) wirkten toxisch [6]. Als Co-Kontaminanten können 1,2-DCA und 1,1-DCE die Umsetzung von DCM durch Inhibierung der Dehalogenase verhindern [25].

2.1.6.4 Biologisches Selbstreinigungspotential

Bei Grundwasserbelastungen mit **DCM** sind Zunahmen des Gehaltes an Chloridionen und eine Abnahme der Sauerstoffkonzentration in der Grundwasserfahne indikativ für einen biologischen Abbau. Bei **TC** könnte der abiotische Zerfall, der an der Bildung von CS₂ erkennbar ist, eine Rolle spielen. Insgesamt scheinen die Chlormethane, bis auf DCM unter aeroben Bedingungen, persistenter zu sein als Chlorethene und 1,2-DCA.

2.1.6.5 Literatur

1. **Alvarez-Cohen, L., and P. L. McCarty.** 1991. Product toxicity and cometabolic competitive inhibition modeling of chloroform and trichloroethylene transformation by methanotrophic resting cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1031-1037.
2. **Bagley, D. M., and J. M. Gossett.** 1995. Chloroform degradation in methanogenic methanol enrichment cultures and by *Methanosarcina barkeri* 227. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3195-3201.
3. **Bouwer, E. J., and P. L. McCarty.** 1983. Transformations of 1- and 2-carbonhalogenated aliphatic organic compounds under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:1286-1294.
4. **Braus-Stromeyer, S. A., R. Hermann, A. M. Cook, and T. Leisinger.** 1993. Dichloromethane as the sole carbon source for an acetogenic mixed culture and isolation of a fermentative, dichloromethane-degrading bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3790-3797.
5. **Brunner, W., D. Staub, and T. Leisinger.** 1980. Bacterial degradation of dichloromethane. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**:950-958.

6. **Byers, H. K., and L. Y. Sly.** 1993. Toxic effects of dichloromethane on growth of methanotrophic bacteria. *FEMS Microb. Ecol.* **12**:35-38.
7. **Cook, A. M., R. Scholtz und Th. Leisinger.** 1988. Mikrobieller Abbau von halogenierten aliphatischen Verbindungen. *GWF, Wasser, Abwasser* **129**:61-69.
8. **Devlin, J. F., and D. Müller.** 1999. Field and laboratory studies of carbon tetrachloride transformation in a sandy aquifer under sulfate reducing conditions. *Environ. Sci. Technol.* **33**:1021-1027.
9. **Dybas, M. J., G. M. Tatar, and C. S. Criddle.** 1995. Localization and characterization of the carbon tetrachloride transformation activity of *Pseudomonas* sp. strain KC. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:758-762.
10. **Egli, C., R. Scholtz, A. M. Cook, T. Tschan, and T. Leisinger.** 1987. Anaerobic dechlorination of tetrachloromethane and 1,2-dichloroethane to degradable products by pure cultures of *Desulfobacterium* sp. and *Methanobacterium* sp. *FEMS Microbiol. Lett.* **43**:257-261.
11. **Egli, C., R. Scholtz, A. M. Cook, T. Tschan, and T. Leisinger.** 1988. Transformation of tetrachloromethane to dichloromethane and carbon dioxide by *Acetobacterium woodii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:2819-2824.
12. **Egli, C., S. Stromeyer, A. M. Cook, and T. Leisinger.** 1990. Transformation of carbon tetrachloride and chloroform to carbon dioxide by anaerobic bacteria is a non-enzymic process. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**:207-215.
13. **Freedman, D. L., and J. M. Gossett.** 1991. Biodegradation of dichloromethane and its utilization as a growth substrate under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2847-2857.
14. **Gälli, R., and P. L. McCarty.** 1989. Kinetics of bioformation of 1,1,1-trichloroethane, trichloromethane and tetrachloromethane by a *Clostridium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:837-844.
15. **Hashsham, S. A., and D. L. Freedman.** 1999. Enhanced biotransformation of carbon tetrachloride by *Acetobacterium woodii* upon addition of hydroxocobalamin and fructose. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4537-4542.
16. **Kästner, M.** 1989. Anreicherung und Isolierung von Chlorkohlenwasserstoffe abbauenden Mikroorganismen unter verschiedenen physiologischen Bedingungen- Abbaukinetiken und Test auf technische Nutzbarkeit zur Sanierung kontaminierter Grundwässer. Dissertation TU Braunschweig, 217 Seiten.
17. **Kriegman-King, M. R., and M. Reinhard.** 1994. Transformation of carbon tetrachloride by pyrite in aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* **28**:692-700.
18. **Lewis, T. A., and R. L. Crawford.** 1993. Physiological factors affecting carbon tetrachloride dehalogenation by the denitrifying bacterium *Pseudomonas* sp. strain KC. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1635-1641.
19. **Mägli, A., M. Messmer, and T. Leisinger.** 1998. Metabolism of dichloromethane by the strict anaerobe *Dehalobacterium formicoaceticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:646-650.

20. **Mägli, A., F. A. Rainey, and T. Leisinger.** 1995. Acetogenesis from dichloromethane by a two-component mixed culture comprising a novel bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2943-2949.
21. **McClay, K., B. G. Fox, and R. J. Stefan.** 1996. Chloroform mineralization by toluene-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2716-2722.
22. **Mikesell, M. D., and S. A. Boyd.** 1990. Dechlorination of chloroform by *Methanosarcina* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1198-1201.
23. **Oldenhuis, R., R. L. J. M. Vink, D. B. Janssen, and B. Witholt.** 1989. Degradation of chlorinated hydrocarbons by *Methylosinus trichosporium* OB3b expressing soluble methane monooxygenase. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2819-2826.
24. **Rittmann, B. E., and P. L. McCarty.** 1980. Utilization of dichloromethane by suspended and fixed film bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**:1225-1226.
25. **Schneider, V., H. Scholz-Muramatsu und S. Gaiser.** 1988. Hemmung der biologischen Elimination von Dichlormethan durch kontaminiertes Grundwasser. *GWF Wasser Abwasser* **129**: 755-758.
26. **van Eekert, M. H. A., T. J. Schröder, A. J. M. Stams, G. Schraa, and J. A. Field.** 1998. Degradation and fate of carbon tetrachloride in unadapted methanogenic granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2350-2356.
27. **van Hylckama Vlieg, J. E. T., W. de Koning, and D. B. Jansen.** 1996. Transformation kinetics of chlorinated ethenes by *Methylosinus trichosporium* OB3b and detection of unstable epoxides by on-line gas chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3304-3312.
28. **Vannelli, T., A. Studer, M. Kertesz, and T. Leisinger.** 1998. Chloromethane metabolism by *Methylobacterium* sp. strain CM4. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1933-1936.
29. **Vogel, T. M., C. S. Criddle, and P. L. McCarty.** 1987. Transformations of halogenated aliphatic compounds. *Critical Review. Environ. Sci. Technol.* **21**:722-736.

2.1.7 Hexachlorcyclohexane (HCHs)

Annette Geller

Hexachlorcyclohexane (HCHs, $C_6H_6Cl_6$) sind chlorierte Cyclohexane mit acht Stereoisomeren, die je nach Stellung des Chlorsubstituenten mit α - bis ϑ -HCH (alpha- bis theta-HCH) bezeichnet werden. Die anteilmäßig wichtigsten Isomere, die bei der Produktion des Insektizids **Lindan (γ -HCH)** gebildet werden, sind α -, β - und γ -HCH. Lindan wird durch die Chlorierung von Benzol im UV-Licht hergestellt und aus dem Isomerengemisch durch Extraktion mit Methanol isoliert. Die verbleibenden Isomeren können thermisch in Chlorwasserstoff und Trichlorbenzol, das Ausgangsstoff für weitere Produkte ist, gespalten werden.

Lindan, das als Fraß- und Kontaktgift wirkt, war bis zum Anfang der 80er Jahre eines der weltweit am häufigsten verwendeten Insektizide. Es wurde eingesetzt gegen Bodenschädlinge, zur Behandlung von Saatgut, zur Bekämpfung von Parasiten bei Nutztieren, zum Holzschutz und in Insektensprays. **Humantoxikologisch** wurden bei in der Lindanproduktion Beschäftigten keine negativen Wirkungen festgestellt. Lindan und die Nebenprodukte (s. 2.1.7.2, Sanierungspraxis) bilden aufgrund ihrer Persistenz und Ökotoxizität ein Gefährdungspotential; das gilt besonders für ehemaligen Produktionsstätten, speziell in den neuen Bundesländern [6; 9; 11].

Die **HCHs** (molare Masse 200,83 g/mol) sind im Gegensatz zu den LCKW schwer wasserlöslich, kaum flüchtig und persistent. Auf Grund dessen können sie in der Nahrungskette angereichert werden. Im Boden werden sie sorbiert, so daß ein Transport durch Sickerwasser in das Grundwasser nur in geringem Ausmaß stattfindet. HCHs werden durch Photolyse, d.h. in Reichweite der UV-Strahlung des Sonnenlichtes, abiotisch verändert bzw. zersetzt. Das stabilste Isomer ist β -HCH. Einige Eigenschaften sind in Tab. 2.23 aufgeführt.

Tab. 2.23: Einige Eigenschaften der HCHs [8; 9]

	Wasserlöslichkeit bei 20 - 25 °C [mg/l]	Lindanproduktion, Isomere [%]	Biologische Abbaubarkeit
α -HCH	1,59	65 - 70	+
β -HCH	0,32	7 - 10	-
γ -HCH (Lindan)	6,2 - 7,4	14 - 15	+

2.1.7.1 Biologischer Abbau

Die biologische Abbaubarkeit der HCHs wird durch die räumliche Stellung der Chloratome zum Ring beeinflusst. Die Geschwindigkeiten der Umsetzungen werden durch die

2.1.7.2 Sanierungspraxis

Schadensfälle mit HCHs sind Mischkontaminationen, denn mit HCHs belastete Böden enthalten als Co-Kontaminanten Chloraromaten. Diese entstehen bei der Weiterverarbeitung der in der Lindanproduktion anfallenden HCH-Isomere. Neben 1,2,4-Trichlorbenzol, das auch biologisch gebildet werden kann, wurden u.a. 1,2,3,4-Tetra-, Penta- und Hexachlorbenzol nachgewiesen [4; 7].

Lindanproduktion mit Aufarbeitung der HCH-Isomeren

In einem Zweigwerk der Firma Boehringer bei Hamburg wurden ab 1951 HCHs produziert und daraus Lindan gewonnen. Aus den Abfall-Isomeren wurde ab 1953 durch thermische Zersetzung 1,2,4-Trichlorbenzol hergestellt, das (I.) zu 2,5-Dichlorphenol und 2,5-Dibromphenol und (II.) zu 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol weiterverarbeitet wurde. Aus letzterem wurde das Herbizid 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure hergestellt. Bei der thermischen Spaltung der HCHs werden als Nebenprodukte polychlorierte Dioxine (PCDDs) und -Furane (PCDFs) gebildet. Bei der Herstellung von 2,4,5-Trichloressigsäure fiel das "Seveso Gift" 2,3,7,8-TCDD an. Daher wurden die Lindan- und Folgeproduktionen 1984 bzw. 1983 eingestellt.

Die **Erkundung** zeigte, daß der Boden des Werksgeländes (80.000 m²) mit Chlorbenzolen, HCHs und Chlorphenolen verunreinigt war, wobei ihre Konzentration in 88 % der untersuchten 2.652 Bodenproben unter 10 mg/kg TS lag. PCDDs, speziell 2,3,7,8-TCDD, und PCDFs wurden fast nur auf oder nahe der Oberfläche gefunden. In einem Fall, in dem wahrscheinlich in hohen Konzentrationen vorliegende **Chlorbenzole als Lösungsvermittler** dienten und so einen Co-Transport ermöglichten, wurden 0,098 µg/kg TS TCCD in rd. 5 m Tiefe nachgewiesen. Das Grundwasser enthielt HCHs und Chlorphenole im µg/l-Bereich; die Konzentrationen der Chlorbenzole waren (ein bis) zwei Zehnerpotenzen höher. Die hoch belasteten Bereiche des Bodens wurden ausgekoffert und thermisch gereinigt [7]. Das Grundwasser wurde später biologisch behandelt (s. Kap. 2.1.8.1 Sanierungspraxis).

Biologischer Abbau von chlorierten Aromaten in Feststoffen

In einem F+E-Projekt sollte ein mikrobiologisches Verfahren zum Abbau von PCBs, PCDDs, PCDFs und HCHs in Böden entwickelt werden. Real kontaminierte Materialien aus dem Bitterfelder Raum wurden mit einer synthetischen Mischkultur aus sechs Bakterienstämmen behandelt. Die Kultur wurde, nach Wachstum in sehr nährstoffreichem Medium, in der Absterbephase zusammen mit der Fermentationslösung in den Boden eingebracht. Der Verbleib der HCHs wurde in der Regel anhand der Veränderungen ihrer Konzentrationen verfolgt [4; 5].

Laboruntersuchungen mit α -, β - und γ -HCH zeigten, daß die Mischkultur die HCHs nicht umsetzte. Einer der Bakterienstämme enthielt ein sporenbildendes Begleitbakterium, das sich nur vermehrte wenn die übrigen Bakterien abgetötet waren. Dieser Stamm baute α -HCH und γ -HCH aerob in Reinkultur schnell ab; β -HCH wurde nicht angegriffen. In 30 Tagen nahm α -HCH bei einer Ausgangskonzentration von 212 mg/l um 98 % und γ -HCH (932 mg/l) um 80 % ab. Die Bildung des jeweils ersten Produktes des aeroben Abbaus, α - und γ -Pentachlorcyclohexen, wurde nachgewiesen; die Fähigkeit zum anaeroben Abbau wurde nicht geprüft. Der Einfluss der Mischkulturen und der Fermentationslösung auf den Verbleib von α -HCH und β -HCH wurde in Proben aus drei unterschiedlich hoch belasteten Böden verglichen.

- In einem Boden, der fast ausschließlich β -HCH enthielt, wurde keines der Isomere angegriffen.
- In Proben des zweiten Bodens (86 mg/kg TS α -HCH, 13 mg/kg TS β -HCH, ca. 60 mg/kg TS Chlorbenzole), der nur **aerob** inkubiert wurde, setzte ein Abbau des α -HCH zwischen 2 und 4,7 Monaten ein. Nach 4,7 Monaten lag die Restkonzentration von α -HCH in den behandelten Ansätzen bei 38 % und in den nur mit Wasser versetzten Kontrollen bei 12 %; β -HCH wurde nicht umgesetzt.
- In den Proben des dritten, hoch mit α -HCH belasteten, aerob und anaerob inkubierten Bodens wurde das Isomer dagegen **nur anaerob** umgesetzt. Die Abnahme lag über 80 %. Auch hier wurde β -HCH nicht angegriffen.

Das zeitlich stark verzögerte Einsetzen des Abbaus von α -HCH zeigt, daß die Eliminierung des α -HCH auf standorteigene in den Proben enthaltene Bakterien, die das Isomer aerob bzw. nur anaerob umsetzen, zurückzuführen ist. Probleme der Bodenvorbereitung und Analytik wurden ausgeräumt, so daß die dargestellten Ergebnisse auf statistisch zuverlässigen Meßwerten beruhen ([4] Anlage Analytische Untersuchungen).

Gas/Feststoff-Wirbelschicht-Bioreaktor zur Bodensanierung

In einem F+E-Projekt wurden zur Erprobung des Verfahrens neben mit MKW belasteten auch mit HCHs belastete Böden eingesetzt. Die Gesamtabbauleistung war schlecht. Nur β -HCH wurde schon innerhalb von 23 Stunden von 600 auf 500 mg/kg TS "abgebaut". Nach der insgesamt einjährigen Behandlung hatten die HCHs um 20 % abgenommen. Es ist nicht klar, ob diese Abnahmen auf nicht-biologischen Prozessen und/oder Schwankungen der Meßwerte in den Bodenproben beruhen, da Angaben zur Meßgenauigkeit fehlen [3].

Zusammenfassung

Die Ergebnisse der Praxisbeispiele zeigen, daß β -HCH biologisch nicht abgebaut wurde. Das Vorhandensein von Bakterien im Boden, die die weiteren Isomere des HCH umsetzen, ist der entscheidende Faktor für eine signifikante Eliminierung. Dabei ist anscheinend das Zufallsprinzip wichtig, nach dem einmal aerob und einmal anaerob α -HCH umsetzende Mikroorganismen das Geschehen bestimmen. Die für eine biologische Sanierung wichtige Frage, ob die abbaubaren HCH-Isomeren besser anaerob oder aerob und zu welchen Endprodukten umgesetzt werden können, läßt sich auch anhand der vorliegenden Ergebnisse aus der Praxis nicht beantworten.

2.1.7.3 Literatur

1. **Bachmann, A., P. Walet, P. Wijnen, W. de Bruin, J. L. M. Huntjens, W. Roelofsen, and A. J., Zehnder.** 1988. Biodegradation of alpha- and beta-hexachlorocyclohexane in a soil slurry under different redox conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:143-149.

2. **Bachmann, A., W. de Bruin, J. C. Jumelet, H. H. N. Rijnaarts, and A. J., Zehnder.** 1988. Aerobic biomineralization of alpha-hexachlorocyclohexane in contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:548-554.
3. **Behns, W., K. Friedrich und H. Haida.** 1998. Nutzung des Gas/Feststoff-Wirbelschicht-Bioreaktors in der mikrobiologischen Bodensanierung. *Chem. Ing. Techn.* **70**:421-427.
4. **Fieseler, C., A. Geller, B. Glied, S. Johne, H.-P. Kohler, H. Köhler, C. Naumann, B. Noll, H. Raschke und A. J. Zehnder.** 1996. Biologischer Abbau von chlorierten Aromaten in Feststoffen. Forschungsprojekt 1450894 2 des BMFT, Abschlußbericht.
5. **Fieseler, C., A. Geller, B. Glied, S. Johne, H.-P. Kohler, H. Köhler, C. Naumann, B. Noll und H. Raschke.** 1997. Biologischer Abbau von chlorierten Aromaten in Feststoffen. *Altlasten Spektrum* **1/97**:9-14.
6. **Haider, K.** 1996. *Biochemie des Bodens.* Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 174 Seiten.
7. **Jürgens, H.-J., R. Roth und H. Schlesing.** 1988. Fallstudie und Vorschläge zur Dekontamination des Geländes einer stillgelegten Herbizidfabrik. In: *Contaminated Soil '88.* Wolf, K., van den Brink, W., J., and Colon, F. J. Eds. Kluwer Academic Publishers, Seite 1067-1073.
8. **Rippen, G.** *Handbuch Umweltchemikalien.* Loseblattsammlung, ecomed Verlag, Landsberg/Lech.
9. **Römpp Lexikon Umwelt.** 1993. Hrsg. H. Hulpke. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
10. **Sahu, S. K., K. K. Patnaik, M. Sharmila, and N. Sethunathan.** 1990. Degradation of alpha-, beta-, and gamma-hexachlorocyclohexane by a soil bacterium under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3620-3622.
11. **Scheffer/Schachtschabel.** 1989. *Lehrbuch der Bodenkunde.* 12., neu bearbeitete Auflage von Schachtschabel, P., Blume, H.P., Brümmer, G., Hartge, K.-H., and U. Schwertmann. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 491 Seiten.

2.1.8 Chloraromaten

Annette Geller

Die unter dem Oberbegriff Chloraromaten zusammengefaßten Stoffgruppen, **Chlorbenzole, Chlorphenole, polychlorierte Biphenyle, Dioxine, Furane** und die chemisch heterogene Gruppe der **Organochlorpestizide** umfassen ein Spektrum von einzelnen für eine biologische Sanierung geeigneten bis ungeeigneten Verbindungen. Mit zunehmender Zahl der Chloratome steigt die Anzahl der Isomere (Verbindungen mit unterschiedlicher Struktur - und dadurch unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften - bei gleicher Summenformel). Wie bei den PAK sind auch hier den chemischen Einzelstoffanalysen aus Kostengründen Grenzen gesetzt.

Innerhalb einer Stoffgruppe nehmen Flüchtigkeit, Wasserlöslichkeit und Mobilität mit zunehmendem Grad der Chlorierung ab; die Persistenz und die Stabilität der Stoffe nimmt zu. Die hochchlorierten Aromaten verbleiben in oberflächennahen Schichten des Bodens und können nur, wie die höher bis hoch kondensierten PAK, durch Co-Transport in tiefere Bodenschichten gelangen, wobei Co-Kontaminanten als Lösungsvermittler dienen. Ein wichtiger Verbreitungsmechanismus ist der Lufttransport mit Bodenpartikeln durch Wind. Aufgrund ihrer Persistenz sind Chloraromaten ubiquitär nachweisbar, auch wenn ihre Produktion eingestellt und ihr Einsatz in den OECD-Ländern schon längerfristig verboten ist.

Die Zahl der Chloraromaten mit nachgewiesenem Gefahrenpotential ist relativ hoch. Allgemein und/oder altlastenrelevante, persistente ökotoxikologisch oder humantoxikologisch bedenkliche Schadstoffe sind Hexachlorbenzol (HCB) und Pentachlorphenol (PCP) (s. Kap. 2.1.8.1), Polychlorierte Biphenyle (PCBs) (s. Kap. 2.1.8.2), polychloriertes Naphthalin (PC-Naphthalin), sowie polychlorierte Dioxine und Furane (PCDDs, PCDFs) (s. Kap. 2.1.8.3). Bei den Organochlorinsektiziden ist es speziell DDT mit seinen Derivaten und bei den Herbiziden die relativ persistente 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (2,4,5-T) und das im Vietnamkrieg zur Entlaubung eingesetzte "Agent Orange" mit seinen humantoxischen Verunreinigungen (s. Kap. 2.1.8.3). Die lipophilen Stoffe werden von Organismen gespeichert und reichern sich in der Nahrungskette an [37; 46; 50; 51; 56; 59; 71].

Die Chloraromaten verhalten sich in ihrer aeroben und anaeroben Abbaubarkeit und den Mechanismen der Dechlorierung im Prinzip wie LCKW. Unterschiede sind durch das aromatische Grundgerüst und das Vorhandensein von Hydroxyl- und Carboxylgruppen bedingt. Bei der Beziehung zwischen Wasserlöslichkeit und Bioverfügbarkeit ergeben sich in Hinblick auf den biologischen Abbau die gleichen Probleme wie bei den PAK (s. Kap. 2.1.2).

2.1.8.1 Chlorbenzole und Chlorphenole

Eigenschaften

Die niedriger chlorierten **Chlorbenzole** sind mit 460 mg/l (MCB) bis 30 mg/l (1,2,4-TCB) noch relativ gut wasserlöslich, während HCB mit 8 µg/l fast unlöslich ist. MCB, 1,2- und 1,3-DCB sind flüssig und stripbar (s. Tab. 2.24). Ab 1,2,4-TCB sind mögliche Verluste durch Ausgasen vernachlässigbar. Die Chlorbenzole sind im Dunklen stabil und können im Boden

durch Sorption irreversibel festgelegt werden. Die **Chlorphenole** sind dagegen aufgrund ihrer Hydroxylgruppe gut wasserlöslich. Selbst die Wasserlöslichkeit des am höchsten chlorierten Phenols, PCP, liegt noch im mg/l Bereich (s. Tab. 2.25). Die Flüchtigkeit der Chlorphenole ist unbedeutend. Sie können durch Sorption an Partikel festgelegt und durch Auswaschen wieder freigesetzt werden. Huminstoffe und Biomasse, z.B. Bakterienzellen, können Chlorphenole binden. Innerhalb der höher chlorierten Phenole kann Photolyse, speziell bei PCP, einen biologischen Abbau erleichtern [53; 68].

Tab. 2.24: Physikalisch-chemische Eigenschaften einiger Chlorbenzole [50; 53; 71]

Name	Abkürzung	Molekulargewicht	Wasserlöslichkeit [mg/l]	Dampfdruck bei 20 °C [Pa]
Monochlorbenzol ³	MCB ¹	112,56	460	1310
1,2-Dichlorbenzol ³	1,2-DCB ¹	147,01	130	150
1,3-Dichlorbenzol ³	1,3-DCB	147,01	121	220
1,4-Dichlorbenzol	1,4-DCB ¹	147,01	73	114
1,2,4-Trichlorbenzol	1,2,4-TCB ^{1,2}	181,45	30	31
Hexachlorbenzol	HCB ²	284,78	8×10^{-3}	$1,1 \times 10^{-3}$

¹ technisch relevante Stoffe

² altlastenrelevante Stoffe (plus 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol (1,2,4,5-TTCB))

³ flüssig bei 25°C

Tab. 2.25: Physikalisch-chemische Eigenschaften einiger Chlorphenole [50; 53]

Name	Abkürzung	Molekulargewicht [g/mol]	Wasserlöslichkeit [mg/l]	Dampfdruck bei 20 °C [Pa]
2-Monochlorphenol	2-CP (o-CP) ¹	128,56	29000	230
3-Monochlorphenol	3-CP (m-CP)	128,56	26000	ca. 30
4-Monochlorphenol	4-CP (p-CP) ¹	128,56	27000	13
2,4-Dichlorphenol	2,4-DCP ^{1,2}	163,00	4400	8,6
2,4,5-Trichlorphenol	2,4,5-TCP ^{1,2}	197,45	1200	< 1
2,4,6-Trichlorphenol	2,4,6-TCP	197,45	420	0,73
Pentachlorphenol	PCP ²	266,34	19	$8,8 \times 10^{-3}$

¹ technisch relevante Stoffe

² altlastenrelevante Stoffe

Herkunft

Chlorbenzole und Chlorphenole werden zur Herstellung von Farben, Pestiziden, Holzschutz- und Imprägnierungsmitteln u.a. verwendet. Außerdem können sie, wie auch PCDD und PCDF (s. Kap. 2.1.8.3), als Zwischen- oder als Nebenprodukte der chemischen Produktion anfallen. Stoffe von technischer Bedeutung sind in Tab. 2.24 und 2.25 mit '1' und in Altlasten relevante Stoffe [50; 71] mit '2' gekennzeichnet. Obwohl die Lindanproduktion und der Einsatz von chlorphenolhaltigen Holzschutzmitteln verboten sind, bilden sie und ihre Nebenprodukte einen Schadstoffpool über den Tab. 2.26 eine Übersicht gibt. Abhängig von der Produktpalette können fast alle der möglichen Isomere der Chloraromaten auch gleichzeitig auftreten (s. Abschnitt Sanierungspraxis).

Tab. 2.26: Chloraromaten als Produkte und Nebenprodukte der chemischen Industrie

Holzschutzmittel: Chlorphenole, technisches Gemisch	
<u>Hauptkomponenten</u>	<u>Hauptverunreinigungen</u>
PCP 2,3,4,6-TTCP	2,4,5-TCP 2,4,6-TCP 2,4-DCP 2,6-DCP
Insektizid: Lindan (γ-HCH)	
<u>Produkt</u>	<u>Nebenprodukte</u>
γ -HCH	α -, β -, δ -, ϵ -HCH thermische Zersetzung \rightarrow HCB, PCP, 1,2,3,4-TTCB 1,2,4-TCB Weiterverarbeitung \downarrow 1,2,4,5-TTCB und 2,5 DCP daraus Produkt \downarrow 2,4,5-T
Herbizide: 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (2,4,5-T)	
<u>Produkte</u>	<u>Nebenprodukte</u>
2,4-D 2,4,5-T	2,4-DCP Nebenprodukt bei der Herstellung und Zwischenprodukt des aeroben Abbaus PCDDs inklusive 2,3,7,8-TCDD, PCDFs und andere

Toxizität

Die toxische Wirkung auf Mikroorganismen ist ein, bei den Chlorbenzolen und besonders bei den Chlorphenolen, wichtiger Faktor für die biologische Sanierung. Nach [51; 52; 47] wurden HCB, PCP und 2,4,6-TCP als Fungizide und 2-, 3- und 4-CP als Fungizide und Bakterizide verwendet. Auch für weitere Chlorbenzole und Chlorphenole wurden unter verschiedenen Bedingungen konzentrationsabhängige inhibitorische Wirkungen auf Mikroorganismen festgestellt. Durch reversible Bindung an Zuschlagstoffe oder Trägermaterialien in Bioreaktoren kann die toxische Konzentration von Chlorphenolen in Lösung auf nicht mehr inhibitorische Werte abgesenkt werden [57].

Anaerober Abbau

Chlorbenzole und Chlorphenole werden anaerob wie die LCKW durch reduktive Dechlorierung transformiert (s. Kap. 2.1.3.3). **Hexa- und Pentachlorbenzol** werden **nur anaerob** angegriffen, während die niedriger chlorierten Benzole zunehmend besser aerob abgebaut und als C+E-Quelle genutzt werden können (s. Tab. 2.27). Im Gegensatz zu den Chlorbenzolen wird schon das am höchsten chlorierte Phenol, **Pentachlorphenol**, aufgrund seiner Hydroxylgruppe als Angriffspunkt **auch aerob** mineralisiert.

Nach den vorliegenden Arbeiten, die überwiegend vor 1995 publiziert wurden, liegt der Schwerpunkt des anaeroben Abbaus von Chlorbenzolen und Chlorphenolen auf der **cometabolischen reduktiven Dechlorierung** [1; 13; 19; 26; 27; 32; 33; 39; 40; 42; 43; 49; 82]. Als Cosubstrate (e⁻ Donoren, s. Kap. 2.1.3.3, anaerober Abbau und Kap. 2.1.3.4, Stoffverwertungskette) wurden von den anaeroben Bakteriengemeinschaften Sucrose, Glucose, Galactose, Hefeextrakt, Pepton, Aminosäuren, Lactat, Ethanol, Isopropanol, Butyrat, Pyruvat, Acetat und Formiat genutzt. Die Autoren betonen die Bedeutung aufeinander eingespielter Gemeinschaften (Consortien) für einen möglichst weitgehenden Abbau. In neueren Arbeiten wurde auch die mit der **Dehalorespiration** verbundene reduktive Dechlorierung von Chloraromaten, z.B. 2-CP [38] und niedrig chlorierten Benzolderivaten [11; 51], nachgewiesen.

Systematische Untersuchungen zu den Bedingungen der reduktiven Dechlorierung der Chlorbenzole und Chlorphenole, analog den mit PCE durchgeführten (s. Kap. 2.1.4.1), sind selten. Überwiegend wurde der Verbleib niedrig(er) chlorierter Verbindungen untersucht. Nach den vorliegenden Ergebnissen werden die Stoffe unter **methanogenen** [19; 20; 39; 43; 49; 66] und **nicht-methanogenen** Bedingungen transformiert (s. Abb. 2.7: 1,2,4-CB, 1,4-CP), [1; 13; 26; 27; 39; 42]. Die Befunde zur reduktiven Dechlorierung unter **sulfat-reduzierenden** Bedingungen sind nicht einheitlich. Es wurde sowohl eine Hemmung der Umsetzungen durch Sulfat [1; 33; 40] als auch Dechlorierung nachgewiesen [22; 23]. Die Frage nach Möglichkeiten und Grenzen der Umsetzung von Chlorbenzolen und -Phenolen unter **denitrifizierenden Bedingungen** ist noch offen.

Bei der reduktiven Dechlorierung der Chlorbenzole und Chlorphenole entstehen Zwischenprodukte deren Vielfalt auf den ersten Blick verwirrend ist. Einige dieser Verbindungen sind gleichzeitig Produkte der mikrobiellen Transformation und der chemischen Industrie (s. Tab. 2.26 und Abb. 2.7). Der Vergleich der Wege der reduktiven Dechlorierung der Chlorbenzole und Chlorphenole zeigt, daß Chlor bevorzugt in *meta*- bzw. *ortho*-Stellung abgespalten wird. Aus Pentachlorbenzol und -phenol entstehen Tetra- und Trichlorbenzole und -phenole mit dem gleichen Verteilungsmuster der Chloratome (s. Abb. 2.7).

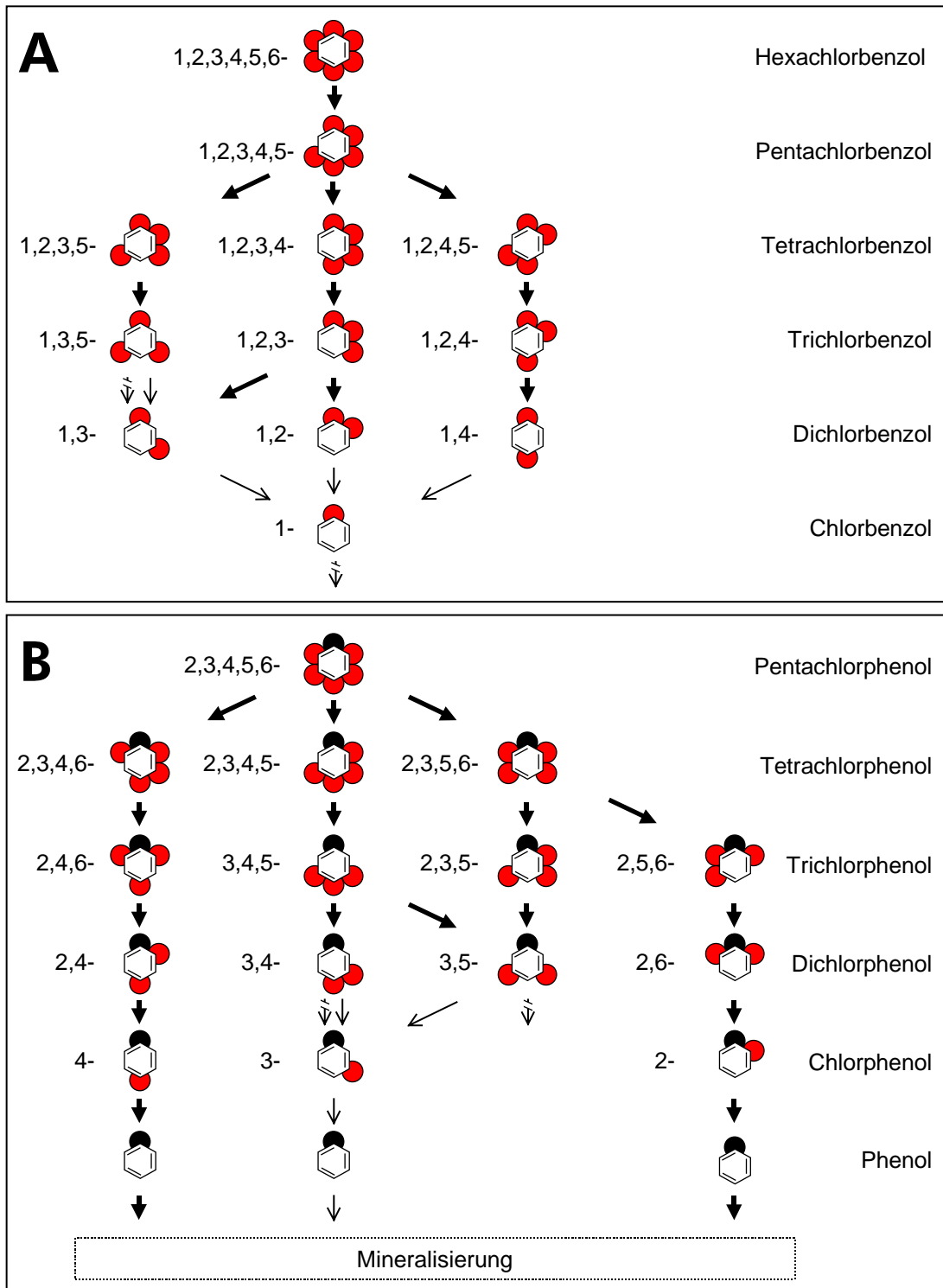


Abb. 2.7: Vergleich der Muster der sequentiellen reduktiven Dechlorierung der Chlorbenzole (A) und Chlorphenole (B). Numerierung: nur Chlorsubstituenten, (●) Chloratom, (●) OH-Gruppe, (→) häufig nachgewiesene Sequenzen der reduktiven Dechlorierung, (→) Dechlorierung schwierig oder selten, (↘) keine weitere Dechlorierung. Literatur: A: [13; 27; 49], B: [26; 43; 66]

Bei den **Chlorbenzolen** zeigen die entstehenden Lücken, daß verbliebene, vereinzelt am Molekül stehende Chloratome von Consortien weniger geschätzt werden. Bei den **Chlorphenolen** spiegelt sich der Einfluss der Hydroxylgruppe ab den Trichlorverbindungen wieder. Es werden mehr, und weiter abbaubare Produkte gebildet als bei den Chlorbenzolen.

Unter den Wegen der sequentiellen Abspaltung von Chlor aus HCB und PCP gibt es bevorzugte Routen (dicke Pfeile (➔), Abb. 2.7). Heterogen zusammengesetzte Bakteriengemeinschaften aus Materialien wie Klärschlammgranulat können aber auch Subpopulationen enthalten, die zusätzlich Nebenwege einschlagen [26]; PCP wurde zum einen mit Glucose reduktiv über das zentrale Zwischenprodukt 2,3,5,6-TTCP zu chlorfreien Produkten (85 - 90 %) abgebaut und zum anderen zu 3,5-DCP (10 %) dechloriert.

Bei der Mineralisierung der Chlorphenole ist Phenol das erste chlorfreie Produkt. Es wurde methanogen weiter zu $\text{CO}_2 + \text{CH}_4$ [20] und sulfidogen zu $\text{CO}_2 + \text{S}^{2-}$ [22] metabolisiert. 2,4-DCP wurde durch ein methanogenes Consortium aus mindestens fünf Bakterienstämmen auf folgendem Weg mineralisiert: 2,4-DCP → 4-CP → Phenol → Benzoat → Acetat → $\text{CO}_2 + \text{CH}_4$ [82]. In einer methanogenen Bakteriengemeinschaft eines Sedimentes wurde aus 2-CP zusätzlich als erstes Zwischenprodukt 3-Chlorbenzoat gebildet, das zu Benzoat dechloriert wurde [6].

Aerober Abbau

Bakterien: Die Chlorbenzole und Chlorphenole können aerob entweder als C+E-Quelle genutzt, oder auch cometabolisch umgesetzt werden. Sie sind schlechter abbaubar als ihre Grundbausteine Benzol und Phenol. Voraussetzung für eine Mineralisierung von Chloraromaten ist die Fähigkeit der Bakterien die Aromaten oder ihre Spaltprodukte zu dechlorieren und abzubauen. Der Schwerpunkt der Untersuchungen zur Mineralisierung lag auf Mono- und Dichlorbenzolen und -Phenolen sowie PCP, das anscheinend aerob besser abgebaut wird als anaerob. Im Gegensatz zum anaeroben Abbau, in dem Bakteriengemeinschaften bzw. Consortien eine zentrale Rolle spielen, können die Chloraromaten aerob durch Reinkulturen auf zwei Wegen mineralisiert werden, durch:

Weg 1: hydrolytische, oxygenolytische und reduktive Dechlorierung (s. Kap. 2.1.3, Tab. 2.14)
vor der Ringspaltung (z.B. PCP),

Weg 2: Dechlorierung **nach der Ringspaltung** (z.B. Mono- bis Tetrachlorbenzole, Chlorphenole, Chlorbenzoate, Chloraniline und Chlorphenoxyacetate (z.B. Herbizid 2,4-D)).

Die aerobe reduktive Dechlorierung (Weg 1) ist im Gegensatz zur sequentiellen, anaeroben reduktiven Dechlorierung nur ein zwischengeschalteter Schritt (Einzelheiten der Abbauewege und dabei umgesetzte Chloraromaten siehe [18; 51; 56; 60]). Beim Abbau auf dem zweiten Weg, der nach der Anzahl der umgesetzten Stoffgruppen der wichtigere ist, sind chlorierte Brenzcatechine (= chlorierte o-Dihydroxybenzole) Ausgangspunkte für die Ringspaltung [45; 63]. Nach der Spaltung des Ringes zwischen den beiden Hydroxylgruppen entstehen die entsprechenden Chlormuconsäuren als erstes aliphatisches Produkt. Wenn die für die Ringspaltung benötigten Enzyme durch die Stellung der Chloratome sterisch behindert werden, akkumulieren Chlorbrenzcatechine. Sie können durch Autoxidation zu nicht mehr abbaubaren, dunkelgefärbten Polymeren kondensieren. Die während der Autoxidation gebildeten Anfangsprodukte sind toxisch für Bakterien [31; 51].

Die **Mineralisierung** von Chlorbenzolen (s. Tab. 2.27) und Chlorphenolen wurde durch Reinkulturen und in Proben aus belastetem und unbelastetem Milieu unter Laborbedingungen nachgewiesen. Der Einfluß von Böden auf den Abbau von 1,2,4,5-TTCB durch *Pseudomonas* sp., Stamm PS 14, der sogar diesen Stoff aerob schnell mineralisiert, wurde in einer exemplarischen Untersuchung mit dem Stamm und ¹⁴C-1,2,4,5-TTCB geprüft [16]. Die Ergebnisse zeigen, daß schon unbelastete Böden die Mineralisierung beeinflussen. Eine Belastung der Böden wirkte sich zusätzlich zur Bodenart negativ aus (s. Tab. 2.28). Pentachlorphenol wurde von verschiedenen Bakterien-Reinkulturen [41; 64; 67] in mit PCP kontaminierten Boden- und Gewässerproben [36; 41; 68] und in einem Gemisch von Stroh und Kompost, das reich an Actinomyceten war, mineralisiert [34]. Die Geschwindigkeit der Mineralisierung der Chlorbenzole und Chlorphenole nimmt mit abnehmender Zahl der Chloratome zu, wobei sich die Isomeren in ihrer Abbaubarkeit unterscheiden. Das anaerob persistierende 1,3,5-TCB (s. Abb. 2.7) scheint auch aerob refraktär zu sein [58; 81].

Tab. 2.27: Aerobe Mineralisierung von ¹⁴C-Chlorbenzolen durch Bakterienstämme

Bakterienstamm	¹⁴ C-Chlorbenzol					Lit.
	1,2,4,5-TTCB	1,2,4-TCB	1,2-DCB	1,4-DCB	MCB	
<i>Pseudomonas</i> sp.						
Stamm PS 14	+	+	+	+	+	[58]
Stamm PS 12		+	+	+	+	[58]
<i>Pseudomonas</i> sp.			+	+	+	[24]
<i>Pseudomonas</i> sp.			+	+	+	[25]
<i>Pseudomonas putida</i>				+	+	[64]
<i>Xanthobacter flavus</i>				+	+	[65]

Aus **Chlorphenolen** können durch **Umbau** Chloranisole entstehen. Chloranisole sind Chlormethoxybenzole, die durch Bodenbakterien und Actinomyceten produziert werden (Biomethylierung: R-OH → R-OCH₃). Aus PCP entsteht Pentachloranisole (PCA), das persistenter, aber flüchtiger ist als PCP. Wenn PCP mineralisiert wird, ist die Abnahme durch Chloranisolbildung prozentual unbedeutend (< 10 %). Wenn PCP jedoch nicht abgebaut wird, gewinnt dieser Eliminationspfad an Bedeutung [34; 57; 68].

Tab. 2.28: Einfluß von Böden auf die Mineralisierung von ^{14}C -1,2,4,5-Tetrachlorbenzol durch *Pseudomonas* sp. Stamm PS 14 [16].

Boden	Bodenart [%]			Dominierende Belastung [g/kg TS Boden]	Mineralisierung [% $^{14}\text{CO}_2$ in 10 d]
	T	U	S		
Sandiger Standardboden	4	21	75	unbelastet	75
Kalkmarsch	16	70	14	unbelastet	69
Braunerde	5	16	79	unbelastet	67
NBZ	5	15	80	Kohlenwasserstoffe: 1,6	35
CV	1,5	5,5	93	Phenolindex: 4,9	7
BHO	7	28	66	PAK: 3,3	4

T: Ton; U: Schluff; S: Sand

Pilze: Lignin abbauende Pilze können nicht nur PAK, sondern auch **Chloraromaten** cometabolisch transformieren, einschließlich der als fungizide Holzschutzmittel dienenden Chlorphenole. Die Untersuchungen wurden häufig mit dem "Modell"-Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* (s. Kap. 2.1.2.1) oder direkt mit Lignin-oxidierenden Enzymen durchgeführt [3; 10; 28; 35; 51; 68; 79]. Chloraromaten können wie die PAK (s. Kap. 2.1.2.1) zu Chinonen und in geringem Umfang auch zu CO_2 oxidiert, dechloriert sowie durch Konjugation und Polymerisation in höhermolekulare Verbindungen, u. a. polychlorierte Dioxine/Furane [8], umgewandelt werden. Wie bei den Bakterien werden aus **Chlorphenolen** in unterschiedlichem Ausmaß **Chloranisole** gebildet, die akkumulieren. Für Pilze ist die Bildung von Pentachloranisol aus Pentachlorphenol eine Reaktion zum **Selbstschutz**, durch die sie dieses Fungizid entgiften können.

Die Frage nach der Relevanz von Ergebnissen, die in Modelluntersuchungen mit "besonders geeigneten" Reinkulturen erhalten werden, wird selten gestellt. Für **Weißfäulepilze** wurde diese Frage in einer vergleichenden Untersuchung mit **PCP** und sieben Pilzarten, davon sechs *Phanerochaete* sp. einschließlich *Phanerochaete chrysosporium* geprüft. Als Indikator für die Wirkung des PCP diente die Länge der Mycelien ("Pilzwurzeln") [35]. Das Wachstum von fünf der Arten wurde bei einer Konzentration von 5 ppm PCP vollständig gehemmt. Nur *Phanerochaete chrysosporium* und *Phanerochaete sordida* wuchsen noch, wenn auch schlechter, bei einer Konzentration von 25 ppm PCP. Diese beiden "resistenten" Stämme entgifteten PCP durch die Bildung von 64 bis 71 % Pentachloranisol, das weitgehend akkumulierte, und transformierten weitere 3 bis 10 % des PCP zu nicht identifizierten Produkten.

Konsequenzen für die Sanierungspraxis

Schadensfälle mit Chlorbenzolen und Chlorphenolen sind oft Mischkontaminationen, die unterschiedlich hoch chlorierte Aromaten enthalten (s. Tab. 2.26). Hexa- und Pentachlorbenzol können nur anaerob angegriffen werden. Auch die Isomere des Tetrachlorbenzols werden anaerob besser umgesetzt. Ob Schadensfälle mit Tetra- und Trichlorbenzolen besser anaerob, aerob oder in anaerob/aerob Verfahren behandelt werden, sollte individuell in

Voruntersuchungen geklärt werden. Das gleiche gilt für die Penta- bis Trichlorphenole, wobei das Vorliegen von nicht toxischen Konzentrationen eine Grundvoraussetzung ist. Die positiven Befunde der Literatur zur aeroben Mineralisierung von Chlorbenzolen und Chlorphenolen sind noch keine Erfolgsgarantie für die Praxis, denn der Abbau der Chloraromaten ist oft unvollständig. Zusätzlich können Bodentyp und Co-Kontaminanten die Umsetzung von Chloraromaten negativ beeinflussen (s. Tab. 2.28 [16]).

Die durch die Wasserlöslichkeit (s. Tab. 2.24) eingeschränkte Bioverfügbarkeit der Chlorbenzole ist ein zusätzliches Hindernis. Auch das Chlorphenol PCP wurde trotz der bedeutend besseren Wasserlöslichkeit (s. Tab. 2.25) in Laboruntersuchungen durch Biomasse sorbiert und so dem Abbau entzogen [34; 68]. Ein Vergleich der Umsetzung von frisch dotiertem ^{14}C -PCP und im Boden schon vorhandenem PCP zeigte, daß die Abbaubarkeit der Chloraromaten in Altschäden, wie bei den PAK, signifikant verschlechtert sein kann [57]. Das Alter eines Schadens kann jedoch auch bewirken, daß sich eine Mikroorganismengemeinschaft entwickelt, die persistente Chloraromaten unter verbesserten Bedingungen *in-situ* vollständig umsetzen kann [69]. Die Frage nach den Grenzen des Einsatzes von Pilzen bei Fungiziden beantwortet sich von selbst.

Sanierungspraxis

Als Folge der Lindanproduktion und der damit verbundenen Herstellung von chlororganischen Produkten waren Boden und Grundwasser des Geländes der Firma Boehringer bei Hamburg mit Chlororganika verunreinigt (Vorgeschichte und erste Maßnahmen s. Kap. 2.1.7.2, Lindanproduktion). Im Grundwasser machten Chlorbenzole über 90 % der Belastung aus. Hauptkontaminante war mit 39 % 1,2,4-TCB (s. Tab. 2.26), in abnehmenden Konzentrationen gefolgt von 1,4-DCB (18 %), 1,3-DCB, MCB, 1,2,3-TCB, 1,2-DCB und 1,3,5-TCB (um 3 %). Die Konzentrationen der hochchlorierten Benzole, HCB, PCB und TTCBs waren mit insgesamt nur 1,7 % niedrig. Die Möglichkeit einer biologischen Behandlung des Grundwassers wurde in unterirdischen Testfeldern mit angeschlossener oberirdischer Wasseraufbereitung geprüft [81].

In-situ: Über einen Spülkreislauf wurden Sauerstoff und Phosphat nach einer kurzen Anaerob-Phase in den Grundwasserleiter infiltriert. In ausreichend mit Sauerstoff versorgten Schichten nahmen die Chlorbenzole ab. Als Indikator für eine biologische Umsetzung diente die Verschiebung des Verhältnisses zwischen dem vergleichsweise gut abbaubaren 1,2,4-TCB und dem schlecht abbaubaren 1,3,5-TCB, das sich im Abstrom relativ anreicherte.

Wasseraufbereitungsanlage: Das Grundwasser wurde in der angeschlossenen oberirdischen Anlage, die aus einer Enteisungsstufe und einer biologischen Stufe mit nachgeschalteten Aktivkohlefiltern bestand, weiter aufbereitet. Das eingespeiste Grundwasser enthielt alle HCH-Isomeren, die in Abb. 2.7 aufgeführten Chlorbenzole und Chlorphenole zuzüglich vier weiterer Di- und Trichlorphenole. Die Konzentrationen der HCHs und der Chlorphenole waren mit 3 - 49 $\mu\text{g}/\text{l}$ bzw. 0,2 - 33 $\mu\text{g}/\text{l}$ sehr niedrig. Bei den Chlorbenzolen dominierte 1,2,4-TCB mit 2 mg/l. Die übrigen Isomere des Di- und des Trichlorbenzols erreichten nur 92 $\mu\text{g}/\text{l}$ (1,3,5-TCB) bis 287 $\mu\text{g}/\text{l}$ (1,4-DCB). Die Konzentrationen von Hexa- und von Pentachlorbenzol betragen 2 bzw. 0,2 $\mu\text{g}/\text{l}$. Schon in der Enteisungsstufe nahmen die Konzentrationen der meisten Stoffe, wahrscheinlich durch Sorption und Co-Präzipitation, um ≥ 90 % ab. In der Biologiestufe wurden sie weiter abgereichert.

Die Konzentrationen der Kontaminanten im Zulauf lagen im Bereich von Schwellenwerten für einen biologischen Abbau. Trotzdem scheint zumindest ein Teil der Stoffe biologisch ange-

griffen zu werden. Einerseits verringerte sich die Beladung der Aktivkohlefilter, nach Angaben der Autoren, mit zunehmender Laufzeit der Anlage. Andererseits wurde das biologisch nicht abbaubare β -HCH (Konzentration im Zulauf $3 \mu\text{g/l}$) nur zu rd. 10 % eliminiert.

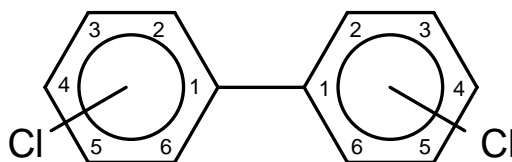
Biologisches Selbstreinigungspotential

Chlorbenzole und Chlorphenole scheinen *in-situ* persistent zu sein, auch wenn geringfügige anaerobe Umsetzungen durch reduktive Dechlorierung festgestellt wurden. Ein Indikator für ein latentes Selbstreinigungspotential ist, wie auch bei anderen Gruppen von Kontaminanten, das Vorhandensein von Mikroorganismen, die diese Schadstoffe in belastetem Boden und Grundwasser abbauen.

2.1.8.2 Polychlorierte Biphenyle (PCB)

Allgemeines

PCBs bestehen aus einem "hantelförmigen" Grundgerüst, in dem zwei Benzolringe über je ein Kohlenstoffatom miteinander verknüpft sind (Biphenyl). Es kann mit ein bis zehn Chloratomen substituiert sein (s. Abb. 2.8). In der homologen Reihe der Mono- bis Decachlorbiphenyle (Molekulargewichte 189 bis 499 g/mol) steigt die Zahl der Isomere mit zunehmender Zahl der Chloratome daher stärker an als bei den Chlorbenzolen. Theoretisch ergeben sich insgesamt 209 homologe und isomere Einzelverbindungen, die als Kongenere bezeichnet werden. Zur Systematisierung wurden sie numeriert (Kongenere nach BALLSCHMITER). Von den 209 möglichen Kombinationen werden bei der Synthese nur etwa die Hälfte gebildet. Aus ihnen wurden sechs Referenzkongenere ausgewählt, deren Bestimmung im Rahmen der 1989 erlassenen PCB-Verbotsordnung vorgeschrieben ist (s. Tab. 2.29).



Stellung der Chloratome:

ortho: 2-, 6-, 2-, 6-

meta: 3-, 5-, 3-, 5-

para: 4-, 4-

Abb. 2.8: Grundgerüst der chlorierten Biphenyle

Die PCBs verhalten sich bezüglich ihrer physikalisch-chemischen Eigenschaften ähnlich wie die Chlorbenzole. Jedoch sind schon die niedriger chlorierten Biphenyle um Zehnerpotenzen schlechter wasserlöslich als die Chlorbenzole, so daß die Festlegung ein bestimmender Prozeß ist. Man muß, wie bei den PAK, unterscheiden zwischen dem Anteil der wasserlöslichen, der bioverfügbaren, der noch und der nicht mehr meßverfügbaren PCB ("bound residues"). Die Wasserlöslichkeiten der Mono- bis Decachlorbiphenyle liegen zwischen ca. 6 mg/l und $0,1 \mu\text{g/l}$. Wie bei den PAK (s. Kap. 2.1.2), den Chlorbenzolen (s. Tab. 2.24) und den Chlorphenolen (s. Tab. 2.25) unterscheiden sich die Isomere bei gleicher Summenformel, bedingt durch ihre Struktur, in ihren Wasserlöslichkeiten (s. Tab. 2.29).

Tab. 2.29: Referenzkongenere nach BALLSCHMITER deren Bestimmung nach der PCB-Verbotsordnung von 1989 vorgeschrieben ist.

Chemische Bezeichnung	PCB [Nr.]	Molekulargewicht [g/mol]	Wasserlöslichkeit [µg/l]*
2,4,4'- Trichlorbiphenyl	28	257,6	407
2,2',5,5'- Tetrachlorbiphenyl	52	292,0	121
2,2',4,5,5'- Pentachlorbiphenyl	101	362,4	13
2,2',3,4,4',5'- Hexachlorbiphenyl	138	360,9	1,3
2,2',4,4',5,5'- Hexachlorbiphenyl	153	360,9	1,3
2,2',3,4,4',5,5'- Heptachlorbiphenyl	180	395,3	

* aus [14]

Die Herstellung von PCBs wurde in den USA 1977 und in der BRD 1983 eingestellt. In der DDR wurden sie nicht gezielt produziert. PCBs wurden aufgrund ihrer Eigenschaften als Kühl- und Isolierflüssigkeiten, Transformatoren- und Hydrauliköl u.a. eingesetzt. Verwendet wurden technische Gemische von verschiedenen hoch chlorierten Kongeneren der PCBs (s. Tab. 2.30), die sich aus Verbindungen mit unterschiedlicher Zahl von Chloratomen und den jeweils dazugehörenden Isomeren zusammensetzt. Die meisten der technisch genutzten Gemische sind praktisch wasserunlöslich, thermisch und chemisch stabil und persistent. PCBs werden durch organische Substanzen gebunden und reichern sich in Organismen, in humushaltigen Bodenschichten und in Sedimenten, z.B. Hafenschlick, an. Aufgrund ihrer Persistenz gehören sie zu den umweltrelevanten Stoffen. Die akute Toxizität der PCBs ist, abhängig vom Chlorierungsgrad, relativ gering. Humantoxische Wirkungen beruhen auf Verunreinigungen mit PCDD/F [14; 21; 46; 50; 55; 56; 59; 71].

Tab. 2.30: Handelsprodukte: Chlorgehalte der Kongenere in technischen Gemischen

Produkt	Hauptkomponenten	Zahl der Chlorsubstituenten*
Aroclor 1221	Monochlorbiphenyle	0 – <u>1</u> – 2 (– 3)
Aroclor 1242	Trichlorbiphenyle	(1 –) 2 – <u>3</u> – 4 (– 5)
Aroclor 1248	Tetrachlorbiphenyle	
Aroclor 1254	Pentachlorbiphenyle	(2 –) – 4 – <u>5</u> – 6 – (– 8)
Aroclor 1260	Hexachlorbiphenyle	

* aus [71]; **fett**: etwa 50 % der enthaltenen Kongenere

Biologischer Abbau

Der biologische Abbau der PCBs ist **meist langsam und unvollständig**, denn er wird nicht nur durch die Wasser-(un-)löslichkeiten limitiert. Auch die Verteilung und die Zahl der Chloratome an den beiden Benzolringen des Biphenyls schränken den aeroben und den anaeroben Abbau im allgemeinen auf Umwandlung in Transformations- oder Teilabbauprodukte ein. Bei der Prüfung auf "Abbau" der PCBs werden häufig, und unter praktischen Aspekten verständlich, nur die Abnahmen der Ausgangssubstanzen gemessen, so daß ihr wirkliches Schicksal unbekannt bleibt.

Anaerob: PCBs werden wie die Chlorbenzole durch cometabolische reduktive Dechlorierung transformiert. In anaeroben, langfristig mit PCBs kontaminierten, aber auch in unbelasteten Sedimenten wurde z.B. die Teil-Dechlorierung von Aroclor 1242 und 1260 durch Bakteriengemeinschaften nachgewiesen [44; 75; 76; 80]. Diese Resultate und weitere Ergebnisse von Untersuchungen mit Reinsubstanzen (Tri- bis Pentachlorbiphenylen) [7; 9; 21; 70; 73; 74; 77], lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Bevorzugt werden Chloratome in meta- oder para-Stellung abgespalten. In der Regel akkumulieren daher PCBs, die Chloratome in *ortho*-Stellung tragen.
- Vereinzelt gelang es, meist erst nach längeren Bemühungen, Mischkulturen anzureichern, die die Fähigkeit zur *ortho*-Dechlorierung besaßen.
- Ob natürliche Bakteriengemeinschaften eher *meta*-, *para*- oder sogar *ortho*-Chloratome abspalten, hängt von ihrer individuellen Zusammensetzung ab, die u. U. von der Umgebungstemperatur beeinflusst wird.

Aerob, Bakterien: Die aerobe Umsetzung der PCBs verläuft nach den gleichen Grundmustern wie der Abbau der Chlorbenzole (Wege 1 und 2, s.o.). Wenn zwei benachbarte, chlorfreie C-Atome vorhanden sind, können PCBs (analog Weg 2) durch Dioxygenasen zu Chlordihydroxybiphenylen oxidiert werden. Wenn die zwei chlorfreien C-Atome in den Positionen **2,3 bzw. 5,6 (2',3' bzw. 5',6')** hydroxyliert werden, kann das PCB-Molekül in mehreren Schritten in Chlorbenzoesäure und eine aliphatische C₅-Säure aufgespalten werden. Einige Bakterien können sich durch vorangehende Abspaltung eines *ortho*-Chloratoms in diesen Abbaupfad einfügen. Die Häufigkeit von Bakterien, die das PCB-Molekül unter Bildung von Chlorbenzoesäure spalten können, nimmt von den nicht-chlorierten zu den *ortho*-chlorierten Biphenylen ab. Während die aliphatischen Spaltprodukte direkt weiter metabolisiert werden können, werden die gebildeten Chlorbenzoesäuren in der Regel nicht von den gleichen Bakterien umgesetzt.

Der aerobe Abbau der PCBs durch Bakterien [2; 18; 21; 48; 61; 62] weist die folgenden gemeinsamen Merkmale auf:

- Monochlorbiphenyle werden "relativ problemlos" umgesetzt; 4-Chlorbiphenyl kann als Wachstumssubstrat genutzt werden. Die weiteren Isomere werden anscheinend nur cometabolisch angegriffen.
- Bei PCBs mit ≥ 3 Chloratomen sind Spaltungen des Moleküls in zwei Teile unter Bildung von Chlorbenzoesäuren und Mineralisierung nicht mehr von Bedeutung, andere Transformationsprodukte dominieren.

- PCBs mit ≤ 5 Chloratomen bilden in der Regel die Obergrenze für die aerobe Transformation, auch wenn zwei Bakterienstämme isoliert wurden, die 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl (PCB 180) oxidieren konnten.
- Außer der Zahl ist die Stellung der Chloratome am Biphenyl-Grundgerüst wichtig für die Persistenz von PCBs. Allgemein werden PCBs, die nur an einem Ring chlosubstituiert sind, besser abgebaut als an beiden Ringen substituierte Kongenere.

Aerob, Pilze: Auch PCBs können von verschiedenen Weißfäulepilzarten cometabolisch abgebaut bzw. transformiert werden. Wichtige Befunde aus Laboruntersuchungen sind [5; 12; 21; 78]:

- Der Angriff ist unspezifisch, daher hat die Stellung der Chloratome keinen Einfluß auf die Umsetzung.
- Eine teilweise Mineralisierung von PCBs ist möglich. Die Menge des gebildeten CO_2 unterscheidet sich von Pilzart zu Pilzart (z.B. 2,4',5- ^{14}C -Trichlorbiphenyl: 1,5 - 11 % $^{14}\text{CO}_2$).
- Die biologische Angreifbarkeit der PCBs nimmt mit zunehmendem Chlorierungsgrad ab. Hexachlorbiphenyle werden kaum mehr umgesetzt.
- PCBs werden durch Pilzhyphen gebunden; z.B. legte *Phanerochaete chrysosporium* > 60 % Tetra- und Hexachlorbiphenyle fest. Die sorbierten Anteile nehmen von Di- bis Pentachlorbiphenyl zu.

Sanierungspraxis

In zwei F+E Projekten wurde der Abbau von PCBs in Böden als Teilaspekt untersucht.

Pintsch-Gelände, Hanau: Das Gelände der ehemaligen Altölraffinerie, das schwerpunktmäßig mit MKW kontaminiert war, enthielt auch PCBs in Boden und Grundwasser. Im Rahmen des Vergleichs der Abbaubarkeit der Kontaminanten und verschiedener aerober Sanierungsverfahren wurde auch der Verbleib der PCB anhand der Abnahmen der sechs Referenzkongenere PCB 28 - PCB 180 (s. Tab. 2.29) verfolgt. Die Ergebnisse waren uneinheitlich [54]:

- In perkolierten **Bodensäulen** wurden, mit einer Ausnahme, keine signifikanten Abnahmen der PCBs festgestellt. Die Ausnahme bildete PCB 28 (Trichlorbiphenyl) dessen Konzentration in einem von vier Ansätzen abnahm.
- In einem **Bodenreaktor**, dem als Verfahrensvarianten Wasserstoffperoxid und Tenside zudosiert wurden, blieben die Gehalte der PCBs 28 und 52 konstant, während sich die Konzentrationen von PCB 180 (-36 %), 153 (-28 %), 138 (-32 %) und 101 (-23 %) verringerten. Als mögliche Ursache wurde eine chemische Oxidation der PCBs angenommen.
- In einer **Miete**, die Rindenmulch als Strukturmaterial enthielt, wurden innerhalb von zwei Jahren Trichlorbiphenyle fast vollständig und Tetrachlorbiphenyle um ca. 60 - 70 % abgereichert. Nennenswerte Verluste durch Bindung an Rindenmulch oder Auswaschen konnten ausgeschlossen werden.
- In einem **Mietenboden** mit Stroh und Pilzmycel (*Pleurotus ostreatus*) nahmen die Gehalte der Referenzkongenere nicht ab, wobei die Ursache unklar war. Bei der Überprüfung des negativen Befundes am Forstbotanischen Institut der Universität Göttingen wurde nach acht Wochen eine Abnahme von ca. 65 % gefunden.

Biologischer Abbau von chlorierten Aromaten in Feststoffen: In dem Projekt sollte ein Verfahren zur biologischen Sanierung von PCBs, PCDDs, PCDFs und HCHs (s. Kap. 2.1.7) in Böden entwickelt und geprüft werden, das auf dem Austrag einer patentierten "Spezialkultur" aus sechs Arten (Bakterien und Hefen) in ihrer Kulturflüssigkeit (Fermentationslösung) beruhte. Die Wirkung des Verfahrens wurde in Laboruntersuchungen mit zwei Altlastenböden geprüft, und es wurde versucht abiotische und biologische Prozesse zu erfassen, die zu einer Abnahme der PCBs beitragen können [14; 15].

Die überwiegend sandigen Böden waren unterschiedlich hoch mit PCBs belastet, 136 mg (Boden 1) und 28 mg/kg TS (Boden 2), und enthielten als dominierende Kontaminanten Tri- bis Pentachlorbiphenyle. Der Verbleib der PCB wurde anhand von Messungen der Referenzkongenere verfolgt. Die wesentlichen Befunde der Laboruntersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- In fast allen Ansätzen beider Böden wurden die PCBs im Verlauf von sieben Monaten abgereichert, wobei eine Umsetzung der Kongenere durch die Spezialkultur ausgeschlossen werden konnte. Nicht erklärbar Abreicherungen, die sowohl durch biologische als auch durch andere Prozesse verursacht sein konnten, lagen zwischen 30 und 60 %.
- Die durchgängigen Abnahmen von Heptachlorbiphenyl (PCB 180; 4 mg/kg TS bzw. 1 mg/kg TS) um $\geq 50\%$ beruhten sehr wahrscheinlich allein auf nicht biologischen Prozessen. Die über diesen Hintergrund hinausgehenden Abnahmen der PCBs 28 und 52 in allen aerob inkubierten Ansätzen und die der PCBs 28 bis 153 in einem von sechs anaeroben Parallelansätzen sind dagegen sehr wahrscheinlich auf biologische Umsetzungen durch die vorhandene Mikroflora zurückzuführen, denn die Fermentationslösung enthielt organische Nährstoffe, die eine Vermehrung der Bodenbakterien und Cometabolismus ermöglichten.
- Ein biologischer Abbau kann, als Artefakt, durch Befeuchten des Bodens mit Leitungswasser vorgetäuscht werden, wie Abnahmen der PCBs um bis zu 50 % zeigten.

Schlußfolgerungen: Die beschriebenen Ergebnisse aus der Literatur und den beiden F+E Projekten verdeutlichen, daß biologische Verfahren bei PCB belasteten Böden mit sehr großen Unsicherheiten behaftet sind:

- Eine wirkliche Erfolgskontrolle ist kaum möglich, denn das Kriterium "Abnahme der Referenzkongenere" sagt nichts über den tatsächlichen Verbleib der PCB aus.
- Die in Laboruntersuchungen nachgewiesenen Abbaumuster der PCB zeigen, daß unter anaeroben Bedingungen Transformationsprodukte Endstufen sein können, die aerob kaum oder nicht weiter umsetzbar sind.
- Die Mehrzahl der in PCB belasteten Böden vorhandenen Kongenere kann auch aerob höchstens cometabolisch transformiert werden.

Aufgrund der schweren und unvollständigen Abbaubarkeit und der überwiegend geringen Bioverfügbarkeit erscheint der Einsatz von biologischen Verfahren bei der Sanierung von PCB-belasteten Böden kaum sinnvoll. Eine Ausnahme bilden vielleicht Böden, die Monochlorbiphenyl als Hauptkomponente enthalten. Ob PCBs geeignete Kandidaten für eine kontrollierte Humifizierung (s. Kap. 2.2) sind, ist unklar.

Biologisches Selbstreinigungspotential

Durch biologische Umsetzungen können die Verteilungsmuster der PCB in über lange Zeiträume kontaminierten Sedimenten beeinflusst werden, wie Untersuchungen in den USA zeigten [17; 21]. Anaerobe Schichten enthielten weniger hoch- und mehr niedrigchlorierte PCBs. In oberflächennahen, aeroben Sedimentschichten waren die Anteile von hochchlorierten PCBs erhöht und die der Mono- und Dichlorbiphenyle vermindert, so daß langfristig eine gewisse Dekontamination *in-situ* möglich ist.

2.1.8.3 Polychlorierte Dioxine und Furane (PCDD/F)

Polychlorierte Dibenzodioxine (PCDD) und Polychlorierte Dibenzofurane (PCDF) sind aromatische Ether, in denen zwei Benzolringe, die bis zu vier Chloratome pro Ring tragen können, über zwei bzw. eine Sauerstoffbrücke miteinander verbunden sind. Aufgrund der großen Zahl der möglichen Stellungen der Chloratome an beiden Ringen gibt es, wie bei den PCBs, eine Vielzahl möglicher Kongenere, deren Toxizität als hoch eingestuft wird. Von besonderer toxikologischer Bedeutung sind sieben Tetra- bis Octachlordioxine und zehn Tetra- bis Octachlorfurane, die in den Stellungen 2,3,7,8 Chlorsubstituenten tragen. Analytisch stellen sich die gleichen Probleme wie bei den PCBs.

PCDD/F sind chemisch stabile, überwiegend extrem persistente Verbindungen, die als Nebenprodukte bei der Herstellung chlorierter Chemikalien und Pestiziden, wie PCP, 2,4-D und 2,4,5-T und bei den verschiedensten Verbrennungsprozessen entstehen. Außerdem können sie bei der biologischen Umsetzung von Chlorphenolen durch Pilze gebildet werden [8]. Ihre Wasserlöslichkeit ist noch geringer als die der PCBs und liegt im $\mu\text{g/l}$ bis ng/l Bereich. Für das "Seveso-Gift", 2,3,7,8-TCDD, das zu den toxischsten organischen Verbindungen gehört, wird eine Wasserlöslichkeit von 13 ng/l angegeben. Da sie praktisch immobil sind, verbleiben sie normalerweise in oberflächennahen Bodenschichten, und der Luftpfad ist wesentlich für ihre großflächige Verbreitung [21; 30; 46; 53; 56; 59].

Biologischer Abbau: Dioxine und Furane, die nicht chlorierten Grundgerüste der PCDD/F, können von einigen Spezialisten aerob als C+E-Quelle genutzt werden, während Mono- und Dichlordioxine und Furane und 2,4,8-Dichlordibenzofuran aerob nur cometabolisch transformiert werden. Anaerob wurde die cometabolische reduktive Dechlorierung von chlorierten PCDD/F nachgewiesen [4; 8; 21; 29; 72]. Aufgrund ihrer Schwer-Abbaubarkeit, der durch die mangelnde Bioverfügbarkeit für die Praxis viel zu langsamen Umsetzungen und ihrer Toxizität sind die PCDD/F **ungeeignet für eine biologische Sanierung**. Berichte in der Tagespresse und in pseudowissenschaftlichen Zeitungen, nach denen bei Schadensfällen mit PCDD/F Aussicht auf biologische Sanierbarkeit besteht, oder die sogar biologisch saniert wurden, sollten mehr als kritisch hinterfragt bzw. nicht geglaubt werden.

Sanierungspraxis: Einer der Ausgangspunkte für das F+E-Projekt zum "biologischen Abbau von chlorierten Aromaten in Feststoffen" (s. Kap. 2.1.8.2, Sanierungspraxis PCBs) war die Absenkung der Konzentrationen von PCDD/F in real kontaminierten Böden auf ca. 20 % des Ausgangswertes als Folge der biologischen Behandlung. Dieser Befund hielt einer Nachprüfung nicht stand. Die Behandlung bewirkte in Böden und Klärschlämmen unsystematische Zu- und Abnahmen der PCDD/F, die verschiedene Ursachen haben konnten, aber sicherlich keinen biologischen Abbau [14; 15].

2.1.8.4 Literatur

1. **Adrian, L., W. Manz, U. Szewzyk, and H. Görisch.** 1998. Physiological characterization of a bacterial consortium reductively dechlorinating 1,2,3- and 1,2,4-trichlorobenzene. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:496-503.
2. **Arendorf, J. J., and D. D. Focht.** 1995. A meta cleavage pathway for 4-chlorobenzoate, an intermediate in the metabolism of 4-chlorobiphenyl by *Pseudomonas cepacia* P166. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:443-447.
3. **Armenante, P. M., N. Pal, and G. Lewandowsky.** 1994. Role of mycelium and extracellular protein in the biodegradation of 2,4,6-trichlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:1711-1718.
4. **Barkovskii, A L., and P. Adriaens.** 1996. Microbial dechlorination of historically present and freshly spiked chlorinated dioxins and diversity of dioxin-dechlorinating populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4556-4562.
5. **Beaudette, L A., S. Davies, P. M. Fedorak, O. P. Ward, and M. A. Pickard.** 1998. Comparison of gas chromatography and mineralization experiments for measuring loss of selected polychlorinated biphenyl congeners in cultures of white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2020-2025.
6. **Becker, J. G., D. A. Stahl, and B. E. Rittmann.** 1999. Reductive dehalogenation and conversion of 2-chlorophenol to 3-chlorobenzoate in a methanogenic sediment community: implications for predicting the environmental fate of chlorinated pollutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:5169-5172.
7. **Berkaw, M., K. R. Sowers, and H. D. May.** 1996. Anaerobic ortho dechlorination of polychlorinated biphenyls by estuarine sediments from Baltimore Harbor. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:2534-2539.
8. **Bünz, P. V. und S. Schmidt.** 1997. Katabolismus dioxinartiger Verbindungen durch Mikroorganismen. *Mitt. Inst. Allg. Bot. Hamburg* **27**:93-99.
9. **Cutter, L., K. R. Sowers, and H. D. May.** 1998. Microbial dechlorination of 2,3,5,6-tetrachlorobiphenyl under anaerobic conditions in the absence of soil or sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:2966-2969.
10. **de Jong, E., J. A. Field, H.-E. Spinnler, J. B. P. A. Wijnberg, and J. A. M. de Bont.** 1994. Significant biogenesis of chlorinated aromatics by fungi in natural environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:264-270.
11. **Diekert, G.** 2000. Dehalorespiration- Chlorkohlenwasserstoff-Atmung in anaeroben Bakterien. *Biospektrum* **6**:32-33.
12. **Dietrich, D., W. J. Hickey, and R. Lamar.** 1995. Degradation of 4,4'-dichlorobiphenyl, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:3904-3909.

13. **Fathepure, B. Z., J. M. Tiedje, and S. A. Boyd.** 1988. Reductive dechlorination of hexachlorobenzene to tri- and dichlorobenzenes in anaerobic sewage sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:327-330.
14. **Fieseler, C., A. Geller, B. Glied, S. Johne, H.-P. Kohler, H. Köhler, C. Naumann, B. Noll, H. Raschke und A. J. Zehnder.** 1996. Biologischer Abbau von chlorierten Aromaten in Feststoffen. Forschungsprojekt 1450894 2 des BMFT, Abschlußbericht.
15. **Fieseler, C., A. Geller, B. Glied, S. Johne, H.-P. Kohler, H. Köhler, C. Naumann, B. Noll und H. Raschke.** 1997. Biologischer Abbau von chlorierten Aromaten in Feststoffen. *Altlasten Spektrum* **1/97**:9-14.
16. **Figge, K., U. Metzdorf, J. Nevermann, J. Schmiese, M. Keskin, P Fortnagel und J. Schmiese.** 1993. Bakterielle Mineralisierung von Dibenzofuran, Dibenzo-p-dioxin und 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol in Böden. *Z. Umweltchem. Ökotox.* **5**:122-130.
17. **Fish, K. M., and J. M. Principe.** 1994. Biotransformations of Aroclor 1242 in Hudson River test tube microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:4289-4296.
18. **Fritsche, W.** 1998. *Umwelt-Mikrobiologie: Grundlagen und Anwendungen.* G. Fischer Verlag. Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm, 252 Seiten.
19. **Genthner, B. R. S., Price II, W. A., and P. H. Pritchard.** 1989. Anaerobic degradation of chloraromatic compounds in aquatic sediments under a variety of enrichment conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:1466-1471.
20. **Genthner, B. R. S., W. A. Price II, and P. H. Pritchard.** 1989. Characterization of anaerobic dechlorinating consortia derived from aquatic sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:1472-1476.
21. **Gleim, D.** 1994. Abbauverhalten altlastenrelevanter (Schad-) Stoffe. Abschlußbericht zum Forschungsprojekt 14807430 des BMFT. Hrsg. DECHEMA Frankfurt a. M.
22. **Hägglom, M. M., and L. Y. Young.** 1990. Chlorophenol degradation coupled to sulfate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:3255-3260.
23. **Hägglom, M. M., and L. Y. Young.** 1995. Anaerobic degradation of halogenated phenols by sulfate reducing consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:1546-1550.
24. **Haigler, B. E., S. F. Nishino, and J. C. Spain.** 1988. Degradation of 1,2-dichlorobenzene by a *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:294-301.
25. **Haigler, B. E., C. A. Pettigrew, and J. C. Spain.** 1992. Biodegradation of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2237-2244.
26. **Hendriksen, H. V., S. Larsen, and B. K. Ahring.** 1992. Influence of a supplemental carbon source on anaerobic dechlorination of pentachlorophenol in granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:365-370.
27. **Holliger, C., G. Schraa, A. J. M. Stams, and A. J. B. Zehnder.** 1992. Enrichment and properties of an anaerobic mixed culture reductively dechlorinating 1,2,3-trichlorobenzene to 1,3-dichlorobenzene. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1636-1644.

28. **Joshi, D. K., and M. H. Gold.** 1993. Degradation of 2,4,5-trichlorophenol by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. **59**:1779-1785.
29. **Keim, T., W. Fancke, S. Schmidt, and P. Fortnagel.** 1999. Catabolism of 2,7-dichloro and 2,4,8-trichlorodibenzofuran by *Sphingomonas* sp. Strain RW1. J. Industr. Microbiol. & Biotechnol. **23**:359-363.
30. **Klein, W., Kördel, W., G. H. M. Krause und J. Wiesner.** 1995. Dioxine und Phthalate im Boden- eine kritische und vergleichende Bewertung- dioxins and phthalates in soil- a critical and comparative assessment. In: Kriterien zur Beurteilung organischer Bodenkontaminationen: Dioxine (PCDD/F) und Phthalate. DECHEMA e.V. Hrsg./Ed. ISBN 3-926959-51-7.
31. **Knackmuss, H. J.** 1997. Abbau von Natur- und Fremdstoffen. In: Umweltbiotechnologie. J., C., G. Ottow und W. Bidlingmaier Hrsg. G. Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, Seite 39-77.
32. **Kohring, G.-W., J. E. Rogers, and J. Wiegel.** 1989. Anaerobic biodegradation of 2,4-dichlorophenol in freshwater lake sediments at different temperatures. Appl. Environ. Microbiol. **55**:348-353.
33. **Kohring, G.-W., X. Zhang, and J. Wiegel.** 1989. Anaerobic dechlorination of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments in the presence of sulfate. Appl. Environ. Microbiol. **55**:2735-2737.
34. **Laine, M. M., and K. S. Jørgensen.** 1996. Straw compost and bioremediated soil as inocula for the bioremediation of chlorophenol-contaminated soil. Appl. Environ. Microbiol. **62**:1507-1513.
35. **Lamar, R. T., M. J. Larsen, and T. K. Kirk.** 1990. Sensivity to and degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete* spp. Appl. Environ. Microbiol. **56**:3519-3526.
36. **Larsson, P., L. Okla, and L. Tranvik.** 1988. Microbial degradation of xenobiotic, aromatic pollutants in humic water. Appl. Environ. Microbiol. **54**:1864-1867.
37. **LFU, Materialien zur Altlastensanierung.** 1991. Handbuch Mikrobiologische Bodenreinigung. Bearbeiter Geller, A., Brauch, H.J., Werner, P., Berberich, G., (Hrsg.). Landesanstalt für Umweltschutz Baden Württemberg, Karlsruhe, 233 Seiten.
38. **Löffler, F. E., J. M. Tiedje, and R. A. Sanford.** 1999. Fraction of electrons consumed in electron acceptor reduction and hydrogen thresholds as indicators of halorespiratory physiology. Appl. Environ. Microbiol. **65**:4049-4056.
39. **Madsen, T., and J. Aamand.** 1991. Effects of sulfuroxy anions on degradation of pentachlorophenol by a methanogenic enrichment culture. Appl. Environ. Microbiol. **57**:2453-2458.
40. **Madsen, T., and J. Aamand.** 1992. Anaerobic transformation and toxicity of trichlorophenols in a stable enrichment culture. Appl. Environ. Microbiol. **58**:557-561.
41. **Miethling, R., and U. Karlson.** 1996. Accelerated mineralization of pentachlorophenol in soil upon inoculation with *Mycobacterium chlorophenolicum* PCP1 and *Sphingomonas chlorophenolica* RA2. Appl. Environ. Microbiol. **62**:4361-4366.

42. **Mohn, W. W., and K. J. Kennedy.** 1992. Limited degradation of chlorophenols by anaerobic sludge granules. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2131-2136.
43. **Nicholson, D. K., S. L. Woods, J. D. Istok, and D. C. Peek.** 1992. Reductive dechlorination of chlorophenols by a pentachlorophenol-acclimated methanogenic consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2280-2286.
44. **Nies, L., and T. M. Vogel.** 1990. Effects of organic substrates on dechlorination of Aroclor 1242. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2612-2617.
45. **Nishino, S. F., J. C. Spain, L. A. Belcher, and C. D. Litchfield.** 1992. Chlorobenzene degradation by bacteria isolated from contaminated groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:1719-1726.
46. **Ottow, J. C. G.** 1997. Abbaukinetik und Persistenz von Fremdstoffen in Böden. In: *Umweltbiotechnologie*. J., C., G. Ottow und W. Bidlingmaier Hrsg. G. Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, Seite 97-138.
47. **Patel, G. B., B. J. C. Agnew, and J. Dicaire.** 1991. Inhibition of pure cultures of methanogens by benzene ring compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:2969-2974.
48. **Pettigrew, C. A., A. Breen, C. Corcoran, and G. S. Sayler.** 1990. Chlorinated biphenyl mineralization by individual populations and consortia of freshwater bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2036-2045.
49. **Ramanand, K., M. T. Balba, and J. Duffy.** 1993. Reductive dehalogenation of chlorinated benzenes and toluenes under methanogenic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:3266-3272.
50. **Rat von Sachverständigen für Umweltfragen.** 1989. Altlasten. Sondergutachten. Metzler-Poeschel Verlag Stuttgart, 304 Seiten.
51. **Reineke, W.** 1999. Mikrobieller Abbau von Chloraromaten. In: *Biotechnologie im Umweltschutz, Bioremediation: Entwicklungsstand- Anwendungen- Perspektiven*. Initiativen zum Umweltschutz 12. S. Heiden, R. Erb, J. Warrelmann und R. Dierstein Hrsg. Erich Schmidt Verlag, Seite 64-98.
52. **Riemann, B., and P. L. Jørgensen.** 1990. Effects of toxic substances on natural bacterial assemblages determined by means of [³H]thymidine incorporation. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:75-80.
53. **Rippen, G.** Handbuch Umweltchemikalien. Loseblattsammlung, ecomed Verlag, Landsberg/Lech.
54. **Ripper, J.** 1995. Untersuchungen zur Optimierung des mikrobiellen Ölabbaus unter Verwendung verschieden Maßstäblicher Versuchssysteme. Dissertation D83 TU Berlin, 195 Seiten.
55. **Römpp Chemie Lexikon.** 1993. Hrsg. J. Falbe und M. Regitz. Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 8. Aufl.
56. **Römpp Lexikon Umwelt.** 1993. Hrsg. H. Hulpke. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

57. **Salonen, M., P. Middeldorp, M. Briglia, R. Valo, M. Haggblom, and A. McBain.** 1989. Clean up of old industrial sites. In: Advances of Applied Biotechnology, Vol. 4, D. Kamely, A., Chakrabarty, G. Omenn eds., Gulf Publishing Company Houston TX., Seite 347-367.
58. **Sander, P., R.-M. Wittich, P. Fortnagel, H. Wilkes, and W. Franke.** 1991. Degradation of 1,2,4- trichloro- and 1,2,4,5-tetrachlorobenzene by *Pseudomonas* strains. Appl. Environ. Microbiol. **57**:1430-1440.
59. **Scheffer/Schachtschabel.** 1989. Lehrbuch der Bodenkunde. 12., neu bearbeitete Auflage von Schachtschabel, P., Blume, H.P., Brümmer, G., Hartge, K.-H., and U. Schwertmann. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart. 491 Seiten.
60. **Schlömann, M., S. R. Kaschabek, and W. Reineke.** 1999. Pathways of bacterial degradation of chloroaromatic compounds - special aspects of chlorocatechol pathways of *Rhodococcus*. In: Behandlung von Abwässern mit halogenorganischen Verbindungen. Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung 12, TU Berlin. Seite 29-62.
61. **Seeger, M., K. N. Timmis, and B. Hofer.** 1995. Conversion of chlorobiphenyls into phenylhexadienoates and benzoates by the enzymes of the upper pathway for polychlorobiphenyl degradation encoded by the bph locus of *Pseudomonas* sp. strain LB400. Appl. Environ. Microbiol. **61**:2654-2658.
62. **Seeger, M., M. Zielinski, K. N. Timmis, and B. Hofer.** 1999. Regiospecificity of dioxygenation of di- to pentachlorobiphenyls and their degradation to chlorobenzoates by the bph encoded catabolic pathway of *Burkholderia* sp. strain LB400. Appl. Environ. Microbiol. **65**:3614-3621.
63. **Spain, J. C., and D. T. Gibson.** 1988. Oxidation of substituted phenols by *Pseudomonas putida* F1 and *Pseudomonas* sp. strain JS6. Appl. Environ. Microbiol. **54**:1399-1404.
64. **Spain, J. C., G. J. Zylstra, C. K. Blake, and D. T. Gibson.** 1989. Monohydroxylation of phenol and 2,5-dichlorophenol by toluene dioxygenase in *Pseudomonas putida* F1. Appl. Environ. Microbiol. **55**:2648-2652.
65. **Spiess, E., C. Sommer, and H. Görisch.** 1995. Degradation of 1,4-dichlorobenzene by *Xanthobacter flavus* 14p1. Appl. Environ. Microbiol. **61**:3884-3888.
66. **Tartakovsky, B., M.-J. Levesque, R. Dumortier, R. Beaudet, and S. R. Guiot.** 1999. Biodegradation of pentachlorophenol in a continuous anaerobic reactor augmented with *Desulfitobacterium frappieri* PCP-1. Appl. Environ. Microbiol. **65**:4357-4362.
67. **Topp, E., R. L. Crawford, and R. S. Hanson.** 1988. Influence of readily metabolizable carbon on pentachlorophenol metabolism by a pentachlorophenol-degrading *Flavobacterium* sp. Appl. Environ. Microbiol. **54**:2452-2459.
68. **Valo, R.** 1990. Occurrence and metabolism of chlorophenolic wood preservative in the environment. Academic Dissertation, University of Helsinki, 517 pp.
69. **van der Meer, J. R., C. Werlen, S. F. Nishino, and J. C. Spain.** 1998. Evolution of a pathway for chlorobenzene metabolism leads to natural attenuation in contaminated groundwater. Appl. Environ. Microbiol. **64**:4185-4193.

70. **van Dort, H. M., and D. L. Bedard.** 1991. Reductive ortho and meta dechlorination of a polychlorinated biphenyls congener by anaerobic microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:1576-1578.
71. **Wiesmann, U. und B. Herbst.** 1999. Biologischer Abbau chlorierter Kohlenwasserstoffe. *Chem. Ing. Tech.* **71**:568-579.
72. **Wittich, R. M.** 1994. Der mikrobielle Abbau von Dibenzo-p-Dioxinen, Dibenzofuranen, Diphenylethern und ihren Derivaten. *BioEngineering* **10**:33-39.
73. **Wu, Q., D. L. Bedard, and J. Wiegel.** 1997. Effect of incubation temperature on the route of microbial reductive dechlorination of 2,3,4,6-tetrachlorobiphenyl in polychlorinated biphenyl (PCB)-contaminated and PCB-free freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2966-2969.
74. **Wu, Q., D. L. Bedard, and J. Wiegel.** 1997. Temperature determines the pattern of anaerobic microbial dechlorination of Aroclor 1260 primed by 2,3,4,6-tetrachlorobiphenyl in woods pond sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4818-4825.
75. **Wu, Q., and J. Wiegel.** 1997. Two anaerobic polychlorinated biphenyl-dehalogenating enrichments that exhibit different para-dechlorination specificities. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4826-4832.
76. **Wu, Q., K. R. Sowers, and H. D. May.** 1998. Microbial reductive dechlorination of Aroclor 1260 in anaerobic slurries of estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1052-1058.
77. **Wu, Q., K. R. Sowers, and H. D. May.** 2000. Establishment of a polychlorinated biphenyl-dechlorinating microbial consortium, specific for doubly flanked chlorines, in a defined sediment-free medium. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:49-53.
78. **Yadav, J. S., J. F. Quensen III, J. M. Tiedje, and C. A. Reddy.** 1995. Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors 1242, 1254, and 1260) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2560-2565.
79. **Yadav, J. S., R. E. Wallace, and C. A. Reddy.** 1995. Mineralization of mono- and dichlorobenzenes and simultaneous degradation of chloro- and methyl-substituted benzenes by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:677-680.
80. **Ye, Dingyi, J. F. Quensen III, J. M. Tiedje, and S. A. Boyd.** 1995. Evidence for para dechlorination of polychlorobiphenyls by methanogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2166-2171.
81. **Zettler, B. und W. Dott.** 1997. Mikrobielle in situ-Sanierung eines mit Chloraromaten verunreinigten Grundwasserleiters. In: 12. DECHEMA-Fachgespräch Umweltschutz: Möglichkeiten und Grenzen der Reinigung kontaminierter Grundwässer. Seite 755-772.
82. **Zhang X., and J. Wiegel.** 1990. Sequential anaerobic dechlorination of 2,4-dichlorophenol in freshwater sediments in the presence of sulfate. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2735-2737.

2.1.9 Nitroaromaten (Schwerpunkt: TNT)

Jochen Michels

2.1.9.1 Allgemeines

Nitroaromaten sind aromatische Verbindungen, die eine oder mehrere Nitrogruppen (-NO₂) an einem Benzolring tragen. Nitroaromaten stellen eine große Klasse von umweltrelevanten Kontaminanten dar. Viele wurden oder werden als Zwischenprodukte für die Herstellung nicht nur von Sprengstoffen, sondern auch von Farbstoffen, Herbiziden, Pharmazeutika, Polyurethan-Schäumen, aber auch für weit verbreitete Duftstoffe (Moschus Xylol und Moschus Keton) produziert [9; 78] (s. Tab. 2.31). Nitroaromaten stellen die Basis aller chemischen Synthesen dar, deren Produkte Stickstoff-Funktionen am aromatischen Ring tragen [36].

Tab. 2.31: Übersicht über nitroraromatische (Grund-)Verbindungen und deren Verwendung. Zusammengestellt unter Verwendung von [7; 22; 78; 79]

Nitroaromatische Verbindung	Verwendung als	Zwischenprodukte für
Nitrobenzol	Lösungsmittel	Aniline, Chlornitrobenzole Chlordinitrobenzol
Dinitrobenzole	–	Dichlorbenzol
Trinitrobenzol	Explosivstoff	–
Nitrophenole	–	Azo- u. Schwefelfarbstoffe, Paracetamol, Pestizide, Photochemikalien
Dinitrophenole	Insektizide, Fungizide, Holzschutzmittel	Azo- u. Schwefelfarbstoffe, Photochemikalien, Pikrinsäure
Trinitrophenol (Pikrinsäure)	Explosivstoff, Farbstoff, Beizmittel	–
Nitrotoluole	–	Azofarbstoffe, Herbizide Dinitrotoluole
Dinitrotoluole	–	Polyurethane, Farbstoffe, Trinitrotoluol
Trinitrotoluol	Explosivstoff	Farbstoffe, Photochemikalien, Trinitrobenzol
Chlornitrobenzole	–	Nitrophenol, Chloraniline, Farbstoffe, Pharmazeutika, Pestizide

Die Gesamtproduktion von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT), des wichtigsten Explosivstoffs des 2. Weltkrieges, belief sich im dritten Reich auf über 800.000 t. In Folge der Produktion, durch Havarien und schließlich durch unsachgemäße Demontage von Anlagen gelangte er weiträumig in Boden und Grundwasser, so daß TNT, sowie seine Vorläufer- und Nebenprodukte heute eine Gruppe von zentralen Kontaminanten bei Rüstungsalasten sind. TNT ist infolge seiner guten Sprengkraft und Brisanz, wegen seiner Gießbarkeit in günstigem Temperaturbereich (ca. 80° C) und wegen seiner Handhabungssicherheit der am meisten gebrauchte militärische Sprengstoff. Er ist darüber hinaus ein wesentlicher Bestandteil gewerblicher Sprengstoffe [62]. TNT bildet schwach gelbliche Kristalle oder Schuppen und hat eine Wasserlöslichkeit von 130 mg/l. In kontaminierten Bereichen liegt TNT je nach Eintragungsart als feiner Staub oder als auskristallisierter Klumpen vor. Die heterogene Verteilung im Boden behindert die Mobilität und damit die Bioverfügbarkeit und erschwert zudem die Analytik.

TNT-spezifische Rüstungsalasten

Ein Report des Umweltbundesamtes, Berlin, weist zwanzig Produktionsstätten für TNT aus, die im Zeitraum von vor dem ersten Weltkrieg bis 1990 in Deutschland betrieben wurden (Abb. 2.9) [94]. Die weltweit erste TNT-Fabrik war in Leverkusen-Schlebusch von 1904 bis 1926 in Betrieb [42]. In Schönebeck an der Elbe wurde TNT noch bis 1990 produziert [94]. Nach Einstellung der Produktion und Demontage der relevanten Installationen sind die Gelände verschiedener ehemaliger Rüstungsfabriken heute zu Wohn- und/oder Gewerbegebieten umgenutzt worden [85]. Ein bemerkenswertes Beispiel ist das Gelände der ehemaligen TNT-Fabrik in Krümmel bei Hamburg, auf dem heute ein Atomkraftwerk steht. Lediglich die Standorte bei Clausthal-Zellerfeld im Harz ("Werk Tanne") [8], Hallschlag ("Espagit") in der Eifel [83], Elsnig bei Leipzig [98] und Schönebeck an der Elbe [94] liegen heute brach.

Im Dritten Reich wurde bis zum Ende des 2. Weltkrieges nicht nur in diesen zwanzig Produktionsstätten Munition produziert und gelagert. Munitionsanstalten waren über das ganze Land verteilt [72]. Eine Studie von 1996 listet 3.240 Rüstungsalasten-Verdachtsflächen auf [94], von denen mindestens 750 potentiell mit Explosivstoffen kontaminiert sind (s. Abb. 2.9) [71]. Es wird geschätzt, daß sich die kontaminierten Flächen zu über 10.000 km² aufsummieren [71].

Für die Produktion des Sprengstoffs waren enorme Wassermengen notwendig. Im "Werk Tanne" fielen z.B. bei einer Produktion von 4.000 t TNT pro Monat täglich 5.000 bis 6.000 m³ saure Abwässer aus den TNT-Wäschen an, die bis an die Löslichkeitsgrenze mit TNT kontaminiert waren. Weitere 35.000 m³ wurden täglich als Kühlmittel benötigt, um den Nitrierungsprozeß zu kontrollieren. Die Gesamtabwassermenge belief sich im "Werk Tanne" auf ca. 40.000 m³ pro Tag [45]. Diese große Menge verunreinigten Abwassers wurde nur neutralisiert und direkt in die Vorfluter eingeleitet, auf dem Werksgelände versickert oder über Schluckbrunnen in den Untergrund versenkt. Bedingt durch diesen enormen Wasserverbrauch lagen Sprengstoffwerke in wasserreichen Gegenden – unseren heutigen Trinkwasser-einzugsgebieten. Durch Produktion, Havarien (Explosionen), Bombenangriffe und schließlich die Demontage durch die Alliierten wurden die Gelände weiträumig mit Nitroaromaten (Mono- Di- und Trinitrotoluole) kontaminiert. Und noch heute, mehr als 50 Jahre nach Ende des zweiten Weltkrieges, werden die Nitroaromaten bei jedem Regen ausgespült, so daß teure Aktivkohle-Filteranlagen das Grundwasser schützen müssen.

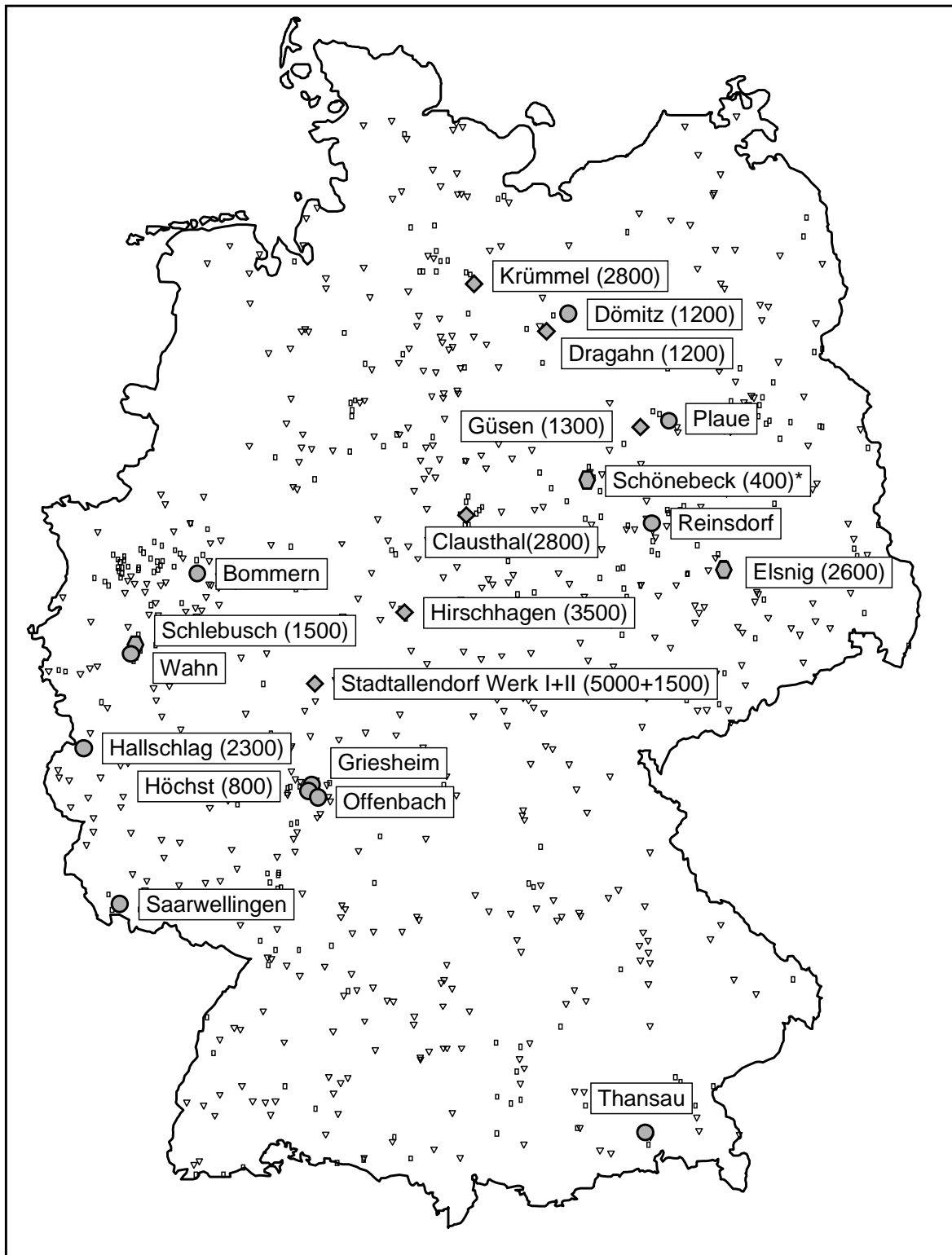


Abb. 2.9: TNT-Fabriken und -Verdachtsstandorte in der Bundesrepublik Deutschland. TNT-Fabriken sind namentlich gekennzeichnet (Monatsproduktionskapazität in t). Legende: (●) Betrieb vor oder im ersten Weltkrieg, (◐) Betrieb im ersten und zweiten Weltkrieg, (◆) Betrieb im zweiten Weltkrieg, *In Schönebeck wurde bis 1990 TNT produziert. (▽) Munitionsanstalten und -Lager; (□) u. a. Pulverfabriken. Zusammengestellt aus [42; 74; 94].

An vielen Standorten wurden neben TNT auch verschiedene andere Sprengstoffe bzw. Treibmittel produziert, darunter Hexogen und Pikrinsäure. Zusammen mit den Zwischen- und Nebenprodukten der industriellen TNT-Herstellung ergeben sich somit eine Vielzahl von sprengstofftypischen Verbindungen (STV). Durch den Betrieb eigener Kraftwerke und der Delaborierung von Feindmunition auf sog. Brandplätzen finden sich als weitere Kontaminanten Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) und Schwermetalle.

Toxikologie von TNT

In mehreren Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) und viele Abbauprodukte sowohl auf Fische [69], Ratten und Mäuse [4], als auch auf Algen und aquatische Pflanzen [86; 92; 106; 107] toxisch wirken. Auf verschiedene Mikroorganismen, wie Hefen, Pilze, Actinomyceten und GRAM-positive Bakterien wirkt TNT ab einer Konzentration von 50 mg/l toxisch. [46]. Aber auch die Vorprodukte des TNT, die Dinitrotoluole, werden als sehr toxisch eingestuft und wirken zudem kanzerogen und mutagen [84].

Die Symptome der Vergiftungen beim Menschen nach inhalativer oder dermalen Aufnahme von Mononitrotoluol, Dinitrotoluol und TNT sind wenige Tage nach Expositionsbeginn wie folgt beschrieben: Allgemeine Schwäche, Kopfschmerzen, Appetitlosigkeit, Benommenheit, Übelkeit, Schlaflosigkeit, Gliederschmerzen, Gefühllosigkeit verschiedener Hautpartien und Durchfall. Starke Veränderungen des Blutbildes sind die Folge der Exposition. Besonders auffällig ist eine Cyanose, eine blau-rote Verfärbung von Lippen, Fingernägeln und Haut infolge Sauerstoffunterversorgung. Hervorgerufen wird sie durch reduzierte Metabolite des TNT, die für vermehrte Methämoglobinbildung und Hämolyse verantwortlich gemacht werden. Die Metaboliten des TNT wirken leberschädigend [51].

2.1.9.2 Biologischer Abbau von Nitroaromaten

1966 konnte dann gezeigt werden, daß Aromaten, die Nitrogruppen tragen, generell biologisch schwerer abbaubar sind als ihre nicht nitrierten Analoga [3]. Im Rahmen der Untersuchung verschiedener Abbauewege von Nitroaromaten sind für den initialen Angriff bisher vier Alternativen nachgewiesen (s. Tab. 2.32):

1. Oxidation des aromatischen Ringes
2. Oxidation einer Methylgruppe (wenn vorhanden)
3. Reduktion einer Nitrogruppe
4. Reduktion des aromatischen Ringes

Weg 1 ist unter aeroben Bedingungen für verschiedene Mono- und Dinitroaromaten beschrieben. Die entsprechenden Mono- oder Dioxygenasen bilden die korrespondierenden Catechole unter Abspaltung von Nitrit. Diese Nitroaromaten können in aller Regel auch als **Wachstumssubstrat** verwertet werden.

Der ebenfalls **produktive** Weg 2 ist bisher nur für den aeroben Abbau von 4-Nitrotoluol beschrieben und vereint den oxidativen und den reduktiven Weg: Nach Oxidation der Methylgruppe zum Nitrobenzoat wird die Nitrogruppe reduziert und als Ammonium freigesetzt [34; 76].

Die initiale Reduktion einer Nitrogruppe (R-NO₂) als Weg 3 erfolgt schrittweise über die Zwischenstufen Nitroso- (R-NO) und Hydroxylamino- (R-NHOH) zur Aminogruppe (R-NH₂). Unter aeroben Bedingungen endet die Reduktion häufig auf der Stufe der Hydroxylamino-Gruppe (sog. partielle Reduktion). Ein Abbau auf dem Weg 3 scheint nur **cometabolisch** zu erfolgen [68], wobei es zur Anreicherung von Teilabbau-Produkten kommen kann.

Tab. 2.32: Beispiele des aeroben Abbaus von verschiedenen Nitroaromaten

Enzym	Nitroaromat	Charakteristisches Zwischenprodukt	Nähr-Quelle*	Lit.
Weg 1: Initiale Oxidation des aromatischen Ringes				
Dioxygenase	Nitrobenzol	Catechol	C+E+N	[66]
	2-Nitrotoluol	3-Methylcatechol	C+E+N	[35]
	2,4-Dinitrotoluol	4-Methyl-5-Nitrocatechol	C+E+N	[90; 67]
	2,6-Dinitrotoluol	3-Methyl-4-Nitrocatechol	C+E+N	[67]
	2,6-Dinitrophenol	4-Nitropyrogallol	C+E+N	[24]
	1,3 Dinitrobenzol	4-Nitrocatechol	N	[18]
Monooxygenase	2-Nitrophenol	Catechol	C+E+N	[108]
	4-Nitrophenol	Hydrochinon	C+E+N	[89]
Weg 2: Initiale Oxidation der Methylgruppe				
Monooxygenase	4-Nitrotoluol	4-Nitrobenzoesäure	C+E+N	[34; 76]
Weg 3: Initiale Reduktion der Nitrogruppe				
Nitroreduktase	Nitrobenzol	2-Aminophenol	C+E+N	[68]
	4-Nitrotoluol	6-Amino- <i>m</i> -Cresol	N	[91]
	2,4-Dinitrotoluol	2-Amino-4-Nitrotoluol	–	[67]
	2,6-Dinitrotoluol	2-Amino-6-Nitrotoluol	–	[67]
	2,4,6-Trinitrotoluol	Aminodinitrotoluole	–	[58]
Weg 4: Initiale Reduktion des aromatischen Ringes				
F₄₂₀-abhängiges Enzymsystem [55]	2,4-Dinitrophenol	Hydrid-Dinitrophenol	C+E+N	[54]
	2,4,6-Trinitrophenol	Hydrid-Trinitrophenol	C+E+N	[56]
	2,4,6-Trinitrotoluol	Dihydrid-Trinitrotoluol	–	[100]

* Nitroaromat kann genutzt werden als
 C+E+N: Kohlenstoff-, Energie- und Stickstoffquelle. Abbau erfolgt produktiv
 N: Nur Stickstoffquelle. Abbau erfolgt cometabolisch
 –: Keine Nutzung nachgewiesen, Abbau erfolgt cometabolisch

Ebenfalls **cometabolisch** erfolgt die Reduktion des aromatischen Ringes (Weg 4). Diese ungewöhnliche initiale Reaktion ist bisher nur für wenige Polynitroaromaten beschrieben: TNT, 2,4-Dinitrophenol und 2,4,6-Trinitrophenol (Pikrinsäure) [55]. Die enzymatisch katalysierte Hydrierung des Ringes führt zu gefärbten Hydrid-Meisenheimer-Komplexen. Es konnten Bakterienstämme isoliert werden, die Dinitrophenol und Pikrinsäure über Hydrid-

Meisenheimer-Komplexe denitrieren und als C+E+N-Quelle nutzen können [56; 54]. Dieselben Stämme vermögen auch TNT reduktiv zu hydrieren, eine Abspaltung von Nitrit erfolgt jedoch nicht [100].

Metabolisierung und Mineralisierung von TNT

Erste Untersuchungen zum TNT-Metabolismus gehen bereits auf die vierziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts zurück, als Urinproben von Arbeitern einer Munitionsfabrik auf Metabolite untersucht wurden. Die gefundenen Produkte deuteten auf eine **reduktive Umsetzung** hin: Hydroxylaminodinitrotoluole, Aminodinitrotoluole, acetylierte Aminodinitrotoluole, Diaminodinitrotoluole, deren demethylierte Derivate (Nitrophenylendiamine) sowie Amino-Nitrokresole konnten schon damals nachgewiesen werden [53]. Viele dieser Metabolite konnte man in der Folge auch in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren nachweisen, was auf ein universell vorhandenes Stoffwechselprinzip hindeutet. Im Laufe der Zeit wurden weitere Metabolite identifiziert, aber bis heute konnte der Stoffwechselweg nicht restlos aufgeklärt werden.

TNT ist aufgrund seiner chemischen Eigenschaften weitgehend **persistent** gegenüber einem mikrobiellen Abbau. Der elektronenziehende Charakter der drei Nitrogruppen verhindert einen initial oxidativen (elektrophilen) Angriff am Ring. Deshalb ist die verbreitetste Reaktion die Reduktion der Nitrogruppen zu den entsprechenden Aminogruppen. Unter aeroben Bedingungen werden als Reduktionsprodukte oft 2-Hydroxylamino-4,6-dinitrotoluol (2-HADNT) und 4-Hydroxylamino-2,6-dinitrotoluol (4-HADNT), 2-Amino-4,6-dinitrotoluol (2-ADNT) und 4-Amino-2,6-dinitrotoluol (4-ADNT), sowie 2,4-Diamino-6-nitrotoluol (2,4-DANT) beschrieben. Nur unter anaeroben Bedingungen ($E_h \leq -200$ eV) wird auch die dritte Nitrogruppe unter Bildung von Triaminotoluol reduziert [5; 15; 77]. "**Nitroreduktasen**", die diese Reaktion katalysieren, sind ubiquitär bei Bakterien und höheren Organismen (Pilze, Pflanzen, Tiere) vorhanden [70]. Letztere haben Nitroreduktase-Aktivitäten als unspezifische Nebenaktivität anderer Enzyme (z. B. Succinat-Dehydrogenase aus Rinderherzen [104], Xanthin-Oxidase aus Kuhmilch [64; 93]). Echte Nitroreduktasen kommen dagegen nur bei Bakterien vor und werden in Typ I (nicht sauerstoffempfindlich) und Typ II (sauerstoffempfindlich) unterschieden [14].

Die Reduktion von TNT durch Mikroorganismen erfolgt aerob wie anaerob immer **cometabolisch**, d.h. nur in Gegenwart eines zum Wachstum verwertbaren Substrates, welches während der Umsetzung als Elektronendonator dient (s. Kap. 9.2). Bisher gibt es noch keinen überzeugenden Beweis für einen produktiven Abbau von TNT, obwohl dieser schon postuliert wurde [23].

Im Boden kann TNT unter anoxischen Bedingungen auch **abiotisch** mit reaktiven Fe(II)-Spezies vollständig zu TAT reduziert werden. Diese reaktiven Fe(II)-Spezies sind entweder durch mikrobielle Fe(III)-Reduktion, durch Adsorption von gelöstem Fe(II) an Fe(III)(hydr)oxiden oder durch Reduktion von strukturellem Fe(III) in Tonmineralen entstanden [33; 41]. Reduzierte organische Substanz kann ebenfalls als Reduktionsmittel für aromatische Nitrogruppen dienen, wobei die Reduktion der organischen Substanz durch die Aktivität Schwefel-reduzierender Bakterien erfolgt [31].

Es wurden eine Reihe von abiotischen und biotischen **Folgeprodukte** nachgewiesen: Die reaktiven Zwischenstufen der Nitroso- und Hydroxylamino-Dinitrotoluole kondensieren unter aeroben Bedingungen spontan miteinander, so daß es zu Dimerisierungen (Azoxy-Tetranitro-

toluol) kommt, wenn sich diese Intermediate anreichern [10; 63]. Aminodinitrotoluole und Diaminonitrotoluole werden biologisch weiter transformiert. So sind Acylierungen (Formylierungen und Acetylierungen) der Aminogruppen beschrieben [9; 10; 37; 63], Oxidation und Methoxylierung der Methylgruppe [99], sowie kovalente Bindung von 2,4-DANT an natürliche Huminstoffe [39] und Huminstoff-Modellsubstanzen [17]. Allen gefundenen Metaboliten ist aber gemein, daß der aromatische Ring nach wie vor intakt ist und auch keine Vorstufen einer Ringspaltung (Catechole) gebildet werden, was belegt, daß der biologische Abbau von TNT eher zu einer Vielzahl von Transformationsprodukten als zur Mineralisation führt [38].

Von besonderer Relevanz scheinen aber die **polaren Metaboliten** zu sein, die an der Methylgruppe oxidiert sind. Diese konnten sowohl in Bodenmaterial [11; 82] als auch im Grundwasser [30] ehemaliger TNT-Produktionsstätten gefunden werden. Zu den polaren Metaboliten, die im Boden des ehemaligen Sprengstoffwerkes "Tanne" gefunden wurden, zählen 4-Amino-2,6-dinitrobenzoesäure, 2,4,6-Trinitrobenzylalkohol und 4-Amino-2,6-dinitrobenzylalkohol (s. Kap. 7).

Über die Herkunft der polaren Metaboliten muß weitgehend spekuliert werden. In der Vergangenheit wurden sie bei Überwachungsprogrammen vernachlässigt, obwohl oder gerade weil sie vergleichsweise gut wasserlöslich und damit mobil sind [9]. Als bisher unerkannte Nebenprodukte der Produktion scheiden sie jedenfalls aus. Weil sie aber nicht aus der TNT-Produktion stammen und auch sehr mobil sind, scheinen nach wie vor biotische und/oder abiotische Prozesse abzulaufen, die zur Bildung polarer Metabolite führen. TNT-Derivate, die an der Methylgruppe oxidiert sind, lassen sich z. B. **photochemisch** erzeugen (s. Kap. 9.2.4) [19]. Allerdings ist eine photochemische Oxidation als Grund für das Vorkommen polarer Metabolite in Bodenproben eher unwahrscheinlich. Eine rein chemische Oxidation von TNT scheidet ebenfalls aus, weil dazu extreme Bedingungen (mehrstündiges Kochen in rauchender Chromschwefelsäure) notwendig sind. Es gibt aber auch Hinweise für die **biologische Oxidation** der Methylgruppe: Während Kompostierungen TNT-kontaminierter Böden [9] konnten polare Metabolite nachgewiesen werden, aber auch im Stoffwechsel eines *Mycobacterium*-Stammes [99].

Daß TNT aber doch in beachtlichem Umfang **mineralisiert** werden kann, konnte anhand des Weißfäulepilzes *Phanerochaete chrysosporium* gezeigt werden [26]. Verantwortlich für diesen Abbau ist das sogenannte ligninolytische Enzymsystem [12; 64]. Das ligninolytische Enzymsystem der Weißfäulepilze besteht unter anderem aus einer Reihe von extrazellulären Peroxidasen (Lignin-Peroxidase, Manganabhängige Peroxidase) und Oxidasen (Laccase), die den Abbau des Holzbestandteils Lignin katalysieren. Der Stoffwechsel beginnt aber dennoch reduktiv, wobei der Pilz zunächst eine Nitrogruppe zu 4-ADNT bzw. 2-ADNT reduziert. Danach finden verschiedene Acylierungsreaktionen statt, die zu einer Vielzahl von formylierten und acetylierten Produkten führen [37; 63]. Eines dieser formylierten Produkte, 2-Amino-4-Formamido-6-Nitrotoluol, konnte schließlich als Substrat der Lignin-Peroxidase identifiziert werden [63]. Die anderen Produkte werden unter ligninolytischen Bedingungen ebenfalls abgebaut [37]. Die Mangan-abhängige Peroxidase vermag 4-ADNT direkt zu mineralisieren, wie mit dem Ligninperoxidase-negativen Pilz *Nematoloma frowardii* gezeigt werden konnte [81]. Kürzlich konnte auch ein intrazelluläres, Cytochrom P-450-abhängiges Enzymsystem identifiziert werden, das an der Mineralisierung von TNT bei *Bjerkandera adusta* beteiligt ist [25].

Die Verbreitung der Fähigkeit zur cometabolischen Mineralisation von TNT wurde in einem breit angelegten Labor-Screening-Programm mit über 91 Pilzstämmen aus 32 Gattungen in Flüssigkultur getestet. Dabei zeigte sich, daß holzerstörende Basidiomyceten allgemein die Fähigkeit besitzen, über 10 % des eingesetzten TNT zu mineralisieren [80], Bodenschimmelpilze dagegen nicht. Eine gute Abbauleistung zeigten auch streuzersetzende Basidiomyceten, die in der obersten Waldbodenschicht leben, und damit für den Einsatz in der biologischen Bodensanierung geeigneter erscheinen, als die Weißfäulepilze (s. Kap. 9.2.7).

Immobilisierung und Humifizierung von TNT

Da TNT allgemein nicht als C+E+N-Quelle dienen kann und Bakterien und Bodenschimmelpilze den Beweis eines direkten Abbaus durch Mineralisierung nicht erbringen können, blieben zunächst nur die holzerstörenden Pilze, um mit diesen ein Sanierungsverfahren auf Basis der Mineralisierung zu etablieren. Jedoch war die Mineralisation von TNT durch Pilze in Gegenwart von Boden vernachlässigbar gering, obwohl TNT in den Versuchen stark abnahm und die bekannten Metaboliten nicht akkumulierten (s. Kap. 9.2.6) [80]. Wahrscheinlich ist aber im Boden die Mineralisierung nicht der primäre Indikator für einen erfolgreichen Abbau von TNT, da auch schwer abbaubare Naturstoffe, wie z. B. Holzbestandteile (Lignin), Gerbstoffe, Harze, Wachse und Melanine im natürlichen System Boden von Mikroorganismen nicht direkt mineralisiert werden. Vielmehr erfolgt der Abbau indirekt über den Umweg der Bildung eines Kohlenstoff-Depots (**Humifizierung**) im Boden. Dieses Depot macht einen beträchtlichen Teil des gesamten Kohlenstoffvorrates aus und ist seinerseits wieder einem langsamen unspezifischen Abbau durch Mikroorganismen unterworfen, so daß über diesen Umweg auch persistente und toxische Naturstoffe entgiftet und in den Kohlenstoffkreislauf einbezogen werden (s. Kap. 9.4.5). Als Humifizierung von Schadstoffen bezeichnet man den Prozeß der irreversiblen Festlegung der Schadstoff-Derivate in der organischen Bodenfraktion (s. Kap. 2.2). Die Vorstufe der Humifizierung ist die Immobilisierung der Schadstoffe an der Bodenmatrix. Tonminerale und die organische Bodenfraktion sind dabei die dominanten Sorbentien.

Die Wechselwirkung zwischen TNT und bestimmten **Tonmineralen** (Schichtsilikaten) beruht auf der Ausbildung von Elektronen-Donator-Akzeptor-Komplexen (EDA-Komplexe) durch eine Ladungsübertragung zwischen den freien π -Elektronen des Sauerstoffs von SiO_2 und dem Elektronen-armen π -System am aromatischen Ring des TNT-Moleküls. Dadurch kann sich TNT koplanar an der siloxanen Oberfläche von Tonmineralen anlagern. Der Verteilungskoeffizient zwischen sorbiert und gelöst (K_d , Adsorptionskonstante) hängt stark von den beteiligten Schichtsilikaten und den austauschbaren hydratisierten Kationen ab, wie Untersuchungen zur Sorption von TNT an reinen Tonen im Labor zeigen [32] (s. Tab. 2.33).

Tab. 2.33 Adsorptionskonstanten (K_d -Werte) von TNT für homoionisch belegte monomineralische Tone (2- und 3-Schicht-Tonminerale) [32].

Tonmineral	Ca^{2+} -Ton K_d [l/Kg]	K^+ -Ton K_d [l/Kg]
Kaolinit	0,3	1.800
Illit	1,2	12.500
Montmorillonit	1,7	21.500

An naturnahen Bodenmodellsubstanzen lassen sich diese Wechselwirkungen auch nachweisen, jedoch sind die gefundenen Adsorptionskonstanten ebenso schwach wie die kalziumionisierter monomineralischer Tone [105]. Reduzierte Metabolite sorbieren schwächer an monomineralische Tone als TNT und die oben bereits vorgestellten polaren Metaboliten sorbieren überhaupt nicht an Tonminerale [33]. Die Sorption von TNT, 2-ADNT und 4-ADNT an Tonminerale ist reversibel. Dagegen wurde gefunden, daß die TNT-Metabolite 2-, 4-HADNT und TAT irreversibel und DANT partiell irreversibel an Tonminerale sorbieren [16; 55].

Die Wechselwirkung zwischen TNT und **organischer Substanz** wurde anhand von Standardhuminsäuren [16; 59] und humosem Oberboden [97] untersucht. Ionische Wechselwirkungen mit Huminsäuren bewirken, daß mit steigendem pH und steigender Ionenstärke mehr TNT gebunden wird. Im Gegensatz dazu zeigen die reduzierten Metabolite, wie z.B. 2,6-Diamino-4-Nitrotoluol (2,6-DANT), bezüglich des pH-Wertes genau entgegengesetztes Verhalten [59]. Von den reduzierten TNT-Metaboliten, insbesondere vom Triaminotoluol (TAT), wird nicht nur eine Festlegung an der anorganischen (s.o.), sondern auch an der organischen Bodenmatrix über kovalente C-N-Bindungen angenommen [77].

Direkte Beweise für das beobachtete Auftreten von nicht extrahierbaren Rückständen, die kovalent an natürliche Huminstoffe gebunden sind, konnten über ¹⁵N-NMR-Spektroskopie bereits mit [¹⁵N]-Anilin an verschiedenen Fulvo- und Huminsäuren erbracht werden. Der Stickstoff der Aminogruppe wurde dabei fest in neu gebildete Heterozyklen eingebaut [96]. Kopplungsexperimente mit 2,4-DANT und Guajacol in Gegenwart einer pilzlichen Laccase ergaben die Bildung einer trimeren Verbindung aus zwei Guajacolumolekülen und einem Molekül DANT, dessen Struktur eindeutig als 5-(2-Amino-3-Methyl-4-Nitroanilino)-3,3'-Dimethoxy-4,4'-Diphenochinon bestimmt wurde [17]. Damit konnte erstmals die Struktur einer spezifischen **Kopplung an Huminstoffmodellsubstanzen** ermittelt werden.

2.1.9.3 Sanierungspraxis

Ende der 80er Jahre lagen bundesweit noch keine Erfahrungen zur Reinigung von mit TNT und anderen STV verunreinigtem Boden vor. Der BMFT (heute BMBF) hat sich damals im Rahmen der MOSAL-Ausschreibung (Modellhafte Sanierung von Altlasten) zur Förderung des FuE-Vorhabens "Modellhafte Sanierung von Altlasten am Beispiel des TNT-Sanierungsprojektes **Stadtallendorf/Hessen**" entschlossen (Laufzeit 01.07.1990 bis 30.04.1999). Eine Dokumentation dieses Vorhabens ist im Rahmen der "Fachübergreifenden Auswertung von Forschungsergebnissen" kürzlich veröffentlicht worden [65]. Weitere Standorte, an denen die Sanierung bereits begonnen wurde, sind Hessisch-Lichtenau/Hirschhagen und Leverkusen-Schlebusch. Dabei wurde u.a. belasteter Oberboden ausgetauscht und je nach Belastungsgrad entweder der Verbrennung, der Bodenwäsche oder dem Bergversatz zugeführt. Um eine Vorstellung von Sanierungskosten und -aufwand zu bekommen, seien die folgenden Zahlen vom Standort Stadtallendorf genannt: Mehr als 4.000 der 11.000 Stadtallendorfer Bürger wohnen auf dem heutigen Werksgelände, 8.000 Leute arbeiten dort [103]. Die Sanierungsmaßnahmen finden statt, ohne die Menschen umzusiedeln oder Industrien zu schließen. Obwohl das Gelände über 420 ha groß ist, mußten bisher nur ca. 100.000 t TNT kontaminiertes Bodenmaterial behandelt werden [6]. Dagegen wird die noch aus dem ersten Weltkrieg stammende Sprengstoff-Fabrik "Espagit" bei Hallschlag nicht saniert, sondern nur in der Kernzone ("Exotentrichter") durch Erdabdeckung gesichert. Die Entscheidung gegen die Sanierung wird im Landkreis nach wie vor heftig diskutiert, wie zahlreiche Zeitungsberichte

dokumentieren [50]. Zur Produktion und Geschichte des Werkes "Espagit" bei Hallschlag ist vor kurzem ein Buch erschienen [73].

Unabhängig von der Sanierungsfrage muß auch die Finanzierung geklärt werden. Wenn möglich sollten verschiedene Optionen des **Flächenrecyclings** geprüft werden. Daß dieses auch bei Rüstungsaltslasten möglich ist, zeigt das Beispiel der Sanierung der ehemaligen Munitionsanstalt "Kleinkötz" in der Nähe von Günzburg, Bayern. Hier ist die Wertschöpfung durch die Sanierung die wichtigste Finanzierungsstütze. Das genannte Gelände wird nach Abschluß der Sanierung an den dänischen Konzern LEGOLAND verkauft werden, die dort einen Freizeitpark errichten wollen [43; 52].

Tatsächlich ist der Gedanke des Flächenrecyclings unter Ausnutzung der Wertschöpfung auch eine Chance für biologische Sanierungsverfahren, nicht nur auf Rüstungsaltslasten. Eine 1999 veröffentlichte Studie zur **Ökonomie verschiedener Sanierungsverfahren** von Bodenmaterialien kam zu dem Ergebnis, daß biologische Bodensanierungsverfahren in Deutschland aus technischen Gründen günstiger sind als Bodenverbrennungs- oder Bodenwaschverfahren [44]. Aber solange die Deponierung von kontaminiertem Bodenmaterial die vordergründig günstigste Alternative zur Verwertung des Bodenmaterials darstellt, ist die Politik gefragt, den nachhaltigen Umgang mit der Ressource Boden zu unterstützen, so wie das Bundesbodenschutzgesetz es in § 1 fordert [13].

Sanierungsoption: Biologische Verfahren

In der Vergangenheit wurden verschiedene *On site*-Verfahrensansätze zur biologischen Bodenbehandlung im Rahmen von Machbarkeitsstudien getestet:

- In Hessisch-Lichtenau/Hirschhagen wurde ein zweistufiges Reaktorverfahren (Bodensuspension) mit 30 t getestet [57]
- In Hallschlag wurde ein zweistufiges Reaktorverfahren (Bodensuspension) mit 50 t und ein anaerob/aerobes Kompostierungsverfahren mit 50 t getestet [83]
- In Leverkusen/Schleebusch wurde ein anaerob/aerobes Kompostierungsverfahren mit 45 t getestet [101]

Das "Werk Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld war und ist häufig "Testobjekt" von biologischen Verfahren zur Sanierung TNT-belasteter Böden: Im Kleinmaßstab wurden dort *On site*-Mieten mit Weißfäulepilzen [8] und streuabbauenden Pilzen (s. Kap. 9.2.7) [40] getestet. Zur Zeit wird auch eine *In situ*-Behandlung auf einer Fläche von 175 qm durchgeführt [102]. Die abschließenden Ergebnisse liegen aber noch nicht vor. Im Rahmen der maßstabsgerechten Erprobung biologischer Sanierungsverfahren (s. Kap. 7 und 9.5) wurden ein anaerob/aerobes Kompostierungsverfahren (s. Kap. 9.5.1), ein dynamisches Beetverfahren (s. Kap. 9.5.2) und ein Mietenverfahren mit Weißfäulepilzen (s. Kap. 9.5.3) jeweils im 70-t-Maßstab erprobt.

Bei Experimenten mit radioaktiv markiertem TNT wurde immer wieder festgestellt, daß TNT und seine Metabolite unabhängig vom untersuchten Prozeß schnell und in hohen Quantitäten irreversibel **an die Bodenmatrix binden**. Das konnte in einem anaerob-aeroben Bodensuspensionsverfahren (> 99 %) [2], bei verschiedenen Kompostierungsvarianten (bis 80 %, wenn der Anteil Boden 25 % nicht überstieg, sonst deutlich höher [20; 21] (Übersicht in [9])) und beim Einsatz von Pilzen (86 %) [28] gezeigt werden. Die Radioaktivität wurde jeweils in den wässrig- und methanolisch-extrahierbaren, und in den organischen Fraktionen Fulvosäuren, Huminsäuren und Huminen bestimmt.

In letzter Zeit wurden die **gebundenen Rückstände** von TNT und Metaboliten an den organischen Bodenfraktionen näher charakterisiert. Dabei standen Untersuchungen zur Remobilisierung dieser Rückstände unter *worst case*-Bedingungen, zur Ökotoxikologie, zum Langzeitverhalten und zur Klärung der Bindungsstruktur im Vordergrund. In Deutschland wurden die Untersuchungen zuerst an einem anaerob/aeroben Bodensuspensionsverfahren durchgeführt und dann im Rahmen des Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung" an einem anaerob-aeroben Kompostierungsverfahren, einem dynamischen Beetverfahren und einem Pilzverfahren. Da die Versuche mit markierten Ausgangssubstanzen durchgeführt werden mußten ($[^{14}\text{C}]$ -TNT oder $[^{15}\text{N}]$ -TNT), war bei allen Untersuchungen die Übertragbarkeit der erzeugten Ergebnisse auf die Sanierungspraxis wichtig. Dieses betraf einerseits sog. "Scaling"-Effekte vom Labor zum Praxismaßstab und andererseits das Verhalten der zugesetzten markierten Substanzen im Vergleich zur Originalkontamination (s. Tab. 2.34).

Tab. 2.34: Untersuchungsparameter zum Nachweis der Nachhaltigkeit biologischer Sanierungsverfahren für TNT-kontaminierte Bodenmaterialien im Rahmen des Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung".

	Labor	Pilot	Maßstabsgerecht
Bodenmaterial Menge [t] Quelle	Standortboden 0,002 "Werk Tanne"	Standortboden 2 "Werk Tanne"	Standortboden 70 "Werk Tanne"
Dotierung	$[^{14}\text{C}]$ TNT, $[^{15}\text{N}]$ TNT	$[^{14}\text{C}]$ TNT	–
TNT-Gehalt [mg/kg]	4.000 – 8.000	200 – 300	500 – 1.000
Chemische Analytik	Bodenparameter, Nitroaromaten	Bodenparameter, Nitroaromaten	Bodenparameter, Nitroaromaten
Massenbilanz (Festlegung)	^{14}C -Fraktionierung	^{14}C -Fraktionierung	–
Remobilisierung	<i>worst case</i> - Bedingungen	<i>worst case</i> - Bedingungen	–
Ökotoxikologie		Boden und Eluat	Boden und Eluat
Langzeitverhalten	–	Großlysimeter	–
Struktur- untersuchungen	^{15}N -NMR	–	–
Literatur	s. Kap. 9.4.3, 9.4.4, 9.4.5 bzw. [29]	s. Kap. 9.4.2	s. Kap. 9.5.1, 9.5.2, 9.5.3 u. Kap. 7

Ohne Beispiel ist deshalb die im Forschungsverbund mit $[^{14}\text{C}]$ -TNT durchgeführte Simulation der drei Sanierungsverfahren im **2-m³-Maßstab** mit nachfolgenden Untersuchungen zur Remobilisierung und zum Langzeitverhalten (s. Kap. 9.4.2). Diese Größenordnung stellt eine

Klammer zwischen den Versuchen im Labor und im Feld dar, da sie das Messen von Laborparametern ($[^{14}\text{C}]\text{-TNT}$, $^{14}\text{CO}_2$) unter praxisnahen Bedingungen erlaubt. Es konnte gezeigt werden, daß der Abbau im 2-m³-Maßstab ähnlich verlief wie im Großmaßstab, und daß das aufdotierte TNT im Prozeß wie die originäre Kontamination umgesetzt wurde. Während der nachfolgenden Untersuchungen zur Remobilisierung und zum Langzeitverhalten konnten keine nennenswerten Mengen an Radioaktivität eluiert oder extrahiert werden. Auch die ökotoxikologischen Untersuchungen lieferten ähnliche Befunde wie die maßstabsgerechte Erprobung (s. Kap. 7).

Im **Kleinmaßstab** wurden die drei Verfahren simuliert, um mit Hilfe von $[^{15}\text{N}]\text{-TNT}$ Material für Strukturanalysen der gebundenen Rückstände zu erzeugen (s. Kap. 9.4.3, 9.4.4 und 9.4.5). Parallel dazu wurden Ansätze mit $[^{14}\text{C}]\text{-TNT}$ durchgeführt, um den Grad der Einbindung abschätzen zu können. Die erfolgreiche Humifizierung konnte jeweils durch den Nachweis der kovalenten Einbindung gezeigt werden, die allerdings nicht quantifizierbar war [49]. Da aber auch durch drastische Extraktions- und Remobilisierungsbedingungen in keinem Fall TNT oder Metaboliten remobilisiert werden konnten, kann von einer quantitativen Festlegung ausgegangen werden, obwohl in geringem Umfang noch freie Nitrogruppen detektiert wurden. Die Einbindung von $[^{15}\text{N}]\text{-TNT}$ beim anaerob/aeroben Bodensuspensionsverfahren wurde ebenfalls untersucht [48]. Auch hier konnten kovalente Bindungen nachgewiesen werden. Langzeituntersuchungen zeigten ebenfalls eine außerordentliche und irreversible Festlegung der Metaboliten [1]. Ökotoxikologische Untersuchungen (s. Kap. 9.3) konnten keine Effekte nachweisen, die auf TNT oder seine Metaboliten zurückzuführen waren. Trotzdem wiesen manche Tests ein toxikologisches Potential im sanierten Bodenmaterial oder im Eluat nach, die aber jeweils auf verfahrensspezifische Einflüsse (Salzfrachten, freie Huminsäuren) zurückzuführen waren. Hier gibt es durchaus noch Optimierungsbedarf [27].

Ausblick

Es stehen heute vier verschiedene Verfahren für die biologische Sanierung TNT-kontaminierter Bodenmaterialien zur Verfügung, die nachweislich auf dem Prinzip der Humifizierung von Schadstoffen beruhen und hier noch einmal explizit erwähnt werden sollen:

1. Anaerob-aerobes Bodensuspensionsverfahren des Fraunhofer Institutes für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart
2. Anaerob-aerobes Kompostierungsverfahren der Fa. Umweltschutz Nord, Ganderkesee
3. Dynamisches Beetverfahren der Fa. Plambeck ContraCon, Cuxhaven
4. Pilzverfahren der Fa. AWIA Umwelt, Göttingen

Es wurden oder werden noch weitere biologische *Off site*- und *In situ*-Verfahren zur Reinigung TNT-kontaminierter Böden/Bodenmaterialien in Deutschland entwickelt oder bereits angeboten. Diesen fehlt zur Zeit aber der Nachweis der Nachhaltigkeit [75; 95] oder eine großmaßstäbliche Erprobung [39].

Zur Qualitätssicherung ist aber der Aufbau eines Kontrollprogramms nötig, das nicht nur auf Basis der chemischen Analytik beruht. Um den Erfolg einer quantitativen Humifizierung nachzuweisen, wurde kürzlich das folgende **Testpaket** vorgeschlagen [60]:

1. Die mit organischen Lösungsmitteln extrahierbaren Schadstoffkonzentrationen sollten unter noch zu definierenden Grenzwerten liegen
2. Der Einsatz einer Remobilisierungs-Testbatterie (z.B. je ein mechanischer, biologischer und chemischer Test) darf nicht zur Remobilisierung von freien Schadstoffen oder Metaboliten führen
3. Boden und Extrakt oder Eluat dürfen sich in ihrer ökotoxikologischen Bewertung (durch Einsatz einer Ökotox-Testbatterie) nicht signifikant von einem unbelasteten Kontrollboden unterscheiden.

2.1.9.4 Biologisches Selbstreinigungspotential

Der Erfolg einer biologischen Selbstreinigung von TNT wird in Böden als gering angesehen. Das liegt an der heterogenen, nicht bioverfügbaren Verteilung der Schadstoffe im Untergrund, die den Abbau erschweren. Bei jedem Regen werden Schadstoffe aus diesen Brocken gelöst und mobilisiert. Biologische und abiotische Prozesse führen während der Passage von TNT durch den Untergrund zu mobileren Verbindungen (Reduktionsprodukte und polare Metabolite), die nicht retardiert werden und ins Grundwasser gelangen. Eine praxisnahe Untersuchung der Prozesse im Untergrund, sowohl in der gesättigten als auch in der ungesättigten Bodenzone ist für die Gefährdungsabschätzung aber dringend erforderlich. Das Beispiel der "Entdeckung" der polaren Metaboliten zeigt, daß man vor (bösen) Überraschungen auch mit dem heutigen Kenntnisstand nicht gefeit ist.

2.1.9.5 Literatur

1. **Achnich C., and H. Lenke.** 2001. Stability of immobilized 2,4,6-trinitrotoluene metabolites in soil under long-term leaching conditions. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**:280-283.
2. **Achnich, C., U. Sieglen, H.-J. Knackmuss, and H. Lenke.** 1999. Irreversible binding of biologically reduced 2,4,6-trinitrotoluene to soil. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**:2416-2423.
3. **Alexander, M., and B. K. Lustigman.** 1966. Effect of chemical structure on microbial degradation of substituted benzenes. *J. Agric. Food Chem.* **14**:410-413.
4. **Ashby, J., Burlinson, P. A. Lefevre, and J. Topham.** 1985. Non-genotoxicity of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) to the mouse bone marrow and the rat liver: implications for its carcinogenicity. *Arch. Toxicol.* **58**:9-14.
5. **Blotevogel, K.-H., and T. Gorontzy.** 2000. Microbial degradation of compounds with nitro-functions. *In: H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler (ed.) Biotechnology Vol. 11b, Environmental processes - soil decontamination, waste gas treatment, potable water preparation.* VCH-Wiley, Weinheim. 274-294.
6. **Böhmer, V., and P. Rölle.** 1999. Jahresbericht 1998 der Hessischen Industriemüll GmbH, Bereich Altlastensanierung (HIM-ASG), Klenkes Druck und Verlag GmbH, Aachen.
7. **Booth, G.** 2001. Aromatic Nitro Compounds. *In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.* 6th Edition, Electronic version, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

8. **Braedt, M., H. Hörseljau, F. Jacobs, and F. Knolle.** 1998. Die Sprengstofffabrik "Tanne" in Clausthal-Zellerfeld. Geschichte und Perspektive einer Harzer Rüstungsaltlast. Papierflieger, Clausthal-Zellerfeld.
9. **Bruns-Nagel D., K. Steinbach, D. Gemsa, and E. von Löw.** 2000. Composting (Humification) of nitroaromatic compounds. In [67]: 357-393.
10. **Bruns-Nagel, D., O. Drzyzga, K. Steinbach, T. C. Schmidt, E. von Löw, T. Gorontzy, K.-H. Blotevogel, and D. Gemsa.** 1998. Anaerobic/aerobic composting of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil in a reactor system. Environ. Sci. Technol. **32**:1676-1679.
11. **Bruns-Nagel, D., T.C Schmidt, O Drzyzga., E. von Löw., K. Steinbach.** 1999. Identification of oxidized TNT metabolites in soil samples of a former ammunition plant. Environ. Sci. Pollut. Res. **6**: 7-10.
12. **Bumpus J. A., and M. Tatarko.** 1994. Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium*: identification of initial degradation products and the discovery of a TNT metabolite that inhibits lignin peroxidases. Curr. Microbiol. **28**:185-190.
13. **Bundesbodenschutzgesetz.** 1998. Gesetz zum Schutz vor schädlichen Bodenveränderungen und zur Sanierung von Altlasten vom 17. März 1998.
14. **Cerniglia, C. E., and C. C. Somerville.** 1995. Reductive metabolism of nitroaromatic and nitropolycyclic aromatic hydrocarbons. In [88]:99-115.
15. **Crawford, R. L.** 1995. Biodegradation of nitrated munition compounds and herbicides by obligately anaerobic bacteria. In [88]: 87-98.
16. **Daun, G., H. Lenke, M. Reuss, and H.-J. Knackmuss.** 1998. Biological treatment of TNT-contaminated soil 1. Anaerobic cometabolic reduction and interaction of TNT and metabolites with soil components. Environ. Sci. Technol. **32**:1956-1963.
17. **Dawel G., M. Kästner, J. Michels, W. Poppitz, W. Günther, and W. Fritsche.** 1997. Structure of laccase mediated product of coupling 2,4-diamino-6-nitrotoluene to guaiacol, a model for coupling of 2,4,6-trinitrotoluene metabolites to a humic organic soil matrix. Appl. Environ. Microbiol. **63**:2560-2565.
18. **Dickel, O., and H.-J. Knackmuss.** 1991. Catabolism of 1,3-dinitrobenzene by *Rhodococcus* sp. QT-1. Arch. Microbiol. **157**:76-79.
19. **Dillert, R., M. Brandt, I. Fornefett, U. Siebers, and D. Bahnemann.** 1995. Photocatalytic degradation of trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds. Chemosphere **30**:2333-2341.
20. **Drzyzga, O., D. Bruns-Nagel, T. Gorontzy, K. H. Blotevogel, and E. von Löw.** 1999. Anaerobic incorporation of the radiolabeled explosive TNT and metabolites into the organic soil matrix of contaminated soil after different treatment procedures. Chemosphere **38**:2081-2095.
21. **Drzyzga, O., D. Bruns-Nagel, T. Gorontzy, K. H. Blotevogel, D. Gemsa, and E. von Löw.** 1998. Incorporation of ¹⁴C-labeled 2,4,6-trinitrotoluene metabolites into different soil fractions after anaerobic-aerobic treatment of soil/molasses mixtures. Environ. Sci. Technol. **32**:3529-3535.

22. **Dunlap, K. L.** 1981. Nitrobenzene und Nitrotoluole *In*: Kirk-Othmer (Hrsg.). Encyclopedia of chemical Technology 3. Aufl. Vol 15, S. 916-932, Wiley, New York.
23. **Duque, E., A. Haidour, F. Godoy und J. L. Ramos.** 1993. Construction of a *Pseudomonas* hybrid strain that mineralizes 2,4,6-trinitrotoluene. *J. Bacteriol.* **175**:2278-2283.
24. **Ecker, S., T. Widmann, H. Lenke, O. Dickel, P. Fischer, C. Bruhn, and H.-J. Knackmuss.** 1992. Catabolism of 2,6-dinitrophenol by *Alcaligenes eutrophus* JMP134 and JMP222. *Arch. Microbiol.* **158**:149-154.
25. **Eilers, A., E. Rüngeling, U.M. Stündl, and G. Gottschalk.** 1999. Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by the white rot fungus *Bjerkandera adusta* DSM 3375 depends on cytochrome *P*-450. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**:75-80.
26. **Fernando, T., J. A. Bumpus, and S. D. Aust.** 1990. Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1666-1671.
27. **Fleischmann, S. und B.-M. Wilke.** 2000. Ökotoxikologische Tests zur Bodenbewertung. Ergebnisse des Verbundes 4 "Ökotoxikologische Testbatterien". *In* [61]: 156-174.
28. **Fritsche, W., K. Scheibner, A. Herre and M. Hofrichter.** 2000. Fungal degradation of explosives: TNT and related nitroaromatic compounds. *In* [87]:213-237.
29. **Geyer, R., M. Weiss, M. Kästner und G. Diekert.** 2000. Analyse der Bindungsstrukturen gebundener Rückstände im Boden nach aerober biologischer Behandlung mit ligninolytischen Pilzen - Bildung und Remobilisierbarkeit nicht extrahierbarer Rückstände. *In* [61]: 123-140.
30. **Godejohann, A., K. Preiss, K.-M. Levsen, C. Wollin, K. Mügge.** 1998. Determination of polar organic pollutants in aqueous samples of former ammunition sites in Lower Saxony by means of HPLC/Photodiode Array Detection (HPLC/PDA) and Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (¹H-NMR). *Acta hydrochim. hydrobiol.* **26**:330-337.
31. **Haderlein, S. B., and R. P. Schwarzenbach.** 1995. Environmental processes influencing the rate of abiotic reduction of nitroaromatic compounds in the subsurface. *In* [88]:199-225.
32. **Haderlein, S. B., K. W. Weissmahr, and R. P. Schwarzenbach.** 1996. Specific adsorption of nitroaromatic explosives and pesticides to clay minerals. *Environ. Sci. Technol.* **30**:612-622. .
33. **Haderlein, S. B., T. B. Hofstetter, and R. P. Schwarzenbach.** 2000. Subsurface chemistry of nitroaromatic compounds. *In* [87]:311-356.
34. **Haigler, B. E., and J. C. Spain.** 1993. Biodegradation of 4-nitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain 4NT. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2239-2243.
35. **Haigler, B. E., W. H. Wallace, and J. C. Spain.** 1994. Biodegradation of 2-nitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain JS42. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3466-3469.
36. **Harterter, D. R.** 1985. The use and importance of nitroaromatic chemicals in the chemical industry. *In*: D. E. Rickert (Ed.), Toxicity of Nitroaromatic Compounds. Chemical Industry Institute of Toxicology Series. Hemisphere Publishing Cooperation, Washington D.C., S. 1-14.

37. **Hawari, J., A. Halasz, S. Beaudet, G. Ampleman, and S. Thiboutot.** 1999. Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) with *Phanerochaete chrysosporium* in agitated cultures at pH 4.5. Appl. Environ. Microbiol. **65**:2977-2986.
38. **Hawari, J., S. Beaudet, A. Halasz, S. Thiboutot, and G. Ampleman.** 2000. Microbial degradation of explosives: biotransformation versus mineralization. Appl. Microbiol. Biotechnol. **54**:605-618.
39. **Held, T., G. Draude, F. R. J. Schmidt, A. Brokamp, and K. H. Reis.** 1997. Enhanced humification as an *in-situ* bioremediation technique for 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) contaminated soil. Environ. Technol. **18**:479-487.
40. **Herre, A., J. Michels, K. Scheibner, and W. Fritsche.** 1997. Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) contaminated soil by a litter decaying fungus. In: Preprints of the fourth international in-situ and on-site bioremediation symposium. April 28 - May 01, 1997. New Orleans **2**: 493-498.
41. **Hofstetter, T. B.** 1999. Reduction of polynitroaromatic compounds by reduced iron species - coupling biogeochemical processes with pollutant transformation. Dissertation ETH Zürich Nr 13'140.
42. **Homburg, A.** 1995. Entwicklung der Explosivstoffindustrie in Deutschland. In: Trimborn, F. Explosivstofffabriken in Deutschland. Ein Nachschlagewerk zur Geschichte der deutschen Explosivstoffindustrie. Verlag Locher, Köln.
43. **IABG, Bereich Umwelt.** 2001. Konversion einer Rüstungsaltplast zum Freizeitpark. Firmeninformation. im Internet unter <http://www.iabg.de>.
44. **Jansky, H.-J., and V. Neumann 1999.** Preisentwicklung in der Bodendekontamination - wirtschaftliche und technische Rahmenbedingungen. TerraTech **2/99**:25-29.
45. **Kayed, A.** 1989. Ergebnisse und Erfahrungen bei der Gefährdungsabschätzung für die Rüstungsaltplasten des ehemaligen Sprengstoffwerkes "Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld. In: Der Niedersächsische Umweltminister (Hrsg.). Expertengespräch Rüstungsaltplasten 25./26. April 1989 in Hannover. S. 249-259.
46. **Klausmeier, R. E., J. L. Osmon, and D. R. Walls.** 1973. The effect of trinitrotoluene on microorganisms. Dev. Ind. Microbiol. **15**: 309-317.
47. **Knicker, H.** 2000. Festkörper ^{15}N -NMR spektroskopische Charakterisierung gebundener Transformationsprodukte von 2,4,6-Trinitrotoluol. In [61]: 141-155.
48. **Knicker, H., C. Achtnich, and H. Lenke.** 2001. Solid-state nitrogen-15 nuclear magnetic resonance analysis of biologically reduced 2,4,6-trinitrotoluene in a soil slurry remediation. J. Environ. Qual. **30**:403-410.
49. **Knicker, H., D. Bruns-Nagel, O. Drzyzga, E. von Löw, and K. Steinbach.** 1999. Characterization of ^{15}N -TNT residues after an anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures by solid state ^{15}N NMR spectroscopic parameters. Environ. Sci. Technol. **33**: 343-349.
50. **Kölner Stadt-Anzeiger.** 2001. Recherche im Internet unter <http://www3.ksta.de/archiv/>, Stichwort "Espagit".

51. **Koss, G., A. Lommel, I. Ollroge, I. Tesseraux, R. Haas und A. D. Kappos.** 1989. Zur Toxikologie der Nitrotoluole und weiterer Nitroaromaten aus rüstungsbedingten Altlasten. Bundesgesundhbl. **32**:527-536.
52. **Lauer, U., A. Dahn und I. Le Dren.** 1999. Mikrobiologische Sanierung von Rüstungsaltpasten - Verfahren und Wege in die Praxis. In: S. Heiden, R. Erb, J. Warrelmann, and R. Dierstein (Hrsg.) Biotechnologie im Umweltschutz. Bioremediation: Entwicklungsstand-Anwendungen-Perspektiven. Erich-Schmidt-Verlag, Berlin, S. 218 - 223.
53. **Lemberg, R. and J. P. Callahan.** 1944. Metabolism of symmetrical trinitrotoluene. Nature **154**:768-769.
54. **Lenke H., D.H. Pieper, C. Bruhn, and H.-J. Knackmuss.** 1992. Degradation of 2,4-dinitrophenol by two *Rhodococcus erythropolis* strains, HL 24-1 and HL 24-2. Appl. Environ. Microbiol. **58**:2928-2932.
55. **Lenke, H. C. Achtnich, and H.-J. Knackmuss.** 2000. Perspectives of bioelimination of polynitroaromatic compounds. In [87]:91-126.
56. **Lenke, H., and H.-J. Knackmuss.** 1992. Initial hydrogenation during catabolism of picric acid by *Rhodococcus erythropolis* strains HL 24-2. Appl. Environ. Microbiol. **58**:2933-2937.
57. **Lenke, H., J. Warrelmann, G. Daun, K. Hund, U. Sieglen, U. Walter, and H.-J. Knackmuss.** 1998. Biological treatment of TNT-contaminated soil II: Biological induced immobilization of the contaminants and full-scale application. Environ. Sci. Technol. **32**:1964-1971.
58. **Lewis, A., M. M. Ederer, R. L. Crawford, and D. L. Crawford.** 1997. Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene J. Ind. Microbiol. Biotechnol. **18**:89-96.
59. **Li, A. Z., K. A. Marx, J. Walker, and D. L. Kaplan.** 1997. Trinitrotoluene and metabolites binding zu humic acid. Environ. Sci Technol. **31**:584-589.
60. **Mahro, B.** 2000. Kein Hinweis auf Wiederfreisetzung von humifizierten PAK und TNT bei der biologischen Bodensanierung, ein Resumee der Arbeit des Teilverbundes 5. In [61]: 1-31.
61. **Mahro, B., H. Mescher und Umweltbundesamt - Projektträger AWAS des BMBF** (Hrsg.). 2000. Verbundvorhaben "Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen bei der biologischen Bodensanierung" - Beiträge beim 2. Statusseminar am 22.02.2000 an der Hochschule Bremen. Grün-Weiße Reihe des BMBF.
62. **Meyer, R.** 1985. Explosivstofflexikon. 6. Aufl., VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
63. **Michels J., and G. Gottschalk.** 1995. Pathway of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. In [88]:135-149.
64. **Michels, J., and G. Gottschalk.** 1994. Inhibition of the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* by hydroxylamino-dinitrotoluene, an early intermediate in the degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. Appl. Environ. Microbiol. **60**:187-194.
65. Modellhafte Sanierung von Altlasten am Beispiel des TNT-Sanierungsprojektes Stadtallendorf/Hessen. 2000. In: Modellhafte Sanierung von Altlasten MOSAL.

Fachübergreifende Auswertung von Forschungsergebnissen. Probiotec GmbH (Redaktion und Bearbeitung). Umweltbundesamt, PT AWAS (Hrsg.). FKZ 1490900. CD-ROM.

66. **Nishino, S. F., and J. C. Spain.** 1995. Oxidative Pathway for the Biodegradation of Nitrobenzene by *Comamonas* sp. Strain JS765. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2308-2313.
67. **Nishino, S. F., G. C. Paoli, and J. C. Spain.** 2000. Aerobic Degradation of Dinitrotoluenes and Pathway for Bacterial Degradation of 2,6-Dinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2139-2147.
68. **Nishino, S. F., J. C. Spain, and Z. He.** 2000. Strategies for aerobic degradation of nitroaromatic compounds by bacteria: process discovery to field application. In [87]:7-62.
69. **Osmon, J. L., and R. E. Klausmeier.** 1972. The microbial degradation of explosives. *Dev. Ind. Microbiol.* **14**:247-252.
70. **Preuß, A, and P.-G. Rieger.** 1995. Anaerobic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds. In [88]: 69-85.
71. **Preuß, J.** 1996. Alte Rüstungsstandorte - Erfassung und Bewertung von Umweltkontaminationen. *Forschungsmagazin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.* **1**:35-51.
72. **Preuß, J. und C. C. Wiegandt.** 1992. Rüstungsstandorte des deutschen Reiches auf dem Gebiet der Bundesrepublik Deutschland. *Geographische Rundschau* **44**:175-178.
73. **Preuß, J. und F. Eitelberg.** 2001. Hallschlag. ISBN 3-88250-045-X (Erhältlich beim Geographischen Institut der Universität Mainz, Saarstr. 21, 55121 Mainz).
74. **Preuß, J., and Haas, R.** 1987. Standorte der Kampfstoffindustrie im ehemaligen Deutschen Reich. *Geographische Umschau* **39**:578-584.
75. **Reinhard, S. und R. Feldmann.** 1998. Von der Forschung in die Praxis. *Umweltmagazin* **12/98**:48.
76. **Rhys-Williams, W., S. T. Taylor, and P. A. Williams.** 1993. A novel pathway for the catabolism of 4-nitrotoluene by *Pseudomonas*. *J. Gen. Microbiol.* **139**:1967-1972.
77. **Rieger P.-G., and H.-J. Knackmuss.** 1995. Basic knowledge and perspectives on biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene and related nitroaromatic compounds in contaminated soil. In [88]:1-18.
78. **Rippen, G.** 1999. *Handbuch Umweltchemikalien. Stoffdaten, Prüfverfahren, Vorschriften.* Loseblattsammlung, ecomed Verlag, Landsberg/Lech.
79. **Römpp Chemie Lexikon.** 1993. Hrsg. J. Falbe und M. Regitz. Thieme Verlag, Stuttgart, New York. 8. Aufl.
80. **Scheibner, K., M. Hofrichter, A. Herre, J. Michels, and W. Fritsche.** 1997. Screening for fungi intensively mineralizing 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**:452-457. Published erratum appears in *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**:431.

81. **Scheibner, K., M. Hofrichter, and W. Fritsche.** 1997. Mineralization of 2-amino-4,6-dinitrotoluene by manganese peroxidase of the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Biotechnol Lett.* **19**:835-839.
82. **Schmidt T. C., K. Steinbach, E. v. Löw, G. Stork.** 1998. Highly polar metabolites of nitroaromatic compounds in ammunition waste water. *Chemosphere* **37**:1079-1091.
83. **Schmitz, M.** 1995. Vorversuche zur Sanierung des Rüstungsaltenstandortes Hallschlag, *TerraTech* **6/95**:31-34.
84. **Schneider, K., J. Oltmanns, M. Hassauer und U. S. Schuhmacher.** 2000. Ermittlung von Prüfwerten für ausgewählte rüstungsaltenstoffspezifische Schadstoffe, 1998-1999. Im Auftrag des Umweltbundesamtes Berlin F+E-Vorhaben 298 76 251.
85. **Schneider, U.** 1989. Erfahrungen aus systematischen Untersuchungen von Standorten ehemaliger Rüstungsbetriebe. In: Der Niedersächsische Umweltminister (Hrsg.). Expertengespräch Rüstungsaltenlasten 25./26. April 1989 in Hannover. S. 261-279.
86. **Smock, L. A. , D. L. Stoneburner, and J. R. Clark.** 1976. The toxic effect of trinitrotoluene (TNT) and its primary degradation products on two species of algae and the fathead minnow. *Water Research* **10**:537-543. .
87. **Spain J. C., J. B. Hughes, H.-J. Knackmuss (eds.).** 2000. Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives. CRC Press, Boca Raton.
88. **Spain, J. C. (ed.).** 1995. Biodegradation of nitroaromatic compounds. Environmental Science Research Series, Vol. 49, Plenum Press, New York.
89. **Spain, J. C., and D. T. Gibson.** 1991. Pathway for biodegradation of *p*-nitrophenol in a *Moraxella* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:812-819.
90. **Spanggord, R. J., J. C. Spain, S. F. Nishino, and K. E. Mortelmans.** 1991. Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:3200-3205.
91. **Spiess, T., F. Desiere, P. Fischer, J. C. Spain, H.-J. Knackmuss, and H. Lenke.** 1998. A new 4-nitrotoluene degradation pathway in a *Mycobacterium* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:446-452.
92. **Sunahara, G. I., S. Dodard, M. Sarrazin, L. Paquet, G. Ampleman, S. Thiboutot, J. Hawari, and A.-Y. Renoux.** 1999. Ecotoxicological characterization of energetic substances using a soil extraction procedure. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **43**:138-148.
93. **Tatsumi, K., A. Inoue, and H. Yoshimura.** 1981. Mode of reactions between xanthine oxidase and aromatic nitro compounds. *J. Pharm. Dyn.* **4**:101-108.
94. **Thieme, J. , R. Haas, and Kopecz, P.** 1996. Bestandsaufnahme von Rüstungsaltenlastverdachtsstandorten in der Bundesrepublik Deutschland, Teil II. UFOPLAN-Nr. 103 40 102, Berichtsnummer UBA-FB 90-030/1, UBA-Texte 25/96.
95. **Thomas. H., A. Gerth, B. Eulerling, A. Böhler.** 2001. Neue Erkenntnisse zur biologischen In-situ-Sanierung TNT-kontaminierter Böden. *TerraTech* **2/01**: 52-54.

96. **Thorn, K. A., P. J. Pettigrew, W. S. Goldenberg, and E. J. Weber.** 1996. Covalent binding of aniline to humic substances. 2. ¹⁵N-NMR studies on nucleophilic addition reactions. *Environ. Sci. Technol.* **30**: 2764-2774.
97. **Track, T.** 1997. Das Transportverhalten von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) und 1,3-Dinitrobenzol (DNB) in der ungesättigten Bodenzone. - Experimentelle Studien und Modelle - Dissertation, Fachbereich Geowissenschaften, Universität Mainz.
98. **Trimborn, F.** 1995. Explosivstofffabriken in Deutschland. Ein Nachschlagewerk zur Geschichte der deutschen Explosivstoffindustrie. Verlag Locher, Köln.
99. **Vanderberg, L. A., J. J. Perry, and P. J. Unkefer.** 1995. Catabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Mycobacterium vaccae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**:937-945.
100. **Vorbeck, C., H. Lenke, P. Fischer, J. C. Spain, and H.-J. Knackmuss.** 1998. Initial reductive reactions in aerobic microbial metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:246-252.
101. **Warrelmann, J. und U. Walter.** 1997. Erprobung und Anwendung mikrobiologischer Verfahren bei der Sanierung von Rüstungsaltslasten. In: V. Franzius, K. Wolf, und E. Brandt (Hrsg.). *Handbuch der Altlastensanierung.* C.F. Müller Verlag, Heidelberg.
102. **Warrelmann, J., H. Koehler, T. Frische, I. Dobner, U. Walter und W. Heyser.** 2000. Erprobung und Erfolgskontrolle eines Phytoremediationsverfahrens zur Sanierung Sprengstoffkontaminierter Böden. Teil I: Konzeption und Einrichtung eines Freilandexperimentes. *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox* **12**: 351-357.
103. **Weingran, C.** 1995. Projektstrukturplanung am Beispiel des Rüstungsaltslastenstandortes Stadtallendorf. *Entwicklung einer Sanierungsstrategie.* *TerraTech* **4/95**:37-40.
104. **Westfall, B. B.** 1943. The reduction of symmetrical trinitrotoluene by a succinic dehydrogenase preparation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **79**:23-26.
105. **Wolff-Boenisch, D., T. Track, D. Schenk und R. Oberhänsli.** 1996. Sorptionsverhalten von 2,4,6-Trinitrotoluol und 1,3-Dinitrobenzol an unterschiedlichen Bodenmodellsubstanzen. *Grundwasser* **2/96**:63-68.
106. **Won, W. D., L. H. Disalvo, and N. G. James.** 1976. Toxicity and mutagenity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. *Appl. Environm. Microbiol.* **31**:76-80. .
107. **Won, W. D., R. J. Heckly, D. J. Glover, and J. C. Hoffsommer.** 1974. Metabolic disposition of 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl. Microbiol.* **27**:13-66.
108. **Zeyer, J., and Kearney, P. C.** 1984. Degradation of *o*-nitrophenol and *m*-nitrophenol by a *Pseudomonas putida*. *J. Agric. Food Chem.* **32**:238-242.

2.2 Humifizierung von Schadstoffen

Annette Eschenbach, Heiko Mescher, Reinhard Wienberg, Bernd Mahro

Der Erfolg der biologischen Bodensanierungsverfahren beruht nicht allein auf dem Abbau der Schadstoffverbindungen, sondern auch auf einer Festlegung von Schadstoffen bzw. Schadstoffderivaten in der Bodenmatrix (vor allem in die organische Substanz (**Humifizierung**) des Bodens und bei einigen Schadstoffen zum Teil auch an Tonminerale). Dies kann maßgeblich zum Verschwinden der Schadstoffe beitragen (Abb. 2.10). Durch herkömmliche analytische Methoden sind diese festgelegten Schadstoffe nicht mehr zu erfassen. Insbesondere für PAK und TNT ist die Immobilisierung der Schadstoffe durch Einbindung in die Humusmatrix nachgewiesen worden (s. Kap. 2.2.2).

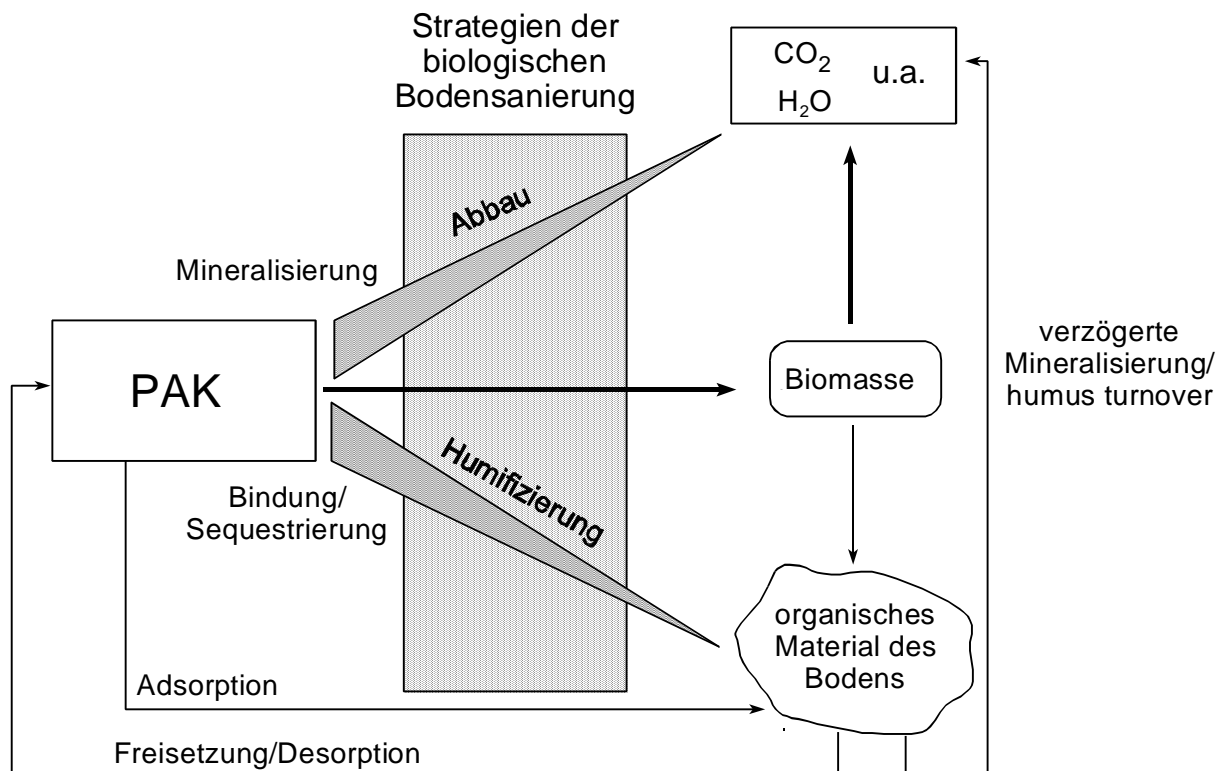


Abb. 2.10: Übersicht über die möglichen biologischen Eliminierungspfade bei dem Abbau von organischen Schadstoffen im Boden hier am Beispiel von PAK [68; 85]

Es lag also nahe, diese Festlegung der Schadstoffe auch als Sanierungsstrategie anzuwenden, wie dies von BERRY & BOYD [10], BOLLAG [15], BOLLAG & MYERS [13], MAHRO et al. [88] vorgeschlagen wurde. Das Verfahren der Humifizierung beruht darauf, die Einbindung der Schadstoffe in die Matrix des Bodens während der Sanierungsdurchführung durch Einstellung der Prozeßparameter gezielt zu fördern, beispielsweise durch Zugabe ausgewählter organischer Supplemente (z.B. Kompost) oder z.B. durch einen Wechsel von Anaerob- und Aerob-Phasen während der Sanierung.

Die Entstehung **gebundener Rückstände**, der sogenannten "**Bound Residues**", ist ein aus agrarwissenschaftlichen Untersuchungen seit vielen Jahren bekanntes Phänomen [12; 22; 41; 42; 75]. Diese Immobilisierung oder Festlegung von Substanzen ist nicht auf organische Schadstoffe begrenzt. Grundsätzlich ist die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen im Boden nichts Ungewöhnliches, da auch beim biologischen Abbau von Naturstoffen nicht-extrahierbare Rückstände gebildet werden [8].

Die **Sorption** oder **Bindung** an die organische Substanz des Bodens, die Huminstoffe, ist bei organischen Schadstoffen – vor allem hydrophoben – der entscheidende Prozeß. Bei anderen Schadstoffgruppen (z.B. bei Schwermetallen) können die anorganischen Bodenbestandteile – und hier insbesondere die Tonminerale – die Sorptionsmatrix oder Schadstoff-Senke darstellen. Dies ist vor allem abhängig von den Ladungsverhältnissen und der Größe der Schadstoffe. Die Herbizide Paraquat und Diquat können z.B. als bivalente Kationen in die Zwischenschichten der Tonminerale interkalieren und dadurch irreversibel gebunden werden [21; 58]. Auch für PAK, TNT-Derivate oder Nitroaromaten wird eine Sorption in die Zwischenschichten der Tonminerale diskutiert [106; 120], doch ist dies beim gleichzeitigen Vorhandensein von Huminstoffen als Sorptionsmatrix für hydrophobe Schadstoffe der untergeordnete Prozeß [51; 106].

Die **natürliche organische Substanz** besteht aus einem heterogenen Gemisch organischer Verbindungen, von leicht mineralisierbaren Pflanzenrückständen bis hin zu komplexen und rekalcitranten mikrobiellen Transformationsprodukten. Die Grundbauelemente der Huminstoffe sind aromatische und langkettige aliphatische Kohlenwasserstoffe, Spaltprodukte von Ligninen, Polysaccharide und Proteine. Die wichtigsten funktionellen Gruppen der Huminstoffe – die wesentlich deren Eigenschaften bestimmen – sind Carboxyl-, Hydroxyl-, Methoxyl- und Amino-Gruppen. Daneben enthalten Huminstoffe aber auch größere hydrophobe (Innen-)Bereiche [125].

Die **Huminstoffe** können über verschiedene kovalente Bindungen (z.B. C-C-Bindungen, Sauerstoff-, oder C-N-Bindungen) miteinander verknüpft oder durch Wasserstoffbrückenbindungen, Charge-Transfer-Beziehungen oder VAN-DER-WAALS-Kräfte verbunden sein. An der Synthese von Huminstoffen sind, nach ZIECHMANN [120], auch Radikalreaktionen beteiligt. Durch diese unterschiedlichen Bindungsformen und Prozesse entstehen **Polymere**, die keine einheitliche Struktur aufweisen. Huminstoffe werden zusätzlich durch die Sorption an Tonminerale als Tonhumus-Komplexe stabilisiert. Die Huminstoffmoleküle sind über ihre funktionellen Gruppen mit den Metallionen der Tonminerale vernetzt. Auch mit freien Metallionen bilden Huminstoffe metallorganische Komplexe.

WERSHAW hat kürzlich eine neue Modellvorstellung zur Struktur und Bildung von Huminstoffen vorgestellt, bei dem hydrophobe und hydrophile Regionen, die zu einer Struktur mit Vesikeln oder Micellen beitragen, eine große Rolle spielen [124; 125].

Durch die vielseitigen Prozesse während der Bildung von Huminstoffen und die wechselnden Mengenverhältnisse der Ausgangsbausteine läßt sich kein allgemein gültiges Modell eines Huminstoffmoleküls oder seiner Monomere aufstellen. Statistisch gesehen ist das Vorkommen zweier gleicher Huminstoffmoleküle äußerst unwahrscheinlich.

Neuere Untersuchungen mit NMR-Spektroskopie sind aber in der Lage, bestimmte Strukturelemente und Bindungstypen in Huminstoffen nachzuweisen. Als besonders geeignet hat sich die **Festkörper-NMR-Spektroskopie** erwiesen, da auch ohne vorherige Extraktion, die die Gefahr einer Bildung von Artefakten in sich birgt, gearbeitet werden kann. Diese

Untersuchungen zeigten beispielsweise, daß aromatische Strukturen eine weit geringere Bedeutung als Strukturelemente aufweisen, als dies lange Zeit angenommen wurde; dies bedeutet unter Umständen auch, daß Polymerisationsreaktionen nicht in dem Ausmaß bei der Bildung von Huminstoffen beteiligt sind, wie bisher postuliert [40; 55; 77; 78; 80]. Auch die phenolischen Elemente von Huminstoffen wurden lange überschätzt [111; 116].

Huminstoffe werden oft in die Fraktionen **Fulvosäuren**, **Huminsäuren** und **Humine** unterteilt. Diese Unterteilung der Huminstoffe entspricht nicht einer Fraktionierung nach strukturechemischen, sondern lediglich nach operationalen Gesichtspunkten, nämlich nach deren Säure/Base-Löslichkeit (s. Kap. 2.3.2.7). Nach ZIECHMANN [121] sind "Huminstoffe durch ihre Reaktivität in der Lage, Xenobiotika durch Einschleusung in Huminfizierungs Vorgänge zu eliminieren oder durch Festlegung von Verbindungen in stabilen Huminstoff/Nicht-Huminstoff-Komplexen aus natürlichen Kreisläufen auszuschleusen".

Im chemischen Sinn wird die Humifizierung natürlicher organischer Substanz als ein irreversibler Prozeß beschrieben. Das bedeutet, daß ein Molekül, welches an der Reaktion teilnimmt, nicht wieder in der Ausgangsform auftritt.

Voraussetzung für die Nutzung der Humifizierung bei der Bodensanierung ist, daß die eingebundenen Schadstoffe aber tatsächlich entweder von dem natürlichen Humus nicht mehr unterscheidbar sind oder, daß diese im Zuge eines sich über mehrere Jahre erstreckenden Humus-"Turnovers" ökologisch nachhaltig zu CO₂ und Wasser endoxidiert werden, daß also die festgelegten Schadstoffe auch immobilisiert bleiben und nicht nach längeren Zeiträumen im Grundwasser, in Pflanzen oder Tieren wieder zum Vorschein kommen.

2.2.1 Begriffsdefinition und Nachweis von nicht-extrahierbaren Rückständen

2.2.1.1 Definitionen von nicht-extrahierbaren Rückständen im Boden

In der Pestizidforschung ist die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen, wie oben erwähnt, schon lange bekannt. Bereits 1975 wurden auf einem Symposium der American Chemical Society gebundene Rückstände wie folgt definiert: "Ein bodengebundener Rückstand ist der nicht-extrahierbare und chemisch nicht-identifizierbare Wirkstoffrückstand, der in Fulvosäuren, Huminsäuren und Huminfraktionen nach intensiver sequentieller Extraktion mit nicht-polaren organischen und polaren Lösungsmitteln verbleibt" [7]. Seitdem wurde die Definition der gebundenen Rückstände fortwährend weiter entwickelt. Basierend auf einer Definition nicht-extrahierbarer Pflanzenschutzmittelrückstände der IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) haben FÜHR et al. [43] kürzlich folgende Definition vorgeschlagen: "Gebundene Rückstände sind Verbindungen in Böden, Pflanzen oder Tieren, die als Ausgangssubstanz oder deren Metabolite nach Extraktion in der Matrix verbleiben. Die Extraktionsmethoden dürfen weder die Verbindung noch die Struktur der Matrix wesentlich verändern. Die Art der Bindung kann teilweise durch matrixverändernde Extraktionsmethoden und anschließende leistungsfähige analytische Methoden geklärt werden. Auf diese Weise wurden bis jetzt zum Beispiel kovalente, ionische und sorptive Bindungen, wie auch Bindungen in Form von Einschlüssen identifiziert. Generell verringert die Bildung von gebundenen Rückständen signifikant die biologische Zugänglichkeit und die biologische Verfügbarkeit der Verbindung."

Nicht-extrahierbare Rückstände werden also operational von originären Schadstoffen oder deren Umwandlungsprodukten (Metaboliten) unterschieden, da diese Fraktion sich immer auf das jeweilig verwendete Extraktionsverfahren bezieht. Es müssen möglichst effektive und erschöpfende Extraktionen Anwendung finden. Weniger effektive Extraktionsverfahren (z.B. wässrig-methanolische Extraktion) sind hingegen geeignet, den Anteil der weniger fest sorbierten Schadstoffe, also beispielsweise noch bioverfügbare Anteile zu erfassen [73].

In Abb. 2.11 ist der mögliche Verbleib von in den Boden eingetragenen organischen Schadstoffen in den verschiedenen Kompartimenten des Bodens in den Phasen fest, flüssig und gasförmig aufgezeigt. Es wird deutlich, um welch ein komplexes System es sich handelt. Eine Mineralisation eines Teils der in unterschiedlichster Form vorliegenden Schadstoffverbindungen zu CO_2 kann durch im Boden vorkommende Mikroorganismen erfolgen. Dabei entscheidet vor allem die Bioverfügbarkeit der Schadstoffe über deren Abbaubarkeit [91].

Die für Abbau und Umbau sowie Festlegungswege wichtigen Prozesse sind in Abb. 2.11 als durchgezogene Linien dargestellt. Die gestrichelten Linien zeigen denkbare Wege auf, die bei der Frage nach einer möglichen Freisetzung nicht-extrahierbarer Rückstände zu klären sind (s. Kap. 2.2.3 und 2.5.2).

Die Übergänge zwischen den unterschiedlichen Kompartimenten beruhen dabei zum Teil auf physikalischen oder chemischen Gesetzmäßigkeiten. Ob ein Schadstoff zum Beispiel vornehmlich gelöst in der wässrigen Phase vorliegt oder eher an der organischen Bodensubstanz oder an den Tonmineralen sorbiert, wird durch schadstoffspezifische Stoffübergangsgrößen, die Hydrophobizität, Verteilungskoeffizienten, Wasserlöslichkeiten oder durch Ladungsverhältnisse bestimmt. Biologische Prozesse sind dabei für die Mineralisation, aber auch für die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände verantwortlich.

Erst durch die Verwendung von radioaktiv-markierten Substanzen sind nicht-extrahierbare Rückstände nachweisbar und quantifizierbar geworden, da sie sich einer konventionellen extraktiven Analytik entziehen. In Abb. 2.12 ist exemplarisch für ^{14}C - Anthracen der Verbleib einer PAK-Verbindung im Boden während einer aeroben Inkubation von 145 Tagen dargestellt. Schon nach 20 Tagen wurden bei diesem Beispiel 50 % nicht-extrahierbar im Boden gebunden. Während der ersten Tage nimmt der extrahierbare Schadstoffanteil aufgrund der Mineralisation zu CO_2 und der Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände stark ab. Flüchtige Ausgangssubstanzen oder Umwandlungsprodukte wurden bei Einsatz von PAK nicht bzw. mit unter 1 % der eingesetzten ^{14}C -Aktivität ermittelt. Im weiteren Verlauf der Inkubation zeigt der extrahierbare Schadstoffanteil und der nicht-extrahierbare Rückstand nur noch geringfügige Veränderungen.

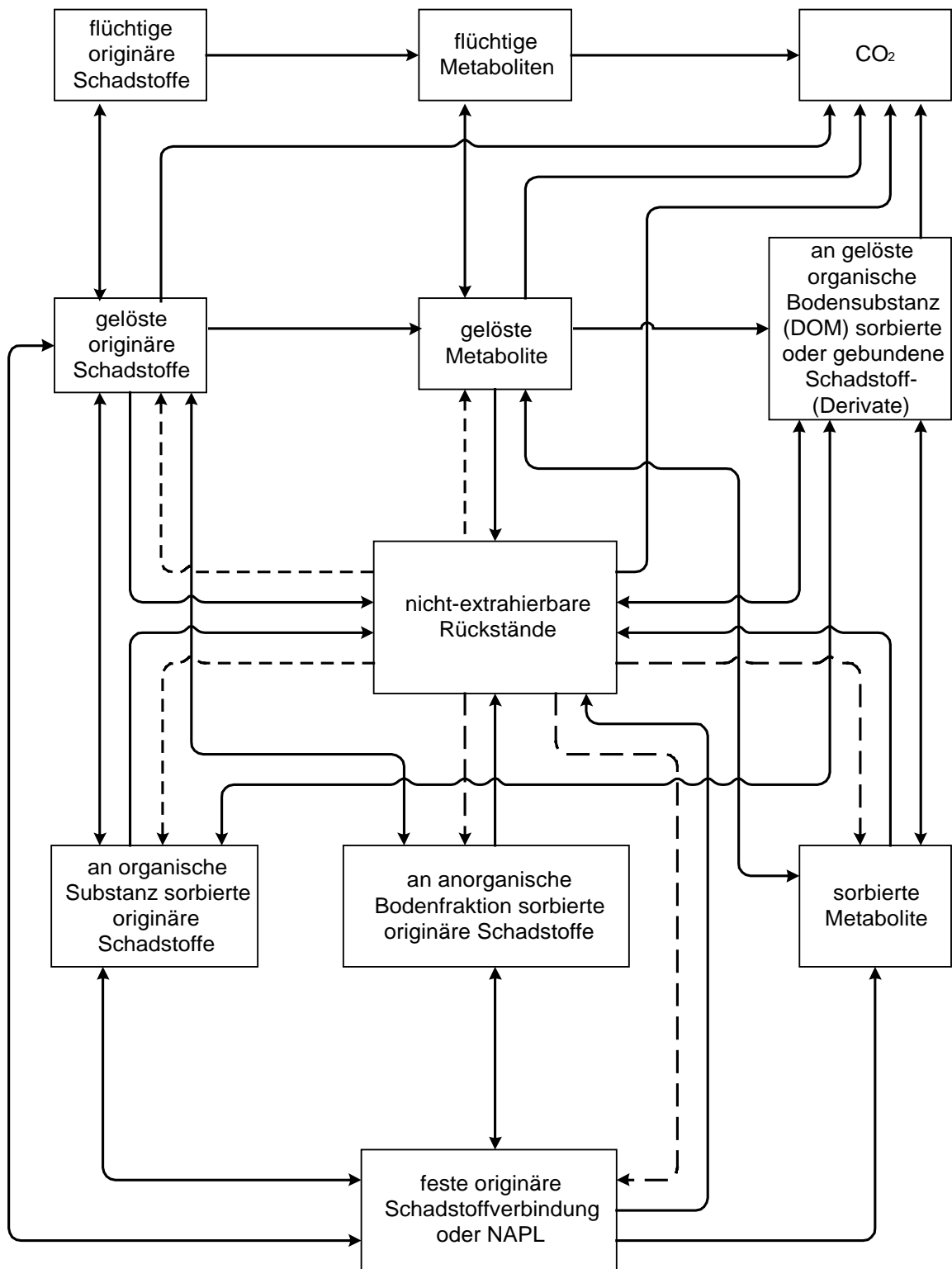


Abb. 2.11: Multi-Kompartiment-Schema zum Verbleib von in den Boden eingebrachten Schadstoffen. NAPL= nonaqueous-phase-liquid: nicht wässrige, flüssige Schadstoffphase.

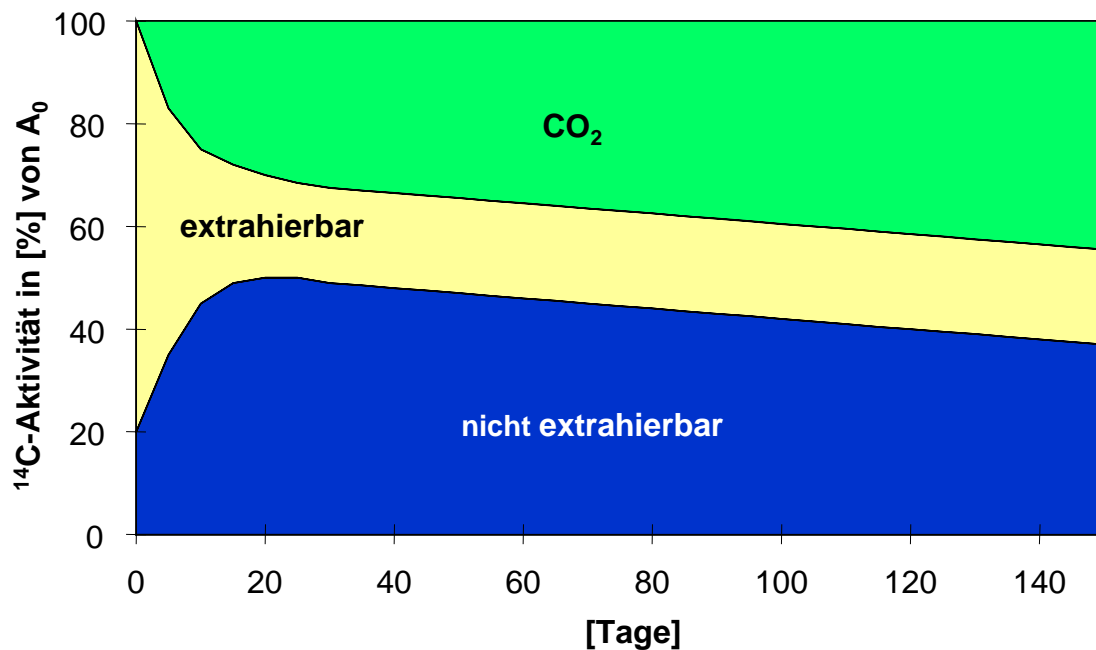


Abb. 2.12: Verbleib von ^{14}C -Anthracen im Boden in Prozent der anfänglichen Gesamtaktivität während einer 145-tägigen aeroben Inkubation [32]

In welchem Ausmaß Mineralisation, Bildung von nicht extrahierbaren Rückständen und der Verbleib in einer extrahierbaren Form ausgeprägt sind, wird im wesentlichen durch die untersuchten Schadstoffe (PAK, TNT oder unterschiedliche Pflanzenschutzmittel) bedingt. So werden PAK beispielsweise sowohl mineralisiert als auch in Form von nicht-extrahierbaren Rückständen festgelegt, während TNT fast ausschließlich nicht-extrahierbar im Boden festgelegt wird und die Mineralisation keine oder nur eine sehr untergeordnete Rolle spielt (s. Kap. 2.2.2). Zumeist verbleibt auch nach langen Einwirkzeiten ein gewisser Anteil der Schadstoffe extrahierbar im Boden. Bei realen Altlastsituationen wird dies durch noch extrahierbare, aber nicht mehr abbaubare Restkontaminationen repräsentiert [90; 126].

(Organische) Schadstoffe können an die organische Bodensubstanz adsorbiert oder gebunden werden, wobei die Bindungsformen zwischen reversibler Sorption und resistenter Festlegung variieren.

Einen Überblick über verschiedene Mechanismen und die Bindungsformen von organischen Schadstoffen an die Bodenmatrix geben z.B. CHIOU [25], HASSETT & BANWART [54], SENESI [114; 115] und WIENBERG [127]. Demnach können Schadstoffe durch VAN-DER-WAALS-Kräfte, Wasserstoffbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen oder Charge-Transfer-Komplexe adsorptiv an die organische Substanz gebunden werden (s. Abb. 2.13). Dabei hängt die Stärke dieser Adsorption von den Eigenschaften der Schadstoffe und der Huminstoffe ab. Es wird davon ausgegangen, daß die Adsorption ein weitgehend reversibler Prozeß ist, ein Teil der Komponenten also verfügbar oder mobilisierbar bleibt und auch lösemittel-extrahierbar ist [14; 93; 101].

Als **stabile Bindungsformen** gelten die kovalenten Bindungen. Allerdings sollte eine Differenzierung vorgenommen werden, da einige der kovalenten Bindungen, z.B. Ester- oder Peptid-Bindungen, leicht hydrolysierbar sind. Ether-, C-C- oder andere C-N-Bindungen, die

schwer oder nicht hydrolysierbar sind, können als stabil angesehen werden. Organische Schadstoffe mit funktionellen Gruppen können kovalente Bindungen eingehen, z.B. können PAK-Verbindungen nach einer Metabolisierung, die mit der Ausbildung funktioneller Gruppen (z.B. Carboxyl- oder Carbonyl-Gruppen) einhergeht, kovalent an die organische Substanz des Bodens gebunden werden [102] (s. Kap. 2.2.2.1). Auch bei TNT ist gezeigt worden, daß zunächst eine Reduzierung der Nitro-Verbindungen nötig ist, um die dabei entstehenden TNT-Metabolite kovalent zu binden (s. Kap. 2.2.2.2).

Eine hydrolytische Spaltung von Ester- oder Peptid-Bindungen kann im Boden z.B. bei Änderung der Milieu-Bedingungen eintreten. Werden zuvor metabolisch aktivierte Schadstoff-derivate, wie dies bei PAK und TNT der Fall wäre, durch Hydrolyse freigesetzt, so handelt es sich hier zwar nicht um die Originalsubstanzen, aber deren weiteres Verhalten oder auch Gefahrenpotential wird ganz wesentlich durch den Grad des vorherigen Abbaus bestimmt. Ob es zu einer erneuten Einbindung, einer Polymerisation dieser Derivate untereinander oder z.B. zu einer Verlagerung kommt, hängt dann von den jeweiligen Bedingungen im Boden ab.

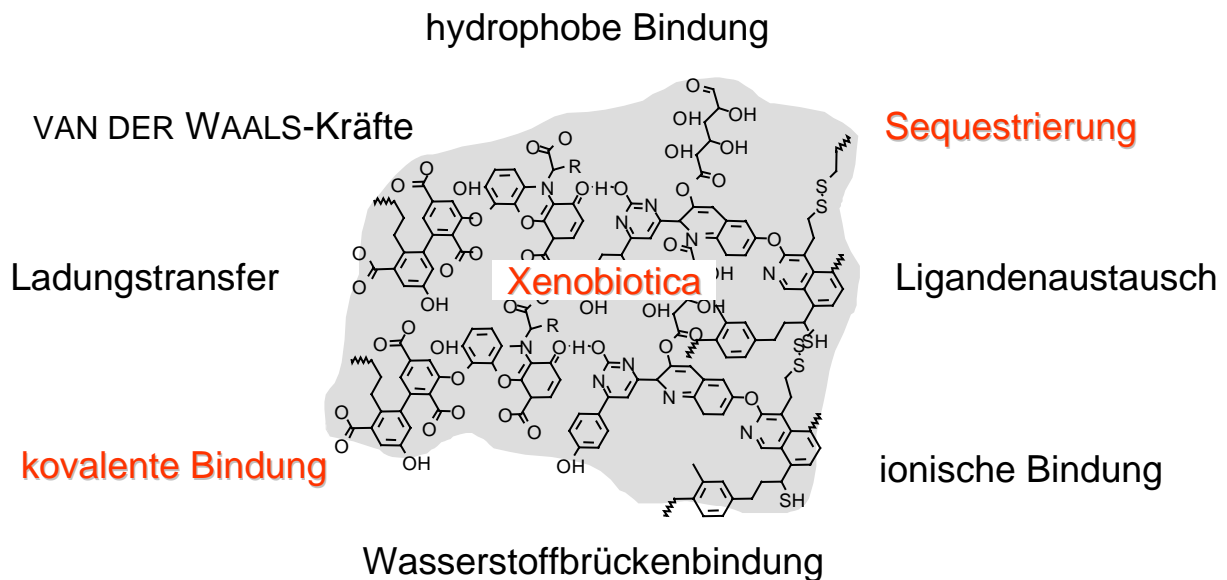


Abb. 2.13: Mögliche Bindungsformen/Wechselwirkungen von Xenobiotika an/mit der Bodenmatrix (organische Substanz und Tonminerale) nach [53]

Der über die reine Adsorption hinausgehende physikalische Einschluß von organischen Schadstoffen (als **Sequestrierung** oder Entrapment bezeichnet) in Poren oder Hohlräume der makromolekularen Huminstoffe findet in letzter Zeit als ein wichtiger unspezifischer Mechanismus der Bindung zunehmend Beachtung [4; 12; 25; 28; 49; 115]. Als Sequestrierung wird auch die langsame Diffusion der Schadstoffe in nicht-zugängliche Mikroporen der Bodenmatrix beschrieben, in denen die Schadstoffe zurückgehalten werden [6]. Dies beruht darauf, daß die organische Bodensubstanz Hohlräume in Nanometer-Größe mit adsorptiv wirksamen inneren Oberflächen aufweisen soll, in die Schadstoffe hinein diffundieren können [98]. Der Verlauf einer möglichen Sequestrierung von Schadstoffen in hydrophoben Regionen von Huminstoffen wurde für PAK von ENGBRETSON & WANDRUSZKA [30] beschrieben. Ein Modell von sequestrierten PAK ist in Abb. 2.14 wiedergegeben.

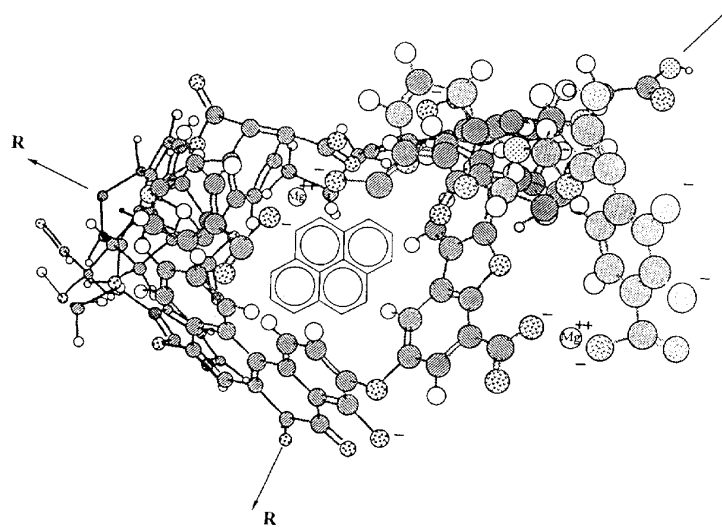


Abb. 2.14: Modellvorstellung eines in die Humussubstanz sequestrierten PAK-Moleküls (verändert nach [30]).

Durch Silylierung des extrahierten Bodenmaterials kann der Nachweis eines solchen Entrapments von Schadstoffen oder auch von deren Derivaten erfolgen. Bei der **Silylierung** wird eine Derivatisierung der organischen Bodensubstanz mit Trimethylchlorsilan durchgeführt. Dabei werden Wasserstoffatome der verschiedenen funktionellen Gruppen ($-OH$, $=NH$, $-NH_2$, $-COOH$) der organischen Bodensubstanz durch Silyl-Gruppen substituiert. Dadurch findet eine Desintegration der Humusaggregate statt, da die dreidimensionale Micellen-Struktur, die zuvor durch Wasserstoffbrückenbindungen oder andere nicht-kovalente Bindungen zusammengehalten wurden, in kleinere Fragmente zerlegt wird. Werden die Schadstoffe nach der Silylierung in gelöster Form freigesetzt, waren sie zuvor sequestriert; werden sie dagegen an Humuspolymer-Bruchstücken freigesetzt, waren sie zuvor kovalent gebunden [28; 50]. Die Silylierungstechnik erfordert somit zusätzlich immer eine Bewertung der Freisetzungsergebnisse (Untersuchungen der molekulare Masse, chromatographische Nachweise der Substanzen o.ä.).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Entstehung nicht-extrahierbarer Rückstände demnach auf adsorptiven Prozessen, auf der Ausbildung kovalenter Bindungen, als auch auf einem Schadstoff-Entrapment beruhen kann, also auf Prozessen, die sich sowohl bezüglich der benötigten Zeiträume als auch hinsichtlich des Chemismus deutlich voneinander unterscheiden.

2.2.1.2 Methoden zur Ermittlung nicht-extrahierbarer Rückstände

Bilanzierungsuntersuchungen mit radioaktiv-markierten Schadstoffen

Radioaktive Isotope (z.B. 3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{32}P , ^{36}Cl) zeichnen sich durch ein äußerst geringes natürliches Vorkommen aus und eignen sich deshalb besonders für "Tracer"-Untersuchungen und Bilanzierungsexperimente in natürlichen Medien. Für die Bilanzierung des Verbleibs organischer Schadstoffe im Boden werden häufig ^{14}C -markierte Verbindungen verwendet.

Durch die radioaktive Markierung ist der Transport und Verbleib der Schadstoffe über alle Pfade analytisch verfolgbar:

- Mineralisation zu $^{14}\text{CO}_2$,
- Entstehung flüchtiger Schadstoffbestandteile,
- extrahierbare originäre Verbindungen und Metabolite,
- nicht-extrahierbare Rückstände (vgl. Abb. 2.11).

Über die Ermittlung der nach einer effektiven Extraktion im Boden verbleibenden ^{14}C -Aktivität ist eine Quantifizierung von nicht-extrahierbaren Rückständen gewährleistet. Diese bilanzierende Bestimmung ist prinzipiell für alle ^{14}C -markierten (Schad-)Stoffe möglich und ist z.B. im Zulassungsverfahren von Pestiziden vorgeschrieben. In Tab. 2.35 sind die Parameter und Analysemethoden aufgeführt, mit Hilfe derer Aussagen zum Verbleib ^{14}C -markierter Xenobiotika im Boden bei Inkubation in einem geschlossenen System (z.B. Bioreaktor) gemacht werden können.

Tab. 2.35: Parameter und Analysemethoden zur Untersuchung des Verbleibs von ^{14}C -markierten Schadstoffen

Bilanzierungsparameter	Analysemethode
Gesamte ^{14}C-Aktivität der Bodenprobe	Verbrennung der unbehandelten Bodenprobe, entstehendes $^{14}\text{CO}_2$ wird in Carbo-Sorb aufgefangen. Bestimmung durch LSC ^a
Extrahierbare originäre ^{14}C-Verbindung oder deren Metabolite	Extraktion mit organischen Lösungsmitteln. Bestimmung durch LSC ^a
nicht-extrahierbare ^{14}C-Rückstände	Verbrennung der extrahierten Bodenprobe, entstehendes $^{14}\text{CO}_2$ wird in Carbo-Sorb aufgefangen. Bestimmung durch LSC ^a
Mineralisierung ($^{14}\text{CO}_2$)	Absorption in NaOH oder Carbo-Sorb. Bestimmung durch LSC ^a
^{14}C-VOC^b-Ausgasung	Absorption in EGME (Ethylglykolmonomethylether). Bestimmung durch LSC ^a
	Absorption in Paraffin oder paraffinierter Glaswolle, Extraktion. Bestimmung durch LSC ^a

^a LSC: Liquid Scintillation Counting (Flüssig Szintillationsmessung)

^b VOC: volatile organic carbon

Die zu bestimmende Radioaktivität (^{14}C -Aktivität) muß jeweils in Lösungen oder Extrakte überführt werden, um sie mit Hilfe eines Flüssig-Szintillators zu analysieren. Der analytische und apparative Aufwand dieser Messung ist vergleichsweise gering und zeichnet sich durch

eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit aus. Der Nachweis einer vollständigen Bilanzierung ist mit hohen Wiederfindungsraten für verschiedene ^{14}C -markierte Verbindungen erbracht worden (Pestizide, PAK, TNT, etc.) wobei die Summe der ^{14}C -Aktivitäten in den einzelnen Pfaden nach Inkubation der jeweils anfänglichen Radioaktivität im Bodenmaterial entsprechen muß. Es wurden beispielsweise Bilanzsummen von $100 \pm 7\%$ erreicht [29; 34; 61]. Als Fazit ist festzuhalten, daß die Bilanzierung mit radioaktiv-markierten Schadstoffen sich insgesamt durch hohe Wiederfindungsraten, hohe Reproduzierbarkeit und Genauigkeit auszeichnet.

Die flüssig-szintillometrische Messung von radioaktiv-markierten Verbindungen ermöglicht zunächst allerdings nur quantitative Aussagen über den Verbleib der Radioisotope, also auch bezüglich der nicht-extrahierbaren Rückstände. Durch Anwendung weiterer analytischer Methoden (z.B. Radio-HPLC) können auch weitergehende qualitative Aussagen darüber getroffen werden, ob es sich bei der extrahierbaren ^{14}C -Aktivität um die Ausgangsverbindung oder um deren Metabolite handelt. Eine qualitative Charakterisierung der nicht-extrahierbaren Rückstände ist auch bei Einsatz von ^{14}C -markierten Verbindungen durch die weiteren Aufarbeitungsmethoden und die Problematik der Artefaktbildung begrenzt. Durch eine Huminstoffanalytik, die eine Trennung von Huminsäuren, Fulvosäuren und Huminen umfaßt, kann der Anteil der Radioaktivität in diesen Fraktionen bestimmt werden [29; 37; 61; 112]. Durch spezifische chemische Degradationsverfahren z.B. alkalische Hydrolyse sind Aussagen zum Vorkommen z.B. Ester-typischer Bindungen möglich [104]. Eine Unterscheidung zwischen kovalent gebundenen und physikalisch eingeschlossenen Schadstoffen oder deren Derivaten wird durch die Silylierung der extrahierten Rückstände möglich.

Beachtet werden muß weiterhin, daß durch die Applikation der radioaktiv-markierten Schadstoffe in (Altlast-)Bodenmaterialien nur die künstlich applizierten Substanzen und nicht die realen Kontaminanten verfolgt werden können. Durch eine realitätsnahe Applikation der radioaktiv-markierten Schadstoffe (z.B. in einer Schadstoffphase: für PAK beispielsweise Teer- oder Anthracen-Öl) und eine künstliche Alterung der applizierten ^{14}C -Substanzen im Bodenmaterial läßt sich die Altlastensituation jedoch erfahrungsgemäß gut simulieren.

Ermittlung von nicht-extrahierbaren Rückständen mit stabilen Isotopen und NMR-spektroskopische Methoden

Nicht-extrahierbare Rückstände können auch durch den Einsatz von **stabilen Isotopen** (z.B. ^{13}C , ^{15}N) nachgewiesen werden. Analog zu den Untersuchungen mit radioaktiv-markierten Substanzen kann der Verbleib der ^{13}C - oder ^{15}N -Isotopenmarkierung aus einem so markierten Schadstoff während eines biologischen Abbaus in den verschiedenen Kompartimenten (CO_2 , extrahierbare Fraktion, gebundene Rückstände und auch in den einzelnen Huminstofffraktionen) verfolgt werden.

Dieser Nachweis der nicht-extrahierbaren Rückstände kann zum einen quantitativ erfolgen, in dem das Mengenverhältnis der eingesetzten stabilen Isotope zu den vorhandenen ^{12}C - bzw. ^{14}N -Atomen bestimmt wird. Zum anderen ist es durch **Kernspinresonanzspektroskopie** (NMR-Spektroskopie, NMR = Nuclear Magnetic Resonance) möglich, die Struktur der chemischen Bindung qualitativ zu erfassen.

Die natürliche Häufigkeit der ^{13}C - und ^{15}N -Isotope in der organischen Bodensubstanz beträgt für ^{13}C : 1,11 % (^{12}C : 98,98 %) und für ^{15}N : 0,37% (^{14}N : 99,63 %) [78; 105]. Für die Untersuchungen müssen also Schadstoffverbindungen eingesetzt werden, die eine hohe Anreiche-

rung der stabilen Isotope tragen. Liegt die zusätzliche Anreicherung weit über der (natürlichen) Häufigkeit der stabilen Isotope im zu untersuchenden Bodenmaterial, sind im NMR-Spektrum ausschließlich die Signale der markierten Schadstoffe und deren Metabolite sichtbar. Eine Möglichkeit die Empfindlichkeit weiter zu steigern, bietet der Einsatz von organischer Substanz, die zuvor künstlich an ^{13}C bzw. ^{15}N angereichert wurde.

Die Lage der Signale im NMR-Spektrum wird dabei von der chemischen und physikalischen Umgebung des beobachteten Atomkerns bestimmt. Dadurch wird eine Zuordnung bestimmter Peaks zu funktionellen Gruppen ermöglicht, so daß deren Beteiligung an der chemischen Einbindung der Schadstoffe bzw. derer Metabolite in die organische Bodensubstanz untersucht werden kann (z.B. Esterbindungen, Peptidbindungen etc.). Als Beispiel sind in Tab. 2.36 ^{15}N -NMR Signale (chemische Verschiebung) verschiedenen chemischen Verbindungen zugeordnet. Durch Integration der Signalfächen läßt sich auch der relative Anteil der zugeordneten funktionellen Gruppen am gesamten organischen Kohlenstoff bzw. Stickstoff der Probe bestimmen. Somit sind durch die NMR-Spektroskopie sowohl quantitative als auch qualitative Aussagen möglich (KNICKER, persönliche Mitteilung).

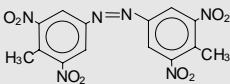
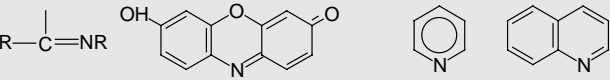

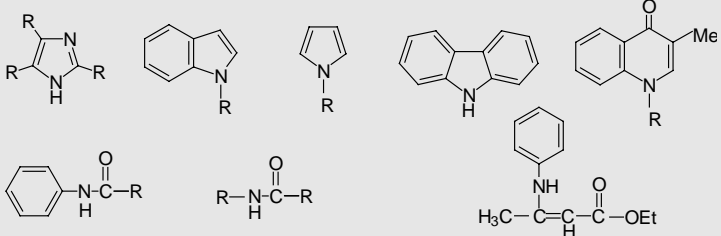
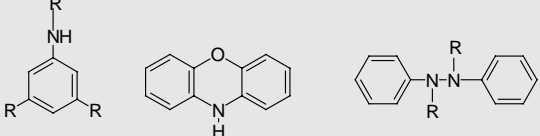
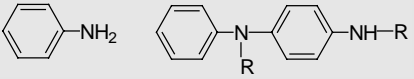
Mit der **Festkörper-NMR-Spektroskopie** als nicht degradativer Technik lassen sich auch unlösliche und komplexe Strukturen z.B. Bodenproben ohne chemische Vorbehandlung charakterisieren. Das Problem der Artefaktbildung durch vorangegangene Extraktionen kann ausgeschlossen werden, da die chemische Zusammensetzung von Proben hier ohne vorherige Extraktion ermittelt werden kann. Somit ermöglicht dieses Verfahren auch die Charakterisierung von gebundenen Rückständen, die mit naßchemischen Verfahren nicht analysiert werden können.

Welche Möglichkeiten die NMR-spektroskopischen Methoden eröffnen, konnten z.B. HATCHER et al. [56] am Beispiel von ^{13}C -markiertem 2,4-Dichlorphenol zeigen. Durch ^{13}C -NMR-Spektroskopie wiesen sie die direkte enzymatische Kopplung von ^{13}C -markiertem 2,4-Dichlorphenol mit natürlichen Huminsäuren nach. Dabei zeigten sie, daß etwa die Hälfte der eingesetzten Verbindungen entweder dimerisiert oder über Ester-, Ether-, und C-C-Bindungen an die organische Bodenmatrix gebunden vorlag. THORN et al. [117] konnte mit der ^{15}N -NMR-Spektroskopie zeigen, daß der Stickstoff aus ^{15}N -markiertem Anilin in Fulvo- und Huminsäuren eingebaut wurde. In den Untersuchungen wurden Verbindungen wie Anilinohydrochinon, Anilinochinon, Anilide, Imine, sowie heterozyklische Stickstoffverbindungen nachgewiesen. In Versuchen mit Meerrettich-Peroxidase und den TNT-Derivaten 4-ADNT, 2-ADNT, 2,4-DANT und 2,6-DANT zeigte THORN [118], daß die Verbindungen in Huminsäuren kovalent eingebunden werden, wobei ebenfalls Anilinochinon, Anilide, Indole, Imine sowie heterozyklischer Stickstoff nachgewiesen wurden.

DEC et al. [27] schlossen ebenfalls aus NMR-Untersuchungen, daß nicht-extrahierbare Rückstände aus ^{13}C -markiertem Cyprodinil durch eine Spaltung des Cyprodinil-Moleküls zwischen den aromatischen Ringen entstehen, wobei die Ringstrukturen jeweils kovalent gebunden werden. Durch Silylierung und ^{13}C -NMR-Spektroskopie zeigten DEC et al. [28] darüber hinaus, daß ein Teil der nicht-extrahierbaren ^{13}C -markierten Cyprodinil-Rückstände unverändert oder nur leicht verändert durch Sequestrierung im Boden gebunden ist, der andere Teil hingegen durch Ringspaltung kovalent gebunden wird. Bei diesen Analysen muß berücksichtigt werden, daß sehr hohe Einsatz-Konzentrationen der markierten Schadstoffe zu anderen Ergebnissen bezüglich des Vorkommens bestimmter Bindungstypen führen können als Untersuchungen mit niedrigeren Konzentrationen. Bei Untersuchungen mit ^{13}C -Cyprodinil

trat bei einer Konzentration von 500 ppm eine deutlich erhöhte Sequestrierung im Vergleich zu einer Konzentration von 3 ppm auf [28].

Tab. 2.36: Zuordnung verschiedener ^{15}N -NMR Signale relativ zu Nitromethan [79]

Chemische Verschiebung [δ (ppm)]	Chemische Verbindung
148 bis 50	Azo-Verbindungen 
50 bis -25	Nitrat, Nitrit, Nitro-Gruppen NO_3^- , NO_2^- , R-NO_2
-25 bis -120	Imin, Phenoxazinon, Pyridin, Quinolin 
-120 bis -165	Nitril, Oxazol 
-165 bis -270	Imidazol, Indol, Pyrrol, Carbazol, Quinolon, Anilide, Amide, Enaminon 
-270 bis -310	Anilin-Derivate, Phenoxazin, Bisphenylhydrazin 
-310 bis -350	Aniline (primäre Amine), Phenylamin 
-358	Ammonium NH_4^+

Ein weiteres Anwendungsgebiet stabiler Isotope ist die Analyse der **Isotopenverhältnisse**. Mit Hilfe der IR-GC-MS (IR: Isotope-Ratio) können z.B. die Isotopenverhältnisse von ^{12}C zu ^{13}C sowie Verschiebungen von applizierten ^{13}C -Substanzen in andere Kohlenstofffraktionen aufgezeigt werden. Bei dieser Technik werden die Substanzen gaschromatographisch getrennt und zu CO_2 oxidiert. In einem nachgeschalteten Massenspektrometer wird die Änderung des $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Isotopenverhältnisses bestimmt [70]. RICHNOW et al. [105] konnten in einem Vergleichsexperiment zeigen, daß sowohl die mit ^{13}C -markierten Substanzen bestimmte Massenbilanz als auch die gemessene Rate der Mineralisation und der Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände mit den, durch den Einsatz von ^{14}C -markierten PAK ermittelten, Ergebnissen vergleichbar war. Neben dem Vorteil, daß stabile Isotope ohne spezielle Sicherheitsmaßnahmen auch in offenen Systemen im Labor und in Freilandversuchen eingesetzt werden können, muß bei dieser Analytik aber berücksichtigt werden, daß sie eines erheblichen analytischen und apparativen Aufwandes bedarf und daß die hohe Genauigkeit der Ergebnisse mit radioaktiv markierten Isotopen nicht erreicht werden kann [105].

Bilanzierungsuntersuchungen ohne Einsatz von markierten Schadstoffen

Die Quantifizierung nicht-extrahierbarer Rückstände ist mit Einschränkungen auch ohne den Einsatz von markierten Isotopen (radioaktive oder stabile Isotope) möglich. Für eine solche Beschreibung der Schadstoffumsetzung im Bodenmaterial ist es aber nicht ausreichend, nur das Verschwinden der Kontamination in der extrahierbaren Fraktion zu verfolgen, sondern es müssen in geschlossenen Inkubationssystemen durch eine Kohlenstoffbilanzierung alle möglichen Transformationswege erfaßt werden. Die Kohlenstoffbilanzierung beruht dabei auf der Ausgangsüberlegung, daß sich die Summe des Kohlenstoffs während der Inkubation nicht verändert, eine Verschiebung der Kohlenstoffanteile aber innerhalb der verschiedenen Pools erfolgt. Die notwendigen Untersuchungsparameter und die dabei einsetzbaren Analysemethoden sind in Tab. 2.37 aufgeführt.

Bei der Bilanzierung ohne markierte Schadstoffe kann die Fraktion der nicht-extrahierbaren Rückstände nur rechnerisch durch die Bilanzlücke gebildet werden [65; 84]. Die Kohlenstoffbilanz setzt sich zusammen aus dem während der Inkubation gebildeten CO_2 , den ausgehenden flüchtigen Kohlenstoffverbindungen, der extrahierbaren Schadstoffkontamination, dem anorganisch gebundenen Kohlenstoff, dem organisch im Humus gebundenen Kohlenstoff und dem in der Biomasse gebundenen Kohlenstoff:

$$\sum C = \sum \text{CO}_2 + \sum C_{\text{flüchtig}} + \sum C_{\text{extrahierbar}} + \text{TIC} + C_{(\text{Humus/neR})} + C_{\text{Biomasse}}$$

Beachtet werden muß auch, daß die Bilanzierung des Schadstoffumsatzes auf der vereinfachenden Annahme beruht, daß die erhöhten CO_2 - bzw. VOC-Konzentrationen und eine erhöhte Biomasse allein auf die Zugabe der Schadstoffe zurückzuführen sind. Deshalb ist die Methode ohne Kontrollansatz ausschließlich für organikarme Bodenmaterialien (Organikgehalt ≤ 1 Gew.%) einsetzbar, da es nur dort möglich ist, die gemessenen Bilanzparameter auf die alleinige Schadstoffumsetzung zurückzuführen.

Eine weitere Möglichkeit bietet die Paralleluntersuchung unkontaminierter Referenzbodenmaterialien. Hierzu kann aus dem unkontaminierten Randbereich der zu untersuchenden Altlast ein vergleichbares Bodenmaterial entnommen werden. Ist dies nicht möglich, kann auch auf ein Modellbodenmaterial zurückgegriffen werden, das dem kontaminierten Boden bezüglich der chemisch-/physikalischen Bodeneigenschaften und der mikrobiellen Besiedlung

möglichst ähnlich ist. Allerdings ist in diesem Fall auf Grund der fehlenden Alterung der Schadstoffe im Boden nur eine eingeschränkte Vergleichbarkeit gegeben [65].

Tab. 2.37: Untersuchungsparameter und Analysemethoden für die Bilanzierung des Schadstoffumsatzes ohne Einsatz markierter Isotope (modifiziert nach [65; 66; 84])

Bilanzierungsparameter	Analysemethode
Gesamtkohlenstoff (TC = total carbon)	Verbrennung und Bestimmung des CO ₂ durch Infrarot-Spektrometrie
Schadstoffkontamination	Gravimetrisch analog DIN 38 409 H17 durch Soxhlet-Extraktion und Entfernung des Extraktionsmittels mit Rotationsverdampfer Photometrisch analog DIN 38 409 H18 mittels Soxhlet-Extraktion und Infrarot-Spektroskopie Gaschromatographisch analog DIN 38 409 H53 (GC-FID) Extraktion und Bestimmung von PAK- und TNT-Kontaminationen durch HPLC und HRGC
Anorganischer Kohlenstoff (TIC = total inorganic carbon)	Bestimmung der Carbonate nach Zermahlen und Betropfen mit HCl. Volumen des entstandenen CO ₂ wird auf C-Gehalt umgerechnet oder Bestimmung mittels Infrarot-Spektrometrie
Biomasse	z.B. Substrat-induzierte-Respiration (SIR)
CO₂-Produktion	Diskontinuierlich mit GC-WLD (WLD = Wärmeleitfähigkeitsdetektor) oder Online mittels Infrarotphotospektrometer oder Absorption des CO ₂ in NaOH, Fällung mit BaCl ₂ und Titration mit HCl gegen Farbumschlag von Phenolphthalein
Ausgasung (VOC)	Diskontinuierlich mit einer Gasmaus oder Adsorption auf z.B. einem Tenax-Röhrchen GC-FID (FID = Flammenionisationsdetektor) oder Online mit FID

Vergleich der Methoden zur Ermittlung nicht-extrahierbarer Rückstände

Die Aussagekraft, sowie die Vor- und Nachteile der genannten Methoden sind in Tab. 2.38 vergleichend zusammengefaßt. Es wird deutlich, daß zwar alle verwendeten Methoden jeweils spezifische Vorteile aufweisen, die Aussagen aber unterschiedlicher Qualität sind. Der Vorteil, daß bei der Untersuchung ohne Einsatz markierter Substanzen die originären Schadstoffe und nicht künstlich zum Boden applizierte Schadstoffe untersucht werden können, wird aber durch den Nachteil, daß nur abschätzende Aussagen möglich sind und die nicht-extrahierbaren Rückstände nicht direkt quantifiziert, sondern nur aus der Bilanzlücke abgeschätzt werden können, aufgehoben.

Letztlich wird die konkrete Fragestellung (Strukturaufklärung, Quantifizierung usw.) entscheiden, welche Methode jeweils am besten geeignet ist. Auch eine Kombination verschiedener Methoden ist möglich. Es können radioaktiv-markierte Schadstoffe, um Aussage über Bilanzen und die Mengenverhältnisse zu erhalten, und gleichzeitig stabile Isotope, um die Art der chemischen Bindung zu analysieren, eingesetzt werden [27]. Dieses Verfahren ist zum wissenschaftlichen Nachweis der Bildungs- und Bindungsverhältnisse von nicht-extrahierbaren Rückständen geeignet, allerdings ist es sehr aufwendig.

Tab. 2.38: Vor- und Nachteile der Methoden zur Ermittlung von nicht-extrahierbaren Rückständen

Methode/ Art der markierten Schadstoffe	Künstliche Applikation der Schadstoffe erforderlich?	Apparativer Aufwand	Analytischer Aufwand	Aussagekraft bezüglich nicht-extrahierbarer Rückstände	
				quantitativ	qualitativ
Einsatz von radioaktiv-markierten Schadstoffen	Ja, Aussagen zu applizierten Schadstoffen	¹⁴ C-Labor, Flüssig-Szintillometrie	Gering, schnelle und einfache Methoden	Bilanzierung aller Schadstoffpfade möglich, direkte Quantifizierung der nicht-extrahierbaren Rückstände	Aussagen zur Bindung nur mit Einschränkungen möglich; z.B. Unterteilung in Fulvosäuren, Huminsäuren und Humine; durch Silylierung auch Erfassung sequestrierter Schadstoffe bzw. -derivate möglich (Metaboliten-Analytik durch Radio-HPLC)
Einsatz von mit stabilen Isotopen markierten Schadstoffen	Ja, Aussagen zu applizierten Schadstoffen	Flüssig oder Festkörper NMR-Spektroskopie; IC-GC-MS	Aufwendige Analytik und Aufarbeitung notwendig	über Bestimmung des Radio-Isotopenverhältnisses auch quantitative Aussagen möglich	Nachweis chemischer Bindungsstrukturen, die untereinander im Vergleich quantifizierbar sind; durch Silylierung auch sequestrierte Schadstoffe bzw. -derivate ermittelbar
Bestimmung der unmarkierten Schadstoffe	Nein, Aussagen zu originären Schadstoffen	Laboraausstattung mit on-line Meßmöglichkeiten	Komplexes Analytikprogramm	mit Einschränkungen über Kohlenstoffbilanz	Keine Aussagen zur chemischen Bindungsstruktur

2.2.2 Entstehung von nicht-extrahierbaren Rückständen bei der biologischen Bodensanierung

2.2.2.1 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)

Die Mikrobiologie und Biochemie des Abbaus von PAK wurde ausführlich beschrieben [9; 23; 24; 86]. Auch Abbau von PAK im Boden wurde in zahlreichen Untersuchungen, zumeist Laboruntersuchungen, nachgewiesen (s. Kap. 2.1.2). Im Boden beruht dabei das "Verschwinden" extrahierbarer PAK auch auf einer starken Adsorption oder Bindung der Schadstoffderivate in der Bodenmatrix [68]. Neben der reversiblen Adsorption [92; 126] kommt es in hohem Maße auch zu einer **Festlegung** von PAK in der Bodenmatrix [62; 89; 96; 100]. Die so festgelegten Verbindungen sind auch durch für PAK sehr effektive Extraktionsverfahren (z.B. durch die alkalische Hydrolyse) nicht mehr aus dem Boden zu entfernen [31] und werden somit zu gebundenen (nicht-extrahierbaren) Rückständen. Die Entstehung nicht-extrahierbarer Rückstände wurde für PAK unter Verwendung ^{14}C -markierter Substanzen u.a. von SCHNÖDER et al. [112], KÄSTNER et al. [69], ESCHENBACH et al. [33], GOODIN & WEBBER [44] und QIU & MCFARLAND [100] beschrieben.

Das Ausmaß der Bildung **nicht-extrahierbarer Rückstände** ist in der Tab. 2.39 für unterschiedliche PAK-Verbindungen in verschiedenen Bodenmaterialien zusammengestellt. Es wird deutlich, daß dieses im Boden sehr unterschiedlich ist. Der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände liegt in der Regel zwischen 20 und 55 % der anfänglichen ^{14}C -Aktivität. Eine deutliche Abhängigkeit von den eingesetzten ^{14}C -PAK-Verbindungen (bis 5-Ring-PAK) läßt sich jedoch nicht ohne weiteres feststellen.

Untersuchungen zeigten, daß während der Inkubation ein zunehmender Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände in der weder mit Säuren noch mit Basen löslichen Fraktion der Humine festgelegt wurde. Der Anteil in den Fulvo- und Huminsäuren war hingegen vergleichbar gering [32; 112]. Es muß aber berücksichtigt werden, daß in Altlastbodenmaterialien die Fraktion der Humine auch nicht-lösliche Kontaminationsbestandteile (Schadstoffmatrix: Kohle-, Kokspartikel usw.) enthalten kann, die nicht nur eine sehr effektive Sorptionsmatrix für PAK darstellen [126], sondern auch nicht-extrahierbar gebundene PAK-Rückstände enthalten können [71] (s. Kap. 2.3.1.4).

In Untersuchungen zum **zeitlichen Einbindeverhalten** konnte gezeigt werden, daß in der Regel auch zu Versuchsbeginn, also direkt (in den eigenen Untersuchungen etwa 1-2 Stunden) nach der Applikation der markierten Substanzen, bereits ein Anteil der ^{14}C -Aktivität nicht-extrahierbar im Boden vorliegt. Dies ist auch in sterilen Bodenmaterialien der Fall [32]. Ein typischer Verlauf der Bildung nicht-extrahierbarer PAK-Rückstände geht aus der Abb. 2.12 hervor. Während der Inkubation erfolgt dann in einem unterschiedlichen Ausmaß eine weitere Zunahme der nicht-extrahierbaren Rückstände. Dieser Sachverhalt sollte bei der Bewertung verschiedener Einflußparameter auf die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände berücksichtigt werden.

Tab. 2.39: Ausmaß der Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände (neR) aus unterschiedlichen ¹⁴C-PAK in verschiedenen Bodenmaterialien (in % der anfänglichen Gesamtaktivität)

¹⁴ C-PAK	Material	Bela- stung ¹	Bodenart	C _{org}	pH	Supplemente	Dauer [d]	neR [%]	Lit.
¹⁴ C- Naphthalin	Altlastboden	niedrig	lehmiger Sand	4,65	7,5	Pilz-Stroh-Material ²	174	20	[32]
	Altlastboden	hoch	lehmiger Sand	7,91	7,6	Pilz-Stroh-Material ²	194	21	[32]
¹⁴ C- Anthracen	Altlastboden	niedrig	lehmiger Sand	4,65	7,5	Pilz-Stroh-Material ²	174	38	[32]
	Boden	Ohne	schluffiger Ton	0,9	6,9	Ohne	291	33	[36]
	Altlastboden	k.A.	lehmiger Sand	6,7	7,2	Ohne	288	51	[36]
	Boden	Ohne	schwach lehmiger Sand	1,1	4,5	Kompost	176	21	[72]
	Boden	Ohne	schwach lehmiger Sand	1,1	4,5	Ohne	176	45	[72]
	Boden	Ohne	schwach lehmiger Sand	1,1	4,5	Kompost	103	24	[69]
	Boden	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	Ohne	120	68	[62]
	Boden	Ohne	sandiger Lehm schluffiger Lehm schluffiger Ton	1,2 2,9 3,9	7,2 7,1 6,0	Klärschlamm	148	35-74	[44]
¹⁴ C-Phen- anthren	Flüssigmedium und Boden	k.A.	sandig toniger Schluff	k.A.	k.A.	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	21	36	[17]
¹⁴ C-Pyren	Altlastboden	k.A.	k.A.	k.A.	4,5 7,7	Ohne	64	13-45	[46]

¹ Belastung: Grad der Kontamination

² Pilz: *Pleurotus ostreatus*

Tab. 2.39: (Fortsetzung)

¹⁴ C-PAK	Material	Bela- stung ¹	Bodenart	C _{org}	pH	Supplemente	Dauer [d]	neR [%]	Lit.
¹⁴ C-Pyren	Altlastboden	niedrig	lehmiger Sand	4,65	7,5	Pilz-Stroh-Material ²	174	15	[32]
	Altlastboden	hoch	lehmiger Sand	7,91	7,6	Pilz-Stroh-Material ²	194	21	[32]
	Boden	Ohne	schluffiger Ton	0,9	6,9	Ohne	291	56	[36]
	Boden	Ohne	schluffiger Ton	0,9	6,9	Kompost	291	21	[36]
	Altlastboden	k.A.	lehmiger Sand	7,91	7,6	Ohne	194	18	[32]
¹⁴ C-Benzo- (a)pyren	Altlastboden	niedrig	lehmiger Sand	4,65	7,5	Pilz-Stroh-Material ²	174	56	[32]
	Altlastboden	hoch	lehmiger Sand	7,91	7,6	Pilz-Stroh-Material ²	194	26	[32]
	Boden	Ohne	schluffiger Ton	0,9	6,9	Ohne	291	21	[36]
	Altlastboden	k.A.	lehmiger Sand	6,7	7,2	Ohne	288	12	[36]
	Boden	Ohne	schluffiger Lehm	0,51	7,2	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	120	37	[100]
	Boden	Ohne	sandiger Lehm schluffiger Lehm schluffiger Ton	1,2 2,9 3,9	7,2 7,1 6,0	Klärschlamm	148	22	[44]
	Altlastboden	k.A.	k.A.	k.A.	4,5 7,7	Ohne	225	6-63	[46]
	Boden	Ohne	stark lehmiger Schluff	1,1	7,7	Ohne	117	20	[112]

¹ Belastung: Grad der Kontamination

² Pilz: *Pleurotus ostreatus*

Das "Verschwinden" der Kontaminanten durch die Zugabe von organischen Zuschlagstoffen wie Kompost wird zum Teil deutlich stimuliert [64; 69; 83; 86]. Deshalb wurde in einigen Studien der Einfluß verschiedener **organischer Supplemente** auf die Entstehung nicht extrahierbarer Rückstände untersucht. Dabei stand zunächst die Annahme im Vordergrund, daß die Zugabe von organischer Substanz als zusätzliche Bindematrix die Humifizierung von Schadstoffen gezielt fördern kann. Diese Annahme konnte aber in weiteren Versuchen nicht bestätigt werden [32; 72], zum Teil war der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände sogar in dem mit Kompost oder Rindenmulch versetzten Bodenmaterial geringer als in einem un-supplementierten Kontroll-Boden [35]. Auch ein ligninolytischer Weißfäulepilz (*Pleurotus ostreatus*) führte nicht zu einer Steigerung des humifizierten Schadstoffanteils [37], obwohl diese Pilze Exoenzyme ausscheiden, die unspezifische Radikalreaktionen und oxidative Kopplungen bewirken [9].

Eine Zugabe von organischen Supplementen (Kompost, Rindenmulch) konnte aber zum Teil den Abbau von PAK im Boden beschleunigen. Der Einfluß der organischen Supplemente ist deshalb vorwiegend auf die **mikrobielle Aktivität** und weniger auf die Bindekapazität der Supplemente zurückzuführen [36]. In keinem der untersuchten Fälle konnte durch die Zugabe organischer Supplemente (Kompost, Rindenmulch) oder auch von Weißfäulepilzen eine gezielte Einbindung oder Humifizierung gefördert werden. Dem entsprechend ist noch kein Supplement gefunden worden, daß ausschließlich die Humifizierung von PAK begünstigt ohne die Mineralisation ebenfalls zu fördern.

Die Bildung nicht-extrahierbarer PAK-Rückstände in Böden mit typischen durchschnittlichen Kohlenstoffgehalten ist offensichtlich nicht durch einen mengenmäßig zu geringen Anteil organischer Substanz bzw. organischer Bindematrix limitiert – und dies trotz hoher PAK-Konzentrationen. Eine biologische Aktivität ist allerdings die Voraussetzung für die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen im Boden. In Untersuchungen mit ¹⁴C-Naphthalin, ¹⁴C-Anthracen, ¹⁴C-Pyren und ¹⁴C-Benzo(a)pyren in sterilisiertem Bodenmaterial war zwar die oben beschriebene initiale spontane Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände (direkt 1-2 Stunden nach der Applikation) festzustellen, aber während der Inkubation fand keine weitere Zunahme dieser Fraktion statt. Im biologisch aktiven Bodenmaterial wurden hingegen z.T. ganz erhebliche Zunahmeraten ermittelt [32; 37; 72].

Beobachtet wurde ein enger Zusammenhang zwischen einer PAK-Abbauaktivität im Boden (Transformation von PAK) und der Bildung gebundener Rückstände. Sobald eine Mineralisation eingesetzt hat, ist eine deutliche Zunahme nicht-extrahierbarer Rückstände festzustellen. Werden die PAK nicht mineralisiert, wie dies teilweise bei Benzo(a)pyren der Fall ist, findet auch keine oder nur eine sehr geringfügige über die spontane Einbindung hinausgehende weitere Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände statt [34]. Gleichzeitig ist die Mineralisation aber auch ein konkurrierender Prozeß. Werden die PAK schnell und in hohem Ausmaß mineralisiert, wie es beispielsweise auf Grund der relativ hohen Wasserlöslichkeit bei Naphthalin oder Pyren ermittelt wurde, ist das Ausmaß der Humifizierung gering. Die Substanzen werden, bevor sie festgelegt werden können, mineralisiert.

Diese Tatsache, daß Mineralisation und Humifizierung einerseits korrelieren und andererseits in einer Art Wettlauf ablaufen, wird z.T. durch das komplexe Zusammenspiel von Faktoren, die den Abbau von PAK im Boden beeinflussen, verschleiert. Wird z.B. einem Bodenmaterial, in dem zuvor kein Abbau der PAK möglich war (z.B. einem unkontaminiertem Modellbodenmaterial), ein organisches Supplement zugesetzt, welches eine Mineralisation der PAK auslöst,

so wird über diesen "Umweg" des einsetzenden Abbaus gleichfalls die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände verstärkt, obwohl das Supplement als solches die Humifizierung der PAK nicht beeinflusst [32; 72].

Demnach ist die metabolische Aktivierung der PAK durch einen teilweisen Abbau ein für die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände entscheidender Prozeß. Dies stützt die Überlegung, daß auch eine kovalente Einbindung von teilweise transformierten PAK-Metaboliten zur Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände führt [34; 37; 72].

Auch bei Inkubation von ¹⁴C-markierten bakteriellen PAK-Metaboliten (¹⁴C-*cis*-1,2-Dihydro-1,2-dihydroxyanthracen und ¹⁴C-4,5-Dicarboxyphenanthren) im Boden zeigte sich eine sehr hohe und z.T. sehr schnelle Einbindung dieser PAK-Derivate [36]. Zum Teil wurden diese Metabolite aber auch sehr schnell und weitgehend mineralisiert. Bei dem pilzlichen Metaboliten ¹⁴C-Anthrachinon wurde ebenfalls eine sehr hohe Mineralisationsrate und eine geringe Festlegung ermittelt [72].

Generell läßt sich aber festhalten, daß **unterschiedliche Mechanismen** an der Ausbildung nicht-extrahierbarer PAK-Rückstände beteiligt sein können:

- sorptive, nicht biologisch induzierte Prozesse
- die Ausbildung von kovalenten Bindungen nach/während einer biologischer Transformation der PAK
- die Sequestrierung von PAK in hydrophobe Huminstoff-Regionen.

Verschiedene mögliche Prozesse der sorptiven und kovalenten Bindung von PAK (-derivaten) in der organischen Substanz sind in Abb. 2.15 dargestellt.

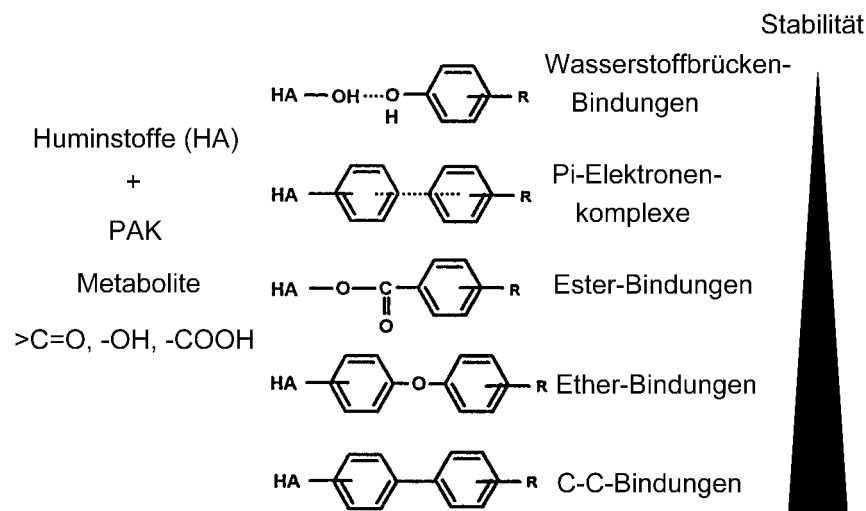


Abb. 2.15: Mögliche Bindungsformen von PAK und deren Metaboliten an die organische Substanz des Bodens (verändert nach [101])

Sorptive Prozesse

Für die spontane, initiale Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände sind wahrscheinlich sorptive Prozesse maßgeblich. Die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände, die direkt nach der Applikation von ^{14}C -markierten PAK auftritt, ist von biogenen Transformationen unabhängig. Als adsorptive Prozesse spielen auch bei PAK VAN-DER-WAALS-Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen oder Charge-Transfer-Komplexe eine Rolle.

Obwohl diese adsorptiven Prozesse zunächst weitgehend reversibel und durch relativ schwache Wechselwirkungen gekennzeichnet sind, können sie dennoch zur Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen beitragen. Darüberhinaus können über längere Zeiträume adsorptiv gebundene Schadstoffe in festere Bindungsformen übergehen und damit resistenter gegenüber Extraktion und Abbau werden [22; 97; 113]. HATZINGER & ALEXANDER [57] beschreiben einen Prozeß der "**Alterung**" (Aging) von PAK im Boden, der zur Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen führt, ohne daß dies mit einer Veränderung der Molekülstruktur der PAK einhergehen soll. Sie führen dieses Phänomen auf eine Diffusion in Mikroporen, eine Verteilung gemäß der Konzentrationsgradienten und starke Adsorption an Oberflächen zurück. Bei kontaminierten Böden kommt auch eine Sorption an die Kontaminationsphase z.B. Kohle und Kokspartikel als Mechanismus der Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände in Betracht (s. Kap. 2.3.1.4) [71; 126].

Kovalente Bindung

Eine kovalente Bindung zwischen PAK und der organischen Bodenmatrix ist bei PAK erst nach einer Metabolisierung, die mit der Ausbildung funktioneller Gruppen (z.B. Carboxyl- oder Carbonyl-Gruppen) einhergeht, zu erwarten. Es sind Ester-, Ether- und C-C-Bindungen zwischen PAK-Metaboliten und Huminstoffen möglich (Abb. 2.15). Dabei nimmt die chemische Stabilität der Bindung ausgehend von Wasserstoffbrückenbindungen, über π -Elektronenkomplexe, Ester- und Etherbindungen bis zu C-C-Bindungen zu [101].

Untersuchungen zur Bindungsstruktur von ^{13}C -markierten PAK-Derivaten und Huminstoffen zeigten, daß bei der Hydrolyse PAK-Fragmente wie ^{13}C -Hydroxynaphthensäuren und ^{13}C -Phthalsäure aus den Huminstoffen freigesetzt wurden [104]. Weiterhin wurde die Bildung von **Ester-Bindungen** zwischen PAK-Metaboliten und Molekülen der organischen Substanz nachgewiesen. Dabei konnte an einem biologisch vorbehandelten PAK-Boden durch Hydrolyse in Gegenwart von ^{18}O -markierter NaOH und spektroskopischen Untersuchungen gezeigt werden, daß ein Teil der freigesetzten Kohlenstoffstrukturen ursprünglich von festgelegten PAK stammen mußte [103].

Sequestrierung

PAK können durch Sequestrierung auch **unverändert festgelegt** werden. ENGBRETSON & WANDRUSZKA [30] konnten zeigen, daß gelöste Huminsäuren in der Lage sind, Pyren in hydrophobe Mikrokompimente einzuschließen (s. Abb. 2.14). Die Stärke dieser Bindung ist dabei von der Hydrophobizität des Bindungsplatzes abhängig. Die Heterogenität und Komplexität organischer Makromoleküle ermöglicht eine große Diversität von unterschiedlich starken hydrophoben Adsorptionsplätzen [95]. Diese unterschiedlichen Prozesse, die an der Ausbildung nicht-extrahierbarer Rückstände von PAK beteiligt sind, laufen in unterschiedlichem Ausmaß auch gleichzeitig nebeneinander ab, so daß sich nicht klar voneinander trennbare Phasen der Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände ergeben.

2.2.2.2 Trinitrotoluol (TNT)

Aufgrund seiner elektrophilen Eigenschaften und der chemischen Struktur ist Trinitrotoluol (TNT) biologisch schwer mineralisierbar. Durch die dreifache Substitution mit Nitrogruppen ist TNT hochoxidiert und vor einem oxidativen Angriff aerober Mikroorganismen weitgehend geschützt [106]. Für eine mikrobielle Umsetzung kommen daher nur reduktive Initialreaktionen in Frage. Der wesentliche Transformationsprozeß ist die **Reduktion** der Nitrogruppen zu Aminogruppen, daneben kann es durch aerobe Bakterien auch zu einer reduktiven Ring-Hydrierung kommen. Durch aerobe Mikroorganismen konnte bisher nur eine partielle Reduktion der Nitrogruppen nachgewiesen werden, unter anaeroben Bedingungen ist hingegen eine vollständige Reduktion der Nitrogruppen möglich [99]. TNT wird dabei über Aminodinitrotoluol (ADNT) (4-Amino-2,6-dinitrotoluol bzw. 2-Amino-4,6-dinitrotoluol) und Diaminonitrotoluol (DANT) (2,6-Diamino-4-nitrotoluol bzw. 2,4-Diamino-6-nitrotoluol) zu Triaminotoluol (TAT) reduziert (s. Abb. 2.16). Diese Reduktion verläuft als cometabolische Reaktion ab (s. Kap. 2.1.9.2).

Eine nennenswerte **Mineralisation** von TNT durch Bakterien wurde weder unter aeroben noch unter anaeroben Bedingungen ermittelt [45]. In Laborkulturen mit ausgewählten ligninolytischen Pilzen (z.B. *Phanerochaete chrysosporium*, *Stropharia rugosoannulata*) konnte z.T. eine erhebliche Mineralisation (52% $^{14}\text{CO}_2$ Mineralisation mit *Stropharia rugosoannulata* innerhalb von 200 Tagen) nachgewiesen werden [38; 94; 108]. Im Boden wurden aber bisher keine vergleichbaren Mineralisationsraten erreicht (vgl. Kap 9.4.3 und 9.4.4) [61].

Daß während einer Inkubation die durch Extraktion des Bodens ermittelbare TNT-Konzentration dennoch schnell abnimmt, ist durch die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände bedingt. Für TNT und seine reduzierten Metabolite ist eine **Sorption** an Tonminerale beschrieben als auch eine Sorption und **Bindung** an die organische Substanz des Bodens. Diese Verbindungen können nicht nur an die Oberfläche der Tonminerale sorbieren [1], sondern auch eine Interkalation in die Zwischenschichten von Tonmineralen wurde postuliert [106]. Von HADERLEIN et al. wurde eine Sorption von Nitroaromaten an Tonminerale durch Bildung von Elektronen-Donor-Akzeptor-Komplexen beschrieben [47].

In Bodenproben, die Huminstoffe enthalten, ist jedoch die organische Substanz als Sorptionsmatrix entscheidender. Es ist davon auszugehen, daß alle TNT-Reduktionsprodukte, die Aminogruppen tragen, mit den funktionellen Gruppen der organischen Substanz reagieren und mit in den Humifizierungsprozeß eingehen können. Bei Verfahrensentwicklungen wurde auf Grund unterschiedlicher Untersuchungen davon ausgegangen, daß die Aminofunktionen kovalente Bindungen mit der organischen Bodensubstanz eingehen und es zur Ausbildung von C-N-Bindungen kommt [13; 117] (auf NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Struktur der Bindung wird später noch eingegangen).

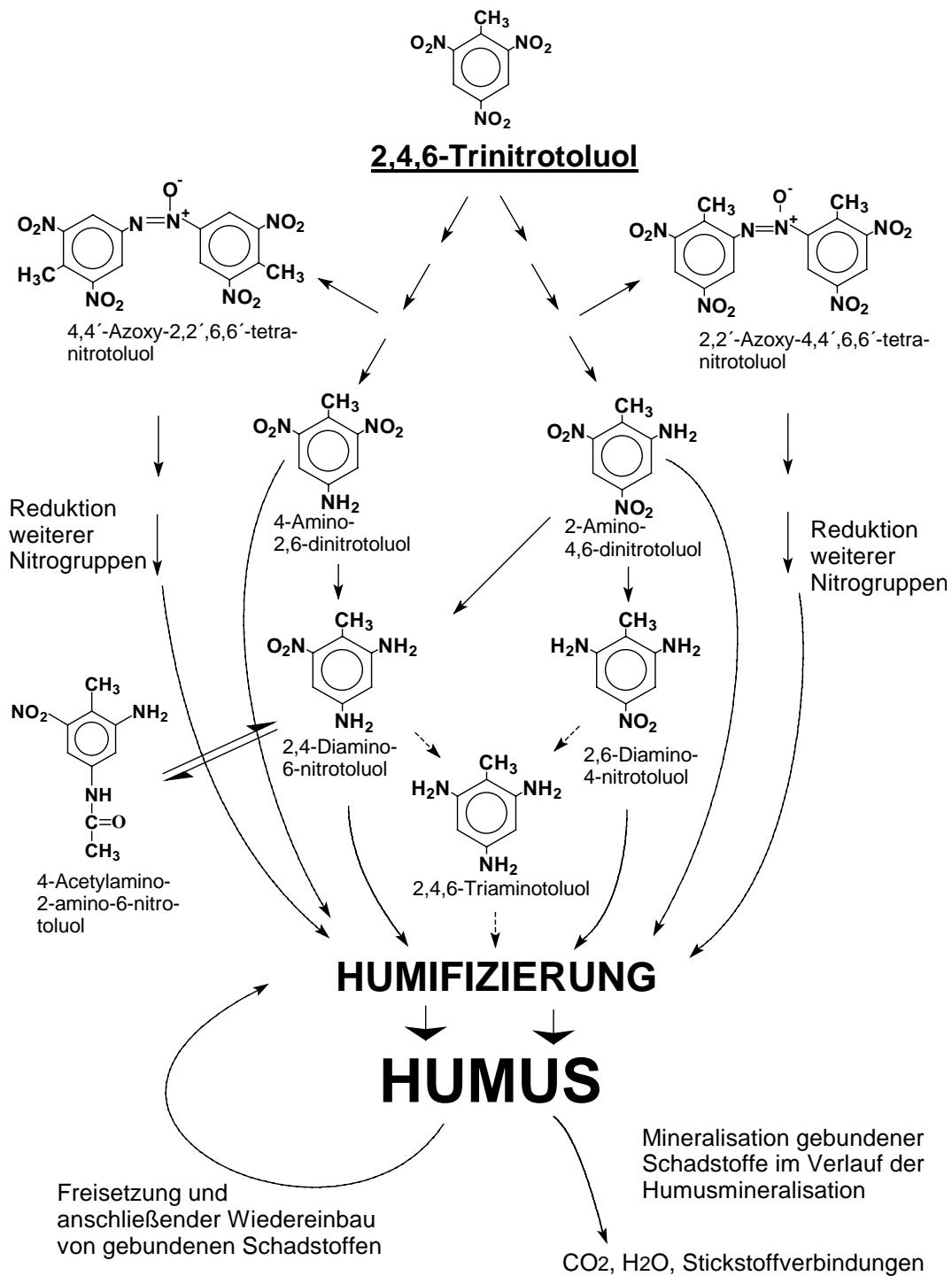


Abb. 2.16: Schematische Darstellung der Humifizierung von TNT. Nach einer Reduktion des TNT werden die reduzierten Metabolite an die Huminstoffmatrix des Bodens gebunden, hier am Beispiel der anaerob/aerob Kompostierung [19].

Die in den letzten Jahren entwickelten Verfahren zur biologischen Sanierung TNT-kontaminierter Böden beruhen im wesentlichen – da ein vollständiger Abbau des TNT im Boden nicht erfolgt – auf einer **Festlegung** der TNT-Metabolite in Form nicht-extrahierbarer Rück-

stände. Im wesentlichen wird dabei durch Zugabe von leicht abbaubaren Kohlenstoffquellen auf eine cometabolische Reduktion des TNT und eine nachfolgende Einbindung dieser Metabolite in die organische Bodenmatrix abgezielt (Abb. 2.16). Als Verfahren sind u.a. beschrieben ein mikrobiologisches *In situ*-Verfahren mit Zugabe von Melasse und Rindenmulch [59], ein zweistufiger Anaerob/Aerob-Prozeß in Bodensuspension [26; 81; 82] und verschiedene Kompostierungsverfahren [16; 18; 67].

Bei einem **Slurry-Verfahren**, das am Rüstungsaltsstandort Hessisch Lichtenau-Hirschhagen im technischen Maßstab erprobt wurde, werden einer Bodensuspension in einer Anaerobphase leicht oxidierbare Kohlenstoffquellen (Glucose oder Saccharose) zugesetzt, die zu einer cometabolischen Reduktion der Nitrogruppen führen. In der nachgeschalteten aeroben Phase sollen die Fermentationsprodukte weiter mineralisiert werden und die Einbindung und Immobilisierung der reduzierten TNT-Metabolite fortschreiten. LENKE et al. [82] konnten mit einem Anaerob-/Aerob-Suspensionsverfahren im großtechnischen Maßstab Schadstoffreduktionen von über 99 % mit den Hauptkontaminanten TNT, 2,4-Dinitrotoluol, Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (Hexogen) nachweisen.

Bei den **Kompostierungsverfahren** werden dem Bodenmaterial ebenfalls leicht abbaubare organische Substrate zugesetzt. Auch unter aeroben Bedingungen konnte durch Kompostierung eine Abnahme der TNT-Konzentration erreicht werden, doch wurde unter aeroben Bedingungen noch unreduziertes TNT und eine erhöhte Toxizität im Vergleich zu einer Anaerob-/Aerob-Behandlung festgestellt [16]. Eine Weiterentwicklung der Kompostierungsverfahren stellen Verfahren mit Anaerob/Aerob-Phasen und der Zugabe leicht mineralisierbarer organischer Substrate dar.

Bei den im Teilverbund am Rüstungsaltsstandort "Werk-Tanne" in Clausthal-Zellerfeld erprobten Verfahren (s. Kap. 7 und Kap. 9.5) handelt es sich um zwei Kompostierverfahren (Dynamisches Mietenverfahren der Firma Plambeck ContraCon und Anaerob-/Aerob-Verfahren der Firma Umweltschutz Nord) und um ein Weißfäulepilz-Verfahren der Firma AWIA (ehemals WISSTRANS)[39; 128].

Bei der Einstellung anaerober Bedingungen sind verschiedene Techniken erprobt worden, z.B. Zusatz von Wasser, Komprimierung des Bodens als trockene Phase, Zugabe von leichtoxidierbaren organischen Substanzen [19]. Bei dem Dynamischen Mietenverfahren werden die anaeroben Bedingungen durch Zugabe Sauerstoff-zehrender organischer Zuschlagstoffe erreicht. Auch das Anaerob-/Aerob-Verfahren nutzt die gezielte Zugabe speziell vorkonditionierter organischer Substrate zur Herstellung anaerober, reduktiver Bodenverhältnisse. Die aeroben Bedingungen werden durch mechanischen Bodenbearbeitung als Trockenverfahren realisiert. Der Anaerob/Aerob-Wechsel erfolgt hier in kürzeren und dafür wiederholten Intervallen, statt als Wechsel in zwei Phasen, wie dies beim Dynamischen Mietenverfahren der Fall ist.

Ein anderes Verfahren hatte zunächst zum Ziel, das Gefährdungspotential von TNT mit Hilfe von **Weißfäulepilzen** durch möglichst vollständigen Abbau im Boden zu reduzieren. Dieser Ansatz beruhte auf wissenschaftlichen Befunden, in denen gezeigt worden war, daß der streuabbauende Pilz *Stropharia rugosoannulata* ¹⁴C-TNT in Flüssigkulturen in hohem Maße mineralisieren konnte [108]. Es zeigte sich jedoch später, daß dieser Prozeß im Boden nicht in gleicher Weise ablief. Während in einer Flüssigkultur von *Stropharia rugosoannulata* durch Induktion der Mangan-Peroxidaseaktivität eine Mineralisation von 26 % ¹⁴C-TNT in nur 35 Tagen erreicht wurde [60], war bei der Inkubation des Pilzes im Boden die Mineralisation

nach einem Zeitraum von 30 Wochen mit ca. 3 % vernachlässigbar gering. Es zeigte sich vielmehr, daß auch diese aerobe Behandlung zu einer Immobilisierung des TNT führte. Hierbei wurden 86 % der ^{14}C -Aktivität in Form nicht-extrahierbarer Rückstände im Boden gebunden. Die Immobilisierung wird dabei darauf zurückgeführt, daß die durch ligninolytische Enzyme gebildeten TNT-Metabolite sofort in der Bodenmatrix gebunden werden und daß diese Kopplungsreaktionen schneller verlaufen als die vollständige Mineralisation [61]. Auch das auf diesen Prozessen beruhende Weißfäulepilz-Verfahren der Firma AWIA ist am Altstandort "Werk Tanne" in Erprobung (s. Kap 9.5.3).

Das Ausmaß der in den verschiedenen Immobilisierungsverfahren jeweils erreichten Einbindung von TNT(-Metaboliten) ist in Tab. 2.40 für verschiedene Verfahren noch einmal anhand von Literaturdaten zusammengetragen. Es sind hier Ergebnisse von Versuchen mit ^{14}C -TNT dargestellt, bei denen nicht nur das Verschwinden des extrahierbaren TNT ermittelt, sondern eine Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände nachgewiesen wurde. Berücksichtigt sind dabei auch bisher nicht veröffentlichte Daten aus dem Forschungsverbund. Genauere Angaben dazu sind im Kap. 9.4.4 ausgeführt.

Wie aus Tab. 2.40 zu entnehmen, wurden in allen Untersuchungen ganz erhebliche Anteile des Schadstoffes in Form nicht-extrahierbarer Rückstände festgelegt. Mit ^{14}C -markiertem TNT konnten DRZYGA et al. [29] beispielsweise zeigen, daß nach einer sequentiellen 9-wöchigen Anaerob-/Aerob-Behandlung etwa 84 % der Radioaktivität in den unterschiedlichen Humusfraktionen gebunden waren. In den Fraktionen Huminsäuren und Fulvosäuren waren nur geringe Beträge von ^{14}C -markierten Substanzen gebunden. Der Hauptbestandteil wurde hingegen in der Fraktion der Humine gebunden. Dieser Befund der vorwiegenden Einbindung in die Fraktion der Humine, wurde auch in der aeroben Inkubation mit ligninolytischen Pilzen bestätigt [61]. ACHTNIH et al. [5] ermittelten ebenfalls eine nahezu vollständige Einbindung der TNT-Derivate. Eine Mineralisation erfolgte nur mit 2-3 %, während gleichzeitig die gebundenen Rückstände von 5 % auf 98 % am Ende der Anaerob-/Aerob-Behandlung anstiegen.

Im Zusammenhang mit der maßstabgerechten Erprobung der drei Sanierungsverfahren der Firmen Plambeck ContraCon, Umweltschutz Nord und AWIA auf dem Rüstungsaltsandort Clausthal-Zellerfeld sind für den Schadstoff TNT zusätzlich auch **Sanierungssimulationen** mit markiertem TNT in *large scale*-Spezialreaktoren (2 m^3) durchgeführt worden, um das Ausmaß der Humifizierung in diesem Maßstab quantitativ nachzuweisen. Bei den Modelluntersuchungen am FhIUCT Schmallenberg wurde sichergestellt, daß die Bedingungen, die einen signifikanten Einfluß auf die mikrobielle Aktivität und damit die Schadstoffumsetzungen und -einbindung ausüben, weitestgehend identisch mit denen im technischen Maßstab waren (s. Kap. 9.4.2) [63].

Das vom Standort Clausthal-Zellerfeld stammende Bodenmaterial wurde nach mehrwöchiger Alterung des applizierten ^{14}C -markierten TNT entsprechend den im Großmaßstab jeweils angewendeten Sanierungsverfahren behandelt (Dynamisches Mietenverfahren, Alternierendes Anaerob-/Aerob-Verfahren, Weißfäulepilz-Verfahren). Die TNT-Konzentrationen im Bodenmaterial nahmen auch in diesen Untersuchungen innerhalb weniger Tage schnell ab. Gleichzeitig wurde das TNT nahezu vollständig in Form nicht-extrahierbarer Rückstände festgelegt (für das Weißfäulepilz-Verfahren lagen bei Redaktionsschluß noch keine Daten vor). Die in Tab. 2.40 aufgeführte Inkubationsdauer entspricht dabei nicht der für die Einbindung benötigten Zeiträume, sie ist bei beiden Verfahren wesentlich kürzer.

Tab. 2.40: Ausmaß der Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände (neR) aus ¹⁴C-TNT in Simulation unterschiedlicher biologischer Sanierungsverfahren

Verfahren	Inkubationsbedingungen	Zuschlagstoffe	Altlast und TNT-Konzentration	Inkubationszeit [d]	Bildung neR [%]	Durchführende Institution	Lit.
Alternierend Anaerob-Aerob	geschlossener Bioreaktor	Firmenspezifisches Substrat	Werk Tanne 4500 mg/kg	92	92	FhIGB Stuttgart (s. Kap. 9.4.4)	
Anaerob-Aerob-dynamisches Beet	geschlossener Bioreaktor	Firmenspezifisches Substrat	Werk Tanne 4100 mg/kg	93	90	Univ. Marburg (s. Kap. 9.4.3)	
Aerob mit ligninolytischen Pilzen	geschlossener Bioreaktor	Pilz-Stroh-Substrat <i>S. rugosoannulata</i>	unkontaminierter Modellboden TNT appliziert: 200 mg/kg	30	86	Universität Jena (s. Kap. 9.2.7)	[61]
Alternierend Anaerob-Aerob	geschlossener Bioreaktor im 2 m ³ -Maßstab	Firmenspezifisches Substrat	Werk Tanne 213 mg/kg	120	> 99	FhIUCT, Schmallenberg (s. Kap. 9.4.2)	[63]
Anaerob/Aerob dynamisches Beet	geschlossener Bioreaktor im 2 m ³ -Maßstab	Firmenspezifisches Substrat	Werk Tanne 273 mg/kg	170	> 99	FhIUCT, Schmallenberg (s. Kap. 9.4.2)	[63]
Anaerob/aerober Bioreaktor	geschlossener Bioreaktor	Melasse	Werk Tanne 590 mg/kg	63	84	Univ. Marburg (s. Kap. 9.2.2)	[29]
Anaerob/aerob Slurry-Reaktor	geschlossener Bioreaktor	Glucose und Mischkultur aus Anaerobiern	Hessisch Lichtenau 350 mg/kg	80	98	FhIGB Stuttgart	[5]

Die Abnahme-Kinetik des applizierten ^{14}C -TNT stimmte sehr gut mit der Abnahmekinetik der TNT-Originalkontamination überein. Ebenfalls wurde ein Rückgang der Toxizität in den biologischen Testsystemen festgestellt. In den Spezialreaktoren ist es somit gelungen, ein vergleichbares Abbauverhalten zur originären Kontamination zu simulieren und die Bedingungen der großtechnischen Sanierung erfolgreich nachzustellen [63]. Detaillierte Ausführungen zu diesen Versuchen sind im Kap. 9.4.2 dargestellt.

Auch die in jüngster Zeit verstärkt durchgeführten Untersuchungen zur Aufklärung der **Struktur der Einbindung** der TNT-Derivate haben den postulierten Prozeß einer reduktiven Aktivierung und nachfolgenden kovalenten Einbindung von TNT bestätigt. Mit Hilfe der Festkörper- ^{15}N -NMR-Spektroskopie konnten z.B. KNICKER et al. [79] in Huminsäure, die aus ^{15}N -TNT angereichertem Bodenmaterial extrahiert und zuvor einer Anaerob-/Aerob-Behandlung unterzogen worden war, Anilin-Derivate und Kondensationsprodukte identifizieren. Dies läßt auf eine Reduktion der Nitro-Gruppen durch die Anaerob-/Aerob-Behandlung, gefolgt von Kondensationsreaktionen mit der organischen Substanz des Bodens, schließen. BRUNS-NAGEL et al. [19] konnten durch ^{15}N -NMR-Spektroskopie in den Huminstofffraktionen eines anaerob/aerob behandelten Bodenmaterials nachweisen, daß TNT-Derivate auch heterozyklisch an Huminstoffe gebunden werden können, wie z.B. Pyrrol, Imidazol, Indol, Chinolon und Carbazol. Außerdem wurden in diesen Versuchen auch Anilin-Derivate und aromatische Amine detektiert.

Eine deutliche Veränderung der NMR-Signale direkt nach Applikation des ^{15}N -TNT und nach einer Anaerob-/Aerob-Behandlung konnten auch ACHTNICH et al. [2] aufzeigen. Während in silyliertem TNT-kontaminiertem Bodenmaterial direkt nach Applikation scharfe Signale durch freies, nicht-reduziertes, ungebundenes TNT oder ADNT erhalten wurden, konnte nach der Anaerob-/Aerob-Behandlung eine starke Signalverbreiterung festgestellt werden, was auf eine kovalente Bindung der Moleküle an die Bodenmatrix zurückgeführt wurde.

Das Ausmaß der Einbindung von TNT-Transformationsprodukten in die Bodenmatrix hängt allerdings – wie ACHTNICH [3] zeigen konnte – stark von der Intensität und Dauer der anaeroben Vorbehandlung ab. So konnte nach der Silylierung der Huminfraktion eines über einen längeren Zeitraum anaerob behandelten ^{14}C -TNT-angereicherten Bodenmaterials zwar Radioaktivität in den organischen Extrakten nachgewiesen werden, doch zeigte sich in der anschließenden Dünnschicht-Chromatographie, daß es sich hierbei nicht um freie TNT-Metabolite, sondern vor allem um höhermolekulare polare Humussubstanzen handelte. Während es bei einer genügend langen Anaerob-Phase somit in ausreichendem Maße zu einer Reduktion zumindest der überwiegenden Zahl der Nitrogruppen und damit multivalenten Einbindung der Transformationsprodukte kommen kann (s. Abb. 2.17), reicht eine stark verkürzte anaerobe Behandlung (8 Tage) hierfür nicht aus. Bei dieser stark verkürzten anaeroben Behandlung konnten zum einen nur geringere Anteile an nicht-extrahierbaren Rückstände ermittelt werden und zum anderen wurden durch Silylierung dieses Bodenmaterials auch größere Mengen an nicht humifizierten, freien Aminodinitrotoluol-, Azoxy- und TNT-Verbindungen freigesetzt.

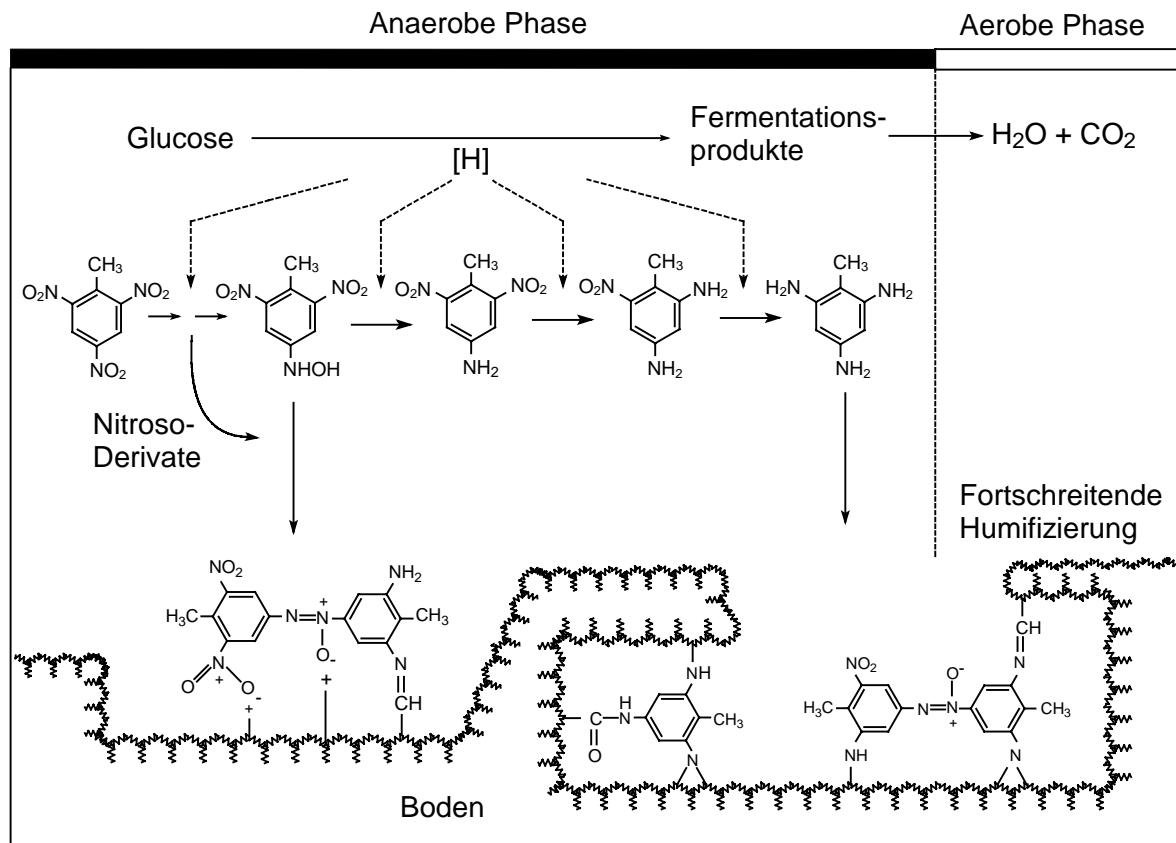


Abb. 2.17: Schematische Darstellung der Reduktion und kovalenten Einbindung von TNT und dessen Transformationsprodukten in die Huminstoffe des Bodens während einer Anaerob-/Aerob-Behandlung in Bodensuspension [3]

2.2.2.3 Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände von Pflanzenschutzmitteln und chlororganischen Schadstoffen

Pestizide gehören zunächst nicht zu den typischen Altlast-Kontaminanten, auch wenn es beispielsweise bei Betriebsunfällen durchaus zum direkten Eintrag von Pestiziden in größeren Konzentrationen in den Boden kommen kann. Dennoch soll hier ein kurzer Überblick über nicht-extrahierbare Rückstände von Pestiziden gegeben werden, weil die Grundmechanismen ihrer Einbindung vergleichbar sind und die Bildung gebundener Rückstände für die unterschiedlichen Wirkstoffe und Formulierungen schon seit vielen Jahren verfolgt wird. Im Zulassungsverfahren von Pestiziden sind Untersuchungen mit radioaktiv-markierten Substanzen im Regelfall vorgeschrieben, um ihren Verbleib und Abbau im Boden zu verfolgen [11].

Ein grundsätzlicher Unterschied zwischen der Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen aus Pestiziden und Altlast-Schadstoffen besteht darin, daß Pestizide i.d.R. nur in sehr kleinen Mengen in den Boden eingetragen werden (< 1mg/kg), während Altlast-Schadstoffe häufig im Bereich von einigen mg/kg oder gar g/kg im Boden vorliegen. Außerdem unterscheidet sich die Art und Weise des Eintrages: Pestizide werden möglichst fein verteilt durch Spritzen oder Sprühen appliziert, während Altlast-Schadstoffe direkt in einer Schadstoffphase (z.B. als Ölphase) oder in Form von Klumpen (z.B. Teer- oder TNT-Klumpen) im Boden vorliegen [87].

CALDERBANK [22] stellte fest, daß – je nach Wirkstoff – durchschnittlich 20 - 70 % (maximal bis 90 %) der applizierten Menge als nicht-extrahierbare Rückstände im Boden verbleiben und daß die Bildung von gebundenen Rückständen bei allen Pestizid-Klassen auftritt.

Eine detaillierte Beschreibung des Ausmaßes der Bildung nicht-extrahierbarer Pestizid-Rückstände ist für verschiedene Substanzen bei KAHN [74; 75] und CALDERBANK [22] wiedergeben. In 28-tägigen **Inkubationsexperimenten** mit ^{14}C -markierten Pestiziden konnte z.B. gezeigt werden, daß die Bildung von nicht-extrahierbaren Pestizid-Rückständen deutlich substanzabhängig ist. Bei Methyl-Parathion betrug der nicht-extrahierbare Anteil 43 %, bei Fonofos 35 %, bei DDT 25 % und bei Dieldrin nur 6,5 % [74]. Phenole und Aniline zeigten dabei die höchste Tendenz nicht-extrahierbare Rückstände zu bilden. Freiland-Lysimeterstudien des Forschungszentrums Jülich (ICG 5) zeigten, daß auch nach Jahren noch in der Regel zwischen 50 - 90 % des verbleibenden Kohlenstoffs eines Pestizides nicht-extrahierbar im Boden vorlagen [123]. In Abb. 2.18 ist das Ausmaß der Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände für unterschiedliche Wirkstoffe zusammenfassend dargestellt.

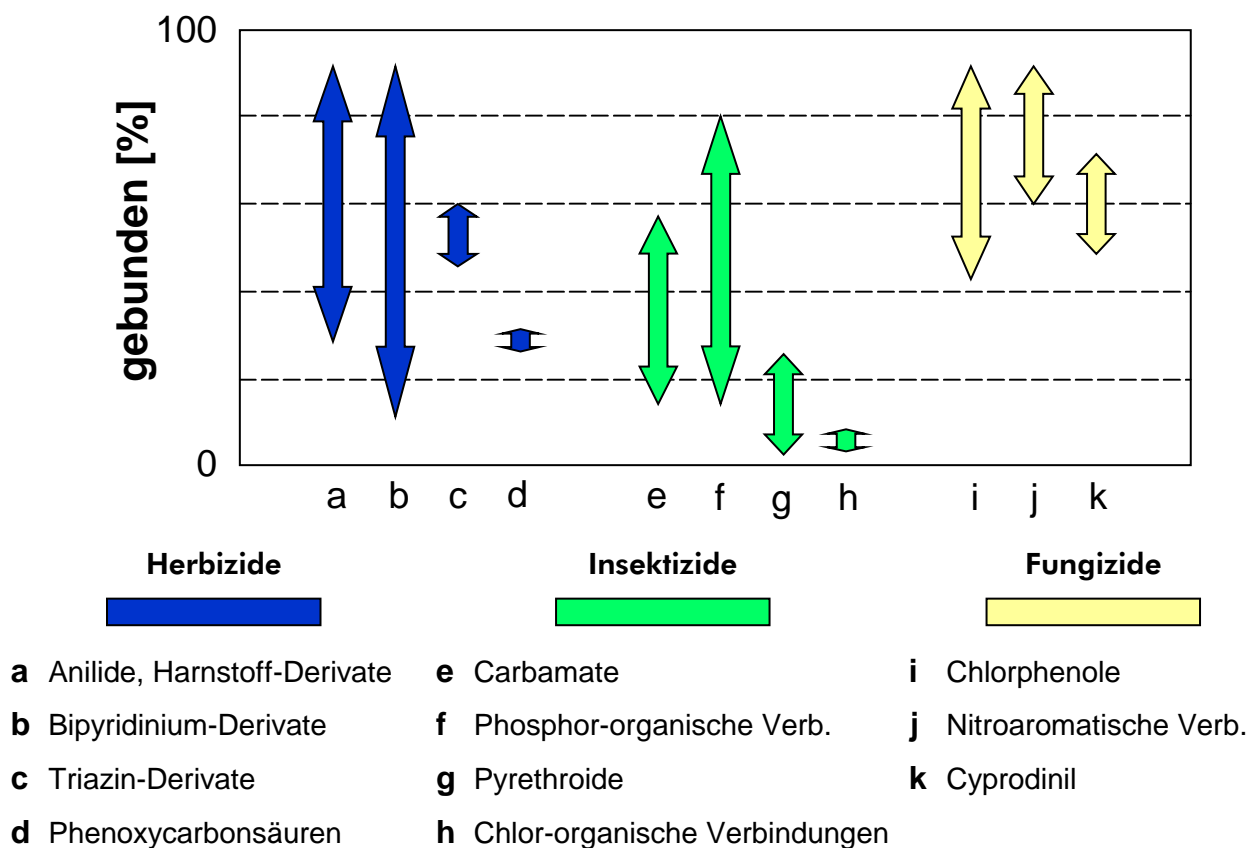


Abb. 2.18: Ausmaß gebundener Pestizid-Wirkstoffe in den drei Substanzklassen Herbizide, Insektizide und Fungizide (aus [53] verändert, nach [22])

Die Bildung von nicht-extrahierbaren Pestizid-Rückständen wird generell durch mikrobielle und physiko-chemische Prozesse verursacht. Wichtige **Parameter** sind u.a. Temperatur, Feuchtigkeit, Textur, Gehalt an organischer Substanz, Gehalt an Tonmineralen, pH des Bodens, mikrobielle Biomasse und Pflanzenbewuchs. Neben diesen bodenspezifischen oder

klimatischen und biologischen Faktoren sind weiterhin die Aufwandsmenge, die Art der Anwendung und vor allem die physiko-chemische Reaktivität der Pestizide und ihrer Metaboliten entscheidend [41; 48]. Aber auch Wechselwirkungen zwischen verschiedenen Pestiziden sind bei der Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen nachgewiesen worden. So kann das Vorhandensein eines Pestizides die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen eines anderen beschleunigen oder auch hemmen [109].

Die **organische Substanz** des Bodens ist für viele Pestizide und chlorierte Aniline und Phenole die primäre Bindematrix. Ebenso wie bei anderen organischen Schadstoffen beruht die Bindung auf unterschiedlichen Mechanismen. Die Wirkstoffe bzw. deren Metabolite können z.B. kovalent, ionisch, über Charge-Transfer-Komplexe, über Wasserstoffbrücken oder über hydrophobe Wechselwirkungen an die Huminstoffmatrix gebunden sein oder durch Sequestrierung in der Matrix eingeschlossen vorliegen. Daß Pestizide auch als unveränderter Wirkstoff sequestriert vorliegen können, haben DEC et al. [27; 28] für Cyprodinil nachgewiesen. Auch durch Hochtemperatur-Destillation konnte KAHN [74] in Experimenten mit ^{14}C -Prometryn aufzeigen, daß ein Großteil der nicht-extrahierbaren Prometryn-Rückstände unverändert im Boden vorlag.

Zur Ausbildung von kovalenten Bindungen kann es z.B. durch den Prozeß der oxidativen Kopplung kommen, den BOLLAG et al. [14] z.B. für das Pestizid 2,4-Dichlorphenol und verschiedene Humusbestandteile unter Einwirkung von Phenoloxidasen nachweisen konnten.

Die Verteilung nicht-extrahierbarer Pestizid-Rückstände innerhalb der verschiedenen Humusfraktionen (Huminsäuren, Fulvosäuren, Huminen) variiert bei verschiedenen Verbindungen und mit der Einwirkzeit. Eine Einbindung in nur eine Humusfraktion konnte bisher nicht nachgewiesen werden [109].

WAIS et al. [122] zeigten z.B. eine Einbindung von ^{14}C -Anilazin in alle Huminstofffraktionen in unterschiedlichen Bodenmaterialien und bei unterschiedlichen Pestizid-Konzentrationen. Ebenso, wie in Untersuchungen von z.B. SCHÄFFER et al. [107] mit ^{14}C -Cyprodinil, war der höchste Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände in der Huminfraktion gebunden. Etwa 28 % der applizierten Radioaktivität fand sich in dieser Studie in der Fraktion der Humine wieder, 11 % in den Huminsäuren und 13 % in der Fraktion der Fulvosäuren.

In Inkubationversuchen mit ^{14}C - und ^{13}C -markiertem Fungizid Cyprodinil konnten HAIDER et al. [52] aufzeigen, daß nach einem Jahr etwa 60 % als nicht-extrahierbare Rückstände im Boden festgelegt und ca. 25 % zu $^{14}\text{CO}_2$ mineralisiert worden waren. Unter sterilen oder anaeroben Bedingungen war die Mineralisation und die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände dagegen vernachlässigbar gering. Nur 3 % wurden in dem autoklavierten Bodenmaterial in der Matrix immobilisiert. Beide Prozesse, die Mineralisation und die Bindung des Fungizids in der Bodenmatrix waren deutlich von der mikrobiellen Aktivität abhängig, womit nachgewiesen werden konnte, daß auch die Bildung dieser nicht-extrahierbaren Rückstände ein biogener Vorgang war [107].

Bei einigen Wirkstoffen kann aber auch eine sehr ausgeprägte und feste Bindung an **Tonminerale** für die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände ausschlaggebend sein. Beispiele hierfür sind Diquat und Paraquat, die in die Zwischenschichten von Tonmineralen eingelagert werden. Auch für die bakterizid wirkende Fluorchinolone ist eine hohe Sorption an Tonminerale nachgewiesen. Der planare Aufbau der Wirkstoffe (z.B. Enrofloxacin) ermöglicht dabei beispielsweise eine Einwanderung in die Zwischenschichten der aufweitbaren Ton-

minerale Montmorillonit oder Vermiculit. Aber auch eine Ausbildung von Komplexen an den äußeren Schichten der Tonminerale wird hier als Bindungsmechanismus diskutiert [20].

Bei chlororganischen Schadstoffen (z.B. chlorierte Biphenyle, chlorierte Phenole, chlorierte Aniline oder chlorierte Benzole) ist das Ausmaß der Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände vom **Chlorierungsgrad** der Substanzen abhängig [109]. Durch die schrittweise Substitution der Kohlenstoffatome eines Moleküls mit Chlor wird die chemische Stabilität und damit die Persistenz in der Umwelt erhöht. Besetzen Chloratome Positionen, die für die Einleitung eines biologischen Abbaus erforderlich sind (z.B. Hydroxylierung), könnten die ersten Schritte dieses Abbaus bereits blockiert sein. Da die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen in vielen Fällen mit biochemischen Reaktionen oder Wechselwirkungen von reaktiven Gruppen in der Bodenmatrix verbunden ist, geht eine Hemmung des Abbaus im allgemeinen auch mit einer Hemmung der Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen einher. Für die genannten vier Substanzklassen gilt, daß mit abnehmendem Chlorierungsgrad die Tendenz zur Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände zunimmt [110] (s. Tab. 2.41).

Tab. 2.41: Einfluß des Chlorierungsgrades ^{14}C -markierter Chemikalien auf die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände im Boden (Lysimeterversuche) [76; 119]

Substanzklasse	Chemikalie	nicht extrahierbar* [%]
Chlorierte Benzole	Hexachlorbenzol	3
	Pentachlorbenzol	6
	1,2,4-Trichlorbenzol	41
	(Benzol)	68
Polychlorierte Biphenyle	2,4,6,2',4'-Pentachlorbiphenyl	7
	2,5,4'-Trichlorbiphenyl	19
	Chloralkylen-9 (2 Chloratome)	40
	2,2'-Dichlorbiphenyl	42
Chlorierte Phenole	Pentachlorphenol	87
	2,4,6-Trichlorphenol	91
Chlorierte Aniline	3,4-Dichloranilin	84
	4-Chloranilin	95

* Anteil in Prozent des im Boden (0 - 10 cm Tiefe) wiedergefundenen ^{14}C am Ende der Vegetationsperiode

Die Art und Stärke der Bindung hängt davon ab, ob der jeweilige Kohlenwasserstoff reaktive Substituenten besitzt oder nicht. Es wird angenommen, daß chlorierte Kohlenwasserstoffe, die keine reaktiven Substituenten besitzen, schwache hydrophobe Bindungen mit der organischen Substanz des Bodens eingehen und so in die Hohlräume der Huminstoffstruktur

eingeschlossen werden. Chlorierte Kohlenwasserstoffe, die eine reaktive Funktion im Molekül besitzen, können unmittelbar oder nach ihrer Metabolisierung in Wechselwirkung mit Substituenten der organischen Substanz des Bodens treten [110]. Es wird angenommen, daß die Hydroxylierung zu phenolischen Metaboliten im Boden einen positiven Einfluß auf die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände hat.

2.2.2.4 Zusammenfassung

Eine Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände findet bei sehr unterschiedlichen Substanzen und Stoffgruppen statt. Nicht-extrahierbare Rückstände sind ein generelles Phänomen, das z.B. bei PAK, TNT und auch den Substanzen der sehr heterogenen Stoffgruppe der Pestizide auftritt. Die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände kann auf unterschiedlichen Wechselwirkungen beruhen: sorptiven Wechselwirkungen, kovalenten Bindungen und einem physikalischen Einschluß (Entrapment, Sequestrierung).

In welcher Art die Festlegung erfolgt, hängt im wesentlichen von den physiko-chemischen Eigenschaften der Schadstoffe selber ab. Bei chlorierten Verbindungen nimmt mit zunehmendem Chlorierungsgrad die Neigung nicht-extrahierbare Rückstände zu bilden ab. Entscheidend ist z.B. auch, ob die Schadstoffe reaktive funktionelle Gruppen tragen, also ob die Schadstoffe direkt als Originalverbindungen eingebaut werden können. Ist erst eine Transformation der Schadstoffe erforderlich, um eine Einbindung zu erreichen, spielt die biologische Aktivität und insbesondere die Transformationsaktivität der Mikroorganismen eine große Rolle.

Die jeweiligen bodeneigenen Bedingungen (Sauerstoffversorgung, reduzierende Bedingungen, pH etc.) wirken sich über die mikrobielle Aktivität und die notwendigen Transformationsreaktionen auf die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände aus.

Als weiterer Aspekt ist die Zeitdauer der "Alterung" der Kontaminanten im Boden entscheidend. Eine längere Inkubationsdauer kann zu einer festeren Sorption und damit zur Ausbildung nicht-extrahierbarer Rückstände führen.

2.2.3 Stabilität von nicht-extrahierbaren Rückständen bei der biologischen Bodensanierung

2.2.3.1 Notwendigkeit des Nachweises der Stabilität

Der vollständige Abbau (die Mineralisation der Schadstoffe) stellt eine unmittelbare Detoxifikation bzw. nachhaltige Entgiftung des kontaminierten Bodens dar und ist u.a. eine Ursache für die hohe Akzeptanz von biologischen Sanierungsverfahren.

Für die biologisch induzierte Festlegung von Schadstoffen muß (insbesondere wenn diese als biologische Sanierungsmethode etabliert werden soll) die Wirksamkeit und **Nachhaltigkeit** dieses Verfahrens durch wissenschaftliche Untersuchungen nachgewiesen werden. Dabei ist es nicht ausreichend, allein die Festlegung der Schadstoffe z.B. mit Hilfe von radioaktiv-markierten Substanzen als nicht-extrahierbare oder gebundene Rückstände nachzuvollziehen (s. Kap. 2.2.1), um diese als langfristig unbedenklich einzustufen. Vielmehr muß wissen-

schaftlich auch nachgewiesen werden, daß von dem Bodenmaterial, welches humifizierte Schadstoffrückstände enthält, unter natürlichen Umständen keine Gefährdung für die Umwelt ausgeht.

Das bedeutet, es darf auch nach langen Zeiträumen (mehreren Jahrzehnten) nicht zu einer nennenswerten **Wiederfreisetzung** der zuvor immobilisierten Schadstoffe oder derer Metabolite in die Umweltmedien Boden, Grundwasser, Atmosphäre oder über die Nahrungskette in Pflanzen und Tieren kommen. Ausgenommen davon ist die Freisetzung von ehemals humifizierten Schadstoffen in nachweislich unschädlicher Form z.B. als CO₂ im Zuge des natürlichen Humus-Turnover. Auch eine zwischenzeitliche Freisetzung von Schadstoff(-derivaten), die in geringem Ausmaß und wesentlich langsamer erfolgt als deren Mineralisation, ist nicht als kritisch zu bewerten, da sich diese Schadstoffe nicht anreichern, sondern im Verlauf der Zeit ebenfalls zu CO₂ umgesetzt werden. Mögliche Freisetzungswege zuvor nicht-extrahierbarer Schadstoffrückstände sind ausführlich in Kap. 2.5.2.2 und in Abb. 2.11 dargestellt. Ob die Schadstoffe stabil im Boden gebunden vorliegen und sich wie ein Teil des natürlichen Humuspolymeres verhalten, hängt auch von der Art der chemischen Bindung ab. Auch auf diesen Sachverhalt wird in Kap. 2.2.1 und 2.2.2 eingegangen.

Eine Möglichkeit die Stabilität der gebundenen Rückstände zu testen, ist die **Simulation** unterschiedlicher *worst case*-Bedingungen. Die nicht-extrahierbaren Rückstände werden dabei unterschiedlichen ökologisch relevanten Streßbedingungen ausgesetzt und das Verhalten bzw. die Stabilität der nicht-extrahierbaren Rückstände wird im Zeitraffer ermittelt. Kommt es während der Untersuchungen zu einer erhöhten Freisetzung von zuvor nicht-extrahierbaren Rückständen in eine verfügbare Fraktion (z.B. extrahierbare Fraktion oder sogar wasserlösliche Fraktion) ist zu überprüfen, ob es sich um die Originalschadstoffe oder Schadstoffderivate handelt, dann ist die Stabilität der nicht-extrahierbar gebundenen Rückstände nicht gegeben.

Ökotoxikologische Untersuchungen können ebenfalls die Unbedenklichkeit der Schadstoff-Festlegung aufzeigen, wenn das Bodenmaterial, welches nach der Sanierung nicht-extrahierbare Schadstoffrückstände enthält, langfristig keine erhöhte Toxizität aufweist (s. Kap. 2.5).

Von einer stabilen Festlegung der Schadstoffe in der organischen Bodenmatrix kann also ausgegangen werden, wenn folgende Kriterien eingehalten werden:

- Die Bindung der Schadstoffe oder Schadstoffderivate an die Bodenbestandteile (zumeist die organische Substanz des Bodens) muß praktisch irreversibel sein, wie dies bei einer stabilen kovalenten Bindung (z.B. C-C- oder C-N- Bindung) zu erwarten ist.
- Die Stabilität der Bindung zwischen den Schadstoffen bzw. Schadstoffderivaten und den Bodenbestandteilen muß auch unter drastischen biologischen, physikalischen und chemischen Streßbedingungen gewährleistet sein.
- Der sanierte Boden muß alle ökotoxikologischen Kriterien der Unbedenklichkeit erfüllen (vgl. Kap. 2.5.1).

2.2.3.2 Untersuchungsstrategien zum Nachweis der Unbedenklichkeit und Bewertung der Stabilität immobilisierter Schadstoffe

Der Nachweis der Unbedenklichkeit der festgelegten oder humifizierten Schadstoffe kann durch Anwendung unterschiedlicher Untersuchungsstrategien erbracht werden, die nachfolgend aufgeführt sind:

1. Aufklärung der Bindungsform zwischen Schadstoff(-derivat) und organischer Substanz des Bodens (mit NMR-spektroskopischen Methoden unter Einsatz stabiler Isotope, z.B. ^{15}N oder ^{13}C).
2. Laborversuche, in denen das Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von humifizierten Schadstoffen unter gezielter Simulation ökologischer Streßbedingungen (*worst case*-Bedingungen) im Zeitraffer verfolgt wird.
3. Untersuchungen im Großmaßstab (Spezialreaktoren und Freilandlysimetern) um einerseits mögliche *scale up*-Effekte bzw. *scale down*-Effekte zu erfassen und andererseits unter möglichst naturnahen Freilandbedingungen das Langzeitverhalten zu ermitteln.
4. Ökotoxikologische Bewertung der mit diesem Verfahren sanierten Bodenmaterialien (gemäß den in Teilverbund 4 "Ökotoxikologische Testbatterien" erarbeiteten Methoden, s. Kap. 2.5 und 9.3).

Diese Untersuchungsstrategien ergänzen sich in ihrer Aussagekraft gegenseitig und wurden in dem Verbundvorhaben 5 "Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen" des Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung" für die Kontaminanten PAK und TNT detailliert in Kombination verfolgt. Diese Untersuchungsstrategien werden in Kap. 2.5.2 "Langzeitverhalten gebundener Rückstände" ausgeführt und einige exemplarische Ergebnisse anhand von Untersuchungen mit TNT und PAK dargestellt.

2.2.4 Literatur

1. **Achnich, C., G. Daun, D. Jackisch, U. Sieglén, B. Wagner, H. Lenke, und H.-J. Knackmuss.** 1997. Festlegung von TNT im Boden durch eine Anaerob-/Aerob-Behandlung: Stabilität der Metabolite. In Umweltbundesamt (ed.) Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten. Tagungsband zum 3. Statusseminar des BMBF-Verbundvorhabens "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten", 26. und 27.02.1997 in Berlin. P1-14.
2. **Achnich, C., H. Lenke, and H.-J. Knackmuss.** 1999. Untersuchungen zur Bindung und Stabilität von festgelegtem reduziertem TNT im Boden nach einer biologischen Anaerob-/Aerob-Behandlung. In Umweltbundesamt (ed.) Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen. Tagungsband zum Statusseminar des BMBF-Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", 22. und 23.10.1998 in Bremen. E1-14.
3. **Achnich, C.** 1999. Sanierung von TNT-kontaminiertem Boden durch Immobilisierung des Schadstoffes: Stabilität und Charakterisierung der Festlegung. Fraunhofer Institut f. Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik. Berichte aus Forschung und Entwicklung. Nr. 015. Fraunhofer IRB Verlag.

4. **Achtnich, C., E. Fernandes, J.-M. Bollag, H.-J. Knackmuss, and H. Lenke.** 1999. Covalent binding of reduced metabolites of (¹⁵N₃)TNT to soil organic matter during a bioremediation process analyzed by ¹⁵N NMR Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* **33**:4448-4456.
5. **Achtnich, C., U. Sieglen, H.-J. Knackmuss, and H. Lenke.** 1999. Irreversible binding of biologically reduced 2,4,6-Trinitrotoluene to soil. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**:2418-2323.
6. **Alexander, M.** 1997. How toxic are toxic chemicals in soil? *Environ. Sci. Technol.* **29**:2713-2717.
7. **America Institute of Biological Science – Environmental Task Group.** 1975. Registration of pesticides in the United States – proposed guidelines. *Fed. Reg.* **40**:123.
8. **Baldock, J. A., J. M. Oades, A. M. Vassallo, and M. A. Wilson.** 1989. Incorporation of uniformly labelled ¹³C-glucose carbon into the organic fraction of a soil. Carbon balance and CP/MAS-¹³C-NMR-measurements. *Soil Biol. Biochem.* **27**:725-746.
9. **Barr, D. P., and S. D. Aust.** 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* **28**:78-87.
10. **Berry, D. F., and S. A. Boyd.** 1985. Decontamination of soil through enhanced formation of bound residues. *Environ. Sci. Technol.*, **19**:1132-1133.
11. **Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft.** 1990. Richtlinien für die Prüfung von Pflanzenschutzmitteln im Zulassungsverfahren, Teil VI, Dez 1990, 5-1: Abbaubarkeit und Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Wasser/Sediment-System; Hrsg. Abteilung für Pflanzenschutzmittel und Anwendungstechnik der Biologischen Bundesanstalt Braunschweig.
12. **Bollag, J.-M., and M. J. Loll.** 1983. Incorporation of xenobiotics into soil humus. *Experienta*, **39**:1221-1234.
13. **Bollag, J.-M., and C. Myers.** 1992. Detoxification of aquatic and terrestrial sites through binding of pollutants to humic substances. *Sci. Total Environ.* **117/118**:357-366.
14. **Bollag, J.-M., C. J. Myers, and R. D. Minard.** 1992. Biological and chemical interactions of pesticides with soil organic matter. *Sci. of Total Environ.* **123/124**:205-217.
15. **Bollag, J.-M.** 1992. Decontaminating soil with enzymes. *Environ. Sci. Technol.* **26**:1876-1881.
16. **Breitung, J., D. Bruns-Nagel, K. Steinbach, L. Kaminski, D. Gemsa, and E. von Löw.** 1996. Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soils by two different aerated compost systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**:795-800.
17. **Brodkorb, T. S., and R. L. Legge.** 1992. Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soils supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:3117-3121.
18. **Bruns-Nagel, D., O. Drzyzga, K. Steinbach, T. C. Schmidt, E. von Löw, T. Gorontzy, K.-H. Blotvogel, and D. Gemsa.** 1998. Anaerobic/aerobic composting of 2,4,6-Trinitrotoluene-contaminated soil in a reactor system. *Environ. Sci. Technol.* **32**:1676-1679.
19. **Bruns-Nagel, D., H. Knicker, O. Drzyzga, B. Casper, K. Steinbach, and E. von Löw.** 1999. Aufklärung der Humifizierung von TNT mittels stabiler Isotope und NMR-Analytik. In Umweltbundesamt (ed.) Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen.

Tagungsband zum Statusseminar des BMBF-Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", 22. und 23.10.1998 in Bremen. F1-16.

20. **Burhenne, J., U. Klaus, and M. Spiteller.** 1999. Einfluß der Struktur von Xenobiotika auf deren Bindung an die anorganische und organische Bodenmatrix. In Umweltbundesamt (ed.) Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen. Tagungsband zum Statusseminar des BMBF-Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", 22. und 23.10.1998 in Bremen. J1-15.
21. **Burns, I. G., and H. B. Hayes.** 1974. Some physico-chemical principles involved in the adsorption of the organic cation paraquat by soil humic materials. *Residue Rev.* **52**:117-146.
22. **Calderbank, A.** 1989. The occurrence and significance of bound pesticide residues in soil. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **108**:71-103.
23. **Cerniglia, C. E., W. L. Campbell, J. P. Freemann, and F. E. Evans.** 1989. Identification of a novel metabolite in phenanthrene metabolism by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2275-2279.
24. **Cerniglia, C. E.** 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* **3**:351-368.
25. **Chiou, C.T.** 1989. Theoretical considerations of the partition uptake of nonionic organic compounds by soil organic matter. In B. L. Sawhney, and K. Brown (ed.) Reactions and movement of organic chemicals in soils. Bd. 22, Soil Sci. Soc. .Am. Inc., Madison. 1-29.
26. **Daun, G., H. Lenke, M. Reuss, and H.-J. Knackmuss.** 1998. Biological Treatment of TNT-contaminated soil. 1. Anaerobic cometabolic reduction and interaction of TNT and metabolites with soil components. *Environ. Sci. Technol.* **32**:1956-1963.
27. **Dec, J., K. Haider, A. Benesi, V. Rangaswamy, U. Plücker, and J.-M. Bollag.** 1997. Analysis of soil-bound residues of ¹³C-labeled fungicide cyprodinil by NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* **31**:1128-1135.
28. **Dec, J., K. Haider, A. Schäffer, E. Fernandes, and J.-M. Bollag.** 1997. Use of silylation procedure and ¹³C-NMR Spectroscopy to characterize bound and sequestered residues of cyprodinil in soil. *Environ. Sci. Technol.* **31**:2991-2997.
29. **Drzyzga, O., D. Bruns-Nagel, T. Gorontzy, K.-H. Blotvogel, D. Gemsa, and E. von Löw.** 1998. Incorporation of ¹⁴C-labeled 2,4,6-Trinitrotoluene metabolites into different soil fraction after anaerobic-aerobic treatment of soil/molasses mixture. *Environ. Sci. Technol.* **32**:3529-3535.
30. **Engebretson, R. R., and R. Wandruszka.** 1994. Microorganization in dissolved humic acids. *Environ. Sci. Technol.* **28**:1934-1941.
31. **Eschenbach, A., M. Kästner, R. Bierl, G. Schaefer, and B. Mahro.** 1994. Evaluation of a new, effective method to extract polycyclic aromatic hydrocarbons from soil samples. *Chemosphere* **28**:683-692.
32. **Eschenbach, A.** 1995. Einfluß von *Pleurotus ostreatus*, Kompost, *Sphingomonas paucimobilis* und der Kontaminationsdauer auf den Verbleib und Abbau ¹⁴C-markierter polyzyklischer Kohlenwasserstoffe (PAK) in Altlastböden. Diss. Techn. Univ. Hamburg-Harburg.

33. **Eschenbach, A., M. Kästner, R. Wienberg, and B. Mahro.** 1995: Microbial PAH degradation in soil material from a contaminated site - Mass balance experiments with *Pleurotus ostreatus* and different ¹⁴C-PAH. In W. J. van den Brink, R. Bosman, and F. Arendt. (ed.) Contaminated soil '95. Kluwer Academic Publ. Dordrecht 377-378.
34. **Eschenbach, A., R. Wienberg, and B. Mahro.** 1997. Bildung und Langzeitstabilität von nicht-extrahierbaren PAK-Rückständen im Boden. Altlastenspektrum **6**:292-297.
35. **Eschenbach, A., R. Wienberg, and B. Mahro B.** 1997. Einsatz von Kompost und Rindenmulch bei der biologischen Altlastensanierung PAK-kontaminierter Bodenmaterialien. Mittlgn. Dt. Bodenkundl. Gesellsch., **83**:279-282.
36. **Eschenbach, A., R. Wienberg, and B. Mahro.** 1998. Untersuchung der Bildung und Langzeitsabiltät von humifizierten PAK in biologisch behandelten Recyclingböden. Abschlußbericht BMBF-Forschungsvorhaben "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", Teilprojekt 7, Förder-Nr. 1480937.
37. **Eschenbach, A., R. Wienberg, and B. Mahro.** 2000. Formation, long-term stability and fate of non-extractable ¹⁴C-PAH-residues in contaminated soils. In D. L. Wise, D. J. Trantolo, E. J. Cichon, H. I. Inyang, U. Stottmeister (eds.): Remediation engineering of contaminated soils. Marcel Dekker, Inc., New York, 429-448.
38. **Fernando, T., J. A. Bumpus, and S. D. Aust.** 1990. Biodegradation of TNT (2,4,6-Trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. **56**:1999-1671.
39. **Fischer, D., and U. Walter.** 1999. Werk Tanne – Erste Ergebnisse der Bodenbehandlung nach dem Anaerob-Aerob-Verfahren. In Umweltbundesamt (ed.) Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen. Tagungsband zum Statusseminar des BMBF-Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", 22. und 23.10.1998 in Bremen. K1-13.
40. **Fründ, R., H.-D. Lüdemann, F. J. González-Vila, G. Almendros, J. C. del Rio, and F. Martín.** 1989. ¹³C-NMR spectroscopy of lignins and lignocellulosic materials: structural differences between humic fractions from different soil types as determined by FT-IR and ¹³C-NMR studies. Sci. Total Environ. **81/82**:187-194.
41. **Führ, F.** 1987. Non-extractable pesticide residues in soil. In R. Greenhalgh, T. R. Roberts (ed.) Pesticide science and biotechnologie. 6th IUPAC congress of pesticide chemistry. Blackwell Sci. Publ., Oxford. 381-389.
42. **Führ, F., W. Steffens, W. Mittelstaedt, and B. Brumhard.** 1991. Lysimeter experiments with ¹⁴C-labelled pesticides - an agroecosystem approach. In H. Frehse (ed.) Pesticide chemistry. Advances in international research, development and legislation. Verlag Chemie, Weinheim. 37-48.
43. **Führ, F., H. Ophoff, P. Burauel, U. Wanner, and K. Haider.** 1998. Modification of the definition of bound residues. In Deutsche Forschungsgemeinschaft (ed.) Pesticide bound residues in soil. Wiley-VCH. Weinheim. 175-177.
44. **Goodin, J. D., and M. D. Webber.** 1995. Persistence and fate of anthracene and benzo(a)pyrene in municipal sludge treated soil. J. Environ. Qual. **24**:271-278.
45. **Gorontzy, T., O. Drzyzga, M. W. Kahl, D. Bruns-Nagel, J. Breitung, E. von Löw, and K.-H. Blotevogel.** 1994. Microbial degradation of explosives and related compounds. Crit. Rev. Microbiol. **22**:265-284.

46. **Grosser, R. J., D. Warshawsky, and J. R. Vestal.** 1991. Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo(a)pyrene and carbazole in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:3462-3469.
47. **Haderlein, S. B., K. W. Weissmahr, and R. P. Schwarzenbach.** 1996. Specific Adsorption of nitroaromatic explosives and pesticides to clay minerals. *Environ. Sci. Technol.* **30**:312-622.
48. **Haider, K.** 1985. Der Einfluß von Bodenparametern auf den Abbau von Pflanzenschutzmitteln. *Berichte über Landwirtschaft, Pflanzenschutzmittel und Boden, SH* **198**:81-92.
49. **Haider, K., M. Spiteller, K. Reichert, and M. Fild.** 1992. Derivatization of humic compounds: An analytical approach for bound organic residues. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **46**:201-211.
50. **Haider, K., M. Spiteller, A. Wais, and M. Fild.** 1993. Evaluation of the binding mechanism of anilazine and its metabolites in soil organic matter. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **53**:125.
51. **Haider, K.** 1995. *Biochemie des Bodens.* Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
52. **Haider, K., J. Dec, A. Schäffer, and J.-M. Bollag.** 1998. Characterization of bound residues from cyprodinil by ¹³C-labelling and NMR spectrometry. *In Deutsche Forschungsgemeinschaft (ed.) Pesticide bound residues in soil.* Wiley-VCH. Weinheim. 41-47.
53. **Haider, K., and A. Schäffer.** 2000. Umwandlung und Abbau von Pflanzenschutzmitteln in Böden - Auswirkungen auf die Umwelt. Thieme-Verlag. in press.
54. **Hassett, J. J., and W. L. Banwart.** 1989. The sorption of nonpolar organics by soils and sediments. *In B. L. Sawhney, and K. Brown. (ed.) Reactions and movement of organic chemicals in soils.* Bd. 22, Soil Sci. Soc. Am. Inc., Madison. 31-44.
55. **Hatcher, P. G., M. Schnitzer, L. W. Dennis, and G. E. Maciel.** 1981. Aromaticity of humic substances in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **45**:1089-1094.
56. **Hatcher, P. G., J. M. Bortiatynski, R. D. Minard, J. Dec, and J.-M. Bollag.** 1993. Use of high-resolution ¹³C-NMR to examine the enzymatic covalent binding of ¹³C-labeled 2,4-dichlorophenol to humic substance. *Environ. Sci. Technol.* **27**:2098-2103.
57. **Hatzinger, P. B., and M. Alexander.** 1995. Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environ. Sci. Technol.* **29**:537-545.
58. **Hayes, M. H. B., M. E. Pick, and B. A. Toms.** 1975. Interactions between clay minerals and bipyridylum herbicides. *Residue Rev.* **57**:1-25.
59. **Held, T.** 1997. Mikrobiologisches in-situ-Verfahren zur Sanierung TNT-kontaminierter Böden. *Wasser/Abwasser.* **138**:38-45.
60. **Herre, A., K. Scheibner, and W. Fritsche.** 1997. Bioremediation von TNT-belasteten Böden mit Pilzen; Metabolisierung, Mineralisierung und Humifizierung. *In Umweltbundesamt (ed.) Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten. Tagungsband zum 3. Statusseminar des BMBF-Verbundvorhabens "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten", 26. und 27.02.1997 in Berlin.* K1-27.
61. **Herre, A., K. Scheibner, M. Kästner, and W. Fritsche.** 1999. Aerobe Behandlung von UR-¹⁴C-TNT-dotiertem Boden mit ligninolytischen Pilzen – Bildung und Remobilisierbarkeit der gebundenen Rückstände. *In Umweltbundesamt (ed.) Langzeit- und Remobilisierungsverhalten*

- von Schadstoffen. Tagungsband zum Statusseminar des BMBF-Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", 22. und 23.10.1998 in Bremen. G1-17.
62. **Hosler, K. R., T. L. Bulman, and P. J. A. Fowlie.** 1988. Der Verbleib von Naphthalin, Anthracen und Benz(a)pyren im Boden bei einem für die Behandlung von Raffinerieabfällen genutztem Gelände. *In* K. Wolf, W. J. van den Brink, F. J. Colon (ed.) Altlastensanierung '88. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht/Boston/London. 111-113.
 63. **Hund-Rinke, K. and W. Kördel.** 2000. Biologische Bodensanierung unter der Lupe. *Umwelt* **30**:51-53.
 64. **Hupe, K., J.-C. Lüth, J. Heerenklage, and R. Stegmann.** 1996. Kompost als Mittel zur Reinigung ölkontaminierter Böden. *Altlastenspektrum* **4**:182-189.
 65. **Hupe, K.** 1998. Optimierung der mikrobiellen Reinigung mineralölkontaminierter Böden in statischen und durchmischten Systemen. *In* R. Stegmann (ed.) *Hamburger Berichte* 15. Economica Verlag, Bonn.
 66. **Hupe, K., M. Koning, J.-C. Lüth, J. Heerenklage, and R. Stegmann.** 1998. Einsatz von Testsystemen zur bilanzierenden Untersuchung der biologischen Schadstoffumsetzung im Boden. *Altlastenspektrum* **6**:360-366.
 67. **Kaplan, D. L., and A. M. Kaplan.** 1982. Thermophilic biotransformations of 2,4,6-Trinitrotoluene under simulated composting conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**:757-760.
 68. **Kästner, M., B. Mahro, and R. Wienberg.** 1993. Biologischer Schadstoffabbau in kontaminierten Böden. *In* R. Stegmann (ed.) *Hamburger Berichte*. Economica Verlag, Bonn.
 69. **Kästner, M., S. Lotter, J. Heerenklage, M. Breuer-Jammali, R. Stegmann, and B. Mahro.** 1995. Fate of ¹⁴C-labeled anthracene and hexadecane in compost-manured soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**:1128-1135.
 70. **Kästner, M., S. Streibich, H. H. Richnow, W. Michaelis, and W. Frische.** 1997. Bildung und Schicksal von gebundenen Rückständen aus Umweltschadstoffen im Boden. *In* Umweltbundesamt (ed.) *Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten*. Tagungsband zum 3. Statusseminar des BMBF-Verbundvorhabens "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten", 26. und 27.02.1997 in Berlin. B1-42.
 71. **Kästner, M.** 1998. Verteilung des Kohlenstoff beim mikrobiellen Abbau von Fremdstoffen im Boden unter besonderer Berücksichtigung der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe – Metabolisierung, Mineralisierung, und Humifizierung. *Habilitationsschrift*.
 72. **Kästner, M., S. Streibich, M. Beyrer, H. H. Richnow, and W. Fritsche.** 1999. Formation of bound residues during microbial degradation of (¹⁴C)anthracene in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1834-1842.
 73. **Kelsey, J. W., B. D. Kottler, and M. Alexander.** 1997. Selektive chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* **31**:214-217.
 74. **Khan, S. U.** 1980. *Pesticides in the soil environment*. Elsevier Scientific Publishing Company, New York.
 75. **Khan, S. U.** 1982. Bound pesticide residues in soil and plants. *Residue reviews.* **84**:1-24.

76. **Klein, W., and I. Scheunert.** 1982. Bound pesticide residues in soil, plants and food with particular emphasis on the application of nuclear techniques. *In* International Atomic Energy Agency. Agrochemicals: Fate in food and the environment. Vienna. IAEA-SM-263/38. 177-205.
77. **Knicker, H., R. Fründ, and H.-D. Lüdemann.** 1993. The chemical nature of nitrogen in soil organic matter. *Naturwissenschaften* **80**:219-221.
78. **Knicker, H., and H.-D. Lüdemann.** 1995. N-15 and C-13 CPMAS and solution NMR studies of N-15 enriched plant material during 600 days of microbial degradation. *Org. Geochem.* **23**:329-341.
79. **Knicker, H., D. Bruns-Nagel, O. Drzyzga, E. von Löw, and K. Steinbach.** 1999. Characterization of ¹⁵N-TNT residues after an anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures by solid-state ¹⁵N NMR spectroscopy. Determination and optimization of the relevant NMR spectroscopic parameters. *Environ. Sci. Technol.* **33**:343-349.
80. **Kögel-Knabner, I., and P. G. Hatcher.** 1989. Characterization of alkyl carbon in forest soils by CP/MAS ¹³C NMR spectroscopy and dipolar dephasing. *Sci. Total Environ.* **81/82**:169-177.
81. **Lenke, H., G. Daun, D. Bryniok, and H.-J. Knackmuss.** 1993. Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten. *Spektrum der Wissenschaft* 106-108.
82. **Lenke, H., J. Warrelmann, G. Daun, K. Hund, U. Sieglen, U. Walter, and H.-J. Knackmuss.** 1998. Biological treatment of TNT-contaminated soil. 2. Biologically induced immobilization of the contaminants and full-scale application. *Environ. Sci. Technol.* **32**:1964-1971.
83. **Lotter, S., A. Brumm, J. Bundt, J. Heerenklage, A. Paschke, H. Steinhart, and R. Stegmann.** 1993. Carbon balance of a PAH-contaminated soil during biodegradation as a result of the addition of compost. *In* F. Arendt, G. J. Annokkee, R. Bosman, W. J. van den Brink. (ed.) Contaminated soils '93. Kluwer Acad. Publishers. 1235-1245.
84. **Lotter, S.** 1995. Biologische Bodenreinigung. *In* R. Stegmann (ed.) Hamburger Berichte 9. Economica Verlag. Bonn.
85. **Mahro, B. and M. Kästner.** 1993. Der mikrobielle Abbau polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) in Böden und Sedimenten: Mineralisierung, Metabolitenbildung und Entstehung gebundener Rückstände. *BioEngineering* **9**:50-58.
86. **Mahro, B., and M. Kästner.** 1993. Mechanisms of microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in soil-compost mixtures. *In* F. Arendt, G. J. Annokkee, R. Bosman, W. J. van den Brink. (ed.) Contaminated soils '93. Kluwer Acad. Publishers. 1249-1256.
87. **Mahro, B.** 1994. Vergleichende Untersuchung zur Wirkung der Zugabe biologisch aktiver Supplemente auf den mikrobiellen Abbau polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) im Boden. Habilitationsschrift TU Hamburg-Harburg, Hamburg.
88. **Mahro, B., A. Eschenbach, M. Kästner, and G. Schaefer.** 1994. Untersuchung von Möglichkeiten zur gezielten Stimulation der biogenen Mineralisierung und Humifizierung von PAK in Böden. *In* TU Berlin, "Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung", Bd. 4, Biologischer Abbau von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen. 55-68.

89. **Mahro, B., G. Schaefer, and M. Kästner** 1994. Pathways of microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *In* R. E. Hinchee, A. Leeson, L. Semprini, S. K. Ong (ed.) *Bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbon compounds*. Lewis Publishers, Boca Raton. 203-217.
90. **Mahro, B., L. M. Schmidt, and A. Eschenbach.** 1999. Möglichkeiten und Grenzen mikrobiologischer Verfahren bei der Sanierung kontaminierter Böden. *In* S. Heiden, R. Erb, J. Warrelmann, and R. Dierstein. *Biotechnologie im Umweltschutz. Bioremediation: Entwicklungsstand – Anwendungen – Perspektiven. Initiativen zum Umweltschutz*, Erich Schmidt Verlag, Berlin. **12**:99-107.
91. **Mahro, B.** 2000. Bioavailability of contaminants. *In* H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, (ed.) *Biotechnology Vol.11 b. Environmental Processes - Soil decontamination, Waste gas treatment, Potable water preparation*; Wiley-VCH, Weinheim. 62-88.
92. **Means, J. C., S. G. Wood, J. J. Hassett, and W. L. Banwart.** 1980. *Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils. Environ Sci Technol.* **14**:1524-1528.
93. **Michaelis, W.** 1994. Chemische Wechselwirkungen von Erdölkontaminationen und deren Abbauprodukten mit der Humusfraktion von Böden. *In* Sonderforschungsbereich 188 der DFG. *Reinigung kontaminierter Böden. Arbeits- und Ergebnisbericht.* Techn. Univers. Hamburg-Harburg. 493-512.
94. **Michels, J. and G. Gottschalk.** 1995. Pathway of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) degradation by *phanerochaete chrysosporium*. *In* J. Spain (ed.) *Biodegradation of nitroaromatic compounds*. Plenum Press. New York.
95. **Murphy, E. M., and J. M. Zachara.** 1995. The role of sorbed humic substances on the distribution of organic and inorganic contaminants in the groundwater. *Geoderma.* **67**:103-124.
96. **Park, K. S., R. C. Sims, W. J. Doucette, and J. E. Matthews.** 1988. Biological transformation and detoxification of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in soil systems. *J. Water Poll. Control Fed.* **60**:1822-1825.
97. **Pignatello, J. J.** 1989. Sorption dynamics of organic compounds in soils and sediments. *In* B. L. Sawhney, and K. Brown. (ed.) *Reactions and movement of organic chemicals in soils.* Bd. 22, Soil Sci. Soc. Am. Inc., Madison. 45-80.
98. **Pignatello, J. J., and B. Xing.** 1996. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ. Sci. Technol.* **30**:1-11.
99. **Preuss, A., J. Frimel, and G. Diekert.** 1993. Anaerobic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Arch. Microbiol.* **159**:345-353.
100. **Qiu, X., and M. J. McFarland.** 1991. Bound residues formation in PAH contaminated soil composting using *Phanerochaete Chrysosporium*. *Hazardous Waste & Hazardous Materials* **8**:115-126.
101. **Richnow, H. H., R. Seifert, and W. Michaelis.** 1993. Der Einfluß der Huminstoffe auf die biologische Bodenreinigung – Assoziation organischer Schadstoffe aus Mineralölkontaminationen. *In* R. Stegmann (ed.) *Bodenreinigung.* Bd. 6, Economica Verlag, Bonn.

102. **Richnow, H. H., R. Seifert, J. Hefter, M. Kästner, B. Mahro, and W. Michaelis.** 1994. Metabolites of xenobiotica and mineral oil constituents linked to macromolekular organic matter in polluted environments. *Adv. Org. Geochem.* **22**:671-681.
103. **Richnow, H. H., A. Eschenbach, J. Hefter, M. Kästner, B. Mahro, R. Seifert, and W. Michaelis.** 1996. Bildungsmechanismen von bound residues bei der biologischen Behandlung kontaminierter Böden. *In* Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung der TU Berlin, Bd. 7. Biologische und chemische Behandlung von PAK-haltigen Böden und Abwässern. 81-97.
104. **Richnow, H. H., A. Eschenbach, B. Mahro, R. Seifert, P. Wehrung, P. Albrecht, and W. Michaelis.** 1998. The use of ¹³C-labelled polycyclic aromatic hydrocarbons for the analysis of their transformation in soil. *Chemosphere*, **36**:2211-2224.
105. **Richnow, H. H., A. Eschenbach, B. Mahro, M. Kästner, E. Annweiler, R. Seifert, and W. Michaelis.** 1999. The formation of nonextractable soil residues – a stable isotope approach. *Environ. Sci. Technol.* **33**:3761-3767.
106. **Rieger, P. G., and H.-J. Knackmuss.** 1995. Basic knowledge and perspectives on biodegradation of 2,4,6-Trinitrotoluene and related nitroaromatic compounds in contaminated soil. *In* J. Spain (ed.) Biodegradation of nitroaromatic compounds. Plenum Press. New York. 1-18.
107. **Schäffer, A., J. Dec, K. Haider, and J.-M. Bollag.** 1998. Soil-bound residues of the novel fungicide cyprodinil: extraction, size-exclusion and thin-layer chromatography. *In* Deutsche Forschungsgemeinschaft (ed.) Pesticide bound residues in soil. Wiley-VCH. Weinheim. 47-52.
108. **Scheibner, K., M. Hofrichter, A. Herre, J. Michels, and W. Fritsche.** 1997. Screening for fungi intensively mineralizing 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**:452-457.
109. **Scheunert, I.** 1992. Transformation and degradation of pesticides in soil. *In* I. Scheunert and H. Parlar. Terrestrial behavior of pesticides. Springer-Verlag. Berlin.
110. **Scheunert, I.** 1999. Entstehung und Freisetzung von nicht-extrahierbaren Rückständen chlorierter organischer Fremdstoffe im Boden. *In* Umweltbundesamt (ed.) Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen. Tagungsband zum Statusseminar des BMBF-Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", 22. und 23.10.1998 in Bremen. D1-7.
111. **Schnitzer, M., and C. M. Preston.** 1986. Analysis of humic acids by solution and solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **50**:326-331.
112. **Schnöder F., W. Mittelstaedt, and F. Führ.** 1994. Das Verhalten von Benzo(a)pyren und Fluoranthen in einer Parabraunerde - Lysimeter- und Laborstudien. *In* TU Berlin (ed.) Biologischer Abbau von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen. Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung **4**:217-230.
113. **Scow, K. M.** 1994. Effect of sorption on biodegradation of organic chemicals in soil. *In* Inegi and Cna (ed.) 15th World Congress of soil science. **4a**:352-361.
114. **Senesi, N.** 1992. Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. *Sci. Total Environ.* **123/124**:63-76.

115. **Senesi, N.** 1993. Organic pollutant migration in soils as affected by soil organic matter. Molecular and mechanistic aspects. In D. Petruzelli, and F. G. Helfferich (ed.) Migration and Fate of pollutants in soils and subsoils. Springer, Berlin. 47-74.
116. **Stevenson, F.J.** 1982. Humus Chemistry. Wiley. New York. N.Y.
117. **Thorn, K. A., P. J. Pettigrew, W. S. Goldenberg, and E. J. Weber.** 1996. Covalent binding of aniline to humic substance. 2. ¹⁵N NMR studies of nucleophilic addition reactions. Environ. Sci. Technol. **30**:2764-2775.
118. **Thorn K. A.** 1997. Covalent binding of the reductive degradation products of TNT to humic substances examined by N-15 NMR. Division of Environ. Chem. Preprints of Extended Abstracts. **37**:305-306.
119. **Topp, E. M.** 1986. Aufnahme von Umweltchemikalien in die Pflanze in Abhängigkeit von physikalisch-chemischen Stoffeigenschaften. Diss. Techn. Univers. München.
120. **Ziechmann, W.** 1980. Huminstoffe. Verlag Chemie, Weinheim.
121. **Ziechmann, W.** 1997. Die Humifizierung und ihre Folgen. In Umweltbundesamt (ed.) Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten. Tagungsband zum 3. Statusseminar des BMBF-Verbundvorhabens "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten", 26. und 27.02.1997 in Berlin. A1-15.
122. **Wais, A.** 1998. Silylation of humic substance-bound residues – A new extraction technique. In Deutsche Forschungsgemeinschaft (ed.) Pesticide bound residues in soil. Wiley-VCH. Weinheim. 78-86.
123. **Wanner, U., and P. Burauel.** 1999. Quantitative und qualitative Untersuchungen zur Aufklärung der Genese nicht extrahierbarer Rückstände in Böden. In Umweltbundesamt (ed.) Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen. Tagungsband zum Statusseminar des BMBF-Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", 22.-23.10.1998 in Bremen. D8-16.
124. **Wershaw, R. L.** 1989. Application of a membrane model to the sorptive interactions of humic substance. Environ. Health Perspectives. **83**:191-293.
125. **Wershaw, R. L.** 1993. Model for humus in soils and sediments. Environ. Sci. Technol. **27**:814-816.
126. **Weissenfels, W. D., H. J. Klewer, and J. Langhoff.** 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. Appl. Microbiol. Biotechnol. **36**:689-696.
127. **Wienberg, R.** 1990. Zum Einfluß organischer Schadstoffe auf Deponietone.- Teil 2: Spezifische Interaktionen. Abfallwirtschaftsjournal 2/6:393-403.
128. **Winterberg, R.** 1999. Maßstabsgerechte Erprobung biologischer Verfahren zur Sanierung von Rüstungsaltslasten: Dynamisches Beetverfahren. In Umweltbundesamt (ed.) Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen. Tagungsband zum Statusseminar des BMBF-Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", 22. und 23.10.1998 in Bremen. L1-12.

2.3 Parameter und Methoden zur Beurteilung der biologischen Sanierbarkeit von Böden

Matthias Kästner

Die Darstellungen des vorliegenden Kapitels sollen den Stand des Wissens vermitteln und den neueren Stand der Forschungen zusammenfassen. Dabei soll besonderes Augenmerk auf biologische Parameter gelegt werden. Deren Untersuchung ist noch nicht generell bei der Altlastenerkundung üblich und kann auch nach mehr als 15 Jahren Praxis der biologischen Bodensanierung noch nicht als allgemeiner Stand der Technik angesehen werden. Die Ausführungen sollen daher auch Methoden bereitstellen, welche Anforderungen an Praktikabilität und Aussagewert bei vertretbarem Kostenaufwand erfüllen können. Die Empfehlungen basieren auf inzwischen gewonnenen praktischen Erkenntnissen, verschiedenen Werken zum Thema [1; 22] und den Ergebnissen des DECHEMA Ad-hoc Arbeitskreises "Labormethoden zur Beurteilung der biologischen Bodensanierung" aus dem Jahre 1992 [18]. Die seinerzeit durch ein Expertengremium abgefaßten Methodenempfehlungen für ein Minimalprogramm zur Untersuchung der biologischen Sanierbarkeit von kontaminierten Böden besitzen auch nach acht Jahren noch Gültigkeit und werden daher in die Ausführungen integriert. Dem Arbeitskreis war es ein besonderes Anliegen, nicht nur eine Methodenbeschreibung vorzulegen, sondern auch klare Aussagen zur Bewertung der Untersuchungsergebnisse zu erarbeiten. Dieses Konzept wurde bei der Erstellung dieses Kapitels beibehalten und alle Angaben zur Bewertung sind entweder durch Einrahmung oder direkt als Kapitel gekennzeichnet.

Probennahme: Für die Beprobung zur Bestimmung der Boden- sowie der physiko-chemischen und biologischen Parameter ist die Probennahmestrategie vom Vorgehen bei der Erkundung und vom Untergrund des Standortes abhängig. Die geologischen Eigenschaften des Untergrundes bestimmen entscheidend die Erkundungsbohrungen und die mögliche Probennahme [22]. Generell sind geeignete Bodenproben bei der Erkundung aus Schürfen oder Kernbohrungen bzw. durch gezielte Beprobung der kontaminierten Bereiche mittels Spaten oder Handschappe zu gewinnen.

Bei der Entnahme der Bodenproben unabhängig von Bohrungen sollte auf eine repräsentative Beprobung Wert gelegt werden. Dies erfolgt zweckmäßigerweise durch eine Zufallsverteilung innerhalb eines Netzmusters auf der zu untersuchenden Fläche. Dabei muß ebenfalls eine Mindestgröße der Probe eingehalten werden. Unter Beachtung statistischer Erkenntnisse steigt diese mit der Inhomogenität und der Teilchengröße stark an. Unter der Maßgabe einer **Partikelgröße** von < 10 mm sind ca. 1 kg ausreichend, während bei Partikelgrößen > 60 mm bereits 10 kg erforderlich sind [22].

Für die Bestimmung biologischer Parameter sind mindestens **0,5 kg erdfeuchten Bodens** erforderlich. Probengefäße sollten im Hinblick auf die verschiedenen Kontaminationen aus Glas oder Metall sein. Für die Bestimmung der physiko-chemischen Parameter und die Schadstoffanalysen müssen die Gefäße verschlossen werden, während diese für die biologischen Parameter nicht verschlossen oder mit ausreichendem Luftraum (5:1; Luftraum:Bodenvolumen) transportiert und gelagert werden sollten.

Generell sollten Transport und Lagerung bei 4°C erfolgen und die Gefäße für mikrobiologische Parameter vorher sterilisiert werden. Wenn möglich sollten Proben für

biologische Parameter binnen 24 h bearbeitet werden. Nach einer Lagerungszeit von mehr als 14 Tagen können aus den hier dargestellten Methoden keine verwertbaren Daten mehr erhoben werden. Ebenso ist auch bei der Analyse des Schadstoffinventars bei längeren Lagerungszeiten mit mikrobiellem Abbau, Verflüchtigung, Oxidation oder ähnlichen Effekten zu rechnen, welche die Konzentrationsbestimmungen verfälschen.

Sofern keine ungestörten Bodenproben für spezielle bodenkundliche Untersuchungen notwendig sind, eignen sich Proben, welche nach den biologischen Kriterien genommen wurden, ebenso für die Untersuchung der physiko-chemischen wie auch der Boden-Parameter. Für weitergehende Bestimmungen zur mikrobiellen Abbaubarkeit sollte das Bodenmaterial zunächst durch ein 5-8 mm und nachfolgend durch ein 2 mm Sieb abgesiebt werden.

Ausgewählte biologische Parameter (siehe Kap. 2.3.4.1 u. Kap. 2.3.4.2) sollten generell bei der Standorterkundung mit bestimmt werden, um grundlegende Daten für die Entscheidung über biologische Methoden der Sanierung während der Planungsphase bereitzustellen. Unabhängig ob später eine *On site*- (s. Kap. 3.1 und Kap. 3.2) oder *In situ*-Sanierung (s. Kap. 3.3) durchgeführt werden soll, ist eine mikrobiologische Untersuchung zur Charakterisierung der am Standort vorkommenden Mikroorganismenpopulation als auch die Bestimmung deren Abbaupotentials für Schadstoffe an dem Bodenmaterial vorzunehmen. Wenn kleinräumige Unterschiede erfaßt werden sollen und keine Mischproben hergestellt werden, ist bei den Maßnahmen zur Gewinnung der Proben darauf zu achten, daß kein Material verschleppt und das Bohrgerät oder der Probennehmer vorher sorgfältig gereinigt wird. Je nachdem, ob eine *In situ*- oder *On site*-Sanierung in Frage kommt, muß bei der Probennahme unterschiedlich vorgegangen werden [18]:

- **On site:** Bei vorhandenem Aushub sind repräsentative Proben (mindestens drei) mittels Handschappe oder Rammkernbohrung. In Spezialfällen, z.B. bei Vorhandensein von Fundamentresten, sind aus Schürfungen Proben zu entnehmen.
- **In situ:** Neben Wasserproben aus entsprechenden Brunnen kann auf Bodenproben nicht verzichtet werden. Die Entnahme von ungestörtem Bodenmaterial aus den kontaminierten Bodenschichten (mindestens drei Proben aus drei verschiedenen Beprobungspunkten) sollte entweder durch Schlauchkern- oder Rammkernbohrung erfolgen.

2.3.1 Bodenparameter

Böden zeichnen sich durch eine hohe Varianz der physikalischen und chemischen Charakteristika aus. Üblicherweise ist die Variabilität in der Horizontalen kleiner als in der Vertikalen. Für eine detaillierte Darstellung von Bodenarten, der Charakterisierung von Böden [7; 36] und der geologischen Eigenschaften des Untergrundes [22] sei hier auf die weiterführende Literatur verwiesen.

Die Bedingungen eines Bodens am Standort bestimmen häufig über die biologische Abbaubarkeit von Kontaminanten und sind damit der limitierende Faktor für die Anwendung von biologischen Sanierungsverfahren. In vielen Fällen können limitierende Faktoren wie Wassergehalt, pH-Wert positiv beeinflusst werden. In **Extremfällen** kann die Bodenklassifizierung allerdings bereits für den Ausschluß bestimmter Verfahrensvarianten sorgen, wenn z.B. die Partikelverteilung keine ausreichende Diffusion zuläßt. Industrielle Standorte können

sehr weitgehende Unterschiede in der Bodenstruktur aufweisen, die in der Regel auf unterschiedliche Nutzungen und Bebauungen zurückgeführt werden können. Informationen über derartige räumliche Strukturen lassen sich bei der Erkundung und Beprobung gewinnen, und sollten verstärkt in die Entscheidungsfindung einbezogen werden.

2.3.1.1 Korngröße, Porenanteil, Aggregation

Kontaminierte Böden können sich in verschiedenen Zonen des Untergrundes befinden. In vertikaler Gliederung von oben nach unten können sie in der ungesättigten Bodenzone, im Bereich des Kapillarsaums bzw. in der gesättigten Bodenzone vorkommen. Jede dieser Zonen hat spezifische Eigenschaften, welche insbesondere bei *In situ*-Verfahren oder Natural-Attenuation-Konzepten (s. Kap. 3.3.1.6) eine entscheidende Rolle für die Art der Behandlung spielen. Gaswechsel, Diffusion und Wassergehalte können in den jeweiligen Zonen sehr unterschiedlich sein. Heterogenitäten durch verdichtete und lockerere Bereiche in Böden führen generell zu Kanalbildungen und damit zu geringerer Effektivität bei *In situ*-Behandlungsmethoden.

Korngröße

Die Korngrößenverteilung der Partikel in einem Boden ist maßgeblich für die Bezeichnung der Bodenart und zugleich ein wesentlicher Faktor für die Auswahl eines Sanierungsverfahrens. Im allgemeinen sind grobe, unverdichtete Materialien wie Sand und Kies leicht zu behandeln.

Z.B. erübrigen sich Bodenwaschverfahren, wenn das Material im wesentlichen aus feinkörnigen Lehm- und Tonpartikeln besteht, weil diese nicht vom Prozeßwasser zu trennen sind.

Ebenso sind die Gasdurchlässigkeit und die Wasserwegsamkeit eines Bodens oder Aquifermaterials wesentlich vom Feinkornanteil ($< 63 \mu\text{m}$) abhängig. Darüber hinaus hat die Korngrößenverteilung einen wesentlichen Einfluß auf den Wassergehalt und die Wasserhaltekapazität (s. Kap. 2.3.2.3) eines Bodens und damit automatisch auch auf die mikrobielle Aktivität (s. Kap. 2.3.4.2). Generell wird in Böden bzw. Lockergesteinen zwischen der **Sandfraktion** ($> 0,063 \text{ mm}$), **Grob-** ($0,063 - 0,02 \text{ mm}$), **Mittel-** und **Feinschlufffraktion** ($0,02 - 0,002 \text{ mm}$) und der **Tonfraktion** ($< 0,002 \text{ mm}$) unterschieden [39].

Partikeldichte

Die Partikeldichte wird durch das spezifische Gewicht eines Bodenpartikels beschrieben. Unterschiede in der Partikeldichte sind für viele Trennprozesse (Flockulation und Sedimentation) insbesondere bei der Bodenwäsche eine wesentliche Grundvoraussetzung. Bei Vorhandensein von Kohlepartikeln (s. Kap. 2.3.1.4) oder anderen organischen Festsubstanzen lassen sich diese Unterschiede zur Abtrennung hoch belasteter Partikel benutzen. Das spezifische Gewicht eines Bodens entscheidet zudem auch über eine spätere Nutzbarkeit des sanierten Bodens.

Mineralische Böden, denen während der Sanierung hohe Anteile an organischen Zuschlagstoffen beigemischt wurden, lassen sich nicht mehr als Baugrund nutzen.

Porenanteil und Permeabilität

Boden ist ein poröses Medium bestehend aus einer mineralischen Feststoffmatrix und dem dazwischen liegenden Porenraum. Der Porenanteil ist daher ein Maß für die Lagerungsdichte eines Bodenmaterials, welche die Wasserhaltekapazität, den Wassergehalt, und damit auch die Gaswegsamkeit bestimmt. Das Verhältnis des **Porenvolumens** (V_p) zum **Gesamtvolumen** des Bodenkörpers (V_g) wird als **Porenanteil** (n) betrachtet [22]. Ein Teil des Bodenwassers ist adhäsiv als Haftwasser an den Bodenpartikeln gebunden. Mit kleiner werdenden Partikeln nimmt deren Oberfläche pro Volumeneinheit und damit auch der Haftwasseranteil (V_h) zu. Dies führt zur einer Erhöhung der Wasserhaltekapazität eines Bodens und damit fast zwangsläufig zu einer Verringerung des Gasaustausches.

Der Anteil des Porenvolumens, der für Wasserbewegungen (Grundwasser) oder den Gasaustausch verbleibt, wird daher als **effektives** oder **nutzbares Porenvolumen** (V_{p*}) bezeichnet und ergibt sich aus der Differenz von V_p minus V_h . Das gesamte Porenvolumen ist daher in Böden mit hohem Feinstkornanteil am größten, während das effektive Porenvolumen am geringsten ist. Dies hat wesentliche Auswirkungen auf die Bioverfügbarkeit von Wasser, die Wasserhaltekapazität (s. Kap. 2.3.2.3) und die Permeabilität.

Die **Permeabilität** ist ein Begriff aus der Hydrogeologie und bezeichnet das hydraulische Vermögen von Lockergesteinen (Böden) Wasser bzw. Grundwasser zu leiten. Diese Eigenschaft wird im wesentlichen vom Porenraum insgesamt und der Porengröße bestimmt. Die Eigenschaft eines Materials, für Wasser unter bestimmten Druckverhältnissen durchfließbar zu sein, bezeichnet man als hydraulische Leitfähigkeit oder Durchlässigkeit [22]. Der sogenannte Durchlässigkeitsbeiwert oder **Durchlässigkeitskoeffizient** k_f [m/s] charakterisiert den Widerstand, den ein durchflossenes Gestein dem Fluid entgegen bringt. Der Durchlässigkeitskoeffizient ist insbesondere bei *In situ*-Sanierungen und der Anwendung von Natural-Attenuation-Konzepten von wesentlicher Bedeutung. Bei k_f -Werten von $< 10^{-4}$ werden hydraulische Maßnahmen als nicht mehr sinnvoll erachtet.

Aggregation

Generell ist jedoch zu beachten, daß sich bei der Bodenvorbehandlung bzw. bei dynamischen Bodenbehandlungsverfahren (s. Kap. 3.2) in Abhängigkeit von der Bodenart und Bindigkeit Probleme durch die Bildung von Pellets und Agglomeraten ergeben können. Diese Pelletbildung oder Aufbauagglomeration erfolgt durch Abrollvorgänge [43], welche sich aufgrund rotierender Bewegungsvorgänge von feuchtem Bodenmaterial ergeben.

Dabei treffen Bodenpartikel aufeinander und haften zunächst durch Flüssigkeitsbrücken aneinander. Mit fortschreitender Umwälzung und zunehmender Pelletgröße kommt es zur Verdichtung, welche im wesentlichen durch Kapillarkräfte verursacht wird. Kollidierende Pellets können aneinander haften und zu größeren Agglomeraten anwachsen. Ebenso kann sich beim Abrollen von Pellets feuchtes Feinmaterial anlagern, was ebenfalls zu einem fortwährenden Aufbau von größeren Pellets führt. Solche Aggregate sind in der Regel so verdichtet, daß der Stofftransport insbesondere der Gastransport zur Versorgung der Mikroorganismen extrem limitiert ist und von Anaerobiose im Innern von Partikeln > 3 mm ausgegangen werden kann [5].

Bodenaggregate können in Laborreaktoren bis zu einer Größe von 10 - 15 cm anwachsen, die sich ohne einen gezielten Gefügebau nicht mehr zerkleinern lassen. In derart verdichtetem Bodenmaterial kommt es generell zu einer Reduzierung der mikrobiellen Aktivität,

welche zu Fehlinterpretationen führen kann. (Von der Verwendung von "Betonmischern" als halbtechnische Testreaktoren ist daher aus den dargestellten Gründen abzuraten. Teigrührmaschinen des Bäckerhandwerkes sind deutlich vorzuziehen, da diese "Reaktoren" speziell für bindige, feuchte Feststoffmaterialien ausgelegt sind.)

Die Bildung der Pellets wird im wesentlichen vom Boden (insbesondere dem Kornanteil $d < 200 \mu\text{m}$), vom Wassergehalt und den Bewegungsabläufen im Reaktor beeinflusst [13]. Bei gegebenem Bodenmaterial kommt dem Wassergehalt eine besondere Bedeutung zu, da erst oberhalb eines bestimmten Wassergehaltes die Pelletbildung in Abhängigkeit von der dynamischen Behandlungsdauer zunimmt. Für die mikrobielle Aktivität ist jedoch ein minimaler Wassergehalt notwendig, so daß der Optimierung hier enge Grenzen gesetzt sein können. Die Zugabe von organischem Material wie Kompost verringert im allgemeinen die Neigung zur Pelletbildung in bindigen Böden. Für die Behandlung von besonders bindigen Böden wird die Verwendung von speziellen Reaktoren vorgeschlagen, bei denen die Durchmischung mit einer Zerstörung der Aggregate beispielsweise durch Mahlkugeln gekoppelt ist [41].

2.3.1.2 Schadstoffmatrices, Begleitkontaminationen

Kontaminierte Böden sind in der Regel komplexe, mehrphasige Systeme, in denen **Bodenluft** (Gasphase), **Porenwasser** (wäßrige Phase), **organische** und **mineralische Feststoffe** (feste Phase) und möglicherweise **Ölphasen** (organische Phase) nebeneinander in unterschiedlichen Konzentrationen vorkommen. Diese vier Phasen können auf vielfältige Weise miteinander in Wechselwirkung treten. Dabei hat die Art, in der die Stoffe mit dem Boden in Kontakt kommen, entscheidenden Einfluß auf deren Bioverfügbarkeit.

Da Schadstoffe in der Regel als Gemische aus mehreren Komponenten in einer Kontamination vorkommen, kann davon ausgegangen werden, daß einige der Komponenten deutlich schwerer mikrobiell abbaubar sind als andere und damit eine höhere Persistenz aufweisen.

Derartige Effekte treten insbesondere bei Diesel- und Vergaserkraftstoffen sowie Mineral- und Teerölen auf. Ebenso ist bei Produktionsrückständen von PCB, HCH, Chloraromaten (insgesamt) oder Sprengstoffen wie TNT oder Hexyl/Hexogen davon auszugehen, daß die Kontamination nicht nur mit den Substanzen erfolgt ist, die analytisch gemessen werden (Leitsubstanzen) sondern mit nahezu der gesamten Palette der möglichen **Begleitsubstanzen** und **Nebenprodukte** der Synthesewege. So machen die 16 EPA-PAK (s. Kap. 2.1.2) in Teerölprodukten wie z. B. Anthracenöl (Holzschutz-Imprägnierungsmittel) weniger als 30 % der Inhaltsstoffe aus, während der Rest aus substituierten Aromaten, wie chinoiden Verbindungen, Akyl- und Acylaromaten, N-, S- und O-Heteroaromaten und phenolischen Verbindungen besteht [11; 29; 30]. In derartigen Teerölen wurden bisher über 400 Einzelsubstanzen nachgewiesen. Auch die Tatsache, daß die 16 EPA-PAK als Reinsubstanz alle kristallin sind, während Teeröle in der Regel schwarze Flüssigkeiten oder pastöse Massen (NAPL, Non-Aqueous Phase Liquid) sind, ist von entscheidender Bedeutung für das Verständnis von deren Eigenschaften.

Der Anteil von chinoiden und phenolischen Aromaten sowie von Heteroaromaten in Teerölen, die aus der **Braunkohleverschwelung** (Braunkohlechemie der ehemaligen DDR) stammen, ist wesentlich höher, als das in Teerölen aus der **Steinkohlechemie** Westdeutschlands der Fall ist. Dies führt zu unterschiedlichem Verhalten der Ölmatrices, da die aus Braunkohle

entstandenen Teeröle in sehr viel stärkerem Maße zu einer Verfestigung und zu Verharzungsreaktionen im Boden neigen.

Damit haben insbesondere bei Teerölen die Matrizes der Begleitstoffe einen wesentlichen Einfluß auf das Umweltverhalten.

2.3.1.3 Bioverfügbarkeit von Schadstoffen in verschiedenen Matrizes

Die **Matrizes** von Schadstoffen in organischen Phasen haben entscheidenden Einfluß auf die Verteilung in den Bodenporen. An ihren Grenzflächen zur Wasserphase unterliegen sie Veränderungen oder Alterungsprozessen, die den Stofftransport wesentlich reduzieren können [11]. Die Grenzflächen determinieren die Bioverfügbarkeit der Einzelkomponenten und damit auch einen möglichen biologischen Abbau.

Der Vergleich der Verteilungskoeffizienten der PAK zwischen organischen Phasen, Huminstoffen und der Wasserphase zeigt, daß die PAK-Konzentration in der Ölphase eines Öl-Wassersystems im Vergleich zur organischen Bodenmatrix etwa 3-mal größer ist. Bei gleichzeitiger Verteilung zwischen organischer Bodenmatrix und Ölphasen befindet sich die Hauptmenge der PAK daher in der Ölphase.

Der Stofftransport aus der Öl- in die Wasserphase wird damit zum maßgeblichen Schritt für einen möglichen mikrobiellen Abbau. Den Phasengrenzflächen kommt dabei eine besondere Bedeutung zu. Die Verteilung von PAK aus Ölphasen in die Wasserphase läßt sich näherungsweise mit dem RAOULT'schen Gesetz beschreiben [23; 24].

Daher stellen sich die Verteilungsgleichgewichte zwischen der Ölphase und dem Bodenwasser nicht nach dem Verteilungsverhalten der Einzelkomponenten ein, sondern nach dem Anteil der betreffenden Substanz an der gesamten Teerölmenge. Die Teerölmatrix hat einen entscheidenden Einfluß auf die Diffusion im Boden.

Die Sorption von Schadstoffen an organische Bodenmatrices wie z. B. Huminstoffe allein kann die Bildung von nicht mehr abbaubaren/bioverfügbaren Restkonzentrationen nicht erklären. Ein Abbau von Schadstoffen in der Wasserphase verschiebt normalerweise das Verteilungsverhältnis. Sinkende Konzentrationen in der Wasserphase ziehen zur Wiederherstellung des Verteilungsgleichgewichtes weitere Desorption nach sich. Damit werden die Verbindungen immer wieder nachgeliefert.

Durch den mikrobiellen Abbau werden in derartigen Schadstoffgemischen in Böden mit zunehmendem Alter der Kontamination schwerer abbaubare Substanzen angereichert.

Neben Effekten der Bioverfügbarkeit führt dies in der Regel zu persistierenden **Restkonzentrationen**. Im Extremfall kann eine Restkontamination nach vollständiger Biodegradation der metabolisierbaren Schadstoffe aus biologisch nahezu inerten Verbindungen bestehen [35] (s. auch Kap. 2.1.1.3 und 2.1.2). Die dargestellten Effekte gelten generell, wenn es sich um Mischkontaminationen von lipophilen Schadstoffen in flüssiger Phase handelt.

Wie aus Untersuchungen mit Mineralölen in wäßrigen Systemen bekannt ist, bilden sich an Grenzflächen zwischen Teeröl- und Wasserphase nach wenigen Tagen bereits ohne mikrobielle Aktivität verfestigte Schichten aus [27]. Diese Trennschichten führen zu **inhomogenen Phasen** und zu wesentlich verringerter Diffusion. Hochviskose Schichten verringern

die Verteilungskonzentrationen der PAK in der Wasserphase [31]. Durch ^{13}C -NMR Untersuchungen des Grenzschichtmaterials konnte gezeigt werden, daß diese Schichten durch Wechselwirkungen mit dem Wasser gebildet werden, die zu semigelatinösen Filmen ohne Änderung der Molekularstruktur des Teeröls führen [31]. Zusätzlich verändert der Verlust von niedermolekularen, bedingt wasserlöslichen Verbindungen in die Wasserphase die mechanischen Eigenschaften eines Teeröls und führt zur Anreicherung von weniger wasserlöslichen und festen Substanzen. Dieser Prozeß wird in der Mineralölchemie als "water washing" bezeichnet und führt zur Anreicherung schwerer residualer Ölfractionen [44].

Sind an diesen Prozessen mikrobielle Abbauvorgänge beteiligt, so werden bevorzugt niedrigsiedende, niedermolekulare Bestandteile des Teeröls abgebaut, so daß mit zunehmender Biodegradation der Anteil der schwerabbaubaren, asphalten-artigen Substanzen zunimmt. Damit steigt die Viskosität der **residualen Teerölphase** zusätzlich an und der Stofftransport über die Grenzfläche bzw. die Bioverfügbarkeit sinkt noch weiter ab. Vor diesem Hintergrund wird klar, daß die Alterung von Teerölen nicht ein Prozeß in der homogenen Phase ist, sondern ein Vorgang, der an den Grenzflächen abläuft und zu inhomogenen Phasen führt [27]. Diese Überlegungen sind in folgendem Modell für ein Bodenpartikel schematisch dargestellt (Abb. 2.19). Sie gelten analog auch für Grenzschichten eines Öltropfens, der sich langsam zu einem "Teerklumpen" verfestigt. Dabei stellt ein durchgehend verfestigter Teerklumpen eine unendlich dicke Grenzschicht dar.

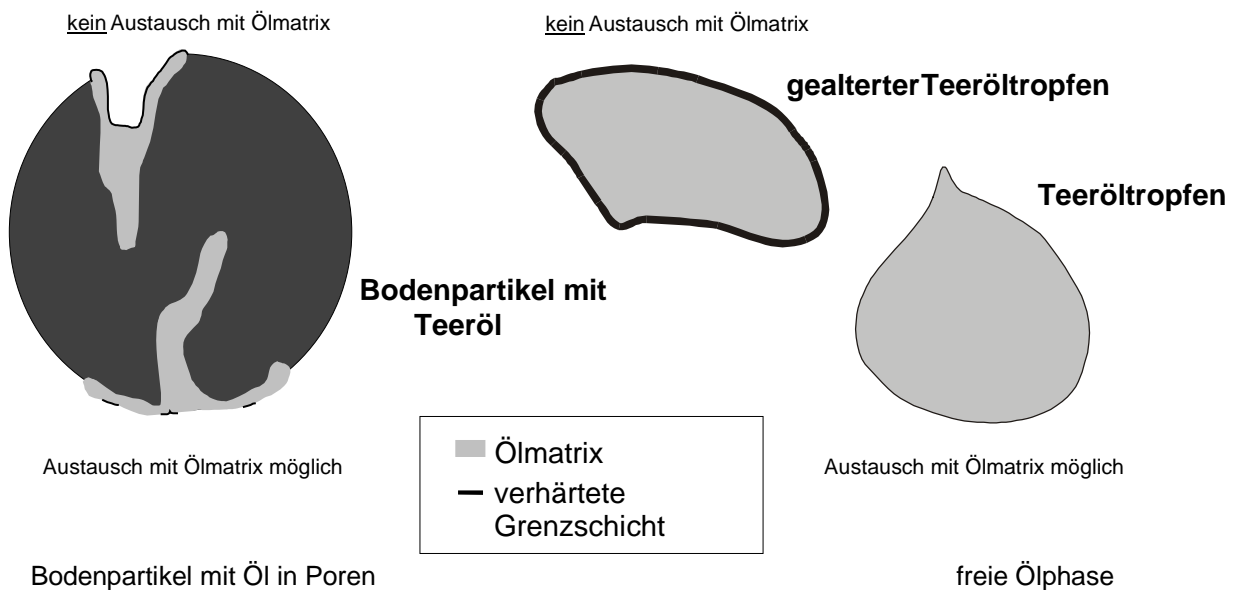


Abb. 2.19: Grenzflächen von Teerölen mit erhöhter Viskosität und reduziertem Stofftransport in die umgebende Wasserphase als Modell für nicht desorbierbare bzw. nicht bioverfügbare Restkonzentrationen.

Aus den dargestellten Prozessen lassen sich verschiedene Strategien zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit insbesondere bei Laboruntersuchungen ableiten. Der Diffusionsfluß (Stofftransport) aus Teerölen in die wässrige Phase kann generell durch Erhöhung der Temperatur, durch Gefügebauaufbruch zur Vergrößerung der Querschnittsfläche, durch Verringerung der Viskosität der Ölphase und durch Verbesserung der Verfügbarkeit erhöht werden (s. Tab. 2.42).

Abgesehen vom Einsatz der Tenside, sind die verschiedenen Möglichkeiten zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit bisher nur sehr wenig bearbeitet worden. In Bodenreaktoren, denen Mahlkugeln zum Gefügeaufbruch (Desagglomeration) zugesetzt wurden, konnte ein verbesserter Abbau von Kohlenwasserstoffen und eine erhöhte mikrobielle Aktivität nachgewiesen werden [41]. In Arbeiten zum Abbau von Teeröl im Boden durch ligninolytische Enzyme von Weißfäulepilzen konnte die Verfügbarkeit der PAK für die extrazellulären Enzyme durch den Zusatz von Aceton und Ethanol als Lösungsmittel deutlich verbessert werden [9; 10]. Durch den Zusatz von Pflanzenöl wurde ebenfalls eine deutliche Mobilisierung der Schadstoffe erreicht [37].

Tab. 2.42: Möglichkeiten zur Erhöhung des Diffusionsflusses aus Teerölen in die wässrige Phase

Ziel	Maßnahme
Gefügeaufbruch	mechanische Bearbeitung Frieren und Auftauen Stoßbehandlung mit Mikrowellen
Senkung der Viskosität	Temperaturerhöhung/Aufschmelzen des Teeröls lipophile Lösungsmittel mit geringer Viskosität biologisch abbaubare Öle mit geringer Viskosität Tenside (und Solubilisierung in der Wasserphase)
Erhöhung der Verfügbarkeit	Zusatz von sorbierenden C-Substraten (u. Temperaturerhöhung) Zusatz von Tensiden zur Änderung der Sorptions-eigenschaften der Bodenmatrix

2.3.1.4 Anthropogene Begleitstoffe

In vielen Untersuchungen zum Schadstoffabbau wird vorausgesetzt, daß sich künstlich zugesetzte Schadstoffe wie die Altlast-Schadstoffe verhalten. Insbesondere bei PAK-Schadensfällen ist diese Grundvoraussetzung jedoch oftmals nicht gegeben. Im Rahmen der wissenschaftlichen Begleituntersuchung zur Sanierung eines Schadensfalles in Hamburg wurde das Verhalten künstlich zugesetzter ^{14}C -markierter Schadstoffe und der Altlastkontamination in einem Experiment zur Simulation von Bodenmieten untersucht [32; 38]. Dabei zeigte sich, daß die künstlich zugesetzten ^{14}C -PAK weitgehend abgebaut wurden, während die 16 EPA-PAK der Altlast um einen Mittelwert von 90 mg/kg schwankten und sich in der Konzentration nicht änderten. Die Bioverfügbarkeit der Altlast-PAK war offensichtlich um Größenordnungen niedriger, als die der zugesetzten ^{14}C -PAK. Darüber hinaus bestand auch kein Austausch zwischen den Schadstoffpools.

Dieses Bodenmaterial besitzt eine "hot spot"-artige, heterogene Verteilung der Kontamination, wie das aus den Minima und Maxima der 16 EPA PAK hervorgeht (s. Abb. 2.20) und war im wesentlichen mit Steinkohleerpech und Kohlepartikeln belastet. Die mangelnde Desorbierbarkeit bzw. Bioverfügbarkeit von PAK in vielen Altlastböden kann auf das Vorhandensein von **Kohle-** und **Kokspartikeln** zurückgeführt werden [46]. Insbesondere deshalb, weil an vielen ehemaligen Gaswerksstandorten feinkörniges Kohle und Schlackematerial zur **Verfestigung** flüssiger Destillationsrückstände benutzt wurde, um eine Deponierung auf dem Gelände zu ermöglichen [48]. Vergleichbar inhomogene Verteilungen wurden auch an Produktionsstandorten von TNT gefunden.

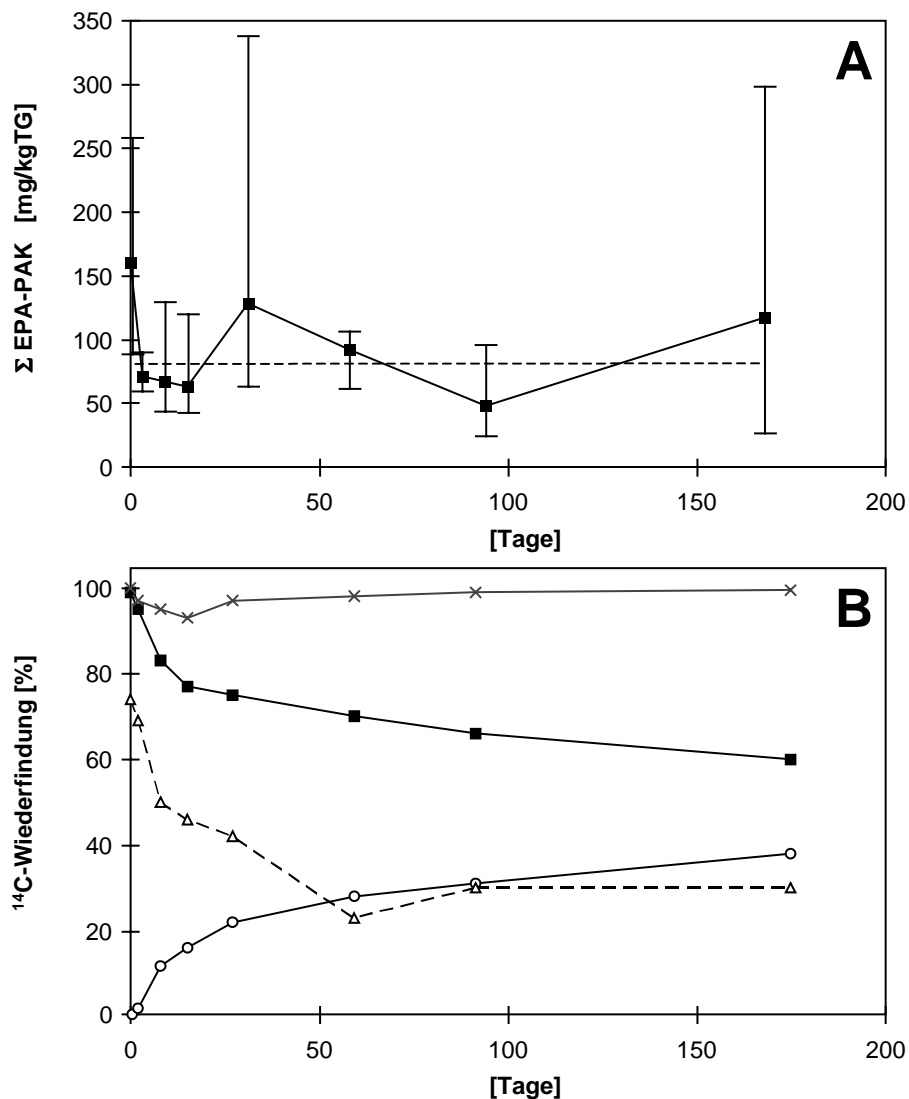


Abb. 2.20: Abbau von PAK in Bodenmaterial eines PAK-Schadensfalles. A: Verlauf des Abbaus der Altlast-PAK (16 EPA PAK; (■) Mittelwerte mit (⊥) Minimal- und (T) Maximalwerten der Einzelproben, (---) Gesamtmittelwert) und B: Verlauf des Abbaus von vier künstlich zugesetzten PAK (¹⁴C-Naphthalin, ¹⁴C-Anthracen, ¹⁴C-Pyren, ¹⁴C-Benz[a]pyren, (■) Boden gesamt, (o) ¹⁴CO₂, (Δ) Extraktion u. alkalische Hydrolyse, (x) Summe), aus [32; 38], mod.

Diese Befunde zeigen, daß Versuchsergebnisse mit künstlich zugesetzten, ^{14}C -markierten Substanzen für Bilanzierungsexperimente in Böden als Simulation des Verhaltens von Altlast-Schadstoffen nur bedingt auf das Verhalten von realen Kontaminationen zu übertragen sind. Vor diesem Hintergrund sollte insbesondere bei PAK-Schadensfällen das Vorhandensein von Kohle- und Kokspartikeln mit einer speziellen Untersuchung überprüft werden, da in den meisten Böden derartige Partikel nicht ohne weiteres zu erkennen sind.

Methode zur Charakterisierung von Kohle- und Kokspartikeln

[KÄSTNER, unveröffentlicht]

0,5 g des zu untersuchenden Bodenmaterials wird mit 5 ml konzentrierter H_2SO_4 in einem Gefäß vorsichtig (Schutzbrille und Abzug!) auf 80°C erhitzt. Dieser Lösung werden 100 mg $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ zugegeben und tropfenweise eine H_2O_2 -Lösung (30 %) zugesetzt bis die Braunfärbung des Bodenmaterials verschwunden ist. Danach wird die Lösung neutralisiert und die Flüssigkeit dekantiert. Das verbliebene partikuläre Material wird anschließend getrocknet und bei 10- bis 20-facher Vergrößerung unter einem Stereomikroskop analysiert (s. Abb. 2.21a-c).

Verbleiben nach dieser Behandlung schwarze Partikel in der Feststofffraktion, welche Strukturen wie in Abb. 2.21b oder c aufweisen, dann kann von einem Einfluß der Kohle- und Kokspartikel auf die Bioverfügbarkeit ausgegangen werden. Lassen sich diese Partikel in Abhängigkeit von der Größe auch im Ausgangsboden identifizieren, so besteht die Möglichkeit diese zu separieren und deren Schadstoffgehalt zu analysieren. Die Trennung verschiedener Partikelgrößen mit differentieller Analytik der PAK ist in der Literatur beschrieben [2]. Sofern die Kontamination weitgehend auf diese Partikel beschränkt ist, kann der Boden mit einfachen Bodenklassier- oder Waschverfahren möglicherweise weitaus effektiver behandelt werden als mit biologischen Methoden.

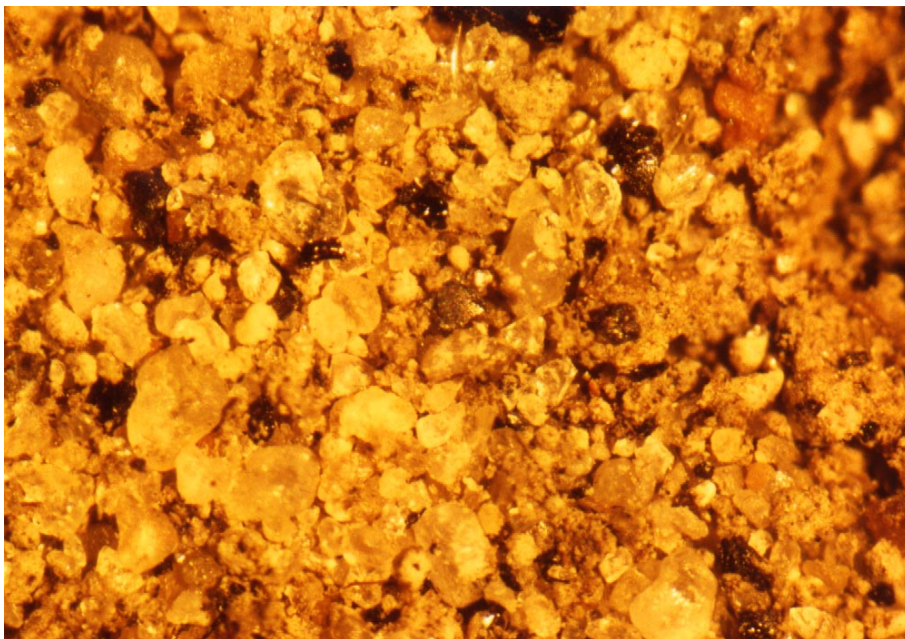


Abb. 2.21a: Partikelverteilung eines PAK-haltigen Bodens nach vollständiger Oxidation der Bodenhuminstoffe (— = 1 cm). Details: siehe Text

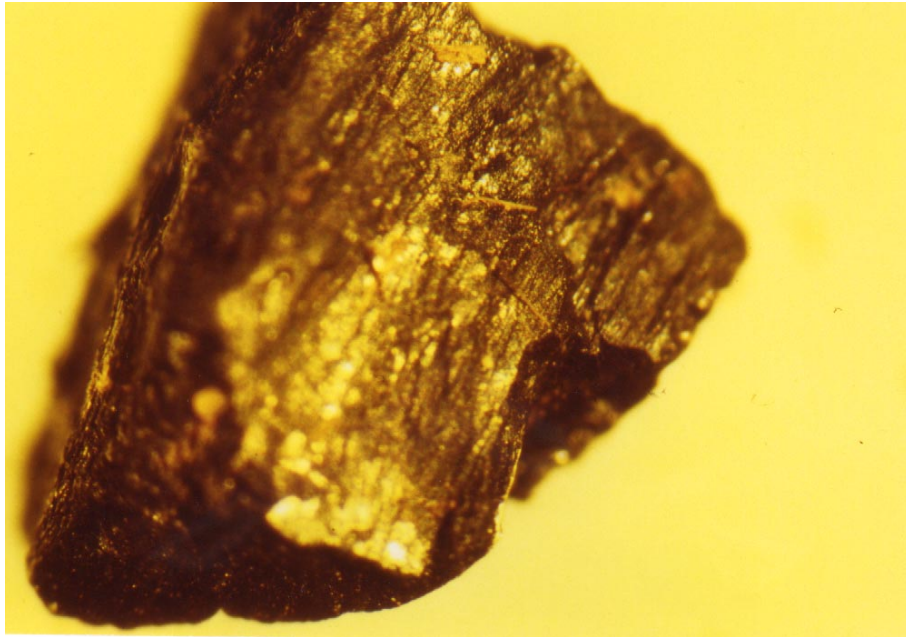


Abb. 2.21b: Kohlepartikel (———— = 0,1 cm)

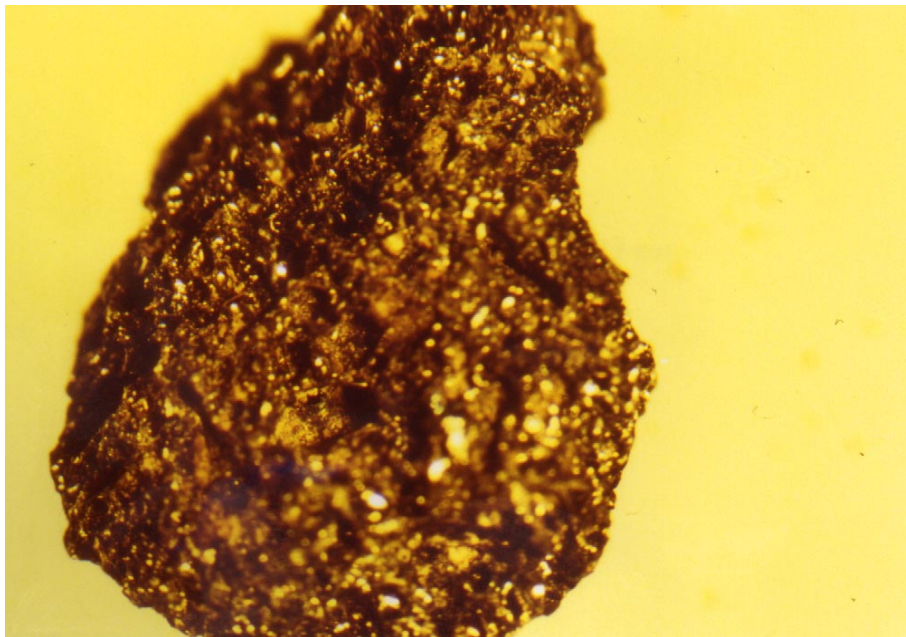


Abb. 2.21c: Schlackepartikel (———— = 0,1 cm)

2.3.2 Physiko-chemische Parameter

Mikroorganismen benötigen bestimmte physiko-chemische Bedingungen (Temperatur, Wasser- und Sauerstoffgehalte, pH-Wert usw.), um ihre Stoffwechselaktivität (Wachstum und Vermehrung, Schadstoffabbau) zu entfalten. Die jeweilige Aktivität erfolgt nur dann mit den maximalen Raten, wenn sich die Bedingungen hierzu in einem **optimalen Bereich** befinden.

Liegen die jeweiligen Standortbedingungen wesentlich über oder unter den optimalen Werten, so ist dadurch die Stoffwechselaktivität und damit auch der Schadstoffabbau wesentlich verlangsamt oder erfolgt gar nicht mehr. Im Folgenden werden einzelne Parameter mit ihren optimalen Bereichen im Einzelnen dargestellt. Für Details der Bestimmung der physiko-chemischen und weiterer Parameter sei auf die weiterführende Literatur verwiesen [6; 8; 39].

2.3.2.1 Temperatur

Die Temperatur ist die physikalische Größe, welche biologische Prozesse in vielfältiger Weise beeinflusst, da praktisch alle **physiko-chemischen Zustandsgrößen** von der Temperatur abhängig sind. Steigende Temperaturen steigern die Reaktionsraten, die Diffusion, die Löslichkeit und Flüchtigkeit von Substanzen und verringern die Viskosität von Flüssigkeiten. Erniedrigt wird dagegen die Löslichkeit von Gasen in Wasser, was insbesondere beim Sauerstoff für die mikrobielle Aktivität wesentlich ist. Bei den physiko-chemischen Wirkungen der Temperatur ergeben sich in der Regel lineare Abhängigkeiten.

Darüber hinaus ist die Temperatur einer der entscheidenden Faktoren für die **mikrobielle Aktivität**, sofern sie sich im optimalen Bereich der betreffenden Mikroorganismen bzw. des Prozesses befindet. In der Regel nehmen die Aktivitäten bzw. die Umsatzraten bei mikrobiell katalysierten Reaktionen oberhalb des Temperaturoptimums relativ schnell ab, während unterhalb des Optimums mit einem langsameren Anstieg zu rechnen ist. Für fast jeden biochemischen Prozeß des Stoffabbaus und -umsatzes existieren Mikroorganismen mit unterschiedlichen Temperaturoptima. Ob diese Organismen jedoch für Sanierungszwecke nutzbar sind, muß im Einzelfall untersucht werden. Generell gilt jedoch, daß abgesehen von thermophilen Prozessen die höchsten mikrobiellen Umsatzraten bei 25 – 35° C erreicht werden.

Biologische und nicht biologische Reaktionen unterscheiden sich durch ihre verschiedenen Temperaturabhängigkeiten: Bei nicht biologisch katalysierten Reaktionen ist die Beziehung zur Temperatur linear, während sie bei biologischen Prozessen das beschriebene Optimum hat. In Laboruntersuchungen lassen sich Eliminationspfade von Kontaminanten, abiotische Prozesse oder biologischer Abbau durch den Vergleich der Abnahmen von Kontaminanten bei verschiedenen Temperaturen in sterilen und lebenden Proben unterscheiden. Wichtig ist, daß der Prüfbereich über den Bereich der maximalen Temperatur für (Eu-)Bakterien hinausgeht. Abhängig von der Herkunft der Proben (Boden und Grundwasser oder Kompostierungsanlage) ist man mit 50° C bzw. 80° C auf der sicheren Seite.

2.3.2.2 pH-Wert

Der pH-Wert ist als negativer dekadischer Logarithmus der H^+ bzw. H_3O^+ -Ionenaktivität in mol/l definiert und stellt ein Maß für den sauren bzw. basischen Charakter einer wässrigen Lösung dar [22]. Lösungen mit pH-Werten < 7 werden als sauer und > 7 als basisch bezeichnet. Der pH-Wert in Böden ist eine komplexe Funktion der Aktivitäten der verschiedensten Ionen. Böden besitzen in der Regel eine Pufferkapazität, d. h. sie können Schwankungen in der H^+ bzw. H_3O^+ -Ionenaktivität in gewissen Grenzen ausgleichen. In schwach gepufferten Böden oder Grundwässern kann der pH-Wert bereits durch mikrobiell gebildetes CO_2 und dessen Löslichkeit im Porenwasser abgesenkt werden, was zu einer Veränderung der mikrobiellen Aktivität führen kann. Optimale pH-Werte liegen für die meisten Schadstoffe abbauenden Bakterien im Bereich zwischen 6,5 und 7,5.

Bestimmung des pH-Wertes

Der pH-Wert des Bodens wird nach der CaCl_2 -Methode gemessen [18]. Dazu wird 1 Teil Boden mit 2,5 Teilen CaCl_2 -Lösung (0,01 M; 1,47 g/l Aqua dest.) gemischt. Diese Suspension wird für mindestens 2 h (max. 12 h) bei Raumtemperatur geschüttelt und nach kurzem Absetzen der Bodenpartikel der pH-Wert des Überstandes gemessen.

2.3.2.3 Wasserhaltekapazität, Wasserspannung, Wassergehalt

Abhängig vom Porenraum eines Bodens und seinem Feinkornanteil (s. Kap. 2.3.1.1) ist der Wassergehalt (= Anteil Wasser am Gesamtgewicht des Bodens; 100 % = X g Wasser + Y g Boden) entscheidend für die Gaswegsamkeit und die mikrobielle Aktivität eines Bodens verantwortlich. Durch die **Partikelverteilung** und die Porengröße wird die Eigenschaft der **Wasserhaltekapazität** (WHK_{max}) eines Bodens beeinflusst. Diese Größe gibt an, wieviel Wasser ein Boden gegen die Schwerkraft festhalten kann, ohne daß Sickerwasser aus dem Bodenkörper austritt. Diese Größe wird angegeben als Anteil Haftwasser (in Prozent) bezogen auf 100 g Trockengewicht des Bodens (x + 100 g!), was oftmals zu Verwechslungen mit dem Wassergehalt führt. Eine Wasserhaltekapazität von 30 % bedeutet daher, daß 100 g eines Bodens 30 g Wasser insgesamt zu halten vermag [36; 42].

Boden übt infolge der Adsorptions- und Kapillarkräfte eine bestimmte **Saugspannung** auf das Bodenwasser aus, das folglich unter entsprechender Wasserspannung steht. Diese kann als Druck angegeben werden. Die Wasserspannung ist bei niedrigen Wassergehalten in dünnen Filmen und feinsten Poren am höchsten (bis zu 10.000 bar (1 bar = 10^5 Pa)) und am niedrigsten bei Wassergehalten oberhalb der sogenannten **Feldkapazität** (FK) (< 0,3 bar, in etwa der Wasserhaltekapazität gleichzusetzen), bei der Sickerwasser auftritt. Unterhalb einer Wasserspannung von etwa 20 bar wird Wasser überhaupt erst für Organismen verfügbar. Diese Grenze gibt den sogenannten **Welkepunkt** (WP) für Pflanzen an (s. Abb. 2.22).

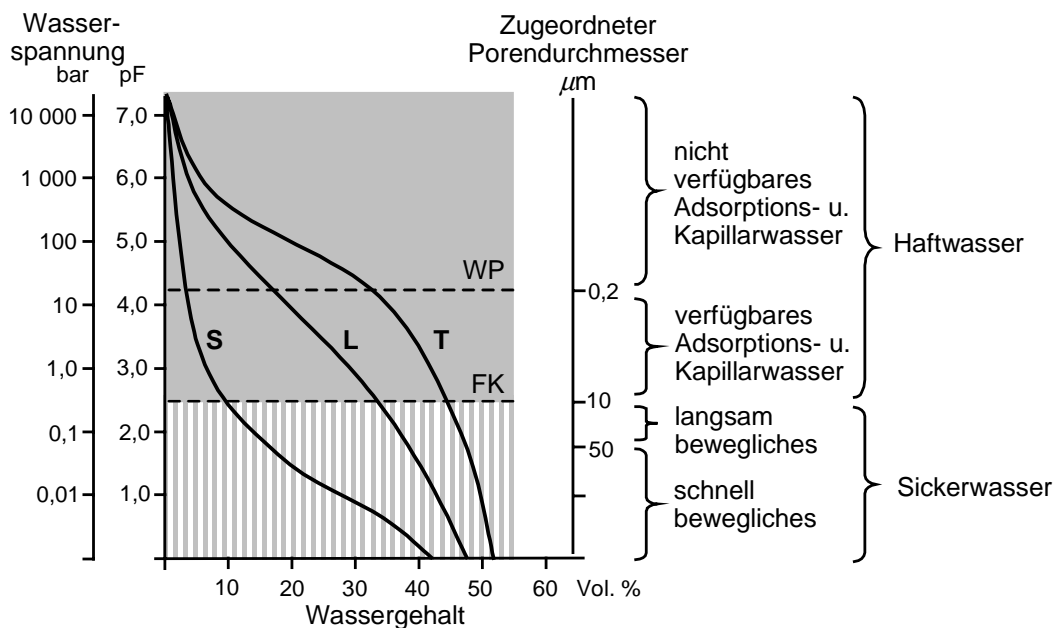


Abb. 2.22: Wasserspannungskurven eines Sandbodens (S), eines Lehmbodens (L) und eines Tonbodens (T), nach [42]

Bei verschiedenen Böden (Sand-, Lehm- und Tonböden) kann daher der Bereich des Haftwassers zwischen dem WP und der FK sehr unterschiedliche Anteile des Wassergehaltes abdecken. So wird die Feldkapazität eines Tonboden erst bei Wassergehalten erreicht, bei denen das Wasser in einem Sandboden bereits anfängt zu fließen.

Generell begünstigen hohe Wassergehalte unterhalb der **Sättigung** (Porenraum vollständig mit Wasser gefüllt) die mikrobielle Aktivität und damit biologische Verfahren zur Behandlung. Daraus ergibt sich ein Optimum für die mikrobielle Aktivität bei möglichst hohen Wassergehalten (Wasser ist "Lösungsmittel" für Mikroorganismen) verbunden mit einem möglichst hohen Gasanteil am Porenraum (= gute Versorgung mit Sauerstoff und Abtransport von CO₂). In vielen Experimenten wurde ein **Maximum** der **mikrobiellen Aktivität** bei Werten zwischen 50 und 60 % der WHK_{max} beobachtet (s. Abb. 2.23).

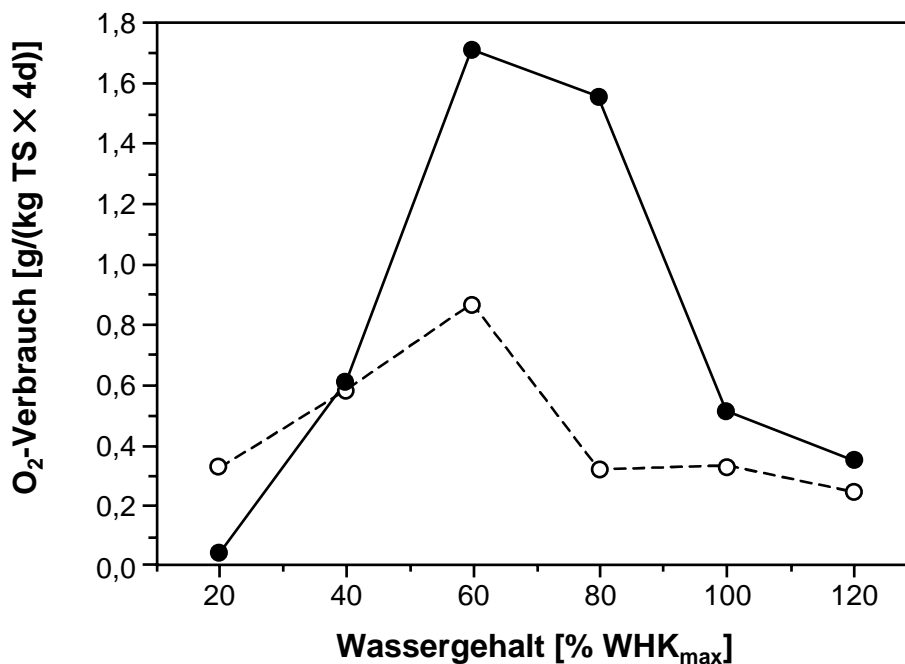


Abb. 2.23: Mikrobielle Aktivität (gemessen als Sauerstoffverbrauch) in Abhängigkeit des Wassergehaltes eines Boden-Kompost-Gemisches mit (●) und ohne (○) Dieselölkontamination, nach [25].

Bestimmung des Wassergehaltes

Zur Bestimmung des Wassergehaltes [18] werden in drei Parallelansätzen jeweils ca. 100 g des homogenen Bodens in Bechergläser (250 ml) oder Porzellanschalen eingewogen und über Nacht bei 105° C getrocknet (Gewichtskonstanz). Bei höheren Gehalten an Dieselölen (flüchtige Mineralölkomponenten) muß bei niedrigeren Temperaturen (z.B. 45° C über Phosphorpentoxid, ca. 48 h) getrocknet werden. Im Anschluß daran werden die Proben im Exsikkator über einem Trockenmittel abgekühlt und erneut gewogen.

Berechnung:

$$\% \text{ Trockensubstanz (TS)} = \frac{\text{Trockengewicht}}{\text{Feuchtgewicht}} \times 100 \quad [100 - \% \text{ TS} = \% \text{ Wassergehalt}]$$

Bestimmung der Wasserhaltekapazität WHK_{max}

Zur Bestimmung des WHK_{max} [18] werden Metall-, Glas- oder Kunststoffzylinder (ca. 8 cm) verwendet, die an einem Ende mit einem feinmaschigen Gewebe verschlossen sind. Die Gefäße werden gewogen und jeweils mit ca. 200 g gut durchmischem, naturfeuchtem Boden (Korngröße ≤ 6 mm) gefüllt, indem immer nur kleine Mengen zugegeben werden und jedesmal durch leichtes Aufklopfen für eine gleichmäßige Füllung gesorgt wird. Jede Bestimmung wird in drei Parallelen durchgeführt. Die Gefäße werden erneut gewogen und in eine mit destilliertem Wasser gefüllte Wanne gesetzt, wobei das Niveau des Wasserspiegels ungefähr dem der Bodenoberfläche entspricht. Ist der Boden bis zur Oberfläche befeuchtet, werden die Zylinder abgedeckt und in ein vorbereitetes Sandbad mit 10 cm Schütthöhe gestellt. Nach zwei Stunden werden die Gefäße in 30-Minuten-Abständen gewogen, bis zwei Wägungen nahezu übereinstimmen. Bei mineralischen Böden ist dies in der Regel nach drei Stunden der Fall.

Das Sandbad besteht aus einer Wanne, die am unteren Rand eine verschließbare Ausflußöffnung besitzt und die mit Feinsand (Körnung: 0,1 – 0,7 mm; 10 cm Schütthöhe) gefüllt ist. Das Sandbad wird bei geschlossener Ausflußöffnung mit Wasser vollständig gesättigt. Das überschüssige Wasser läßt man durch die Öffnung ablaufen. Ein feuchtes Tuch wird auf den Sand gelegt. In Parallelproben wird der Wassergehalt des naturfeuchten Bodens bestimmt.

Berechnung:

$$100 \% WHK_{max} = \frac{(a + b)}{c} \times 100 = \text{H}_2\text{O-Aufnahme}/100 \text{ g Trockengewicht}$$

WHK_{max} = Wasserhaltekapazität

a = H_2O -Aufnahme pro 100 g naturfeuchtem Boden

b = H_2O -Gehalt in 100 g naturfeuchtem Boden

c = Trockengewicht von 100 g naturfeuchtem Boden

2.3.2.4 Sauerstoffgehalt

Bei Wassersättigung von Böden (Überschreiten der Wasserhaltekapazität) sinkt die Gaswegsamkeit rapide ab und ein Austausch findet ohne externe Durchmischung nur noch über **Diffusion** statt. Mit höheren Gehalten an organischem Kohlenstoff und entsprechender aerober mikrobieller Aktivität führt deren Sauerstoffzehrung sofort zu **anaeroben Verhältnissen** und sinkenden Redoxpotentialen. Generell geht man davon aus, daß auch in aeroben Böden im Innern von Partikeln mit einem Durchmesser von > 3 mm anaerobe Verhältnisse herrschen [12]. Sinkt der Sauerstoffgehalt der Bodenlösung unter 1 mg/l, so setzt eine Sukzession der anaeroben Prozesse ein (s. Kap. 2.3.2.5).

2.3.2.5 Redoxpotential

Das **Redoxpotential** (E_h angegeben als Spannung [V]) beschreibt das Oxidations-Reduktions-Potential eines Mediums in Bezug auf chemische Reaktionen. Es ergibt sich aus dem Verhältnis der Konzentrationen bzw. Aktivitäten aller oxidierten und reduzierten Stoffe in einem

Bodenmaterial. Das Redoxpotential ist ein Maß für die Tendenz von Verbindungen oder Elementen, Elektronen abzugeben. Diese Tendenz zur Elektronenabgabe wird relativ zu der des molekularen Wasserstoffs angegeben. Das Redoxpotential hängt generell von den Konzentrationen der an den Redoxreaktionen teilnehmenden Komponenten ab und wird durch die NERNST'sche Gleichung ausgedrückt, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll [22; 40]. Redoxpotentiale von Böden sind im wesentlichen abhängig von der Tiefe unter der Oberfläche und der Diffusionsrate von Sauerstoff in den Boden hinein. Letztere hängt von der Größe und Zahl der luftgefüllten Poren ab, welche wiederum abhängig von der Korngrößenverteilung und dem Wassergehalt des Bodens sind. Das Redoxpotential ist zudem auch vom pH-Wert der Bodenlösungen und über die mikrobielle Aktivität auch vom Gehalt an biochemisch umsetzbaren organischen Substanzen (CSB/BSB) abhängig.

Der Gehalt an Eisen- und Manganionen der verschiedenen Wertigkeiten in Böden und Grundwässern ist beispielsweise vom Redoxpotential abhängig [22]. In reduzierendem Milieu werden in der Regel lösliche reduzierte Ionen gebildet. Diese werden bei Anstieg des Redoxpotentials z. B. durch Belüftung eines anaeroben Grundwassers in die nicht lösliche, oxidierte Form überführt und damit ausgefällt, was zu drastischen Veränderungen in der Durchlässigkeit führen kann (Brunnenverockerung).

Bestimmte Stoffwechselleistungen von Mikroorganismen sind abhängig vom jeweiligen Redoxpotential der Umgebung (Boden, Gewässer), welches damit den mikrobiellen Stoffwechsel determiniert. Bei der Oxidation von organischen Verbindungen (Substraten) durch Mikroorganismen wird der Kohlenstoff oxidiert, die freiwerdende Energie zum Wachstum der Organismen genutzt. Der freiwerdende Wasserstoff und die Elektronen werden auf andere Moleküle (**Elektronenakzeptoren**) übertragen, deren Verfügbarkeit entscheidend durch das Redoxpotential beeinflusst wird. Diese Moleküle sind entweder anorganische, terminale Elektronenakzeptoren wie O_2 , NO_3^- (Denitrifikation), Fe^{3+} , Mn^{4+} , V^{5+} , SeO_4^{2-} , As^{5+} , SO_4^{2-} , oder CO_2 bei **Atmungsprozessen** oder Abbauprodukte der Substrate wie z. B. bei **Gärungen** [20]. Darüber hinaus können offensichtlich auch komplexe organische Verbindungen wie Huminstoffe in gewissem Umfang als Elektronenakzeptoren dienen [26]. Diese Vorgänge sind jedoch oft mit einem Wechsel der Oxidationsstufe des Eisens verbunden und erfolgen sequentiell nacheinander bis alle potentiellen Elektronenakzeptoren verbraucht bzw. reduziert sind (**Sukzession der Stoffwechselprozesse**; Details der Atmungsprozesse und Gärungen (s. Kap 2.1.3)).

Umgekehrt setzt mit dem Zutritt von Sauerstoff bzw. mit der Erhöhung des Redoxpotentials eine Sukzession der oxidativen mikrobiellen Prozesse ein. Dabei werden reduzierte organische Verbindungen und anorganische Elektronenakzeptoren wieder oxidiert und die wieder freiwerdenden Elektronen bzw. der Wasserstoff zur Synthese von Biomasse genutzt.

Diese geomikrobiologischen und geochemischen Prozesse laufen generell ab und müssen bei Eingriffen in den Redoxstatus von Böden und Sedimenten beachtet werden.

Beispielsweise muß bei einer *In situ*-Sanierung nicht nur der Sauerstoffbedarf für die mikrobielle Oxidation der betreffenden organischen Schadstoffe berechnet werden, sondern auch der für die Oxidation aller anderen vorhandenen reduzierten Verbindungen, die aus thermodynamischen Gründen mit bedient werden müssen.

Ein wesentlicher Faktor für den mikrobiellen Abbau von organischen Verbindungen und Kontaminanten ist die ausreichende Verfügbarkeit von Elektronenakzeptoren. Ausgehend von

der Tatsache, daß die meisten Umweltschadstoffe insbesondere Kohlenwasserstoffe nur einem sehr langsamen fermentativen Abbau zugänglich sind, gewinnen terminale Elektronenakzeptoren für Atmungsprozesse an besonderer Bedeutung. Aus deren Verfügbarkeit lassen sich Rückschlüsse auf den natürlichen Abbau im Untergrund (gesättigte und ungesättigte Bereiche) eines Standortes gewinnen. In der Regel werden Elektronenakzeptoren sukzessive in der Reihenfolge $O_2 > NO_3^-/NO_x > Fe^{3+}, Mn^{4+} > [Huminstoffe] > SO_4^{2-} > CO_2$ verbraucht. Aus den Gehalten an diesen Verbindungen lassen sich ebenfalls Rückschlüsse auf den natürlichen Abbau ziehen. Insbesondere bei der Betrachtung des natürlichen Rückhaltes und Abbaus von Schadstoffen (sog. Natural Attenuation Konzepte (s. Kap. 3.3.1.6)) ist die Ermittlung dieser Parameter wesentlich für die Abschätzung des Abbaupotentials im Untergrund.

2.3.2.6 Nährstoffgehalt (C:N:P-Verhältnis)

Mikrobielle Biomasse setzt sich im Mittel aus etwa 50 % Kohlenstoff, 20 % Sauerstoff, 14 % Stickstoff, 8 % Wasserstoff, 3 % Phosphor, je 1 % Schwefel und Kalium zusammen [40]. Diese Elemente müssen daher für ein optimales Wachstum von Mikroorganismen im Boden in entsprechender Menge vorhanden sein oder dem Boden von außen zugeführt werden. Zu den wichtigsten Nährstoffen im Boden gehören C, N, P, und K. Neben den Makroelementen C, O, H, N, und P sind weitere Spurenelemente wie S, K, Mg, Ca, Fe, Na, Cl, Zn, Mn, Md, Se, Co, Cu, Ni, u. a. für das Wachstum und die Aktivität von Mikroorganismen essentiell. In Böden sind diese Elemente jedoch in der Regel in ausreichenden Mengen vorhanden bzw. als Begleitstoffe in Kunstdüngern enthalten, so daß auf eine Bestimmung und eine Zudosierung verzichtet werden kann.

In der Praxis können beim mikrobiellen Abbau von organischen Schadstoffen N, P, und K limitierend sein, sofern es sich um vollständig metabolisierbare Schadstoffe handelt (s. Kap. 2.3.3). Daher muß der Nährstoffgehalt dieser Elemente geprüft und ggf. eingestellt werden. Ideale Nährstoffverhältnisse liegen normalerweise bei C:N:P von etwa 100:10:2 [1]. Organische Nährstoffe sind in der Regel dann limitierend, wenn die Schadstoffe von Mikroorganismen nur cometabolisch abgebaut werden können.

Organische Nährstoffe werden bei Sanierungen im wesentlichen als komplexe, wenig selektiv auf das Wachstum von Mikroorganismen wirkende Substrate eingesetzt, welche zugleich auch die anderen Elemente mit abdecken. Solche Substrate sind z. B. Kompost, Rindenmulch, Stroh, Rübenhackschnitzel oder andere Abfallstoffe aus der Landwirtschaft wie z. B. Melasse, Gülle. Spezifische organische Nährstoffe, die Mikroorganismen mit speziellen StoffwechsellLeistungen in ihrer Aktivität unterstützen, sind z. B. Erdgas oder Methan, welche insbesondere beim mikrobiellen Abbau von LCKW eine Rolle spielen (s. Kap. 2.4.3).

In diesem Zusammenhang ist insbesondere in der Sanierungspraxis der Einsatz von komplexen Substraten als sogenannte **Zuschlagstoffe** zu nennen (deren Zusammensetzung und Herkunft in der Regel von Firmen nicht im Detail preisgegeben werden). Dabei wird in der Regel nicht nur das Ziel verfolgt, Substrate für das Wachstum und die Aktivität der Mikroorganismen zu liefern, sondern damit auch Boden verbessernde Maßnahmen einzuleiten, wie z. B. die Verbesserung der Belüftung oder Anhebung des pH-Wertes bei Einsatz von Kompost [16]. Auf die Möglichkeiten zur Aufhebung der Nährstoffmangelsituation sowie anderer Limitierungen durch physiko-chemische Faktoren etc. wird an anderer Stelle eingegangen (s. Kap. 2.3.4.4 bis 2.3.4.5, 2.4.3 und 3.2.1.2).

2.3.2.7 Huminstoffgehalt

Mit dem Huminstoffgehalt wird der sich zersetzende Teil natürlicher organischer Substanz in Böden bezeichnet. Als Daumenregel wird der TOC-Wert multipliziert mit dem Faktor 2 als Gehalt an Huminstoffen eines Bodens angenommen.

Huminstoffe werden postmortal aus verrottendem Material von verschiedenen Organismen (Pflanzen, Tiere und Mikroorganismen) gebildet. Zu den Ausgangsstoffen gehören im wesentlichen Pflanzenmaterial (Kohlenhydrate, Proteine, Lipide, Zellulose, Hemicellulose, Lignine, Cutine, Suberine und Wachse), Bestandteile der Bodenfauna, Zellwandmaterial von Bakterien und Pilzen (Mureine, Chitine, Melanine, u. a.) sowie Sekundärmetabolite im weitesten Sinne von allen beteiligten Organismengruppen. Im allgemeinen wird eine komplexe Mischung aus natürlich vorkommenden, schwer abbaubaren, gelb bis braun gefärbten, kolloidalen Substanzen im Boden als Humus bezeichnet [17].

Huminstoffe besitzen Molekülmassen (MG) von 1.000 bis 20.000 Dalton (z. T. auch mit Werten bis zu 100.000 Da). Sie können in Böden in Mengen von einigen Promille bis zu 30 % vorkommen (Tab. 2.43). Huminstoffe haben relativ definierte, chemische und physikalische Eigenschaften, sie weisen jedoch keine einheitliche, reproduzierbare chemische Struktur auf. Huminstoffmoleküle können sich zu größeren Aggregaten mit Fragmenten der Biomasse und anorganischen Bestandteilen der Bodenmatrix (Tonminerale) zusammenlagern und werden klassisch nach ihren Löslichkeitseigenschaften in **Fulvosäuren**, **Huminsäuren** und **partikuläre Humine** unterteilt. Diese Einteilung erfolgt pragmatisch und läßt keine eindeutigen Schlußfolgerungen auf das chemische Verhalten der Stoffe zu:

Fulvosäuren: löslich in Säuren und in Basen (MG: 250 - 2.100 Da)

Huminsäuren: löslich in Basen und mit Säuren ausfällbar (MG: 1.400 -100.000 Da)

partikuläre Humine: unlöslich (MG wie Huminsäuren jedoch komplexere Strukturen).

Tab. 2.43: Allgemeine Definition von Humusgehalten in Böden [22]

org. Substanz in [%]	Bezeichnung
< 1	humusarm
1 – 2	schwach humos
2 – 4	mäßig humos
4 – 8	stark humos
8 – 15	humusreich
15 – 30	anmoorig
> 30	torfig

Durch Zugabe von organischen Zuschlagstoffen bei Sanierungsmaßnahmen (s. Kap. 2.4.3), wie Rindenmulch, Kiefernborke oder Kompost kann der Humusgehalt stark erhöht werden.

Dies ist bei Wiederverwendung des Bodenmaterials im Landschaftsbau ein erwünschter Effekt, der jedoch bei einer künftigen Nutzung als Baugrund von extremem Nachteil sein kann. Darüber hinaus hat der Humusgehalt eines Bodens in der Regel einen positiven Einfluß auf die mikrobielle Aktivität eines Bodens und den Schadstoffabbau. Zugleich kann jedoch auch die Sorption von Schadstoffen erhöht werden, was allerdings meist nur bei Kontaminationen in Spuren (\ll ppm-Bereich) von Bedeutung ist. Lösliche Bestandteile von Huminstoffen, wie die Fulvo- und Huminsäuren können auch als Trägersubstanzen bzw. Lösungsvermittler für lipophile Substanzen dienen und damit u. U. die Mobilität von Schadstoffen in der Wasserphase erhöhen. Zur Untersuchung dieser Problematik ist daher die Analyse der Eluatwerte (S4 [6]) sowie die Bestimmung toxikologischer Parameter [19] notwendig.

2.3.3 Biologische Abbaubarkeit der Schadstoffe

Der mikrobielle Abbau von Umweltschadstoffen kann nach physiologischen Gesichtspunkten unterschieden werden in:

- I. vollständige **Metabolisierung** und **Mineralisierung**
intrazellulär; vollständiger Abbau des Kohlenstoffgerüsts, theoretisch keine Metabolitenakkumulation, produktiver Abbau mit Bildung von Biomasse (Nutzung als C+E-Quelle), CO_2 und H_2O als Hauptprodukte.
- II. **cometabolische Transformation**
vorwiegend intrazellulär; partielle Oxidation des Kohlenstoffgerüsts, in der Regel Akkumulation teiloxydierter Metabolite, unproduktiver Abbau ohne Bildung von Biomasse, CO_2 und H_2O als mögliche Produkte.
- III. unspezifische **radikalische Oxidation**
vorwiegend extrazellulär; Initialoxidation durch Radikalbildung, unspezifische Folge-reaktion der primären Oxidationsprodukte, Reaktionsketten bis zum CO_2 möglich.

Der Typ der **vollständigen Metabolisierung und Mineralisierung** beinhaltet den weitgehendsten Abbau von Xenobiotika und ist für viele Schadstoffgruppen nur bei Bakterien beschrieben worden. Dabei wird in der Regel ein Teil der betreffenden Substanz von den Mikroorganismen als Kohlenstoff- und Energiequelle zum Aufbau von Biomasse genutzt und der übrige Teil zu CO_2 und Wasser mineralisiert. Der vielfach für diesen Abbau verwendete Begriff "vollständige Mineralisierung" sollte besser nicht mehr verwendet werden, da er suggeriert, daß der gesamte Kohlenstoff aus der Substanz als CO_2 wiedergefunden wird. Dies kann natürlich nie der Fall sein, weil ein bestimmter Anteil des Kohlenstoffes immer für Erhaltung und Aufbau der Biomasse gebraucht wird. Bei der vollständigen Metabolisierung kann es vorübergehend zur Akkumulation geringer Mengen von Metaboliten kommen. Diese Metabolite werden unter bestimmten Bedingungen auch außerhalb der Zellen gefunden.

Der cometabolische Abbau bzw. präziser formuliert die **cometabolische Transformation** wurde für eine ganze Reihe von Umweltschadstoffen beschrieben. Das wesentliche Kriterium für diesen Typ des Abbaus ist, daß die entsprechenden Mikroorganismen die Verbindungen nicht als alleinige C+E-Quelle nutzen bzw. damit wachsen können. Dieser Typ des Abbaus ist, abgesehen von einer Entgiftungsfunktion, für die Organismen ohne erkennbaren Wachstumsvorteil. Die Organismen sind daher auf zusätzliche Substrate angewiesen, um ihren

Stoffwechsel aufrecht zu erhalten und zu wachsen. Für diesen Typ des "Abbaus" kommen praktisch alle bekannten Abbauewege in Betracht, die nicht zum Wachstum der Organismen führen (unproduktiver Abbau). Meistens entstehen dabei jedoch primäre Oxidationsprodukte, welche dann z. B. von anderen Organismen weiter metabolisiert werden können.

Eine weitere Möglichkeit der Metabolisierung von Umweltschadstoffen besteht in der **unspezifischen, radikalischen Oxidation**. Dieser Typ wird durch die Eigenschaften der ligninolytischen Enzymsysteme von Weißfäulepilzen ermöglicht. Beim Abbau des in der Natur relativ persistenten Holzes sind diese Organismen auf den Abbau von Lignin spezialisiert. Aufgrund der makromolekularen Struktur und der Wasserunlöslichkeit des Lignins kann der Abbau nur über extrazelluläre Enzyme erfolgen. Mit diesen Enzymsystemen (Lignin-, Mangan-Peroxidasen [LiP, MnP] und Laccasen), deren Wirkungsmechanismen im Detail noch nicht vollständig aufgeklärt sind, sind die Pilze fähig, durch radikalkatalysierte Spaltungsreaktionen Lignin zu depolymerisieren. Diese unspezifischen Oxidationsreaktionen prädestinieren diese Gruppe von Pilzen für den biologischen Abbau besonders persistenter Umweltschadstoffe.

Beim mikrobiellen Abbau jeglicher organischer Substanz in Böden finden Reaktionen statt, die zu einer Verteilung des Ausgangskohlenstoffes in verschiedene Kompartimente führen. Neben der **Metabolisierung**, der **Mineralisierung** und der Bildung von **Biomasse** wird ein Teil des Kohlenstoffes in der refraktären organischen Bodenmatrix festgelegt. Beim Abbau von Naturstoffen werden diese Prozesse als **Humifizierung** bezeichnet. Huminstoffe und Biomasse können ihrerseits ebenfalls wieder Ausgangspunkt für erneute Umsätze sein. Xenobiotika und deren Metabolite werden in analoger Weise ebenfalls in die Reaktionen einbezogen [15]. Eine Stimulierung der mikrobiellen Aktivität durch Zusatz von organischen Substraten führt in der Regel zu einer Beschleunigung des Umsatzes in allen Teilprozessen.

2.3.4 Biologische Parameter

Neben den physikalischen und chemischen Untersuchungen zur Gefährdungsabschätzung hat die Untersuchung der biologischen Parameter [18] zunächst das Ziel, eine erste Aussage über die Beeinträchtigung der am Standort vorhandenen Boden-Mikroorganismen durch die betreffende Kontamination zu liefern. Zur Vermeidung zusätzlicher Kosten sollten einige Untersuchungen als **Minimalprogramm** in die orientierende Erstuntersuchung einbezogen werden. Für zusätzliche Details und die Bestimmung zusätzlicher biologischer Parameter wird auf weiterführende Literatur verwiesen [1; 39].

In den nächsten Jahren ist damit zu rechnen, daß über die Bestimmung molekularbiologischer Marker oder die Detektion bestimmter Enzymaktivitäten das Potential für mikrobiologische Sanierungen ermittelt werden kann [4]. Derartige Methoden sind aber heute in Europa noch weitgehend auf Forschungslabors beschränkt, so daß diese Methoden nur begrenzt empfohlen werden können.

Folgende Fragen sollen mit der Untersuchung der biologischen Parameter beantwortet werden:

- a) Sind lebensfähige Mikroorganismen vorhanden?
- b) Besitzen die Mikroorganismen unter Standortbedingungen eine Stoffwechselaktivität bzw. ist eine Stoffwechselaktivität induzierbar?

Die Beantwortung der Fragen erfolgt durch den quantitativen Nachweis lebensfähiger Bakterien sowie mit Hilfe biologischer Testverfahren.

Die Bestimmung der Zellzahlen reicht allein nicht aus, weil extreme Unterschiede zwischen dem Oberboden und tieferen Bodenbereichen zu erwarten sind und weil über die Zellzahlen keine Aussage über die **biologische Aktivität** möglich ist (z.B. Vorliegen von Dauerstadien oder Vorhandensein von inaktiven Bakterien). Eine fehlende Atmungsaktivität kann beispielsweise auch darauf zurückzuführen sein,

- daß keine Mikroorganismen im Boden vorhanden sind,
- daß keine verwertbaren Kohlenstoffquellen im Boden vorhanden sind (Kontrolle durch Zugabe einer externen C-Quelle) oder
- daß ein toxischer Einfluß auf die Mikroorganismen vorhanden ist.

Erst die Durchführung beider Atmungstests (siehe unten) erlaubt eine zuverlässige Aussage über eine vorhandene Hemmwirkung der Kontamination auf die Bodenmikroorganismen.

Läßt sich ein eventuell vorhandener Hemmeffekt nicht durch vorliegende chemisch-analytische Befunde erklären, so ist dies ein Hinweis auf das Vorhandensein bisher nicht erkannter Schadstoffe und sollte Anlaß zu weiteren Analysen sein.

Grundsätzlich ist die Untersuchung der biologischen Parameter in einem Dreistufenplan sinnvoll:

1. Das **Minimalprogramm** (s. Kap. 2.3.4.1 u. 2.3.4.2) zur Untersuchung der mikrobiellen Sanierbarkeit soll in den Rahmen der orientierenden Erstuntersuchung von Altlastenverdachtsflächen einbezogen werden und eine Aussage darüber liefern, ob eine Beeinträchtigung der am Standort vorhandenen Bodenmikroorganismen durch die betreffende Kontamination vorliegt (Mikrobielle Standortuntersuchung).
2. Die **orientierende Prüfung** des mikrobiellen Schadstoffabbaus (s. Kap. 2.3.4.3 u. 2.3.4.4) soll im Rahmen der Sanierungsuntersuchung eines Altlastenfalles durchgeführt werden und mit der Beantwortung der Frage, ob die Kontamination der Bodenprobe durch die standorteigene Mikroorganismenpopulation prinzipiell abbaubar ist, die generelle mikrobiologische Sanierbarkeit beurteilen.
3. Die **weiterführenden Untersuchungen** zur mikrobiellen Sanierung (s. Kap. 2.3.4.5) weisen ausgewählte Methoden aus, mit denen die verschiedenen Sanierungstechniken in Laborversuchen simuliert werden können.

2.3.4.1 Minimalprogramm: Mikrobieller Besatz

Bearbeitung der Bodenproben für Kulturmethoden: Aus dem inneren Kern der Bodenproben (z.B. Schlauchkerne) werden Teile unter aseptischen Bedingungen entnommen. Zur Ablösung der Mikroorganismen wird eine Bodendispersion hergestellt. Dazu werden zu 10 g Bodenprobe in einem 250-ml-Erlenmeyerkolben in 100 ml sterile 0,2 %-ige Tetranatrium-pyrophosphat-Lösung gegeben. Bei 150 U/min wird die Probe für 30 min bei 15° C bis 20° C auf einem Schüttler dispergiert. Der Überstand wird in einen sterilen 250-ml-Meßzylinder überführt. Nach der Sedimentation größerer Partikel innerhalb von 2 bis 5 min wird ein Teil des partikelfreien Überstandes mit einer sterilen Pipette abgehoben und weiter verarbeitet.

Herstellung der Verdünnungsreihe: Die Verdünnungsreihe wird in dekadischen Stufen in einem physiologischen (isotonischen) Medium (z.B. 0,9 % NaCl- bzw. KCl-Lösung oder 1 M NaH_2PO_4 auf einen pH-Wert 7,0 - 7,1) vorgenommen.

Quantifizierung aerober und fakultativ anaerober Mikroorganismen

Die nachfolgenden Untersuchungen werden beschränkt auf den Nachweis aerober (und fakultativ anaerober) copiotropher Bakterien, weil hiermit das breiteste Spektrum keimfähiger Mikroorganismen erfaßt wird (An dieser Stelle muß allerdings darauf hingewiesen werden, daß generell der größte Teil der Bodenmikroorganismen mit derartigen Kulturverfahren nicht kultiviert werden kann; als erste Näherung ist die Methode aber dennoch zu empfehlen). Das Gußplattenverfahren [6] ist für die Untersuchungen ungeeignet, da die hohen Temperaturen (45° Celsius) des noch flüssigen Agarmediums temperaturempfindliche Mikroorganismen abtöten. Es empfiehlt sich das Ausspateln des Inokulums (Proben aus Verdünnungsreihe) auf Agaroberflächen mittels DRIGALSKY-Spatel.

Bearbeitung: Aus jeder Probe wird eine dezimale Verdünnungsreihe in isotonischem Medium angelegt (s. o.). Aus den Verdünnungsstufen bis 10^{-7} wird je 0,1 ml auf **R2A-Medium** (nach [33]) ausgespatelt. Dieses Agarmedium ist standardisiert, in dehydratisierter Form kommerziell (Difco) erhältlich und liefert eine hohe Ausbeute an unterschiedlichen Bakterienarten. Das Artenspektrum, das man mit verschiedenen nährstoffreichen Medien wie R2A, 1/10 Standard I oder 1/2 TGE erhält, ist u. U. verschieden und anders als das mit einem nährstoffarmen Medium, da jeweils unterschiedliche Arten zur Entwicklung kommen.

Zusammensetzung des R2A-Mediums (g/l Aq. dest.): Hefeextrakt (0,5), Proteose Pepton No.3 (0,5), Casamino Acids (0,5), Glucose (0,5), lösl. Stärke (0,5), Natriumpyruvat (0,3), K_2HPO_4 (0,3), $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,05), Agar (15,0); pH 7,2 einstellen mit krist. K_2HPO_4 oder KH_2PO_4 vor Agarzugabe.

Die Inkubation der beimpften Platten erfolgt unter aeroben Bedingungen bei 20°C für 10 Tage. Die Auswertung soll nach 5 und 10 Tagen erfolgen (in der Regel wird der 10-Tage-Wert angegeben). Die Zahl der Bakterien wird anhand der gewachsenen Kolonien mittels Auflicht vor schwarzem Hintergrund bestimmt.

2.3.4.2 Minimalprogramm: Mikrobielle Aktivität des Bodens

Als biologische Testverfahren eignen sich Atmungstests bei denen die CO_2 -Bildung oder der O_2 -Verbrauch eines Bodens bestimmt werden. Grundlage der Bestimmung der **potentiellen Atmungsaktivität** ist die Messung der mikrobiellen Atmung nach Zugabe eines leicht verwertbaren Substrates (Glucose) im Überschuß, während die **aktuelle Atmungsaktivität** ohne jegliche Substratzugabe im physiologischen Normalzustand des Bodens ermittelt wird. Da sowohl karbonat-haltige Böden als auch eventuell vorhandene CO_2 -verwertende Bakterien den CO_2 -Gehalt im Gasraum signifikant beeinflussen können, ist ein sicherer Aktivitätsnachweis ausschließlich über den O_2 -Verbrauch möglich. Ferner beeinflußt der Wassergehalt des Bodens die mikrobiologische Aktivität sehr stark. Deshalb ist eine standardisierte Einstellung auf 50 % (± 10 %) Wasserhaltekapazität (WHK_{max}) notwendig. Mit dieser Standardisierung kann die Methode sowohl für Boden aus der gesättigten als auch der ungesättigten Bodenzone verwendet werden.

Vorbereitung der Bodenproben, Einstellung des Wassergehaltes: Gut durchmischter naturfeuchter Boden (Korngröße ≤ 6 mm) wird auf 50 % (± 10 %) seiner maximalen Wasserhaltekapazität (s. Kap. 2.3.2.3) eingestellt und 48 h bei 22° C in Behältern gelagert, die Luftzutritt gewährleisten. Ist der aktuelle Wassergehalt des Bodens geringer als gefordert, wird der Boden in einer Wanne als dünne Schicht ausgebreitet und die benötigte Wassermenge portionsweise gleichmäßig auf der Oberfläche verteilt. Dabei wird der Boden immer wieder gut durchmischt. Ist der aktuelle Wassergehalt des Bodens höher als gefordert, wird der Boden bis zum Erreichen von 50 % WHK_{max} bei Raumtemperatur gelagert. Oberflächliches Austrocknen ist durch periodisches Mischen unbedingt zu vermeiden.

Bestimmung der potentiellen mikrobiellen Aktivität: Grundlage dieser Bestimmung ist die Messung der mikrobiellen Aktivität des Bodens nach Zugabe eines leicht verwertbaren Substrates (Glucose) im Überschuß.

Bearbeitung: 100 g Boden (Trockengewicht) werden mit 1000 mg Glucose, 150 mg NH₄Cl und 20 mg K₂HPO₄ (C:N:P = 100:10:1) gut vermischt. Die Glucoseveratmung wird als O₂-Aufnahme in einem geschlossenen System (Respirometer, Oximeterflaschen, Sapromat) bestimmt. Am geeignetsten sind Systeme, bei denen der verbrauchte Sauerstoff kontinuierlich nachgeliefert wird. Bei Geräten ohne Nachlieferung ist zu gewährleisten, daß der O₂-Vorrat während der Meßperiode nicht limitierend wirkt. In 500-ml-Gefäßen können in der Regel bis zu 200 g Boden eingesetzt werden. Die Respirometergefäße werden nach dem Mischen der Proben mit Glucose bei 22° C über 24 Stunden inkubiert und die Sauerstoffaufnahme registriert. Zur Erfassung geringer Atmungsraten oder bei langer lag-Phase kann eine Versuchszeit bis zu 7 Tagen erforderlich sein.

Bestimmung der aktuellen mikrobiellen Aktivität: Wie oben beschrieben, jedoch ohne Glucosezugabe. Die Inkubationszeiten richten sich nach der mikrobiellen Aktivität und sollten 7 Tage nicht überschreiten.

Auswertung: Für die Auswertung ist der lineare Teil der Sauerstoffverbrauchskurve heranzuziehen. Berechnet wird die pro Zeiteinheit aufgenommene Sauerstoffmenge. Die Angabe der Ergebnisse erfolgt in mg O₂-Aufnahme pro 100 g Trockengewicht und Tag.

Bewertung der Ergebnisse des Minimalprogramms

Die Untersuchungsergebnisse zum mikrobiellen Besatz und zur potentiellen und aktuellen Atmungsaktivität weisen auf eine vorhandene Hemmwirkung der Kontamination und eine Einschränkung des mikrobiellen Sanierungspotentials hin, wenn:

1. bei der Quantifizierung der aeroben und fakultativ anaeroben Mikroorganismen weniger als 10^3 koloniebildende Einheiten pro g Trockengewicht Boden nachgewiesen werden
- und
2. keine eindeutige aktuelle oder potentielle Atmungsaktivität nachweisbar ist.
Als Richtwerte gelten aktuelle Atmungsaktivitäten von
 $\leq 0,4 \text{ mg O}_2 / (100 \text{ g Boden} \times \text{d})$ bzw. $\leq 0,5 \text{ mg CO}_2 / (100 \text{ g Boden} \times \text{d})$
oder potentielle Atmungsaktivitäten von
 $\leq 4,0 \text{ mg O}_2 / (100 \text{ g Boden} \times \text{d})$ bzw. $\leq 5,0 \text{ mg CO}_2 / (100 \text{ g Boden} \times \text{d})$

2.3.4.3 Orientierende Prüfung: Schadstoffabbau durch die Mikroflora

Bei einem Untersuchungsprogramm zur Beurteilung der prinzipiellen biologischen Sanierbarkeit sind vertiefende chemische, biologische, geologische, hydrogeologische und verfahrenstechnische Untersuchungen notwendig, deren Ergebnisse in die Betrachtungen einbezogen werden sollten. Die nachfolgenden Ausführungen beschränken sich nur auf den biologisch/mikrobiologischen Teil. Ziel ist die Beantwortung der Frage:

Ist die Kontamination der Bodenprobe durch die standorteigene (autochthone) Mikroflora prinzipiell abbaubar?

Die Beantwortung der Frage erfolgt aufbauend auf den **Ergebnissen des Minimalprogramms** durch weitergehende Versuche im Labor. Sollten diese Untersuchungen nicht zeitgleich mit den mikrobiologischen Standortuntersuchungen und mit gleichem Probenmaterial erfolgen, sind zum Vergleich die Quantifizierung der aeroben und fakultativ anaeroben Mikroorganismen sowie die Bestimmung der aktuellen und potentiellen mikrobiellen Atmungsaktivität zu wiederholen. Gegebenenfalls sind die Untersuchungen zusätzlich auf andere Mikroorganismengruppen auszudehnen. Für bestimmte ökophysiologische Gruppen (wie Nitrat-, Fe- oder Sulfat-reduzierende Mikroorganismen) sind entsprechende Titer-Verfahren [4; 39] anzuwenden.

Bei der Durchführung der Laborversuche müssen die Flüchtigkeit der in Frage kommenden Schadstoffe sowie Anforderungen der vorgesehenen Analytik berücksichtigt werden. Für verschiedene Stoffgruppen gelten dabei die folgenden Empfehlungen:

Gruppe 1: Schadstoffe, deren Flüchtigkeit zu berücksichtigen ist:

- BTX-Aromaten, Naphthaline
- Vergaser-Kraftstoffe, Kerosin, Dieselöl
- Chlorierte Kohlenwasserstoffe (CKW)

Gruppe 2: Schadstoffe, deren Flüchtigkeit unberücksichtigt bleiben kann:

- (gealtertes Heizöl), Schmieröle, Mineralöle
- Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (außer Naphthalin)
- Polychlorierte Biphenyle

Die Abbauversuche werden in Suspensionen oder mit naturfeuchtem Bodenmaterial durchgeführt. Die im folgenden aufgeführten Methoden stellen die geringsten Anforderungen an die Laborausstattung dar. Apparativ aufwendigere Methoden mit gleicher Zielsetzung sind ebenfalls anwendbar.

Für die Schadstoffe der Gruppe 1 ist zu fordern, daß die Versuche in Gefäßen durchgeführt werden, die gasdicht geschlossen sind (Schüttelkolben mit teflonkaschierten Dichtungen, Sapromat-Gefäße). Bei den Versuchen soll keine Kinetik des Stoffabbaus aufgenommen werden, sondern eine Endpunktbestimmung erfolgen. Daher wird im folgenden davon ausgegangen, daß der Versuchsansatz am Ende der Inkubationszeit vollständig aufgearbeitet werden kann. Für die beiden Schadstoffgruppen werden unterschiedliche Vorgehensweisen vorgeschlagen:

Schadstoffgruppe 1:

Vom angelieferten Probenmaterial werden durch geschickte Materialentnahme möglichst vergleichbare Proben für die vorgesehenen parallelen Versuchsansätze gewonnen. Dazu sollte möglichst ungestörtes Probenmaterial herangezogen werden. Die mechanische Zerkleinerung und/oder Homogenisierung sollte wegen der Flüchtigkeit der Stoffe und der damit verbundenen Verluste soweit wie möglich vermieden werden. Es sind mindestens zwei Ansätze erforderlich, von denen einer als Kontrolle dient und vergiftet über die gesamte Versuchsdauer mitbehandelt wird oder ersatzweise kurze Zeit nach Versuchsbeginn als Null-Kontrolle aufgearbeitet wird.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird der Versuchsansatz im geschlossenen Gefäß tiefgefroren. Damit wird der Dampfdruck so weit erniedrigt, daß beim Öffnen des Gefäßes Schadstoffverluste minimiert werden. 100 ml kaltes Aceton und 50 ml Pentan werden zugegeben und das Gefäß wieder verschlossen. Nach dem Auftauen wird der Inhalt eine halbe Stunde kräftig gerührt. Bei Ansätzen in Schüttelkolben Zugabe von Magnetrührstab nicht vergessen. Die Pentan-Phase wird im Gaschromatographen (GC) analysiert.

Bei Vorliegen von CKW kann wegen ihrer besseren Wasserlöslichkeit bei der Extraktion auf die Zugabe von Aceton verzichtet werden. Gegebenenfalls muß der Pentan-Anteil vergrößert werden. Dies führt zwar zu geringeren CKW-Konzentrationen im Extrakt, die aber aufgrund der hohen Nachweisempfindlichkeit des ECD (Electron-Capture-Detector) im GC ausgeglichen werden können. Alternativ ist die Messung des Stoffabbaus über die Analyse in der Gasphase denkbar. Dabei ist das Verhältnis von Flüssig- zu Gasvolumen des Versuchsansatzes zu berücksichtigen, ebenso wie die zur Analyse erforderliche Gasprobemenge.

Schadstoffgruppe 2:

Die Probenteilung und Inkubation erfolgt analog der Behandlung für die erste Schadstoffgruppe. Nach Ablauf der Inkubationszeit ist eine möglichst quantitative Abtrennung von Feststoff und Flüssigkeit vorzunehmen, die durch Filtration über Membranfilter oder Zentrifugation ($10.000 \times g$, 10 min) erfolgen kann. Aufgrund der definierten Löslichkeit und der im Vergleich zur Bodenoberfläche geringen Oberfläche der Gefäßwandung wird davon ausgegangen, daß der im Wasser befindliche bzw. an der Wandung der Gefäße anhaftende Schadstoffanteil vernachlässigt werden kann.

Die Feststoff-Fraktion wird an der Luft getrocknet (ca. 3 – 5 Tage). Ein Wassergehalt $\leq 5\%$ soll erreicht werden. Falls für das untersuchte Stoffspektrum bei diesem Trocknungsvorgang noch Verdunstungsverluste erwartet werden (niedrigsiedende Mineralöle, Heizöl, Naphthalin) oder sehr schlecht trocknende Proben vorliegen, kann alternativ eine chemische Trocknung mit wasserfreiem Natriumsulfat durchgeführt werden. Dabei ist der feuchte Boden mit so viel Natriumsulfat zu verreiben, bis ein rieselfähiges Material vorliegt. Der Verdünnungseffekt ist zu berücksichtigen.

Das getrocknete Material wird für die verschiedenen Stoffgruppen in folgender Weise extrahiert:

- PAK im Soxhlet mit Toluol als Lösungsmittel
- PCB im Soxhlet mit Hexan, Aceton, Toluol (6:3:1) oder Essigsäureethylester

- Mineralölkohlenwasserstoffe mit einem geeigneten Lösungsmittel und mit GC, HPLC oder IR (DIN H18, [6]) analysiert.

Der Wirkungsgrad der Lösungsmittlextraktion ist für gealterte Kontaminationen bei polarenen Lösemitteln (z.B. Essigsäureethylester) unter Umständen größer als beim Einsatz eines unpolaren Lösungsmittels wie z.B. Toluol oder Trichlortrifluorethan (R113) und muß im Einzelfall geprüft werden.

Abbauversuche in Suspensionskultur

Eine Bodensuspension (original Standortmaterial mit standorteigenen Mikroorganismen) wird in einem relativ großvolumigen abgeschlossenen Gefäß (Gasphase: Luft, zur Sicherstellung einer ausreichenden Sauerstoffversorgung) über einen ausreichenden Zeitraum inkubiert. Der Nachweis des mikrobiologischen Schadstoffabbaus erfolgt über die Dokumentation (chemische Analytik) der Abnahme der Ausgangssubstanz (Endpunktbestimmung). Zur Kontrolle (Adsorption-, Stripp- und Analysenverlust) dient ein vergifteter Versuchsansatz.

Durchführung: In gasdicht verschließbaren Gefäßen (Erlenmeyerkolben, Schottflaschen mit teflonkaschierten Dichtungen) mit einem Volumen von 1000 ml werden (möglichst unmittelbar nach der Probennahme) eine definierte Menge feuchtes Bodenmaterial (entsprechend 50 g Trockengewicht) und 200 ml Mineralsalzmedium (750 mg NH_4Cl und 100 mg K_2HPO_4 pro l) eingebracht. Die Gefäße werden verschlossen im Dunkeln auf einem Schüttler mit 100 Upm bei Temperaturen zwischen 20° und 25° C oder Raumtemperatur für mind. 28 Tage inkubiert (bei PAK-Abbauversuchen bis zu 6 Wochen). Danach wird der gesamte Probenansatz für die chemische Analytik (z.B. Extraktion) aufbereitet.

Als Kontrolle dient ein gleichbehandelter jedoch mit Natriumazid (10 g/l Mineralsalzmedium) vergifteter Probenansatz, der bei $\leq 4^\circ \text{C}$ im Kühlschrank gelagert wird.

Abbauversuche in Standkultur mit feuchtem Bodenmaterial

Eine Bodenprobe definierter Feuchte (original Standortmaterial mit standorteigenen Mikroorganismen) wird in einem relativ großvolumigen abgeschlossenen Gefäß (Gasphase Luft zur Sicherstellung einer ausreichenden Sauerstoffversorgung) über einen ausreichenden Zeitraum inkubiert. Der Nachweis des mikrobiologischen Schadstoffabbaus erfolgt über die Dokumentation (chemische Analytik) der Abnahmen der Ausgangssubstanz (Endpunktbestimmung). Zur Kontrolle (Adsorption-, Stripp- und Analysenverlust) dient ein gekühlter Versuchsansatz unter N_2 -Atmosphäre.

Da die mikrobielle Aktivität in Bodenkulturen nur sehr schwer zu unterdrücken ist, kann hierbei auch die folgende Methode für den Ansatz **abiotischer Kontrollversuche** genutzt werden: In die Kulturgefäße werden 5 ml CHCl_3 mit Siedesteinen in einem Reagenzglas eingestellt und bis zum Sieden des Chloroforms evakuiert. Dabei stellt sich eine Atmosphäre aus CHCl_3 ein, welche für die nahezu vollständige Inhibierung aller Elektronentransportprozesse in den Zellen und damit für deren Abtötung sorgt. Die Aktivität unabhängiger Enzyme wird davon jedoch nicht beeinflusst. Diese Methode ist allerdings nur anwendbar, wenn keine Interferenzen des CHCl_3 mit der Schadstoffanalytik zu erwarten ist.

Durchführung: 100 g gut durchmischter naturfeuchter Boden (Korngröße $\leq 6 \text{ mm}$) wird nach Einstellung auf $50 \pm 10 \%$ seiner maximalen Wasserhaltekapazität (s. Kap. 2.3.2.3) mit 150 mg NH_4Cl und 20 mg K_2HPO_4 versetzt und in ein gasdicht verschließbares Gefäß mit einem Volumen von 1 l (Weckglas, Schottflasche mit teflonkaschierten Dichtungen) einge-

bracht. Oberflächliches Austrocknen des Bodenmaterials (Taupunktunterschreitung an der Gefäßwand) ist durch Auskleidung der Innenwand mit einem angefeuchteten Filterpapier zu vermeiden. Die Gefäße werden verschlossen im Dunkeln bei Temperatur zwischen 20° und 25° C (Zimmertemperatur) für 28 Tage inkubiert (bei PAK-Abbauversuchen bis zu 6 Wochen). Danach wird der gesamte Probenansatz für die chemische Analytik (z.B. Extraktion) aufbereitet. Als Kontrolle dient ein gleichbehandelter Probenansatz, der bei $\leq 4^{\circ}\text{C}$ im Kühlschrank und unter N_2 -Atmosphäre gelagert wird.

Bewertung der Ergebnisse

Die Untersuchungsergebnisse weisen auf ein Potential zur mikrobiellen Sanierung hin, wenn:

- | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <ol style="list-style-type: none">1. in den Abbauansätzen $\geq 70\%$ der Schadstoffkonzentration eliminiert werden
<u>und</u>2. eine eindeutige Differenz ($\geq 50\%$) der Schadstoffkonzentration im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollansätzen zu verzeichnen ist. |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Wenn der Kontrollansatz ebenfalls eine Schadstoffreduktion $\geq 50\%$ aufweist, sind weitergehende Untersuchungen durchzuführen, um den Einfluß chemisch/physikalischer Faktoren (z.B. Absorption, Strippeffekte) abzuklären bzw. den eindeutigen mikrobiellen Abbau zu belegen.

(Liegen neben der Kontamination mit organischen Schadstoffen zusätzlich Kontaminationen mit Cyaniden und/oder Schwermetallen vor, dann kann trotz prinzipieller biologischer Metabolisierbarkeit der organischen Verbindungen der Schadstoffabbau vollständig blockiert sein)

2.3.4.4 Orientierende Prüfung: Bioverfügbarkeit der Schadstoffe

Insgesamt kann davon ausgegangen werden, daß in einem Boden durch die Zugabe von leicht verwertbaren Nährstoffen (wie z. B. Pflanzenmaterial oder Komposten) und Substraten insgesamt eine Beschleunigung des mikrobiellen Abbaus und der Eliminierung von Umweltschadstoffen stattfindet, sofern die Substanzen relativ gut biologisch abbaubar sind [16]. Bei schwer oder nicht abbaubaren Verbindungen werden durch den Zusatz von weiterem organischem Material mehr **Möglichkeiten zur Stabilisierung** bereitgestellt, welche die Bioverfügbarkeit u. U. herabsetzen können. Insgesamt geht dieser Effekt jedoch mit einer weitgehenden Detoxifizierung einher [3; 45; 47]. Den Problemen der mangelnden Bioverfügbarkeit von Verbindungen durch Sequestrierung in Aggregaten kann in der Bodensanierung in gewissem Umfang durch mechanischen Gefügebrauch bzw. durch intensives Mischen begegnet werden, was in der Regel zu mehr Abbau und weniger stabilisierten Restkonzentrationen führt. Wiederholtes Eintrocknen und Befeuchten kann dabei allerdings kontraproduktive Wirkungen haben.

Je langsamer der mikrobielle Abbau jedoch stattfindet, desto mehr Zeit steht für die **Sequestrierung** in Aggregat- und Molekülstrukturen und abiotische Wechselwirkungen mit der Bodenmatrix zur Verfügung. Über diese Prozesse kann die Bioverfügbarkeit der Komponenten mit der Zeit reduziert werden, so daß auch prinzipiell abbaubare Verbindungen in einem bestimmten Boden persistieren können. Ebenso nehmen alle Metabolite, die von den Mikroorganismen als Stoffwechselprodukte ausgeschieden werden, an den Wechselwirkungen

mit der Bodenmatrix teil. Darüber hinaus kann die Bioverfügbarkeit der Schadstoffe auch durch die Schadstoffmatrix oder durch anthropogene Begleitstoffe wie Kohle- und Kokspartikel beeinflusst werden (s. Kap. 2.3.1.2, 2.3.1.3 und 2.3.1.4).

Durchführung: Das Vorliegen mangelnder Bioverfügbarkeit kann mit einfachen Experimenten untersucht werden [46]. Die Schadstoffe des zu untersuchenden Bodens werden dazu mit einem geeigneten Lösungsmittel extrahiert und der gleiche Boden erneut (oder ein Referenzboden) mit dem Extrakt kontaminiert und das Lösungsmittel abgedampft. Dieses Bodenmaterial wird dann oben beschriebenen Abbauxperimenten (s. Kap. 2.3.4.3) unterzogen.

Bewertung der Ergebnisse

Läßt sich mit dem applizierten Schadstoffextrakt ein mikrobieller Abbau erreichen, während dies im Originalboden nicht möglich ist, so ist dieser durch mangelnde Bioverfügbarkeit limitiert. Wenn dies nicht der Fall ist, liegt mangelnde Abbaubarkeit des Schadstoffgemisches selbst vor. Dies ist z. B. bei stark gealterten Kontaminationen von Mineralölkohlenwasserstoffen und Teerölen insbesondere bei Gaswerksstandorten zu erwarten (s. Kap. 2.3.1.3).

2.3.4.5 Weiterführende Abbauersuche zur mikrobiellen Sanierung

Unter Kenntnis der prinzipiellen mikrobiellen Sanierbarkeit sowie der gegebenen Standortbedingungen sind weiterführende Abbauersuche zur Ermittlung der biologischen Sanierbarkeit angezeigt, welche ausschließlich mit Standortmaterial und standorteigenen Mikroorganismen durchgeführt werden sollten. Diese Versuche haben zum Ziel, das mögliche Verfahrensprinzip bzw. Sanierungsverfahren (s. Kap. 3) im Labormaßstab zu erproben. Die verschiedenen in den unterschiedlichen Labors derzeit zur Anwendung kommenden Methoden sind im folgenden zusammengestellt. Der Bezug zu den in der Praxis angewandten mikrobiellen Sanierungstechniken ist in Tab. 2.44 dargestellt und soll eine Entscheidungshilfe für die geeignete Labormethode ermöglichen.

Tab. 2.44: Übersicht über Labormethoden zur Prüfung der verschiedenen mikrobiologischen Sanierungstechniken

Sanierungstechnik	Wasserhaltekapazität				
	unterschritten		überschritten		
	I Standgefäß	II Lysimeter	II Perkolator	III überstaute Säule	IV Suspensionsreaktor
Naßmiete (s. Kap. 3.1.1.6)		+	+		
Trockenmiete (s. Kap. 3.1.1.6)	+	+			
Feststoffreaktor (s. Kap. 3.2.1.3)	+				
Suspensionsreaktor (s. Kap. 3.2.1.4)					+
<i>In situ</i> (s. Kap. 3.3)			+	+	
Natural Attenuation (s. Kap. 3.3.1.6)	(+)	+		+	

I. Abbauversuche in Standgefäßen und Bodenreaktoren unter "Boden-nahen" Bedingungen

Während im wäßrigen Milieu vorwiegend die Mineralisierung der Schadstoffe zu Kohlendioxid und Wasser unter Bildung von Biomasse bzw. Transformation zu sich anhäufenden Stoffwechselprodukten stattfindet, laufen im Boden (**Wassergehalte 50 – 60 % der Wasserhaltekapazität**) wesentlich komplexere Vorgänge ab. Neben den grundsätzlichen Abbaureaktionen, die im Bodenwasser stattfinden können, muß im Boden noch mit einer "Humifizierung" der Umweltschadstoffe gerechnet werden. Unter Humifizierung ist in diesem Falle der Einbau der originären Verbindungen oder deren Transformationsprodukte in die organische Bodenmatrix zu verstehen. Zusätzlich finden an den Oberflächen von Ton-Humus-Komplexen in Abhängigkeit vom jeweiligen Schadstoff intensive Ad- und Desorptionsvorgänge statt. Diese Vorgänge können die Schadstoffe für die Analytik verbergen und damit einen Abbau vortäuschen. Diese Versuche sollen einen Abbau unter "Boden-nahen" Bedingungen simulieren, wie er bei Mietenverfahren (oder z.T. bei Aushub und Lagerung) zu erwarten ist.

Die Wechselwirkungen zwischen **Schadstoffen** und **Bodenmatrix** können ihrerseits auch dafür sorgen, daß die Wirkungen von toxischen Verbindungen reduziert werden und dadurch ein mikrobieller Abbau möglich wird. Es ist aber auch möglich, daß Sorptionsvorgänge die

Bioverfügbarkeit limitieren und einen unmittelbaren Abbau durch die Mikroorganismen verhindern. Andererseits sind jedoch Mikroorganismen bekannt, die im Boden Sorptionskomplexe von Schadstoffen mit Huminstoffen abbauen können, die im wäßrigen Milieu nicht angegriffen werden. Diese Mikroorganismen sorgen durch Bildung von Exoenzymen in der Natur für den Abbau bzw. die Humifizierung von schwer abbaubaren (Fest-)Stoffen, wie z. B. Holz oder die Ligninfraktion des Holzes. In einem belebten Boden können somit verschiedene Abbaumechanismen wirksam werden:

- die Mineralisation
- der unvollständige Abbau (Transformation)
- und die Festlegung der Schadstoffe oder der Transformationsprodukte in der organischen Bodenmatrix (synonym gebraucht für "Humifizierung")

Welche der Reaktionen überwiegen, hängt sowohl vom Schadstoff als auch von der Bodenzusammensetzung ab. Es kann daher bei bestimmten Schadstoffen wie Schwerölen, polyzyklischen Aromaten oder anderen aromatischen Verbindungen vorteilhaft sein, die Abbaubarkeit unter variierenden Bodenbedingungen zu untersuchen, um gesicherte Aussagen über den Abbau treffen zu können.

Zur Untersuchung des Abbaus unter "Boden-nahen" Bedingungen eignen sich im einfachsten Falle Versuche in Weithalsgläsern, wie sie nachfolgend beschrieben sind. Mit solchen Versuchen kann sehr leicht die Wirkung von bestimmten Bodenzusätzen wie Kompost etc. getestet werden. Komplexere Studien müssen an Reaktoren durchgeführt werden, die durch spezielle Vorrichtungen eine Probennahme ermöglichen.

Verfahrensbeschreibung (statische Bodenkulturen): Sofern durch die Messung der aktuellen Atmungsaktivität des Bodens gewährleistet werden kann, daß der Sauerstoffgehalt in den Kulturgefäßen nicht limitierend wird, sind für derartige Bodenkulturen einfache Weithalsgefäße oder Zeißlertöpfe geeignet. Bei höherem Sauerstoffbedarf kann auf einfache Weise die Versorgung durch Anschluß eines flexiblen, mit Sauerstoff gefüllten Gassackes erreicht werden (s. Abb. 2.24). Idealerweise sollten diese Versuche jedoch in einem Sapromat oder in Oximeterflaschen durchgeführt werden.

Versuchsdurchführung: Eine 100 g Trockengewicht entsprechende Bodenprobe (Korngröße < 6 mm) wird schonend auf ca. 40 % der maximalen Wasserhaltekapazität getrocknet (s. Kap. 2.3.4.2); bei Anwesenheit von flüchtigen Schadstoffen muß die Trocknung in einem Exsikkator über Blaugel erfolgen. Diese getrocknete Bodenmenge wird dann in die Versuchsgefäße (s. Abb. 2.24) überführt und die erforderliche Menge Wasser bis zum Erreichen von 60 % der max. Wasserhaltekapazität unter ständigem Mischen zugegeben. In dieser Menge Wasser wird eine auf 100 g TG Boden bezogene Menge an Nährsalzen (150 mg NH_4Cl und 20 mg K_2HPO_4) gelöst und damit in den Boden eingebracht (Bei sehr bindigem Bodenmaterial empfiehlt sich u. U. das Untermischen von strukturverbessernden Zuschlagstoffen wie Blähton, Holzmehl, Torf o.ä., s. Kap. 2.3.1.1). Zur Absorption des entstehenden CO_2 werden in die Versuchsgefäße Behälter mit Kalilauge (44 g/l) oder festem Calciumhydroxid (Drägerröhrchen) eingestellt. Die Bodenkulturen werden dann verschlossen und 30 Tage oder ggf. 60 Tage bei 20° C inkubiert. Oberflächliches Austrocknen des Bodenmaterials (Kondenswasserbildung an den Gefäßwänden) ist durch Auskleiden der Innenwände mit feuchtem Filterpapier zu vermeiden. Als Kontrollversuche mit gehemmter biologischer Aktivität dienen Kulturansätze, die mit Stickstoff (oder CHCl_3 , s. Kap. 2.3.4.3)

begast werden und entweder mit 200 mg Natriumazid versetzt (2 g/kg TG) oder bei 4° C im Kühlschrank inkubiert werden.

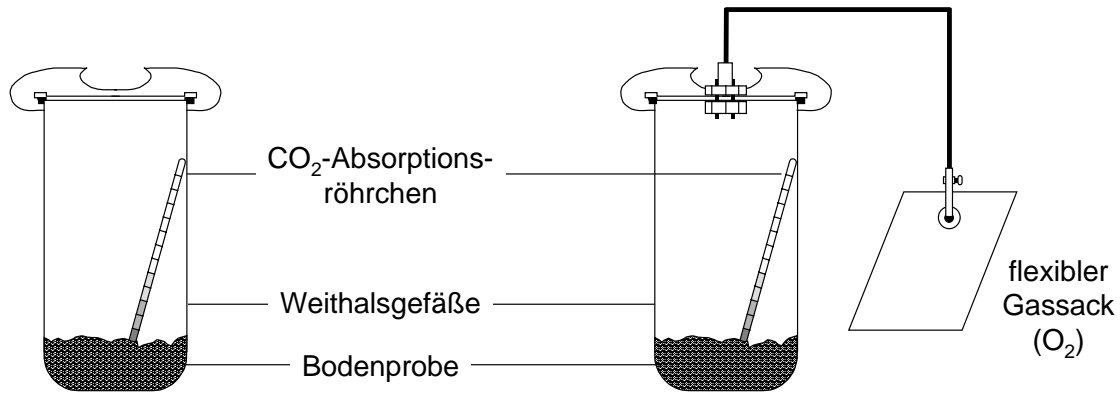


Abb. 2.24: Versuchsgefäße für Bodenkulturen

Analytik/Meßparameter: Bestimmt werden in der Regel jeweils die Anfangs- und Endgehalte der Schadstoffe. Je nach Fragestellungen können jedoch andere Meßgrößen von Interesse sein, wie z. B. Bakterienzahl, pH-Wert, O₂-Verbrauch, CO₂-Bildung, Gesamtkohlenstoff oder ökotoxikologische Parameter zur Beurteilung der Veränderung des Bodens [19].

Verfahrensbeschreibung (Bodenreaktoren): Versuche in Bodenbioreaktoren dienen zur Prüfung einer bestimmten **Sanierungstechnik** im Labormaßstab, in denen über einen definierten Versuchszeitraum Proben zur Ermittlung von kinetischen Daten genommen werden können. In der Regel muß dieser Aufwand zur **Optimierung** des Verfahrens betrieben werden, wenn z.B. **Begasungsraten** oder **Stoffbilanzen** ermittelt werden sollen. Mittlerweile steht eine Vielzahl von Versuchssystemen zur Verfügung, die auch für stoffspezifische Bilanzrechnungen genutzt werden können [14].

Die Details des Versuchsaufbaus hängen jeweils von den verwendeten Bodenreaktoren ab. Dabei ergeben sich prinzipiell zwei Möglichkeiten des Betriebes:

1. statische Verfahren
(ohne Bewegung des Bodens; Mietenverfahren)
2. dynamische Verfahren
(mit Bewegung des Bodens, Mietenverfahren mit Wenden des Bodens, Roll- oder Trommelreaktoren)

Probenvorbereitung/Versuchsdurchführung: Die Vorbereitung der Bodenproben erfolgt analog zu den Weckglasversuchen, wobei bei größeren Systemen auf Kontrollversuche in der Regel verzichtet werden muß. Die Details der Versuchsdurchführungen hängen vom jeweiligen Reaktor und den zugrunde gelegten Fragestellungen ab. Aus diesem Grunde werden im Folgenden nur Beispiele möglicher Reaktoren dargestellt.

Statische Verfahren: Als Beispiel für die Verfahrensvariante ohne Bewegung des Bodens wird hier ein Versuchsaufbau [13] dargestellt, bei dem eine Bodensäule kontinuierlich belüftet wird (Abb. 2.25).

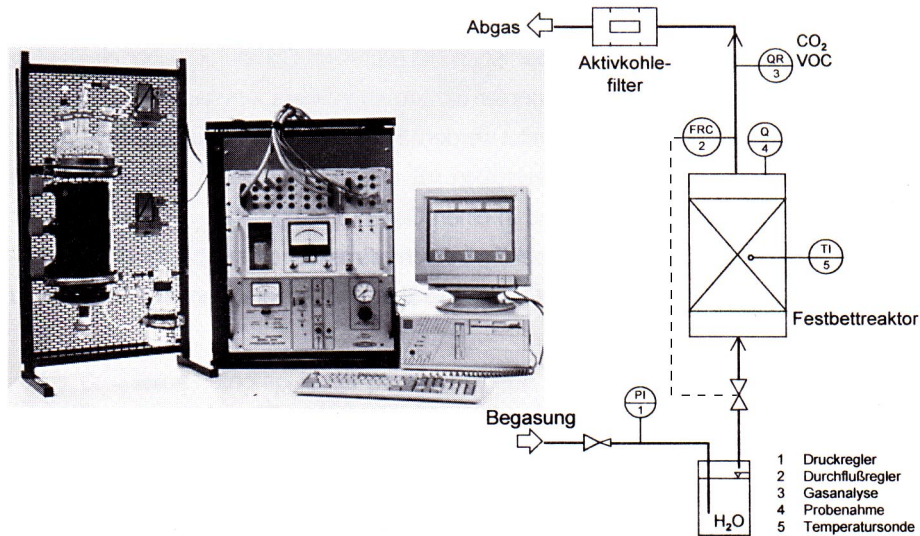


Abb. 2.25: Versuchsaufbau für einen Glasbioreaktor zur Untersuchung des Schadstoffabbaus in Böden [13]

Dynamische Verfahren: Als Beispiel für die Verfahrensvariante mit Bewegung des Bodens wird hier die Laborvariante eines kontinuierlich belüfteten Reaktors dargestellt, der mittels Schaufelrädern kontinuierlich oder diskontinuierlich durchmischt werden kann (Abb. 2.26). Bei diesen Verfahren kommt es aufgrund der verbesserten Durchmischung und damit verbundenen Belüftung zu einem wesentlich beschleunigten mikrobiellen Abbau der Schadstoffe insbesondere bei Kohlenwasserstoffen [13].

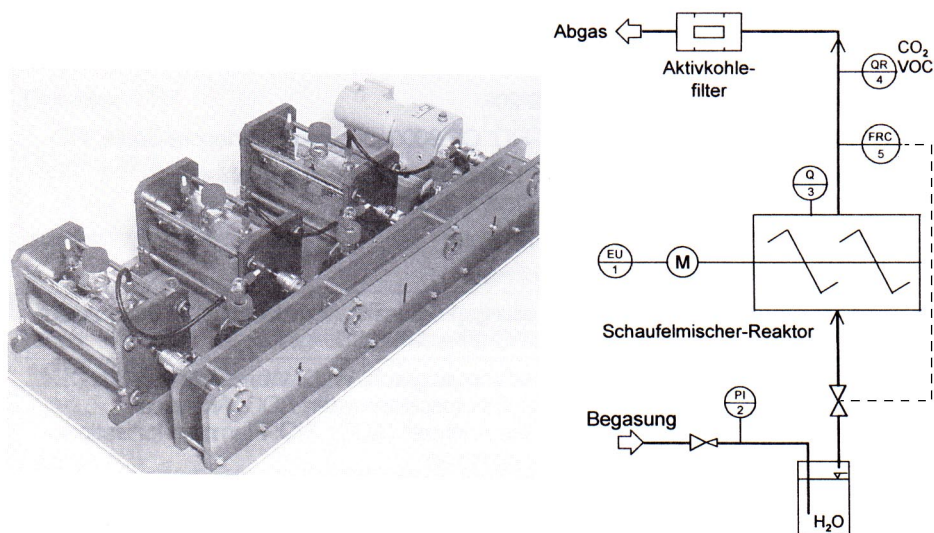


Abb. 2.26: Schematische Darstellung von Bodenbioreaktoren mit Bewegung des Bodens [13]

Generell ist jedoch zu beachten, daß sich bei den dynamischen Verfahren in Abhängigkeit von der Bodenart und Bindigkeit Probleme durch die Bildung von Pellets ergeben können (s. Kap.

2.3.1.1). Mit fortschreitender Umwälzung und zunehmender Pelletgröße kommt es zur Verdichtung, so daß der Stofftransport insbesondere der Gastransport zur Versorgung der Mikroorganismen extrem limitiert ist und damit von Anaerobiose und mangelnder Aktivität der Mikroorganismen im Innern von verdichteten Partikeln > 3 mm ausgegangen werden kann. Für die Behandlung von besonders bindigen Böden wird die Verwendung von speziellen Reaktoren vorgeschlagen, bei denen die Durchmischung mit einer Zerstörung der Aggregate gekoppelt ist.

Bewertung der Ergebnisse

Für die Bewertung der Ergebnisse bezüglich des Schadstoffabbaus in den Reaktorversuchen werden generell die gleichen Kriterien zugrunde gelegt, die auch für die vorausgegangenen Versuche beschrieben sind (s. Kap. 2.3.4.3). Diese ergeben Aufschluß über die mögliche Einsetzbarkeit von statischen oder dynamischen Mietenverfahren (s. Kap. 3.1) und Bodenreaktoren (s. Kap. 3.2).

Für andere Meß- und Analysenparameter müssen vergleichbare Kriterien vom jeweiligen Anwender festgelegt werden. Dies gilt vor allem für den Einsatz dieser Versuche zum Screening auf die Wirkung von Zuschlagstoffen oder die Ermittlung von Abbaukinetiken mittels zeitlich gestaffelter analysierter Parallelansätze. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf mögliche Probleme bezüglich Bioverfügbarkeit (s. Kap. 2.3.1.3, 2.3.1.4 und 2.3.4.4), Aggregatbildung (s. Kap. 2.3.1.1) und die Veränderung ökotoxikologischer Parameter [19] gelegt werden, sofern diese im Rahmen der weiterführenden Untersuchung mit erhoben werden.

Mit Hilfe dieser Versuche lassen sich auf einfache und kostengünstige Weise die Randbedingungen des Abbaus in Bodensystemen sowie die Parameter für die Planung der verfahrenstechnischen Umsetzung der Sanierung ermitteln.

Die Untersuchung des Abbaus von Schadstoffen unter "Boden-nahen" Bedingungen kann für einen spezifischen Boden zu folgenden Punkten Aussagen liefern, die bei der weitergehenden Untersuchung wesentlich für die Beurteilung der biologischen Sanierbarkeit sind:

- Bestimmung der geeigneten Verfahrenstechnik
- Aufnahme der Abbaukinetik (Optimierung)
- Bestimmung der erreichbaren Restkonzentrationen
- Bilanzierung des Stoffverteilung (Gas, Feststoff/Boden und Wasser; Verhältnis Mineralisierung gegenüber Festlegung)
- Bestimmung der Toxizität in Abhängigkeit von der Abbaukinetik

II. Abbauversuche im Perkolator/Lysimeter

Mit Hilfe dieser Untersuchungsmethoden soll das Abbauverhalten der jeweiligen Kontamination mit originärem Bodenmaterial modellhaft ermittelt werden. Dabei wird die Betriebsweise der Modelleinheit so gewählt, daß **Abbauprognosen** für das später anzuwendende Verfahren möglich werden. Aufbau und Betrieb solcher Einheiten sind grundsätzlich so zu wählen, daß Erkenntnisse über das Abbauverhalten unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen möglich werden. Damit soll erreicht werden, daß Verfahrensänderungen zur Optimierung des Abbaus möglich werden.

Verfahrensbeschreibung (Perkolationseinrichtung): Das Prinzip besteht darin, daß eine Perkulationsflüssigkeit und Luft kontinuierlich oder periodisch über einen Festkörper geleitet werden. Die Festphase wird im allgemeinen im gesättigten Fluß durchströmt. Während die Perkulationsflüssigkeit in der Regel im Kreislauf gepumpt wird, wird frische Luft zugeführt und die den Festkörper durchströmende Luft als Abluft abgeführt. Je nach Aufgabenstellung und Aufbauvariante kann die wäßrige und/oder gasförmige Phase während der Versuchsdauer kontinuierlich oder stichprobenartig untersucht werden.

Als Beispiel für eine solche Laboranlage wird hier ein System dargestellt, welches ohne zusätzliche Pumpen auskommt [18]. Dabei wird die Perkulationsflüssigkeit durch Druckluft gefördert (in den meisten Labors verfügbar bzw. durch Aquarienluftpumpen) und damit zugleich eine Belüftung des Systems gewährleistet (Abb. 2.27).

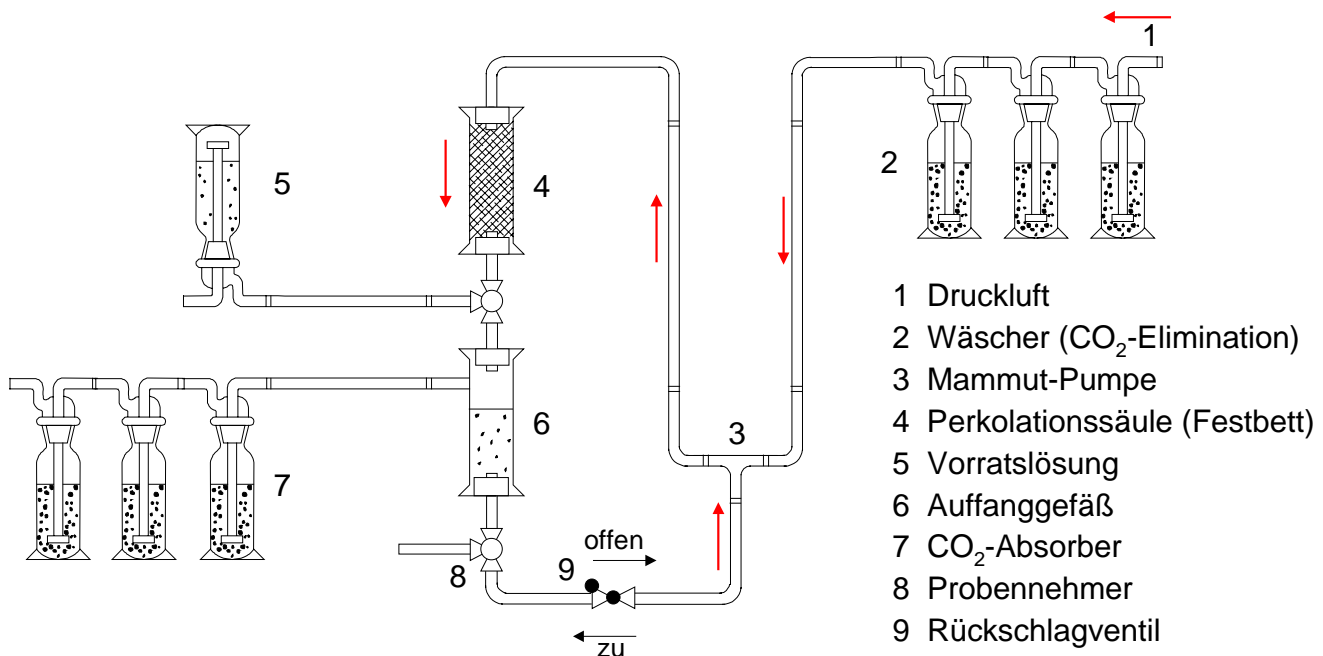


Abb. 2.27: Schematische Darstellung einer Perkolationseinheit

Von einer Druckluftquelle (1) wird die Luft durch einen CO₂-Wäscher mit 25 - 50 % NaOH geleitet. Der CO₂-Wäscher (2) – hier nur schematisch durch Waschflaschen symbolisiert – besteht aus drei hintereinander geschalteten Einheiten. Die ersten beiden Einheiten bestehen aus Waschflaschen, die mit NaOH gefüllt sind, während die dritte Einheit mit Natronkalk gefüllt ist. Letztere dient dazu, mögliche Aerosolpartikel aus den vorhergegangenen Einheiten abzufangen. Die CO₂-freie Luft wird dann über ein T-Stück (3), in das die Perkulationsflüssigkeit aus dem Auffanggefäß (6) drückt, geleitet. Eine solche Anordnung des Rohrsystems bewirkt, daß die Perkulationsflüssigkeit nach dem Prinzip einer Mammut-Pumpe über den Festkörper (4) geleitet wird. Luft und Perkulationsflüssigkeit durchströmen nun das Festbett und gelangen schließlich in das unterhalb der Perkolationssäule montierte Auffanggefäß (6). Während die Luft über CO₂-Absorbergefäße (7) ins Freie gelangt, wird die Perkulationsflüssigkeit über ein Rückschlagventil (8) wieder in den Kreislauf eingespeist. Um Perkulationsflüssigkeit zu ersetzen oder andere Lösungen in das System einzuspeisen, besteht die

Möglichkeit das Leitungssystem zwischen Perkolations säule und Auffanggefäß zu verzweigen und die neue Lösung über eine Vorratsflasche (5) (auf dem Kopf stehende Waschflasche) in das System einzupressen. Abwandlungen der Führung der wäßrigen oder der Gas-Phase sind hier einfach möglich und richten sich nach der jeweiligen Aufgabenstellung beim Anwender. Diese Apparatur ermöglicht zudem die Beprobung der Gas-, wie auch der Wasserphase und einen einfachen Wechsel der Perkolationslösung.

Versuchsdurchführung: Nachdem die Proben für die chemische und ggf. mikrobiologische Analyse gezogen worden sind, wird das homogenisierte Bodenmaterial in die Perkolations säule eingefüllt. Danach wird Prozeßwasser in einer Menge zugesetzt, die einen Anstieg des Wasserspiegels über das Niveau der T-Verzweigung (s. Abb. 2.27 (3)) zuläßt. Die Zusammensetzung des Prozeßwassers ist abhängig von der Art und Konzentration der vorliegenden Kontamination, sowie der jeweiligen Fragestellung. Oft wird Leitungswasser benutzt, dem lediglich N- und P- Salze zugesetzt werden. Auf die Zugabe von Spurenelementen kann verzichtet werden, da diese in der Regel vom Boden selbst zur Verfügung gestellt werden. Eine Einstellung des pH-Wertes ist im allgemeinen nicht notwendig; der Ausgangs-pH sollte aber in einem Bereich zwischen 6,5 und 7 liegen.

Nach Anstellen der Druckluft werden Prozeßwasser und CO₂-freie Luft pulsierend über die Perkolations säule geleitet. Während das Wasser über den Vorratsbehälter wieder in den Kreislauf eingeschleust wird, gelangt die Gasphase als Abluft über drei CO₂-Absorptionsgefäße in die Atmosphäre. Die Absorptionsgefäße werden mit 100 ml Natronlauge (44 g/l) gefüllt. In periodischen Abständen wird das der Perkolations säule am nächsten stehende Absorbergefäß entfernt und die Lauge zum Zwecke der CO₂-Bestimmung mit standardisierter Salzsäure zurücktitriert.

Die Versuche werden in der Regel bei Zimmertemperatur in einem abgedunkelten Raum durchgeführt. Die Abdunkelung ist notwendig, um Algenwachstum zu vermeiden. Algenwachstum würde zu Fehlinterpretationen der CO₂-Entwicklung als Parameter für die Atmungsaktivität der mikrobiellen Biomasse führen, da gebildetes Kohlendioxid von den Algen fixiert wird.

Die Versuchsdauer sollte mindestens 28 d betragen. In vielen Fällen hat sich aber gezeigt, daß erst die Verlängerung der Versuchsdauer um ein Vielfaches zu hinreichend aussagekräftigen Ergebnissen führt.

Abwandlungen als Lysimeter: Eine solche Perkolations säule läßt sich auch im nicht gesättigten Fluß betreiben (Lysimeterbetrieb). In einem solchen Fall wird der Boden auf eine bestimmte Feuchte eingestellt und nur mit wassergesättigter Luft durchströmt. In periodischen Abständen wird der Feuchtigkeitsgrad überprüft und entsprechend nachgeregelt. Das Nachregeln geschieht im allgemeinen so, daß die Bodensäule kurzfristig übersättigt wird (Zugesetzte Flüssigkeitsmenge > WHK_{max}) und die überschüssige Flüssigkeitsmenge im Vorratsgefäß aufgefangen wird. Bei einem solchen Betrieb können sich Zugabemenge der Flüssigkeit und Zugabezeitpunkt nach dem tatsächlichen Wettergeschehen richten, so daß dabei bereits Freilandbedingungen simuliert werden können. Will man den Betrieb bei einer exakten Bodenfeuchte fahren, besteht die Möglichkeit ein Tensiometer (Saugkerze mit Manometer) einzubauen. Die Regelung geschieht dann über das Manometer, das einen Kontakt z.B. zu einer Pumpe auslöst, wenn ein festgelegter Saugspannungswert unterschritten wird.

Überstaute Bodensäule: Eine andere Möglichkeit besteht darin die Bodensäule ohne Luftzutritt nur mit Lösung zu durchströmen. In einem solchen Fall empfiehlt es sich, die Säule aufwärts zu durchströmen, um in jedem Fall die noch vorhandene Luft zu verdrängen.

Analytik/Meßparameter: In der Regel wird bei einer solchen Versuchsanordnung ein periodisches Monitoringprogramm durchgeführt, um die mikrobielle Aktivität in der Bodensäule, bzw. die Kinetik des Abbaus zu erfassen. Zum Standardprogramm der kontinuierlich bzw. stichprobenartig durchzuführenden Analysen zählt die CO₂-Bestimmung der Abluft und des DOC-Gehaltes sowie der pH-Wert der Perkulationsflüssigkeit. Spezielle Analysen der wässrigen Phase, wie Keimzahlbestimmungen, Bestimmung der Nährstoffe, ökotoxikologische Untersuchungen und die Bestimmung der originären Schadstoffe oder deren Metabolite sollten zusätzlich durchgeführt werden. Die Schadstoffgehalte des Bodens werden im allgemeinen zu Beginn der Untersuchung und nach Abschluß der Perkolation durchgeführt. Die anzuwendenden Analyseverfahren sind abhängig von der Art der vorliegenden Kontamination.

Bewertung der Ergebnisse

Durch den Betrieb einer Perkolationseinheit können bereits Erkenntnisse über die Kinetik des Schadstoffabbaus gewonnen werden. Während der klassische Betrieb (Durchströmen der Bodensäule wechselweise mit Luft und Flüssigkeit) mehr grundsätzliche Ergebnisse liefert, können im Lysimeterbetrieb Verhältnisse simuliert werden, die z.B. den Verhältnissen in einer Miete (s. Kap. 3.1) oder dem ungesättigten Boden bei *In situ*-Sanierungen (s. Kap. 3.3) weitgehend entsprechen.

Mit Hilfe dieses relativ einfachen Systems ist es möglich, potentielle Verfahrensabläufe einer später erfolgenden Sanierungsmaßnahme zu prüfen und ein für den spezifischen Fall geeignetes Verfahren auszuwählen. Durch Erfassung der Abbaukinetik und Variation des Perkulatorbetriebes ist es weiterhin möglich, Verfahrensoptimierungen für den technischen Betrieb durchzuführen.

In Abhängigkeit von der Fragestellung können der Ablauf des Schadstoffabbaus und Veränderungen im Bodenkörper sehr genau beobachtet werden. Durch den Betrieb einer solchen Perkolationseinheit können Aussagen gewonnen werden über:

- Bildung von Abbauprodukten und CO₂
- Auftreten von toxischen Zwischenprodukten
- Auswascheffekte
- Nährstoffbilanzen
- pH-Wert Änderungen und
- Wirkung von Zuschlag- oder Hilfsstoffen.

Ähnliches gilt beim Durchströmen unter Ausschluß von Luft. Unter solchen Voraussetzungen können Grundwasserfließstrecken weitestgehend simuliert werden.

III. Abbauversuche in überstauten Bodensäulen bei kontinuierlichem Betrieb

Die nachfolgend beschriebenen Versuchssysteme eignen sich zur Untersuchung des Abbauverhaltens von Kohlenwasserstoffen in gut durchlässigen Grundwasserleitern unter aeroben bzw. Nitrat- bzw. Eisen-/Huminstoff-reduzierenden Bedingungen und sind daher insbesondere bei geplanten *In situ*-Sanierungen (s. Kap. 3.3) oder der Prüfung von **Natural Attenuation** Konzepten (s. Kap. 3.3.1.6) sinnvoll. Darüber hinaus lassen sich Optimierungsversuche (z.B. der Einsatz verschiedener Elektronenakzeptoren, Düngerkonzentrationen) durchführen. Das zu untersuchende Bodenmaterial muß eine wasserdurchlässige Struktur aufweisen; in der Regel sind sandig-kiesige Böden geeignet.

Letztere Konzepte gewinnen zunehmend an Bedeutung, so daß die Bewertungsmaßstäbe hier besondere Relevanz gewinnen (siehe auch [21]). Neben der Ermittlung des Verursachers stehen Fragen zur Schadstoffverlagerung mit dem Grundwasserstrom sowie insbesondere auch die biologische Abbaubarkeit unter typischen Aquiferbedingungen im Zentrum des Interesses. In jüngster Zeit werden Methoden zur Beschreibung des biologischen *In situ*-Abbaus entwickelt, welche auf der mikrobiellen Isotopenfraktionierung von Schadstoffen beruhen. Damit kann theoretisch der biologische Schadstoffabbau anhand der Verhältnisse der Kohlenstoffisotope ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) organischer Schadstoffe, unabhängig von anderen Senken wie Adsorption und Verdünnung, im Aquifer erfaßt werden. Sofern diese Konzepte Praxisreife erlangen, ermöglichen sie eine Bewertung des intrinsischen Abbaupotentials und der zu erwartenden Ausbreitung von Schadstofffahnen [34].

Verfahrensbeschreibung (überstaute Bodensäule): Als Reaktionssysteme dienen einfache, kontinuierlich aufwärts durchströmte Festbettreaktoren, die in der Regel aus Glas sein sollten (ca. 8 – 10 cm Innendurchmesser, 40 – 50 cm Länge [18]). Die Reaktoren werden von unten nach oben mit Prozeßwasser durchströmt. Der Reaktorbetrieb mit Strömung von unten nach oben ohne Kreislaufführung wurde aus folgenden Gründen gewählt:

- Die Strömungsführung von unten nach oben stellt in der Säule wassergesättigte Bedingungen bei sehr gleichmäßigem Fluß ein. Totzonen und Kanäle, wie sie in von oben nach unten durchströmten Säulen häufig auftreten, werden vermieden.
- Die kontinuierliche Betriebsweise ohne Rückführung des flüssigen Mediums stellt eine bessere Annäherung der Versuchsbedingungen an die Situation einer realen *In situ*-Sanierung dar, da dort in der Regel zwischen Entnahme- und Infiltrationseinheit eine Wasserreinigung erfolgt.
- Durch Kontrolle chemischer Parameter am Ein- und Ausgang der kontinuierlichen Reaktoren ist eine Bilanzierung des Nährstoff- sowie des Elektronenakzeptorverbrauches möglich.
- Die Einstellung quasi-stationärer Bedingungen und die Änderung der Betriebsbedingungen (Konzentrationsänderungen, Durchflußmengen) sowie deren Auswirkung auf das System sind leichter zu beobachten als in einem Batch-System.

Probenvorbereitung: Das für die Abbauversuche aus einem Schadensfall entnommene kontaminierte Bodenmaterial wird vor Einbau in die Reaktoren vorsichtig homogenisiert. Bei sehr heterogenen Proben empfiehlt sich eine Siebung auf 2 mm Korndurchmesser. Durch den Homogenisierungsschritt als auch durch eine nachgeschaltete Siebung können Verdampfungsverluste leichtflüchtiger Kohlenwasserstoffe auftreten.

Versuchsdurchführung: Die Reaktoren werden mit dem homogenisierten Bodenmaterial befüllt. Pro Versuchsansatz werden ca. 2 kg Bodenmaterial bis zu einer Füllhöhe von ca. 30 cm in die Säulen eingefüllt. Das Bodenmaterial ist mit einem Stampfer gleichmäßig zu verdichten, um einheitliche Fließbedingungen für das Prozeßwasser zu erzeugen. Als wässriges Versuchsmedium (Prozeßwasser) eignet sich in der Regel Leitungswasser, das mit NH_4Cl (15 mg/l) und KH_2PO_4 (10 mg/l) angereichert wird. Als Prozeßwasser kann auch Grundwasser aus dem Standortbereich eingesetzt werden. Der Ausgangs-pH sollte auf 6,5 – 7 eingestellt werden. Auf einen Zusatz von Spurenelementen kann verzichtet werden, da diese aus dem Fein- und Feinstkornanteil des Bodens zur Verfügung stehen. Die Flußrate ist für jeden Reaktor auf 50 ml/h einzuregulieren, was bei einem Säulendurchmesser von 8 cm eine Flächenbelastung von $1 \text{ ml}/(\text{cm}^2 \times \text{h})$ entspricht.

Die Versuchstemperatur sollte sich relativ konstant in einem Bereich von 15 – 21° C bewegen. Zur Verhinderung von Fotooxidationen und Algenwachstum sind die Reaktoren abzudunkeln. Zur Versorgung der Mikroorganismen mit Elektronenakzeptoren eignen sich in dem beschriebenen Versuchssystem Luft, technischer Sauerstoff, Wasserstoffperoxid oder Nitrat.

Luft und technischer Sauerstoff können über eine dem Reaktor vorgeschaltete Blasensäule in das Medium eingebracht werden. H_2O_2 und Nitrat können direkt dem Vorratsbehälter des Prozeßmediums zudosiert werden.

Eine generelle Aussage über die einzusetzende Konzentration ist bei H_2O_2 und Nitrat nicht möglich. Hier muß im Einzelfall im Rahmen der Optimierung eine Anpassung erfolgen. Als günstige "Startkonzentration" haben sich für H_2O_2 150 mg/l und für Nitrat 500 mg/l erwiesen. Beim Einsatz von Luft oder technischem Sauerstoff wird die O_2 -Konzentration durch die maximale Sättigung im Prozeßwasser bestimmt.

Analytik/Meßparameter: Zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende ist das Bodenmaterial auf das vorliegende Schadstoffspektrum hin zu untersuchen. Darüber hinaus ergibt sich oftmals ein besseres Verständnis der ablaufenden Prozesse, wenn weitere mikrobiologische Parameter (Gesamtzellzahlen etc.) mit in diese Untersuchungen einbezogen werden. Während des Versuchszeitraumes, der minimal 30 Tage betragen sollte (ideal sind 60 Tage) kann das in Tab. 2.45 aufgeführte Monitoringprogramm abgewickelt werden (Beprobung am Auslauf, je nach Versuchsbedingungen auch zusätzliche Parameter).

Tab. 2.45: Monitoringprogramm bei kontinuierlich betriebenen, überstauten Bodensäulen

Beprobung	Analyseparameter	Häufigkeit
Prozeßmedium	pH Gelöstsauerstoff Wasserstoffperoxid	täglich
	Ammonium Phosphat Nitrat Nitrit Keimzahlen (CFU)	wöchentlich
Boden	Keimzahlen (CFU)	wöchentlich

Bewertung der Ergebnisse

Die Experimente in überstauten Bodensäulen können folgende Informationen über das Abbauverhalten von Kohlenwasserstoffen in gut durchlässigen Grundwasserleitern geben:

- Simulation von *in situ*-ähnlichen Bedingungen (durch Anpassung der Verweilzeit des Prozeßmediums in der Bodensäule kann das Versuchssystem an spezifische Schadensfallbedingungen angepaßt werden)
- Einsatz verschiedener Elektronenakzeptoren
- Bildung von Abbauprodukten und CO₂
- Auswascheffekte
- Nährstoffbilanzen
- Änderung der physiko-chemischen Bedingungen
- Verstopfungseffekte durch Biomassebildung

Aufgrund der oben dargestellten Kriterien steht mit dem beschriebenen Versuchssystem ein Instrument zur Verfügung, das Vorhersagen im Hinblick auf den Einsatz von "mikrobiologischen *In situ*-Techniken" im wassergesättigten Aquiferbereich erlaubt. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, durch Steuerung der Versuchs-Randbedingungen schadensfallspezifische Konditionen einzustellen. Die erhaltenen Versuchsergebnisse sind aber i.d.R. nicht ohne entsprechende Interpretation der Werte auf die Praxis übertragbar.

IV. Abbauversuche in Suspensionsreaktoren

Der Einsatz von Suspensionsreaktoren erlaubt die Einstellung weitgehend optimaler Wachstumsbedingungen für Mikroorganismen. Gute Stoffverteilung, hoher O₂-Eintrag und die Regelbarkeit des wäßrigen Mediums zeichnen die Suspensionsreaktoren aus. Bei gut fluidisierbaren Feststoffen wie feinkörnigen Böden oder Schlämmen eignen sich solche Reaktoren auch zur Prüfung des mikrobiellen Schadstoffabbaus aus der Feststoffphase, so daß dieser unter optimierten Laborbedingungen untersucht werden kann.

Feinkörnige Böden (hoher Ton- und Schluffanteil), Separationsschlämme aus Bodenwaschanlagen oder andere aus Feststoffen (< 50 µm) zusammengesetzte Schlämme lassen sich nur unzureichend in statischen Verfahren behandeln. Um die mikrobiologische Reinigung solcher Feststoffe prinzipiell zu prüfen, ist es notwendig, dynamische Verfahren anzuwenden. Da hier Suspensionsreaktoren die günstigsten Bedingungen bieten, ist der Einsatz von Airlift- oder Rührreaktoren angezeigt. Aufgrund des zunehmenden Kostendrucks bei biologischen Verfahren haben Verfahren in Suspensionsreaktoren an Bedeutung verloren. Daher wird an dieser Stelle auf die ausführliche Beschreibung der Versuchsreaktoren selbst verzichtet und auf die Literatur verwiesen [18; 28].

Probenvorbereitung: Zur Separierung des Feinstkornanteils werden ca. 5 kg des kontaminierten Bodens in einem 5 l Becherglas mit isotonischem Medium aufgeschwemmt. Nach einer Absetzzeit von 30 – 60 sec. wird der trübe Überstand in ein zweites Gefäß überführt. Der Feststoffanteil wird bestimmt, indem 30 – 50 ml des aufgeschwemmten Materials im Trockenschrank bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen werden.

Beschickung des Airliftreaktors: Der Bodensuspension wird nun so viel Wasser zugegeben, bis ein Feststoffanteil von ca. 20 % eingestellt ist. Mit dieser Feststoffsuspension wird der Airliftreaktor (4 – 6 l Volumen) befüllt und abhängig vom C-Gehalt mit Nährsalzen versetzt. Bei einer Begasungsrate von ca. 1 l Zuluft pro l Reaktorvolumen und Minute wird der Feststoff fluidisiert.

Versuchsdurchführung und Meßprogramm: Nach einer Vermischungsphase von 24 h beginnt die eigentliche Versuchsdurchführung. Für die Startanalyse wird dem Reaktor eine Probe entnommen, mikroskopiert und die Schadstoffzusammensetzung im Boden und im Wasser (filtriert) analysiert. Gleichzeitig findet eine Keimzahlbestimmung (KBE, Koloniebildende Einheiten) auf einem Komplex-Nährboden (s. Kap. 2.3.4.1) und, abhängig vom Schadstoffspektrum, auf definierten Medien (Diesel-, PAK-, Phenol- u.a. Nährböden) statt. Der pH-Wert wird ggf. eingestellt und summarische Parameter wie TOC oder CSB im Bodenmaterial und im Prozeßmedium ermittelt. Die zur Abluftfiltration eingesetzte Aktivkohle wird vor Versuchsbeginn auf ihren Schadstoffgehalt hin überprüft.

In wöchentlichen Abständen wird aus einer Probe der Keimgehalt erfaßt, der pH-Wert gemessen und mikroskopiert. Bei Langzeituntersuchungen (6 Wochen und mehr) findet eine chemische Zwischenanalyse statt (zur Erfassung der Abbaukinetik sind mehrere Zwischenanalysen erforderlich), die sowohl das Schadstoffspektrum als auch die Nährsalzkomponenten (Phosphat, Nitrat-, Nitrit- oder Ammonium-N) berücksichtigt.

Nach Abschluß des Versuches (in der Regel nach 4 – 6 Wochen) wird das Programm der Startanalyse nochmal durchgeführt. Durch Vergleich der Anfangs- und End-Werte lassen sich die Abbauleistungen im Boden berechnen, die Anreicherung von Schadstoffen und unbekanntem Verbindungen sowie die Entgasung flüchtiger, an Aktivkohle adsorbierbaren Verbindungen abschätzen. Die Ergebnisse werden mit dem Verlauf der Keim- oder Zellzahlen und der pH-Kurve verglichen. Je nach Restbelastung des Bodens und Behandlungswassers ist zu entscheiden, ob Toxizitätsuntersuchungen des behandelten Materials erforderlich sind.

Bewertung der Ergebnisse

Generell gelten für die Bewertung dieser Versuche weitgehend die gleichen Kriterien wie in den vorausgegangenen Kapiteln.

Die mit Suspensionsreaktoren im Labormaßstab bei optimalen Bedingungen zu erzielenden Ergebnisse stellen in der Regel die maximal erreichbaren Abbauwerte dar, welche mit biotechnologischen Methoden ohne weitere aktivierende Additive möglich sind. Stellt sich heraus, daß dieses Prüfverfahren nicht zum gewünschten Ziel führt, kann generell auch auf ein Scheitern anderer biologischer Verfahrensvarianten geschlossen werden.

In diesem Falle ist generell die Bioverfügbarkeit bzw. die prinzipielle mikrobielle Abbaubarkeit der Schadstoffe in der Feinkornfraktion zu untersuchen (s. Kap. 2.3.1.2, 2.3.1.3 und 2.3.1.4), sofern dies nicht im Vorfeld bereits erfolgt ist. Aus Kostengründen haben sich Verfahren mit Suspensionreaktoren (s. Kap. 3.2) in der Praxis bisher allerdings kaum durchsetzen können.

2.3.5 Literatur

1. **Alef, K.** 1994. Biologische Bodensanierung – ein Methodenbuch. VCH Weinheim.

2. **Böttger, D.** 1996. Technologische Voruntersuchungen für die mikrobielle Bodensanierung. TerraTech **3/96**: 46-49.
3. **Bollag, J. M.** 1992. Decontaminating soil with enzymes. Environ. Sci. Technol. **26**: 1876-1881.
4. **Burlage, R. S., R. Atlas, D. Stahl, G. Geesey, and G. Sayler.** 1997. Techniques in microbial ecology. Oxford University Press, New York.
5. **Dauids, L, H.-C. Flemming, and P. A. Wilderer.** 1997. Microorganisms and their role in soil. In: Sikdar, S. K., Irvine, R. L. (eds.). Fundamentals and Applications – Vol. 1 Bioremediation: Principles and Practice. Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Basel.
6. **DEV** - Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. VCH, Weinheim.
7. **DVWK** (Hrsg.). 1996. Sanierung kontaminierter Böden. Schriftenreihe des Deutschen Verbandes für Wasserwirtschaft und Kulturbau e. V., Heft 116. Wirtschafts- und Verl.-Ges. Gas und Wasser, Bonn.
8. **Eaton, A. D., L. S. Clesceri, and A. E. Greenberg.** 1995. Standard methods for the examination of Water and Eastewater. American Public Health Association.
9. **Field, J. A., F. Boelsma, H. Baten, and W. H. Rulkens.** 1995. Oxidation of anthracene in water/solvent mixtures by the white-rot fungus, *Bjerkandera* sp. strain BOS55. Appl. Microbiol. Biotechnol. **44**: 234-240.
10. **Field, J. A., M. Kottermann, R. Meulenberg, R. Wasseveld, and T. Grotenhuis.** 1996. Use of white-rot fungi for decontamination of contaminated soil. Proceeding of the Workshop on Contaminated Soils, Technical University of Hamburg-Harburg, April 1996.
11. **Ghoshal, S., A. Ramaswami, and R. G. Luthy.** 1996. Biodegradation of naphthalene from coal tar and heptamethylnonane in mixed batch systems. Environ. Sci. Technol. **30**: 1282-1291.
12. **Haider, K.** 1998. Microbe-soil-organic contaminat interactions. pp. 33-51. In: Bioremediation of contaminated soils. Agronomy Monographs No. 37. ASA, CSSA, SSSA, Madison, Wisconsin.
13. **Hupe, K.** 1998. Optimierung der mikrobiellen Reinigung mineralöl-kontaminierter Böden in statischen und durchmischten Systemen. Hamburger Berichte, Bd. 15. Verlag Abfall Aktuell, Stuttgart.
14. **Hupe, K., M. Koning, J. C. Lüth, J. Heerenklage und R. Stegmann.** 1998. Einsatz von Testsystemen zur bilanzierenden Untersuchung der biologischen Schadstoffumsetzung im Boden. Altlasten Spektrum **6/98**: 360-366.
15. **Kästner, M., B. Mahro, B. und R. Wienberg.** 1993. Biologischer Schadstoffabbau in kontaminierten Böden (unter besonderer Berücksichtigung der Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffe PAK), Hamburger Berichte, Bd. 5, Economica Verlag, Bonn.
16. **Kästner, M., M. Breuer-Jammali, and B. Mahro.** 1998. PAH degradation and survival of degrading bacteria introduced into soil. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 359-362.

17. **Kästner, M.** 2000. The "humification" process or the formation of refractory soil organic matter. p. 89-125. *In*: H.-J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, and P. Stadler (eds.). *Biotechnology*, 2nd. Edition, Vol. 11b; Environmental Processes. Wiley-VCH, Weinheim.
18. **Klein, J.** (Hrsg.). 1992. Labormethoden zur Beurteilung der biologischen Bodensanierung. (Bericht der Ad-hoc-Arbeitsgruppe "Labormethoden ..." des Interdisziplinären Arbeitskreises: Biotechnologie Boden). DECHEMA, Frankfurt.
19. **Klein, J.** (Hrsg.). 1994. Biologische Testmethoden für Böden. (Bericht der Ad-hoc-Arbeitsgruppe "Methoden zur toxikologischen/ökotoxikologischen Bewertung von Böden" des Interdisziplinären Arbeitskreises: Biotechnologie Boden). DECHEMA, Frankfurt.
20. **Köhler, M. und F. Völsgen.** 1998. *Geomikrobiologie*. Wiley VCH, Weinheim.
21. **Kreysa G., T. Track, J. Michels und J. Wiesner** (Hrsg.). Beiträge zum Umweltschutz. 1. Symposiums "Natural Attenuation - Möglichkeiten und Grenzen naturnaher Sanierungsstrategien". DECHEMA, Frankfurt.
22. **Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg** (Hrsg.). 1991. *Handbuch Mikrobiologische Bodenreinigung. Materialien zur Altlastenbearbeitung Band 7*. Karlsruhe.
23. **Lee, L. S., M. Hagwall, J. J. Delfino, and P. S. C. Rao.** 1992. Partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from Diesel fuel into water. *Environ. Sci. Technol.* **26**: 2104-2110.
24. **Lee, L. S., P. S. C. Rao, and I. Okuda.** 1992. Equilibrium partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons from coal tar into water. *Environ. Sci. Technol.* **26**: 2110-2115.
25. **Lotter, S.** 1995. *Biologische Bodenreinigung*. Hamburger Berichte, Abfallwirtschaft, Technische Universität Hamburg-Harburg, Bd. 9. Economica Verlag, Bonn.
26. **Lovley, D. R., J. D. Coates, E. L. Blunt-Harris, E. J. P. Phillips, and J. C. Woodward.** 1996. Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Science* **382**: 445-448.
27. **Luthy, R. G., A. Ramaswami, S. Ghoshal, and W. Merkel.** 1994. Interfacial films in coal tar nonaqueous-phase liquid-water systems. *Environ. Sci. Technol.* **27**: 2914-2918.
28. **Mann, V. G., C. Sinder und J. Klein.** 1996. Scale up und Optimierung eines Suspensionsbioreaktors zur mikrobiellen Behandlung PAK-kontaminierter, bindiger Böden (DMT-BIODYN-Verfahren). S. 435-446. *In*: Stegmann, R. (Hrsg.). *Neue Techniken der Bodenreinigung*. Hamburger Berichte Bd. 10, Abfallwirtschaft TU Hamburg-Harburg, Economica Verlag.
29. **Mueller, J. G., P. J. Chapman, and P. H. Pritchard.** 1989. Creosote contaminated sites: their potential for bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* **23**: 1197-1201.
30. **Mueller, J. G., D. P. Middaugh, S. E. Lantz, and P. J. Chapman.** 1991. Biodegradation of creosote and pentachlorophenol in contaminated groundwater: Chemical and biological assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1277-1285.
31. **Nelson, E. C., S. Ghoshal, J. C. Edwards, G. X. Marsh, and R. G. Luthy.** 1996. Chemical characterization of coal tar-water interfacial films. *Environ. Sci. Technol.* **30**: 1014-1022.

32. **Nordlohne, L., A. Eschenbach, R. Wienberg, B. Mahro und M. Kästner.** 1995. Versuche in Kleinreaktoren und Batchversuche mit Zudotierung ¹⁴C-markierter Schadstoffe. Teilprojekt 4, Wissenschaftliches Untersuchungsprogramm "Veringstraße" (Verbundvorhaben): Sanierungsbegleitende Untersuchung zur Stoffbilanz und zur Metabolitenbildung bei der Durchführung eines Weißfäule-Mietenverfahrens zur Reinigung des PAK-kontaminierten Bodens von dem Schadensfall "Veringstraße 2", Abschlußberichte an die Umweltbehörde der Hansestadt Hamburg, Februar 1995 (siehe auch [38]).
33. **Reasoner D. J., and E. E. Geldreich.** 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 1-7.
34. **Richnow, H. H. und R. Meckenstock.** 1999. Ein neues isotopengeochemisches Konzept zur Kennzeichnung der *in situ*-Biodegradation in kontaminierten Grundwasserleitern. *TerraTech* **5/99**: 38-41.
35. **Riis, V., D. Miethe und W. Babel.** 1998. Grenzen der Sanierbarkeit von Mineralölschadensfällen. *Altlasten Spektrum* **4/98**: 214-218.
36. **Schachtschabel, P., H. P. Blume, G. Brümmer, K. H. Hartge und U. Schwertmann.** 1998. Scheffer/Schachtschabel - Lehrbuch der Bodenkunde. 14. neu bearb. u. erw. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
37. **Schaefer, G.** 1991. Einfluß von Ölmatrix und anderen Kohlenstoff-Kosubstraten auf die Kinetik des mikrobiellen Abbaus polyaromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK). Diplomarbeit, TU Hamburg-Harburg.
38. **Schaefer, G., A. Eschenbach, K. Hupe, J. Heerenklage, J. Lüth, B. Mahro, M. Kästner und R. Stegmann.** 1995. Sanierungsbegleitende Untersuchungen zur Stoffbilanz, Metabolitenbildung und der Entstehung gebundener Rückstände bei der Durchführung eines Weißfäule-Mietenverfahrens zur Reinigung des PAK-kontaminierten Bodens von dem Schadensfall "Veringstraße 2". Teilprojekt 3, Wissenschaftliches Untersuchungsprogramm "Veringstraße" (Verbundvorhaben): Sanierungsbegleitende Untersuchung... (s.o.), Abschlußberichte an die Umweltbehörde der Hansestadt Hamburg, Februar 1995 (siehe auch [32]).
39. **Schinner, F., R. Öhlinger, E. Kandeler, and R. Margesin.** 1996. *Methods in soil biology.* Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
40. **Schlegel, H. G.** 1992. *Allgemeine Mikrobiologie.* Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
41. **Scholz, J., B. G. Müller, J. Schwedes und W. D. Deckwer.** 1996. Verbesserung der mikrobiellen Bodenreinigung in Feststoffreaktoren durch Desagglomeration. S. 411-411. *In*: Stegmann, R. (Hrsg.). *Neue Techniken der Bodenreinigung.* Hamburger Berichte Bd. 10, Abfallwirtschaft TU Hamburg-Harburg, Economica Verlag.
42. **Schroeder, D.** 1984. *Bodenkunde in Stichworten.* Verlag Ferdinand Hirt, Unterägeri, CH.
43. **Schubert, H.** 1984. *Aufarbeitung fester mineralischer Rohstoffe.* Bd. III. VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig.
44. **Tissot, B. P., and D. H. Welte.** 1984. *Petroleum Formation and Occurrence.* 2nd. Edition, Springer-Verlag, Berlin.

45. **Verstraete, W., and W. Devliegher.** 1996. Formation of non-bioavailable organic residues in soil: Perspectives for site remediation. *Biodegradation* **7**: 471-485.
46. **Weißenfels, W. D., H. J. Klewer, and J. Langhoff.** 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 689-696.
47. **White, J. C., J. W. Kelsey, P. B. Hatzinger, and M. Alexander.** 1997. Factors affecting sequestration and bioavailability of phenanthrene in soils. *Environ. Tox. Chem.* **16**: 2040-2045.
48. **Wiesmann, U.** 1994. Der Steinkohleteer und seine Destillationsprodukte - Ein Beitrag zur Geschichte der Technik und der Bodenverschmutzung. S. 3-18. *In*: B. Weigert (Hrsg.). *Biologischer Abbau von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen*, Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung 4, SFB 193, TU Berlin.

2.4 Maßnahmen zur Steuerung der biologischen Aktivität und ihre Wirkungen

Annette Geller

Die biologische Sanierung von Schadensfällen wird durch eine Reihe von Maßnahmen ermöglicht oder beschleunigt, die sich in drei Kategorien unterteilen lassen (s. Tab. 2.46):

- I. Allgemeine Maßnahmen (A) zur Verbesserung der Lebensbedingungen für die Mikroorganismen.
- II. Spezielle Maßnahmen (S), die auf den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Kontaminanten, ihrem Abbauverhalten und den (hydro-)geologischen Gegebenheiten beruhen.
- III. Verfahrenstechnische Maßnahmen, mit denen die biologischen Maßnahmen realisiert werden (s. Kap. 3).

Tab. 2.46: Maßnahmen bei der biologischen Sanierung von kontaminiertem Boden und Grundwasser: A: Allgemeine Maßnahmen, S: Spezielle Maßnahmen.

Parameter	Maßnahmekategorie		siehe Kapitel
Regulation von physikalisch-chemischen Milieufaktoren			
pH-Wert	A		2.4.1.1
Wassergehalt	A		2.4.1.2
Temperatur	A		2.4.1.3
Sauerstoffgehalt	A	S	2.4.2.1, 2.4.2.2
Redoxpotential	A	S	2.4.2.3
Zugabe von Nährstoffen			
Mineralsalze	A		2.4.3.1
Organische Nährstoffe	(A)	S	2.4.3.2
Zugabe von Zuschlagstoffen			
Strukturauflockernde Funktion	A		2.4.3.3
Cosubstratfunktion	(A)	S	2.4.3.2
Zugabe von Tensiden			
Synthetische Tenside		S	2.4.4.1
Biotenside		S	2.4.4.2
Zugabe von Mikroorganismenkulturen			
Bakterien		S	2.4.5
Pilze		S	2.4.5

Die zu den Punkten (I.) und (II.) gehörenden, erforderlichen oder möglichen Maßnahmen sind weitgehend gleich bei *In situ*-, *On site*- und *Off site*-Verfahren (s. Kap. 3). Nur die **Wichtung** ihrer Vor- und Nachteile ist unterschiedlich.

In diesem Kapitel wurden, neben den folgenden Übersichtsartikeln und Büchern [10; 11; 16; 25; 34], die in Kap. 2.1 dargestellten Ergebnisse benutzt. Dort in anderem Zusammenhang aufgeführte und zusätzlich verwendete Literatur wird hier im Kontext zitiert.

2.4.1 pH-Wert, Wassergehalt und Temperatur

Mikroorganismen benötigen bestimmte pH- und Temperaturbereiche und eine Mindestmenge Wasser, um leben und arbeiten zu können. Die Lage der optimalen Bereiche und die Unter- und Obergrenzen, in denen ein Stoffwechsel gerade noch möglich ist, unterscheiden sich nicht nur bei den verschiedenen taxonomischen und physiologischen Bakteriengruppen, sondern schon auf der Ebene der Arten. Infolgedessen setzen sich die Bereiche bei Mischpopulationen immer aus der Summe der Bedürfnisse der einzelnen Mikroorganismen zusammen, und das Optimum zahlenmäßig schwach vertretener Arten oder Gruppen kann schon außerhalb des Optimums der Gemeinschaft liegen.

2.4.1.1 pH Wert

Das pH-Optimum liegt bei den meisten Bakterien in einem Bereich zwischen pH 6,5 und pH 8. In Sanierungsverfahren eingesetzte, ligninolytische Pilze haben niedrigere pH-Optima, die um pH 5 liegen. Die Häufigkeitsverteilung der pH-Werte in unbelasteten Böden ist zweigipfelig. Ein Maximum erstreckt sich vom schwach sauren bis in den schwach alkalischen Bereich (pH 5,9 - 7,8); das zweite liegt im sauren Bereich (pH 3,8 - 4,2) [26]. Nach Schadensfällen und während einer biologischen Sanierung können sich die pH-Werte durch gebildete Teilabbauprodukte und geochemische Prozesse verschieben, wenn die Pufferkapazität des Bodens nicht ausreicht. Verschiebungen des pH-Wertes beeinflussen die Löslichkeiten von Mineralstoffen, Metall- und Schwermetallsalzen und die Konformation – und damit das Bindungsverhalten – von Huminstoffen.

Möglichkeiten der Steuerung des pH-Wertes sind Zugabe von Säuren, Basen, Pufferlösungen wie z.B. Phosphatpuffer (Pufferbereich pH 6 - 8), oder bei Böden Kalkung. Bei einer Regulierung des pH-Wertes in gesättigtem Boden sind pH-aktive, feste Stoffe vorzuziehen, die erst bei Kontakt mit freiem Wasser ihre Wirkung entfalten wie z.B. Kalk (CaO) [KÄSTNER mdl. Mitt.], der sich unter Bildung von stark alkalischem Calciumhydroxid (Ca(OH)₂) löst. Wenn die Pufferkapazität des Bodens erschöpft ist, sollte nicht versucht werden, sie durch Pufferzugabe wiederherzustellen, da es in der Praxis kaum möglich und mit sehr hohem Risiko verbunden ist [ROHNS mdl. Mitt.].

2.4.1.2 Wassergehalt

Da Stoffe nur in gelöster Form in die Zellen aufgenommen und metabolisiert werden können, benötigen Mikroorganismen Wasser zum Leben, d.h. für:

- die Aufnahme von gelösten organischen Substanzen und Mineralsalzen,
- die Ausscheidung von Exoenzymen, die organische Verbindungen in eine für die Aufnahme in die Zelle geeignete Form bringen sollen, wobei als Nebeneffekt Kontaminanten cometabolisch transformiert werden können (z.B. PAK durch ligninabbauende Pilze),
- die Ausscheidung von Stoffwechsel- und Entgiftungsprodukten.

Da Bakterien klein sind, reicht in Böden das Haftwasser um und zwischen den Partikeln zum Leben aus, wenn es ausreichend Nährstoffe enthält. Für Sanierungen wird im Boden in der Regel eine Wassersättigung zwischen 50 und 70 % der maximalen Wasserhaltekapazität als optimal angesehen (s. Kap. 2.3 und Kap. 3). Werte < 50 % der maximalen Wasserhaltekapazität sind bei Reaktorverfahren zu niedrig für Mikroorganismen.

2.4.1.3 Temperatur

Wenn ausreichend Sauerstoff und gut abbaubare Kontaminanten vorhanden sind, kann die Umgebungstemperatur in Böden, *in situ* und *ex situ*, während des aeroben Abbaus von Kontaminanten meßbar ansteigen. Denn die Mineralisierung organischer Substanzen ist auch bei Mikroorganismen mit der Produktion von Wärme verbunden. Das Ausmaß des Temperaturanstiegs hängt von der Menge der verwertbaren Kontaminanten und den Randbedingungen ab. In Mieten kann die Temperatur bei MKW-belasteten Böden auf $\geq 40^\circ\text{C}$ ansteigen.

Die Steigerung der Temperatur wirkt sich auf verschiedene, für biologische Sanierungsverfahren wichtige Größen aus:

- Die Geschwindigkeit der Stoffumsetzungen von Mikroorganismen steigt an und ist aerob mit einem Anstieg des Sauerstoffbedarfs verbunden. Gleichzeitig nimmt die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser ab.
- Die Flüchtigkeit und Wasserlöslichkeit von Kontaminanten nehmen zu, und viskose Verbindungen werden mobiler.
- Die Reaktivität von polaren Verbindungen (z.B. Metabolite) steigt, wodurch Polymerisations- und Bindungsprozesse beschleunigt werden können.

Eine direkte Regulierung der Temperatur ist bei *in situ*-Sanierungen (nahezu) unmöglich. Bei *on site*- und *off site*-Verfahren kann sie durch Erwärmung des Bodens bzw. des Wassers angehoben werden (s. Kap. 3). Voruntersuchungen zur Beziehung zwischen Temperatur und Schadstoffabbau sind hier eine wesentliche Entscheidungshilfe für die Kosten/Nutzen-Rechnung. Ergebnisse von Laboruntersuchungen zur Beziehung zwischen Temperatur und Geschwindigkeit des Abbaus von Kontaminanten sind in Kap. 2.1 für die einzelnen Stoffgruppen zusammengestellt.

In gemäßigten Klimazonen wie in Deutschland, leben Bakterien in tieferen Bodenschichten und im Grundwasser in einer Umgebung mit konstant niedriger Temperatur, und viele Arten wachsen bei $\geq 35^\circ\text{C}$ nicht mehr. Die Vermehrung von standorteigenen Bakteriengemeinschaften bei höheren Temperaturen im Labor führt schon im Bereich von 25°C bis 30°C zu einer Verschiebung des Artenspektrums, wobei u.U. für eine Sanierung nützliche Bakterien verdrängt werden können. Einige Vertreter der anaeroben, LCKW abbauenden

Bakterien haben dagegen ein höheres Temperaturoptimum (s. Kap. 2.1.3), und bei PCBs konnten die Abbauwege in Sedimentproben durch die Inkubationstemperatur gesteuert werden (s. Kap. 2.1.8.2).

2.4.2 Sauerstoff und Redoxpotential

Bei Schadensfällen mit aerob gut abbaubaren Kontaminanten, wie z.B. MKW (s. Kap. 2.1.1), wird im Untergrund zuerst der vorhandene Sauerstoff gezehrt, dann Nitrat, Eisen, Mangan und schließlich auch Sulfat reduziert, wobei das Redoxpotential sinkt. Um den Untergrund zu aerobisieren muß Sauerstoff zugeführt werden. Dabei hat sich gezeigt, daß aufgrund von sauerstoffzehrenden Nebenreaktionen der reale Sauerstoffverbrauch bei *in situ*-Sanierungen von MKW-Schadensfällen etwa sechs mal höher ist, als die für den Abbau benötigte, berechnete Menge.

2.4.2.1 Sauerstoffzehrende Reaktionen und anorganische Fällungsprozesse

Sauerstoffzehrende Prozesse sind für die Sanierungspraxis immer dann wichtig, wenn:

- ein infolge eines Schadensfalles anaerob gewordener Boden oder Grundwasserleiter aerob saniert werden soll,
- bei anaerob/aerob Verfahren von der anaeroben zur aeroben Betriebsweise gewechselt wird.

In Tab. 2.47 sind die verschiedenen Sauerstoff verbrauchenden Prozesse, die dabei gebildeten Produkte, angestrebte Wirkungen – wie z.B. kontrollierte Humifizierung von PAK (s. Kap. 2.2.2.1) und TNT (s. Kap. 2.2.2.2) – und mögliche, unerwünschte Nebenwirkungen aufgelistet.

2.4.2.2 Sauerstoff und Sauerstoffträger

Sauerstoff, Wasserstoffperoxid

Für den aeroben Abbau kann Sauerstoff durch Luft, Pressluft, Reinstsauerstoff, Wasserstoffperoxid oder feste Sauerstoffträger zugeführt werden. Da die Wasserlöslichkeit von reinem Sauerstoff mit rd. 54 mg/l bei 10° C gering ist, kann Wasser mit Wasserstoffperoxid weit über die Löslichkeit hinaus mit Sauerstoff angereichert werden (Tab. 2.48). Wasserstoffperoxid wirkt in höheren Konzentrationen bakterizid und oxidiert als Nebeneffekt organische Substanzen. Wasserstoffperoxid zerfällt in Wasser und Sauerstoff. Wenn es überdosiert wird, können sich Gasblasen bilden und die Porenräume blockieren. Beim Einsatz von Pressluft für den Eintrag von Sauerstoff über die Bodenluft besteht die Gefahr, daß flüchtige Kontaminanten ausgetragen werden.

Tab. 2.47: Sauerstoffzehrende Prozesse bei der Aerobisierung von anaerobem Boden und Wasser.

Sauerstoffverbrauch für	Bildung von	(mögliche) Wirkungen
Abbau organischer Substanzen		
Kontaminanten	CO ₂ , Biomasse Folgereaktion: CO ₂ + Ca ²⁺ Teilabbauprodukte	clogging ¹ Kalkausfällung Festlegung
Organische Nähr- und Zuschlagstoffe mit Cosubstratfunktion	wie oben und Huminstoffe	wie oben und kontrollierte Humifizierung
Oxidation reduzierter Substanzen (vereinfacht)		
Ammonium (NH ₄ ⁺)	Nitrat (NO ₃ ⁻ + H ⁺)	Absinken des pH-Wertes
reduzierter Schwefel (S ⁰ , S ²⁻ , H ₂ S)	Sulfat (SO ₄ ²⁻ + H ⁺)	Absinken des pH-Wertes
reduziertes Eisen allgem. (Fe ²⁺)	oxidiertes Eisen (Fe ³⁺ , u.a. Fe(OH) ₃)	Verockerung ²
Eisensulfid (FeS ₂)	oxidiertes Eisen und Sulfat (Fe ²⁺ + SO ₄ ²⁻ + H ⁺)	Absinken des pH-Wertes
Folgereaktion Fe ²⁺ + SO ₄ ²⁻	Eisenhydroxid (Fe(OH) ₃)	Verockerung ²
reduziertes Mangan allgem. (Mn ²⁺)	Oxidiertes Mangan (Mn ³⁺ , u.a. Mn(OH) ₃)	Ausfällung ²
Manganhydroxide (Mn(OH) ₃)	Manganoxide (MnO ₂)	Ausfällung ²

¹ clogging: Verstopfen des Porenraumes

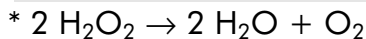
² Damit verbundene Copräzipitation von Leicht- und Schwermetallen

ORC

Eine Neuentwicklung aus den USA ist der Sauerstoffträger **ORC** (**O**xygen **R**elease **C**ompound), dessen wirksamer Bestandteil Magnesiumperoxid ist, das sich in Sauerstoff und Magnesiumhydroxid spaltet ($MgO_2 + H_2O \rightarrow Mg(OH)_2 + \frac{1}{2} O_2$) [7]. Praktische Erfahrungen werden zeigen, inwieweit die Erwartungen erfüllt werden können und ob der Einsatz unter dem Blickwinkel des Kosten/Nutzen-Verhältnisses sinnvoll ist.

Tab. 2.48: Maßnahmen zum Sauerstoffeintrag in Wasser [25; 34]

Maßnahme	Sauerstoffeintrag [mg/l O ₂]
Begasung mit Luftsauerstoff	rd. 10 (10 °C)
Begasung mit reinem Sauerstoff	rd. 50 (10 °C)
500 mg/l Wasserstoffperoxid*	rd. 235
1.000 mg/l Wasserstoffperoxid*	rd. 470



Nitrat

Die fakultativ anaeroben, nitratreduzierenden Bakterien (Denitrifikanten) sind Lebenskünstler: Sie benutzen Sauerstoff als Elektronenakzeptor, so lange er vorhanden ist (aerobe Atmung) und nehmen dann Nitrat zur Oxidation von organischen Substanzen. Dabei wird Nitrat über mehrere Stufen zu molekularem Stickstoff oxidiert, und Nitrit kann zwischenzeitlich akkumulieren ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$). Sobald wieder ausreichend Sauerstoff zur Verfügung steht, schalten die Denitrifikanten auf die für sie stoffwechselphysiologisch ergiebigere aerobe Atmung um (s. Tab. 2.47).

Nitrat wird aus Kostengründen als Dünger (s. Kap. 2.4.3.1) oder als Kalium- bzw. Natriumsalz dosiert. Diese Kationen beeinflussen den Ionenhaushalt des Bodens. Bei der Behandlung von Grundwasser sind die Grenzwerte der Trinkwasserverordnung [32] für Nitrat (50 mg/l), Nitrit (0,1 mg/l), Kalium (12 mg/l), Natrium (150 mg/l) und Calcium (400 mg/l) zu berücksichtigen.

Die Denitrifikation kann zu erhöhter Stickstofffreisetzung und damit zur Verminderung der hydraulischen Durchlässigkeit durch gebildete Gasblasen führen. Neben pulsweiser Zugabe können die einzusetzenden Mengen von Nitrat durch zusätzliche Dosierung von Wasserstoffperoxid herabgesetzt werden.

Kombination von Nitrat und Sauerstoff

Bei der biologischen Sanierung von Kontaminationen mit MKW hat sich die gleichzeitige oder abwechselnde Dosierung von (Luft-)Sauerstoff bzw. Wasserstoffperoxid und Nitrat bewährt [30]. Als günstige Anfangskonzentrationen haben sich 150 ppm Wasserstoffperoxid und 500 ppm Nitrat erwiesen [KÄSTNER mdl. Mitt.]. Teiloxidierte MKW (Alkohole, Aldehyde, Säuren und phenolische Verbindungen) werden anaerob mit Nitrat besser abgebaut, als die nicht oxidierten Ausgangssubstanzen (s. Kap. 2.1.1). MKW werden daher sequentiell, aerob - anaerob, schneller abgebaut als rein anaerob. Nitrat entlastet das Sauerstoffbudget dadurch, daß der Sauerstoffbedarf für den Abbau organischer Substanzen (a) im anaeroben Milieu, in dem eindiffundierender oder zugeführter Sauerstoff sofort gezehrt wird (scheinbare Anaerobiose) und (b) im semiaeroben, sauerstofflimitierten Milieu herabgesetzt wird.

Sulfat

In sauerstoff-freiem Milieu, unter sulfatreduzierenden Bedingungen (s. Tab. 2.49), wird Sulfat von sulfatreduzierenden Bakterien als Elektronenakzeptor für den Abbau organischer

Substanzen benutzt (Sulfatatmung). Dabei entstehen organische Säuren und Wasserstoff, die von anderen anaeroben Bakterien weiter verwertet werden (s. Kap. 2.1.3 LCKW, Kap. 2.1.4 Chlorethene und Tab. 2.50).

In der neuesten Zeit wurde auch der, lange Zeit für unmöglich gehaltene, anaerobe Abbau von MKW in Proben aus langfristig belasteten Arealen mit Sulfat als Elektronenakzeptor nachgewiesen (Kap. 2.1.1). Dieser Prozeß, der ein niedriges Redoxpotential voraussetzt (s. Tab. 2.49), kann über lange Zeiträume im Zuge der Selbstreinigung ein wichtiger Eliminationspfad sein. Sulfatdosierung zur Sanierung von MKW-Schäden in einem strikt anaeroben Milieu, wie in einer US-amerikanischen Veröffentlichung [35] vorgeschlagen, erscheint jedoch nicht sehr sinnvoll. *In situ* sind die umgesetzten Mengen gering, da sich die Sulfatreduzierer nur langsam vermehren (s. Kap. 2.1.1). Außerdem greift die Dosierung von Sulfat in den Schwefelkreislauf ein und verstärkt unerwünschte Nebenwirkungen:

- anaerob: Bildung von Eisensulfid- bzw. Schwefelwasserstoff (FeS, H₂S),
- bei Aerobisierung: Versauerung durch Sulfatbildung (SO₄²⁻ + H⁺).

2.4.2.3 Redoxpotential

Das Redoxpotential wird durch die Menge des vorhandenen bzw. nachgelieferten Sauerstoffs und durch die vorliegende Menge abbaubarer organischer Substanzen gesteuert. Wenn die Sauerstoffzehrung durch biologischen Abbau größer ist als die Nachlieferung, wird das Milieu anaerob, und das Redoxpotential sinkt. Die Reduktion/Zehrung von Nitrat, Sulfat und oxidierten Metallspecies bewirken ein weiteres Absinken (Tab. 2.49). Als **Maßnahme** kann das Redoxpotential durch Dosierung von Sauerstoff und Sauerstoffträgern angehoben und durch Dosierung sauerstoffzehrender, organischer Substanzen (s. Kap. 2.4.3.2 und Tab. 2.50) abgesenkt werden.

Mikroorganismen benötigen, abhängig vom Stoffwechselltyp, unterschiedliche Redoxpotentiale. In Verbindung mit den am Redoxpotential erkennbaren Veränderungen der Lebensbedingungen verschiebt sich auch die Zusammensetzung von Bakteriengemeinschaften (vereinfacht dargestellt):

aeroben → fakultativ anaeroben → eisen- und manganreduzierenden →
strikt anaeroben sulfatreduzierenden → methanbildenden (methanogenen) Bakterien

Gleichzeitig verschiebt sich das Spektrum der verwerteten organischen Substanzen und der Endprodukte der Stoffumsetzungen (Einzelheiten in Kap. 2.1.3). Diese Beziehung zwischen der Abnahme des Redoxpotentials und den ablaufenden Reduktionsprozessen gilt großräumig in Wasser und Boden. Kleinräumig, in sogenannten Mikrohabitaten, gibt es ein Nebeneinander von besser und schlechter mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgten Bereichen und somit ganz unterschiedlichen Redoxpotentialen. Strikt anaerobe, sulfatreduzierende Bakterien sind z.B. auch in "aeroben" Böden, Belebtschlamm [27] und in Biofilmen zu finden.

Tab. 2.49: Beziehung zwischen den Bereichen der Redoxpotentiale und der Abfolge mikrobiologisch katalysierter Redoxreaktionen in Gewässern [31] und in Böden und Sedimenten [20].

Prozesse	Redoxpotential*		
	Gewässer Eh [mV]		Böden, Sedimente Eh [mV]
Sauerstoffatmung	+800	bis +200	
Denitrifikation $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$	+750	bis +50	+300
Manganreduktion $\text{MnO}_2 \rightarrow \text{Mn}^{2+}$	+450	bis +50	+300
Nitratreduktion $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$ $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NH}_4^+$	+400	bis -200	
Eisenreduktion $\text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Fe}^{2+}$	+50	bis < -500	+100
Reduktion organischer Substanzen $\text{C}_{\text{org.}} \rightarrow \text{Organische Säuren}$ $\text{C}_{\text{org.}} \rightarrow \text{Organische Säuren} + \text{H}_2$	-100	bis < -500	
Sulfatreduktion $\text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{S}^{2-}$	-150	bis < -500	-100
Methanbildung $\text{Organische Säuren} \rightarrow \text{CH}_4$	-200	bis < -500	-200

* Alle Angaben gerundet

2.4.3 Nähr- und Zuschlagstoffe

Mikroorganismen benötigen Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphor (C, N, P) zum Aufbau von Biomasse, d.h. Zellwänden, Schleimhüllen, Organellen, Enzymen und den Informationsträgern DNA und RNA. Abhängig von der Zusammensetzung der Zellen und ihrem physiologischen Zustand liegt ihr C : N : P Verhältnis in einem Bereich von

$$\text{C : N : P} = 100\text{-}200 : 10\text{-}30 : 1$$

Diese Zahlen sind die Basis für eine Zugabe von Mineralsalzen und organischen Nährstoffen. Für die Stimulation der biologischen Aktivität werden als optimal für die Praxis C:N:P Verhältnisse zwischen 100 : 5 : 1(2) und 100 : 10 : 10 angegeben, obwohl auch das Verhältnis von 100 : 2 : (0,5) ausreicht [ROHNS mdl. Mitt.] (vergleiche auch Kap. 2.3.2.6 und Kap. 3.1.1.9). Im Einzelfall sollte die erforderliche Dosierung ausgetestet werden, denn die zu dosierenden Mengen hängen ab von:

- den vorhandenen und den angestrebten Zellzahlen,
- der Menge der biologisch abbaubaren Substanzen, Kontaminanten und/oder Zuschlagstoffe und
- den verfügbaren N- und P- Reserven des Bodens.

Bei einer Überschlagsrechnung ist zu beachten, daß bei Wachstumssubstraten etwa 50 % des Kohlenstoffs als CO_2 durch die Atmung verloren geht und nur der Rest als biogener organischer Kohlenstoff übrig bleibt.

2.4.3.1 Mineralsalze

Neben Wasser benötigen Mikroorganismen verschiedene Elemente: Metalle werden in Form ihrer Kationen aufgenommen. Benötigt werden vor allem Kalium und Natrium, aber auch Calcium für den Stofftransport, weitere Metalle und in kleinen Mengen Spurenelemente als katalytische Zentren in Enzymen. Weitere wesentliche Elemente sind Stickstoff, Phosphor und Schwefel als Bestandteile von Zellinhaltsstoffen, die normalerweise als Anionen aufgenommen werden (s. Kap. 2.3.2.6).

Kalium und Natrium liegen bei Sanierungen in der Regel in ausreichenden Konzentrationen vor, und normalerweise reicht die Zufuhr von Stickstoff- und Phosphorsalzen aus, die in Düngern enthalten sind. Lieferanten für Stickstoff sind Ammonium- und Nitrat anionen und Aminogruppen. Lieferanten für Phosphor und Schwefel sind Phosphate und Sulfate. Alle Salze (Kationen + Anionen) der benötigten Elemente müssen gut wasserlöslich sein. Für eine Dosierung infrage kommende Verbindungen sind Kalium- und Natriumnitrat, Ammoniumsulfat, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Ammoniumnitrat, NH_4NO_3 und Harnstoff, $\text{NH}_2\text{-CO-NH}_2$. Die Dosierung von Phosphatlösungen kann *in situ* zu Ausfällungen von Calcium- und Magnesiumphosphaten führen. Durch die Verwendung von Natriummetahexaphosphat, $(\text{NaPO}_3)_n$, früher in Waschmitteln als Komplexbildner für diese Salze verwendet, wurden die Ausfällungen vermieden [28].

2.4.3.2 Organische Nährstoffe

Die bei biologischen Sanierungsverfahren verwendeten Nährstoffe lassen sich nach ihrer Zusammensetzung bzw. Herkunft in zwei Gruppen unterteilen, in:

- I. **Unspezifische organische Nährstoffe**, die das Wachstum eines breiten Spektrums von Mikroorganismen ermöglichen oder beschleunigen sollen. Unspezifische Nährstoffe sind
 - a) undefinierte Nährstoffe oder Gemische, deren Grundbestandteile als chemische Gruppen aus ihrer Herkunft abgeleitet werden können, wie z.B.:
 - Kompost: je nach Herkunft unterschiedliche Anteile von Kohlenhydraten, Aminosäuren, Fettsäuren und Huminstoffen u.a.,
 - Stroh: ligninhaltige Gerüstsubstanzen, Kohlenhydrate
 - Melasse und Zuckerrübenschnitzel: schwerpunktmäßig Kohlenhydrate
 - Nährbouillon: Fleischextrakt, schwerpunktmäßig Aminosäuren
 - Hefeextrakt: Aminosäuren und Vitamine

b) definierte Nährstoffe, wie die praktisch eingesetzten Kohlenhydrate:

- Saccharose: Rohrzucker, Disaccharid aus Fructose
- Glucose: Monosaccharid

Die Zuschlagstoffe Kompost und Stroh sind hier aufgeführt, da sie nicht nur strukturauflockernd wirken, sondern auch Nährstoffe für Bakterien und Pilze enthalten. Bei den Bakterien sind Kohlenhydratverwerter und Aminosäureverwerter zwei stoffwechselphysiologische Großgruppen, in denen verschiedene taxonomische Gruppen vertreten sind.

Innerhalb dieser beiden Großgruppen können jedoch nicht alle Aminosäureverwerter alle Aminosäuren als Wachstumssubstrate nutzen, und nicht alle Kohlenhydratverwerter können alle Zucker abbauen; z.B. sind es bei Glucose nur rd. 30 % der taxonomisch erfassten Arten. D.h. schon die Wahl eines unspezifischen Nährstoffs wirkt selektiv und führt zu Populationsverschiebungen.

II. **Spezifische organische Nährstoffe** sind definierte Substanzen, die nur einzelne stoffwechselphysiologische oder taxonomische Bakteriengruppen verwerten. Diese werden gezielt als Cosubstrate eingesetzt, um spezielle Stoffumsetzungen zu ermöglichen. In der Praxis liegt der Schwerpunkt auf dem aeroben und dem anaeroben Abbau von Chlorethenen. Von dem breiten Spektrum der möglichen Stoffe wurden bisher verwendet:

aerob:

- Aromaten: Toluol und Phenol
- Aliphatische Gase: Methan, Ethen, (Erdgas)

anaerob:

- Alkohole: Methanol und Ethanol
- Salze organischer Säuren: Essigsäure (Acetat), Milchsäure (Lactat) und
- HRC: (**H**ydrogen **R**elease **C**ompound) Polylactatester aus dem Lactat freigesetzt wird, das Bakterien anaerob zu Acetat und Wasserstoff abbauen [7]. In Hinblick auf einen praktischen Einsatz dieser Neuentwicklung gilt das für ORC gesagte.

Gründe für eine Zugabe organischer Nährstoffe

Mit der Maßnahme können, abhängig von den verwendeten Nährstoffen, bei den verschiedenen Gruppen von Kontaminanten unterschiedliche Ziele verfolgt werden (Tab. 2.50):

1. Die Zugabe **unspezifischer Nährstoffe** zielt auf eine schnelle Vermehrung von Bakterien in der Hoffnung, daß mit den Gesamtzellzahlen auch die Zahlen der kontaminantabbauenden Bakterien zunimmt.

Bei der Sanierung von Schadensfällen mit ausreichenden Mengen an Kontaminanten, die als Wachstumssubstrate genutzt werden können (z.B. MKW), ist eine zusätzliche Dosierung von organischen Nährstoffen überflüssig. Ähnliches gilt für Mischkontaminationen aus gut und schlecht abbaubaren Stoffen, wie MKW und PAK auf Gaswerksgeländen. Hier können die Co-Kontaminanten als "Starternährstoffe" und Aromaten zusätzlich als Induktoren dienen. Wenn keine gut abbaubaren Co-Kontaminanten vorhanden sind, kann eine Nährstoffzugabe unter Umständen sinnvoll sein.

2. Ein weiteres Ziel, von – zumindest bis jetzt – eher rein akademischem Interesse, ist die Induktion von Enzymen durch Zugabe **spezifischer Nährstoffe**, die für den Abbau von nicht ohne weiteres umsetzbaren Kontaminanten benötigt werden.
3. **Spezifische und unspezifische Nährstoffe** dienen der Versorgung mit Cosubstraten bei Kontaminanten, die nur cometabolisch umgesetzt werden.

Bei praxisrelevanten Kontaminanten, die nur cometabolisch transformiert werden, haben die zugeführten Nährstoffe als Cosubstrate zwei Funktionen: Sie ermöglichen das Wachstum der Mikroorganismen und die am Abbau der Nährstoffe beteiligten Enzyme transformieren "nebenbei" die Kontaminanten.

4. Das Redoxpotential kann durch Dosierung **spezifischer und unspezifischer Nährstoffe** abgesenkt werden, wenn die Kontaminanten nur bzw. besser anaerob umgesetzt werden.

Die geeigneten Nährstoffe und ihre erforderlichen Mindestkonzentrationen müssen in Voruntersuchungen ermittelt werden. Nach den bisher vorliegenden Erfahrungen reicht es aus, die kostengünstigeren unspezifischen Substrate zu verwenden. Als Nebeneffekt werden beim anaeroben Abbau der Nährstoffe schrittweise die Cosubstrate gebildet, die bei LCKW für die reduktive Dechlorierung nötig sind, wie Lactat, Acetat, Formiat und Wasserstoff, während das Redoxpotential sinkt (s. Kap. 2.1.3.2).

5. Bei Kontaminanten, die biologisch nur unvollständig abgebaut werden, ist die Zugabe von **unspezifischen Nährstoffen** eine Maßnahme zur Festlegung an gebildete Huminstoffe (s. Kap. 2.2).

Die Funktionen der unspezifischen und der spezifischen Nährstoffe überschneiden sich teilweise, so daß es für bestimmte Zielsetzungen zwei oder mehr Auswahlmöglichkeiten gibt. Wesentliche Kriterien für die Entscheidung zwischen mehreren Nährstoffen sind die Antworten auf folgenden Fragen:

- Welcher Nährstoff bietet größere Erfolgschancen?
- Wie sind die Kosten bei vergleichbarem Nutzen?
- Welche Probleme kann es bei der Dosierung geben?
- Welche unerwünschten Nebenwirkungen sind zu berücksichtigen?
- Inwieweit kann auf praktischen Erfahrungen aufgebaut werden?
- Wo ist noch F+E Bedarf für eine weitere Optimierung?

Die zu stellenden Fragen sind bei jeder Stoffgruppe anders gelagert. Die entsprechenden Einzelheiten sind in den jeweiligen Kapiteln zum "Abbau von Umweltschadstoffen" (s. Kap. 2.1) und den zugehörigen Abschnitten "Sanierungspraxis" dargestellt; Testmethoden sind in Kap. 2.3.4 aufgeführt. Weitere Kriterien für die Auswahl bilden verfahrenstechnische Aspekte (Kap. 3), wie z.B. Explosionsschutz beim Einsatz von organischen Gasen, Art des Eintrages und das Sicherstellen, daß die organischen Nährstoffe *in situ* die Zielkontaminanten erreichen.

Tab. 2.50: Zur Steuerung von biologischen Aktivitäten verwendete org. Nährstoffe

organische Nährstoffe	Kontaminanten	Verwendungszweck	Siehe Kapitel
Unspezifische organische Nährstoffe			
Kompost	PAK	Starternährstoffe, Wachstumssubstrat Humifizierung	2.1.2 2.2.2.1
	MKW	Starternährstoffe	2.1.1
Zuckerrübenschnitzel, Melasse	MKW	Starternährstoffe	2.1.1
	TNT	kontrollierte Humifizierung	2.1.9, 2.2.2.2
Stroh	PAK	Cosubstrat für Pilze	2.1.2.2, 2.1.2.6
	CA*	Cosubstrat für Pilze	2.1.8.1, 2.1.8.2
	TNT	Cosubstrat für Pilze	2.1.9, 2.2.2.2
Saccharose	PCE, TCE	Wachstumssubstrat zum Absenken des Redoxpotentials und dabei Lieferung von Cosubstraten ⁺ (organische Säuren und H ₂) für die anaerobe reduktive Dechlorierung	2.1.3.3, 2.1.3.4, 2.1.4.1, 2.1.4.3
	TNT	kontrollierte Humifizierung	2.1.9, 2.2.2.2
Glucose	TNT	kontrollierte Humifizierung	2.1.9, 2.2.2.2
Spezifische organische Nährstoffe			
Phenol, Toluol	TCE, cis-DCE	Cosubstrate für den aeroben Abbau, Dioxygenasen (Toluol: USA, Phenol: NL, USA)	2.1.3.5, 2.1.4.2 (2.1.4.3)
Methan, Ethen, Erdgas	TCE, cis-DCE	Cosubstrate für den aeroben Abbau, Monooxygenasen	2.1.3.5, 2.1.4.2, 2.1.4.3
Methanol, Ethanol, Lactat, HRC	PCE, TCE	Cosubstrate ⁺ für die anaerobe, cometabolische reduktive Dechlorierung	2.1.3.3, 2.1.3.4, 2.1.4.1, 2.1.4.3
Acetat, Formiat, H₂	PCE, TCE	Cosubstrate ⁺ für die anaerobe reduktive Dechlorierung	2.1.3.3, 2.1.3.4, 2.1.4.1, 2.1.4.4

* CA: Chloraromaten

⁺ Elektronendonatoren

2.4.3.3 Zuschlagstoffe

Rindenmulch, Borke (Kiefernborke als Abfallprodukt der Forstwirtschaft), Stroh und Kompost werden bei Mietenverfahren als Zuschlagstoffe verwendet. Die Zuschlagstoffe können eine Steigerung des Abbaus bzw. eine verstärkte Abreicherung von Kontaminanten bewirken durch:

- Steigerung der biologischen Aktivität aufgrund besserer Sauerstoff- und gleichmäßigerer Nährstoffversorgung, die durch die Auflockerung und Strukturverbesserung des Bodens bewirkt wird,
- Cosubstratfunktion bei Kompost und Rindenmulch (vergl. organische Nährstoffe),
- Verringerung der Toxizität und Verbesserung des biologischen Abbaus durch Verdünnung der Bodenbelastung und/oder reversible Bindung durch Sorbentien, z.B. MKW an Kiefernborke oder Pentachlorphenol an Sägemehl [17; 24],
- Verminderung der meßverfügbaren, d. h. nachweisbaren Mengen bei irreversibler Bindung von Kontaminanten und/oder Teilabbauprodukten im Rahmen von Immobilisierungsprozessen,
- Ausgasen von flüchtigen Kontaminanten bei der Bodenvorbereitung während des Untermischens.

In einem rund zweijährigen Großversuch mit Altöl belastetem Standortboden (Pintsch Gelände, Hanau) wurde die **Wirkung verschiedener Zuschlagstoffe** mit Anteilen von Boden : Zuschlagstoff im Verhältnis von 9 : 1 und 7 : 3 verglichen [22]. Bei dem Verhältnis von 9 : 1 waren die Abnahmen der MKW im ersten halben Jahr am höchsten. Während der weiteren 1½ Jahre verringerten sich ihre Konzentrationen nur noch geringfügig. Größere Mengen der Zuschlagstoffe, im Verhältnis von 7 : 3, erhöhten die Eliminationsraten nicht wesentlich; bei Kompost verringerte sich die Abnahme der MKW auf 81 %, was auf Verschlechterung der Sauerstoffzufuhr durch Verkleben des Bodens zurückgeführt wurde.

Nach rund zwei Jahren lagen die Abnahmen der apolaren MKW bei Einsatz der Zuschlagstoffe (Verhältnis 9:1) bei 94 % (Rindenmulch), 92 % (Kompost), 81 % (Tongranulat), 78 % (Stroh) und bei der Kontrolle (nur Boden) nur bei 71 %. Die verstärkten Abnahmen mit Kompost und Rindenmulch wurden auf Förderung des Wachstums der Mikroflora zurückgeführt.

Bilanzierende Laboruntersuchungen zum Verbleib der MKW in mit Dieselöl dotiertem Boden mit **Kompost** aus Biomüll, Laub und Küchenabfällen bei dem als optimal ermittelten Verhältnis von Boden : Kompost von 2 : 1 ergaben eine "Bilanzlücke" von rd. 35 % nach 3,5 Monaten. Im Kontrollboden ohne Kompost betrug sie nur 8 % des organischen Kohlenstoffs. Die Bilanzlücke wurde u.a. auf Festlegungsprozesse zurückgeführt, durch die der Anteil der extrahierbaren, d.h. meßverfügbaren, MKW verringert wird [8].

Der Befund wurde durch Untersuchungen mit Boden und gealtertem Kompost (TS Boden : TS Kompost 8 : 2), ¹⁴C-Hexadecan und ¹⁴C-Anthracen erhärtet [6]. Hexadecan (MKW) wurde entsprechend seiner guten Abbaubarkeit zu 53 % ¹⁴CO₂ mineralisiert; 15,5 % des markierten Kohlenstoffs wurden so festgelegt, daß es nicht mehr extrahiert werden konnte. Anthracen (EPA-PAK) wurde entsprechend seiner schlechteren Abbaubarkeit nur zu 23 % ¹⁴CO₂

mineralisiert, während 42 % des markierten Kohlenstoffs irreversibel gebunden wurde. Im Boden ohne Kompost wurde Anthracen nicht mineralisiert und nur zu < 12 % festgelegt.

Diese und Ergebnisse weiterer Untersuchungen mit Anthracen (und anderen PAK: s. Kap. 2.2.2.1) zeigen zwei mögliche Wirkungen von Kompost:

- Verbesserung der Abbauleistung (Mineralisierung oder Teilabbau) und
- verstärkte Festlegung als gebundene Rückstände, sogenannte "bound residues" in der Huminstoffmatrix.

Die Wirkungen von Kompost sollten vor einem Einsatz geprüft werden, da die Art des zu behandelnden Bodens und die Zusammensetzung des Kompostes wichtig sind. Die Zusammensetzung des Kompostes und damit seine Funktion als Nährstofflieferant und/oder Sorbens hängen von Herkunft und Alter ab (z.B. Biomüll oder Grünschnitt, frisch oder kompostiert).

2.4.4 Tenside

Die Bioverfügbarkeit von Kontaminanten kann limitiert werden durch zu geringe Wasserlöslichkeit, Sorption an Bodenbestandteile wie Huminstoffe und Tonminerale und bei Vorliegen als diffusionslimitierte Restsättigung in Mikroporen. Eine mögliche Maßnahme zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit ist der nicht unumstrittene Einsatz von Tensiden. **Tenside** sind grenzflächenaktive Stoffe mit hydrophoben, an hydrophobe Grenzflächen adsorbierenden, und hydrophilen, wasserlöslich machenden Molekülteilen. Sie wirken als Lösungsvermittler und emulgieren Öl durch Bildung kleinster Tröpfchen (Ö/W-Emulsion). Man unterscheidet synthetische Tenside und die von Mikroorganismen produzierten Biotenside.

2.4.4.1 Synthetische Tenside

Die synthetischen Tenside werden unterteilt in:

1. **Anionische Tenside** mit hydrophilen Säuregruppen, die häufig instabile Emulsionen bilden,
2. **Kationische Tenside** mit hydrophilen Hydroxygruppen, die in hohen Konzentrationen eingesetzt werden müssen und häufig bakterizid und fungizid wirken,
3. **Ampholytische Tenside** mit hydrophilen Säure- und Hydroxylgruppen, die in Abhängigkeit vom pH-Wert in ionisierter Form als Kationen oder als Anionen vorliegen, und die ein gutes Dispergierungs- und Schutzkolloidvermögen haben und
4. **Nicht-ionische Tenside** mit einem neutralen, nicht-ionischen hydrophilen Teil.

Synthetische Tenside dienen der Mobilisierung von Residualphasen (MKW, Teeröle, LCKW) und sollen allgemein durch Solubilisierung kaum wasserlöslicher Kontaminanten die Bioverfügbarkeit erhöhen (MKW, PAK, PCBs) [12; 22]. Kriterien bei der Auswahl von Tensiden sind:

- **Wirksamkeit:** Die Beziehung zwischen der Art des Tensids und der für eine mobilisierende Wirkung einzusetzenden Konzentration.

- **Toxizität:** Die Beziehung zwischen dem Schwellenwert für eine bakterizide oder fungizide Wirkung und der erforderlichen Konzentration für eine emulgierende Wirkung.
- **Biologische Abbaubarkeit:** Eine Abbaubarkeit von > 80 % ist in der Tensidverordnung vorgeschrieben.

Aufgrund dieser Kriterien werden bei biologischen Sanierungsverfahren Handelspräparate aus anionischen und/oder nicht-ionischen Tensiden einzeln oder in Gemischen verwendet [5; 22].

Ein Kriterium für die Auswahl nicht-ionischer Tenside ist ihr HLB-Wert (**H**ydrophilic **L**ipophilic **B**alance), der im Bereich der Werte für die zu mobilisierenden Kontaminanten liegen sollte. Für Mineralöl und aromatenreiche Öle betragen die HLB-Werte (aus [5]):

Benzin	14	Benzol	15
Mineralöl	10-12	Chlorbenzole	13
Paraffinöl	13	Toluol	15
Petroleum	14	Xylole	14

2.4.4.2 Biotenside

Biotenside sind von **Bakterien und Hefen** beim Vorhandensein von Kohlenwasserstoffen und von verschiedenen organischen Nährstoffen synthetisierte, grenzflächenaktive Verbindungen, die hydrophile und hydrophobe Komponenten enthalten. Sie werden von den Mikroorganismen entweder in das umgebende Medium abgegeben oder verbleiben an der Zellwand, die sie als extrazelluläre Hülle umgeben. Biotenside werden meist nach ihrer chemischen Zusammensetzung benannt und in drei Großgruppen unterteilt [4; 18; 23]:

1. **niedermolekulare** Biotenside (Glykolipide mit Zucker- und Fettsäureresten, Lipopeptide) und Stoffe mit Tensidwirkung (Fettsäuren, neutrale Lipide und Phospholipide)
2. **hochmolekulare, amphiphile** Polymere mit einem hydrophoben Ende (Lipopolysaccharide, Lipoglycane und Lipoteichonsäuren) und
3. **hochmolekulare, polyphile** Polymere bei denen hydrophobe Gruppen über das ganze Molekül verteilt sind (hydrophobe Polysaccharide wie z.B. das gut untersuchte Emulsan, ein mit Fettsäuren "gespicktes" Polysaccharid).

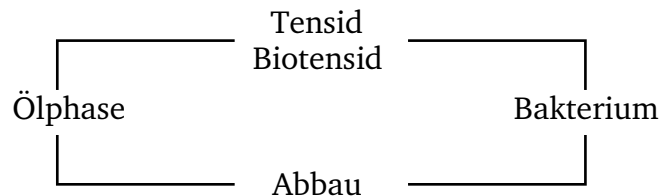
Eine weitere Gruppe bilden die sogenannten "partikulären Polymere" (Polysaccharide, Phospholipide), die als Vesikel in der für den Stofftransport in die Zelle verantwortlichen äußeren Zellmembran zwischen dem Cytoplasma (Zellinneres) und der Zellwand liegen. Die Vesikel sind die wirkungsvollsten Emulgatoren von Ölen.

Die aufgeführten Gruppen von Biotensiden sind nicht nur als Emulgatoren und Vermittler eines Abbaus von Kohlenwasserstoffen wichtig. In ihrer biologischen Grundfunktion dienen sie auch dem schnellen Wechsel zwischen Freischwimmen/Festsitzen und dem langfristigen Festsitzen von Bakterien an Oberflächen, wie z.B. in Biofilmen. Die Zellwände werden, je nach ihren Eigenschaften, durch die Umkleidung mit Biotensiden hydrophil oder hydrophob und die Zellen schwimmen frei oder sitzen fest. Einzelheiten hierzu und zu Eigenschaften und Bildung von Biotensiden können drei neueren Übersichtsartikeln entnommen werden [4; 18; 23].

2.4.4.3 Wirkung von synthetischen Tensiden und Biotensiden

In Öl-, Mineralöl- oder Teeröl-haltigem Wasser haben synthetische Tenside und Biotenside zwei Wirkungen:

1. sie emulgieren wasserunlösliche Kohlenwasserstoffe und
2. beeinflussen positiv oder negativ das Gefüge zwischen



Widersprüchliche Befunde zur Tensidwirkung, Verbesserung oder Verschlechterung des Abbaus von Kohlenwasserstoffen sind auf diese Wechselwirkungen zurückzuführen, wie in letzter Zeit vermehrt durchgeführte Untersuchungen mit Bakterien zeigten [1; 3; 29].

Die Mobilisierung von kaum wasserlöslichen bis wasserunlöslichen Schadstoffen durch **synthetische Tenside** reicht im Idealfall aus, um sie bioverfügbar zu machen. Eine verbesserte Bioverfügbarkeit ist jedoch nicht automatisch mit einer gesteigerten Abbauleistung verbunden, denn die Wechselwirkungen der Oberflächen des emulgierten Öls und der Bakterienzellwände beeinflussen die Gegebenheiten, die ein Bakterium zum Abbau benötigt. In Tab. 2.51 ist die Situation für Bakterien dargestellt, die mit emulgiertem Öl konfrontiert sind.

Tab. 2.51: Wechselwirkungen zwischen durch Tenside emulgiertem Öl, Bakterienzellwänden und Abbau: Ionische Tenside (anionische, kationische und ampholytische Tenside, die einen hydrophoben und einen hydrophilen Molekülteil haben, der abhängig vom pH-Wert in anionischer oder kationischer Form vorliegt; nicht-ionische Tenside (synthetische und Biotenside haben einen neutralen hydrophilen und einen hydrophoben Molekülteil).

Wechselwirkung	Anionisches Tensid, Ladung negativ (-)	Kationisches Tensid, Ladung positiv (+)	Nicht-ionisches Tensid, hydropiler Teil neutral
Hydrophobe Ölschicht	Öl emulgiert Oberfläche hydrophil Ladung (-)	Öl emulgiert Oberfläche hydrophil Ladung (+)	Öl emulgiert Oberfläche hydrophil neutral
Bakterienzellwand	Bakterien mit positiv geladener (+) Zellwand können anheften	Bakterien mit negativ geladener (-) Zellwand können anheften	Bakterien mit hydrophiler Zellwand können anheften
Abbau	Nur für angeheftete Zellen ist ein Abbau des Öls möglich		

Bei ionischen Tensiden beruht die Wechselwirkung auf der Ladung der Tensidmoleküle und der Ladung der Bakterienzellwand: Ungleiche Ladungen der Zelloberflächen und der emulgierten Öltröpfchen ziehen sich an, und die Bakterien können sich anheften; gleiche

Ladungen stoßen sich ab. Bei nicht-ionischen Tensiden beruht die Wechselwirkung auf der Polarität der Moleküle der Zelloberflächen (hydrophil oder hydrophob): Die neutrale hydrophile Oberfläche des emulgierten Öls und Bakterien mit hydrophiler Zellwand ziehen sich an, während sich Bakterien mit hydrophoben Oberflächen nicht anheften können.

Biotenside wirken wie nicht-ionische, synthetische Tenside, wenn sie in das Wasser abgegeben werden. Die hydrophobe Oberfläche des Öls wird hydrophil, da sich das Tensid mit seinem hydrophoben Teil an den Kohlenwasserstoff heftet und seinen hydrophilen Teil in das umgebende Wasser streckt. Wenn die Zelloberfläche der Bakterien ebenfalls hydrophil ist, können sie andocken und die Oberfläche eines Öltropfens besetzen (s. Tab. 2.51).

Bei Zellwänden, die von Biotensiden umhüllt werden oder Tensid-Vesikel enthalten, muß unterschieden werden zwischen schon emulgiertem Öl, das sich wie in Tab. 2.51 dargestellt verhält, und nicht emulgiertem Öl. Hier wirkt die Zelloberfläche selbst als Tensid, wenn sie hydrophob ist, und Bakterien können an ihrer Kontaktfläche durch direkten Abbau von Kohlenwasserstoffen in die Ölschicht bzw. Öltropfen eindringen. Wenn die Zelloberfläche dagegen hydrophil ist, stoßen sich Zellen und Öl ab.

2.4.4.4 Praktischer Einsatz von Tensiden

Synthetische Tenside

In der Sanierungspraxis werden, wenn überhaupt, überwiegend nicht-ionische Tenside, aber auch Gemische, die zusätzlich anionische Tenside enthalten, verwendet. Hinter der international großen Zahl von Handelsnamen stecken die verschiedensten organischen Verbindungen mit unterschiedlichen Großgruppen von hydrophilen und hydrophoben Grundbestandteilen (z.B. Glykolether, Phospholipide, Polyglycoside), die sich in ihren HLB-Werten, ihrer biologischen Abbaubarkeit und ihrer Wirkung auf den Abbau von Kontaminanten unterscheiden. Des weiteren wurde die Eignung von "Naturstoffen", Rhapsöl, Biodiesel (Rhapsölmethylester) und Alkohol als zusätzliche Lösemittel geprüft. Die Zusätze verstärkten die Wirkung der Tenside und wurden zudem als Nährstoffe genutzt (u.a. [13]).

Praxisorientierte Veröffentlichungen zeigen für synthetische Tenside verschiedene grundsätzliche Handicaps:

- die Möglichkeit, daß die Tenside vor den Kontaminanten abgebaut werden und so ihr Abbau durch besser verwertbare Tenside verzögert oder verhindert wird,
- das Problem der Tensidkonzentration, die auf Mikroorganismen noch nicht toxisch aber schon solubilisierend wirken soll,
- das Sicherstellen des für die Mobilisierung erforderlichen engen Kontaktes zwischen Tensid und Öl im Boden,
- der Zeitraum des Einsatzes von Tensiden, der erforderlich ist, um den Abbau von Kontaminanten langfristig zu gewährleisten,
- Kosten, Genehmigung des Einsatzes *in situ* und außerdem
- zehren biologisch abbaubare Tenside von dem Sauerstoff, der für die Sanierung benötigt wird.

Die Bedeutung der einzelnen Punkte hängt von der Art der verwendeten Handelspräparate ab. Es wurde festgestellt, daß die Untersuchungen zu Art, Konzentration und Dosierung von Tensiden noch zu intensivieren sind, und die Wirkung eines biologisch abbaubaren Tensids auf den Schadstoffabbau fallweise zu prüfen ist [16]. Des weiteren ist nicht klar, inwieweit es eine Beziehung zwischen der chemischen Zusammensetzung von Tensiden, der Art des abzubauenen Schadstoffes, MKW oder PAK, und der abbaufördernden oder -hemmenden Wirkung der Tenside auf die Bakterien gibt. Testmethoden für Voruntersuchungen zur Limitierung des Abbaus durch mangelnde Bioverfügbarkeit sind in Kap. 2.3.4.5 aufgeführt.

Biotenside

Biotenside werden von zahlreichen Mikroorganismen produziert, können im großtechnischen Maßstab gewonnen und wie synthetische Tenside bei der Bodenbehandlung verwendet werden. Versuche zur Wirkung wurden schwerpunktmäßig mit niedermolekularen Biotensiden, Rhamno-, Sophorose- und Trehaloselipiden, durchgeführt. Hochmolekulare, polymere Biotenside wurden seltener auf ihre Einsatzmöglichkeit bei der biologischen Sanierung geprüft [2].

Aufgrund der Handicaps der synthetischen Tenside – relative Toxizität und begrenzte Wirksamkeit bei niedrigen Konzentrationen – ist die Verwendung von Biotensiden eine denkbare, allerdings teurere Alternative. Außerdem ist der Sinn und praktische Nutzen dieses Umwegs jedoch mehr als fraglich (s. Kap. 9.6.2). Denn Bakterien können Biotenside direkt an Ort und Stelle produzieren und bauen als Folge Kontaminanten erkennbar ab, wie Schadensfälle mit MKW in der Praxis zeigen. In einer exemplarischen Untersuchung produzierten die Bodenbakterien Biotenside, von denen ein Glykolipid identifiziert wurde. Die Oberflächenspannung sank mit zunehmender Versuchsdauer und Tensidkonzentration auf 25 % des Ausgangswerts. Nach 76 Stunden lagen die Restgehalte der Kohlenwasserstoffe bei der Versuchstemperatur von 25 °C unter 20 % [19].

Das Vorhandensein von MKW ist jedoch nicht automatisch mit der Synthese und Abgabe von Biotensiden verbunden, wie Negativergebnisse zeigen. Die für eine reproduzierbare Biotensidbildung erforderlichen Randbedingungen sind noch unklar. Auch Untersuchungen mit Biotenside produzierenden Reinkulturen ergeben kein einheitliches Bild [4]. Die Kenntnis der Randbedingungen ist jedoch Grundvoraussetzung für die **sinnvolle Maßnahme "Förderung der Biotensidbildung durch standorteigene Bakterien zur Beschleunigung des Abbaus von MKW und Teeröl" bei biologischen *in situ*- und *ex situ*-Verfahren**. Daher sollten Untersuchungen hierzu Gegenstand von gezielten F+E Projekten sein.

2.4.5 Mikroorganismenkulturen

Die Zugabe von Mikroorganismenkulturen (neudeutsch: Bioaugmentation, s. Kap. 3.1.1.7) soll den Abbau von Kontaminanten verbessern oder ermöglichen. Verwendet werden:

1. Mischkulturen, die aus der standorteigenen Mikroflora angereichert wurden und wieder in ihrem Herkunftsort ausgebracht werden, mit der Begründung der Beschleunigung der Sanierung aufgrund der vermehrten Zahl von Kontaminanten-abbauenden Bakterien.
2. Reinkulturen, die aus dem (oder einem vergleichbaren) Standort isoliert wurden und sich durch Stoffwechselaktivitäten auszeichnen, die einen beschleunigten Abbau von Kontaminanten bewirken.

minanten ermöglichen können, wie z.B. ein Bakterienstamm, der Dieselöl schon bei +10 °C vergleichsweise schnell abbaute.

3. Reinkulturen, die aufgrund spezieller Stoffwechselwege bestimmte, schwer-abbaubare Kontaminanten abbauen und z.T. streng definierte Milieubedingungen benötigen, die eingestellt und aufrechterhalten werden müssen. Ein Beispiel hierfür ist ein Bioreaktor mit einer künstlichen Mischkultur aus vier Bakterienstämmen, die PCE zu Ethen abbaut (s. Kap. 2.1.3.2).
4. Genetisch veränderte Reinkulturen, die Plasmide mit Genen zu weiteren Abbauwegen enthalten und durch diese neu erworbenen Fähigkeiten schwer abbaubare Stoffe, wie z.B. PCBs (Kap. 2.1.5.2), effizienter transformieren können.
5. Verschiedene Arten von ligninabbauenden Weißfäulepilzen, die – mit Stroh vermischt – in Böden die Transformation (s. Kap. 7, 9.2.6, 9.2.7 und 9.5.3) von schwer-abbaubaren Stoffen ermöglichen bzw. beschleunigen.

2.4.5.1 Faktoren, die die Wirkung zugesetzter Kulturen beeinträchtigen

Die Wirkung von zugegebenen Mikroorganismen wird durch zwei Faktoren negativ beeinflusst, von denen der erste vermeidbar ist. Durch schlechte Wahl der Anzuchtbedingungen – Vollmedium, das gut abbaubare Nährstoffe in hohen Konzentrationen enthält und/oder möglichst warm, um schnell hohe Zellzahlen zu erhalten – werden für den Einsatz an kontaminierten Standorten ungeeignete Mikroorganismen angereichert. D.h. die Bedingungen der Anzucht müssen sich von vorne herein an dem späteren Milieu, normalerweise kalt und arm an leicht verwertbaren Substraten und fast ausschließlich Kontaminanten als Nährstoffe, orientieren.

Der zweite Faktor ist naturgegeben, da kontaminierte Standorte normalerweise nicht steril sind. Der Nutzen der Zugabe von Mikroorganismen wird dadurch drastisch eingeschränkt, daß die autochthone Mikroflora besser an ihre Umgebung angepasst ist, als die zugegebenen Bakterien und im Konkurrenzkampf erprobt, so daß es die Neuankömmlinge schwer haben. Neben der Konkurrenz um anorganische und organische Nährstoffe ist die Ausscheidung von Antibiotika ein wirkungsvoller Mechanismus zur Abschreckung unerwünschter Nachbarn im Boden. Selbst in den wenigen Fällen, in denen der Einsatz von Spezialkulturen sinnvoll ist, wie bei gezielt steuerbaren Bioreaktoren, kann die Maßnahme daher fragwürdig werden.

2.4.5.2 Erfahrungen und Konsequenzen

Der Einsatz von Mischkulturen, die aus der standorteigenen Mikroflora angereichert wurden (Punkt 1), kann in der Anfangsphase den Abbau von Kontaminanten beschleunigen. Über den gesamten Sanierungszeitraum zeigen beimpfte Böden im Vergleich mit unbeimpften Kontrollen jedoch keine Verbesserung der Gesamtleistung, wie für MKW häufig nachgewiesen. Durch die flankierenden Maßnahmen zur Milieuverbesserung werden auch die standorteigenen Mikroorganismen aktiviert. Bei zugegebenen Reinkulturen (Punkte 2 – 4) wirkt sich die Konkurrenz durch die standorteigene Mikroflora verstärkt aus. In allen Untersuchungen in denen die Überlebensfähigkeit von Spezialkulturen geprüft wurde, verdrängten die

standorteigenen Bakterien die Kulturen, die im Verlauf von ein bis mehreren Monaten abstarben.

Ein positiver Nebeneffekt von zugegebenen Bakterienstämmen mit speziellen Eigenschaften (Punkt 4) ist die Weitergabe dieser Eigenschaften an die autochthone Mikroflora durch horizontalen Gentransfer. Die praktische Bedeutung dieses Transfers lässt sich nur indirekt aus Beispielen ableiten, wie z.B. nach vielen Jahren auftretende, bestimmte Abbauleistungen im Freiland oder auch die Zunahme antibiotikaresistenter Stämme in Krankenhäusern [9; 14; 15; 17; 21; 33].

Bei der Zugabe von Pilzen (Punkt 5) wurden widersprüchliche Ergebnisse erhalten. Handicaps bei der Transformation von Kontaminanten durch ligninabbauende Weißfäulepilze sind:

- die Handhabung, d.h. die Art der Lagerung während des Transportes und die sachgerechte Einbringung und Behandlung im Boden,
- die nur geringfügige Mineralisierung und
- die Bildung von Teilabbauprodukten.

Wenn der Teilabbau zu Produkten führt, die in der Humusfraktion irreversibel gebunden werden, ist er von Vorteil. Der in Laboruntersuchungen erfolgversprechende Einsatz von Pilzen scheitert in der Praxis wahrscheinlich meist an den vom Labor abweichenden Gegebenheiten im Boden und mangelnder Erfahrung im Umgang mit Pilzen.

Konsequenzen

Aus den bisherigen Erfahrungen ergibt sich als Konsequenz, daß der Einsatz von Kulturen bei den meisten biologischen Sanierungen, speziell bei Schadensfällen mit MKW, überflüssig ist. In der Regel sind bei den meisten Schadstoffgruppen *in situ* Mikroorganismen vorhanden, die die Zielkontaminanten umsetzen können (s. Abschnitte Selbstreinigungspotential Kap. 2.1.1 - 2.1.9). Nur ihre Zahl muß durch Verbesserung bzw. Anpassung der Milieubedingungen an die jeweiligen Bedürfnisse erhöht werden.

In speziellen *on site*-(Reaktor-)Verfahren und bei der Reinigung sporadisch anfallender, belasteter Wässer kann die Zugabe von Spezialisten u.U. sinnvoll sein. Bei den speziellen Reaktorverfahren müssen die Milieubedingungen so selektiv gewählt werden, daß ein Verdrängen durch standorteigene Mikroorganismen nicht möglich ist. Künstliche Systeme sind jedoch auf die Dauer recht störanfällig, wie z.B. schon die "Mondphasen" bei Reinkulturen in der großtechnischen Produktion von Pharmaka zeigen. Daher sollte auch hier versucht werden, Kontaminanten umsetzende Mikroorganismengemeinschaften (Consortien) direkt im Verfahren anzureichern, auch wenn die Adaptations-, d.h. Einfahrphase Geduld erfordert.

2.4.6 Literatur

1. **Allen, C. C. R., D. R. Boyd, F. Hempenstall, M. J. Larkin, and N. D. Sharma.** 1999. Contrasting effects of a nonionic surfactant on the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons to *cis*-dihydrodiols by soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1335-1339.

2. **Barkay, T., S. Navon-Venezia, E. Z. Ron, and E. Rosenberg.** 1999. Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier Alasan. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:2697-2702.
3. **Bruheim, P., H. Bredholt, and K. Eimhjellen.** 1999. Effects of surfactant mixtures, including Corexit 9527, on bacterial oxidation of acetate and alkanes in crude oil. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1658-1661.
4. **Desai, J. D., and I. M. Banat.** 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:47-64.
5. **Hurtig, H.-W., T. Knacker, H. Schallnass und G. Arendt.** 1988. In-situ Mobilisierung von Restölkonzentrationen im Boden: Entwicklung eines Verfahrens zur Auswahl von ölmobilisierenden Detergentien. In: *Contaminated Soil '88*. Wolf, K., van den Brink, W., J., , and Colon, F. J. Eds. Kluwer Academic Publishers pp. 941-948.
6. **Kästner, M., S. Lotter, J. Heerenklage, M. Breuer-Jammali, R. Stegmann and B. Mahro.** 1995. Fate of ¹⁴C-labeled anthracene and hexadecane in compost manured soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**:1128-1135.
7. **Koenigsberg, S., W. Farone und T. Raphael.** 1999. Biologischer Abbau von Grundwasserkontaminationen mit ORC[®] und HRC[™]. In *DECHEMA Fachgespräche Umweltschutz: Natural Attenuation, Möglichkeiten und Grenzen naturnaher Sanierungsstrategien. Resümee und Beiträge zum 1. Symposium Natural Attenuation vom 27. bis 28. Oktober 1999 bei der DECHEMA e.V., Frankfurt a.M., S. 224.*
8. **Koning, M., K. Hupe, J. Braukmeier, J.-C. Lüth, I. Cohrs und R. Stegmann.** 1999. Biologische Bodensanierung: Bilanzierende Laboruntersuchungen und Verfahrensoptimierung in der Sanierungspraxis. In: *Biotechnologie im Umweltschutz, Bioremediation: Entwicklungsstand - Anwendungen - Perspektiven. Initiativen zum Umweltschutz 12.* S. Heiden, R. Erb, J. Warrelmann und R. Dierstein Hrsg. Erich Schmidt Verlag, pp.124-131.
9. **Krumme, M. L., K. N. Timmis, and D. F. Dwyer.** 1993. Degradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4 and the constitutive mutant strain G4 5223 PR1 in aquifer microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:2746-2749.
10. **Lexikon der Biochemie.** 1995. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
11. **LFU, Materialien zur Altlastensanierung.** 1991. Handbuch Mikrobiologische Bodenreinigung. Bearbeiter Geller, A., Brauch, H.J., Werner, P., Berberich, G. Landesanstalt für Umweltschutz Baden Württemberg (Hrsg.), Karlsruhe.
12. **Löffler, F. E., J. M. Tiedje, B. Z. Fathepure, K. F. Hayes, L. M. Abriola, K. D. Pennell, and P. Adriaens.** 1998. Remediation of chlorinated solvents at the Bachman road site using innovative technologies. Workshop: Abbau chlorierter Kohlenwasserstoffe, 28. und 29. Sept. 1998, Fraunhofer-Institutszentrum Stuttgart, D. Bryniok, P. Koziollek Hrsg. Bezug über Dr. D. Bryniok, Fraunhofer Institut IGB Nobelstr. 12, 70569 Stuttgart. Nr. 14, 6 pp.
13. **Mann, V. G., J. Klein und D. C. Hempel.** 1998. Optimierung eines Suspensionsreaktorverfahrens zur biologischen Sanierung feinkörniger Böden. *Chem. Ing. Tech.* **70**:427-431.

14. **Margesin, R. and F. Schinner.** 1997. Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:2660-2664.
15. **Massol-Deya, A., R. Weller, L Rios-Hernandez, J.-Z. Zhou, R. F. Hickey, and J. M. Tiedje.** 1997. Succession and convergence of biofilm communities in fixed-film reactors treating aromatic hydrocarbons in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:270-276.
16. **Michaelsen, M.** 1999. Biologische Bodensanierungsverfahren- Stand, Praxis und Möglichkeiten. In: *Biotechnologie im Umweltschutz, Bioremediation: Entwicklungsstand- Anwendungen- Perspektiven. Initiativen zum Umweltschutz 12.* S. Heiden, R. Erb, J. Warrelmann und R. Dierstein Hrsg. Erich Schmidt Verlag, pp.186-194.
17. **Miethling, R., and U. Karlson.** 1996. Accelerated mineralization of pentachlorophenol in soil upon inoculation with *Mycobacterium chlorophenolicum* PCP1 and *Sphingomonas chlorophenolica* RA2. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:4361-4366.
18. **Neu, T., R.** 1996. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microb. Rev.* **60**:151-166.
19. **Oberbremer, A., and R. Hüller-Hurtig.** 1989. Aerobic stepwise hydrocarbon degradation and formation of biosurfactants by an original soil population in a stirred reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**:528-586.
20. **Patrick, W. H., R. P. Gambrell, and S. P. Faulkner.** 1996. Redox measurements of soils. In: *Methods of soil analysis part 3, chemical methods.* Bigham J., M., and J., M. Bartels eds., No 5 in the soil science Society of America book series. Published by Soil Science Soc. Amer., Inc., Amer. Soc. Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, USA. Chap. 42, pp.1255-1273.
21. **Peters, M., E. Heinaru, E. Talpsep, H. Wand, U. Stottmeister, A. Heinaru, and A. Nurk.** 1997. Acquisition of a deliberately introduced phenol degradation operon, *pheBA*, by different indigenous *Pseudomonas* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4899-4906.
22. **Ripper, J.** 1995. Untersuchungen zur Optimierung des mikrobiellen Ölabbau unter Verwendung verschieden Maßstäblicher Versuchssysteme. Dissertation D83 TU Berlin.
23. **Rosenberg, E., and E. Z. Ron.** 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**:154-162.
24. **Salonen, M., P. Middeldorp, M. Briglia, R. Valo, M. Haggblom, and A. McBain.** 1989. Clean up of old industrial sites. In: *Advances of Applied biotechnology, Vol. 4,* D. Kamely, A., Chakrabarty, G. Omenn eds., Gulf Publishing Company Houston TX., pp. 347-367.
25. **Schäfer-Treffenfeldt, W.** 1996. Mechanismen und Einflußfaktoren bei der mikrobiologischen In-situ-Sanierung von Böden. 11. DECHEMA-Fachgespräch Umweltschutz, In-situ-Sanierung von Böden. pp.29-38.
26. **Scheffer/Schachtschabel.** 1989. Lehrbuch der Bodenkunde. 12., neu bearbeitete Auflage von Schachtschabel, P., Blume, H.P., Brümmer, G., Hartge, K.-H., and U. Schwertmann. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart. 491 Seiten.

27. **Schramm, A., C. M. Santegoeds, H. K. Nielsen, H. Ploug, M. Wagner, M. Pribyl, J. Wanner, R. Amann, and D. de Beer.** 1999. On the occurrence of anoxic microniches, denitrification, and sulfate reduction in aerated activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4189-4196.
28. **Steiof, M. und W. Dott.** 1996. Wasserpfadbezogene Bewertung einer mikrobiologischen In-situ-Sanierung. 11. DECHEMA-Fachgespräch Umweltschutz, In-situ-Sanierung von Böden. pp.365-376.
29. **Stelmack, P. L., M. R. Gray, and M. A. Pickard.** 1999. Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:163-168.
30. **Stieber, M.** 1997. Erfahrungen zum biologischen in-situ-Abbau von Kohlenwasserstoffen in Grundwässern. 12. DECHEMA-Fachgespräch Umweltschutz: Möglichkeiten und Grenzen der Reinigung kontaminierter Grundwässer. pp. 387-399.
31. **Stumm, W., and J., J. Morgan.** 1996. Redox conditions in natural waters. In *Aquatic Chemistry 3rd Ed.* J. Wiley & Sons, Inc. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore Chap. 8.5, pp. 464-507.
32. **Trinkwasserverordnung IX-4 (TVO).** 1991. Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe, zuletzt geändert am 1. April 1998, BGBl.
33. **Valenzuela, J., U. Bumann, R. Cespedes, L. Padilla, and B. Gonzales.** 1997. Degradation of chlorophenols by *Alcaligenes eutrophus* JMP134(pJ4) in bleached kraft mill effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:227-232.
34. **Voigt, H.-J.** 1990. Hydrogeochemie. Springer-Lehrbuch. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong. 310 S.
35. **Weiner, J. M., T. S. Lauck and D. R. Lovley.** 1998. Enhanced anaerobic benzene degradation with the addition of sulfate. *Bioremediation J.* **2**:159-173.

2.5 Parameter und Methoden zur Beurteilung der Qualität sanierter Böden

2.5.1 Ökotoxikologische Testverfahren

Susanne Fleischmann

2.5.1.1 Einleitung

Der Boden erfüllt natürliche Funktionen *"als Lebensgrundlage und Lebensraum für Menschen, Tiere, Pflanzen und Bodenorganismen, Bestandteil des Naturhaushalts und Abbau-, Ausgleichs- und Aufbaumedium für stoffliche Einwirkungen auf Grund der Filter-, Puffer- und Stoffumwandlungseigenschaften, insbesondere zum Schutz des Grundwassers"* (BBodSchG § 2 Abs. 2 [4]).

Zur Bewertung von Verdachtsflächen, schädlichen Bodenveränderungen, altlastenverdächtigen Flächen und Altlasten wurden in der Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung (BBodSchV 1999 [5]) im Anhang 2 Vorsorge-, Prüf- und Maßnahmenwerte für die Pfade Boden – Mensch, Boden – Grundwasser und Boden – Nutzpflanze festgelegt. Die Lebensraumfunktion für Bodenorganismen und die von ihnen gesteuerten Prozesse blieben dagegen bisher unberücksichtigt.

Die Bewertung schadstoffbelasteter Böden und Bodenmaterialien ist derzeit ausschließlich auf chemische Analysen begrenzt. Ein Boden gilt als "sauber", wenn die für die jeweilige Nutzung vorgesehenen Restkonzentrationen bzw. Vorsorgewerte an Schadstoffen nicht überschritten werden. Die alleinige Beurteilung kontaminierter bzw. sanierter Bodenproben aufgrund physikalisch/chemischer Untersuchungen ist jedoch aus folgenden Gründen nicht sinnvoll:

- Böden von Altlastenstandorten sind häufig mit Kombinationen zahlreicher Schadstoffe belastet, deren mögliche synergistische Wirkungen bislang unbekannt sind und deshalb bei der Aufstellung von Prüf- oder Maßnahmewerten nicht berücksichtigt wurden.
- Altlastenstandorte sind ebenfalls oft mit Kontaminationen unbekannter Art belastet, die im Zuge der Routineanalytik nicht erfasst werden.
- Das von Schadstoffen ausgehende Gefährdungspotential wird von den abiotischen Eigenschaften der Bodenmatrix (pH-Wert, Humusgehalt etc.) und den chemischen Eigenschaften des Schadstoffes wesentlich beeinflusst. Schadstoffgesamtgehalte eignen sich deshalb wenig zur Bewertung der Mobilisierbarkeit und Bioverfügbarkeit für biologische Systeme.
- Bei Sanierungsverfahren können toxische Schadstoffmetabolite/Zerfallsprodukte gebildet werden bzw. in den Boden eingetragen werden, deren Vorhandensein im Zuge der Kontrollanalytik nicht erfasst wird.

Gegenüber der herkömmlichen Beurteilung von Böden bieten **ökotoxikologische Testverfahren** entscheidende Vorteile. Sie integrieren die Effekte aller wirksamen Schadstoffe: Effekte von Schadstoffen, die nicht routinemäßig erfasst werden, Effekte von Schadstoffmetaboliten und Kombinationseffekte von Schadstoffgemischen. Sie sind deshalb eine notwendige und wertvolle Ergänzung zur Schadstoffanalytik, insbesondere bei der Gefährdungsabschätzung für Böden/Bodenmaterialien.

Testverfahren zur Gefährdungsabschätzung von Sickerwässern und Eluaten belasteter Standorte werden bereits angewendet [6] und für die Beurteilung von Altlasten diskutiert [16; 22].

2.5.1.2 Auswahl ökotoxikologischer Testverfahren

Testverfahren können sowohl im Rahmen von Detailuntersuchungen für die Bewertung des ökotoxikologischen Potentials von kontaminierten Böden und Bodenaushub (Detailuntersuchungen) eingesetzt werden als auch zur orientierenden Verlaufskontrolle bei biologischen Bodensanierungen und schließlich zur Erfolgskontrolle von Sanierungen.

Für repräsentative Aussagen zur Ökotoxizität ist es notwendig, Testorganismen verschiedener taxonomischer und trophischer Gruppen auszuwählen sowie verschiedene ökotoxikologische Meß-Endpunkte (s. Kap. 4.2). Die Auswahl der biologischen Testverfahren kann jedoch in Abhängigkeit von der zukünftigen Nutzung der Böden und den jeweiligen Schutzgütern eingegrenzt werden (Tab. 2.52).

Tab. 2.52: Auswahl geeigneter Testverfahren in Abhängigkeit von der geplanten Nutzung (nach KREYSA & WIESNER [19], verändert)

Bodennutzung	Bodenfunktionen		
	Rückhaltefunktion Wasserpfad	Lebensraumfunktion	
		Pflanzenstandort	Bodenbiozönose
Böden	Nachweis einer biologischen Wirksamkeit		
unter versiegelten Flächen	nein*	nein	nein
nicht versiegelte, gewerblich genutzte Flächen	ja	nein	nein
Deponieabdeckung	ja	(ja)	nein
Grün-, Park- und Freizeitflächen	ja	(ja)	(ja)
Flächen mit gärtnerischer oder landw. Nutzung	ja	ja	ja
Wohngebiete, Kinderspielflächen	ja	ja	ja

* gilt nur für den Bereich der ungesättigten Bodenzone

() nur qualitative Testauswertung, ggf. Einzelfallentscheidung

Besondere Bedeutung kommt der **Rückhaltefunktion** der Böden/Bodenmaterialien zu. Die wasserlösliche Fraktion an Schadstoffen und Metaboliten kann nicht nur mit dem Sickerwasser ausgewaschen werden und das Grund- bzw. Trinkwasser kontaminieren, sondern weist auch das höchste akute Wirkpotential für Mikroorganismen, Pflanzen und Bodentiere auf. Zur Überprüfung der **Rückhaltefunktion** müssen Bodeneluate hergestellt und deren ökotoxikologisches Potential überprüft werden. Es kann sich als notwendig erweisen, zusätzlich Untersuchungen zur Genotoxizität anzuschließen, insbesondere wenn bei der chemischen Analytik bereits genotoxisch wirkende Stoffe nachgewiesen wurden.

Sollen sanierte Böden als Deponieabdeckung, Grün-, Park- und Freizeitflächen oder für landwirtschaftliche Nutzung verwendet werden, müssen zusätzlich die **Lebensraumfunktionen Pflanzenstandort und Bodenbiozönose** untersucht werden. Je nach zukünftiger Nutzung kann es hier notwendig sein, sowohl Kurzzeittests (z. B. Akuttests) als auch Langzeittests (z. B. Reproduktionstests) durchzuführen.

2.5.1.3 Zusammenstellung einer Testbatterie

Für die routinemäßige Untersuchung von Boden(-materialien) auf ökotoxikologische Befunde eignen sich insbesondere einfach durchzuführende Testverfahren mit eindeutigen Ergebnissen. Die Eignung der Testverfahren für die Erfolgskontrolle bei Bodensanierungen wird nach folgenden Kriterien bewertet:

1. **Akzeptanz, Standardisierungsgrad:** Viele ökotoxikologische Testverfahren haben bereits einen hohen Grad der Standardisierung erreicht. Dies gilt vor allem für aquatische Testsysteme, die bei der Bewertung der Rückhaltefunktion von Böden bzw. Bodenmaterialien z.T. routinemäßig eingesetzt werden. Sie eignen sich deshalb grundsätzlich zur Erfolgskontrolle bei der Bewertung von Altlasten und kontaminierten Böden. Die Anwendbarkeit von Testsystemen, die für die Chemiekalorienprüfung bzw. die Untersuchung von Wasser und Abwasser und nicht für die ökotoxikologische Bewertung von Bodenmaterialien bzw. kontaminierten Böden entwickelt wurden, bedarf einer eingehenden Prüfung (s. Kap. 9.3 "Ökotoxikologische Testbatterien"). Ihr Einsatz bei der ökotoxikologischen Untersuchung von Böden ist ebenfalls grundsätzlich möglich, es müssen ggf. Anpassungen im Testprotokoll vorgenommen werden.
2. **Praktikabilität, apparativer und zeitlicher Aufwand, Durchführbarkeit:** Im Hinblick auf eine routinemäßige Anwendung können nur solche Verfahren in eine Testbatterie ökotoxikologischer Tests aufgenommen werden, die hinreichend empfindlich Störungen mit ausreichender Genauigkeit anzeigen. Einfache Verfahren mit geringem apparativen Aufwand sind gegenüber aufwendigen, nur in wenigen Speziallabors durchzuführenden zu bevorzugen (vor allem aus Kostengründen).
3. **Ökologische Signifikanz:** Biologische Testverfahren zur Bewertung der Bodenqualität bzw. zur Gefährdungsabschätzung lassen sich generell in drei Hauptgruppen einteilen:
 - a. Tests mit standorteigenen Organismen: Der Zustand der standorteigenen Organismen wird überprüft bzw. standorteigene Organismen werden im Testsystem eingesetzt. Zu dieser Kategorie gehören z. B. der Test auf Bodenatmung und der Test auf potentielle Nitrifikation.

- b. Tests mit standortfremden, aber bodentypischen Organismen und Testsystemen: Es werden Organismen eingesetzt, die nicht unbedingt von dem zu untersuchenden Boden(-material) stammen, aber typischerweise in Böden vorkommen. Zu dieser Kategorie gehören z. B. der Pflanzenwachstumshemmtest und Tests mit terrestrischen Invertebraten.
- c. Tests mit bodenuntypischen Organismen und Testsystemen: Diese Tests arbeiten mit biologischen Systemen und Organismen im Sinne von Bioindikation oder Meßsensoren. Zu diesen Tests gehören Leuchtbakterientest, Algentest und Daphnientest.

Auf die Testverfahren kann an dieser Stelle nicht ausführlich eingegangen werden, hier kann nur auf die Zusammenstellungen geeigneter Testverfahren hingewiesen werden [6; 16; 19; 22] und siehe Kap. 9.3.

4. **Empfindlichkeit:** Schädigungen der jeweiligen Bodenfunktion bzw. Organismengruppe durch relevante Schadstoffe müssen empfindlich angezeigt werden.
5. **Reproduzierbarkeit der Testergebnisse:** Tests müssen die üblichen Qualitätsanforderungen an Reproduzierbarkeit erfüllen.

2.5.1.4 Anwendungsmöglichkeiten für ökotoxikologische Testbatterien im Rahmen der Altlastenerfassung- und Sanierung

Folgendes Schema veranschaulicht die mögliche Vorgehensweise bei der Anwendung ökotoxikologischer Testverfahren (Abb. 2.28):

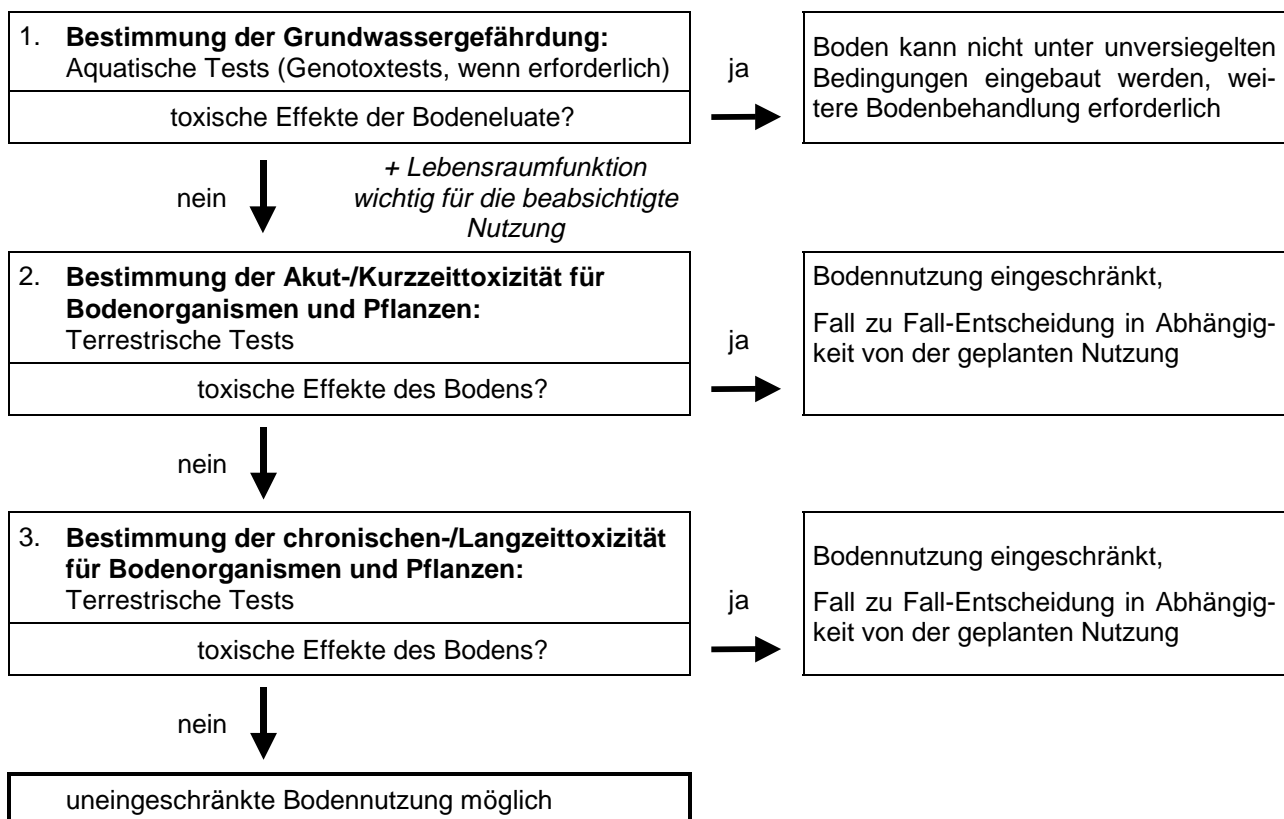


Abb. 2.28: Teststrategie bei der Anwendung ökotoxikologischer Testverfahren

2.5.2 Langzeitverhalten gebundener Rückstände

Annette Eschenbach, Heiko Mescher, Reinhard Wienberg, Bernd Mahro

Wie bereits ausgeführt (s. Kap. 2.2.3), können Aussagen zum Langzeitverhalten von im Boden gebundenen Schadstoff-Rückständen durch unterschiedliche Untersuchungsstrategien erhalten werden. Im folgenden wird auf strukturchemische Untersuchungen, auf Laboruntersuchungen zur Langzeitstabilität unter gezielter Simulation von *worst case*-Maßnahmen und auf Untersuchungen im Kubikmetermaßstab in Bioreaktoren und Freilandlysimetern eingegangen. Darüber hinaus sollte auch eine ökotoxikologische Bewertung der sanierten Böden, die gebundene Rückstände enthalten, erfolgen. Diese Methoden wurden bereits in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben.

2.5.2.1 Strukturchemische Untersuchungen

Eine Möglichkeit das **Langzeitverhalten** gebundener Rückstände zu bewerten, ist der Nachweis der Art der chemischen Bindung zwischen den Schadstoffen bzw. Schadstoffderivaten und der Bodenmatrix durch Einsatz NMR-spektroskopischer Methoden.

Kann eine stabile, d.h. nicht leicht hydrolysierbare, Art der kovalenten Bindung zwischen den funktionellen Gruppen der Schadstoffe(-derivate) und der organischen Bodensubstanz nachgewiesen werden, ist dies als eine irreversible Form der Bindung anzusehen. Bei dieser Bindungsart ist davon auszugehen, daß die Schadstoffe bei einer möglichen Zersetzung der organischen Bodensubstanz bzw. deren Umwandlung nicht wieder in Form der Originalschadstoffe oder als Schadstoffderivate, sondern nur noch als ein von der natürlichen organischen Substanz nicht unterscheidbares (Humus-)Molekül freigesetzt werden [7; 9; 13].

Bei der Ausbildung von stabilen kovalenten Bindungen ist also eine hohe Langzeitstabilität der Immobilisierung gegeben.

Die Untersuchungen der Bindungsform können sowohl durch Festkörper-NMR-Spektroskopie als auch durch Flüssig-NMR-Spektroskopie erfolgen. Die **Festkörper-NMR-Spektroskopie** ermöglicht eine chemische Charakterisierung der Stickstoff- bzw. Kohlenstoff-Fraktion in komplexen Stoffgemischen, ohne daß Extraktionsverfahren angewendet werden müssen. Es können also auch Substanzen identifiziert werden, die sich aufgrund ihrer geringen Löslichkeit einer herkömmlichen Analyse entziehen. Allerdings ist die Auflösung der Signale relativ gering und es kann z.T. zu einer Unterschätzung des Gehaltes von funktionellen Gruppen (z.B. bei der ^{15}N -NMR-Spektroskopie von Nitrogruppen) kommen.

Dem gegenüber hat die **Flüssig-NMR-Spektroskopie** den Vorteil einer relativ hohen Signalauflösung. Allerdings müssen vor jeder Messung Extraktions- oder Derivatisierungsschritte durchgeführt werden, bei denen eine Artefakt-Bildung – d.h. eine Veränderung der Struktur der Bindung – nicht ausgeschlossen werden kann.

Für eine NMR-Untersuchung müssen die zu untersuchenden Schadstoffe mit stabilen Isotopen markiert (als ^{13}C , ^{15}N -Verbindungen) im Bodenmaterial inkubiert werden, dabei muß eine deutliche **Anreicherung** gegenüber der natürlichen Häufigkeit der stabilen Isotope erreicht werden (z.B. für ^{15}N -TNT 4 bis 10 g/kg Boden). Ein anderes sehr aufwendiges Verfahren ist

es, mit stabilen Isotopen abgereichertes Material (z.B. ^{13}C -abgereicherte organische Substanz, die zu Humus zersetzt wird) einzusetzen. Bei diesem zweiten Ansatz können die Schadstoffe in niedrigeren Konzentrationen analysiert werden, was oft den zu untersuchenden Bedingungen eher entspricht (zum Einfluß der Konzentration der Schadstoffe auf die Einbindungsart: s. Kap 2.2.1 und [10]).

Durch diese (relative) Anreicherung der stabilen Isotope gegenüber der umgebenden Matrix sind deutliche Signale im NMR-Spektrum zu identifizieren, die von den markierten Schadstoffen bzw. deren Derivaten stammen.

Die ermittelten chemischen Verschiebungen oder Resonanzen sind den unterschiedlichen chemischen Bindungsarten zuzuordnen, wie dies in Tab. 2.36 in Kap. 2.2.1.2 exemplarisch für ^{15}N -NMR-Signale aufgeführt ist. Durch die Anwendung dieser aufwendigen Technik kann in einer Bodenprobe die chemische Struktur, also die Qualität, der Bindung der immobilisierten ^{15}N -TNT-Metaboliten oder ^{13}C -PAK-Metaboliten (oder anderer organischer ^{15}N - oder ^{13}C -markierten Verbindungen) mit der organischen Bodensubstanz charakterisiert werden, und es ist auch möglich, die relativen Anteile der verschiedenen kovalenten Bindungen zu ermitteln.

Allerdings ist mit diesem Verfahren nur eine Identifizierung der Bindungsstruktur weniger Prozentanteile der gesamten nicht-extrahierbaren Rückstände möglich. Es können keine Aussagen über die Gesamtheit der Bindungen der nicht-extrahierbaren Rückstände getroffen werden (vgl. Kap. 2.2.1.2, Tab. 2.38).

Durch Anwendung NMR-spektroskopischer Methoden konnte beispielsweise in jüngster Zeit gezeigt werden, daß reduzierte TNT-Derivate in Form von Anilinderivaten und aromatischen Aminen [8; 18] oder als Imin- und Azoxyverbindungen oder als heterozyklisch gebundenes ^{15}N , [2; 8] kovalent an organische Substanz gebunden werden. Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen wurde nach einer ausreichenden anaeroben Inkubation eine multivalente Einbindung der TNT-Umwandlungsprodukte über reduzierte Nitrogruppen postuliert [1].

Eine genauere Beschreibung dieser Untersuchungen findet sich weiter hinten (s. Kap. 9.4.4) und weitere NMR-spektroskopische Untersuchungen zur Bindung von Schadstoffen an die organische Substanz sind in KNICKER et al. [18]; BRUNS-NAGEL et al. [8]; ACHTNICH et al. [2], DEC et al. [10] und THORN [21] beschrieben.

2.5.2.2 Laboruntersuchungen zur Langzeitstabilität unter gezielter Simulation von Remobilisierungsmaßnahmen

Ziel dieser Versuche ist es, mögliche Einflußfaktoren, die sich negativ auf die Langzeitstabilität der nicht-extrahierbaren Schadstoffrückstände auswirken können, gezielt zu simulieren und so eine mögliche Freisetzung der Schadstoffrückstände unter **worst case-Bedingungen** zu ermitteln. Diese Laborversuche zur Langzeitstabilität werden i.d.R. als Bilanzierungsuntersuchungen mit ^{14}C -markierten Schadstoffen durchgeführt, da so Aussagen über den Verbleib der Gesamtheit der nicht-extrahierbaren Rückstände – also zur Quantität – möglich sind. Bei Bedarf können aber auch NMR-Spektroskopie-Untersuchungen zur Veränderung der Struktur der Bindung nach Anwendung von *worst case*-Maßnahmen durchgeführt werden. Derartige Untersuchungen wurden mit nicht-extrahierbaren Rückständen aus ^{15}N -TNT im Verbundvorhaben 5 "Langzeit und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen" durchgeführt (s. Kap. 9.4.3, Kap. 9.4.4 und Kap. 9.4.5).

Unter natürlichen Bedingungen unterliegt die organische Substanz des Bodens einem ständigen Um- und Abbau. Faktoren, die die Degradation bzw. Humifizierung beeinflussen, sind neben biologischen Einflußparametern wie dem Vorhandensein von Humus-abbauenden Mikroorganismen oder Enzymen, klimatische, physikalische und chemische Bedingungen (z.B. Temperaturwechsel, pH-Änderungen, Zerstörung oder Beeinflussung der Bodenaggregate, Feuchte-Wechsel). Entsprechend der natürlichen Einflußfaktoren können in diesen Laborversuchen physikalische, chemische und biologische Streßbedingungen (*worst case*-Maßnahmen) im Zeitraffer simuliert werden (s. Tab. 2.53).

Tab. 2.53: Streßbedingungen zur Simulation von natürlichen Abb- und Umbau-Reaktionen im Boden (*worst case*-Bedingungen)

Maßnahme	Methode
Biologische Remobilisierungstests	
Zusatz Humus- oder Schadstoff-abbauender Mikroorganismen	<i>Trametes versicolor, Rhodococcus erythropolis, Stropharia rugosoannulata, Nematoloma frowardii, Pleurotus ostreatus</i>
Zugabe oxidativer oder radikalbildener Enzyme	Ligninasen, Laccasen, Meerrettichperoxidase, Glucoseoxidase
Zugabe unspezifisch wirksamer Supplemente	Kompost, Rindenmulch, Waldbodenstreu
Einsatz von streuabbauenden Organismen der Bodenfauna	Regenwürmer
Pflanzenverfügbarkeit und Rhizosphäreneffekt	Bepflanzung mit mono- und dikotylen Pflanzen wie Hafer und Kresse
Physikalische Remobilisierungstests	
Klimasimulation	Frost/Tau-Zyklen
Änderung des Wassergehaltes	Feuchte/Trocken-Zyklen
Mechanische Zerstörung der Aggregatstruktur	Ultraschallbehandlung, Mörsern oder Mahlen mittels Kugelmühle
Chemische Remobilisierungstests	
Auflösung von metallorganischen Komplexen	Zusatz von Komplexbildnern (EDTA)
Simulation saurer Regen	pH-Änderung
Extrem-Extraktion	Wasserdampfextraktion
Desorption	Tensideinsatz

In diesen Remobilisierungsversuchen können somit einerseits natürlich ablaufende Prozesse der Humus-Transformation (Zugabe von Humus-abbauenden Organismen, Enzymen oder auch organischen Supplementen) und andererseits künstliche Extremsituationen simuliert werden.

Biologische Remobilisierungstests: Werden organische Supplemente wie z.B. Kompost, Rindenmulch oder Waldbodenstreu zugegeben, ist nicht nur eine Mineralisation der betreffenden Schadstoffverbindung möglich, sondern die Supplemente enthalten auch Mikroorganismen, die sehr effektiv zum Ab- und Umbau organischer Substrate (z.B. Streu- und Kompost-Zersetzung) fähig sind. So können z.B. radikalbildende Enzyme durch Pilze freigesetzt werden, die eine remobilisierende Wirkung auf nicht-extrahierbare Rückstände im Boden ausüben können.

Auch Makroinvertebraten (z.B. Regenwürmer) spielen eine wichtige Rolle beim Streuabbau. Durch die Aufnahme von Bodenmaterial mit nicht-extrahierbaren Rückständen, durch die Zerkleinerung des Bodenmaterials und durch die Vermischung des Bodenmaterials mit Schleimstoffen und Enzymen ist eine remobilisierende Wirkung durch Regenwürmer denkbar.

Durch Bepflanzung dieses Bodenmaterials können Rhizosphäreneffekte und die daraus resultierende Pflanzenverfügbarkeit von nicht-extrahierbaren Rückständen geprüft werden.

Physikalische Remobilisierungstests: Schnelle Temperaturwechsel (Frost/Tau-Zyklen) bewirken durch Frostsprengung oder Quell-/Trocknungsprozesse infolge schneller Feuchte-Wechsel ein Aufbrechen der Aggregate und eine Vergrößerung der inneren Oberflächen. Extremere ist die Zerstörung der Aggregatstruktur des Bodenmaterials durch Ultraschallbehandlung, Mörsern oder Zermahlen mit einer Kugelmühle, wodurch einerseits die zugängliche Oberfläche bedeutend vergrößert wird und andererseits eventuell in den Aggregaten eingeschlossene nicht-extrahierbare Rückstände freigesetzt werden können.

Chemische Remobilisierungstests: Die Zugabe von Komplexbildnern bewirkt die Auflösung von metall-organischen Komplexen, die zur Stabilisierung der organischen Substanz des Bodens entscheidend beitragen. Durch diese Aufhebung der räumlichen Struktur der Huminstoff-Micellen kann es ebenfalls zu einer Freisetzung physikalisch eingeschlossener Schadstoff(-derivate) kommen. Durch die Zugabe saurer Lösungen kann der Einfluß der Bodenversauerung (langjähriger saurer Regen) im Zeitraffer untersucht werden.

In den bilanzierenden Untersuchungen mit ^{14}C -markierten Schadstoffrückständen wird Bodenmaterial mit humifizierten Schadstoffen, also einem erheblichen Anteil nicht-extrahierbarer ^{14}C -Rückstände, diesen beschriebenen Tests ausgesetzt und anschließend der Anteil der jeweils eluierbaren, extrahierbaren und nicht-extrahierbaren ^{14}C -Aktivität bestimmt (s. Abb. 2.29).

Werden nicht-extrahierbare Rückstände infolge der **Remobilisierungsmaßnahmen** in eine extrahierbare oder sogar eluierbare Fraktion freigesetzt, ist zu prüfen, in welcher Form die remobilisierten Rückstände vorliegen. Eine Mineralisation zu CO_2 und Wasser entspricht einer vollständigen Detoxifizierung der Rückstände. Eine Umsetzung zu CO_2 kann dabei ein Zeichen dafür sein, daß die nicht-extrahierbaren Rückstände gemeinsam mit der organischen Substanz, an der sie gebunden sind, in den Humus-Turnover einbezogen werden. Durch die weitergehende Untersuchung der Extrakte und Eluate können molekulare Massen und physiko-chemische Eigenschaften der freigesetzten ^{14}C -Aktivität näher bestimmt werden. Eine Freisetzung von originären Schadstoffen ist bei zuvor sequestrierten Substanzen (physikalisch

eingeschlossen) denkbar. Bei kovalent gebundenen Schadstoffderivaten kann es möglicherweise zu einer Remobilisierung in Form von Metaboliten kommen. Eine Freisetzung der originären Schadstoffverbindungen oder auch in Form von deren Metaboliten wäre als kritisch zu beurteilen.

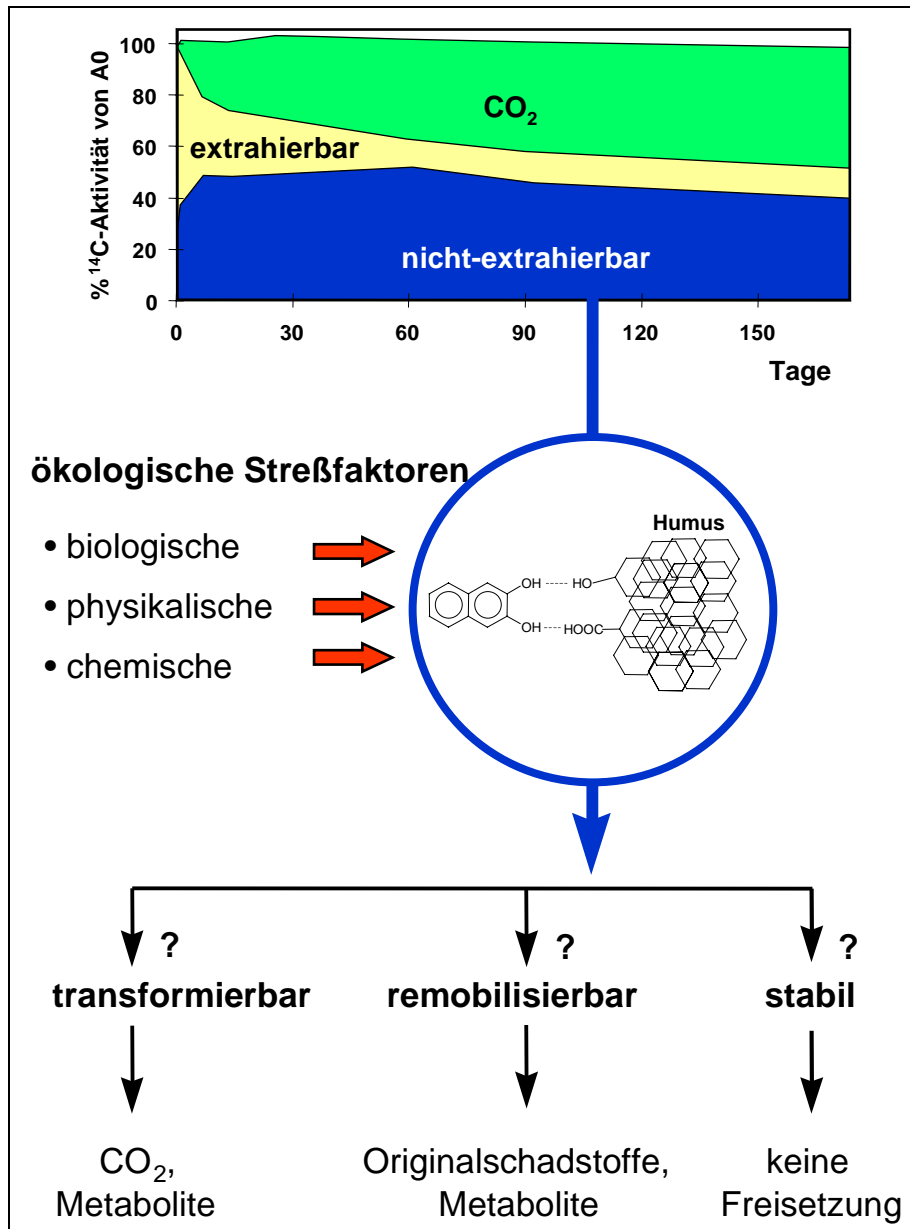


Abb. 2.29: Schema zur Untersuchung der Langzeitstabilität nicht-extrahierbarer festgelegter Schadstoffe im Boden [13]

Am Beispiel von PAK konnte gezeigt werden, daß eine Remobilisierung nicht-extrahierbarer Rückstände in eine verfügbare Fraktion bei Anwendung biologischer oder physikalischer Maßnahmen nicht auftritt [11; 14] (s. Abb. 2.30). Die biologischen Remobilisierungsversuche verdeutlichten, daß die in der Humusmatrix gebundenen Schadstoffe nicht völlig inert

vorliegen, sondern sehr langsam mineralisiert (Umwandlung zu $^{14}\text{CO}_2$) werden, was die Vermutung, daß sie in den normalen Humus-Turnover miteinbezogen werden, bekräftigt. Lediglich die Extraktion mit EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), die eine Auflösung der metall-organischen Komplexe im Boden bewirkt, ergab eine deutliche Reduzierung der nicht-extrahierbaren Rückstände zugunsten einer erhöhten Extrahierbarkeit. Bei der hier freigesetzten ^{14}C -Aktivität handelte es sich jedoch nicht um hydrophobe sequestrierte originäre PAK, sondern der Effekt ist aller Wahrscheinlichkeit nach auf eine Abspaltung von gelöster organischer Substanz zurückzuführen [11; 12]. Auch für ^{14}C -TNT-Rückstände wurden bei einer EDTA-Behandlung vergleichbare Ergebnisse erzielt [3; 15]. Eine signifikante ^{14}C -Aktivität konnte in den Extrakten ermittelt werden, doch stammte diese nicht von TNT selber. Auch biologische Maßnahmen führten zu keiner Remobilisierung gebundener TNT-Rückstände [15]. Diese Untersuchungsmethode kann also eine hohe Stabilität der nicht-extrahierbar festgelegten Rückstände von PAK- und TNT-Rückständen belegen. Eine eingehende Darstellung der Ergebnisse ist in Kap. 9.4.2 und 9.4.4 wiedergegeben.

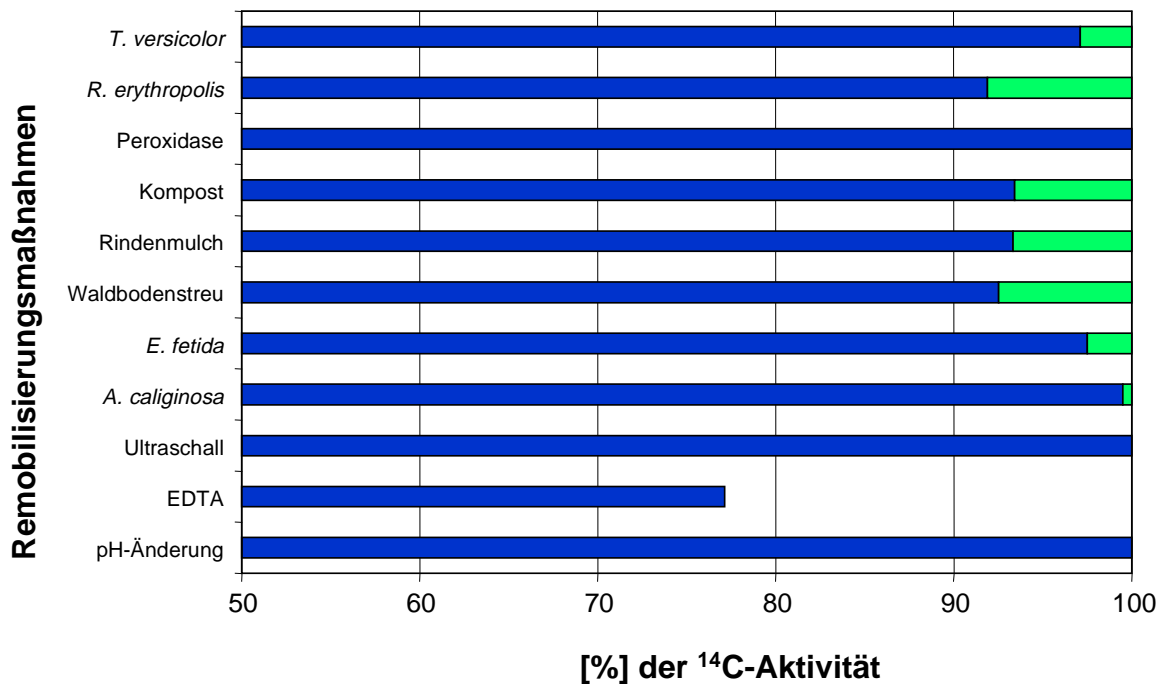


Abb. 2.30: Stabilität von nicht-extrahierbaren ^{14}C -PAK-Rückständen bei Anwendung unterschiedlicher Remobilisierungsmaßnahmen (Angabe in [%] der vor den Remobilisierungsversuchen im Boden nicht-extrahierbaren ^{14}C -Aktivität).

Legende: (■) nicht-extrahierbare Rückstände; (■) entstandenes CO_2

Aussagen zur Bilanzierung und damit zur Stabilität der nicht-extrahierbar festgelegten Schadstoffrückstände sind auch durch Einsatz stabiler Isotope und Untersuchung der Isotopen-Verhältnisse in den verschiedenen Kompartimenten möglich, doch muß die geringere Genauigkeit dieser Analytik berücksichtigt werden [20].

2.5.2.3 Untersuchungen mit ^{14}C -markierten Verbindungen im Kubikmetermaßstab in Bioreaktoren und Freilandlysimetern

Um biologische Bodensanierungsverfahren, die primär auf der Immobilisierung der Kontaminanten in der Bodenmatrix beruhen, in ihrem Langzeitverhalten sicher bewerten zu können, ist es sinnvoll die Langzeitstabilität der bei dem gegebenen Verfahren jeweils gebildeten Rückstände auch im größerem Maßstab und ggf. auch in Freilandversuchen weiter zu untersuchen. Bodentypische Phänomene wie Kanalbildung (*preferential flow*), Gradientenbildung oder *Hot spots* sind in Laborversuchen nur schwer nachzubilden. Der Einsatz von Lysimetern ist deshalb in der Agrarforschung im Rahmen der Genehmigung und Zulassung von Pestiziden schon seit längerem Stand der Technik. Obwohl *Scale up*-Versuche im Altlastenbereich auf Grund des hohen Aufwandes nicht vor jeder Sanierungsmaßnahme durchgeführt werden können, ist der einmalige Einsatz bei der Einführung einer spezifischen Verfahrenstechnik (z.B. Humifizierung von TNT) jedoch empfehlenswert. *Scale up*-Untersuchungen sind somit eine sinnvolle Maßnahme, um unter praxisnäheren Bedingungen die Mobilität von nicht-extrahierbaren Schadstoffrückständen, deren Versickerungsverhalten und damit eine mögliche Grundwassergefährdung, zu untersuchen.

Unter umweltrelevanten Extrembedingungen (Zeitraffer-Effekte, Änderung der Temperatur, Einfluß der Beregnung, Auswaschung der Schadstoffe mit dem Sickerwasser) kann das Langzeitverhalten in **Spezialreaktoren im halbtechnischen Maßstab** untersucht werden. Dadurch lassen sich Aussagen über die Remobilisierung und Grundwassergefährdung der festgelegten Rückstände beispielsweise unter beschleunigter Humusumsetzung treffen. Im Zeitraffer können z.B. während einer zweijährigen Inkubationsdauer durch charakteristische Temperatureinstellungen acht Jahreszyklen simuliert werden.

In **Freilandlysimeteruntersuchungen** ist es bei Einsatz markierter Verbindungen möglich, unter natürlichen Einflüssen (Niederschläge, Temperatureinflüsse, etc.) den Verbleib der nicht-extrahierbaren Rückstände bezüglich Abbau, Sorption und Festlegung, Freisetzung, Bioverfügbarkeit und Transport bilanzierend zu untersuchen. Durch die Bepflanzung mit verschiedenen Kulturen (z.B. Lein, Getreide, Salat, Karotten, Buschbohne, Sellerie) kann die Pflanzenverfügbarkeit von nicht-extrahierbaren Rückstände beurteilt werden. Die Anwendung einer ^{14}C -HPLC-Analytik ermöglicht darüber hinaus den Nachweis von Metaboliten. Die erhaltenen Bodenmaterialien, Bodeneluate und Sickerwässer können anschließend weiterhin mittels ökotoxikologischer Testverfahren bewertet werden.

Im Rahmen des Verbundvorhabens 5 werden entsprechende *Scale up*-Untersuchungen im Fraunhofer Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie (FhIUCT), Schmallingenberg, zur Simulation der drei in Clausthal-Zellerfeld angewendeten TNT-Sanierungsverfahren und zur Simulation eines PAK-Sanierungsverfahrens mit Zugabe organischer Supplemente durchgeführt. Die dabei eingesetzten Spezialreaktoren weisen ein maximales Volumen von 2 m³ (Durchmesser 150 cm, max. Füllhöhe 110 cm), die Freiland-Lysimetern ein maximales Volumen von 1,2 m³ (Durchmesser 100 cm, Füllhöhe des kontaminierten Bodens 50 cm) auf. Genauere Beschreibungen und Ergebnisse dieser Untersuchungen sind bei HUND-RINKE & KÖRDEL [17], sowie in Kap. 9.5.2 dieses Leitfadens dargestellt.

2.5.3 Literatur

1. **Achtnich, C.** 1999. Sanierung von TNT-kontaminiertem Boden durch Immobilisierung des Schadstoffes: Stabilität und Charakterisierung der Festlegung. Fraunhofer Institut f. Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik. Berichte aus Forschung und Entwicklung. Nr. 015. Fraunhofer IRB Verlag.
2. **Achtnich, C., E. Fernandes, J.-M. Bollag, H.-J. Knackmuss, and H. Lenke.** 1999. Covalent binding of reduced metabolites of ($^{15}\text{N}_3$)TNT to soil organic matter during an anaerob/aerob treatment process using ^{15}N spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* **33**:4448-4456.
3. **Achtnich, C., U. Sieglen, H.-J. Knackmuss, and H. Lenke.** 1999. Irreversible binding of biologically reduced 2,4,6-Trinitrotoluene to soil. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**:2418-2323.
4. **BBodSchG** – Gesetz zum Schutz vor schädlichen Bodenveränderungen und zur Sanierung von Altlasten (Bundes-Bodenschutzgesetz) v. 17.3.1998 (BGBl. S. 502).
5. **BBodSchV** – Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung v. 12.7.1999 (BGBl. I S. 1554).
6. **Becker van Sloten, K., D. Rossel, , J. Tarradellas.** 1999. Anwendung ökotoxikologische Testverfahren auf Sickerwasse und Eluate von belasteten Standorten. in: Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaften (ed.). Altlasten Gefährdungsabschätzung. Bern.
7. **Bollag, J.-M., and M. J. Loll.** 1983. Incorporation of xenobiotics into soil humus. *Experienta*, **39**:1221-1234.
8. **Bruns-Nagel, D., H. Knicker, O. Drzyzga, B. Casper, K. Steinbach, and E. von Löw.** 1999. Aufklärung der Humifizierung von TNT mittels stabiler Isotope und NMR-Analytik. In Umweltbundesamt (ed.) Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen. Tagungsband zum Statusseminar des BMBF-Verbundvorhabens "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", 22. und 23.10.1998 in Bremen. F1-16.
9. **Dec, J., K. Haider, A. Benesi, V. Rangaswamy, U. Plücken, and J.-M. Bollag.** 1997. Analysis of soil-bound residues of ^{13}C -labeled fungicide cyprodinil by NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* **31**:1128-1135.
10. **Dec, J., K. Haider, A. Schäffer, E. Fernandes, and J.-M. Bollag.** 1997. Use of silylation procedure and ^{13}C -NMR Spectroscopy to characterize bound and sequestered residues of cyprodinil in soil. *Environ. Sci. Technol.* **31**:2991-2997.
11. **Eschenbach, A., R. Wienberg, and B. Mahro.** 1998. Fate and stability of nonextractable residues of (^{14}C)PAH in contaminated soils under environmental stress conditions. *Environ. Sci. Technol.* **32**:2585-2590.
12. **Eschenbach, A., R. Wienberg, and B. Mahro.** 1998. Untersuchung der Bildung und Langzeitstabilität von humifizierten PAK in biologisch behandelten Recyclingböden. Abschlußbericht BMBF-Forschungsvorhaben "Biologische Verfahren zur Bodensanierung". Teilprojekt 7. Förder-Nr. 1480937.

13. **Eschenbach, A., R. Wienberg, and B. Mahro.** 1999. Die Rolle von nicht-extrahierbaren im Boden festgelegten PAK-Rückständen für die Bewertung biologischer Bodensanierungen. Mittlgn. Dt. Bodenkundl. Gesellsch. **91**:601-604.
14. **Eschenbach, A., R. Wienberg, and B. Mahro.** 2000. Formation, long-term stability and fate of non-extractable ¹⁴C-PAH-residues in contaminated soils. In D. L. Wise, D. J. Trantolo, E. J. Cichon, H. I. Inyang, U. Stottmeister (eds.): Remediation engineering of contaminated soils. Marcel Dekker, Inc., New York, 429-448.
15. **Herre, A., K. Scheibner, M. Kästner, and W. Fritsche.** 1999. Aerobe Behandlung von UR-¹⁴TNT-dotiertem Boden mit ligninolytischen Pilzen – Bildung und Remobilisierbarkeit der gebundenen Rückstände. In Umweltbundesamt (ed.) Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen. Tagungsband zum Statusseminar des BMBF-Verbundvorhabens "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", 22. und 23.10.1998 in Bremen. G1-17.
16. **Hund, K.** 1993. Entwicklung von biologischen Testsystemen zur Kennzeichnung der Bodenqualität. Abschlußbericht F+E-Vorhaben UFO-Plan-Nr. 23-10.
17. **Hund-Rinke, K. and W. Kördel.** 2000. Biologische Bodensanierung unter der Lupe. Umwelt **30**:51-53.
18. **Knicker, H., D. Bruns-Nagel, O. Drzyzga, E. von Löw, and K. Steinbach.** 1999. Characterization of ¹⁵N-TNT residues after an anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures by solid-state ¹⁵N NMR spectroscopy. Determination and optimization of the relevant NMR spectroscopic parameters. Environ. Sci. Technol. **33**:343-349.
19. **Kreysa, G., and J. Wiesner (eds.).** 1995. Bioassays for soils. DECHEMA (Deutsche Gesellschaft für Chemisches Apparatewesen, Chemische Technik und Biotechnologie e.V.), Frankfurt. 45 pp.
20. **Richnow, H. H., A. Eschenbach, B. Mahro, M. Kästner, E. Annweiler, R. Seifert, and W. Michaelis.** 1999. The formation of nonextractable soil residues – a stable isotope approach. Environ. Sci. Technol. **33**:3761-3767.
21. **Thorn K. A.** 1997. Covalent binding of the reductive degradation products of TNT to humic substances examined by N-15 NMR. Division of Environ. Chem. Preprints of Extended Abstractes. **37**:305-306.
22. **Thüringer Ministerium für Landwirtschaft, Naturschutz und Umwelt** 1997. Biologische Verfahren in der Laboranalytik bei Altlasten - Stoffsammlung. Materialien und Berichte zur Altlastenbearbeitung in Thüringen, Heft 2.

3 Biologische Sanierungsverfahren

Jürgen Warrelmann

Das vorliegende Kapitel beschreibt die zur Zeit in Deutschland eingesetzten biologischen Sanierungstechniken sowie Verfahren, die nach derzeitigem Kenntnisstand in den nächsten Jahren verstärkt Eingang in die Sanierungspraxis finden werden. Techniken, die in der Vergangenheit eingesetzt wurden bzw. ausschließlich in anderen Ländern Berücksichtigung finden, werden nicht behandelt. Ein Beispiel hierfür ist das 'Landfarming', das vornehmlich in den U.S.A. und teilweise in anderen Ländern praktiziert wird.

Neben der Beschreibung der Verfahren, den jeweiligen Voraussetzungen und den Praxiserfahrungen wird die Vorgehensweise für eine vergleichende ökonomische Bewertung dargestellt.

Biologische Bodensanierungsverfahren werden in **Ex situ-Techniken** (mit Bodenaushub) und **In situ-Techniken** (ohne Bodenaushub) eingeteilt, wobei *Ex situ*-Sanierungen je nach Ort der Behandlungsanlage als *on site*- (am Sanierungsort) oder *Off site*-Verfahren (außerhalb des Sanierungsortes) zur Anwendung kommen. Zu den *Ex situ*-Techniken gehören die Mietentechnik (s. Kap. 3.1), Reaktorverfahren (s. Kap. 3.2) sowie Kombinationsverfahren. Zu den *In situ*-Techniken zählen Infiltrations- und Belüftungsverfahren, sowie Verfahren der Bioremediation, mit deren Hilfe Schadstoffe in der gesättigten und ungesättigten Zone biologisch abgebaut werden.

3.1 Mietentechnik

3.1.1 Grundlagen

Seit etwa Mitte der achtziger Jahre hat sich die Mietentechnik in Deutschland etabliert und kann heute als vielfach erprobtes und bewährtes Bodenreinigungsverfahren angesehen werden. Die Mietentechnik kommt vornehmlich in **stationären Bodenbehandlungsanlagen** zum Einsatz und weist inzwischen den größten Verbreitungsgrad unter allen Bodensanierungsverfahren auf. Dies trifft sowohl für die Kapazität der Anlagen, den Bodendurchsatz als auch für die Verwertungsquote der behandelten Böden zu [51].

3.1.1.1 Definition

Unter dem Begriff 'Mietentechnik' sind Verfahren zu verstehen, die in Form von angelegten Bodenmieten zu einem biologischen Abbau von Schadstoffen führen. Bei den Mieten handelt es sich um Haufwerke unterschiedlicher Form und Größe (vgl. Kap. 3.1.1.4), zu denen die Böden aufgeschüttet werden. Die Mieten werden in der Regel als **Boden- oder Regenerationsmieten** bezeichnet.

3.1.1.2 Wissenschaftlich-technische Grundlagen

Grundsätzlich wird der biologische Abbau von Schadstoffen in Bodenmieten dadurch erreicht, daß limitierende Faktoren, wie z. B. die Sauerstoff- oder Nährstoffversorgung von Mikroorganismen, aufgehoben werden, so daß eine Stimulierung der biologischen Aktivität im Boden erfolgt. Durch die Behandlung des Bodens kommt es außerdem zu einer Homogenisierung der Verunreinigungen, wodurch die Verfügbarkeit der Schadstoffe für die beteiligten Mikroorganismen verbessert wird. Verantwortlich für den Abbau von Schadstoffen im Boden sind **Bakterien bzw. Pilze**, die entweder bereits im Boden vorhanden sind (autochthone Mikroorganismen) oder in Form von Kulturen dem Boden zugesetzt werden. Liegt ein vollständiger biologischer Abbau vor, werden die organischen Schadstoffe einerseits zu mineralischen Endprodukten (Kohlendioxid, Wasser, ggf. Chlorid u. a.), andererseits in Biomasse umgesetzt. Auch ein unvollständiger biologischer Abbau läßt sich zur Reinigung kontaminierter Böden nutzen, indem die Schadstoffe entweder in unschädliche Metaboliten (Zwischenprodukte) umgewandelt werden oder durch Einbaureaktionen im Boden festgelegt werden (Immobilisierung/Humifizierung, (s. Kap. 2.2).

Verfahrenstechnisch ist die Mietentechnik mit der Kompostiertechnik vergleichbar, wobei die biologische Aktivität in Bodenmieten allerdings deutlich geringer ist als bei der Kompostierung [26]. Dieser Analogie wird in der englischsprachigen Literatur durch den Begriff 'composting' für Mietentechnik Rechnung getragen [3]. Die Durchführung der Mietentechnik erfolgt in Hallen, Zelten bzw. auf gedichtetem Untergrund. Eine Übersicht zum Verfahrensablauf ist in Abb. 3.1 wiedergegeben.

3.1.1.3 Bodenvorbehandlung

Vor dem Anlegen einer Miete erfolgt eine mechanische Bodenvorbehandlung. Einerseits werden dadurch **Störstoffe** (z. B. Schrott, grober Bauschutt, Holzreste usw.) entfernt, andererseits wird durch diesen Verfahrensschritt eine **Homogenisierung** des Bodens erreicht. Sind die abgetrennten Störstoffe kontaminiert, so ist es je nach Art des Materials (z. B. Bauschutt, Steine, Mauerwerk usw.) möglich, dieses auf behandelbare Korngrößen (in der Regel 30 bis 50 mm) zu brechen und dem Boden zuzusetzen. Bauschuttanteile in einer Bodenmiete sollten allerdings 30 Gew.-% nicht überschreiten [40].

Die Bodenvorbehandlung wird in der Regel mit der Einarbeitung von Zuschlagstoffen kombiniert (s. Kap. 3.1.1.8).

3.1.1.4 Mietenaufbau

Der Mietenaufbau wird wesentlich durch die eingesetzte Maschinenteknik und das jeweilige Belüftungsverfahren (s. unten) bestimmt. Je nach Form der Bodenmiete wird zwischen **Tafel-(Rechteck-)mieten, trapezförmigen und pyramidenförmigen Mieten** unterschieden. Bodenmieten werden entsprechend der Maschinenteknik und den Platzverhältnissen auch in Form von unmittelbar benachbarten Mietensträngen angelegt.

Die Höhe der Bodenmieten beträgt bis zu 3 Metern, in Ausnahmefällen werden Hochmieten mit über 3 Metern Höhe angelegt. Unter den Begriffen 'Biobeete' bzw. 'Beetverfahren' kommen auch flache Mietenverfahren zum Einsatz. Hier besteht allerdings ein erhöhter Platzbedarf.

3.1.1.5 Mietenbelüftung

Mietentechniken sind in der Regel aerobe Verfahren, die für den biologischen Schadstoffabbau Sauerstoff benötigen. Je nach Art der Sauerstoffversorgung unterscheidet man zwischen passiver und aktiver Belüftung.

Eine **passive Belüftung** von Bodenmieten wird erreicht durch einen schichtenförmigen Mienenaufbau, bestehend aus einer wechselnden Abfolge aus Boden- und Belüftungsschichten (s. Abb. 3.2). In den Belüftungsschichten werden grobe Strukturstoffe, wie z. B. Holzhackschnitzel, eingesetzt und auf diese Weise eine Versorgung der Bodenschichten mit Luftsauerstoff über passive Diffusion erreicht. Die Nachlieferung des Luftsauerstoffs wird zudem verbessert, wenn sich der Mietenkörper durch die biologische Aktivität erwärmt (Kamineffekt).

Zu der aktiven Belüftung von Bodenmieten gehört die Zwangsbelüftung und die dynamische Belüftung. Bei der **Zwangsbelüftung** wird mit Hilfe technischer Einbauten oder Maßnahmen eine Versorgung der Bodenmiete mit Luftsauerstoff erreicht. Zur Anwendung kommen Siebböden, Drainrohre oder Luftpflanzen (s. Abb. 3.2). Je nach Anordnung der Gebläsevorrichtungen unterscheidet man zwischen Druck- und Saugbelüftung. Bei Vorliegen leichtflüchtiger Komponenten bietet die Saugbelüftung Vorteile, da Emissionen dadurch vermieden werden können, daß der Sauganlage ein Abluftfilter nachgeschaltet wird.

Eine **dynamische Belüftung** wird erreicht durch regelmäßiges Wenden bzw. Umsetzen der Bodenmieten und wird in der Praxis am häufigsten angewendet. Dabei wird der Boden mit Hilfe von Wende- bzw. Umsetzmaschinen aufgenommen und zu einer neuen Miete aufgeschichtet. Auf diese Weise wird Umgebungsluft in die Bodenmiete eingetragen.

Die Art der Mietenbelüftung bestimmt wesentlich den betriebstechnischen Ablauf des Verfahrens. In der Fachliteratur wird dementsprechend zwischen statischen bzw. stationären Mietenverfahren (passive Belüftung, Zwangsbelüftung) und dynamischen Mietenverfahren bzw. Wendeverfahren (dynamische Belüftung) unterschieden [23; 71].

3.1.1.6 Mietenbewässerung

Eine wesentliche Voraussetzung für biologische Aktivitäten im Boden ist ein ausreichender Wassergehalt. Je nach Art der Bewässerung von Bodenmieten unterscheidet man zwischen Trockenmieten (Trockenrotteverfahren) und Naßmieten (Mieten mit Prozeßwasserkreislauf) [18].

Bei **Trockenmieten** wird zu Beginn der Behandlung ein Wassergehalt eingestellt, der der natürlichen Bodenfeuchte entspricht, so daß kein freies Wasser (Sickerwasser, Prozeßwasser) während des Betriebes anfällt. Um eine Austrocknung der Miete im Verlauf der Behandlung zu verhindern, erfolgt eine regelmäßige Überprüfung und ggf. Einstellung des Wassergehaltes (in der Regel beim Wenden bzw. Umsetzen der Miete). Bei **Naßmieten** erfolgt während des Betriebes eine Bewässerung mit Berieselungseinrichtungen. Dabei fällt freies Prozeßwasser an, welches gefaßt (z. B. mit Hilfe von Drainageleitungen) und je nach Belastung gereinigt werden muß. Das gereinigte Wasser kann dann erneut zur Verrieselung verwendet werden (Prozeßwasserkreislauf). Bedingt durch die notwendigen Einbauten, wie z. B. Drainagerohre oder Drainschichten, handelt es sich bei Naßmieten grundsätzlich um statische Mieten [40].

3.1.1.7 Mietenbeimpfung

Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, Bodenmieten mit mikrobiologischen Kulturen zu beimpfen (**Bioaugmentation**). Diese Maßnahme wird aus zwei Gründen durchgeführt:

1. Der Ausgangsboden weist eine sehr geringe mikrobiologische Besiedlungsdichte bzw. Aktivität auf, die sich nach Aufhebung von Limitationsfaktoren (Nährstoffe, Sauerstoff usw.) zudem nicht ausreichend steigern läßt.
2. Es liegen Schadstoffe im Boden vor, die nur (oder wesentlich effizienter) durch die Zugabe von Spezialkulturen biologisch abgebaut werden.

Zum Einsatz können entweder aus dem kontaminierten Standort entnommene und durch Anzucht vermehrte Mikroorganismen oder standortfremde, unter speziellen Gesichtspunkten ausgewählte Mikroorganismen kommen. In diesem Zusammenhang werden zum Beispiel vorgezogene Pilzkulturen wie etwa Weißfäulepilze verwendet, die durch ihre Enzymausstattung über ein breites Spektrum an Abbauleistungen verfügen.

Bei der Zugabe von Kulturen in Bodenmieten ist zu berücksichtigen, daß sich die zugesetzten Mikroorganismen in der neuen Umgebung etablieren müssen, zumal sie sich in Konkurrenz mit der autochthonen Mikroflora, d. h. den bereits im Boden vorhandenen Mikroorganismen, befinden. Grundsätzlich ist deshalb die Optimierung der autochthonen Mikroflora der Beimpfung mit Spezialkulturen vorzuziehen [46]. In Einzelfällen kann aus den oben dargelegten Gründen allerdings eine Beimpfung sinnvoll sein. Umstritten ist jedoch der Einsatz gentechnisch veränderter Mikroorganismen (GVOs) in der Bodensanierung [15].

3.1.1.8 Struktur- und Zuschlagstoffe

Unter Struktur- und Zuschlagstoffen sind Stoffe zu verstehen, die dem Boden zu Beginn der Behandlung zugesetzt werden und dabei zu einer lockeren Bodenstruktur und guten Durchlüftung führen [22]. Art und Menge der Zuschlagstoffe sind abhängig von der Struktur des zu behandelnden Bodens (s. Kap. 2.4.3.3).

Zum Einsatz kommen Rindenprodukte (Rindenmulch, Rindenumus, Borke), Stroh, Komposte u. a. Die Zugabe dieser Stoffe erhöht außerdem den organischen Anteil des Bodens und fördert dessen biologische Aktivität. Bei der Zugabe von Struktur- und Zuschlagstoffen ist zu beachten, daß die zu erreichenden Zielwerte nicht durch eine bloße Verdünnung oder Vermischung mit geringer belastetem Material oder mit anderen unbelasteten Stoffen eingestellt werden ("abfallrechtliches Verdünnungsverbot", vgl. [37]).

3.1.1.9 Nährstoffe

Der Mangel an Nährstoffen ist einer der limitierenden Faktoren beim biologischen Schadstoffabbau im Boden. Die Kenntnis der Nährstoffgehalte im zu behandelnden Boden ist deshalb von Bedeutung. Wie in Kapitel 2.4.3 ausführlich dargestellt, gehören zu den wichtigsten Nährstoffen organische und anorganische **Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphorverbindungen**. Zum einen sollten diese Nährstoffe in ausreichenden Gehalten vorliegen, zum anderen ein günstiges Verhältnis der Nährstoffgehalte untereinander einge-

stellt werden. Dieses sogenannte **C:N:P-Verhältnis** sollte zwischen 100:15:2 bis 100:10:1 (Gewichtseinheiten) liegen [29], kann aber in Einzelfällen auch weiter variieren.

Nährstoffe können sowohl in flüssiger als auch fester Form, z. B. als Pulver oder Granulat, dem Boden zugesetzt werden. Zum Einsatz kommen unter anderem handelsübliche Dünger. Auch sogenannte 'Fertilizer' mit Langzeit-Dünge-Effekt kommen in der Bodensanierung zur Anwendung.

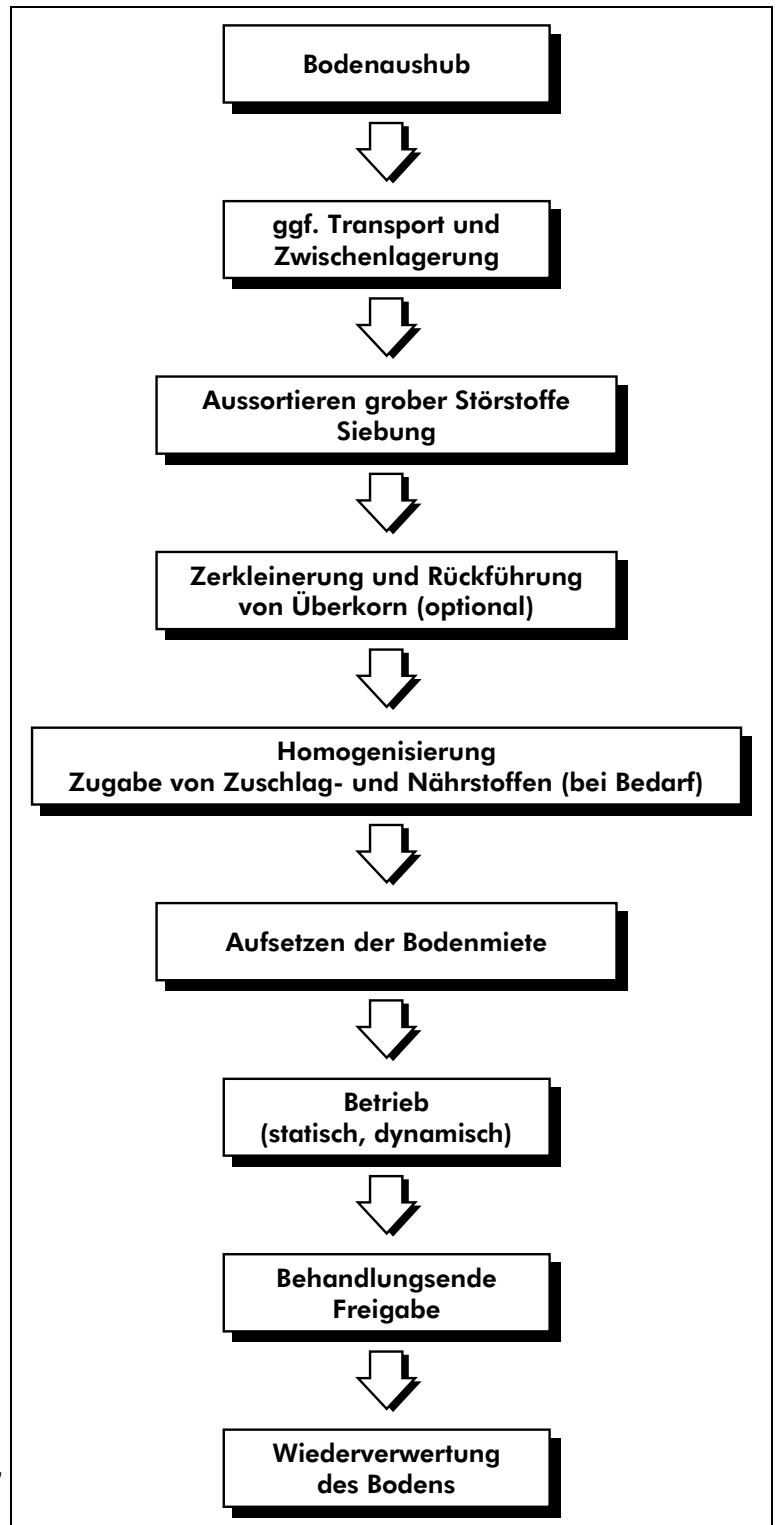


Abb. 3.1: Schematischer Ablauf der Mietentechnik

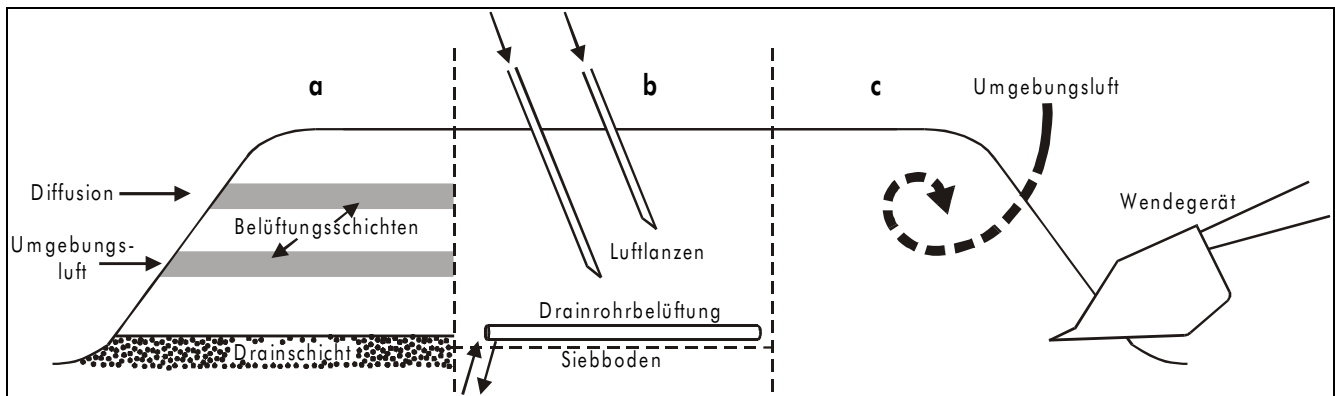


Abb. 3.2: Schematischer Aufbau einer Bodenmiete mit passiver Belüftung (a), Zwangsbelüftung (b) bzw. dynamischer Belüftung (c)

3.1.2 Voraussetzungen

3.1.2.1 Bodenaushub und Standortverhältnisse

Als *Ex situ*-Sanierungsverfahren setzt die Mietentechnik einen Aushub des kontaminierten Bodens voraus. Der kontaminierte Boden muß somit zugänglich sein und sollte nicht bebaut sein, es sei denn, das Sanierungskonzept sieht den Abriß der entsprechenden Gebäude vor. Weitere Einschränkungen für einen Bodenaushub bestehen, wenn unterirdische Anlagen (z. B. Tanks, Rohrleitungen, Kanalsysteme u. a.) existieren, die erhalten bleiben sollen. Optimale Voraussetzungen für einen Bodenaushub sind dann gegeben, wenn diese Einschränkungen nicht bestehen und darüberhinaus die Bodenkontamination gut lokalisierbar ist und sich vergleichsweise wenig ausgebreitet hat.

Liegen ausreichende Platzverhältnisse vor und ist beabsichtigt, den gereinigten Boden nach der biologischen Behandlung an gleicher Stelle wiedereinzubauen, bietet sich bei ausreichenden Bodenmengen eine Sanierung vor Ort an (*on site*). Eine Bodenreinigung außerhalb des Ortes, an dem der kontaminierte Boden anfällt (*off site*), wird in der Regel in ortsfesten Bodenreinigungsanlagen durchgeführt. Hier sind zusätzlich Transportmaßnahmen und Verwertungskriterien zu beachten (s. Kapitel 3.1.3).

3.1.2.2 Bodeneigenschaften

Eine wesentliche Voraussetzung für die Bodenbehandlung im Mietenverfahren ist ein optimaler **Wassergehalt** des Bodens. Böden im erdfeuchten Zustand verfügen je nach Bodenart über eine Feuchte bis etwa 30 Gew.-%. Liegt der Wassergehalt deutlich höher bzw. tritt freies Wasser auf, ist für Tockenmieten eine Vorbehandlung notwendig, um den Feuchtegehalt herabzusetzen (Konditionierung durch wasseraufnehmende Zuschlagstoffe, Entwässerung des Bodens).

Einen wichtigen Einfluß auf die Behandlung hat die jeweilige **Korngrößenverteilung** der Böden. Wegen ihres hohen Sorptionsvermögens in Bezug auf die Schadstoffe eignen sich lehmige und tonige Böden nur mit Einschränkungen für die Mietentechnik und sollten vorab

geprüft werden, ob sie biologisch behandelbar sind (s. Kapitel 2.3). Einen Indikator dafür stellen unter anderem die Schadstoffgehalte im Eluat und damit die biologische Verfügbarkeit der jeweiligen Schadstoffe dar. Umgekehrt ist bei extrem grobkörnigen Böden, d.h. Böden mit hohen Kiesanteilen, zu prüfen, ob die Kiesfraktion kontaminiert ist und ggf. durch ein geeigneteres Verfahren, wie z. B. eine Schotterwäsche, behandelt werden kann.

Eine weitere Einflußgröße der biologischen Bodenbehandlung stellt der **Anteil organischer Substanz** dar. Ein hoher Organik-Anteil bzw. der Einsatz hoher Anteile organischer Zuschlagstoffe können die spätere Verwertung des gereinigten Bodens, z. B. den Einsatz als Unterboden, einschränken, wobei als Maß für die Verdichtung und damit Eignung des Bodens die **Proctor-Zahl** herangezogen wird.

Ebenfalls Einfluß auf die biologische Behandlung hat der **pH-Wert** des Bodens. Bei den meisten Böden treten pH-Werte zwischen 6 und 8 auf. Stark abweichende pH-Werte hemmen biologische Aktivitäten und damit den Schadstoffabbau im Boden. Deshalb ist in solchen Fällen eine Neutralisation des Bodens erforderlich. Die Einstellung eines optimalen pH-Wertes stellt somit eine wichtige Regulationsmöglichkeit bei der biologischen Bodensanierung dar.

3.1.2.3 Schadstoffe

Grundvoraussetzung für die Art der Schadstoffe, die mit der Mietentechnik behandelbar sind, ist deren **biologische Abbaubarkeit**. Das Abbauverhalten der verschiedenen Schadstoffgruppen ist in Kapitel 2.1 "Beurteilung des Abbauverhaltens von Umweltschadstoffen" ausführlich dargestellt.

Bedingt durch die **Verfahrensführung** zielt die Mietentechnik auf die Behandlung aerob abbaubarer Schadstoffe ab, unabhängig davon, welche Art der Belüftung (s. Kap. 3.1.1.5) gewählt wird. Eine Ausnahme stellen modifizierte Mietenverfahren dar, die durch Menge und Zusammensetzung der Zuschlagstoffe eine anaerobe bzw. zweistufige (anaerob – aerobe) Verfahrensführung erlauben [70]. Durch den hohen Anteil leicht verwertbarer, organischer Zuschlagstoffe führen diese zu einer biologischen Sauerstoffzehrung innerhalb der Bodenmiete, so daß sich im Mietenkörper rasch anaerobe Verhältnisse einstellen. Die Vorgänge sind mit einer biologischen Kompostierung vergleichbar, so daß diese modifizierte Mietentechnik auch als Kompostierungsverfahren bezeichnet wird. Anaerob-aerobe Mietenverfahren wurden bei der biologischen Behandlung Sprengstoff-kontaminierter Böden im technischen Maßstab erprobt [69; 73] (vgl. Kap. 7).

Einige Schadstoffeigenschaften lassen den Einsatz der Mietentechnik nur mit Einschränkungen bzw. zusätzlichen Maßnahmen zu. So erfordert das Vorliegen von Schadstoffen mit hoher **Flüchtigkeit** (z. B. BTEX-Aromaten, kurzkettige Aliphaten, LCKW) besondere technische Maßnahmen wie Absaugung und Abluftreinigung, was beispielsweise durch eine starke Saugbelüftung mit nachgeschaltetem Abluftfilter realisiert werden kann. Zur Emissionsvermeidung sind eventuell auch Verfahren mit geschlossenen Reaktoren angezeigt (vgl. Kap. 3.2).

3.1.2.4 Hemmfaktoren

Neben den dargestellten Einschränkungen bei Boden- und Schadstoffeigenschaften können besondere Hemmfaktoren vorliegen, die den gewünschten Schadstoffabbau verhindern:

- Die **Bioverfügbarkeit** der Schadstoffe in den Bodenmieten kann durch geringe Wasserlöslichkeit oder durch Sorption an organische Substanz und/oder an den Tonanteil im Boden eingeschränkt sein ([23] und Kapitel 2.3.1.3). Die Bioverfügbarkeit stellt einen Schlüsselfaktor bei der biologischen Sanierung dar [36]. Ist die Bioverfügbarkeit der Schadstoffe niedrig, kann der Einsatz von Stoffen mit lösungsvermittelnden Eigenschaften (z. B. Tenside, Emulgatoren) sinnvoll sein, wobei die Effekte solcher Substanzen durch Referenzen oder Voruntersuchungen nachgewiesen werden sollten ([39] und Kap. 2.4.4).
- Hohe, **toxisch wirkende Schadstoffkonzentrationen** können den biologischen Abbau hemmen. Da diese auch bei **inhomogener Verteilung** der Schadstoffe lokal erreicht werden können, ist durch eine Vorbehandlung sicherzustellen, daß eine Egalisierung der Schadstoffgehalte im Boden erreicht wird (durch intensive Homogenisierung des Bodens).
- Begleitverunreinigungen, sog. **Co-Kontaminanten**, können die Aktivität der am Abbau beteiligten Mikroorganismen hemmen (s. Kap. 2.3.1.2). Besondere Bedeutung haben Schwermetall-Verunreinigungen, die in hohen Konzentrationen den Abbau organischer Schadstoffe behindern können. Weiterhin können Hemmeffekte bei Vorliegen biozider Stoffe auftreten, die gegenüber Mikroorganismen toxisch sind (z. B. Pflanzenschutzmittel) [59] (s. Kap. 2.3.1.4). Im Gegensatz dazu können Co-Kontaminanten auch den Abbau selbst hemmen, wenn diese ein Konkurrenzsubstrat für den Hauptschadstoff darstellen.

Neben den hier dargestellten Einflußgrößen gibt es eine Reihe weiterer Parameter, die die Sanierbarkeit von Böden bestimmen. Diese werden eingeteilt in Bodenparameter, physikochemische Parameter und biologische Parameter. Die Bedeutung und methodische Bestimmung dieser Einflußgrößen ist im einzelnen im Kapitel 2.3. "Beurteilung der biologischen Sanierbarkeit von Böden, Parameter und Methoden" dargestellt.

3.1.3 Technische Anforderungen

3.1.3.1 Bodenaushub und -transport

Nach Abschluß der gesetzlich vorgeschriebenen Untersuchung und Durchführung einer Machbarkeitsstudie wird schadstoffbelasteter Boden mit geeignetem Gerät (Stand der Technik) entnommen. Hierbei sind die "Regeln für Sicherheit und Gesundheitsschutz bei der Arbeit in kontaminierten Bereichen" [61] zu beachten, z. B.:

- Organisatorische Maßnahmen (Baustellenkoordinator, Sanierungsplan)
- Meßtechnische Überwachung
- Einsatz von Erdbaumaschinen und Fahrzeugen mit geeigneten Filteranlagen (z. B. gem. ZH 1/184 [62])
- Maßnahmen gegen Gefahrstoffe (Lüftungsmaßnahmen, Schutzausrüstung)

Der Aushub wird gutachterlicherseits überwacht. Hier sind entsprechende Anforderungen an die **Sachkunde** zu berücksichtigen. Ggf. ist ein Sachverständiger für Altlasten nach § 18 BBodSchG beizuziehen. Zur genauen Eingrenzung des Umfangs zu behandelnder kontaminierter Materialien sind weitere Beprobungen und Untersuchungen während der

Aushubarbeiten (Qualitätssicherungsmaßnahmen) durch ein geeignetes Vorortlabor für zeitnahe Entscheidungen sinnvoll.

Der **Transport** von kontaminiertem Bodenmaterial ist unter Beachtung der rechtlichen Vorschriften durchzuführen:

- Rechtliche Grundlagen, insbesondere Transportgenehmigung (§ 49 KrW-/AbfG), Entsorgungsnachweis (NachwV), Deklaration
- Vermeidung von möglichen Emissionen (z. B. bei leichtflüchtigen Kohlenwasserstoffen) durch Verschluss, Kapselung in gasdichten Wannen oder Mulden etc.
- Weitere Schutzmaßnahmen, Dekontamination der Fahrzeuge (z. B. Reifenwaschanlage)

In einem **Sanierungsplan** (§13 BBodSchG) sollen diese Anforderungen vor dem Bodenaushub und -transport festgelegt und behördlich abgestimmt sein.

3.1.3.2 Anforderungen an Anlagen

Biologische Bodenbehandlungsanlagen müssen entsprechend des durchzuführenden Verfahrens und der Kontamination des zu behandelnden Materials technisch ausgestattet sein; dabei sind sowohl die geplanten Verfahrensschritte als auch der spätere Rückbau der Anlage zu berücksichtigen (vgl. Entwurf zur VDI 3898 "Emissionsminderung/biologische Bodenbehandlungsanlagen" [67], "Mikrobiologische Verfahren zur Bodendekontamination" [27] und "Anforderungen an biologische Bodenbehandlungsanlagen nach dem Mietenverfahren" [40]). An die Ausstattung der Anlagen sind folgende Anforderungen zu stellen:

- Bodenanlieferung/Annahme
(geschützte Lagerfläche, ggf. Einhausung, ggf. Ablufttechnik)
- Bodenaufbereitung/Erstkonditionierung
(Einhausung, Transportmaschinen, Aufbereitungstechnik, Abluftführung)
- Biologischer Prozeß
(Einhausung, Einhaltung der Umgebungs- und Milieubedingungen, ggf. Ablufttechnik)
- Nachkonditionierung
(Maschinen- oder Verfahrenstechnik)

Fachspezifische **Zertifizierungen** (z. B. "Entsorgungsfachbetrieb") und **Qualitätsmanagement-Systeme** [11] sind für die qualitätsgerechte Durchführung der Sanierungsmaßnahme erforderlich.

3.1.3.3 Monitoring des Schadstoffabbaus

Ein **Monitoringkonzept** ist für jede Verfahrensvariante festzulegen. Um hinsichtlich der Kostenkontrolle den analytischen Umfang möglichst gering zu halten, sind die Untersuchungsergebnisse der Deklarationsanalyse sowie der Voruntersuchungen hilfreich. Die Analyse eines Leitparameters für den/die Schadstoffe und die für den Sanierungsverlauf notwendigen Kenndaten (z. B. Nährstoffversorgung, Temperatur, Wasser- und Sauerstoffgehalt, pH-Wert) sind in den meisten Fällen ausreichend.

Die generelle Vorgehensweise bei der **Probennahme** wird in Kapitel 4.1 erläutert. Die zeitliche Planung der Probennahmen oder Messungen richtet sich nach der voraussichtlichen Dauer der Maßnahme, den allgemeinen Erfahrungswerten und dem Verlauf der Dekontamination und kann daher nur grundlegend festgelegt werden. Entsprechende Bodenprobennahme- und Untersuchungspläne müssen erstellt und dokumentiert werden. Die Ergebnisse aus den Untersuchungen, resultierende Entscheidungen und getroffene Maßnahmen (z. B. Konditionierung des Nährstoffhaushalts) sind im Rahmen der Qualitätssicherung entsprechend aufzuzeichnen und zu begründen.

3.1.3.4 Immissionsschutz

Die Betreiberpflichten sind grundlegend im BImSchG geregelt (s. Kap. 5). Für die einzelne Bodenbehandlungsanlage werden die Anforderungen in der immissionsschutzrechtlichen Genehmigung konkretisiert (s. Kap. 5.4).

Die Einhaltung der dem Betreiber obliegenden Pflichten erfolgt regelmäßig unter Mitwirkung des **Immissionsschutzbeauftragten** (§§ 53 ff. BImSchG). Dieser ist gemäß § 1 Abs. 1 i.V.m. Anhang I Nrn. 42 der 5. BImSchV für genehmigungsbedürftige Anlagen zur *Off site*-Behandlung von verunreinigtem Boden zu bestellen. Seine Aufgaben liegen in der Gestaltung und Planung immissionsrelevanter Einrichtungen wie z. B. Abluftechnik und Abluftreinigung, ihrer Kontrolle während des Betriebs sowie der Planung und Durchführung von Emissionsmessungen zur Eigenkontrolle (z. B. Wirkungsgradbestimmung einer Abluftreinigungsanlage, Rein- und Rohgas). Externe Emissionsmessungen werden durch eine nach §§ 26, 28 BImSchG bekanntgegebene Meßstelle durchgeführt. In begründeten Fällen können auch kontinuierliche Messungen gemäß § 29 BImSchG erforderlich sein.

Sämtliche Emissionsmessungen, sowie deren Probennahme werden in VDI-Richtlinien geregelt (z. B. Bestimmung des gesamten organischen Kohlenstoffs nach VDI 3481 mit Probennahme gemäß VDI 2066). Eine Übersicht der gültigen VDI-Richtlinien wird vom Verein Deutscher Ingenieure herausgegeben (VDI / DIN Handbuch zur Reinhaltung der Luft) [66].

Die zulässigen **Emissionsgrenzwerte** werden für genehmigungsbedürftige Anlagen in der Technischen Anleitung zur Reinhaltung der Luft (TA Luft) geregelt [20]. Maßgebend sind die in der Anlagengenehmigung festgesetzten Emissionsgrenzwerte, welche sich aufgrund regionaler Besonderheiten von denen in der TA Luft angegebenen Massenkonzentrationen unterscheiden können. Auch andere immissionsschutzrechtliche Vorgaben (z. B. Höhe des Abluftkamins, Meßrhythmus etc.) können abweichend zur TA Luft in der Anlagengenehmigung festgelegt werden.

3.1.3.5 Arbeitsschutz

Der Umgang mit **Gefahrstoffen** (hier: Schadstoffe im Boden) wird in der "Verordnung über gefährliche Stoffe" (Gefahrstoffverordnung) [19] mit den zugehörigen "Technischen Regeln für Gefahrstoffe" (TRGS) geregelt [64]. Weiterhin werden die "Unfallverhütungsvorschriften" (UVV), Berufsgenossenschaftliche Richtlinien (ZH-Richtlinien), DIN-Normen, VDI-Bestimmungen sowie die Verordnung über brennbare Flüssigkeiten (VbF) mit den technischen Regeln (TRbF) herangezogen [65].

Hinweis: Da die Berufsgenossenschaften ihr Vorschriften- und Regelwerk derzeit neu ordnen, werden die UVV in BGV (Berufsgenossenschaftliche Vorschriften) im Rahmen von Neudrucken gelegentlichsbezogen umbenannt. Sie sind gemäß des autonomen Satzungsrechts der BG verbindlich. Weiterhin werden im Rahmen der Umstrukturierung BGR (Berufsgenossenschaftliche Regeln), BGI (Berufsgenossenschaftliche Informationen) und BGG (Berufsgenossenschaftliche Grundsätze) erarbeitet bzw. vorhandenes Material umbenannt.

Die Ausstattung und Anforderungen an Arbeitsplätze werden in der Arbeitsstättenverordnung (ArbStättV) [2] mit entsprechenden Richtlinien (ArbStättR) [1] beschrieben.

Belange des **Arbeitsschutzes** regelt die Fachkraft für Arbeitssicherheit, ein Sicherheitsingenieur oder der Sicherheitsbeauftragte. Die Bestellung von Fachkräften und Beauftragten erfolgt in Relation zur Unternehmensgröße. Aufgaben dieser Art können auch von externen Stellen wahrgenommen werden. Hauptsächliche Tätigkeiten liegen in der Kontrolle von Anlagen (z. B. Einhaltung der o. g. Bestimmungen, Mängelerkennung, sicherer Arbeitsablauf), der Regelung des persönlichen Arbeitsschutzes (z. B. Sicherheitskleidung, Augen- und Gehörschutz, Atemschutz) und der Ermittlung von Gefahrstoffen. Personen, welche mit Arbeiten in kontaminierten Bereichen beauftragt sind, müssen sich einer **arbeitsmedizinischen Vorsorgeuntersuchung** durch einen fachkundigen Arzt (§3 UVV "Betriebsärzte") unterziehen. Für jeden Arbeitsplatz sind Gefährdungsabschätzungen und Arbeitsplatzanalysen durchzuführen (z. B. "Ermittlung und Beurteilung der Konzentrationen gefährlicher Stoffe in der Luft in Arbeitsbereichen", TRGS 402 und "Bewertung von Stoffgemischen in der Luft am Arbeitsplatz", TRGS 403).

Auftretende Schadstoffkonzentrationen gefährlicher Stoffe in der Luft, z. B. durch Emissionen, werden in der TRGS 900 bewertet. Hier sind "Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen" (MAK-Werte), Technische Richtkonzentrationen (TRK-Werte) und biologische Arbeitsstofftoleranzwerte (BAT-Werte) aufgeführt. Die Einhaltung dieser Grenzwerte ist mittels technischer Schutzmaßnahmen oder persönlicher Schutzausrüstung zu gewährleisten. In diesem Zusammenhang wird auf die "Regeln für Sicherheit und Gesundheitsschutz bei der Arbeit in kontaminierten Bereichen" [61] verwiesen, deren Inhaltsstruktur in Tabelle 3.1 aufgeführt ist.

Tab. 3.1: Inhaltsstruktur der Regeln für Sicherheit und Gesundheitsschutz bei der Arbeit in kontaminierten Bereichen (BGR 128) [61]

Bereich	Regelung in
Organisation	Punkt 4-7
Arbeitsplatz	Punkt 8 und 9
Anlage und Betrieb	Punkt 10-13
Schutzmaßnahmen	Punkt 14-21

Während der Durchführung von biologischen Sanierungsverfahren mittels Mietentechnik sind schwerpunktmäßig folgende Punkte zu beachten (vgl. auch "Anforderungen an biologische Bodenbehandlungsanlagen nach dem Mietenverfahren" [40]):

- Sicherer Umgang mit Erdbaumaschinen und komplexer maschineller Bodenaufbereitungstechnik (Schulung, Fachwissen)
- Vermeidung auftretender Gefahrstoffemissionen durch kontaminierten Boden am Arbeitsplatz durch technische Schutzmaßnahmen (Be- und Entlüftung, Filteranlagen)
- Routinemäßige Ermittlung von Gefahrstoffen am Arbeitsplatz

Bei Auftreten ungewöhnlicher Betriebszustände ist immer der Sicherheitsbeauftragte oder Immissionsschutzbeauftragte (gem. des betrieblichen Notfall- oder Sicherheitsplans) zu verständigen.

3.1.3.6 Lärmschutzmaßnahmen

Die Anforderungen für die Errichtung und den Betrieb von genehmigungsbedürftigen Anlagen werden hinsichtlich des Schallschutzes in der "Technischen Anleitung zum Schutz gegen Lärm" (TA Lärm) beschrieben [21]. Sie werden für die einzelne Anlage durch den Genehmigungsbescheid verbindlich konkretisiert.

Die aufgeführten **Immissionsrichtwerte** sind uneingeschränkt einzuhalten. Bei verfahrensbedingten vorübergehenden Lärmemissionen (z. B. Aufstellung einer Anlage), die über die Spitzenbegrenzungen (vgl. TA Lärm Nr. 2.4.2.1 und 2.4.2.2 ff.) hinausgehen, sind Maßnahmen zur Geräuschminimierung zu treffen. In der Genehmigungsphase wird das Vorhaben auch im Sinne der TA Lärm geprüft. Geräuschemittenten werden ermittelt (z. B. Fahrzeuge, Maschinenaggregate) und die Geräuschemissionen gemessen. In der Immissionsbetrachtung ist die Entfernung der Emissionsquelle zum nächstgelegenen Nachbarn und die Gebietseinteilung für die Immissionsrichtwerte (TA Lärm Nr. 2.32) wesentlich. Ergeben sich erhöhte Geräuschemissionen, sind nach dem jeweiligen Stand der Technik (TA Lärm, Nr. 2.3) geeignete Lärmschutzmaßnahmen anzuwenden.

Generelle Lärmschutzmaßnahmen ergeben sich durch den überwiegend eingehausten Betriebsablauf und die definierten Betriebszeiten. In der Planungs- und Genehmigungsphase sind die Lärmschutzaspekte zu berücksichtigen und der Genehmigungsbehörde im Antragsverfahren entsprechend darzulegen.

3.1.3.7 Nachsorgemaßnahmen

Nach Abschluß einer Sanierung (Sanierungszielwert durch abschließende Deklarationsanalyse nachgewiesen) ist bei *On site*-Anlagen, d. h. einer speziell für ein Sanierungsprojekt am Sanierungsort errichteten Anlage, der **Rückbau** erforderlich. Der Untergrund, welcher im Vorfeld mit einer Abdichtung vor dem kontaminierten Material geschützt wurde, ist ggf. abschließend zu begutachten. Sofern eine immissionsschutzrechtliche Genehmigung bestand, ist die Stilllegung vom Anlagenbetreiber gem. § 16, Abs. 2 BImSchG anzuzeigen.

3.1.4 Praxiserfahrungen

Die Mietentechnik wird großtechnisch bereits seit vielen Jahren als **Standardverfahren** in der Bodensanierung eingesetzt [14]. Für exemplarische Anwendungsfälle wird auf die Referenzliste erfolgreicher Sanierungen im Rahmen einer Firmenbefragung (s. Kap. 6.4, 6.5) und auf die kürzlich vom Umweltbundesamt kostenlos herausgegebene Datenbank "Technologieregister zur Sanierung von Altlasten" - TERESA 2.1 (s. Kap. 8.3.4) verwiesen.

3.1.4.1 Stand und Verbreitung der Technik

Mietenverfahren finden überwiegend Anwendung bei Bodenkontaminationen mit MKW (Mineralölkohlenwasserstoffen) und BTEX-Aromaten. Dies ist einerseits auf die große Verbreitung von Kontaminationen durch Mineralölprodukte (Benzine, Vergaserkraftstoffe, Dieselkraftstoffe, Heizöle) zurückzuführen [41] und beruht andererseits auf der guten biologischen Abbaubarkeit dieser Stoffgruppen (vgl. Kap. 2.1.1). Vereinzelt kommen Mietenverfahren auch bei PAK (polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen) zum Einsatz, allerdings nur dann, wenn ausschließlich oder überwiegend niedrigkondensierte PAK (2- bis 4-Ring-Verbindungen) vorliegen. Weitere Stoffklassen, wie z. B. Phenolverbindungen, nitrierte bzw. chlorierte Kohlenwasserstoffe, werden nur in seltenen Fällen mit dem Mietenverfahren behandelt. Die Gründe dafür liegen darin, daß trotz positiver Ergebnisse im Labormaßstab die großtechnische Erprobung biologischer Verfahren bei diesen Stoffgruppen wenig oder nur teilweise erfolgreich war [55].

Unter den Verfahrensvarianten findet das **dynamische Mietenverfahren** bzw. Wendeverfahren (s. Kap. 3.1.1) am häufigsten Anwendung, nicht zuletzt durch die inzwischen hohe Verbreitung der notwendigen Maschinenteknik (Siebanlagen, Aufbereitungsaggregate, Umsetzmaschinen, Wendegeräte usw.). Darüber hinaus haben dynamische Verfahren im Vergleich zur statischen Mietentechnik Vorteile in der Logistik des Anlagenbetriebes, da die notwendigen Wendegeräte durch zeitversetzten Einsatz jeweils für mehrere Mieten bzw. Mietenstränge genutzt werden können.

Bedingt durch die rasche Entwicklung stationärer Bodenreinigungsanlagen ist eine deutliche Verschiebung von *On site*-Sanierungen hin zu *Off site*-Sanierungen zu beobachten. Inzwischen existiert ein flächendeckendes Netz von Bodenreinigungsanlagen in Deutschland und lediglich große Bodenmengen werden noch *on site* behandelt [54]. Zu diesem Trend haben folgende Gründe beigetragen [45]:

- Keine durch Installation mobiler Anlagen bedingten Wartezeiten am Schadensort
- Kein hoher Platzbedarf am Schadensort
- Übergang des Eigentums des kontaminierten Bodens auf den Sanierer, d. h. Entlassung des Sanierungspflichtigen aus der Verantwortung für den Boden
- Wirtschaftliche Behandlung auch kleiner Bodenmengen

Dem Vorteil der vorhandenen Infrastruktur in stationären Behandlungsanlagen steht allerdings der Nachteil der Bodentransporte gegenüber [26]. Durch den Ausbau des Anlagennetzes in Deutschland haben sich die Transportwege in den letzten Jahren jedoch deutlich verkürzt.

In der Praxis werden Mietenverfahren nicht nur als alleinige Sanierungstechnik, sondern auch in **Kombination mit nicht-biologischen Verfahren** eingesetzt. Dies ist bei komplexen Belastungssituationen der Fall, wenn einzelne Bodenbereiche sehr unterschiedliche Schadstoffkonzentrationen aufweisen oder sogar durch verschiedene Kontaminationsarten gekennzeichnet sind, die nicht vollständig durch biologische Verfahren behandelt werden können. Dazu wird der kontaminierte Boden im Zuge des Aushubs in verschiedene Chargen aufgeteilt, die anschließend getrennt behandelt werden. Zum Einsatz kommen Kombinationen mit thermischer Bodenreinigung bzw. mit Bodenwaschverfahren, wobei als Entscheidungskriterien Eignung und Kosten der jeweiligen Verfahren herangezogen werden. Am häufigsten sind Kombinationen aus biologischer Miententechnik und thermischer Bodenreinigung. In diesen Fällen werden hochkontaminierte Bodenbereiche einer thermischen Behandlung zugeführt (z. B. bei Vorliegen von Mineralölen in flüssiger Phase), während geringer belastete Bodenchargen mit der Miententechnik behandelt werden.

3.1.4.2 Kostenrelevante Einflußgrößen

In der Praxis der *Ex situ*-Bodensanierung ist derzeit ein Trend zum 'Minimalaufwand' zu beobachten [26], der seine Ursachen in einem Preisverfall auf dem Sanierungsmarkt hat. Dieser Trend schlägt sich auch auf die biologischen Behandlungsverfahren nieder [28].

Die Behandlung kontaminierter Böden mit biologischer Miententechnik unterliegt einer Reihe kostenrelevanter Einflußgrößen, die im folgenden aufgeführt sind:

Zugänglichkeit

Wie für alle *Ex situ*-Verfahren stellt die Zugänglichkeit des Geländes bzw. des kontaminierten Bodenmaterials einen wichtigen Kostenfaktor dar, weil hier unter Umständen aufwendige Vorarbeiten zu leisten sind, z. B. Abriß von Gebäuden oder Anlagenteilen, Bau von Erschließungswegen, Wasserhaltung bei Auskofferungsmaßnahmen usw.

Transport

Findet die Bodenbehandlung *off site*, also außerhalb des Schadensortes, statt, kann die Entfernung und somit der Transportweg die Gesamt-Behandlungskosten wesentlich beeinflussen.

Anlagenbau und -betrieb

Die Investitionen für Behandlungsanlage und Maschinenteknik inklusive Aufwendungen für Planung, Genehmigungen usw. sind kostenrelevant, ebenso die Betriebskosten (Personal, Energie, Betriebsstoffe, Rohstoffe, Verwertung) und die analytische Überwachung (z. B. Auftragsanalytik).

Behandlungsdauer

Die Behandlungsdauer ist als wichtige kostenrelevante Einflußgröße abhängig von der Bodenbeschaffenheit, der Art und Verteilung der Schadstoffe sowie der Bearbeitungstechnik. Darüberhinaus hängt der erforderliche Behandlungszeitraum vom vorgegebenen Sanierungsziel ab.

Bodenmenge

Die Menge des zu behandelnden Bodens hat wesentlichen Einfluß auf die spezifischen Behandlungskosten, da für Kleinmengen die eingesetzte Maschinenteknik unrentabel wird.

Mietenhöhe

Die Kapazität der Behandlungsanlage und damit der potentielle Bodendurchsatz pro Fläche wird unter anderem durch die Höhe der angelegten Bodenmieten bestimmt. Diese beträgt in der Regel bis zu 3 Metern. Wirtschaftlich interessant ist der Einsatz von Hochmieten (bis zu 5 Metern), allerdings liegen hier noch wenig Betriebserfahrungen vor.

Bedarf an Zuschlag- und Nährstoffen

Je nach Bodenbeschaffenheit und Schadstoffbelastung ist ein Bedarf unterschiedlicher Mengen und Qualitäten von Struktur- und Zuschlagstoffen erforderlich (vgl. Kap. 3.1.1.8). Hochwertige Strukturstoffe für strukturarme Böden können somit einen erheblichen Kostenfaktor darstellen. Weiterhin beeinflusst der Bedarf an Nährstoffen die jeweiligen Kosten zur Durchführung des Mietenverfahrens. In Einzelfällen sind weitere Additive, wie z. B. Kalk zur pH-Wert-Regulierung, ggf. auch Tenside zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit von Schadstoffen, notwendig, die ebenfalls in die Kosten des Verfahrens einfließen.

Technische Zusatzmaßnahmen

Technische Zusatzmaßnahmen sind notwendig beim Vorliegen von Schadstoffen mit besonderen Eigenschaften, z. B. hoher Toxizität oder hoher Flüchtigkeit. So erfordert die Behandlung flüchtiger Schadstoffe im Boden Maßnahmen zur Fassung und Behandlung der Emissionen. Solche Zusatzmaßnahmen können den Verfahrensablauf entscheidend verändern und damit hohe Kosten verursachen.

Die hier dargestellten kostenrelevanten Größen geben einen Anhaltspunkt für die wirtschaftlichen Einflüsse bei Anwendung der Mietentechnik wieder. Die Vorgehensweise bei einer vergleichenden ökonomischen Bewertung verschiedener Sanierungsverfahren ist in Kapitel 3.4 dargestellt.

3.2 Reaktorverfahren

3.2.1 Grundlagen

3.2.1.1 Definition

Unter Reaktorverfahren der biologischen Bodensanierung sind Technologien zu verstehen, die in geschlossenen Systemen (**Bioreaktoren**) zu einem biologischen Schadstoffabbau führen. Je nach Wassergehalt des zu behandelnden Bodens wird zwischen **Feststoff- und Suspensionsreaktoren** unterschieden.

3.2.1.2 Wissenschaftlich-technische Grundlagen

Der biologische Abbau von Schadstoffen in Bioreaktoren wird analog der Mietentechnik grundsätzlich dadurch erreicht, daß Limitationsfaktoren für den Abbau aufgehoben werden. In Bioreaktoren läßt sich dieses Ziel allerdings schneller und effektiver erreichen als in Bodenmieten, weil erstens ein wesentlich höherer Durchmischungsgrad von Boden und Zusatzstoffen erreicht werden kann, und zweitens ein geschlossenes System besser kontrollierbar und damit steuerbar ist. Welche Limitationsfaktoren vorliegen können und welche Möglichkeiten zu deren Aufhebung in Bioreaktoren bestehen, geht aus der nachfolgenden Tab. 3.2 hervor.

Tab. 3.2: Aufhebung von Limitationsfaktoren in Bioreaktoren¹

Limitierende Faktoren	Aufhebung der Limitation
Sauerstoffmangel	Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks durch intensive Belüftung, optimierte Begasungstechnik bzw. Verwendung von reinem (technischem) Sauerstoff
Nährstoffmangel	Zugabe von Nährstoffkomponenten und schneller Ausgleich kleinräumiger Nährstoffdefizite durch geeignete Mischereinbauten
Physikalische Milieufaktoren	Konditionierung durch Einstellung von pH-Wert, Feuchtigkeit (Mischaggregate), Temperatur (Heizelemente, Wärmetauscher)
Verfügbarkeit der Schadstoffe	Erhöhung des Stoffübergangs in die wäßrige Phase durch Erhöhung des Wassergehaltes und kontinuierlicher Durchmischung (Mischaggregate)
Fehlen / Mangel an Schadstoffabbauenden Mikroorganismen	Beimpfung mit vorgezogenen Kulturen (Bioaugmentation)

¹ modifiziert nach [68]

Bioreaktoren für die Reinigung kontaminierter Böden können sehr unterschiedlich aufgebaut sein. Trotz dieser Vielfältigkeit gibt es folgende gemeinsame Grund-Elemente:

- Reaktorbehälter zur Aufnahme des Bodens (bzw. der Bodensuspension)
- Mischaggregate zur Homogenisierung des Bodens und Verteilung von Zusatzstoffen
- Begasungseinrichtungen zur Versorgung mit Sauerstoff, ggf. auch mit Inertgasen
- Abluftfilter zur Reinigung kontaminierter Prozeßabluft
- Dosiereinrichtungen für die Zugabe von Additiven (Nährstoffe, Elektronenakzeptoren, Elektronendonatoren, pH-aktive Substanzen, Redox-aktive Substanzen etc.)
- Temperiereinrichtungen zur Erzeugung und Kontrolle der gewünschten Temperaturen

Durch die geschlossene Bauweise und den hohen Homogenisierungsgrad der zu behandelnden Böden lassen sich in Bioreaktoren relevante Parameter meßtechnisch gut erfassen. Die Erfassung dieser Daten kann entweder durch Einzelmessungen oder kontinuierlich durch online-Messungen erfolgen. Verfügt ein Bioreaktor über eine Prozeßsteuerung, lassen sich darüber hinaus wichtige Parameter auf vorgegebene Sollwerte hin regeln und dadurch optimale Abbaubedingungen einstellen.

3.2.1.3 Feststoffreaktoren

In Feststoffreaktoren werden erdfeuchte Böden behandelt, so daß kein freies Wasser in Form von Sicker- oder Prozeßwässern auftritt. Der Feuchtegehalt beträgt dabei in der Regel zwischen 50 und 70 % der maximalen Wasserhaltekapazität der zu behandelnden Böden [72]. Es konnte gezeigt werden, daß die Einstellung des Wassergehaltes entscheidenden Einfluß auf die biologische Aktivität im Boden hat. Bei geringen Feuchtigkeiten (unter 50 % der maximalen Wasserhaltekapazität) steht den schadstoffabbauenden Mikroorganismen nicht genügend Wasser zur Verfügung, während bei hohen Feuchtigkeiten die Sauerstoffversorgung der Mikroorganismen limitiert ist [52; 53] (vgl. Kap. 2.3.2.3). Bei feinkörnigen/bindigen Böden ist die Sauerstoffversorgung von Mikroorganismen zudem durch die Bildung unerwünschter Bodenpellets behindert [48] (s. auch Kap. 2.3.1.1).

Bei der Bodenvorbehandlung ist besonderes Augenmerk auf eine sorgfältige Störstoffauslese zu richten, weil Störstoffe als feste Bestandteile im Boden an den Mischaggregaten der Reaktoren zu Beschädigungen führen können [25]. Grobe Partikel werden bei Bedarf mittels eines Brechers auf die notwendige Korngröße zerkleinert (vgl. Kap. 3.1.1.3).

Die Einteilung von Feststoffreaktoren erfolgt nach dem jeweiligen Bauprinzip. In Abb. 3.3 sind ausgewählte Reaktoren dargestellt. Zur Anwendung kommen zum einen **Drehtrommel- bzw. Drehrohrreaktoren**. Die Reaktoren bestehen aus einer Drehtrommel mit fest eingebauten Mischeinrichtungen und können ein Fassungsvermögen bis zu 100 m³ haben [23]. Ähnliche Anlagen werden in der thermischen Bodenreinigung, in der Zementherstellung bzw. bei Trocknungsprozessen (z. B. Sandtrocknungsanlagen) eingesetzt. Prinzipiell lassen sich Drehtrommelanlagen sowohl chargenweise (Batch-Betrieb) als auch kontinuierlich betreiben.

Im Gegensatz zu Drehtrommelanlagen verfügen **Wannen- und Röhrenreaktoren** über ein festes (statisches) Reaktorgehäuse und mobile Mischeinrichtungen [68]. Wannenreaktoren bestehen aus einzelnen Segmenten (modularer Aufbau) und lassen sich somit der erforderlichen Behandlungskapazität anpassen. Durch Deckelung der Segmente ist das System geschlossen. Ein Mischaggregat mit vertikal angeordneten Rührwellen durchläuft den gesamten Wannenreaktor und führt zu einem hohen Homogenisierungsgrad des Bodens. Röhrenreaktoren verfügen dagegen über eine bewegliche Schnecke, die den Boden im Reaktorinneren bewegt und dadurch homogenisiert.

Als weiterer Reaktortyp kommen **Flachbettreaktoren** zum Einsatz [72]. Sie bestehen aus einem oder mehreren flachen Containern, die stapelbar sind und somit mobil eingesetzt werden können. Zur Homogenisierung des Bodens verfügen die einzelnen Container über mehrere parallele horizontale Rührwellen. Die Belüftung erfolgt über Begasungsschläuche am Containerboden. Optional läßt sich der zu behandelnde Boden zudem über einen Wasserkreislauf bewässern (Sprinkleranlage, gelochter Containerboden, Auffangwanne).

In Einzelfällen sind weitere Reaktortypen zur biologischen Sanierung kontaminierter Böden erprobt bzw. eingesetzt worden. Dazu zählen **vertikale Reaktoren** in einer Bauweise, die aus der Betontechnik (Chargenmischer) bzw. aus der Silotechnik (Silofermenter, Siloreaktoren) bekannt ist. Vertikalreaktoren bieten einen vergleichsweise einfachen Aufbau, sind jedoch nur begrenzt einsetzbar (Verdichtungsproblematik).

3.2.1.4 Suspensionsreaktoren

Im Gegensatz zu Feststoffreaktoren werden in Suspensions- oder slurry-Reaktoren durch Zugabe von Wasser oder wässrigen Medien Bodenschlämme eingesetzt. Dadurch wird die maximale Wasserhaltekapazität des Bodens deutlich überschritten. Suspensionsreaktoren werden meist mit Feststoffanteilen zwischen 30 und 50 Gew.-% betrieben [72]. Bodensuspensionen mit höheren Feststoffgehalten sind technisch schwer zu handhaben, niedrigere Feststoffgehalte sind dagegen in der Regel unwirtschaftlich.

Verfahrenstechnisch bieten Bodensuspensionen im Vergleich zu Feststoffverfahren zwei wesentliche Vorteile. Erstens führen sie zu äußerst homogenen Gemischen, deren Behandlung entsprechend gut kontrollierbar und steuerbar ist. Zweitens lassen sich in Suspensionsverfahren feinkörnige, bindige und schlecht durchlässige Böden bzw. Bodenfraktionen biologisch reinigen, die als Feststoff nicht oder nur unzureichend behandelbar sind. Nachteilig erweist sich ein erhöhter Aufwand bei der Herstellung von Bodensuspensionen und insbesondere bei der Entwässerung der Suspension nach erfolgter Behandlung (z. B. durch den Einsatz von Filterpressen, Siebbandpressen etc.).

Die Bauprinzipien von Suspensionsreaktoren stammen im wesentlichen aus der Abwassertechnik und damit verknüpften Schlammbehandlungsverfahren. Auf diese Weise ließen sich wichtige Erkenntnisse, z. B. Techniken des Sauerstoffeintrages oder auch Anaerobotechniken, auf Suspensionsreaktoren übertragen. Die Einteilung von Suspensionsreaktoren erfolgt nach dem jeweiligen Verfahrensprinzip (s. Abb. 3.3), wobei allerdings auch Kombinationen verschiedener Verfahrensprinzipien in einem Reaktortyp vorliegen können.

Rührreaktoren bestehen aus einem statischen Gehäuse und einem Rührsystem, das zum einen die Bodensuspension in Schwebelage hält, zum anderen für eine gleichmäßige Verteilung der Luftzufuhr bzw. der dosierten Zusatzstoffe in der Suspension sorgt. Die Reaktoren können beispielsweise als Rührkesselsysteme mit einer zentralen Rührwelle ausgelegt sein. Zur Anwendung kommen auch Wannenreaktoren mit einem modularen Aufbau, wie bereits im Kap. 3.2.1.3, "Feststoffreaktoren", beschrieben, wobei allerdings für Suspensionen andere Rührertypen, Begasungs- und Dosierungseinrichtungen als für Feststoffe verwendet werden.

Neben Rührreaktoren werden für die Behandlung von Bodensuspensionen auch **Schlaufenreaktoren** und **Wirbelschichtreaktoren** eingesetzt. Um die Bodenpartikel in Schwebelage zu halten und einen hohen Durchmischungsgrad mit den zugesetzten Additiven zu erzielen, erfolgt eine Kreislaufführung der Suspension. Bei Schlaufenreaktoren entsteht das Strömungsbild einer Schlaufe, bedingt durch den Einbau eines konzentrischen Leitrohres im Reaktorrinnen (s. Abb. 3.3). Bei Wirbelschichtreaktoren dagegen wird eine Kreislaufführung erreicht, indem die Suspension aus dem oberen Teil des Reaktors (Reaktorkopf) abgezogen wird und über eine Pumpe unten wieder zugeführt wird. Befinden sich am Boden von Schlaufen- oder Wirbelschichtreaktoren Belüftungseinrichtungen, läßt sich ein Absetzen von Bodenpartikeln durch aufsteigende Luft-(Gas-)blasen vermeiden (**Airlift-Prinzip**).

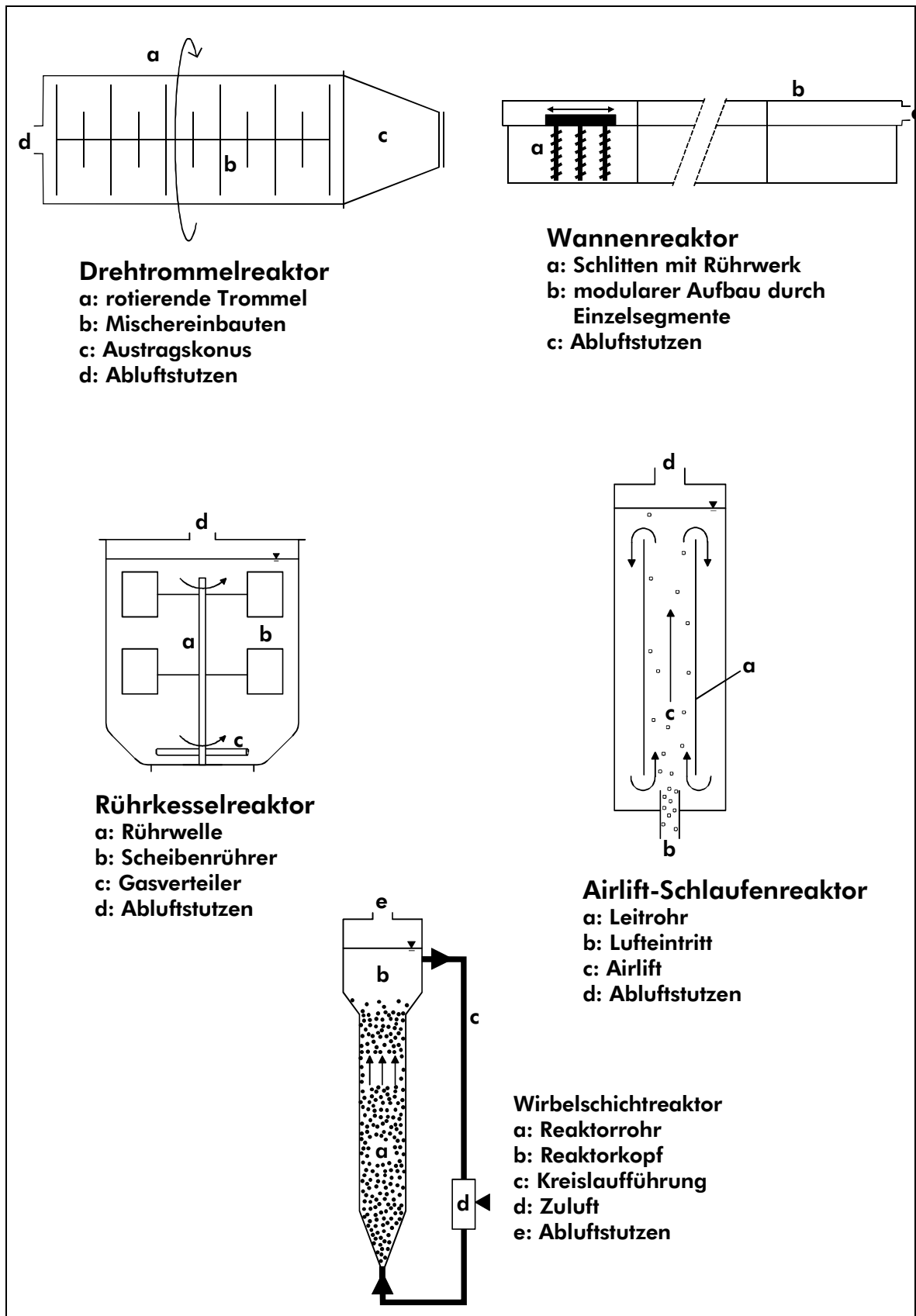


Abb. 3.3: Bauprinzip ausgewählter Feststoff- und Suspensionsreaktoren. Die Darstellungen sind stark vereinfacht.

Neben den dargestellten Reaktortypen gibt es zahlreiche Modifikationen und Einzelentwicklungen. Einige der Entwicklungen stammen aus der Feststofftechnologie, z. B. modifizierte Drehtrommelreaktoren für die Behandlung von Bodensuspensionen. Auch das aus der Abwasserreinigung abgeleitete Sequence-Batch-Verfahren findet bei der Behandlung von Bodensuspensionen Anwendung [24]. Weitere Ansätze zielen auf die Entwicklung von Mehrstufensystemen ab, in denen einzelne Kornfraktionen klassiert und unterschiedlich behandelt werden [72]. Die Wirtschaftlichkeit dieser mit einem hohen technischen Aufwand verbundenen Verfahren ist allerdings fraglich.

3.2.1.5 Betriebsweisen

Prinzipiell lassen sich Bioreaktoren sowohl in Gegenwart von Sauerstoff (aerob) als auch in Abwesenheit von Sauerstoff (anaerob) betreiben. Durch die Steuerbarkeit von Bioreaktoren ist außerdem eine zwei- oder mehrstufige Verfahrensführung möglich (z. B. anaerob/aerob-Behandlung). Dadurch führen Bioreaktoren im Vergleich zur konventionellen aeroben Mietentechnik zu einer deutlichen Erweiterung des Spektrums behandelbarer Schadstoffe.

Der Eintrag von Sauerstoff in Bioreaktoren zur **Erzeugung aerober Verhältnisse** kann auf verschiedene Weise erfolgen. Bei Feststoffreaktoren sorgen im allgemeinen Mischaggregate für einen regelmäßigen oder sogar kontinuierlichen Kontakt des Bodens mit Luftsauerstoff. Bei Suspensionsreaktoren dagegen erfolgt der Eintrag von Sauerstoff über Zuluftleitungen mit Gasverteilern, Injektionsdüsen oder Begasungsmembranen, wobei sowohl Druckluft als auch technischer Sauerstoff zum Einsatz kommen können. In einigen Fällen erfolgt eine externe Begasung über separate Blasensäulen, die mit dem Bioreaktor verschaltet sind [43]. Prinzipiell ist auch der Eintrag von Sauerstoff über gelöste Sauerstoffträger wie z. B. Wasserstoffperoxid möglich.

Zur **Erzeugung anaerober Verhältnisse** in Bioreaktoren erfolgt eine Begasung der Reaktoren mit Inertgas (z. B. Stickstoff), so daß dadurch Sauerstoffreste aus dem System ausgetrieben werden. Dazu können prinzipiell die gleichen Begasungseinheiten verwendet werden, über die im aeroben Betrieb Sauerstoff zugeführt wird. Eine weitere Möglichkeit zur Erzeugung anaerober Bedingungen besteht darin, den Reaktor unter Luftabschluß zu halten und den im System befindlichen Sauerstoff durch biologische Sauerstoffzehrung zu verbrauchen. Dieser Prozeß läßt sich durch Zugabe leicht verwertbarer Kohlenstoffquellen beschleunigen und bietet sich primär bei Suspensionsreaktoren an, weil wäßrige Systeme den Luftabschluß begünstigen. In jedem Fall ist zu berücksichtigen, daß bei anaerober Verfahrensführung geeignete Elektronenakzeptoren (z. B. Nitrat, Sulfat) in ausreichender Menge zur Verfügung stehen müssen.

Für die **Beimpfung** von Bioreaktoren mit Mikroorganismen gibt es im wesentlichen die gleichen Gründe wie oben beschrieben (s. Kap. 3.1.1.7). Zum Einsatz kommen beispielsweise Klär- und Faulschlämme oder vorgezogene Kulturen von Mikroorganismen. Bioreaktoren bieten als geschlossene Systeme den Vorteil, daß zugesetzte Kulturen besser kontrollierbar sind. Darüber hinaus lassen sich die erforderlichen Wachstumsbedingungen zur Etablierung zugesetzter Mikroorganismen besser einstellen. Grundsätzlich gilt jedoch, daß die Stimulierung der autochthonen Mikroflora einer Beimpfung mit Spezialkulturen vorzuziehen ist (vgl. Kap. 3.1.1.7).

Beim Vorliegen von Mangelbedingungen erfolgt bei Bioreaktoren - analog den anderen biologischen Reinigungsverfahren - der Zusatz von **Nährstoffen**. Neben organischen und anorganischen Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphorverbindungen sind je nach Abbauprozess weitere Elemente notwendig, wie unter Kapitel 3.1.1.9 und 2.4.3 dargestellt. Als Applikationsform kommen feste, gelöste und flüssige Nährstoffe in Frage. Durch den hohen Homogenisierungsgrad in Bioreaktoren lassen sich lokale Nährstoffdefizite ausgleichen. Als weitere **Additive** können bei Bioreaktoren organische Co-Substrate, Puffersubstanzen, Redox-aktive Substanzen, Komplexbildner, Detergentien und Lösungsvermittler zum Einsatz kommen. Dagegen ist eine Bodenauflockerung durch Zugabe von Strukturstoffen (bei Feststoffreaktoren) im Gegensatz zur Mietentechnik nicht üblich, weil der Boden durch den Mischvorgang im Reaktor selbst intensiv bewegt und gelockert wird [68].

3.2.2 Voraussetzungen

3.2.2.1 Standortverhältnisse

Grundsätzlich lassen sich Reaktorverfahren vor Ort (*on site*) als auch außerhalb des Ortes, an dem der kontaminierte Boden anfällt, (*off site*) einsetzen. Die Wahl des Standortes hängt von verschiedenen Kriterien ab. Zum einen bestimmt der Aufbau von Reaktor und Anlagenkomponenten, ob das System mobil einsetzbar ist oder ausschließlich stationär betrieben werden kann. Desweiteren entscheiden die Platzverhältnisse vor Ort darüber, ob alle notwendigen Anlagenteile und ggf. Einhausungen untergebracht werden können. Ein weiteres Kriterium stellt die Menge des zu behandelnden Bodens dar. Für die Behandlung von Kleinmengen bietet sich eine *Off site*-Behandlung durch Bioreaktoren in einer stationären Bodenreinigungsanlage an. Werden Bioreaktoren *on site* eingesetzt, ist zu berücksichtigen, daß diese technisch anspruchsvollen Verfahren eine ausreichende Infrastruktur und Betreuung (Meßtechnik, Personal etc.) erfordern. Schließlich wird die Wahl des Standortes auch dadurch bestimmt, ob ein Wiedereinbau des gereinigten Bodens vor Ort beabsichtigt ist.

3.2.2.2 Bodeneigenschaften

Wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, werden Reaktorverfahren sowohl für die Behandlung von erdfeuchten Böden als auch von Bodenschlämmen bzw. -suspensionen eingesetzt. Die Behandlung von Böden in Feststoffreaktoren erfordert **Wassergehalte** zwischen 50 und 70 % der maximalen Wasserhaltekapazität und ist damit vergleichbar mit den Anforderungen in der Mietentechnik. Liegen höhere Wassergehalte vor, bieten Feststoffreaktoren die Möglichkeit, den Feuchtegehalt des Bodens durch Nutzung der Belüftungseinrichtungen herabzusetzen, so daß auf eine separate Vortrocknung des Bodens verzichtet werden kann.

Liegt das Ausgangsmaterial bereits als Bodenschlamm vor, so kann dieser direkt bzw. nach Einstellung des gewünschten Feststoffanteils (i. d. R. 30 bis 50 Gew. %) in Suspensionsreaktoren eingesetzt werden.

Einen wichtigen Einfluß auf die Auswahl des Reaktorverfahrens stellt die **Bodentextur** der zu behandelnden Böden dar:

- Feststoffreaktoren sind vorwiegend für grobkörnige und wenig bindige Böden geeignet; nur so ist eine ausreichende Durchlässigkeit der Böden (Sauerstoffversorgung) gewährleistet. Die Behandlung feinkörniger Böden in Feststoffreaktoren führt häufig zu einer Pelletbildung und damit verbunden zu einer Verschlechterung der Sauerstoffversorgung [26].
- Suspensionsreaktoren dagegen zielen primär auf die Behandlung feinkörniger Böden oder Bodenfraktionen ab. Dies erfordert in einigen Fällen eine Klassierung der zu behandelnden Böden, wodurch Grobfraktionen abgetrennt und ggf. gesondert behandelt werden [72]. Feinkörnige Bodenpartikel lassen sich durch verschiedene Systeme (Rührwerk, Airlift, Flüssigkeitsumwälzung) in Schwebelage halten, was zu einem optimalen Kontakt zum umgebenden Medium führt. Dies wiederum ist die Voraussetzung zur Desorption der Schadstoffe, die nach Übergang in die wässrige Phase für Mikroorganismen verfügbar sind.

Weitere Bodeneigenschaften, die Einfluß auf die biologische Behandlung von Böden haben, gelten auch für Reaktorverfahren und sind in Kapitel 2.3 "Beurteilung der biologischen Sanierbarkeit von Böden, Parameter und Methoden" dargestellt.

3.2.2.3 Schadstoffe

Die **biologische Abbaubarkeit** der zu behandelnden Schadstoffe ist selbstverständlich auch bei Reaktorverfahren grundlegende Voraussetzung für die Anwendung dieser Technik. In diesem Zusammenhang sei auf die "Beurteilung des Abbauverhaltens von Umweltschadstoffen" in Kap. 2.1 verwiesen. Im Vergleich zur Mietentechnik läßt sich bei Reaktorverfahren das Spektrum behandelbarer Schadstoffe durch die vielfältigen Möglichkeiten der **Verfahrensführung** deutlich erweitern. Wie unter Kapitel 3.2.1.5 erläutert, ist eine aerobe, anaerobe oder auch mehrstufige Verfahrensführung möglich. Dadurch lassen sich in Bioreaktoren beispielweise höher chlorierte Kohlenwasserstoffe wie Tetrachlorethen [44] oder Sprengstoffe wie Trinitrotoluol (TNT) [33; 63] behandeln. Durch die Steuerbarkeit von Bioreaktoren sind sogar besondere Anforderungen, z. B. reduzierte Sauerstoffpartialdrücke für mikroaerophile Mikroorganismen, realisierbar.

Bioreaktoren zielen in besonderer Weise auf die Behandlung von Schadstoffen ab, deren physikalische Eigenschaften in konventionellen Verfahren Probleme bereiten. So sind Bodenkontaminationen, die eine sehr geringe **Wasserlöslichkeit** aufweisen, normalerweise einem biologischen Abbau nicht oder nur unzureichend zugänglich, insbesondere wenn es sich um feinkörnige Böden handelt (eingeschränkte Bioverfügbarkeit). Suspensionsreaktoren tragen diesem Problem Rechnung, indem sie für einen permanenten Kontakt zwischen schadstoffbelasteten Bodenpartikeln und der umgebenden wässrigen Phase sorgen und damit den Stoffübergang begünstigen. Die Eignung von Suspensionsverfahren für solche Fragestellungen konnte demonstriert werden [43].

Bioreaktoren eignen sich auch für die Behandlung von Schadstoffen mit hoher **Flüchtigkeit**. Durch die geschlossene Bauweise verbleiben die Stoffe in der Gasphase des Reaktors bzw. werden gezielt abgesaugt und über Abluftfilter gereinigt. Reaktorverfahren erlauben somit eine vollständige Emissionskontrolle.

Neben den Schadstoffeigenschaften spielt **die Verteilung und Konzentration der Schadstoffe** im zu behandelnden Boden eine wichtige Rolle. Durch die Mischtechnik führen

Reaktorverfahren zu einer raschen Egalisierung der Schadstoffgehalte im Boden. Dies gilt insbesondere für Suspensionsreaktoren, die auch zu einer Auflösung von festen Schadstoffmatrizes (z. B. Einschlüsse, Kristalle) führen können. Durch die Egalisierung werden lokale Kontaminationsherde aufgelöst, die oberhalb des physiologischen Konzentrationsbereichs liegen, und damit die Voraussetzungen für einen gleichmäßigen biologischen Schadstoffabbau geschaffen.

3.2.2.4 Hemmfaktoren

Prinzipiell gelten für Reaktorverfahren die gleichen Hemmfaktoren, wie bereits für die Mietentechnik dargestellt (vgl. Kap. 3.1.2.4). Allerdings bietet die vielfältige Verfahrensführung größere Möglichkeiten, Hemmfaktoren aufzuheben, z. B. eine stufenweise Eliminierung von Co-Kontaminanten.

3.2.3 Technische Anforderungen

3.2.3.1 Bodenaushub und -transport

Die Vorgehensweise für *On site*- bzw. *Off site*-Sanierungen ist in Kapitel 3.1.3.1 beschrieben. Für die Bearbeitung von kontaminierten Böden in Bioreaktoren kann analog verfahren werden.

Der **Bodenaushub** ist unter Beachtung folgender Kriterien durchzuführen:

- Rechtliche Grundlagen, Sanierungsplan
- Regeln für Sicherheit und Gesundheitsschutz bei der Arbeit in kontaminierten Bereichen
- Meßtechnische Überwachung
- Technischer und persönlicher Arbeitsschutz
- Gutachterliche Überwachung
- Beprobung und Analytik durch ein Vorortlabor

Der **Bodentransport** ist unter Beachtung folgender Kriterien zu organisieren:

- Rechtliche Grundlagen
- Emissionsschutz
- Sonstige Schutzmaßnahmen

Die einzelnen Kriterien werden in Kapitel 3.1.3.1 erläutert.

Die angewandten Verfahren und Arbeitsschritte müssen im Sanierungsplan (§13 BBodSchG) aufgeführt werden.

3.2.3.2 Anforderungen an Anlagen

Der Bioreaktor muß hinsichtlich der Aufgabenstellung konzipiert werden. Hierzu wird auf Standardisierungs- und Ausrüstungsempfehlungen für Bioreaktoren und periphere Einrichtungen verwiesen [58]. Diese Empfehlungen gelten sowohl für großtechnische Reaktoren als auch für Versuchsreaktoren im halbtechnischen Maßstab. In Abb. 3.4 ist ein Standard-Bioreaktor mit zugehöriger Peripherie dargestellt.

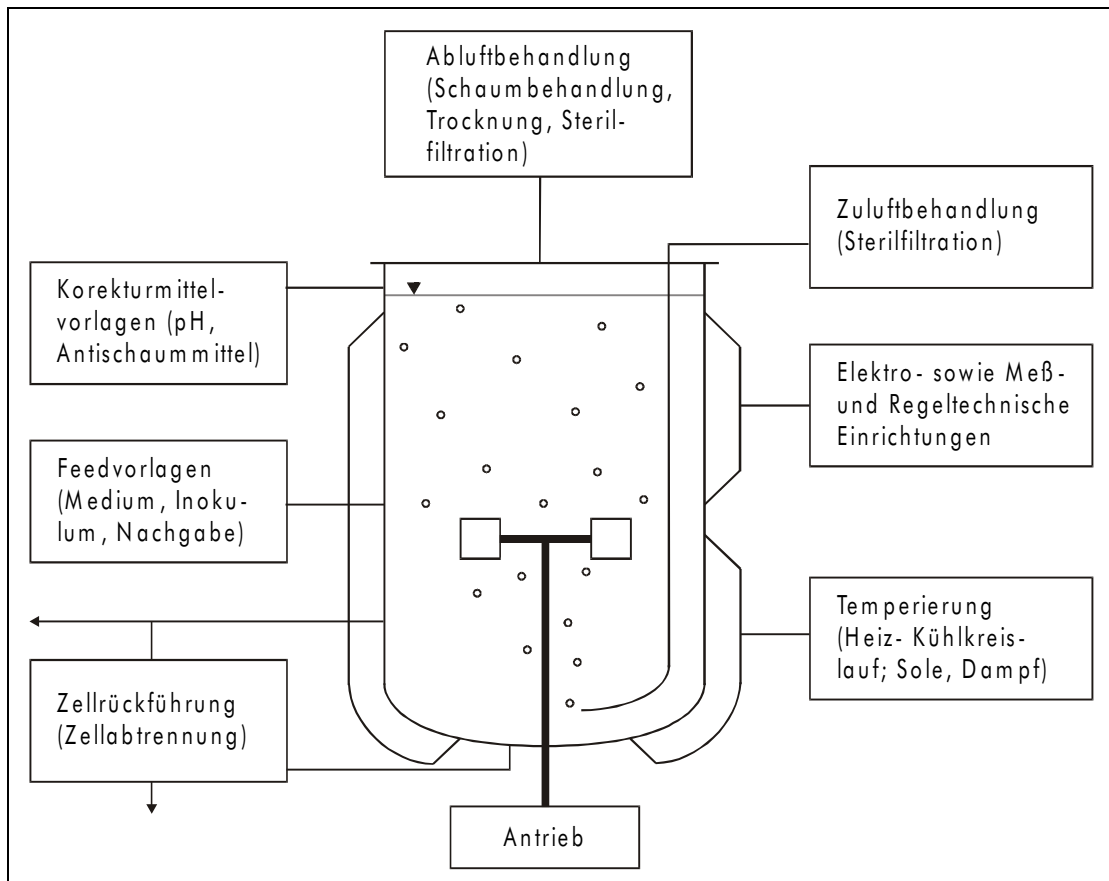


Abb. 3.4: Standard-Bioreaktor mit zugehöriger Peripherie nach [58]

Die anhängigen Aggregate sind der Aufgabenstellung anzupassen. So entfallen bei der Bearbeitung von Böden oder Bodensuspensionen in Bioreaktoren einzelne Elemente, z. B. die Zellrückführung, in der Regel auch die Sterilfiltration der Zuluft. Andere Elemente, z. B. Vorrichtungen zum Ein- und Austrag von Böden bzw. Bodensuspensionen, sind dagegen zu ergänzen.

Mit der zuständigen Behörde ist die Genehmigungssituation (Anzeige, Genehmigung, Bauartzulassung) zu klären.

3.2.3.3 Bodenvorbereitung

Eine Vorbereitung des zu sanierenden Bodenmaterials erfolgt nach den Erfordernissen der gewählten Reaktortechnik und kann folgende Arbeitsschritte umfassen:

- Fraktionierung des Materials (Trennung nach Korngröße)
- Aussortierung von Fremdstoffen (Kunststoffe, Metall etc.)
- Konditionierung des Materials (z. B. Einstellung des Wassergehalts, des pH-Wertes, Nährstoff-Zugabe etc.), ggf. auch Beimpfung (z. B. Zugabe von Belebtschlamm etc.)

Bei der Bearbeitung des kontaminierten Bodens sind Maßnahmen hinsichtlich des Arbeits- und Immissionsschutzes (s. Kap. 3.2.3.6) zu beachten.

3.2.3.4 Monitoring des Schadstoffabbaus

Prinzipiell bieten Bioreaktoren die Möglichkeit einer umfassenden Überwachung von Parametern, die entweder in direktem Zusammenhang mit dem Schadstoffabbau stehen oder aber für den Betriebsverlauf wichtige Meßgrößen darstellen. Zu den potentiellen **Parametern**, die je nach Reaktorverfahren zur Überwachung der Prozeßabläufe kommen können, zählen:

Parameter zur Überwachung des Schadstoffabbaus

- Kontaminanten
- Metaboliten (soweit nachweisbar)
- Verbrauch von Auxiliar-Substraten

Parameter zur Regelung des Prozeßverlaufes

- Sauerstoffpartialdruck (p_{O_2})
- Kohlendioxidpartialdruck (p_{CO_2})
- pH-Wert
- rH-Wert (Redoxpotential)
- Temperatur

Parameter zur Überwachung und Steuerung der Anlage

- Abgas
- Druck
- Füllstand und Schaumhöhe
- Drehzahl und Leistung

Mikrobiologische Parameter

- Gesamt- und Lebendzellzahl
- Biomasse
- Mikrobielle Aktivität
- Enzymaktivitäten

Es ist zu prüfen, welche Messungen kontinuierlich/automatisiert durchgeführt werden müssen (z. B. pH, O₂, CO₂, Schaumhöhe, Füllstand, Abgas). Anzuwendende Meßtechniken sind in der Literatur beschrieben [58]. Für die übrigen Parameter wird ein Beprobungs- und Meßintervall festgelegt und dokumentiert.

Die Planung und Bestimmung der Schadstoffparameter erfolgt in analoger Weise. Es besteht einerseits die Möglichkeit der Probenahme und zeitnahen Analyse des Probenmaterials, andererseits stehen auch hier automatisierte Analysensysteme (z. B. Prozeßgaschromatographie, Infrarot-Gasanalytoren, online-Hochdruckflüssigkeits-chromatographie) zur Verfügung.

Die Dokumentation der Meßergebnisse enthält weiterhin die Punkte Bilanzierung, Wartungsintervalle, Einstell- und Optimierungsarbeiten.

3.2.3.5 Entwässerung

Die Entwässerung ist bei der Verwendung von Suspensionsreaktoren notwendig und kann analog der üblichen Prozeßtechnik, z. B. wie bei Klärwerken, erfolgen. Ein Beispiel für die mechanische Entwässerung ist die Kammerfilterpresse. Durch die Zugabe von Hilfsmitteln (z. B. Polyelektrolyte) kann die Schlammentwässerung verbessert werden. Das abfiltrierte Prozeßwasser wird in den Behandlungsprozeß zurückgeführt bzw. ist für die Verwertung/Einleitung in das öffentliche Abwassersystem zu untersuchen (Einleitbestimmungen).

3.2.3.6 Immissions-, Arbeits- und Lärmschutz

Die Grundlagen zum Immissionsschutz sind in den Kapiteln 3.1.3.4 und 5.4 beschrieben. Während der Aufarbeitung/Vorbereitung des Bodenmaterials zur Behandlung im Bioreaktor ist das Emissionsverhalten der Schadstoffe einzuschätzen. Diese Prognose entscheidet über den Einsatz von Emissionsminderungen oder -vermeidungen beim Vorliegen flüchtiger Schadstoffe (z. B. Kapselung, Absaugung, Abgasreinigungsanlagen).

Eine Abluftbehandlung des Bioreaktors ist in der Literatur [58] beschrieben. Zum Einsatz können Sterilfilter (bei relevanter Emission von Mikroorganismen) und Tröpfchenabscheider (Demister) kommen. Flüchtige Schad- und Geruchsstoffe werden durch weitere Filter (z. B. Aktivkohle und Biofilter) abgereinigt.

Belange des Arbeitsschutzes ergeben sich aus Art und Umfang der eingesetzten Technik (vgl. Unfallverhütungsvorschriften) und den Gefahrstoffen. Der Umgang mit Gefahrstoffen ist in Kapitel 3.1.3.5 beschrieben.

Die Ermittlung und Beurteilung von Geräuschemissionen sowie deren Minderung erfolgt wie unter Kapitel 3.1.3.6

3.2.3.7 Nachsorgemaßnahmen

Das sanierte Material ist nach entsprechender Entwässerung hinsichtlich der Verwertung zu untersuchen (Verwertungs- oder Freigabeanalyse). Verwertungsmöglichkeiten und Zielwerte sind in Kapitel 5.7 aufgeführt.

3.2.4 Praxiserfahrungen

Im Bereich der Bodensanierung wurde eine Vielzahl von Reaktorverfahren im Labormaßstab entwickelt und im halbtechnischen und technischen Maßstab erprobt. Exemplarische Anwendungsfälle gehen aus der Referenzliste erfolgreicher Sanierungen im Rahmen einer Firmenbefragung hervor (s. Kap. 6.5).

3.2.4.1 Stand und Verbreitung der Technik

Seit vielen Jahren wird die Entwicklung von Bioreaktoren vorangetrieben, um sie für die Behandlung kontaminierter Böden und Schlämme einzusetzen. Inzwischen liegen viele **wissenschaftliche und technische Erfahrungen** im Umgang mit Bioreaktoren vor, darunter Drehtrommelreaktoren [31], Rühr- und Wannenreaktoren [56; 57], Airlift-Reaktoren und Blasensäulenfermenter [7; 17], Wirbelschichtreaktoren [43] u. v. m. Das Spektrum erfolgreich behandelte Schadstoffe reicht von MKW und BTEX über niedrigkondensierte PAK bis hin zu hochchlorierten Kohlenwasserstoffen (Chlorethene, Chlorphenole) und sprengstofftypischen Verbindungen [3]. Zu diesen Erfahrungen hat in Deutschland einerseits der anwendungsorientierte Sonderforschungsbereich 'Reinigung kontaminierter Böden' (SFB 188 der Deutschen Forschungsgemeinschaft, s. Kap. 8.3.3) beigetragen, andererseits zahlreiche Einzelentwicklungen durch Sanierungsfirmen und Forschungsinstitute. In den U.S.A. ist die Entwicklung von Bodenreaktoren beispielsweise durch das SITE-Programm (*Superfund Innovative Technology Evaluation*) forciert worden.

Diesen Entwicklungen steht ein Defizit bei der industriellen Umsetzung gegenüber. Vielfach ist der Einsatz von Bioreaktoren zur Bodensanierung über den Pilotmaßstab bislang nicht hinausgekommen bzw. beschränkt sich auf einzelne Sanierungsprojekte. Auf diesen Umstand wurde bereits in den Empfehlungen zu Forschung und Entwicklung auf dem Gebiet 'Biologische Bodenreinigung' des interdisziplinären Arbeitskreises 'Umweltbiotechnologie – Boden' der DECHEMA hingewiesen [32]. Derzeit ist davon auszugehen, daß der wachsende Kostendruck auf dem Gebiet der Bodensanierung der weiteren Umsetzung technisch anspruchsvoller Verfahren eher entgegensteht. Künftiger Forschungs- und Entwicklungsbedarf besteht deshalb vor allem im Bereich der Kostenminimierung solcher Verfahren, z. B. durch Verkürzung der Abbauzeiten, Einsparung von Maschineneinsatz oder Verringerung des Platzbedarfs [54].

Die wissenschaftlich-technische Entwicklung von Bioreaktoren in der Bodensanierung geht zunehmend **in Richtung Suspensions-(slurry-)Verfahren**. Dies wird insbesondere bei der Realisierung der Verfahren im halbtechnischen Maßstab deutlich; wobei ein aktueller Überblick der Literatur zu entnehmen ist (z. B. [26]). Diese Entwicklung liegt darin begründet, daß Suspensionsverfahren den Anwendungsbereich der biologischen Bodensanierung in Richtung feinkörnige Böden erweitern. Feststoffreaktoren, die sich primär zur Reinigung gut durchlässiger, grobkörniger Böden eignen, befinden sich dagegen in Konkurrenz zu anderen Sanierungsverfahren, wie z. B. der Bodenwäsche. Sie kommen dementsprechend nur selten zum Einsatz [25].

Im technischen bzw. großtechnischen Maßstab finden Suspensionsreaktoren derzeit vereinzelt Anwendung in **Kombination mit Bodenwaschverfahren**. Dabei wird der kontaminierte Boden zunächst in einer Waschanlage aufgeschlossen und anschließend in verschiedene

Korngrößenklassen separiert. Die kontaminierten Fein- bzw. Feinstkornfraktionen werden in Suspensionsreaktoren biologisch behandelt, wobei in Abhängigkeit vom Trennschnitt der jeweiligen Fraktionen unterschiedliche Reaktorsysteme eingesetzt werden, z. B. Rührreaktoren und Airlift-Schlaufenreaktoren [7; 56]. Neuere Arbeiten konzentrieren sich auf die Behandlung von Feinstfraktionen (Korngrößen unter $5 \mu\text{m}$) mit Hilfe von Bioreaktoren [50]. Generell steht der Einsatz von Bioreaktoren zur Behandlung belasteter Fein- und Feinstfraktionen aus der Bodenwäsche jedoch in starker Konkurrenz zur üblichen Entsorgung dieser Reststoffe durch Deponierung.

3.2.4.2 Kostenrelevante Einflußgrößen

Die Behandlung kontaminierter Böden bzw. Bodensuspensionen mit Bioreaktoren unterliegt einer Reihe kostenrelevanter Einflußgrößen, die im folgenden aufgeführt sind. Diese geben einen Anhaltspunkt für die wirtschaftlichen Einflüsse bei der Anwendung von Bioreaktoren in der Bodensanierung wieder. Die Vorgehensweise bei einer vergleichenden ökonomischen Bewertung verschiedener Sanierungsverfahren ist in Kapitel 3.4 dargestellt.

Zugänglichkeit und Transport des Bodens

Analog der Mietentechnik stellt auch bei Reaktorverfahren die Zugänglichkeit des Geländes bzw. des kontaminierten Bodenmaterials einen wichtigen Kostenfaktor dar, weil hier unter Umständen aufwendige Vorarbeiten zu leisten sind, z. B. Abriß von Gebäuden oder Anlagenteilen, Bau von Erschließungswegen, Wasserhaltung bei Auskofferungsmaßnahmen usw.

Anlagenentwicklung

Da Reaktorverfahren nicht als Standardtechnik in der biologischen Bodensanierung eingesetzt werden, stellt die Entwicklung bzw. Anpassung des Verfahrens an die Aufgabenstellung eine kostenrelevante Einflußgröße dar.

Anlagenbau und -betrieb

Die Investitionen für Reaktor, Meßtechnik und Anlagenperipherie (z. B. Abluftfilter) inklusive Aufwendungen für Planung, Genehmigungen usw. sind kostenrelevant, ebenso die Betriebskosten (Personal, Energie, Betriebsstoffe, Rohstoffe, Verwertung) und die analytische Überwachung. Der Mehraufwand bezüglich der Betriebs- und Energiekosten wurde am Beispiel verschiedener Betriebstemperaturen für Suspensionsreaktoren untersucht [74].

Gesamtanlage

Stellt der Bioreaktor nur einen von mehreren Aufbereitungs- und Reinigungsschritten dar (z. B. in Kombination mit Bodenwäsche), hängen die spezifischen Behandlungskosten von Bau und Betrieb der Gesamtanlage ab.

Behandlungsdauer

Die Behandlungszeit bestimmt bei technisch anspruchsvollen Verfahren in besonderer Weise die spezifischen Kosten. Sie ist abhängig von dem Zustand des Ausgangsmaterials (Feststoff oder Schlamm, Bodentextur, Störstoffe etc.), der Art und Konzentration der Schadstoffe sowie der Reaktortechnik. Auch die Beschickungs- und Fördertechnik des Reaktors kann wesentlichen Einfluß auf die Gesamtbehandlungsdauer haben. Für Reaktorverfahren sind sehr kurze

Behandlungszeiten und somit hohe Durchsätze zu fordern, damit diese Techniken konkurrenzfähig sind.

Bodenmenge

Die Menge des zu behandelnden Bodens hat wesentlichen Einfluß auf die spezifischen Behandlungskosten, da für Kleinmengen die eingesetzte Maschinenteknik unrentabel wird.

Platzbedarf

Je nach Bauweise sind Bioreaktoren durch einen vergleichsweise geringen Platzbedarf gekennzeichnet, vorausgesetzt, es werden hohe Abbauraten und damit hohe Durchsätze erzielt. Der Platzbedarf wiederum hat Einfluß auf die Kosten der Gesamtanlage (Größe der Einhausung, Infrastruktur etc.).

Bedarf an Additiven

In der Regel werden Bioreaktoren keine Strukturstoffe zugegeben. Hohe Kosten kann dagegen der Bedarf an Nährstoffen und ggf. Konditionierungsmitteln (pH-, Redox-aktive Substanzen, Tenside etc.) verursachen.

Entwässerung

Ein wesentlicher Kostenfaktor bei Suspensionsverfahren ist die Entwässerung der Suspension nach Abschluß der Behandlung, z. B. mit Hilfe von mobilen Filterpressen.

3.3 *In situ*-Sanierung

3.3.1 Grundlagen

3.3.1.1 Definition

Unter biologischer *In situ*-Sanierung sind Verfahren zu verstehen, bei denen der kontaminierte Boden (ungesättigte Bodenzone) oder der kontaminierte Grundwasserleiter (gesättigte Bodenzone) in ihren natürlichen Lagerungsverhältnissen verbleiben [41]. Ein Aushub des kontaminierten Bodens ist somit bei *In situ*-Sanierungsverfahren auszuschließen. Im Idealfall ist der Untergrund als überdimensionaler 'Reaktor' anzusehen, in dem der biologische Sanierungsprozeß abläuft. Wie nachfolgend dargestellt, sind die einzelnen Verfahren vom Prinzip und von ihrer technischen Durchführung her sehr unterschiedlich.

3.3.1.2 Wissenschaftlich-technische Grundlagen

In situ-Verfahren beruhen sowohl auf physikalischen, chemischen als auch auf biologischen Prozessen. Physikalische und chemische Prozesse führen zu einer Entfernung, Umwandlung oder Immobilisierung (Fällung, Sorption) der Schadstoffe im Untergrund. Biologische Prozesse können nicht nur abbaubare Schadstoffe eliminieren, sondern auch physikalisch-chemische Prozesse initiieren oder unterstützen. Umgekehrt treten biologische Abbaureaktionen als 'Sekundäreffekte' beim Einsatz physikalischer oder chemischer Verfahren auf. Insofern handelt es sich bei biologischen *In situ*-Verfahren eher um **Verfahrens-**

kombinationen, die von konventionellen Techniken abgeleitet werden. Ein Beispiel findet sich in Kapitel 9.6.1 "Untersuchung zum mikrobiellen *In situ*-Abbau von CKW".

Faktoren, die den Abbau im Untergrund limitieren, wie z. B. ein Mangel an Nährstoffen oder Sauerstoff, müssen dazu aufgehoben werden. Verantwortlich für den biologischen Schadstoffabbau im Boden sind insbesondere **Mikroorganismen** (wie Bakterien und Pilze), aber auch höhere Bodenorganismen.

Als **Sanierungsbereiche** für *In situ*-Verfahren kommen die verschiedenen Bodenzonen in Frage, wobei eine Einteilung der *In situ*-Verfahren nach dem Prinzip der jeweils eingesetzten Technik erfolgt:

- Die **oberflächennahe ungesättigte Bodenzone** kann mit Phytoremediationsverfahren (s. Kap 3.3.1.5) behandelt werden.
- **Tiefere Bereiche der ungesättigten Bodenzone** werden mit Infiltrationsverfahren (s. Kap 3.3.1.3) und Belüftungsverfahren (s. Kap. 0) erreicht.
- In der **gesättigten Bodenzone** sind ebenfalls Infiltrationsverfahren und Belüftungsverfahren weit verbreitet. Reaktive Wände (mit biologisch aktiven Füllmaterialien) als passive Maßnahme für die gesättigte Bodenzone befinden sich dagegen erst in der Entwicklung.

3.3.1.3 Infiltrationsverfahren

Bei diesen Verfahren werden über Verrieselung, Lanzen, Pegel und Brunnen **Additive** in die tieferen Bodenzonen infiltriert, die geeignet sind, den biologischen Abbau zu stimulieren bzw. limitierende Bedingungen für einen Schadstoffabbau im Untergrund aufzuheben. Dazu können folgende Additive zum Einsatz kommen:

- Zu den wichtigsten **Nährstoffen** im Boden gehören Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphorverbindungen, die dem kontaminierten Bodenbereich bei entsprechenden Mangelbedingungen zugeführt werden, um das mikrobielle Wachstum anzuregen.
- **Co-Substrate** werden zugegeben, um einen cometabolischen Fremdstoffabbau zu initiieren. So ist bekannt, daß der Schadstoff Tetrachlorethen (PCE) nur unter anaeroben Bedingungen bei Anwesenheit spezifischer Kohlenstoffquellen abgebaut wird (s. Kap. 2.1.4).
- Als **Elektronenakzeptoren** werden gelöster Sauerstoff [O₂], Wasserstoffperoxid [H₂O₂] und Ozon O₃] infiltriert. Weiterhin werden in jüngster Zeit sogenannte Oxygen Release Compounds (ORC[®], Regenes Inc.) bzw. Oxygen Releasing Materials (ORM) eingesetzt, die durch Zerfall zu einer Freisetzung von Sauerstoff führen [34; 47; 49]. Neben Verbindungen, die zu einer Freisetzung von Sauerstoff führen, kommen auch indirekte Sauerstoffträger zum Einsatz. Zumeist werden hier Nitrate (z. B. Kaliumnitrat [KNO₃], Ammoniumnitrat [NH₄NO₃]) eingesetzt, die als Elektronenakzeptor beim Abbau organischer Schadstoffe fungieren [23]. Die Wirkungsweise von Nitrat als Elektronenakzeptor ist in Kapitel 2.4.2.2 erläutert.
- Eine Modifizierung der Milieubedingungen kann auch durch Zuführung von **Elektronendonatoren** erreicht werden. Dabei handelt es sich um leicht verwertbare Substrate, die eine Sauerstoffzehrung bewirken oder Wasserstoff (in Form von sog. Reduktionsäquivalenten) freisetzen. Als kommerziell erhältliches Produkt sei hier HRCTM (Hydrogen Release

Compound, Glyceroltripolyactat, Regenesis Inc.) erwähnt, dessen Wirkungsweise in Kapitel 2.4.3.2 dargestellt ist. Schadstoffe wie z. B. höher chlorierte Kohlenwasserstoffe, die nur unter anaeroben Bedingungen oder einer Abfolge aus anaeroben und aeroben Bedingungen abbaubar sind, lassen sich auf diese Weise umsetzen [35].

- **Puffersubstanzen** (Säuren, Laugen) können zur pH-Regulierung eingesetzt werden.
- **Detergenzien** dienen der Erhöhung der Bioverfügbarkeit.
- Um einen Schadstoffabbau im Untergrund zu erreichen oder zu beschleunigen können auch Mikroorganismen zugesetzt werden. Die Gründe für den Zusatz von Mikroorganismen (**Bioaugmentation**) sind bereits in Kapitel 3.1.1.7 diskutiert worden.

Beim Zusatz von Additiven für *In situ*-Verfahren ist generell zu berücksichtigen, daß neben den dargestellten Wirkungen unerwünschte Nebeneffekte auftreten können [41]. So kann der Eintrag von Sauerstoffverbindungen zu einer Oxidation und Ausfällung von Eisen-, Mangan- und anderen Metallverbindungen im Untergrund führen, was einerseits zu einer unerwünschten Sauerstoffzehrung führt, andererseits technische Probleme verursachen kann (Verockerung von Sanierungsbrunnen etc.). Mit einem Einsatz von Nitrat als Additiv für *In situ*-Verfahren ist vorsichtig umzugehen (Gefahr einer Grundwasserverunreinigung). Ebenso sollten Nährstoffe, Elektronendonatoren und Detergentien sorgfältig dosiert werden, um zusätzliche Belastungen des Grundwassers zu vermeiden. Übermäßiges Bakterienwachstum durch Nährstoffzugaben kann zur Verstopfung der Porenräume führen ("Bioclogging"). Bei der Zugabe von Mikroorganismen ist eine gleichmäßige Verbreitung wegen deren Tendenz zur Immobilisierung innerhalb des Kontaminationskörpers häufig nicht erreichbar. Auch besteht das Problem, daß sich zugesetzte Mikroorganismen in Konkurrenz zur autochthonen Mikroflora befinden und sich in der neuen Umgebung ggf. nicht etablieren können. (s. Kap. 2.4.4.2 und 3.1.1.7).

Ungesättigte Bodenzone

Für die *In situ*-Sanierung der wasserungesättigten Bodenzone wird aus dem Aquifer entnommenes Wasser mit Additiven versetzt und in die ungesättigte Bodenzone infiltriert (Abb. 3.5a). Die Infiltration erfolgt – je nach Ausdehnung der Kontamination – entweder über einzelne oder über ein Leitungssystem verbundene Filterrohre bzw. Brunnen. Durch tiefenverstellbare Einsatzrohre läßt sich der Kontaminationkörper abschnittsweise mit Additiven versorgen, wodurch unterschiedlich kontaminierte Tiefenbereiche gezielter angegangen werden können [41]. Entscheidend für den Erfolg von Infiltrationsverfahren ist eine möglichst homogene Verteilung der Additive, weil andernfalls nur eine partielle Behandlung des Kontaminationskörpers erreicht wird. Deshalb sind u. U. Tracer-Versuche erforderlich, um zu entscheiden, ob eine ausreichend homogene Verteilung der zugesetzten Komponenten erreicht werden kann. Generell ist anzumerken, daß Additive, die ausschließlich über Infiltration in die wasserungesättigte Bodenzone eingebracht werden, nur einen relativ kleinen Wirkungsbereich (eingeschränkter Stofftransport, Sorptionsprozesse) haben, so daß eine hohe Dichte an Infiltrationsbrunnen erforderlich werden kann.

Dadurch, daß die Infiltration und Wasserentnahme in verschiedenen Bodenschichten stattfinden, entsteht kein geschlossener Kreislauf. Es ist deshalb darauf zu achten, die Menge des Infiltrationsmediums zu begrenzen, um eine infiltrationsbedingte Ausbreitung der Kontamination durch Sickervorgänge zu vermeiden. Außerdem ist eine Überwachung des

angrenzenden Geländes bzw. des Grundwassers notwendig, ggf. in Verbindung mit Sicherungsmaßnahmen [41].

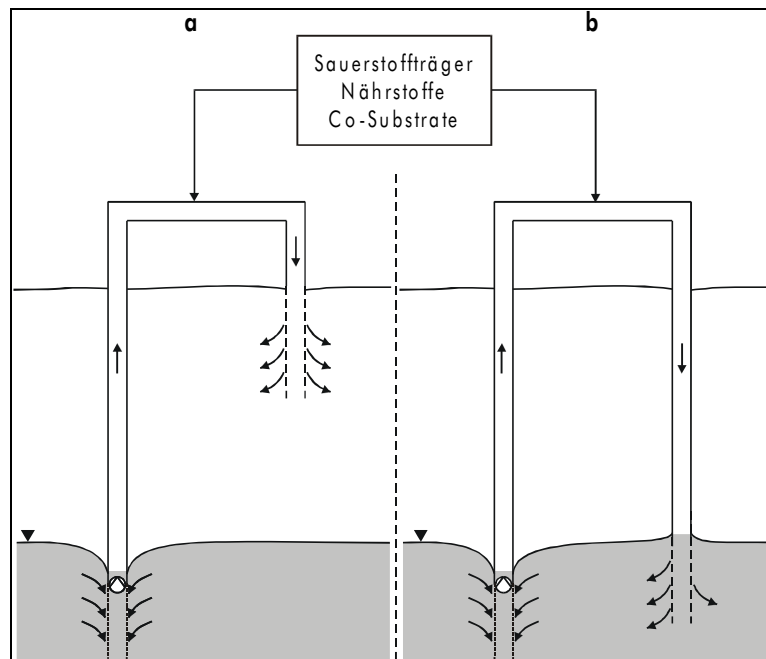


Abb. 3.5: Schematische Darstellung von Infiltrations-Verfahren für die ungesättigte Bodenzone (a) und gesättigte Bodenzone (b)

Gesättigte Bodenzone

Für die *In situ*-Sanierung der wassergesättigten Bodenzone erfolgt eine Kreislaufführung des Infiltrationsmediums. Dazu wird zunächst Wasser infiltriert und nach Durchströmung des kontaminierten Bereiches wieder entnommen. Entnommenes, kontaminiertes Wasser wird *on site* behandelt (z. B. mit einer biologischen Reinigungsstufe) und in den Untergrund reinfiltriert. Bei der Infiltration können wieder Additive (s. o.) zugesetzt werden, die den biologischen Abbau im Kontaminationskörper induzieren. Je nach Anordnung der Infiltrations- und Entnahmeeinheiten können unterschiedliche Spülssysteme im Untergrund erzeugt werden (horizontale Spülung, vertikale Spülung), wobei nicht nur die gesättigte, sondern auch die ungesättigte Bodenzone durchspült und gereinigt werden kann.

Um bei Spülverfahren einen Abstrom verunreinigten Wassers zu vermeiden, ist aus Sicherheitsgründen im allgemeinen die Entnahmemenge im Sanierungsbereich deutlich größer als die Infiltrationsmenge, die den belasteten Bereich durchströmt [42]. Das (ggf. gereinigte) Überschusswasser (Abschlagswasser) kann unter Einhaltung der Einleitbestimmungen (Trinkwasserverordnung, landesspezifische Regelungen, z. B. Einhaltung von Hintergrundwerten) außerhalb des Sanierungsbereiches in den Aquifer zurückgeführt werden. Als weitere Schutzmaßnahme läßt sich zur dauerhaften Isolierung der kontaminierten Zone vom unbelasteten Grundwasserleiter eine **Schutzinfiltration** vornehmen [41]. Hierzu wird Grundwasser aus anderen Grundwasserbereichen bzw. -stockwerken verwendet.

Bei der in Abb. 3.5b dargestellte Verfahrensvariante ohne *On site*-Behandlung besteht die Problematik, daß die Einleitbestimmungen für das zu infiltrierende Wasser schwer

einzuhalten sind. In Kombination mit einer *On site*-Behandlung (s. Abb. 3.6) dagegen wird das entnommene Wasser vor der Reinfiltration gereinigt und erfüllt bei erfolgreicher Behandlung die Voraussetzung für die Einleitung in den Aquifer.

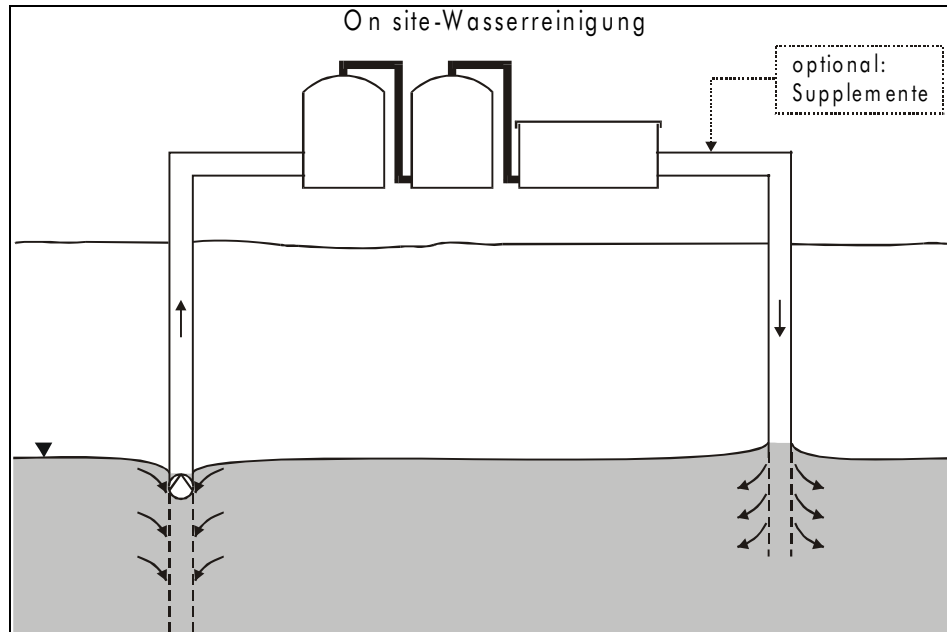


Abb. 3.6: Schematische Darstellung eines Infiltrationsverfahrens für die gesättigte Bodenzone mit *On site*-Wasserbehandlung

3.3.1.4 Belüftungsverfahren

Zur Anwendung kommen Verfahren, die zu einer direkten oder indirekten Belüftung des Bodens führen und dadurch eine Sauerstofflimitation aufheben. Die Techniken, die zur Belüftung des Untergrundes verwendet werden, leiten sich von Verfahren ab, die auf ein Strippen flüchtiger Kontaminanten aus der Bodenluft und aus belastetem Grundwasser abzielen. Belüftungsmaßnahmen lassen sich sowohl kontinuierlich als auch diskontinuierlich durchführen. Auf diese Weise kommt es zu einer Induktion des aeroben Schadstoffabbaus.

Ungesättigte Bodenzone

Im einfachsten Fall wird Druckluft in den Bodenkörper eingeblasen (**Bioventing**). Dazu werden Belüftungslanzen oder -pegel installiert, die in den Kontaminationsbereich hineinragen (s. Abb. 3.7a). Je nach Bodenstruktur und Anordnung der Pegel verteilt sich der mit der Luft eingebrachte Sauerstoff und führt zu einer Stimulierung des aeroben Schadstoffabbaus. Indirekt wird eine Belüftung des Bodens auch bei der **Bodenluftabsaugung** erreicht. Die Bodenluftabsaugung gehört zu den pneumatischen Verfahren, die auf dem Austrag von Schadstoffen aus dem Untergrund über den Luftpfad basieren. Durch die Absaugung wird eine Bodenluftströmung induziert, die zu einer Versorgung des kontaminierten Bereiches mit Umgebungsluft führt. Eine **Bodenluft-Kreislaufführung** entsteht bei der Kombination beider Verfahren. Dadurch kann eine gut kontrollierbare Sauerstoffversorgung erzielt werden [42].

Diese ist bei flüchtigen Schadstoffkomponenten obligatorisch. Grundsätzlich ist der Schadstoffgehalt in der Bodenluft zu überwachen sowie die Emission von Schadstoffen an der Bodenoberfläche zu kontrollieren.

Gesättigte Bodenzone

Hier kommen Verfahren zur Anwendung, bei denen Druckluft in den gesättigten Bereich eingeblasen wird. Dazu werden Brunnen installiert und in geeigneter Weise verfiltert, so daß die Preßluft den Kontaminationskörper über kegelförmig ausgebildete Belüftungszonen möglichst vollständig erreicht (s. Abb 3.7b). Das hat zwei wesentliche Effekte: Zum einen wird eine Schadstoffdesorption und -stripping durch die Luftströmung im Aquifer erreicht, zum anderen wird ein biologischer Abbau der Schadstoffe über die Sauerstoffversorgung induziert ('**Biosparging**' [30]). Diese als Air-Sparging bezeichnete Verfahren werden in der Regel in Kombination mit einer Bodenluftabsaugung der ungesättigten Bodenzone eingesetzt. Auf diese Weise kann eine kontrollierte Luftströmung in der ungesättigten Bodenzone sichergestellt und eine Schadstoffverfrachtung in Umgebungsbereiche vermieden werden.

Der Erfolg von Belüftungsmaßnahmen hängt wesentlich von den Untergrundeigenschaften ab, insbesondere der Dichte und Gasdurchlässigkeit (ausgedrückt als Durchlässigkeitskoeffizient) des Bodens. Prinzipiell kann der Eintrag von Druckluft in kontaminierte Grundwasserbereiche zur Verdriftung von Schadstoffen in unbelastete Zonen des Aquifers führen. Bei einem Eintrag von Sauerstoff in den Aquifer ist weiterhin zu beachten, daß es zu Ausfällungen in Form von Eisen- und Manganoxiden kommen kann.

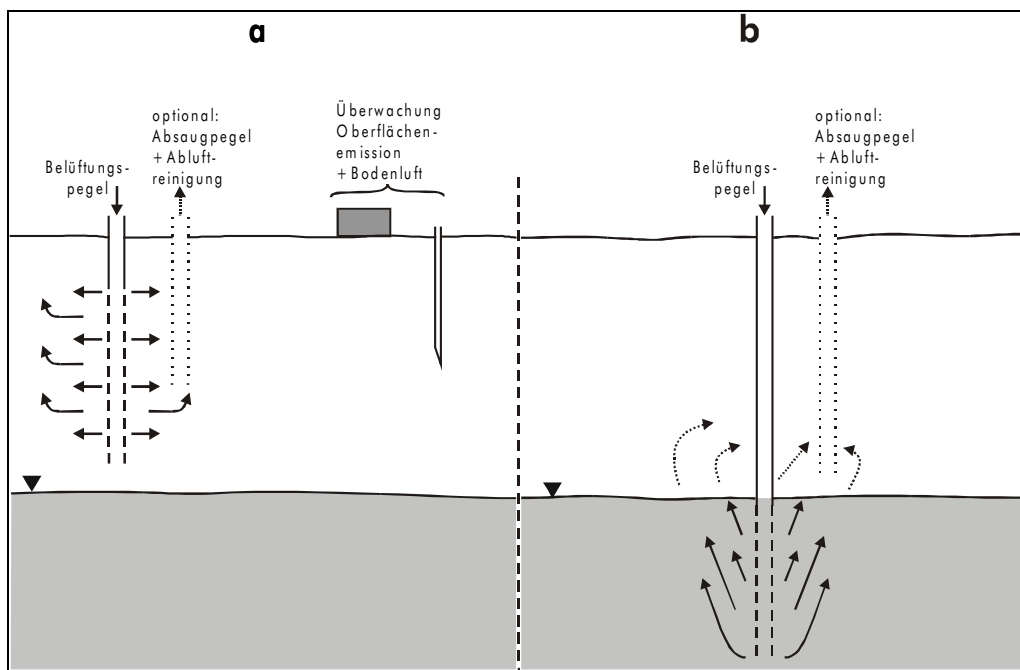


Abb. 3.7: Schematische Darstellung von Belüftungsverfahren für die ungesättigte Bodenzone (a) und gesättigte Bodenzone (b)

3.3.1.5 Phytoremediation

Bei der Phytoremediation (s. Abb. 3.8) werden höhere Pflanzen zur Reinigung kontaminierter Böden eingesetzt. Die Verfahren zielen naturgemäß auf die Dekontamination oberflächennaher Bodenverunreinigungen ab. Phytoremediationsverfahren lassen sich sowohl auf Kontaminationen mit organischen Schadstoffen als auch anorganischen Schadstoffen (Schwermetalle) anwenden.

Bei der Reinigung kontaminierter Bodenoberflächen mit Pflanzen spielen verschiedene Prozesse eine Rolle. Am häufigsten werden Pflanzen zur **Phytoextraktion** von Schadstoffen eingesetzt. Bei Verunreinigungen mit Schwermetallen, z. B. Blei, Kupfer, Zink, Cadmium usw., führt die Phytoextraktion zum Entzug der Schadstoffe aus dem Boden, indem die Schwermetalle von den Pflanzen aufgenommen und akkumuliert werden [6]. Hier kommen insbesondere Pflanzen mit hohen Akkumulationsleistungen, sogenannte **Hyperakkumulatoren**, zum Einsatz [8]. Die Pflanzen nehmen dabei den löslichen und damit mobilen Anteil von Schwermetallen im Boden auf [13]. Nach Akkumulation der Schwermetalle in den Pflanzen werden diese geerntet, und die kontaminierte pflanzliche Biomasse wird entsorgt (z. B. durch thermische Verfahren). Dazu sollten die Pflanzen einschließlich ihrer Wurzeln geerntet werden, weil sich Schwermetalle nach der Aufnahme insbesondere im Wurzelgewebe anreichern [60].

Bei der Aufnahme organischer Schadstoffe durch Pflanzen kann es zu einer **Phytodegradation** kommen, d. h. einem Abbau der Verbindungen im Pflanzengewebe. Ein Beispiel findet sich in Kapitel 9.2.8 "Aufnahme von TNT in krautige Pflanzen". Prinzipiell kann es bei der Behandlung leichtflüchtiger Schadstoffe im Boden auch zu einer **Phytovolatilisierung** kommen, d. h. die Schadstoffe gelangen in die Pflanze und werden über Transpirationsprozesse in die Atmosphäre emittiert. Bislang sind jedoch nur geringe Emissionsraten leichtflüchtiger Schadstoffe über diesen Prozeß nachgewiesen worden [5].

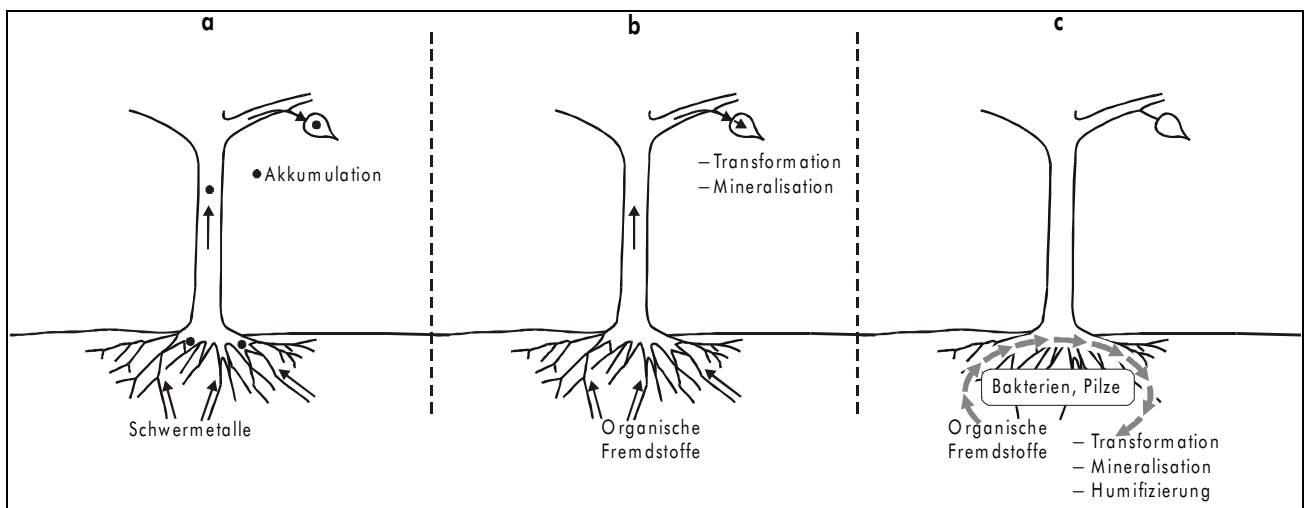


Abb. 3.8: Schematische Darstellung von Phytoremediationsverfahren: (a) Phytoextraktion, (b) Phytodegradation und (c) Rhizosphären-Degradation

Ein weiterer Effekt von Phytoremediationsverfahren ist der Abbau organischer Schadstoffe in der Rhizosphäre, d. h. im Wurzelbereich der Pflanze (**Rhizosphären-Degradation**). Diese Abbauprozesse werden entweder durch die in den Wurzelexsudaten vorhandenen Enzyme (z. B. Peroxidasen, s. Kap. 9.2.8) oder durch vergesellschaftete Rhizosphärenorganismen (Bodenbakterien, Bodenpilze, Mykorrhiza-Pilze) katalysiert. Wurzelbereiche zeichnen sich durch wesentlich höhere mikrobielle Aktivitäten aus als der wurzelfreie Boden [16]. Die Funktion der Pflanze liegt dabei einerseits in der Bereitstellung der Wurzelstruktur selbst, andererseits in der Versorgung der Bodenorganismen mit Sauerstoff und Nährstoffen durch die Wurzelexsudate.

Bepflanzungen tragen darüber hinaus auch zur Verminderung der Schadstoffausbreitung bei (**Phytostabilisierung**). Durch die Reduzierung der Sickerwasserbildung mittels Transpiration der Pflanzen wird dem unkontrollierten Auswaschen von Schadstoffen (Leaching) entgegengewirkt. Der Bewuchs vermindert auch die Erosion der Böden.

Phytoremediationsverfahren befinden sich allerdings noch nicht in der technischen Anwendung.

3.3.1.6 Natural Attenuation

Natürlicherweise im Untergrund ablaufende Abbau- und Rückhalteprozesse können die Ausbreitung von Schadstoffen in der ungesättigten und gesättigten Bodenzone verlangsamen. Der Begriff "Natural Attenuation" kennzeichnet diese Verringerung der Schadstoffbelastung eines kontaminierten Systems unter natürlichen Bedingungen. Dabei kann es zu einer Verminderung von Masse, Toxizität, Mobilität, Volumen oder Konzentration der Schadstoffe im Boden oder Grundwasser kommen [12]. Das Vertrauen auf Natural Attenuation-Prozesse kann in Verbindung mit einem Monitoring als Sanierungsstrategie eingesetzt werden. Eine Langzeitüberwachung sieht die EPA als Voraussetzung für die Akzeptanz von Natural Attenuation als Sanierungsstrategie. Dafür wurde der Begriff "**Monitored Natural Attenuation**" vorgeschlagen.

Während sich der Begriff "Natural Attenuation" ausschließlich auf die unbeeinflusste Nutzung natürlicher Rückhalte- und Reinigungsprozesse im Untergrund bezieht, wird die Anwendung von Verfahren zur Stimulierung von Selbstreinigungsprozessen als "**Enhanced Natural Attenuation**" bezeichnet. Diese zielt auf die Nutzbarmachung des natürlichen Schadstoffabbaus durch eine Verstärkung, Optimierung bzw. Beschleunigung von Selbstreinigungsprozessen ab, indem durch einfache technische Maßnahmen die physikalischen oder chemischen Bedingungen am Ort des Schadstoffabbaus verändert werden.

Für Sanierungsstrategien, die Natural Attenuation berücksichtigen, besteht zunächst ein Forschungs- und Entwicklungsbedarf, da die beteiligten Prozesse erkannt und über ein Monitoring-Programm bilanziert werden müssen. Dazu werden standortspezifische hydrogeologische Modelle benötigt, die ein umfassendes Verständnis der Prozesszusammenhänge ermöglichen und die Grundlage für eine Prognose des zukünftigen Kontaminationsverlaufs darstellen. Schließlich müssen die rechtlichen Voraussetzungen für die Nutzung von natürlicherweise im Untergrund ablaufenden Prozessen zur Schadstoffminderung geschaffen werden.

Das Bundesministerium für Bildung und Forschung hat kürzlich erst die Förderaktivität "Natürlicher Rückhalt und Abbau von Schadstoffen bei der Sanierung kontaminierter Böden

und Grundwässer" bekanntgegeben. Aus diesem Grunde gibt es zur Zeit keine Anwendungsbeispiele in Deutschland, die über den reinen Erkenntniszuwachs hinausgingen.

3.3.2 Voraussetzungen

Die hier geschilderten Voraussetzungen beziehen sich im wesentlichen auf die Infiltrations- und Belüftungstechniken. Phytoremediationsverfahren oder die Sanierungsstrategie Natural Attenuation befinden sich noch im Versuchsstadium und sind derzeit zur Reinigung kontaminierter Böden nicht praxisrelevant.

3.3.2.1 Standort- und Untergrundverhältnisse

In situ-Verfahren finden in erster Linie dort Anwendung, wo die **Zugänglichkeit** kontaminierter Bodenbereiche eingeschränkt ist. Dieses ist der Fall, wenn sich auf dem kontaminierten Standort Gebäude, Anlagen, Kanalsysteme, Rohrleitungen oder andere infrastrukturelle Einrichtungen befinden, die geschützt werden sollen.

Der Einsatz von *In situ*-Verfahren erfordert die Kenntnis der Untergrundverhältnisse am kontaminierten Standort, insbesondere Abfolge und Mächtigkeiten der geologischen Schichten sowohl in vertikaler als auch horizontaler Richtung.

Für die Behandlung der ungesättigten Zone ist darüber hinaus die Kenntnis folgender **Bodenfaktoren** von Bedeutung [42]:

- Bodenstruktur (Aggregation, Vorhandensein von Makroporen)
- Bodentextur (Korngrößenverteilung)
- Porosität/Lagerungsdichte
- Wassergehalt
- Gehalt an organischer Substanz

Durch diese Faktoren wird einerseits die Luftdurchlässigkeit, andererseits das Sorptionsverhalten des Bodens beeinflusst. Belüftungsverfahren für die ungesättigte Bodenzone erfordern eine ausreichende Luftdurchlässigkeit im gesamten zu dekontaminierenden Bodenkörper.

Für die Behandlung der gesättigten Bodenzone ist das Verständnis des hydrogeologischen Systems von Bedeutung [10]. Dieses beinhaltet:

- horizontale/vertikale Schichtenabfolge
- die hydraulischen Durchlässigkeiten der wasserführenden Schichten (ausgedrückt als Durchlässigkeitsbeiwert)
- Grundwasserfließregime
- die geo- und hydrochemischen Milieubedingungen im Grundwasser
- potentielle Sorbentien (z. B. Ton, organische Substanz)

3.3.2.2 Schadstoffe

Wesentliche Grundvoraussetzungen für Kontaminationen, die mit biologischen *In situ*-Verfahren behandelt werden sollen, sind die biologische **Abbaubarkeit** (mit Ausnahme von Schwermetallen, die durch Phytoremediation lediglich aus dem Boden extrahiert werden, vgl. Kap. 3.3.1.5), und die **Bioverfügbarkeit** aller Schadstoffe. Das Abbauverhalten der einzelnen Schadstoffgruppen sowie Bestimmungsmethoden zur Bioverfügbarkeit von Schadstoffen sind in den Kapiteln 2.1 und 2.3 dargestellt.

Schadstoffe mit stark eingeschränkter Bioverfügbarkeit kommen für biologische *In situ*-Verfahren nicht in Frage. Beispielhaft sei hier die Behandlung von Teerverunreinigungen genannt, deren Inhaltsstoffe (Teeröle) kaum bioverfügbar sind und damit auch nicht abgebaut werden können.

Je nach Verfahren kommen bei biologischen *In situ*-Sanierungen unterschiedliche **Abbaubedingungen** zum Tragen. Belüftungsverfahren und Infiltrationsverfahren mit Sauerstoffträgern zielen auf die Behandlung aerob abbaubarer Schadstoffe ab. Werden dagegen Nitratverbindungen oder organische Substrate in den Untergrund eingebracht, so lassen sich auch anaerob abbaubare Schadstoffe behandeln.

Neben dem Abbauverhalten kommt den **physikalischen und chemischen Eigenschaften** der Schadstoffe bei *In situ*-Verfahren große Bedeutung zu. Folgende schadstoffspezifischen Eigenschaften sollten deshalb bei der Planung biologischer *In situ*-Verfahren berücksichtigt werden:

- Dampfdruck
- Sättigungskonzentration
- Wasserlöslichkeit, Mobilität
- Verteilungsgleichgewicht zwischen Gas- und Wasserphase
- Möglichkeit der Bildung explosionsfähiger Gasgemische

Werden bei Vorliegen flüchtiger Verbindungen Belüftungsverfahren eingesetzt, so ist dafür zu sorgen, daß sich die Stoffe durch die Belüftungsmaßnahmen nicht unkontrolliert ausbreiten (Monitoringprogramm, technische Schutzmaßnahmen wie z. B. Absaugpegel).

Als weitere Einflußgröße für biologische *In situ*-Verfahren spielt die räumliche **Verteilung der Schadstoffe** im Untergrund eine Rolle. Hier ist insbesondere die relative Lage der Kontamination zum Grundwasser zu nennen, die ggf. technische Schutzmaßnahmen erforderlich macht (Schutzinfiltrationen, Spundwände usw.). Extrem inhomogene Kontaminationsverteilungen im Untergrund führen auch zu einem uneinheitlichen Abbau: Schadstoffherde werden nur langsam von den Rändern her abgebaut, und niedrige Kontaminantengehalte gehen nicht zurück, weil die Schwellenkonzentration unterschritten ist (s. Kap. 2, Einführung).

3.3.2.3 Hemmfaktoren

Als Hemmfaktoren für biologische *In situ*-Verfahren kommen prinzipiell die gleichen Faktoren wie für *Ex situ*-Verfahren in Frage. Dazu können Begleitverunreinigungen, biozide Stoffe und extreme pH-Werte und Milieubedingungen zählen (s. Kap. 3.1.2.4).

3.3.2.4 Erprobung im Pilotmaßstab

Wie oben dargestellt, hängt der Erfolg der *In situ*-Sanierungen von verschiedenen Faktoren ab. Standortsspezifische Randbedingungen muß die Erkundung liefern, schadstoffspezifische Randbedingungen werden je nach Fragestellung durch Vorversuche im Labor-, Technikums- oder Feldmaßstab geklärt. Bei großen Sanierungsmaßnahmen ist ein Pilotversuch vor Ort, z. B. in Form einer **Testfelderprobung oder -sanierung**, erforderlich. Abhängig von dem eingesetzten Verfahren liefern diese Versuche folgende Informationen [30]:

- Wirkungsradien von Luftinjektionen/Luftabsaugung und erzielbare Über- bzw. Unterdrücke in räumlicher Verteilung
- Dynamik der Schadstoffübergänge zwischen fester, flüssiger und gasförmiger Phase
- Zeitlicher Verlauf von Schadstofffrachten, die aus dem Untergrund extrahiert werden können
- Kinetik des biologischen Schadstoffabbaus
- Auswirkungen auf andere Schutzgüter

Auf diese Weise werden die spezifischen Standortverhältnisse vor Ort bei der verfahrenstechnischen Planung berücksichtigt. Pilotversuche bieten ferner die Grundlage für **Prognosen** zum erreichbaren Sanierungsziel und zur Sanierungsdauer und erlauben damit auch eine Kostenabschätzung.

3.3.3 Überwachungs- und Schutzmaßnahmen

3.3.3.1 Anlagentechnik und -betrieb

Anlagentechnik und -betrieb bei *In situ*-Verfahren bedürfen einer intensiven Überwachung. Je nach Verfahrensart sind folgende Maßnahmen notwendig:

- Kontrolle und Wartung von Anlagen zur Luftinjektion (*In situ*-Belüftungsverfahren), inklusive der Feststellung des Gasaustritts (Bodenluft, Oberflächenemission).
- Wartung und Überwachung von Anlagen zur Bodenluftabsaugung, z. B. Ermittlung des Volumenstroms, der Schadstoffgehalte und der Randparameter.
- Wartung und Überwachung von Bodenluftreinigungsanlagen, z. B. Biofilter, Aktivkohlefilter, katalytische Nachverbrennungsanlagen (KNV), hinsichtlich des Wirkungsgrades (Schadstoffmessungen im Roh- und Reingas) und der Einhaltung von Emissionsgrenzwerten (s. Kap. 0).

- Wartung und Überwachung von *On site*-Grundwasserreinigungsanlagen (s. Kap. 3.3.1.3), z. B. chemisch-physikalische Reinigungsanlagen (CPA) und Aktivkohlefilter hinsichtlich der Schadstoffanreicherung und der Einhaltung behördlich vorgeschriebener Einleitwerte.

Die aufgeführten Wartungs- und Überwachungsmaßnahmen sind in einem festgelegten Zeitraster (kürzere Intervalle in der Anfangsphase sinnvoll) durchzuführen. Meßergebnisse und Tätigkeitsbeschreibungen werden dokumentiert.

Der sichere Betrieb der Anlagenteile ist durch sinnvolle Maßnahmen (Bauartzulassung, CE-Kennzeichnung, Wartungs- und Verfahrenspläne) zu gewährleisten.

In situ-Sanierungen werden in der Regel im Rahmen des Wasserhaushaltsgesetzes (WHG) genehmigt.

3.3.3.2 Monitoring des Schadstoffabbaus

Während der gesamten Sanierungsmaßnahme wird ein im Sanierungsplan festgelegtes Monitoring durchgeführt. Die zu untersuchenden Kompartimente (Boden, Grundwasser und Bodenluft) sowie Art und Umfang des Monitorings richten sich nach den jeweiligen Verfahren (s. Kap. 3.3.1). Ebenso werden Nährstoffgehalte und etwaige Randparameter (z. B. Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt in der Bodenluft) ermittelt. Je nach Verfahrensart kommen folgende Maßnahmen bei der Überwachung einer *In situ*-Sanierung zur Anwendung:

- Überwachung von Grundwassermeßstellen auf Schadstoffe und Grundwasserstand.
- Entnahme von Bodenproben im Sanierungsgebiet und deren Untersuchung auf Schadstoffkonzentrationen und Abbauaktivitäten.
- Überwachung von Grundwasser- und Bodenluftkontrollpegeln zum Erkennen von Verlagerungsprozessen.

3.3.3.3 Immissions-, Arbeits- und Lärmschutz

Für die Einhaltung immissionsschutzrechtlicher Anforderungen und Auflagen werden Emissions- und Wirkungsgradmessungen durchgeführt. Die eingesetzte **Abluftreinigungstechnik** wird somit überprüft. Im Rahmen der Überwachung des Anlagenbetriebes (s. Kap. 3.3.3.1) wird festgelegt, welche Immissionsschutzmessungen (Parameter, Meßpunkte) durch wen (Eigenkontrolle des Betreibers oder Meßstelle nach §§26,28 BImSchG) durchgeführt werden. Grundlegende Anforderungen bezüglich des Immissionsschutzes sind in Kap. 3.1.3.4 beschrieben.

Hinsichtlich des **Arbeitsschutzes** werden im allgemeinen die "Regeln für Sicherheit und Gesundheitsschutz bei der Arbeit in kontaminierten Bereichen" herangezogen [61]. Die Anforderungen an den Umgang mit Gefahrstoffen werden hier hinreichend beschrieben. Ein Sicherheitsplan bzw. ein Arbeitsschutzkonzept ist für jede Sanierungsmaßnahme zu erstellen. Weiteres über den Umgang mit Gefahrstoffen ist in Kapitel 3.1.3.5 und die Beurteilung und Minimierung von Geräuschemissionen in Kapitel 3.1.3.6 erläutert.

3.3.3.4 Nachsorgemaßnahmen

Nach der erfolgreichen Behandlung sind nachsorgende Überwachungsmaßnahmen gemäß BBodSchG durchzuführen:

- Nach Beendigung der *In situ*-Sanierung wird durch ein fortführendes Monitoring die Nachhaltigkeit der Sanierungsergebnisse überprüft.
- An entsprechenden Kontrollmeßstellen sind nach Stillstand der *In situ*-Anlage über einen ausreichenden Zeitraum (z. B. ein Jahr) weitere Beprobungen und Schadstoffanalysen durchzuführen.
- Sinnvollerweise sollte die Sanierungsanlage über diesen Zeitraum weiterhin Bestand haben, um bei Bedarf sofort wieder in Betrieb genommen zu werden.

3.3.4 Praxiserfahrungen

Die Entwicklung biologischer *In situ*-Verfahren ist in den letzten Jahren intensiv vorange-trieben worden, so daß sie generell in der Altlastensanierung inzwischen breite Anwendung finden. Je nach Verfahrensart ist der Stand der Technik jedoch unterschiedlich und bedarf deshalb einer differenzierten Einzelfallbetrachtung. Exemplarische Anwendungsfälle gehen aus der 'Referenzliste erfolgreicher biologischer Bodensanierungen' im Rahmen einer Firmenbefragung hervor (s. Kap. 6.5).

3.3.4.1 Stand und Verbreitung der Technik

Je nach Anwendungsbereich haben Infiltrationsverfahren einen sehr unterschiedlichen Verbreitungsgrad. Verfahren für die ungesättigte Bodenzone durch Infiltration von Additiven, wie z. B. Nährstoffe, Co-Substrate oder Sauerstoffträger, sind als alleiniges Sanierungs-verfahren in der Praxis wenig verbreitet, da ohne Zusatzmaßnahmen die Ausbreitung dieser Stoffe im Untergrund und damit ihr Wirkungsbereich stark eingeschränkt ist. Dagegen sind Infiltrationsverfahren für die gesättigte Bodenzone insbesondere dann von Bedeutung, wenn ein **Spülkreislauf** eingerichtet wird und dieser mit einer *On site*-Reinigung des kontami-nierten Grundwassers kombiniert wird (s. Abb. 3.6). Infiltrationsverfahren für die gesättigte Bodenzone werden bei Kontaminationen mit MKW und BTEX, vereinzelt auch bei PAK (soweit diese wasserlöslich sind) und LCKW eingesetzt. Solange Infiltrationsverfahren allerdings als alleinige Sanierungsverfahren angewendet werden, ergeben sich in der Regel lange Sanierungszeiten.

Belüftungsverfahren wie etwa die Bodenluftabsaugung leiten sich von pneumatischen Bodensanierungsverfahren ab und haben in der Sanierungspraxis seit vielen Jahren einen hohen Stellenwert. Vergleichsweise neu ist die Entwicklung direkter Belüftungsverfahren zur biologischen *In situ*-Sanierung (**Bioventing, Air Sparging**). In den letzten Jahren haben diese Verfahren zunächst in den U.S.A., aber mittlerweile auch in Deutschland einen beachtlichen Verbreitungsgrad erlangt. Direkte Belüftungsverfahren finden derzeit Anwendung bei Kontaminationen mit MKW (deutlich unterhalb der Sättigungsgrenze), BTEX und in Einzelfällen auch niedrigkondensierten PAK. Für LCKW, selbst bei nicht vollständigem

Chlorierungsgrad, wie z. B. Trichlorethen, sind diese Verfahren weniger geeignet, da der aerobe Abbau langsamer ist als beispielsweise bei MKW oder BTEX, und deshalb eher eine Strippung der Schadstoffe als ein quantitativer biologischer Abbau zu erwarten ist. Verbreitet ist eine Kombination dieser Verfahren mit Maßnahmen zur **Bodenluftabsaugung** der ungesättigten Bodenzone. Auf diese Weise werden flüchtige Schadstoffkomponenten durch Absaugung entfernt (und nachfolgend gereinigt) und nicht-flüchtige Kohlenwasserstoffe *in situ* unter aeroben Bedingungen abgebaut. Eine Kombination von Air Sparging und Bodenluftabsaugung wird insbesondere dann eingesetzt, wenn sich die Kontamination über die gesättigte und ungesättigte Bodenzone erstreckt.

In der Sanierungspraxis werden auch **Kombinationen** aus Belüftungs- und Infiltrationsverfahren eingesetzt. So können beispielsweise Belüftungsverfahren (Bioventing, Air Sparging) mit der Applikation von Nährstoffen kombiniert werden, wobei die installierten Druckluftanlagen sowohl zur Belüftung als auch zur Nährstoff-Infiltration genutzt werden können, so daß keine Zusatzeinbauten notwendig sind. Darüber hinaus wird die Ausbreitung der Additive im Untergrund durch den Belüftungsprozeß gefördert.

Die Entwicklung von **Phytoremediationsverfahren** ist in den letzten Jahren intensiv vorangetrieben worden, allerdings mit Schwerpunkt in den U.S.A. [16]. Die Behandlung von Schwermetallverunreinigungen im Boden durch Phytoextraktion findet Anwendung, erfordert allerdings lange Sanierungszeiten. Aufgrund der derzeitigen Entwicklung ist davon auszugehen, daß insbesondere Verfahren der Phyto- und Rhizosphärendegradation für organische Schadstoffe in oberflächennahen Bodenschichten künftig in der Praxis an Bedeutung gewinnen werden [4]. Allerdings liegen für die Phytoremediation organischer Schadstoffe bislang noch zu wenige Erfahrungen im Feldmaßstab vor.

In den letzten Jahren haben biologische *In situ*-Verfahren an Bedeutung zugenommen [32]. In naher Zukunft könnte sich ein Trend in Richtung kostengünstiger Verfahren abzeichnen (z. B. Phytoremediation). Neben ökonomischen bieten solche Verfahren auch ökologische Vorteile, die durch eine Ökobilanzierung erfaßt werden können [25]. Allerdings sind im allgemeinen lange Sanierungszeiten in Betracht zu ziehen.

3.3.4.2 Kostenrelevante Einflußgrößen

Da es sich bei biologischen *In situ*-Verfahren um eine heterogene Gruppe verschiedenster Sanierungstechniken handelt, ist die Kostenbetrachtung abhängig vom jeweiligen Verfahren. Es lassen sich jedoch generelle kostenrelevante Einflußgrößen angeben, die nachfolgend aufgeführt sind:

Untergrundaufbau

Die geologischen und hydrogeologischen Gegebenheiten am Schadensort bestimmen die Auslegung des Sanierungsverfahrens. So sind die Wirkungsradien von Brunnen oder Lanzen abhängig von der Durchlässigkeit des Bodens. Damit besteht ein direkter Einfluß dieser Faktoren auf die Sanierungskosten.

Bei einem heterogenen Untergrundaufbau müssen Sanierungsanlagen in der Regel größer dimensioniert werden. Auch die Anforderungen an das Monitoringsystem können steigen und damit die Sanierungskosten erhöhen.

Art, Ausmaß und Lage der Kontamination

Die Art der vorliegenden Schadstoffe sowie das Ausmaß der Kontamination haben Einfluß auf die spezifischen Behandlungskosten (Kosten pro Tonne Boden). Die Lage der Kontamination relativ zum Grundwasserleiter bestimmt die Aufwendungen, um Schadstoffausträge in den Aquifer hinein oder Schadstoffverlagerungen innerhalb des Aquifers zu vermeiden.

Anlagenbau und -betrieb

Die Investitionen für *In situ*- und *On site*-Anlagenteile inklusive Aufwendungen für Planung, Genehmigungen usw. sind kostenrelevant, ebenso die Betriebskosten (Personal, Energie, Betriebsstoffe, Additive) einschließlich analytischer Überwachung sowie die Abbaukosten der Anlage.

Sanierungsdauer

Die Sanierungsdauer ist als wichtige kostenrelevante Einflußgröße abhängig vom Verfahren, den standortspezifischen Randbedingungen sowie der Art und Verteilung der Schadstoffe. Bereits bei der Planung der Sanierungsmaßnahme sollte deshalb eine möglichst genaue Prognose der Sanierungsdauer erstellt werden. Letztere ist auch für die Akzeptanz des ausgewählten Verfahrens von Bedeutung.

Bedarf an Additiven

Je nach Verfahren, Kontamination und Untergrundverhältnissen ist ein Bedarf unterschiedlicher Additive erforderlich. Der jeweilige Beschaffungspreis stellt eine kostenrelevante Einflußgröße dar.

Technische Schutzmaßnahmen

Bei Vorliegen von Kontaminationen mit besonderen Eigenschaften (hohe Flüchtigkeit, Toxizität) bzw. bei Anwendung bestimmter Techniken (z. B. direkte Belüftungsverfahren) sind u. U. zusätzliche, kostenträchtige technische Schutzmaßnahmen erforderlich.

Die hier dargestellten kostenrelevanten Größen geben einen Anhaltspunkt für die wirtschaftlichen Einflüsse bei Anwendung biologischer *In situ*-Verfahren wieder. Die Vorgehensweise bei einer vergleichenden ökonomischen Bewertung verschiedener Sanierungsverfahren ist in Kapitel 3.4 dargestellt.

3.4 Vergleichende Ökonomische Bewertung

Eva Wortmann und Kai Steffens

3.4.1 Einleitung

Für die rationelle und erfolgreiche Durchführung von Sanierungsvorhaben sind die Belange und Beiträge vieler Beteiligter zu berücksichtigen und zu koordinieren. Zu den **Beteiligten** zählen u.a.: Flächeneigentümer, Anlieger, Behörden, Ingenieurbüros, Sanierungsunternehmen und Laboratorien. Die Vielzahl der Beteiligten und die Komplexität des Prozesses ergeben die Notwendigkeit einer durchdachten Planung und Überwachung des Projektes. Dies betrifft sowohl die im Regelfall komplizierten technischen Zusammenhänge und Abhängigkeiten als auch die zielführende kaufmännische Projektabwicklung. In diesem Zusammenhang ist insbesondere die Kostenplanung, Kostenerfassung und Kostensteuerung von zentraler Bedeutung.

Die Sanierung einer Altlast zur Gefahrenabwehr oder zur Reduzierung vorhandener Belastungen zur Ermöglichung einer höherwertigen Nutzung ist eine **Sachinvestition** mit langfristiger Bindung des eingesetzten Kapitals. Diese Sachinvestition dient der Wertsteigerung der Fläche, deren Verkehrswert vor der Bearbeitung durch behebungspflichtige ("Altlasten") oder nicht behebungspflichtige Lasten gemindert ist. Die nicht behebungspflichtigen Lasten können Nutzungsbeschränkung bedingen und sich dadurch auf den Verkehrswert auswirken.

Die Tolerierbarkeit im Boden verbleibender Restkontaminationen sowie deren Ausmaß sind dabei von der **geplanten Nutzung** abhängig. Die in diesem Zusammenhang definierten Ziele beeinflussen direkt die Sanierungskosten, denn der Gesamtaufwand (und zumeist auch die darin enthaltenen Kosten für die Reinigung des Bodens) steigt, je geringer die angestrebte Restbelastung ist.

Bei der **Auswahl des Sanierungsverfahrens** stellt die technische Möglichkeit, das angestrebte Sanierungsziel zu erreichen, das erste positive Auswahlkriterium dar. Nach dieser Eingrenzung auf die technisch geeigneten Sanierungsverfahren sollte im zweiten Schritt ein Vergleich der Vor- und Nachteile verschiedener Szenarien auch unter Kostengesichtspunkten vorgenommen werden. In den Kapiteln 3.1 bis 3.3 des vorliegenden Leitfadens wird ausführlich auf biologische Sanierungsverfahren eingegangen. Dort werden die technischen Merkmale dieser Verfahren beschrieben, die einer Alternativenbetrachtung zugrundegelegt werden können.

Die Kosten von Projekten insgesamt und auch – in engeren Grenzen – die Kosten, die für die Anwendung einer Sanierungstechnik anfallen, sind direkt von den Spezifika eines jeden Einzelfalles abhängig. Dieser Leitfaden kann also keine Zusammenstellung absoluter Werte enthalten. Vielmehr sollen in diesem Kapitel generelle Aspekte und Instrumentarien der Kostenplanung und -erfassung angesprochen werden, die einer Alternativenbewertung im Einzelfall zugrunde gelegt werden können. Dazu werden die der Betriebswirtschaftslehre entstammenden methodischen Ansätze auf die Altlastensanierung übertragen und anhand von Beispielen erläutert.

Um zu gewährleisten, daß die **Projektkosten** vollständig erfaßt werden, ist eine inhaltliche und eine zeitliche Gliederung dieser Kosten erforderlich. Im Folgenden werden beide Arten der Gliederung vorgestellt und erläutert. In dem sich anschließenden Teilkapitel zur Wirtschaftlichkeitsbetrachtung werden die Projektkosten systematisiert und in eine einführende Erläuterung der Grundlagen der Kostenvergleichsrechnung mit Darstellung eines Beispiels einbezogen.

Kostenplanungen sind immer mit Unsicherheiten behaftet. Diese Selbstverständlichkeit ist gerade in Sanierungsprojekten zu beachten, da sich die Dimension des zu bearbeitenden Problems häufig erst im Projektverlauf offenbart. Deshalb sind bei der Kostenplanung diejenigen Faktoren, die eine deutliche und unerwartete Steigerung der Projektkosten nach sich ziehen können, besonders zu berücksichtigen. Eine Sensitivitätsanalyse der Projektkosten kann hierfür das geeignete Instrumentarium sein.

Das letzte Teilkapitel befaßt sich mit der Kontrolle und Steuerung des Sanierungsverlaufes durch ein projektbegleitendes Controlling.

3.4.2 Gliederung der Projektkosten

Für eine vergleichende Wirtschaftlichkeitsbetrachtung ist es notwendig, nicht nur die entstehenden "direkten" Behandlungskosten, sondern die gesamten Projektkosten der Sanierung zu berücksichtigen. Gerade in den zusätzlichen, vom gewählten Sanierungsverfahren abhängigen Kosten kann ein entscheidender Kostenfaktor verborgen sein. Nur eine Erfassung dieser (potentiellen) Kosten sowie eine Bewertung der damit verbundenen Risiken erlaubt einen belastbaren Vergleich mehrerer Alternativen.

3.4.2.1 Verfahrensabhängige und verfahrensunabhängige Sanierungskosten

Die Projektkosten einer Sanierung lassen sich inhaltlich in verfahrensabhängige und verfahrensunabhängige Kosten gliedern. Unter **verfahrensabhängigen Kosten** sind alle Kosten zu verstehen, deren Auftreten oder Höhe direkt vom gewählten Sanierungsverfahren beeinflusst wird. Die Behandlungskosten sind als ein Teil dieser verfahrensabhängigen Kosten zu berücksichtigen. Dagegen sind die **verfahrensunabhängigen Kosten** von den Verhältnissen auf dem Sanierungsstandort bzw. den Rahmenbedingungen des Falles bestimmt. Sie sind durch die Auswahl von Alternativen nicht beeinflussbar.

Zur Verdeutlichung der Zusammenhänge soll ein Beispiel dienen, das über den hier zu steckenden technischen Rahmen der biologischen Verfahren hinausgeht: am Beispiel der grundsätzlich unterschiedlichen Verfahren der mikrobiologischen Mietentechnik und der thermischen Behandlung soll die gewählte Abgrenzung der verfahrensabhängigen und verfahrensunabhängigen Kosten erläutert werden.

Während der **Gefährdungsabschätzung** auf einem Altstandort fallen Kosten für die Erkundung und Beurteilung an. Die Intensität der Untersuchung und damit auch die Höhe der entstehenden Kosten ist im wesentlichen standortbezogen und damit unabhängig von ggf. später auszuwählenden Sanierungsverfahren. Zu diesem Zeitpunkt der Altlastenbearbeitung

ist noch keine Entscheidung hinsichtlich der Erfordernis einer Sanierung oder für ein bestimmtes Sanierungsverfahren gefallen. Erst der Aufwand im Schritt der **Sanierungsuntersuchung** wird dann verfahrensabhängig, wenn die Eignung verschiedener Sanierungsverfahren getestet werden soll. Der Test auf Eignung der thermischen Behandlung für verdampfbare/verbrennbare Schadstoffe bedarf im Regelfall nur einer vergleichsweise geringen Untersuchungsintensität, da diese Art der Behandlung wenig selektiv für bestimmte Schadstoffgruppen und deren Konzentrationen ist. Gleichzeitig ist bei diesen Verfahren jedoch mit vergleichsweise hohen Behandlungskosten zu rechnen (vgl. Abb. 3.9).

Beim Einsatz der Mietentechnik sind höhere Kosten für die Sanierungsuntersuchung zu kalkulieren, wenn eine exakte Identifikation von belastetem und unbelastetem Boden gewünscht ist. Als Ergebnis erhält man ein geringes zu behandelndes Bodenvolumen und nur geringe Behandlungskosten. Die Verschiebung der Relationen der Einzelposten zu den Projektkosten sind der Abbildung 3.9 zu entnehmen.

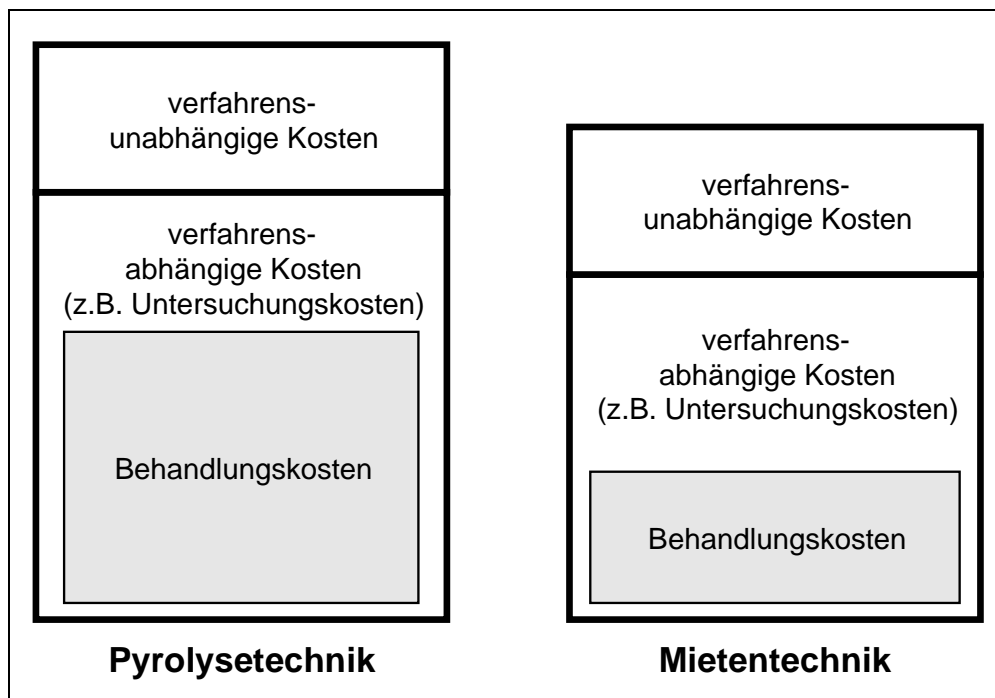


Abb. 3.9: Relationen und Status verfahrensabhängiger und verfahrensunabhängiger Sanierungskosten

Weitere Faktoren mit direkten Auswirkungen auf die zusätzlichen verfahrensabhängigen Kosten sind die für die Sanierung zur Verfügung stehende **Zeit** und – im Fall von *On site*-Mietensanierungen – die vorhandene **Sanierungsfläche**.

Zielt die Sanierung auf einen schnellen Abschluß der Bodenbehandlung, wird ein zeitintensives, aber kostengünstiges Verfahren, wie z.B. die *On site*-Mietentechnik, als Alternative ausscheiden. Gleiches gilt für Standorte, in denen keine ausreichend großen Behandlungsflächen zur Verfügung stehen. Je nach Eigentumsverhältnissen müssen für die Dauer der Sanierung für diese Flächen Mietkosten eingeplant werden. Die Anwendung einer thermischen Behandlung verringert dagegen gleichzeitig Flächen- und Zeitbedarf. Die

Sanierung kann früher beendet werden, die Fläche steht früher für die geplante Folgenutzung zur Verfügung. Da nun der wirtschaftliche Nutzen der Sanierung für den Eigentümer früher eintritt, kann dies die erhöhten Behandlungskosten ausgleichen.

Aus der Vielzahl der **verfahrensunabhängigen Kosten** seien nachfolgend nur einige Beispiele genannt:

- Fixe Gemeinkosten, z.B. gesetzliche Unfallversicherung, Risikoversicherung und betriebliche Haftpflichtversicherung
- Verkehrswertminderung aufgrund der eingeschränkten Nutzungsmöglichkeit des Grundstücks
- Entschädigungsleistungen bei Nutzungseinschränkungen an Nutzer, Renditenausfall falls Nutzungen teilweise oder insgesamt nicht mehr möglich sind
- Langfristige Teuerungsrate
- Kostenrelevante Bauplanänderungen im Falle einer neuen Nutzung oder eines konkreten Bauvorhabens
- Umsiedlung von Bewohnern

Bereits aus dieser exemplarischen Aufzählung wird deutlich, daß die Gesamtkosten eines Projektes stark von den verfahrensunabhängigen Kosten dominiert sein können. In der Konsequenz heißt dies, daß das Einsparpotential durch die kostenorientierte Auswahl von Sanierungstechnologien in der Relation zu den Gesamtkosten gering sein kann. Die in einem solchen Fall konsequente Schlußfolgerung lautet, daß dann auch eine Technik gewählt werden könnte, die möglicherweise nicht die niedrigsten Kosten mit sich bringt, aber gegenüber Risiken "robuster" ist, als die Alternativen. Von besonderer Bedeutung kann in dieser Hinsicht das zeitliche Risiko, also die Prognosesicherheit des Sanierungszeitraumes sein. Die Auswahl einer "risikoarmen" jedoch etwas teureren Behandlungstechnik wäre in einem solchen Fall also nur mit relativ geringen Mehrkosten verbunden (vgl. auch Kap. 3.4.3.3).

Die Zusammenstellung und Gegenüberstellung verfahrensabhängiger und verfahrensunabhängiger Kosten dient also auch dazu, die relative Wertigkeit von Argumenten (z.B. Geld, Zeit, Risiko (= Störungsanfälligkeit)) für den Einzelfall zu ermitteln.

3.4.2.2 Zeitliche Gliederung von Projektkosten

Jedes Sanierungsprojekt kann zusätzlich zur bereits vorgestellten inhaltlichen Gliederung auch in drei zeitliche Abschnitte (vor, während und nach der Sanierung) unterteilt werden. Eine solche Gliederung steigert die Transparenz dann, wenn gleichzeitig eine Darstellung der wirtschaftlichen Charakteristika der Phasen erfolgt. Dies soll im folgenden in der gebotenen Kürze angesprochen werden.

In der **Phase vor der Sanierung** entstehen in erster Linie Kosten für die Historische und Technische Erkundung der altlastenverdächtigen Fläche. Während der dazu notwendigen Maßnahmen ist mit Nutzungsbeeinträchtigungen des Grundstücks zu rechnen. Weiterhin ist aufgrund des Imageverlustes eine Wertminderung des Grundstücks und eine damit eventuell einhergehende Entwertung eines Grundpfandrechts denkbar.

Während der Sanierungsmaßnahmen treten als wirtschaftliche Auswirkungen vor allem die Kosten der Altlastensanierung und die weitere Nutzungsbeeinträchtigung des Grundstücks auf. Die in der ersten Phase genannten weiteren wirtschaftlichen Folgen können auch in dieser Phase weiterbestehen.

Auch in der **Phase nach der Sanierung** kann die Nutzung des Geländes dauerhaft beeinträchtigt sein, wenn die Planung einer Neunutzung nicht verwirklicht werden kann. Durch eine Sanierung ist aber auch eine Werterhöhung des Grundstücks und des Grundpfandrechts möglich. Dies gilt insbesondere in den Fällen, in denen die kontaminierte Fläche vor der Sanierung eine geringerwertige Nutzung aufgewiesen hat. Zu den weiteren positiven wirtschaftlichen Auswirkungen zählen die Möglichkeiten des Grundstückverkaufs. Für die Kommunen liegen die Vorteile im wesentlichen in der Steigerung des Umfeldwertes für Wohn- bzw. Gewerbeansiedlung.

3.4.3 Wirtschaftlichkeitsbetrachtung

3.4.3.1 Systematik

Aufbauend auf die Zeitachse werden die Projektkosten in die drei Phasen vor, während und nach der Sanierung unterteilt. Jede Phase kann wiederum in mehrere Teilleistungen differenziert werden. Für eine vergleichende ökonomische Bewertung der Sanierungsverfahren wird eine noch genauere Spezifizierung benötigt, um sicherzustellen, daß alle Kostenfaktoren berücksichtigt werden. Diesem Anspruch trägt die nachfolgende Systematik Rechnung.

Die Teilleistungen der Historischen und Technischen Erkundung in der Gefährdungsabschätzung sowie die sofortige Gefahrenabwehr erzeugen verfahrensunabhängige Kosten. Bereits während der Sanierungsplanung ändert sich die Höhe der Kosten je nach betrachteter Sanierungsalternative. Ab dem Zeitpunkt nach der Wirtschaftlichkeitsbetrachtung, an dem eine endgültige Entscheidung gefallen ist, werden alle Kosten bis zum Abschluß der Sanierung als verfahrensabhängig anzusehen sein.

Diese Systematik wird im nachfolgenden Kapitel als Grundlage einer exemplarischen Kostenvergleichsrechnung für einen fiktiven Schadensfall genutzt. Zunächst jedoch soll die folgende Aufzählung (Tab. 3.3) zur Verdeutlichung der (möglichen) Kostenpositionen dienen, ohne daß sie einen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt.

Tab. 3.3: Mögliche Kostenpositionen einer Altlastensanierung und Einteilung in Projektphasen

1. Phase: Vorleistungen

Teilleistungen	Spezifizierung
Historische Erkundung	Standorthistorie Recherche über Geologie, Hydrogeologie, frühere Nutzung und umweltrelevante Ereignisse Lokalisation der Verdachtsflächen Kontaminiertes Medium bestimmen (Grundwasser, Boden, Bodenluft) Erstbewertung mit Art, Menge und Quelle der Schadstoffe
Technische Erkundung/ Gefährdungsabschätzung	Aufstellung des Untersuchungsprogrammes samt Überwachung Bohrung, Schürfe, Grundwassermeßstellen Probenahme und Analytik Gutachten erstellen
Sofortige Gefahrenabwehr	Umzäunung, Oberflächenabdeckung und Räumungsarbeiten Evakuierung der Bewohner/ Anwohner Betretungs- und Nutzungsverbot erteilen
Sanierungsplanung	Sanierungsuntersuchung (weitere Standorterkundung) Entwicklung der Sanierungsalternativen Versuche zur Behandelbarkeit Wirtschaftlichkeitsbetrachtung (Kostenvergleichsrechnung) Genehmigungsplanung Ausschreibung ggf. Rechtsberatung ggf. großtechnische Versuche

2. Phase: Sanierungsdurchführung

Teilleistungen	Spezifizierung
Behandlungskosten	<p>Standortvorbereitung, Abbrucharbeiten</p> <p>Aushub, Erdarbeiten</p> <p>Transport des Bodens</p> <p>Vorbehandlung des Bodens</p> <ul style="list-style-type: none"> - Sieben, Homogenisieren, Brechen <p>Vorbereitung der Behandlungsfläche</p> <ul style="list-style-type: none"> - Basisabdichtung, Sickerwasserfassung - Bau von Spundwänden - Abdecken und Überdachen - Einhausen mit Entlüftung <p>Erwerb bzw. Mietkosten der Ausrüstung</p> <p>Aufbau und Betrieb der Behandlungsanlage (z.B.)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Brunnenbau - Luft- und Wasserpegeleinrichtungen - Flächendrainagen, -Rohrsysteme legen - Befeuchtungssysteme bzw. Trocknung - Wenden des Bodens - Abluftreinigung <p>Versorgung mit Wasser und Strom</p> <p>Betriebsmittel</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nährstoffversorgung - Strukturverbesserer - Co-Substrate - Tenside, Oxidationsmittel - Züchtungen allochthoner oder Vermehrung autochthoner Bakterien <p>Verbrauchsmaterial</p> <ul style="list-style-type: none"> - Filtermaterial z.B. Aktivkohle - Schutzausrüstung (Handschuhe, Staubmasken u.ä.) <p>Analytik / Erfolgskontrolle</p> <ul style="list-style-type: none"> - Schadstoffanalytik - mikrobielle Laboruntersuchung - begleitendes Monitoring

2. Phase: (Fortsetzung)

Teilleistungen	Spezifizierung
Behandlungs- begleitende Leistungen	Sanierungsplanung/-begleitung - Ausführungsplanung - Bauleitung - Bauüberwachung - Projektbetreuung/Controlling Arbeits- und Emissionsschutz - Schwarz-Weiß-Anlagen, Personenschleusen - Fahrzeug- und Reifenwaschanlagen - Lärmschutz - Staubminderung Transport von Personal und Ausrüstung Bereitstellung des Bodens zur Behandlung auf dem Standort oder geordnetes Zwischenlager Öffentlichkeitsarbeit Miete für die Behandlungsfläche ggf. gesonderte Personalkosten

3. Phase: Folgeleistungen

Teilleistungen	Spezifizierung
	Rückbau der Installationen Rückstandsentsorgung von Feststoffen Abwasserbehandlung Verfüllung und Rekultivierung Langzeitüberwachung/Monitoring Dokumentation

3.4.3.2 **Kostenvergleichsrechnung**

Die Wirtschaftlichkeit einer Altlastensanierung sollte bereits in der Planungsphase abgeschätzt werden. Anhand einer Kostenvergleichsrechnung ist es möglich, die wirtschaftlichen Folgen einer Investition im Rahmen einer Sanierung abzuschätzen und die unter den gegebenen Bedingungen am besten geeignete Sanierungsmethode herauszufinden. Die Kostenvergleichs-

rechnung dient dazu, die in einer Zeitperiode bei einer gegebenen Kapazität (z.B. Sanierungsumfang) anfallenden Projektkosten zweier oder mehrerer sich ausschließender Alternativen gegenüberzustellen. Gewählt wird dann jene Alternative, die bei gleichem Nutzen die geringsten Kosten verursacht.

Die Frage, ob der **Nutzen** größer ist als die Kosten, bleibt dabei unberücksichtigt. Dieser Fragestellung geht die Kosten-Nutzen-Analyse nach, die aber an dieser Stelle nicht vorgestellt wird, da der Nutzen der Sanierung eng mit den festgelegten Sanierungszielwerten verbunden ist. Der Nutzen wird also im Vorfeld der Sanierung festgelegt und jedes in den Vergleich einbezogene Verfahren muß die Sanierungszielwerte erreichen können.

Jedes Sanierungsverfahren besitzt bestimmte **Charakteristika**, wie z.B. die Behandlungsgeschwindigkeit, den Flächenbedarf, die allgemeine und behördliche Akzeptanz oder den Grad der Umweltbelastung (z. B. durch im Boden verbleibende Stoffe). Diese Merkmale lassen sich in einer Entscheidung nur mittels definierter Annahmen in monetäre Kriterien fassen, müssen jedoch ebenfalls bei der Entscheidung für ein Verfahren berücksichtigt werden.

Zum Zeitpunkt der Entscheidungsfindung werden noch nicht die vollständigen Kosteninformationen aus der technischen Ausführungsplanung zur Verfügung stehen können. Allerdings können die wesentlichen **Eckdaten der Sanierung** ermittelt werden. Diese sind z.B. die Kostenobergrenze für das Gesamtprojekt, aber auch die Zuordnung von Kosten der alternativen Sanierungsverfahren zu den Teilleistungen. Ein Vergleich der Verfahren führt dann zu einer Rangfolge der Sanierungsalternativen, die es dem Eigentümer gestattet, die beste Handlungsmöglichkeit auszuwählen. In der Praxis kann zwischen der Entscheidung und der Realisierung der Sanierung eine längere Zeit vergehen. Deshalb kann eine Änderung oder Anpassung der ursprünglichen Entscheidung nötig werden.

Beispiel für eine Kostenvergleichsrechnung

Nachfolgend wird ein beispielhaft stark vereinfachter Kostenvergleich für zwei Sanierungsverfahren in einem angenommenen Schadensfall durchgeführt (Tab. 3.4). Folgendes **Szenario** wird der Beispielrechnung zugrunde gelegt:

Am Verladegalgan eines Tanklagers, in direkter Nähe eines Lagergebäudes, wird unbemerkt ein Verbindungsstück nicht korrekt angeschlossen. Während der Verladung treten ca. 2000 Liter Vergaserkraftstoff aus. Die Kohlenwasserstoffe dringen in das Erdreich ein, das aus Kiessanden mit einem Schluffanteil besteht. Untersuchungen ergeben, daß das Grundwasser noch nicht kontaminiert ist und bei einer sofortigen Sanierung auch nicht kontaminiert wird.

Die erste Sanierungsalternative stellt die **On site-Mietentechnik** (s. Kap. 3.1) dar. Der kontaminierte Boden wird auf einer Fläche von 10 × 15 Metern und einer Tiefe von 5 Metern ausgekoffert. Zur Baugrubenabsicherung und zum Schutz der angrenzenden Lagerhalle wird an einer Wand eine Spundwand eingezogen. In einer bestehenden, leerstehenden Halle auf dem Gelände des Tanklagers wird die Mietenfläche hergerichtet. Nach dem Aushub wird die Grube mit Bergkies verfüllt und wieder bebaubar gemacht. Die Bauzeit beträgt eine Woche.

Als zweite Alternative werden die Kosten einer **In situ-Sanierung** (s. Kap. 3.3) kalkuliert. Dazu wird der Boden mit Luftpflanzen belüftet und an Infiltrationspegeln werden Nährlösung und autochthone Mikroorganismen in den Boden eingebracht (Bioaugmentation). Die an einer Stelle abgesaugte Bodenluft wird über Aktivkohle gereinigt.

Bei beiden Alternativen wird von einer Behandlungszeit von einem Jahr ausgegangen.

Tab. 3.4: Beispiel für eine Kostenvergleichsrechnung

1. Phase: Vorleistungen

Kostenfaktor	Mietentechnik [DM]	In situ-Sanierung [DM]
Historische Erkundung Standorthistorie	4.000	4.000
Gefährdungsabschätzung 15 Rammkernsondierungen und 3 Grundwassermeßstellen (á 15 Meter)	45.000	45.000
Sofortmaßnahmen Sicherung des Schadensbereiches und Oberflächenabdeckung	2.500	2.500
Betretungs-/Nutzungsverbot (bzw. diesbezügliche Sicherung)	1.500	1.500
Sanierungsplanung Sanierungsuntersuchung, Sanierungsalternativen, Wirtschaftlichkeitsbetrachtung, Genehmigungsplanung, Ausschreibung und ggf. Rechtsberatung	20.000	20.000
Behandlungsvorversuche	15.000	15.000
Absaug-/Pumpversuche	–	6.500
Summe Vorleistungen:	88.000	94.500

2. Phase: Sanierungsdurchführung

Kostenfaktor	Mietentechnik [DM]	In situ-Sanierung [DM]
Standortvorbereitung/Abbrucharbeiten	–	–
Aushub, Erdarbeiten		
Spundwand (Gebäudeschutz)	20.000	–
Bodenaushub 10×15×5 Meter und Verbringung zur Mietenfläche	6.500	–
Transport des Bodens	–	–

2. Phase: Fortsetzung

Kostenfaktor	Mietentechnik [DM]	In situ-Sanierung [DM]
Vorbehandlung des Bodens		
Sieben, Homogenisieren (inkl. Mietkosten)	20.000	–
Vorbereitung der Behandlungsfläche		
Herrichtung einer Mietenfläche in einer bestehenden Halle vor Ort	10.000	–
Mietkosten der Ausrüstung		
Radlader, RotarCleanTrommel	s. Vorbehandlg.	–
Bodenluftabsaugungsanlage	–	10.000
Aufbau und Betrieb der Behandlungsanlage		
Einbau des Bodenmaterials in die Miete	8.000	–
Dreimaliges Umsetzen der Miete	15.000	–
Errichtung von 3 Bodenluftabsaugpegeln, Bodenluftmeßstellen und Infiltrationspegel für Nährlösung etc.	–	11.000
Frostsicherung der Leitung	–	2.000
Anlagenwartung	–	3.500
Versorgung mit Wasser und Strom	–	6.500
Betriebsmittel, Verbrauchsmaterial		
Nährlösung, autochthone Bakterien, Strukturstoffe, Befeuchtung	15.000	15.000
Aktivkohle (inkl. Entsorgung)	–	4.500
Analytik/Erfolgskontrolle		
3 x Bodenproben mit Rammkernsondierung	–	7.500
Laboranalytik, mikrobiologischer Status	3.200	8.500
begleitendes Monitoring	–	4.000
Sanierungsbegleitung		
Anlagenbetreuung vor Ort und Koordination	12.000	12.000
Arbeits- und Emissionsschutz	–	–

2. Phase: Fortsetzung

Kostenfaktor	Mietentechnik [DM]	In situ-Sanierung [DM]
Transport von Personal und Ausrüstung Transport Anlagecontainer, Wasserabscheider, Seitenkanalgebläse, Aktivkohlefiltereinheit	–	5.500
Zwischenlagerung des Bodens	–	–
Öffentlichkeitsarbeit	–	–
Miete für die Behandlungsfläche	–	–
Summe Sanierungsdurchführung	100.700	90.000

3. Phase Folgeleistungen

Kostenfaktor	Mietentechnik [DM]	In situ-Sanierung [DM]
Rückbau der Installationen Rückbau der Absaugpegel	–	2.500
Rückstandsentsorgung von Feststoffen Verwertung des gereinigten Bodenmaterials	15.000	–
Abwasserbehandlung in bestehenden Benzinabscheider	–	–
Verfüllung und Rekultivierung Rückverfüllung der Baugrube mit Bergkies	3.000	–
Langzeitüberwachung	–	–
Dokumentation 3 Zwischen- und ein Abschlußbericht	6.500	8.000
Summe Folgeleistungen	24.500	10.500
Summe Gesamtkosten	213.200	195.000

Der zeitliche Anfall der Kosten erstreckt sich von den ersten Voruntersuchungen über die Sanierungsdurchführung bis zum Abschluß der Nachsorgephase. Der **Gesamtzeitraum**, in dem die Kosten zu verschiedenen Zeitpunkten anfallen, kann je nach Sanierungsvorhaben einige Jahre betragen. Bei einer mehrjährigen Sanierung müssen die zu den verschiedenen Zeitpunkten anfallenden Kosten mittels eines festgelegten Zinssatzes auf einen gewählten Bezugszeitpunkt hin auf- bzw. abgezinst (akkumuliert bzw. diskontiert) werden, da die Kosten unterschiedliche Wertschätzung besitzen. Beim betrachteten Sanierungsbeispiel entfällt eine finanzmathematische Aufbereitung der Kosten, da von einem Projektzeitraum von einem Jahr ausgegangen wird.

Für ein weitergehendes Studium der dynamischen Kostenvergleichsrechnung werden die "Leitlinien zur Durchführung dynamischer Kostenvergleichsrechnungen" der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) empfohlen [38].

3.4.3.3 Sensitivitätsanalyse

Zur Veranschaulichung des Gegenstandes der Sensitivitätsanalyse sei hier an das oben dargestellte Kostenvergleichsbeispiel angeknüpft. Die obige Gegenüberstellung der Kosten zur Sanierung des angenommenen Schadensfalles zeigt einen kostenmäßigen Vorteil der *In situ*-Sanierung von 18.200 DM gegenüber der Mietentechnik.

Eine Sensitivitätsanalyse liefert Antworten auf die Frage, welche Änderungen der Rahmenbedingungen dazu führen können, daß dieses Ergebnis nicht mehr haltbar ist. In unserem obigen Beispiel liegt eine stark unterschiedliche Gewichtung der fixen und variablen Kosten in den beiden Alternativen vor. Eine **Verlängerung des Bearbeitungszeitraumes** der Sanierung dürfte sich hier also deutlich unterschiedlich auf die beiden Gesamtsummen auswirken. Die Höhe der jährlichen laufenden Kosten wird sich beim Mietenverfahren auf ca. 48.000 DM belaufen. Für die *In situ*-Sanierung ist mit jährlichen Kosten von ca. 75.000 DM zu rechnen. Unter der Annahme, daß der Sanierungszielwert für Kohlenwasserstoffe nicht innerhalb eines Jahres erreicht werden kann und daher die Sanierung ein weiteres Jahr fortgesetzt werden muß, verändern sich die Gesamtkosten folgendermaßen: Die zweijährige Behandlung des Bodens mit der Mietentechnik wird ca. 261.200 DM und eine *In situ*-Sanierung ca. 270.000 DM kosten. Damit stellt in diesem Beispiel die Mietentechnik ab dem zweiten Behandlungsjahr das kostenmäßig günstigere Verfahren dar.

Neben der unerwarteten Verlängerung der Behandlungszeit können auch **nachträgliche Veränderungen an der Anlage** einen bedeutenden Kostenfaktor darstellen. Beispielhaft wird hier angenommen, daß auch nach über zwei Jahren Behandlungszeit der Sanierungszielwert für Kohlenwasserstoffe nicht erreicht wird. Zur Reduzierung des Versagensrisikos des gesamten Projektes wird die Anlage verbessert. Als Grund für die schlechten Abbauraten in den Mieten wird hier angenommen, daß allein durch das Umsetzen keine ausreichende Belüftung gewährleistet ist, so daß der Einbau einer aktiven Belüftung mit Lanzen notwendig wird. Die kostenmäßige Auswirkung dieser Umrüstung wird in der nachfolgenden Abbildung dargestellt. Bei der *In situ*-Sanierung wird angenommen, daß zur Verbesserung der Belüftung weitere Luftlanzen und daher auch zusätzliche Pumpen installiert werden müssen. Zur Verstärkung der mikrobiellen Aktivität wird wiederholt Nährlösung über die Infiltrationspegel eingebracht. Die Kosten für diese Umrüstung werden ebenfalls in der Abb. 3.10 berücksichtigt.

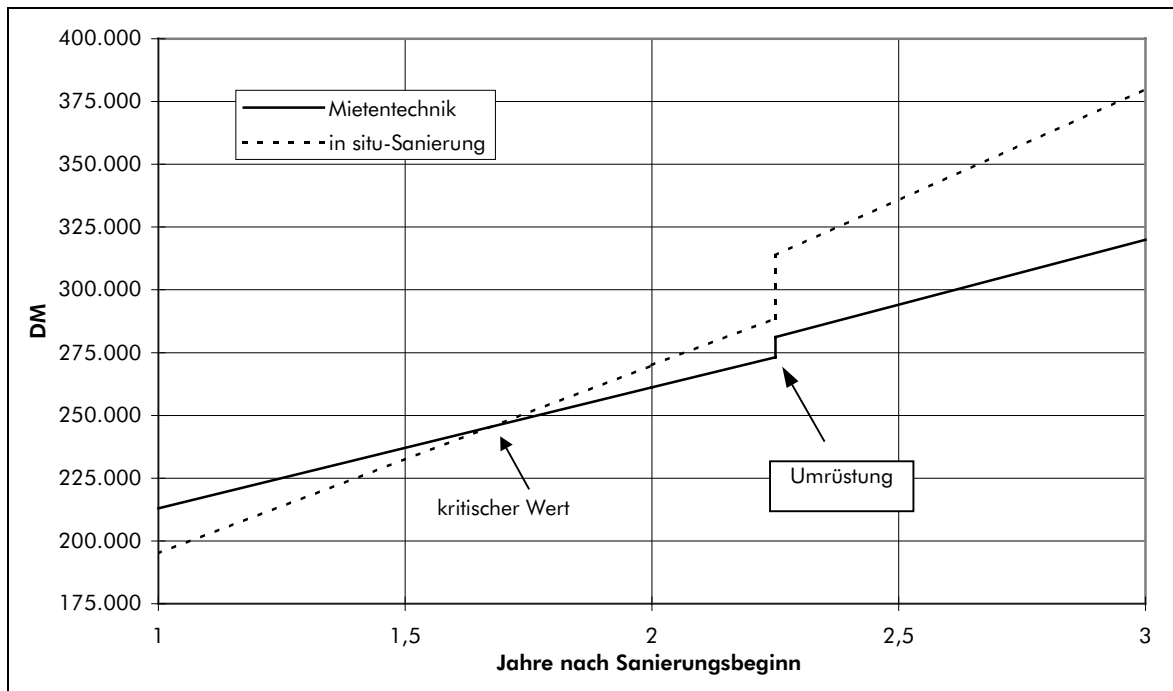


Abb. 3.10: Graphische Ermittlung des kritischen Wertes

Es zeigt sich, daß der in unserem Beispiel anfänglich vorhandene Kostenvorteil der *In situ*-Sanierung mit den auftretenden Schwierigkeiten im Projektverlauf verschwindet. Die Mietentechnik ist zumindest in dem hier konstruierten Beispiel deutlich "robuster" gegenüber Planungsänderungen. Die Sensitivitätsanalyse ergibt also, daß die Wahl des *In situ*-Verfahrens bei reibungslosem Verlauf mit einem Kostenvorteil verbunden ist, jedoch ein größeres Risiko höherer Mehrkosten bei Planungsänderungen beinhaltet.

Vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Kostenverläufe sei noch einmal auf die relative Bedeutung der verfahrensabhängigen zu den Gesamtkosten verwiesen. Für den Fall, daß nur ein kleines Kosteneinsparungspotential durch die Auswahl des Behandlungsverfahrens mit dem niedrigsten Preis erschlossen werden kann, sollte auf jeden Fall das Verfahren mit den geringsten Risiken gewählt werden.

Im folgenden sollen noch einige Aspekte genannt werden, die Kostenrisiken minimieren können.

Der Vorbereitung einer Sanierung kommt eine besondere Bedeutung bei der Kalkulation der Projektkosten zu. Die Historische und Technische Erkundung der Altlast hat zum Ziel, Art und Umfang der Schadstoffbelastung vollständig zu erfassen. Da alle im Vorfeld der Sanierung gesammelten Informationen als Grundlage für die Sanierungs- und Projektkostenplanung dienen, können die Projektkosten bei einer unzureichenden Vorerkundung deutlich beeinflußt werden. Je genauer die Rahmenbedingungen bekannt sind, um so exakter kann also die Planung der Sanierung und deren Einhaltung sein.

Folgende Kostenparameter sind als kritisch anzusehen, da sie aufgrund ihrer Bedeutung in der Lage sind, die Gesamthöhe der Projektkosten deutlich zu beeinflussen. Ihr Kostenverlauf muß daher ständig überprüft werden.

- Ein entscheidendes, kostenwirksames Problem einer unzureichenden Vorerkundung kann die **Entdeckung weiterer Kontaminanten** oder Kontaminationsherde zu Beginn der Behandlung sein. Im Extremfall kann dadurch die gewählte Sanierungstechnik unbrauchbar für den sich aktuell darstellenden Schadensfall werden. Auch bei Beibehaltung der Sanierungstechnik können die neu entdeckten Kontaminationsherde das kontaminierte Bodenvolumen signifikant vergrößern. Mit Vergrößerung des kontaminierten Bodenvolumens erhöhen sich die Kosten für Aushub, Transport, Analytik und Behandlung annähernd linear. Anders geartet ist der Fall, wenn bei der Planung eine zu geringe Bodentiefe angenommen wurde. So kann anstelle der geplanten einfachen Baugeräte überraschend ein Spezialtiefbau notwendig werden, aufgrund dessen sich die Kosten für den Bodenaushub vervielfachen. Ein Fund von Altfundamenten wird im gleichen Maße die Kosten für Erdarbeiten stark steigern.
- Aus einer groben **Fehleinschätzung der Standortverhältnisse** in der Phase der Vorerkundung können kostenintensive Stillstandszeiten während der Sanierungsphase resultieren. Auch in dieser nicht-produktiven Phase fallen Mietkosten für Geräte und Material sowie Kosten für Personal an.
- Der Faktor Arbeits- und Emissionsschutz kann ebenfalls als kostenrelevant angesehen werden. Als wichtigster Punkt ist eine **Fehleinschätzung der Tagesleistungen** im kontaminierten Bereich zu nennen. Die verringerte Tagesleistung wird kostenwirksam durch erhöhte Personalkosten und längere Standzeiten der Sanierung.
- Zum Schutz der umliegenden Anwohner, des Personals und des Grundwassers können **weitere Überwachungs- und Sicherungsmaßnahmen** erforderlich werden. Bei einer *In situ*-Sanierung kann der Einbau von Spundwänden benötigt werden, um ein Abströmen der Schadstofffahne aus dem Sanierungsbereich zu verhindern. Für das Mieten-Verfahren kann je nach Standort und Kontamination eine Einhausung mit einer Filteranlage notwendig werden. Außerdem wird häufig eine Basisabdichtung zur Sicherung des Grundwassers von den zuständigen Behörden gefordert.
- Im Zusammenhang mit dem Genehmigungsverfahren und der Festlegung der Sanierungszielwerte sind weitere kostensensitive Faktoren zu berücksichtigen. Eine **Verzögerung der Genehmigungserteilung** hat direkte Auswirkungen auf die Sanierungsplanung (Zeitmanagement). Eine **Veränderung der Sanierungszielwerte** durch die Genehmigungsbehörde ist ebenfalls von entscheidender Kostenrelevanz, kann aber i.d.R. nicht vom Altlasteneigentümer beeinflusst werden. Im Ergebnis können die geänderten Zielwerte bedeuten, daß die gewählte Sanierungstechnik nicht mehr geeignet ist und eine neue Technikwahl erforderlich wird.

3.4.4 Projektbegleitendes Controlling

Nachdem die Entscheidung für ein bestimmtes Sanierungsverfahren getroffen wurde, ist ein effektives Controlling (Steuerung und Kontrolle) des Projektverlaufes erforderlich. Mit dem Controlling steht ein wirtschaftliches Instrument zur Verfügung, das vor allem durch systematische Planung, Kontrolle und Steuerung bei der **Einhaltung des Kostenstellenplanes** hilft. Zentraler Aspekt des Controlling ist ein ständiger Vergleich der Soll-Werte aus der Planung mit den Ist-Werten aus der Realisierung (Soll-Ist-Vergleich). Die zugrunde-

gelegten Soll-Werte entstammen der Planungsphase der Sanierung und waren Grundlage für die Entscheidungsfindung.

In der nachfolgenden Abbildung werden die Zusammenhänge des Projektcontrollings als ein Regelkreis dargestellt (Abb. 3.11).

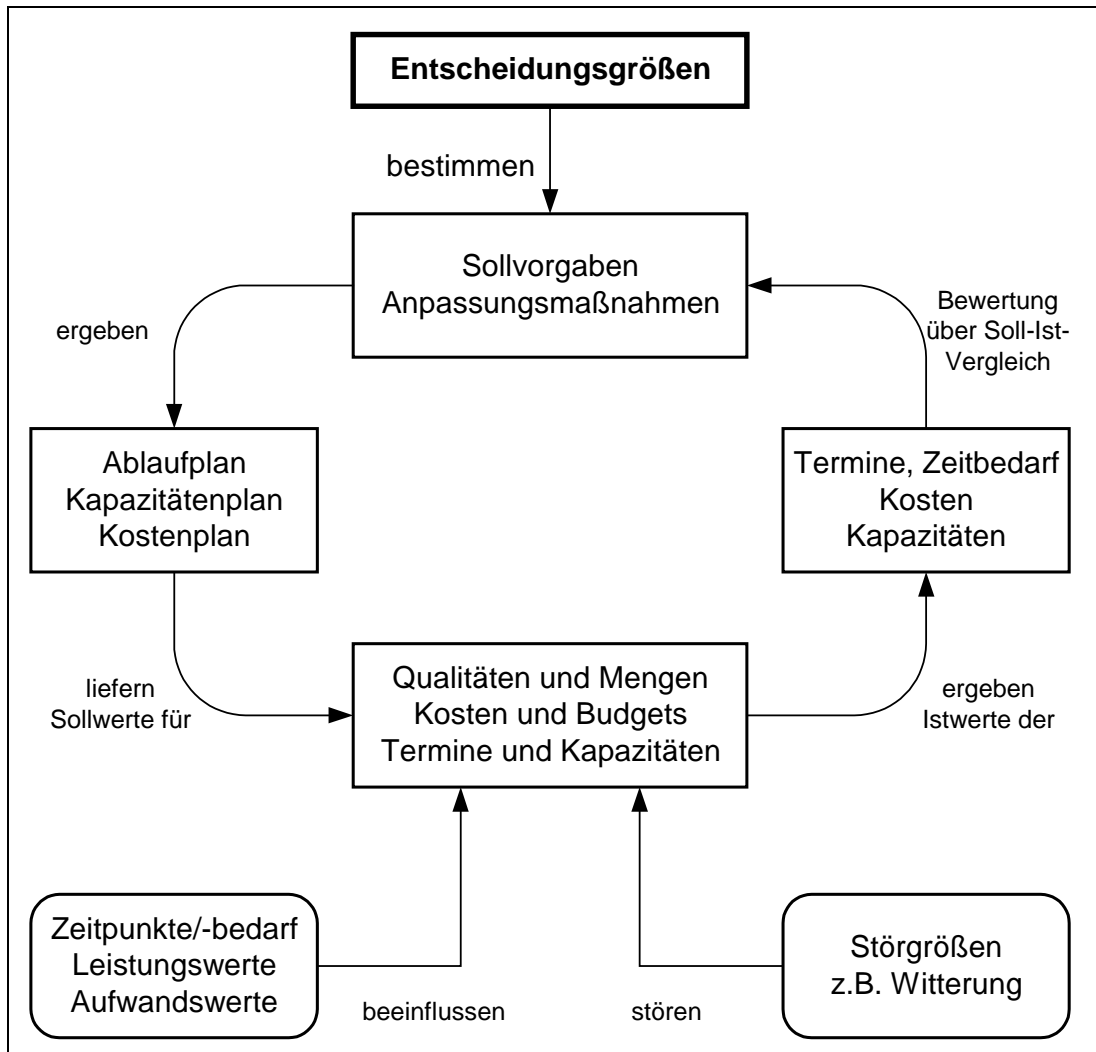


Abb. 3.11: Regelkreis des Projektcontrollings (verändert nach: Deutscher Verband der Projektsteuerer e.V. [9])

Durch die laufende Überprüfung des Projektes können Informationen über Abweichungen und deren Ursachen gewonnen werden. Bereits in der Phase der Sanierungsdurchführung sind Kontrollprozesse nach Abschluß von Teilen der Sanierung begleitend durchzuführen, um eventuelle Abweichungen aufzudecken und falls erforderlich steuernd eingreifen zu können.

Das Controlling sollte auf einer nach extern gerichteten und einer internen Ebene erfolgen. Beim **extern gerichteten Controlling** wird der Bearbeitungsfortschritt, die Bearbeitungsqualität und die Kostenkontrolle der beauftragten Sanierungsfirma überprüft. Die Qualität ist für den Controller insofern von Bedeutung, als daß das Sanierungsziel auf jeden Fall eingehalten werden muß. Eine Überschreitung der Grenzwerte zieht Nacharbeiten und Kosten nach sich und gefährdet ggf. sogar den Gesamterfolg des Projektes.

Die Basis für das **interne Controlling** stellen die Ablaufplanung und der Kostenplan dar. Da die eigenen Tätigkeiten nicht als Angebot mit einer Leistungsbeschreibung verfaßt sind, muß eine Rahmen-Checkliste ausgearbeitet werden, die ständig erweitert bzw. korrigiert wird. Sie wird nach Prioritäten aufgebaut und enthält den Zeitplan, die Sanierungsphasen, einzelne Aktivitäten und den Gesamtkostenplan.

Darüber hinaus hat das **Zeitmanagement** für die Einhaltung des Kostenplanes einer Sanierung eine wesentliche Bedeutung. Im Fall einer parallelen Durchführung einzelner Aktivitäten werden die dazu notwendigen Auszahlungen zu einem früheren Zeitpunkt als im Falle einer gestaffelten Durchführung vorgenommen und können so höhere Finanzierungskosten bedingen. Auf der anderen Seite kann eine verkürzte Gesamtdauer der Sanierung zu insgesamt reduzierten Auszahlungen führen. Gleichzeitig sind durch eine frühzeitige Nutzung des sanierten Geländes erhöhte Einzahlungen möglich. Somit stellt der Aufbau eines Zeitmanagement ein eigenes Problem dar, welches darin besteht, die ökonomischen Effekte der geplanten Projektabwicklung abzuschätzen und eine vorteilhafte zeitliche Koordination vorzunehmen. Defizite im Zeitmanagement können zu einer erheblichen Überschreitungen des geplanten Zeitrahmens und der angesetzten Soll-Werte führen.

Nach dem Ende der Sanierungs- und Nachsorgemaßnahmen wird für ein umfassendes Controlling eine **Abschlußdokumentation** mit entsprechender Bilanz empfohlen. In dieser Bilanz sollte die Aufhebung der Nutzungsbeschränkung als Steigerung des Verkehrswertes des sanierten Grundstückes berücksichtigt werden.

3.4.5 Literatur und Datenbank zum Thema ökonomische Bewertung

AHO-Fachkommission (1996): Untersuchungen für ein Leistungsbild und zur Honorierung für den Planungsbereich "Altlasten"; Schriftenreihe der AHO Nr.8

Bracke et al. (1995): Entwicklung einer Systematik zur Kostenermittlung bei der Altlastensanierung - KOSAL-; Umweltbundesamt, Texte 20/95, Berlin

Bunk, J. et al. (1999): Die Vergabe von Leistungen zur Altlastenbehandlung. In: ITVA [Hrsg.] altlasten spektrum 4/99, S. 211ff., Berlin

Deutscher Verband der Projektsteuerer e.V. (1994): DVP-Informationen Februar 1994, DVP-Verlag, Wuppertal

Fischer; Köchling; Nabert, (1999): Praxisratgeber Altlastensanierung Band 2, WEKA-Fachverlag für Techn. Führungskräfte, Augsburg

Hoffmann, J. und Viedt, H. (1998): Biologische Bodenreinigung: ein Leitfaden für die Praxis; Springer-Verlag, Berlin

Krabbe, E. (Hrsg.) (1992): Leitfaden zum Grundstudium der Betriebs-Wirtschaftslehre, Deutscher Betriebswirte-Verlag, Gernsbach

LAWA-Arbeitsgruppe (1998): Leitlinien zur Durchführung dynamischer Kostenvergleichsrechnungen (KVR-Richtlinien), Herausgeber: Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA), München

Lemser, B. und Tillmann, A. (1997): Wirtschaftlichkeit von Bodensanierungen: Ansätze zur ökonomischen Bewertung von Altlastensanierungen im privaten und öffentlichen Bereich, Erich Schmidt-Verlag, Berlin

Schierenbeck, H. (1993): Grundzüge der Betriebswirtschaftslehre, 11. Auflage, Oldenbourg Verlag GmbH, München

Wöhe, G. (1990): Einführung in die Allgemeine Betriebswirtschaftslehre, 17 Auflage, Verlag Franz Vahlen GmbH, München

Woll, A. (Hrsg.) (1992): Wirtschaftslexikon, Oldenbourg Verlag GmbH, München

3.5 Literatur

1. **ArbStättR.** 1989. Richtlinien des Rates vom 30. November 1989 über Mindestvorschriften für Sicherheit und Gesundheitsschutz in Arbeitsstätten veröffentlicht in ABI EG, Nr. L393, S. 1-12, Bezugsquelle DITR
2. **ArbStättV.** 1997. Verordnung über Arbeitsstätten (ArbStättV) Carl Heymanns Verlag KG.
3. **Alexander, M.** 1999. Biodegradation and Bioremediation. 2nd Edition. Academic Press, San Diego, USA.
4. **Alleman, B. C. und A. Leeson.** 1999. Proceedings from the Fifth International *In Situ* and *On Site* Bioremediation Symposium. Battelle Press, Columbus, OH.
5. **Baeder-Bederski, O., P. Kuschik, and U. Stottmeister.** 1999. Phytovolatilization of organic contaminants. In: S. Heiden, R. Erb, J. Warrelmann und R. Dierstein (Hrsg.). Biotechnologie im Umweltschutz. S. 175-183. Erich Schmidt Verlag, Berlin.
6. **Bargagli, R.** 1998. Phytoremediation of Metal-Contaminated Sites. In: Trace Elements in Terrestrial Plants, pp. 293-317. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
7. **Brox, G. H., W. R. Mahaffay, and B. S. Yare.** 1999. Soil Washing and Bioslurry Treatment – Cleanup of a Closed Industrial Site. In: B. C. Alleman und A. Leeson (Eds.). Proceedings from the Fifth International *In Situ* and *On Site* Bioremediation Symposium. Vol. 5: Bioreactor and *Ex situ* Biological Treatment Technologies, pp. 19-24. Battelle Press, Columbus, OH.
8. **Cunningham, S. D. und D. W. Ow.** 1996. Promises and prospects of phytoremediation. Plant. Physiol. 110, pp. 715-719.
9. **Deutscher Verband der Projektsteuerer e.V.** 1994. DVP-Informationen Februar 1994, DVP-Verlag, Wuppertal.
10. **DGG.** 1999. Hydrogeologische Modelle: Ein Leitfaden für Auftraggeber, Ingenieurbüros und Fachbehörden. Hrsg.: Fachsektion Hydrogeologie in der Deutschen Geologischen Gesellschaft. H. 10, Dt. Geologische Ges.

11. **DIN EN ISO 9000.** 1999. Qualitätsmanagementsysteme – Grundlagen und Begriffe, Beuth Verlag GmbH.
12. **EPA.** 1999. Use of Monitored Natural Attenuation at Superfund, RCRA Corrective Action, and Underground Storage Tank Sites. OSWER Directive 9200.4-17P.
13. **Felix, H.** 1999. Sanierung von schwermetallbelasteten Böden und Gewässern mit Pflanzen. In: S. Heiden, R. Erb, J. Warrelmann und R. Dierstein (Hrsg.). Biotechnologie im Umweltschutz. S. 154-165. Erich Schmidt Verlag, Berlin.
14. **Franzius, V.** 1993. Stand der Bodenreinigungsverfahren bei der Altlastensanierung. Umwelt Technologie Aktuell 6/93, GIT-Verlag, Darmstadt.
15. **Fritsche, W.** 1998. Umwelt-Mikrobiologie. Grundlagen und Anwendungen. Gustav-Fischer Verlag, Jena.
16. **Fritsche, W.** 1999. Abbau von Mineralölkohlenwasserstoffen und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen. In: S. Heiden (Hrsg.). Innovative Techniken der Bodensanierung. S. 22-41. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Berlin.
17. **Gallenkemper, B., A. Kötter und G. Janikowski.** 1999. Weiterführende Untersuchungen zur biologischen Ölschlammaufbereitung im Mietenverfahren und im Suspensionsreaktor. In: S. Heiden (Hrsg.). Innovative Techniken der Bodensanierung. S. 234-247. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Berlin.
18. **GDCh. 1996.** Leitfaden 'Erfolgskontrolle bei der Bodenreinigung. Arbeitskreis Bodenchemie und Bodenökologie der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie. Red.: W. Kördel, U. Müller-Wegener, H. Neumaier & K. T. von der Trenck. Monographie Bd. 4, Gesellschaft Deutscher Chemiker, Frankfurt a. M.
19. **GefStoffV.** 1999, Verordnung zum Schutz vor gefährlichen Stoffen, Carl Heymanns Verlag KG.
20. **Hansmann, K.** 1997a. TA-Luft. In: Hansmann, K. (Hrsg.). Bundesimmissionsschutzgesetz und ergänzende Vorschriften, Textausgabe mit Einführungen und Anmerkungen, 17. Auflage, Nomos Verlagsgesellschaft, Baden Baden.
21. **Hansmann, K.** 1997b. TA-Lärm. In: Hansmann, K. (Hrsg.). Bundesimmissionsschutzgesetz und ergänzende Vorschriften, Textausgabe mit Einführungen und Anmerkungen, 17. Auflage, Nomos Verlagsgesellschaft, Baden Baden.
22. **Henke, G. A.** 1998. Biologische Bodensanierung. In: G. A. Henke (Hrsg.). Altlastensanierung. Aus der Praxis für die Praxis. S. 35-46. Vulkan-Verlag, Essen.
23. **Hoffmann, J. und H. Viedt.** 1998. Biologische Bodenreinigung – Ein Leitfaden für die Praxis. Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg.
24. **Hufenreuter, G. und H. Tiefel.** 1995. Aufbereitungsanlage für kontaminierte Gleisschotter. DECHEMA-Jahrestagung 95, Tagungsband, S. 120-121, Wiesbaden.
25. **Hugo, A., M. Koch, H. Lindemann und H. Robrecht.** 1999. Altlastensanierung und Bodenschutz. Planung und Durchführung von Sanierungsmaßnahmen – Ein Leitfaden. Springer-Verlag, Berlin – Heidelberg.

26. **Hupe, K.** 1998. Optimierung der mikrobiellen Reinigung mineralölkontaminierter Böden in statischen und durchmischten Systemen. Hamburger Berichte Bd. 15., Verlag Abfall Aktuell, Stuttgart.
27. **ITVA.** 1994. Arbeitshilfe 'Mikrobiologische Verfahren zur Bodendekontamination'. FA H1, Ingenieurtechnischer Verband Altlasten, Berlin.
28. **ITVA.** 1997. ITVA-Preisspiegel zur Dekontamination von Böden. Altlastenspektrum 4: 191.
29. **Kappesser, S.** 1994. Mikrobiologische Sanierungsverfahren. In: K. Alef (Hrsg.). Biologische Bodensanierung. S. 187-225. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
30. **Karfusehr, G. & B. Müller-Schmidt.** 1998. Pneumatische Verfahren. In: G. A. Henke (Hrsg.). Altlastensanierung. Aus der Praxis für die Praxis. S. 69-78. Vulkan-Verlag, Essen.
31. **Kiehne, M. & R. Buchholz.** 1996. Der mobile Drehrohrreaktor zur kontinuierlichen, mikrobiellen Bodensanierung. In: R. Stegmann (Hrsg.). Neue Techniken der Bodenreinigung. Hamburger Berichte Bd. 10, S. 423-434. Economica Verlag, Bonn.
32. **Klein, J.** 1996. Empfehlungen zu Forschung und Entwicklung auf dem Gebiet 'Biologische Bodenreinigung'. Interdisziplinärer Arbeitskreis "Umweltbiotechnologie – Boden". DECHEMA, Frankfurt a. M.
33. **Knackmuss, H.-J.** 1999. Perspektiven der biologischen Elimination von Trinitrotoluol (TNT) und Begleitkontaminationen im Boden. In: S. Heiden (Hrsg.). Innovative Techniken der Bodensanierung. S. 42-57. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Berlin.
34. **Koenigsberg, S, C. Sandefur, and W. Cox.** 1997. The Use of Oxygen Release Compound (ORC[®]) in Bioremediation. In: B. C. Alleman and A. Leeson (Eds.). Proceedings from the Fourth International *In Situ* and *On Site* Bioremediation Symposium. Vol. 4, p. 247. Battelle Press, Columbus, OH.
35. **Koenigsberg, S. S. and W. A. Farone.** 1999. The Use of Hydrogen Release Compound (HRC[™]) for CAH Bioremediation. In: B. C. Alleman & A. Leeson (Eds.). Proceedings from the Fifth International *In Situ* and *On Site* Bioremediation Symposium. Vol. 2: Engineered Approaches for *In Situ* Bioremediation of Chlorinated Solvent Contamination, pp. 67-72. Battelle Press, Columbus, OH.
36. **Koerdel, W., K. Hund und W. Klein.** 1999. Erfassung und Bewertung von Mobilität und Bioverfügbarkeit bei der Beurteilung kontaminierter und gereinigter Böden. In: S. Heiden (Hrsg.). Innovative Techniken der Bodensanierung. S. 93-109. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Berlin.
37. **LAGA.** 1995. Anforderungen an die stoffliche Verwertung von mineralischen Reststoffen / Abfällen. Länderarbeitsgemeinschaft Abfall, hmb AmtlAnz 1995, 2210.
38. **LAWA-Arbeitsgruppe.** 1998. Leitlinien zur Durchführung dynamischer Kostenvergleichsrechnungen (KVR-Richtlinien), Herausgeber: Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA), München.

39. **Löser, C., H. Seidel, R. Fischer und U. Stottmeister.** 1999. Mikrobieller Kohlenwasserstoffabbau im Boden in Perkolationsystemen mit Prozeßsteuerung. In: S. Heiden (Hrsg.). Innovative Techniken der Bodensanierung. S. 117-135. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Berlin.
40. **LUA-Merkblatt Nr. 8.** 1997. Anforderungen an biologische Bodenbehandlungsanlagen nach dem Mietenverfahren. Red.: M. Odensaß & S. Schroers, Hrsg.: Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen, Essen.
41. **LfU-Handbuch.** 1991. Mikrobiologische Bodenreinigung. Red.: A. Geller, P. Werner, H.-J. Brauch & G. Berberich, Hrsg.: Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe.
42. **LfU-Handbuch.** 1995. Altlasten und Grundwasserschadensfälle: Hydraulische und pneumatische *in situ* Verfahren. Red.: D. Reiersloh, K. Rastetter, Hrsg.: Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe.
43. **Mann, V. G., C. Sinder, F. Pfeifer und J. Klein.** 1996. *Scale up* und Optimierung eines Suspensionsbioreaktors zur mikrobiellen Behandlung PAK-kontaminierter, bindiger Böden (DMT-BIODYN-Verfahren). In: R. Stegmann (Hrsg.) Neue Techniken der Bodenreinigung. Hamburger Berichte Bd. 10, S.435-446. Economica Verlag, Bonn.
44. **Meyer, O., R. I. Refae, J. Baumann, H. v. Reis, M. Langenbach, S. Abu-Issa, J. Warrelmann und W. Kohler.** 1997. Sanierungsverfahren am Modellstandort Eppelheim: Biologischer Abbau von leichtflüchtigen Schadstoffen in Wasser, Boden und Luft. In: C. Knorr & T. v. Schell (Hrsg.). Mikrobieller Schadstoffabbau. S. 297-333. Verlag Vieweg, Braunschweig/Wiesbaden.
45. **Michaelsen, M.** 1999. Biologische Bodensanierungsverfahren – Stand, Praxis und Möglichkeiten. In: S. Heiden, R. Erb, J. Warrelmann & R. Dierstein (Hrsg.). Biotechnologie im Umweltschutz. S. 132-138. Erich Schmidt Verlag, Berlin.
46. **Müller, R., C. Breidenbach und G. Hofmann.** 1996. Ist der Einsatz von speziell im Labor gezüchteten Mikroorganismen in der Bodensanierung sinnvoll? In: R. Stegmann (Hrsg.). Neue Techniken der Bodenreinigung. Hamburger Berichte Bd. 10, S.343-360. Economica Verlag, Bonn.
47. **Mysona, E. S. and W. D. Hughes.** 1999. Remediation of BTEX in Groundwater with LNAPL Using Oxygen Releasing Materials (ORM). In: B. C. Alleman & A. Leeson (Eds.). Proceedings from the Fifth International *In Situ* and *On Site* Bioremediation Symposium. Vol. 3: *In Situ* Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon and Other Organic Compounds, pp. 283-288. Battelle Press, Columbus, OH.
48. **Parthen, J.** 1992. Untersuchungen zur mikrobiologischen Sanierung von mit PAK verunreinigten feinkörnigen Böden im Drehtrommelreaktor. Dissertation, Universität Hannover.
49. **Race, S. L. and P. M. Goeke.** 1999. Study of Natural Bioremediation Projects Using Time-Release Oxygen Compounds. In: B. C. Alleman & A. Leeson (Eds.). Proceedings from the Fifth International *In Situ* and *On Site* Bioremediation Symposium.. Vol. 3: *In Situ* Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon and Other Organic Compounds, pp. 295-300. Battelle Press, Columbus, OH.

50. **Reinert, G., W. Lotz, J. Fiedler, T. Bauer, S. Heidingsfelder, T. Neese, U. Keller und R. Breiter.** 1999. "Trennschnitt 5 μm " für die Bodenwäsche – biologische Reinigung der Feinstfraktion. TerraTech 3/99, S. 49-51, Vereinigte Fachverlage, Mainz.
51. **Schmitz, H. J. und P. Andel.** 1997. Bodenbehandlungsanlagen: Die Jagd nach dem Boden wird härter. TerraTech 5/97, S. 17-31, Vereinigte Fachverlage, Mainz.
52. **Scholz, J., B. G. Müller, J. Schwedes und W.-D. Deckwer.** 1996. Verbesserung der mikrobiellen Bodenreinigung in Feststoffreaktoren durch Desagglomeration. In: Neue Techniken der Bodenreinigung. Hrsg.: R. Stegmann. Hamburger Berichte Bd. 10, S.411-422. Economica Verlag, Bonn.
53. **Scholz, J., B. G. Müller, J. Schwedes, and W.-D. Deckwer.** 1999. Conditions and Effects of Microbial Soil remediation in Solid-State Bioreactors. In: B. C. Alleman & A. Leeson (Eds.). Proceedings from the Fifth International *In Situ* and *On Site* Bioremediation Symposium. Vol. 5: Bioreactor and *Ex situ* Biological Treatment Technologies, pp. 155-160. Battelle Press, Columbus, OH.
54. **Schulz-Berendt, V.** 1999a. Marktsituation für die biologische Bodensanierung. In: S. Heiden (Hrsg.). Innovative Techniken der Bodensanierung. S. 110-116. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Berlin.
55. **Schulz-Berendt, V.** 1999b. Biologische Bodensanierung – Praxis und Defizite. In: H. Koehler, K. Mathes und B. Breckling (Hrsg.). Bodenökologie – interdisziplinär. S. 151-160. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
56. **Schuster, E und M. Blank-Huber.** 1994. Bodenwäsche und Biologie unter einem Dach. TerraTech 1/94, S. 42-45, Vereinigte Fachverlage GmbH, Mainz.
57. **Stolpmann, H., H. Lenke, J. Warrelmann, E. Heuermann, A. Früchtnicht, G. Daun & H.-J. Knackmuss.** 1995. Bioremediation of TNT-contaminated soil by the TERRANOX system. In: Biological Unit Processes for Hazardous Waste Treatment. Eds.: R. E. Hinchee, R. S. Skeen & G. D. Sayles, pp. 283-288. Battelle Press, Columbus, OH.
58. **Storhas, W.** 1994. Bioreaktoren und periphere Einrichtungen, Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden.
59. **Stottmeister, U.** 1997. Biologische Verfahren. In: Fachgruppe Wasserchemie in der GDCh (Hrsg.). Chemie und Biologie der Altlasten. S. 427-436. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
60. **Stottmeister, U., H. Seidel und P. Kuschk.** 1999. Mikrobielles Leaching und Remediation anorganisch kontaminierter Böden. In: S. Heiden (Hrsg.). Innovative Techniken der Bodensanierung. S. 58-75. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, Berlin.
61. **TBG.** 1997. Regeln für Sicherheit und Gesundheitsschutz bei der Arbeit in kontaminierten Bereichen (BGR 128, vormals ZH 1/183). 7. Ausgabe, Tiefbau-Berufsgenossenschaft, München.
62. **TBG.** 1996. Merkblatt für Fahrerkabinen mit Anlagen zur Atemluftversorgung auf Erdbaumaschinen und Spezialmaschinen des Tiefbaues (ZH 1/184). Ausg. 1. Tiefbau-Berufsgenossenschaft, München.

63. **Track, T. und D. Schenk.** 1998. Recherche über das Abbau- / Transformationsverhalten von 2,4,6-Trinitrotoluol, 2,4- & 2,6-Dinitrotoluol sowie den Entwicklungsstand von Sanierungstechnologien für Sprengstoffkontaminationen. Studie BMVBW.
64. **TRGS.** 1997. Technische Regeln für Gefahrstoffe (TRGS), Carl Heymanns Verlag KG.
65. **VbF.** 1997. Verordnung über Anlagen zur Lagerung, Abfüllung und Beförderung brennbarer Flüssigkeiten zu Lande (VbF), Carl Heymanns Verlag KG.
66. **VDI.** 1994. Beschränkung der Emission luftfremder Stoffe, Band 2 und Band 3. In: Handbuch zur Reinhaltung der Luft, Verein Deutscher Ingenieure, Düsseldorf
67. **VDI.** 1999. Emissionsminderung physikalisch-chemischer, thermischer und biologischer Bodenbehandlungsanlagen. Entwurf zur VDI 3898, Kommission Reinhaltung der Luft (KRdL) im VDI und DIN, Normenausschuss, Fachbereich Umweltschutztechnik, Köln.
68. **Vollmer-Heuer, G.** 1996. Mikrobiologische Bodensanierung im Bioreaktor. In: W.J. Bartz (Hrsg.) Mikrobiologische Bodensanierung – Planung, Genehmigung, Arbeitsschutz und Qualitätsmanagement bei mikrobiologischen Sanierungsmaßnahmen. Kontakt & Studium, Bd. 498, S. 101-111. Expert-Verlag, Renningen-Malmsheim.
69. **Walter, U., D. Fischer, J. Warrelmann, W. Heyser und G. A. Henke.** 1998. Anaerob / Aerob - Verfahren zur biologischen Behandlung sprengstoffkontaminierter Böden. TerraTech 3/98, S. 42-45, Vereinigte Fachverlage, Mainz.
70. **Warrelmann, J. und U. Walter.** 1997. Erprobung und Anwendung mikrobiologischer Verfahren bei der Sanierung von Rüstungsaltslasten. In: V. Franzius, E. Brandt und K. Wolf (Hrsg.). Handbuch der Altslastensanierung. 8. Erg.-Lfg., 5325, S. 1-18. C. F. Müller Verlag, Heidelberg.
71. **Wilhelm, V.** 1996. Einführung in die Thematik 'Mikrobiologische Bodensanierung'. In: W.J. Bartz(Hrsg.). Mikrobiologische Bodensanierung – Planung, Genehmigung, Arbeitsschutz und Qualitätsmanagement bei mikrobiologischen Sanierungsmaßnahmen. Kontakt & Studium, Bd. 498, S. 1-17. Expert-Verlag, Renningen-Malmsheim.
72. **Winterberg, R.** 1994. Bioreaktoren. In: Biologische Bodensanierung. Hrsg.: K. Alef. S. 215-225. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
73. **Winterberg, R., E. von Löw und T. Held.** 1998. Dynamisches Mietenverfahren zur Sanierung von Rüstungsaltslasten. TerraTech 3/98, S. 39-41, Vereinigte Fachverlage, Mainz.
74. **Woodhull, P. M. and D. E. Jerger.** 1995. Temperature Effects on Kinetics and Economics of Slurry-phase Biological Treatment. In: R. E. Hinchee, C. M. Vogel, and F. J. Brockman (Eds.). Biological Unit Processes for Bioremediation. pp. 289-295. Battelle Press, Columbus, OH.

4 Empfohlene Methoden bei der Qualitäts- und Erfolgskontrolle

André Dahn

Bei allen Stufen der Altlastenbearbeitung kommt es im Sinne der Qualitätssicherung darauf an, für jede Maßnahme einen adäquaten und angemessenen Bearbeitungsgrad einzusetzen. Das Zusammenwirken von einzelnen Leistungsträgern bei der Altlastensanierung ist entscheidend für dessen "Qualität" [36]. Die Qualitätssicherung bzw. Qualitätskontrolle ist erst auf Basis vorhandener Regelwerke bzw. Vorschriften/Festlegungen für einzelne Leistungen möglich. Daher zeichnet sich ein Projekt im Bereich der Sanierung durch folgende Qualitätsmerkmale aus:

- phasenweise Bearbeitung der Problemstellung unter stetiger Zielanpassung und Zielkontrolle bei klarer inhaltlicher Zieldefinition sowie
- eine qualitätsgerechte Projektdurchführung (eine eindeutige Projektorganisation mit transparenten Projektabläufen, -struktur, -zuständigkeiten, -controlling sowie Zusammenarbeit mit dem Auftraggeber und mit den Partnern) und
- eine qualitätsgerechte "Produktherstellung" bzw. nachvollziehbare, auswertbare und überprüfbare Ergebnisdarstellung.

Eine Erfolgskontrolle basierend auf diesen Prinzipien setzt so eine Projektkoordination voraus, die eine reibungslose Zusammenarbeit der Projektbeteiligten und eine einheitliche Vorgehensweise sowie einen reproduzierbaren Ablauf der Erprobung von mehreren Sanierungsverfahren ermöglicht. Darüber hinaus wird das Ziel verfolgt, die Maßnahmen der wissenschaftlichen Begleitung von der Probennahme bis zur Ergebnisbewertung einschließlich Berichterstellung entsprechend den gültigen Regelwerken [5; 31; 46; 47] bzw. den internen Projektfestlegungen nachvollziehbar zu dokumentieren. Im folgenden wird die Umsetzung dieser Ziele und Anforderungen während der maßstabsgerechten Erprobung von biologischen Sanierungsverfahren am Beispiel der Arbeiten im Verbundvorhaben 6 des Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung" dargestellt (s. Kap. 7). Die Abb. 4.1 zeigt einen prinzipiellen schematischen Zusammenhang der Anforderungen an die Qualitätssicherung.

Bei den folgenden Ausführungen wird davon ausgegangen, daß den betrachteten biologischen Bodenbehandlungen die erforderlichen und angemessenen Maßnahmen und Untersuchungen entsprechend der BBodSchV, Teil 2 bis 4 sowie Anhang 3 [5] vorausgegangen sind und daß die Sanierungsmaßnahme auf Grundlage eines Sanierungsplanes erfolgt.

Die dargestellten Maßnahmen beziehen sich primär auf die Begleitung von biologischen *Ex situ*-Verfahren. Dagegen verlangt die Spezifik der *In situ*-Verfahren zusätzlich kontinuierliche Kontrolluntersuchungen des Bodenwasserhaushaltes auf Grundlage einer ausgewogenen Bilanzierung zur Vermeidung des Wasseraustrages in die tieferen Bodenschichten, die für die hier betrachteten Verfahren nicht relevant sind.

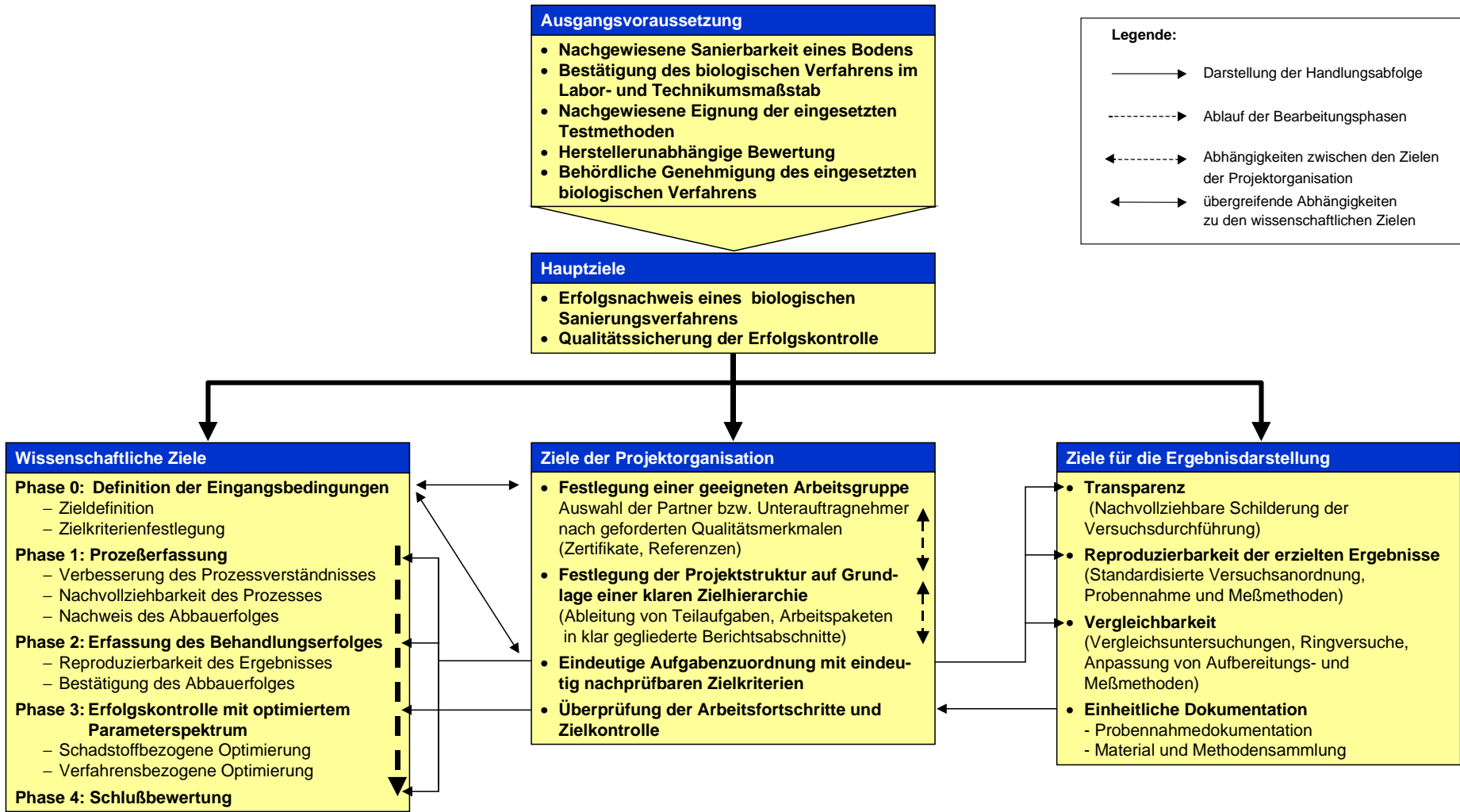


Abb. 4.1: Qualitätsmerkmale bei der Erfolgskontrolle im Rahmen der maßstabsgerechten Erprobung biologischer Verfahren

4.1 Chemische Analytik

4.1.1 Probennahme

Grundsätzlich unterscheiden sich die in Vorbereitung der chemischen Untersuchungen der Erfolgskontrolle erforderlichen Maßnahmen zur Probennahme, Probenvorbehandlung und Probenaufbereitung nicht wesentlich von denen, die bei der Erkundung der Altstandorte zum Einsatz kommen. Entscheidend ist, daß die Proben repräsentativ für die Erreichung der gestellten Ziele sind. Das Vorgehen bei der Probennahme, die nur von geschultem Personal erfolgen soll, richtet sich primär nach den Festlegungen des Bundesbodenschutzgesetzes [31; 5]. Für Detailfragen der Probennahme wird deshalb auf einschlägige Veröffentlichungen [5; 31; 46; 47] und insbesondere auf Empfehlungen der LABO/LAGA-Arbeitsgruppe "Qualitätssicherung bei der Altlastenbehandlung" verwiesen.

4.1.1.1 Grundsätzliche Arten der Beprobungen

Als Beprobungsarten im Rahmen der biologischen Verfahrenserprobung werden hier die Beprobungen für die chemische Analytik und für die ökotoxikologischen Untersuchungen verstanden. Im einzelnen sind folgende Beprobungsphasen unter Berücksichtigung der jeweilig spezifischen Zielsetzungen zu unterscheiden:

- **Voruntersuchungen**
Vergleichsuntersuchungen und Deklarierung des ausgekofferten und zu behandelnden Materials
- **Untersuchungen zum Behandlungsbeginn**
Untersuchungen des jeweiligen Ausgangsmaterials vor Beginn der Behandlung in den Mieten
- **Begleitende Untersuchungen (während der Behandlung)**
Festgelegte bzw. beauftragte Kontrolluntersuchungen (z. B. zwecks Nachweis des Abbaus, bei Notwendigkeit der Erfassung des Abbauprozesses, zur Durchsetzung des Arbeits- und Gesundheitsschutzes);
Anmerkung: Besondere Beachtung ist ggf. der Probennahme und Probenaufbereitung bei Behandlungsbeginn zu widmen (insbesondere beim Vorhandensein von biologisch aktivem Material, bei kurzfristigem Abbau).
- **Zwischenuntersuchung**
Untersuchung nach Abschluß der Bodenbehandlung, vor Auslagerung des Bodenmaterials
- **Enduntersuchung**
Ergänzende Untersuchungen nach Auslagerung und erfolgter Nachreife des Bodenmaterials o. ä. vor Wiedereinbau bzw. Verwertung.
- **ggf. Nachhaltigkeitsuntersuchungen**
Monitoring der Flächen, auf denen die Auslagerung des behandelten Bodenmaterials erfolgte.

4.1.1.2 Erforderliche Mindestinformationen für die Planung

Folgendes gilt als grundsätzliche Voraussetzung für die Erarbeitung eines Untersuchungsprogramms für die Erfolgskontrolle und einer qualitätsgerechten Probenahme entsprechend dem Bundesbodenschutzgesetz und der Bundesbodenschutz- und Altlastenverordnung sowie in Anlehnung an die Länderregelungen:

- Informationen zu **Standortgeschichte**, zum **Schadstoffspektrum**, zu **Altlastflächen** und **Bodeneigenschaften**, zu den **geologischen** und **hydrogeologischen Bedingungen**.

Dazu sind vorhandene Gutachten aus früheren Bearbeitungsphasen (Historische Erkundung, Orientierende Erkundung, Detailuntersuchung und Sanierungsuntersuchung) zu sichten bzw. auszuwerten.

- **Ortsbesichtigung**

Im Rahmen einer Ortsbesichtigung vor Beginn der Bodenauskoffierung sind wesentliche Randbedingungen zu ermitteln, wie z. B. Zugänglichkeit des Standortes für die Beprobungen, ggf. vorhandene Sicherungsmaßnahmen, geltende Sicherheitsfestlegungen, Angaben zu Ver- und Entsorgungsleitungen (Energie, Wasser u.ä.).

4.1.1.3 Grundsätzliche Festlegungen zur Planung

Nach Festlegung des relevanten Parameterspektrums für die Kontrolle und Begleitung der Bodenbehandlung ist zu jeder der vorgenannten Beprobungsphasen eine detaillierte Probenahme-strategie und Beprobungshäufigkeit unter besonderer Beachtung folgender Aspekte zu erstellen:

- Umfang des zu behandelnden Bodens,
- Schadstoffart,
- Schüttung des Haufwerkes,
- geplante Verwertung des behandelten Bodens und
- Umfang und Zuverlässigkeit der Daten/Vorkenntnisse über das zu behandelnde Material.

Im Ergebnis sind das Analytikprogramm und der Beprobungsplan zu erarbeiten und ggf. mit dem Auftraggeber abzustimmen (s. Kap. 4.4.4).

Beprobungsplan

Im Beprobungsplan sind Festlegungen zur horizontalen (Lage und Anzahl der Beprobungspunkte) sowie zur vertikalen Verteilung (Beprobungsteufe, Beprobungsintervall) der Probenahmepunkte sowie der Probenanzahl zu treffen. Spezielle Festlegungen betreffen die Probenahme und Probenhandhabung je nach Stand der Behandlung, die Probenlagerung und -konservierung vor Ort sowie den Probentransport, die Arbeitsschutzmaßnahmen und die Entsorgung des kontaminierten Materials.

Untersuchungsprogramm einschließlich Analysenplan

Die Analytikstrategie orientiert sich an der Historie der Altlastfläche, von der der Boden entnommen wurde, am bekannten (ggf. potentiellen) Schadstoffspektrum, am Behandlungsverfahren und den zu erreichenden Behandlungszielen. Besondere Bedeutung haben:

- Art und Menge der Bodenbestandteile (Bodenzusammensetzung),
- Hintergrundbelastungen, Begleitkontaminanten,
- eingesetzte Hilfsstoffe und
- die durch mikrobielle Metabolisierung bzw. chemische Umwandlungen entstehenden bzw. entstandenen Substanzen (Zwischen-/Nebenprodukte des Abbaus).

Schwerpunkt bildet eine zuverlässige Festlegung der zu ermittelnden (zu analysierenden) Parameter. Folgende Festlegungen sind zu treffen:

- Probenanzahl/-menge,
- Probenübergabe an das Labor einschließlich Transportbedingungen,
- Probenlagerung und -konservierung im Labor,
- Rückstellproben und
- Probenentsorgung.

Das Untersuchungsprogramm sollte zusätzlich Aussagen zu folgenden Aspekten enthalten:

- Art und Umfang des Einsatzes stationärer und mobiler Meßtechnik am Behandlungsstandort,
- Die Angaben zu den Meßverfahren bzw. Normvorschriften,
- Festlegungen zur Dokumentation der Analytikergebnisse (z. B. Lieferung von Chromatogrammen, Spektren), Forderungen zur Auswertung und Bewertung der Analyseergebnisse (evtl. Bilanzierungen),
- Entsorgung von nicht benötigtem bzw. untersuchtem Probenmaterial vor Ort und im Labor sowohl des kontaminierten als auch nicht kontaminierten Materials und
- Entsorgung von kontaminierter Schutzkleidung und den verwendeten Dekontaminationsmitteln.

Auf weitere Details wird in den folgenden Kapiteln eingegangen.

4.1.1.4 Durchsetzung des Arbeits- und Gesundheitsschutzes

Die Beprobung soll nur von geschultem Personal vorgenommen werden. Die Forderungen der ZH 1/183 [56] bzw. BGR 128 [3] sind umfassend und konsequent durch die Realisierung folgender Maßnahmen durchzusetzen:

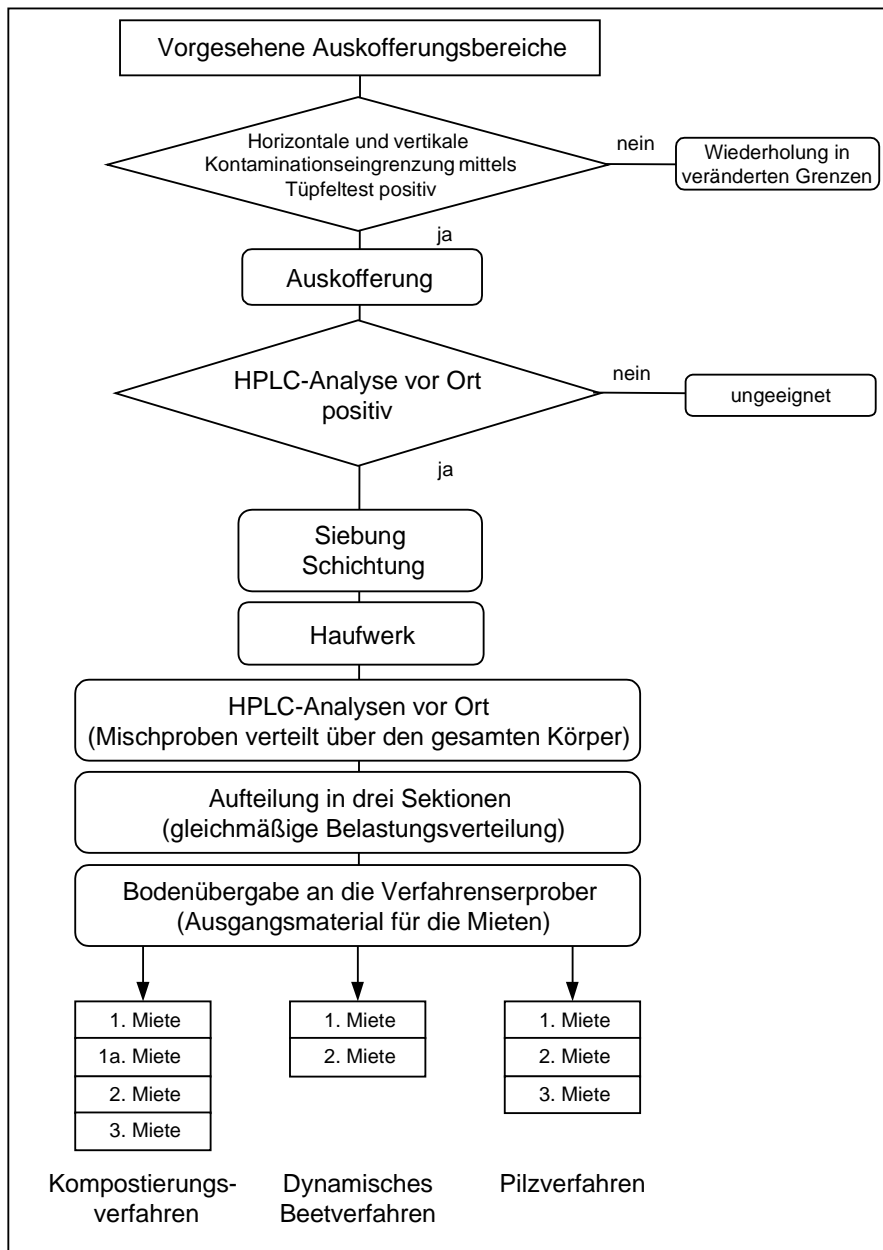
- Erarbeitung bzw. Präzisierung eines Arbeits- und Sicherheitsplanes,
- Erarbeitung der Betriebsanweisung(en),
- Bereitstellung erforderlicher persönlicher Ausrüstungen und
- Durchführung der festgelegten, nachweisbaren Belehrungen aller beteiligten Mitarbeiter.

4.1.1.5 Zusammenstellung eines repräsentativen Ausgangsmaterials

Zur Ermittlung und flächigen Kartierung der auszukoffernden Bereiche auf dem Werksgelände "Tanne" wurden Bodenproben vor und unmittelbar während der Auskoffierung genommen und

zur horizontalen und vertikalen Eingrenzung der Kontamination und damit der Auskoffergrenzen mittels Schnelltest verwendet.

Die Abbildung 4.2 verdeutlicht am Beispiel der Gewinnung von Ausgangsmaterial für die maßstabsgerechte Erprobung von drei verschiedenen biologischen Verfahren zur Sanierung TNT-kontaminierter Erde diesen Ablauf. Als Schnelltest wurde der Tüpfeltest für TNT (qualitativer TNT Nachweis) nach HAAS [33] verwendet.



**Abb. 4.2: Entscheidungs-
schema für die Gewinnung von Ausgangsmaterial** am Beispiel der maßstabsgerechten Erprobung von drei verschiedenen biologischen Verfahren zur Bodensanierung

4.1.1.6 Durchführung der Probennahme

Unter Berücksichtigung des Schadstoffspektrums sowie der relevanten Gefährdungs- bzw. Ausbreitungspfade sind zu beproben und zu untersuchen:

- Boden,
- Sickerwasser (soweit mit Anfall zu rechnen ist),
- Luft.

Besondere Beachtung besitzt die Führung der vollständigen und aussagekräftigen Probenahmeprotokolle (Beantwortung: Wer, wann, wo, was, wie?). In der Anlage befindet sich das Muster eines Probenahmeprotokolls, erstellt in Anlehnung an die Regelungen in der einschlägigen Literatur [5; 31; 46; 47] (s. Anlagen, Kap. 4.6). Gegebenenfalls sind Mindestangaben (obligatorische) und optionale Felder festzulegen.

Bei der Auswahl des Probennahmeverfahrens müssen eine repräsentative Probenahme und reproduzierbare Meßergebnisse gewährleistet werden. Wesentliche Auswahlkriterien sind:

- Aufgabenstellung und Ziel der Untersuchungen,
- enthaltene Stoffe und ihre Eigenschaften,
- Bodentyp/-eigenschaften (z. B. Korngröße, Wassergehalt),
- erforderliche Probenmenge und Güteklasse der Probe nach DIN 4021 [16],
- Aspekte der Arbeitssicherheit.

Vorrangige Aufschlußverfahren für die Beprobung des Haufwerkes sind die Handbohrung (Bohrstocksondierung), Kleinrammbohrung und Handschürfe.

Die Probepunkteverteilung einschl. Teufenorientierung ergibt sich aus der Schüttung des Haufwerkes, der Schadstoffart und aus den Festlegungen im Beprobungsplan. Soweit sich Änderungen notwendig ergeben (z. B. in Abhängigkeit vom Reaktionsverlauf), ist die Zustimmung des Erarbeiters des Beprobungsplanes einzuholen. Die Änderungen sind zuverlässig zu dokumentieren.

Zur Gewährleistung einer repräsentativen und für die Untersuchungen notwendigen Menge sind für die chemischen Analysen in der Regel etwa 250 ml bis 500 ml (d. h. ca. 0,5 bis 1 kg) Probenmaterial zu entnehmen. Für ggf. festgelegte Rückstellproben erhöht sich die Probenmenge entsprechend.

Im Einzelfall wird es notwendig sein, die Sickerwasserbildung und Luftzusammensetzung zu überwachen. Die hierzu notwendigen Probenahmen sind von der Bodenkontamination und dem Bodenreinigungsverfahren abhängig. Die Details (z. B. Probenahmeorte, Entnahmetechnik) sind in dem Beprobungsplan festzulegen.

4.1.2 Probenlagerung und -transport

4.1.2.1 Vor-Ort-Behandlung und Lagerung

Grundsätzlich ist anzustreben, daß das Probenmaterial umgehend in das Labor transportiert und einer zügigen Probenaufbereitung unterzogen wird. Die Schadstoffe in den entnommenen Proben unterliegen chemischen Veränderungen und biologischen Umsetzungen. In einer Behandlungsmiete hat dabei die jeweils erreichte Phase des Reaktionsablaufes eine besondere Bedeutung. Bei Proben von biologisch aktivem Bodenmaterial ist damit zu rechnen, daß weder die Konservierungsmaßnahmen noch das Tiefgefrieren die biologischen Prozesse unterbinden. In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse des Verbundvorhabens 4 "Ökotoxikologische Testbatterien" auch interessant (s. Kap. 4.2). Sollte eine sofortige chemisch-analytische Untersuchung im Labor nicht möglich sein, ist eine Probenkonservierung durchzuführen.

Physikalische Verfahren zur Probenkonservierung

Die Boden- bzw. Wasserproben sind sofort nach der Entnahme und auf dem Transportweg kühl (ca. 4 °C bis 6 °C) und dunkel zu lagern. Da weiterhin mikrobiologische Reaktionen in der Bodenmatrix ablaufen, sollte die Lagerzeit unter diesen Bedingungen bis zur Probenaufbereitung und Analyse einen Tag nicht überschreiten und dokumentiert werden. Eine deutliche Verlangsamung von Abbauvorgängen bei Bodenproben ist durch das Tiefgefrieren und Aufbewahren bei Temperaturen von ca. -18 °C bis -25 °C erreichbar.

Chemische Verfahren zur Probenkonservierung (für Wasserproben)

Soweit die Probenkühlung nicht ausreichend ist, kommt für Wasserproben eine chemische Konservierung durch Zugabe von Chemikalien in fester Form oder in Lösung zum Einsatz (saure Konservierung, alkalische Konservierung, Konservierung mit bestimmten Reagenzien). Veränderungen in der Probenmatrix können dabei jedoch im Einzelfall nicht ausgeschlossen werden.

Zusammenstellungen der bei der Bestimmung von anorganischen, organischen und Summenparametern empfohlenen Konservierungsmethoden (einschl. Hinweise auf einzusetzende Gefäße) befinden sich in dem Dokument "Probenbehandlung" und in der Schriftenreihe "Grundwasserüberwachungsprogramm" der LfU Baden-Württemberg [45]. Grundlage ist die Methodensammlung [6] unter Bezugnahme auf einschlägige DIN-Normen, insbesondere DIN 38405 [8] und DIN 38406 [9].

Falls eine sofortige analytische Untersuchung der Wasserproben nicht möglich ist, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, das Extraktionsmittel vor der Entnahme der Wasserproben im Probengefäß vorzulegen. Dadurch wird weitgehend vermieden, daß die Adsorption der Analyten an den Gefäßwänden erfolgt. Ein Nebeneffekt ist, daß während des Transportes schon ein großer Teil der zu analysierenden Spezies extrahiert wird. Die chemische Konservierung ist mit dem jeweiligem Labor abzusprechen.

Probentransport

Die Wasser- und Bodenproben sind kühl (bei 4 °C), dunkel und erschütterungsfrei zu transportieren. Als Hilfsmittel sind geeignete Kühlbehälter oder der Einsatz von Kühlaggregaten vorzusehen. Des weiteren ist bei leichtflüchtigen Proben darauf zu achten, daß durch den

Transport keine Ausgasung stattfinden kann. Im Regelfall wird es durch den Einsatz speziell gasdichter Probengefäße erreicht.

Luftproben sollten entweder im adsorbiertem Zustand (Aktivkohle, TENAX) oder in *Headspace-Vials* unter Lichtabschluß bei Raumbedingungen (ca. 20 °C) transportiert werden.

Aus der Gefahrgutverordnung Straße [29] ergeben sich grundsätzliche Hinweise zur Zuordnung der Stoffe zu Gefahrenklassen, zu den Verpackungen, zu den erforderlichen Sicherheitsvorkehrungen sowie zur Kennzeichnungspflicht und den mitzuführenden Begleitpapieren. Beim Transport explosivstoffhaltiger Proben sind ggf. die einschlägigen Festlegungen des Gesetzes über explosionsgefährliche Stoffe [30] in Verbindung mit seiner 1. Verordnung [26] zu beachten. Der Transport ist durch einen Probenbegleitschein (Muster siehe Anlage in Kap. 4.6.4) zu dokumentieren.

4.1.3 Probenaufbereitung

4.1.3.1 Analytische Untersuchungen im Labor

Für die analytischen Arbeiten sind die Festlegungen des Untersuchungsprogramms/Analyseplans verbindlich. Abweichungen sind nur nach Abstimmung mit dem Auftraggeber zulässig und zu dokumentieren.

Für die im folgenden genannten Arbeitsschritte gelten vollinhaltlich die Festlegungen der Bodenschutz- und Altlastenverordnung (BodSchV) vom 12.07.1999, Anhang 1, Teil 3 [5]:

- Probenauswahl und -vorbehandlung
- Extraktion, Elution
- Analysenverfahren

Für die Untersuchungen von rüstungsaltspezifischen Stoffen gelten folgende ergänzende Hinweise.

4.1.3.2 Aufbereitung von Bodenproben

Für eine Extraktion von sprengstofftypischen Verbindungen (STV) haben sich Acetonitril, Methanol und Diethylether bewährt, während für die Extraktion von kampfstofftypischen Verbindungen meistens *tert.*-Buthylmethylether, Dichlormethan oder Metylisobutylketon verwendet werden. Wenn es sich um hydrolyseempfindliche Substanzen handelt, muß der Bodenprobe vor der Extraktion wasserfreies Natriumsulfat zugesetzt werden.

4.1.3.3 Aufbereitung von Wasserproben

Für die Extraktion von STV-haltigen Wasserproben wird hauptsächlich die Extraktion mit Dichlormethan bevorzugt, obgleich es intensive Bemühungen gibt, dieses aus umweltrelevanten Gründen durch andere Extraktionsmittel zu ersetzen. Die Festphasenextraktion bietet eine Alternative zur gebräuchlichen Flüssig-Flüssig-Extraktion. Wegen ihres geringeren Lösungsmittelbedarfs wird sie auch in zunehmenden Maße genutzt [12].

4.1.4 Analysenmethoden, -zuverlässigkeit, -reproduzierbarkeit

Die Repräsentativität der Analysen bei der maßstabsgerechten Erprobung am Standort "Werk Tanne" wurde durch die interne und externe Qualitätssicherung der zertifizierten und akkreditierten Untersuchungsstellen gewährleistet. Vor Beginn der Untersuchungen wurden die Analysenvorschriften definiert. Mit einer festgelegten Dokumentation unter Beachtung der Regelungen in der DIN 32645:05.94 [7] wurde die Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der Analysen ermöglicht. Die Absicherung der Ergebnisse (HPLC-DAD, GC, GC-MS) erfolgte über die Retentionszeiten und den Vergleich der Spektren mit den Spektren aus spezifizierten Stoffdatenbanken.

Im Rahmen des Verbundvorhabens 6 wurden neben sprengstofftypischen Verbindungen (STV) die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK), Schwermetalle sowie polare Nitroverbindungen (Aminodinitrobenzoesäuren, Aminodinitrobenzylalkohole, Trinitrobenzoesäure, Trinitrobenzylalkohol und Dinitrophenol) analysiert. Darüber hinaus wurden zur umfassenden Charakterisierung des Bodenmaterials pH-Wert, organischer Kohlenstoffgehalt, Trockenmasse sowie Korngrößenverteilung und Wasserhaltekapazität bestimmt.

Für die Bestimmung von sprengstofftypischen Verbindungen wurden Vergleichsuntersuchungen, ähnlich Ringversuchen, zwischen den im Verbundvorhaben 6 beteiligten Labors durchgeführt (s. Kap. 4.4).

4.1.5 Dokumentation in der Erfolgskontrolle

Als Grundlage für die Qualitätssicherung der Einzelmaßnahmen und Untersuchungen wurde prinzipiell einheitliches Vorgehen festgelegt und mit der erarbeiteten Dokumentation möglichst lückenlos, zuverlässig und nachweislich dokumentiert.

Folgende Unterlagen wurden auf Basis des Beprobungs- und Analytik-/Testplanes für die Probennahme sowie für die chemischen und ökotoxikologischen Untersuchungen erarbeitet:

1. Probennahmeprotokolle
2. Probenbegleitscheine
3. Prüfberichte (einschließlich Analysenprotokolle bzw. Testerberichte).

Hinweise zu den Verantwortlichkeiten für die Erstellung der Dokumente sowie den erforderlichen Bestätigungen bzw. Mitzeichnungen sind in Kap. 4.6 (Anlagen) enthalten. Für die Erarbeitung einer einzelfallbezogenen Dokumentation sind die geltenden Richtlinien und Vorschriften zu berücksichtigen [31; 46; 47].

4.2 Biologische Testverfahren

Susanne Fleischmann

Ohne die Mitarbeit der Mitglieder des Verbundvorhabens 4 "Ökotoxikologische Testbatterien" hätten Kapitel 4.2.1 und 4.2.2 nicht in dieser Form entstehen können. Besonderer Dank gilt Prof. Dr. R. ACHAZI, Dr. A. EISENTRÄGER, Frau Dr. K. HUND-RINKE, Dr. W. KALSCH, Dr. W. KÖRDEL, Dr. W. PAULI, Dr. F. PFEIFER, Dr. J.-P. RILA, Dr. J. RÖMBKE, Dr. C. TEBBE, Prof. Dr. Dr. B.-M. WILKE, Frau B. WINKEL.

Ziel von Bodensanierungen im Sinne des BBodSchG ist eine dauerhafte Gefahrenabwehr. Der Sanierungserfolg muß deshalb durch Untersuchungen zur Nachhaltigkeit der Sanierung bestätigt werden. Konventionelle Untersuchungen sind oft auf chemische Analysen begrenzt. Wird das Endprodukt einer Bodensanierung in die Umwelt ausgebracht oder soll es sogar als Lebensraum dienen, sollte die Erfolgskontrolle jedoch durch eine (öko-)toxikologische Bewertung des Endprodukts ergänzt werden. Biologische Testverfahren lassen sich vielfältig zur ökotoxikologischen Beurteilung von Böden und Bodenmaterialien einsetzen. Schwerpunkt der folgenden Ausführungen ist der Einsatz ausgewählter Tests zur Erfolgskontrolle von Bodensanierungen.

Sowohl die Eignung der hier empfohlenen Testsysteme zur (öko-)toxikologischen Beurteilung von Böden und Bodenmaterialien als auch die Interpretierbarkeit und Aussagekraft der Bewertungsstrategie wurden im Rahmen des Verbundvorhabens "Ökotoxikologische Testbatterien" anhand zahlreicher Bodenproben eingehend überprüft bzw. validiert. Die Methoden werden eingehend später beschrieben (s. Kap. 9.3).

4.2.1 Probennahme, -transport und -vorbehandlung

4.2.1.1 Probennahme und Transport von Boden

Grundsätzlich gelten hinsichtlich der Probennahme und des -transportes die Festlegungen der Kap. 4.1.1 und 4.1.2 analog. Die Abweichungen betreffen lediglich die Menge des Probenmaterials, die in Folge die Wahl der Entnahmetechnik beeinflusste. Statt Handbohrungen wurden Proben durch mehrere Schürfe, verteilt über die Mietenfläche und -tiefe, gewonnen. Diese wurden dann zum Mischprobenmaterial vermengt. Je nach Untersuchungsumfang betrug die Probenmenge bis zu 200 kg. Darüber hinaus erfolgte in gleicher Weise die Probennahme von Null-Proben aus den nachweislich nicht kontaminierten Bereichen des Standortes, die bei den ökotoxikologischen Tests zur Durchführung von Kontroll-Untersuchungen verwendet wurden.

Die Dokumentation der Probennahme, des Probentransportes und der Probenlagerungsbedingungen wurde in Anlehnung an die entsprechende Dokumentation der Probennahme für die chemische Analytik modifiziert (s. Kap. 4.6, Anlagen).

4.2.1.2 Lagerung, Transport, Konservierung von Boden

Eine Lagerung von mit organischen Schadstoffen belasteten Proben ist möglichst zu vermeiden, da immer Schadstoffverluste durch Lagerung auftreten (s. Kap. 9.3.8). Sollte dennoch eine Lagerung notwendig sein, sollte sie die durch die jeweiligen Testverfahren vorgegebenen Zeiträume unter definierten Bedingungen nicht übersteigen (s. Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Art und maximale Dauer der Probenlagerung [42]

Lagerungs-Höchstdauer		Biologische Untersuchungen		
Eluatuntersuchungen		Pflanzentest	Bodenbiozönose	mikro-biologische Tests
Eluat	Boden			
7 d bei 4 °C, sonst unverzögerlich einzufrieren	unverzögerliche Eluatherstellung nach Proben- vorbereitung	3 Monate bei 4 °C	3 Monate bei 4 °C	1 Monat bei 4 °C (eventuell 3 Monate bei 4 °C)

Die Probengeschichte ist exakt zu dokumentieren, um den Einfluß der Probenlagerung auf die Testbefunde interpretieren zu können. Werden Bodenproben längere Zeit gelagert, muß eine zusätzliche Schadstoffbestimmung direkt vor Testdurchführung eingeplant werden.

4.2.1.3 Vorbereitung von Bodenproben

Böden/Bodenmaterialien für den Einsatz in Testbatterien sollten möglichst zentral vorbereitet werden. Die Erfahrungen des Verbundvorhabens 4 "Ökotoxikologische Testbatterien" zeigten, daß eine Siebung auf 2 cm mit nachfolgender Homogenisierung mittels Riffelteiler (mechanisches Probenmischgerät) zu zufriedenstellender Probenhomogenität führt. Es ist dabei nicht vermeidbar, daß leichtflüchtige Schadstoffanteile verloren gehen.

Zur Herstellung von Bodeneluaten s. Kap. 9.3.5 Teil A. Prinzipiell gelten für die Vereinheitlichung der Eluatherstellung für aquatische Tests folgende Eckdaten:

- Massenverhältnis Boden + Wasser (deion.) = 1 + 2, bezogen auf Bodentrockengewicht, das in der Probe vorliegende Wasser soll berücksichtigt werden.
- Ausschütteln für 24 h.
- Zentrifugation bei $2.100 \times g$ für 20 min. mit anschließender Filtration über Glasfaser-mikrofilter ($< 0,45 \mu\text{m}$), die Trübung soll < 50 FNU sein, wird die Trübung nicht erreicht, Zentrifugation bei höherer Umdrehungszahl (Vorschlag: Sorvall: $20.000 \times g$ für 1 h).
- Für die analytische Bestimmung des bioverfügbaren Schadstoffanteils sollte die Trübung < 10 FNU sein.

4.2.1.4 Probennahme von Human- und Luftproben

Die Probennahmezeitpunkte richten sich nach dem Behandlungsfortschritt. Wenn möglich wird vorweg eine Null-Probe (d. h. ohne Exposition) genommen. Vor Beginn werden alle ProbandInnen zur jüngsten Arbeitsanamnese standardisiert befragt. Zur Beurteilung des Allgemeinzustandes wird ein standardisiertes, klinisch-chemisches Untersuchungsprofil mitbestimmt.

Die Probennahme exponierter MitarbeiterInnen ist in der Regel zum Schichtende nach Beendigung eines Arbeitsabschnittes durchzuführen. In der Regel werden Blut und Urin am selben Tag abgenommen bzw. abgegeben. Zusätzlich werden Vergleichsproben von nicht belasteten Arbeitnehmern des Tiefbaus gezogen (n = 30). Eine Beschreibung der Probennahme ist in [49; 50; 51; 52] enthalten.

Der Weitertransport der Proben muß im gekühlten Zustand erfolgen. Entweder noch am selben Tag, spätestens am Folgetag sollten die Proben an ihrem Bestimmungsort sein.

Für die Gewinnung von Luftproben werden *personal airsampler* (PAS) verwendet. Es sind keine Passivsammler zu verwenden.

4.2.1.5 Aufbereitung der Human- und Luftproben

Die Aufbereitung der Proben ist in [34; 49; 50; 51; 52] beschrieben.

4.2.2 Ökotoxikologische Tests

Voraussetzung für die ökotoxikologische Bewertung sanierter Bodenmaterialien ist die umfassende Charakterisierung des Materials anhand der chemisch-physikalischen Parameter. Die Einflüsse des jeweiligen Sanierungsverfahrens sind zu berücksichtigen. Für die abschließende Interpretation der ökotoxikologischen Befunde muß unterschieden werden in:

- Verfahren, die die bodenspezifischen Eigenschaften des Materials nicht wesentlich ändern und
- Verfahren, deren Endprodukt erheblich vom ursprünglichen Bodenmaterial abweicht (z. B. durch den Einfluß von Zuschlagstoffen).

Für repräsentative Aussagen zur Ökotoxizität ist es notwendig, Testorganismen der verschiedenen betroffenen taxonomischen und trophischen Gruppen auszuwählen sowie verschiedene Ökotoxizitätsgruppen einzubeziehen (z. B. akute, chronische Toxizität, Genotoxizität (s. Kap 4.2.4). Im Verbundvorhaben "Ökotoxikologische Testbatterien" wurden folgende Testverfahren eingehend untersucht (s. Tab. 4.2).

Tab. 4.2: Ausgewählte Testverfahren für ökotoxikologische Testbatterien (Genotoxizität s. Kap. 4.2.4)

Gruppe	Testsystem	Testorganismus	Standardisierung
Rückhaltefunktion - Tests mit Bodeneluat			
"Aquatische Tests"	Algen-Zellvermehrungshemmtest	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	DIN 38412-33 [12]
	Daphnien-Kurzzeitest	<i>Daphnia magna</i>	DIN 38412-30 [11]
	Leuchtbakterientest (Lumineszenz)	<i>Vibrio fischeri</i>	DIN EN ISO 11348 [17]
	Leuchtbakterien-Zellvermehrungshemmtest	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	DIN 38412-37 [13]
	ToxiChromoPad-Test	<i>Escherichia coli</i>	[43]
Lebensraumfunktion - Tests mit Boden			
Pflanzen	akuter Pflanzenwachstumshemmtest	<i>Avena sativa, Lepidum sativum</i>	ISO 11269-2 (mod.) [20]
	chronischer Pflanzenwachstumshemmtest*	<i>Avena sativa, Brassica rapa</i>	ISO/TC 190/SC4/WG3N58 [40]
Mikroorganismen	Bodenatmungskurven	Bodenmikroflora	ISO/TC 17155 Entwurf [39]
	potentielle Nitrifikation	ammoniumoxid. Bakterien	ISO/CD 15685 [38]
	Reporterbakterien*	gentech. veränderte Bakterien	
	ToxiChromoPad-Test	<i>Escherichia coli</i>	[43]
Bodeninvertebraten	Collembolentest	<i>Folsomia candida</i>	DIN ISO 11267 (mod.) [18]
	Enchytraeentest	<i>Enchytraeus crypticus</i>	ISO WD 16387 (mod.) [37]
	Regenwurmtest	<i>Eisenia fetida</i>	DIN ISO 11268-1+2 [19]
	Test mit Bodenprotozoen*	Bodenciliaten	

* Tests in Entwicklung

4.2.2.1 Testdurchführung und Ergebnisbewertung

Die Auswahl der zu prüfenden Bodenfunktionen zur **Erfolgskontrolle** von Sanierungen kann sich an der zukünftigen Nutzung der sanierten Böden/Bodenmaterialien orientieren [42], um unverhältnismäßige Untersuchungskosten zu vermeiden (Tab. 4.3). Werden z. B. (inerte) Unterböden *in situ* saniert, ist eine Folgenutzung als Oberboden mit Lebensraumfunktion für Pflanzen und Bodentiere i.d.R. nicht vorzusehen, entsprechende Testverfahren entfallen dann.

Tab. 4.3: Auswahl geeigneter Testverfahren in Abhängigkeit von der geplanten Nutzung (nach [42], verändert)

Bodennutzung	Bodenfunktionen		
	Rückhaltefunktion Wasserpfad	Lebensraumfunktion Pflanzenstandort	Bodenbiozönose
Böden	Prüfung einer biologischen Wirksamkeit		
1 unter versiegelten Flächen	nein*	nein	nein
2 nicht versiegelte, gewerblich genutzte Flächen	ja	nein	nein
3 Deponieabdeckung	ja	(ja)	nein
4 Grün-, Park- und Freizeitflächen	ja	(ja)	(ja)
5 Flächen mit gärtnerischer oder landwirtschaftlicher Nutzung	ja	ja	ja
Biologische Testsysteme	aquatische Tests	terrestrische Tests	

* gilt nur für den Bereich der ungesättigten Bodenzone
 () nur qualitative Testauswertung, ggf. Einzelfallentscheidung

Nutzung 1: Wird ein (saniertes) Material so eingebaut, daß es mit der Umwelt nicht in Wechselwirkung tritt (z.B. unter versiegelten Flächen ohne Grundwasserkontakt), kann auf ökotoxikologische Testverfahren verzichtet werden. Ein Screening der potentiellen Toxizität eines solchen Materials wird aber dennoch empfohlen, um zukünftige Folgenutzungen planen zu können.

Nutzung 2-5: Soll saniertes Material wieder eingebaut oder als durchwurzelbare Bodenschicht eingesetzt werden, erweitert sich entsprechend der geplanten Nutzung das Spektrum der anzuwendenden Tests. In einem 1. Schritt wird eine Testbatterie mit Eluattests (ggf. Genotoxizitätstests eingeschlossen) durchgeführt und in folgenden Untersuchungen in einem 2. Schritt durch "terrestrische" Testverfahren ergänzt (s. Abb. 4.3).

1. Schritt: Tests mit Bodeneluaten

Besondere Bedeutung hat die über den Wasserpfad mobilisierbare Fraktion der Schadstoffe. Sie kann nicht nur mit dem Sickerwasser ausgewaschen werden und das Grund- bzw. Trinkwasser kontaminieren, sondern weist auch das höchste akute Wirkpotential für Mikroorganismen, Pflanzen und Bodentiere auf. Die ökotoxikologische Überprüfung sanierter Bodenmaterialien sollte deshalb mit Testverfahren an Bodeneluaten beginnen (Herstellung der Eluate: s. Kap. 9.3.5 Teil A), um die Rückhaltefunktion zu beurteilen. Empfohlen wird eine Batterie an aquatischen Biotests und ggf. Genotoxizitätstests. Wird hier bereits ein erhöhtes ökotoxikologisches Potential festgestellt, kommt aus Gründen des Grundwasserschutzes ein Wiedereinbau auf unversiegelten Flächen nicht in Frage. Weitere Testverfahren zur Lebensraumfunktion können dann entfallen. Siehe dazu Abb. 4.3.

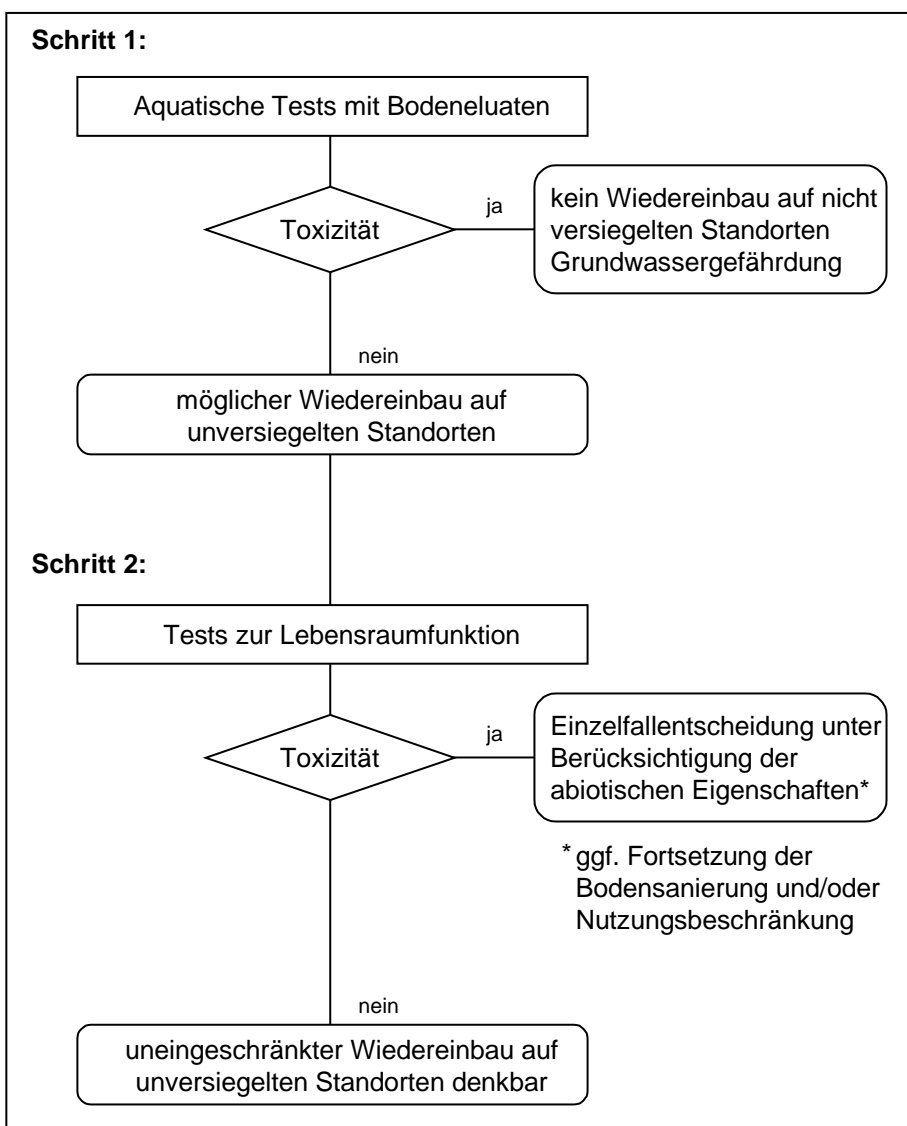


Abb. 4.3: Anwendung ökotoxikologischer Testverfahren zur Erfolgskontrolle von Bodensanierungen

Sind die untersuchten Bodeneluatete toxikologisch unbedenklich und ist somit das Risiko für einen Schadstoffaustrag in das Grundwasser gering, ist unter Beachtung der vorgesehenen Bodennutzung (Tab. 4.4) prinzipiell ein unversiegelter Wiedereinbau des Materials möglich. Die Risikoabschätzung bezüglich der Bodenrückhaltefunktion erfolgt in Anlehnung an die Empfehlungen der DECHEMA [42].

Tab. 4.4: Beurteilung der Rückhaltefunktion (nach [42], verändert)

Ergebniskombinationen der aquatischen Testsysteme				Gefahr von Schadstoff-austrag	Einbau-empfehlung unversiegelt
Algen [2]	Daphnien [1]	Leuchtbakterien			
		Lumineszenz [4]	Wachstum [3]		
-	-	-	-		ja
-	-	+ $G_L = 3 - 8$	-		
+	-	-/+	n. e.	gegeben	nein*
-	+	-/+	n. e.		
+	+	+	n. e.		
-	-	+ $G_L > 8$	n. e.		
-	-	+ $G_L = 3 - 8$	+		

- = kein Effekt; $G_{A,D} \leq 4$ oder $G_{LW} \leq 2$
- + = $G_{A,D} > 4$ oder $G_{LW} > 2$
- n. e. = nicht erforderlich
- * = weitere Untersuchungen erforderlich

Sowohl die Einsetzbarkeit der empfohlenen Testsysteme zur Untersuchung von Bodeneluatn als auch die Interpretierbarkeit und Aussagekraft der Bewertungsstrategie wurden im Rahmen des Verbundvorhabens "Ökotoxikologische Testbatterien" anhand zahlreicher Bodenproben eingehend überprüft bzw. validiert. Für eine sichere und umfassende Bewertung der Bodenrückhaltefunktion ist der Einsatz einer Testbatterie prinzipiell sinnvoll und wünschenswert. Es ist jedoch anhand der konkreten Vorgaben und Bedingungen im Einzelfall zu entscheiden, ob die Durchführung aller empfohlenen Tests notwendig erscheint. Eine praktikable Untersuchungsstrategie kann z. B. darin bestehen, im Sinne eines Screening zunächst den Leuchtbakterientest durchzuführen, welcher bei G_L -Werten > 8 i.d.R. eine eindeutige Bewertung zulässt. Bei derartigen Ergebnissen können weitere ökotoxikologische Tests zur Bewertung der Rückhaltefunktion entfallen.

2. Schritt: Terrestrische Tests zur Lebensraumfunktion

Soll saniertes Material als Lebensraum für Pflanzen und Bodenorganismen dienen, ist eine Überprüfung der Lebensraumfunktion notwendig. Auch hier richtet sich der Umfang des Testprogramms nach der geplanten Folgenutzung. Je nach toxikologischem Befund (Tab. 4.5) müssen dann in Einzelfallentscheidungen Nutzungsbeschränkungen festgelegt werden. Zur Genotoxizität siehe Kapitel 4.2.4. Sind alle Befunde unbedenklich, ist eine uneingeschränkte Verwendung des Materials möglich. Die Abb. 4.4 zeigt den Einsatz terrestrischer Tests.

Tab. 4.5: Ausgewählte Bewertungskriterien zur Bodentoxizität für terrestrische Tests (Legende siehe nächste Seite)

Bodenfunktion/Testsystem	Bewertungskriterium	Bewertungsgröße
Akut- bzw. Kurzzeittests		
<u>Lebensraumfunktion Pflanzen</u>		
akuter Pflanzenwachstumshemmtest	Hemmung der 50 %+ 50 % Mischung des Bodens mit Boden bekannt guter Qualität	$M_g + SD_{Mg} < 0,9 \times M_b^{(3)}$
<u>Lebensraumfunktion Mikroorganismen</u>		
Bodenatmungskurven	Q_R lag-time	> 0,3 > 20 h
pot. Nitrifikation	Hemmung der 50 %+ 50 % Mischung des Bodens mit Boden bekannt guter Qualität	$M_g + SD_{Mg} < 0,9 \times M_b^{(3)}$
Reporterbakterien*	Test noch in Entwicklung	
<u>Lebensraumfunktion Bodeninvertebraten</u>		
Collembolentest	Reduktion der Überlebensrate im Vergleich zur Kontrolle	> 20 %
Enchytraeentest		
Regenwurmtest⁽²⁾		
Reproduktions- bzw. Langzeittests		
Test mit Bodenprotozoen*	Hemmung der Excystierung	> 30 %
chronischer Pflanzenwachstumshemmtest*	Hemmung im Vergleich zur Kontrolle ⁽¹⁾	> 50 %
Collembolentest	Reduktion der Reproduktionsrate im Vergleich zur Kontrolle	> 50 %
Enchytraeentest		
Regenwurmtest		
Test mit Bodenprotozoen*	Hemmung der Zellvermehrung	> 30 %

Tab. 4.5: Legende

- * Test in Entwicklung
- (1) Der Kontrollboden sollte nährstoffarm sein. Ist der Kontrollboden zu nährstoffreich, wird in vielen Testböden eine über 50 %ige Hemmung auftreten, die lediglich auf Unterschieden im Nährstoffgehalt beruht
 - (2) Verringerung der tolerierbaren Abweichung in Abhängigkeit von der Wahl der Kontrollböden denkbar
 - (3) M_g Biomasse der Mischung, gemessen
 SD_{Mg} Standardabweichung der Testergebnisse
 M_b : berechnete Biomasse = $0,5 \times (\text{Biomasse bekannter Boden} + \text{Biomasse Testboden})$
 0,9: empirisch bestimmter Faktor

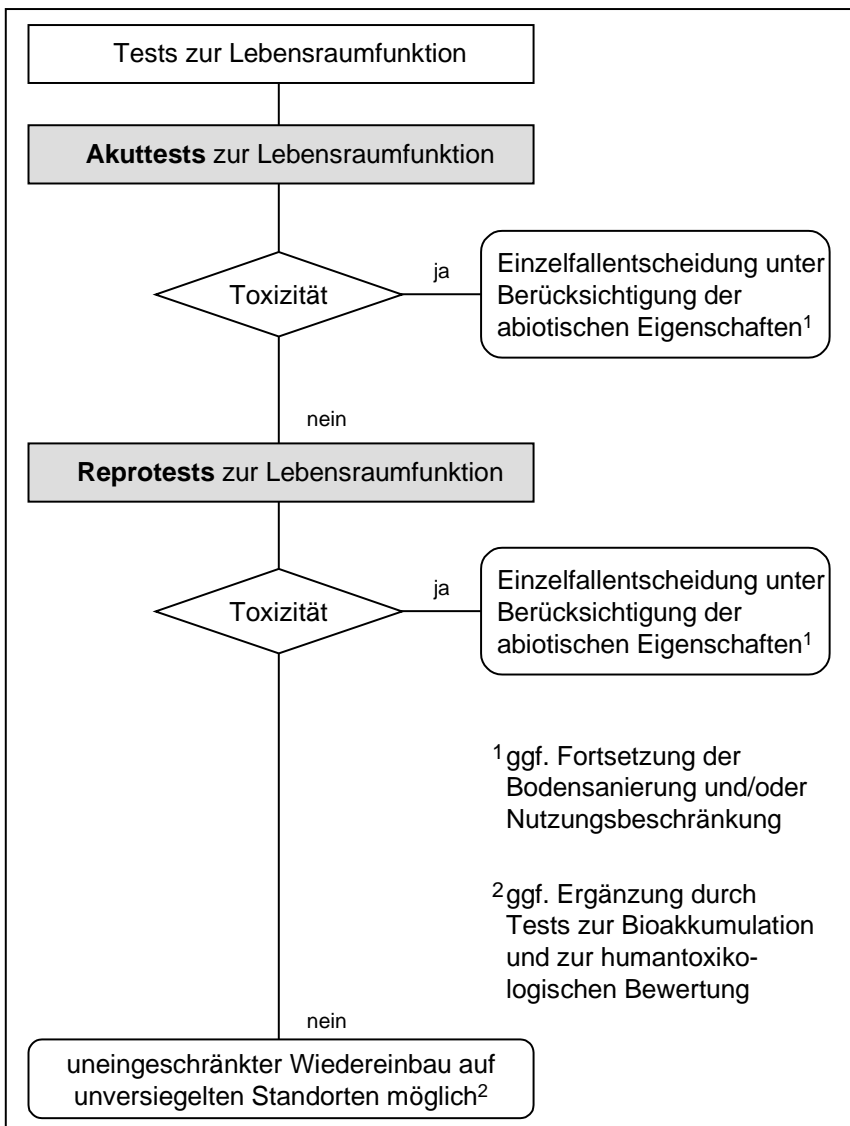


Abb. 4.4: Anwendung terrestrischer Testverfahren zur Erfolgskontrolle von Bodensanierungen

Die uneingeschränkte Freigabe eines sanierten Bodens für sensible Nutzungen wird prinzipiell nicht angestrebt. Um eine potentielle Gefährdung durch Restschadstoffe und Metabolite auszuschließen, sind hier neben den Testverfahren zur aquatischen und terrestrischen Ökotoxizität auch Testverfahren zur Bioakkumulation und deren humantoxikologische Bewertung unbedingt notwendig.

4.2.2.2 Hinweise zur Anwendung der untersuchten Testverfahren

Die Testdurchführungen der einzelnen Testverfahren sind in Kap. 9.3 nachzulesen. Die oben genannten "terrestrischen" Tests setzen in ihrer ursprünglichen Form das Vorhandensein unbelasteter Kontrollen als Vergleichsmaßstab voraus (mit Ausnahme des ToxichromoPad-Tests und des Reporterbakterientests). Da bei der Untersuchung sanierter Böden häufig keine unkontaminierten Kontrollböden des gleichen Standortes zur Verfügung stehen und die Böden im Sanierungsprozeß stark verändert werden, müssen u. U. alternative Verfahren für die Bewertung der Untersuchungsergebnisse angewendet werden.

Fehlt die Bezugsgröße, fehlt also ein unkontaminierter Boden mit vergleichbaren Eigenschaften wie die des kontaminierten Testbodens, wird insbesondere für den Pflanzenwachstumshemmtest und die potentielle Ammoniumoxidation folgende Vorgehensweise empfohlen: Der Testboden wird mit unbelastetem Boden bekannter Qualität 1:1 gemischt und die Testergebnisse der Mischung zu den Testergebnissen der Einzelböden in Beziehung gesetzt. Dieses Verfahren erlaubt auch die Bewertung von (inerten) Unterböden durch terrestrische Testverfahren.

Bei dem Reproduktionstest mit Regenwürmern ist eine derartige Vorgehensweise nicht geeignet. In diesem Fall müssen die Ergebnisse auf einen Kontrollboden bezogen werden. Dabei bestimmt die Vergleichbarkeit in den chemisch-physikalischen Eigenschaften von Kontroll- und Testboden die tolerierbare Abweichung (s. Kap. 9.3.5, Teil B).

Aus der Erfahrung des Verbundvorhabens 4 "Ökotoxikologische Testbatterien" können folgende Hinweise gegeben werden:

Hinweise zu Tests mit Bodeneluaten

- Im **Leuchtbakterientest** ist eine Beeinträchtigung der **Lumineszenz** durch hohe DOM-Werte im Eluat möglich.
- Der **Daphnien-Test** erwies sich bei den im Rahmen des o.g. Verbundvorhabens untersuchten Böden mit PAK, MKW und Nitroaromaten als Hauptkontaminanten als vergleichsweise unempfindlich, so daß im Rahmen der Gesamtbewertung keine zusätzlichen Erkenntnisse erzielt wurden. Diese Aussage darf jedoch ohne weitergehende Untersuchungen zur statistischen Absicherung nicht verallgemeinert werden, so daß bis zum Vorliegen weiterer Erkenntnisse nicht generell auf den Daphnien-Test zu verzichten ist. Beispielweise liefert der Daphnientest bei hexogenhaltigen Eluaten bessere Ergebnisse als der Leuchtbakterientest, wie im Teilvorhaben 8 des Verbundvorhabens 3 "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten" gezeigt werden konnte (s. Kap. 9.2.9).

Hinweise zu terrestrischen Tests

- Starke Abweichung von abiotischen Eigenschaften verbreiteter natürlicher (Ober-)Böden beeinträchtigen naturgemäß **alle Tests**. Schwierigkeiten können auftreten bei pH-Werten < 4 bzw. > 8, hohen Salzgehalten bzw. Leitfähigkeiten (> 1 ms/cm).
- Es bestehen Hinweise darauf, daß die **Reproduktionsrate** der **Bodeninvertebraten** durch höhere Schluff-/ Tongehalte beeinflusst wird.
- Beim **chronischen Pflanzentest** wurden außerdem Unterschiede im Nährstoffgehalt zwischen Test- und Kontrollböden und die Wasserleitfähigkeit der Testböden als Faktoren identifiziert, die das Testergebnis beeinflussen können.
- Die **Interpretation** der ökotoxikologischen Befunde erfolgt unter Berücksichtigung der verfahrenstypischen Behandlungsmaßnahmen und deren Wirkungen auf den Testorganismus. Für die wissenschaftlich fundierte Ergebnisbewertung biologischer Testverfahren ist die chemisch-physikalische Charakterisierung (s. Kap. 9.3) des (Ausgangs-)Bodenmaterials und des Endproduktes eines Sanierungsverfahrens Voraussetzung.
- Die Bewertung der Untersuchungsergebnisse soll Hinweise auf die Eignung des behandelten Bodenmaterials für die geplante Folgenutzung (z.B. Deponieabdeckung, Pflanzenstandort, Verfüllung von Baugruben) enthalten.

4.2.3 Einsatz in der Erfolgskontrolle von großtechnischen Verfahren

(Öko-)toxikologische Tests zeigen alle schädlichen Wirkungen, die von einem Boden/Bodenmaterial ausgehen, empfindlich an. Im Rahmen der Untersuchungen des Verbundvorhabens 4 "Ökotoxikologische Testbatterien" konnte an zahlreichen MKW-, PAK- und TNT-belasteten Böden/Bodenmaterialien aus Sanierungen gezeigt werden, daß die ausgewählten Testverfahren die Verbesserung der Bodenqualität nach erfolgter Bodenbehandlung zuverlässig erkennen. Für eine Erfolgskontrolle muß zunächst sorgfältig und vorausschauend abgewogen werden, in wie weit das Sanierungsverfahren das ursprüngliche Bodenmaterial beeinflussen wird. Hohe Gaben von Zuschlagstoffen wie org. Material, Dünger oder Strukturverbesserer verändern die chemischen und physikalischen Eigenschaften des zu sanierenden Materials (s. Kap. 2.3.1.1). Im ungünstigsten Fall kann in einem unausgereiften biologisch behandelten Material durch Zuschlagstoffe zeitweilig eine Toxizität erzeugt werden. Diese Toxizität kann in der Regel durch eine entsprechende Nachreife reduziert bzw. völlig aufgehoben werden. Für die sinnvolle Bewertung eines behandelten Bodens ist also auch der Zeitpunkt der Beprobung von entscheidender Bedeutung. Für Böden aus Kompostsanierungsverfahren wird eine Erfolgskontrolle nach einer Nachreife des Materials empfohlen.

4.2.4 Genotoxikologischen Testverfahren

4.2.4.1 Probennahme, -transport, -lagerung

Die Probennahme für die genotoxikologischen Tests erfolgte im Rahmen der Beprobungen für die ökotoxikologischen Untersuchungen. Die Probengewinnung und -handhabung ist analog dem in den Kap. 4.1.1 und 4.1.2 beschriebenen Vorgehen bei der Probennahme für die chemische Analytik zu gestalten. Zur Probenmenge und Dokumentation s. Kap. 4.2.1.1.

4.2.4.2 Genotoxikologischen Tests

Für die Beurteilung des über den Wasserpfad mobilisierbaren genotoxikologischen Potentials von Böden wurden im Rahmen des Verbundvorhabens 4 "Ökotoxikologische Testbatterien" folgende Biotests eingesetzt und für die Untersuchung von Bodeneluaten als prinzipiell geeignet befunden (s. Tab. 4.6). Die Bewertung der mit Bodeneluaten erzielten Ergebnisse erfolgt entsprechend den Vorgaben der genannten Normen.

Tab. 4.6: Genotoxikologische Testverfahren

Testsystem	Teststämme	Standardisierung
Ames-Test	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 98 <i>S. typhimurium</i> TA 100	DIN Entwurf 38415-4 (Stand 1/1998) [15]
umu-Test	<i>S. typhimurium</i> TA1535/pSK1002	DIN 38415-3 [14]
SOS-Test	<i>Escherichia coli</i> PQ37	in Anlehnung an das Protokoll des <i>umu</i> -Tests
NM2009-Test	<i>S. typhimurium</i> TA1535/pSK1002/pNM12	in Anlehnung an das Protokoll des <i>umu</i> -Tests

Da für die Auslösung mutagener Effekte Schwellenkonzentrationen generell nicht oder nur schwer zu definieren sind, kann bei den genotoxikologischen Tests die Forderung nach einer möglichst geringen Nachweisgrenze für genotoxische Verbindungen abgeleitet werden. Für eine umfassende Bewertung der Bodenrückhaltefunktion kann somit neben der Untersuchung der Bodeneluat in einem zweiten Schritt die Aufkonzentrierung der im Eluat vorhandenen Schadstoffe durch Festphasenextraktion [23; 24] mit anschließender Testung der Eluat-Extrakte sinnvoll sein. Dabei wird anhand der vorliegenden Ergebnisse und bei Anwendung des Bewertungsschemas aus Abb. 4.5 derzeit eine theoretische Aufkonzentrierung um den Faktor 15 vorgeschlagen. Bei höherer Konzentrierung können auch "unbelastete" Referenzböden positive Befunde liefern (Hintergrund-Genotoxizität), welche nicht durch anthropogen eingetragene Schadstoffe bedingt sind. Die vorgeschlagene Untersuchungs- und Bewertungsstrategie ist in Abb. 4.5 zusammengefasst.

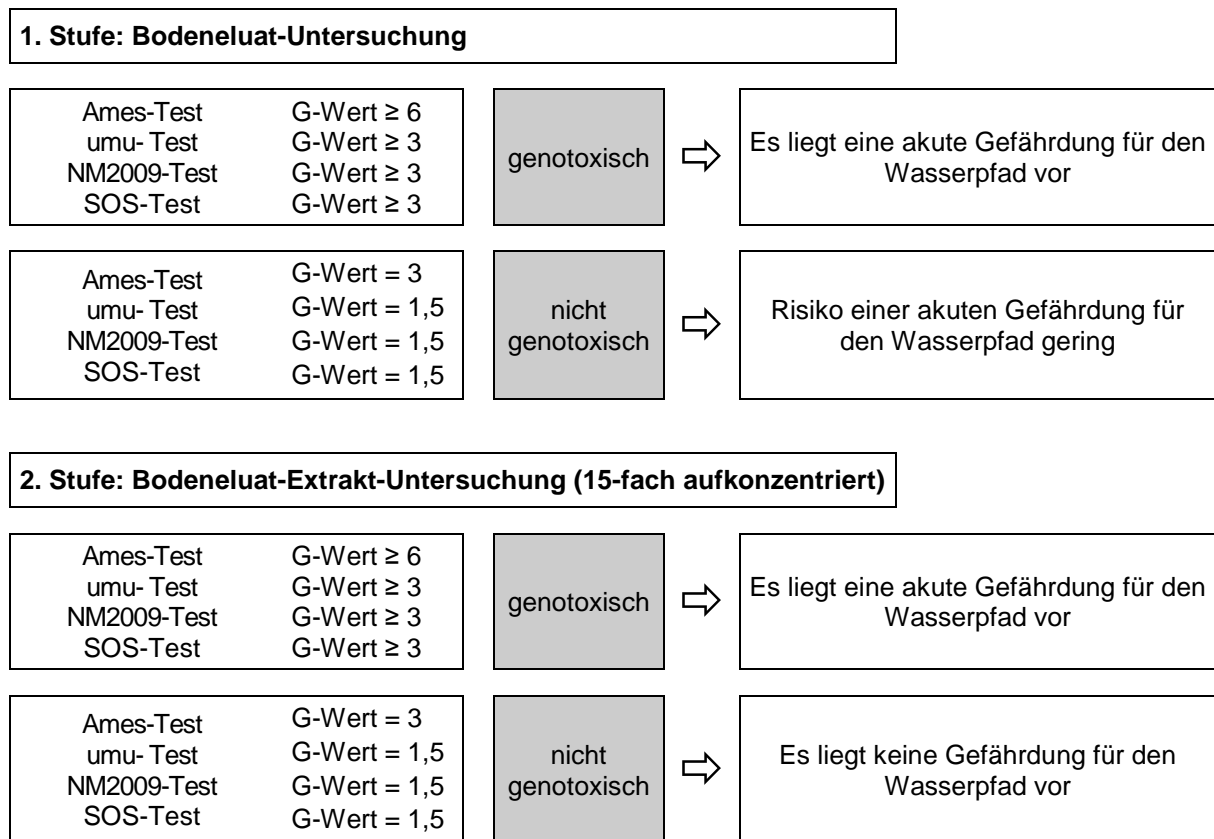


Abb. 4.5: Bewertung der mittels genotoxikologischer Tests erzielten G-Werte

Eine allgemeingültige Empfehlung für die Auswahl eines oder mehrerer Genotoxizitätstests wird anhand der vorliegenden Erfahrungen nicht gegeben. Es ist anhand der konkreten Vorgaben und Bedingungen im Einzelfall zu entscheiden, welcher Test oder welche Testbatterie einzusetzen ist und welche Teststrategie zu fordern ist (z.B. nur Stufe 1 oder Stufe 1 + Stufe 2).

Bezüglich der aufgeführten Testsysteme wurde im Rahmen des o.g. Verbundvorhabens für die untersuchten Böden mit PAK, MKW und Nitroaromaten als Hauptkontaminanten u.a. aufgezeigt, daß der AMES-Test im Vergleich zum *umu*-Test etwas empfindlicher reagiert (andererseits aber deutlich aufwendiger in der Versuchsdurchführung ist), daß der NM2009-Test auf Nitroaromaten besonders sensibel reagiert und daß der SOS-Test die geringste Empfindlichkeit zu haben scheint. Diese vorläufigen Aussagen müssen jedoch durch weitergehende Untersuchungen statistisch abgesichert werden.

4.2.5 Humantoxikologische Tests und Air-Monitoring

Es wird bei einem Umgang mit gefährlichen Stoffen eine intensive arbeitsmedizinische Betreuung zur Validierung der getroffenen Arbeitsschutzmaßnahmen vorgeschlagen. Diese beinhaltet das in der Bauwirtschaft etablierte "Arbeitsmedizinische Untersuchungsprogramm auf Altlasten" [49] und Untersuchungen zum Biological (Effekt) Monitoring [34; 51]. Zu Details der humantoxikologischen Tests und zum Air-Monitoring wird auf [49; 50; 51; 52] verwiesen.

4.3 Untersuchungen zur Langzeitstabilität

Annette Eschenbach

4.3.1 Ausgangssituation möglicherweise immobilisierter Schadstoffe

Nach erfolgter biologischer Bodensanierung ist ein Anteil der ursprünglichen Kontaminanten biologisch abgebaut, d.h. zu Kohlendioxid mineralisiert worden, und ein anderer Anteil liegt in der organischen Bodenmatrix festgelegt vor. Das Verhältnis zwischen Mineralisation und Festlegung kann Schadstoff-bedingt sehr unterschiedlich sein. Bei TNT erfolgt beispielsweise keine oder nur eine äußerst geringe Mineralisation, aber eine nahezu vollständige Festlegung [1; 21]. Bei PAK-Kontaminationen sind zumeist beide Prozesse deutlich ausgebildet, da eine Festlegung im Zuge des Abbaus der Schadstoffe erfolgt [28; 48]. Da die biologische Abbaubarkeit der PAK sehr unterschiedlich ist (s. Kap. 2.1.2), ist auch deren Festlegung (Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände) unterschiedlich stark ausgeprägt (s. Kap. 2.2.2.1).

Für die Bewertung der Langzeitstabilität immobilisierter Schadstoffe sind die Ausgangsbedingungen der Sanierungsverfahren zu berücksichtigen. Erste Bedingung an eine erfolgreiche Sanierung ist, daß die extrahierbare Fraktion der betreffenden Schadstoffe (z.B. MKW, PAK, TNT) unter den jeweiligen Grenzwert der Kontaminanten abgereichert ist, unabhängig davon ob dies durch einen Abbau oder eine Immobilisierung erfolgt. Weiter ist zu unterscheiden, ob es sich um ein aerobes oder anaerobes Verfahren oder um eine Kombination handelt, ob das Verfahren ein Suspensions- (s. Kap. 3.2) oder trockenes Verfahren (s. Kap. 3.1) ist, und ob organische Supplemente, z.B. Kompost, Rindenmulch, Melasse oder Tierdung, dem Bodenmaterial zugesetzt wurden (s. Kap. 2.4.3).

Durch Anwendung der jeweiligen Sanierungsverfahren kann – neben dem unterschiedlichen Abbau der Schadstoffe – sowohl das Ausmaß der Bildung der nicht-extrahierbaren Rückstände als auch die Art der Schadstoff-Fixierung im Boden variieren. Dieser Umstand hat eine große Bedeutung für die Bewertung der Stabilität der nicht-extrahierbaren Rückstände. So kann z.B. bei der Ausbildung stabiler kovalenter Bindungen zwischen Schadstoff bzw. Schadstoffderivat und organischer Bodensubstanz – wenn es sich nicht um leicht hydrolysierbare Bindungen wie z.B. Ester- oder Peptidbindungen, sondern um stabile C–C-Bindungen handelt – von einer so festen Einbindung der Schadstoffe in die Humusmatrix ausgegangen werden, daß es unwahrscheinlich ist, daß die Schadstoffe daraus in ihrer ursprünglichen chemischen Konfiguration wieder freigesetzt werden. In diesem Fall ist vielmehr davon auszugehen, daß die eigentlich schadstoffbürtigen Moleküle im Boden wie biogene Moleküle zum Bestandteil der natürlichen organischen Bodensubstanz geworden sind.

Da die Schadstoffe dazu aber zunächst metabolisiert (im Falle des TNT reduziert (s. Kap. 2.1.9.2), bei PAK oxidiert (s. Kap. 2.1.2.2)) werden müssen, um effektiv eingebunden werden zu können, haben die Bedingungen des Sanierungsverfahrens einen großen Einfluß auf den Humifizierungsprozeß. Unterbleibt die metabolische Transformation aufgrund der gewählten Sanierungsbedingungen, erfolgt die Immobilisierung möglicherweise lediglich durch räumlichen Einschluß in der Humusmatrix und ohne Bindung (*physical entrapment*; Sequestrierung). Eine solche Art der Immobilisierung ist aber nach jetzigem Kenntnisstand nicht als vergleichbar stabil einzuschätzen und kann damit auch eine potentielle Gefährdung darstellen (s. Kap. 2.2).

4.3.2 Einsatz von Tests zur Langzeitstabilität in der Erfolgskontrolle von großtechnischen Verfahren

Um den Erfolg von Bodensanierungsverfahren – die in erster Linie auf die Immobilisierung (physikalische oder chemische Einbindung in die Bodenstruktur) von Schadstoffen abzielen – zu bewerten, müssen Untersuchungen durchgeführt werden, die jeweils nachweisen, daß die festgelegten Schadstoffe absehbar auch über lange Zeiträume (viele Jahrzehnte) stabil im Boden vorliegen werden und somit kein Gefährdungspotential darstellen. Dabei sollte, um die Nachhaltigkeit einer solchen biologischen Sanierung gewährleisten zu können, auch das Langzeitverhalten der sanierten Böden untersucht werden, wenn die Konzentrationen der extrahierbaren Ausgangsschadstoffe nach Anwendung der Sanierungsverfahren bereits unterhalb der jeweils zulässigen Grenzwerte liegt.

Zur Vorbereitung und Erprobung derartiger Tests ist ein aufwendiges Versuchsprogramm erforderlich. So wurden z. B. im BMBF-Verbundvorhaben 5 "Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen bei der biologischen Bodensanierung" sowohl bilanzierende Untersuchungen zur Langzeitstabilität mit ^{14}C -markierten Schadstoffen im Labor- und Lysimetermaßstab als auch Untersuchungen zur Struktur und Stabilität der chemischen Bindungen mit Hilfe von stabilen ^{15}N -Isotopen durchgeführt (s. Kap. 2.5.2 und Kap. 9.4).

In *scale up*-Versuchen ist zu überprüfen, inwieweit die Ergebnisse der Laborversuche in den großtechnischen Maßstab übertragen werden können. Diese Untersuchungen wurden für PAK- und TNT-Kontaminationen unter Anwendung eines breiten Spektrums unterschiedlicher Sanierungsverfahren (TNT: dynamisches Beetverfahren, alternierendes Anaerob-Aerob-Verfahren, Pilzverfahren; PAK: Sanierungsverfahren mit Zugabe von Kompost, Rindenmulch oder Weißfäulepilzen im Mietenverfahren oder als Bioreaktortechnologie) verfolgt. Mit diesen Arbeiten wurde für PAK und TNT-Belastungen nun eine Bewertungsgrundlage geschaffen, die sichere Aussagen zum Remobilisierungsverhalten der genannten Schadstoffe ermöglicht. Aus diesen Erkenntnissen läßt sich aber auch ein – aus Zeit- und Kostengründen notwendig zu reduzierendes – Untersuchungsprogramm ableiten, daß nun in der Sanierungspraxis zur Beurteilung von biologisch sanierten Bodenmaterialien herangezogen werden kann.

Die auf dieser Basis nachfolgend (s. Kap. 4.3.3) vorgeschlagenen Remobilisierungs-Testverfahren können als Methodenpaket in die Erfolgskontrolle von großtechnischen Bodensanierungsverfahren implementiert werden. Mit der vorgenommenen Testauswahl werden alle möglicherweise auftretenden Freisetzungsbedingungen (biologische, physikalische und chemische *worst case*-Situationen) ausreichend berücksichtigt. Mit Hilfe dieser Untersuchungen können die Stabilität und das Langzeitverhalten der nicht-extrahierbaren Rückstände zugleich auch im Zeitraffer bewertet werden.

Die Anwendbarkeit dieser Tests ist für die Schadstoffe TNT und PAK bei praktischen Sanierungsfällen abgesichert. Sollen Aussagen zu anderen Schadensfällen getroffen werden, bei denen möglicherweise mit anderen Bindungsmechanismen (z.B. großer Anteil sequestrierter Schadstoffe oder vorwiegende Sorption an der anorganischen Bodenmatrix/Tonminerale) gerechnet werden muß, ist jedoch zu empfehlen, gesondert ein ausführliches Untersuchungsprogramm durchzuführen.

4.3.3 Auswahl geeigneter Bewertungsverfahren

Zum Nachweis der Langzeitstabilität und des Remobilisierungsverhaltens von festgelegten Schadstoff-Rückständen in biologisch sanierten Bodenmaterialien können eine Vielzahl verschiedener Methoden angewendet werden, die als *worst case*-Untersuchungen, verschiedene ökologische Stressbedingungen unter Einbeziehung biotischer und abiotischer Einflußfaktoren im Zeitraffereffekt simulieren. Aus dieser breiten Palette von Remobilisierungsmethoden (s. Kap. 2.5.2.2) sind repräsentative und die – um auf der sicheren Seite zu sein – zugleich auch effektivsten und einfach durchzuführenden Remobilisierungstests auszuwählen. Für die Bewertung der Langzeitstabilität geeignet sind danach:

- als biologischer Test die Zugabe Humus-abbauender Mikroorganismen
- als physikalischer Test die Zerstörung der Bodenaggregatstruktur und die Klimasimulation durch Frost-Tau-Zyklen
- als chemischer Test die Zugabe Kationen-komplexierender Substanzen und die Simulation sauren Regens

Die auf dieser Basis mit Hilfe markierter Isotope bisher durchgeführten Remobilisierungsversuche [27; 35] haben weiter gezeigt, daß zur Bewertung der Langzeitstabilität von TNT- oder PAK-Rückständen die Betrachtung des eluierbaren und extrahierbaren Anteils der Schadstoffe ausreichend aussagekräftig ist. Eine mögliche Freisetzung, die nicht auch in der eluierbaren oder extrahierbaren Fraktion ermittelt worden wäre, trat hier nicht auf.

Die Schadstoffe wurden entweder mineralisiert und damit vollständig detoxifiziert oder als nicht-extrahierbare Rückstände langfristig festgelegt. Für TNT- oder PAK-Rückstände können zukünftig also Remobilisierungsuntersuchungen (*worst case*-Untersuchungen) auch ohne Einsatz von Isotopen-markierten Verbindungen erfolgen. Für die Beurteilung nicht-extrahierbarer Rückstände anderer Stoffgruppen ist aber eine vollständige Bilanzierung mit Hilfe ¹⁴C-markierter Substanzen eine Grundvoraussetzung. Für PAK und TNT wird die Bestimmung der Konzentration der Ausgangsverbindung und der möglichen Metabolite im Eluat und in den Extrakten mittels Standardanalytik (HPLC, GC-MS, HR-GC etc.) als ausreichend betrachtet. Die vor diesem Hintergrund durchzuführenden Tests werden im folgenden genauer beschrieben:

4.3.3.1 Simulation biologischer Freisetzungsprozesse

Das zu untersuchende Bodenmaterial wird mit **Huminstoff-abbauenden Mikroorganismen** (z. B. *Rhodococcus erythropolis* (DSM 1069), *Trametes versicolor* (DSM 3086), *Nematoloma frowardii* (DSM 11239), *Stropharia rugosoannulata* (DSM 11373)) versetzt und über einen Zeitraum von ca. 4 - 6 Wochen aerob inkubiert. Während dieser Zeit sollte die Schadstoff-Mineralisation ein "Mineralisationsplateau" (= Stagnation der CO₂-Bildung) erreichen. Als Kontrolle dient eine un-supplementierte Bodenprobe, die ebenfalls inkubiert wird. Anschließend wird das Bodenmaterial mit einem für die Schadstoffe geeigneten Extraktionsverfahren behandelt (für PAK beispielsweise: wässrig/methanolische Extraktion, Lösemittelextraktion, alkalische Hydrolyse). Die erhaltenen Extrakte werden gemäß Standardanalytik untersucht.

4.3.3.2 Simulation physikalischer Freisetzungsprozesse durch mechanische Zerstörung

Um zu untersuchen, ob die direkte mechanische Zerstörung der Aggregatstruktur der Bodenproben einen Einfluß auf die immobilisierten Schadstoffe hat, wird das sanierte Bodenmaterial mit einem **Ultraschall-Desintegrator** behandelt. Alternativ wird das Zermahlen des Bodenmaterial mittels **Kugelmühle** oder intensives **Mörsern** empfohlen. Der Einfluß der Aggregatzerstörung auf das Elutionsverhalten der im Boden gebundenen Schadstoffe wird anschließend durch Mehrfach-Elutionen mit Wasser untersucht. Die erhaltenen Eluate werden entsprechend der Standardanalytik des zu untersuchenden Schadstoffes bestimmt (HPLC, GC, GC-MS usw.).

4.3.3.3 Simulation physikalischer Freisetzungsprozesse durch Klimasimulation

Durch wiederholte **Frost/Tau-Zyklen** (Temperaturwechsel zwischen -20 °C und +40 °C) wird eine Frostsprengung oder Frostgare der Aggregate im zu bewertenden Bodenmaterial erreicht. Der Phase mit schnellen Temperaturwechseln (jeweils im 24 h-Zyklus) folgt eine Inkubationsphase mit für Mikroorganismen günstigen Temperaturbedingungen (konstante Temperatur von +20 °C). Danach erfolgt erneut eine Phase mit Frost/Tau-Zyklen und anschließend wieder eine Inkubationsphase bei +20 °C.

Die Versuchsphasen mit konstanten Temperaturen werden eingefügt, um den Mikroorganismen unter diesen günstigen Milieubedingungen eine Mineralisation der eventuell remobilisierten Rückstände zu ermöglichen. Als Kontrolle dient unbehandeltes Bodenmaterial mit nicht-extrahierbaren Rückständen, also Material das über die gesamte Versuchsdauer bei +20 °C inkubiert wird, das ansonsten aber analog untersucht bzw. extrahiert wird. Nach der Behandlung wird der Verbleib der Schadstoffe in den unterschiedlichen Fraktionen ermittelt (extrahierbar durch Methanol/Wasser, extrahierbar durch Lösemittel (Aceton), alkalisch hydrolysierbar). Die Extrakte werden entsprechend der für die zu untersuchenden Schadstoffe notwendigen Standardanalytik untersucht.

4.3.3.4 Simulation chemischer Freisetzungsprozesse durch EDTA

Bei dieser Remobilisierungsmaßnahme wird das sanierte Bodenmaterial mit einer EDTA-Lösung (EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure) behandelt. Die Extraktion mit **Kationenkomplexierenden Agenzien** (EDTA) löst die Metalle aus den die organische Substanz des Bodens stabilisierenden metall-organischen Komplexen. Durch die Veränderung der räumlichen Struktur der organischen Substanz können möglicherweise sequestrierte originäre Schadstoffe (physikalisch-eingeschlossene Verbindungen) freigesetzt werden.

Die Untersuchungen werden mit Na₂-EDTA-Lösungen in verschiedenen Konzentrationen (0,01 M, 0,025 M, 0,05 M) durchgeführt, die auf pH 4,6 eingestellt werden. Als Kontrolle dient Bodenmaterial, welches mit Wasser extrahiert wird. Die EDTA-Extraktion wird zweimal aufeinanderfolgend mit drei Parallelen durchgeführt, wobei das Boden/Extraktionsmittel-Verhältnis 1:6 beträgt [27].

4.3.3.5 Simulation chemischer Freisetzungsprozesse durch pH-Änderung

Um zu untersuchen, ob die immobilisierten Schadstoffrückstände im Bodenmaterial unter dem Einfluß von pH-Änderungen remobilisiert werden können, wird ein häufig auftretender, lang andauernder saurer Regen simuliert und das Elutionsverhalten ermittelt.

Das zu bewertende Bodenmaterial wird mit **angesäuertem Wasser** (pH 5, eingestellt mit einer Mischung aus Salpeter- und Schwefelsäure) versetzt, und auf einem Horizontalschüttler extrahiert (18 h). Nach Abtrennung der festen und kolloidalen Bodenbestandteile wird die Schadstoffkonzentration in der Lösung gemäß Standardanalytik bestimmt. Anschließend werden die Gefäße mit den Bodenpellets erneut mit angesäuertem Wasser versetzt. Die gesamte Prozedur wird zehnmal wiederholt [32].

4.3.4 Testdurchführung und Bewertung

Die in Kap. 4.3.3 vorgeschlagenen Remobilisierungstests sollen nach Ablauf eines biologischen Sanierungsverfahrens mit dem behandelten Bodenmaterial durchgeführt werden. Die Konzentration der Schadstoffe und möglicher Schadstoffderivate in den Extrakten und Eluatensoll gemäß der jeweils adäquaten Standardanalytik (HPLC, GC, GC-MS usw.) untersucht werden. Dabei sollten auch eventuell gebildete Metaboliten besondere Beachtung finden.

Wenn nach Anwendung der Remobilisierungsmaßnahmen **keine Freisetzung** von Schadstoffen oder deren Metaboliten im Eluat oder Extrakt festzustellen ist oder sich diese im Bereich natürlicher Hintergrundwerte bewegt, ist von einer nachhaltigen Detoxifikation des sanierten Bodenmaterials, entweder durch Mineralisation oder durch die Bildung von nicht-mobilisierbaren Rückständen auszugehen. Diese Immobilisierung der Schadstoffe durch die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen wird aus wissenschaftlicher Sicht nach derzeitigem Kenntnisstand als unbedenklich angesehen, da eine Freisetzung als originäre Schadstoffverbindung auch nach langen Zeiträumen nicht mehr zu erwarten ist.

Sprechen die ebenfalls durchzuführenden ökotoxikologischen Untersuchungen (vgl. Kap. 4.2) auch für die Unbedenklichkeit des Bodenmaterials, kann dieses mit hinreichender Sicherheit als gereinigt gelten und eine Weiterverwertung erfolgen. Es sollte dann vorzugsweise wieder am Standort eingebaut werden, wobei allerdings eine Ausbringung auf besonders sensiblen Flächen wie in Wasserschutzgebieten oder der Einbau auf Kinderspielplätzen, Sportplätzen, Schulhöfen, Klein- und Hausgärten sowie die Verbringung auf landwirtschaftlich genutzten Flächen aus Vorsorgegründen vermieden werden sollte. Alternative Verwertungsmöglichkeiten für derartig sanierte Bodenmaterialien wären z.B. der Einsatz als Füllmaterial beim Straßenbau, bei Lärmschutzwällen, für den Tagebau oder als Abdeckmaterial von Deponien [5; 44].

Wird bei den Tests hingegen eine **Freisetzung** zuvor festgelegter Schadstoffe festgestellt (Zunahme der extrahierbaren Schadstoffe nach Anwendung der Remobilisierungsmaßnahmen), die den Sanierungszielwert übersteigt, ist die Festlegung als nicht stabil anzusehen und das Bodenmaterial bezüglich einer Gefahrenabschätzung als kritisch und bedenklich zu bewerten. Dies gilt besonders, wenn die Freisetzung der Schadstoff(-derivate) schneller abläuft als deren zu erwartender Abbau. Über die endgültige Verwendung dieses Materials wird dann im Einzelfall zu entscheiden sein.

4.4 Qualitätssicherung der Bodenuntersuchungen und Untersuchungsmethoden

André Dahn, Jürgen Thieme, Jelena Karutz

4.4.1 Anforderungen an Untersuchungsstellen

Es ist sicherzustellen, daß die Untersuchungsstellen ihre Sachkunde, personelle und gerätetechnische Ausstattung und Zuverlässigkeit in geeigneter Form unter Beweis stellen.

In Übereinstimmung mit dem Bundesbodenschutzgesetz [5; 31] beschränkt sich die Frage der Qualitätssicherung der Untersuchungen nicht nur auf die qualitätsgerechte Durchführung von Analysen und Tests. Bereits in der präanalytischen Phase ist es notwendig einzelne Arbeitsschritte zuverlässig und nachvollziehbar zu planen, durchzuführen und zu dokumentieren.

Dazu eignen sich z.B. Qualitätssicherungsleitfäden mit Verfahrens- und Arbeitsanleitungen, die auf Verlangen dem Auftraggeber vorgelegt werden können. Im weiteren Sinne gehört zur Qualitätssicherung, daß vor Durchführung der Untersuchungen die Untersuchungsmethoden klar definiert und im einzelnen festgelegt werden, wobei Methoden auf der Grundlage gültiger und anerkannter Regeln der Technik der Vorzug gegenüber den Methoden ohne externe Überprüfung gegeben werden soll (vgl. [5]).

4.4.1.1 Mindestforderungen an die chemisch-analytischen Labors

Für die einbezogenen Analyselabors gelten folgende Mindestforderungen:

- Nachweis der Akkreditierung nach der EN DIN 45001 "Allgemeine Kriterien zum Betreiben von Prüflaboratorien" [25]
- Nachweis einer externen Qualitätssicherung durch Teilnahme an einschlägigen Ringversuchen
- Nachweis eines internen Qualitätssicherungssystems mit einem Probenmanagement von der Probennahme bis zur Entsorgung des Probenmaterials
- Einschlägige Befähigungsnachweise der Mitarbeiter
- Nachweis der Teilnahme des Laborpersonals an thematischen Weiterbildungsmaßnahmen,
- Nachweisliche Durchführung regelmäßiger Arbeitsschutzbelehrungen
- Nachweisliche regelmäßige arbeitsmedizinische Vorsorgeuntersuchungen (Basisuntersuchungen und aufgabenabhängige Erweiterungen)

4.4.1.2 Dokumentation der analytischen Untersuchungen

Die komplette Dokumentation, die durch das Analytiklabor zu erstellen ist, muß folgende Einzelheiten enthalten:

- Ausschreibungen, Angebote, Beauftragung, evtl. Unteraufträge, Rechnungen

- besondere, zu dokumentierende Absprachen
- Schriftwechsel, Protokolle
- Analysenpläne, Sondierprotokolle
- Probenbegleitscheine, Nachweis der Lagerbedingungen nach EN DIN/ISO 14507 [22]
- Prüfberichte (Muster siehe Anlage in Kap. 4.6.5),
- Datenspeicher.

Diese Unterlagen werden archiviert und i. d. R. 3 Jahre aufbewahrt. Mit den dazugehörigen Rohdaten wird gleichermaßen verfahren.

4.4.2 Anforderungen an Gutachter

An den Gutachter, der bei der Sanierungsdurchführung die Erfolgskontrolle und die Bewertung der gesamten Maßnahme gewährleisten muß, werden folgende Anforderungen als Voraussetzung für eine objektive Beurteilung sowie gemäß BBodSchV [5] gestellt.

- Vorhandensein einer erforderlichen **besonderen Fachkunde** zur Erarbeitung von Bewertungskriterien, Sanierungszielen und Gesamtbewertung (Zusammenarbeit in einem interdisziplinären Team für die Berücksichtigung der chemischen, (öko-)toxikologischen und biologischen, ggf. geo- und hydrogeologischen, bodenkundlichen und ökonomischen Aspekte bei der Sanierungsplanung, -vorbereitung, -durchführung und bei den anschließenden Kontrollmaßnahmen).
- Gewährleistung der Zuverlässigkeit der Bewertung (u.a. die Fähigkeit den neuesten Stand der Wissenschaft und Technik einzubeziehen, Nachweis der Beteiligung an den aktuellen Fortbildungsveranstaltungen).
- Hersteller- und Industrieunabhängigkeit.
- Nachweis einer erforderlichen (DV-)technischen Ausstattung.
- Nachweis einer Zertifizierung für Qualitätssicherung.

Die entsprechenden Vorschriften der Länder, die auf Grundlage der Anforderungen des § 18 des BBodSchG erlassen worden sind bzw. sich in Vorbereitung befinden, sind bei der Auswahl der Gutachter und Untersuchungsstellen zu beachten.

4.4.3 Vergleichsuntersuchungen

Für die chemischen und ökotoxikologischen Untersuchungen erfolgten vor Beginn der maßstabsgerechten Erprobung zusätzlich **Vergleichsuntersuchungen** ähnlich den Ringversuchen zum Abgleich der Analysen- und Testergebnisse zwischen den Verfahrenserprobern und der wissenschaftlichen Begleitung, die anhand der Wiederfindungsraten bewertet wurden (Anlagenband zum Konzept der wissenschaftlichen Begleitung (KwB/AB), Anlage 4) [41].

Die durchgeführten Vergleichsuntersuchungen (KwB/AB/Anlage 5) [41] erfolgten mit dem Ziel die Voraussetzungen für eine allseitige Bewertung der Analyseergebnisse zu schaffen, da dadurch nicht nur die Analyseergebnisse des Kontrollabors sondern auch der Verfahrenserprober in die Betrachtung und Bewertung einbezogen werden konnten.

4.4.3.1 Chemische Analytik

Im Rahmen einer analytischen Erfolgskontrolle wurden Untersuchungen mit dem Ziel durchgeführt, sowohl die Richtigkeit und Genauigkeit als auch die Vergleichbarkeit der Laborergebnisse zwischen den beteiligten Labors zu gewährleisten. Die Untersuchungen umfaßten in Absprache mit dem NLÖ folgende Verbindungen: 2,4,6-TNT, 1,3-DNB, 1,3,5-TNB, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 2-NT, 3-NT, 4-NT, 2-A-4,6-DNT, 4-A-2,6-DNT und Hexogen.

Im Rahmen der Untersuchungen erhielt jeder Verfahrenserprober 2 homogenisierte Bodenproben, die typisch für die Startphase des Projektes waren (hohe Anfangskonzentrationen an TNT, begleitende Abbau- und Nebenprodukte) und 2 Bodenblindproben. Zusätzlich erhielten sie zur Isolierung des Extraktionsschrittes einen vorgefertigten Methanol-Extrakt dieser Proben, sowie eine methanolische Standardlösung zur Abschätzung des Fehlers beim eigentlichen Analysenschritt.

Mit den Ergebnissen waren folgende Angaben an das Kontrollabor zu übermitteln:

- Aufbereitungs- und Analysendatum,
- Variationen in der Methode gegenüber der SOP (Verdünnungsschritte etc.),
- Kurzangaben zu den chromatographischen Bedingungen (Säule, Eluenten, Fluß, Meßwellenlängen),
- verwendete Standards (Hersteller ggf. Verfallsdatum und Charge),
- Chromatogramme (bei Mehrfachbestimmungen jeweils nur einmal),
- Spektrenidentifizierung.

4.4.3.2 Vergleichsuntersuchungen bei ökotoxikologischen Tests

Für die Vereinheitlichung der Herstellung der Bodeneluatate im Rahmen der aquatischen Tests erfolgte ein Vergleich von entsprechenden Vorschriften, die durch die beteiligten Verfahrenserprober sowie durch das Fraunhofer Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie normalerweise verwendet wurden. Die Eluatherstellung kann in Abhängigkeit vom Boden die ermittelte Toxizität in unterschiedlichem Ausmaß beeinflussen (s. Kap. 9.3.5 Teil A). Die Ergebnisse des Vergleiches waren durch das Fraunhofer Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie, das die Untersuchung durchführte, als Anleitung zur Eluatherstellung den Beteiligten zur Verfügung gestellt.

4.4.4 Dokumentation

Zur Gewährleistung einer zuverlässigen Dokumentation wurden für alle durchzuführenden Probennahme- und Untersuchungsarbeiten im Verbundvorhaben 6 Formblätter zusammengestellt. Im einzelnen waren folgende Unterlagen einzusetzen:

- Probennahmedokumentation PD
- Beprobungsplan BP (Blätter 1 und 2),
- Probennahmeprotokolle PP (Blätter 1 und 2),
- Probenbegleitscheine PS,
- Analyseplan AP,
- Prüfbericht/Analysenprotokoll PB (Blätter 1 und 2) / Testplan

Muster aller Unterlagen sind als Anlagen in Kap. 4.6 beigelegt.

4.4.5 Nachhaltigkeitsuntersuchungen

Grundsätzlich sind die Untersuchungen zur Kontrolle der Nachhaltigkeit der Sanierungsergebnisse bei einer *In situ*-Sanierung bzw. beim Verbringen des behandelten Bodenmaterials in die Umwelt vorzusehen. Ihr Umfang und ihre Häufigkeit sind mit der zuständigen Behörde vorab oder nach Abschluß der Behandlung abzustimmen und die Finanzierung festzulegen bzw. zu klären. In Abhängigkeit von den Restkonzentrationen und von den relevanten Schadstoffen sowie von der Nutzung der zur Verbringung des Bodenmaterials gewählten Fläche können Kontrolluntersuchungen gestaffelt innerhalb einer oder mehrerer Vegetationsperioden erfolgen. Dabei sollte darauf geachtet werden, daß diese Untersuchungen keine Verzögerung in der Endberichterstattung über die Sanierungsmaßnahme verursachen und separat abrechenbar vorgesehen werden.

4.4.6 Einsatz in der Erfolgskontrolle von großtechnischen Verfahren

Siehe dazu die Ausführungen in dem Anlagenband zum Konzept für die wissenschaftliche Begleitung (KwB/AB/Anlage 5) [41], welches im Rahmen der maßstabsgerechten Erprobung von biologischen Sanierungsverfahren – Verbundvorhaben 6 – erarbeitet wurde.

4.5 Humantoxikologische Untersuchungen im Arbeitsschutz

André Dahn

Im folgenden wird auf die Humantoxizität beim Umgang mit Altlasten und im Verlauf von Altlastensanierungen eingegangen. Es wird davon ausgegangen, daß bei Einhaltung der Vorschriften zur Arbeitssicherheit und ordnungsgemäßem Betrieb von Bodenbehandlungsanlagen eine Gefährdung sich nur auf die Anlage selbst und die nahe Umgebung beschränkt.

Der Umgang mit kontaminierten Böden und die biologische Bodensanierung erfordern sorgfältige Schutzmaßnahmen. Dazu gehört u.a.

- die Gefährdungsermittlung für die geplanten Sanierungsmaßnahmen, d.h. die Gefährdung durch schädliche Substanzen, kontaminierte Stäube und durch die eingesetzten bzw. sich aufgrund der Bodenbehandlung entwickelnden Mikroorganismenpopulationen,
- die arbeitsmedizinische Betreuung. Sie sollte das in der Bauwirtschaft etablierte "Arbeitsmedizinische Untersuchungsprogramm auf Altlasten" und Untersuchungen zum Biological (Effekt) Monitoring beinhalten. Diese Untersuchungen umfassen neben mikrobiologischen Parametern auch die klimatischen Parameter und erfolgen nach den Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe [55]. Bestimmt werden die luftgetragenen Mikroorganismen und der hygienisch relevante Keimbesatz im Boden-Substrat-Gemisch,
- die Auswahl und Erprobung geeigneter Arbeitsschutzmaßnahmen, um mögliche Expositionen ausschließen zu können, Maßnahmen zur Einhaltung der Arbeitssicherheit.

Zu den Gefahren bei Bodensanierungen gehören zum einen die Toxizität der Schadstoffe, Schadstoffmetabolite und der betriebstechnisch entstehenden kontaminierten Stäube und zum anderen verfahrenstypische Gefahren durch die biologischen Arbeitsstoffe.

4.5.1 Toxizität von Schadstoffen und deren Metaboliten und kontaminierter Stäube

Die Aufnahme der Schadstoffe in den Menschen erfolgt im wesentlichen über Atemluft, Hautkontakt und orale Aufnahme. Bei Einhaltung der Arbeitsschutzmaßnahmen ist der Hauptpfad der Schadstoffausbreitung der Luftpfad. Sowohl flüchtige Schadstoffe als auch kontaminierte Stäube können so in die Raum- und Umgebungsluft transportiert und über die Atemluft aufgenommen werden.

Folgende Wirkungsweisen schädlicher Stoffe können auftreten: Störung der Enzymreaktionen, Schädigung von Organen, Hautschädigungen, Karzinogenität, Mutagenität, Teratogenität, Allergien.

Zur Vermeidung von erhöhten Expositionen mit kanzerogenem Material bzw. zur Einhaltung von vorgegebenen Richtwerten müssen ausgewählte humantoxikologische Untersuchungen durchgeführt werden (Tab 4.7).

Tab. 4.7 Untersuchungen zur Toxizität relevanter Schadstoffe und kontaminierter Stäube

Untersuchung	Richtlinie
Air-Monitoring	
Schadstoffgehalt in der Umgebungsluft ⁽¹⁾	TA Luft 1986 [54]
Schadstoff-Gehalt in der Raumluft	Hauptverband der gewerbl. Berufsgenossenschaften 1997 [34]
Schadstoffbelastung am Arbeitsplatz	TBG 1993 [49], SABBIONI u. BEYERBACH 1995 [51], SABBIONI et al. 1996 [52]
Humantoxikologische Untersuchungen	
Urinmetabolite	TBG 1993 [49], SABBIONI u. BEYERBACH 1995 [51], SABBIONI et al. 1996 [52]
Hämoglobin-Addukte	TBG 1993 [49], SABBIONI u. BEYERBACH 1995 [51], SABBIONI et al. 1996 [52]

⁽¹⁾ (Immissionsschutz)

4.5.2 Gefährdungspotential durch biologische Arbeitsstoffe

Während der Bodensanierung durch biologische Verfahren kommt es i.d.R. zu einer deutlichen Erhöhung der Mikroorganismenzahlen. Dieses Gefährdungspotential muss durch Schutzmaßnahmen minimiert werden und mögliche schädliche Auswirkungen müssen kontrolliert werden. Mögliche Untersuchungen sind in Tabelle 4.8 zusammengefasst.

Tab. 4.8: Untersuchungen zum Gefährdungspotential durch biologische Arbeitsstoffe

Untersuchung	Richtlinie
Biologische Sicherheit	
Luftgetragene Mikroorganismen	TRBA 1997 [55], BIA-Arbeitsmappe 1997 [4]
Biologische Arbeitsstoffe	
Hygienisch relevanter Keimbesatz im Bodensubstrat-Gemisch	TRBA 1997 [55], ALEF 1991 [2], SCHINNER 1993 [53], LAGA M 10 [44]

4.6 Anlagen

Bezeichnung	Verantwortlich für die Erarbeitung	Bestätigung bzw. Mitzeichnung durch	Bemerkungen
Probennahmedokumentation (PD)	Projektbearbeiter	–	Zusammenstellung aller Unterlagen zwecks Nachweisführung, Aufbewahrung in der Themenakte
Beprobungsplan (BP)	Projektbearbeiter	Projektleiter	Übergabe des bestätigten Beprobungsplanes an Probennehmer, nach Abschluß der Probennahme Rückgabe an Projektbearbeiter
Probennahmeprotokolle (PP)	Probennehmer	Projektbearbeiter	Nach Abschluß der Probennahme Übergabe an Projektbearbeiter
Probenbegleitscheine (PS)	Probennehmer	Transporteur Labormitarbeiter	Mitführung beim Transport (2 fach), nach Bestätigung der Übernahme Rückgabe von 1 Expl. an Projektbearbeiter
Analyseplan (AP)	Projektbearbeiter	Projektleiter	Übergabe an Laborleiter vor Beginn der Probennahme
Prüfbericht/ Analysenprotokoll (PB)	Labormitarbeiter	Laborleiter	Übergabe des bestätigten Berichtes an Projektleiter

4.6.1 Anlage: Probennahmedokumentation

Probennahmedokumentation

Nr.: PD_

Projekt:	
Projektleiter:	
Objekt:	
Beprobungszeitraum:	

Zur Dokumentation gehören:

	Nummer/ Kennzeichen
Beprobungsplan	BP_
Probennahmeprotokolle	PP_
Probenbegleitscheine	
Analyseplan	AP_
Prüfberichte (Analysenprotokolle)	PB_

4.6.2 Anlage: Beprobungsplan

Seite 1 von ..

Beprobungsplan Nr.: BP_

Datum:

Projekt:		Objekt:	
Projektleiter:		Beprobungszeitraum:	
Erarbeiter:		Probennehmer:	

Bereitzustellende Unterlagen/ Geräte	vorhanden		Bemerkungen/ Hinweise	überegeben / Datum
	ja	nein		
Betretungsgenehmigung				
Arbeits- und Sicherheitsplan/ Betriebsanweisung				
Persönliche Schutzausrüstungen				
Lageplan/ -skizze der Probennahmepunkte				
Probennahmegeräte				
Probengefäße				

Ergänzende Angaben/ Hinweise:	
Arbeitsschutzmaßnahmen/Gefährdungen	
Erforderliche Abstimmungen mit beteiligten Firmen	
Entnahme von Vergleichsproben	
Zugehöriger Analyseplan	Nr. AP_

(Fortsetzung: Nächste Seite)

Durchzuführende Arbeiten: (Zutreffendes ankreuzen, Arbeiten bei Bedarf ggf. ergänzen)			
Probennahme Boden	<input type="checkbox"/>	Einmessen nach Lage	<input type="checkbox"/>
Probennahme Bodenmaterial/ Haufwerk	<input type="checkbox"/>	Einmessen nach Höhe	<input type="checkbox"/>
Probennahme Boden(-material)/ Handschürfe	<input type="checkbox"/>	Einmessen nach Tiefe (Haufwerk) ca.	<input type="checkbox"/>
Probennahme Boden(-material)/ Handbohrung	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Probennahme Boden(-material)/ RKS	<input type="checkbox"/>	Entsorgung Probenmaterial	<input type="checkbox"/>
· Kerndurchmesser [.....mm]	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Probennahme Bodenluft	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Probennahme Bodenluftprüfröhchen	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
Probennahme Sickerwasser	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

Bemerkungen / Besonderheiten zur Probennahme:	
(u.a. Hinweise zu Probenvorbehandlung, Rückstellproben, Dringlichkeiten, Lagerungs- und Transportbedingungen)	
-Probenlagerung bis zum Transport:	-18° C
-Temperatur beim Transport:	≤ 4° C

4.6.3 Anlage: Probennahmeprotokoll**Probennahmeprotokoll (Boden/ Bodenmaterial) Nr. PP_****Probenbezeichnung(en):****1 Stammdaten**

Probennahmetag/ Uhrzeit:

Anlaß/ Grund:

Beprobungsplan BP

Ort/ Objekt:

Bezeichnung des Probennahmepunktes:

Probennehmer/ Firma:

Untersuchungsparametergruppe: STV MKW SM PAK CKW
Sonstige, und zwar:**2 Probennahme**

Art der Probennahme:

Gerät:

Einzel-/ Mischprobe:

Bei Mischprobe:

Anzahl der Einstiche:

Endtiefe/Tiefenintervall [m]:

Probenbildung:

Art des Probengefäßes:

Braunglasflaschen (mit Schraubverschluß)
(einschl. Art des Verschlusses)

Probenvorbehandlung (Art, Datum/Zeit):

(Fortsetzung: Nächste Seite)

3 Probenbeschreibung

Probenmenge(n) [ml]:

Zustand der Probe: gestört

Einflüsse auf die Probe
(z. B. Witterung, Niederschläge, Raumklima):

Beobachtungen bei der Probennahme
(z. B. Gasentwicklung, Reaktionen):

Hinweise/ Ergebnisse von gleichzeitigen
Vor-Ort-Untersuchungen:

Probenbezeichnung	
Konsistenz, Feuchte, Farbe	
Verunreinigungen	
Bemerkungen/ Besonderheiten	

Sonstige Bemerkungen (zur Probennahme/
zu Probennahmebedingungen)

Wurden Vergleichsproben entnommen,
ggf. durch wen?

4 Lage des(r) Probennahmepunkte(s)

5 Lagerung und Transport der Probe(n)

Probenlagerung bis zum Abtransport
(Datum/Zeit der Einlagerung, Behältnis, Temperatur usw.):

Probenbegleitschein Nr.: PS

Ort, Datum:

Unterschrift: Probennehmer

Transportbedingungen:

Fahrzeug:

Behälter:

Lagertemperatur:

Übernehmender

am Probennahmeort:

...../..... Datum/ Uhrzeit:

Name /Unterschrift

Transport durch:

...../.....

Name /Unterschrift

Übernehmender im Labor:

...../..... Datum/ Uhrzeit:

Name /Unterschrift

Bemerkungen / Besonderheiten zur analytischen Untersuchung:

(u.a. Hinweise zu Rückstellproben, Dringlichkeiten, Lagerungsbedingungen, Probenentsorgung)

Unterschriften:

Projektleiter:

Erarbeiter Analyseplan:

4.6.6 Anlage: Prüfbericht

Prüfbericht Nr.: PB_

Datum:

Angaben zum Labor:

(u.a. Bezeichnung, Adresse, Akkreditierungen)

Angaben zum Auftraggeber:

(u.a. Bezeichnung, Adresse, Telefon-Nr.)

Projekt:		Objekt:	
Projektleiter:		Probeneingang:	
Bearbeiter:			

Allgemeine Hinweise zum Prüfbericht:

Folgende Anlagen sind Bestandteile des Prüfberichtes:

- Spektren und/ oder Chromatogramme
- Erweiterte Methodenbeschreibung
- Graphische Ergebnisdarstellung

Unterschriften:

Verantwortlicher Bearbeiter:

Prüfer/ Laborleiter:

4.7 Literatur

1. **Achtnich, C., U. Sieglen, H.-J. Knackmuss, and H. Lenke.** 1999. Irreversible binding of biologically reduced 2,4,6-trinitrotoluene to soil. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**:2418-2323.
2. **Alef, K.** 1991. Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie. ecomed Landberg/Lech.
3. **BGR 128:** Berufsgenossenschaftliche Regeln für Sicherheit und Gesundheit bei der Arbeit Nr. 128: Kontaminierte Bereiche.
4. **BIA-Arbeitsmappe** 1997. Biologische Arbeitsstoffe. Loseblattsammlung. 18. Lfg. Kennziffer 9400ff.
5. **Bundesbodenschutz- und Altlastenverordnung (BBodSchV).** 16.07.1999. Bundesgesetzblatt **36**:1554.
6. **DEV 1995:** Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, 33. Lieferung, Weinheim.
7. **DIN 32645:05.94.** Chemische Analytik – Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze – Ermittlung unter Wiederholungsbedingungen – Begriffe, Verfahren, Auswertung.
8. **DIN 38405.** Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchungen: Beschreibung verschiedener Analyseverfahren.
9. **DIN 38406.** Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchungen: Beschreibung verschiedener Analyseverfahren zur Bestimmung von Kat- und Anionen.
10. **DIN 38407 F21** (Entwurf, eingereicht zur Normung): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung gemeinsam erfaßbarer Stoffe (Gruppe F), Teil 21: Bestimmung ausgewählter Explosivstoffe und verwandter Verbindungen durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit UV-Detektion.
11. **DIN 38412-30.** 1989. Testverfahren mit Wasserorganismen – Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Daphnien über Verdünnungsstufen.
12. **DIN 38412-33.** 1991. Testverfahren mit Wasserorganismen – Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen.
13. **DIN 38412-37.** 1999. Testverfahren mit Wasserorganismen. Teil 37: Bestimmung der Hemmwirkung von Wasser auf das Wachstum von Bakterien (*Photobacterium phosphoreum*-Zellvermehrungshemmtest).
14. **DIN 38415-3.** (1996) Suborganismische Testverfahren (GruppeT) Teil 3: Bestimmung des erbgutverändernden Potentials von Wasser mit dem umu-Test (T3).
15. **DIN 38415-4** Entwurf (Stand 1998): Suborganismische Testverfahren (GruppeT) Teil 4: Bestimmung des erbgutverändernden Potentials von Wasser mit dem Ames-Test.
16. **DIN 4021:10.90** Baugrund – Aufschluß durch Schürfe und Bohrungen sowie Entnahme von Proben.

17. **DIN EN ISO 11348.** 1999. Testverfahren mit Wasserorganismen – Bestimmung der Hemmwirkung von Wasser auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest).
18. **DIN ISO 11267 (mod.)**.1997. Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Bodenschadstoffen auf Collembolen (*Folsomia candida*) – Verfahren zur Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung.
19. **DIN ISO 11268-1+2.** 1997. Bodenbeschaffenheit – Wirkungen von Schadstoffen auf Regenwürmer (*Eisenia fetida*) – Teil1: Verfahren zur Bestimmung der akuten Toxizität unter Verwendung von künstlichem Bodensubstrat. Teil 2: Verfahren zur Bestimmung der Wirkung auf die Reproduktionsleistung.
20. **DIN ISO 11269-2.** 1995. Bodenbeschaffenheit – Bestimmung der Wirkungen von Schadstoffen auf die Bodenflora – Teil 2: Wirkung von Chemikalien auf Saataufbau und Wachstum höherer Pflanzen.
21. **Drzyga, O., D. Bruns-Nagel, T. Gorontzy, K.-H. Blotvogel, D. Gemsa, and E. von Löw.** 1998. Incorporation of ¹⁴C-labeled 2,4,6-Trinitrotolulene metabolites into different soil fraction after anaerobic-aerobic treatment of soil/molasses mixture. *Environ. Sci. Technol.* **32**:3529-3535.
22. **E DIN/ISO 14507:02.90.** Bodenbeschaffenheit – Probenvorbehandlung für die Bestimmung von organischen Verunreinigungen in Böden.
23. **Ehrlichmann H., Dott W., Eisenträger A.** 2000. Assessment of the water extractable genotoxic potential of contaminated soil samples. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* in press
24. **Ehrlichmann H.** 1999 Entwicklung eines Konzepts zur Bewertung des wässrig extrahierbaren genotoxischen Potentials kontaminierter Böden mit optimierten und miniaturisierten prokaryontischen Testverfahren. Dissertation, RWTH Aachen, Shaker Verlag, Aachen.
25. **EN DIN 45001:5.90.** Allgemeine Kriterien zum Betreiben von Prüflaboratorien.
26. **Erste Verordnung zum Sprengstoffgesetz** in der Neufassung der Bekanntmachung vom 31. Januar 1991, geändert durch die Verordnung vom 26. Oktober 1993.
27. **Eschenbach, A., R. Wienberg, and B. Mahro.** 1998. Fate and stability of nonextractable residues of [¹⁴C]PAH in contaminated soils under environmental stress conditions. *Environ. Sci. Technol.* **32**:2585-2590.
28. **Eschenbach, A., R. Wienberg, and B. Mahro.** 2000. Formation, long-term stability and fate of non-extractable ¹⁴C-PAH-residues in contaminated soils. *In* Wise, D. L., D. J. Trantolo, E. J. Cichon. (Eds.) *Remediation of hazardous waste contaminated soils.* 2nd Edition, Marcel Dekker, Inc., New York. in press.
29. **Gefahrgutverordnung Straße - GGVS** vom 12. Dezember 1996 (BGBl. I S. 1886)
30. **Gesetz über explosionsgefährliche Stoffe** (Sprengstoffgesetz - SprengG) in der Neufassung der Bekanntmachung vom 14. April 1986, geändert durch das Gesetz vom 28. Juni 1990

31. **Gesetz zum Schutz vor schädlichen Bodenverunreinigungen und zur Sanierung von Altlasten** (Bundes-Bodenschutzgesetz-BBodSchG) vom 17. März 1998. BGBl. I Nr. 16/1998, S. 502.
32. **Griest, W. H., A. J. Stewart, C.-H. Ho, R. L. Tyndall, A. A. Vass, J. E. Caton, and W. M. Caldwell.** 1994. Characterization of explosives processing waste decomposition due to composting. US Army Report ORNL/TM12812.
33. **Haas, R. und G. Storck.** 1989. Konzept zur Untersuchung von Rüstungsaltslasten. 1. Untersuchung ehemaliger TNT-Fabriken und Füllstationen. Fresenius Z. Anal. Chem. 335:839-846.
34. **Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften.** 1997. Von den Berufsgenossenschaften anerkannte Analysenverfahren zur Feststellung der Konzentrationen krebserzeugender Arbeitsstoffe in der Luft in Arbeitsbereichen. Carl Heymanns Verlag, Köln.
35. **Herre, A., K. Scheibner, M. Kästner, and W. Fritsche.** 1999. Aerobe Behandlung von U-¹⁴TNT-dotiertem Boden mit ligninolytischen Pilzen – Bildung und Remobilisierbarkeit der gebundenen Rückstände. In Umweltbundesamt (Hrsg.) Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen. Tagungsband zum Statusseminar des BMBF-Verbundvorhabens „Biologische Verfahren zur Bodensanierung“, 22. und 23.10.1998 in Bremen. G1-17.
36. **Hilker, J.** Qualitätsmanagement nach DIN ISO 9000 ff. in WEKA Praxislösungen „Boden schützen, Altlasten sanieren“, WEKA Fachverlag für technische Führungskräfte, Augsburg, 1999.
37. **ISO WD 1638.** 1998. Soil quality - effects of pollutants on enchytraea; Method of the determination of effects on reproduction.
38. **ISO/CD 15685,** 1999. Soil Quality – Ammonium Oxidation, a rapid method to test potential nitrification in soil.
39. **ISO/CD 17155.** 2000. Entwurf: Soil quality - Soil respiration curves.
40. **ISO/TC 190/SC 4/WG 3 N 58.** 2000. Entwurf: Soil quality – Chronic toxicity in higher plants.
41. **Konzept für wissenschaftliche Begleitung** einschließlich Anlagenband: IABG, Verbundvorhaben 6 im Rahmen des BMBF-Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", 2000.
42. **Kreysa, G. and J. Wiesner** (eds.). 1995. Bioassays for soils. DECHEMA (Deutsche Gesellschaft für Chemisches Apparatewesen, Chemische Technik und Biotechnologie e.V.), Frankfurt. 45 pp.
43. **Kwan, K. K.** 1991. Qualitative Direct sediment toxicity testing procedure (DSTTP). NWRI Contribution No. 91-90.
44. **Länderarbeitsgemeinschaft Abfall, LAGA M 10.** 1998. Länderarbeitsgemeinschaft Abfall. Anforderungen an die stoffliche Verwertung von mineralischen Reststoffen/Abfällen. Technische Regeln.
45. **lfu BAWÜ 1994:** Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg (Hrsg.): Grundwasserüberwachungsprogramm: Beprobung von Grundwasser – Literaturstudie, 2., unveränderte Auflage, Karlsruhe, 1994.
46. **Materialien zur Altlastenbearbeitung** des Landes Brandenburg, Band 4, 8, 1998.

47. **Materialien zur Altlastenbehandlung.** Probenahme bei der Technischen Erkundung von Altlasten, Freistaat Sachsen, Landesamt für Umwelt und Geologie, 3/1998.
48. **Richnow, H. H., A. Eschenbach, B. Mahro, M. Kästner, E. Annweiler, R. Seifert, and W. Michaelis.** 1999. The formation of nonextractable soil residues – a stable isotope approach. *Environ. Sci. Technol.* **33**:3761-3767.
49. **Rumler, R. und K. König.** 1993. Leitfaden der arbeitsmedizinischen Betreuung von Arbeitnehmern in kontaminierten Bereichen (2. Auflage, Juni 1993), Tiefbau- Berufsgenossenschaft, Arbeitsmedizinischer Dienst, Landsberger Strasse 309, 80687 München.
50. **Rumler, R. und G. Sabbioni.** Maßstabsgerechte Erprobung biologischer Verfahren mit Erfolgskontrolle auf dem Standort Werk "Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld, Beitrag: Arbeitsmedizin und Toxikologie, 1999.
51. **Sabbioni, G. and Beyerbach, A.** (1995) Determination of hemoglobin adducts of arylamines in humans. *J. Chromatogr.*, **667**, 75-83.
52. **Sabbioni, G., J. Wei, and Y.-Y. Liu.** 1996. Determination of hemoglobin adducts in workers exposed to 2,4,6-trinitrotoluene. *J. Chromatogr.* **682**:243-248.
53. **Schinner, F. et al (ed.).** 1993. Bodenbiologische Arbeitsmethoden. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo.
54. **TA Luft.** 1986. Erste allgemeine Verwaltungsvorschrift zum Bundesimmissionsschutzgesetz (Technische Anleitung zur Reinhaltung der Luft vom 27.2.1986). GMBI. S. 95.
55. **TRBA.** 1997. Technische Regeln für biologische Arbeitsstoffe. Bundesarbeitsblatt.
56. **ZH 1/183:** Regeln für Sicherheit und Gesundheitsschutz bei der Arbeit in kontaminierten Bereichen, Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften – Fachausschuß Tiefbau, Ausgabe April 1997 (neu: siehe BGR 128).

5 Rechtliche Rahmenbedingungen der biologischen Bodensanierung

Helmut Fouquet

5.1 Einleitung

Die Sanierung des kontaminierten Bodens wirft eine Reihe von Rechtsfragen auf. Sie betreffen zunächst die Entscheidung über die Durchführung der Sanierung, insbesondere das Bestehen und die Reichweite von Sanierungspflichten. Diese ist vor allem durch das BBodSchG geregelt. Weiter enthält das KrW-/AbfG bedeutsame Vorschriften für den Umgang mit dem kontaminierten Material. Regelungen über die Errichtung und den Betrieb von Bodenbehandlungsanlagen finden ihre Grundlage primär im BImSchG, den Landes-Bauordnungen sowie dem WHG in Verbindung mit den Landes-Wassergesetzen.

Im einzelnen ist im folgenden einzugehen auf:

- die Pflicht zur Bodensanierung (Kap. 5.2),
- die abfallrechtliche Einordnung kontaminierten Bodens (Kap. 5.3),
- das Anlagenrecht (Kap. 5.4) sowie
- den Wiedereinbau des entnommenen Bodens (Kap. 5.5).

Nur hinzuweisen ist an dieser Stelle auf die Vielzahl zusätzlicher Probleme auch rechtlicher Art, die beim – praktisch bisher kaum relevanten – Einsatz gentechnisch veränderter Organismen auftreten.

5.2 Sanierungspflicht

Nach der zentralen Sanierungsvorschrift des § 4 Abs. 3 Satz 1 BBodSchG sind der Verursacher einer schädlichen Bodenveränderung oder Altlast sowie dessen Gesamtrechtsnachfolger, der Grundstückseigentümer und der Inhaber der tatsächlichen Gewalt über ein Grundstück verpflichtet, den Boden und Altlasten sowie durch schädliche Bodenveränderungen und Altlasten verursachte Verunreinigungen von Gewässern so zu sanieren, daß dauerhaft keine Gefahren, erheblichen Nachteile oder erheblichen Belästigungen für den einzelnen oder die Allgemeinheit entstehen (ausführlich zum folgenden FOUQUET [15]).

Rechtlich ist die Sanierungspflicht in zweifacher Hinsicht von Bedeutung: Sie steuert zum einen die Entscheidung über die Durchführung der Sanierung. Zum anderen trifft sie eine Regelung über die Finanzierung der zu treffenden Maßnahmen. Ist ein Verantwortlicher nicht greifbar, so bleibt die Sanierungsentscheidung ein gesetzlich nicht eigens geregelter Vorgang innerhalb der Verwaltung. Die Kosten fallen notwendigerweise der Allgemeinheit zur Last.

5.2.1 Gefahren und Maßnahmen

5.2.1.1 Abzuwehrende Störungen

Schädliche Bodenveränderungen

Schädliche Bodenveränderungen definiert § 2 Abs. 3 BBodSchG als Beeinträchtigungen der Bodenfunktionen, die geeignet sind, Gefahren, erhebliche Nachteile oder erhebliche Belästigungen für den einzelnen oder die Allgemeinheit herbeizuführen.

Ausgangspunkt ist mithin eine Beeinträchtigung der in § 2 Abs. 2 beschriebenen Bodenfunktionen. Der Begriff des Bodens umfaßt in räumlicher Hinsicht die oberste Schicht der Erdkruste, einschließlich der gasförmigen (Bodenluft) und flüssigen Bestandteile (Bodenlösung), mit Ausnahme des Grundwassers, d.h. der gesättigten Zone und der Grundwasserbetten (§ 2 Abs. 1 BBodSchG), deren Schutz allein durch das Wasserrecht geregelt ist (NIES [37], § 2 BBodSchG Rnr. 5; QUEITSCH [45], Rnr. 15; RADTKE [46], § 2 Rnr. 5 ff.; SANDEN [51], § 2 Rnr. 8 f.; PEINE [43], S. 361 f.). Die Bodenfunktionen umfassen in erster Linie die natürlichen Funktionen (§ 2 Abs. 2 Nr. 1 BBodSchG) als

- Lebensgrundlage und Lebensraum für Menschen, Tiere, Pflanzen und Bodenorganismen;
- Bestandteil des Naturhaushalts, insbesondere mit seinen Wasser- und Nährstoffkreisläufen sowie
- Abbau-, Ausgleichs- und Aufbaumedium für stoffliche Einwirkungen auf Grund der Filter-, Puffer- und Stoffumwandlungseigenschaften, insbesondere auch zum Schutz des Grundwassers.

Daneben nennt das Gesetz Funktionen als Archiv der Natur- und Kulturgeschichte (§ 2 Abs. 2 Nr. 2 BBodSchG) sowie Nutzungsfunktionen (§ 2 Abs. 2 Nr. 3 BBodSchG) als

- Rohstofflagerstätte,
- Fläche für Siedlung und Erholung,
- Standort für die land- und forstwirtschaftliche Nutzung und
- Standort für sonstige wirtschaftliche und öffentliche Nutzungen, Verkehr, Ver- und Entsorgung.

Stoffliche Einträge bilden dabei den Schwerpunkt der in der Praxis vorkommenden Beeinträchtigungen (vgl. QUEITSCH [45], Rnr. 21).

Der **Begriff der Gefahr** entstammt dem allgemeinen Polizeirecht. Im Rahmen der Bestimmung des Begriffs "schädliche Bodenveränderungen" bezeichnet er Beeinträchtigungen von Rechtsgütern des Einzelnen sowie der Allgemeinheit, wie etwa des Lebens, der Gesundheit und des Eigentums sowie der öffentlichen Wasserversorgung, insbesondere des Grundwassers, und des Bodens selbst. Die Begriffe "erheblicher Nachteil" und "erhebliche Belästigung" sind dem BImSchG entnommen. Als Nachteil wird die Beeinträchtigung von Interessen verstanden, mit der keine Verletzung eines Rechtsguts verbunden ist, insbesondere Vermögenseinbußen. Belästigungen sind insbesondere Beeinträchtigungen des körperlichen oder seelischen Wohlbefindens, etwa durch Geruchsemissionen. Erheblich sind solche Nachteile und Belästigungen, die auch im Hinblick auf die Vielfalt der Bodennutzungen in einem hochindustrialisierten und dichtbesiedelten Land wie Deutschland dem Einzelnen und der

Allgemeinheit nicht mehr zumutbar sind. Erforderlich ist mithin eine Abwägung der Nutzungs- und der Schutzinteressen (FOUQUET [15], S. 9 ff.; HILGER [21], Rnr. 45 f.; NIES [37], BBodSchG § 2 Rnr. 25; SANDEN [51], § 2 Rnr. 44 ff.; QUEITSCH [45], Rnr. 28 ff.; NUMBERGER [38], § 2 Rnr. 17 ff.).

Mit dem sehr weiten Wahrscheinlichkeitsmaßstab der Eignung, Gefahren, erhebliche Nachteile oder erhebliche Belästigungen hervorzurufen, dürften alle Beeinträchtigungen der Bodenfunktionen von dem Begriff der schädlichen Bodenveränderungen erfaßt sein, die sich nicht auf den eingetretenen Zustand beschränken, sondern sich innerhalb des Bodens oder anderer Umweltmedien, namentlich des Wassers oder der Luft, ausbreiten oder sich organisch oder sozial über ein zumutbares Maß hinaus auf den Menschen auswirken (vgl. a. HILGER [22], § 4 Rnr. 26).

Altlasten

Altlasten sind definiert als

1. stillgelegte Abfallbeseitigungsanlagen sowie sonstige Grundstücke, auf denen Abfälle behandelt, gelagert oder abgelagert worden sind (Altablagerungen), und
2. Grundstücke stillgelegter Anlagen und sonstige Grundstücke, auf denen mit umweltgefährdenden Stoffen umgegangen worden ist (Altstandorte),

durch die schädliche Bodenveränderungen oder sonstige Gefahren für den Einzelnen oder die Allgemeinheit hervorgerufen werden (§ 2 Abs. 5 BBodSchG). Im Hinblick auf Bodenbeeinträchtigungen bilden die Altlasten somit einen Spezialfall der schädlichen Bodenveränderung nach § 2 Abs. 3 BBodSchG, der nach den §§ 11 ff. BBodSchG ein besonderes Sanierungsmanagement eröffnet (QUEITSCH [45], Rnr. 41).

Maßnahmenwerte

§ 8 Abs. 1 Satz 2 Nr. 2 BBodSchG ermächtigt die Bundesregierung, durch Rechtsverordnung nach Anhörung der beteiligten Kreise und mit Zustimmung des Bundesrats Werte für Einwirkungen oder Belastungen festzulegen, bei deren Überschreiten unter Berücksichtigung der jeweiligen Bodennutzung in der Regel von einer schädlichen Bodenveränderung oder Altlast auszugehen ist und Maßnahmen erforderlich sind. Derartige **Maßnahmenwerte** enthält Anhang 2 BBodSchV für (siehe Anhang 1)

- die direkte Aufnahme von Dioxinen/Furanen auf Kinderspielflächen, in Wohngebieten, Park- und Freizeitanlagen und Industrie- und Gewerbegrundstücken (Nr. 1.2) sowie
- den Schadstoffübergang Boden - Nutzpflanze im Hinblick auf die Pflanzenqualität (Nr. 2.2, 2.3).

§ 5 Abs. 4 BBodSchV stellt klar, das es bei der Bewertung, ob eine schädliche Bodenveränderung vorliegt, letztlich stets auf die **Gegebenheiten des Einzelfalls** ankommt. Gesichtspunkte für eine vom numerischen Maßnahmenwert abweichende Beurteilung sind etwa besondere bodenchemische Bedingungen, die z.B. auf eine deutlich verringerte Mobilität der Schadstoffe schließen lassen, sowie die tatsächliche Zugänglichkeit der Fläche oder besondere Nutzungsformen des Bodens (amtliche Begründung, BR-Drs. 780/98, S. 82). § 4 Abs. 8 BBodSchV legt insoweit fest, das eine schädliche Bodenveränderung oder Altlast selbst bei Überschreitung der Maßnahmenwerte nicht besteht bei Böden mit naturbedingt erhöhten Gehalten an Schadstoffen, soweit diese Stoffe nicht durch Einwirkungen auf den

Boden in erheblichem Umfang freigesetzt wurden. Bei Böden mit großflächig siedlungsbedingt erhöhten Schadstoffgehalten kann ein Vergleich dieser Gehalte mit den im Einzelfall ermittelten Schadstoffgehalten in die Gefahrenbeurteilung einbezogen werden.

Soweit in der Verordnung für einen Schadstoff kein Prüf- oder Maßnahmenwert festgesetzt ist, sind bei der Bewertung die im Bundesanzeiger Nr. 161a v. 28.8.1999 veröffentlichten zur Ableitung der entsprechenden Werte herangezogenen Methoden und Maßstäbe zu beachten (§ 4 Abs. 5 BBodSchV). Dadurch wird klargestellt, daß die Bewertung von Bodenkontaminationen nach den Anforderungen der Verordnung vorzunehmen ist und nicht anhand der bisher kursierenden (vgl. unten Kap. 5.2.2.1: Veränderter technisch-wissenschaftlicher Erkenntnisstand) oder zukünftiger anderer Bodenwert-Listen und Bewertungsgrundsätze (amtliche Begründung, BR-Drs. 780/98, S. 81; vgl. a. KOBES [31], S. 264 f.).

5.2.1.2 Sanierungsziele und -maßnahmen

Ziel der Sanierung ist die dauerhafte Verhinderung von Gefahren, erheblichen Nachteilen und erheblichen Belästigungen. Maßstab ist in erster Linie das sich aus der planungsrechtlich zulässigen Nutzung der betreffenden Grundstücke ergebende Schutzbedürfnis, soweit dies mit dem Schutz vor allem der natürlichen Bodenfunktionen nach § 2 Abs. 2 Nr. 1 BBodSchG zu vereinbaren ist (§ 4 Abs. 4 Satz 1 BBodSchG). Für nach dem Inkrafttreten des Gesetzes am 1.3.1999 eingetretene schädliche Bodenveränderungen (sog. "Neulasten") schreibt § 4 Abs. 5 die Beseitigung der Schadstoffe verbindlich vor, soweit dies im Hinblick auf die Vorbelastung des Bodens verhältnismäßig und dem Verursacher unter dem Gesichtspunkt des Vertrauensschutzes nach Satz 2 zuzumuten ist. Die bei der Sanierung von Gewässern zu erfüllenden Anforderungen bestimmen sich nach dem Wasserrecht (§ 4 Abs. 4 Satz 3 BBodSchG).

Als **Sanierungsmaßnahmen** kommen bei Belastungen mit Schadstoffen an erster Stelle Dekontaminationsmaßnahmen zur Beseitigung oder Verminderung der Schadstoffe (§ 2 Abs. 7 Nr. 1) in Betracht. Sie sind gemäß § 5 Abs. 1 BBodSchV zur Sanierung geeignet, wenn sie auf technisch und wirtschaftlich durchführbaren Verfahren beruhen, die ihre praktische Eignung zur umweltverträglichen Beseitigung oder Verminderung von Schadstoffen gesichert erscheinen lassen. Dabei sind auch die Folgen des Eingriffs insbesondere für Böden und Gewässer zu berücksichtigen. Daneben kommen Sicherungsmaßnahmen in Betracht, die eine Ausbreitung der Schadstoffe langfristig verhindern oder vermindern, ohne die Schadstoffe zu beseitigen (§ 2 Abs. 7 Nr. 2 BBodSchG, § 4 Abs. 3 Satz 2 BBodSchG). Nur soweit diese nicht möglich oder unzumutbar sind, sind sonstige Schutz- und Beschränkungsmaßnahmen, insbesondere Nutzungsbeschränkungen, durchzuführen (§ 4 Abs. 3 Satz 3, § 2 Abs. 8 BBodSchG).

Vorbereitend soll bei Altlasten, bei denen wegen der Verschiedenartigkeit der erforderlichen Maßnahmen ein abgestimmtes Vorgehen notwendig ist oder von denen auf Grund von Art, Ausbreitung oder Menge der Schadstoffe in besonderem Maße schädliche Bodenveränderungen oder sonstige Gefahren für den Einzelnen oder die Allgemeinheit ausgehen, die Durchführung von Sanierungsuntersuchungen zur Entscheidung über Art und Umfang der erforderlichen Maßnahmen sowie die Vorlage eines Sanierungsplans verlangt werden (§ 13 Abs. 1 Satz 1 BBodSchG). Die **Sanierungsuntersuchung** dient der Ermittlung der geeigneten, erforderlichen und angemessenen Maßnahmen zur Erfüllung der Pflichten nach § 4

Abs. 3 BBodSchG unter Berücksichtigung von Maßnahmenkombinationen und Begleitmaßnahmen (Anhang 3 Nr. 1 Abs. 1 BBodSchV). Bei ihr ist auch zu prüfen, inwieweit Veränderungen des Bodens nach der Sanierung verbleiben und welche rechtlichen, organisatorischen und finanziellen Gegebenheiten für die Durchführung der Sanierung von Bedeutung sind (§ 6 Abs. 1 BBodSchV). Auf der Sanierungsuntersuchung aufbauend stellt der **Sanierungsplan** das beabsichtigte Vorgehen vollständig unter Einschluß der Eignung der Maßnahmen, ihrer Auswirkungen auf die Umwelt, der voraussichtlichen Kosten und der erforderlichen Zulassungen textlich und zeichnerisch dar (§ 6 Abs. BBodSchV). Einen Überblick über die Anforderungen an Sanierungsuntersuchungen und Sanierungsplan im einzelnen gibt Anhang 3 BBodSchV. Zur Verbindlicherklärung des Sanierungsplans siehe unten (s. Kap. 5.4.5).

5.2.2 Verantwortlichkeit

Auch für die Bestimmung des für die Durchführung der Sanierung Verantwortlichen hat das BBodSchG eine Rechtsvereinheitlichung auf Bundesebene gebracht. Zahlreiche Rechtsfragen bleiben gleichwohl umstritten und letztlich vom Gesetz ungeklärt.

Mit Blick auf die einzelnen rechtlichen Problembereiche empfiehlt es sich, auch bei der Anwendung des § 4 Abs. 3 Satz 1 BBodSchG an der tradierten Unterscheidung zwischen Verhaltens- und Zustandsverantwortlichkeit festzuhalten.

5.2.2.1 Verhaltensverantwortlichkeit

Als Verhaltensverantwortliche benennt die Vorschrift den Verursacher der schädlichen Bodenveränderung sowie dessen Gesamtrechtsnachfolger.

Verursacher

Die Haftung des Verursachers folgt den hergebrachten sicherheits- und ordnungsrechtlichen **Grundsätzen**, wie sie in der Rechtsprechung auch bisher schon in Altlastenfällen herangezogen wurden (vgl. zum folgenden insbesondere das Urteil des OVG Münster v. 30.5.1996 - 20 A 2640/94 - NVwZ 1997, 507, 508 ff.).

Ihr zugrunde liegt ein Verhalten des Einzelnen, das die schädliche Bodenveränderung oder Altlast verursacht hat. Dieser Ursachenzusammenhang wird juristisch nach ordnungsrechtlich geprägten Maßstäben eingeschränkt. Zurechnungskriterium ist dabei zunächst die Feststellung, daß im Einzelfall durch ein bestimmtes Verhalten die im jeweiligen Ordnungsrecht vorgesehene Gefahrenschwelle überschritten und damit eine unmittelbare Ursache für den Eintritt der Gefahr gesetzt worden ist (OVG Münster v. 7.3.1996 - 20 A 657/95 - NVwZ 1997, 804, 805). Ergänzend sind weitere Kriterien der Rechtswidrigkeit und des Pflichtenverstoßes heranzuziehen, die dazu bestimmt sind, eine angemessene, der verfassungsrechtlich verbürgten Verhältnismäßigkeit gerecht werdende Risikoverteilung zwischen dem Handelnden einerseits und der Allgemeinheit andererseits sicherzustellen. Weil die Frage der Verursachung im Sinne der ordnungsrechtlichen Vorschriften – hier des § 4 Abs. 3 Satz 1 BBodSchG – im Grundsatz unabhängig davon zu beantworten ist, ob das Tun oder Unterlassen subjektiv vorwerfbar und die Gefahr vorhersehbar war, soll durch dieses Korrektiv eine

letztlich konturenlose Gefährdungshaftung für jegliche Folgen gewerblicher Tätigkeit vermieden werden (ausführlich HILGER [22], § 4 Rnr. 47 ff.; FOUQUET [15], S. 21 ff.).

Der bei der Verursachung eingetretener schädlicher Bodenveränderungen, insbesondere bei Altlasten notwendige Vergangenheitsbezug wirft eine Reihe von Zurechnungsproblemen auf, die in der Rechtsprechung und im rechtswissenschaftlichen Schrifttum vielfach noch nicht abschließend geklärt sind. So wendet etwa der VGH Mannheim in einem Beschluß v. 4.3.1996 auf eine spätestens 1936 eingetretene Kontamination Vorschriften des erst 1972 geschaffenen AbfG (Gesetz über die Beseitigung von Abfällen - Abfallbeseitigungsgesetz - v. 7.6.1972, BGBl. I S. 873) an, ohne auf die hier angesprochene Problematik einzugehen (10 S 2687/95 - NVwZ-RR 1996, 387 = ZUR 1996, 214). In dem Urteil v. 27.9.1996 zu einem ähnlich gelagerten Fall begnügt er sich mit der Feststellung, die entsprechenden landesrechtlichen Vorschriften über die Erkundung und Sanierung von Altlasten beinhalteten keine verfassungsrechtlich unzulässige Rückwirkung (10 S 413/96 - VBlBW 1997, 110). Ziel der Bemühungen um eine rechtliche Klärung muß es jedoch sein, die der Haftung zugrunde gelegten Verhaltenskriterien der Rechtslage in der Vergangenheit und den in ihr niedergelegten Wertungen, die die Richtschnur für das rechtskonforme Verhalten bildeten, anzupassen.

Einen ersten Problembereich stellt insoweit die **Fortentwicklung des Rechtsgüterschutzes** im Laufe der Jahrzehnte dar (dazu auch BECKER [1], S. 140 ff.).

So war das Grundwasser erst durch das Inkrafttreten des Wasserhaushaltsgesetzes (WHG) im Jahr 1960 gegen jegliches Hineingelangen von Schadstoffen geschützt (dazu BVerwG v. 16.11.1973 - 4 C 44/69 - DVBl. 1974, 297, 299). Für das Gebiet der ehemaligen DDR dürfte sich ein vergleichbarer Schutz aus dem Wassergesetz v. 17.4.1963 (Gesetz über den Schutz, die Nutzung und die Instandhaltung der Gewässer und den Schutz vor Hochwassergefahren - GBl. I S. 77) ergeben. Das vorher in weiten Gebieten geltende Preußische Wassergesetz v. 7.4.1913 richtete sich hingegen nur gegen solche Verunreinigungen des Grundwassers, durch die im Einzugsbereich einer Wassergewinnungsanlage Gesundheitsgefahren für die Bevölkerung erwachsen oder rechtlich geschützte Interessen privater Dritter gefährdet waren (OVG Münster, a.a.O.; vgl. auch OVG Lüneburg v. 7.3.1997 - 7 M 3628/96 - NJW 1998, 97, 98 = GewArch 1998, 173, 175).

Der Boden war - entgegen anderslautenden Behauptungen im juristischen Schrifttum (z.B. SCHINK [52], S. 364) - bis in jüngere Zeit nur im Rahmen einzelner fachgesetzlicher Abwägungen, nicht aber in einer dem Schutz des Wassers nach dem WHG vergleichbaren Weise umfassend gegen Beeinträchtigungen aller Art geschützt. Ein derartiger Schutz ist auf der Ebene des einfachen Gesetzes erstmals durch die Bodenschutzgesetze der Länder Baden-Württemberg (Gesetz zum Schutz des Bodens - Bodenschutzgesetz - v. 24.6.1991 - Gbl. S. 434), Berlin (Gesetz zur Vermeidung und Sanierung von Bodenverunreinigungen - Berliner Bodenschutzgesetz - v. 10.10.1995 - GVBl. S. 646) und Sachsen (Erstes Gesetz zur Abfallwirtschaft und zum Bodenschutz im Freistaat Sachsen v. 12.8.1991 - GVBl. S. 306) erfolgt. Weiterhin umfaßte die Sanierungspflicht nach § 77 HessWG (Hessisches Wassergesetz v. 22.1.1990, GVBl. I S. 114) auch Bodenverunreinigungen, die eine nachhaltige Beeinträchtigung von Bodeneigenschaften besorgen lassen. Eine entsprechende bundesweite Regelung liegt erst seit dem Inkrafttreten des BBodSchG am 1.3.1999 vor. Zuvor läßt sich ein derartiger Schutz allenfalls auf das 1994 eingeführte Staatsziel Umweltschutz (Art. 20a GG) stützen.

Spezielle Regelungen über das Behandeln, Lagern und Ablagern von Abfällen wurden erst mit dem Abfallgesetz (AbfG) 1972 geschaffen. Vereinzelt Stimmen in der juristischen Literatur, die eine Anwendung dieser Vorschriften auf vorher begründete und fortbestehende abfallrechtswidrige Zustände befürworten (z.B. PAETOW [40], S. 512 f.), ist nicht zu folgen. Umstritten ist, ob die nach den abfallrechtlichen Vorschriften begründete Verpflichtung zur Beseitigung unzulässiger Abfallablagerungen auch noch fortdauert, wenn die Stoffe über einen langen Zeitraum mit dem umliegenden Boden verwachsen sind und so ihre Abfalleigenschaft verloren haben (vgl. unten, Kap. 5.3.3; bejahend VGH München v. 21.11.1988 - 20 CS 88.2324 - NVwZ 1989, 682).

Veränderter technisch-wissenschaftlicher Erkenntnisstand: Aus stärker tatsächlichem Blickwinkel stellt sich das Problem, das vor allem bei zeitlich weit zurückliegenden Altlasten die damaligen Produktionen und Ablagerungen erst aus heutiger Sicht zu einer Gefahr für Schutzgüter der öffentlichen Sicherheit führten, während nach dem damaligen technisch-wissenschaftlichen Erkenntnisstand eine solche nicht als gegeben erachtet werden konnte. Auch insoweit sind zur Bestimmung einer Überschreitung der maßgeblichen Gefahrenschwelle die seinerzeit geltenden Maßstäbe heranzuziehen, weil nur so eine dem Grundsatz der Verhältnismäßigkeit gerecht werdende Begrenzung der Zurechnung von Gefahren gewährleistet ist.

Auf diesem Wege kann den in der Vergangenheit verwendeten Bodenwert-Listen und Bewertungsgrundsätzen (vgl. a. oben, Kap. 5.2.1.1) eine indizielle Bedeutung für den seinerzeitigen technisch-wissenschaftlichen Erkenntnisstand zukommen. Für die sogenannte "Holland-Liste" (Niederländische Liste, siehe Anhang 2) hat das OVG Lüneburg eine indizielle Bedeutung der Überschreitung der dort angegebenen Werte für das Vorliegen einer nachweisbaren Verunreinigung von Boden und Grundwasser angenommen. Zur Begründung einer Sanierungsanordnung genüge daher regelmäßig, daß eine Überschreitung der C-Werte der alten Fassung der "Holland-Liste" festgestellt sei. Der Verantwortliche könne jedoch die dadurch begründete Schädlichkeitsvermutung etwa durch den Nachweis besonderer Umstände des Einzelfalls entkräften (v. 7.3.1997 a.a.O., NJW 1998, 97 = GewArch 1998, 174). Eine ähnliche Bedeutung ist den Maßnahmenschwellenwerten des Anhangs 2 der Empfehlungen für die Erkundung, Bewertung und Behandlung von Grundwasserschäden der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA)[34] (siehe Anhang 3) beizulegen. Eine gesteigerte Verbindlichkeit für die Vollzugspraxis kommt den zur Umsetzung der Empfehlungen oder bereits vorher erlassenen entsprechenden Richtlinien der einzelnen Bundesländer zu (eine Zusammenstellung in Deutschland verwendeter Listen zur Bodenbeurteilung findet sich in Der Rat von Sachverständigen in Umweltfragen [30], Tabelle 1.13). Bei der Anwendung dieser Listen bedarf allerdings der jeweilige Aussagegehalt der in ihnen aufgeführten Werte als bloße Prüf-, als Maßnahmen- oder Sanierungszielwerte stets einer kritischen Würdigung.

Ebenso wie die Gesetzeslage zum Zeitpunkt der Verursachung der schädlichen Bodenveränderung kann auch das Vorliegen einer behördlichen Genehmigung für eine Anlage oder gewerbliche Tätigkeit die Verantwortlichkeit ausschließen. Eine solche **Legalisierungswirkung behördlicher Genehmigungen** wurde von der Rechtsprechung beispielsweise für die immissionsschutzrechtliche Genehmigung während der Betriebsdauer der genehmigten Anlage (BVerwG v. 2.12.1977 - 4 C 75.75 - E 55, 118, 120 f.), für die wasserrechtliche Erlaubnis (BGH v. 3.2.2000 - III ZR 296/98 - DVBl. 2000, 904, 906 = NuR 2000, 410, 411 f.) sowie für gewerberechtliche Genehmigungen auch in Altlastenfällen (vgl. OVG Münster v. 30.5.1996, a.a.O.) angenommen. Voraussetzung ist in jedem Fall die

Erteilung einer formellen Genehmigung; eine bloße Anzeige der Tätigkeit bei der zuständigen Behörde reicht hingegen ebenso wenig aus wie eine eventuelle behördliche Duldung (BVerwG v. 2.12.1977, a.a.O., S. 124 f.).

Schwierigkeiten bereitet die genaue Bestimmung der Reichweite von Genehmigungen. Sie ergibt sich aus dem Regelungsgehalt des jeweiligen Genehmigungsbescheids. Dabei gilt im Zweifel der Grundsatz, daß das, was nicht ausdrücklich vom Bescheid erfaßt ist, auch nicht erlaubt ist. Vor vorschnellen Typisierungen, etwa der Annahme, eine Genehmigung des Anlagenbetriebs habe auch die – ordnungsrechtswidrige – Ablagerung von Rest- und Abfallstoffen umfaßt, ist nachdrücklich zu warnen (VGH München v. 26.7.1991 - 22 CS 90.400 - BayVBl. 1992, 274; VGH Mannheim v. 4.3.1996 - 10 S 2687/95 - NVwZ-RR 1996, 387, 389 = ZUR 1996, 214, 216; HILGER [22], § 4 Rnr. 69 ff.). Auch für durch Störfälle verursachte Kontaminationen kommt eine Legalisierungswirkung von Genehmigungen nicht in Betracht (VGH Mannheim v. 14.12.1989 - 1 S 2719/89 - NVwZ 1990, 781, 783).

Ausnahmsweise können auch **andere staatliche Einflußnahmen** eine Inanspruchnahme des Verursachers zur Gefahrenabwehr ausschließen. Dies hat das OVG Münster unter dem Gesichtspunkt des hoheitlichen Zwangs für die Bedingungen der Kriegsproduktion des 1. Weltkriegs angenommen. Ähnliches hat auch für die Kriegsproduktion des 2. Weltkriegs zu gelten (CLÉMENT [7], S. 139 ff.). Für in der ehemaligen DDR verursachte Kontaminationen fordert REHBINDER eine entsprechende Rechtfertigung für die Versagung der für einen umweltgerechten Betrieb erforderlichen genehmigungspflichtigen Investitionsmittel ([49] S. 424 f.).

Zeitliche Grenzen der Inanspruchnahme: Schließlich kann für die Zurechnung einer gegenwärtigen Störung zu einer sie verursachenden Handlung der seither eingetretene Zeitablauf nicht außer acht gelassen werden. Zwar kommt nach ganz herrschender Meinung eine Verjährung der ordnungsrechtlichen Verantwortlichkeit grundsätzlich nicht in Betracht. Jedoch zieht das OVG Münster in dem Urteil v. 30.5.1996 unter dem Rechtsinstitut der Verwirkung den Rechtsgedanken der Verjährung entsprechend heran. Eine Verwirkung ist um so mehr in Betracht zu ziehen als zum Zeitablauf noch weitere Umstände hinzutreten, wie z.B. ein durch eine langandauernde Untätigkeit der Behörde in Kenntnis der Verunreinigungen geschaffener Vertrauenstatbestand. Prinzipiell ablehnend hat sich allerdings der VGH Mannheim zu einer zeitlichen Begrenzung der Verhaltensverantwortlichkeit geäußert (v. 4.3.1996, a.a.O., NVwZ-RR 1996, 390).

Rechtsnachfolger

Mit der ausdrücklichen Benennung des Gesamtrechtsnachfolgers des Verursachers als Verantwortlichen hat der Gesetzgeber des BBodSchG diese bisher höchst umstrittene Rechtsfrage entschieden. Nicht eindeutig geregelt ist jedoch, inwieweit die Vorschrift auch für Fälle gelten soll, in denen die Rechtsnachfolge bereits vor Inkrafttreten des BBodSchG eingetreten ist (VGH Mannheim v. 25.10.1999 - 8 S 2407/99 - VBIBW 2000, 154, 155 f.).

Die Nachfolgetatbestände folgen aus dem Zivilrecht. Sie umfassen etwa den Erbgang sowie die gesellschaftsrechtliche Übernahme, Verschmelzung und Umwandlung von Unternehmen. Im einzelnen werfen vor allem die gesellschaftsrechtlichen Nachfolgetatbestände auch und gerade bei der Anwendung auf die bodenschutzrechtliche Sanierungspflicht schwierige Rechtsprobleme auf, die der Klärung durch Rechtsprechung und juristisches Schrifttum harren (vgl. etwa zu Umwandlungen GIESBERTS / FRANK [20], S. 505 ff.; speziell zur Spaltung von

Unternehmen THEUER [63]). Kein Fall der Gesamtrechtsnachfolge ist jedenfalls der Erwerb des Handelsgeschäfts eines Einzelkaufmanns (VGH Kassel v. 9.9.1999 - 8 UE 656/95 - NVwZ 2000, 828 f. = NuR 2000, 285, 286).

Innerhalb des Anwendungsbereichs der Regelung geht die Pflicht in dem Umfang und mit den Beschränkungen, mit denen sie zum Zeitpunkt des Eintritts des Nachfolgetatbestands existierte (siehe Abschnitt "Verursacher"), auf den Rechtsnachfolger über. Sie muß mithin bereits entstanden sein und noch fortbestehen (vgl. OVG Münster v. 30.5.1996, a.a.O., S. 508). Ebenfalls anwendbar sind die in dem jeweiligen Nachfolgetatbestand vorgesehenen Möglichkeiten einer Haftungsbeschränkung für den Rechtsnachfolger (vgl. BVerwG v. 20.1.1977 - 5 C 18/76 - E 52, 16, 25 f.; VGH München v. 13.12.1994 - 22 CS 94.1022 - NVwZ-RR 1995, 647, 648).

5.2.2.2 Zustandsverantwortlichkeit

Verpflichtete

Im Zentrum der Zustandsverantwortlichkeit stehen der Grundstückseigentümer und der Inhaber der tatsächlichen Gewalt über ein Grundstück. **Grundstückseigentümer** ist diejenige Person, die entsprechend den zivilrechtlichen Regelungen der §§ 873 - 902, 925 - 928 BGB i.V.m. dem in der Grundbuchordnung (GBO) geregelten Grundbuchrecht formal im Grundbuch als Eigentümer eingetragen ist. Das interne Verhältnis zwischen dem eingetragenen Eigentümer und dem abweichenden Besitzer ist demgegenüber für die Verpflichtung nach dem BBodSchG unbeachtlich. Entscheidend für die Eigenschaft als **Inhaber der tatsächlichen Gewalt** ist ein unmittelbarer Zugriff auf das Grundstück, d.h. die Möglichkeit, ungehindert auf das Grundstück einwirken zu können, wie z.B. beim Mieter oder Pächter oder bei einem dinglich an dem Grundstück Berechtigten. (SCHOENECK [58], § 4 Rnr. 16 f.; QUEITSCH [45], Rnr. 92).

Grundsätzlich endet die Zustandsverantwortlichkeit mit der Aufgabe des Eigentums oder seiner Übertragung auf einen anderen bzw. der Beendigung der tatsächlichen Gewalt. Sie wird in der Person eines neuen Eigentümers oder Inhabers der tatsächlichen Gewalt originär neu begründet. Insoweit bereitet auch die Haftung des Gesamtrechtsnachfolgers keine Probleme (VGH Mannheim v. 4.8.1995 - 10 S 828/95 - NVwZ 1996, 1036, 1037 = BB 1996, 392, 394; OVG Münster v. 30.5.1996, a.a.O., NVwZ 1997, 507 f.).

Abweichend von diesem Grundsatz erweitert das BBodSchG in besonderen Fällen die Haftung des Zustandsverantwortlichen. Dies gilt zunächst für den praktisch wohl eher seltenen Tatbestand, daß der Berechtigte zivilrechtlich das Eigentum an dem Grundstück aufgibt (Dereliktion, § 928 BGB; § 4 Abs. 3 Satz 4, 2. Alt. BBodSchG). Des weiteren sieht § 4 Abs. 6 Satz 1 BBodSchG eine Nachhaftung des früheren Eigentümers vor, der sein Grundstück nach dem Inkrafttreten des Gesetzes am 1.3.1999 veräußert hat und dabei die schädliche Bodenveränderung oder Altlast kannte oder hätte kennen müssen. Für die mögliche Kenntnis wird der Erfassung der Fläche in einem Altlastenkataster besondere Bedeutung zukommen (SCHOENECK [58], § 4 Rnr. 47). Einschränkend bestimmt § 4 Abs. 6 Satz 2 BBodSchG, daß dies für denjenigen nicht gilt, der beim Erwerb des Grundstücks in schutzwürdiger Weise darauf vertraut hat, das schädliche Bodenveränderungen oder Altlasten nicht vorhanden sind.

Daneben bestimmt § 4 Abs. 3 Satz 4, 1. Alt. BBodSchG die Haftung desjenigen, der aus handels- oder gesellschaftsrechtlichem Grund für eine juristische Person einzustehen hat, der das belastete Grundstück gehört. Sie betrifft vor allem Fälle der gesellschaftsrechtlichen Durchgriffshaftung etwa wegen Unterkapitalisierung und qualifizierter Konzernabhängigkeit. Typisch sind etwa Ausgründungen von Unternehmensteilen in neue Kapitalgesellschaften, die nur mit dem gesetzlich vorgeschriebenen Mindestkapital ausgestattet sind und denen die kontaminierten Flächen übertragen werden (GIESBERTS / FRANK [20], S. 508 ff.; HILGER [22], § 4 Rnr. 96 ff.; QUEITSCH [45], Rnr. 96 f.; SCHINK [54], S. 803 f.; SCHOENECK [58], § 4 Rnr. 42 f.). Zu den Problemen der Konzernhaftung siehe TURIAUX / KNIGGE [65], S. 379 ff.; SCHMITZ-RODE / BANK [57], S. 419 f.). Weitere Fallgruppen werden aufgezeigt von FLEISCHER / EMPT [12]; BECKER [1], S. 137 ff. Kritisch zu der neuen Regelung SPIETH / WOLFERS [62], S. 357 f.

Verfassungsrechtliche Grenzen der Zustandshaftung

Die Weite der nicht nur verschuldens-, sondern auch verhaltensunabhängigen Zustandshaftung wird auch in Fachkreisen immer wieder als unbillig empfunden. Bereits seit längerem wird deshalb eine Begrenzung der Zustandsverantwortlichkeit im Hinblick auf das Eigentumsgrundrecht des Art. 14 GG diskutiert.

Eher zurückhaltend hat sich allerdings wiederholt das BVerwG zu einer **Haftungsbegrenzung** geäußert. Nach seiner Auffassung hätten derartige Überlegungen von vornherein auszuschließen, wenn der Zustandsverantwortliche bei der Begründung des Eigentums bzw. der Sachherrschaft vom nicht ordnungsgemäßen Zustand der Sache gewußt oder zumindest Tatsachen gekannt habe, die auf das Vorhandensein eines solchen Zustands schließen lassen (v. 14.12.1990 - 7 B 134.90 - NVwZ 1991, 474, 475; v. 14.11.1996 - 4 B 205.96 - UPR 1997, 193; v. 10.7.1998 - 11 B 35.98 - NJW 1998, 3582).

Eine ausdrückliche gesetzliche Regelung dieses Problems ist im Gesetzgebungsverfahren zum BBodSchG gescheitert. § 25 Abs. 2 des Regierungsentwurfs sah unter den vom BVerwG formulierten Voraussetzungen eine Begrenzung der Haftung auf den Wert des Grundstücks vor (BT-Drs. 13/6701). Demgegenüber hat sich der Bundesrat für eine bloße Härtefallregelung ausgesprochen (Stellungnahme, BT-Drs. 13/6701, S. 46; Anrufung des Vermittlungsausschusses, BT-Drs. 13/8182, S. 8). Nachdem der Bundestag dem Entwurf der Bundesregierung gefolgt ist (vgl. Beschlußempfehlung und Bericht des Umweltausschusses, BT-Drs. 13/7891, S. 20 f.), wurde die vorgesehene Regelung im Vermittlungsausschuß schließlich ganz gestrichen (BT-Drs. 13/9637, S. 5).

Gegen die Auffassung des BVerwG hat das BVerfG jüngst entschieden, daß zur Bestimmung der Grenze dessen, was einem Eigentümer durch die Pflicht zur Gefahrenabwehr an Belastungen zugemutet werden darf, grundsätzlich vom Verkehrswert des Grundstücks nach Sanierung als erstem Anhaltspunkt auszugehen ist. Eine diese Grenze überschreitende Belastung kann insbesondere dann unzumutbar sein, wenn die von dem Grundstück ausgehende Gefahr aus Naturereignissen, aus der Allgemeinheit zuzurechnenden Ursachen oder von nicht nutzungsberechtigten Dritten herrührt. Ferner kann die Belastung bereits unterhalb der Höhe des Verkehrswerts unzumutbar sein, wenn das Grundstück den wesentlichen Teil des Vermögens des Pflichtigen bildet und die Grundlage seiner privaten Lebensführung einschließlich seiner Familie darstellt. Eine den Verkehrswert übersteigende Belastung kann andererseits zumutbar sein, wenn der Eigentümer das Risiko beim Erwerb oder bei der Nutzung des Grundstücks bewußt in Kauf genommen hat. Jedoch kann auch hier die Kostenbelastung nur auf solche Vermögensgegenstände, insbesondere andere Grundstücke

- bezogen werden, die mit dem sanierungsbedürftigen Grundstück eine funktionale Einheit - etwa innerhalb eines Unternehmens - bilden. Sie hat weiterhin die individuelle wirtschaftliche Leistungsfähigkeit des Sanierungspflichtigen zu berücksichtigen. Bei fahrlässiger Unkenntnis des Risikos ist nach dem Grad der Fahrlässigkeit sowie aus dem Risiko erzielter Vorteile - etwa durch einen reduzierten Kaufpreis oder einen erhöhten Pachtzins zu differenzieren; eine unterschiedslose Gleichsetzung von fahrlässiger mit willentlicher Verhaltensweise wird den verfassungsrechtlichen Anforderungen nicht gerecht (v. 16.2.2000 - 1 BvR 242/91 u.a. - NJW 2000, 2573, 2575 f. = DVBl. 2000, 1275, 1277 ff.).

Die grundsätzliche Begrenzung der Haftung des Zustandsverantwortlichen auf den Grundstückswert entspricht einer bereits früher von einigen Stimmen des juristischen Schrifttums und der obergerichtlichen Rechtsprechung vertretenen Position, die sich auf die Begründung der Zustandsverantwortlichkeit aus dem bloßen Innehaben von Eigentum und Sachherrschaft bezieht und aus ihr eine generelle Begrenzung der Inpflichtnahme ableitet (z.B. SPARWASSER / GEIßLER [61], S. 1320 ff.; BENDER / SPARWASSER / ENGEL [4], Rnr. 5/147 ff.; OERDER [39], § 4 Rnr. 56; SCHÖNFELD [59], § 24 Rnr. 8; VGH Kassel v. 21.5.1997 - 7 TG 2293/95 - NVwZ-RR 1998, 747, 750). Besondere verfassungsrechtliche Bedenken bestehen vor diesem Hintergrund gegen die Haftung des früheren Eigentümers nach Dereliktion oder Veräußerung (vgl. FOUQUET [15], S. 86 f.; KAHL [25], S. 55 ff.; KNOPP [29], S. 1012 f.; SPIETH / WOLFERS [62], S. 356 f.).

5.2.2.3 Inanspruchnahme und Kosten

Ermessensentscheidung der Behörde

Zur Erfüllung der sich aus § 4 BBodSchG ergebenden Sanierungspflicht kann die zuständige Behörde die erforderlichen Anordnungen treffen (§ 10 Abs. 1 Satz 1 BBodSchG). Die Entscheidung darüber steht in ihrem pflichtgemäßen Ermessen. Wie § 10 Abs. 1 Satz 4 BBodSchG hervorhebt, findet der Ermessensspielraum der Behörde seine Grenze in der Verhältnismäßigkeit der zu treffenden Maßnahmen. Sie erfordert, daß die behördlich angeordnete Maßnahme zur Verfolgung des von der gesetzlichen Ermächtigung umfaßten Ziels geeignet, erforderlich und proportional ist (HILGER [22], § 10 Rnr. 14; SCHOENECK [58], § 10 Rnr. 16).

In diesem Rahmen hat die Behörde auch eine Entscheidung darüber zu treffen, welchen unter mehreren Verantwortlichen sie in Anspruch nehmen will. Leitprinzipien dieser Entscheidung sind zum einen die Effektivität der Gefahrenabwehr und zum anderen die Gerechtigkeit der Störerinanspruchnahme. Hinsichtlich der **Effektivität** der Gefahrenabwehr liegt das Hauptaugenmerk auf der Frage, welcher Verantwortliche die Gefahr am schnellsten und wirkungsvollsten beseitigen kann. Als Kriterien für die **Auswahlgerechtigkeit** lassen sich unter strikter Würdigung der Umstände des Einzelfalls die jeweilige Sachnähe der einzelnen Verantwortlichen, die interne Haftungsverteilung zwischen ihnen und ihre jeweilige finanzielle Leistungsfähigkeit heranziehen. Einen abstrakten Vorrang der Verhaltens- vor der Zustandshaftung gibt es nicht (VGH Mannheim v. 4.3.1996, a.a.O., NVwZ-RR 1996, 390; v. 17.3.1998 - 10 S 177/97 - UPR 1999, 113, 114; v. 25.10.1999, a.a.O., S. 155; VGH München v. 13.5.1986 - 20 CS 86.338 - NVwZ 1986, 942, 945; KOTHE [32], S. 97; OERDER [39], § 4 Rnr. 30).

Kosten der Maßnahmen

Die zur Durchführung Verpflichteten tragen gemäß § 24 Abs. 1 Satz 1 BBodSchG die Kosten der Sanierungsmaßnahmen. Nach den Verwaltungsvollstreckungsgesetzen der Länder gilt dieser Grundsatz auch, wenn die Behörde die dem Pflichtigen obliegende Maßnahme im Wege der Ersatzvornahme selbst durchführt (z.B. §§ 77 Abs. 1 Satz 1, 59 VwVG NW, § 11 Abs. 2 KostO NW). Ergänzend sieht § 25 BBodSchG eine Verpflichtung des Grundstückseigentümers, der die Kosten für eine Sanierung nicht oder nicht vollständig selbst getragen hat, zum Wertausgleich für die durch den Einsatz öffentlicher Mittel bedingte Wertsteigerung seines Grundstücks vor.

Mehreren Verpflichteten räumt § 24 Abs. 2 BBodSchG untereinander einen zivilrechtlichen Ausgleichsanspruch in Anlehnung an den Gesamtschuldnerausgleich nach § 426 Abs. 1 BGB ein. Dieser Anspruch besteht unabhängig davon, ob die (potentiellen) Regressschuldner (ebenfalls) von der zuständigen Behörde zur Sanierung herangezogen worden sind. Umstritten ist aber, ob der Anspruch auch demjenigen zusteht, der die Sanierung freiwillig durchführt (so z.B. FRENZ [18], S. 648; SCHÖNFELD [60]), oder nur demjenigen, der mittels Ordnungsverfügung oder Sanierungsvertrag (§ 14 Abs. 4 BBodSchG) von der zuständigen Behörde zu ihrer Vornahme verpflichtet wurde (so z.B. WAGNER [68], S. 421 f.; KNOCH [28]). Der Umfang der von den einzelnen Sanierungspflichtigen im Verhältnis untereinander zu tragenden Kosten hängt - vorbehaltlich anderer vertraglicher Abreden, z.B. im Rahmen eines Grundstückskaufvertrags - von den jeweiligen Anteilen der Beteiligten an der Verursachung der Gefahr oder des Schadens ab. Insoweit dürfen allerdings die erheblichen praktischen Schwierigkeiten beim Nachweis der Verursachungsanteile, insbesondere in Fällen von Gemengelage von Unternehmen mit ähnlichen technischen Produktionsstrukturen, sowie bei der zivilrechtlichen Durchsetzung des Regressanspruchs nicht verkannt werden (ausführlich PÜTZENBACHER [44], S. 1140 f.; SCHLETTE [55], S. 53 ff.; WAGNER [68], S. 422 f.; v. WESTERHOLT [69], S. 932).

Lediglich in Sachsen gilt aufgrund der Vorschrift des § 8 SächsABG die Freistellungsklausel des Art. 1 § 4 Abs. 3 UmweltRG über die in ihr bestimmte Antragsfrist hinaus fort. Danach kann die zuständige Behörde unter den dort beschriebenen Umständen den Eigentümer eines Grundstücks von den ihm bei der Durchführung der erforderlichen Sanierungsmaßnahmen erwachsenen Kosten freistellen, soweit die Altlast oder schädliche Bodenveränderung vor dem 1.7.1990 zu einem Zeitpunkt entstanden ist, zu dem er keine tatsächliche Gewalt über sein Grundstück innehatte, und es ihm nicht zugemutet werden kann, die Kosten selbst zu tragen.

5.2.3 Stilllegung von AbfalldPONEN

Eine besondere Sanierungspflicht für nach dem Inkrafttreten des Abfallgesetzes (AbfG) am 11.6.1972 stillgelegte Deponien sieht § 36 Abs. 2 KrW-/AbfG vor. Danach soll die zuständige Behörde den Inhaber verpflichten, auf seine Kosten das Gelände, das für eine Deponie verwandt worden ist, zu rekultivieren und sonstige Vorkehrungen zu treffen, die erforderlich sind, Beeinträchtigungen des Wohls der Allgemeinheit zu verhüten. Die Sanierung von der Deponie ausgehender schädlicher Bodenveränderungen oder sonstiger Gefahren für den einzelnen oder die Allgemeinheit erfolgt im übrigen nach den Vorschriften des BBodSchG.

5.3 Abfallrechtliche Einordnung

5.3.1 Abfalleigenschaft

Abfälle sind nach der Legaldefinition des § 3 Abs. 1 Satz 1 KrW-/AbfG

- alle beweglichen Sachen,
- die unter die in Anhang I des Gesetzes aufgeführten Gruppen fallen,
- und denen sich ihr Besitzer nach Abs. 2 bis 4 entledigt, entledigen will oder entledigen muß.

Voraussetzung der Abfalleigenschaft des kontaminierten Erdreichs ist zunächst, daß es sich bei ihm um eine **bewegliche Sache** handelt. Sie kommt mithin erst mit der Auskoffierung des Bodens in Betracht (BVerwG v. 21.12.1998 - 7 B 211/98 - NVwZ 1999, 421), nicht hingegen bei einer *In situ*-Behandlung (BECKMANN [2], S. 306 f.; BECKMANN / KERSTING [3], § 3 KrW-/AbfG Rnr. 8, 18).

Den **Abfallgruppen** nach Anhang I des Gesetzes kommt wegen der Auffanggruppen Q1 und Q 16 kaum eine die Abfalleigenschaft einschränkende Bedeutung zu. So umfaßt die Gruppe Q 16 "Stoffe und Produkte aller Art," die nicht einer der vorher genannten Gruppen angehören. Als speziellere Zuordnung kommt für das ausgekofferte Erdreich die Gruppe Q 15 "Kontaminierte Stoffe oder Produkte, die bei der Sanierung von Böden anfallen" in Betracht.

Die aus der EG-Abfallrichtlinie übernommenen Abfallgruppen werden durch einen **Abfallartenkatalog** der EG-Kommission sowie die zur Umsetzung in nationales Recht erlassene Verordnung zur Einführung des Europäischen Abfallkatalogs (EAKV) konkretisiert. Auch dieser Katalog versteht sich lediglich als ein Verzeichnis mit beschreibender und systematisierender Funktion (vgl. § 1 EAKV). Der ausgekofferte Boden läßt sich hier als "Erde und Steine" dem Abfallschlüssel 17 05 01 zuordnen. Spezieller ist jedoch die in der BestbÜAbfV unter dem Abfallschlüssel 17 05 99 D1 aufgeführte Gruppe "Bodenaushub, Baggergut sowie Abfälle aus Bodenbehandlungsanlagen mit schädlichen Verunreinigungen".

Der **Wille zur Entledigung** ist nach § 3 Abs. 3 Satz 1 Nr. 2 KrW-/AbfG hinsichtlich solcher beweglicher Sachen anzunehmen, deren ursprüngliche Zweckbestimmung entfällt, ohne das ein neuer Verwendungszweck unmittelbar an deren Stelle tritt. Dies ist bei dem ausgekofferten Boden ersichtlich der Fall. Bis zu seiner Dekontaminierung und dem anschließenden Wiedereinbau an der gleichen oder einer anderen Stelle entbehrt er offenbar jeder Funktion.

Der Entledigungswille manifestiert sich regelmäßig - wenn auch nicht notwendigerweise - in einer **Entledigungshandlung** nach § 3 Abs. 2 KrW-/AbfG. Eine solche liegt insbesondere vor, wenn der Besitzer bewegliche Sachen einer Verwertung im Sinne des Anhangs II B oder einer Beseitigung im Sinne des Anhangs II A des Gesetzes zuführt. Die Anhänge führen jeweils Verwertungs- und Beseitigungsverfahren auf, die in der Praxis angewandt werden. Die Behandlung des entnommenen Erdreichs kann in bezug auf verbleibende Schadstoffe, die eine nachfolgende Deponierung des Bodens als Abfall zur Beseitigung notwendig machen (vgl. unten, Kap. 5.5.2) oder auf abgetrennte Schadstoffe, die gemeinwohlverträglich zu beseitigen sind, insbesondere von dem Beseitigungsverfahren D8 erfaßt sein als biologische Behandlung, durch die Endverbindungen oder Gemische entstehen, die mit einem anderen Beseitigungsverfahren entsorgt werden müssen.

Entledigen muß sich der Besitzer nach dem sog. objektiven Abfallbegriff des § 3 Abs. 4 KrW-/AbfG beweglicher Sachen, wenn

- diese entsprechend ihrer ursprünglichen Zweckbestimmung nicht mehr verwendet werden,
- aufgrund ihres konkreten Zustands geeignet sind, gegenwärtig oder zukünftig das Wohl der Allgemeinheit, insbesondere die Umwelt zu gefährden, und
- deren Gefährdungspotential nur durch eine ordnungsgemäße und schadlose Verwertung oder Beseitigung nach den Vorschriften des KrW-/AbfG und der auf seiner Grundlage erlassenen Rechtsverordnung ausgeschlossen werden kann.

Der **Wegfall der ursprünglichen Zweckbestimmung** liegt auch bereits der Begründung der Abfalleigenschaft durch den Entledigungswillen des Besitzers (vgl. oben c.) zugrunde. Eine eigenständige Bedeutung kommt der Alternative des "Entledigen Müssens" daher nur zu, soweit - bei kontaminiertem Erdreich kaum möglich - ein neuer Verwendungszweck unmittelbar, d.h. ohne vorherige Behandlungsmaßnahmen, an die Stelle des vorherigen tritt.

Die **Gefährdung des Wohls der Allgemeinheit, insbesondere der Umwelt**, bildet in aller Regel gerade den Grund für die Durchführung der Bodensanierung.

Die Frage, ob das **Gefährdungspotential nur durch eine Verwertung oder Beseitigung auf der Grundlage des KrW-/AbfG ausgeschlossen werden kann**, beurteilt sich zunächst danach, ob überhaupt eine Nutzung außerhalb des Abfallrechts in Betracht kommt. Voraussetzung dafür ist eine nach objektiven Kriterien festzustellende Nutzungsabsicht des Erzeugers bzw. Besitzers der Sache. Eine Indizwirkung kommt dabei der Frage zu, ob für den betreffenden Stoff ein Markt besteht. Kann der Stoff an verwendungs- oder verwertungsbereite Dritte gegen Entgelt veräußert werden, handelt es sich also um ein "Wirtschaftsgut", so ist im allgemeinen eine Entsorgung als Abfall nicht geboten, weil davon ausgegangen werden kann, daß in derartigen Fällen die für den Umgang mit dem Stoff einschlägigen Fachgesetze zur Wahrung des Wohls der Allgemeinheit ausreichen. Muß der bisherige Besitzer hingegen für die Abnahme des Stoffes ein Entgelt bezahlen, so ist dies ein Hinweis darauf, daß die Weitergabe an Dritte typischerweise mit Gefahren verbunden ist, die eine Entsorgung als Abfall gebieten, weil hier in besonderem Maße die Besorgnis besteht, daß die Stoffe aus Kostengründen umweltgefährdend beseitigt werden (BVerwG v. 24.6.1993 - 7 C 11.92 - NVwZ 1993, 988, 989; 7 C 10.92 - NVwZ 1993, 990; beide zu § 1 Abs. 1 Satz 1, 2. Alt. des früheren Abfallgesetzes - AbfG).

Einschränkend nimmt die Vollzugspraxis zusätzlich einen Vergleich mit den sonst einschlägigen ordnungsrechtlichen Vorschriften vor. Diese müssen nach Inhalt und Schutzziel gleichermaßen geeignet sein, das spezifische Gefährdungspotential der betreffenden Sache unter Kontrolle zu halten, etwa indem sie außer an den Behandlungsvorgang auch Anforderungen an einen nachfolgenden umweltverträglichen Einsatz der Stoffe vorsehen (vgl. Bund-/Länder-AG [5], Nr. II.2.3.).

Für kontaminiertes Erdreich wird in aller Regel niemand bereit sein, ein Entgelt zu entrichten; ein Marktpreis läßt sich mit ihm nicht erzielen. Vielmehr wird der bisherige Besitzer seinerseits für die Abnahme zahlen müssen. Schon deshalb ist regelmäßig die Abfalleigenschaft auch in der Alternative des "Zwangsabfalls" gegeben. Ob im übrigen die Vorschriften des sonstigen Ordnungsrechts ein dem Abfallrecht vergleichbares Schutzniveau gewährleisten, läßt sich nur für jedes Material und anhand seiner vorgesehenen Verwendung im Einzelfall beurteilen.

5.3.2 Abfall zur Verwertung und zur Beseitigung

Unter den Abfällen unterscheidet das Gesetz grundlegend zwischen solchen zur Verwertung und zur Beseitigung (§ 3 Abs. 1 Satz 2 KrW-/AbfG). Die genaue Abgrenzung zwischen den beiden zählt nach wie vor zu den umstrittensten Fragen seiner Auslegung (vgl. zum Streitstand: Bund-/Länder-AG [5], Nr. III.2.1.1.1; VGH Mannheim v. 20.10.1998 - 14 S 1037/98 - ZUR 1999, 103, 105 f.; DOLDE / VETTER [9], S. 940 ff.; BECKMANN / KERSTING [3], § 4 KrW-/AbfG Rnr. 21 ff.; FRENZ [17], § 4 Rnr. 24; HÖSEL / VON LERSNER / WENDENBURG [23], KrW-/AbfG § 4 (0104) Rnr. 23 ff.; KLÖCK [26], S. 119; SCHINK [53], S. 257 f.; speziell zu den Problemen beim Vollzug der Regelung WITTHOHN / SMEDDINCK [70]).

Die Vorschrift des § 3 Abs. 1 Satz 2 KrW-/AbfG bestimmt als **Abfälle zur Verwertung** positiv solche, die verwertet werden, und als **Abfälle zur Beseitigung** negativ solche, die nicht verwertet werden. Die bei der Bodenbehandlung allein in Betracht kommende stoffliche Verwertung beinhaltet die Substitution von Rohstoffen durch das Gewinnen von Stoffen aus Abfällen oder die Nutzung der stofflichen Eigenschaften der Abfälle für den ursprünglichen oder einen neuen Zweck (§ 4 Abs. 3 Satz 1 KrW-/AbfG). Die Abgrenzung zur Abfallbeseitigung richtet sich nach dem Hauptzweck der Maßnahme. Dieser muß nach einer wirtschaftlichen Betrachtungsweise, unter Berücksichtigung der im einzelnen Abfall bestehenden Verunreinigungen, in der Nutzung des Abfalls und nicht in der Beseitigung des Schadstoffpotentials liegen (§ 4 Abs. 3 Satz 2 KrW-/AbfG). § 10 Abs. 2 Satz 4 KrW-/AbfG stellt demgegenüber klar, daß die Behandlung von Abfällen auch dann als Abfallbeseitigung anzusehen ist, wenn die Nutzung nur untergeordneter Nebenzweck der Beseitigung ist (§ 10 Abs. 2 Satz 4 KrW-/AbfG).

In der **wirtschaftlichen Betrachtung** sind die Kosten der Maßnahme dem wirtschaftlichen Nutzen der gewonnenen bzw. wiederverwendeten Stoffe gegenüberzustellen. Dabei ist, anders als beim Entledigungswillen nach § 3 Abs. 3 KrW-/AbfG, bei dem es auf den positiven Nutzen des jeweiligen Besitzers des Materials ankommt, auf die objektive Sichtweise eines außenstehenden Dritten abzustellen. Ausgehend von der konkret beabsichtigten Maßnahme dürfte es für die Höhe der Kosten regelmäßig keinen Unterschied machen, ob sie als Verwertungs- oder Beseitigungsmaßnahme (vgl. § 10 Abs. 2 Satz 3 KrW-/AbfG) durchgeführt wird. Der wirtschaftliche Nutzen findet seinen Ausdruck insbesondere im Marktwert des gewonnenen Materials. In diesem Rahmen sind auch Verunreinigungen zu berücksichtigen, die das den Abfall bildende Stoffgemisch zum angestrebten Verwertungszweck als weniger geeignet erscheinen lassen.

Daneben kommt dem im Abfall enthaltenen Schadstoffpotential eine korrigierende Funktion im Hinblick auf eine **umweltverträgliche Abfallentsorgung** zu. Maßgebliche Gesichtspunkte sind hier die Anreicherung von Schadstoffen im Wirtschaftskreislauf sowie ihre diffuse Verbreitung in der Umwelt.

Die Zuordnung als Verwertungs- oder Beseitigungsverfahren nach den Anhängen II A und II B KrW-/AbfG hat demgegenüber lediglich Beispielcharakter. Keine Bedeutung für die Abgrenzung kommt dem Vorrang der Verwertung vor der Beseitigung (§ 5 Abs. 2 Satz 2 KrW-/AbfG) zu. Er besagt lediglich, daß unter mehreren in Betracht kommenden Behandlungsweisen grundsätzlich diejenige zu wählen ist, die eine möglichst weitgehende künftige

Nutzung der im Abfall enthaltenen Stoffe ermöglicht. Die **wirtschaftliche Zumutbarkeit** als Grenze der Verwertungspflicht (§ 5 Abs. 4 KrW-/AbfG) stellt auf die Belange des jeweiligen Abfallbesitzers ab und kann schon deshalb keinen Einfluß auf die nach objektiven Maßstäben vorzunehmende Abgrenzung zwischen Beseitigung und Verwertung haben.

Für die **Einordnung von Bodenbehandlungsmaßnahmen** ergibt sich daraus folgendes: Liegt eine Bodenverunreinigung vor, die nach Art und Umfang eine Sanierung gebietet, so dürften die Kosten der Behandlung des ausgekofferten Materials zumeist den Wert des gereinigten Bodens erheblich übersteigen, so das eine Einordnung der Behandlung als Verwertungsmaßnahme schon deshalb nicht in Betracht kommt. Hinzu treten können auch nach der Behandlung verbleibende Belastungen des Materials. Der kontaminierte Boden ist daher regelmäßig als Abfall zur Beseitigung einzustufen. Immerhin sind nach Maßgabe des jeweiligen Einzelfalls auch Bodenbehandlungen denkbar, die den dargestellten Anforderungen an eine Einordnung der Maßnahme als eine solche der Verwertung genügen.

5.3.3 Dauer der Abfalleigenschaft

Eine Bestimmung über die Dauer der rechtlichen Eigenschaft einer Sache als Abfall enthält das KrW-/AbfG nicht.

Die Vollzugspraxis geht wohl davon aus, daß eine Sache die Abfalleigenschaft erst dann wieder verliert, wenn die durch sie ausgelösten abfallrechtlichen Pflichten vollständig erfüllt sind. Bei der stofflichen Verwertung dauert danach die Abfalleigenschaft grundsätzlich solange fort, bis die Sache tatsächlich wieder genutzt wird (ähnlich wohl BVerwG v. 19.11.1998 - 7 C 31/97 - ZUR 1999, 110, 111). Allerdings kann die Abfalleigenschaft im Einzelfall auch schon mit dem Gewinnen von Stoffen beendet sein, wenn von ihnen keine abfallspezifischen Beeinträchtigungen für das Wohl der Allgemeinheit mehr ausgehen können. Als Anhaltspunkte dafür werden etwa herangezogen: die Vergleichbarkeit mit Primärrohstoffen, das Fehlen abfallspezifischer rechtlicher Einschränkungen für die weitere Verwendung sowie ein positiver Marktwert (vgl. Bund-/Länder-AG, Nr. II.3.). Entsprechendes hat für die gemäß § 10 Abs. 2 Satz 3 KrW-/AbfG gebotene Nutzung bei der Behandlung von Abfällen zur Beseitigung anfallender Stoffe zu gelten. Im übrigen endet die Abfalleigenschaft bei der Beseitigung, wenn die Stoffe ihre Eigenschaft als bewegliche Sache verloren haben (SCHINK [53], S. 248).

Zutreffender erscheint es, von vornherein nicht von einem Bestehen der rechtlichen Eigenschaft als Abfall über einen gewissen Zeitraum auszugehen, sondern bei der Anwendung der einzelnen abfallrechtlichen Norm zu prüfen, ob die Abfalleigenschaft zu dem Zeitpunkt besteht, auf den die Norm sich bezieht (FLUCK [13], § 3 Rnr. 79 KrW-/AbfG).

Nach beiden Ansätzen ist die Abfalleigenschaft jedenfalls dann beendet, wenn der behandelte Boden wieder in ein Grundstück eingebaut ist oder bereits vorher in seiner Zusammensetzung dem natürlichen Boden entspricht. Im übrigen ist eine differenzierte Betrachtung nach der Art und Weise der Sanierung notwendig.

5.4 Anlagenrecht

Sowohl die formellen als auch die materiellen rechtlichen Anforderungen an die Errichtung und den Betrieb von Bodenbehandlungsanlagen hängen davon ab, ob die Sanierung auf dem verunreinigten Grundstück ohne oder mit Aushub des Bodens stattfindet oder nach dem Aushub und Transport auf einem anderen Grundstück erfolgt. Im einzelnen sind drei Arten von Anlagen zu unterscheiden:

1. ortsfeste Anlagen zur Behandlung entnommenen Bodens,
2. mobile bauliche Anlagen zur Behandlung entnommenen Bodens und
3. sonstige Bodenbehandlungsanlagen.

Hinzu kommen können in allen drei Fällen das Erfordernis einer wasserrechtlichen Erlaubnis für die Benutzung von Gewässern (dazu Kap. 5.4.4) sowie verfahrensrechtliche Erleichterungen durch einen für verbindlich erklärten Sanierungsplan bzw. eine behördliche Sanierungsverfügung (Kap. 5.4.5).

5.4.1 Ortsfeste Anlagen zur Behandlung entnommenen Bodens

5.4.1.1 Genehmigungspflicht

Nach § 4 Abs. 1 BImSchG i.V.m. § 1 Abs. 1 und Nr. 8.7 des Anhangs der 4. BImSchV bedürfen Anlagen zur Behandlung von verunreinigtem Boden einer Genehmigung durch die nach den landesrechtlichen Vorschriften zuständige Behörde, soweit den Umständen nach zu erwarten ist, das sie länger als zwölf Monate an demselben Ort betrieben werden. Der Begriff der Anlage ist dabei weit zu verstehen. Er umfaßt nach § 3 Abs. 5 BImSchG u.a. Betriebsstätten, ortsfeste Einrichtungen und Grundstücke, auf denen emissionsträchtige Arbeiten - d.h. solche, von denen insbesondere Luftveränderungen und Geräusche ausgehen können (vgl. § 3 Abs. 3 BImSchG) - ausgeführt werden.

Die **immissionsschutzrechtliche Genehmigung** schließt die anderen, die Anlage betreffenden behördlichen Entscheidungen ein, insbesondere öffentlich-rechtliche Genehmigungen und Zulassungen. Ausgenommen sind u.a. wasserrechtliche Erlaubnisse und Bewilligungen (§ 13 Satz 1 BImSchG; dazu unten, Kap. 5.4.4).

Das Abfallrecht knüpft an die immissionsschutzrechtliche Regelung an. § 27 Abs. 1 Satz 1 KrW-/AbfG bestimmt, daß Abfälle zum Zwecke der Beseitigung (vgl. oben, Kap. 5.3.2) nur in den dafür zugelassenen Anlagen oder Einrichtungen (**Abfallbeseitigungsanlagen**) behandelt, gelagert oder abgelagert werden dürfen. Für die Zulassung ortsfester Abfallbeseitigungsanlagen zur Lagerung oder Behandlung von Abfällen schreibt § 31 Abs. 1 KrW-/AbfG vor, daß sie eine Genehmigung nach den Vorschriften des BImSchG brauchen; einer weiteren Zulassung nach dem KrW-/AbfG bedarf es nicht. Für die Verwertung von Abfällen enthält das KrW-/AbfG überhaupt keine eigene Regelung über die Anlagenzulassung.

5.4.1.2 Materielle Voraussetzungen der immissionsschutzrechtlichen Genehmigung

Die Genehmigung ist gemäß § 6 Abs. 1 BImSchG zu erteilen, wenn sichergestellt ist, daß die sich aus § 5 BImSchG und konkretisierenden Rechtsverordnungen nach § 7 BImSchG ergebenden Pflichten erfüllt werden, und andere öffentlich-rechtliche Vorschriften und Belange des Arbeitsschutzes der Errichtung und dem Betrieb der Anlage nicht entgegenstehen.

Immissionsschutzrechtliche Betreiberpflichten

Als Betreiberpflichten bestimmt § 5 Abs. 1 BImSchG:

1. Schutz vor schädlichen Umwelteinwirkungen und sonstigen Gefahren, erheblichen Nachteilen und erheblichen Belästigungen für die Allgemeinheit und die Nachbarschaft. Schädliche Umwelteinwirkungen i.S. dieser Vorschrift sind nach den Begriffsbestimmungen des § 3 BImSchG vor allem Luftverunreinigungen und Lärm, die in erheblichem Maße auf die Umwelt einwirken;
2. Vorsorge gegen schädliche Umwelteinwirkungen, insbesondere durch die dem Stand der Technik entsprechende Emissionsbegrenzung;
3. Vermeidung oder ordnungsgemäße und schadlose Verwertung von Abfällen, oder wenn diese technisch nicht möglich oder unzumutbar sind, ihre gemeinwohlverträgliche Beseitigung sowie
4. Abwärmennutzung, die allerdings nach § 5 Abs. 2 BImSchG der Regelung durch eine - bisher noch nicht erlassene - Rechtsverordnung bedarf.

Abfallrechtliche Vorschriften

Unter den anderen zu beachtenden öffentlich-rechtlichen Vorschriften hervorzuheben sind die materiellen Regelungen des KrW-/AbfG. Dies gilt zunächst für das Gebot, Abfälle vorrangig zu verwerten (§ 5 Abs. 2 Satz 2 KrW-/AbfG) bzw. das in ihnen enthaltene stoffliche Potential so weit wie möglich zu nutzen (§ 10 Abs. 2 Satz 3 KrW-/AbfG). Ferner sind sowohl Abfälle zur Beseitigung als auch Abfälle zur Verwertung gemeinwohlverträglich zu entsorgen (§§ 10 Abs. 1, 4; 11 Abs. 1; 5 Abs. 3 Satz 3 KrW-/AbfG). Dieser Grundsatz findet für die Abfallverwertung eine besondere Ausprägung in der Verhinderung einer Schadstoffanreicherung im Wirtschaftskreislauf (§ 5 Abs. 3 Satz 3, 2. Halbs. KrW-/AbfG). Menge und Schädlichkeit von Abfällen zur Beseitigung sind durch die Behandlung zu vermindern (§ 10 Abs. 2 Satz 2 KrW-/AbfG). Der Anforderung des § 5 Abs. 2 Satz 3 KrW-/AbfG, eine der Art und Beschaffenheit des Abfalls entsprechende hochwertige Verwertung anzustreben (dazu FOUQUET / MAHRWALD [16], S. 144 ff.), dürfte im Bereich der Bodenbehandlung hingegen kaum Bedeutung zukommen. Entsprechendes gilt bei für verbindlich erklärten Ausweisungen von Abfallbeseitigungsanlagen in Abfallwirtschaftsplänen gem. § 29 Abs. 4 KrW-/AbfG.

Die zur Konkretisierung der abfallrechtlichen Anforderungen bereits unter dem früheren AbfG erlassene TA Abfall sieht eine Behandlung der Abfälle u.a. durch biologische Verfahren vor, die vorrangig ihre Verwertung ermöglichen soll. Soweit eine Verwertung auch nach der Vorbehandlung nicht möglich ist, sind die Abfälle so zu behandeln, daß schädliche und gefährliche Inhaltsstoffe soweit zerstört, umgewandelt, abgetrennt, konzentriert oder immobilisiert werden, daß sie ohne Beeinträchtigung des Wohls der Allgemeinheit abgelagert werden

können. Dabei ist auch eine Volumenreduzierung anzustreben (Nrn. 4.1, 4.4.2.1, 4.4.1 i.V.m. Anhang C, Nr. 8.1 TA Abfall). Allgemeine Anforderungen an die Einrichtung sowie die technische und bauliche Ausführung der Behandlungsanlagen einschließlich der einzelnen Anlagenbereiche sind im Abschnitt 6 der TA Abfall geregelt.

Die Mischung der zu behandelnden Abfälle mit Abfällen aus anderen Sanierungsfällen, mit anderen Sorten und Arten von Abfall sowie mit anderen Stoffen etwa als Zuschlags- oder Nährstoffe ist dann zulässig, wenn sie verfahrenstechnisch begründet ist. Nur soweit diese Voraussetzung nicht gegeben ist ergibt sich insbesondere aus §§ 5 Abs. 2 Satz 4, 11 Abs. 2 KrW-/AbfG, Nr. 4.2 TA Abfall ein abfallrechtliches Vermischungsverbot (vgl. GIESBERTS [19]).

Wasserrechtliche Vorschriften

Die Regelung des § 19g WHG über Anlagen zum Lagern und Behandeln wassergefährdender Stoffe ist auch bei der Entscheidung über die Erteilung der immissionsschutzrechtlichen Genehmigung zu beachten. Wassergefährdende Stoffe i.S.d. § 19g WHG sind feste, flüssige und gasförmige Stoffe, die geeignet sind, nachhaltig die physikalische, chemische oder biologische Beschaffenheit des Wassers nachteilig zu verändern (§ 19g Abs. 5 Satz 1 WHG). Sie sind in der aufgrund des § 19g Abs. 5 Satz 2 WHG ergangenen Verwaltungsvorschrift wassergefährdende Stoffe (VwVwS) näher bestimmt. Häufig wird gerade die Gefährdung des Grundwassers den Anlaß für die Bodensanierung bilden, so daß sie eine Behandlung wassergefährdender Stoffe nach § 19g WHG darstellt.

Die Anlagen müssen gemäß § 19g Abs. 1 Satz 1 WHG so beschaffen sein und so eingebaut, aufgestellt, unterhalten und betrieben werden, daß eine Verunreinigung der Gewässer oder eine sonstige nachteilige Veränderung ihrer Eigenschaften nicht zu besorgen ist. Sie müssen mindestens entsprechend den allgemein anerkannten Regeln der Technik beschaffen sein sowie eingebaut, aufgestellt, unterhalten und betrieben werden (§ 19g Abs. 3 WHG). Die verwendeten Anlagen, Anlagenteile und technischen Schutzvorkehrungen bedürfen grundsätzlich einer behördlichen Eignungsfeststellung oder Bauartzulassung (§ 19h WHG; Einzelheiten siehe dort).

Für das Lagern von Stoffen sowie die Beförderung von Flüssigkeiten und Gasen ergibt sich der gleiche Sorgfaltsmaßstab im übrigen aus den §§ 26 Abs. 2, 34 Abs. 2 WHG. Daneben statuiert § 18a Abs. 1 Satz 1 WHG das Gebot einer gemeinwohlverträglichen Abwasserentsorgung.

Baurechtliche Vorschriften

Unter den baurechtlichen Vorschriften regeln die Bauordnungen der Länder die Art und Weise der Errichtung der Anlage vor allem im Hinblick auf die Sicherheit des Bauwerks. Die Zulässigkeit der Anlage an ihrem Standort bestimmt sich nach dem in den §§ 29 ff. BauGB enthaltenen Bauplanungsrecht. Dabei besteht für öffentlich zugängliche Abfallbeseitigungsanlagen - d.h. solche, die nicht überwiegend der Eigenentsorgung eines Abfallerzeugers dienen, sondern bei denen der Kreis der Anlieferer nicht von vornherein begrenzt ist (LÖHR [36], § 38 Rnr. 23) - eine gewisse Lockerung der Bindungen an die Festlegungen eines bestehenden Bebauungsplans bzw. der Planersatztatbestände der §§ 34 f. BauGB aufgrund der Privilegierung nach § 38 BauGB. Bei der Behandlung direkt am Kontaminationsort (*On site*-Behandlung) werden vielfach Gründe des Wohls der Allgemeinheit für den Standort der Anlage sprechen, so daß eine Befreiung von entgegenstehenden Festsetzungen eines Bebauungsplans gemäß § 31 Abs. 2 Nr. 1 BauGB in Betracht kommt bzw. eine entsprechende Berücksichtigung im Rahmen der §§ 34 f. BauGB geboten ist.

Belange des Arbeitsschutzes

Allgemeine Regelungen des Arbeitsschutzes enthält das ArbSchG, das die Verhütung von Arbeitsunfällen und arbeitsbedingten Gesundheitsgefahren sowie die menschengerechte Gestaltung der Arbeit zum Ziel hat. Seine Anforderungen werden durch zahlreiche Rechtsverordnungen konkretisiert, etwa

- die bereits auf der Grundlage der GewO erlassene ArbStättV über die Beschaffenheit und den Betrieb von Arbeitsstätten,
- die BaustellV über die Arbeitssicherheit und den Gesundheitsschutz auf Baustellen,
- die AMBV über die Beschaffenheit, Bereitstellung und Benutzung von Arbeitsmitteln,
- die PSA-BV über die Auswahl, Bereitstellung und Erhaltung der Funktionsfähigkeit von persönlichen Schutzausrüstungen sowie die gebotene Unterweisung der Beschäftigten,
- die LasthandhabV über organisatorische Maßnahmen, geeignete Arbeitsmittel, Berücksichtigung der körperlichen Eignung und Unterweisung der Beschäftigten bei der manuellen Handhabung von Lasten.

Umgang mit Gefahrstoffen: Bei der Sanierung von Altlasten zu berücksichtigen sind ferner die §§ 15 ff. GefStoffV, die ihre Grundlage in der Verordnungsermächtigung des § 19 Abs. 1 Satz 1 ChemG finden. Zwar ist die Sanierung von Altlasten in der GefStoffV nicht explizit geregelt, jedoch wird vielfach die Einstufung der im Boden enthaltenen Stoffe als explosionsgefährlich, brandfördernd oder entzündlich, giftig, gesundheitsschädlich, ätzend, reizend, sensibilisierend, krebserregend, fortpflanzungsgefährdend, erbgutverändernd, umweltgefährlich oder mit sonst chronisch schädigenden Eigenschaften behaftet (vgl. § 3 Abs. 1 GefStoffV; §§ 19 Abs. 2; 3 Nr. 1, 4; 3a Abs. 1 ChemG) den Anlaß für die Sanierung bilden.

Insoweit regeln die vor allem relevanten Vorschriften der §§ 16 - 22 GefStoffV den Umgang mit den Gefahrstoffen, insbesondere das Lagern, Aufbewahren, Be- und Verarbeiten, Abfüllen, Umfüllen, Mischen, Entfernen, Vernichten oder Befördern (§ 3 Abs. 2 GefStoffV, § 3 Nr. 10 ChemG) sowie überhaupt die Tätigkeit in ihrem Gefahrenbereich (§ 2 Abs. 3 Satz 1 GefStoffV). Die Verordnung statuiert vor allem Schutzpflichten des Arbeitgebers. Hervorzuheben sind etwa (vgl. KLOEPFER [27], § 17 Rnr. 107 ff.)

- die Pflicht zur Ermittlung der Gefahrstoffe, zur Ermittlung und Beurteilung der mit ihrem Umgang verbundenen Gefahren sowie zur Anordnung der gebotenen Schutzmaßnahmen (§ 16);
- die allgemeine Schutzpflicht des § 17;
- die Überwachung der Maximalen Arbeitsplatzkonzentration, der Technischen Richtkonzentration oder des Biologischen Arbeitsplatztoleranzwerts von gefährlichen Stoffen in der Luft am Arbeitsplatz (§ 18). Bei ihnen handelt es sich um für einzelne Stoffe durch Beschluß des Ausschusses für Gefahrstoffe festgelegte Richtwerte, bei denen im allgemeinen die Gesundheit der Arbeitnehmer nicht beeinträchtigt wird;
- die Rangfolge der Schutzmaßnahmen (§ 19);
- die Erstellung von Betriebsanweisungen (§ 20) und die Unterweisung der Arbeitnehmer (§ 21) sowie
- Hygienemaßnahmen (§ 22).

Zusätzliche Anforderungen sehen §§ 15a Abs. 3 bis 5; 25 und 35 ff. sowie die Anhänge IV und V GefStoffV für den Umgang mit bestimmten, insbesondere krebserzeugenden und erbgutverändernden Stoffen vor.

Die in der GefStoffV getroffenen Regelungen werden ergänzt durch die allgemein anerkannten sicherheitstechnischen, arbeitsmedizinischen und hygienischen Regeln über Einstufung, Sicherheitsinformation und Arbeitsorganisation und sonstige gesicherte arbeitswissenschaftliche Erkenntnisse (§ 17 Abs. 1 Satz 2 GefStoffV), insbesondere wenn sie in den nach § 52 GefStoffV vom Ausschuß für Gefahrstoffe festgelegten Technischen Regeln für gefährliche Arbeitsstoffe / Gefahrstoffe (TRGS) konkretisiert sind.

Hinweise zur Arbeitsmedizinischen Vorsorge finden sich in den §§ 28 ff. GefStoffV.

Anforderungen an **Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen** enthält die am 1.4.1999 in Kraft getretene BioStoffV.

Sie unterteilt die biologischen Arbeitsstoffe nach ihrer Gefährlichkeit für die menschliche Gesundheit in vier aufeinander aufbauenden Risikogruppen, denen jeweils eine Schutzstufe mit den entsprechenden technischen, organisatorischen und persönlichen Schutzmaßnahmen zugeordnet ist. Die Einstufung wird positiv konkretisiert durch den Anhang III der EG-Richtlinie über den Schutz der Beschäftigten gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit (90/679/EWG) in ihrer jeweils geltenden Fassung (§§ 3 f., 6 Abs. 2, 2 Abs. 7 BioStoffV).

Für alle biologischen Arbeitsstoffe ist der Arbeitgeber zur Durchführung einer Gefährdungsbeurteilung verpflichtet (§§ 5 - 8 BioStoffV). Eine allgemeine Schutzpflicht ist in § 10 Abs. 1 BioStoffV geregelt. Ergänzend sind die vom Ausschuß für biologische Arbeitsstoffe (vgl. § 17 BioStoffV) ermittelten und vom Bundesministerium für Arbeit und Sozialordnung im Bundesarbeitsblatt bekanntgegebenen Regeln und Erkenntnisse (Technische Regeln für biologische Arbeitsstoffe - TRBA) zu beachten. § 10 Abs. 2 BioStoffV verpflichtet den Arbeitgeber, biologische Arbeitsstoffe, die eine Gesundheitsgefahr für Beschäftigte darstellen, durch weniger gefährliche biologische Arbeitsstoffe zu ersetzen, soweit dies zumutbar und nach dem Stand der Technik möglich ist. Weitere technische, organisatorische und persönliche Schutzmaßnahmen ordnen die §§ 10 ff. BioStoffV sowie Anhang III BioStoffV bei Tätigkeiten außerhalb von Laboratorien und ähnlichen Einrichtungen für Arbeitsstoffe der Risikogruppen 2 bis 4 an.

Vorschriften der Berufsgenossenschaften: Zusätzliche Anforderungen an den Arbeitsschutz können sich aus dem Regelwerk der Berufsgenossenschaften als Träger der gesetzlichen Unfallversicherung mit seinen Unfallverhütungsvorschriften (UVV, § 15 SGB VII), Regeln der Sicherheitstechnik, Richtlinien und Merkblättern ergeben. Von allgemeiner Bedeutung sind hier etwa die UVV Allgemeine Vorschriften (VBG 1), die UVV Bauarbeiten (VBG 37) sowie die UVV Arbeitsmedizinische Vorsorgeuntersuchung (VBG 100; BURMEIER [6], Rnr. 18).

Eine Zusammenstellung von Inhalten aus nationalen, europäischen und internationalen Vorschriften, technischen Regelwerken wie DIN-Normen und VDE-Bestimmungen sowie berufsgenossenschaftlichem Erfahrungsgut enthalten die "Regeln für Sicherheit und Gesundheitsschutz bei der Arbeit in kontaminierten Bereichen - ZH 1/183" v. April 1997, erarbeitet vom Fachausschuß Tiefbau im Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften. In Bereichen, in denen es sonst keine hinreichenden Regelungen gibt, treffen sie die erforderlichen sicherheitstechnischen Bestimmungen. Adressaten der Richtlinien sind

Unternehmer und deren Beschäftigte in der gewerblichen Wirtschaft, Arbeitgeber und Arbeitnehmer im öffentlichen Dienst sowie der Auftraggeber, der z.B. als Eigentümer des kontaminierten Bereichs oder als der zur Sanierung Verpflichtete (vgl. oben, Kap. 5.2) die Sanierungsarbeiten zu veranlassen hat. Besondere Bestimmungen für Anlagen und Einrichtungen zur Sanierung kontaminierter Böden (Sanierungsanlagen) finden sich in Abschnitt 12 sowie für die Sanierung von gefahrstoffbelasteten Böden durch biologische Arbeitsstoffe (mikrobiologische Sanierungsverfahren) in Abschnitt 13 des Regelwerks.

5.4.1.3 Genehmigungsverfahren

Für das immissionsschutzrechtliche Genehmigungsverfahren für eine Bodenbehandlungsanlage ist zu unterscheiden, ob der in ihr zu behandelnde Boden ausschließlich am Standort der Anlage entnommen oder auch von anderen Kontaminationsorten herangebracht wird (vgl. § 2 Abs. 1 Satz 1 i.V.m. Anhang Nr. 8.7 4. BImSchV).

Für die Genehmigung von Anlagen zur Behandlung von verunreinigtem Boden, der nicht ausschließlich am Standort der Anlage entnommen wird (**Off site-Verfahren**), ist grundsätzlich das Verfahren nach § 10 BImSchG anzuwenden. Eine Ausnahme besteht für Anlagen, die ausschließlich oder überwiegend der Entwicklung und Erprobung neuer Verfahren dienen (Versuchsanlagen), wenn die Genehmigung für einen Zeitraum von höchstens drei Jahren nach Inbetriebnahme der Anlage - mit der Möglichkeit der Verlängerung um ein weiteres Jahr - erteilt werden soll (§ 2 Abs. 3 Satz 1 4. BImSchV). Die Einzelheiten dieses Verfahrens sind in der 9. BImSchV geregelt. Kennzeichnend ist die weitreichende Öffentlichkeitsbeteiligung (§ 10 Abs. 3, 4, 6, 7, 8 BImSchG). In seinem Rahmen ist auch eine Umweltverträglichkeitsprüfung durchzuführen (§ 3 Abs. 1 S. 1 i.V.m. Anlage Nr. 1, Anhang Nr. 26, 27 UVPG).

Für die Genehmigung von Anlagen zur Behandlung von Boden, der ausschließlich am Standort der Anlage entnommen wird (**On site-Verfahren**), sowie für Versuchsanlagen ist gemäß § 19 Abs. 1 BImSchG i.V.m. § 2 Abs. 1 Nr. 2, Abs. 2, Anhang Nr. 8.7 4. BImSchV ein vereinfachtes Verfahren durchzuführen. Nur auf Antrag des Vorhabenträgers kann die Genehmigungsbehörde die Genehmigung im Verfahren nach § 10 BImSchG erteilen (§ 19 Abs. 3 BImSchG). Ein solches Vorgehen kann sinnvoll sein, um den Ausschluß von privatrechtlichen Abwehransprüchen nach § 14 BImSchG, der nur aufgrund des Genehmigungsverfahrens nach § 10 BImSchG möglich ist (§ 19 Abs. 2 BImSchG), zu erreichen. Im Unterschied zum Genehmigungsverfahren nach § 10 BImSchG entfällt im vereinfachten Verfahren die Öffentlichkeitsbeteiligung (§ 19 Abs. 2 BImSchG). Auch eine Umweltverträglichkeitsprüfung ist nicht durchzuführen.

In beiden Verfahren holt die für die Erteilung der Genehmigung zuständige Behörde (Genehmigungsbehörde) die Stellungnahmen der Behörden ein, deren Aufgabenbereich durch das Vorhaben berührt wird (§ 10 Abs. 5 BImSchG). Dies sind insbesondere die Behörden, deren Zulassungsentscheidung durch die immissionsschutzrechtliche Genehmigung ersetzt wird. Welche Behörden im einzelnen für die Erteilung der Genehmigung zuständig und welche nach ihrem Aufgabenbereich anzuhören sind, bestimmt sich nach Landesrecht und ist deshalb von Bundesland zu Bundesland verschieden (siehe Umweltbundesamt [66]).

5.4.1.4 Betrieb

Die für den Betreiber der Bodenbehandlungsanlage geltenden materiellen Pflichten, namentlich nach dem Immissionsschutz-, Abfall- und Wasserrecht sowie des Arbeitsschutzes, sind nicht bloß bei der Errichtung, sondern auch während des Betriebs der Anlage zu beachten. § 19i Abs. 2 WHG hebt insoweit die Pflicht des Betreibers einer Anlage zum Lagern und Behandeln wassergefährdender Stoffe i.S.d. § 19g WHG hervor, ihre Dichtheit und die Funktionsfähigkeit der Sicherheitseinrichtungen ständig zu überwachen.

Der Einhaltung dieser Pflichten dienen die besonderen Vorschriften über die behördliche Überwachung der Anlagen, etwa in §§ 26 ff. BImSchG, § 40 KrW-/AbfG, § 21 WHG.

Das Instrumentarium zu ihrer Durchsetzung ist in den jeweiligen Einzelrechtsgebieten bestimmt. So können nach § 17 Abs. 1 Satz 1 BImSchG nachträgliche Anordnungen zur Erfüllung der immissionsschutzrechtlichen Betreiberpflichten getroffen werden. § 21 KrW-/AbfG ermächtigt die zuständige Behörde, die im Einzelfall erforderlichen Anordnungen zur Durchführung des KrW-/AbfG und der auf seiner Grundlage erlassenen Rechtsverordnung zu treffen. Entsprechend ermächtigen zumeist Generalklauseln der Landes-Wassergesetze die zuständigen Behörden zur Abwehr von gewässerbezogenen Gefahren, insbesondere von Verstößen gegen wasserrechtliche Vorschriften.

Im Bereich des Arbeitsschutzes kann die zuständige Landesbehörde im Einzelfall die Anordnungen treffen, die zur Beseitigung festgestellter oder zur Verhütung künftiger Verstöße gegen das ChemG oder gegen die nach ihm erlassenen Rechtsverordnungen, namentlich der GefStoffV notwendig sind (§ 23 Abs. 1 ChemG). Darüber hinaus kann sie gemäß § 41 Abs. 6 GefStoffV die Maßnahmen anordnen, die der Arbeitgeber im Einzelfall zur Erfüllung der ihm nach den vorangehenden Abschnitten der Verordnung obliegenden Pflichten (vgl. oben, Kap. 5.4.1.2: Umgang mit Gefahrstoffen) zu treffen hat, insbesondere Maßnahmen zur Abwendung besonderer Gefahren sowie Feststellungen über das tatsächliche Bestehen vermuteter Gefahren und erforderliche Maßnahmen zu ihrer Abwendung. Weiterhin sieht die GefStoffV Anforderungen zum individuellen Schutz von Arbeitnehmern vor, insbesondere regelmäßige und außerordentliche arbeitsmedizinische Untersuchungen (§§ 28 ff., 41 Abs. 1 bis 4 GefStoffV). Schließlich ermächtigt § 17 Abs. 1 Satz 2 SGB VII die Unfallversicherungsträger, im Einzelfall Maßnahmen anzuordnen, welche Unternehmer oder Versicherte zur Erfüllung ihrer Pflichten aufgrund der UVV sowie zur Abwendung besonderer Unfall- und Gesundheitsgefahren zu treffen haben.

5.4.2 Mobile bauliche Anlagen zur Behandlung entnommenen Bodens

5.4.2.1 Genehmigungsbedürftigkeit

Die Errichtung mobiler Bodenbehandlungsanlagen kann als Errichtung einer baulichen Anlage einer Baugenehmigung bedürfen (vgl. z.B. § 60 BauO NW). Bauliche Anlagen sind nach den Legaldefinitionen der Landesbauordnungen mit dem Erdboden verbundene, aus Baustoffen und Bauteilen hergestellte Anlagen. Dabei besteht eine Verbindung mit dem Boden auch dann, wenn die Anlage durch eigene Schwere auf dem Boden ruht oder nach ihrem Verwendungszweck dazu bestimmt ist, überwiegend ortsfest benutzt zu werden (z.B. § 2 Abs.

1 Satz 1 BauO NW). Aus diesem weiten Begriff der baulichen Anlage fallen nur Bodenbehandlungsanlagen heraus, die auch während ihres zeitlich begrenzten Einsatzes auf einem fahrbaren Untersatz, z.B. auf einem Sattelaufleger, montiert sind und so jederzeit vom Grundstück wegbewegt werden können. Alle anderen Bodenbehandlungsanlagen sind in der Regel baugenehmigungspflichtig.

Neben der Baugenehmigung, die anders als die immissionsschutzrechtliche Genehmigung keine Konzentrationswirkung hat, können weitere spezielle Zulassungen erforderlich sein. Hervorzuheben sind auch hier wasserrechtliche Erlaubnisse und Bewilligungen für Gewässerbenutzungen nach den §§ 2 ff. WHG (dazu unten, Kap. 5.4.4). Ferner bedürfen Anlagen zum Lagern und Behandeln wassergefährdender Stoffe i.S.d. § 19g WHG grundsätzlich einer behördlichen Eignungsfeststellung, soweit sie nicht nach wasser-, immissionsschutz-, arbeitsschutz-, bauordnungs- oder europarechtlichen Vorschriften der Bauart nach zugelassen sind (§ 19h WHG). Eine behördliche Entscheidung mit Konzentrationswirkung läßt sich auch hier nach § 13 Abs. 6 BBodSchG durch einen für verbindlich erklärten Sanierungsplan erreichen.

§ 27 Abs. 1 Satz 3 KrW-/AbfG stellt klar, daß die Lagerung und Behandlung von Abfällen zur Beseitigung auch zulässig ist, soweit die diesen Zwecken dienenden Anlagen als unbedeutende Anlagen nach dem BImSchG keiner Genehmigung bedürfen. Dies ist u.a. bei mobilen Abfallbeseitigungsanlagen der Fall, die von vornherein nicht für eine Betriebsdauer von mehr als 12 Monaten am gleichen Ort vorgesehen sind und die § 1 Abs. 1 Satz 1 4. BImSchV deshalb von der Genehmigungspflicht ausnimmt (kritisch dazu TISCHER [64], S. 239 f.; wie hier FLUCK [13], § 27 KrW-/AbfG Rnr. 157).

5.4.2.2 Genehmigungsvoraussetzungen

Die Genehmigung zum Errichten baulicher Anlagen (Baugenehmigung) ist zu erteilen, wenn dem Vorhaben öffentlich-rechtliche Vorschriften nicht entgegenstehen (z.B. § 70 Abs. 1 S. 1 BauO NW). Ebenso wie die immissionsschutzrechtliche Genehmigung setzt also auch die Baugenehmigung die Einhaltung aller einschlägigen öffentlich-rechtlichen Vorschriften voraus. Somit sind auch bei der Errichtung von mobilen Bodenbehandlungsanlagen die materiellen Vorschriften des Abfallrechts sowie die Regelungen des Arbeitsschutzes zu beachten. Daneben können ebenso wie bei den ortsfesten Anlagen (vgl. oben, Kap. 5.4.1.2) vor allem die Vorschriften des materiellen Bauordnungsrechts sowie des Wasserrechts Bedeutung erlangen.

Hinzu kommen die immissionsschutzrechtlichen Vorschriften für nicht nach § 4 BImSchG genehmigungsbedürftige Anlagen, zu denen auch Maschinen, Geräte und sonstige ortsveränderliche Einrichtungen zählen (§ 3 Abs. 5 Nr. 2 BImSchG). Sie sind gemäß § 22 Abs. 1 Satz 1 BImSchG so zu errichten und zu betreiben, das

1. schädliche Umwelteinwirkungen verhindert werden, die nach dem Stand der Technik vermeidbar sind,
2. nach dem Stand der Technik unvermeidbare schädliche Umwelteinwirkungen auf ein Mindestmaß beschränkt werden und
3. die beim Betrieb entstehenden Abfälle ordnungsgemäß beseitigt werden können.

Indem die Vorschrift das Hervorrufen schädlicher Umwelteinwirkungen nicht gänzlich verbietet, sondern im Rahmen des Unvermeidlichen hinnimmt, bleibt sie in ihren An-

forderungen hinter denen des § 5 Abs. 1 Nr. 1 BImSchG für genehmigungsbedürftige Anlagen zurück. Eine Obergrenze bildet hier allerdings § 25 Abs. 2 BImSchG, wonach die Behörde die Errichtung oder den Betrieb untersagen soll, wenn die schädlichen Umwelteinwirkungen das Leben oder die Gesundheit von Menschen oder bedeutende Sachwerte gefährden. Auch eine rein emissionsbezogene Vorsorge (vgl. § 5 Abs. 1 Nr. 2 BImSchG) wird nicht verlangt (JARASS [24], § 22 Rnr. 19; ROßNAGEL [50], § 22 Rnr. 132). Ebenso fehlt ein § 5 Abs. 1 Nr. 3 BImSchG entsprechendes Reststoffverwertungsgebot.

Hingegen setzt der bauplanungsrechtliche Begriff der baulichen Anlage nach § 29 Satz 1 BauGB, der Voraussetzung für die Anwendbarkeit der §§ 30 ff. BauGB über die bauliche Nutzung von Grundstücken ist, eine auf Dauer angelegte Verbindung der Anlage mit dem Erdboden voraus (SCHLICHTER [56], § 29 Rnr. 7 f.; LÖHR [36], § 29 Rnr. 10), die bei mobilen Anlagen gerade nicht gegeben ist.

5.4.2.3 Genehmigungsverfahren

Die Baugenehmigung ergeht in einem einfachen behördlichen Zulassungsverfahren ohne Umweltverträglichkeitsprüfung und Öffentlichkeitsbeteiligung.

5.4.2.4 Betrieb

Für die Anforderungen an den Betrieb der Anlage gilt das unter Kap. 5.4.1.4 ausgeführte entsprechend. Anordnungen zur Durchsetzung der immissionsschutzrechtlichen Pflichten nach § 22 BImSchG finden ihre Grundlage in § 24 BImSchG.

5.4.3 Sonstige Bodenbehandlungsanlagen

Als sonstige Bodenbehandlungsanlagen kommen z.B. in Betracht Anlagen zur Bodenwäsche, die auf einem Sattelaufleger nicht fest mit dem Erdboden verbunden sind, oder die *In situ*-Bodenbehandlung.

Auch soweit für diese Anlagen keine speziellen Zulassungsverfahren, wie z.B. für Gewässerbenutzungen (dazu Kap. 5.4.4) bestehen, sind die materiellen Vorschriften vor allem des Abfallrechts, des Immissionsschutzrechts für nicht genehmigungsbedürftige Anlagen (§§ 22 ff. BImSchG), des Wasserrechts sowie des Arbeitsschutzrechts zu beachten (vgl. oben, Kap. 5.4.2.2). Zu ihrer Durchsetzung kann die Behörde Verfügungen im Einzelfall erlassen (vgl. oben, Kap. 5.4.2.4).

5.4.4 Wasserrechtliche Erlaubnis

Nach § 2 Abs. 1 WHG bedarf eine Benutzung von Gewässern der behördlichen Erlaubnis. Benutzungen im Sinne des WHG sind gemäß § 3 Abs. 1 WHG etwa das Entnehmen von Grund- und Oberflächenwasser oder das Einleiten von Brauchwasser in einen Vorfluter oder in die Kanalisation. Von besonderer Bedeutung für *In situ*-Sanierungen ist der Benutzungstatbestand der Nr. 5 - das Einleiten von Stoffen in das Grundwasser. Nach dem

Auffangtatbestand des § 3 Abs. 2 Nr. 2 WHG gelten als Benutzungen auch Maßnahmen, die geeignet sind, dauernd oder in einem nicht nur unerheblichen Ausmaß schädliche Veränderungen der physikalischen, chemischen oder biologischen Beschaffenheit des Wassers herbeizuführen.

Die **Erlaubnis und die Bewilligung sind zu versagen**, soweit von der beabsichtigten Benutzung eine Beeinträchtigung des Wohls der Allgemeinheit, insbesondere eine Gefährdung der öffentlichen Wasserversorgung, zu erwarten ist (§ 6 Abs. 1 WHG). Eine Beeinträchtigung des Wohls der Allgemeinheit liegt insbesondere vor, wenn durch die Benutzung eine schädliche Veränderung des Grundwassers oder sonstige nachteilige Veränderung seiner Eigenschaften zu erwarten ist. Die Erteilung der Erlaubnis steht im übrigen im wasserwirtschaftlich geprägten Ermessen der Behörde.

Zusätzliche besondere Anforderungen sieht § 7a WHG für das Einleiten von Abwasser vor. Danach ist die Schadstofffracht des Abwassers so gering zu halten, wie dies bei Einhaltung der jeweils in Betracht kommenden Verfahren nach dem Stand der Technik möglich ist (Abs. 1 Satz 1). Als Stand der Technik definiert § 7a Abs. 5 WHG den Entwicklungsstand technisch und wirtschaftlich durchführbarer fortschrittlicher Verfahren, Einrichtungen oder Betriebsweisen, die als beste verfügbare Techniken zur Begrenzung von Emissionen praktisch geeignet sind und folgt damit dem europäischen Standard der "best available technique not entailing excessive cost - BATNEEC" (KLOEPFER [27], § 13 Rnr. 98, § 3 Rnr. 76). Schlechthin verboten ist nach § 26 Abs. 1 WHG das Einleiten von festen, nicht aber von schlammigen Stoffen in oberirdische Gewässer zum Zweck der Entledigung. Eine Erlaubnis zum Einleiten von Stoffen in das Grundwasser darf gemäß § 34 Abs. 1 WHG nur erteilt werden, wenn eine schädliche Verunreinigung des Grundwassers oder eine sonstige nachteilige Veränderung seiner Eigenschaften nicht zu besorgen ist.

Die Erlaubnis ergeht grundsätzlich im einfachen Verwaltungsverfahren. § 4 WHG hebt die Möglichkeit hervor, die Erlaubnis mit Bedingungen und Auflagen zu versehen.

Gemäß § 7 Abs. 1 Satz 1 WHG ist die **Erlaubnis von Gesetzes wegen widerruflich**. Unter den gleichen Voraussetzungen sind als mildere Mittel auch nachträgliche Bedingungen und Auflagen zulässig; § 5 Abs. 1 Satz 1 WHG hebt dies für einzelne Arten nachträglicher Bestimmungen ausdrücklich hervor. Ein Widerruf wird insbesondere in Betracht kommen, wenn sich während des Betriebs herausstellt, daß die Voraussetzungen für die Zulassung nicht eingehalten werden oder die Behörde aufgrund des ihr eingeräumten Ermessens sonst berechtigt wäre, die Zulassung zu versagen. In diesem Sinne heben Bestimmungen einiger Landeswassergesetze ausdrücklich hervor, daß die Erlaubnis widerrufen werden kann, wenn von der weiteren Benutzung eine Beeinträchtigung des Wohls der Allgemeinheit zu erwarten ist und eine Beschränkung der Erlaubnis nicht ausreicht, dies zu vermeiden (z.B. § 25 Abs. 2 Satz 1 Buchst. a LWG NW; dazu CZYCHOWSKI [8], § 7 Rnr. 24 f.; vgl. a. PAPE [42], § 7 WHG Rnr. 26 ff.).

5.4.5 Für verbindlich erklärter Sanierungsplan, Sanierungsverfügung

Außer für Vorhaben, die der Umweltverträglichkeitsprüfung unterliegen, also insbesondere für solche, die im nicht vereinfachten immissionsschutzrechtlichen Genehmigungsverfahren ergehen (vgl. oben, Kap. 5.4.1.3), lassen sich gemäß §§ 13 Abs. 6, 16 Abs. 2 BBodSchG durch einen für verbindlich erklärten Sanierungsplan oder eine behördliche Sanierungsverfügung behördliche Entscheidungen mit Bündelungswirkung treffen, die – anders als bei der

Konzentrationswirkung der immissionsschutzrechtlichen Genehmigung – auch die wasserrechtliche Erlaubnis mit einbeziehen können (ausführlich zur Rechtsnatur dieser "Einschlußwirkung" FLUCK [14]). Voraussetzung ist, daß die mit eingeschlossenen Entscheidungen im Sanierungsplan bzw. in der Anordnung aufgeführt werden. Auf diese Weise werden die Behörden in die Lage versetzt, ein effektives Verfahrensmanagement durchzuführen (DOMBERT [10], BBodSchG § 13 Rnr. 29; HILGER [21], Rnr. 84; ERBGUTH / STOLLMANN [11], S. 133 f.; KOBES [30], S. 793; zurückhaltender VIERHAUS [67], Einleitung BBodSchG Rnr. 106).

5.5 Wiedereinbau des entnommenen Bodens

5.5.1 Allgemeine Anforderungen

Beim Wiedereinbau des entnommenen Bodens ist zunächst die allgemeine wasserrechtliche Vorschrift des § 1a Abs. 2 WHG zu beachten, die bei Maßnahmen, mit denen Einwirkungen auf ein Gewässer verbunden sein können, die Anwendung der nach den Umständen erforderlichen Sorgfalt fordert, um eine Verunreinigung des Wassers oder eine sonstige nachteilige Veränderung seiner Eigenschaften zu verhüten. Ferner sind die nach Lage des Einzelfalls einschlägigen Vorschriften etwa des Bau- sowie des Naturschutzrechts zu beachten. Bodenschutzrechtlich sind, wie § 5 Abs. 6 BBodSchV klarstellt, die beschriebenen (vgl. oben, Kap. 5.2.1) Anforderungen an die Sanierung nach § 4 Abs. 3 BBodSchG abschließend.

5.5.2 Einbau als Abfall

5.5.2.1 Grundsätze

Soweit der ausgekofferte Boden nicht schon durch die Behandlung die Abfalleigenschaft verloren hat (dazu oben, Kap. 5.3.3), treten für den Wiedereinbau die Vorschriften des KrW-/AbfG hinzu. Danach sind einerseits die stofflichen Eigenschaften des Bodens so weit wie möglich zu nutzen (§§ 5 Abs. 2 Satz 2, 10 Abs. 2 Satz 3 KrW-/AbfG). Andererseits darf die vorgesehene Entsorgung - hier also der Wiedereinbau - das Wohl der Allgemeinheit nicht beeinträchtigen (§§ 10 Abs. 4, 5 Abs. 3 KrW-/AbfG). Im einzelnen ist zu differenzieren, ob der Wiedereinbau zum Zweck der Verwertung oder zu dem der Beseitigung erfolgt (zur Abgrenzung siehe oben, Kap. 5.3.2).

5.5.2.2 Anforderungen an die Verwertung

Zur Konkretisierung der sich aus den mitunter gegenläufigen Vorschriften ergebenden Anforderungen hat die Länderarbeitsgemeinschaft Abfall (LAGA [33]) noch unter der Geltung des früheren AbfG Anforderungen an die stoffliche Verwertung von mineralischen Reststoffen/Abfällen, darunter auch Technische Regeln für die Verwertung von Boden erarbeitet. In ihnen werden bestimmte Zuordnungswerte als Orientierungswerte für einzelne Schadstoffparameter zu einzelnen Einbauklassen festgelegt (siehe Anhang 4). Für die Einbauklassen werden jeweils spezifische Beschränkungen und Sicherungsmaßnahmen beschrieben (Tab. 5.1).

Die Schadstoffgehalte bis zu den **Zuordnungswerten Z 0** kennzeichnen natürlichen Boden. Werden sie eingehalten, ist davon auszugehen, daß die in § 2 Abs. 1 AbfG (§ 10 Abs. 4 KrW-/AbfG) genannten Schutzgüter des Wohls der Allgemeinheit nicht beeinträchtigt werden. Gleichwohl soll auf besonders sensiblen Flächen, wie Kinderspielplätzen, Sportanlagen, Schulhöfen, Klein- und Hausgärten, gärtnerisch und landwirtschaftlich genutzten Flächen sowie festgesetzten und geplanten Trinkwasserschutzgebieten oder Heilschutzgebieten auf den Einbau von Boden aus der Bodenbehandlung und der Altlastensanierung aus Vorsorgegründen regelmäßig verzichtet werden.

Tab. 5.1: Einbauklassen und Zuordnungswerte

Einbauklasse	Zuordnungswert (als Obergrenze der Einbauklasse)
Uneingeschränkter Einbau	Zuordnungswerte Z 0
Eingeschränkter offener Einbau	Zuordnungswerte Z 1.1
in hydrogeologisch günstigen Gebieten unter Beachtung der Vorbelastung (Verschlechterungsverbot)	Zuordnungswerte Z 1.2
Eingeschränkter Einbau mit definierten technischen Sicherungsmaßnahmen	Zuordnungswerte Z 2

Weiterhin ist in Gebieten, in denen die Hintergrundbelastung einschließlich der allgemeinen anthropogenen Zusatzbelastung höher liegt, regelmäßig ein uneingeschränkter Einbau des dort anfallenden Bodens bis zu diesen höheren Werten möglich.

Bei Unterschreitung der **Zuordnungswerte Z 1** ist ein offener Einbau des Bodens in unempfindlichen Flächen möglich. Dies können bergbauliche Rekultivierungsgebiete, Straßenbau und begleitende Erdbaumaßnahmen, Industrie-, Gewerbe- und Lagerflächen oder Parkanlagen, soweit sie eine geschlossene Vegetationsdecke haben, sein. Ausgenommen sind Trinkwasser- und Heilquellenschutzgebiete, Gebiete mit häufigen Überschwemmungen, Naturschutzgebiete und Biosphärenreservate sowie die schon genannten besonders sensiblen Flächen und Nutzungen. Beim Einbau soll der Abstand zwischen der Schüttkörperbasis und dem höchsten zu erwartenden Grundwasserstand mindestens 1 m betragen.

Weiter werden **Zuordnungswerte Z 1.1 und Z 1.2** unterschieden. Dabei gelten die Z 1.2-Werte nur für hydrogeologisch günstige Gebiete, insbesondere solche, bei denen der Grundwasserleiter nach oben durch flächig verbreitete, ausreichend mächtige Deckschichten mit hohem Rückhaltevermögen gegenüber Schadstoffen überdeckt ist. In Gebieten mit agrarischer Nutzung ist eine Verwertung bei Überschreitung der Z 1.1-Werte nicht zulässig. Im übrigen ist wegen der höheren Schadstoffgehalte bei der Verwertung bis zur Obergrenze Z 1.2 ein Erosionsschutz, z.B. durch eine geschlossene Vegetationsdecke, erforderlich.

Werden bloß die **Zuordnungswerte Z 2** eingehalten, kommt ein Einbau nur bei Erdbaumaßnahmen, der Anlage von Verkehrsflächen sowie zur bautechnischen Verwendung im

Deponiekörper und nur mit definierten technischen Sicherheitsmaßnahmen in Betracht. Ausgeschlossen ist auch hier der Einsatz in den für die Einbauklasse 1 genannten Gebieten.

Bei einem Überschreiten der Z 2-Werte (d.h. **Zuordnungswerte Z 3 bis Z 5**) kommt regelmäßig nur die Ablagerung als Abfall zur Beseitigung oder die chemisch-physikalische, thermische oder mikrobiologische Vorbehandlung in Betracht.

5.5.2.3 Anforderungen an die Beseitigung

Erfolgt der Einbau als Deponierung von Abfall zur Beseitigung, so bedarf er gemäß §§ 27 Abs. 1 Satz 1, 31 Abs. 2 KrW-/AbfG grundsätzlich einer Planfeststellung bzw. einer Plangenehmigung nach § 74 Abs. 6 VwVfG i.V.m. § 31 Abs. 3 KrW-/AbfG.

Soll das entnommene Bodenmaterial im Bereich der von der Altlastensanierung betroffenen Fläche wieder eingebracht werden, können ein für verbindlich erklärter Sanierungsplan oder eine behördliche Anordnung zur Durchführung der Sanierung die abfallrechtliche Zulassung ersetzen (§ 13 Abs. 5 BBodSchG). Voraussetzung ist, daß durch die Regelung im Sanierungsplan bzw. in der Anordnung sichergestellt wird, daß das Wohl der Allgemeinheit nicht beeinträchtigt wird. Materiell werden damit die gleichen Anforderungen wie für die Zulassung als Abfallbeseitigungsanlage nach § 32 Abs. 1 Nr. 1 KrW-/AbfG zugrunde gelegt, so daß § 13 Abs. 5 BBodSchG eine Erleichterung ausschließlich in verfahrensrechtlicher Hinsicht mit sich bringt (SCHOENECK [58], § 13 Rnr. 29 f.; DOMBERT [10], BBodSchG § 13 Rnr. 45 f.; vgl. a. KOBES [30], S. 794).

Daneben kommt im Einzelfall die Erteilung einer Ausnahmegewilligung vom Anlagenzwang nach § 27 Abs. 1 KrW-/AbfG gemäß § 27 Abs. 2 KrW-/AbfG in Betracht, wenn sichergestellt ist, daß durch den Einbau das Wohl der Allgemeinheit nicht beeinträchtigt wird (dazu PAETOW [41], § 27 Rnr. 51; VON LERSNER [35], KrW-/AbfG § 27 (0127), Rnr. 34; FLUCK [13], § 27 KrW-/AbfG Rnr. 182).

5.6 Gesetze, Verordnungen, Allgemeine Verwaltungsvorschriften

AMBV - Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei der Benutzung von Arbeitsmitteln bei der Arbeit (Arbeitsmittelbenutzungsverordnung) v. 11.3.1997 (BGBl. I S. 450)

ArbSchG - Gesetz über die Durchführung von Maßnahmen des Arbeitsschutzes zur Verbesserung der Sicherheit und des Gesundheitsschutzes der Beschäftigten bei der Arbeit (Arbeitsschutzgesetz) v. 7.8.1996 (BGBl. I S. 1246), zuletzt geändert am 4.12.1997 (BGBl. I S. 3843)

ArbStättV - Verordnung über Arbeitsstätten (Arbeitsstättenverordnung) v. 20.3.1975 (BGBl. I S. 729), zuletzt geändert am 4.12.1996 (BGBl. I S. 1841)

BauGB - Baugesetzbuch i.d.F. v. 27.8.1997 (BGBl. I S. 2141, ber. BGBl. 1998 I S. 137)

BauO NW - Bauordnung für das Land Nordrhein-Westfalen (Landesbauordnung) v. 7.3.1995 (GV NW S. 218, ber. S. 982), geändert am 24.10.1998 (GV NW S. 687)

BaustellV - Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz auf Baustellen (Baustellenverordnung) v. 10.6.1998 (BGBl. I S. 1283)

BBodSchG - Gesetz zum Schutz vor schädlichen Bodenveränderungen und zur Sanierung von Altlasten (Bundes-Bodenschutzgesetz) v. 17.3.1998 (BGBl. I S. 502)

BBodSchV - Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung v. 12.7.1999 (BGBl. I S. 1554)

BestbüAbfV - Verordnung zur Bestimmung von besonders überwachungsbedürftigen Abfällen (Bestimmungsverordnung besonders überwachungsbedürftige Abfälle) v. 10.9.1996 (BGBl. I S. 1366), geändert am 22.12.1998 (BGBl. I S. 3956)

BGB - Bürgerliches Gesetzbuch v. 18.8.1896 (RGL. S. 195), zuletzt geändert am 21.7.1999 (BGBl. I S. 1642)

BImSchG - Gesetz zum Schutz vor schädlichen Umwelteinwirkungen durch Luftverunreinigungen, Geräuschen, Erschütterungen und ähnliche Vorgänge (Bundes-Immissionsschutzgesetz) i.d.F. v. 14.5.1990 (BGBl. I S. 880), zuletzt geändert am 19.10.1998 (BGBl. I S. 3178)

BioStoffV - Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei Tätigkeiten mit biologischen Arbeitsstoffen v. 27.1.1999 (BGBl. I S. 50), zuletzt geändert am 18.10.1999 (BGBl. S. 2059, 2065)

ChemG - Gesetz zum Schutz vor gefährlichen Stoffen (Chemikaliengesetz) i.d.F. v. 25.7.1994 (BGBl. I S. 1703), zuletzt geändert am 14.5.1998 (BGBl. I S. 950)

EAKV - Verordnung zur Einführung des Europäischen Abfallkatalogs v. 13.9.1996 (BGBl. I S. 1428)

GBO - Grundbuchordnung i.d.F. v. 26.5.1994 (BGBl. I S. 1114), zuletzt geändert am 6.6.1995 (BGBl. I S. 778)

GefStoffV - Verordnung zum Schutz vor gefährlichen Stoffen (Gefahrstoffverordnung) v. 26.10.1993 (BGBl. I S. 1782, ber. s. 2049), zuletzt geändert am 15.11.1999 (BGBl. I S. 2233)

GewO - Gewerbeordnung i.d.F. v. 22.2.1999 (BGBl. I S. 202), geändert am 24.3.1999 (BGBl. I S. 385)

GG - Grundgesetz für die Bundesrepublik Deutschland v. 23.5.1949 (BGBl. S. 1), zuletzt geändert am 16.7.1998 (BGBl. I S. 1822)

KostO NW - Kostenordnung zum Verwaltungsvollstreckungsgesetz v. 12.8.1997 (GV NW S. 258), geändert am 13.2.1998 (GV NW S. 132)

KrW-/AbfG - Gesetz zur Förderung der Kreislaufwirtschaft und Sicherung der umweltverträglichen Beseitigung von Abfällen (Kreislaufwirtschafts- und Abfallgesetz) v. 27.9.1994 (BGBl. I S. 2705), zuletzt geändert am 25.8.1998 (BGBl. I S. 2455)

LasthandhabV - Verordnung über Sicherheit und Gesundheitsschutz bei der manuellen Handhabung von Lasten bei der Arbeit (Lastenhandhabungsverordnung) v. 4.12.1996 (BGBl. I S. 1841)

LWG NW - Wassergesetz für das Land Nordrhein-Westfalen (Landeswassergesetz) i.d.F. v. 25.6.1995 (GV NW S. 926)

PSA-BV - Verordnung über Sicherheit und Gesundheit bei der Benutzung persönlicher Schutzausrüstungen bei der Arbeit (PSA-Benutzungsverordnung) v. 4.12.1996 (BGBl. I S. 1841)

SGB VII - Siebtes Buch Sozialgesetzbuch - Gesetzliche Unfallversicherung - v. 7.8.1996 (BGBl. I S. 1254), zuletzt geändert am 22.12.1999 (BGBl. I S. 2534)

SächsABG - Sächsisches Abfallwirtschafts- und Bodenschutzgesetz i.d.F. v. 31.5.1999 (Sächs GVBl. S. 261)

TA Abfall - Zweite allgemeine Verwaltungsvorschrift zum Abfallgesetz, Teil 1: Technische Anleitung zur Lagerung, chemisch/physikalischen, biologischen Behandlung, Verbrennung und Ablagerung von besonders überwachungsbedürftigen Abfällen v. 12.3.1991 (GMBL. S. 139, ber. S. 469)

UmweltRG - Umweltrahmengesetz v. 29.6.1990 (GBl. DDR I S. 649), zuletzt geändert am 22.3.1991 (BGBl. I S. 766)

UVPG - Gesetz über die Umweltverträglichkeitsprüfung v. 12.2.1990 (BGBl. I S. 205), zuletzt geändert am 18.8.1997 (BGBl. I S. 2081)

VwVfG - Verwaltungsverfahrensgesetz i.d.F. v. 21.9.1998 (BGBl. I S. 3050)

VwVG NW - Verwaltungsvollstreckungsgesetz für das Land Nordrhein-Westfalen i.d.F. v. 13.5.1980 (GV NW S. 510), zuletzt geändert am 18.3.1997 (GV NW S. 50)

VwVwS - Allgemeine Verwaltungsvorschrift zum Wasserhaushaltsgesetz über die Einstufung wassergefährdender Stoffe in Wassergefährdungsklassen (Verwaltungsvorschrift wassergefährdende Stoffe) v. 17.5.1999 (BANz Nr. 98a)

WHG - Gesetz zur Ordnung des Wasserhaushalts (Wasserhaushaltsgesetz) i.d.F. v. 12.11.1996 (BGBl. I S. 1695), zuletzt geändert am 25.8.1998 (BGBl. I S. 2455)

4. BImSchV - Vierte Verordnung zur Durchführung des BImSchG (Verordnung über genehmigungsbedürftige Anlagen) i.d.F. v. 14.3.1997 (BGBl. I S. 504), zuletzt geändert am 23.2.1999 (BGBl. I S. 186)

9. BImSchV - Neunte Verordnung zur Durchführung des BImSchG (Verordnung über das Genehmigungsverfahren) i.d.F. v. 29.5.1992, zuletzt geändert am 23.2.1999 (BGBl. I S. 186)

5.7 Anhänge

Anhang 1: Maßnahmenwerte nach Anhang 2 BBodSchV

1. Direkte Aufnahme von Dioxinen/Furanen (Ziffer 1.2) (in [ng]-TEq^{*})/kg Trockenmasse, Feinboden, Analytik nach Anhang 1 BBodSchV)

Stoff	Kinderspiel- flächen	Wohngebiete	Park- und Freizeit- anlagen	Industrie- und Gewerbe- grundstücke
Dioxine/Furane (PCDD/F)	100	1.000	1.000	10.000

^{*}) Summe der 2, 3, 7, 8-TCDD-Toxizitätsäquivalenzwerte (nach NATO/CCMS)

2. Schadstoffübergang Boden - Nutzpflanze auf Ackerbauflächen und in Nutzgärten im Hinblick auf die Pflanzenqualität (Ziffer 2.2)

Stoff	auf Flächen mit Brotweizenanbau oder Anbau stark Cadmium-anreichernder Gemüsearten [mg/kg] ¹	ansonsten [mg/kg] ¹
Cadmium	0,04	0,1

¹) in mg/kg Trockenmasse, Feinboden, Analytik nach Anhang 1 BBodSchV)

Extraktionsverfahren: Ammoniumnitrat.

3. Schadstoffübergang Boden - Nutzpflanze auf Grünlandflächen im Hinblick auf die Pflanzenqualität (Ziffer 2.3)

Stoff	[mg/kg] ¹
Arsen	50
Blei	1.200
Cadmium	20
Kupfer	1.300 ²)
Nickel	1.900
Quecksilber	2
Thallium	15
Polychlorierte Biphenyle (PCB ₆)	0,2

¹) in mg/kg Trockenmasse, Feinboden, Analytik nach Anhang 1 BBodSchV)

²) Bei Grünlandnutzung durch Schafe gilt als Maßnahmenwert 200 mg/kg Trockenmasse.

Anhang 2: Testtabelle für die Beurteilung von Konzentrationen verschiedener Stoffe im Boden und Grundwasser für die Nutzungsformen Wohngebiete und Trinkwassergewinnungsgebiete (Niederländische Liste)

A – Referenzwerte B – Prüfwerte für nähere Untersuchung C – Prüfwerte für Sanierungsuntersuchung bzw. Sanierung			
Vorkommen in:	Boden [mg/kg Trockenmasse]		
Stoffe/Konzentrationshöhe			
I. Metalle	A	B	C
Chrom	BQ	250	800
Kobalt	20	50	300
Nickel	BQ	100	500
Kupfer	BQ	100	500
Zink	BQ	500	3000
Arsen	BQ	30	50
Molybdän	10	40	200
Cadmium	BQ	5	20
Zinn	20	50	300
Barium	200	400	2000
Quecksilber	BQ	2	10
Blei	BQ	150	600
II. anorganische Verbindungen	A	B	C
Ammonium (als N)	–	–	–
Fluorid (gesamt)	BQ	400	2000
Cyanid (gesamt – frei)	1	10	100
Cyanid (gesamt – komplexgebunden)	5	50	500
Schwefel (gesamt Sulfide)	2	20	200
Bromid (gesamt) ***)	20	50	300
Phosphat (als P) **)	–	–	–
Nitrat (als N) **)	–	–	–
Sulfat ***)	–	–	–
Chlorid ***)	–	–	–

Fortsetzung Anhang 2

III. aromatische Verbindungen	A	B	C
Benzol	0,05 n	0,5	5
Ethylbenzol	0,05 n	5	50
Toluol	0,05 n	3	30
Xylole	0,05 n	5	50
Phenole	0,05 n	1	10
Aromaten (gesamt) ¹⁾	–	7	70
IV. polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH)	A	B	C
Naphthalin	BQ	5	50
Anthracen	BQ	10	100
Phenanthren	BQ	10	100
Fluoranthren	BQ	10	100
Chrysen	BQ	5	50
Benzo(a)pyren	BQ	1	10
Benz(a)anthracen	BQ	5	50
Benzo(k)fluoranthren	BQ	5	50
Indeno(1, 2, 3-cd)pyren	BQ	5	50
Benzo(ghi)perylen	BQ	10	100
PAH (gesamt) ²⁾	1	20	200
V. chlorierte Kohlenwasserstoffe (CKW)	A	B	C
aliphatische CKW (einzeln)	BQ	5	50
aliphatische CKW (gesamt)	–	7	70
Chlorbenzole (einzeln)	BQ	1	10
Chlorbenzole (gesamt)	–	2	20
Chlorphenole (einzeln)	BQ	0,5	5
Chlorphenole (gesamt)	–	1	10
chlorierte polycyclische Kohlenwasserstoffe (gesamt)	BQ	1	10
polychlorierte Biphenyle (PCB) (gesamt)	BQ	1	10
EOCl (extrahierbares organisches Chlor) (gesamt)	0,1	8	80

Fortsetzung Anhang 2

VI. Pestizide	A	B	C
org. Chlorpestizide (einzeln)	BQ	0,5	5
org. Chlorpestizide (gesamt)	–	1	10
Pestizide (einzeln) (nicht chloriert)	BQ	1	10
Pestizide (gesamt) (nicht chloriert)	–	2	20
VII. sonstige Verunreinigungen	A	B	C
Tetrahydrofuran	0,1	4,0	40
Pyridin	0,1	2,0	20
Tetrahydrothiophen	0,1	5,0	50
Cyclohexan	0,1	6,0	60
Styrol	0,1	5,0	50
Phthalat (gesamt)	0,1	50	500
oxid. PAH (gesamt)	1	200	2000
Mineralöl	BQ	1000	5000

*) Die niedrigen Werte gelten in sandigen Gebieten, die höheren in Gebieten mit Ton- und Torfböden.

**) Niedrigere Werte können zum Schutz nährstoffarmer Gebiete erforderlich sein.

***) Höhere Werte treten von Natur aus in Gebieten mit starkem maritimem Einfluß auf.

BQ Referenzwerte der Bodenqualität

n Nachweisgrenze

¹⁾ Aromaten (gesamt) = Summe Benzol, Ethylbenzol, Toluol, Xylole

²⁾ PAH (gesamt) = Summe der unter IV aufgeführten polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe

Quelle: VROM NL, 1988

(Abdruck aus: Der Rat von Sachverständigen in Umweltfragen, 1989 [47])

Anhang 3: Orientierungswerte für Bodenbelastungen nach LAWA

Parameter	Einheit	Prüfwert	Maßnahmen- schwellenwert
PAK, gesamt ¹⁾	mg/kg	2 – 10	10 – 100
- Naphthalin als Einzelstoff	mg/kg	1 – 2	5
LHKW, gesamt ²⁾	mg/kg	1 – 5	5 – 25
- Σ LHKW, karzinogen ³⁾	mg/kg	0,1 – 1	0,1 – 5
LHKW, gesamt ²⁾ – in der Bodenluft ⁸⁾	mg/m ³	5 – 10	50
PCB, gesamt ⁵⁾	mg/kg	0,1 - 1	1 – 10
Kohlenwasserstoffe ⁶⁾ (außer Aromaten)	mg/kg	300 – 1000	1000 – 5000
BTX-Aromaten, gesamt ^{7) 8)}	mg/kg	2 – 10	10 – 30
- Benzol als Einzelstoff	mg/kg	0,1 – 0,5	0,5 – 3
Phenole, wasserdampflich	mg/kg	1 – 10	10 – 25
Chlorphenole, gesamt	mg/kg	1 – 5	5 – 10
Chlorbenzole, gesamt	mg/kg	1 – 5	5 – 10

¹⁾ PAK, gesamt: Summe der polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, in der Regel Summe von 16 Einzelsubstanzen nach der Liste der US Environmental Protection Agency (EPA) ohne Naphthalin; ggf. unter Berücksichtigung weiterer relevanter Einzelstoffe (z. B. Methylnaphthaline)

²⁾ LHKW, gesamt: Leichtflüchtige Halogenkohlenwasserstoffe, d. h. Summe der halogenierten C₁- und C₂-Kohlenwasserstoffe

³⁾ LHKW, karzinogen: besondere Festlegung für die Summe der erwiesenermaßen karzinogenen LHKW Tetrachlormethan (CCl₄), Chlorethen (Vinylchlorid, C₂H₃Cl) und 1,2-Dichlorethan

⁴⁾ PBSM, gesamt: Organisch-chemische Stoffe zur Pflanzenbehandlung und Schädlingsbekämpfung einschließlich ihrer toxischen Hauptabbauprodukte

⁵⁾ PCB, gesamt: Summe der polychlorierten Biphenyle; in der Regel 6 Kongenere nach Ballschmiter (bzw. Altöl-VO), ggf. unter Berücksichtigung weiterer relevanter Einzelstoffe

⁶⁾ Bestimmung mittels IR-Spektroskopie nach DIN 38409-H18

⁷⁾ BTX-Aromaten, gesamt: Leichtflüchtige aromatische Kohlenwasserstoffe (Benzol, Toluol, Xylole, Ethylbenzol, Styrol, Cumol etc.); besondere Festlegung für Benzol

⁸⁾ Die Orientierungswerte für LHKW in der Bodenluft können mit Einschränkung auch für die Beurteilung von Belastungen mit leichtflüchtigen BTX-Aromaten herangezogen werden.

⁹⁾ Es sind nur Orientierungswerte für leichtflüchtige und lipophile organische Stoffe genannt. Die Tabelle gibt hilfsweise als Übergangslösung Hinweise zur Bewertung. Sie gilt, bis wissenschaftlich fundierte Gesamtgehalte oder einheitliche, aussagekräftige Elutionsverfahren für diese Stoffe vorgelegt werden.

Anhang 4: Zuordnungswerte für Boden nach LAGA, Technische Regeln Verwertung

Zuordnungswerte Feststoff für Boden

Parameter	Dimension	Zuordnungswert			
		Z 0	Z 1.1	Z 1.2	Z 2
Ph-Wert ¹⁾		5,5 –	5,5 –	5 – 9	–
EOX	mg/kg	1	3	10	15
Kohlenwasserstoffe	mg/kg	100	300	500	1000
Σ BTEX	mg/kg	< 1	1	3	5
Σ LHKW	mg/kg	< 1	1	3	5
Σ PAK n. EPA	mg/kg	1	5 ²⁾	15 ³⁾	20
Σ PCB (Congenere nach DIN 51527)	mg/kg	0,02	0,1	0,5	1
Arsen	mg/kg	20	30	50	150
Blei	mg/kg	100	200	300	1000
Cadmium	mg/kg	0,6	1	3	10
Chrom (ges.)	mg/kg	50	100	200	600
Kupfer	mg/kg	40	100	200	600
Nickel	mg/kg	40	100	200	600
Quecksilber	mg/kg	0,3	1	3	10
Thallium	mg/kg	0,5	1	3	10
Zink	mg/kg	120	300	500	1500
Cyanide (ges.)	mg/kg	1	10	30	100

¹⁾ Niedrigere pH-Werte stellen allein kein Ausschlußkriterium dar. Bei Überschreitung ist die Ursache zu prüfen.

²⁾ Einzelwerte für Naphthalin und Benzo-(a)-Pyren jeweils kleiner 0,5.

³⁾ Einzelwerte für Naphthalin und Benzo-(a)-Pyren jeweils kleiner 1,0.

Zuordnungswerte Eluat für Boden

Parameter	Dimension	Zuordnungswert			
		Z 0	Z 1.1	Z 1.2	Z 2
pH-Wert ¹⁾		6,5 – 9	6,5 – 9	6 – 12	5,5 – 12
elektrische Leitfähigkeit	$\mu\text{S}/\text{cm}$	500	500	1000	1500
Chlorid	mg/l	10	10	20	30
Sulfat	mg/l	50	50	100	150
Cyanid (ges.)	$\mu\text{g}/\text{l}$	< 10	10	50	100 ³⁾
Phenolindex ²⁾	$\mu\text{g}/\text{l}$	< 10	10	50	100
Arsen	$\mu\text{g}/\text{l}$	10	10	40	60
Blei	$\mu\text{g}/\text{l}$	20	40	100	200
Cadmium	$\mu\text{g}/\text{l}$	2	2	5	10
Chrom (ges.)	$\mu\text{g}/\text{l}$	15	30	75	150
Kupfer	$\mu\text{g}/\text{l}$	50	50	150	300
Nickel	$\mu\text{g}/\text{l}$	40	50	150	200
Quecksilber	$\mu\text{g}/\text{l}$	0,2	0,2	1	2
Thallium	$\mu\text{g}/\text{l}$	< 1	1	3	5
Zink	$\mu\text{g}/\text{l}$	100	100	300	600

¹⁾ Niedrigere pH-Werte stellen allein kein Ausschlußkriterium dar. Bei Überschreitung ist die Ursache zu prüfen.

²⁾ Bei Überschreitungen ist die Ursache zu prüfen. Höhere Gehalte, die auf Huminstoffe zurückzuführen sind, stellen kein Ausschlußkriterium dar.

³⁾ Verwertung für Z 2 > 100 $\mu\text{g}/\text{l}$ ist zulässig, wenn Z 2 Cyanid (leicht freisetzbar) < 50 $\mu\text{g}/\text{l}$.

5.8 Literatur

1. **Becker, B.** 1999. Die neue öffentlich-rechtliche Haftung für die Sanierung schädlicher Bodenveränderungen und Altlasten nach § 4 III BBodSchG, DVBl.: 134
2. **Beckmann, M.** 1995. Rechtsfragen der Genehmigung mobiler Bodenreinigungsanlagen, NVwZ: 305
3. **Beckmann, M und A. Kersting.** 1999. In: Umweltrecht, Komm., Begr. Landmann, Robert von / Rohmer, Gustav, Losebl.
4. **Bender, B., R. Sparwasser und R. Engel.** 1995 Umweltrecht, 3. Aufl.
5. **Bund-/Länder-AG.** 1997. Abfallbegriff, Abfallverwertung und Abfallbeseitigung nach dem KrW-/AbfG, Entwurf, gebilligt von der Umweltministerkonferenz am 5. / 6.11.1997
6. **Burmeier, H.** 1999. Grundsätze zum Arbeits- und Nachbarnschutz bei der Sanierung von Altlasten. In: V. Franzius, K. Wolf und E. Brandt (Hrsg.). Handbuch der Altlastensanierung, Losebl. 2. Aufl. Fach 7102
7. **Clément, A.** 1997. Handlungsstörerhaftung für Rüstungsaltlasten nach dem Montan-Schema
8. **Czychowski, M.** 1998. WHG, Komm., 7. Aufl.
9. **Dolde, K.-P. und A. Vetter.** 1997. Abgrenzung von Abfallverwertung und Abfallbeseitigung nach dem KrW-/AbfG, NVwZ: 937
10. **Dombert, M.** 1999. In: R. v. Landmann und G. Rohmer (Komm., Hrsg.). Umweltrecht, Losebl.
11. **Erbguth, W. und F. Stollmann.** 1999. Einzelfragen der Sanierung und des Altlastenmanagements im Bundes-Bodenschutzgesetz, NuR: 127
12. **Fleischer, H. und M. Empt.** 2000 Gesellschaftsrechtliche Durchgriffs- und Konzernhaftung und öffentlich-rechtliche Altlastenverantwortlichkeit, ZIP: 905
13. **Fluck, J.** 1999. Kreislaufwirtschafts-, Abfall- und Bodenschutzrecht, Losebl.
14. **Fluck, J.** 1999. Die Bündelungswirkung der Verbindlicherklärung von Sanierungsplänen nach dem BBodSchG, DVBl.: 1551
15. **Fouquet, H.** 2000. Die Sanierungsverantwortlichkeit nach dem BBodSchG
16. **Fouquet, H. und B. Mahrwald.** 1999. Die Hochwertigkeit der Verwertung nach dem KrW-/AbfG, NuR: 144
17. **Frenz, W.** 1998. KrW-/AbfG, Komm., 2. Aufl.
18. **Frenz, W.** Die antizipierte Mitwirkung im Rahmen des Ausgleichsanspruchs nach § 24 II BBodSchG
19. **Giesberts, L.** 1999. Vermischung von Abfällen: Verbote und Gebote im deutschen und gemeinschaftsrechtlichen Abfallrecht, NVwZ: 600

20. **Giesberts, L. und O. Frank.** 2000. Sanierungsverantwortlichkeit nach BBodSchG bei Erwerb, Veräußerung und Umwandlung von Unternehmen und bei Grundstückstransaktionen, DB: 505
21. **Hilger, B.** 1999 Das Bundes-Bodenschutzgesetz, In: V. Franzius, K. Wolf und E. Brandt (Hrsg.). Handbuch der Altlastensanierung, 2. Aufl. Losebl. Stand 1999, Fach 10130
22. **Hilger, B.** 1998. In: F. Holzwarth, H. Radtke und B. Hilger. BBodSchG, Handkomm.
23. **Hösel, G., H. v. Lersner und H. Wendenburg.** 1998. Recht der Abfallbeseitigung, Loseblatt
24. **Jarass, H. D.** 1995 BImSchG, Komm., 3. Aufl.
25. **Kahl, W.** 2000. Die Sanierungsverantwortlichkeit nach dem BBodSchG, Die Verwaltung 29
26. **Klöck, O.** 1997. Stoffliche und energetische Abfallverwertung im KrW-/AbfG, ZUR: 117
27. **Kloepfer, M.** 1998. Umweltrecht, 2. Aufl.
28. **Knoche, J.** 1999. Ausgleichsansprüche nach § 24 II BBodSchG ohne behördliche Verpflichtung eines Sanierungsverantwortlichen?, NVwZ: 1198
29. **Knopp, L.** 1999. "Flucht aus der Zustandsverantwortung?" und neues BBodSchG, DVBl.: 1010
30. **Kobes, S.** 1998. Das Bundes-Bodenschutzgesetz, NVwZ: 786
31. **Kobes, S.** 2000. Die Untersuchung, Bewertung und Sanierung von Altlasten nach dem BBodSchG, NVwZ: 261
32. **Kothe, P.** 1999. Was ändert sich im Umgang mit Altlasten und Verdachtsflächen? UPR: 96
33. **Länderarbeitsgemeinschaft Abfall (LAGA).** 1995. Anforderungen an die stoffliche Verwertung von mineralischen Reststoffen/Abfällen, hmb AmtlAnz: 2210
34. **Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA).** 1994. Empfehlungen für die Erkundung, Bewertung und Behandlung von Grundwasserschäden (als Veröffentlichung gegen Kostenerstattung zu beziehen bei der Geschäftsstelle der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser, Umweltministerium Baden-Württemberg, Postfach 10 34 39, 70029 Stuttgart)
35. **von Lersner, H.** 1998. In: G. Hösel / H. von Lersner / H. Wendenburg [23]
36. **Löhr, R.-P.** 1996. In: U. Battis, M. Krautzberger und R.-P. Löhr: BauGB, Komm., 5. Aufl.
37. **Nies, V.** 1999. In: R. v. Landmann und G. Rohmer (Komm., Hrsg.). Umweltrecht, Losebl.
38. **Numberger, U.** 1999. In: M. Oerder, U. Numberger und T. Schönfeld. BBodSchG, Komm.
39. **Oerder, M.** 1999. In: M. Oerder, U. Numberger und T. Schönfeld. BBodSchG, Komm.
40. **Paetow, S.** 1990. Das Abfallrecht als Grundlage der Altlastensanierung, NVwZ: 510
41. **Paetow, S.** 1998. In: P. Kunig, S. Paetow und L. A. Versteyl. KrW-/AbfG, Komm.
42. **Pape, K. A.** 1999 In: In: R. v. Landmann und G. Rohmer (Komm., Hrsg.). Umweltrecht, Losebl.

43. **Peine, F.-J.** 1999. Bodenschutzrecht und Wasserrecht, UPR: 361
44. **Pützenbacher, S.** 1999. Der Ausgleichsanspruch nach § 24 II BBodSchG, NJW 1137
45. **Queitsch, P.** 1999. BBodSchG, 2. Aufl.
46. **Radtke, H.** 1998. In: F. Holzwarth, H. Radtke und B. Hilger. BBodSchG, Handkomm.
47. **Der Rat von Sachverständigen für Umweltfragen.** 1989. Altlasten, Sondergutachten
48. **Der Rat von Sachverständigen für Umweltfragen.** 1995. Sondergutachten "Altlasten", BT-Drs. 13/380 v. 2.5.1995
49. **Rehbinder, E.** 1991. Die Freistellung von Anlagenerwerbern von der Verantwortlichkeit für die Sanierung von Altlasten in den neuen Bundesländern, DVBl.: 421
50. **Roßnagel, A.** 1998. In: H.-J. Koch, und Scheuing, D. H. (Hrsg.). Gemeinschaftskommentar zum BImSchG, Losebl.
51. **Sanden, J.** 1998. In: J. Sanden und S. Schoeneck. BBodSchG, Kurzkomm.
52. **Schink, A.** 1991. Grenzen der Störerhaftung bei der Sanierung von Altlasten, VerwArch 82: 357
53. **Schink, A.** 1997. Der neue Abfallbegriff und seine Folgen, VerwArch 88: 231
54. **Schink, A.** 1999. Verantwortlichkeit für die Gefahrenabwehr und die Sanierung schädlicher Bodenveränderungen nach dem BBodSchG, DÖV 797
55. **Schlette, V.** 2000. Ausgleichsansprüche zwischen mehreren Umweltstörern gemäß § 24 Abs. 2 BBodSchG, VerwArch : 41
56. **Schlichter, O.** 1995. In: O. Schlichter und R. Stich. Berliner Kommentar zum BauGB, Hrsg., 2. Aufl.
57. **Schmitz-Rode, W. und S. Bank.** 1999. Die konzernrechtliche Haftung nach dem BBodSchG, DB: 417
58. **Schoeneck, S.** 1998. In: J. Sanden und S. Schoeneck. BBodSchG, Kurzkomm.
59. **Schönfeld, T.** 1999. In: M. Oerder, U. Numberger und T. Schönfeld. BBodSchG, Komm.
60. **Schönfeld, T.** 2000. Nochmals: Ausgleichsansprüche nach § 24 II BBodSchG ohne behördliche Verpflichtung eines Sanierungsverantwortlichen? NVwZ: 648.
61. **Sparwasser, R. und B. Geißler.** 1995 Grenzen der Zustandsstörerhaftung am Beispiel des Altlastenrechts, DVBl.: 1317
62. **Spieth, F. und B. Wolfers.** 1999. Die neuen Störer: Zur Ausdehnung der Altlastenhaftung in § 4 BBodSchG, NVwZ: 355
63. **Theuer, A.** 1999. Sanierungsverantwortlichkeit des Gesamtrechtsnachfolgers nach dem BBodSchG am Beispiel der Spaltung von Unternehmen, DB: 621

64. **Tischer, B.-M.** 1997. Auswirkungen des neuen Abfallbegriffs auf die Genehmigung von Abfallentsorgungsanlagen, UPR: 238
65. **Turiaux, A. und D. Knigge.** 1999. Bundes-Bodenschutzgesetz - Altlastensanierung und Konzernhaftung, BB: 377
66. **Umweltbundesamt.** 1994. Behördenführer - Zuständigkeiten im Umweltschutz, 2. Aufl. (zu beziehen bei: Umweltbundesamt, Bismarckplatz 1, 14193 Berlin)
67. **Vierhaus, H. P.** 1999. In: J. Fluck (Hrsg.). Kreislaufwirtschafts-, Abfall- und Bodenschutzrecht, Hrsg. Losebl.
68. **Wagner, G.** 2000. Ausgleichsansprüche unter mehreren Verantwortlichen nach dem BBodSchG, BB: 417
69. **Graf von Westerholt, B.** 2000. Nochmals: Ausgleichsansprüche bei der Sanierung kontaminierter Grundstücke. NJW: 931
70. **Witthohn, A. und U. Smeddinck.** 2000. Abgrenzung Abfall zur Beseitigung und Abfall zur Verwertung - das unlösbare Problem? NdsVBl.: 77

6 Schadstoff- und verfahrensbezogene Übersichtsmatrizen

Thomas Track, Ulrich Gehrke, Jochen Michels

6.1 Einleitung

Im Rahmen einer Sanierungsplanung bilden zum einen das Schadstoffspektrum und zum anderen verfahrensbezogene Randbedingungen die Grundlage für eine Auswahl von Sanierungsansätzen. Durch das Verbinden einzelner Schwerpunkte soll der Leser beim Auffinden übergreifender thematischer Verknüpfungen innerhalb des Leitfadens unterstützt werden. Dazu wurden eine schadstoffbezogene Matrix, die eine Übersicht über das Abbauverhalten der in diesem Leitfaden behandelten Schadstoffe gibt (Tab. 6.1), sowie zwei verfahrensbezogene Matrizen, die einerseits die Eignung verschiedener biologischer Sanierungsoptionen (Tab. 6.2) und die damit in Zusammenhang stehenden rechtlichen Aspekte (Tab. 6.3) erstellt.

In den Matrizen stellen wir auch einen Bezug zu den einzelnen Datenblättern der in 1999 gestarteten Umfrage für die Referenzliste erfolgreiche biologische Bodensanierung (REBB) her. Eine Auswertung der Ergebnisse findet sich in (Kap. 6.4). Wir haben uns entschieden, die Datenblätter aufgrund des Umfangs nur in elektronischer Form zu veröffentlichen.

Deshalb empfehlen wir für die Arbeit mit den Matrizen und der REBB die Nutzung der CD-ROM, da dort sämtliche Verweise als interaktive 'Links' angelegt sind, so daß schon ein einziger Klick direkt in die entsprechenden Kapitel des Leitfadens bzw zu dem Datenblatt führt.

Dieses Kapitel stellt somit nicht nur im Aufbau des Leitfadens das Bindeglied zwischen den allgemeinorientierten und den fallbezogenen Kapiteln dar.

6.2 Schadstoffbezogene Übersichtsmatrix

Im Rahmen einer Sanierungsplanung bestimmen oftmals schon die vorgefundenen Schadstoffe, ob biologische Sanierungsverfahren oder chemisch-/physikalische Sanierungsansätze in die weitere Entscheidungsfindung mit einbezogen werden können. Die Verknüpfung von Abbauverhalten der unterschiedlichen Schadstoffgruppen, möglichen Sanierungsverfahren mit besonderen Mechanismen die bei einigen Schadstoffen für die Sanierung von Bedeutung sind sowie Hinweisen auf durchgeführte Sanierungen sind in Tabelle 6.1 zusammengefaßt.

Tab. 6.1: Übersicht über das Abbauverhalten verschiedener Schadstoffe

	Abbau	Sanierungspraxis	Selbstreinigung	Humifizierung	Projekte des FV	REBB Fälle (s. Kapitel 6.5)
MKW	2.1.1					
Aliphatische KW	2.1.1.1					
BTEX	2.1.1.2	2.1.1.4, 2.1.1.5				9, 10, 16, 17, 32, 34, 36, 37, 44, 46, 51-53, 57, 59-62, 64, 80, 82
Mineralölprodukte	2.1.1.3	2.1.1.4, 2.1.1.5	2.1.1.6		9.6.2, 9.6.3	3, 5, 7, 8, 11, 16-19, 22, 25-32, 34, 36, 37, 39, 44-46, 50-53, 56-62, 64-82
PAK	2.1.2	2.1.2.7	2.1.2.8	2.2.2.1	9.4, 9.4.1	9, 17, 24, 32, 39, 46, 57, 65, 68, 69, 75, 78, 81
LCKW	2.1.3					17, 23, 49, 60
Chlorethene	2.1.4	2.1.4.3	2.1.4.4		9.6.1	
Chlorethane	2.1.5	(2.1.5.3)	2.1.5.3		9.6.1	
Chlormethane	2.1.6		2.1.6.4			
HCH	2.1.7	2.1.7.2	–			
Chloraromaten	2.1.8					46
Chlorbenzol/-phenol	2.1.8.1	2.1.8.1	2.1.8.1			
PCB's	2.1.8.2	2.1.8.2	2.1.8.2			57
Polychlorierte Dioxine/Furane	2.1.8.3	2.1.8.3	–			
Nitroaromaten	2.1.9.2					
TNT	2.1.9.2	2.1.9.3	2.1.9.4	2.2.2.2	7, 9.2, 9.4, 9.5	63

6.3 Verfahrensbezogene Matrizen

Für die verschiedenen biologischen Verfahrensgruppen zur Bodensanierung sind in Tabelle 6.2 Hinweise auf verfahrenstechnische Grundlagen sowie verschiedene Faktoren und Randbedingungen zusammengestellt, welche auf eine Verfahrensauswahl oder Bewertung Einfluß haben.

Der biologische Abbau von Schadstoffen stellt unterschiedliche Ansprüche an die Verfahrenstechnik. So sind z.B. verschiedene Verfahrensführungen (aerob/anaerob, kombiniert) oder Nährstoffangebote für den Schadstoffabbau erforderlich. Damit kann gewährleistet werden, daß die Prozesse der geeigneten Abbaupfade vollständig ablaufen und somit die Entstehung unerwünschter Zwischen- und Endprodukte minimiert oder gar verhindert werden kann.

Für die Genehmigung biologischer Sanierungsverfahren bedeutend sind das Verständnis der Prozesse, sowie geeignete Maßnahmen zur Steuerung und Überwachung. Weiterhin eine Qualitätskontrolle, welche sensitive Schlüsselparameter erfaßt, ohne von ihrem Umfang nicht-finanzierbar zu sein, sowie der Nachweis des nachhaltigen Sanierungserfolges. Im Forschungsverbund "Biologische Verfahren zur Bodensanierung" wurden Mechanismen identifiziert und Methoden entwickelt, welche Eingang in die Bereiche Prozess-, Qualitäts- und Erfolgskontrolle des Leitfadens gefunden haben. Dazu zählen

- Chemische Untersuchung von Kontaminaten in Bodenproben (s. Kap. 4.1)
- Untersuchungen zur Ökotoxizität belasteter und behandelter Bodenmaterialien (s. Kap. 2.5.1, 4.2, 9.3)
- Untersuchungen zur Langzeitstabilität gebundener Rückstände in behandelten Bodenmaterialien (s. Kap. 2.5.2, 4.3, 9.4)
- Qualitätssicherung bei Bodenuntersuchungen (s. Kap. 4.4)
- Arbeitsschutz (s. Kap. 4.5)

Neben den verfahrenstechnischen Randbedingungen gilt es für die Verfahren unterschiedliche rechtliche Aspekte, von der Sanierungspflicht, abfallrechtlichen Einordnung bis hin zum Wiedereinbau, zu berücksichtigen (Tab. 6.3). Die *In situ*-Verfahren werden hier, aufgrund ihrer meist einzelfallbezogenen Regelungen nur am Rande angesprochen. Schutz- und Überwachungsmaßnahmen sind für einen korrekten Sanierungsablauf unerlässlich und variieren in Abhängigkeit vom ausgewählten Sanierungsverfahren.

Tab. 6.2: Charakteristika und Eigenschaften der Sanierungsverfahren

Verfahren	Grundlagen	Sanierbarkeit von Böden	Bodeneigenschaften	Schadstoffe	Hemmfaktoren	Steuerung der biologischen Aktivität	Prozesskontrolle	Kostenfaktoren	ökonomische Bewertung	Praxisbeispiele	REBB-Fälle (s. Kap. 6.5)	
Mietentechnik	3.1.1	2.3.4.5	3.1.2.2	3.1.2.3	3.1.2.4	2.4	3.1.3.3	3.1.4.2	3.4	3.1.4	3-5, 7, 9-11, 16-19, 22-32, 39, 46, 50-53, 61-70, 72, 74-76, 78-82	
Reaktorverfahren	3.2.1		3.2.2.2	3.2.2.3	3.2.2.4		3.2.3.4	3.2.4.2		3.2.4	3.2.4	57
Feststoffreaktoren	3.2.1.3											
Suspensionsreaktoren	3.2.1.4											
In situ-Sanierung	3.3.1	Tab.	3.3.2.1	3.3.2.2	3.3.2.3	3.3.3.4	3.3.4.2	3.3.4	3.3.4	37, 44, 49		
Infiltrations-Verfahren	3.3.1.3	2.44										
Belüftungsverfahren	3.3.1.4	34, 36, 44, 45, 56, 58, 60, 71, 77										
Phytoremediation	3.3.1.5											
Natural Attenuation	3.3.1.6											

Tab. 6.3: Rechtliche Aspekte, Schutz- und Überwachungsmaßnahmen

Verfahren	rechtliche Aspekte				Schutz- und Überwachung			
	Sanierungspflicht	Abfallrechtliche Einordnung	Anlagenrecht	Wiedereinbau	Immissionsschutz	Arbeitsschutz	Lärmschutz	Nachsorge/Überwachung
Mieten-technik	5.2	5.3	5.4	5.5	3.1.3.4, 5.4	3.1.3.5	3.1.3.6	3.1.3.7
Reaktor-verfahren	5.2	5.3	5.4	5.5	3.1.3.4, 3.2.3.6, 5.4	3.2.3.6, 3.1.3.5	3.1.3.6, 3.2.3.6	3.2.3.7
In situ-Sanierung	5.2	-	-	-	3.1.3.4, 3.3.3.3, 5.4	3.3.3.3, 3.1.3.5	3.1.3.6, 3.3.3.3	3.3.3.4

Im Leitfaden sind in unterschiedlichen Bereichen Erfahrungen aus der Praxis eingearbeitet. Bei der Abhandlung der Verfahren selbst (Kap. 3) wird auf deren technischen Stand und ihre Verbreitung eingegangen sowie kostenrelevante Einflußgrößen aufgezeigt. Die Durchführung und Ergebnisse der maßstabsgerechten Erprobung von Mietenverfahren zur Behandlung TNT kontaminierten Bodenmaterials in Clausthal-Zellerfeld sind als ausführliches Beispiel in Kap. 7 dargestellt. Ergänzungen dazu finden sich in den Darstellungen der Teilvorhaben des Forschungsverbundes (Kap. 9). Über die Projekte, welche aus der o.g. Firmenbefragung in einer Referenzliste zusammengestellt wurden (Kap. 6.4), kann auf bereits vorliegende Erfahrungen zurückgegriffen werden.

6.4 REBB - Referenzliste Erfolgreiche Biologische Bodensanierung

Um einen Überblick über die in Deutschland angewandten biologischen Bodensanierungsverfahren zu gewinnen führte die Koordinierung des Forschungsverbundes „Biologische Verfahren zur Bodensanierung“ eine Umfrage bei den Bodensanierungsfirmen durch und bat diese, ihre erfolgreich durchgeführten Sanierungen in eine firmenübergreifende Referenzliste einzutragen. Dazu wurden Fragebögen an 281 in Deutschland ansässige Bodensanierungsfirmen verschickt, Pressemitteilungen in allen relevanten Fachzeitschriften veröffentlicht und eine Internetseite zum Download der Fragebögen entworfen. Durch diese Aktion war sichergestellt, daß alle relevanten Firmen erreicht wurden.

Über den Fragebogen wurden Daten zu dem behandelten Material, dem angewandten Sanierungsverfahren, dessen Leistung und dem Standort erhoben (Tab. 6.4). Besonderes Augenmerk wurde auf die Identifizierung der an dem Projekt beteiligten Stellen gelegt, um dort vorhandenes Wissen für zukünftige Anwendungen zugänglich zu machen. Im Rahmen der Leitfadenerstellung wurden die Daten statistisch ausgewertet, wobei es nicht möglich war die Angaben zu überprüfen.

Tab. 6.4: Gliederung der Fragebögen der REBB

Boden/Bodenmaterial	Kontaminationsart und Schadstoffgehalt Bodenart/-beschaffenheit
Sanierungsverfahren	Verfahrensart Verfahrenstechnik Name des Verfahrens Beschreibung des Verfahrens genutzte Zuschlagsstoffe Behandlungskosten
Sanierung	behandeltes Volumen Behandlungsdauer Verwertung des behandelten Bodens
Standort	Ort und Nutzung des verunreinigten Geländes
Beteiligte	Sanierungsdurchführender Sanierungspflichtiger Genehmigungsbehörde

Auf die Fragebogenaktion hin, die in 1999 gestartet wurde, haben 33 Unternehmen insgesamt 82 Sanierungsfälle eingereicht, von denen 62 Fragebögen dem Schema der Referenzliste entsprachen. Die übrigen 20 Fragebögen konnten nicht verwertet werden. Sie bezogen sich z. B. auf ausländische Sanierungen, waren falsch bzw. unvollständig ausgefüllt oder es handelte sich um Versuchssanierungen, die nur über Sondergenehmigungen durchführbar waren und somit nicht Übertragbar sind. Die im folgenden ausgewerteten Fragebögen stehen als Kapitel 6.5 auf der beiliegenden CD-ROM zur Verfügung. Allen Unternehmen die sich an der Befragung beteiligt haben, sei an dieser Stelle für Ihre Unterstützung gedankt.

Die ausgewählten Fallbeispiele gliedern sich in 13 *In situ*- und 49 *Ex situ*-Sanierungen, wovon 24 *on site* und 25 *off site* durchgeführt wurden. Das Spektrum der angewandten Verfahren konzentriert sich hauptsächlich auf die Mietentechnik (Abb. 6.1), als ein Standardverfahren der biologischen Bodensanierung. Reaktorverfahren sind im Vergleich dazu von untergeordneter Bedeutung. Bei den *In situ*-Sanierungen liegt der Schwerpunkt auf Kontaminationen, die bis in das Grundwasser hinein reichen. Die angewandten *In situ*-Verfahren lassen sich in zwei Hauptgruppen untergliedern. Zum einen sind dies die Belüftungs- d.h. Airsparging-/Bioventingverfahren, zum anderen Verfahren zu Infiltration von Nährstoffen in den Untergrund. Diese sind mit einer Kreislaufführung des Prozesswassers als eine Art "*In situ*-Reaktoren"

konzipiert und teilweise mit einer biologischen Prozesswasseraufbereitung kombiniert. Sonstige *In situ*-Ansätze sind von untergeordneter Bedeutung.

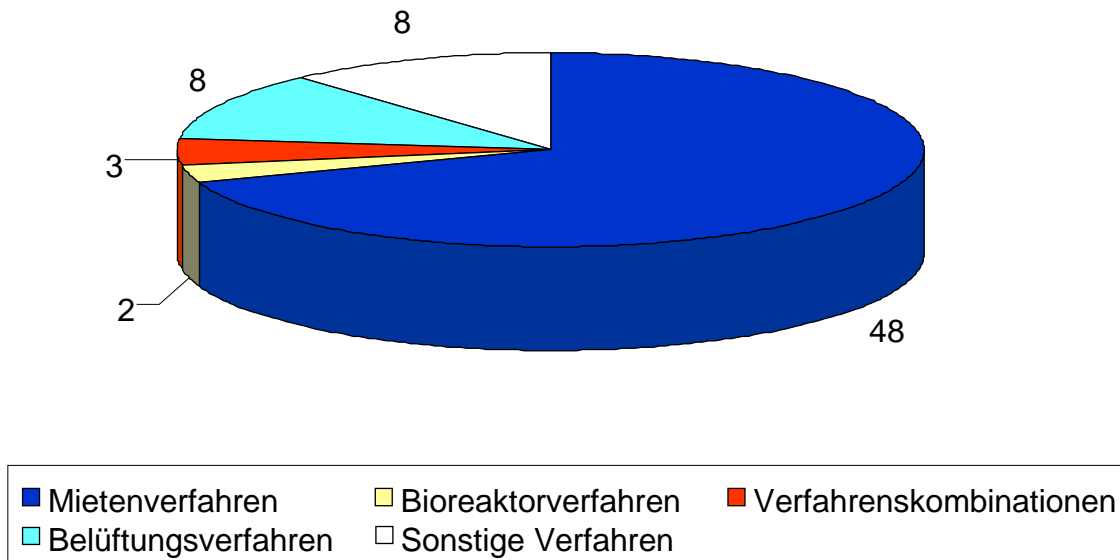


Abb. 6.1: Angewandte Verfahren (Mehrfachnennungen möglich)

Obwohl die Datengrundlage der Referenzliste keine genaueren Aussagen zuläßt, ist aus den eingereichten Sanierungsfällen erkennbar, daß mit biologischen Verfahren vor allem biologisch leicht abbaubare Kontaminationen behandelt werden. Hier fallen vor allem die MKW und BTEX kontaminierten Bodenmaterialien und zum Teil auch geringe Kontaminationen mit kurzkettigen PAK auf (Abb. 6.2).

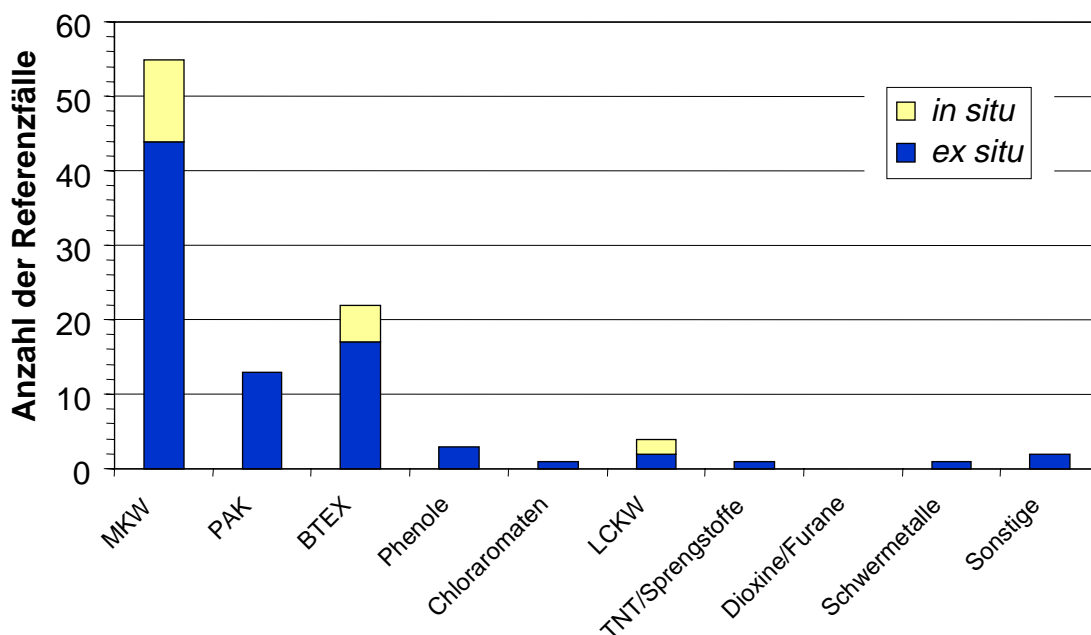


Abb. 6.2: Schadstoffgruppen der behandelten Bodenmaterialien (Mehrfachnennungen sind möglich)

Bei den vorliegenden biologischen Bodensanierungen wurden vor allem grobkörnige Bodenmaterialien (Abb. 6.3) behandelt. In diesen grobkörnigen Böden können die erforderlichen Millieu- und Nährstoffbedingungen meist problemlos eingestellt werden, wodurch eine gezielte Stimulation der mikrobiellen Dekontamination erfolgen kann. Bei feinkörnigen, bindigen Böden treten oftmals Probleme bei Millieuanpassung (aerob/anaerob) auf. Ebenso kann ein hohes Sorptionsvermögen verschiedener Schadstoffe an Tone zu einer verminderten Bioverfügbarkeit der Schadstoffe führen. Inhomogenitäten in der Schadstoffverteilung und andere Effekte können ebenfalls dem Behandlungserfolg entgegenstehen (s. Kap. 3).

Die behandelten Bodenmaterialien weisen überwiegend geringe Gehalte an organischer Substanz ($C_{org.}$) (< 4%) in der Bodenmatrix auf, in einigen Fällen (17 %) liegen die $C_{org.}$ -Gehalte auch im Bereich von 4 – 15 %.

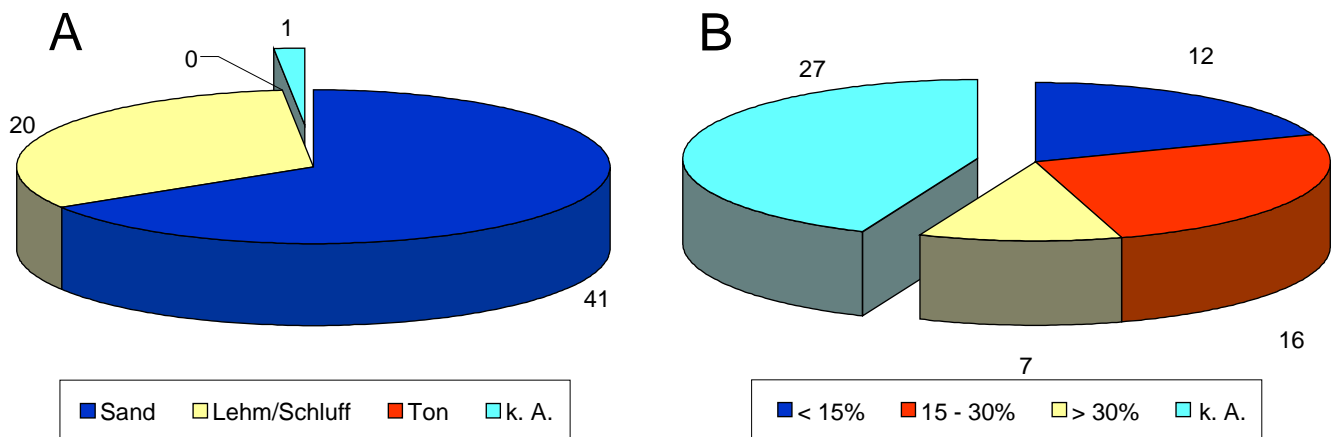


Abb. 6.3: Verteilung der Hauptbodenarten (A) und Feinkornanteile (< 63µm) (B) der behandelten Materialien

Das Spektrum der Behandlungszeiträume des kontaminierten Materials ist insgesamt recht breit. Es zeigt sich jedoch, daß etwa Zweidrittel der Sanierungen nach 9 Monaten abgeschlossen sind (Abb. 6.4). Auch viele *In situ*-Verfahren sind in diesem Zeitraum bereits abgeschlossen.

Die behandelten Mengen kontaminierten Materials erreichen bis zu 100.000 t und decken damit einen großen Bereich typischer Sanierungsvolumina ab. In Zweidrittel der Sanierungsfälle wurden zwischen 1.000 und 50.000 t Bodenmaterial behandelt (Abb. 6.5).

Als ein Vorteil biologischer Sanierungsverfahren werden immer wieder die vielfältigen Nutzungsmöglichkeiten des behandelten Materials genannt. Dies wird auch bei den Angaben zum Verbleib des behandelten Bodenmaterials deutlich (Abb. 6.6). Bei etwa einem Drittel der *Ex situ*-Behandlungen war ein Wiedereinbau vor Ort möglich. Des weiteren konnte in einer Vielzahl der Fälle das behandelte Material einer eingeschränkten Verwertung im Bereich des Erd- bzw. Straßenbaus oder bei Rekultivierungsmaßnahmen zugeführt werden. Eine Deponierung des Materials nach Abschluß der biologischen Bodensanierung wurde selten als weitere Verwendung genannt. Teilweise waren dies auch nur geringe Anteile des behandelten Materials.

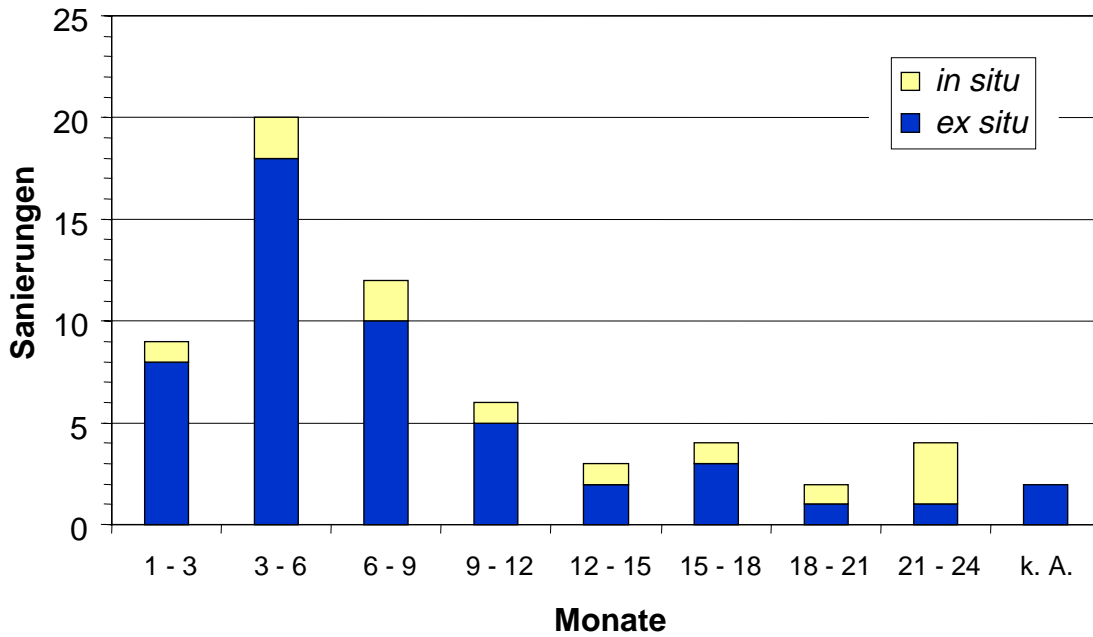


Abb. 6.4: Verteilung der Angaben zur Behandlungsdauer biologischer Sanierungsverfahren

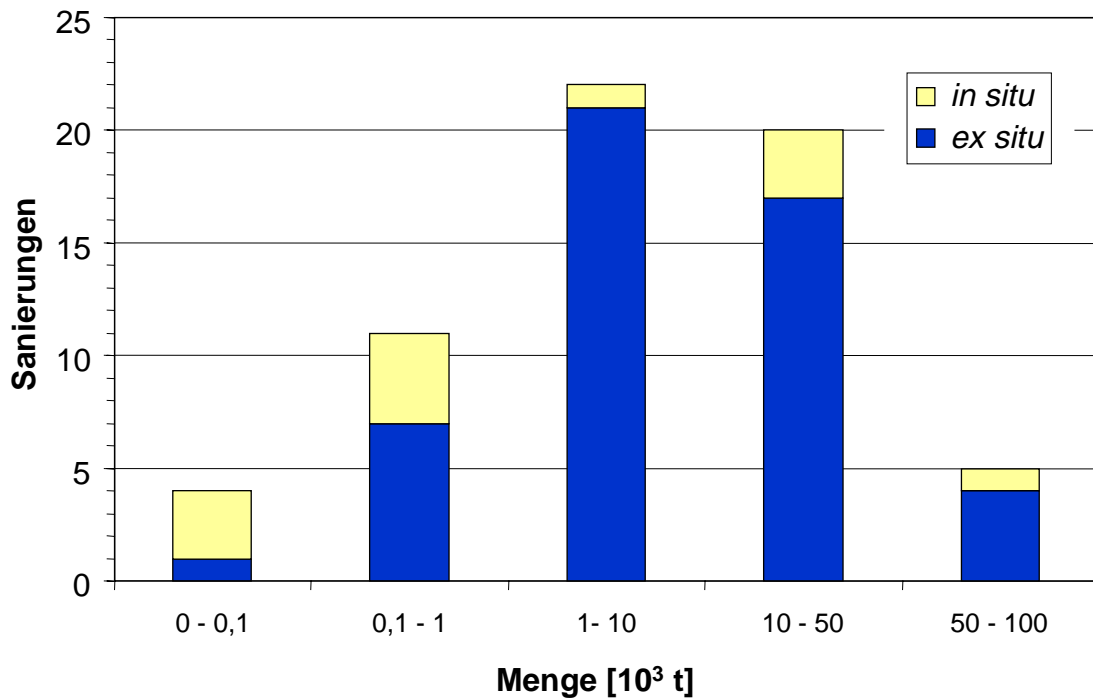


Abb. 6.5: Verteilung der Angaben zu den Mengen behandelten Bodenmaterials bei biologischen Sanierungsverfahren

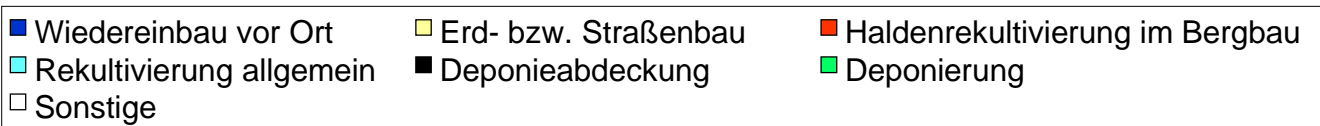
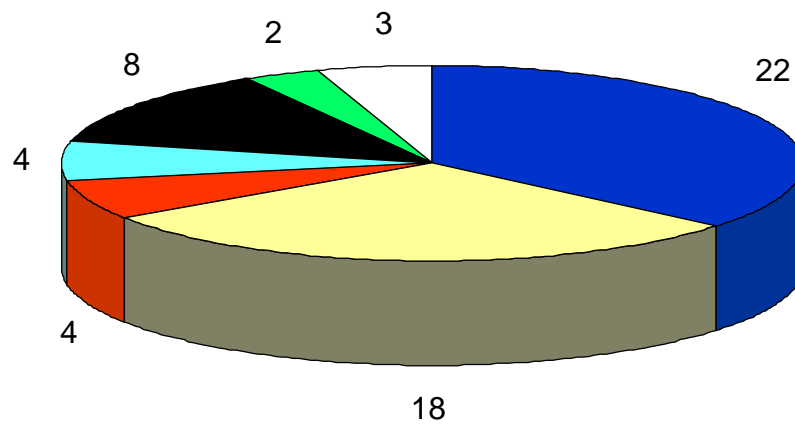


Abb. 6.6: Verbleib des behandelten Bodenmaterials bei den On-/Off site-Sanierungen (Zahlen = Anzahl der Fälle, Mehrfachnennungen möglich)

Zu den Behandlungskosten liegen nicht für alle Fallbeispiele Zahlen vor (Abb. 6.7). Die genannten Werte liegen hauptsächlich unterhalb der 100 DM/t-Grenze mit einem Schwerpunkt zwischen 25 und 75 DM/t. Zum Teil wurden in die Behandlungskosten Verwertungskosten eingerechnet. Auch gilt es zu berücksichtigen, daß es sich um unterschiedliche Verfahren handelt, welche in verschiedene Sanierungsszenarien eingesetzt wurden. Daher kann es sich hier nur um eine grobe Einschätzung handeln, zumal auch zu vielen Verfahren keine Angaben zum Preis gemacht wurden.

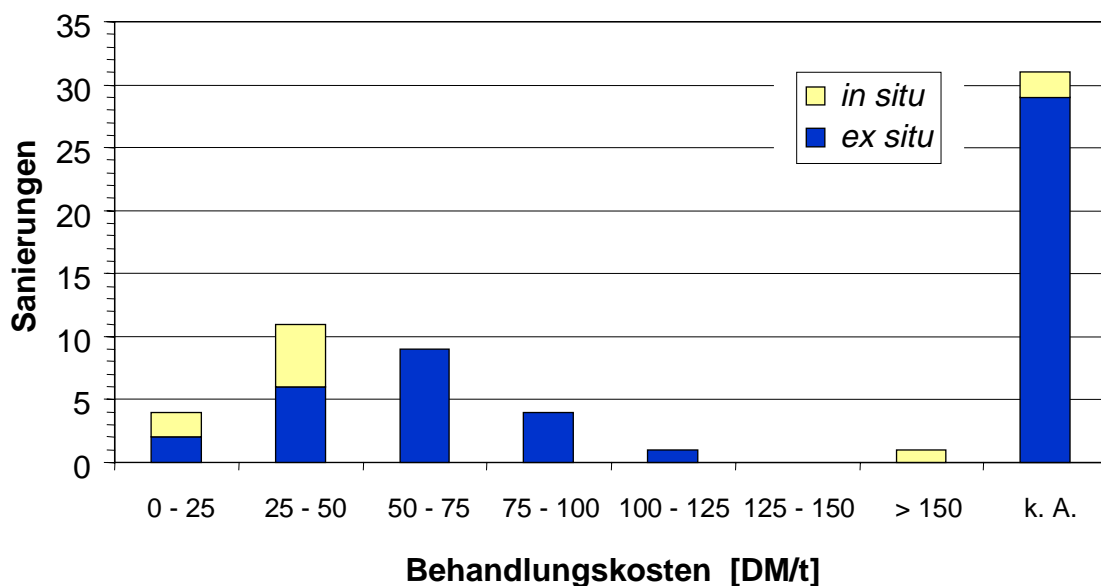


Abb. 6.7: Behandlungskosten in DM pro tonne für biologische Sanierungsverfahren.

Mit den im Forschungsverbund entwickelten und erprobten biologischen Verfahren zur Sanierung TNT-kontaminierter Böden stehen nun auch für die Gruppe der Nitroaromaten leistungsfähige Mietenverfahren zur Verfügung. Da diese Verfahren im Rahmen des Forschungsverbundes in einer maßstabsgerechten Erprobung, mit einem von einer normalen Sanierung abweichenden, Genehmigungsverfahren eingesetzt wurden, sind sie trotz ihrer erfolgreichen Anwendung noch nicht in dieser Referenzliste aufgeführt. Sie stehen jedoch für die Anwendung zur Verfügung und sind im Kapitel 7 des Leitfadens ausführlich beschrieben.

6.5 Datenblätter der REBB

Die in die Auswertung einbezogenen Projekte stehen als Kapitel 6.5 auf der beiliegenden CD-ROM mit Detailinformationen zur Verfügung.

Datenblatt 3

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 3.800 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 μm	< 5 %
organische Substanz	k.A.
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	On site-Sanierung von MKW-kontaminierten Boden
Beschreibung	Das vorbehandelte Material wurde mittels Radlader und Förderband zu einer Tafelmiete aufgesetzt. Gleichzeitig wurden die Biomassesuspension und Nährsalze, sowie ein Belüftungssystem eingebracht. Um Emissionen zu vermeiden, wurde die Abluft über ein Filtersystem geführt. Zur Beobachtung des Abbauprozesses wurden umfangreiche Untersuchungen im Boden und in der Abluft durchgeführt.
Zuschlagstoffe	k.A.
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 4

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	Phenol: 2,80 mg/kg TS
Hauptbodenart	k.A.
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	k.A.
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	Off site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	Biologische Phenoldekontamination
Beschreibung	Das vorbehandelte Material wurde mittels Rotorcleaner zu einer Tafelmiete aufgesetzt. Gleichzeitig wurden die Biomassesuspension, Nährsalze und ein Belüftungssystem eingebracht. Um Emissionen zu vermeiden, wurde die Abluft über Filtersysteme geführt. Zur Beobachtung des Abbauprozesses wurden umfangreiche Untersuchungen im Boden, sowie in der Abluft durchgeführt.
Zuschlagstoffe	k.A.
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 4 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	2.170 t
Behandlungszeitraum	08/96 - 01/97
Behandlungsdauer	7 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Deponierung (Klasse: 3)
Standort	
Bundesland	Sachsen
Stadt	Chemnitz
weitere Angaben	k.A.
Nutzung des Geländes:	ehemaliges Werksgelände
Beteiligte	
Sanierungs- durchführende/r:	FZB Biotechnik GmbH Glienicker Weg 185 12489 Berlin
	Umweltschutz Grumbach-Sachsen GmbH Willsdruffer Str. 10 01723 Grumbach
Sanierungspflichtiger:	In-Bau GmbH NL Solaris, Chemnitz
Genehmigungs- behörde/ Ansprechpartner:	Regierungspräsidium Chemnitz

Datenblatt 5

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 2.400 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 μm	20 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	Off site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	IMA-Verfahren
Beschreibung	Behandlung in Mieten; Sauerstoffzufuhr erfolgt mechanisch
Zuschlagstoffe	Nährstoffe
Behandlungskosten	49,50 DM/t

Datenblatt 5 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	640 t
Behandlungszeitraum	12/98 - 07/99
Behandlungsdauer	6,5 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Erd- bzw. Straßenbau
Standort	
Bundesland	Rheinland-Pfalz
Stadt	k.A.
weitere Angaben	k.A.
Nutzung des Geländes:	Tanklager
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	IMA Sanierungszentrum GbR Wörthstr. 1 76726 Germersheim
Sanierungspflichtiger:	Mineralölkonzern
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Bezirksregierung Rheinland-Pfalz Abt. Landwirtschaft und Umwelt Friedrich-Ebert-Str. 2 67433 Neustadt/Weinstraße Herr Kögel

Datenblatt 7

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 10.000 mg/kg TS
Hauptbodenart	Lehm/Schluff
Kornanteil < 63 µm	30 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	Dekontamination durch Einsatz von BIODEKON
Beschreibung	Das Präparat BIODEKON dient den standorteigenen Bakterien als optimale Nährstoffquelle. Neben Energie, Phosphor und Stickstoffquelle ist ein ausgewogenes Kohlenstoffangebot für eine deutliche Vermehrung der Mikroorganismen (Bakterien, Pilze) notwendig. Die Kohlenstoffquelle wird daher im Nährstoffkomplex minimiert angeboten. Daher nutzen die Mikroorganismen als Kohlenstoff-Quelle die organischen Schadstoffe.
Zuschlagstoffe	Nährstoffkomplex BIODEKON
Behandlungskosten	37 DM/t

Datenblatt 7 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	5.000 t
Behandlungszeitraum	03/96 - 08/96
Behandlungsdauer	6 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort und Deponieabdeckung
Standort	
Bundesland	Sachsen
Stadt	Leipzig
weitere Angaben	ehemalige Kaserne
Nutzung des Geländes:	Neubau, Verwaltungsgebäude
Beteiligte	
Sanierungsdurchführende/r:	BOSAG GmbH Leipzig
Sanierungspflichtiger:	LVA Sachsen
Genehmigungsbehörde/ Ansprechpartner:	Stadt Leipzig

Datenblatt 8

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 10.000 mg/kg TS
Hauptbodenart	Lehm/Schluff
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	k.A.
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	<i>In situ</i> -Verfahren
Verfahrenstechnik	k.A.
Name	DROP
Beschreibung	Verfahren bewirkt Anregung des mikrobiellen Abbaus <i>in situ</i> mittels spezieller Anwendungstechnik für Sanierungshilfsstoff. Abbaubeschleunigung bis 2 m unter GOK ohne Zwangsbelüftung.
Zuschlagstoffe	Erreichter Sanierungszielwert lag unter 500 mg/kg MKW Biocrack
Behandlungskosten	15 - 20 DM/t

Datenblatt 8 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	500 t
Behandlungszeitraum	06/99 - 07/99
Behandlungsdauer	1 Monat
Verwertung des behandelten Bodens	<i>in situ</i>
Standort	
Bundesland	Bayern
Stadt	Kissing
weitere Angaben	Reihenhaussiedlung
Nutzung des Geländes:	Gartennutzung
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	IABG mbH Umwelt- und Managementsysteme
Sanierungspflichtiger:	Grundstückseigentümer
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Landratsamt Aichbach

Datenblatt 9

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	PAK: 35 mg/kg TS BTEX: 20 mg/kg TS
Hauptbodenart	Lehm/Schluff
Kornanteil < 63 µm	30 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	Off site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	Trockenrotteverfahren
Beschreibung	Absieben der Anteile > 40 mm, entsprechend den Ergebnissen der Voruntersuchung, Zusatz von Nährstoffen, autochthonen (extern vermehrten) Mikroorganismen, Belüften mittels Unterdruck in abgedeckten Biomieten.
Zuschlagstoffe	org. Strukturmaterial (Baumrinde, Mulch)
Behandlungskosten	80 DM/t

Datenblatt 9 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	5.000 t
Behandlungszeitraum	01/97 - 06/98
Behandlungsdauer	18 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Erd- bzw. Straßenbau und Haldenrekultivierung im Bergbau
Standort	
Bundesland	Bayern
Stadt	Kelheim
weitere Angaben	k.A.
Nutzung des Geländes:	k.A.
Beteiligte	
Sanierungs- durchführende/r:	BSG Bodensanierungs GmbH Süd-Chemie-Str. 3 93309 Kelheim
Sanierungspflichtiger:	k.A.
Genehmigungs- behörde/ Ansprechpartner:	Landratsamt Kelheim

Datenblatt 10

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	BTEX: 50 mg/kg TS
Hauptbodenart	Lehm/Schluff
Kornanteil < 63 µm	35 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	Off site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	Trockenrotteverfahren
Beschreibung	Absieben der Anteile > 40 mm, entsprechend den Ergebnissen der Voruntersuchung, Zusatz von Nährstoffen, autochthonen (extern vermehrten) Mikroorganismen, Belüften mittels Unterdruck in abgedeckten Biomieten.
Zuschlagstoffe	org. Strukturmaterial (Baumrinde, Mulch)
Behandlungskosten	80 DM/t

Datenblatt 10 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	5.000 t
Behandlungszeitraum	05/98 - 02/99 (beheizt)
Behandlungsdauer	7 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Erd- bzw. Straßenbau und Haldenrekultivierung im Bergbau
Standort	
Bundesland	Bayern
Stadt	Kelheim
weitere Angaben	k.A.
Nutzung des Geländes:	k.A.
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	BSG Bodensanierungs GmbH Süd-Chemie-Str. 3 93309 Kelheim
Sanierungspflichtiger:	k.A.
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Landratsamt Kelheim

Datenblatt 11

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 15.000 mg/kg TS
Hauptbodenart	Lehm/Schluff
Kornanteil < 63 μm	k.A.
organische Substanz	4 - 15 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	Off site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	Trockenrotteverfahren
Beschreibung	Absieben der Anteile > 40 mm, entsprechend den Ergebnissen der Voruntersuchungen, Zusatz von Nährstoffen, autochthonen (extern vermehrten) Mikroorganismen, Belüften mittels Unterdruck in abgedeckten Biomieten.
Zuschlagstoffe	org. Strukturmaterial (Baumrinde, Mulch)
Behandlungskosten	80 DM/t

Datenblatt 11 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	20.000 t
Behandlungszeitraum	03/97 - 11/97
Behandlungsdauer	8 Monate(z.T. zusammen mit BTX)
Verwertung des behandelten Bodens	Erd- bzw. Straßenbau und Haldenrekultivierung im Bergbau
Standort	
Bundesland	Bayern
Stadt	Kelheim
weitere Angaben	k.A.
Nutzung des Geländes:	k.A.
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	BSG Bodensanierungs GmbH Süd-Chemie-Str. 3 93309 Kelheim
Sanierungspflichtiger:	k.A.
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Landratsamt Kelheim

Datenblatt 16

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 7.000 mg/kg TS BTEX: 50 mg/kg TS
Hauptbodenart	Lehm/Schluff
Kornanteil < 63 µm	20 %
organische Substanz	k.A.
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	Off site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	Ruhemietenverfahren
Beschreibung	Kontaminiertes Erdreich wird mit Nährstoffen versetzt, zu Ruhemieten aufgesetzt und bei Bedarf gewendet.
Zuschlagstoffe	Nährstoffe
Behandlungskosten	ca. 100 DM/t

Datenblatt 16 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	5.000 t
Behandlungszeitraum	03/97 - 10/97
Behandlungsdauer	5 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Deponieabdeckung
Standort	
Bundesland	Baden-Württemberg
Stadt	Göppingen
weitere Angaben	Gemeinde Schlat
Nutzung des Geländes:	Biolog. Bodenbehandlung
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	LEONHARD WEISS GmbH & Co.
Sanierungspflichtiger:	versch. Mineralölfirmen
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Landratsamt Göppingen Fr. Breining

Datenblatt 17

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 23.000 mg/kg TS PAK: 30 mg/kg TS BTEX: 5.600 mg/kg TS LCKW: 40 mg/kg TS Schwermetalle: 1.810 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	13 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren und Belüftungsverfahren (Airsparging/Bioventing)
Name	Povel-Biobeetverfahren
Beschreibung	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Homogenisierung/Klassierung, max. Korngröße 3,5 cm ▪ Mischung mit Zuschlagstoffen ▪ Aufsetzen zu Biobeeten ▪ Ansaat mit Rasengut ▪ Folienwannen mit Drainagebett / Belüftungsdrainagen ▪ Berieselung / Entwässerung ▪ Sickerwasserreinigung
Zuschlagstoffe	Grünkompost / Coniferenborke-Gemisch, Phosphatdünger
Behandlungskosten	ca. 62 DM/t

Datenblatt 17 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	36.000 t
Behandlungszeitraum	chargenweise 1988 - 1997
Behandlungsdauer	18 Monate pro Charge
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort und Erd- bzw. Straßenbau und Deponieabdeckung
Standort	
Bundesland	Niedersachsen
Stadt	Nordhorn
weitere Angaben	Textilindustrie-Brache (16 ha)
Nutzung des Geländes:	vorher: Textilindustrie 3-stufig / nachher: innerstädtisches Wohngebiet
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	EN-PRO-TEC GmbH, Nordhorn Ökochemie + Umweltanalytik Oldenburg GmbH G. Knoll GmbH, Bauunternehmen, Haren-Erika
Sanierungspflichtiger:	Stadt Nordhorn Bundesmodellvorhaben Povel-Sanierung (Städtebau-Förderung)
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Bezirksregierung Weser-Ems, Oldenburg, Herr Kossel Umweltbundesamt Berlin, Herr Dr. Bachmann Bundesbauministerium, Mdirig. Dr. Krautzberger

Datenblatt 18

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 2.300 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	2 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	Off site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	terracleen - Verfahren
Beschreibung	k.A.
Zuschlagstoffe	keine
Behandlungskosten	65 DM/t

Datenblatt 18 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	3.337,32 t
Behandlungszeitraum	05/95 - 06/95
Behandlungsdauer	1,5 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Erd- bzw. Straßenbau und Deponieabdeckung und Lärmschutzwall
Standort	
Bundesland	Sachsen
Stadt	Gneisenaustadt Schildau
weitere Angaben	k.A.
Nutzung des Geländes:	stationäre Bodensanierungsanlage
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Dierichs & Hagedorn Consulting GmbH
Sanierungspflichtiger:	Elf Oil AG
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Regierungspräsidium Leipzig Referat 63 Herr Meier

Datenblatt 19

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 3.860 mg/kg TS
Hauptbodenart	Lehm/Schluff
Kornanteil < 63 μm	ca. 15 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	Off site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	terracleam - Verfahren
Beschreibung	k.A.
Zuschlagstoffe	keine
Behandlungskosten	50 DM/t

Datenblatt 19 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	5.370 t
Behandlungszeitraum	12/98 - 12/99
Behandlungsdauer	12 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Bergrechtliche Verfüllung
Standort	
Bundesland	Sachsen
Stadt	Seifersbach
weitere Angaben	k.A.
Nutzung des Geländes:	stationäre Bodensanierungsanlage
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Bodensanierungsgesellschaft mbH Seifersbach Am Wald 09648 Seifersbach
Sanierungspflichtiger:	Deutsche Bahn AG
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Regierungspräsidium Chemnitz Frau Wolf

Datenblatt 22

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 500 mg/kg TS
Hauptbodenart	Lehm/Schluff
Kornanteil < 63 µm	70 %
organische Substanz	k.A.
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	Off site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	Regenerationsmiete System Wayss & Freytag
Beschreibung	s. Franzius et al.: Handbuch der Altlastensanierung; Teil8/4.4.6.4; Seiten 1-10
Zuschlagstoffe	Kompost 5 Vol.%
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 22 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	1.500 t
Behandlungszeitraum	März - Juli
Behandlungsdauer	3,7 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Rekultivierung
Standort	
Bundesland	Baden-Württemberg
Stadt	Stuttgart
weitere Angaben	k.A.
Nutzung des Geländes:	unbekannt
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Wayss & Freytag Umwelttechnik
Sanierungspflichtiger:	Kommune
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	

Datenblatt 23

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	LCKW: 300 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	ca. 15 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	<i>Off site</i> -Verfahren
Verfahrenstechnik	Mietenverfahren mit angeschlossener Luftabsaugung
Name	Regenerationsmiete System Wayss & Freytag
Beschreibung	s. Franzius et al.: Handbuch der Altlastensanierung; Teil8/4.4.6.4; Seiten 1-10
Zuschlagstoffe	keine
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 23 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	3.500 t
Behandlungszeitraum	Oktober - Dezember
Behandlungsdauer	2 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Erd- bzw. Straßenbau
Standort	
Bundesland	Hessen
Stadt	Frankfurt/Main
weitere Angaben	k.A.
Nutzung des Geländes:	Metallindustrie
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Wayss & Freytag AG Umwelttechnik
Sanierungspflichtiger:	Bauherr
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	RP Darmstadt

Datenblatt 24

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	PAK: 100 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	20 %
organische Substanz	4 - 15 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	Off site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	Kombi-Verfahren zur biologischen Bodensanierung
Beschreibung	Mikrobiologisches Verfahren zum Abbau von Schadstoffen mit nur geringer Bioverfügbarkeit - insbesondere PAK, das auf der Basis einer Lösevermittlung der Schadstoffe durch Tenside basiert. Der Abbau findet in herkömmlichen Mieten unter Zusatz von Tensiden, Nährstoffen, Sauerstoff und ggf. Kompost statt. Mit Hilfe dieses Verfahrens werden auch höherringige PAK abgebaut.
Zuschlagstoffe	Kompost
Behandlungskosten	45 DM/t

Datenblatt 24 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	110 t
Behandlungszeitraum	12/97 - 03/98
Behandlungsdauer	3 - 4 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort
Standort	
Bundesland	Sachsen
Stadt	k.A.
weitere Angaben	k.A.
Nutzung des Geländes:	Brachland
Beteiligte	
Sanierungsdurchführende/r:	Institut für Energetik und Umwelt gGmbH Torgauer Str. 116 04347 Leipzig
Sanierungspflichtiger:	k.A.
Genehmigungsbehörde/ Ansprechpartner:	k.A.

Datenblatt 25

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 10.000 mg/kg TS
Hauptbodenart	Lehm/Schluff
Kornanteil < 63 μm	k.A.
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	Xenex® Biobeetverfahren
Beschreibung	k.A.
Zuschlagstoffe	k.A.
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 25 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	50.000 t
Behandlungszeitraum	k.A.
Behandlungsdauer	3 - 5 Monate pro Charge
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort und Deponieabdeckung
Standort	
Bundesland	Sachsen-Anhalt
Stadt	k.A.
weitere Angaben	Pipeline Unfall BAB 9
Nutzung des Geländes:	k.A.
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Lobbe GmbH & Co Geschäftsbereich Sanierung Friedrich-Kaiser-Straße 13 58638 Iserlohn
Sanierungspflichtiger:	k.A.
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	k.A.

Datenblatt 26

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 10.000 mg/kg TS
Hauptbodenart	Lehm/Schluff
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	4 - 15 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	Xenex® Biobeetverfahren
Beschreibung	k.A.
Zuschlagstoffe	k.A.
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 26 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	20.000 t
Behandlungszeitraum	k.A.
Behandlungsdauer	3 - 5 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort
Standort	
Bundesland	Nordrhein-Westfalen
Stadt	k.A.
weitere Angaben	Tanklager der NATO
Nutzung des Geländes:	-
Beteiligte	
Sanierungsdurchführende/r:	Lobbe GmbH & Co Geschäftsbereich Sanierung Friedrich-Kaiser-Straße 13 58638 Iserlohn
Sanierungspflichtiger:	k.A.
Genehmigungsbehörde/ Ansprechpartner:	k.A.

Datenblatt 27

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 12.000 mg/kg TS
Hauptbodenart	Lehm/Schluff
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	4 - 15 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	Off site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	Xenex®-Mietenverfahren
Beschreibung	k.A.
Zuschlagstoffe	k.A.
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 27 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	12.000 t
Behandlungszeitraum	k.A.
Behandlungsdauer	4 - 6 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort
Standort	
Bundesland	Nordrhein-Westfalen
Stadt	k.A.
weitere Angaben	ehemaliges Industriegelände
Nutzung des Geländes:	=> Wohnbebauung
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Lobbe GmbH & Co Geschäftsbereich Sanierung Friedrich-Kaiser-Straße 13 58638 Iserlohn
Sanierungspflichtiger:	k.A.
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	k.A.

Datenblatt 28

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 10.000 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	4 - 15 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	Xenex® Biobeetverfahren
Beschreibung	k.A.
Zuschlagstoffe	k.A.
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 28 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	1.200 t
Behandlungszeitraum	k.A.
Behandlungsdauer	3 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort
Standort	
Bundesland	Nordrhein-Westfalen
Stadt	k.A.
weitere Angaben	Tanklastzugunfall an BAB
Nutzung des Geländes:	k.A.
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Lobbe GmbH Geschäftsbereich Sanierung Friedrich-Kaiser-Straße 13 58638 Iserlohn
Sanierungspflichtiger:	k.A.
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	k.A.

Datenblatt 29

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 8.000 mg/kg TS
Hauptbodenart	Lehm/Schluff
Kornanteil < 63 μm	k.A.
organische Substanz	4 - 15 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	Off site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	Xenex® Biobeetverfahren
Beschreibung	k.A.
Zuschlagstoffe	k.A.
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 29 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	17.000 t (2 Chargen)
Behandlungszeitraum	k.A.
Behandlungsdauer	3 / 11 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Deponieabdeckung
Standort	
Bundesland	Nordrhein-Westfalen
Stadt	k.A.
weitere Angaben	Regenrückhaltebecken
Nutzung des Geländes:	k.A.
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Lobbe GmbH Geschäftsbereich Sanierung Friedrich-Kaiser-Straße 13 58638 Iserlohn
Sanierungspflichtiger:	k.A.
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	k.A.

Datenblatt 30

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 10.000 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	Xenex® Biobeetverfahren
Beschreibung	k.A.
Zuschlagstoffe	k.A.
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 30 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	5.000 t
Behandlungszeitraum	k.A.
Behandlungsdauer	3 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort
Standort	
Bundesland	Brandenburg
Stadt	k.A.
weitere Angaben	k.A.
Nutzung des Geländes:	Tanklager
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Lobbe GmbH & Co Drebkauer Straße 99 03130 Spremberg
Sanierungspflichtiger:	k.A.
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	k.A.

Datenblatt 31

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 10.000 mg/kg TS
Hauptbodenart	Lehm/Schluff
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	Off site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	Xenex® Mietenverfahren
Beschreibung	k.A.
Zuschlagstoffe	k.A.
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 31 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	5.000 t
Behandlungszeitraum	k.A.
Behandlungsdauer	3 Monate (je Charge)
Verwertung des behandelten Bodens	Erd- bzw. Straßenbau
Standort	
Bundesland	Nordrhein-Westfalen
Stadt	k.A.
weitere Angaben	Kasernengelände
Nutzung des Geländes:	=> Wohnbebauung
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Lobbe GmbH & Co Geschäftsbereich Sanierung Friedrich-Kaiser-Straße 13 58638 Iserlohn
Sanierungspflichtiger:	k.A.
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	k.A.

Datenblatt 32

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 3.000 mg/kg TS PAK: 50 mg/kg TS BTEX: 1.000 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	Off site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren und Bodenluftabsaugung als Vorstufe
Name	XENEX
Beschreibung	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Biobeet ▪ Bodenauflockerung ▪ Zufuhr von Wasser, Dünger, Bakteriennährlösung
Zuschlagstoffe	k.A.
Behandlungskosten	120 DM/t (inkl. Bodenluftabs.)

Datenblatt 32 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	15.000 t
Behandlungszeitraum	12/97 - 06/99
Behandlungsdauer	12 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Erd- bzw. Straßenbau und Deponieabdeckung
Standort	
Bundesland	Brandenburg
Stadt	Elsterwerda
weitere Angaben	k.A.
Nutzung des Geländes:	Bahnhof
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Lobbe GmbH & Co NL Spremberg
Sanierungspflichtiger:	DB AG Dresden
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Amt für Immissionsschutz Cottbus Frau Schmerl

Datenblatt 34

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 12.000 mg/kg TS BTEX: 190 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	20 - 30 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	<i>In situ</i> -Verfahren
Verfahrenstechnik	Belüftungsverfahren (Airsparging/Bioventing)
Name	Bioventing
Beschreibung	Gezielte Belüftung des Bodens zum beschleunigten aeroben Abbau organischer Schadstoffe durch im Boden vorhandene Mikroorganismen
Zuschlagstoffe	keine
Behandlungskosten	50 DM/t

Datenblatt 34 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	20.000 t
Behandlungszeitraum	02/95 - 02/97
Behandlungsdauer	24 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Verbleib vor Ort (<i>in situ</i>)
Standort	
Bundesland	Brandenburg
Stadt	Neuruppin
weitere Angaben	Panzerkaserne
Nutzung des Geländes:	Militärstandort
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Battelle Ingenieurtechnik GmbH
Sanierungspflichtiger:	Land Brandenburg/Zweckverband Konversion im Ruppiner Land
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	LUA Brandenburg/Umweltamt des Kreises Neuruppin

Datenblatt 36

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: < 10.000 mg/kg TS BTEX: < 50 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 μm	5 %
organische Substanz	> 15 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	<i>In situ</i> -Verfahren
Verfahrenstechnik	Belüftungsverfahren (Airsparging/Bioventing)
Name	Bioventing/Bioslurping
Beschreibung	Gezieltes Vakuum-unterstütztes Absaugen der freien Phase vom Grundwasser bei gleichzeitiger nachgeschalteter Belüftung des Bodens zum beschleunigten aeroben Abbau organischer Schadstoffe durch die autochtone Bodenbiozönose
Zuschlagstoffe	keine
Behandlungskosten	35 DM/t

Datenblatt 36 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	33.000 t
Behandlungszeitraum	04/96 - 08/97
Behandlungsdauer	15 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Verbleib vor Ort (<i>in situ</i>)
Standort	
Bundesland	Brandenburg
Stadt	Preschen
weitere Angaben	Tanklager des ehemaligen Fliegerhorstes Preschen
Nutzung des Geländes:	Gewerbegebiet
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Battelle Ingenieurtechnik GmbH
Sanierungspflichtiger:	Staatsbauamt Cottbus
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	OFD Cottbus

Datenblatt 37

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 790 mg/kg TS BTEX: 2.685 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	< 3 %
organische Substanz	4 - 15 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	<i>In situ</i> -Verfahren
Verfahrenstechnik	Grundwasserzirkulationsbrunnen mit biologischer Unterstützung
Name	UVB-Verfahren der IEG Reutlingen
Beschreibung	<p>An einen speziell nach Art und Tiefenlage der Kontamination ausgebauten Brunnen mit mindestens zwei Filterstrecken wurde durch einen Ventilator Unterdruck angelegt. Über eine mehrstufige Düsenplatte wird das von einer Pumpe geförderte Grundwasser belüftet. Durch den intensiven Kontakt der eingeleiteten Frischluft mit dem Grundwasser treten die in der Flüssigkeit gelösten flüchtigen Schadstoffe in die Gasphase über.</p> <p>Durch die im Brunnen stattfindenden Fließprozesse stellen sich im Aquifer entsprechende horizontale und vertikale Strömungen ein. Diese bewirken eine intensive Durchspülung auch von geringer durchlässigen horizontalen, oft hoch kontaminierten Schichten, die bei herkömmlicher Grundwasserentnahme nicht erfaßt werden können. Auf diese Weise zirkuliert das aus dem Brunnen austretende gereinigte Wasser im gesamten vom GZB-System beeinflussten Aquiferbereich und transportiert dabei ständig Schadstoffe zum Brunnen. Zur Anregung der aeroben biologische Abbauprozesse können die entsprechenden Nährstoffe in die Zirkulationsströmung mit eingegeben werden.</p>
Zuschlagstoffe	adaptierte Mikroorganismen, Nährstoffe flüssig
Behandlungskosten	ca. 40 DM/t

Datenblatt 37 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	ca. 10.000 t
Behandlungszeitraum	08/94 - 01/95
Behandlungsdauer	7 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Verbleib vor Ort (<i>in situ</i>)
Standort	
Bundesland	Mecklenburg-Vorpommern
Stadt	Parchim
weitere Angaben	k.A.
Nutzung des Geländes:	k.A.
Beteiligte	
Sanierungs- durchführende/r:	Anakat GmbH Oudenarder Straße 16-20 13347 Berlin Tel.: 030/4558080 Fax: 030/4564946
Sanierungspflichtiger:	Mineralölgesellschaft
Genehmigungs- behörde/ Ansprechpartner:	Landkreis Parchim Umweltamt Moltkeplatz 2 Tel.: 03871/722-0 Fax: 03871/722-646

Datenblatt 39

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: bis 12.000 mg/kg TS PAK: 80 mg/kg TS BTEX: 80 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	On site-Bodensanierung
Beschreibung	In zwei Biobeetanlagen die auf dem Gelände einer ehemaligen militärischen Liegenschaft errichtet wurden, wurde der dort vorhandene kontaminierte Boden eingebaut und biologisch saniert.
Zuschlagstoffe	hochaktive biologische Mikroorganismensuspension
Behandlungskosten	54 DM/t

Datenblatt 44

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: bis 16.300 mg/kg TS BTEX: bis 100 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	4 - 15 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	<i>In situ</i> -Verfahren
Verfahrenstechnik	BioAirlift-Verfahren
Name	BioAirlift-Verfahren
Beschreibung	Mit Hilfe eines speziellen Grundwasserzirkulationsbrunnens wird der Aquifer mit Sauerstoff und Nährsubstrat angereichert. Der Schadstoffabbau findet aerob sowohl im Brunnen selbst, als auch im Untergrund statt, der als riesiger Bioreaktor fungiert.
Zuschlagstoffe	keine
Behandlungskosten	ca. 50 DM/t

Datenblatt 44 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	ca. 20.000 t
Behandlungszeitraum	04/96 - 06/98
Behandlungsdauer	22 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Verbleib vor Ort (<i>in situ</i>)
Standort	
Bundesland	Schleswig-Holstein
Stadt	Wallsbüll
weitere Angaben	Kreis Schleswig-Flensburg
Nutzung des Geländes:	Militärstandort
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	ZÜBLIN Umwelttechnik Albstadtweg 1 70567 Stuttgart
Sanierungspflichtiger:	Landesbauamt Flensburg Fichtestr. 2 24943 Flensburg
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Landratsamt Schleswig-Flensburg Herr Strube / Abfallwirtschaft

Datenblatt 45

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: bis 10.000 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	4 - 15 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	<i>In situ</i> -Verfahren
Verfahrenstechnik	Belüftungsverfahren (Airsparging/Bioventing)
Name	bioventing
Beschreibung	Eine spezifische Nährsubstratlösung wird über ein Lanzen-system in die kontaminierte, ungesättigte Bodenzone ver-rieselt. Die O ₂ -Versorgung erfolgt durch aktive Belüftung.
Zuschlagstoffe	keine
Behandlungskosten	ca. 50 DM/t

Datenblatt 45 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	500 t
Behandlungszeitraum	11/94 - 10/95
Behandlungsdauer	10 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Verbleib vor Ort (<i>in situ</i>)
Standort	
Bundesland	Baden-Württemberg
Stadt	Karlsruhe
weitere Angaben	k.A.
Nutzung des Geländes:	Betriebstankstelle
Beteiligte	
Sanierungsdurchführende/r:	ZÜBLIN Umwelttechnik
Sanierungspflichtiger:	Industriebetrieb
Genehmigungsbehörde/ Ansprechpartner:	Landratsamt Karlsruhe

Datenblatt 46**der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"**

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 9.030 mg/kg TS PAK: 4,7 mg/kg TS BTEX: 0,5 mg/kg TS Chloraromaten: 0,4 mg/kg TS
Hauptbodenart	Lehm/Schluff
Kornanteil < 63 µm	47 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	SOTEC-BIOSAN
Beschreibung	Die Mietenbehandlung wurde in vier Behandlungszelten durchgeführt, die mit einer biologischen Abluftreinigung versehen waren. Der Boden wurde mit organischem Substrat versetzt und nach Aufschüttung zu Tafelmieten belüftet und bei Bedarf beregnet.
Zuschlagstoffe	organisches Substrat
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 46 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	67.000 t
Behandlungszeitraum	11/93 - 07/97 (3 Chargen)
Behandlungsdauer	ca. 14 Monate (je Charge)
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort
Standort	
Bundesland	Hessen
Stadt	Hanau
weitere Angaben	Gelände der Pintsch-Oel-GmbH
Nutzung des Geländes:	ab 1943: Ablagerung von Bleicherdefilterkuchen 1946 - 1983: Altölaufbereitung ab 1984: Industriebrache
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	ARCADIS Trischler & Partner GmbH, Darmstadt (Sanierungsüberwacher) Saarberg Ökotechnik GmbH, Saarbrücken (Sanierer)
Sanierungspflichtiger:	Hessische Industriemüll GmbH - Altlastensanierungsgesellschaft (HIM-ASG) Wiesbaden
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Regierungspräsidium Darmstadt, Abteilung Staatliches Umweltamt Hanau

Datenblatt 49

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	LCKW
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	<i>In situ</i> -Verfahren
Verfahrenstechnik	Kombinationsverfahren mit nachgeschalteter Wasserreinigung
Name	Infiltrationsverfahren
Beschreibung	Auswaschung von LCKW- und BTX-Schadstoffen mittels eines Infiltrations-/Exfiltrations-Brunnensystems, Reinigung der Prozeßwässer in einer nachgeschalteten biologischen Wasserreinigung (anaerob/aerobe Prozeßführung)
Zuschlagstoffe	Substrate im Zulauf Wasseranlage
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 49 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	70 t
Behandlungszeitraum	12/93 - 06/94
Behandlungsdauer	6,5 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Verbleib vor Ort (<i>in situ</i>)
Standort	
Bundesland	Baden-Württemberg
Stadt	Eppelheim
weitere Angaben	ehem. Deponie
Nutzung des Geländes:	Bepflanzungen => Naherholungsgebiet
Beteiligte	
Sanierungsdurchführende/r:	Umweltschutz Nord GmbH & Co.
Sanierungspflichtiger:	k.A.
Genehmigungsbehörde/ Ansprechpartner:	Landesamt für Umweltschutz Herr Köhler

Datenblatt 50

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 2.000 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 μm	k.A.
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	TERRAFERM
Beschreibung	k.A.
Zuschlagstoffe	Strukturstoffe, Nährstoffe
Behandlungskosten	60 DM/t

Datenblatt 50 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	13.400 t (in 2 Chargen)
Behandlungszeitraum	04/96 - 06/96 und 04/97 - 08/97
Behandlungsdauer	5 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort
Standort	
Bundesland	Rheinland-Pfalz
Stadt	Mainz
weitere Angaben	k.A.
Nutzung des Geländes:	Wohnbebauung
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Umweltschutz Nord GmbH & Co.
Sanierungspflichtiger:	Stadt Mainz
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Bezirksregierung Staatliches Amt für Wasser und Abfallwirtschaft

Datenblatt 51

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: bis 5.500 mg/kg TS BTEX: bis 50 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	5 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	Off site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	Terraferm-Verfahren
Beschreibung	zusätzlich zum Mietenverfahren: - Gebäude- und Tankrückbau - Grundwassersanierung
Zuschlagstoffe	nach Bedarf
Behandlungskosten	70 DM/t

Datenblatt 51 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	35.000 t
Behandlungszeitraum	09/98 - 08/99
Behandlungsdauer	4 - 6 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Erd- bzw. Straßenbau und Deponieabdeckung und Baustoffindustrie
Standort	
Bundesland	Hessen
Stadt	Hanau
weitere Angaben	Francois-Kaserne Hanau-Lamboy
Nutzung des Geländes:	Wohnbebauung Landesgartenschau Hessen 2002
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Umweltschutz Nord GmbH, Ganderkesee Bodenreinigungsanlage Neu-Isenburg
Sanierungspflichtiger:	Bundesvermögensamt Militärische Liegenschaften
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	OFD Frankfurt Frau Gartenmeyer

Datenblatt 52

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: bis 10.000 mg/kg TS BTEX: bis 20 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	15 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	Terraferm-Verfahren
Beschreibung	k.A.
Zuschlagstoffe	nach Bedarf
Behandlungskosten	70 DM/t

Datenblatt 52 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	76.000 t
Behandlungszeitraum	09/96 - 08/98
Behandlungsdauer	4 - 6 Monate (je Charge)
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort
Standort	
Bundesland	Bayern
Stadt	Regensburg
weitere Angaben	ehemaliges Tanklager
Nutzung des Geländes:	Gewerbefläche im Hafengebiet
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Umweltschutz Nord GmbH, Ganderkesee
Sanierungspflichtiger:	Mineralölindustrie
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Umweltamt Regensburg Fr. Dr. Elsner

Datenblatt 53

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 5.000 mg/kg TS BTEX: 20 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	Terraferm
Beschreibung	k.A.
Zuschlagstoffe	Rindenmulch
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 53 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	11.500 t
Behandlungszeitraum	10/98 - ?
Behandlungsdauer	8 - 10 Monate (je Sanierungsfeld)
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort
Standort	
Bundesland	Brandenburg
Stadt	k.A.
weitere Angaben	ehem. militärische Liegenschaft
Nutzung des Geländes:	=> Wohnbebauung
Beteiligte	
Sanierungsdurchführende/r:	Umweltschutz Ost GmbH
Sanierungspflichtiger:	Immobilienfirma
Genehmigungsbehörde/ Ansprechpartner:	k.A.

Datenblatt 56**der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"**

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 26.100 mg/kg TS
Hauptbodenart	Lehm/Schluff
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	k.A.
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	<i>In situ</i> -Verfahren
Verfahrenstechnik	chemisch-biologisches Mehrstufenverfahren, abfallfrei
Name	BiLiPerMA
Beschreibung	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ermittlung des kontaminierten Bereichs 2. Abbautest für das Schadstoffpotential im Original 3. Einbringen des chemischen Reaktionspartners über Lanzen 4. Einbringen der biologischen Wirksuspension 5. Belüftung des Behandlungsbereichs über Lanzen 6. Kontrolle der Wirksamkeit der Methode durch Bodenbeprobung im Abstand von 4 Wochen 7. Wiederholung Schritt 3 bis 6
Zuschlagstoffe	k.A.
Behandlungskosten	66 DM/t

Datenblatt 56 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	52,5 t
Behandlungszeitraum	10/97 - 03/98
Behandlungsdauer	5 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Verbleib vor Ort (<i>in situ</i>)
Standort	
Bundesland	Niedersachsen
Stadt	Oberharz
weitere Angaben	k.A.
Nutzung des Geländes:	industriell
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Arbeitsgemeinschaft Biolipsia Umweltdienste mit einem international tätigem Ingenieurbüro
Sanierungspflichtiger:	Grundstückseigentümer
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	freiwillig / keine behördlichen Auflagen erteilt

Datenblatt 57**der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"**

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 18.000 mg/kg TS PAK: ger. Ant. BTEX: ger. Ant. PCB: ger. Ant.
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	k.A.
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Bioreaktorverfahren
Name	BiLiCONT
Beschreibung	In einem mobilen Sanierungsreaktor, der sich auch für chemische Schwermetallimmobilisierung, Bodenluftabsaugung und Kompostierung eignet, wurde mit passiver Belüftung das Schadstoffpotential biologisch unter Zusatz einer Biomassesuspension abgereinigt auf KW < 200 mg/kg TS. (Weitere Informationen unter http://www.biolipsia.com)
Zuschlagstoffe	k.A.
Behandlungskosten	55 DM/t

Datenblatt 57 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	45 t
Behandlungszeitraum	07/97 - 09/97
Behandlungsdauer	3 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort
Standort	
Bundesland	Brandenburg
Stadt	Strausberg
weitere Angaben	Märkischer Oderlandkreis
Nutzung des Geländes:	Gewerbefläche
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Biolipsia Umweltdienste Dr. Wolf-Dieter Schwidop
Sanierungspflichtiger:	Alter Pars GmbH
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Umweltamt MOL, Frau Menzel

Datenblatt 58

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 26.000 mg/kg TS
Hauptbodenart	Lehm/Schluff
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	k.A.
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	<i>In situ</i> -Verfahren
Verfahrenstechnik	Belüftungsverfahren (Airsparing/Bioventing) und biologische Aktivierung des Kohlenwasserstoffabbaus (Mehrstufenverfahren)
Name	BiLiPerMa
Beschreibung	<ol style="list-style-type: none"> 1. Eingrenzung des verunreinigten Bereiches 2. 24 h Abbautest im Labor 3. Einbringen des chem. Reaktionspartners über Bodenlanzen 4. Einbringen der biologischen Wirksuspension 5. Belüftung des Behandlungsbereichs über Bodenlanzen 6. Kontrollen der Wirksamkeit des Schadstoffabbaus durch Bodenbeprobungen im Abstand von 4 Wochen 7. Wiederholung der Schritte 3 - 6
Zuschlagstoffe	s.o.
Behandlungskosten	65 DM/t

Datenblatt 58 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	52 t
Behandlungszeitraum	10/97 - 03/98
Behandlungsdauer	5 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Verbleib vor Ort (<i>in situ</i>)
Standort	
Bundesland	Niedersachsen
Stadt	Oberharz
weitere Angaben	lange industrielle Nutzung
Nutzung des Geländes:	fortlaufend industriell
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Auras Ingenieurgesellschaft und ein analytisches Labor
Sanierungspflichtiger:	Grundstückseigentümer
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	keine behördlichen Auflagen, privatrechtliche Durchführung

Datenblatt 59

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 4.800 mg/kg TS BTEX: 1.700 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	< 15 %
organische Substanz	k.A.
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	Off site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mietenverfahren (+ Bodenluftabsaugung am Unfallort)
Name	Regenerationsmiete System Wayss & Freytag
Beschreibung	kombiniert biologisch-physikalische Behandlung; s. Franzius et al.: Handbuch der Altlastensanierung; Teil8/4.4.6.4; Seiten 1-10
Zuschlagstoffe	keine
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 59 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	1.000 t
Behandlungszeitraum	k.A.
Behandlungsdauer	3,3 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Erd- bzw. Straßenbau
Standort	
Bundesland	Hessen
Stadt	k.A.
weitere Angaben	k.A.
Nutzung des Geländes:	Tankunfall mit VK
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Wayss & Freytag Umwelttechnik
Sanierungspflichtiger:	Unfallverursacher
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	k.A.

Datenblatt 60

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW BTEX LCKW
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 μm	10 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	<i>In situ</i> -Verfahren
Verfahrenstechnik	Pump and Treat und Belüftungsverfahren (Airsparging/Bioventing)
Name	Mikrobielle <i>In situ</i> -Sanierung
Beschreibung	Stimulierung des Abbaus in der ungesättigten und gesättigten Zone; Bestimmung der Kohlenstoffbilanz als Erfolgskontrolle
Zuschlagstoffe	keine
Behandlungskosten	netto 7,03 DM/t

Datenblatt 60 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	85.000 t
Behandlungszeitraum	08/92 - 09/93; 08/98 - 09/99
Behandlungsdauer	24 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Verbleib vor Ort (<i>in situ</i>)
Standort	
Bundesland	Hessen
Stadt	Frankfurt am Main
weitere Angaben	ehemaliges Mineralöllager, 25.000 m ²
Nutzung des Geländes:	Industrie-/Gewerbegebiet
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Hafenbetriebe der Stadt Frankfurt
Sanierungspflichtiger:	Mineralölkonzerne/Hafenbetriebe
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	RP-Darmstadt, Staatl. Umweltamt Frankfurt/Frau Dornig

Datenblatt 61

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 3.500 mg/kg TS BTEX: 15 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	15 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	
Beschreibung	Mietenverfahren mit Zusatz von Nährstoffen und O ₂ -Träger mit aktiver Belüftung
Zuschlagstoffe	Nährstoffe /O ₂ -Träger
Behandlungskosten	30 DM/t

Datenblatt 61 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	2.800 t
Behandlungszeitraum	01/98 - 04/98
Behandlungsdauer	5 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Erd- bzw. Straßenbau
Standort	
Bundesland	Nordrhein-Westfalen
Stadt	Kamp - Linford
weitere Angaben	Gelände ehem. Spedition Hasenrahm
Nutzung des Geländes:	Tankstelle der Spedition Hasenrahm
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	ÖKOPLAN Umwelttechnik GmbH Gutenbergstraße 6 47051 Duisburg
Sanierungspflichtiger:	Herr Wolfgang Dömkes Wörthstraße H2b 47053 Duisburg
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Kreis Wesel Der Landrat Fachgruppe 60/7 Reeser Landstraße 31 46483 Wesel

Datenblatt 62**der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"**

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 10.300 mg/kg TS BTEX: 758 mg/kg TS
Hauptbodenart	Lehm/Schluff
Kornanteil < 63 µm	28 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	Off site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	
Beschreibung	Mietenverfahren unter Einsatz von hochwirksamen Nährlösungen und einem speziellen Sauerstoffträger. Die Mieten werden entsprechend dem Abbauverhalten umgesetzt. Nach 7 Monaten war der MKW-Gehalt bei 190 mg/kg; BTEX unter 0,5 mg/kg.
Zuschlagstoffe	hochwirksame Nährlösung / Sauerstoffträger
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 62 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	400 t
Behandlungszeitraum	11/98 - 05/99
Behandlungsdauer	7 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Erd- bzw. Straßenbau
Standort	
Bundesland	Nordrhein-Westfalen
Stadt	Bergisch-Gladbach
weitere Angaben	ehem. Reinigung
Nutzung des Geländes:	Standort einer Reinigung
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	ÖKOPLAN Umwelttechnik GmbH Gutenbergstraße 6 47051 Duisburg
Sanierungspflichtiger:	Eheleute Dr. Lückeroth Hans-Böckler-Straße 8 53225 Bonn
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Bezirksregierung Düsseldorf Dezernat 52 Cecilienallee 2 40474 Düsseldorf

Datenblatt 63

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	TNT: 50 - 70 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	20 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	Off site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	verbessertes Mietenverfahren
Beschreibung	mehrfacher Aerob/Anaerob-Wechsel Animpfung mit Lignin- und Zellulose-abbauenden Pilzen
Zuschlagstoffe	ligninreiche organische Reststoffe
Behandlungskosten	65,00 DM/t (inkl. Verwertung)

Datenblatt 63 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	600 t
Behandlungszeitraum	03/98 - 08/98
Behandlungsdauer	5 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Rekultivierung Tagebauflächen
Standort	
Bundesland	Sachsen-Anhalt
Stadt	Schönebeck/Elbe
weitere Angaben	Produktion von Kampfmitteln
Nutzung des Geländes:	Industriebrache
Beteiligte	
Sanierungsdurchführende/r:	Chemiewerk Schönebeck 39218 Schönebeck
Sanierungspflichtiger:	k.A.
Genehmigungsbehörde/ Ansprechpartner:	RP Magdeburg 39108 Magdeburg

Datenblatt 64**der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"**

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 3.000 - 8.000 mg/kg TS PAK: 40 – 70 mg/kg TS BTEX: 5 – 25 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	15 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	<i>Off site</i> -Verfahren
Verfahrenstechnik	Kombinationsverfahren mit Mieten- und Reaktorverfahren
Name	Aerosoles Mietenverfahren
Beschreibung	Zugabe von waschaktiven Substanzen Bodenluftabsaugung Teilweiser PAK-Abbau in flüssiger Phase (aerob) in einem Reaktor
Zuschlagstoffe	ca. 5 % org. Reststoffe
Behandlungskosten	25,00 DM/t zzgl. Verwertungskosten

Datenblatt 64 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	1.000 t
Behandlungszeitraum	06/99 - 08/99
Behandlungsdauer	2 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Rekultivierung
Standort	
Bundesland	Sachsen-Anhalt
Stadt	Dessau
weitere Angaben	Tanklager (Kraftstoffe, Heizöl)
Nutzung des Geländes:	Industriebrache
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	MVG
Sanierungspflichtiger:	Minol Grundstücksverwaltungs- und -verwertungsgesellschaft mbH
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	RP Dessau

Datenblatt 65

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 5.000 mg/kg TS AOX: 600 mg/kg TS
Hauptbodenart	Lehm/Schluff
Kornanteil < 63 µm	60 %
organische Substanz	> 15 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	Off site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	k.A.
Beschreibung	Schadstoffabbau im aeroben Milieu Zugabe von 20 % Strukturmaterial (anorganisch) Belüftung und Entwässerung durch Bodenluftabsaugung
Zuschlagstoffe	10 % org. Reststoffe
Behandlungskosten	45,00 DM/t zzgl. Verwertungskosten

Datenblatt 65 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	6.000 t
Behandlungszeitraum	04/98 - 10/98
Behandlungsdauer	6 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Deponierung (Klasse: TaSi Dk II (30%)) und Rekultivierung (70%)
Standort	
Bundesland	Sachsen
Stadt	Frankenberg
weitere Angaben	Erdfaulbecken Kläranlage
Nutzung des Geländes:	Neubau Schlammentwässerung
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Bauer und Mourik Umwelttechnik
Sanierungspflichtiger:	Zweckverband Mittleres Erzgebirgsvorland Hainichen
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	RP Chemnitz

Datenblatt 66

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 4.000 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	< 5 %
organische Substanz	k.A.
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	Off site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	HOCHTIEF-Verfahren
Beschreibung	Die mikrobiologische Bodenreinigung erfolgte nach dem HOCHTIEF-Mietenverfahren. Nach einer intensiven Aufbereitung mit Auflockerung, Siebung und Zudosierung von Strukturbildnern und Nährstoffen erfolgte ein Aufbau zu Regenerationsmieten. Sohlabdichtungen und Filter gewährleisten den Emissionsschutz. Die Sauerstoffversorgung wird durch automatisch gesteuerte Gebläse sichergestellt. Wasserabweisende Spezialmembranen verhindern den Zutritt von Niederschlagswasser. Durch kontinuierliche Probenahme und Analytik wird der Fortschritt der Sanierung verfolgt.
Zuschlagstoffe	Nährstoffe
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 66 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	3.600 t
Behandlungszeitraum	02/90 - 08/90
Behandlungsdauer	6 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Erd- bzw. Straßenbau
Standort	
Bundesland	Bayern
Stadt	München
weitere Angaben	Bürogebäude Bayerische Berufsgenossenschaft
Nutzung des Geländes:	Standort Verwaltungsgebäude
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	HOCHTIEF Umwelt GmbH
Sanierungspflichtiger:	Bayerische Berufsgenossenschaft
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Baugenehmigung durch Gemeinde Gräfeling Wasserwirtschaftsamt München Umweltreferat München

Datenblatt 67

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 4.140 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	k.A.
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	HOCHTIEF-Verfahren
Beschreibung	Die mikrobiologische Bodenreinigung erfolgte nach dem HOCHTIEF-Mietenverfahren. Nach einer intensiven Aufbereitung mit Auflockerung, Siebung und Zudosierung von Strukturbildnern und Nährstoffen erfolgte ein Aufbau zu Regenerationsmieten. Sohlabdichtungen und Filter gewährleisten den Emissionsschutz. Die Sauerstoffversorgung wird durch automatisch gesteuerte Gebläse sichergestellt. Wasserabweisende Spezialmembranen verhindern den Zutritt von Niederschlagswasser. Durch kontinuierliche Probenahme und Analytik wird der Fortschritt der Sanierung verfolgt.
Zuschlagstoffe	Nährstoffe und anorganische Strukturbildner
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 67 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	1.998 t
Behandlungszeitraum	08/93 - 11/93
Behandlungsdauer	4 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort
Standort	
Bundesland	Niedersachsen
Stadt	Salzwedel
weitere Angaben	ehemalige Standorttankstelle
Nutzung des Geländes:	Militärgelände
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	HOCHTIEF
Sanierungspflichtiger:	Bundesverteidigungsministerium
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Landesumweltamt Salzwedel/ Staatliches Umweltamt Magdeburg

Datenblatt 68

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 1.500 mg/kg TS PAK: 80 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	HOCHTIEF-Verfahren
Beschreibung	Die mikrobiologische Bodenreinigung erfolgte nach dem HOCHTIEF-Mietenverfahren. Nach einer intensiven Aufbereitung mit Auflockerung, Siebung und Zudosierung von Strukturbildnern und Nährstoffen erfolgte ein Aufbau zu Regenerationsmieten. Sohlabdichtungen und Filter gewährleisten den Emissionsschutz. Die Sauerstoffversorgung wird durch automatisch gesteuerte Gebläse sichergestellt. Wasserabweisende Spezialmembranen verhindern den Zutritt von Niederschlagswasser. Durch kontinuierliche Probenahme und Analytik wird der Fortschritt der Sanierung verfolgt.
Zuschlagstoffe	Nährstoffe
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 68 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	13.000 t
Behandlungszeitraum	07/89 - 03/90
Behandlungsdauer	6 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Erd- bzw. Straßenbau
Standort	
Bundesland	Nordrhein-Westfalen
Stadt	Krefeld
weitere Angaben	Gaswerksgelände und Verwaltung
Nutzung des Geländes:	ehemaliges Gaswerksgelände
Beteiligte	
Sanierungs- durchführende/r:	HOCHTIEF
Sanierungspflichtiger:	Stadtwerke Krefeld
Genehmigungs- behörde/ Ansprechpartner:	Umweltamt der Stadt Krefeld

Datenblatt 69

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 4.000 mg/kg TS PAK
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	k.A.
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	HOCHTIEF-Verfahren
Beschreibung	Chargenweise Behandlung des belasteten Bodens. Behandlung jeder Charge innerhalb einer Vegetationsperiode.
Zuschlagstoffe	Nährstoffe und anorganische Strukturbildner
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 69 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	100.000 t
Behandlungszeitraum	11/93 - 10/96
Behandlungsdauer	24 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Erd- bzw. Straßenbau
Standort	
Bundesland	Sachsen-Anhalt
Stadt	Weißenfels
weitere Angaben	neben der Autobahn A9
Nutzung des Geländes:	Landwirtschaftliche Nutzung
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	HOCHTIEF Umwelt GmbH
Sanierungspflichtiger:	Hydrierwerk Zeitz
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Staatliches Amt für umweltschutz Halle/Saale Herr Seydel

Datenblatt 70

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 3.500 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	< 10 %
organische Substanz	k.A.
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	HOCHTIEF-Mietenverfahren
Beschreibung	Die mikrobiologische Bodenreinigung erfolgte nach dem HOCHTIEF-Mietenverfahren. Nach einer intensiven Aufbereitung mit Auflockerung, Siebung und Zudosierung von Strukturbildnern und Nährstoffen erfolgte ein Aufbau zu Regenerationsmieten. Sohlabdichtungen und Filter gewährleisten den Emissionsschutz. Die Sauerstoffversorgung wird durch automatisch gesteuerte Gebläse sichergestellt. Wasserabweisende Spezialmembranen verhindern den Zutritt von Niederschlagswasser. Durch kontinuierliche Probenahme und Analytik wird der Fortschritt der Sanierung verfolgt.
Zuschlagstoffe	Nährstoffe
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 70 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	18.000 t
Behandlungszeitraum	08/90 - 09/90 (mehrere Chargen)
Behandlungsdauer	ca. 3 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort
Standort	
Bundesland	Nordrhein-Westfalen
Stadt	Wildenrath
weitere Angaben	Airbase Wildenrath
Nutzung des Geländes:	Militärische Nutzung
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	HOCHTIEF Umwelt GmbH
Sanierungspflichtiger:	Finanzbauamt Erkelenz
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Staatliches Bauamt Wildenrath

Datenblatt 71

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 3.600 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 μm	1 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	<i>In situ</i> -Verfahren
Verfahrenstechnik	Belüftungsverfahren (Airsparging/Bioventing) und Nährstoffeintrag über Tropfbewässerung
Name	HOCHTIEF Umwelt <i>In situ</i> Verfahren
Beschreibung	Die Sanierung erfolgte mittels Sauerstoffeintrag über Belüftungsbrunnen (saugende Belüftung). Gleichzeitig wurden flüssige Nährstoffe über ein Tropfleitungssystem eingebracht. Der Eintrag von Nährstoffen sowie der Schadstoffabbau wurden über Bodenprobenentnahmen und anschließende Analytik kontrolliert.
Zuschlagstoffe	Nährstoffe
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 71 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	500 t
Behandlungszeitraum	04/97 - 10/99
Behandlungsdauer	21 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Verbleib vor Ort (<i>In situ</i> -Verfahren)
Standort	
Bundesland	Niedersachsen
Stadt	29499 Zernien
weitere Angaben	k.A.
Nutzung des Geländes:	Stahl und Maschinenbau Betrieb
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	HOCHTIEF Umwelt GmbH
Sanierungspflichtiger:	k.A.
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Umweltamt Lüchow-Dannenberg Herr Most

Datenblatt 72

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 4.300 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	k.A.
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	HOCHTIEF-Verfahren
Beschreibung	Die mikrobiologische Bodenreinigung erfolgte nach dem HOCHTIEF-Mietenverfahren. Nach einer intensiven Aufbereitung mit Auflockerung, Siebung und Zudosierung von Strukturbildnern und Nährstoffen erfolgte ein Aufbau zu Regenerationsmieten. Sohlabdichtungen und Filter gewährleisten den Emissionsschutz. Die Sauerstoffversorgung wird durch automatisch gesteuerte Gebläse sichergestellt. Wasserabweisende Spezialmembranen verhindern den Zutritt von Niederschlagswasser. Durch kontinuierliche Probenahme und Analytik wird der Fortschritt der Sanierung verfolgt.
Zuschlagstoffe	Nährstoffe und anorganische Strukturbildner
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 72 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	4.500 t
Behandlungszeitraum	bis 10/94
Behandlungsdauer	
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort
Standort	
Bundesland	Sachsen
Stadt	Leipzig
weitere Angaben	k.A.
Nutzung des Geländes:	Bahn-Gelände
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	HOCHTIEF Umwelt GmbH
Sanierungspflichtiger:	Deutsche Reichsbahn
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Umweltamt der Stadt Leipzig

Datenblatt 73

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 1.400 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	k.A.
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Behandlung in Systemcontainern
Name	HOCHTIEF-Containerverfahren
Beschreibung	Die mikrobiologische Bodenreinigung erfolgte nach dem HOCHTIEF-Containerverfahren. Nach einer intensiven Aufbereitung mit Auflockerung, Siebung und Zudosierung von Strukturbildnern und Nährstoffen erfolgt eine Behandlung in Systemcontainern. Der Emissionsschutz wird durch Filter gewährleistet. Die Sauerstoffversorgung wird durch automatisch gesteuerte Gebläse sichergestellt. Durch kontinuierliche Probenahme und Analytik wird der Fortschritt der Sanierung verfolgt. Das HOCHTIEF-Containerverfahren hat sich besonders bei geringen Mengen verunreinigten Bodens bewährt, wo ein Mietenaufbau zu kostenintensiv wäre.
Zuschlagstoffe	Nährstoffe und anorganische Strukturbildner
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 73 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	1.350 t
Behandlungszeitraum	07/90 - 04/92
Behandlungsdauer	13 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort
Standort	
Bundesland	Nordrhein-Westfalen
Stadt	Hamminkeln
weitere Angaben	Schrottplatz der Deutschen Bahn AG
Nutzung des Geländes:	Schrottplatz
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	HOCHTIEF
Sanierungspflichtiger:	Deutsche Bahn AG
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Deutsche Bahn AG Umweltamt Hamminkeln

Datenblatt 74

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 4.900 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	k.A.
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	HOCHTIEF Mietenverfahren
Beschreibung	Die mikrobiologische Bodenreinigung erfolgte nach dem HOCHTIEF-Mietenverfahren. Nach einer intensiven Aufbereitung mit Auflockerung, Siebung und Zudosierung von Strukturbildnern und Nährstoffen erfolgte ein Aufbau zu Regenerationsmieten. Sohlabdichtungen und Filter gewährleisten den Emissionsschutz. Die Sauerstoffversorgung wird durch automatisch gesteuerte Gebläse sichergestellt. Wasserabweisende Spezialmembranen verhindern den Zutritt von Niederschlagswasser. Durch kontinuierliche Probenahme und Analytik wird der Fortschritt der Sanierung verfolgt.
Zuschlagstoffe	Nährstoffe und Strukturverbesserer
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 74 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	18.000 t
Behandlungszeitraum	05/93 - 11/93
Behandlungsdauer	7 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort
Standort	
Bundesland	Nordrhein-Westfalen
Stadt	Finnentrop
weitere Angaben	Diesellok-Tankstelle Bahnhof Finnentrop
Nutzung des Geländes:	Tankstelle
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	HOCHTIEF Umwelt GmbH
Sanierungspflichtiger:	Deutsche Bahn AG
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Deutsche Bahn AG

Datenblatt 75

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 700 mg/kg TS PAK: 90 mg/kg TS
Hauptbodenart	Lehm/Schluff
Kornanteil < 63 µm	50 %
organische Substanz	k.A.
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	HOCHTIEF-Verfahren
Beschreibung	Die mikrobiologische Bodenreinigung erfolgte nach dem HOCHTIEF-Mietenverfahren. Nach einer intensiven Aufbereitung mit Auflockerung, Siebung und Zudosierung von Strukturbildnern und Nährstoffen erfolgte ein Aufbau zu Regenerationsmieten. Sohlabdichtungen und Filter gewährleisten den Emissionsschutz. Die Sauerstoffversorgung wird durch automatisch gesteuerte Gebläse sichergestellt. Wasserabweisende Spezialmembranen verhindern den Zutritt von Niederschlagswasser. Durch kontinuierliche Probenahme und Analytik wird der Fortschritt der Sanierung verfolgt.
Zuschlagstoffe	Nährstoffe / Perlite
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 75 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	4.000 t
Behandlungszeitraum	10/90 - 11/91
Behandlungsdauer	12 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	k.A.
Standort	
Bundesland	Nordrhein-Westfalen
Stadt	Burgsteinfurt
weitere Angaben	Bahnhofsgelände
Nutzung des Geländes:	Bahnhof
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	HOCHTIEF
Sanierungspflichtiger:	Deutsche Bundesbahn
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	k.A.

Datenblatt 76

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 15.000 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	k.A.
organische Substanz	k.A.
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	HOCHTIEF-Verfahren
Beschreibung	Die mikrobiologische Bodenreinigung erfolgte nach dem HOCHTIEF-Mietenverfahren. Nach einer intensiven Aufbereitung mit Auflockerung, Siebung und Zudosierung von Strukturbildnern und Nährstoffen erfolgte ein Aufbau zu Regenerationsmieten. Sohlabdichtungen und Filter gewährleisten den Emissionsschutz. Die Sauerstoffversorgung wird durch automatisch gesteuerte Gebläse sichergestellt. Wasserabweisende Spezialmembranen verhindern den Zutritt von Niederschlagswasser. Durch kontinuierliche Probenahme und Analytik wird der Fortschritt der Sanierung verfolgt.
Zuschlagstoffe	Nährstoffe
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 76 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	58.000 t
Behandlungszeitraum	07/90 - 06/93 (mehrere Chargen)
Behandlungsdauer	unterschiedlich (je nach Ausgangssituation)
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort
Standort	
Bundesland	Hessen
Stadt	Frankfurt/Main
weitere Angaben	Rhein-Main-Airbase, Kerosinschaden
Nutzung des Geländes:	Militärstandort
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	HOCHTIEF Umwelt GmbH
Sanierungspflichtiger:	Staatsbauamt Frankfurt/Main
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	k.A.

Datenblatt 77

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: bis 12.900 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	25 %
organische Substanz	4 - 15 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	<i>In situ</i> -Verfahren
Verfahrenstechnik	Kombinationsverfahren mit Belüftung
Name	Mikrobiologisches <i>In situ</i> -Verfahren
Beschreibung	Zunächst Eingrenzung und Erstellung von Sanierungsbrunnen (Lanzen) in regelmäßigen Abständen im Schadstoffkörper. Hierüber erfolgt <ol style="list-style-type: none"> 1. eine Beimpfung des Bodens mit Mikroorganismen-Mischkulturen zum Schadstoffabbau und 2. eine Bodenluftabsaugung zur O₂-Versorgung der Mikroorganismen.
Zuschlagstoffe	Mikroorganismen-Mischkultur
Behandlungskosten	175 DM/t

Datenblatt 77 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	300 t
Behandlungszeitraum	02/95 - 08/96
Behandlungsdauer	18 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	<i>in situ</i>
Standort	
Bundesland	Saarland
Stadt	Saarbrücken
weitere Angaben	ehem. Tankstellengelände
Nutzung des Geländes:	früher: Tankstelle mit Waschstraße jetzt: geplant ist Wohnbebauung
Beteiligte	
Sanierungs- durchführende/r:	Biologische Bodensanierung Günter Meyer GmbH Alte Ziegelei 13-17 51491 Overath
Sanierungspflichtiger:	DEA Mineralöl AG Karl-Benz-Straße 60314 Frankfurt/Main
Genehmigungs- behörde/ Ansprechpartner:	Landesamt für Umweltschutz (LfU) Herr Kaiser 66119 Saarbrücken

Datenblatt 78

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: bis 80.000 mg/kg TS PAK: bis 120 mg/kg TS Phenol: bis 25 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	< 5 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	
Beschreibung	Aushub, Einlagerung in Mieten und Beimpfung mit Standorteigenen Mikroorganismen (vor Ort isoliert, fermentiert und in großer Menge angezüchtet), Mietenumlagerung (teilweise)
Zuschlagstoffe	keine
Behandlungskosten	75 DM/t

Datenblatt 78 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	25.000 t
Behandlungszeitraum	05/97 - 11/97
Behandlungsdauer	7 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort
Standort	
Bundesland	Sachsen
Stadt	Dresden
weitere Angaben	ehem. Tanklager der Deutschen Reichsbahn
Nutzung des Geländes:	Gewerbegebiet, von 1890-1995 Tanklager
Beteiligte	
Sanierungsdurchführende/r:	Biologische Bodensanierung Günter Meyer GmbH Alte Ziegelei 13-17 51491 Overath
Sanierungspflichtiger:	Deutsche Bahn AG Kompetenzzentrum Sanierungsmanagement Dresden
Genehmigungsbehörde/ Ansprechpartner:	Stadt Dresden Umweltamt

Datenblatt 79

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: bis 800 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	ca. 20 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	<i>On site</i> -Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren und Belüftungsverfahren (Airsparging/Bioventing)
Name	<i>On site</i> -Verfahren
Beschreibung	Einlagerung des Materials in Biobeete und Beimpfung mit Mikroorganismen, Belüftung durch Vakuumetechnik
Zuschlagstoffe	keine
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 79 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	3.300 t
Behandlungszeitraum	07/99 - 10/99
Behandlungsdauer	4 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Erd- bzw. Straßenbau
Standort	
Bundesland	Nordrhein-Westfalen
Stadt	Paderborn-Sennelager
weitere Angaben	Panzerwaschplatz
Nutzung des Geländes:	Truppenübungsplatz
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Biologische Bodensanierung Günter Meyer GmbH Alte Ziegelei 13-17 51491 Overath
Sanierungspflichtiger:	Englische Armee
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Staatl. Bauamt Paderborn Außenstelle Senne

Datenblatt 80

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: ca. 15.000 mg/kg TS BTEX: ca. 900 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	35 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	Off site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	ContraCon-Verfahren
Beschreibung	<p>Das ContraCon-Verfahren beruht auf einem dynamischen Beet. Es wird <i>on site</i> und in Bodenbehandlungszentren eingesetzt. Der Einsatz des biologischen Beet- (oder Mieten-) verfahrens führt zur Mineralisierung der Schadstoffe durch die im Boden vorhandenen (autochthonen) Mikroorganismen. Die Produkte der mikrobiellen Schadstoffumsetzung sind Wasser und Kohlendioxid.</p> <p>Die Technik des biologischen ContraCon-Verfahrens ist aus landwirtschaftlichen Techniken der Bodenbearbeitung abgeleitet.</p> <p>Der Boden wird durch mechanische Bearbeitung regelmäßig homogenisiert und belüftet. Um maximale Schadstoffumsatzraten erreichen zu können, wird der Boden durch die Zugabe von Mineraldüngern mit den notwendigen Nährstoffen versorgt. Eine Zugabe organischer Strukturstoffe erfolgt bei den meisten natürlichen Böden nicht. Dies ist vor allem für ein möglichst weites Bodenverwertungsspektrum vorteilhaft. Lediglich die Behandlung von Tonen und Schluffen erfordert den Zusatz von strukturverbessernden anorganischen oder organischen Zusätzen, um eine ausreichende Bodenbelüftung sicherzustellen.</p>
Zuschlagstoffe	Mineraldünger
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 80 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	12.000 t
Behandlungszeitraum	06/96 - 01/98 (mehrere Chargen)
Behandlungsdauer	insges. 20 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Haldenrekultivierung im Bergbau
Standort	
Bundesland	Sachsen-Anhalt
Stadt	Halle
weitere Angaben	ehemaliges Tanklager
Nutzung des Geländes:	1923/24 - 1949 Tanklager der Deutschen Shell AG
	1949 - 1990 Tanklager der Deutschen Kraftstoff- und Mineralölzentrale, aus welcher sich die VEB Minol entwickelte
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Plambeck ContraCon Bau- und Umwelttechnik GmbH Peter-Henlein-Straße 2-4 27472 Cuxhaven
Sanierungspflichtiger:	Deutsche Shell Aktiengesellschaft Überseering 35 22284 Hamburg
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Regierungspräsidium Leipzig Braustraße 2 04107 Leipzig

Datenblatt 81

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: 10.740 mg/kg TS PAK: 90 mg/kg TS Phenol: 20 mg/kg TS
Hauptbodenart	Sand
Kornanteil < 63 µm	28 %
organische Substanz	< 4 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	ContraCon-Verfahren
Beschreibung	<p>Das ContraCon-Verfahren beruht auf einem dynamischen Beet. Es wird <i>on site</i> und in Bodenbehandlungszentren eingesetzt. Der Einsatz des biologischen Beet- (oder Mieten-) verfahrens führt zur Mineralisierung der Schadstoffe durch die im Boden vorhandenen (autochthonen) Mikroorganismen. Die Produkte der mikrobiellen Schadstoffumsetzung sind Wasser und Kohlendioxid.</p> <p>Die Technik des biologischen ContraCon-Verfahrens ist aus landwirtschaftlichen Techniken der Bodenbearbeitung abgeleitet.</p> <p>Der Boden wird durch mechanische Bearbeitung regelmäßig homogenisiert und belüftet. Um maximale Schadstoffumsatzraten erreichen zu können, wird der Boden durch die Zugabe von Mineraldüngern mit den notwendigen Nährstoffen versorgt. Eine Zugabe organischer Strukturstoffe erfolgt bei den meisten natürlichen Böden nicht. Dies ist vor allem für ein möglichst weites Bodenverwertungsspektrum vorteilhaft. Lediglich die Behandlung von Tonen und Schluffen erfordert den Zusatz von strukturverbessernden anorganischen oder organischen Zusätzen, um eine ausreichende Bodenbelüftung sicherzustellen.</p>
Zuschlagstoffe	Mineraldünger
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 81 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	42.660 t
Behandlungszeitraum	Erdarbeiten: 03/92 - 06/92, Sanierung: 04/93 - 10/95
Behandlungsdauer	18 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort
Standort	
Bundesland	Sachsen
Stadt	Böhlen
weitere Angaben	ehemaliges Druckgaswerk der SOWAG, Böhlen
Nutzung des Geländes:	ab 1936 Erzeugung von Kraftstoffen, Heizölen und Chemierohstoffen, wie Schwefel- und Phenolverbindungen, auf der Basis von Braunkohlenschwelteeren und Erdölen sowie Stadtgas auf der Grundlage von Braunkohlebriketts. Ab 1969 wurden die Anlagen etappenweise außer Betrieb genommen.
Beteiligte	
Sanierungsdurchführende/r:	Plambeck ContraCon Bau- und Umwelttechnik GmbH Peter-Henlein-Straße 2-4 27472 Cuxhaven
Sanierungspflichtiger:	Sächsische Olefinwerke AG Werkstraße 04564 Böhlen
Genehmigungsbehörde/ Ansprechpartner:	Regierungspräsidium Leipzig Herr Wuckel Referat 63 Karl-Liebknecht-Straße 145 07030 Leipzig

Datenblatt 82

der Referenzliste "Erfolgreiche Biologische Bodensanierung"

Boden / Bodenmaterial	
Belastung	MKW: bis 11.800 mg/kg TS BTEX: bis 192 mg/kg TS
Hauptbodenart	Lehm/Schluff
Kornanteil < 63 µm	65 %
organische Substanz	4 - 15 %
Sanierungsverfahren	
Verfahrensart	On site-Verfahren
Verfahrenstechnik	Mieten-/Biobeetverfahren
Name	ContraCon-Verfahren
Beschreibung	<p>Das ContraCon-Verfahren beruht auf einem dynamischen Beet. Es wird <i>on site</i> und in Bodenbehandlungszentren eingesetzt. Der Einsatz des biologischen Beet- (oder Mieten-) verfahrens führt zur Mineralisierung der Schadstoffe durch die im Boden vorhandenen (autochthonen) Mikroorganismen. Die Produkte der mikrobiellen Schadstoffumsetzung sind Wasser und Kohlendioxid.</p> <p>Die Technik des biologischen ContraCon-Verfahrens ist aus landwirtschaftlichen Techniken der Bodenbearbeitung abgeleitet.</p> <p>Der Boden wird durch mechanische Bearbeitung regelmäßig homogenisiert und belüftet. Um maximale Schadstoffumsatzraten erreichen zu können, wird der Boden durch die Zugabe von Mineraldüngern mit den notwendigen Nährstoffen versorgt. Eine Zugabe organischer Strukturstoffe erfolgt bei den meisten natürlichen Böden nicht. Dies ist vor allem für ein möglichst weites Bodenverwertungsspektrum vorteilhaft. Lediglich die Behandlung von Tonen und Schluffen erfordert den Zusatz von strukturverbessernden anorganischen oder organischen Zusätzen, um eine ausreichende Bodenbelüftung sicherzustellen.</p>
Zuschlagstoffe	Mineraldünger, Perlite
Behandlungskosten	k.A.

Datenblatt 82 (Fortsetzung)

Sanierung	
behandelte Menge	8.650 t
Behandlungszeitraum	02/97 - 11/98
Behandlungsdauer	10 Monate
Verwertung des behandelten Bodens	Wiedereinbau am Standort
Standort	
Bundesland	Niedersachsen
Stadt	Osnabrück
weitere Angaben	Kasernengelände der britischen Armee
Nutzung des Geländes:	Tankstellenbetrieb
Beteiligte	
Sanierungs-durchführende/r:	Plambeck ContraCon Bau- und Umwelttechnik GmbH Peter-henlein-Straße 2-4 27472 Cuxhaven
Sanierungspflichtiger:	Staatshochbauamt Osnabrück i.V. der Bundesrepublik Deutschland Hakenstr. 13 49074 Osnabrück
Genehmigungs-behörde/ Ansprechpartner:	Umweltamt Osnabrück Herr Gerdts Natruper-Torwall 49034 Osnabrück

7 Biologische Bodensanierung in der Praxis. Erfahrungen am Beispiel der maßstabsgerechten Erprobung biologischer Sanierungsverfahren im "Werk Tanne"

André Dahn, Jochen Michels

7.1 Einleitung

Das ehemalige Sprengstoffwerk "Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld war eine der fünf größten Produktionsstätten für 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) des Dritten Reiches. Auf dem 117 ha großen Gelände wurden von 1939 bis 1944 über 100.000 t des Sprengstoffs hergestellt. Durch Produktion, Havarien und letztendlich auch durch die Delaborierung wurde das Werksgelände weiträumig mit TNT und anderen Nitroaromaten kontaminiert. Neben der vergleichsweise guten Datenlage über die Verteilung der Sprengstoffkontamination auf dem Werksgelände war die fehlende Nachnutzung ausschlaggebend für die Entscheidung, das Verbundvorhaben 6 "Maßstabsgerechte Erprobung biologischer Sanierungsverfahren mit Erfolgskontrolle" gerade hier durchzuführen.

Im Verbundvorhaben 3 "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten" (s. Kap. 9.2) wurden verschiedene biologische Verfahren zur Sanierung TNT-kontaminierter Böden entwickelt. Zur Erprobung dieser und anderer Verfahren gab es eine bundesweite Ausschreibung, aus der drei Verfahrenserprober hervorgegangen sind:

- Das Kompostierverfahren (Anaerob-Aerob-Verfahren) der Fa. Umweltschutz Nord GmbH & Co., Ganderkesee, ist eine firmeneigene Entwicklung.
- Das dynamische Beetverfahren der Fa. Plambeck ContraCon Bau und Umwelttechnik GmbH, Cuxhaven, wurde zusammen mit der Universität Marburg, Institut für Umwelthygiene, entwickelt (s. Kap. 9.2.2 und Kap. 9.2.4)
- Das Pilzverfahren der Fa. WISSTRANS (neu: AWIA) Umwelt GmbH, Göttingen, wurde in Zusammenarbeit mit der Universität Jena, Institut für technische Mikrobiologie, entwickelt (s. Kap. 9.2.6 und Kap. 9.2.7)

Im dem hier dargestellten Verbundvorhaben (VV) wurden drei biologische Verfahren unter vergleichbaren Bedingungen (in Bezug auf die Böden und deren Belastungen, die Analytik, die Kontrollböden und natürlich die Standortbedingungen) in zwei bis drei Chargen á 70 t TNT-belasteten Bodenmaterials erprobt. Ziel der Verfahrenserprobung war der genehmigte Wiedereinbau des behandelten Bodenmaterials am Standort. Dazu war der Nachweis einer weitgehenden und nachhaltigen Bodendetoxifizierung durch validierte ökotoxikologische Testverfahren zu erbringen. Neben dem Einsatz klassischer Analytik zur Verfolgung des Schadstoffabbaus wurden bei der Erfolgskontrolle der Erkenntnisfortschritt der VV 4 "Ökotoxikologische Testbatterien" (s. Kap. 9.3) und VV 5 "Langzeit- und Remobilisierungsverhalten" (s. Kap. 9.4) mit berücksichtigt.

Das Konzept für die wissenschaftliche Begleitung wurde mit Wissenschaftlern und Behörden abgestimmt mit dem Ziel, die Vorgehensweise bei der Verfahrenserprobung zu beschreiben sowie die Maßnahmen für die Qualitäts-/Erfolgskontrolle der drei zu erprobenden Verfahren nachvollziehbar darzustellen. Da es sich hierbei um einen konkreten Erprobungsfall unter

definierten Rahmenbedingungen handelte, lieferte es einen grundlegenden Beitrag zur Schaffung einheitlicher Bewertungskriterien und somit für die Erhöhung behördlicher und öffentlicher Akzeptanz von biologischen Sanierungsverfahren.

7.2 Anlagen und Verfahren

7.2.1 Zentraler Versuchsbereich

Auf einem 4200 m² großen Areal am nordöstlichen Rand des Werksgeländes hatte die Industrieanlagen-Betriebsgesellschaft mbH (IABG), Niederlassung Berlin, die mit der Standortkoordination und der wissenschaftlich-technischen Begleitung des Verbundvorhabens betraut war, den zentralen Versuchsbereich hergerichtet. (s. Abb. 7.1). Zu den Aufgaben gehörte die Koordination der Bauaktivitäten im Zuge des Aufbaus der Versuchsanlagen sowie die Planung und Bauüberwachung bei der Errichtung der zentralen Einrichtungen des Versuchsbereiches (Schwarz-/Weiß-Einrichtungen, Container-Bodenlager, Medienversorgung etc.). Zwei Verfahrenserprober haben ihre Bodenbehandlungszelte aufgestellt, ein dritter ist mit seiner Behandlungsanlage in ein Gebäude eingezogen. Nach Abschluß der Erprobung wurden die Anlagen rückgebaut.

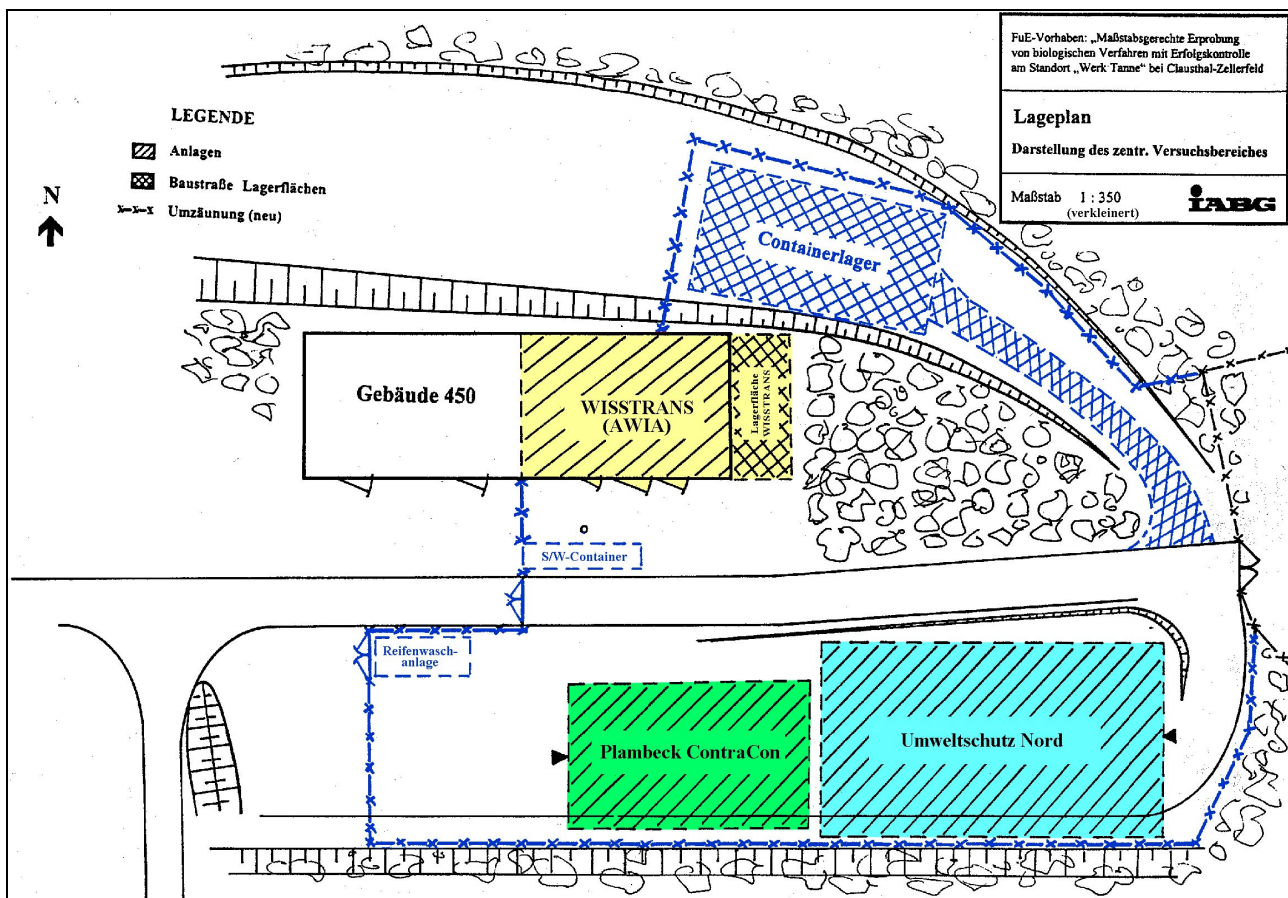


Abb. 7.1: Zentraler Versuchsbereich. Legende: (■) zentrale Installationen (Zaun, Tore, Reifenwaschanlage, Schwarz/Weiß-Bereich und Containerlager), (■) Behandlungszelt des anaerob/aeroben Kompostierungsverfahrens, (■) Behandlungszelt des dynamischen Beetverfahrens, (■) Umgebautes Gebäude und Freifläche des Pilzverfahrens

7.2.2 Anaerob/aerobes Kompostierungsverfahren (Umweltschutz Nord)

Das grundlegende Verfahrensprinzip besteht darin, daß in einer ersten, anaeroben Stufe durch die Applikation leicht verwertbarer Substrate eine Reduktion sprengstofftypischer Verbindungen (STV) zu reaktiven Zwischenprodukten erfolgt, die sukzessive durch aerobe Verfahrensschritte in der Huminfraction des Bodens festgelegt werden. Die Nachbehandlung dient zum einen dem biologischen Abbau überschüssiger organischer Verbindungen, zum anderen der Förderung des Humifizierungsprozesses, so daß eine Konversion der Kontaminanten in naturverwandte, im Boden vorkommende Verbindungen (Huminstoffe) eintritt (s. Abb. 7.2, Einzelheiten s. Kap. 9.5.1).

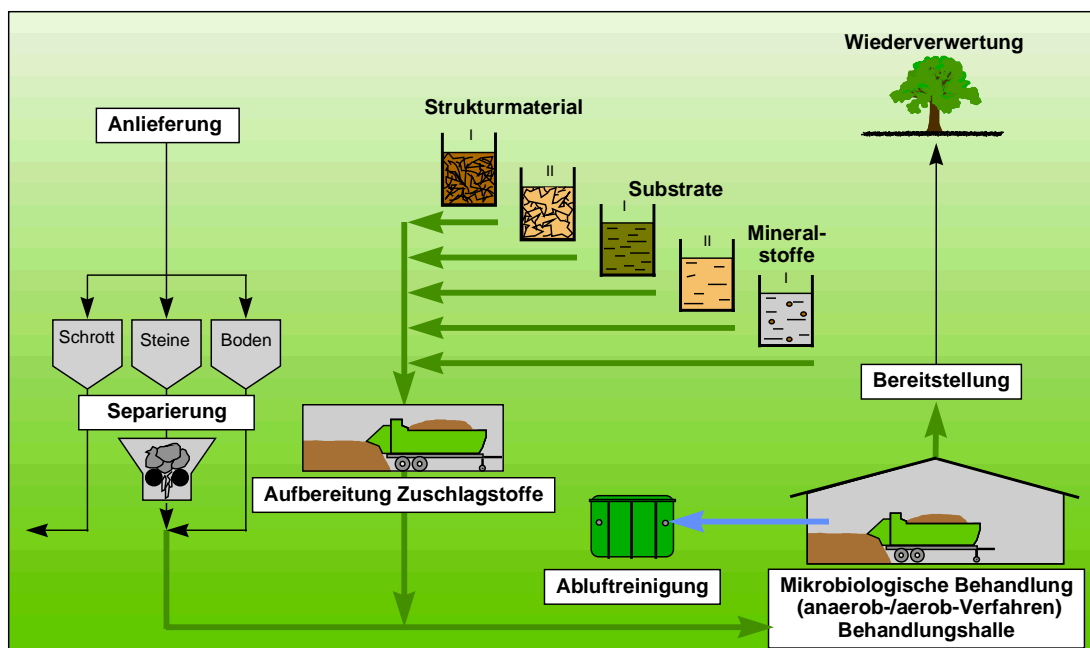


Abb. 7.2: Darstellung des Kompostierungsverfahrens der Fa. Umweltschutz Nord

Prozeßbeschreibung:

- Nutzung der standorteigenen Mikroorganismen
- Zusatz von sauerstoffzehrenden Substraten (Dung und Abfallstoffe der Land- und Forstwirtschaft)
- Fließender Übergang von anaerob nach aerob durch Substratverbrauch und damit verbundene nachlassende mikrobiologische Aktivität
- Mittels spezieller Aufbereitungs- und Behandlungstechnologie wird eine homogene Mischung aus Bodenmaterial und Substratzusatz erzielt
- Die Materialbearbeitung richtet sich nach Abbaugrad und den mikrobiologischen Prozessparametern
- TNT wird über ADNT und DANT und TAT reduziert
- Während des gesamten Prozessverlaufes werden Metaboliten in die organische Bodenfraktion eingebunden

7.2.3 Dynamisches Beetverfahren (Plambeck ContraCon)

Das Prinzip der Bodenbehandlung beruht auf einer gezielten Umwandlung der Schadstoffe während einer vorgeschalteten anaeroben Phase und ihrem anschließenden irreversiblen Einbau in die Bodenmatrix unter aeroben Bedingungen (s. Abb. 7.3). Voraussetzung für die mikrobiell induzierte Detoxifizierung ist die Zugabe eines durch die autochthonen Mikroorganismen leicht verwertbaren organischen Substrates. Es wurden Verfahrensvarianten mit verdichtetem Beet und unverdichteter Miete erprobt (Einzelheiten s. Kap. 9.5.2).

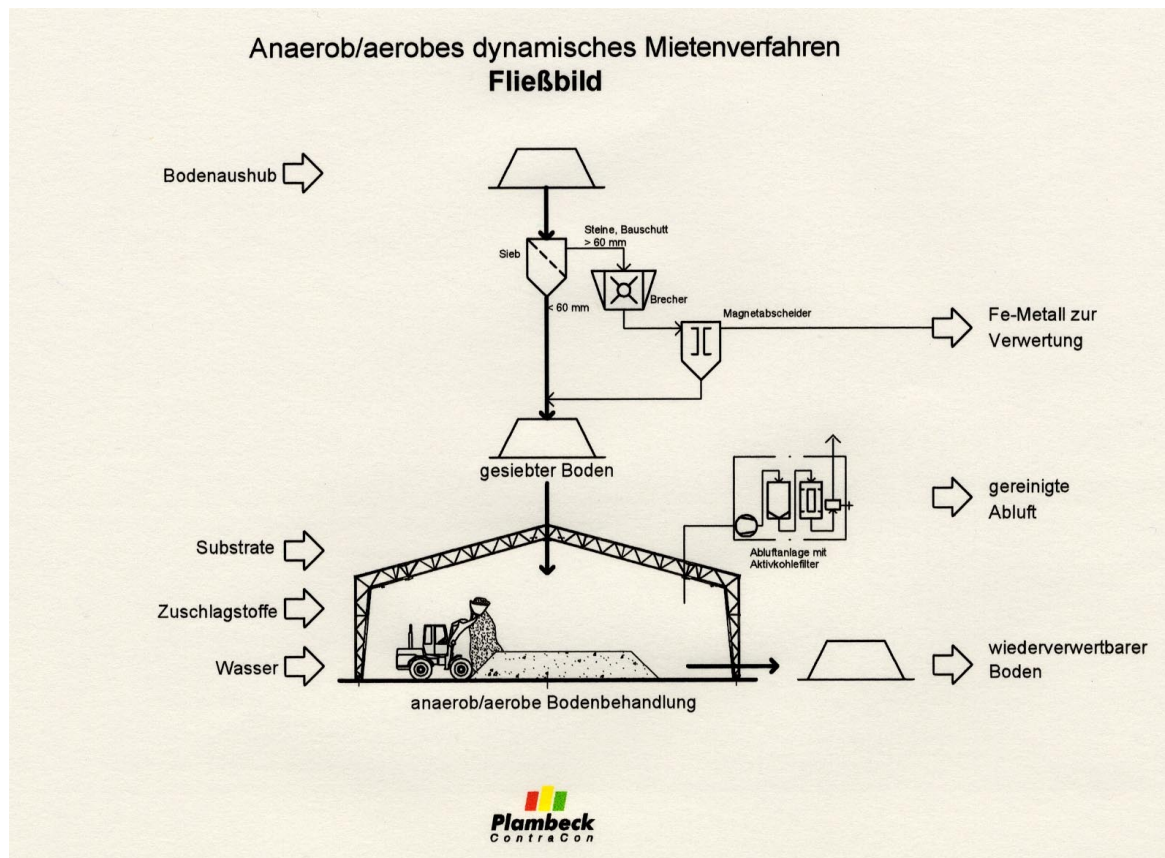


Abb. 7.3: Dynamisches Mietenverfahren der Fa. Plambeck ContraCon

Prozeßbeschreibung:

- Nutzung der standorteigenen Mikroorganismen
- Zusatz von sauerstoffzehrenden Substraten (Pflanzliche Abfallstoffe der Landwirtschaft)
- Während des gesamten Prozesses werden die zugegebenen Substrate verbraucht
- Zweistufiges anaerob/aerobes Verfahren
- Boden wird erst in der aeroben Phase gewendet und belüftet
- In der anaeroben Phase wird TNT zu ADNT und DANT reduziert
- Während der aeroben Phase werden diese reduzierten TNT-Metabolite in die organische Bodenfraktion eingebunden

7.2.4 Pilzverfahren (AWIA Umwelt (ursprünglich WISSTRANS Umwelt))

Das Verfahren beruht auf dem Potential von Weißfäulepilzen und streuzersetzenden Pilzen, TNT zersetzen zu können. Die Zersetzungsprodukte werden entweder mineralisiert oder in der organischen Bodenfraktion festgelegt. Dazu werden Mieten durch schichtweises Einbringen von Pilz/Stroh-Substratgemisch in den mit Nitroaromaten belasteten Boden errichtet. Es handelt sich um ein einstufiges, rein aerobes Verfahren mit geringer Bodenbewegung während der Behandlung. Der Boden wird in einer Miete mit einer Saugbelüftung, ,Untergrundabdichtung und Sickerwasserfassung behandelt. Temperatur und Feuchtigkeit werden in der eingehausten Miete kontrolliert. Ein Austrocknen des Bodens wird durch regelmäßiges Berieseln verhindert. (s. Abb. 7.4, Einzelheiten s. Kap. 9.5.3).

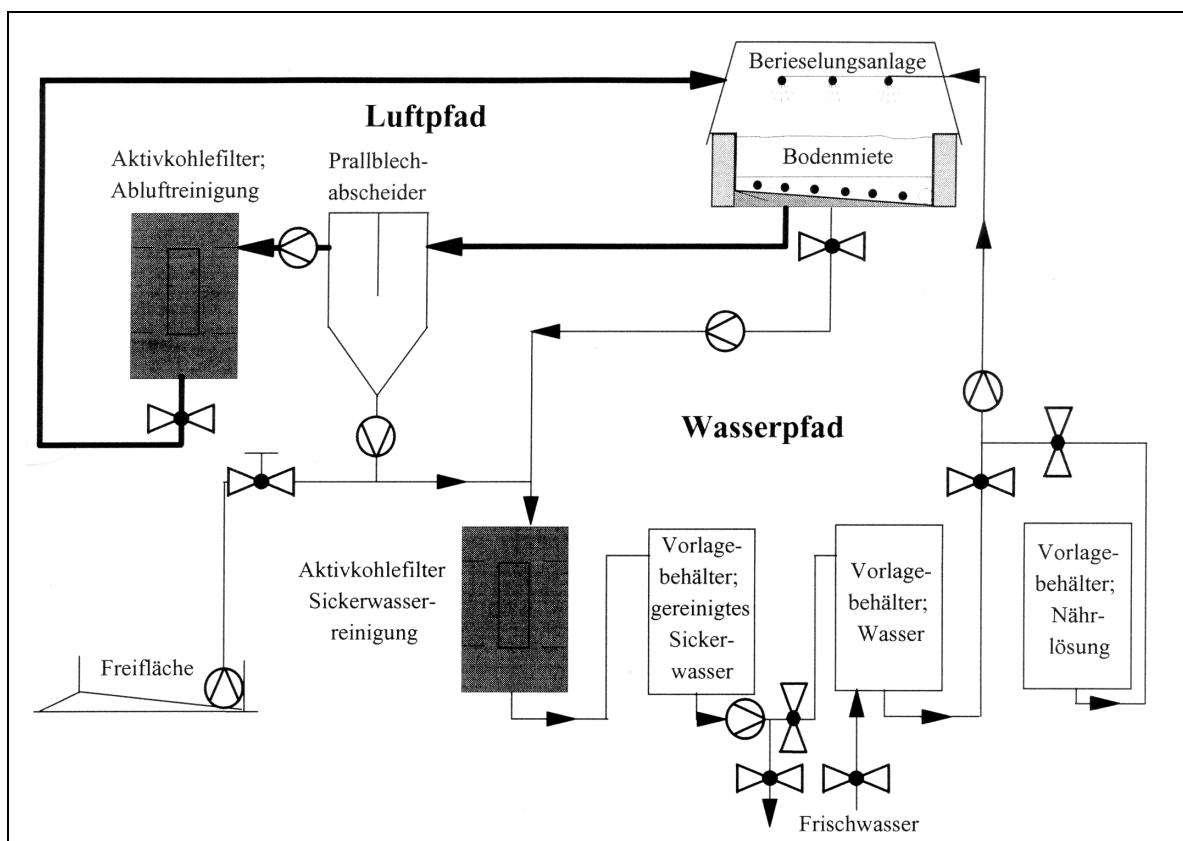


Abb. 7.4: Pilzverfahren der Fa. AWIA Umwelt GmbH

Prozeßbeschreibung:

- Zugesezte Weißfäulepilze bzw. streuabbauende Pilze, die auf Strohsubstrat vorgezogen wurden
- Rein aerobes Verfahren
- Stroh und Boden werden in alternierenden Schichten aufgesetzt und nicht gewendet
- TNT wird zu ADNT und DANT reduziert. Metaboliten werden durch die extrazellulären Enzyme der Pilze zerstört
- Fragmente werden in die organische Bodenfraktion eingebaut

7.2.5 Haufwerk

Folgende Anforderungen an das Bodenmaterial im Haufwerk wurde seitens der Verfahrenserprober gestellt:

- mittlere Nitroaromatenbelastung von 500 bis 2.500 mg/kg
- Angeforderte Menge: 520 t
- Grobanteil > 60 mm ist zu entfernen.

Für den Aushub des Bodens auf dem Gelände des ehemaligen Sprengstoffwerkes "Tanne" war der Standortkoordinator verantwortlich. Hierfür mußte zuvor ein Naturschutzrechtlicher Befreiungs- und Erlaubnisbescheid von der zuständigen Behörde eingeholt werden. Auf den Auskofferungsflächen war vor Beginn der Arbeiten eine sicherheitstechnische Kampfmittelfreigabe durchzuführen.

Bevor eine Aufteilung des Haufwerkes an die drei Verfahrenserprober erfolgen konnte, mußten nachvollziehbare Daten über die Verbreitung der TNT-Belastung im Haufwerk vorhanden sein: Hierzu erfolgte eine Probennahme über die gesamte Fläche des aufgeschütteten Bodenkörpers. Danach wurde das Haufwerk in drei Teile (Sektionen) aufgeteilt und die Schadstoffverteilung nochmals ermittelt.

Nach Untersuchung der Sektionen (Ausgangsmaterial für die Mieten der Verfahrenserprober) lagen folgende mittlere Konzentrationen für die Bodenmaterialien der jeweiligen Sektion vor. Die Verfahrenserprober erhielten das Bodenmaterial gemäß ihrer Anforderung:

- | | |
|--------------------------------------|----------------|
| - Sektion der Fa. Umweltschutz Nord | 1120 mg/kg TNT |
| - Sektion der Fa. Plambeck ContraCon | 1215 mg/kg TNT |
| - Sektion der Fa. Wisstrans Umwelt | 1500 mg/kg TNT |

Die Konzentrationen jeder Sektion wurden aus den Medianwerten von mindestens 40 Proben ermittelt, um somit die durch das Vorhandensein von partikulärem TNT aufgetretenen Messwertstreuungen aufzufangen.

Nach der Analyse und Aufteilung des Haufwerkes durch den Standortkoordinator ging der Boden in die Verantwortung der Verfahrenserprober über.

7.2.6 Bodenbehandlung

Die Bodenbehandlung erfolgte über einen Zeitraum von zwei Jahren von Mai 1998 bis Mai 2000. Die Verfahren sollten maßstabsgerecht erprobt werden, um die Notwendigkeit weiterer verfahrensspezifischer Anpassungen bei einer Vergrößerung des Maßstabs auszuschließen und damit Aussagen über den großtechnischen Prozeß zu ermöglichen.

Das Bodenmaterial wurde von den Verfahrenserprobern in zwei oder drei aufeinanderfolgenden Chargen á 70 t behandelt. Dabei wurde ihnen die Möglichkeit eingeräumt, die Verfahren bei jeder Charge zu modifizieren. Nicht unmittelbar behandeltes Bodenmaterial wurde auf einer bereiteten Freifläche (Containerlager) abgedeckt zwischengelagert (s. Abb. 7.1).

7.3 Genehmigungsrechtliche Anforderungen

Grundvoraussetzung für die Durchführung der maßstabsgerechten Erprobung der drei biologischen Bodenbehandlungsverfahren war eine Betriebsgenehmigung der Versuchsanlagen auf dem Standort Clausthal-Zellerfeld. Die Betriebsgenehmigung erfolgte nach der 4. BImSchV und beinhaltete im wesentlichen die nachfolgend beschriebenen Anforderungen.

7.3.1 Anlagengenehmigung

Im Rahmen der Vorbereitung der Verfahrenserprobung waren die beteiligten Firmen verpflichtet, erforderliche Genehmigungen (nach BImSchG) zur Errichtung und zum Betrieb der Versuchsanlagen zur Bodenbehandlung zu beantragen. Nach Vorliegen dieser Genehmigungen wurden die Anlagen durch die einzelnen Verfahrenserprober errichtet.

Die gesetzlichen Rahmenbedingungen für die Bodenbehandlung waren in den Anlagengenehmigungen gem. BImSchG geregelt. Als eine Auflage der Anlagengenehmigung mußten ein Immissionsschutzkonzept erarbeitet und entsprechende Messungen durchgeführt werden. Dazu gehörten:

- die Bestimmung des Mononitrotoluol-Gehaltes in der Luft am 27.05.98 (durchgeführt von Fa. Wisstrans)
- Lärmmessungen und Messungen von organischem Gesamtkohlenstoff am 28.05.98 (durchgeführt von Fa. Plambeck ContraCon)
- Gesamtstaub- und Nitroaromatenbelastung in der Luft bei Bodenbewegung am 02.06.98 (durchgeführt von Fa. Umweltschutz Nord)

Der Standortkoordinator übernahm dabei die Koordination der erforderlichen Aktivitäten sowie das Behördenmanagement.

7.3.2 Genehmigung zum Wiedereinbau der sanierten Bodenmaterialien

Seitens der Bezirksregierung Braunschweig wurde folgende grundsätzliche Anforderung für die Zustimmung der Bodenmaterialauslagerung vorgegeben:

Zustimmung zur Bodenmaterialauslagerung, sofern keine Verschlechterung des Bodenausgangsmaterials nach der Behandlung hinsichtlich des Schadstoffgehaltes und des Eluatverhaltens festgestellt wird.

Dazu war die Vorlage der nachfolgend genannten Analysenergebnisse (s. Tab. 7.1) erforderlich. Das behandelte Bodenmaterial durfte also nur eingebaut werden, wenn eine Erhöhung der Belastung des Untergrundes an der Einbaustelle ausgeschlossen werden konnte.

Als Basis für die Entscheidung, in welchen Bereichen des Standortes "Werk Tanne" das behandelte Bodenmaterial entsprechend der Genehmigung nach BImSchG wieder eingebaut werden konnte, erfolgten der Vergleich und die Bewertung der Analysenwerte und der toxikologischen Parameter der Proben des Ausgangsmaterials und der Proben nach Abschluß der Behandlung.

Tab. 7.1: Parameterumfang der Analysen zur Vorlage bei der Genehmigungsbehörde

Chemisch/Physikalisch	Ökotoxikologisch
Sprengstofftypische Verbindungen	Leuchtbakterien-Hemmtest
Polare Nitroaromaten	Ames-Test
PAK (Feststoff/Eluat)	
Schwermetalle (Feststoff/Eluat)	
Nährstoffgehalte (Feststoff/Eluat)	
pH	

7.3.3 Arbeitsschutz

Für alle am Standort vorgesehenen Arbeiten wurde ein Rahmen-Arbeitsschutzkonzept erarbeitet, auf dessen Basis die Arbeits- und Sicherheitspläne sowie Betriebsanweisungen gemäß TRGS 555 "Betriebsanweisung und Unterweisung nach § 20 GefStoffV" durch die Verfahrenserprober erstellt wurden. Die Koordination der einzelnen Arbeitsschutzmaßnahmen vor Ort sowie das Überwachen der in den Betriebsanweisungen festgelegten Forderungen gemäß ZH 1/183 (BGR 128) erfolgte durch die IABG als bestellten Koordinator im Sinne ZH 1/183 (BGR 128), Ziffer 5.1.

Folgende Aktivitäten wurden im Hinblick auf einen übergeordneten Arbeitsschutz realisiert:

- Erarbeiten und Festlegen der Mindestanforderungen an den Arbeitsschutz in Abstimmung mit der Tiefbaugenossenschaft (TBG) sowie mit den Verfahrenserprobern
- Prüfung und Abstimmung der einzelnen Arbeits- und Sicherheitspläne sowie der jeweiligen Betriebsanweisungen
- Kontrolle/Überwachung der Einhaltung des Arbeitsschutzes
- Durchführen von Kontrollmessungen
- Koordination und Dokumentation des Arbeitsschutzes

7.4 Konzept für die wissenschaftliche Begleitung (KwB)

7.4.1 Einführung

Im Rahmen der wissenschaftlichen Begleitung der maßstabsgerechten Erprobung bestand die Aufgabe, den Sanierungserfolg der einzelnen Verfahren im Hinblick auf eine nachhaltige und umweltverträgliche Bodenbehandlung zu bewerten. Voraussetzung dafür war die Durchführung einer umfassenden externen und verfahrensbegleitenden Erfolgskontrolle, die sowohl chemische als auch bodenphysikalische, ökotoxikologische und humantoxikologische Parameter berücksichtigt. Gleichzeitig fanden die neuesten Erkenntnisse und Ergebnisse der Verbundvorhaben 4 ("Ökotoxikologische Testbatterien") und 5 ("Langzeit- und Remobilisierungsverhalten") Eingang. Ein weiteres Kriterium war die Aussage zur biologischen Sicherheit, zur Wirtschaftlichkeit und Effizienz der einzelnen Verfahren. Das Konzept wurde mit den Mitgliedern des Beirates (s. Kap. 7.4.2) abgestimmt. Folgende Grundlagen wurden im Konzept berücksichtigt:

- die dem Auftrag an die Industrieanlagen-Betriebsgesellschaft mbH zugrunde liegende Vorhabensbeschreibung für das FuE-Vorhaben "Maßstabsgerechte Erprobung biologischer Verfahren mit Erfolgskontrolle auf dem Standort 'Werk Tanne' bei Clausthal-Zellerfeld", Teilaufgabe 1 - Standortkoordination und wissenschaftliche Begleitung
- Das Bundes-Bodenschutzgesetz und die Bodenschutz- und Altlastenverordnung
- Materialien der Landesämter zur Altlastenbehandlung [4; 5]
- Praxisleitfaden "Systematische Untersuchung eines Rüstungsaltlastverdachtsstandortes" [3]
- Geltende Normen und Vorschriften

In Abbildung 7.5 ist der schematische Ablauf der Bearbeitungsphasen während der dynamischen Entwicklung des Konzeptes für die wissenschaftliche Begleitung dargestellt.

Zur Vorbereitung der Erprobung wurde das Ausgangsmaterial umfassend untersucht. Vergleichsuntersuchungen wurden zur Qualitätssicherung der Analysen und Tests durchgeführt und ausgewertet. Schließlich wurde das gewählte Parameterspektrum mit den zuständigen Behörden abgestimmt und das Untersuchungsprogramm erarbeitet.

Während der Behandlung der ersten Chargen wurde primär eine allseitige Prozeßerfassung gewährleistet. Auf der Basis der zweiten Chargen wurde der Behandlungserfolg geprüft bzw. festgestellt. Aus der Gegenüberstellung der Ergebnisse der ersten und der zweiten Mieten wurde das Untersuchungsprogramm kritisch bewertet. Letztendlich diente das optimierte Konzept bei den dritten Chargen zur Verifizierung der bisherigen Ergebnisse und um die Erfolgskontrolle mit einer abschließenden Schlußbewertung zu sichern.

Diese Vorgehensweise hat sich dahingehend bewährt, daß sie eine permanent flexible Bewertung, Auswertung und Umsetzung der gewonnenen Erkenntnisse aus der Verfahrenserprobung und der relevanten Ergebnisse aus den Verbundvorhaben 4 und 5 ermöglichte.

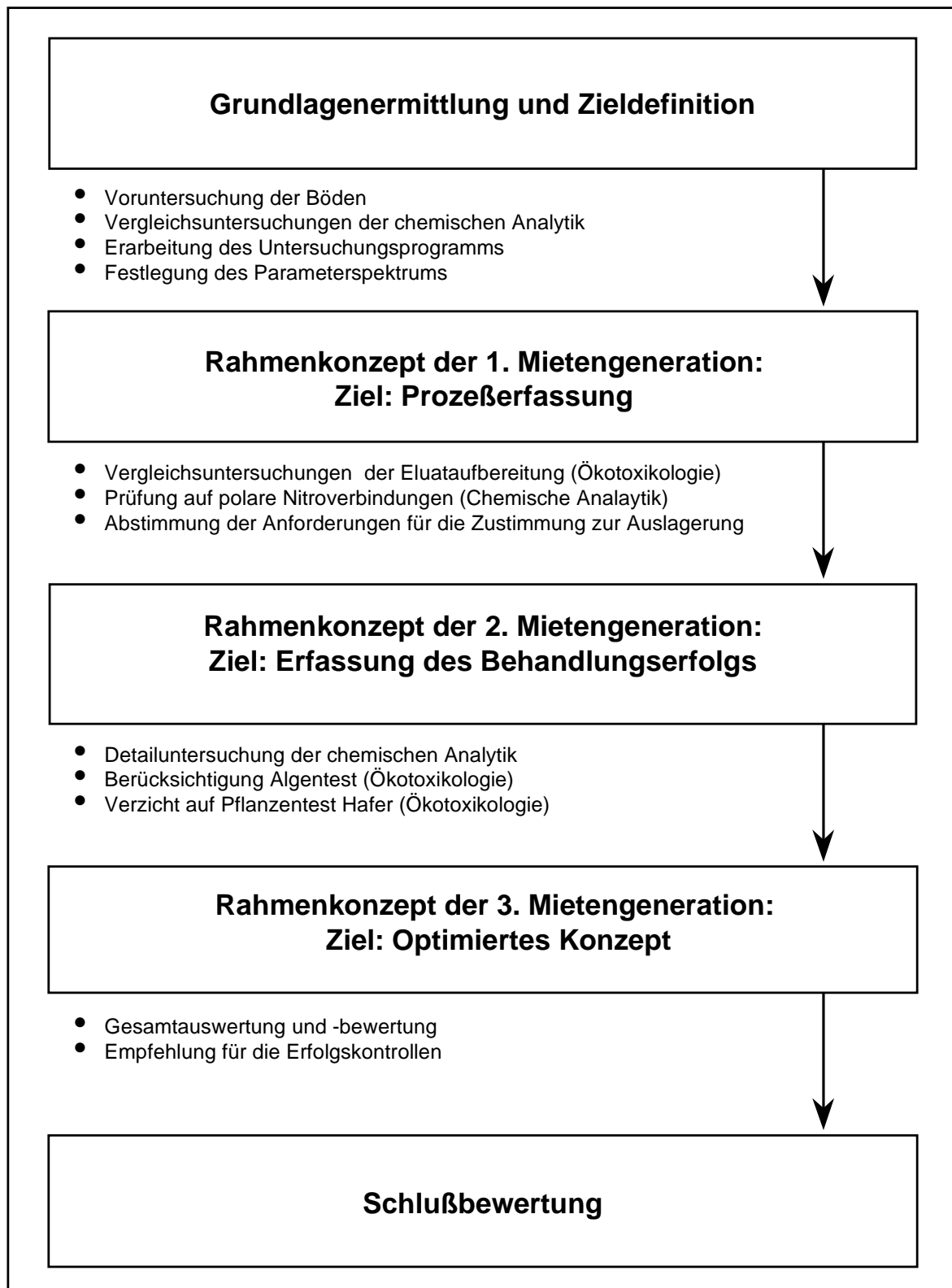


Abb. 7.5: Schematische Darstellung der Entwicklung des Konzeptes zur wissenschaftlichen Begleitung. Dargestellt sind Arbeitsschritte und Modifikationen.

7.4.2 Projektbeirat

Zur umfassenden gegenseitigen Information der Projektbeteiligten und der zuständigen Behörden sowie zur Koordination der verbundübergreifenden Arbeiten im Verbundvorhaben 6 wurde ein Projektbeirat als ein beratendes und projektbegleitendes Gremium vierteljährlich einberufen. Im Beirat waren folgende Funktionen und Institutionen vertreten:

- der Projektträger
- die Gesamtkoordination des BMBF-Forschungsverbundes (s. Kap. 9.1)
- die Koordinierungen der Verbundvorhaben 4 und 5 (s. Kap. 9.3 bzw. Kap. 9.4)
- die Standortkoordination (Koordination Verbundvorhaben 6 (s. auch Kap. 9.5))
- die Verfahrenserprober (s. Kap. 9.5.1, Kap. 9.5.2 u. Kap. 9.5.3)
- die Genehmigungsbehörden: Bezirksregierung Braunschweig und Landkreis Goslar
- der Standorteigentümer
- das Umweltbundesamt
- das Niedersächsische Landesamt für Ökologie
- die Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung
- die Tiefbau-Berufsgenossenschaft

7.4.3 Untersuchungen im Rahmen des wissenschaftlichen Begleitkonzeptes

Zur Gewährleistung einer wissenschaftlichen Erfolgskontrolle der Verfahrenserprobung waren Untersuchungen am Bodenmaterial **vor** (Ausgangszustand und unbelasteter Referenzzustand), **während** (verfahrensbegleitende Kontrolle) und **nach** der Bodenbehandlung (Endprodukt) vorgesehen. Dazu zählten bodenphysikalische, chemisch-analytische Untersuchungen und ökotoxikologische Tests. Humantoxikologische und Luft-Untersuchungen runden das Kontrollprogramm ab. Die Verwertbarkeit des Endproduktes beschreibende Parameter wie Proktordichte, Rolligkeit etc. waren nicht Gegenstand dieser Untersuchung.

Die Untersuchungen erfolgen nach der Abstimmung mit den Verfahrenserprobern und den Genehmigungsbehörden über die fachspezifischen Abläufe hinsichtlich

- der Beprobungszeiträume,
- der Probenmenge und -anzahl,
- des Probenahmeortes sowie
- des Transportes und der Lagerung der Proben.

Gleiches gilt für die Aufbereitung der Proben, den zu untersuchenden Parameterumfang und anzuwendende Analyseverfahren.

Gleichzeitig waren die aktuellen Forschungsergebnisse der parallel laufenden VV 4 (s. Kap. 9.3) und VV 5 (s. Kap. 9.4) einzubeziehen. Sämtliche Arbeitsschritte wurden sowohl gemäß geltenden Vorschriften als auch der im Verbundvorhaben verbindlich festgelegten Regelungen dokumentiert und nachgewiesen. Im Untersuchungsprogramm wurden während der Bearbeitungszeit des Verbundvorhabens bekannt gewordene relevante wissenschaftliche Ergebnisse Dritter berücksichtigt. Eine wesentliche Grundlage für die Bewertung der Verfahrenskennwerte war die Führung einer einheitlichen Dokumentation durch alle Verfahrenserprober, die von der Standortkoordination erstellt und überprüft wurde.

Mit der Durchführung der für die Erfolgskontrolle vorgesehenen chemisch-analytischen Untersuchungen ist das durch die Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM) sowie das Deutsche Akkreditierungssystem Prüfwesen (DAP) akkreditierte Labor der IABG beauftragt worden. Die Bestätigung der Qualifikation erhielt das Labor der IABG unter anderem durch die erfolgreiche Teilnahme an einem Methodenvergleich der Hessischen Landesanstalt für Umwelt zur Bestimmung von Nitroverbindungen und Aminen in Böden von Rüstungsaltslasten im Januar 1998.

Mit dem Pflanzenwachstumstest wurde das Institut für Landschaftsentwicklung an der TU Berlin beauftragt (vergl. auch Kap. 9.3.1). Den Regenwurmtest führte das Institut für Biologische Analytik und Consulting IBACON GmbH durch. Der Leuchtbakterienhemmtest und der AMES-Test wurden an das Institut für Umwelt- und Verfahrenstechnik der Gesellschaft für Forschung und Prüfung mbH (DMT) vergeben (vergl. auch Kap. 9.3.6). Das Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie hat eine Empfehlung für ein standardisiertes Verfahren zur Eluatherstellung für die ökotoxikologischen Untersuchungen erarbeitet (vergl. auch Kap. 9.3.5, Teil A)

Humantoxikologische Untersuchungen wurden durch das Arbeitsmedizinische Präventionszentrum der Forschungsgesellschaft für angewandte Systemsicherheit und Arbeitsmedizin e.V. (FSA) vorgenommen. In Ergänzung zu den arbeitsmedizinischen Untersuchungen erfolgte durch den Technischen Aufsichtsdienst der Tiefbau-Berufsgenossenschaft ein Air-Monitoring der Raumluft in den Versuchsanlagen.

Mit den Untersuchungen der bodenphysikalischen und -chemischen Kenngrößen wurde u.a. die TU Berlin beauftragt.

Parallel zur Erfolgskontrolle führten die Verfahrenserprober prozeßbegleitende chemische und ökotoxikologische Kontrolluntersuchungen durch.

7.4.3.1 Chemisch-analytische Untersuchungen

Die chemisch analytischen Untersuchungen (siehe Tab. 7.2) dienten der

- Charakterisierung des Ausgangsmaterials
- verfahrensbegleitenden Verfolgung des Schadstoffabbaus nach behördlich abgestimmter Parameterliste
- Kontrolle der behandelten Bodenmaterialien vor Auslagerung auf die Freifläche
- Charakterisierung des Endproduktes
- Bewertung der Erfolgskontrolle hinsichtlich der Abbauwirksamkeit eingesetzter Verfahren

Tab. 7.2: Untersuchungsprogramm Chemische Analytik

Analyse	Vorschrift
Schwermetalle	
Schwermetalle im Boden	im Königswasseraufschluß DIN ISO 11466 ¹
Chemische Parameter	
GC-MS-Screening	GC-MS-Analyse nach basischer und saurer DCM-Extraktion
PAK	16 PAK/EPA 610 E DIN ISO 13877 1995-06 (A) ¹
Sprengstofftypische Verbindungen²	nach EPA 8330, modifiziert IABG-HV 2 1996-10
Polare Nitroaromanten³	Institut f. Immunologie und Umwelthygiene der Philipps-Universität Marburg [1]

¹ je nach Extraktion

² gemäß Parameterfestlegung (siehe Tab. 7.3)

³ gemäß Parameterfestlegung (siehe Tab. 7.4)

Die konzeptionellen Überlegungen bezüglich der chemischen Analysen von sprengstofftypischen Verbindungen orientierten sich vorrangig am Ringversuch des Niedersächsischen Landesamtes für Ökologie (NLÖ), der 17 Sprengstoffderivate in Böden umfaßte. Ausgehend davon, daß die Analytik einerseits eine an den sanierungsrelevanten Parametern orientierte Erfolgskontrolle und andererseits einen Methodenabgleich der beteiligten Labore gewährleisten sollte, wurden die in der Tabelle 7.3 angegebene Parameterspektren I und II (PS I und PS II) in Abstimmung mit den Behörden festgelegt. Das Untersuchungsprogramm PS I war vorrangig für die Bodenproben aus dem Ausgangsmaterial für die Mieten sowie für ausgewählte Proben aus dem Endprodukt der Verfahrenserprobung vorgesehen. Die Hauptuntersuchungen auf Nitroaromaten und Nebenprodukte erfolgten mittels HPLC-DAD und mit Hilfe von GC-MS-Screening.

Zur Untermauerung des abgestimmten Untersuchungsumfanges sollte aus einigen dieser Proben ein GC-MS-Screening erstellt werden. Nach Ermittlung einer oder mehrerer Verbindungen im toxisch relevanten Konzentrationsbereich, die im festgelegten reduzierten Untersuchungsumfang (PS II) nicht enthalten sind, sollte die Entscheidung über ihre Aufnahme in das Untersuchungsprogramm im Projektbeirat getroffen werden.

Zur Durchführung der Vergleichsuntersuchung, der Messungen in einem Vor-Ort-Labor sowie der verfahrensbegleitenden Analysen wurde ein Untersuchungsumfang, der sich an Leitparametern orientiert (PS II), als ausreichend angesehen. Diese Parameter sind ohne wesentliche Trennprobleme quantitativ, mit ausreichender Genauigkeit im Labor mittels HPLC-DAD isokratisch analysierbar und können im Rahmen der vorgesehenen Analytik im Vor-Ort-Labor bei der Bereitstellung des Bodenmaterials bestimmt werden.

Tab. 7.3: Untersuchungsprogramm sprengstofftypische Verbindungen

Erfolgskontrolle (PS I) Charakterisierung der Ausgangsmaterialien und der Endprodukte	Vergleichsuntersuchung (PS II) Vor-Ort-Messung und verfahrensbegleitende Analytik
2 - Mononitrotoluol	2 - Mononitrotoluol
3 - Mononitrotoluol	3 - Mononitrotoluol
4 - Mononitrotoluol	4 - Mononitrotoluol
2,3 - Dinitrotoluol	
2,4 - Dinitrotoluol	2,4 - Dinitrotoluol
2,6 - Dinitrotoluol	2,6 - Dinitrotoluol
3,4 - Dinitrotoluol	
3,5 - Dinitrotoluol	
2,4,6 - Trinitrotoluol	2,4,6 - Trinitrotoluol
2,4,5 - Trinitrotoluol	
2,3,4 - Trinitrotoluol	
3,4,5 - Trinitrotoluol	
2,3,6 - Trinitrotoluol	
2 - Amino - 4,6 - Dinitrotoluol	2 - Amino - 4,6 - Dinitrotoluol
4 - Amino - 2,6 - Dinitrotoluol	4 - Amino - 2,6 - Dinitrotoluol
2 - Amino - 4 - Mononitrotoluol	
2 - Amino - 6 - Mononitrotoluol	
4 - Amino - 2 - Mononitrotoluol	
1,3 - Dinitrobenzol	1,3 - Dinitrobenzol
1,2 - Dinitrobenzol	
1,4 - Dinitrobenzol	
1,3,5 - Trinitrobenzol	1,3,5 - Trinitrobenzol
Hexogen	Hexogen

Polare aromatische Nitroverbindungen (s. Tab. 7.2) wurden kürzlich auf verschiedenen TNT-Produktionsstandorten nachgewiesen. Deshalb wurden einzelne Proben aus dem Ausgangsmaterial und den Mieten auf folgende Substanzen analysiert (Tab. 7.4):

Tab. 7.4: Untersuchungsprogramm polare Nitroaromaten

polare Nitroaromaten
4 - Amino - 2,6 - Dinitrobenzylalkohol
2,4,6 - Trinitrobenzylalkohol
2,4,6 - Trinitrobenzoesäure
2 - Amino - 4,6 - Dinitrobenzoesäure
4 - Amino - 2,6 - Dinitrobenzoesäure
3,5 - Dinitrophenol

Ihre Auswahl orientierte sich vornehmlich an aktuellen Forschungsergebnissen der Universität Marburg und des Fraunhofer Institutes für Toxikologie und Aerosolforschung [1; 2].

Darüber hinaus erfolgte die Bestimmung des Glühverlustes sowie der Hintergrundbelastung durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) und Schwermetalle in dem Ausgangsmaterial, nach der Behandlung vor Auslagerung der Miete und im Endprodukt.

7.4.3.2 Ökotoxikologische Tests

Ziel von Bodensanierungen im Sinne des BBodSchG ist eine dauerhafte Gefahrenabwehr. Der Sanierungserfolg muß deshalb durch Untersuchungen zur Nachhaltigkeit der Sanierung bestätigt werden, wenn es in die Umwelt ausgebracht werden oder es sogar als Substrat dienen soll. Da bisher bekannte Testmethoden nicht für die ökotoxikologische Bewertung von Bodenmaterialien bzw. kontaminierten Böden entwickelt wurden, bedarf Ihre Verwendbarkeit bei der Bodenbegutachtung einer eingehenden Prüfung.

Ökotoxikologische Tests dienen der:

- zusätzlichen Bewertung des Einflusses der Nitroaromaten-Kontamination und der Auswirkungen der erprobten Verfahren auf die Lebensraumfunktion und die Schadstoffrückhaltung in den untersuchten Böden vor und nach der Behandlung
- Kontrolle der Schadstoffrückhaltung im behandelten Bodenmaterialien vor Auslagerung auf die Freifläche (aquatische Tests)
- Erfassung des toxikologischen Einflusses nicht identifizierter und unbekannter Verbindungen (terrestrische Tests) im Endprodukt

Für den Einsatz ökotoxikologischer Verfahren wurden folgende Mindestvoraussetzungen definiert, die die Eignung dieser Testverfahren bestimmen:

- Die zu untersuchenden und zu reinigenden Bodenflächen sollten später als Lebensraum dienen
- Für jede Lebensraumfunktion (Mikroflora, Bodenfauna, Vegetation) war jeweils mindestens ein Test einzusetzen
- Der Test mußte für Ausgangsmaterial und Endprodukt geeignet sein
- Kontrollversuche müssen immer parallel durchgeführt werden

Um eine ökotoxikologische Bewertung des in den verschiedenen Verfahren am Standort "Werk Tanne" behandelten Bodenmaterials vornehmen zu können, wurden zur Untersuchung der Rückhaltevermögen, der Lebensraumfunktionen und der Genotoxizität geeignete Testverfahren für ein Mindestuntersuchungsprogramm mit dem Ziel der Validierung der großtechnischen Versuche ausgewählt. Die ausgewählten Testverfahren wurden für die Bewertung des ökotoxikologischen Potentials des kontaminierten Bodenmaterials (Ausgangsmaterial) und des Bodenmaterials nach Abschluß der Behandlung (Bodenmaterial vor Auslagerung bzw. Endprodukt) eingesetzt. Diese Auswahl läßt sich nicht verallgemeinern, da die biologischen Testverfahren zur Erfolgskontrolle von biologischen Bodenbehandlungen von der zukünftigen Nutzung der Böden und der jeweiligen Boden- und Schadstoffart bestimmt werden. Die in Tab. 7.5 aufgelisteten Tests kamen im Zuge der maßstabsgerechten Erprobung zum Einsatz (Für nähere Erläuterungen zu den Tests siehe Kap. 2.5.1, 4.2, 9.3, 9.3.1 - 9.3.8):

Tab. 7.5: Untersuchungsprogramm Ökotoxikologische Tests

Testsystem	Vorschrift
Aquatische Tests (Rückhaltevermögen)	
Leuchtbakterien-Hemmtest	DIN 38412 Teil 34
Zellvermehrungshemmtest (opt.)	DIN 38412 Teil 37
Terrestrische Tests (Lebensraumfunktion)	
Pflanzenwachstumshemmtest (akut)	ISO 11269-2
Kombinierter Atmungstest	ISO-Draft
Hemmung der potentiellen Ammoniumoxidationsaktivität	ISO/CD 15685 1999
Regenwurmtest (akut)	ISO 11268-1
Genotoxikologische Tests	
Ames-Test	DIN Entwurf 38415-4 1/1998

7.4.3.3 Bodenphysikalische und -chemische Untersuchungen

Grundlage für die ökotoxikologische Bewertung sanierter Bodenmaterialien war eine umfassende Charakterisierung des Materials anhand der chemisch-physikalischen Parameter (s. Tab. 7.6). Zusätzlich waren aber auch die Einflüsse des jeweiligen Sanierungsverfahrens zu berücksichtigen. Für die abschließende Interpretation der ökotoxikologischen Befunde mußte unterschieden werden in Verfahren, die die bodentypischen Eigenschaften des Materials nicht wesentlich ändern, und Verfahren, deren Endprodukt erheblich vom ursprünglichen Bodenmaterial abweicht (z. B. durch den Einfluß von Zuschlagstoffen).

Tab. 7.6: Untersuchungsprogramm physikalisch-chemische Parameter

Testparameter	Vorschrift
Organischer C-Gehalt	Nasse Veraschung, Lichterfelder Methode (Farbreaktion analog DIN 19684 Teil 2)
Trockenmasse	DIN ISO 11465 1996-12 (A)
Korngrößenverteilung	DIN 19683-2 und 3
pH-Wert	DIN ISO 10390 1997-03 (A)
max. Wasserhaltekapazität	ISO 14238 Annex A
Nährstoffgehalte	verschiedene

Diese Untersuchungen wurden zur physikalisch-chemischen Bewertung des Bodens der Auskofferungsbereiche vor Ort, der Ausgangsmaterialien und des Endproduktes durchgeführt. Die physikalisch-chemischen Charakteristika des Bodens waren für die Ergebnisbewertung zum Ende der Verfahrenserprobung auch hinsichtlich der Verwertung des behandelten Bodenmaterials von Bedeutung.

7.4.3.4 Humantoxikologische Untersuchungen und Raumlufuntersuchungen (Airmonitoring)

Des weiteren erfolgte im Rahmen der Erfolgskontrolle eine arbeitsmedizinische Betreuung zur Kontrolle der Einhaltung der Arbeitssicherheitsanforderungen (Humantoxikologische und Raumlufuntersuchungen (Airmonitoring)). Diese beinhaltete das in der Bauwirtschaft etablierte "Arbeitsmedizinische Untersuchungsprogramm auf Altlasten" und Untersuchungen zum Biological (Effekt) Monitoring (Tab. 7.7 und Tab. 7.8).

Tab. 7.7: Untersuchungsprogramm Arbeitsschutz

Untersuchung	Richtlinie
Air-Monitoring²	
Schadstoffgehalt in der Umgebungsluft¹	TA Luft 1986
Schadstoff-Gehalt in der Raumluf	Hauptverband der gewerbl. Berufsgenossenschaften 1997
Schadstoffbelastung am Arbeitsplatz	TBG 1993
Humantoxikologische Untersuchungen	
Urinmetabolite	TBG 1993
Hämoglobin-Addukte	TBG 1993
Biologische Sicherheit	
Luftgetragene Mikroorganismen	TRBA 1997, BIA-Arbeitsmappe 1997
Biologische Arbeitsstoffe	
Hygienisch relevanter Keimbesatz im Bodensubstrat-Gemisch	TRBA 1997

¹ (Immissionsschutz)

² gemäß Parameterfestlegung (siehe Tab. 7.8)

Die Untersuchungen umfaßten neben mikrobiologischen Parametern auch die klimatischen Parameter und erfolgten nach den Technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (8). Bestimmt wurden die luftgetragenen Mikroorganismen und der hygienisch relevante Keimbesatz im Boden-Substrat-Gemisch. Die vor Ort arbeitenden Beschäftigten der Verfahrenserprober und der IABG wurden auf freiwilliger Basis auf Urinmetabolite und Hämoglobin-

Addukte untersucht. Zur Kontrolle der Einhaltung von Grenzwerten wurden Raumlufmessungen zur Mononitrotoluolen-Bestimmung vor Beginn der Mietenansätze und während der Umsetzungsarbeiten durchgeführt.

Tab. 7.8: Untersuchungsprogramm Airmonitoring

Untersuchungsparameter Nitroaromaten	
2 - Mononitrotoluol	1 - Mononitrobenzol
3 - Mononitrotoluol	1,3 - Dinitrobenzol
4 - Mononitrotoluol	1,3,5 - Trinitrobenzol
2,4 - Dinitrotoluol	4 - Amino - 2,6 - Dinitrotoluol
2,6 - Dinitrotoluol	2 - Amino - 4,6 - Dinitrotoluol
2,4,6 - Trinitrotoluol	

7.5 Ergebnisse und Schlußfolgerungen

7.5.1 Chemische Analytik

Zum Bewerten der Abbauergebnisse in den Mieten wurden die Meßergebnisse der Verfahrenserprober als Vergleich zu den Messungen der Erfolgskontrolle herangezogen. Es konnte gezeigt werden, daß für die Schadstoffkonzentrationen sowohl in den Ausgangsmaterialien (siehe Abb. 7.6) als auch während des Abbauprozesses in den Mieten (Beispiel siehe Abb. 7.7) eine weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse vorliegt.

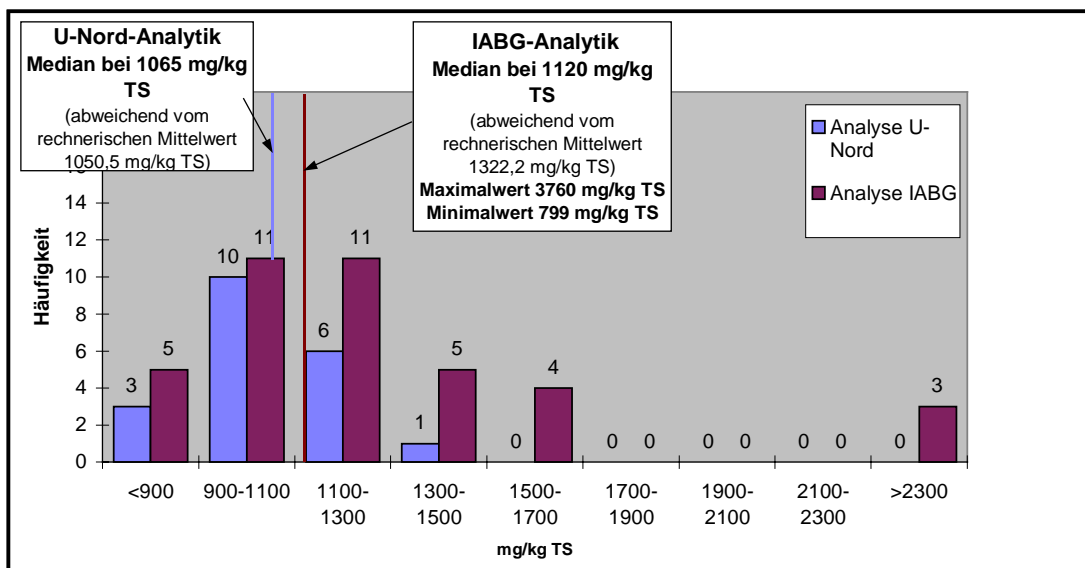


Abb. 7.6: Vergleich der Häufigkeitsverteilungen der TNT-Konzentrationen im Ausgangsmaterial am Beispiel der 1. Miete der Fa. Umweltschutz Nord.

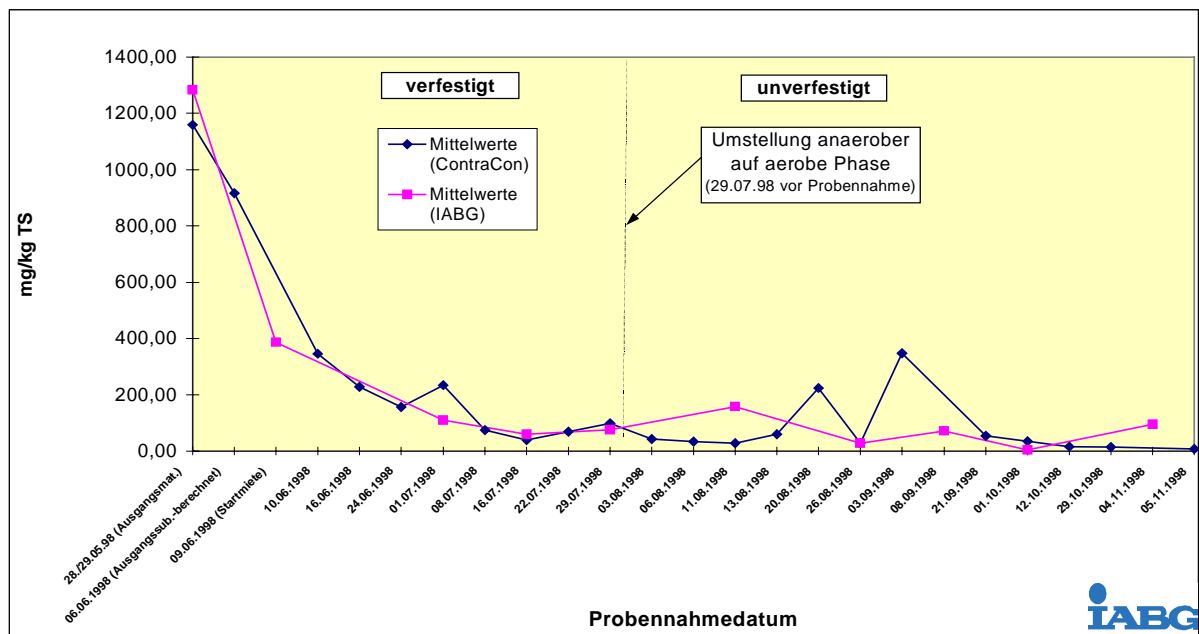


Abb. 7.7: Vergleich der Analysenwerte von TNT am Beispiel der 1. Miete von ContraCon

7.5.1.1 TNT und verwandte Nitroaromaten

Bei allen drei Verfahren konnte ein drastischer Rückgang der TNT-Gehalte im Sanierungsverlauf festgestellt werden. Tab. 7.9 zeigt die TNT-Konzentrationen in den Bodenmaterialien der drei Verfahren vor (**Ausgangsmaterial**) bzw. nach der jeweiligen biologischen Behandlung (**Material nach Auslagerung**) sowie 4 Wochen nach der Auslagerung (**Endprodukt**). Das Kompostierungsverfahren der Fa. Umweltschutz Nord und das dynamische Beet-/Mietenverfahren der Fa. Plambeck ContraCon konnten TNT unter die Nachweisgrenze abreichern. Das Pilz-Verfahren erreichte eine Abreicherungsleistung von 99 %. Die Metaboliten der ersten und zweiten Reduktionsstufe (ADNT bzw. DANT) von TNT gingen durch die Behandlungen ebenfalls zurück. Bei den Verfahren mit einem anaeroben Behandlungsschritt kam es zu Beginn durch die schnelle Reduktion großer Mengen TNT zu einer kurzfristigen Akkumulation von ADNT. Sämtliche anderen Verbindungen aus dem Untersuchungsprogramm der Nitroaromaten (s. Tab. 7.3) waren entweder nicht oder nur in geringem Maße vorhanden, spätestens im Endprodukt aber nicht mehr nachweisbar.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an behandeltem Bodenmaterial im Rahmen der Erfolgskontrolle zeigen, daß mit zunehmender Substrat- und Nährstoffzugabe der TNT-Abbau beschleunigt werden kann. Gleiches gilt, wenn die Intervalle zur Bodenmaterialhomogenisierung verdichtet werden. Letzteres erfordert aber einen höheren mechanischen Aufwand und spiegelt sich voraussichtlich in den Betriebskosten nieder. Durch höhere Substrat- und Nährstoffzugaben ergibt sich die Notwendigkeit einer längeren Lagerungsdauer der Bodenmaterialien, wie die nachfolgenden Ergebnisse zeigen. Insgesamt ist hier noch ein Ansatz für eine weitergehende Verfahrensoptimierung zu sehen.

Tab. 7.9: Feststoffgehalte von TNT und seinen biologischen Hauptmetaboliten im Bodenmaterial der 1. Mietengeneration

Prozeß	Ausgangsmaterial	Mat. v. Auslagerung	Endprodukt
TNT [mg/kg TS]			
Kompostierung¹	1322	0,1	n.n.
Dynamische Miete²	1284	0,2	n.n.
Pilzverfahren³	1637	51	17
2-Amino-4,6-Dinitrotoluol [mg/kg TS]			
Kompostierung	39,0	0,5	n.b.
Dynamische Miete	34,55	0,35	n.b.
Pilzverfahren	29,15	2,83	3,0
4-Amino-2,6-Dinitrotoluol [mg/kg TS]			
Kompostierung	62,25	1,25	n.b.
Dynamische Miete	60,98	0,36	n.b.
Pilzverfahren	39,4	20,17	13,8

¹ s. Kap. 7.2.2, ² s. Kap. 7.2.3, ³ s. Kap. 7.2.4
n.b.: nicht bestimmt; n.n.: nicht nachweisbar

7.5.1.2 Polare Nitroaromaten

Bisher wurden in Deutschland bei Erkundungen und Gefährdungsabschätzungen ehemaliger TNT-Produktionsstätten TNT-Folgeprodukte mit oxidiertem Methylgruppe nicht berücksichtigt. Kürzlich konnte jedoch in mehreren Untersuchungen gezeigt werden, daß diese Verbindungen sowohl im Grundwasser [2] als auch im Boden solcher Standorte nachweisbar sind [7; 8; 1]. Gefunden wurden 4-Amino-2,6-dinitrobenzoesäure, Trinitrobenzylalkohol und 4-Amino-2,6-dinitrobenzylalkohol sowie 3,5-Dinitroanilin (als Abbauprodukt von Trinitrobenzol). Eine Analytik dieser Stoffe wurde erst nach Beginn der Verfahrenserprobung möglich, so daß keine Bodenproben aus dem Haufwerk untersucht werden konnten. Stattdessen wurden Bodenproben aus dem Containerlager und zum Vergleich auch eine Rückstellprobe untersucht (s. Tab. 7.10). Da die genannten Substanzen in den Bodenmaterialien zum Teil nachgewiesen wurden, wurde überprüft, inwieweit diese Substanzen durch die biologische Behandlung eliminiert werden können.

Es zeigte sich, daß das Bodenmaterial mit deutlichen Mengen 2-ADNBS belastet war (Containerboden). Die Herkunft der polaren Nitroaromaten in den Böden auf ehemaligen Rüstungsbetrieben ist bisher nicht bekannt. Mikrobiologische und chemische Prozesse werden diskutiert, die die Methylgruppe von TNT oder ADNT oxidieren. Gezeigt werden konnte, daß TNT photochemisch zu TNBS umgesetzt wird (s. Kap 9.2.5). Untersuchungen zur Toxizität von TNBS und ADNBS wurden vom Umweltbundesamt, Außenstelle Bad Elster, durchgeführt.

Tab. 7.10: Feststoffgehalte von Nitrobenzoesäuren (polare Nitroaromaten) im Bodenmaterial der 2. Mietengeneration

Prozeß	Ausgangsmaterial	Mat. v. Auslagerung	Endprodukt
Trinitrobenzoesäure (TNBS) [mg/kg TS]			
Kompostierung	} 1,1 ¹ 0,3 ²	n.n.	n.b.
Dynamische Miete		n.n.	n.b.
Pilzverfahren		n.n.	n.n.
2-Amino-4,6-dinitrobenzoesäure (2-ADNBS) [mg/kg TS]			
Kompostierung	} 60,8 ¹ 25,4 ²	n.n.	n.b.
Dynamische Miete		n.n.	n.b.
Pilzverfahren		n.n.	0,61
4-Amino-2,6-dinitrobenzoesäure (4-ADNBS) [mg/kg TS]			
Kompostierung	} n.n. ¹ n.n. ²	n.n.	n.b.
Dynamische Miete		n.n.	n.b.
Pilzverfahren		n.n.	n.n.

¹ Containerboden, eine Messung für alle Verfahren

² Rückstellboden, eine Messung für alle Verfahren

n.b.: nicht bestimmt (Genehmigungserfordernis bereits erfüllt); n.n.: nicht nachweisbar

Zum Abschluß der Verfahren hatte sich herausgestellt, daß TNBS und ADNBS in allen Verfahrensvarianten unter die Nachweisgrenze abgebaut wurden. Da nur im Auslagerungsmaterial des Pilzverfahrens noch Nitroaromaten vorhanden waren (s. Tab. 7.9), wurde das Endprodukt dieses Verfahrens als einziges auf polare Nitroaromaten untersucht.

7.5.1.3 Schwermetalle

Weil der Boden geogen bedingt eine hohe Hintergrundbelastung an Schwermetallen (Zink: ca. 800 mg/kg TS; Blei: ca. 1000 mg/kg TS; Cadmium: ca. 4 mg/kg TS) aufweist, wurde auch eine mögliche Erhöhung der Schwermetall-Eluierbarkeit im biologisch behandelten Bodenmaterial untersucht. Diese wurde einerseits wegen der mechanischen Bodenbehandlung (Gefügebaubruch) und andererseits wegen der Milieuänderungen im Bodenmaterial durch die biologische Behandlung erwartet. In Tabelle 7.11 sind die Eluatwerte der im wesentlichen vorhandenen Schwermetalle, vor und nach der Bodenbehandlung, aufgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, daß keine generelle Aussage über eine Änderung des Eluatverhaltens gemacht werden kann. Tendenziell ist festzustellen, daß das Pilzverfahren den geringsten Einfluß auf die Eluierbarkeit der Schwermetalle ausübt. Eine mögliche Ursache ist, daß das Bodengefüge und die Milieubedingungen nur wenig verändert werden. Bemerkenswert ist,

daß die hohen Schwermetallkonzentrationen den biologischen Nitroaromatenabbau in allen Verfahrensvarianten nicht behindert haben.

Tab. 7.11: Eluatwerte von Schwermetallen des Bodenmaterials der 2. Mietengeneration (Werte von den Verfahrenserprobern ermittelt).

Prozeß	Ausgangsmaterial	Mat. v. Auslagerung	Endprodukt	
Zink [$\mu\text{g/l}$]				
Kompostierung	}	< 20	n.b.	
Dynamische Miete		140 ¹	175	n.b.
Pilzverfahren			62	n.b.
Blei [$\mu\text{g/l}$]				
Kompostierung	}	< 500	n.b.	
Dynamische Miete		120 ¹	96/73 ²	n.b.
Pilzverfahren			99	n.b.
Cadmium [$\mu\text{g/l}$]				
Kompostierung	}	< 50	n.b.	
Dynamische Miete		<4,5 ¹	4	n.b.
Pilzverfahren			0,6	n.b.

¹ Containerboden

² Beet/Miete

7.5.1.4 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

Neben Sprengstoffen und Schwermetallen ist der Boden des ehemalige Rüstungswerkes mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) belastet. Untersucht wurde die Frage, welchen Einfluß die biologischen Sanierungsverfahren auf die kaum bioverfügbare PAK-Kontamination haben (Grundlagen zum biologischen Abbau von PAK: s. Kap. 2.1.2). Die Ergebnisse sind in Tabelle 7.12 dargestellt.

Die biologischen Sanierungsverfahren beeinflussten die Gehalte an PAK in den Bodenmaterialien nur wenig. Die hier eingesetzten biologischen Verfahrensvarianten werden auch bei der Sanierung PAK-kontaminierter Böden angewendet, sofern nur niedrig kondensierte PAK vorliegen (vergl. Kap. 3.1.4.1). Allerdings müssen die Verfahren dann auch für diese Schadstoffgruppe optimiert sein.

Tab. 7.12: Feststoffgehalte von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe im Bodenmaterial der 1. Mietengeneration (16 EPA-PAK)

Prozeß	Ausgangsmaterial	Mat. v. Auslagerung	Endprodukt
EPA-PAK [mg/kg TS]			
Kompostierung	57,0	32,6	n.b.
Dynamische Miete	52,9	45,3	n.b.
Pilzverfahren	31,5	28,0	n.b.

n.b.: nicht bestimmt

7.5.2 Ökotoxikologische Tests

Für die Genehmigung des Wiedereinbaus war der Nachweis zu erbringen, daß sich das Eluat des sanierten Bodenmaterials in ökotoxikologischer Hinsicht nicht verschlechtert hat. Zur Überprüfung der Bodenrückhaltefunktion wurden der Leuchtbakterien-Hemmtest und der AMES-Test gefordert (s. Kap. 7.3.2). In der Tabelle 7.13 sind die Ergebnisse für alle drei Verfahren aus unterschiedlichen Mietengenerationen dargestellt.

Tab. 7.13: Ergebnisse der aquatischen Tests der Bodeneluat unterschiedlicher Mietengenerationen

Prozeß	Ausgangsmaterial	Mat. v. Auslagerung	Endprodukt
Leuchtbakterien-Hemmtest [G_L]			
Kompostierung	190	550	2
Dynamische Miete	318	8	4
Pilzverfahren	190	20	2
Ames-Test [G_{EA}]			
Kompostierung	12	3	n.b.
Dynamische Miete	12	3	n.b.
Pilzverfahren	12	3	n.b.

Ein G_L -Wert ≤ 4 gilt als nicht toxisch

Ein G_{EA} -Wert ≤ 3 gilt als nicht toxisch

n.b.: nicht bestimmt

Die G-Werte geben die Verdünnungsstufe an, bei der erstmals ein toxischer/mutagener Effekt auftritt. Je höher der G-Wert, desto toxischer/mutagener ist das Eluat (Zur Definition der G-Werte: s. Kap. 9.3.6, Abschnitt 4.2 und 4.3).

Durch die Sanierung ging die Toxizität der Bodenmaterialien bei allen drei Verfahren bis in unbedenkliche Bereiche zurück. Auffällig war indes die vorübergehend gestiegene Toxizität im Bodeneluat des Ausgangsmaterials der Kompostierung. Hierbei handelte es sich aber um einen verfahrensbedingten Effekt, der durch hohe Nährsalzkonzentrationen verursacht wurde; insbesondere die Stickstoffgehalte waren kurzzeitig nach der Behandlung im Eluat erhöht (siehe Tab. 7.14). Im Endprodukt, also nach einer Lagerung von 4 Wochen, war der Effekt bereits wieder abgeklungen. Ähnliche Phänomene sind auch bei normalen Kompostmieten zu beobachten. Das genotoxische Potential ist bereits durch die TNT-Abreicherung so weit zurückgegangen, daß auf eine weitere Testung des Endproduktes verzichtet werden konnte.

Ein wesentlicher Einfluß der hohen Schwermetallkonzentrationen und der PAK-Gehalte (s.o.) auf die Toxizität im Bodenmaterial konnte nicht nachgewiesen werden. Weitere ökotoxikologische Tests, vor allem zur Lebensraumfunktion wurden durch die Projekte des Verbundvorhabens 4 "Ökotoxikologische Testbatterien" am Bodenmaterial der ersten Mietengeneration des Kompostierungsverfahrens durchgeführt. Die entsprechenden Bezeichnungen im Verbundvorhaben 4 für dieses Bodenmaterial sind (s. Kap. 9.3):

CTNT04a/b: TNT-unbelasteter Kontrollboden vom Standort, der nach dem gleichen Sanierungsverfahren behandelt wurde (Technikumsmaßstab der Kompostierung)

CTNT4a/b: 1. Mietengeneration (Kompostierungsverfahren); a = Ausgangsmaterial, b = Material vor Auslagerung).

Die ausführlichen Ergebnisse finden sich in den Kapiteln 9.3.1 bis 9.3.7.

7.5.3 Chemisch-physikalische Bodenuntersuchungen

Für die Genehmigung zum Wiedereinbau der behandelten Bodenmaterialien auf dem Werks Gelände waren auch die Eluatwerte der düngewirksamen Stoffe von Bedeutung, da das Gelände in einem Vorranggebiet für die Wassergewinnung liegt. In Tab. 7.14 sind die Eluatwerte für Nitrat, Nitrit und Ammonium aufgeführt.

Das Pilzverfahren erhöhte die Eluatwerte für Nährstoffe im Boden nicht, während diese sowohl beim Kompostierungsverfahren als auch beim dynamischen Beet-/Mietenverfahren erhöht waren. Diese beeinflussten wahrscheinlich auch den Leuchtbakterientest (s. Tab. 7.13). Weitere chemisch-physikalische Untersuchungen waren für die Genehmigung der Wiederauslagerung nicht nötig. Eine komplette Auflistung der Werte findet sich in Kap 9.3, Tab. 4.

7.5.4 Arbeitsschutz

Die im Rahmen des Arbeitsschutzes geforderten Untersuchungen (s. Tab. 7.7) sind durchgeführt worden. Weder die Messungen zum Air-Monitoring (Belastungen durch staubgebundene sowie flüchtige Schadstoffe am Arbeitsplatz sowie in der Umgebung der Anlage), noch die humantoxikologischen Untersuchungen an den auf dem Standort tätigen Mitarbeitern haben Schadstoffe nachweisen können. Die Untersuchungen zur biologischen Sicher-

heit (luftgetragene Mikroorganismen) und zu den biologischen Arbeitsstoffen (hygienisch relevanter Keimbefall im Bodensubstrat-Gemisch) haben keine erhöhten Belastungen gezeigt.

Tab. 7.14: Eluatwerte vom Nährsalzgehalt unmittelbar nach Abschluß der biologischen Bodenmaterialbehandlung

Prozeß	Ausgangsmaterial	Mat. v. Auslagerung	Endprodukt
Ammonium [mg/l]			
Kompostierung	} < 0,5	< 1	n.b.
Dynamische Miete		11,6	n.b.
Pilzverfahren		0,7	n.b.
Nitrat [mg/l]			
Kompostierung	} 8	47,4	n.b.
Dynamische Miete		19,5 ²	n.b.
Pilzverfahren		< 0,2	n.b.
Nitrit [mg/l]			
Kompostierung	} 0,1	1,24	n.b.
Dynamische Miete		0,06	n.b.
Pilzverfahren		< 0,01	n.b.

n.b.: nicht bestimmt

7.5.5 Diskussion der Ergebnisse

Eine Reihe von Verfahrensansätzen zur biologischen Behandlung TNT-kontaminierter Böden wurden in den vergangenen Jahren entwickelt. Vergleichende Untersuchungen zur technischen Umsetzung und Erprobung biologischer *on site* Verfahren mit laufender und abschließender Erfolgskontrolle wurden bisher aber nicht durchgeführt. Nunmehr wurden erstmalig biologische Sanierungen von Bodenmaterialien, die belastet waren mit dem Sprengstoff TNT sowie dessen Vor-, Neben- und Abbauprodukte, **vergleichend maßstabsgerecht erprobt**.

Dieses Vorgehen wurde auch von der zuständigen Behörde, der Bezirksregierung Braunschweig, begrüßt, weil die weitgehend parallele Erprobung von drei unterschiedlichen Verfahren mit einer gemeinsamen wissenschaftlichen Begleitung - nicht zuletzt durch die Fördermittel des BMBF - Möglichkeiten eröffnet hat, die im Regelfall schon aus finanziellen Gründen nicht denkbar sind [6]. Deshalb hat die Behörde für den Wiedereinbau die Auflage des Verschlechterungsverbot gefordert und sich damit am Bundesbodenschutzgesetz orientiert, das in §13(5) den Wiedereinbau entnommenen Bodenmaterials regelt (s. Kap. 5.5).

Voraussetzung für eine (vergleichende) Erfolgskontrolle war die Erstellung eines **wissenschaftlichen Begleitkonzeptes**. Dazu waren nicht nur die umfassende Beschreibung des Prozeßverlaufes, sondern auch die Formulierung der Kriterien zur Bewertung des Sanierungserfolges erforderlich. Das Ziel war die Genehmigung des Wiedereinbaus des sanierten Bodenmaterials am Standort. Eine solche hatte es in Vergangenheit nicht gegeben: Sämtliche Pilotversuche zur biologischen Sanierung TNT-kontaminierter Böden endeten, trotz guter Ergebnisse, aber in Ermangelung von Bewertungskriterien, auf der Deponie.

Das wissenschaftliche Begleitkonzept war dynamisch und transparent anzulegen. Ausgehend von einem sehr breit ausgerichteten Untersuchungsprogramm sollten die relevanten Parameter identifiziert werden, die zur **Darstellung der Abbauprozesse** notwendig sind. Jedoch beschreiben die mit vertretbarem Aufwand bestimmbaren Parameter nur die unmittelbaren Effekte der biologischen Behandlung: Die Nitroaromaten verschwinden und die akute Toxizität im Eluat nimmt ab.

Die Genehmigungsbehörde Braunschweig orientierte sich in ihrer Parameterliste (s. Tab. 7.1) an diesem Machbaren, obwohl in der Vergangenheit bei vergleichbaren (Pilot-)Sanierungen genau diese Liste nicht ausreichend war. Sie läßt nämlich keine Bilanzierung der Prozesse zu und damit kann sie die Nachhaltigkeit der biologischen Sanierungen nicht belegen. Die Genehmigungsbehörde konnte sich nur deshalb an dieser Liste orientieren, weil auf der Grundlagenseite der Forschungsverbund "Biologische Verfahren zur Bodensanierung" diese Nachhaltigkeit am Beispiel der Verfahren der maßstabsgerechten Erprobung mit hohem wissenschaftlichen Aufwand belegte.

Die Bodenmaterialien wurden in **ökotoxikologischen Testreihen** mit Akut- und Langzeittests charakterisiert (Kap. 9.3), die **Bildung gebundener Rückstände aus TNT** wurde verfahrensabhängig bilanziert und deren Langzeitverhalten (Remobilisierbarkeit, Toxizität) untersucht (Kap. 9.4). Die **Struktur der gebundenen Rückstände** wurde ebenfalls verfahrensabhängig mit Isotopenmarkierungen aufgeklärt und deren Änderungen in Langzeittests untersucht. Durch Verknüpfung all dieser Erkenntnisse wurde deutlich, daß der Rückgang von TNT und Toxizität nicht auf einer einfachen Maskierung von Schadstoffen beruht, sondern eine nachhaltige Rückführung seiner Bestandteile in die globalen Stoffkreisläufe bedeutet.

7.5.5.1 Genehmigung der Wiederauslagerung

Das von den drei Verfahrenserprobern sanierte Bodenmaterial konnte am Standort "Werk Tanne" mit behördlicher Genehmigung wieder eingebaut werden. Als problematisch hat sich einzig und allein der Nährstoffgehalt in zwei der drei Verfahren während der Nachreifephase der Bodenmaterialien herausgestellt. Die Behörde ist in Bezug auf düngewirksame Stoffe relativ sensibel, weil das Werksgelände von Schutzzonen für die Trinkwassergewinnung umgeben ist und damit der wasserrechtlich begründete Besorgnisgrundsatz anzuwenden ist:

"Diese Zustimmung konnte für alle Chargen erteilt werden, wenn auch die Anforderungen an die Belastungen wegen der z.T. in erheblichen Mengen verfahrensbedingt verbliebener düngewirksamer Stoffe nicht ganz erfüllt werden konnten.

Die Zustimmungen zur Ausbringung wurden nur deshalb erteilt, weil

- *die Gesamtschadstoff-Frachten im Verhältnis zur positiven Bilanz der sprengstofftypischen Verbindungen nicht so erheblich erschienen,*

- mit den Ergebnissen der ökotoxikologischen Untersuchungen eine erhebliche Verringerung des toxischen bzw. gentoxischen Potentials nachgewiesen wurde, und weil
- die Gesamtmasse des behandelten Materials nicht als relevant erachtet wurde im Verhältnis zur Gesamtkontamination des Werksgebietes." [6]

7.5.5.2 Ergebnisse der Verfahrenserprobung

Die Verfahren unterscheiden sich im wesentlichen in Art und Aufwand der Bodenmaterialaufbereitung (Homogenisierung und Substratzugabe) und der damit erreichbaren Reduzierung der Behandlungsdauer der Bodenmieten. Es konnte gezeigt werden, daß bei **höheren Substrat- und Nährstoffzugaben** auch eine schnellere Umwandlung des TNT im Bodenmaterial erfolgt. Die höheren Substratzugaben erfordern nach Abschluss der Behandlung jedoch eine längere Nachreifedauer, bis das behandelte Bodenmaterial zur Auslagerung freigegeben werden kann.

Alle drei Erprober haben zeigen können, daß ihre biologischen Prozesse zur Sanierung TNT-kontaminierter Böden grundsätzlich geeignet und die **Verfahren technisch machbar** sind. Weder relativ hohe Anfangsbelastungen von über 1000 mg/kg TS noch Co-Kontaminationen wie Blei oder PAK behindern die biologischen Prozesse. Aus Sicht der wissenschaftlichen Begleitung bestehen ungeachtet der bereits sehr positiven Abbauergebnisse für alle drei Verfahren noch weitere Optimierungsmöglichkeiten hinsichtlich Substrat- und Nährstoffzugabe und einer energieeffizienten Homogenisierung des Bodenmaterials.

Ziel dieser **Optimierung** ist es, mit geringen Substrat- und Nährstoffzugaben sowie möglichst niedrig gehaltenem Homogenisierungsaufwand eine weitestgehende TNT-Umwandlung und Einbindung der Umwandlungsprodukte in die Huminmatrix des Bodens bei gleichzeitig geringerer Zwischenlagerungsdauer der behandelten Bodenmaterialien zu erreichen. "Weitestgehend" heißt hier nicht unbedingt vollständig, wenn das nur auf Kosten hoher Substrat- und Zuschlagstoff-Mengen und energieaufwendigen Bodenbearbeitungszyklen geht.

Ziel der biologischen Bodensanierung kann es nicht sein, ein Bodenmaterial zu erzeugen, das als frei von allen Belastungen gilt. Das schließt schon der Vorsorgegedanke aus, nach dem saniertes Bodenmaterial grundsätzlich nicht in die freie Verwertung gelangen sollte. In diesem speziellen Fall wird das schon durch die Schwermetall-Gehalte verhindert. Ziel muß es vielmehr sein, die **Funktionen des Bodens wiederherzustellen**.

7.5.5.3 Ergebnisse der Erfolgskontrolle

Die positiven Abbauergebnisse der Verfahrenserprober werden durch die Untersuchungen der Erfolgskontrolle bestätigt. Damit sind die Ergebnisse der analytischen Begleitung des Prozeßverlaufs von den Verfahrenserprobern und der IABG vergleichbar. Zur Bewertung der Prozesse reichen Messungen des Ausgangsmaterials, des behandelten Bodenmaterials und des Endproduktes aus.

Das Parameterspektrum in der **Nitroaromaten-Analytik** kann eingegrenzt werden. Für die Verfolgung der biologischen Behandlung reichen bei den drei untersuchten Verfahren 2,4,6 TNT und die Metabolite der ersten Abbaustufe (Amionodinitroaromaten) als Leitparameter

aus. TNBS und DNABS waren als einzige polare Verbindungen im Ausgangsmaterial vorhanden und sind nach der biologischen Behandlung in der Miete nicht mehr nachweisbar.

Das entwickelte und erprobte Konzept kann als Grundlage für die **wissenschaftliche Begleitung** bei anderen biologischen Verfahren sowie an anderen Standorten unter Berücksichtigung des entsprechenden Schadstoffspektrums und der bodenphysikalischen Charakteristika herangezogen werden. Mit dem Ziel einer Standardisierung des wissenschaftlichen Begleitprogramms für die biologischen Sanierungsverfahren, wird auch die Möglichkeit der behördlichen Zertifizierung von biologischen Verfahren in Betracht gezogen. Die "zertifizierten" Verfahren können dann bei vergleichbaren Böden und ermitteltem Schadstoffspektrum ohne wissenschaftliche Begleitung bzw. mit einer "gekürzten" Begleitung kosteneffektiv zur Bewertung des Behandlungserfolges eingesetzt werden.

Mit dieser Erfolgskontrolle ist es erstmalig gelungen, die **Nachhaltigkeit** einer biologischen Bodensanierung nachzuweisen, die nicht auf einer Schadstoffmineralisierung, sondern auf einer Schadstoffumwandlung mit anschließend irreversibler Einbindung der Transformationsprodukte in den Boden beruht.

7.6 Literatur

1. **Bruns-Nagel, D., T.C Schmidt, O Drzyzga., E. von Löw., K. Steinbach.** 1999. Identification of oxidized TNT metabolites in soil samples of a former ammunition plant. Environ. Sci. Pollut. Res. **6**:7 – 10.
2. **Godejohann, A., K. Preiss, K.-M. Levsen, C. Wollin, K. Mügge.** 1998. Determination of polar organic pollutants in aqueous samples of former ammunition sites in Lower Saxony by means of HPLC/Photodiode Array Detection (HPLC/PDA) and Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (¹H-NMR). Acta hydrochim. hydrobiol. **26(6)**:330-337.
3. **Köppler, J., Thieme, J., Fengler, S., Nießen, R., Dr. Sohr, J.** 1999. Systematische Untersuchung eines Rüstungsalzlastverdachtsstandort. Ein Praxisleitfaden. Umweltbundesamt, UBA-Texte, 37/99.
4. **Materialien zur Altlastenbearbeitung.** Land Brandenburg, Band 4, 8, 1998.
5. **Materialien zur Altlastenbehandlung.** Probennahme bei der Technischen Erkundung von Altlasten, Freistaat Sachsen, Landesamt für Umwelt und Geologie, 3/1998.
6. **Rischmüller, U.** 2000. Bewertung der Ergebnisse des Verbundvorhabens 6: "Maßstabsgerechte Erprobung biologischer Verfahren mit Erfolgskontrolle auf dem Standort 'Werk Tanne' bei Clausthal-Zellerfeld, Oberharz" aus Sicht der Genehmigungsbehörde. ConSoil 2000, Satellitenseminar Rüstungsalzlasten, Kurzfassungen.
7. **Schmidt T. C., K. Steinbach, , E. v. Löw, G. Stork.** 1998. Highly polar metabolites of nitroaromatic compounds in ammunition waste water. Chemosphere **37**:1079 – 1091.
8. **Steinbach, K.** 1997. Identifizierung polarer TNT-Metabolite und Synthese-Nebenprodukte mit HPLC-MS, Sanierung von Altlasten - Technologie für die Umwelt-Fachtagung Grundwasser-sanierung (Rüstungsalzlasten) 07.-08.10.1997 in Munster.

8 Verzeichnisse und Informationsquellen

Jochen Michels, Thomas Track

8.1 Autorenverzeichnis (Kapitel 1-8)

Autor (mit email)	Adresse	Kapitel
Dipl.-Ing. André Dahn	IABG GmbH Niederlassung Berlin Straße der Pariser Kommune 38 10243 Berlin	4, 7
Dr. Annette Eschenbach	GKSS-Forschungszentrum Geesthacht GmbH Abteilung TPT Max-Planck-Str. 21502 Geesthacht	2.2, 2.5.2, 4.3
Dipl. Geoök. Susanne Fleischmann	Technische Universität Berlin Inst. f. Landschaftsentwicklung Lentzeallee 76 14195 Berlin	2.5, 4.2
Dr. Helmut Fouquet	Straße der Pariser Kommune 29-31 10243 Berlin	5
Prof. Dr.-Ing. Volker Franzius	Umweltbundesamt FG II 3 Bismarckplatz 1 14393 Berlin	Vorwort
Dipl.-Ing. Ulrich Gehrke	DECHEMA e.V. Theodor-Heuss-Allee 25 60486 Frankfurt am Main	6
Dr. Annette Geller	Hans-Löscher-Straße 46 39108 Magdeburg	2, 2.1, 2.1.1-2.1.8, 2.4
Dr. habil. Matthias Kästner	UFZ Leipzig-Halle GmbH Sektion Sanierungsforschung Permoser Straße 15 04318 Leipzig	2.3
Dipl. Chem. Jelena Karutz	IABG GmbH Niederlassung Berlin Straße der Pariser Kommune 38 10243 Berlin	4.7

Autor	Adresse	Kapitel
Prof. Dr. Bernd Mahro	Hochschule Bremen Fachbereich 3 Neustadtswall 30 28199 Bremen	2.2, 2.5.2, 4.3
Dipl. Ing. Heiko Mescher	Hochschule Bremen Fachbereich 3 Neustadtswall 30 28199 Bremen	2.2, 2.5.2 4.3
Dr. Jochen Michels	DECHEMA e.V. Theodor-Heuss-Allee 25 60486 Frankfurt am Main	1, 2.1.9, 6, 7, 8, Realisierung
Dipl. Geol. Kai Steffens	Probiotec GMBH Schilling Straße 333 52355 Düren	3.4
Dipl.-Ing. Jürgen Thieme	IABG GmbH Niederlassung Berlin Straße der Pariser Kommune 38 10243 Berlin	4.4
Dr. Thomas Track	DECHEMA e.V. Theodor-Heuss-Allee 25 60486 Frankfurt am Main	6, 8
Dr. Jürgen Warrelmann	Zentrum f. Umweltforschung und Umwelt- technologie FSP Nachhaltige Sanierung Leobener Straße 28359 Bremen	3
Dr. Reinhard Wienberg	Umwelttechnisches Labor und Büro Dr. R. Wienberg Gotenstr. 4 20097 Hamburg	2.2, 2.5.2
Dipl. Biol. Eva Wortmann	Probiotec GMBH Schilling Straße 333 52355 Düren	3.4

8.2 Glossar, Abkürzungen

Acetogene Bakterien. → Obligat anaerobe Bakterien, die Essigsäure auf zwei Wegen bilden. → Chemolithotroph mit H₂ und CO₂ und → chemoorganotroph aus Zuckern.

Adaptation. Anpassung von Mikroorganismen, entweder als individueller Stamm, oder als Konsortium, an bestimmte Funktionen einer Umgebung (z.B. Nährstoffangebot). Häufig dauert es eine gewisse Zeit (lag-phase) bis sich die Adaption etabliert hat.

adult. Geschlechtsreif.

aerob. Anwesenheit von Sauerstoff.

Akkumulation. Anreicherung von Stoffen in Luft, Boden, Wasser und Lebewesen.

Akut-Test. Test auf die Toxizität einer Substanz/eines Bodenmaterials bei kurz andauernder Exposition, Testparameter meist Tod des Organismus. → Ökotoxikologische Testverfahren.

Aliquot. Repräsentativer Teil einer Probe.

Altablagerungen. Sind stillgelegte Abfallbeseitigungsanlagen sowie sonstige Grundstücke, auf denen Abfälle behandelt, gelagert oder abgelagert worden sind.

Altlasten. Sind → Altablagerungen und → Altstandorte, durch die schädliche → Bodenveränderungen oder sonstige Gefahren für den einzelnen oder die Allgemeinheit hervorgerufen werden.

Altlastverdächtige Flächen. Sind → Altablagerungen und → Altstandorte, bei denen der Verdacht schädlicher → Bodenveränderungen oder sonstiger Gefahren für den einzelnen oder die Allgemeinheit besteht.

Altstandorte. Grundstücke stillgelegter Anlagen und sonstige Grundstücke, auf denen mit umweltgefährdenden Stoffen umgegangen worden ist, ausgenommen Anlagen, deren Stilllegung einer Genehmigung nach dem Atomgesetz bedarf.

anaerob. Abwesenheit von Sauerstoff.

Anaerobe Atmung. Prozesse, die der Energiebereitstellung dienen, bei denen aufgrund des

Mangels an Sauerstoff alternative anorganische Elektronenakzeptoren genutzt werden. Diese entstammen nicht dem Metabolismus des Ausgangssubstrates. Nitrat (→ Denitrifikation) bzw. Sulfat (→ Sulfat reduzierende Bakterien) können alternativ zur Endoxidation genutzt werden. Carbonat wird von → acetogenen und → methanogenen Bakterien genutzt.

anthropogen. Durch menschliche Einwirkungen verursachte Veränderungen.

Aquatische Tests. → Ökotoxikologische Testverfahren.

Aquifer. Eine durchlässige, wasserführende Formation mit erschließbaren Wassermengen.

Artefaktbildung. Veränderung der Bindungsstruktur z.B. zwischen Schadstoff (-derivaten) und der organischen Bodensubstanz durch Anwendung rigoroser Extraktionsverfahren.

Ausbreitungspfad. → Wirkungspfad. Weg der Schadstoffe aus der Altlast in die Umweltmedien Wasser, Boden und Luft. Unterschieden wird zwischen der Ausbreitung über direkten Kontakt und der Ausbreitung, die an Transportmittel gebunden ist (Wasser, Luft).

Auxiliarsubstrat. Ein Substrat, das zum Wachstum und zum Erhalt des Stoffwechsels genutzt wird.

Belastung. → Verunreinigung.

Beprobungsplan. An den Einzelfall angepasster Plan zur räumlichen Lage der Beprobungspunkte bei Untersuchung der altlastverdächtigen Fläche in den zu untersuchenden Medien.

Bestimmungsgrenze eines Analyseverfahrens. Kleinste Stoffmenge, die mit einer geforderten statistischen Sicherheit (meist 95 %) bei einmaliger Analyse quantitativ bestimmt werden kann.

Betanal(+). Phenmedipham: 3-[Methoxycarbonyl-aminophenyl]-N-[3'-methyl-phenyl]-carbammat.

Beurteilung, Fachliche. Einschätzung oder Abschätzung der im Einzelfall eingetretenen Einwirkungen auf Schutzgüter, der bestehenden Risiken sowie eine Aufklärung der Ursachen.

Aufgabe der fachlichen Beurteilung ist – nach vorangegangener Plausibilitätsprüfung der Meßergebnisse – eine Einschätzung oder Abschätzung der im einzelnen Falle eingetretenen Einwirkungen auf Schutzgüter und der bestehenden bzw. zukünftig zu erwartenden Risiken sowie eine Aufklärung der Ursachen. Reichen die vorliegenden Daten, Tatsachen und Erkenntnisse für eine abschließende Risikoabschätzung nicht aus, sind Art und Umfang der dafür erforderlichen weiteren Ermittlungen anzugeben. Dabei ist für Aufgaben der Gefahrenabwehr die reale Nutzung, für Zwecke der Bauleitplanung bzw. Baugenehmigung die vorhandene und die rechtlich mögliche bzw. die geplante Nutzung zu berücksichtigen.

Die Beurteilung dient als Grundlage für die Prüfung der Rechtsfragen, der Ermessensausübung und der Entscheidung durch die zuständige Behörde.

Bestandteil der Beurteilung sind im einzelnen folgende Schritte:

- Darstellung aller im Einzelfall möglichen Wirkungspfade, auf denen die Schadstoffe zu Schutzgütern gelangen können.
- Beschreibung der Selektivität, Genauigkeit und Richtigkeit der Messergebnisse.
- Ermittlung der Tatsache, ob die Schadstoffgehalte in den beurteilungsrelevanten Bereichen/Umweltmedien der Verdachtsfläche/Altlast signifikant höher als in der unbeeinflussten Umgebung sind (ursachenbezogenen Betrachtung).
- Beschreibung der zurechenbaren Einwirkungen nach Art und Ausmaß.
- Beschreibung der Einwirkungen und Wirkungen, die nach sachkundiger Prognose in überschaubarer Zukunft nach Art und Ausmaß zu besorgen sind
- Aufzeigen noch offener Fragen
- Vorschläge für ggf. notwendige weitergehende Untersuchungen zur Sachverhaltsermittlung.

Beweisniveau. Definiertes Umfang der für die → Bewertung jeder → Untersuchungsstufe erforderlichen Datenbasis.

Bewertung, Fachliche und rechtliche. → Beurteilung des ermittelten Sachverhalts durch die zuständige Behörde nach Abschluss

einer → Untersuchungsstufe (Erreichen eines bestimmten Kenntnisstandes) zur Festlegung des weiteren → Handlungsbedarfs nach den Grundsätzen des allgemeinen Verwaltungshandelns, insbesondere dem Abwägungsgebot und dem Grundsatz der Verhältnismäßigkeit der Mittel.

Fachliche und rechtliche Beurteilung des ermittelten Sachverhalts mit dem Ziel, inwieweit sich der Verdacht des Vorliegens einer schädlichen Bodenveränderung oder Altlast verdichtet oder bestätigt hat und welche Maßnahmen zur Gefahrenabwehr erforderlich und geeignet sind. Bei der Bewertung im Rahmen der Gefährdungsabschätzung sind insbesondere die Prüf- und Maßnahmenwerte, Art und Konzentration der Schadstoffe, die sachverständig ermittelte und prognostizierte Möglichkeit ihrer Ausbreitung in die Umwelt und ihrer Aufnahme durch Menschen, Tiere und Pflanzen sowie die Nutzung des Grundstücks zu berücksichtigen.

Biologischer Sauerstoffbedarf. Maß für die aerobe Oxidierbarkeit von organischen Substanzen durch Mikroorganismen.

Biomasse. Das gesamte Trockengewicht von Verbindungen, die einen biologischen Ursprung haben. Dazu zählen ganze Organismen, Zellen und Zellbestandteile.

Bioverfügbarkeit. Kriterium zur Aufnahme von Substanzen in biologische Zellen über direkten Zellkontakt, den Wasserpfad oder den Luftpfad. Damit bestimmen Oberfläche, Lokalisierung, Mobilität, Wasserlöslichkeit oder Flüchtigkeit die Bioverfügbarkeit einer Substanz. Im Boden können Substanzen durch Adsorption an die Bodenmatrix, Einschluß (Sequestrierung) und Einlagerung in (für Mikroorganismen nicht zugängliche) Mikroporen in ihrer Bioverfügbarkeit herabgesetzt sein.

Biozid. Chemischer Stoff (Wirkstoff oder Zubereitung), der Organismen abtötet, synonym zu Pestizid.

Biozönose. Lebensgemeinschaft (Summe der miteinander in Wechselwirkung stehenden Organismen eines Ökosystems).

Boden. Ist die obere Schicht der Erdkruste, soweit sie Träger der → Bodenfunktionen ist, einschließlich der flüssigen Bestandteile (Bodenlö-

sung) und der gasförmigen Bestandteile (Bodenluft), ohne Grundwasser und Gewässerbetten.

Bodenfunktionen. Der Boden erfüllt.

1. natürliche Funktionen als
 - a) Lebensgrundlage und Lebensraum für Menschen, Tiere, Pflanzen und Bodenorganismen,
 - b) Bestandteil des Naturhaushalts, insbesondere mit seinen Wasser- und Nährstoffkreisläufen,
 - c) Abbau-, Ausgleichs- und Aufbaumedium für stoffliche Einwirkungen auf Grund der Filter-, Puffer- und Stoffumwandlungseigenschaften, insbesondere auch zum Schutz des Grundwassers,
2. Funktionen als Archiv der Natur- und Kulturgeschichte sowie
3. Nutzungsfunktionen als
 - a) Rohstofflagerstätte,
 - b) Fläche für Siedlung und Erholung,
 - c) Standort für die land- und forstwirtschaftliche Nutzung,
 - d) Standort für sonstige wirtschaftliche und öffentliche Nutzungen, Verkehr, Ver- und Entsorgung.

Bodenveränderungen, Schädliche. Sind Beeinträchtigungen der → Bodenfunktionen, die geeignet sind, → Gefahren, erhebliche Nachteile oder erhebliche Belästigungen für den einzelnen oder die Allgemeinheit herbeizuführen.

BSB: → Biologischer Sauerstoffbedarf.

BTEX-Aromaten. Monoaromatische Verbindungen: Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylole.

¹⁴C: radioaktives Kohlenstoff-Isotop (β-Strahler), das zur Markierung von Verbindungen (z.B. Schadstoffen, Pestiziden) für Bilanzierungsexperimente genutzt wird.

C_{org}: organischer Kohlenstoffgehalt.

C+E-Quelle. Kohlenstoff- und Energiequelle.

¹⁴C-Aktivität. Radioaktivität des Kohlenstoff-Isotop → ¹⁴C.

C-C-Bindung. kovalente Bindung zwischen zwei Kohlenstoffatomen.

C-N-Bindung. Kovalente Bindung zwischen einem Kohlenstoffatom und einem Stickstoffatom.

Carbendazim. 2-Methoxycarbonylamino-benzimidazol; Wirkstoff des Fungizids Derosal 60.

cfu: → Kolonie bildende Einheiten (engl.: colony forming units).

Charge-Transfer-Komplex. Lockerer Zusammenschluß von elektronenarmen Molekülen (Elektronenakzeptor) und elektronenreichen Molekülen (Elektronendonator).

Chemischer Sauerstoffbedarf. Summenparameter für die Sauerstoffequivalente, die zur vollständigen Oxidation der Inhaltsstoffe eines Wassers oder Bodens durch starke chemische Oxidationsmittel (wie z. B. Dichromate oder Permanganate) benötigt werden.

Clitellum. Drüsige Verdickung des Integuments im Bereich der männlichen Genitalporen bei geschlechtsreifen Clitellaten (z.B. Lumbriciden, → Enchytraeiden) während der Fortpflanzungszeit.

Collembolen. Springschwänze, ungeflügelte, weichhäutige, Kleininsekten (Länge 0,2 bis 10 mm) mit Sprungapparat, leben als Destruenten im Mineralboden, Streu und bodennaher Vegetation; weltweit verbreitet.

Cometabolismus. Transformation eines nicht zum Wachstum verwertbaren Substrates in Gegenwart eines Auxiliarsubstrates.

Copiotrophe Bakterien. Können nur in Nährmedien wachsen, die organisches Material in hohen Konzentrationen (> 100 mg C/l) enthalten.

CSB: → Chemischer Sauerstoffbedarf.

2,4-D: 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, anionisches Herbizid.

Defaunieren. Abtöten der Tiere einer Probe, z.B. durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

Dekontaminationsmaßnahme. Maßnahmen zur Beseitigung oder Verminderung der Schadstoffe.

Denitrifikation. Reduktion von Nitrat über Nitrit zu N₂ durch → fakultativ anaerobe Bakte-

rien. Übertragung von Reduktionsäquivalenten auf Nitrat, wenn Sauerstoff als Elektronenakzeptor nicht zur Verfügung steht.

Derosal 60. → Carbendazim.

Destruenten. Organismen, die tote pflanzliche und tierische Substanz bis zur Stufe der anorganische Ausgangsstoffe abbauen, z.B Sapro-, Humi-, Bakterio-, und Mycophage.

Detailuntersuchung. → Technische Untersuchung. Gesamtheit der standort- und wirkungspfadbezogenen Untersuchungen, die aufbauend auf den Ergebnissen der orientierenden Untersuchung zur abschließenden Ermittlung des Sachverhaltes und für die Feststellung der zuständigen Behörde über Art und Umfang einer schädlichen Bodenveränderung oder Altlast erforderlich sind. Bei Detailuntersuchungen sind insbesondere festzustellen: die Menge, räumliche Verteilung, Mobilität und Mobilisierbarkeit der Schadstoffe im Bereich der altlastverdächtigen Fläche bzw. der Altlast, ihre Ausbreitung im Boden, in Gewässer oder in der Luft, die betroffenen Wirkungspfade und die Exposition der Schutzgüter.

Vertiefte weitere Untersuchung zur abschließenden Gefährdungsabschätzung, die insbesondere der Feststellung von Menge und räumlicher Verteilung von Schadstoffen, ihrer mobilen oder mobilisierbaren Anteile, ihrer Ausbreitungsmöglichkeiten in Boden, Gewässer und Luft sowie der Möglichkeit ihrer Aufnahme durch Menschen, Tiere und Pflanzen dient.

DEV: Deutsche Einheitsverfahren.

Diauxie. Zweiphasiges Wachstum. Tritt auf, wenn zwei Nährstoffe nicht gleichzeitig verbraucht werden.

Dikotyle. Zweikeimblättrige Pflanze.

Diquat. 1,1-Ethylen-2,2-bipyridylium-Salz, kationisches Herbizid.

DU: Detailuntersuchung.

Durchschnittsprobe. Die durch Zusammenmischung definierter Einzelproben vor Ort oder in der Untersuchungsstelle hergestellt wird (→ Mischprobe).

EC-Werte. Abkürzung für engl. effective concentration (effektive Konzentration); die EC50

ist die Konzentration eines Stoffes bei der 50 % der exponierten Organismen innerhalb eines definierten Zeitraums den geprüften Effekt zeigen.

EC₅₀: Stoffkonzentration, die 50 % eines max. erreichbaren Effektes bewirkt.

EDA-Komplex. → Elektronen-Donator-Akzeptor-Komplex

Einzelprobe. Probe von einer Probennahmestelle, die eine gesamte Schicht, einen gesamten Bodenhorizont oder einen Teil von ihnen repräsentiert.

Elektronen-Donator-Akzeptor-Komplex.

→ Charge-Transfer-Komplex

Emissionen. Im Sinne des Immissionsschutzes die von einer Anlage ausgehenden Luftverunreinigungen, Geräusche, Erschütterungen, Licht, Wärme, Strahlen und ähnliche Erscheinungen [§ 3 Abs. 3 BImSchG]. I.w.S. wird der Begriff für die von → altlastverdächtigen Flächen und → Altlasten ausgehenden → Verunreinigungen verwendet. → Schadstoffaustrag.

Enchytraeen (Enchytraeidae). Kleine, weißliche Anneliden (2 - 35 mm); leben als Destruenten in Boden, Streu, Kompost, limnischen Sedimenten und der Litoralzone des Meeres; weltweit verbreitet.

Entrapment. Physikalischer Einschluß von originären Schadstoffen in der Humusmatrix.

Erfassung. Erster und grundlegender Arbeitsabschnitt bei der Behandlung von → altlastverdächtigen Flächen. Einzelheiten der Erfassung der Altlasten und altlastverdächtigen Flächen können die Länder regeln [§ 11 BBodSchG].

Erhebung. Systematische Zusammenführung vorhandener, aber verstreuter Informationen über → altlastverdächtige Flächen. Die Erhebung ist Teil der → Erfassung.

Erkundung. Ermittlung von Daten, Tatsachen und Erkenntnissen über → altlastverdächtige Flächen und → Altlasten mit dem Ziel ihrer Entlassung aus dem Altlastverdacht, ihrer → Überwachung oder → Sanierung.

Erstbewertung. Grobe Begutachtung von altlastverdächtigen Flächen zur Feststellung der Bearbeitungspriorität.

Essigsäurebakterien. Aerob wachsende Bakterien, die Substrate nur unvollständig oxidieren können. Sie bilden aus Glucose und Ethanol Essigsäure.

Ester-Bindung. Chemische Bindung über ein Kohlenstoff- und Sauerstoffatom z.B. R-C(O)-R' (R, R' = Alkyl- oder Arylrest).

Ether-Bindung. Chemische Bindung über ein Sauerstoffatom z.B. R-O-R' (R, R' = Alkyl- oder Arylrest).

euedapisch. Im Boden lebend.

F-Generation. Generation der Nachkommen.

fakultativ anaerobe Bakterien. Bakterien, die sowohl → aerob als auch → anaerob wachsen können.

FENTONS Reagenz. Komplex aus Eisen(II)-Salzen (z.B. Eisengallussäure) und Wasserstoffperoxid. Reaktionen mit Fentons Reagenz verlaufen über Radikalbildung.

Flüssig-Flüssig-Extraktion. Extraktionsverfahren bei dem eine gelöste Substanz aus ihrem Lösemittel durch ein anderes, mit dem ersten nur geringfügig mischbares Extraktionsmittel heiß oder kalt extrahiert wird.

Flüssig-Szintillator. Gerät zur Detektion und Quantifizierung von Radioaktivität (Alpha- und Beta-Teilchen, Elektronen sowie von Röntgenstrahlen emittierte Radionuklide).

Freisetzung. Umfassender Begriff für alle Vorgänge, durch die → Schadstoffe allein oder zusammen mit anderen Stoffen (z.B. verunreinigter Boden) von einer → Altlast verlagert werden.

Zur Freisetzung führen chemische, physikalische und/oder biologische Vorgänge (z.B. Gasbildung), der Einfluss natürlicher Transportmedien (Wasser, Wind) oder die selbständige Aufnahme durch Lebewesen (Pflanze, Mensch), s. auch → Mobilisierung, → Wirkungspfad.

Frostgare. Aggregatbildung durch frostbedingte Austrocknung in Böden.

Funktionelle Gruppen. Polare Atombindungen von organischen Kohlenwasserstoffen, die die Reaktivität einer Stoffklasse bestimmen.

Gärung. Mikrobiologische Prozesse, die der Energiebereitstellung dienen, bei denen aufgrund des Mangels an anorganischen Elektronenakzeptoren die während der Substratoxidation anfallenden Elektronen auf organische Akzeptoren übertragen werden. Diese werden entweder beim Substratabbau bereitgestellt oder sind durch ein zweites Substrat verfügbar.

Gefahr. Sachlage, bei der bei ungehindertem Ablauf des Geschehens in überschaubarer Zukunft mit hinreichender Wahrscheinlichkeit ein Schaden für ein oder mehrere Schutzgüter eintreten kann.

Begriff des allgemeinen Ordnungsrechts (Polizeirecht), der eingeeengt für die gesetzliche Bestimmung des Begriffs → Altlast von Bedeutung ist. Bezüglich der zeitlichen Nähe werden akute, konkrete und latente Gefahren mit unterschiedlichen Rechtsfolgen unterschieden.

Gefährdung. Möglichkeit der Schädigung von Schutzgütern durch eine von einer schädlichen Bodenveränderung oder Altlast ausgehenden Einwirkung.

Gefährdungsabschätzung. ist der zusammenfassende Begriff für die Gesamtheit der Untersuchungen und Beurteilungen, die notwendig sind, um die Gefahrenlage bei der einzelnen → altlastverdächtigen Fläche abschließend zu klären. Die Gefährdungsabschätzung umfaßt alle im Einzelfall auf die Erfassung folgenden Maßnahmen bis zur abschließenden → Gefahrenbeurteilung durch die zuständige Behörde. Sie ist der zweite Arbeitsabschnitt in der Altlastenbehandlung und gliedert sich im typischen Falle in

- die → Erstbewertung,
- die → orientierende Untersuchung,
- die → Detailuntersuchung.

Jeder dieser Teilschritte enthält eine fachliche und rechtliche Beurteilung; diesen gehen in der Erstbewertung eine Auswertung der Erfassungsunterlagen und ggf. Nacherhebungen, in der orientierenden und Detailuntersuchung konkrete Untersuchungen voraus.

Die rechtliche Beurteilung wird durch die zuständige Behörde durchgeführt.

Gefährdungspotential. Umfang möglicher Gefährdungen oder Schädigungen von Schutzgütern in der Umgebung von altlastverdächtigen

Flächen, die unter bestimmten Bedingungen zu erwarten sind.

Die Bedingungen unter denen Gefährdungspotentiale abgeschätzt werden, sollten sich auf den Einzelfall unter Annahme bestimmter Zustände innerhalb eines möglichen und wahrscheinlichen Geschehensablaufs beziehen, z.B. → Mobilisierung eines Teils des → Schadstoffinventars, versagen einzelner natürlicher oder technischer Barrieren, Änderung der Realnutzung.

Gefahrenbeurteilung. Zusammenfassender Begriff für die fachlichen und rechtlichen Beurteilungen auf der Basis von Untersuchungen zur Ermittlung des → Gefährdungspotentials einer Altlast in bestimmungsgemäßen Ablauf der → Untersuchungen.

Gefahrenermittlung. die von der Behörde durchgeführte oder angeordnete Erforschung des wahren Sachverhalts (Sachverhaltsermittlung) unter Berücksichtigung aller Umstände, die der rechtlichen Prüfung dient, ob im Einzelfall eine → Gefahr für die öffentliche Sicherheit oder Ordnung besteht.

geogen. Durch geologische Einwirkung verursacht.

Gutachter. Ist ein Sachverständiger (natürliche Person), der die erforderlichen Voraussetzungen besitzt und bereit ist,

- im Auftrag der zuständigen Behörde oder eines anderen Auftraggebers und
 - als Grundlage für deren Entscheidungen,
- die über eine Altlast-Verdachtsfläche oder Altlast erhobenen und ermittelten Daten, Tatsachen und Erkenntnisse besonders sachkundig zu beurteilen und/oder aufgrund seiner Sachkunde geeignete und verhältnismäßige Maßnahmen für ein behördliches Eingreifen oder das Tätigwerden des Auftraggebers vorzuschlagen.

Habitat .Aufenthaltort einer biologischen Art.

Handlungsbedarf. behördliche Festlegung von weiteren Handlungsschritten als Ergebnis der Bewertung von Untersuchungsstufen. Erforderliche Maßnahmen z.B. zur Altlastenbehandlung als Ergebnis von Bewertungen.

HE: → Historische Erkundung.

Herbizid. Pflanzenvertilgungsmittel.

Heterozyklen. Verbindung aus einem ringförmigen Molekülgerüst, daß außer Kohlenstoffatomen Sauerstoff-, Stickstoff- oder Schwefelatom enthält (O-, N-, S-Heterozyklen).

Heterozyklische Stickstoffverbindung. Stickstoffhaltige → Heterozyklen (z.B. Pyrrol, Indol, Imidazol, Carbazol, Quinolon).

Hintergrundgehalt. Schadstoffgehalt eines Bodens, der sich aus dem geogenen (natürlichen) Grundgehalt eines Bodens und der ubiquitären Stoffverteilung als Folge diffuser Einträge in den Boden zusammensetzt. Der geogene Grundgehalt umfaßt den Stoffbestand eines Bodens, der sich aus dem Ausgangsgestein (lithogener Anteil), ggf. Vererzungen (chalkogener Anteil) und der durch pedologische Prozesse beeinflussten Umverteilung (Anreicherung oder Verarmung) von Stoffen im Boden ergibt.

Hintergrundwerte. sind repräsentative Werte für allgemein verbreitete Hintergrundgehalte eines Stoffes oder einer Stoffgruppe in Böden.

Historische Erkundung. Standortbezogene Sammlung, Aufbereitung und Auswertung der über eine altlastverdächtige Fläche in schriftlichen Quellen, Karten und Luftbildern sowie aus Befragungen vorliegenden Daten, Tatsachen und Erkenntnisse insbesondere auch über die frühere und gegenwärtige Nutzung der Fläche.

HLB-Wert. (von engl.: hydrophilic lipophilic balance). Der HLB-Wert wird zur Charakterisierung von Tensiden verwendet und ist ein Maß für die Wasser- bzw. Öl-Löslichkeit von vorwiegend nichtionischen Tensiden u. die Stabilität von Emulsionen. Er drückt das Verhältnis der Stärke des hydrophilen Anteils zu der Stärke des lipophilen Anteils im Molekül aus. Die relativen Stärken können u. a. über die Dielektrizitätskonstante des Tensids ermittelt werden. Substanzen mit niedrigem HLB-Wert (< 10) sind in der Regel gute W/O-Emulgatoren, während hydrophilere Tenside mit höherem HLB-Wert als O/W-Emulgatoren wirken. Tenside haben einen HLB-Wert von 13 - 15, Lösungsvermittler 12 - 18.

Humifizierung. Beim Abbau von Naturstoffen in Böden finden Ab- und Umbaureaktionen statt, die zu einer Verteilung des Ausgangskohlenstoffes in verschiedene Kompartimente füh-

ren. Ein Teil des Kohlenstoffes wird in der refraktären organischen Bodenmatrix festgelegt (s. Kap. 2.2).

Huminstoffe. Huminstoffe werden postmortal aus verrottendem Material von verschiedenen Organismen (Pflanzen, Tiere und Mikroorganismen) gebildet. Im allgemeinen wird eine komplexe Mischung aus natürlich vorkommenden, schwer abbaubaren, gelb bis braun gefärbten, kolloidalen Substanzen im Boden als Humus bezeichnet (s. Kap. 2.3.2.7).

Humusturnover. Verweilzeit der organischen Substanz in Böden (ca. 30 - 40 Jahre).

Hydrolyse. Chemische Reaktion, bei der eine Verbindung unter Einwirkung von Wasser gespalten wird.

Hydrophobe Wechselwirkungen. Wechselwirkung zwischen apolaren (hydrophoben) Molekülen. Durch hydrophobe Wechselwirkungen kommt es auch zur Bildung von Micellen.

Hydroxylierung. Einführung einer Hydroxy-Gruppe (durch Substitution oder Addition) in eine organische Verbindung (z.B. durch Ersatz von funktionellen Gruppen oder Wasserstoff-Atomen durch OH-Gruppen).

Immission. Im Sinne des Immissionsschutzes auf Menschen, Tiere, Pflanzen oder Sachen einwirkende Luftverunreinigungen, Geräusche, Erschütterungen, Licht, Wärme, Strahlen und ähnliche Umwelteinwirkungen [§ 3 Abs. 2 BImSchG]. I.w.S. sind darunter auch sonstige von einer → altlastverdächtigen Flächen hervorgerufenen Einwirkungen auf ihre Umgebung zu verstehen.

inertter Boden. Boden mit einem organischen Kohlenstoffgehalt < 1%, zumeist Unterböden.

insulare Restsättigung. Die Anteile einer nicht-benetzenden Flüssigkeit sind residual; sie befinden sich im Zentrum größerer Poren.

Integument. Haut von Wirbellosen.

Interpretation. Umfasst die sinnvolle und nachvollziehbare Verknüpfung aller gewonnenen Erkenntnisse zum Sachverhalt, um zu einer nachvollziehbaren Prognose des weiteren Geschehensablaufes zu kommen und die Emissionspfade bzw. die damit verknüpften Risiken

einschätzen zu können. Das Ziel der Interpretation von Untersuchungsergebnissen ist es, ausgehend von der Nutzung ein Risiko zu charakterisieren. Anreicherung von Stoffen in Luft, Boden, Wasser und Lebewesen.

Invertebraten. Wirbellose Tiere.

Ionenbindung. Anziehende Kraft, die negative und positive Ionen zusammenhält. Bei Übergang von Elektronen von Atomen einer Sorte auf Atome einer anderen Sorte kommt es zur Ionenbindung.

Schadstoff(-derivate), die in kationischer Form oder als Protonenakzeptor vorliegen, können z.B. mit der organischen Substanz des Bodens ionische Bindungen eingehen.

Isotope-ratio-GC/MS. Methode zur Bestimmung der Isotopenverhältnisse ($^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$) mit Gaschromatographie und Massenspektroskopie.

juvenil. Jung (nicht geschlechtsreif).

K_{CAL}: Pflanzenverfügbares Kalium.

KBE: → Kolonie bildende Einheiten (engl.: colony forming units, cfu).

Klärschlammgranulat. Entwässertes Granulat aus Klärschlamm.

Kolonie bildende Einheiten. Wenn Mikroorganismen auf Agar wachsen, bilden sie sog. Kolonien, sichtbar voneinander unterscheidbare Strukturen von Zellmaterial. Jede Kolonie entsteht aus einer Zelle oder einem Zellaggregat. Aus der Verdünnung des Ausstrichs und der Anzahl der Kolonie bildenden Einheiten (cfu) läßt sich die Populationsdichte in einem Ausgangsmedium berechnen (in cfu/ml oder cfu/g).

Kontamination. → Verunreinigung mit schädlichen Stoffen.

Kontaminationspotential. Art und Menge der Schadstoffe, mit deren Freisetzung und Eintrag in den Boden aus bestimmten technischen Anlagen und Nebeneinrichtungen

- bei üblichem Betrieb,
- bei gestörtem Betrieb sowie
- bei und nach der Stilllegung erfahrungsgemäß zu rechnen ist.

Das auf den einzelnen Altstandort bezogene Kontaminationspotential ergibt sich aus dessen

konkreter gewerblicher und industrieller Vornutzung unter Berücksichtigung des Betriebszeitraums der einzelnen Anlagen und der sonstigen Betriebseinrichtungen.

Kovalente Bindung. I.d.R. stabile Bindung, die durch gemeinsame Elektronen zwischen zwei Atomen bewirkt wird. Kovalente Bindungen zwischen Schadstoffderivaten und organischer Bodensubstanz können durch enzymatische, chemische oder photochemische Reaktionen induziert werden, bei denen funktionelle Gruppen der Humussubstanz als Bindungspartner fungieren.

Lebensraumfunktion. → Ökotoxikologische Testverfahren.

Life-cycle-Tests. Biotest, mit dem der Einfluß auf einen Generationszyklus erfaßt wird.

Liganden-Austausch. Wasserstoffmoleküle, die mit Huminsäuren komplexierten Metallionen assoziiert sind, werden durch funktionelle Gruppen der Schadstoffe oder deren Metaboliten ersetzt.

Lysimeter. Oben offene Behälter, die mit gestörten oder ungestörten Bodenproben beschickt werden und für verschiedenste Untersuchungen (z.B. Wasserhaushaltsbilanzierungen, Schadstoffverteilung, -transport und Auswaschverhalten) eingesetzt werden.

Maßnahmenwert. Werte für Einwirkungen oder → Belastungen, bei deren Überschreiten unter Berücksichtigung der jeweiligen Bodennutzung in der Regel von einer → schädlichen Bodenveränderung oder → Altlast auszugehen ist und Maßnahmen erforderlich sind.

Metabolismus. Der biochemische Stoffwechsel eines Organismus.

Metabolite. Produkte und Intermediate, die in einem biologischen Stoffwechsel gebildet werden.

Methanogene Bakterien. → Obligat anaerobe Bakterien. Sie bilden Methan als Endprodukt ihres Energiestoffwechsels. Teilweise reduzieren sie Kohlendioxid mit Wasserstoff zu Methan.

Migration. Verlagerung von Stoffen, die zu deren Dispersion oder Konzentration in der Erdrinde führt. Verantwortlich für die Migration

sind innere Faktoren, die u.a. als chemische und physikalische Konstanten bekannt sind und sich nicht verändern, und äußere milieubedingte Faktoren, die sich ständig ändern.

Mikrokosmos. Im Bereich der Mikrobiologie ist damit die Simulation der "realen Welt" im Labor gemeint, um Mikroorganismen unter weitgehend natürlichen Bedingungen zu untersuchen.

Mineralisierung. Der biologische Abbau von organischen Verbindungen zu Kohlendioxid, Wasser und anorganischen Nährsalzen. Beim Fremdstoffabbau werden in Laborexperimenten zumeist radioaktiv markierte Substanzen (¹⁴C-Markierung) eingesetzt, um über die Bildung von ¹⁴C-markiertem Kohlendioxid eine Mineralisierung zu quantifizieren.

Mischprobe. Durchschnittsprobe, die durch Zusammenmischung definierter Einzelproben vor Ort oder in der Untersuchungsstelle hergestellt wird.

MKW: Mineralölkohlenwasserstoffe (s. Kap. 2.1.1).

Mobilität. Zusammenfassender Begriff für die Verlagerungsfähigkeit, Beweglichkeit eines Stoffes aufgrund seiner Eigenschaften unter definierten Bedingungen.

Monokotyle. Einkeimblättrige Pflanze.

Monooxygenase. Zu den Oxygenasen gehörendes Enzym. Überträgt ein Atom von molekularem Sauerstoff auf ein Substrat. Das andere Sauerstoff-Atom reagiert mit zwei Wasserstoff-Atomen zu Wasser. Diese können aus dem Substrat kommen.

Mortalitätstest. → Akut-Test mit dem Endpunkt Mortalität.

N_{tot}: Gesamtstickstoffgehalt.

Nematoden. Fadenwürmer; mikroskopisch kleine Invertebraten; leben im Salz- und Süßwasser, im Boden und Kompost; weltweit verbreitet.

NERNST'sche Gleichung. Gleichung zur Berechnung des Redoxpotentials in Abhängigkeit von Temperatur und Konzentrationen.

NMR-Spektroskopie. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (Kernspin-Resonanz-Spektroskopie).

obligat anaerobe Bakterien. Bakterien, die ausschließlich anaerob wachsen (gären) können, da ihnen Entgiftungsmechanismen von toxischen Sauerstoffspezies fehlen, die bei aerober Atmung auftreten.

Ökotoxikologische Testverfahren. Dienen der Bewertung des Gefährdungspotentials von (schadstoffbelasteten) Böden, Bodenmaterialien und Wässern durch biologische Tests. Man unterscheidet Tests zur Bestimmung der Bodenrückhaltefunktion (sog. Eluattests, aquatische Tests) und Tests zur Bestimmung der Lebensraumfunktion (terrestrische Tests).

Unabhängig vom Testorganismus werden direkte Einflüsse (Mortalitätsrate, Beeinträchtigung, Entwicklung, Fluchtverhalten etc.) durch → Akuttests und Langzeiteinflüsse durch → Reproduktionstests unterschieden.

Oligotrophe Bakterien. Können dauerhaft in Nährmedien wachsen, die organisches Material in niedrigen Konzentrationen enthalten (1 bis 15 mg C/l).

organoleptische Prüfung. sensorische Analyse von Geruch und Aussehen.

Orientierende Untersuchung. Örtliche Untersuchungen, insbesondere Messungen, auf der Grundlage der Ergebnisse der Erfassung zum Zweck der Feststellung, ob der Verdacht einer schädlichen Bodenveränderung oder Altlast ausgeräumt ist oder ein hinreichender Verdacht besteht.

OU: → Orientierende Untersuchung.

P_{CAL}: pflanzenverfügbare Phosphor.

P-Generation. Elterngeneration.

PAK: → Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe (s. Kap. 2.1.2).

Parameter. Größen für Stoffe, Stoffgruppen bzw. physikalische, chemische oder biologische Eigenschaften, deren konkrete, festgestellte Werte für die Beschreibung des → Schadstoffinventars einer altlastverdächtigen Fläche oder für die Ermittlung der Schadstoffausbreitung benötigt werden.

Paraquat. 1,1-Dimethyl-4,4-bipyridylium-Salz, kationisches Herbizid.

pendulare Restsättigung. Eine nicht-mischbare Flüssigkeit befindet sich im residuellem Sättigungszustand neben einer zweiten in den Winkeln und Zwickeln eines Bodenporenraumes.

Peptid-Bindung. Carbonsäureamid-Gruppierung (–CO–NH–), die bei der Kondensation von Aminocarbonsäuren entsteht, wenn die Carboxyl-Gruppe (–COOH) einer Aminosäure mit der Amino-Gruppe (–NH₂) einer anderen Aminosäure unter Wasserabspaltung reagiert. Die Peptid-Bindung ist eine chemisch oder enzymatisch hydrolysierbare Bindung.

Pestizide. Schädlingsbekämpfungsmittel.

pH: negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration (0-6: sauer; 7: neutral; 8-14: alkalisch).

Phenmedipham. 3-(Methoxycarbonyl-amino-phenyl)-N-(3'-methyl-phenyl)-carbamate; Wirkstoff des Blattherbizids Betanal(+).

Phytan. 2,6,10,14-Tetramethylhexadecan. Zusammen mit → Pristan eine Maß für die Alterung eines MKW-Schadens.

π-Elektronen-Komplex. Lockerer Zusammenschluß von elektronenarmen (Elektronenakzeptor) und elektronenreichen aromatischen Molekülen (Elektronendonator).

Polymerisation. Überführung von niedermolekularen Verbindungen in hochmolekulare Verbindungen. Aus Monomeren, die reaktive Mehrfachbindungen oder Ringe enthalten, werden stufenlos Polymere gebildet.

Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe bestehen aus zwei und mehr kondensierten (annelierten) Benzolringen. PAKs sind vor allem in Erdöl und Kohle enthalten und können auch bei unvollständigen Verbrennungen neu gebildet werden.

Predator. Raubtier.

Pristan. 2,6,10,14-Tetramethylpentadecan. Zusammen mit → Phytan eine Maß für die Alterung eines MKW-Schadens.

Prüfwerte. Werte, bei deren Überschreiten unter Berücksichtigung der Bodennutzung eine

einzelfallbezogene Prüfung durchzuführen und festzustellen ist, ob eine schädliche Bodenveränderung oder Altlast vorliegt.

RAOULT'sches Gesetz. Der Partialdruck einer Komponente einer idealen Lösung ist gleich Stoffmengenanteil der Komponente mal Dampfdruck der reinen Komponente.

Referenzwerte. Werden vom Hintergrundwerten abgeleitet; werden unter bestimmten Rahmenbedingungen hinsichtlich des räumlichen Bezugs und der bodenkundlichen Merkmale zum Vergleich verschiedener Konzentrationen herangezogen. Sie sind nicht wirkungsbezogen abgeleitet.

Sie stellen eine Interpretation der verfügbaren Daten zu Hintergrundwerten dar.

Sie können aus Hintergrundwerten abgeleitet werden, indem letztere für eine bestimmte Fragestellung und bestimmte konkrete Einzelfälle in spezifischer Form ausgewertet und als Referenzwerte herangezogen werden.

repräsentativ. Etwas statistisch richtig zeigend; typisch für den Durchschnitt.

Reproduktions-Test. Chronischer Test mit dem Endpunkt Reproduktion. Dauert länger als ein Akut-Test mit gleichem Organismus. → Ökotoxikologische Testverfahren.

Rückhaltefunktion → Ökotoxikologische Testverfahren.

Sachverständiger. Wer Aufgaben nach § 18 Satz 1 BBodSchG wahrnehmen soll, muß die für diese Aufgabe erforderliche Sachkunde und Zuverlässigkeit besitzen, sowie über die erforderliche gerätetechnische Ausstattung verfügen. Zusätzlich zu den im BBodSchG ausdrücklich genannten Anforderungen hat der Sachverständige auch diejenigen Voraussetzungen zu erfüllen, die dem Wesen der Sachverständigentätigkeit innewohnen. Anforderungen an [Richtlinie für die Bekanntgabe von Sachverständigen nach § 18 BBodSchG - Bereich Altlasten].

Sanierungsmaßnahme. Maßnahmen

1. zur Beseitigung oder Verminderung der Schadstoffe (Dekontaminationsmaßnahmen),
2. die eine Ausbreitung der Schadstoffe langfristig verhindern oder vermindern, ohne die

Schadstoffe zu beseitigen (Sicherungsmaßnahmen),

3. zur Beseitigung oder Verminderung schädlicher Veränderungen der physikalischen, chemischen oder biologischen Beschaffenheit des Bodens.

Sanierungsplan. Ein Sanierungsplan soll die unter Nummer 1 bis 5 genannten Angaben sowie die für eine Verbindlichkeitserklärung nach § 13 Abs. 6 des BBodSchG erforderlichen Angaben und Unterlagen enthalten.

1. Darstellung der Ausgangslage,
2. Textliche und zeichnerische Darstellung der durchzuführenden Maßnahmen und Nachweis ihrer Eignung,
3. Darstellung der Eigenkontrollmaßnahmen zur Überprüfung der sachgerechten Ausführung und Wirksamkeit der vorgesehenen Maßnahmen,
4. Darstellung der Eigenkontrollmaßnahmen im Rahmen der Nachsorge einschließlich der Überwachung ,
5. Darstellung des Zeitplans und der Kosten.

Sanierungsuntersuchung. Mit Sanierungsuntersuchungen bei Altlasten sind die zur Erfüllung der Pflichten nach § 4 Abs. 3 des BBodSchG geeigneten, erforderlichen und angemessenen Maßnahmen zu ermitteln. Die hierfür in Betracht kommenden Maßnahmen sind unter Berücksichtigung von Maßnahmenkombinationen und von erforderlichen Begleitmaßnahmen darzustellen.

Die Prüfung muss insbesondere

- die schadstoff-, boden-, material- und standortspezifische Eignung der Verfahren,
- die technische Durchführbarkeit,
- den erforderlichen Zeitaufwand,
- die Wirksamkeit im Hinblick auf das Sanierungsziel,
- eine Kostenschätzung sowie das Verhältnis von Kosten und Wirksamkeit,
- die Auswirkungen auf die Betroffenen im Sinne von § 12 Satz 1 des BBodSchG und auf die Umwelt,
- das Erfordernis von Zulassungen,
- die Entstehung, Verwertung und Beseitigung von Abfällen,
- den Arbeitsschutz,
- die Wirkungsdauer der Maßnahmen und deren Überwachungsmöglichkeiten,

- die Erfordernisse der Nachsorge und
- die Nachbesserungsmöglichkeiten.

Einzelfallbezogene Ermittlung und Prüfung einer technisch geeigneten, rechtlich zulässigen und verhältnismäßigen Konzeption zur Beseitigung, Verhinderung oder Verminderung vorhandener Schadstoffe. Dabei sind insbesondere die technischen Sanierungsmöglichkeiten, die Möglichkeiten einer Schadstoffverlagerung, die bisherige oder künftige Nutzung sowie die, für die Durchführung der Sanierung entscheidungsrelevanten rechtlichen, organisatorischen und finanziellen Randbedingungen zu prüfen. Der im Rahmen der Sanierungsuntersuchung ausgearbeitete Sanierungsvorschlag dient der zuständigen Behörde und dem Verpflichteten bzw. Sanierungsträger als Grundlage für die Entscheidung über das Maßnahmenkonzept.

Sanierungsziel. Auf den Einzelfall bezogene, von den Schutzziele abgeleitete und in der Regel aufgrund der Sanierungsuntersuchung abschließend festgestellte Maßgaben für das technische Ergebnis von Sanierungsmaßnahmen.

Schadstoffe (umweltgefährdende Stoffe). Stoffe und Zubereitungen im Sinne des § 3 a des Chemikaliengesetzes, wassergefährdende Stoffe im Sinne des § 19 g Abs. 5 des Wasserhaushaltsgesetzes sowie sonstige Stoffe, soweit sie die Funktion des Bodens schädigen können.

Schadstoffinventar. Gesamtheit der vorkommenden Schadstoffe bei Altstandorten und Altablagerungen; das Schadstoffinventar wird durch die Art, Menge, Beschaffenheit und Verteilung der Stoffe charakterisiert [MELF, NRW 1992].

Gesamtheit der in einer Altlast vorhandenen Schadstoffe.

Schadstoffpotential. Schadstoffinventar zuzüglich seiner möglichen Auswirkungen auf die Schutzgüter.

Schutz- und Beschränkungsmaßnahmen. Im Sinne des Bundesbodenschutzgesetzes sonstige Maßnahmen, die Gefahren, erhebliche Nachteile oder erhebliche Belästigungen für den einzelnen oder die Allgemeinheit verhindern oder vermindern, insbesondere Nutzungsbeschränkungen.

Schutzgut. Durch das Gesetz bzw. Rechtsverordnung geschützte Güter des Einzelnen (z.B. Gesundheit des Menschen) und der Allgemeinheit (z.B. Reinheit des Wasserhaushalts). Von der Rechtsordnung geschützte Güter des Einzelnen (z.B. Leben, Gesundheit, Eigentum) oder der Allgemeinheit (z.B. Reinheit des Wasserhaushalts).

Sequestrierung. Physikalischer Einschluß von (Schad-)stoffen in hydrophoben Hohlräumen von Makromolekülen (z.B. in Mizellen).

Sicherungsmaßnahme. Im Sinne des Bundesbodenschutzgesetzes Maßnahmen die eine Ausbreitung der Schadstoffe langfristig verhindern oder vermindern, ohne die Schadstoffe zu beseitigen.

Silylierung. Derivatisierung von aktiven Wasserstoffatomen von funktionellen Gruppen (Hydroxyl- oder Carboxylgruppen) durch Trimethylsilylgruppen (z.B. Trimethylchlorsilan, TMSCI) zur Auflösung der mizellaren Struktur der organischen Bodensubstanz, wodurch z.B. sequestrierte Verbindungen freigesetzt werden können.

Sofortmaßnahme. Aufgrund von Erkenntnissen aus der Erfassung, aus der Erstbewertung oder aus Untersuchungen ohne weitere Aufklärung notwendige Maßnahmen zur Abwehr von Gefahren für die öffentliche Sicherheit.

Sulfat reduzierende Bakterien. → obligat anaerobe Bakterien, die Sulfat als Elektronenakzeptor nutzen und zu Sulfid (H_2S) reduzieren (Sulfatatmung, dissimilatorische Sulfatreduktion). Neben Sulfat können auch Sulfit, Trithionat, Thiosulfat und elementarer Schwefel genutzt werden.

Szintillator. Gerät zur Detektion und Quantifizierung von Radioaktivität durch Umwandlung von beta-Strahlung in Fluoreszenz.

2,4,5-T: 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure, anionisches Herbizid.

TC: (engl.: Total Carbon) gibt den gesamten Anteil an Kohlenstoff in einem Boden an. Es gilt: $TC = TOC + TIC$.

Tensid. Molekül, daß ein hydrophobes und ein hydrophiles Ende besitzt.

Terrestrische Tests. → Ökotoxikologische Testverfahren.

TIC: engl.: total inorganic carbon. Summenparameter zur Beschreibung des Gehaltes an anorganischen Verbindungen in einem Boden.

TOC: engl.: total organic carbon. Summenparameter zur Beschreibung des Gehaltes an organischen Verbindungen in einem Boden.

Trinkwasserverordnung. Die Trinkwasserverordnung (TVO), in der Fassung vom Dezember 1990, regelt, welche Eigenschaften das Trinkwasser haben muß, welche Stoffe darin nicht oder nur unterhalb bestimmter Grenzwerte enthalten sein dürfen.

trophische Gruppe. Fraßebene.

TVO: → Trinkwasserverordnung.

Überwachung. Altlasten und altlastverdächtige Flächen unterliegen, soweit erforderlich, der Überwachung durch die zuständige Behörde. Bei Altstandorten und Altablagerungen bleibt die Wirksamkeit von behördlichen Zulassungsentscheidungen sowie von nachträglichen Anordnungen durch die Anwendung dieses Gesetzes unberührt.

Uferfiltration. Wasser, das aus oberirdischen Gewässern, durch deren Bett in den Grundwasserleiter eindringt. Voraussetzung für die Uferfiltration ist ein hydraulisches Potentialgefälle vom oberirdischen Gewässer zur Grundwasseroberfläche, sowie eine entsprechende Durchlässigkeit des Gewässerbetts.

Untersuchung. → orientierende Untersuchung, → Detailuntersuchung.

VAN-DER-WAALS-Kräfte. Zwischenmolekulare Kräfte, die als schwache Bindungskräfte zwischen inerten Atomen und gesättigten Molekülen auftreten.

Verunreinigung. Durch menschliche Aktivitäten in die Umweltmedien – Wasser, Boden, Luft – entlassene Schadstoffe.

Wasserstoffbrückenbindung. Intermolekulare Anziehung zwischen dem Wasserstoffatom eines Moleküls und einem einsamen Elektronenpaar eines anderen Moleküls. Durch die große Zahl von funktionellen Gruppen an der Oberfläche der Humussubstanz und die daraus resultie-

rende große Affinität zu aktiven Wasserstoffatomen von Schadstoffen oder deren Metaboliten entstehen Wasserstoffbindungen.

Wirkungspfad. Weg eines Schadstoffes von der Schadstoffquelle bis zu dem Ort einer möglichen Wirkung auf ein Schutzgut.

worst case-Bedingungen. Simulation von natürlich auftretenden Extrembedingungen zur Bewertung des Remobilisierungs- und Langzeitverhaltens von humifizierten Schadstoff(-derivaten) im Boden (s. Kap. 4.3).

zymogen. Zymogene Böden sind nährstoffreiche Böden, die Fermentationen fördern.

8.3 Informationsquellen

8.3.1 zusätzliche Literatur

Altlastenfachinformationssystem Baden-Württemberg ALFA-WEB

Ziel des Vorhabens AlfaWeb (Altlasten-Fachinformationen im World-Wide Web) ist es, von der Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg (LfU) erstellte Arbeitshilfen für eine landeseinheitliche, systematische Altlastenbearbeitung mit den Mitteln moderner Informations- und Kommunikationstechnologien zu erschließen und den Altlasten-Sachbearbeitern über rechnergestützte Navigations- und Zugangshilfen eine effektive Informationsbeschaffung zu ermöglichen. Die Vollversion des Altlasten-Fachinformationssystems AlfaWeb stellt Altlasten-Handbücher und -Fachberichte der Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg als Hypertext-Dokumente zur Verfügung. Daneben sind einige Anwendungsprogramme aus dem Altlastenbereich integriert.

AlfaWeb entsteht in einem gemeinsamen Forschungsvorhaben des Forschungszentrums Karlsruhe und der Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg. Bei der fachlichen Ausgestaltung und der kommerziellen Umsetzung sind die beiden Ingenieurbüros IUT und AHK beteiligt. AlfaWeb ist Teil des Verbundprojekts GLOBUS des Ministeriums für Umwelt und Verkehr Baden-Württemberg. Ziel von GLOBUS ist die Entwicklung einer aktiven Auskunftskomponente für Umweltsachdaten.

Die AlfaWeb CD-ROM über die Firma AHK - Gesellschaft für Angewandte Hydrologie und Kartographie (<http://www.ahk-freiburg.de>) erworben werden.

Sächsisches Altlastenfachinformationssystem SALFA-WEB

Die durch das LfUG und SMUL veröffentlichten Handbücher und Materialienbände zur Altlastenbehandlung sind über das Sächsische Altlastenfachinformationssystem (SALFA) elektronisch verfügbar.

Das SALFA basiert auf dem baden-württembergischen XfaWeb mit dem dort bereits das ALFA-WEB (s.o.) erstellt wurde. Für die sächsische Variante (SALFA-WEB) werden die schon entwickelten DV-Werkzeuge sowie die Softwareumgebung vollständig übernommen.

Der entscheidende Grund für die zügige Schaffung des SALFA-WEB ist die Möglichkeit einer netzartigen Verknüpfung der fachlichen Materialien und Gesetzlichkeiten. So kann z.B. ein Link von der im BBodSchG genannten Sanierungsuntersuchung zum entsprechenden Handbuch erfolgen. Somit ist die Voraussetzung für ein effektives Arbeiten gegeben. Das in der Praxis zwingend notwendige integrale Vorgehen wird daher erleichtert. Ziel ist die Anwendung des SALFA im Rahmen der Altlastenbehandlung durch einen breiten Anwenderkreis (Verpflichtete, Ingenieurbüros und Behörden).

Die vorliegenden Handbücher und Materialienbände sind derzeit noch nicht vollständig mit den neuen Gesetzlichkeiten (BBodSchG, BBodSchVO, SächsAGB) konform, können aber durch die Möglichkeiten des SALFA demnächst unkompliziert angepaßt werden.

Weitere Informationen zum SALFA-WEB sind im Internet (<http://www.lfug.de/Fachinfo/Abfall-Altlasten/SalfaWeb/SalfaWeb-nt/index.html>) oder über das Landesamt für Umwelt und Geologie, Referat Altlasten, Zur Wetterwarte 11, 01109 Dresden erhältlich.

Handbuch der Altlastensanierung

Prof. Dr. Volker Franzius; Klaus Wolf, Dipl.-Ing.; Prof. Dr. Edmund Brandt, Dipl.-Pol. (2000): Handbuch der Altlastensanierung, C. F. Müller Verlag, Heidelberg. (Das Werk wird nach Bedarf aktualisiert.)

Schwerpunkte des Handbuchs der Altlastensanierung sind Methoden der Sicherung und Dekontaminierung von mit Schadstoffen belasteten Böden. Es werden Sanierungsmöglichkeiten mit Fallbeispielen nach dem heutigen Stand der Technik aufgezeigt. Ergänzend sind Vorschriften und Auszüge aus den einschlägigen Gesetzen aufgeführt. Weitere Informationen sind im Internet zu finden (<http://www.huethig.de/themen/rws/umweltrecht/altlasten.html>).

Im einzelnen werden die folgenden vier Bereiche angesprochen:

- Einführung und Übersichten, Stich- und Fachwörterverzeichnis, Ursachen, Charakteristika und Ausmaß der Altlastenproblematik, Erfassung und Bestandsaufnahme, Untersuchungen zur Beurteilung kontaminierter Flächen, Gefährdungsabschätzungen
- Sanierungsverfahren, Emissionsschutz, Arbeits- und Anwohnerschutz, Sicherheitsvorkehrungen, Überwachung, Nachsorge, Folgenutzung
- Beispiele komplexer Altlastensanierungen, Rechtsfragen, Finanzierung der Altlastensanierung, Altlastenmanagement
- Vorschriften, Arbeitshilfen, Anschriften Sanierungsbeteiligter

Boden schützen, Altlasten sanieren

Fischer, Bodo; Köchling, Peter; Nabert, Gisela (1999): Boden schützen, Altlasten sanieren. WEKA Verlag, Augsburg.

Das Handbuch gibt eine Übersicht zu rechtlichen Anforderungen auf Bundes- Landes- und europäischer Ebene. Im weiteren wird der Themenkomplex Sanierung mit verschiedenen begleitenden Themen abgehandelt und auf den Bereich vorsorgender Bodenschutz eingegangen. Ergänzt wird das Werk durch Musterdokumente und Ansprechpartner. Die Themenbereiche sind wie folgt untergliedert:

- Recht: Bodenschutzrecht Bund/Länder, angrenzende Rechtsgebiete, EU-Recht, Recht in der Praxis, Altlastenhinweise der Länder, Ausführungsanleitungen
- Sanierung von Altlasten: Erfassung, Historische Erkundung, Untersuchungsmethoden, Gefährdungsabschätzung, Sanierungsuntersuchung, -planung, -techniken, Flächenrecycling, Rüstungsaltposten, Gutachter/Sachverständige, Finanzierung/Versicherungsfragen, Umweltmanagementsysteme
- Vorsorgender Bodenschutz: Bodendefinition, Bodenfunktionen, Vorsorgemaßnahmen, Finanzierung
- Musterdokumente
- Ansprechpartner/ Internetadressen: Dienstleister, Ämter, Forschungseinrichtungen.

Ökonomische Aspekte der Altlastensanierung

Leitfaden über Finanzierungsmöglichkeiten und -hilfen in der Altlastenbearbeitung und im Brachflächenrecycling

Ziel des Leitfadens ist es, eine Übersicht der Förder- und Finanzierungsmöglichkeiten für die Untersuchung und Sanierung von Altlasten sowie die Entwicklung von Brachflächen zu geben. Neben den unmittelbar zur Förderung der Altlastensanierung geschaffenen Förderprogrammen wurden aus der Vielzahl weiterer Förderprogramme diejenigen berücksichtigt, welche die Förderfähigkeit von Leistungen zur Untersuchung und Sanierung von Altlasten und Brachflächen ausdrücklich erwähnen. Dazu gehören Programme zur Entwicklung von Brachflächen, zur Stadterneuerung und zur Entwicklung von Wirtschaft und Infrastruktur.

Die Recherche der Förderprogramme wurde in der Zeit vom 01.10.1999 bis zum 30.04.2000 durchgeführt. Da der Bereich öffentlicher Förderprogramme in ständiger Veränderung begriffen ist, stellt der vorliegende Leitfaden somit eine Momentaufnahme zum Ende April 2000 dar. Das Umweltbundesamt, als Auftraggeber dieses Leitfadens, beabsichtigt, diesen Leitfaden zukünftig fortzuschreiben und zu aktualisieren.

Der Leitfaden soll einen Überblick über die Vielzahl von Möglichkeiten zur Einwerbung öffentlicher Zuwendungen sowie über mögliche Finanzierungs- und Vertragsmodelle zur Sanierung und Entwicklung von Altlasten und Brachflächen geben. Ergänzend hierzu wird die Herangehensweise in der Finanzierung von Altlastensanierung und Brachflächenrecycling in den Niederlanden, Großbritannien und den USA betrachtet.

http://www.umweltdaten.de/altlast/web1/berichte/finanz/finanz_t.htm

8.3.2 Regelwerke

Gesetz zum Schutz vor schädlichen Bodenveränderungen und zur Sanierung von Altlasten (Bundes-Bodenschutzgesetz - BBodSchG)

Zweck dieses Gesetzes ist es, nachhaltig die Funktionen des Bodens zu sichern oder wiederherzustellen. Hierzu sind schädliche Bodenveränderungen abzuwehren, der Boden und Altlasten sowie hierdurch verursachte Gewässerverunreinigungen zu sanieren und Vorsorge gegen nachteilige Einwirkungen auf den Boden zu treffen. Bei Einwirkungen auf den Boden sollen Beeinträchtigungen seiner natürlichen Funktionen sowie seiner Funktion als Archiv der Natur- und Kulturgeschichte so weit wie möglich vermieden werden.

Länderarbeitsgemeinschaft Abfall - LAGA

Die von der Länderarbeitsgemeinschaft Abfall (LAGA) erstellten Technischen Regeln zur Verwertung von Boden- und Bauschutt werden oftmals einer abfallrechtlichen Bewertung mineralischer Reststoffe und Abfälle zugrunde gelegt. Für diesen Bereich gibt es bislang keine bundeseinheitlichen rechtsverbindlichen Vorgaben.

Die Technischen Regeln sollen zu einer Verminderung der Abfallmengen und Inanspruchnahme von Deponieraum führen. Eine stoffliche Verwertung von Abfällen soll ohne die Gefahr eines diffusen Schadstoffaustrages in die Umwelt ermöglicht werden.

Anforderungen an die stoffliche Verwertung von mineralischen Reststoffen/Abfällen – Technische Regeln –, Mitteilungen der Länderarbeitsgemeinschaft Abfall (LAGA) 20, 6. 11. 1997

8.3.3 Öffentliche F+E-Initiativen

Modelhafte Sanierung von Altlasten - MOSAL

Von 1989 bis 2000 unterstützte das BMBF die großtechnische Anwendung von Verfahren und Technologien sowie die Weiterentwicklung des Standes der Technik an 13 modellhaften Altlastenstandorten in der Bundesrepublik. Es handelt sich um repräsentative Altlastenstandorte bezüglich Schadstoffspektrum, geologischer Verhältnisse, Gefährdungspotential, ehemaliger Nutzung etc.

Die Anwendung von Verfahrenskombinationen, die Minimierung von Reststoffen sowie der Wiedereinbau bzw. die Wiederverwertung des dekontaminierten Bodens waren dabei von wesentlichem Interesse.

Ziel dieser Fördermaßnahme war es, neue Sanierungstechniken, wie z.B. Bodenwaschverfahren, biologische *In situ*- und *On site*-Verfahren oder thermische Verfahren "Vor Ort" (*in situ* und *on site*) modellhaft zu erproben und zu bewerten. Getestet wurden folgende technische Neuentwicklungen von Sanierungsfirmen unter den Praxisbedingungen unterschiedlicher modellhafter Standorte:

- Bodenwäschen für die Entfernung von Dioxinen/Furanen, Schwermetallen, PAK, TNT, Hg
- Thermische Verfahren zur Entfernung von PAK, Dioxinen, Hg, TNT
- Biologische Verfahren zur Entfernung von MKW, PAK-Mischböden, Dioxinen
- Bodenluftabsaugung zur Entfernung von CKW

sowie verschiedene Kombinationen dieser Verfahren.

Eine Zusammenfassung und übergreifende Auswertung der Arbeiten auf den Standorten ist als CD beim Umweltbundesamt (<http://www.umweltbundesamt.de>) kostenfrei erhältlich.

Bilaterale Zusammenarbeit: BMBF - U.S. EPA

Seit vielen Jahren kooperieren die Bundesrepublik Deutschland und die Vereinigten Staaten von Amerika erfolgreich im Umweltschutz. Diese Kooperation wurde im April 1990 durch den Abschluss einer bilateralen Vereinbarung zwischen dem damaligen Bundesministerium für Forschung und Technologie (heute: Bundesministerium für Bildung und Forschung, BMBF) und der United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) auf dem Gebiet der Altlastensanierung weiter intensiviert. Im Rahmen dieser Zusammenarbeit wurden erstmals Dekontaminationsverfahren gemeinsam von deutschen und amerikanischen Experten getestet und bewertet.

In der ersten Phase der Kooperation von 1991 bis 1996 stand das Erfassen und das Verständnis für die Herangehensweise des Partners an die Bewertung von Dekontaminationsverfahren im Vordergrund. Es wurden gemeinsam 10 innovative Dekontaminationsverfahren, orientiert am vorhandenen amerikanischen Standard des SITE-Programmes der U.S. EPA, in den USA und Deutschland getestet.

An das bis dahin bearbeitete Programm der Phase 1 (bis 1996) schloss sich eine zweite Phase (bis 2000) an, in der ein deutscher Qualitätsstandard (Verfahrensanweisung, Leitfaden) für die Tests von Dekontaminationsanlagen (Empfehlung für den DETAD (s.u.)) erarbeitet und erprobt werden sollte. Ferner sollten gemeinsam die Ansätze und Grundzüge eines Standards für die Langzeitüberwachung sanierter Altlasten und zu überwachender Verdachtsflächen erarbeitet werden.

Das gemeinsame Arbeitsprogramm der deutschen und amerikanischen Partner für die Phase II (1996 bis 2000) gliederte sich in sechs Unterpunkte:

1. Empfehlungen für einen "Deutscher-Technikstandard Altlasten-Dekontamination" (DETAD) in Form eines Leitfadens für die Tests von Dekontaminationsanlagen.
2. Vorbereitung von Anlagentests (Zielformulierung, Aufstellung eines Test- und Beprobungsprogramms, Auswahl der Analyse-/Meßmethoden).
3. Test von je 5 Dekontaminationsverfahren in den USA und der Bundesrepublik Deutschland unter paralleler Anwendung des U.S.-Standards gemäß SITE-Programm bzw. dem neu entwickelten DETAD.
4. Bewertung der Leistungsfähigkeit der getesteten Dekontaminationsverfahren auf Basis der gewonnenen Daten.
5. Gemeinsame Bewertung der DETAD- und U.S.-Ansätze beim Test der Dekontaminationsverfahren.
6. Entwicklung gemeinsamer Ansätze für Standards zum Langzeitmonitoring belasteter Flächen auf Basis der Ansätze zum Qualitätsmanagement auf deutscher und amerikanischer Seite.

Mit dem Deutschen Monitoringstandard Altlasten-Sicherung (DEMAS) wurde ein Konzept entwickelt, mit dessen Hilfe alle am Prozess der Altlastensanierung Beteiligten bei der Planung und Durchführung von im Einzelfall erforderlichen Überwachungen in der Nachsorgephase und den damit verbundenen Schritten unterstützt werden.

Der dreibändige Abschlußbericht zu Phase I ist in der "Grün-weißen Reihe" beim Umweltbundesamt (<http://www.umweltbundesamt.de>) kostenfrei zu beziehen. Die CD mit den Ergebnissen der Phase II ist ebenfalls kostenfrei beim Umweltbundesamt erhältlich.

Sonderforschungsbereich 188 - Reinigung kontaminierter Böden

1989 wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) ein Sonderforschungsbereich (SFB) "Reinigung kontaminierter Böden" eingerichtet. Im Rahmen dieses SFB erforschten 16 Teilprojekte einschließlich eines übergeordneten Projektes der TU Hamburg-Harburg (Sprecherhochschule) und der Universität Hamburg die Grundlagen für Verfahren zur Sanierung kontaminierter Böden.

Der SFB wurde in den ersten drei Phasen für den Zeitraum vom 01.01.1989 bis 31.12.1997 gefördert. Die vierte und letzte Förderungsperiode endete am 31.12.2000.

Schwerpunkte im SFB waren neben der Untersuchung, Entwicklung und Optimierung von Reinigungsverfahren vor allem die analytischen und meßtechnischen Verfahren zu optimieren, welche die schnelle und umfassende Beschreibung von Prozessen ermöglichen. Wichtig waren in diesem Zusammenhang auch die Untersuchungen zur Definition von Reinigungszielen. Um diese zu erreichen, sind u.a. Schadstoffbilanzen zu erstellen, ökotoxikologische Grenzwerte zu erarbeiten und die Schadstoffverfügbarkeit für Mikroorganismen zu quantifizieren.

Weitere Informationen über den Sonderforschungsbereich 188 sind über den ehemaligen Sprecher des SFB (Prof. Dr.-Ing. Rainer Stegmann, Technische Universität Hamburg-Harburg, Harburger Schloßstraße 37, 21079 Hamburg) und das Internet (<http://www.tu-harburg.de/aws/sfb/sfb188.html>) erhältlich.

8.3.4 Datenbanken

Technologieregister zur Sanierung von Altlasten - TERESA

Die Datenbank TERESA 2.1 (Technologieregister zur Sanierung von Altlasten) gibt einen Überblick über 116 Sanierungsfirmen, beschreibt 189 Sanierungsverfahren und verzeichnet 680 Referenzen für die Altlastensanierung bzw. das Flächenrecycling.

In der Datenbank wird unterschieden zwischen Firmendaten, Sanierungsverfahren, deren Leistungsfähigkeit und schadstoffspezifischer Eignung sowie Referenzen.

Die Datenbank TERESA 2.1 wird als CD vom Umweltbundesamt herausgegeben (<http://www.umweltbundesamt.de>).

Stoffdatenbank für altlastenrelevante Schadstoffe (STARS)

Die Stoffdatenbank STARS wurde zur Sicherstellung einer hohen Bewertungsqualität der Gefährdungsabschätzung von Altlasten sowie der Vergleichbarkeit und Verfügbarkeit von speziell für die Altlastenbearbeitung erforderlichen Daten aufgebaut. Der Aufbau erfolgte in Zusammenarbeit zwischen dem Umweltbundesamt (UBA) und der Oberfinanzdirektion (OFD) Hannover, die im Auftrag des Bundesministeriums für Verkehr, Bau und Wohnungswesen (BMVBW) für die Altlastenbearbeitung auf Liegenschaften des Bundes zuständig ist. Mit der Entwicklung und Realisierung des ALIS wurde die Dresdener Firma Stoller Ingenieurtechnik GmbH (SIG) beauftragt.

In der STARS werden zur Zeit Daten für ca. 1000 Stoffe abgebildet, zu denen ca. 60.000 Merkmalsangaben recherchiert und abgefragt werden können. Die Merkmalsangaben der Stoffe sind zu folgenden Sachgebieten verfügbar:

- physikalisch-chemische Stoffparameter (wie u.a. Dichte, Verteilungskoeffizient [log P], Sorptionskoeffizient, Löslichkeit)
- Umweltverhalten (Abbauverhalten und Stabilität im Wasser, Boden und unter Lichteinwirkung, Bioakkumulation und Biomagnifikation),

- Ökotoxikologie (Toxizität gegenüber aquatischen Pflanzen, Vertebraten, Invertebraten, gegenüber terrestrischen höheren Pflanzen, Bodenorganismen, anderen Spezies und gegenüber Mikroorganismen)
- Toxikologie (Human- und Säugetiertoxizität, Umwelttoxizität, Akute Toxizität, Subakute, chronische und subchronische Toxizität, Tolerable Körperdosen, Gentoxizität, Einstufung der Kanzerogenität, Exposition des Menschen)
- stoffspezifische Regelwerke (Gefahrstoffverordnung (GefStoffV); Trinkwasserverordnung (TrinkwV), Wassergefährdungsklasse (WGK), Maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK), Technische Richtkonzentration (TRK), Biologischer Arbeitsplatztoleranzwert (BAT))
- Arbeitssicherheit (Gefährliche Reaktionen, Gesundheitsgefährdungen, Persönliche Schutzmaßnahmen, Erste Hilfe)
- Bundes - Bodenschutz- und Altlastenverordnung (BBodSchV)
Vorsorge-, Prüf- und Maßnahmenwerte der BBodSchV und Prüfwerte aus dem Handbuch "Berechnung von Prüfwerten zur Bewertung von Altlasten" und die dazugehörigen Basisdaten Toxikologie in Tabellenform
- Analysenverfahren
- Listenwerte
Die Listen enthalten die mit Stand 1999 in den einzelnen Bundesländern, durch Gremien und andere Länder (Niederlande, Schweiz) eingeführten oder häufig herangezogenen Werte zur Beurteilung stofflicher Verunreinigungen im Boden und Wasser.

Im Internet wurde eine Demoversion der STARS bereitgestellt, die unter der Adresse: <http://www.stoller-dresden.de/stars.html> einsehbar ist.

Datenquellen der STARS sind die im UBA vorliegende Stoffdatensammlung "Gemeinsamer Stoffdatenpool des Bundes und der Länder (GSBL)", sowie die Schadstoffinformationen des BMVBW für die Anwendung der baufachlichen "Richtlinien für die Planung und Ausführung der Sicherung und Sanierung belasteter Böden" für die Liegenschaften des Bundes. Die Daten werden jeweils mit der Originalquelle zitiert.

Die STARS ist Bestandteil des Altlasten-Informationssystems (ALIS). Über entsprechend programmierte Schnittstellen ist die STARS mit den anderen ALIS-Modulen ALV (Datenbank Altlastverdachts- und Altlaststandorte) und der wissensbasierten Anwendung – Analysenplanung bei der Untersuchung von Altlasten XUMA-AMOR (eine gemeinsame Entwicklung von der Landesanstalt für Umweltschutz (LfU) Baden-Württemberg, des Sächsischen Landesamtes für Umweltschutz und Geologie (LfUG), des Landesumweltamtes (LUA) Nordrhein-Westfalen und des BMU/Umweltbundesamtes) verbunden. Die realisierte Schnittstelle ermöglicht beispielsweise nach einer Abfrage der an einem ausgewählten Standort ausgewiesenen Schadstoffe (historische Erkundung und Untersuchung) in der Datenbank ALV, die anschließende Ausweisung der zu berücksichtigenden Schadstoffeigenschaften aus dem Datenbestand der STARS.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.1 Verbundvorhaben 1: Koordinierung des Forschungsverbundes und Erstellung eines Leitfadens

Dr. Dieter Sell

Dr. Jochen Michels

Dr. Thomas Track

Ulrich Gehrke

DECHEMA

Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V.

Karl-Winnacker-Institut

Theodor-Heuss-Allee 25

60486 Frankfurt am Main

Förderkennzeichen: 1491064

Laufzeit: 01.11.1996 – 31.05.2001

1 Zusammenfassung und Zielsetzung

Im BMBF-Forschungsverbund "Biologische Verfahren zur Bodensanierung" wurde die Abbaubarkeit beispielhafter persistenter Kontaminationen auf Altlastenböden untersucht. Dazu zählen polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), die man im Boden ehemaliger Kokereien und Gaswerke findet, Rückstände der Sprengstoffproduktion, wie beispielsweise 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) oder Hexogen (RDX) sowie chlorierte Kohlenwasserstoffe (TCE, PER), die Boden und Grundwasser von ehemaligen Raffinerie-Standorten belasten.

Biologische Bodensanierungsverfahren mußten sich bislang mit der thermischen Bodenbehandlung messen lassen: Ein Schadstoff sollte möglichst vollständig zu Kohlendioxyd, Wasser und anderen anorganischen Substanzen "verbrannt" werden. Auch die Wissenschaft folgte lange diesem Prinzip, indem Bakterien gesucht und kultiviert wurden, die im Labor Schadstoffe mineralisieren können. Aber ein biologisch aktiver Boden hat nicht das Bestreben organische Substanzen zu verbrennen, sondern zu verwerten. Das ist das Grundprinzip der Kompostierung. Im Forschungsverbund wurde dies erkannt und damit die Humifizierung von Schadstoffen als Verfahrensziel bei einer biologischen Sanierung vor die Mineralisierung gestellt.

Das Ziel des Forschungsverbundes war die schnelle Übertragung von Erkenntnissen der Grundlagenforschung zum biologischen Abbau von Schadstoffen im Boden in Technologien zur nachhaltigen und überprüfbaren biologischen Sanierung von Altlastenstandorten. Der BMBF-Forschungsverbund bestand aus über 40 Einzelprojekten, die in sieben Verbundvorhaben organisiert waren (s. Abb. 1). Er wurde vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) finanziert und vom Projektträger Abfallwirtschaft und Altlastensanierung (PT AWAS) im Umweltbundesamt betreut. Der Forschungsverbund wurde von der Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e.V. (DECHEMA, Frankfurt/Main) mit dem Ziel koordiniert, den vorliegenden Leitfaden zur biologischen Bodensanierung zu erstellen.

Durch die enge Verknüpfung der Projekte aus unterschiedlichen Disziplinen im Forschungsverbund konnten Wissenslücken schnell identifiziert und geschlossen werden: Das Verbundvorhaben 6 "Maßstabsgerechte Erprobung in Clausthal-Zellerfeld" baute auf den Erkenntnissen der Verfahrensentwickler aus dem Verbundvorhaben 3 "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten" auf. Diese profitierten wiederum von dem "Feed-Back" aus den Feldversuchen. Entscheidend war auch die wissenschaftliche Begleituntersuchung: Die im Verbundvorhaben 4 "Ökotoxikologische Testbatterien" entwickelten Methoden sollten einerseits die Qualität der Feldversuche sichern, andererseits konnten sie erst an der "Maßstabsgerechten Erprobung" evaluiert werden. Die notwendigen Verknüpfungen wurden hier durch die Experimente zum "Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von gebundenen Rückständen" im Verbundvorhaben 5 geschaffen.

Quasi das Vorbild dieses Forschungsverbundes war das Verbundvorhaben 2 "Humifizierung von PAK" gewesen, weil es bereits diesen interdisziplinären Ansatz zur Nachhaltigkeitsprüfung verfolgte. Das Verbundvorhaben endete bereits 1997, so daß in diesem Kapitel 9 die Ergebnisdarstellungen der einzelnen Projekte fehlen (s. Abb. 2). Die Erkenntnisse, die aus diesem Verbundvorhaben gewonnen wurden, sind allerdings im Forschungsverbund erhalten geblieben und auch in den Leitfaden eingeflossen, da viele Kollegen im Rahmen anderen Verbundvorhaben weitergearbeitet haben.

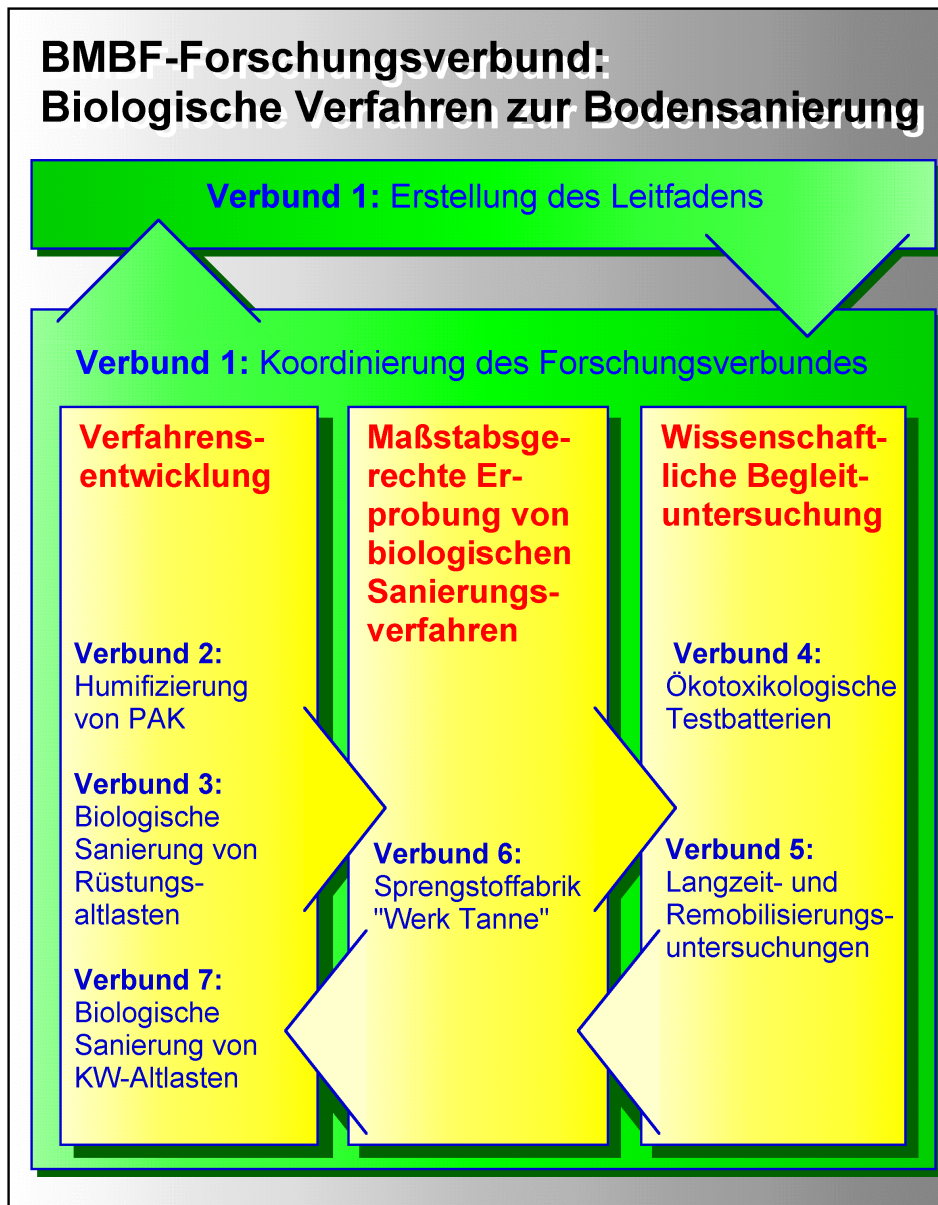


Abb. 1: Inhaltliche Struktur des Forschungsverbundes. Die Überlappungen kennzeichnen die Kommunikationswege.

2 Struktur des Forschungsverbundes

2.1 Verfahrensentwicklung

Spontane biologische Prozesse der Selbstreinigung laufen im Boden aus vielen Gründen nur sehr langsam ab. Selten liegt das daran, daß die zur Reinigung befähigten Mikroorganismen nicht vorhanden sind. Zumeist werden für den Abbau bestimmte Bedingungen benötigt, die im Boden nicht oder nicht optimal vorliegen. Zu den wichtigeren Faktoren zählen:

Redoxverhältnisse. Das Redoxpotential und damit das Mikrobenspektrum werden durch die An- bzw. Abwesenheit von Sauerstoff beeinflusst. Außerdem werden bevorzugte Abbauewege und -leistungen über das Redoxpotential gesteuert (Thermodynamik).

pH-Wert. Redoxpotential und pH-Wert hängen unmittelbar miteinander zusammen. Darüber hinaus haben Mikroorganismen und Enzyme pH-abhängige Aktivitäts-Optima.

Bioverfügbarkeit. Viele Schadstoffe sind in Wasser nur schwer löslich, an die Bodenmatrix sorbiert oder aus Mikroporen nur schwer mobilisierbar. Häufig liegen die Kontaminanten auch als Kristalle oder gar als Brocken im Boden vor. Dann ist der Abbau stark eingeschränkt.

Wassergehalt. Der Wassergehalt beeinflusst die Sauerstoffdiffusion, Schadstofffreisetzung und -verteilung. Die Aktivität von Mikroorganismen ist ebenfalls abhängig vom Wassergehalt.

Durch intensive Grundlagenforschung konnten in den Verbundvorhaben zur Verfahrensentwicklung (Verbundvorhaben 2, 3 und 7; siehe Abb. 1) Bedingungen für eine nachhaltige und effiziente biologische Sanierung im Boden ermittelt werden. In erster Linie gehörte dazu die biochemische Untersuchung der Abbauewege. Durch Metaboliten- und Produktidentifikation konnten Stoffwechselwege definiert und bilanziert werden. Dabei wurden auch notwendige Cosubstrate bzw. Elektronendonatoren und -akzeptoren identifiziert.

Diese Erkenntnisse wurden genutzt, um

- eine Stimulation der autochthonen Mikrobenflora und damit eine Optimierung der Reinigungsleistung durch einen gesteuerten biologischen Prozeß im Boden zu erreichen.
- gezüchtete, nicht genetisch veränderte Mikroorganismen mit besonderen Abbauleistungen im Boden etablieren zu können. Ein erfolgreiches Beispiel hierfür war die Einbringung von weißfäuleerregenden oder streuschichtbewohnenden Pilzen in den Boden, die mit Hilfe eines besonderen Enzymsystems auch schwer abbaubare Kontaminanten angreifen.
- eine Grundlage für die Bioremediation mit Pflanzen (Phytoremediation) zu schaffen. Diese eignet sich besonders für großflächige, niedrig kontaminierte Bereiche. Neben organischen Kontaminationen kann die Phytoremediation auch Schwermetalle in Böden abreichern.

Der Forschungsverbund hat erreicht, daß heute die Humifizierung von Schadstoffen die Grundlage der Verfahren zur biologischen Sanierung von kontaminiertem Boden ist, nicht deren Mineralisierung. Organische Bodenkontaminationen werden bei diesem Verfahrensprinzip durch die biologischen Prozesse zerlegt und durch Einbindung in Humus umgewandelt.

2.2 Maßstabsgerechte Erprobung

Die biologischen Verfahren zum Abbau von Explosivstoffen, die im Verbundvorhaben 3 "Biologische Sanierung von Rüstungsaltlasten" entwickelt wurden, wurden schließlich maßstabsgerecht auf dem Gelände der ehemaligen Sprengstofffabrik "Werk Tanne" getestet. Die Versuchsanlagen wurden am 6. Mai 1998 im Rahmen eines Statusseminars des Forschungsverbundes durch das BMBF eröffnet.

Die Umsetzung der Laborergebnisse in großtechnische Sanierungen wurde genutzt, um auch zu einer ökonomischen Bewertung der biologischen Verfahren zu gelangen. Dabei wurden Maßstabseffekte, Sanierungszeiträume, Sanierungszielwerte und die Produktverwertung bei

der Beurteilung berücksichtigt. So wurden erfolgversprechende Methoden einer sanften Umweltbiotechnik zur Marktreife weiterentwickelt.

Wie angesprochen war auch die Frage der Produktverwertung für die ökonomische – und auch die ökologische – Bewertung der Sanierungsverfahren relevant. Durch das intensive wissenschaftliche Begleitprogramm zur Erfolgskontrolle wurde die Transparenz der biologischen Verfahren erhöht, und die Genehmigungsbehörden erhielten Entscheidungssicherheit. Mit dieser Basis konnte erstmals biologisch gereinigtes, vormals TNT-kontaminiertes Bodenmaterial am Standort wieder eingebaut werden, was den vollen Erfolg der maßstabsgerechten Erprobung nur unterstreicht.

2.3 Wissenschaftliche Begleituntersuchungen

Die Beurteilung des Sanierungserfolges im "Werk Tanne" war von der Erfolgskontrolle abhängig. Die chemische Analytik war dazu zwar notwendig aber nicht ausreichend, da diese nur das Verschwinden der Schadstoffe während der biologischen Bodensanierung nachweisen konnte. Bei den komplexen Vorgängen im Boden konnte sie aber nicht deren Verbleib dokumentieren. Im Forschungsverbund wurde deshalb im Bereich der wissenschaftlichen Begleituntersuchung der Nachweis der nachhaltigen Detoxifizierung biologisch sanierter Böden untersucht.

Das Verbundvorhaben 4 "Ökotoxikologische Testbatterien" hat Tests an Böden mit Bodenorganismen, also mit Pflanzen, Bakterien, Würmern und Insekten optimiert, um ganz generell einen sanierten Boden als giftig oder ungiftig einordnen zu können. Untersucht wurden dabei nicht nur die Rückhaltefunktion des Bodens, sondern auch die Lebensraumfunktion mit den verschiedenen trophischen Ebenen. Die Mehrzahl dieser Tests waren bereits in der Chemikaliertestung etabliert, jedoch mußten sie an die Problematik von schadstoffbelasteten oder sanierten Böden angepaßt werden.

Das Verbundvorhaben 5 zum Langzeit- und Remobilisierungsverhalten beschäftigte sich mit dem Verbleib der TNT- und PAK-Metabolite während der Bodensanierung. Da diese durch Ausbildung kovalenter Bindungen in die organische Bodenfraktion eingebunden werden, können die Vorgänge mit bekannten Reaktionen der Humusbildung verglichen werden. Die sog. "nicht extrahierbaren Rückstände" sind auch mit drastischen chemischen Extraktionsmethoden nicht mehr herauslösbar. Die Generierung derselben erfolgte im Labor in enger Absprache mit den Verfahrenserprobern, um möglichst authentisches Material zu erhalten. Mit Hilfe verschiedener Extraktionsversuche und Klimasimulationen wurde das Remobilisierungsverhalten untersucht. Unterstützt wurde diese Charakterisierung durch sehr umfangreiche Strukturanalysen und Bilanzierungen der gebundenen Rückstände mit Hilfe isotopenmarkierter Verbindungen im Boden.

2.4 Koordinierung des Forschungsverbundes und Entwicklung des Leitfadens

Die Gesamtkoordinierung des Forschungsverbundes führte das Projektmanagement durch und förderte so die Arbeiten des Forschungsverbundes. Daneben wurden Literatur- und Patentrecherchen durchgeführt. Die Gesamtkoordinierung vertrat den Forschungsverbund in der Öffentlichkeit und stellte die Kommunikation zu relevanten Fachgruppen sicher.

Der vorliegende Leitfaden wurde von externen Autoren und Mitwirkenden des Forschungsverbundes gleichermaßen erstellt, weil der Leitfaden den interdisziplinären Ansatz der biologischen Bodensanierung durch ein weites Themenspektrum widerspiegeln soll. Eine wesentliche und zeitintensive Aufgabe der Gesamtkoordinierung bestand nun darin, die Informationen in den einzelnen Kapiteln im Kontext des Gesamtwerkes abzustimmen und auch effektiv miteinander zu verknüpfen, um so dem Leser die Zusammenhänge transparent vermitteln zu können. Ein Werkzeug dazu ist die vorliegende CD-ROM, mit der sich während des Lesens alle Verknüpfungen direkt anwählen lassen. Dazu wurden eigene Routinen für den Adobe Acrobat in Visual Basic geschrieben, um die ca. 5.000 Verknüpfungen verwalten zu können. Das Layout des Leitfadens ist in klassischem Stil gehalten und ist mit den gewählten Schriftarten für das Lesen am Bildschirm wie im Buch gleichermaßen geeignet.

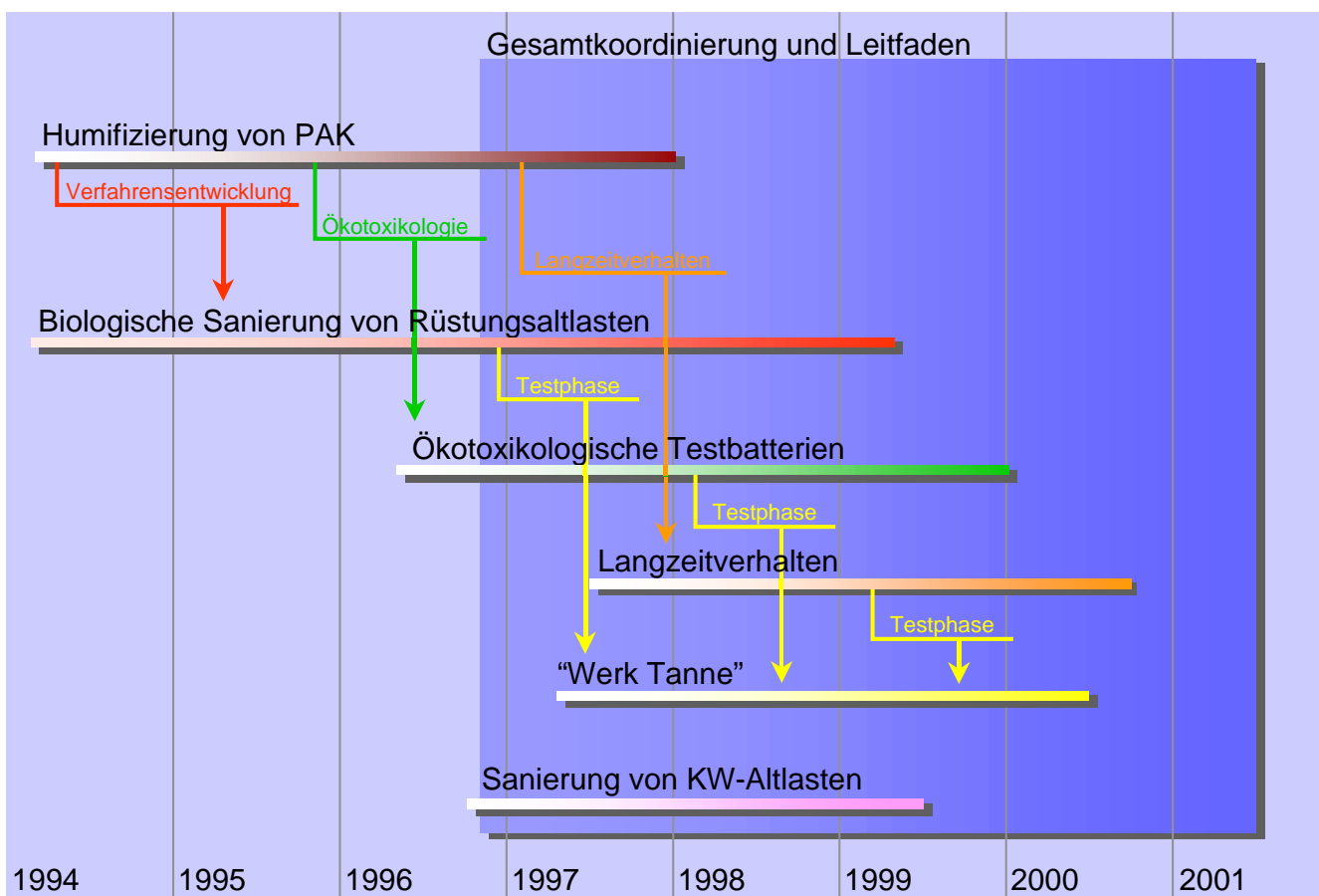


Abb. 2: Zeitliche Struktur des Forschungsverbundes. Die einzelnen Elemente "Verfahrensentwicklung", "Ökotoxikologie" und "Langzeitverhalten" hatten sich bereits im Verbundvorhaben 2 "Humifizierung von PAK" bewährt. Die maßstabsgerechte Erprobung im "Werk Tanne" war schließlich das Testfeld für diese drei Elemente.

3 Eigene Veröffentlichungen

Vorträge:

Vorstellung des Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung". Statusseminar des BMBF-Forschungsverbundes "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten", Umweltbundesamt Berlin, 27. Februar 1997.

Vorstellung des Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung". Fachgespräch des BMBF-Forschungsverbundes "Ökotoxikologische Testbatterien", Braunschweig, 03. März 1997.

Vorstellung des Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung". VAAM-Frühjahrstagung 1997, Hamburg, 18. März 1997.

Vorstellung des Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung". Interdisziplinärer Arbeitskreis Umweltbiotechnologie-Boden, Universität Stuttgart, 14. Mai 1997.

Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten. Kolloquium beim SFB 188 "Reinigung kontaminierter Böden", Hamburg-Harburg, 23. Mai 1997.

Forschungsverbund "Biologische Verfahren zur Bodensanierung". Innovationsforum 97, Messe Leipzig, 16. September 1997.

Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten. Fachseminar Biologische Bodensanierung, Ruhr-Universität Bochum, 22. Oktober 1997.

Forschungsverbund "Biologische Verfahren zur Bodensanierung". Statusseminar des BMBF-Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", Clausthal-Zellerfeld, 06. Mai 1998.

Processes for the Bioremediation of soil, Presentation on the 17th Meeting of the "Japanese-German Panel for Research and Development of Environmental Technology", Forschungszentrum Karlsruhe, 18. November 1998.

Vortragsleitung des Themenblockes "Biologische Bodensanierung" im Fachprogramm der "TerrTec 1999", Leipzig, 04. März 1999.

BMBF-Forschungsverbund Biologische Verfahren zur Bodensanierung. Vortrag auf der Fachtagung "Biotechnologie im Umweltschutz, Bioremediation: Entwicklungsstand-Anwendungen-Perspektiven", ARGE EXPO 2000, Munster 09.-12. Mai 1999.

Moderation des Vortragsblocks "Ziele biologischer Sanierungsverfahren" auf der Fachtagung "Bioremediation: Entwicklungsstand-Anwendungen-Perspektiven, Fachtagung Biotechnologie im Umweltschutz", ARGE EXPO 2000, Munster 09.-12. Mai 1999.

Moderation der Podiumsdiskussion auf der Fachtagung "Bioremediation: Entwicklungsstand-Anwendungen-Perspektiven, Fachtagung Biotechnologie im Umweltschutz", ARGE EXPO 2000, Munster 09.-12. Mai 1999.

I. Verfahrensentwicklung und Begleitforschung in der biologischen Bodenbehandlung, II. Maßstabsgerechte Erprobung biologischer Verfahren am Rüstungsalblasten-Standort "Werk Tanne" mit Erfolgskontrolle. Kolloquium der Arbeitsgruppe "Biologische Boden und Grundwassersanierung", Umweltbiotechnologisches Zentrum am Umweltforschungszentrum Halle-Leipzig, 25. Mai 1999.

BMBF-Forschungsverbund Biologische Verfahren zur Bodensanierung. Vortrag auf dem Fachseminar Biologische Bodensanierung, Ruhr-Universität-Bochum, 10. Juni 1999.

Field Assessment of Different Bioremediation Techniques for TNT Contaminated Soils. Presentation on the European Congress on Biotechnology, Brüssel, 12. Juli 1999.

BMBF-Forschungsverbund Biologische Verfahren zur Bodensanierung. Vortrag auf dem Statusseminar "Ökotoxikologische Testbatterien". Berlin, 01. Sep. 1999.

Field Assessment of Different Bioremediation Techniques for TNT Contaminated Soils At "Werk Tanne". Second International Symposium on Degradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives. Leesburg, VA, USA, 09. Sep. 1999.

BMBF Joint Research Group "Processes for the bioremediation of Soil". 12th General Environmental Technology Data Exchange Meeting 1999. Annexes No. DEA-A-94-GE-1311// -1520// -1521// -1522. Koblenz, 13. Sep. 1999.

BMBF-Forschungsverbund Biologische Verfahren zur Bodensanierung. 3. CPM-Fachtagung Kampfmittel- und Sprengstoffbeseitigung in Böden. Magdeburg, 06. Okt. 1999.

Vorstellung des Leitfadens Biologische Verfahren zur Bodensanierung. 2. Statusseminar des BMBF-Verbundvorhabens Langzeit und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen bei der biologischen Bodensanierung. Bremen, 22. Feb. 2000.

Aufgaben und Ziele des Forschungsverbundes Biologische Verfahren zur Bodensanierung. Erweiterte Projektbeiratssitzung des Verbundvorhabens Maßstabsgerechte Erprobung biologischer Sanierungsverfahren. Clausthal-Zellerfeld, 29. Mai 2000.

Approved Biological Treatment Technologies for the Sustainable Cleanup of TNT-Contaminated Soil. 2000 NATO/CCMS Pilot Study Meeting (Phase III). Evaluation of Demonstrated and Emerging Technologies for the Treatment of Contaminated Land and Groundwater. Hessischer Landtag, Wiesbaden 25. bis 30. Juni 2000.

Vortragsleitung des Satellitenseminars "Abandoned armament sites" im Rahmen der ConSoil 2000, Leipzig, 21. September 2000.

Targets and Results of the Joint Research Group "Processes for the bioremediation of Soil". Satellitenseminar "Abandoned armament sites" im Rahmen der ConSoil 2000, Leipzig, 21. September 2000.

Ökotoxikologische Untersuchungen im Rahmen des Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung". 18. Osnabrücker Umweltgespräche der Deutschen Bundesstiftung Umwelt "Toxikologische Bewertung von Böden - Neue Herausforderung für Bio-Assays", Osnabrück, 05. Dezember 2000.

Veröffentlichungen

- Michels, J.** 1997. Altlasten: Neue Wege der biologischen Bodensanierung, Umwelttechnik-Forum 3/97, 17-18.
- Michels, J.** 1997. Biologische Verfahren reinigen kontaminierte Böden, BioTec 5/97, 50-51.
- Michels, J. (Hrsg.).** 1997. Forschungsverbund Biologische Verfahren zur Bodensanierung. Eine Zusammenstellung der laufenden Projekte, 2. Auflage (zum Forschungsforum 97).
- Michels, J. (Hrsg.).** 1997. Forschungsverbund Biologische Verfahren zur Bodensanierung. Eine Zusammenstellung der laufenden Projekte, 3. aktualisierte Auflage, Grüne Reihe des BMBF.
- Michels, J. (Ed.).** 1997. Joint Research Group Processes for the Bioremediation of Soil, 1. Auflage Grüne Reihe des BMBF.
- Michels, J.** 1997. Biologische Verfahren zur Bodensanierung. In: Franzius, V., Brandt, E. (Hrsg.) Handbuch der Altlastensanierung, 10. Erg.-Lfg, 2. Aufl. Dezember 97, C. F. Müller Verlag, Heidelberg.
- Michels, J. (Hrsg.).** 1998, Forschungsverbund Biologische Verfahren zur Bodensanierung. Eine Zusammenstellung der laufenden Projekte, März 1998, Grün-weiße Reihe des BMBF.
- Michels, J. (Ed.),** 1998 Joint Research Group Processes for the Bioremediation of Soil, März 1998, Grün-weiße Reihe des BMBF.
- Michels, J.** 1998. Sprengstoff-Fabrik Werk Tanne. Umweltmagazin Dez. 98, 44-45.
- Michels, J.** 1999. Forschungsverbund "Biologische Verfahren zur Bodensanierung" In: Michels, J. und U. Gehrke (Hrsg.): BMBF-Statusseminar des Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", 06. Mai 1998, Tagungsband auf CD-ROM.
- Michels, J. und U. Gehrke (Hrsg.).** 1999. BMBF-Statusseminar des Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", 06. Mai 1998, Tagungsband auf CD-ROM.
- Gehrke, U. und J. Michels, (Hrsg.).** 1999. Forschungsverbund Biologische Verfahren zur Bodensanierung. Eine Zusammenstellung der laufenden Projekte, April 1999, Grün-weiße Reihe des BMBF.
- Gehrke, U. und J. Michels (Ed.).** 1999 Joint Research Group Processes for the Bioremediation of Soil. Compilation of Current Projects. April 1999, Grün-weiße Reihe des BMBF.
- Michels, J.** 1999. Forschungsverbund "Biologische Verfahren zur Bodensanierung" In: Michels, J. und U. Gehrke (Hrsg.): BMBF-Statusseminar des Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", 06. Mai 1998, Tagungsband auf CD-ROM.
- Dahn, A., A. Eschenbach, S. Fleischmann und J. Michels.** 1999. BMBF-Forschungsverbund "Biologische Verfahren zur Bodensanierung". In: S. Heiden, R. Erb, J. Warrelmann, und R. Dierstein (Hrsg.). Initiativen zum Umweltschutz 12. Biotechnologie im Umweltschutz. Bioremediation: Entwicklungsstand-Anwendungen-Perspektiven, Erich-Schmidt-Verlag, Berlin. S. 43 - 51.

Michels, J., U. Walter, R. Winterberg, A. Spreinat, and A. Dahn. 1999. Field Assessment of Different Bioremediation Techniques for TNT Contaminated Soils. Extended Abstracts, European Congress on Biotechnology, Brüssel, Beitrag Nr. 2987.

Michels, J., T. Track und U. Gehrke. 1999. Biologische Verfahren zur Bodensanierung – Fortschritte bei der Behandlung und Bewertung sprengstoffkontaminierter Böden.- UTA – Umwelt Technologie Aktuell.

Michels, J. 2000. Vorstellung des vorläufigen Leitfadens "Biologische Verfahren zur Bodensanierung". In Mahro, B., H. Mescher und Umweltbundesamt - Projektträger AWAS des BMBF (Hrsg.). 2000. Verbundvorhaben "Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen bei der biologischen Bodensanierung" - Beiträge beim 2. Statusseminar am 22.02.2000 an der Hochschule Bremen. Grün-Weiße Reihe des BMBF.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.2 Verbundvorhaben 3: Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten

Prof. Dr. Wolfgang Fritsche

Dr. Katrin Scheibner

Dipl.-Ing. Angela Herre

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Institut für Mikrobiologie

Lehrstuhl für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie

Philosophenweg 12

07743 Jena

Förderkennzeichen: 1450821 A2

Laufzeit: 01. 03. 1996 – 30. 04. 1999

1 Zum Erkenntnisstand der biologischen Sanierung von Rüstungsaltslasten

Schwerpunkt des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) seit 1993 geförderten Verbundvorhabens (VV) 3 "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten" war es, umfassende wissenschaftliche Erkenntnisse zum mikrobiellen Abbau von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) und seiner Metabolite zu gewinnen. Diese Forschungen schaffen wesentliche Grundlagen für die Erprobung biologischer Sanierungsverfahren, welche im VV 6 "Maßstabsgerechte Erprobung von biologischen Verfahren mit Erfolgskontrolle am Standort Werk Tanne bei Clausthal-Zellerfeld" praktisch umgesetzt und weiterentwickelt werden (siehe Kapitel 9.5 des Leitfadens).

Die wissenschaftlichen Beiträge und Lösungsansätze zur Eliminierung von TNT und sprengstoffspezifischen Verbindungen, den Hauptkontaminationen am Standort "Werk Tanne" in Clausthal-Zellerfeld, die in den einzelnen Teilvorhaben (TV) des VV 3 erarbeitet wurden, sind zudem stark vernetzt mit den Untersuchungen assoziierter, nicht zum VV gehörenden Partner. Zu ihnen gehören das Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart in enger Verbindung mit dem Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik der Fraunhofer-Gesellschaft in Stuttgart sowie die Firma Umweltschutz Nord, Ganderkesee.

Da TNT praktisch von allen Organismen metabolisiert werden kann, wurden in den acht TV des VV 3 sehr unterschiedliche Methoden zur biologischen Sanierung TNT-kontaminierter Böden entwickelt. Sie beruhen auf der folgenden drei Organismengruppen: Standorteigene Bakterienflora, zugesetzte Pilze und spezifische Pflanzen. Eine Zusammenfassung der inhaltlichen Strukturierung des VV 3 ist Tabelle 1 zu entnehmen.

In Anknüpfung an die Ergebnisse aus der Literatur zum biologischen Abbau von TNT und kongenerer Nitroaromaten, welche zu Beginn der Arbeiten 1993 vorlagen, ist ein bedeutender Erkenntniszuwachs innerhalb der TV erarbeitet worden.

Tab. 1: Teilvorhaben des Verbundvorhabens 3 "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten"

Teilvorhaben (Kapitel*)	Projekttitle der zweiten Förderperiode Bewilligungsempfänger
3.1 (9.2.1)	Entwicklung eines mikrobiologischen Sanierungsverfahrens am Beispiel des ehemaligen Sprengstoffwerkes "Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld <i>IABG, Niederlassung Berlin</i>
3.1.1 (9.2.2)	Aerob und anearob-aerobe Behandlung TNT-kontaminierter Böden vom Standort "Tanne" (Immobilisierung) <i>Universität Marburg, Bereich Umwelthygiene</i>
3.1.2 (9.2.3)	Anaerobe Extraktion in Perkolationsssäulen <i>Universität Oldenburg, Abteilung Mikrobiologie</i>
3.1.3 (9.2.4)	Naßchemische Behandlung von TNT-belasteten Prozeßwässern <i>Institut für SolarenergieforschungHameln, Außenstelle Hannover</i>
3.1.4 (9.2.5)	Technikumsversuche zur Optimierung und zum scale up der Sanierungsversuche <i>Plambeck ContraCon GmbH, Cuxhaven</i>
3.3 (9.2.6)	Kompostierung von Rüstungsaltslasten mit Weißfäulepilzen-Schadstoffbilanzierung und Qualität des sanierten Bodens <i>AWIA Umwelt (vormals WISSTRANS Umwelt) GmbH, Göttingen</i>
3.4 (9.2.7)	Bioremediation von TNT-belasteten Böden mit Pilzen; Untersuchungen zur Metabolisierung, Mineralisierung und Humifizierung <i>Universität Jena, Lehrstuhl f. Techn. Mikrobiologie</i>
3.5	Abbau der Sprengstoffe Hexyl und Hexogen in Boden und Wasser - Entwicklung von Verfahren zu Abbau und Bewertung <i>FZB Biotechnik GmbH Berlin</i>
3.6	Freilandversuche zur TNT-Dekontamination und ¹⁴ C-TNT-Aufnahme durch Gehölze <i>BBA für Land- und Forstwirtschaft, Berlin</i>
3.7 (9.2.8)	Aufnahme von TNT in krautige Pflanzen <i>Universität Marburg, FB Biologie</i>
3.8 (9.2.9)	Abbau der Sprengstoffe Hexogen und Hexyl durch Pilze <i>IABG, Ottobrunn</i>

*Kapitelnummer in diesem Leitfaden

2 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) - Ein Umweltschadstoff

Der ehemals sorglose Umgang mit der Natur bereitet heute große Probleme. Luft, Wasser und Boden sind vielerorts mit Schadstoffen belastet, sichtbare Destabilisierungen von Ökosystemen sind die Folge. Die Verantwortung für die kommenden Generationen erfordert gerade im Hinblick auf die Altlasten- und Abfallproblematik das Beschreiten neuer Wege, wie die Entwicklung ökologisch sinnvoller und ökonomisch vertretbarer Technologien. Zu den Problemstoffen bei der Sanierung von Altlasten gehören Sprengstoffe. In mehr als 70 Orten auf dem Gebiet der Bundesrepublik Deutschland wurden während der Zeit des Dritten Reichs Sprengmittel produziert. Dazu kommt eine große Anzahl von Munitionsabfüllanlagen und -depots. Boden und Wasserleiter solcher Areale bergen den Begriff Sprengstoff im wahrsten Sinne des Wortes in sich [31].

Die Herstellung von Sprengstoffen, vor allem von TNT, erreichte während des 2. Weltkrieges ein Ausmaß von ca. 55.000 Tonnen pro Jahr [4]. Allein im Werk "Tanne" in Clausthal-Zellerfeld wurden bis zur Zerstörung durch einen Bombenangriff im Oktober 1944 105.000 Tonnen TNT produziert [23]. Dazu kam eine durch die TNT-Wäschen bis zur Löslichkeitsgrenze (100 mg/l TNT) kontaminierte Abwassermenge von bis zu 40.000 m³ pro Tag. Diese sauren Abwässer wurden neutralisiert, direkt in Vorfluter oder Schlammteiche eingeleitet, bzw. versickerten auf dem Werksgelände oder wurden in Einzelfällen über Schluckbrunnen in den Untergrund verpreßt [27].

Die Herstellung von Nitroaromaten wird bis heute intensiv betrieben, da diese Verbindungen u.a. als Ausgangsprodukte für die industrielle Produktion von Anilinen, Pestiziden, Farbstoffen und nach wie vor von Sprengstoffen eingesetzt werden.

Die Auswirkungen von Nitroaromaten und insbesondere ihrer Folgeprodukte (Aminoderivate) auf die Umwelt wurden lange Zeit unterschätzt. Die meisten dieser Verbindungen sind polar und wurden in Routine-Analyseverfahren (z.B. Stripping-Technik, Extraktion mit unpolaren Lösungsmitteln) nicht erfaßt. Mit geeigneten Methoden (z.B. Adsorptionstechniken) lassen sie sich heute jedoch praktisch überall nachweisen; im Boden, in der Luft, in Oberflächenwässern und im Grundwasser [22].

TNT ruft beim Menschen nach inhalativer oder dermaler Aufnahme Vergiftungserscheinungen hervor. Eine Folge sind starke Veränderungen des Blutbildes [24]. Im Ergebnis von Tierversuchen wurde die Zuordnung von TNT in die Schadstoffgruppe III-B (DFG, 1990) getroffen, wonach sowohl TNT als auch die primären Reduktionsprodukte 2-Amino-4,6-dinitrotoluol (2-AmDNT) und 4-Amino-2,6-dinitrotoluol (4-AmDNT) als kanzerogen und mutagen gelten [38]. Aufgrund solcher Wirkungen ist das Interesse am Auftreten dieser Verbindungen, ihr ökologisches Verhalten und insbesondere an ihrer Eliminierung aus der Umwelt groß.

Der sicherste Weg, derartige Fremdstoffe aus der Umwelt zu entfernen, besteht in ihrem vollständigen Abbau zu Kohlendioxid (CO₂), Wasser und anorganischen Stickstoffverbindungen. Daneben kann auch die irreversible Festlegung der Nitroaromaten und ihrer Reduktionsprodukte in der Bodenhumusmatrix zu einer dauerhaften Detoxifikation führen [21].

3 Der TNT-Abbau als cometabolischer Prozeß

Forschungsschwerpunkt innerhalb der einzelnen Teilvorhaben (TV) des VV Rüstungsaltslasten war es, das biologische Potential zur Sanierung von Rüstungsaltslasten umfassend zu ermitteln. Daher wurden sowohl aerobe und anaerobe Bakterien, verschiedene Pilzgruppen wie auch Pflanzen in Rein- und Mischkulturen und autochthone Mikroorganismengemeinschaften untersucht. Für alle biologischen Systeme wurde nachgewiesen, daß TNT und kongenere Verbindungen nicht als einzige Kohlenstoff-, Stickstoff- oder Energiequelle genutzt werden können. Der Abbau erfolgt nur cometabolisch, d.h. in Gegenwart eines zum Wachstum verwertbaren Substrates, welches während der Umsetzung als Elektronendonator fungiert. Als Substrate bieten sich preiswerte Kohlenhydrate, wie z.B. die landwirtschaftlichen Nebenprodukte Stroh oder Melasse an [16]. Das Prinzip des Cometabolismus ist in Abb. 1 erläutert. Die Mikroorganismenzellen fungieren als komplexe Katalysatoren, die schrittweise TNT zu Amino-Nitrotoluolen reduzieren. Der primäre biologische Angriff erfolgt reduktiv, sowohl unter oxischen als auch unter anoxischen Bedingungen. Das trifft auch für den primären Angriff durch höhere Pflanzen zu. Als Substrat werden hier die bei der Photosynthese gebildeten Assimilate wirksam.

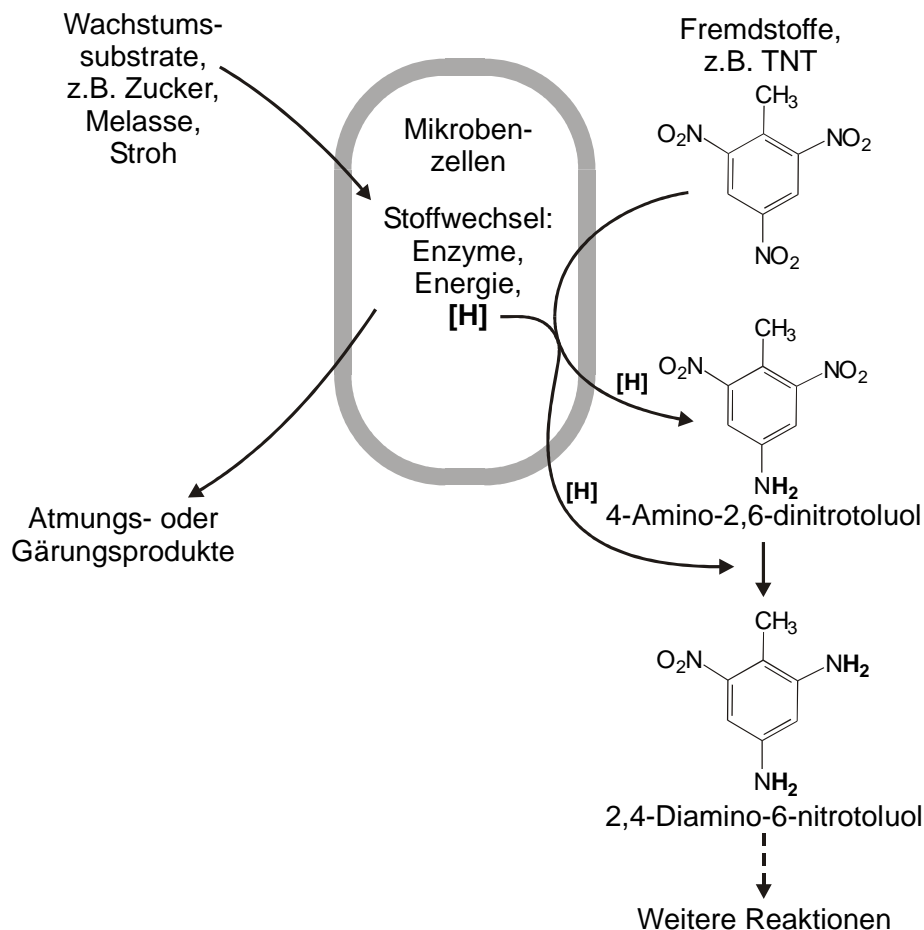


Abb. 1: Prinzip des mikrobiellen Cometabolismus

4 Das Potential zur TNT-Umsetzung bei Mikroorganismen

In den Partnerinstitutionen wurden vor allem zwei Organismengruppen bearbeitet, bakterielle Mischkulturen mit der Fähigkeit zum Wachstum unter anaeroben und aeroben Bedingungen sowie Pilze, die zu den Holz und Streu abbauenden Basidiomyceten gehören. Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Stoffwechselwege dieser Organismengruppen sind in Abb. 2 zusammengestellt.

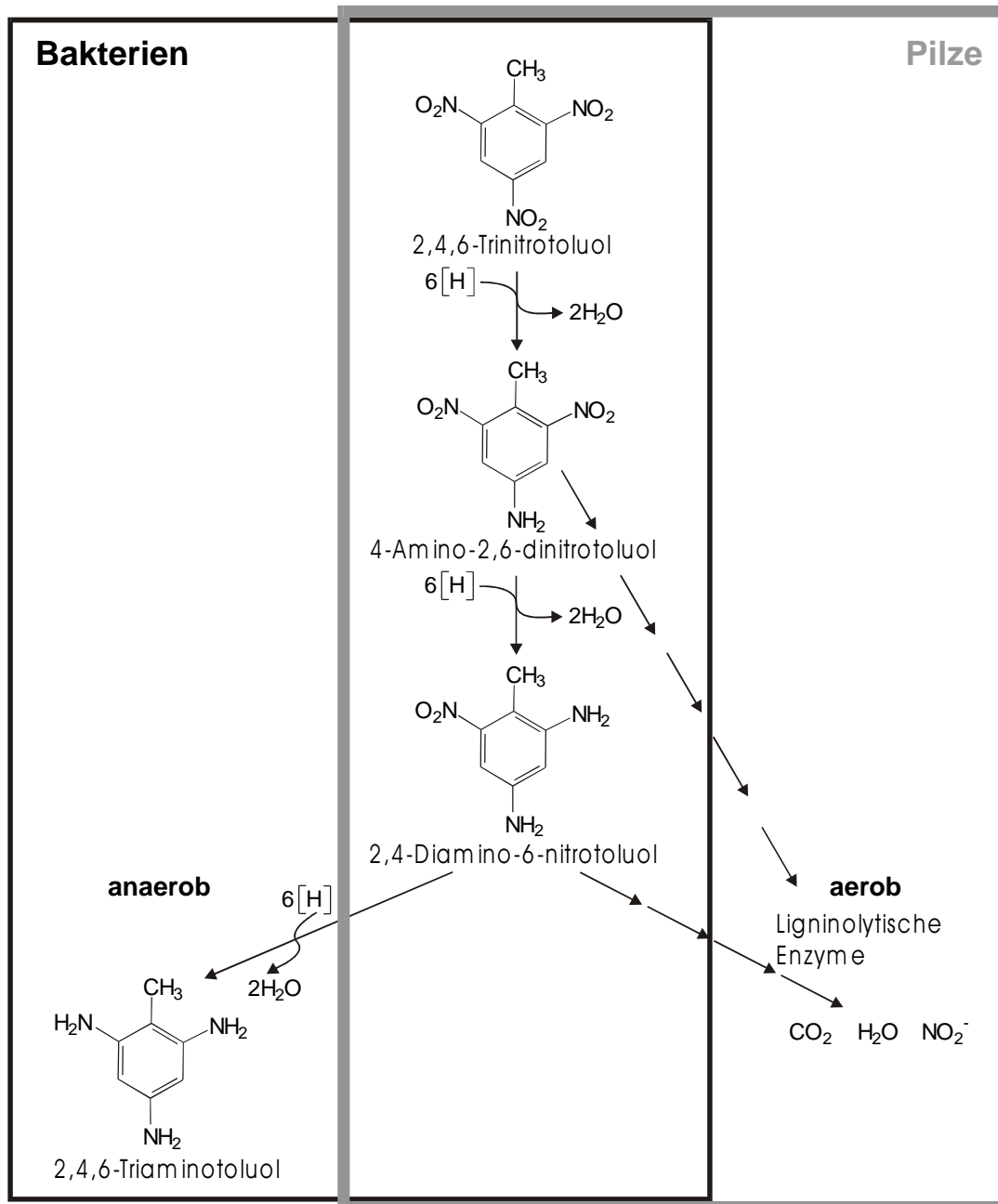


Abb. 2: Gemeinsamkeiten und Unterschiede des cometabolischen TNT-Abbaus durch Bakterien und Pilze

TNT ist aufgrund seiner chemischen Eigenschaften außerordentlich persistent gegenüber einem mikrobiellen Abbau. Neben dem durch die Nitrosubstituenten verursachten Fremdstoffcharakter erschwert der negativ induktive Effekt der Nitrogruppe den elektrophilen Angriff durch mikrobielle Oxygenasen. Dieser Effekt verursacht die Persistenz im Boden und wird mit steigender Zahl der Nitrosubstituenten verstärkt.

An der biologischen Umsetzung von TNT wird bereits seit mehr als 50 Jahren gearbeitet. Dabei wurde nachgewiesen, daß TNT zu Aminodinitrotoluol reduziert wird und Nitroso- und Hydroxylaminoderivate als Zwischenprodukte auftreten [25; 45]. Die TNT-Reduktion ist eine sowohl unter Bakterien als auch und Pilzen weit verbreitete Eigenschaft [2; 3; 7; 18; 32]. Als häufigste Reduktionsprodukte treten 2- und 4-AmDNT auf. In Abhängigkeit vom Redoxpotential wurden auch 2,6-Diamino-4-nitrotoluol (2,6-DAmNT) und 2,4-Diamino-6-nitrotoluol (2,4-DAmNT) gefunden [13; 15; 41]. Nur bei strikt anaeroben Bakterien wurde die Bildung von 2,4,6-Triaminotoluol (TAT) [8; 15; 26] gefunden. Diese vollständige TNT-Reduktion erfordert ausreichende Mengen eines oxidierbaren Substrates, das als Elektronen-Donator fungiert [33].

Oxidative Initialreaktionen durch Bakterien sind für Trinitroaromaten wie TNT oder Pikrat nicht bekannt [34].

5 TNT-Transformation durch Bakterien

Im Ergebnis der Arbeiten des Verbundvorhabens zeigte sich, daß Mikroorganismen verschiedene Wege zur Transformation von TNT nutzen, die verbreitetste Reaktion jedoch die initiale Reduktion von TNT ist. Es konnten bisher keine Ringspaltungsprodukte bei der bakteriellen TNT-Umsetzung nachgewiesen werden. Alle beschriebenen Intermediate bestehen aus einem aromatischen Grundkörper, der chemisch zumeist ein N-substituiertes Toluol darstellt.

Neben den in Abb. 2 dargestellten Abbauprodukten wird ein breites Spektrum weiterer Metabolite gebildet. Wesentliche Intermediate sind, basierend auf Erkenntnissen der Literatur und Untersuchungen der Verbundpartner, in Abb. 3 zusammengestellt.

Wie aus dieser Darstellung zu entnehmen, ist neben der TNT-Nitrogruppenreduktion zu Aminodinitrotoluol und Diaminonitrotoluol in neueren Arbeiten auch die Acylierung einer Aminogruppe von 2,4-DAmNT unter Bildung von 4-N-Formyl- oder 4-N-Acetylamino-2-amino-6-nitrotoluol gefunden worden [6; 28]. Außerdem konnte bei aeroben Organismen ein reduktiver Initialangriff am aromatischen System beobachtet werden. Für den hierbei gebildeten Hydrid-Meisenheimer Komplex wurde nachgewiesen, daß dieser einer weiteren Hydrid-Addition unterliegt und es zur Bildung eines protonierten Dihydrid-Meisenheimer Komplexes als dead-end Produkt kommt [44].

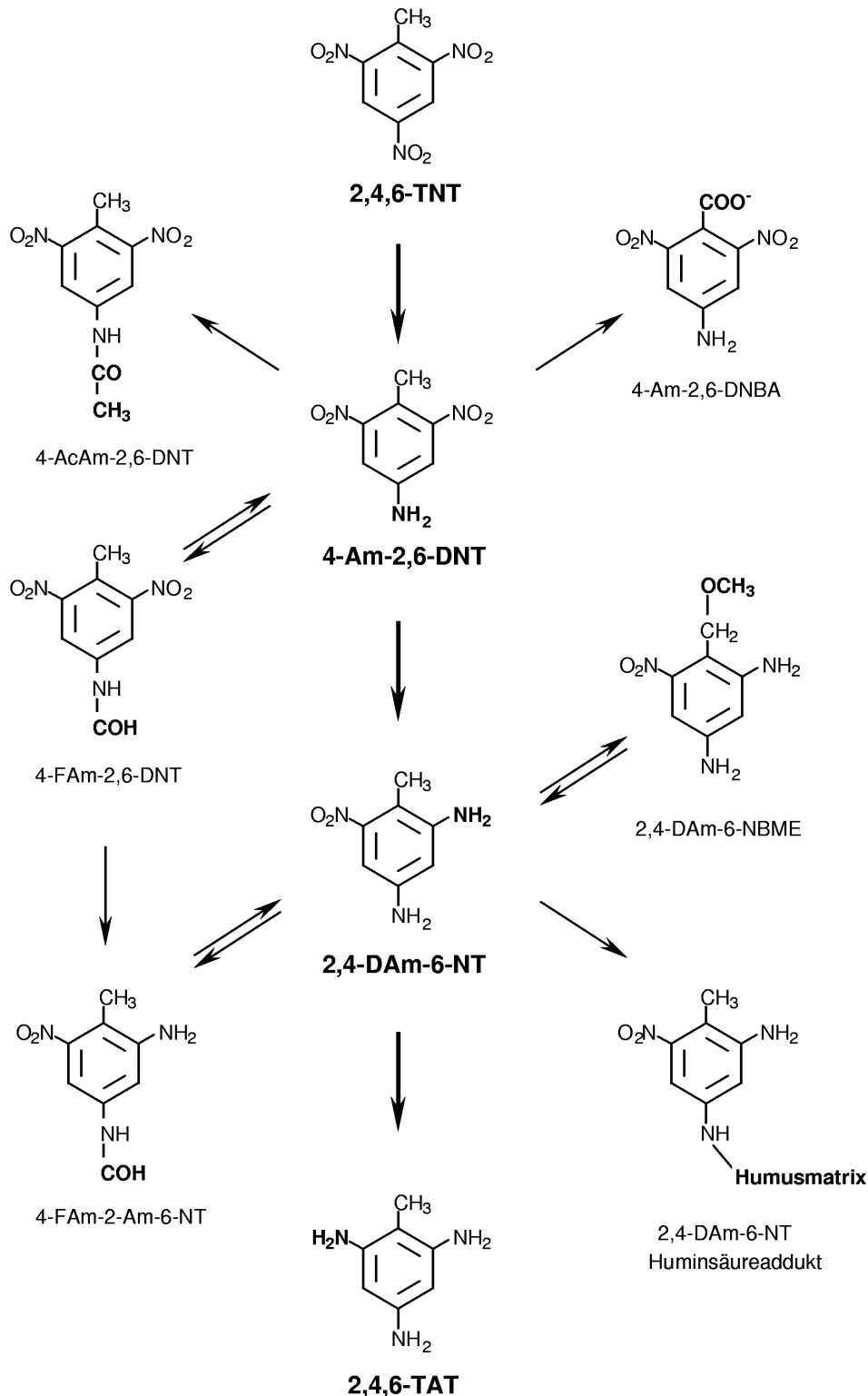


Abb. 3: Biogene Transferprodukte des TNT-Metabolismus [30]

Für die Methylgruppe des TNT ist nur deren Oxidation beschrieben. Als Transformationsprodukt konnte unter anderem 4-Amino-2,6-dinitrobenzoesäure nachgewiesen werden [43]. Dieses Ergebnis ist von besonderem Interesse, da erst kürzlich teilweise erhebliche Mengen an

2-Amino-4,6-dinitrobenzoesäure in Bodenproben des ehemaligen Sprengstoffwerkes "Tanne" in Clausthal-Zellerfeld nachgewiesen werden konnten [9].

Es wird deutlich, daß eine große Anzahl von Verbindungen bei der Sanierungsforschung berücksichtigt werden müssen. Zu den Metaboliten kommen an kontaminierten Standorten noch die aus der Produktion von TNT stammenden Zwischenprodukte hinzu.

Untersuchungen zur Mineralisierung von TNT durch Bakterien ergaben, daß ein Abbau von TNT zu CO₂ nur in geringem Umfang erfolgt [2; 3]. Auch die Untersuchung des TNT-Abbaus unter kombiniert anaerob/ aeroben Bedingungen führte zu keiner nennenswerten Mineralisierung durch Bakterien [1]. Eine effektive Mineralisierung des Sprengstoffs durch Bakterien erscheint bei dem derzeitigen Wissensstand unwahrscheinlich [5; 6; 14; 34].

6 TNT-Abbau durch Pilze

Veröffentlichungen zum Abbau aromatischer Verbindungen lassen den Schluß zu, daß speziell Weißfäulepilze durch ihr ligninolytisches Enzymsystem ein unspezifisches und dadurch wesentlich breiteres Potential zur Mineralisierung von persistenten Umweltschadstoffen besitzen als Bakterien [12].

Erste Versuche zur Mineralisierung von TNT durch Weißfäulepilze wurden 1990 mit *Phanerochaete chrysosporium* durchgeführt [11]. Die Unspezifität des ligninolytischen Enzymsystems des Pilzes bewirkte hier eine partielle Mineralisierung der Verbindung, allerdings blieb unklar, auf welche Weise die ligninolytischen Enzyme in den Abbauprozess involviert waren [28]. Der überwiegende Teil der Untersuchungen zum TNT-Abbau wurde mit dem Weißfäulepilz *P. chrysosporium* durchgeführt [11; 28; 29; 39; 40; 41]. Erst durch ein umfangreiches Screening- und Isolierungsprogramm innerhalb des TV 3.4 (s. Kapitel 9.2.7 dieses Leitfadens), wobei über 91 Pilzstämme aus 32 Gattungen getestet wurden, bestätigte sich, daß holzabbauende Basidiomyceten (u.a. *Bjerkandera adusta*, *Trametes versicolor*) allgemein die Fähigkeit besitzen, TNT zu mineralisieren [10; 35]. Erstmals konnte im Rahmen dieser Untersuchungen auch eine substantielle Mineralisierung von TNT durch streuzeretzende Basidiomyceten, u.a. *Stropharia rugosoannulata*, *Agrocybe praecox*, beobachtet werden, was für die potentielle Anwendbarkeit von Pilzen in der Bodensanierung von Bedeutung ist [17]. Die Umsetzung des TNT's bis zum Kohlendioxid erfolgt mehrstufig, wobei als erster Schritt die intrazelluläre Reduktion einer Nitrogruppe stattfindet [40], was auch bei den Bakterien zu beobachten ist. Die gebildeten Monoaminodinitrotoluole werden durch die Pilze ausgeschieden und damit für extrazelluläre Enzyme zugänglich [19]. Zunächst konnte nachgewiesen werden, daß das extrazelluläre Enzym Lignin-Peroxidase (LiP) entscheidend an der Mineralisierung der TNT-Reduktionsprodukte beteiligt ist [29]. Nach der Entdeckung gut TNT mineralisierender, aber LiP-negativer Pilze, wie *Stropharia rugosoannulata*, konzentrierte sich die Arbeit im TV 3.4 auf die Mangan-Peroxidase (MnP) [19; 20; 36; 37]. Es wurde gezeigt, daß die MnP die Reduktionsprodukte des TNT's effektiv zu mineralisieren vermag, wobei neben CO₂ ein komplexes Gemisch organischer Säuren entsteht [36; 20]. Selbst das oxidativ nur schwer angreifbare TNT-Molekül kann durch das MnP-System partiell zu CO₂ abgebaut werden [42].

7 Biostimulation und Bioaugmentation als Sanierungsprinzipien

Basierend auf diesen Ergebnissen wurden in den Einzelvorhaben des Forschungsverbundes "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten" zwei Verfahrensstrategien vorrangig bearbeitet, die kombinierten anaerob/aeroben Prozesse mit Bakterien und aerobe Prozesse mit ligninolytischen Pilzen. Beide Prinzipien wurden in verschiedener Weise zeitlich und räumlich variiert, was auch in den verschiedenen Termini der Prozesse zum Ausdruck kommt.

Die bakteriellen Prozesse wurden mit sogenannten autochthonen Bakterien, d.h. im natürlichen Habitat vorkommenden Bakterien durchgeführt. Ihre Entwicklung und Stoffwechselaktivität wurde durch Zusätze von Substraten stimuliert, daher der Terminus **Biostimulation**. Diese Substrate dienen einerseits als Nährstoffe für die autochthone Mikroorganismenflora und andererseits als Ausgangsmaterial für Kompostierungs- und Humifizierungsprozesse sowie zur Strukturverbesserung des Bodens. In enger Zusammenarbeit mit der IABG (Teilvorhaben TV 3.1, Kap. 9.2.1 dieses Leitfadens) wurde an der Phillips-Universität Marburg (TV 3.1.1, Kap. 9.2.2 dieses Leitfadens) ein biologisches Verfahren zur Sanierung Nitroaromaten-kontaminierter Böden mittels anaerob/aeroben Kompostierung entwickelt. Bei dieser Methode wird der kontaminierte Boden mit ca. 20 Gew. % eines organischen Materials vermischt und anschließend anaerob/aerob behandelt. Es konnte demonstriert werden, daß die unter anaeroben Bedingungen (erzeugt durch Komprimierung) gebildeten Metabolite in der aeroben Phase in die Humusmatrix eingebunden werden können. Eine Durchmischung des Bodens während beider Behandlungsphasen erwies sich dabei für die TNT-Reduktion und Humifizierung als förderlich. Der Verlauf der TNT- und Metabolitenkonzentration während dieser anaerob/aeroben Behandlung weist eine starke Abnahme des TNT-Gehaltes in den ersten 10 Tagen auf. Gleichzeitig werden 4- und 2- AmdNT gebildet, sowie geringe Mengen von 2,4-Diaminonitrotoluol (2,4-DAmNT). In dem sich anschließenden aeroben Behandlungsschritt kommt zu einer fast vollständigen Elimination von TNT und seiner Reduktionsprodukte. Es wird postuliert, daß es sich dabei um eine kovalente Einbindung in die Humusmatrix handelt. Diese Immobilisierung führt zur Eliminierung des Problemoleküls, da es mit der Entstehung humusartiger Komplexe in das Makropolymer integriert worden ist und mit diesem dem Humus-turnover unterliegt. Dieser anaerob/aerobe Kompostierungsansatz wurde von der Fa. Plambeck ContraCon GmbH unter den Gesichtspunkten der großtechnischen Anwendung weiterentwickelt und innerhalb des Forschungsverbundes 6 in Clausthal-Zellerfeld im Pilotmaßstab erprobt.

Voraussetzung für die Anwendbarkeit dieses Behandlungsprinzips ist es, daß weder die originären Schadstoffe noch toxische Umwandlungsprodukte nach der Bodenbehandlung wieder freigesetzt werden. Diese Bedingung muß auch längerfristig erfüllt werden, was intensive Begleituntersuchungen zum Langzeitverhalten der gebundenen Rückstände, der Remobilisierbarkeit und des Schadstoffcharakters auch unbekannter Umwandlungsprodukte durch Biotests erfordert. Beiden Problemstellungen wird in VV 5 Rechnung getragen.

In Verknüpfung mit den Untersuchungen zur anaerob/aeroben Kompostierung wurden an der Universität Oldenburg (TV 3.1.2, Kap. 9.2.3 dieses Leitfadens) obligat anaerobe Mikroorganismen auf die effektive Umsetzung von TNT bis zu TAT untersucht [14]. Mit der vollständigen anaeroben TNT-Reduktion ist eine Zunahme der Wasserlöslichkeit der gebildeten Metabolite verbunden. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurde ein Verfahren entwickelt, welches auf der Reinigung TNT-kontaminierter Böden durch eine mikrobiell unterstützte Bodenwäsche basiert.

Während der anaeroben Inkubation im Boden/Wasser-Suspensionsreaktor wird TNT durch die im Boden vorhandenen Mikroorganismen zu den besser wasserlöslichen 2-AmDNT, 4-AmDNT, 2,4-DAmNT und 2,6-DAmNT umgesetzt. Dadurch ist der Boden nun mit Wasser behandelbar, wobei TNT und seine Reduktionsprodukte zu 60 - 70 % extrahiert werden. Dieser Effekt wurde auf den Einsatz von Melasse als Auxiliarsubstrat während der anaeroben Inkubation zurückgeführt, welcher eine gesteigerte TNT-Umsetzung bewirkte und zu einer Abnahme des ursprünglich vorhandenen TNT's führte. Die anfallenden Prozeßwässer können nun entweder biologisch oder photooxidativ aufbereitet werden und nach Elimination der Schadstoffe durch Kreislaufführung wieder dem Waschprozeß zugeleitet werden.

Die Reinigung dieser Prozeßwässer aus der biologischen Bodenbehandlung wurde im TV 3.1.3 (Kap. 9.2.4 dieses Leitfadens), am Institut für Solarenergieforschung Hannover, untersucht.

Mit dem Ziel, eine kostengünstige Behandlung für die belasteten Perkolationswässer zu entwickeln, wurden verschiedene chemisch-oxidativen Methoden getestet. Dabei hat sich der Photo-Fenton-Prozess als das geeignetste Verfahren herausgestellt, da nur in diesem der Abbau von TNT und 1,3,5-Trinitrobenzol hinreichend schnell erfolgte.

Der Photo-Fenton-Prozeß basiert auf der Bildung von Hydroxylradikalen aus Wasserstoffperoxid in einer durch gelöste Eisen(II)-Ionen katalysierten Reaktion. Die Generation von Eisen(II) erfolgt dabei durch Absorption von ultraviolettem Licht. Obwohl die Dosierung von Wasserstoffperoxid und Eisensalz im molaren Verhältnis von Eisen zu Kohlenstoff zu Wasserstoffperoxid wie 1:14:20 notwendig ist, kommt es erst in diesem Verfahren durch zahlreiche radikalvermittelte Reaktionsschritte zur vollständigen TNT-Oxidation zu Kohlendioxid, Wasser und Nitrat.

Im Gegensatz zum chemischen Abbau von TNT ist die biologische Mineralisierung nur durch den Einsatz von ligninolytischen Pilzen und ihrer Enzyme erzielt worden. Bei diesem biotechnologischen Ansatz, der im TV 3.4 (Kap. 9.2.7 dieses Leitfadens) des Forschungsverbundes an der Universität Jena bearbeitet wird, gelang es auf Basis einer ähnlichen radikalischen Reaktion TNT und seine Metabolite durch das isolierte Mangan-Peroxidase-System vollständig zu mineralisieren.

Neben dem enzymatischen Abbau im Flüssigsystem konnte innerhalb des TV 3.3 (Kap. 9.2.6 dieses Leitfadens), welches durch die Fa. AWIA Umwelt (vormals WISSTRANS Umwelt) Göttingen bearbeitet wird, nachgewiesen werden, daß ligninolytische Basidiomyceten TNT auch im Bodensystem umsetzen können.

Das zweite, einfürend bereits genannte Verfahrensprinzip, die **Bioaugmentation**, beinhaltet den Zusatz bzw. die Beimpfung des kontaminierten Bodens mit leistungsfähigen Pilzen (Basidiomyceten). Die Erprobung dieser Prozesse erfolgte in zwei Verbundvorhaben durch den Einsatz ausgewählter ligninolytischer Pilzstämmen, die auf Stroh als Wachstumssubstrat vorkultiviert werden. Auch bei den Bioaugmentations-Versuchen mit Pilzen wurde die Eliminierung von TNT erreicht, die vor allem auf die Einbindung seiner Abbauprodukte in die Humusmatrix des Bodens zurückzuführen ist.

Es wurde gefunden, daß durch den Pilz *Bjerkandera adusta* sowohl im Labormaßstab als auch bei der Behandlung von einer Tonne Boden 99 % der eingesetzten TNT-Konzentration abgebaut wird. Auftretende TNT-Reduktionsprodukte wurden dabei in dem Maße ihrer Entstehung weiter verstoffwechselt [10].

Im Hinblick auf die Verfahrensentwicklung zur biologischen Sanierung von Böden ehemaliger Standorte der Rüstungsindustrie wurde an der Universität Jena (TV 3.4) eine *on site* Kompostierung mit dem ligninolytischen Streupilz *Stropharia rugosoannulata* auf dem Gelände des ehemaligen Sprengstoffwerkes "Tanne" in Clausthal-Zellerfeld durchgeführt. In dem einstufigen Bioaugmentations-Verfahren wurde TNT-kontaminierter Boden schichtweise mit Pilz-Stroh-Substrat ligninolytischer Pilze versetzt und in einem Mietensystem unter aeroben Standortbedingungen inkubiert. Dabei wurden positive Befunde für die Etablierung von Pilzen im Boden und für die nachhaltige Abnahme der TNT-Konzentration im Standortboden, ohne Akkumulation oder Austrag reduzierter Stoffwechselintermediate erbracht. Es wird davon ausgegangen, daß die Abbauprodukte des TNT in der Humusmatrix des eingesetzten Bodens immobilisiert wurden, bisher konnte jedoch nicht geklärt werden, ob diese Abbauprodukte noch aromatischen Charakter tragen und wie sie in der Bodenmatrix gebunden sind.

8 Bildung gebundener Rückstände

Die mit verschiedenen mikrobiellen Systemen durchgeführten Sanierungsmodelle von TNT-Bodenkontaminationen führten zu der Erkenntnis, daß die Abbauprodukte von TNT an die Bodenmatrix gebunden werden. Diese Ergebnisse wurden in den Arbeitsgruppen vor allem durch den Einsatz von radioaktiv markierten Verbindungen erzielt. Während des aeroben und anaeroben mikrobiellen Abbaus von TNT in kontaminierten Böden konnte festgestellt werden, daß ein erheblicher Teil des TNT, bzw. seiner Transformationsprodukte, als nicht extrahierbarer Rückstand im Boden verbleibt. Über Art und Bindungsform dieser Rückstände und über deren Stabilität lagen bisher keine gesicherten Informationen vor. Nachfolgende Projekte sollen daher Aufschluß über die Bildung und Stabilität der Rückstände aus dem mikrobiellen Abbau von TNT liefern und das Spektrum möglicher Metabolite genauer bestimmen.

Das Auftreten gebundener Rückstände zeigt, daß die Bindung oder der Einschluß von Metaboliten des TNT an bzw. in die Humusmatrix der wesentliche Detoxifikationsprozeß im Boden ist. Die bei den verschiedenen Verfahren angewandten Behandlungsmaßnahmen dienen der Erhöhung der Bioverfügbarkeit des TNT und der anschließenden Metabolisierung zu Produkten, die in Humifizierungsvorgänge eingehen. Der Mechanismus der Einbindung ist weitgehend ungeklärt. In Abb. 4 sind verschiedene Möglichkeiten der "Humifizierung" von TNT-Metaboliten dargestellt.

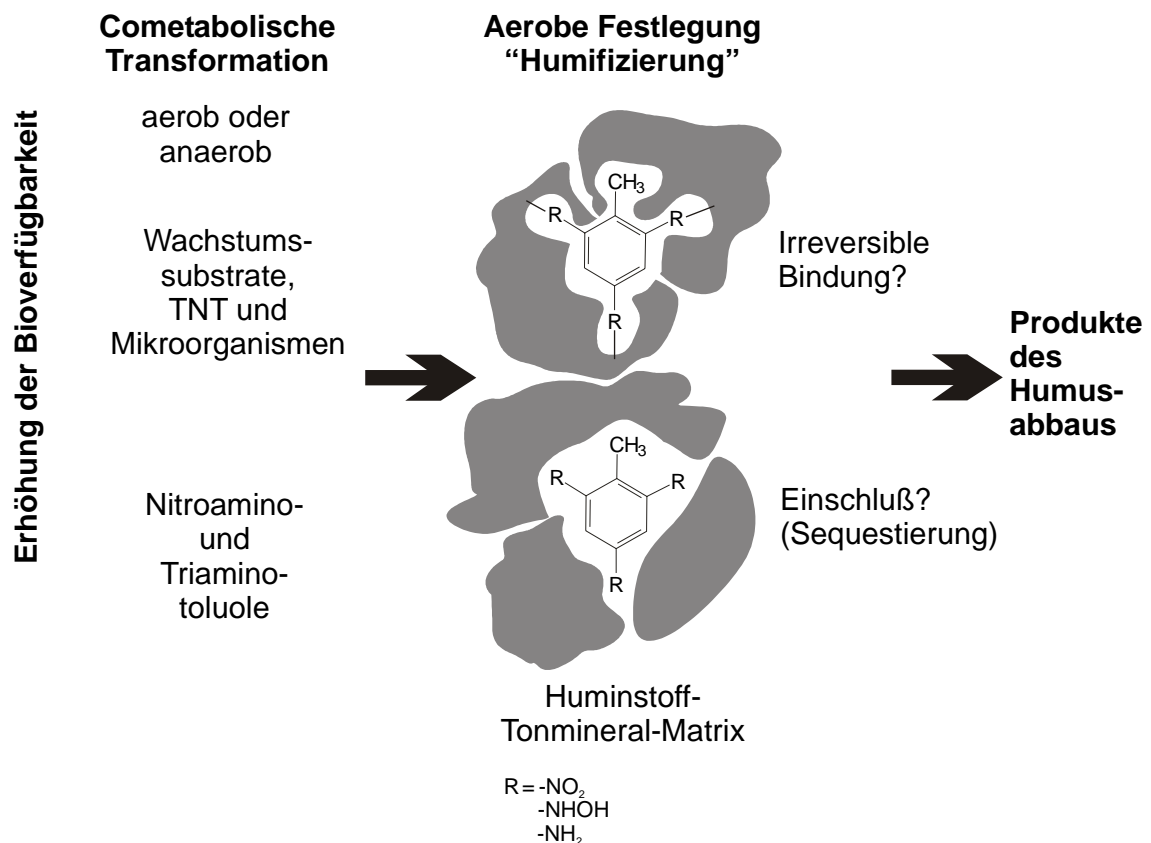


Abb. 4: Möglichkeiten der "Humifizierung" von TNT-Metaboliten

Durch die biologischen Prozesse der Biostimulation und Bioaugmentation werden TNT und die daraus gebildeten Metabolite vor allem durch Prozesse, die der Humifizierung ähnlich sind, aus kontaminierten Böden eliminiert. In Folge dessen muß das Langzeitverhalten dieser behandelten Böden aufgeklärt werden. Diese Aufgabe wird in dem Forschungsverbund 5 "Langzeit- und Remobilisierungsverhalten" tiefgründig bearbeitet (Kap. 9.4 dieses Leitfadens).

9 Wesen der Phytoremediation

Unter Phytoremediation werden biologische Verfahren zusammengefaßt, in denen Pflanzen zur Reinigung von kontaminierten Böden, Schlämmen und Abwässern eingesetzt werden. Pflanzen fördern in zweifacher Hinsicht die Eliminierung von TNT im Boden. Erstens kann durch das Aufbringen geeigneter Vegetation auf kontaminierte Böden die biologische Aktivität der autochthonen Organismengemeinschaften und damit der Schadstoffabbau aktiviert werden. Zweitens sind Pflanzen in der Lage, organische Schadstoffe direkt aus dem Boden aufzunehmen, zu detoxifizieren und in die oberirdischen Teile der Biomasse zu transportieren. Dadurch können die Schadstoffe dem Boden entzogen werden. Die pflanzliche Biomasse könnte nach der Ernte im Mietenverfahren unter Zusatz von Pilzen vollständig entsorgt werden. In der Gesamtheit führen diese Aktivitäten zu einer dauerhaften, längerfristigen Stimulierung des biologischen Selbstreinigungspotentials in den durchwurzelteten Bodenbereichen. Für die Bodensanierung ist die Phytoremediation aus ökonomischen Gründen

insbesondere für großflächige, oberflächennahe Kontaminationen mit mittleren und niedrigen TNT-Konzentrationen von besonderem Interesse.

Forschungsinhalt zweier Teilvorhaben (TV 3.6 und 3.7) war daher die Entwicklung von *in-situ* Verfahren, bei denen die Behandlung des kontaminierten Bodens mittels verschiedener Pflanzenfamilien angestrebt wurde.

Die im TV 3.6 in Kleinmachnow durchgeführten Untersuchungen an Weiden und Pappeln führten im Gefäßversuch zu einer deutlichen Abnahme der Nitroaromatenkonzentration im Boden. Dabei kam es einerseits zur Aufnahme der Schadstoffe in die Pflanze, zum anderen führte die Bepflanzung zur Beschleunigung der mikrobiellen TNT-Umsetzung im Boden.

Aus den Untersuchungen zum TV 3.7 (Kap. 9.2.8 dieses Leitfadens), welches in Marburg bearbeitet wurde, geht hervor, daß auch eine Reihe von Kulturpflanzen (krautige Pflanzen) die Abnahme von TNT im Rhizosphärenboden (wurzelnahe Bodenschichten) und die Aufnahme und Metabolisierung von TNT in den Pflanzen bewirken. Dabei kommt es vor allem in den Pflanzenwurzeln zu einer Anreicherung der TNT-Metabolite. Maßgeblich am Sanierungserfolg beteiligt sind somit die Prozesse der Aufnahme des Schadstoffes bzw. seiner Abbauprodukte in die Pflanze und daneben die Abnahme der Schadstoffkonzentration im Boden durch die Bepflanzung. Beide Prozesse sollen zu einer Metabolisierung bzw. Immobilisierung des Schadstoffes führen, so daß seine Bioverfügbarkeit herabgesetzt und eine Detoxifikation des Bodens erreicht wird.

10 Abbau der Sprengstoffe Hexogen und Hexyl

Neben dem TNT spielen andere Explosivstoffe, wie Hexyl und Hexogen, am Standort "Werk Tanne" keine Rolle. Für die Behandlung des gesamten Spektrums von Explosivstoffen war es jedoch nötig in zwei weiteren Teilvorhaben des Forschungsverbundes den mikrobiologischen Abbau von Hexogen- und Hexylsprengstoffen zu untersuchen.

Die Liegenschaften des ehemaligen Sprengstoffwerkes "WASAG-Elsnig" bei Torgau/Elsnig in Sachsen weisen neben TNT-Belastungen auch Kontaminationen mit den Sprengstoffen Hexogen (Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin) und Hexyl (2,2',4,4',6,6'-Hexanitrodiphenylamin) auf. Ziel der Untersuchungen des TV 3.5 war es, die Grundlagen des mikrobiellen Abbaus von Hexogen und Hexyl zu erarbeiten und diese in einem technischen Sanierungsverfahren zur Bodenreinigung umzusetzen. Für diese Untersuchungen wurde folgende Strategie genutzt: Aktivierung aerober, autochthoner Mikroorganismen durch Zusatz externer Nährstoffquellen. Im Anschluß daran erfolgte eine anaerobe Inkubationsphase, welche von einer wiederholten aeroben Inkubationsphase abgeschlossen wurde. Im Ergebnis dieser Biostimulations-Behandlung konnte eine deutliche Abnahme der Hauptkontaminationen und ihrer Schadstoffwirkung u.a. durch Biotests nachgewiesen werden.

Neben dem Abbau im Boden scheinen Hexogen- und Hexylsprengstoffe in Grundwasserleitern eine größere Persistenz gegenüber dem mikrobiellen Abbau zu besitzen. Innerhalb des TV 3.8 (Kap. 9.2.9 dieses Leitfadens) wurden standortspezifische Pilze verschiedener Pilzgruppen und einheimische Basidiomyceten auf ihr Potential zum Hexogen- und Hexylabbau getestet. Abbauversuche mit Grundwasserproben des Standortes Torgau/Elsnig, die neben Hexogen und Hexyl auch mit TNT, Trinitrobenzol und Dinitrotoluolen kontaminiert waren, zeigten,

daß insbesondere die Pilze TA 78029 und AK 9613 ein großes Potential zur Eliminierung von sprengstofftypischen Verbindungen besitzen. Damit wurden Voraussetzungen für den potentiellen Einsatz spezieller Pilze innerhalb eines biotechnologischen Verfahrens zur Reinigung von Hexogen-/ und Hexyl-kontaminierten Grundwässern geschaffen. Wie auch beim TNT erfolgte die effizienteste Umsetzung von Hexogen und Hexyl im Wasser- und im Bodensystem durch einen cometabolischen Abbau mit zusätzlicher Stickstoffquelle.

Danksagung

Dem Umweltbundesamt, Projektträger Abfallwirtschaft und Altlastensanierung des BMBF gilt unser Dank für die intensive Förderung der Arbeiten im Forschungsverbund 3 "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten" und die vertrauensvolle Zusammenarbeit.

Unseren verbindlichen Dank möchten wir Frau Dr. Annett Weiland-Wascher und Herrn W. Franke für die kompetente Begleitung der Arbeiten innerhalb des BMBF-Verbundvorhabens aussprechen.

Abschließend möchten wir allen KollegInnen und MitarbeiterInnen in den verschiedenen Teilvorhaben für die offenen und gewinnbringenden Diskussionen und den kollegialen Erfahrungsaustausch unseren herzlichen Dank übermitteln.

Die wichtigsten Ergebnisse aus dem Forschungsverbund 3 "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten" wurden u. a. jährlich als "Autorenbeiträge zum Statusseminar des Verbundes Rüstungsaltslasten" zur Veröffentlichung zusammengestellt. Die Publikationen erfolgten in der "Grün-Weißen-Reihe" und wurden unter Leitung von Frau Dr. Annett Weiland-Wascher vom Umweltbundesamt in enger Zusammenarbeit mit dem DECHEMA e.V. vorgenommen.

11 Literatur

1. **Achtnich, C., G. Daun, D. Jackisch, U. Sieglen, B. Wagener, H. Lenke, and H.-J. Knackmuss.** 1997. Festlegung von TNT im Boden durch eine Anaerob /Aerob-Behandlung: Stabilität der Metabolite. In: Beiträge der Autoren zum III. Satusseminar (Februar 1997, Berlin). BMBF-Verbund "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten".: 243-252.
2. **Boopathy, R., M. Wilson, C. D. Montemagno, J. F. Manning, Jr., and C. F. Kulpa** 1994. Biological transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by soil bacteria isolated from TNT-contaminated soil. *Bioresource-Technol.* **47**: 19-24.
3. **Boopathy, R., J. Manning, C. D. Montemagno, and C. F. Kulpa.** 1994. Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by a *Pseudomonas* consortium under aerobic conditions. *Current Microbiol.* **28**: 131-137.
4. **Braedt, M., M. H. Hörseljau, F. Jakobs, and F. Knolle.** 1993. Die Sprengstoffabrik Tanne in Clausthal-Zellerfeld. VWM-Verlag Dr. P. Wagner. Mannheim. 66-97.

5. **Breitung, J., D. Bruns-Nagel, E. von Löw, K. Steinbach, L. Kaminski, R. Haas, and D. Gemsa.** 1995. Mikrobielle Sanierung von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) kontaminierten Böden. UWSF-Z Umwelttech. Ökotox. **7**: 195-200.
6. **Bruns-Nagel, D., J. Breitung, E. von Löw, K. Steinbach, T. Gorontzy, M. Kahl, K.-H. Blotevogel, and D. Gemsa.** 1996. Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene in aerobic soil columns. Appl. Environ. Microbiol. **62**: 2651-2656.
7. **Bryant, D.W., D. R. McCalla, M. Leeksa, and P. Laneuville.** 1980. Type I nitroreductases of *Escherichia coli*. Can. J. Microbiol. **27**: 81-86.
8. **Crawford, R.L.** 1995. Biodegradation of nitrated munition compounds and herbicides by obligately anaerobic bacteria. In: Biodegradation of nitroaromatic compounds. Spain, J.C. (ed.). Plenum Press, New York: 87-98.
9. **Dahn, A., J. Karutz, and J. Thieme.** 1998. Vorbereitende Maßnahmen zur Sicherstellung einer Vergleichbarkeit verschiedener biologischer Verfahren im Rahmen des Verbundvorhabens 6. In: Proceedings der Fachtagung "Sanierung kontaminierter Böden" (registriertes Projekt der EXPO 2000), Munster: V23-1 - V23-15.
10. **Eilers, A.** 1996. Abbau von 2,4,6-Trinitrotoluol durch *Bjerkandera adusta* unter Beteiligung von Cytochrom P-450 und Entwicklung eines biologischen Verfahrens zur Sanierung von TNT-belasteten Böden. Dissertation. Georg-August-Universität Göttingen.
11. **Fernando, T., J. A. Bumpus, and S. D. Aust.** 1990. Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. **56**: 1666-1671.
12. **Field, J.A., E. deJong, G. Feijoo-Costa, and J. A. M. deBont.** 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. TiBTech **11**: 44-48.
13. **Gilcrease, P.C. and V. G. Murphy.** 1995. Bioconversion of 2,4-diamino-6-nitrotoluene to novel metabolite under anoxic and aerobic conditions; trinitrotoluene degradation of *Pseudomonas fluorescens*. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 4209-4214.
14. **Gorontzy, T., O. Drzyzga, M. W. Kahl, D. Bruns-Nagel, J. Breitung, E. von Löw, and K.-H. Blotevogel.** 1994. Microbial degradation of explosives and related compounds. Critical. Review in Microbiology. **20**: 265-284.
15. **Gorontzy, T., T. Raber, D. Bruns-Nagel, O. Drzyzga, and K.-H. Blotevogel.** 1997. Transformation of the explosive TNT by *Clostridia*. In: Preprints of the fourth international in situ and on-site bioremediation symposium (28.4.- 1.5 1997). **2**: 48-52.
16. **Gorontzy, T., T. Raber, and K.-H. Blotevogel.** 1997. Anaerobe Perkolation in Bodensäulen. In: Beiträge der Autoren zum III. Satusseminar (Februar 1997, Berlin). BMBF-Verbund "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten": F1-F16.
17. **Herre, A., K. Scheibner, and W. Fritsche.** 1998. Bioremediation von 2,4,6-Trinitrotoluol-kontaminiertem Boden durch Pilze auf einem Rüstungsaltslastenstandort. TerraTech **4**: 52-55.
18. **Hofrichter, M., and K. Scheibner.** 1995. Rolle der Bodenpilze beim Fremdstoffabbau. TerraTech **3**: 69-71.

19. **Hofrichter, M., K. Scheibner, U. Sack, and W. Fritsche.** 1997. Degradative capacities of white-rot and litter decaying fungi for persistent natural and xenobiotic compounds. In: Advances in mushroom biology and production. Rai, R.D., Dhar, B.L., Vermar, R.N. (eds.). Mushroom Society of India. Solan. 271-280.
20. **Hofrichter, M., K. Scheibner, I. Schneegaß, and W. Fritsche.** 1998. Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 399-404.
21. **Kaplan, D. L. and A. M. Kaplan.** 1983. Reactivity of TNT and TNT-microbial reductionproducts with soil components. U.S. Army natick research and development labs., MA, AD-A 135 512/2, NATICK/TR-83/041.
22. **Karrenbrock, F. and K. Haberer.** 1984. Gewässerschutz, Wasser, Abwasser. **72**: 139-160.
23. **Kayed, A.** 1989. Ergebnisse und Erfahrungen bei der Gefährdungsabschätzung für die Rüstungsaltslasten des ehemaligen Sprengstoffwerkes "Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld. In: Gesprächsrunde Rüstungsaltslasten 25./26. April 1989 in Hannover. Der Niedersächsische Umweltminister (Hrsg.): 249-259.
24. **Koss, G., A. Lommel, I. Ollroge, I. Tesseraux, R. Haas, and A. D. Kappos.** 1989. Zur Toxikologie der Nitrotoluole und weiterer Nitroaromaten aus rüstungsbedingten Altslasten. Bundesgesundhbl. **32**: 527-536.
25. **Lemberg, R., and J. P. Callahan.** 1944. Metabolism of symmetrical trinitrotoluene. Nature **154**: 768-769.
26. **Lenke, H., B. Wagener, G. Daun, and H.-J. Knacknuss.** 1994. TNT-contaminated soil: a sequential anaerobic/aerobic process for bioremediation, abstr. Q-383, p. 456. Abstr. 94th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1994.
27. **Martinetz, D.** 1987. Chemie, Toxikologie, Ökotoxikologie und Beseitigung von Explosivstoffen. In: Handbuch der Umweltchemikalien, Stoffdaten-Prüfverfahren-Vorschriften, 2. Aufl. Bd. 3, II-2.6 Rüstungsaltslasten. Rippen, G. (ed.). ecomed Verlag: 175-178.
28. **Michels, J.** 1993. Abbau von 2,4,6-Trinitrotoluol durch den Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium*. Dissertation. Georg-August-Universität Göttingen.
29. **Michels, J., and G. Gottschalk.** 1994. Inhibition of lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* by hydroxylaminodinitrotoluene, an early intermediate in the degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. Appl. Environ. Microbiol. **60**: 187-194.
30. **Michels, J. und W. Fritsche.** 1996. Entwicklung biologischer Sanierungsverfahren zum Abbau von 2,4,6-TNT. In: Materialien zur Altslastenbehandlung 5/96: Behandlung von Rüstungsaltslasten im Raum Torgau-Elsnig. Sächsischers Staatsministerium für Umwelt und Landesentwicklung
31. **Oberholz, A.** 1989. Auf dem Pulverfaß. Zeitschrift Natur **4**: 45-53.
32. **Parrish, F.W.** 1977. Fungal transformation of 2,4-dinitrotoluene and 2,4,6-trinitrotoluene. Appl. Environ. Microbiol. **34**: 232-233.

33. **Preuß, A., J. Fimpel, and G. Diekert.** 1993. Anaerobic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Arch. Microbiol.* **159**: 345-353.
34. **Rieger, P-G., and H.-J. Knackmuss.** 1995. Basic knowledge and perspectives on bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene and related nitroaromatic compounds in contaminated soil. In: *Biodegradation of nitroaromatic compounds*. Spain, J.C. (ed.) Plenum Press, New York: 1-18.
35. **Scheibner, K., M. Hofrichter, A. Herre, J. Michels, and W. Fritsche.** 1997. Screening for fungi intensively mineralizing 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl Microbiol. Biotechnol.* **47**: 452-457.
36. **Scheibner, K., M. Hofrichter, and W. Fritsche.** 1997. Mineralization of 2-amino-4,6-dinitrotoluene by manganese peroxidase of the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Biotechnol Lett.* **19**: 835-839.
37. **Scheibner, K., and M. Hofrichter.** 1998. Conversion of aminonitrotoluenes by fungal manganese peroxidase. *J. Basic Microbiol.* **38**: 63-71.
38. **Schneider, K., and F. Kalberlah.** 1992. Toxikologische Bewertung der Rüstungsaltslasten "Neue Wiese-Muna Lehre". Gutachten im Auftrag des Umweltministeriums Niedersachsen.
39. **Stahl, J.D., and S. D. Aust.** 1993. Plasma membrane-dependent reduction of 2,4,6-trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**: 471-476.
40. **Stahl, J.D., and S. D. Aust.** 1993. Metabolism and detoxification of TNT by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **192**: 477-482.
41. **Stahl, J.D., and S. D. Aust.** 1995. Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. In: *Biodegradation of nitroaromatic compounds*. Spain, J.C. (ed.). Plenum Press, New York: 117-134.
42. **Van Aken, B., M. Hofrichter, K. Scheibner, A. Hatakka, H. Naveau, and S. N. Agathos.** 1998. Enzymatic in vitro combustion of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. *Biodegradation*. *Submitted*.
43. **Vanderberg, L.A., J.J. Perry, and P.J. Unkefer.** 1995. Catabolism of 2,4,6, trinitrotoluene by *Mycobacterium vaccae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 937- 945.
44. **Vorbeck, C., H. Lenke, P. Fischer, J.C. Spain, and H.- J. Knackmuss.** 1998. Initial reductive reactions in aerobic microbial metabolism of 2,4,6-Trinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 246-252.
45. **Yamashina, I., S Shikata, and F. Egami.** 1954. Enzymatic reduction of aromatic nitro, nitroso and hydroxyl amino compounds. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **27**: 42-45.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.2 Verbundvorhaben 3: Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten

9.2.1 Entwicklung eines mikrobiologischen Sanierungsverfahrens am Beispiel des ehemaligen Sprengstoffwerkes "Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld (TV 3.1)

André Dahn

IABG, Niederlassung Berlin
Straße der Pariser Kommune 38
10243 Berlin

Förderkennzeichen: 145079112

Laufzeit: 01.06.1996 - 30.06.1999

1 Zielsetzung und Zusammenfassung

1.1 Ziele des Forschungsvorhabens

Das vorliegende FuE-Vorhaben "Technikuntersuchungen zur weiterführenden Entwicklung eines mikrobiologischen Sanierungsverfahrens von Rüstungsaltslasten am Standort Werk 'Tanne' bei Clausthal-Zellerfeld" ist innerhalb der BMBF-Förderaktivität "Biologische Verfahren zur Bodensanierung" im Verbundvorhaben 3 "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten" angesiedelt. Es bildet als Phase 2 zusammen mit (und aufbauend auf) der Phase 1 "Entwicklung eines mikrobiologischen Sanierungsverfahrens am Beispiel des ehemaligen Sprengstoffwerkes 'Tanne' bei Clausthal-Zellerfeld (Niedersachsen)" das Teilvorhaben 1 im erwähnten Verbundvorhaben 3.

Ziel der Phase 2 "Technikuntersuchungen zur weiterführenden Entwicklung eines mikrobiologischen Sanierungsverfahrens am Standort Werk 'Tanne'" ist es, die in der Grundlagenforschung und bei der ersten technischen Umsetzung gewonnenen Ergebnisse (Phase 1) im Technikumsmaßstab weitergehend zu erproben und zu bestätigen und daraus eine großtechnische Verfahrenskonzeption zur mikrobiologischen Sanierung für TNT-belastete Böden zu entwickeln.

1.2 Inhalt des Forschungsvorhabens

In der Phase 2 des FuE-Vorhabens werden im Labormaßstab entwickelte Ansätze zur mikrobiologischen Sanierung TNT-belasteter Böden im Technikumsmaßstab erprobt. Für die Technikumsuntersuchungen erfolgte eine Umstrukturierung des Projektes. Diese Maßnahme wurde erforderlich, weil von den bislang untersuchten Verfahrensvarianten lediglich das von der Universität Marburg beschriebene Verfahren bestehend aus

- anaerober TNT-Transformation und
- aerober Humifizierungsstufe (Teilprojekte 1+4)

vielversprechende Ergebnisse in der in Phase 1 "Entwicklung eines mikrobiologischen Sanierungsverfahrens am Beispiel des ehemaligen Sprengstoffwerkes 'Tanne' bei Clausthal-Zellerfeld, Land Niedersachsen" durchgeführten Machbarkeitsuntersuchung lieferte. Weiterhin erfolgt eine Untersuchung zur Optimierung des *anaeroben Extraktionsverfahrens*. Technikumsversuche werden ebenfalls zur naßchemischen Behandlung von TNT-belasteten Prozeßwässern und Standortwässern durchgeführt. Der Schwerpunkt der Technikumsuntersuchungen wird in der Charakterisierung der vorgenannten Verfahren und in der toxikologischen Bewertung der Produkte aus dieser Bodenbehandlung liegen. Für die toxikologische Bewertung wird im Rahmen dieses Vorhabens ein immunotoxisches Testsystem unter Verwendung von menschlichen Makrophagen entwickelt.

Des Weiteren werden die Produkte aus der Bodenbehandlung im Hinblick auf ihr stabiles Langzeitverhalten untersucht. Hierbei zielt die Untersuchung im wesentlichen auf das Bindungsverhalten der TNT-Reduktionsprodukte an die Humusmatrix ab.

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

2.1 Problemstellung

2.1.1 Grundsätzliche Problematik von nitroaromatischen Verbindungen

2.1.1.1 Verbreitung

Aromatische Verbindungen stellen eine natürlich vorkommende und sehr weit verbreitete Substanzklasse von Molekülen (z. B. Lignin) dar. Ihre mikrobielle Mineralisation konnte unter verschiedenen Bedingungen nachgewiesen werden [13; 34].

Die Verbreitung der Nitroaromaten in der Umwelt wird nach Zeyer [74] weitgehend unterschätzt. Dieses liegt nicht nur an deren z.T. schwierigen analytischen Aufbereitung und Erfassung, wobei ähnliches auch für die polaren und aufgrund der hohen Wasserlöslichkeit mit den üblichen Verfahren schwer anreicherbaren aromatischen Amine gilt [29], sondern auch der z.T. damit zusammenhängenden lokalen Eingrenzung der Problematik [19]. Untersuchungen über die Bioverfügbarkeit von Schadstoffen konzentrieren sich zur Zeit v.a. auf halogenierte bzw. chlorierte Kohlenwasserstoffe, einfache aromatische und aliphatische Kohlenwasserstoffe sowie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und Pestizide [37; 40; 42; 52].

2.1.1.2 Auswirkungen auf die Umwelt

Mit der beginnenden Produktion von TNT Anfang des 20. Jahrhunderts traten auch erste Fälle von Vergiftungen unter den Arbeitern auf. Beispielsweise wurden in den USA in den ersten 7 ½ Monaten des Ersten Weltkrieges 17 000 Fälle von TNT-Vergiftungen bekannt, 475 davon verliefen tödlich [64].

TNT ist chemisch sehr stabil, so daß es auch heute als dominanter Schadstoff zahlreicher Rüstungsstandorte des Deutschen Reiches nachgewiesen wird. Bereits in geringen Konzentrationen wirkt TNT allergieauslösend. Die akute und chronische Toxizität gegenüber dem Menschen drückt sich vor allem in Blut- und Leberschäden aus. TNT kann durch Einatmung oder über die Haut aufgenommen werden. Im Körper verändert es den Blutfarbstoff und zerstört die roten Blutkörperchen (Hämolyse) [26; 64]. Häufig auftretende Krankheitsbilder sind Leber- und Nierenschäden, Gelbsucht und Anämie. TNT gilt als mutagen und wird als humankanzerogen eingestuft.

Der erste offiziell bekannte Grenzwert für die maximal zulässige Konzentration von TNT am Arbeitsplatz stammt aus der Zeit des Zweiten Weltkrieges und wurde in den USA auf einen Wert von 1,5 mg/m³ festgelegt [38]. Der heutige MAK-Wert liegt mit 1,3 mg/m³ [51] etwas unter dem damals gültigen Grenzwert.

Um die Gefahr, die von den mit TNT verunreinigten Böden ausgeht, beurteilen zu können, ist auch die Kenntnis der möglichen Vorprodukte und Abbauprodukte von TNT und deren Toxizität wichtig. Diese Komponenten sind ebenfalls in dem Böden ehemaliger Produktionsstätten zu finden. Allein durch die TNT-Produktion können rund 500 Einzelsubstanzen aus Ausgangsstoffen, Zwischenprodukten, End- und Abbauprodukten entstehen [50]. Sowohl im menschlichen Körper als auch durch Kompostierung im Boden wird 2,4,6-TNT zu Aminodinitrotoluolen reduziert, die ebenfalls als toxisch eingestuft werden.

Besondere Aufmerksamkeit muß den Vorprodukten, den Dinitrotoluolen geschenkt werden, da sie als sehr toxisch eingestuft werden und zudem kanzerogen und mutagen wirken.

Zur Ermittlung des toxikologischen Potentials und der Einstufung einer Substanz gibt es verschiedene Testmethoden. Für einige der häufig auftretenden Verbindungen sind die erhaltenen Testergebnisse in [50] zusammengefaßt.

In mehreren Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) und viele Abbauprodukte sowohl auf Fische [45], Ratten und Mäuse [4], als auch auf Algen und andere aquatische Faunen [57; 69; 70] toxisch wirken. Ebenso wurden Wachstumsdepressionen bei Pilzen, Hefen, Aktinomyceten und Bakterien [31], sowie mutagene Wirkungen auf Mikroorganismen [28; 29; 69] verzeichnet. Auch im Microtox-Assay, einem ökotoxikologischen Testverfahren, in dem durch Messung der Biolumineszenz der Einfluß von Schadstoffen auf *Photobacterium phosphoreum* ermittelt wird, wiesen TNT und dessen Metabolite Diaminonitrotoluol und Dinitromethylanilin eine unterschiedliche, z.T. sehr hohe Toxizität gegenüber dem Testorganismus auf [21]. Hemmende Wirkungen auf des Pflanzenwachstum wurden ebenfalls nachgewiesen [33; 46; 53].

2.1.2 Allgemeine Problematik der Rüstungsaltlasten

Trinitrotoluol, bekannt als TNT, war der am häufigsten produzierte Sprengstoff des Zweiten Weltkrieges. Neben den großen Sprengstoffwerken, wie beispielsweise das Werk "Tanne" in Clausthal-Zellerfeld oder "Stadtallendorf", existierten im Deutschen Reich auch eine Vielzahl kleinerer Munitionswerke oder Munitionsanstalten, sogenannte Munas, in denen Explosivstoffe in Granaten oder Bomben abgefüllt wurden. Diese Anlagen wurden nach Beendigung des Zweiten Weltkrieges gemäß Potsdamer Abkommen durch die alliierten Streitkräfte überwiegend delaboriert, demontiert und vielerorts gesprengt.

Die durch die Produktion selbst und durch die Demontage verursachten Altlasten unterscheiden sich von den zivilen, industriellen Altlasten durch einige sehr spezifische Merkmale. Das Gefährdungspotential ist aus folgenden Gründen besonders hoch einzuschätzen:

- Die Produktion erfolgte überwiegend unter Kriegsbedingungen, die Produktion hatte grundsätzlich Vorrang vor Maßnahmen zum Schutz der Beschäftigten und der Umwelt.
- Viele dieser Liegenschaften befinden in der Nähe umweltsensibler Nutzungen. Aus Tarngründen wurden für die Rüstungsbetriebe waldreiche Gebiete bevorzugt. Darüber hinaus waren wasserreiche Standorte besonders geeignet, weil mit der Sprengstoffherstellung ein größerer Wasserbedarf verbunden war.
- Die Inbetriebnahme von Produktionsanlagen erfolgte teilweise noch vor der endgültigen Fertigstellung der notwendigen Entsorgungseinrichtungen. Die Entsorgung der Reststoffe war nach heutigen Maßstäben nicht ordnungsgemäß. Das unsachgemäße Deponieren von Reststoffen hatte zur Folge, daß ein Verschleppen von Kontaminationen über die Liegenschaftsgrenzen hinaus erfolgte.
- Durch Demontage und Sprengungen sind Kontaminationen auch an Stellen möglich, die aufgrund der Nutzung dort nicht zu erwarten sind.

- Aufgrund der damaligen Einstufung als "militärisches Geheimnis" ist die Nutzungsgenese heute vielfach nur bruchstückhaft nachvollziehbar. Recherchen sind daher schwieriger als bei industriellen Altstandorten.
- Die Situation im Untergrund ist durch häufig anzutreffende anthropogene Veränderungen extrem unübersichtlich (z.B. durch Sprengungen, Bombardierungen, "geschobene Flächen" beim Truppenabzug). Aus Tarngründen wurden Anlagen unter die Erde verlegt, was ggf. zu direkten Grundwasserbeeinträchtigungen oder zusätzlichen Grundwassergefährdungen führte.
- Auf vielen Rüstungsstandorten stellte die Entsorgung von Abwässern und das Abwasserkanalsystem eines der Kernprobleme dar.

Dies macht deutlich, daß sich die Rüstungsalasten vom Umfang und vom Schadstoffinventar her wesentlich von industriellen Altlasten und Altablagerungen abheben. Detaillierte Darstellungen der mikrobiellen Umsetzung von Sprengstoffen sind veröffentlicht worden [16; 22; 23; 73].

2.1.3 Spezielle Standortsituation

Im ehemaligen Sprengstoffwerk "Tanne" östlich von Clausthal-Zellerfeld wurde von Juni 1939 bis Oktober 1944 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) hergestellt und abgefüllt. Die Produktion wurde im Oktober 1944 durch einen Bombenangriff stillgelegt. Nach Kriegsende im Mai 1945 wurde das Werk dann von der britischen Besatzungsmacht demontiert und teilweise gesprengt.

Bei der TNT-Produktion fielen giftige, intensiv gefärbte Abwässer an, deren Beseitigung erhebliche Probleme verursachte (Fischsterben in den Vorflutern) und immer noch verursacht (z. B. Auffinden von Giftstoffen im Trinkwasser im Einzugsbereich der Schluckbrunnen in Osterode/Petershütte).

Da die bei der TNT-Produktion anfallenden Abwässer stark sauer waren, wurden sie mit Kalk neutralisiert, wobei große Mengen an Kalkschlamm anfielen. In diesem blieben auch Schadstoffe aus dem Abwasser zurück. Diese Kalkschlämme wurden außerhalb des eigentlichen Werksgeländes im Uferbereich der unmittelbar im Südwesten an das Werksgelände angrenzenden drei Teiche, den Unteren, den Mittleren und den Oberen Pfauenteich abgelagert. So befinden sich im Nordosten des Unteren und des Mittleren Pfauenteiches jeweils eine Halde aus Kalkschlamm. Auch zwischen den beiden Pfauenteichen befindet sich eine, allerdings wesentlich kleinere, Ablagerung von Kalkschlamm. Durch Sickerwässer aus den Halden und auch aus dem Werksgelände, die mit Stoffen aus der TNT-Produktion auch heute noch belastet sind, werden permanent Schadstoffe in die beiden Pfauenteiche eingetragen.

Auch der Untergrund des eigentlichen Werksgeländes ist nach derzeitigem Kenntnisstand aufgrund der damaligen Produktionsabläufe, der zahlreichen Explosionen und der Bombentreffer in größeren Teilbereichen mit TNT belastet. Höher kontaminierte Bereiche mit > 100 mg TNT/kg Boden sind die ehemaligen Füllstellen (Geb.-Nr. 413, 415, 417 und 419 sowie Geb.-Nr.412, 414 und 418), der Standort der ehemaligen Tonsilerdeanlage (Geb.-Nr. 110) und die ehemalige Trinitrierung Geb.-Nr. 337) und die Munitionstestanlage, auch als Brandplatz bezeichnet. Weite Teile des Geländes sind mit 1 bis 100 mg/kg als mittel bis

schwach ($< 1 \text{ mg/kg}$) belastet einzustufen. Dazu gehören u. a. das Gebäude der ehemaligen Dinitrierung (Geb.-Nr. 338) und seine unmittelbare Umgebung.

Das in den Sickerschächten zutage tretende und aus Pegeln beprobte Hangsickerwasser ist ebenfalls TNT-kontaminiert.

Die auf dem Standort ermittelte Kontamination stellt hohe Anforderungen an den zu entwickelnden Verfahrensansatz. Mit den ersten Untersuchungen für das Teilvorhaben 1 "Entwicklung eines mikrobiologischen Sanierungsverfahrens am Beispiel des ehemaligen Sprengstoffwerkes 'Tanne' bei Clausthal-Zellerfeld" wird diesem Ansatz in besonderem Maße Rechnung getragen.

2.2 Bekannte Ergebnisse

2.2.1 Abbauverhalten von nitroaromatischen Verbindungen

Der mikrobielle Abbau bzw. Umbau einiger Nitroaromen u.ä. Verbindungen wie. z. B. 2,4,6-Trinitrotoluol, 2,4- und 2,6-Dinitrotoluol und bestimmter Nitrophenole, die als wichtige Komponenten der hier zu untersuchenden Rückstände der Sprengstoffproduktion nachgewiesen wurde, wurde von einigen Autoren beschrieben [2; 6; 8; 9; 39; 47; 59; 69; 70; 72].

Gegenstand des primären Anliegens vieler Untersuchungen war jedoch die Frage nach der Metabolisierbarkeit dieser Stoffe durch Enzymsysteme oder durch die Intestinalmikroflora höherer Organismen [48; 72]. Darüber hinaus wurden z.T. über metabolische Reaktionen mikrobielle Testverfahren (Ames-Test u.a.) zur Erfassung des karzinogenen und mutagenen Potentials dieser Substanzen und der entsprechenden Metabolite eingesetzt [39; 48; 49; 56; 67; 69; 71].

Untersuchungen in der Umwelt konzentrierten sich vor allem auf mikrobielle Prozesse in durch Produktionsbetriebe kontaminierte Abwässer und Oberflächenwässer [6; 47] wobei in der Regel Isolate aus belasteten Substraten oder Enzympräparationen auf Abbauaktivitäten in vitro getestet wurden [39; 59; 41; 70; 74]

Unterschiedliche Abbauege von Nitroaromaten wurden postuliert und durch Identifikation charakteristischer Metabolite bestätigt:

- Oxidative Eliminierung der Nitrogruppe unter Freisetzung von Nitrit und Ringspaltung über Dihydroxiverbindungen (Cachetol mit nachfolgender Mineralisierung, Nachgewiesen u.a. bei einigen Nitrophenolen [7; 74; 75]);
- stufenweise Reduktion der Nitrogruppe über Nitroso- und Hydroxylaminverbindungen zu aromatischen Aminen, die entweder Substrate eines weiteren mikrobiellen (über reduktive Desaminierung, Catechol etc.) bzw. abiotischen Abbaus sind oder neben anderen Metaboliten, Ausgangsprodukte neuer Verbindungen darstellen [9; 37; 39; 47; 59; 70; 74; 75], so z.B. Dimerisierungsprodukte wie Azoxytoluole., die aus den Hydroxylamino-Zwischenprodukten hervorgehen.
- Produktion nicht oder gering abbaubarer Zwischenprodukte (dead-end-Produktion). So können z. B. im Wasser und im Boden über Polymerisierung sowie Adsorptionenwirkungen stabile, nicht oder wenig biologiefähige Endprodukte gebildet werden [7; 20; 27; 29; 32; 39; 47; 70; 74].

Neben dem Umbau zu persistenten Verbindungen kann es zu "Giftungs"-Reaktionen durch den Metabolismus kommen [48; 62; 67]. Insbesondere der Abbau zu aromatischen Aminen muß unter diesem Gesichtspunkt betrachtet werden [7; 19; 29; 36; 41], zumal erhöhte Polarität und teilweise verstärkte Mobilität im Untergrund (Wasserlöslichkeit) zusätzlich das Grundwasser gefährden können [7; 36; 37].

2.2.2 Abbau von TNT

2.2.2.1 Photochemischer Abbau

In der Wasser- und Abwasserbehandlung sind mehrere Verfahren der chemischen Stoffumwandlung bekannt und im technischen Einsatz erprobt [1; 65]. Für die Oxidation organischer Abwasserinhaltsstoffe stehen eine Reihe von Oxidationsmitteln zur Verfügung. Aufgrund verschiedener vorteilhafter Eigenschaften [54] erscheint der Einsatz von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) besonders interessant. Durch die Aktivierung mit FE (II)-Salzen (Fenton's Reagens) oder anderen Katalysatoren, durch elektrische Energie werden aus H_2O_2 Hydroxyl-Radikale ($\bullet OH$) gebildet, die zu den stärksten bekannten Oxidationsmitteln gehören.

Zur Oxidation aromatischer Verbindungen mit H_2O_2 / FE(II)-Salz (Fenton's Reagens) liegen Übersichtsartikel und Monographien vor [55; 58; 66]. Für eine Vielzahl von Einzelsubstanzen (u.a. auch N-substituierte Aromaten [14]) konnte gezeigt werden, daß sie mit Fenton's Reagens entgiftet werden können. Auch die Behandlung von Industrie-Abwässern und Deponiesickerwasser mit Fenton's Reagens wurde erprobt.[15; 18; 54].

Als Endprodukt der Behandlung mit Fenton's Reagens entsteht ein Gemisch organischer Verbindungen. Die biologische Abbaubarkeit einer behandelten wässrigen Lösung ist im Vergleich zu einer unbehandelten Probe wesentlich erleichtert. Grundsätzlich gilt, daß ein an sich refraktärer CSB mit H_2O_2 / FE(II) zumindest zum größten Teil in biologisch abbaubare Substanzen umgewandelt wird, und auch toxische organische Verbindungen durch Oxidation zu mikrobiologisch abbaubaren Verbindungen transformiert werden [18; 54].

So wurde die Oxidation eines komplex zusammengesetzten Abwassers aus der Nitroaromatenproduktion mit Fenton's Reagens beschrieben [15]. Die Inhaltsstoffe des unbehandelten Abwassers waren toxisch oder ließen sich biologisch nicht abbauen. Es konnte gezeigt werden, daß durch chemische Oxidation ein Produktgemisch gebildet wurde, das in einer kontinuierliche betriebenen Laborbelebtschlammanlage vollständig biologisch verwertet wurde. Durch die Teiloxidation werden die organischen Inhaltsstoffe eines Abwassers häufig auch in besser adsorbierbare Stoffe umgewandelt. Dadurch kann der spezifische Aktivkohleverbrauch einer nachgeschalteten Aktivkohleadsorption gesenkt werden [18].

Die Oxidation organischer Wasserinhaltsstoffe durch H_2O_2 kann auch durch UV-Bestrahlung aktiviert werden [60]. Die Kombination H_2O_2 /UV wurde erfolgreich für die Oxidation von 2,4,6-Trinitrotoluol [43], 2,4-Dinitrotoluol [24] und phenolischer Intermediate der 2,4-Dinitrotoluol-Oxidation [25] eingesetzt.

2.2.2.2 Aerobe biologische Behandlung

Die Schwerpunkte der Untersuchungen lagen auf Experimenten zur Kompostierung von kontaminierten Böden und der aeroben Infiltration von Nährlösungen in kontaminierten Böden. Die zu Beginn der Arbeiten bereits veröffentlichten Ergebnisse zur ex-situ Behandlung von TNT kontaminierten Böden mittels Kompostierung deuteten auf eine weitgehende Eliminierung der Nitroaromaten während eines Kompostierungsprozesses hin [30]. Durch Kompostierungsversuche mit ¹⁴C-TNT konnte ferner von Isbister et al. 1984 [10] belegt werden, daß über 80% der markierten Substanz als nicht extrahierbare Rückstände im Boden verblieben. Unklar blieb dabei die Art der chemischen Bindung an das Kompostmaterial und es fehlten Versuche zur Remobilisierung der Schadstoffe aus dem Kompostmaterial, um mögliche Gefährdungen frühzeitig zu erkennen. Außerdem fehlten Untersuchungen zur Ökotoxikologie.

Erste Hinweise auf eine Abnahme der Toxizität des Bodenmaterial während einer Kompostierung erbrachten Arbeiten von Tan et al. (1992) [63], Griest et al. (1993) [17] und eigene Versuche. Gute Ergebnisse wurden in den bekannten Arbeiten lediglich mit Zuschlagstoffmengen von etwa 90% Vol. erreicht. Im Rahmen des Projektes wurde eine Optimierung des Kompostierungsverfahrens bei einer Reduktion des Zuschlagstoffes auf 50% Vol. erreicht. Außerdem wurde ein Modell für die Einbindung des Schadstoffes in den Boden entwickelt.

Es konnte gezeigt werden, daß viele Pilze, Hefen, Aktinomyzeten und gram-positive Bakterien recht gut in Gegenwart von TNT wachsen, wenn die Konzentration von 20 mg/l nicht überschritten wird. Dagegen gab es mehrere gram-negative Bakterien, die sich auch noch bei Konzentrationen von 100 mg/l entwickelten, bei noch höheren Konzentrationen aber deutlich gehemmt wurden [31].

Mehrere Autoren [10; 30; 39] versuchten mit Hilfe von Kompostierungsverfahren einen TNT-Abbau zu erreichen. Lediglich in den Versuchen von Doyle et al. (1986) [10] konnte ein vollständiger Abbau des TNT und dessen Metabolite unter Verwendung von Pferdemit-Heu-Kompost oder von Klärschlamm-Rinden-Kompost erzielt werden. Der Abbau war bei höheren Kompostierungstemperaturen (60° C) schneller und besser als bei niedrigeren Temperaturen (50° C). TNT-Metabolite (Aminoderivate von DNT) akkumulierten nicht in den Komposten. Allerdings konnte ein Aufschluß des Benzolringes auch in dieser umfassenden Arbeit nicht nachgewiesen werden.

2.2.2.3 Anaerobe biologische Behandlung

Über anaerobe Abbauprozesse [74] ist wenig bekannt. Sukzession von aeroben und anaeroben Abbaureaktionen (sowie auch abiotischen) spielen möglicherweise bei "natürlichen" Metabolisierungsreaktionen eine bedeutende Rolle. Positiv wird von manchen Autoren ein zweiphasiger Abbauweg beurteilt. Unter anaeroben Bedingungen werden die aromatischen Nitroverbindungen zu aromatischen Aminen reduziert. Die dabei entstehenden Anilinverbindungen könnten, wie bereits bekannt, unter aeroben Verhältnissen vollständig mineralisiert werden. So sollte grundsätzlich, wie Blotevogel und Butte (1990) [5] für p-Nitrophenol zeigen konnten, eine komplette Mineralisierung von zumindest bestimmten Nitroaromaten unter anoxischen Bedingungen möglich sein. Auf diesen Ergebnissen ist zu

schließen, daß eine Biologie für diese Verbindungen existiert und anaerobe Verfahren zunächst einmal favorisiert werden sollten. Trotzdem sind bisher nur wenige Daten zum Abbau von Nitrotoluolen verfügbar. Diese deuten allerdings darauf hin, daß vor allem Aminotoluole durch chemische aber auch vor allem durch biologisch vermittelte Transformationsreaktionen entstehen. Der mikrobielle Abbau von Aminotoluolen dürfte ein Schlüsselproblem im Mineralisierungsprozeß darstellen. Deshalb muß der Schwerpunkt der Untersuchungen nicht nur auf den Edukten der TNT-Produktion, sondern vornehmlich auf den Reduktionsprodukten, wie z. B. Triaminotoluol oder Aminonitrotoluolen, liegen. Aus diesem Grund befaßte sich die Universität Marburg im Teilprojekt 1 (Kapitel 9.2.2 des Leitfadens) zusätzlich zur Universität Oldenburg (Teilprojekt 2, Kapitel 9.2.3 des Leitfadens) mit den anaeroben Abbauprozessen.

2.2.3 Chemie und Biologie der Immobilisierung von Nitroaromaten

Das dynamische Beetverfahren beruht auf der in Abbildung 1 dargestellten Transformation des TNT zu Amino-Dinitrotoluolen und Diamino-Nitrotoluolen unter anaeroben Bedingungen und der anschließenden Immobilisierung dieser Produkte unter aeroben Bedingungen. Die mikrobiologischen und chemischen Teilreaktionen, die dem Immobilisierungskonzept zugrunde liegen, sind ausführlich beschrieben worden [16; 22; 73].

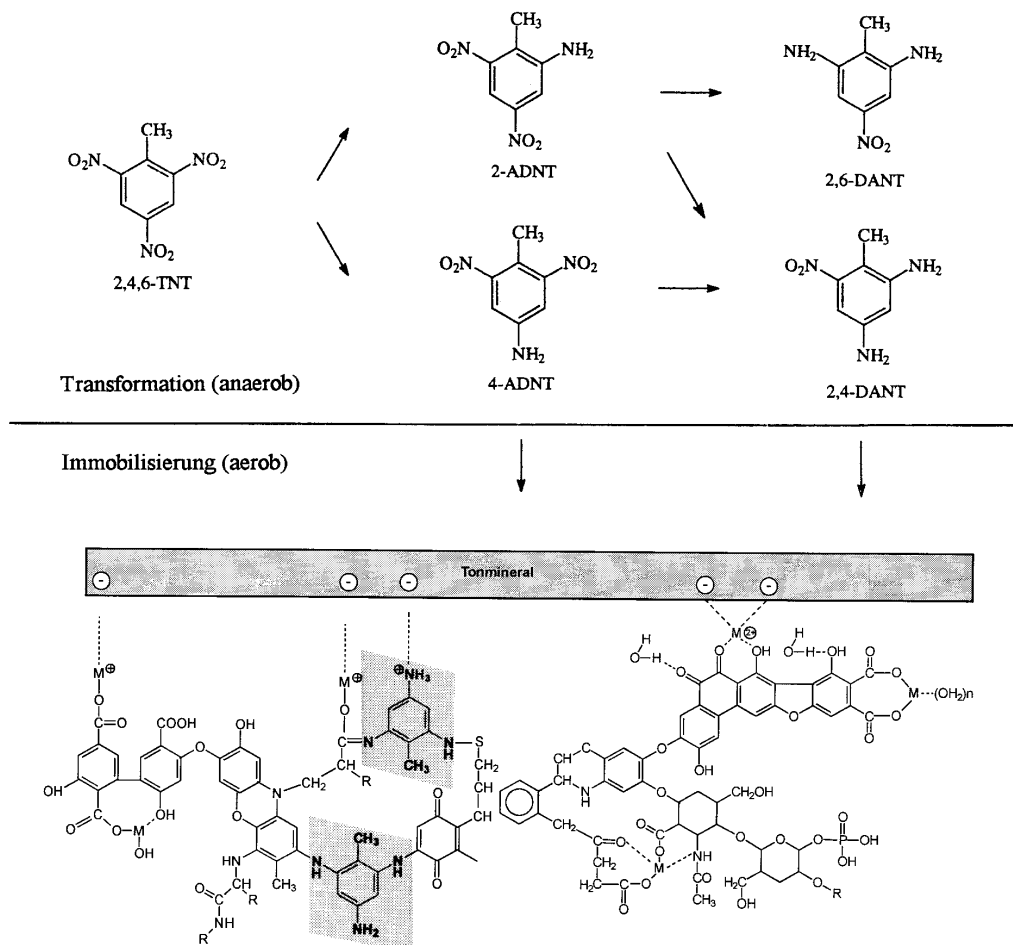


Abb.1: Modellvorstellung der Immobilisierung von Nitroaromaten durch anaerob/aerobe Behandlung TNT-kontaminierter Böden

2.2.4 Derzeitiger Stand der biologischen Verfahren

2.2.4.1 Verfahren zur Schadstoffmineralisierung

Zahlreiche Untersuchungen zur biologischen Behandlung von Sprengstoffen behandeln die Mineralisierung der Schadstoffe. Gelingt die vollständige oder weitgehende Mineralisierung (z. B. analog der Umsetzung von BTX-Aromaten oder Mineralölkohlenwasserstoffe), sind Überlegungen zum Langzeitverhalten des behandelten Bodens nicht erforderlich. Die Mineralisierung des TNT gelang jedoch bisher in Bodensystemen in nur unerheblichem Ausmaß. In Ansätzen zur bakteriellen Umsetzung von Trinitrotoluol in Böden, in Flüssigkulturen oder in Kompostierungsansätzen konnte radioaktiv markierter TNT-Kohlenstoff nur zu wenigen Prozentanteilen in der Form des Kohlendioxid nachgewiesen werden. Selbst in optimierten Laborsystemen konnte eine nennenswerte bakterielle Mineralisierung des Trinitrotoluol bis heute nicht sicher nachgewiesen werden. Lediglich Pilze waren in der Lage, in Flüssigkulturen höhere Anteile (maximal ca. 40 %) des radioaktiv markierten TNT-Kohlenstoffs als Kohlendioxid freizusetzen [11; 61]. In Bodensystemen waren derart hohe Mineralisierungsgrade aber auch dann nicht nachweisbar, wenn die Kultivierungsbedingungen auf das Wachstum von Pilzen abgestimmt waren.

2.2.4.2 Verfahren zur biologisch induzierten Immobilisierung von Nitroaromaten

Auf Grund der unvollständigen Mineralisierung von Trinitrotoluol in Böden stehen zur Zeit die mikrobiologischen Immobilisierungsverfahren im Mittelpunkt der Entwicklung biologischer Verfahren der Sanierung sprengstoffkontaminierter Böden. Die Untersuchungen zur Umsetzung von TNT hatten wiederholt gezeigt, daß im Verlauf der TNT-Transformation eine Einbindung von Metaboliten erfolgte, die mit einer Detoxifizierung verbunden war. Diese Beobachtung wurde systematisch zu biologischen Immobilisierungsverfahren ausgebaut, die mittlerweile interessante Alternativen zu nicht biologischen Verfahren darstellen. Die mikrobielle Transformation des TNT wurde intensiv untersucht und in Reaktionsmodellen dargestellt, die in mehreren Literaturübersichten ausführlich beschrieben werden [22; 73]. Allgemein geht man von einer sukzessiven Reduktion der Nitrogruppen des TNT zu Aminogruppen aus. Es wird vermutet, daß die Aminogruppen für die Einbindung der TNT-Transformationsprodukte in die Bodenmatrix verantwortlich sind. Die Einbindungsreaktionen werden als Humifizierungsprozesse beschrieben, doch ist bislang die exakte chemische Natur der gebildeten Produkte nicht aufgeklärt. Die Charakterisierung der chemischen Eigenschaften dieser Stoffe sowie ihr Langzeitverhalten unter verschiedenen Umweltbedingungen wird zur Zeit in Rahmen von Forschungsprojekten intensiv untersucht.

Reaktorverfahren zur Bodenbehandlung

Auf dem Prinzip der Schadstoffimmobilisierung beruht ein Reaktorverfahren, das durch ein deutsches Forschungsinstitut erarbeitet [35] und durch ein Sanierungsunternehmen im Pilotmaßstab erprobt wurde [3]. dieses Verfahren wurde zur Behandlung von Böden entwickelt, die mit dem dominanten Schadstoff Trinitrotoluol kontaminiert sind. Es ist durch folgende Eigenschaften gekennzeichnet:

- Transformation des Trinitrotoluol zum Triaminotoluol unter anaeroben Bedingungen
- Bearbeitung des Bodens nach Aufschlammung während der anaeroben Phase in Gegenwart organischer Cosubstrate
- Immobilisierung des Triaminotoluol unter aeroben Bedingungen in einer Bodenmiete nach Abtrennung des nahezu schadstofffreien Prozeßwassers

Das Verfahren wurde auf den Rüstungsaltslasten "Hirschhagen" bei Hessisch-Lichtenau und "Hallschlag" (Nordeifel) im Pilotmaßstab eingesetzt [3]. Die Bildung des TAT ist auf sehr geringe Redoxpotentiale angewiesen, die sich unter technischen Bedingungen nur in einer Suspension oder Bodenaufschlammung erreichen lassen. Der hohe Wassergehalt erfordert aber die kostenintensive Trennung des Wassers vom Boden vor der aeroben Behandlung oder spätestens vor der Bodenwiederverwertung.

Bereits im Winter 1993/1994 wurde in den USA auf dem Standort der "Weldon Spring Ordnance Works" ein Reaktorverfahren im Pilotmaßstab im Rahmen des Site-Programms der United States Environmental Protection Agency eingesetzt [12]. Im Rahmen dieses Versuches wurden 23 m² eines Bodens behandelt, der mit Trinitrotoluol als dominantem Schadstoff (1.500 mg/kg TS) kontaminiert war. Als Reaktor diente ein einfacher Tank, der auf Grund der niedrigen Außentemperaturen abgedeckt und zeitweise erhitzt wurde [12]. Der Tank wurde diskontinuierlich durchmischt.

Vor der Behandlung wurde der Boden mit einem Trennschnitt von 15,9 mm gesiebt. Anschließend wurde der Boden mit Prozeßwasser im Massenverhältnis 1:1 versetzt. Als Cosubstrat diente ein stärkehaltiges Nebenprodukt der Kartoffelverarbeitung. Außerdem wurde ein Phosphat-Puffer zugesetzt, um den pH-Wert auf einen Wert von 7 einzustellen. Die Zugabe einer Trinitrotoluol-umsetzenden Starterkultur erwies sich als notwendig für die Bodenbehandlung. Die Zugabe erfolgte nach Einstellung anaerober Bedingungen. Ein Redoxpotential von weniger als -200 mV wurde durch die Vergärung des Cosubstrates im Bioreaktor innerhalb von 26 Tagen eingestellt.

Begleituntersuchungen ergaben, daß die Trinitrotoluol-Umsetzung bei pH-Werten zwischen 6,0 und 7,0 sowie bei Temperaturen von 35-37°C und einem Redoxpotential von weniger als -200 mV optimal verliefen. Während der Behandlung wurde der Bodensuspension Salzsäure zugegeben, um einem steigenden pH-Wert entgegenzuwirken. Innerhalb von 9 Monaten konnte die TNT-Konzentration von 1.500 mg/kg TS auf 8,7 mg/kg TS reduziert werden. Nach 5 Monaten wurde ein Transformationsgrad von 95% überschritten. Während der Behandlung traten Zwischenprodukte auf, die jedoch nach der Behandlung analytisch nicht mehr nachweisbar waren.

Toxikologische Untersuchungen (Keimwachstum, Wurzelwachstum, Regenwurmüberlebensfähigkeit und -wachstum), die nach 5-monatiger Behandlungsdauer durchgeführt wurden, zeigten eine Detoxifizierung des Bodens [12]. Als geschwindigkeitsbestimmender Schritt wird die Lösung der kristallin vorliegenden Schadstoffe angesehen. Die veröffentlichten Daten machen keine eindeutige Aussage zur Art der Schadstoffelimination: es bleibt unklar, ob eine Mineralisierung der Schadstoffe angenommen wird oder ob die Detoxifizierung auf die Schadstoffimmobilisierung zurückgeführt wird. Eine aerobe Nachbehandlung, wie sie bei den oben beschriebenen Immobilisierungsverfahren vorgesehen ist, wurde nicht durchgeführt. Eine ökonomische Analyse ergab einen Behandlungspreis von 147 \$/m³ für ein Sanierungsvolumen von 3.824 m³ [12].

Verfahren, die auf dem Prinzip der Bodenaufschlammung während der anaeroben Reaktionsphase beruhen, sind mit dem Nachteil der hohen Kosten für die Wasserabtrennung vor Beginn der aeroben Phase oder vor der Bereitstellung des Bodens zur Wiederverwertung verbunden.

Seit 1993 verfolgt die Universität Marburg einen ebenfalls anaerob/aeroben Ansatz, in dem der Boden jedoch nicht suspendiert wird, sondern während der anaeroben Phase lediglich staunäß gehalten und während der anschließenden aeroben Phase analog der Kompostierung belüftet wird. Das Verfahren ist daher *als 2-Phasen-Kompostierung* oder *anaerob/aerobe Kompostierung* veröffentlicht worden (Bruns-Nagel et al., 1994; Bruns-Nagel et al., 1998). Ein wesentlicher Unterschied zum o. g. Suspensionsverfahren liegt in der Art der typischen Zwischenprodukte der TNT-Transformation: Nicht Triaminotoluol (TAT) ist das typische und angestrebte Zwischenprodukt, sondern Amino-Dinitrotoluole sowie Diamino-Nitrotoluole. Dem Verfahren liegt die Hypothese zugrunde, daß auch diese Zwischenprodukte irreversibel immobilisiert werden können.

Kompostierungsverfahren

Anders als bei den oben beschriebenen Immobilisierungsverfahren werden Kompostierungen unter aeroben Bedingungen betrieben. Durch die Zugabe sehr hoher Zuschlagstoff- (Cosubstrat)-Anteile kommt es zu einer Temperaturerhöhung auf Werte um 55 - 60 ° C bei der thermophilen Kompostierung oder ca. 40 ° C bei der mesophilen Kompostierung. Die Massenanteile des Zuschlagstoffes können dabei 60 % und mehr betragen. Als Mindestanteil des organisch gebundenen Kohlenstoffs werden 20 Gew.-% angegeben [68]. Die Kompostierung wurde mit verschiedensten Zuschlagstoffen, z. B. Stroh, Pferdemist, Hühnermist oder Sägespänen, untersucht [22].

Dabei konnten die Konzentrationen des Trinitrotoluol und seiner nachweisbaren Metaboliten auch bei sehr hohen Schadstoffkonzentrationen deutlich gesenkt werden. Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Trinitrotoluol haben deutlich gezeigt, daß, wie bei den oben beschriebenen Immobilisierungsverfahren, die Mineralisierung des Schadstoffes keine nennenswerte Rolle spielt. Statt dessen wurde der radioaktiv markierte Kohlenstoff des Schadstoffes an die Feststofffraktion des Kompostes gebunden [44]. Drastische Extraktionsmethoden führten zur partiellen Überführung des festgelegten, radioaktiv markierten Kohlenstoffs, doch konnten die freigesetzten Verbindungen bisher nicht charakterisiert werden.

Eine Bewertung des Kompostierungsverfahrens ist daher, vor allem unter dem Gesichtspunkt des ökotoxikologischen Langzeitverhaltens, schwierig. Die veröffentlichten Untersuchungen wurden im Labor- und Technikumsmaßstab durchgeführt, doch wird zur Zeit ein Standort der US-Army in Oregon mit einem Kompostierungsverfahren großtechnisch saniert [68]. Die Anwendung von Kompostierungsverfahren muß vor allem auf Grund der erheblichen Erhöhung des Anteiles der organischen Trockensubstanz des Bodens als problematisch angesehen werden. Die hohe Konzentration der Zuschlagstoffe bewirkt eine deutliche Änderung der physikalischen Eigenschaften des behandelten Bodens, so daß das Verwertungsspektrum des Bodens stark eingeschränkt wird.

2.2.4.3 Bodendekontamination durch Pilze

Während bei den Verfahren zur Schadstoffimmobilisierung nach dem Stand des Wissens für die Schadstoffumsetzungen vorwiegend Bakterien verantwortlich sind, werden bei den Verfahren zur Bodendekontamination durch Pilze die Kultivierungsbedingungen auf das Wachstum bestimmter Pilze abgestimmt. Für die Schadstoffumsetzungen werden dem Boden auf Stroh kultivierte Pilze, sogenannte Pilz/Stroh-Substrate, in hohen Konzentrationen zugesetzt. Intensive Untersuchungen des Trinitrotoluol wurden mit dem Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* durchgeführt, doch scheint dieser Pilz für technische Verfahren auf Grund seiner geringen Toleranz gegenüber diesem Schadstoff und wegen seiner hohen Empfindlichkeit gegenüber Bodenbewegungen nicht geeignet zu sein [22]. Die Suche nach Trinitrotoluol-umsetzenden Pilzen führte u. a. auch zur Untersuchung des Weißfäule-Pilzes *Bjerkandera adusta*, durch dessen Einsatz in Laboruntersuchungen ein Mineralisierungsgrad des TNT von ca. 40 % erreicht werden konnte. Unter technischen Bedingungen sind die Mineralisierungsgrade in einem Bodensystem jedoch weitaus geringer, so daß auch der Einsatz von Pilzen eine Bodendekontamination vor allem durch Schadstofftransformation und -Immobilisierung erreicht. Beim großtechnischen Einsatz der Bodendekontamination durch Pilze gelten die unter 2.2.4.2, Teil Kompostierung, dieses Beitrages gemachten Einschränkungen. Auch hier schränken die hohen Konzentrationen der Zuschlagstoffe die Bodenverwertung stark ein.

2.2.4.4 In situ-Verfahren zur Bodendekontamination

Ein wesentliches Problem der Sanierung zahlreicher Standorte der Militärproduktion oder des Militärbetriebes ist die großflächige Verteilung der Kontamination. Eine vollständige Sanierung auch der geringer kontaminierten Bereiche erscheint, vor allem aus finanziellen Gründen, kaum realisierbar. Andererseits verursachen diese Standorte oft über den Wasserpfad eine Gefährdung der menschlichen Gesundheit. Aus diesen Gründen ist für die Sanierung weiter, diffus kontaminierter Areale eine biologische in situ-Technologie vorgeschlagen worden, die sich von herkömmlichen in situ-Verfahren deutlich unterscheidet.

Das Konzept wurde an Beispiel Trinitrotoluol-kontaminierter Böden entwickelt und sieht die Verrieselung einer Cosubstrathaltigen Nährlösung, die Einbringung organischer Stoffe (z. B. Rindenmulch) zur Erhöhung des organischen Trockensubstanz-Anteiles und die Erhöhung der Bodenfeuchte zur Schaffung anaerober Verhältnisse während der Phase der Trinitrotoluol-Transformation vor. Durch die Transformationsreaktionen wird der Schadstoff analog den ex situ-Immobilisierungsverfahren zu Metaboliten umgesetzt, die irreversibel an die Ton-Humus-Fraktion des Bodens binden. Da in situ strikt anaerobe Verhältnisse nicht erreicht werden können, werden die Diaminonitrotoluole als die zu immobilisierenden Metaboliten der Trinitrotoluol-Umsetzung angesehen. Eine Eluierung von Schadstoffen durch Niederschläge soll auf diese Weise verhindert werden [22].

2.2.4.5 Pflanzenverfahren

Alternativ den mikrobiologischen in situ-Verfahren ist auch die Möglichkeit der Sanierung Trinitrotoluol-kontaminierter Böden durch Pflanzen untersucht worden. Pflanzen (z. B. Gräser, Bohnen oder Luzerne) akkumulieren Trinitrotoluole und Metaboliten der

Trinitrotoluol-Transformation vor allem in den Wurzeln. Ob langfristig eine Umsetzung zu unbedenklichen Produkten oder eine irreversible Fixierung erfolgt, ist noch nicht geklärt. Solange diese Frage offen ist, muß also von einer Pflanzenernte ausgegangen werden, die den Wurzelbereich umfaßt. Die zahlreichen ungeklärten Fragen lassen eine Sanierung Trinitrotoluol-kontaminierter Böden durch Pflanzen zur Zeit unwahrscheinlich erscheinen [22].

2.2.4.6 Verfahren zur Behandlung Nitroaromaten-kontaminierter Wässer

Nitroaromaten-kontaminierte Wässer fallen im Bereich der militärischen Altlasten als Standortwässer an. Außerdem sind sie als Prozeßwässer der Bodensanierung bei großtechnischen Sanierungen zu erwarten, wenn Extraktionsverfahren oder biologische Suspensionsverfahren verwendet werden. Stand der Technik der Reinigung von Standortwässern ist die Aktivkohlefiltration, die meist mit einer thermischen Entsorgung der schadstoffbeladenen Aktivkohle verbunden ist. Eine im Hinblick auf die Reststoffminimierung entwickelte großtechnische verfahrenstechnische Lösung, die ähnlich niedrige Betriebskosten aufweist, ist bislang nicht vorhanden.

3 Angewandte Methoden

Die Aufgabe der IABG innerhalb des Forschungsvorhabens besteht in der Projekt- sowie in der wissenschaftlichen und technischen Begleitung. Ziel der Projektbegleitung ist eine im Hinblick auf die Einhaltung von Kosten, Terminen und Forschungsinhalten erfolgreiche Projektdurchführung. Diese Teilaufgabe ist so untersetzt, daß alle maßgeblichen Tätigkeiten zur

- Projektvorbereitung (Organisation des Projektteams, Projektentwicklung, inhaltliche Abstimmung)
- terminlichen, kostenseitigen und inhaltlichen Kontrolle und Steuerung,
- Personaleinsatzplanung,
- Vertragswesen,
- Externen und internen Projektdokumentation sowie
- Vorsorglichen Ausrichtung des Forschungsvorhabens auf eine großtechnische Weiterentwicklung der angestrebten Lösung

enthalten sind.

Die wissenschaftliche und technische Begleitung zielt darauf ab, möglichst optimale Rahmenbedingungen für den Beginn der eigentlichen Untersuchungen in den Teilprojekten zu schaffen und diese im laufenden Projekt entsprechend anzupassen und zu optimieren. Hierzu zählen Maßnahmen

- zur Organisation des Projektes ,

- zur Bewertung der von Projektpartnern erzielten Ergebnisse,
- zur Ausrichtung technischer Lösungen in Zusammenhang mit sicherheitstechnischen Fragen,
- zur Qualitätssicherung der Versuchsdurchführung und -dokumentation sowie
- zum Berichtswesen .

Bei der Realisierung der vorgenannten Aufgaben lagen die Schwerpunkte der IABG im Berichtszeitraum in den folgenden Tätigkeiten:

3.1 Qualitätssicherung

Die Kontrolle der Durchführung der Analytik bei den vier Projektpartnern erfolgte im Auftrag des Projektkoordinators mittels Vergleichsuntersuchungen durch Dr. Rainer Haas (Büro für Altlastenerkundung und Umweltforschung, Marburg).

Der Bericht: "Analytischen Qualitätssicherung" über die Ergebnisse der drei Vergleichsuntersuchungen und Darstellung der chemisch-analytischen Untersuchungsmethoden wurde am 15.05.1998 fertiggestellt und durch den Projektkoordinator geprüft.

3.2 Inhaltliche Projektsteuerung

Die inhaltliche Steuerung orientierte sich vornehmlich an der festgelegten Zielhierarchien im Forschungsprojekt und der hieraus resultierenden Arbeitspakete im Rahmen der abgestimmten Projektstruktur. Die Arbeitspakete und Arbeitsschritte wurden schriftlich über die Versuchskurzbeschreibungen und Ergebniskurzberichte festgehalten und konnten anhand der dargelegten, unteretzten Zielstellung auf Zielkonformität zur übergeordneten Teilaufgabe überprüft werden. Bei nicht konformer Zielstellung wurden Arbeitspakete inhaltlich überarbeitet oder gestrichen und neu ausgerichtet.

3.3 Terminplanung und -kontrolle

Da es sich um ein Forschungsprojekt mit unklarem Verlauf der biologischen Untersuchungen handelte waren terminliche Festlegungen innerhalb der einzelnen Arbeitspakete nur in sehr breiten Zeiträumen möglich. Die Terminkontrolle erfolgte deshalb im Rahmen der quartalsweise durchgeführten Arbeitsgruppengespräche. Bei relevanten zeitlichen Verzögerungen wurden dichtere Kontrollabfragen durchgeführt. Diese Kontrollabfragen waren aber im wesentlichen nur für die Termineinhaltung der Berichtsabgabe erforderlich.

3.4 Vertragswesen, Auftragsverwaltung

Im Hinblick auf das Vertragswesen hatte die IABG die Aufgabe, die Erfüllung der in den entsprechenden FuE-Verträgen fixierten Leistungen in Abstimmung mit der IVG als Zuwendungsempfänger zu überwachen. Die Kontrolle der Leistungserfüllung innerhalb des Forschungsvorhabens betraf die Inhalte der Leistungen. Die Überwachung des Mittelabflusses

bzw. die Kostenkontrolle erfolgte im Rahmen eines separaten Vertrages mit der IVG und war damit nicht Bestandteil dieses Forschungsvorhabens.

Für die Kontrolle der Leistungen wurde ein Zeitplan erstellt, in dem als Meilensteine Termine zur Leistungserfüllung, d.h. zur Abgabe von Zwischenberichten, festgelegt wurden. Die Überprüfung der Leistungserfüllung erfolgte anhand der zu erstellenden Zwischenberichte sowie im Rahmen von regelmäßig stattfindenden Arbeitsgesprächen mit den Forschungspartnern.

Erst nach Vorlage der Zwischenberichte als Leistungsnachweis und der Prüfung der Inhalte im Hinblick auf die abgestimmte Projektstruktur sowie hinsichtlich der erforderlichen Qualität, erfolgte die Prüfung der zugehörigen Rechnungen und die Weiterleitung dieser Zahlungsbelege an den Zuwendungsempfänger, IVG.

3.5 Kostenkontrolle

Zusätzlich zum wissenschaftlich/technischen Projektmanagement, welches im Rahmen dieses Forschungsvorhabens durchzuführen war, wurde die IABG von der IVG mit der Kostenkontrolle beauftragt. Voraussetzung für die Rechnungsprüfung war die Vorlage des jeweiligen Leistungsnachweises für den betreffenden Rechnungszeitraum (dokumentiert durch Zwischenberichte oder durch Ergebnisse von Arbeitsgesprächen) sowie die Freigabe durch das wissenschaftlich/technische Projektmanagement nach Prüfung der Inhalte.

Die Rechnungen hatten die Forschungspartner in Form von entsprechenden Formularen in der Regel quartalsweise zu übergeben. Im Rahmen der Kostenkontrolle erfolgte eine formelle Prüfung dieser Zahlungsformulare sowie eine sachliche Überprüfung der im Leistungszeitraum angeführten Kosten im Hinblick auf die erbrachten Leistungen sowie hinsichtlich der in den Verträgen bewilligten Mittel.

Nach Vorlage der Zahlungsformulare aller Vorhabensbeteiligten wurden die Kosten zusammengefaßt und auf dieser Grundlage das entsprechende Formular für den Zuwendungsempfänger vorbereitet. Das vorbereitete Formular hatte die IVG dem Zuwendungsgeber, d.h. dem BMBF/UBA, zur Bewilligung der Bundesmittel zu übergeben. Zudem wurde im Zuge der Kostenkontrolle die IVG regelmäßig in Form von Übersichten über die Kostensituation informiert.

3.6 Vorhabensübergreifende Tätigkeiten

Übergreifend zur projektbezogenen internen Koordination erfolgten durch die IABG folgende Tätigkeiten:

- Abstimmung mit dem Projektträger PT AWAS über eine einheitliche Berichtsstruktur für den Zwischenbericht und den Abschlußbericht
- Gesamte Berichtsführung für den Projektträger und dem Koordinator des Verbundvorhabens 3, Universität Jena
- Direkter Ansprechpartner für externe Anfragen zum Teilvorhaben 3.1
- Außendarstellung des Teilvorhabens 3.1 durch Veröffentlichungen oder durch Vorträge im Rahmen der Statusseminare des Verbundvorhabens 3.

- Abgleich der projektinternen Zielstellungen mit denen des Verbundvorhabens nach Einbeziehung von Untersuchungsergebnissen der parallel durchgeführten Teilvorhaben.

3.7 Berichtswesen

Für das Projektjahr 1997 wurde im Berichtszeitraum ein Zwischenbericht über den Projektstand erstellt. Dieser Bericht wurde dem Projektträger AWAS vorgelegt. Für die Erstellung des Zwischenberichtes wurde mit dem Projektträger eine Gliederung abgestimmt. Die Gliederung des Berichtes wurde so angelegt, daß die einzelnen Kapitel später in einer einheitlichen Datenbank einfließen können.

3.8 Qualitätsmanagement

IABG ist zertifiziert nach DIN/ISO 9001 und integrierte auch im Berichtszeitraum für die Projektkoordination und Berichtsführung innerhalb des Forschungsvorhabens folgende Merkmale der Qualitätskontrolle:

- Erarbeitung einer Projektstruktur nach Aufbau der Zielhierarchie (Hauptziele, Teilziele, unterere Ziele)
- Darstellung und Ablauf des Projektes gemäß erarbeiteter Projektstruktur anhand festgelegter Arbeitspakete und Arbeitsschritte.
- Kontrolle der Zielkonformität von Arbeitspaketen und Arbeitsschritten im Hinblick auf die Hauptziele im Projekt und ggf. Zielrevision bei einer Schwerpunktverlagerung.
- Koordinierung von Vergleichsuntersuchungen zum Abgleich der von den vier Projektpartnern eingesetzten chemischen Analytik.
- Kontrolle der Berichtsführung
- Durchsetzung einer einheitlichen Außendarstellung der einzelnen Teilprojekte im Teilvorhaben 3.1

3.9 Vorhabensverlauf

3.9.1 Ausgangssituation

Bei dieser technischen Machbarkeitsuntersuchung geht es primär um das Herausfiltern des optimalen Verfahrens im Hinblick auf eine Weiterführung in den großtechnischen Maßstab. Hierzu sind folgende Rahmenbedingungen zu beachten:

- TNT-Konzentration im zu behandelnden Bodenmaterial zwischen 500 - 15.000 mg/kg
- Hoher Schluffanteil im Bodenmaterial, geringe Durchlässigkeit des Bodens
- Begleitkontamination durch Schwermetalle, vornehmlich Blei und Zink, vorhanden
- Hohe Toxizität des Ausgangsmaterials hinsichtlich Leuchtbakterientest und Regenwurmtest
- Weitere Nitroaromatenbelastungen wie DNT und DNB sind gering

Folgende allgemeine Fragestellungen sind für die Verfahrensfindung relevant:

- Läßt sich ein weitgehender TNT-Abbau erreichen?
- Wenn ja, über welchen Abbauweg, aerob oder anaerob?
- Wenn Metabolite beim TNT-Abbau entstehen, sind sie abbaubar und wenn ja, wie hoch ist der Abbaugrad?
- Wie hoch ist der technische Aufwand für den Betrieb/ die Realisierung eines funktionstüchtigen Verfahrens?
- Sind die technischen und wirtschaftlichen Ergebnisse/Erkenntnisse über das/die Verfahren ausreichend für eine Übertragbarkeit in einen Technikumsversuch?
- Sind die Ergebnisse aus toxikologischen Untersuchungen sowie aus Versuche zur Bilanzierung des Verfahrens erfolgsversprechend?

Diese Fragestellung bietet die Grundlage, aus denen die Kriterien für die Verfahrensfindung und daraus ein entsprechender Entscheidungsalgorithmus abgeleitet werden kann. Dieser Algorithmus wird im Rahmen dieses Forschungsvorhabens an den nachfolgend genannten Verfahrensansätzen zur Anwendung gebracht.

3.9.2 Verfahrensansätze

Folgende Verfahrensansätze wurden im Vorfeld der Verfahrensentwicklung einer vertieften anwendungsorientierten Machbarkeitsuntersuchung mit dem vorgenannten Bodenmaterial unterzogen:

- Aerobes Verfahren zur TNT-Mineralisierung
- Verfahren zur anaeroben Transformation des TNT und anschließenden Immobilisierung der Transformationsprodukte unter aeroben Bedingungen, kurz "TNT-Immobilisierung" oder "TNT-Humifizierung" genannt.
- Extraktion von TNT durch anaerobe Umwandlung des TNT zu den entsprechenden Aminoaromaten, die anschließend wäßrig eluierbar sind, kurz "Anaerobe TNT-Extraktion" genannt und
- Naßchemische Oxidation von Prozeßwässern aus der "Anaeroben TNT-Extraktion"

3.9.3 Ablauf der Entscheidungsfindung

Entsprechend dem in Abbildung 2 dargestellten Entscheidungsalgorithmus erfolgt für die Verfahrensansätze anhand des zuvor aufgestellten Fragenkatalogs eine weiterführende Machbarkeitsüberprüfung. Hierbei werden die aufgelisteten Kriterien nach dem Fragenkatalog entsprechend der zuvor formulierten Reihenfolge gebildet und in einer positiv/ negativ-Abfrage für die Verfahrensfindung eingesetzt.

Deutlich negative Ergebnisse führen zum Ausschluß des Verfahrens für die weiteren Untersuchungen. Bei Ausschluß eines Verfahrens ergibt sich die Notwendigkeit einer Anpassung und weiteren Untersetzung der zu Beginn des Vorhabens festgelegten Projektstruktur, da sich Aufgabenschwerpunkte verlagern. In diesem Vorhaben waren folgende drei Anpassungen der Projektstruktur erforderlich.

1. Verlagerung der Untersuchungen auf anaerobe Verfahren nach Ausschluß des Mineralisierungsverfahrens
2. Schwerpunktlegung auf ein biologisches Verfahren zum TAT-Abbau als Behandlung der Prozeßwässer aus der "Anaeroben TNT-Extraktion" nach Wegfall der Naßoxidation
3. Konzentration auf die Überführung des dynamischen Beetverfahrens in die Technikumsreife nach Ausschluß des Reaktorverfahrens

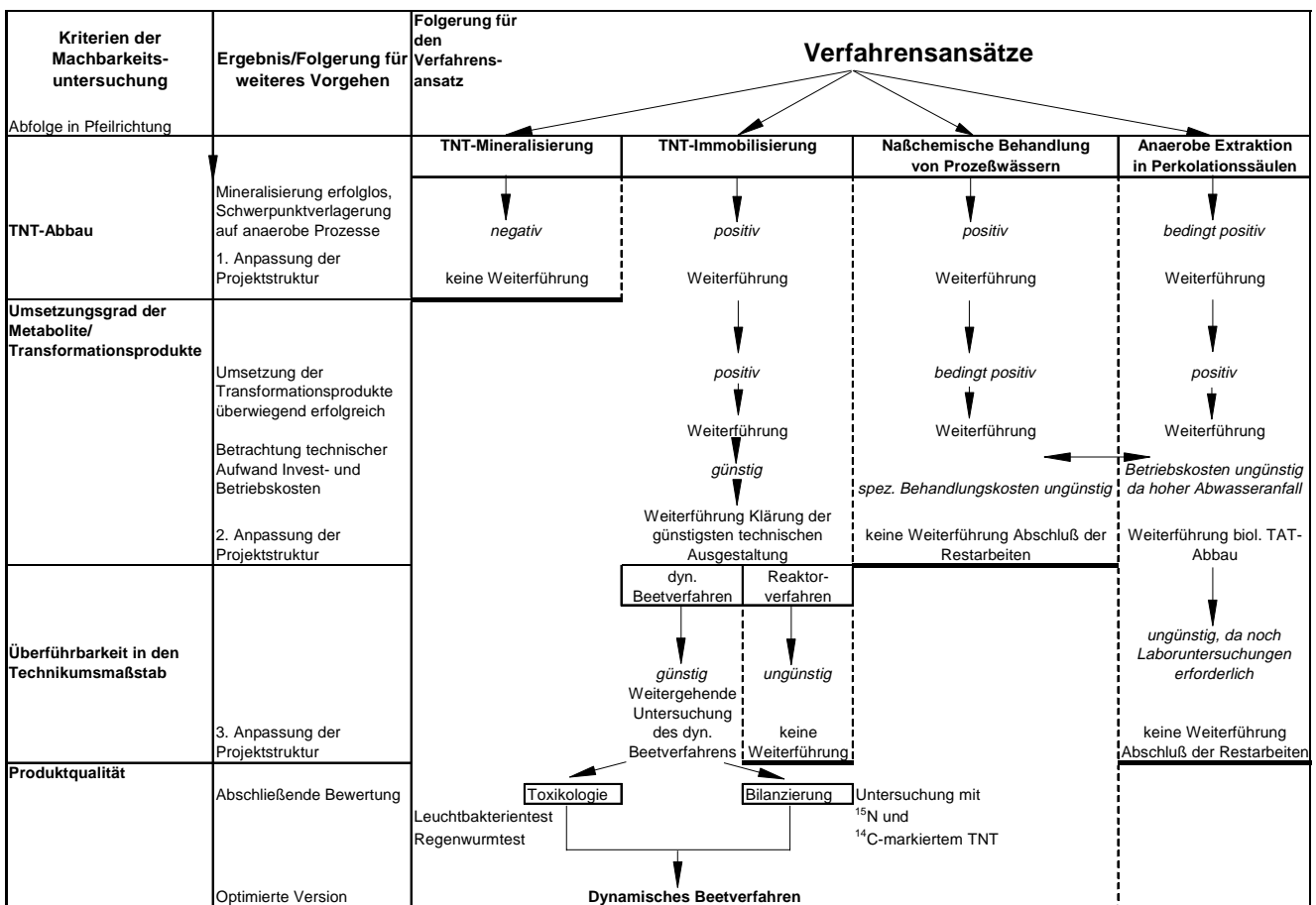


Abb. 2: Entscheidungsalgorithmus

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Ergebnisse der Teilprojekte

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Projektpartner lassen sich wie folgt zusammenfassen. Es ist anzumerken, daß die Ergebnisse für einen schluffig-lehmigen Boden (Boden vom Standort Werk "Tanne") mit einer Kontamination von 1-10 g TNT / kg Boden gelten.

Die Verfahren zur Schadstoffmineralisierung brachten nicht den erwünschten Erfolg. Wie es sich schon in der 1. Phase angedeutet hatte, gelingt die Mineralisierung von TNT in Bodensystemen nur in unerheblichen Maßstab. Es wurden die Forschungen in diese Richtung eingestellt und verstärkt in erfolgversprechenderen Projekte weitergeforscht.

Die Untersuchungen zur Umsetzung von TNT hatten wiederholt gezeigt, daß im Verlauf der TNT-Transformation eine Einbindung von Metaboliten erfolgte, die mit einer Detoxifizierung verbunden war. Diese Beobachtung wurde systematisch zu biologischen Immobilisierungsverfahren ausgebaut. Das Verfahren wurde von der Universität Marburg und der ContraCon GmbH zum Dynamische Beetverfahren weiterentwickelt und optimiert. Das dynamische Beetverfahren beruht auf der cometabolischen Transformation des TNT zu Amino-Dinitrotoluolen und Diamino-Nitrotoluolen unter anaeroben Bedingungen und der anschließenden Immobilisierung dieser Produkte unter aeroben Bedingungen.

Die mikrobielle Transformation des TNT wurde intensiv untersucht, konnte aber noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Die Einbindungsreaktion wird als Humifizierungsprozeß beschrieben. Die exakte chemische Struktur und das Langzeitverhalten der Produkte wird zur Zeit im Vorhaben 5 für den großtechnischen Maßstab erforscht.

Eine Anpassung des Verfahrens vom Labormaßstab auf den Technikumsmaßstab konnte durch die ContraCon GmbH erfolgreich durchgeführt werden. Bei der Substratwahl erwiesen sich handelsübliche, lagerbare Melasseschnitzel als geeignet.

Für ein Konzept zur in-situ Sanierung TNT-kontaminierter Böden, welches die Verrieselung einer cosubstrathaltigen Nährlösung neben der Einbringung organischer Stoffe (Erhöhung des organischen Trockensubstanz-Anteiles) und der Erhöhung der Bodenfeuchte (Schaffung anaerober Verhältnisse während der Phase der TNT-Transformation) vorsieht, wurden Versuche mit flüssigen Cosubstraten durchgeführt. Diese erbrachten leider keine befriedigenden Ergebnisse.

Im Labormaßstab konnte mit dem Verfahren der Anaeroben Perkolation ein Großteil des TNT eluiert werden. Doch Probleme bereitete vor allem das oft kristalline Vorliegen des TNT im Boden und der hohe Wasserverbrauch. Auch die Umsetzung der Erkenntnisse in einer Technikumsanlage schlugen fehl, da sich das Bodenmaterial zu stark verdichtete und nicht mehr perkolierbar war. Der Einsatz von Stroh als Strukturverbesserer und eine Kreislaufführung des Perkulationswassers könnten dem Verfahren neue Chancen eröffnen, obwohl besonders durch die Notwendigkeit eines Strukturverbesserers der Einsatz als in-situ-Verfahren erschwert wird. Resümee aus dieser Untersuchung: Das anaerobe Perkulationsverfahren ist unter der o.g. Versuchsbedingung (schluffiger Boden und TNT-Konzentration > 1.000 mg/kg) nicht geeignet.

Im Zusammenhang mit der Aufbereitung der anfallenden Prozeßwässer aus der anaeroben Perkolation wurde die weitere Umsetzung von TAT (Triaminotoluol) durch Chlostridien und

Pelobacter untersucht. TAT entsteht bei der anaeroben Metabolisierung von TNT als Zentralintermediat und wird von den genannten Bakterienstämmen cometabolisch umgesetzt. Ein gesondertes Vorhaben zur Aufklärung der genauen Reaktionswege des TAT-Abbaus könnte helfen, die natürlichen anaeroben Abbauewege des TNT unter Freilandbedingungen nachzuvollziehen.

Die Verfahren zur Behandlung Nitroaromaten-kontaminierter Wässer wurden im Rahmen dieses Forschungsprojekt von der ISFH GmbH untersucht. Stand der Technik der Reinigung von Standortwässern ist die Aktivkohlefiltration. Als Alternative wurde die Behandlung mittels Photokatalyse, Fenton-Prozeß und des Photo-Fenton Prozesses untersucht. Es zeigte sich, daß diese Verfahren einen sehr hohen Energieeintrag erfordern und sich das hochgiftige Trinitrobenzol bildete. Dadurch sind diese Verfahren sehr energieintensiv und kostenaufwendig und damit nicht konkurrenzfähig.

4.2 Darstellung der ausgewählten Verfahrensvariante: Das dynamische Beetverfahren

4.2.1 Verfahrensprinzip

Das Verfahrensprinzip basiert auf den in Abbildung 3 dargestellten biochemischen Reaktionen.

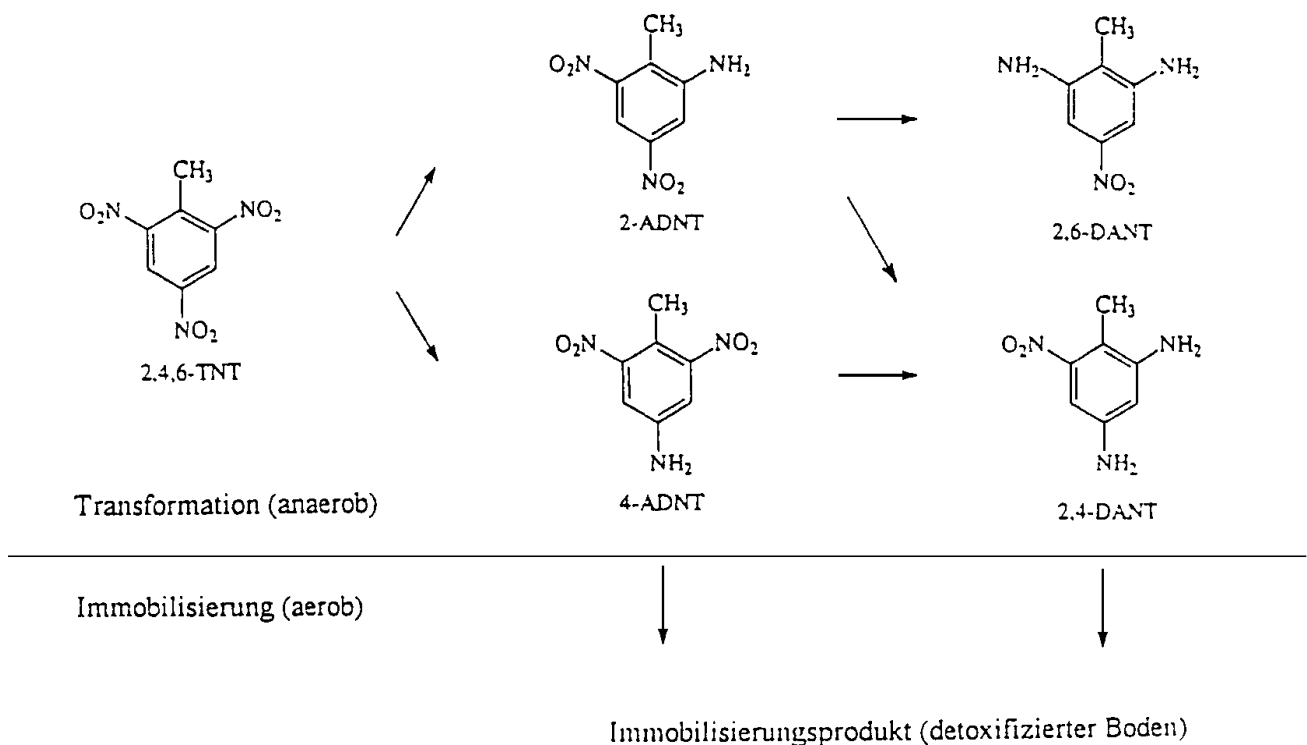


Abb. 3: Immobilisierung von Nitroaromaten durch anaerob/aerobe Behandlung TNT-kontaminierter Böden

Die Detoxifizierung der Böden läuft in zwei verfahrenstechnischen Schritten ab:

1. Transformation des Trinitrotoluols zu reduzierten Umsetzungsprodukten. Dieser Schritt erfolgt vorzugsweise unter anaeroben Bedingungen.
2. Immobilisierung der Transformationsprodukte durch irreversible Einbindung in die Ton/Humus-Fraktion des Bodens unter aeroben Bedingungen.

Für die mikrobiellen Umsetzungsreaktionen werden organische Substrate benötigt, die den beteiligten Mikroorganismen das Wachstum ermöglichen. Diese Substrate werden im Verfahrensablauf vollständig mineralisiert, d. h. zu den Endprodukten Kohlendioxid und Wasser abgebaut.

4.2.2 Verfahrenstechnische Voraussetzungen für die Optimierung des Abbauprozesses

Das Sanierungsverfahrens hat folgende Voraussetzungen zu erfüllen:

1. Der Boden wird detoxifiziert
2. Das Wiederverwertungsspektrum des behandelten Bodens ist möglichst weit
3. Das Verfahren ist ökonomisch attraktiv

Hierzu sind folgende Verfahreigenschaften zur Erfüllung der Voraussetzung erforderlich:

- Durch die Minimierung des Prozeßwassergehaltes des behandelten Bodens sollte als Technologie die verfahrenstechnisch einfache und zuverlässige dynamische Miete in leicht modifizierter Form eingesetzt werden können. Technisch aufwendige und kostenintensive Anlagen sowie die kostenintensive Bodenentwässerung entfallen bei Anwendung dieser Technik.
- Die Minimierung der Konzentration organischer Substrate oder anderer Zuschlagstoffe sollte ein möglichst weites Wiederverwertungsspektrum des Bodens gewährleisten. Die strukturellen Eigenschaften des Bodens sollen möglichst wenig verändert werden.

Diese Eigenschaften waren die wesentlichen verfahrenstechnischen Kriterien für die Entwicklungsarbeiten im Teilvorhaben 3.1.

4.2.3 Verfahrensablauf

Der Verfahrensablauf eines großtechnischen Verfahrens entspricht dem in Abbildung 4 dargestellten Konzept:

Nach der Auskofferung des Bodenmaterials wird der Boden grob gesiebt. Anschließend werden das für die Schadstoffumsetzung notwendige organische Substrat und weitere Zusätze, wie z. B. Nährstoffe, in den Boden eingebracht. Nach intensiver Durchmischung erfolgt der Einbau des Bodens in eine eingebaute Beetanlage, die aus den bewährten Beetanlagen der konventionellen biologischen Bodensanierung abgeleitet ist.

Durch die einsetzenden anaeroben mikrobiellen Umsetzungsreaktionen werden die Nitroaromaten, insbesondere das TNT, zu reduzierten Produkten transformiert. Nach

Abschluß dieser Umsetzungen wird die aerobe Behandlungsphase durch eine intensive Belüftung des Bodens durch mechanische Bearbeitung eingeleitet (dynamisches Beet). Durch die Umsetzungen während der aeroben Behandlung erfolgt die Einbindung des Transformationsprodukte in die Ton/Humus-Fraktion des Bodens. Das behandelte Bodenmaterial kann anschließend ausgelagert und nach den Vorgaben der Genehmigungsbehörden wiederverwendet werden. Die Einbindung der Nitroaromaten in die Ton/Humus-Fraktion soll zur Detoxifizierung des Bodens führen. Auch unter extremen Extraktionsbedingungen, z. B. bei niedrigen pH-Werten, sollen Nitroaromaten nach der biologischen Behandlung nur noch in geringsten Restkonzentrationen freigesetzt werden, so daß durch die biologische Behandlung eine Emission von Nitroaromaten über den Wasserpfad wirkungsvoll unterbunden werden kann.

Das Verfahren sollte zur Behandlung von hoch und gering mit TNT kontaminierten Böden eingesetzt werden.

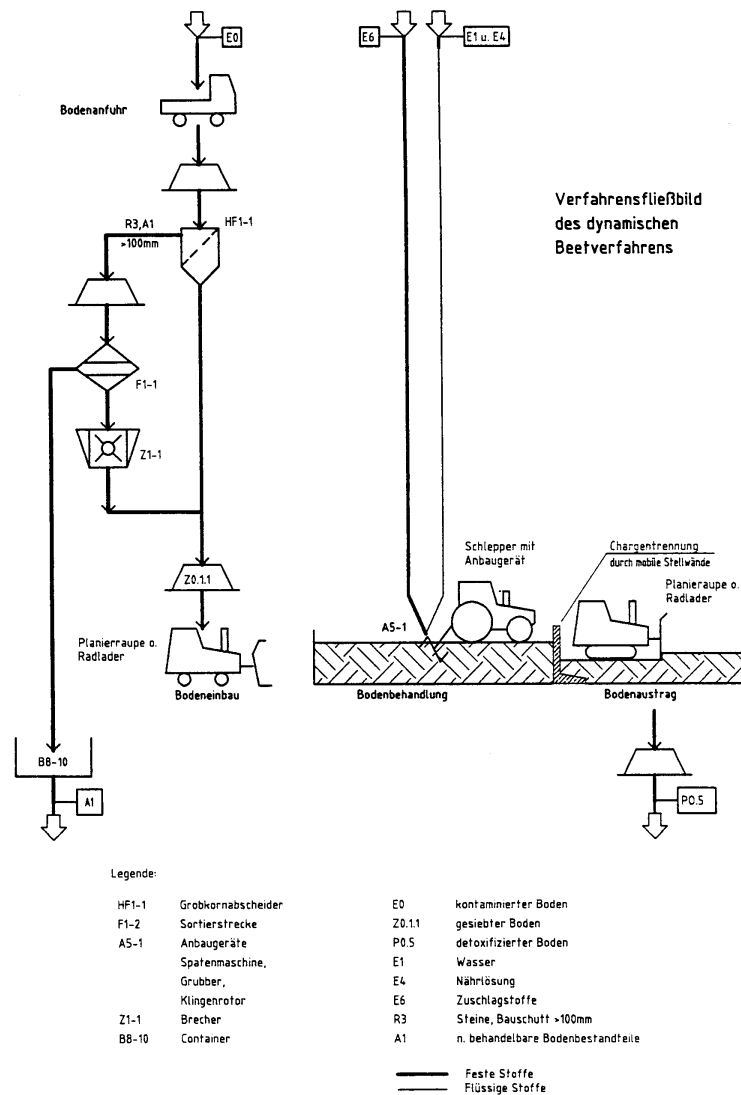


Abb. 4: Verfahrensfließbild des dynamischen Beetverfahrens

5 Ausblick

Als Endergebnis liegt das dynamische Beetverfahren in Technikumsreife vor, das auch durch toxikologische Untersuchungen sowie durch begleitende Bilanzierungsversuche seine Einsatzfähigkeit für die vorgenannten Bodenmaterialien unter Beweis stellen konnte. Das Verfahren wird nun im großtechnischen Maßstab erprobt. Die Ergebnisse sind im Zwischenbericht "Maßstabsgerechte Erprobung biologischer Verfahren mit Erfolgskontrolle auf dem Standort 'Werk Tanne' bei Clausthal-Zellerfeld" vom März 1998 bzw. im entsprechenden Schlußbericht nachzulesen.

6 Formeln und Abkürzungen

°C	Grad Celsius
ADNT	Aminodinitrotoluol(e)
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
DANT	Diaminonitrotoluol(e)
DNT	Dinitrotoluol(e)
FuE	Forschung und Entwicklung
g	Gramm, Fallbeschleunigung der Erde
Gew. %	Gewichtsprozent
IVG	Industrieverwaltungsgesellschaft
l	Liter
m	meter
m-	milli-
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
TAT	2,4,6-Triaminotoluol
TNT	2,4,6-Trinitrotoluol
u.a.	unter anderem; und andere
UBA	Umweltbundesamt
UV	ultravioletter Spektralbereich des Lichtes
Vol. %	Volumenprozent

7 Eigene Publikationen

- Publikation "Anaerobic/aerobic composting of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil in a reactor system" in *Environmental Science & Technology* (1998), 32:1676-1679.
- Publikation "Balance of metabolites and radioactivity distribution after transformation of [14C]-TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by an anaerobic *Desulfovibrio* species and an aerobic *Serratia* species" (by O. Drzyzga, D. Bruns-Nagel, T. Gorontzy, K.-H. Blotevogel and E. von Löw) in *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*.
- Publikation "Microbially supported washing of soil contaminated with the explosive 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) and photooxidative treatment of process waters" (by R. Dillert, T. Gorontzy) in *Environmental Science & Technology*.
- Publikation "Transformation and degradation of 2,4,6-triaminotoluene by the anaerobic bacterium *Pelobacter acidigallici*" (by A. Carstens, T. Gorontzy) in *Archives of Microbiology*.
- Publikation "Anaerobic incorporation of the radio-labeled explosive TNT and metabolites into the organic soil matrix of contaminated soil after different treatment procedures" (by O. Drzyzga, D. Bruns-Nagel, T. Gorontzy, K. Blotevogel & E. von Löw) in *Chemosphere*.
- Publikation "Charakterization of 15N-TNT residues after an anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures by solid-state 15N NMR spectroscopy. 1. Determination and optimization of relevant NMR spectroscopic parameters" (by H. Knicker, D. Bruns-Nagel, O. Drzyzga, E. von Löw und K. Steinbach) in *Environmental Science and Technology* 1999, 33, 343-349
- Publikation "Incorporation of 14C-labeled 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) metabolites into different soil fractions after anaerobic and anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures" (by O. Drzyzga, D. Bruns-Nagel, T. Gorontzy, K.H. Blotevogel, D. Gemsa and E. von Löw) in *Environmental Science and Technology* 1998, 32, 3529-3535.
- Publikation "Mass balance studies using 14C-labeled 2,4,6-trinitrotoluene mediated by an anaerobic *Desulfovibrio* species and an aerobic *Serratia* species" (by O. Drzyzga, D. Bruns-Nagel, T. Gorontzy, K.H. Blotevogel, D. Gemsa and E. von Löw) in *Current Microbiology* Vol.37 (1998), pp. 380-386.
- Publikation "Photocatalytic degradation of trinitrotoluene and trinitrobenzene: influence of hydrogen peroxide" (by R. Dillert, I. Fornefett, U. Siebers, D. Bahnemann) in *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 94 (1996) 231-236
- Publikation: "Effect of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites on human monocytes" (by D. Bruns-Nagel, S. Scheffer, B. Casper, H. Garn, O. Drzyzga, E. von Löw und D. Gemsa) in *Environmental Science & Technology*.
- Publikation: „Identification of oxidized TNT metabolites in soil samples of a former ammunition plant,“ (by D. Bruns-Nagel, T.C. Schmidt, O. Drzyzga, E. von Löw, K. Steinbach) in *Environmental Science and Pollution Research* 6 (1) 7-10 (1999)
- Publikation: „Microbial degradation of compounds with nitro-functions" (by K.-H. Blotevogel, T. Gorontzy) in J. Klein (ed.) *Biotechnology*, Vol. 11b, *Environmental Processes II*, Wiley-VCH, Weinheim, 273-302 (2000)

Publikation: „Alkaline hydrolysis of TNT in soil followed by thermal treatment of the hydrolysates,, (by A. Saupe, H. Garvens, L. Heinze) in Chemosphere 36, (8), 1725-1744,

7.1 Vorträge

Bruns-Nagel, D., H. Knicker, O. Drzyzga, B. Casper, K. Steinbach und E. von Löw. 1998. Aufklärung der Humifizierung von TNT mittels stabiler Isotope und NMR-Analytik. Statusseminar des BMBF-Vorhabens "Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen" am 22./23.09.98, Hochschule Bremen. Tagungsband erschienen in der Grün-weißen-Reihe des BMBF, ISBN 3-88135-323-2

Bruns-Nagel, D., O. Drzyzga, K. Steinbach, R. Winterberg, D. Gemsa und E. von Löw. 1998. Metabolisierung und Humifizierung von TNT während eines anaerob/aerob Beetverfahrens, DECHEMA-Jahrestagungen, 26.-28. Mai 98, Wiesbaden. Tagungsband S. 249-250

Bruns-Nagel, D., J. Breitung, T. Gorontzy, K.-H. Blotevogel, K. Steinbach, and E. v. Löw 1997. Bioremediation of 2,4,6-Trinitrotoluene-contaminated soil by anaerobic/aerobic and aerobic methods. In Situ and On-Site Bioremediation. 28. April - 01. Mai 1997 in New Orleans.

7.2 Poster

Poster für das Statusseminar des Forschungsverbundes in Clausthal-Zellerfeld:

- Rüstungsaltslasten – Detoxifikation durch Extraktion (by K.-H. Blotevogel, T. Gorontzy)

Zwei Poster für das Seminar am 6./7.05.98 in der Universitätsaula in Clausthal-Zellerfeld :

- Humifizierung von TNT (von D. Bruns-Nagel, O. Drzyzga, B. Casper, E. von Löw & K. Steinbach)
- Einbindung von TNT in Boden (von O. Drzyzga, D. Bruns-Nagel, K. Steinbach & E. von Löw)

Zwei Poster für die VAAM-Jahrestagung am 22.3. bis zum 25.3.98 in Frankfurt/Main und für das Statusseminar am 23./24.2.98 bei der DECHEMA in Frankfurt :

- Incorporation of ¹⁴C-labeled TNT metabolites into various fractions of the organic soil matrix (by O. Drzyzga, D. Bruns-Nagel & E. von Löw)
- Identification of acetylated and formylated TNT metabolites in anaerobic / aerobic treated soil (by D. Bruns-Nagel, O. Drzyzga, K. Steinbach & E. von Löw)

Zwei Poster für die Fachtagung "In situ and on-site Bioremediation" 1997 in New Orleans:

- Transformation of the explosive TNT by clostridia (by K.-H. Blotevogel, T. Gorontzy)
- Fate of nitroaromatics derived from explosives in anoxic (by K.-H. Blotevogel, T. Gorontzy)

Poster für die Jahrestagung der Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie (VAAM e.V.) 1997 in Hamburg:

- Umwandlung von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) durch *Clostridium spec* (by T. Gorontzy)

Poster für das Statusseminar des Forschungsverbundes in Frankfurt:

- Optimization of the microbially enhanced remediation of soil contaminated with the explosive TNT (by K.-H. Blotevogel, T. Gorontzy)

Poster für die Jahrestagung der Vereinigung für allgemeine und angewandte Mikrobiologie (VAAM e.V.) 1998 in Frankfurt:

- Degradation of 2,4,6-Triaminotoluene (TAT) by an facultatively anaerobic, fermenting bacterium (by K.-H. Blotevogel, T. Gorontzy)

8 Literaturverzeichnis

1. **Abwasserbehandlung.** In: Ullmanns Encyclopädie der technischen Chemie. Bd. 2, 4. Aufl. Verlag Chemie: Weinheim
2. **Akhmetova, D. Z. & R. P. Naumova** (1986): Final Stages of the Preliminary metabolism of 2,4,6-trinitrofluorene in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiologica* 55, 1040 - 1041.
3. **Anonym** (1995): Vorversuche zur Sanierung des Rüstungsstandortes Hallschlag. *TerraTech* 6, 31 - 34.
4. **Ashby, J., Burlinson, P. A. Lefevre & J. Topham** (1985): Non-genotoxicity of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) to the mouse bone marrow and the rat liver: implications for its carcinogenicity. *Arch. Toxicol.* 58, 9 - 14.
5. **Blotevogel, K.-H. & W. Butte** (1990): The behaviour of nitroaromatic compounds under methanogenic conditions. in: *DECHEMA Biotechnology Conferences*, Vol. 3B, 883 - 887.
6. **Bringmann, G. & R. Kühn** (1971): Biologischer Abbau von Nitrotoluolen und Nitrobenzolen mittels *Azotobacter agilis*. *Gesundheitsring.* 9/92, 273.
7. **Bruhn, C.; H. Lenke & H.-J. Knackmuss** (1987): Nitrosubstituted compounds as nitrogen source of bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 208 - 210 und H.-J. Knackmuss, Universität Stuttgart: pers. Mitteilung. Schreiben v. 19.3.1987.
8. **Carpenter, D. F.; N. G. Mc Cormick; J. H. Cornell & A. M. Kaplan** (1978): Microbial transformation of ¹⁴C - labeled 2,4,6-trinitrotoluene in an activated sludge system. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 949 - 954.
9. **De Jong, R.** (1975): -Stellungnahme des Hygiene - Institutes des Ruhrgebietes Gelsenkirchen f. d. Stadtverwaltung Hessisch - Lichtenau: Kontamination durch TNT - Halden im Raum Hessisch - Lichtenau - Hessa v. 11.9.1975.

10. **Doyle, R. C., J. D. Isbister, G. L. Anspach & J. F. Kitchens** (1986): Composting Explosives / Organic contaminated soils. Final technical report, Atlantic Research Corporation, Alexandria, Virginia, 198 pp.
11. **Eilers, A. & G. Gottschalk** (1994): Using the white rot fungus *Bjerkandera adusta* for bioremediation of TNT-contaminated soils. Poster, "Gemeinsame Frühjahrstagung der VAAM und der GDHM", Hannover, 07. - 09.03.1994
12. **EPA United States Environmental Protection Agency** (1995): J. R. Simplot ex-situ anaerobis bioremediation technology: TNT.EPA540/R-95/529a, September 1995
13. **Evans, W. C. & G. Fuchs** (1988): Anaerobic degradation of aromatic compounds. *Ann Rev Microbiol* 42, 289 - 317.
14. **Feuerstein, W. , E. Glibert und S. H. Eberle** (1981): *vom Wasser* 56; 35.
15. **Gilbert, E.** (1984): *Vom Wasser* 62; 307.
16. **Gorontzy, T.; O. Drzyzga; M. Kahl; D. Bruns-Nagel; J. Breitung; E. v. Löw; K.-H. Blotevogel** (1994): Microbial degradation of explosives and related compounds. *Critical Rev. Microbiol.* 20 (4); 265 - 284.
17. **Griest, W.H.; A.J. Stewart; R.L. Tyndall; J.E.Caton; C.-H. Ho; K.S.Ironside; W.M. Caldwell and E. Tan** (1993), Chemical and toxicological testing of composted explosive contaminated soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 12: 1105 1116
18. **Gruntz, U. und A. Wyss** (1990): *z.Wasser-Abwasser-Forsch.* 23; 58.
19. **Haas, R. und E. v. Löw** (1986): Grundwasserbelastung durch eine Altlast. die Folgen einer ehemaligen Sprengstoffproduktion für die heutige Trinkwassergewinnung. *Forum Städte-Hygiene* 36, 86 - 89
20. **Haas, R.** (1985): Trennung, Nachweis und Bestimmung von Nitrotoluidinen. *Forum Städte-Hygiene* 36, 86 - 89.
21. **Hankenson, K. und D. J. Schaeffer** (1991): Microtox Assay of Trinitrotoluene, Diaminonitrotoluene, and Dinitromethylaniline Mixtures. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 550 - 553.
22. **Held, F. K.** (1995): Möglichkeiten zur mikrobiellen Sanierung explosivstoff-kontaminierter Böden. In: *Rippen-Handbuch Umweltchemikalien* (Rippen, Hrsg.), ecomed, Landsberg/Lech, (Loseblattsammlung)
23. **Hingson, F- K.** (1992): Microbial degradation of nitroaromatic compounds. *Adv. Appl. Microbiol.* 37, 1 - 19.
24. **Ho, P. C.** (1984): Report AMXTH-TE-TR-85001 [Ordner No. AD-A 150 956].
25. **Ho, P. C.** (1986): *Environ. Sci. Techn.* 20; 260.
26. **Hommel** (1993): *Handbuch der gefährlichen Güter*; Springer-Verlag, Berlin.

27. **Hsu, T. S. & R. Borth** (1976): Hydrolysable and non hydrolysable 3,4-dichloroanilin complexes and their respective rates of biodegradation. *J. Agric. Food Chem.* 24, 118 - 122.
28. **Kaplan, D. L. & A. M. Kaplan** (1982): Mutagenicity of 2,4,6- Trinitrotoluene-Surfactant Complexes. *Bull. Environmental Contamination and Toxicology*, 28, 33 - 38.
29. **Kaplan, D. L. & A. M. Kaplan** (1982): 2,4,6-Trinitrotoluene-surfactant complexes: Decomposition, mutagenicity and soil leaching studies. *Environmental Science and Technology* 16, 566 - 571
30. **Kaplan, D.L., and A.M. Kaplan** (1982) Thermophilic biotransformations of 2,4,6-Trinitrotoluene under simulated composting conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44: 757-760.
31. **Klausmeier, R. E., J. L. Osmon, J. C. Hoffsommer** (1973): Metabolic disposition of 2,4,6-Trinitrotoluene. *Applied Microbiology*, 27, 513 - 516
32. **Koss, G., R. Haas, I. Schreiber, J. Preuß, B. Geestermann & B. Lehmann** (Arbeitsgruppe Umweltkontaminationen und Altlasten).
33. **Lankungs, D. B. & O. Gan** (1981): Identification of development of chemical analysis methods for plant and animal tissues. *US Army Armament and Development Command*, Englewood, Md.
34. **Leisinger, T.; & W. Brunner** (1986): Poorly Degradable Substances. pp 475 - 513; In: Rehm HJ (Ed.) *Biotechnology* Vol. 8, Verlag Chemie, Weinheim.
35. **Lenke, H.; G. Daun; D. Bryniok; H.-J. Knackmuss** (1993): Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten. *Spektrum der Wissenschaften* 10, 106 - 108.
36. **Löw, E v., L. Kaminski, W. Neumeier, R. Haas & K. Steinbach** (1989): Mikrobieller Abbau von Nitroaromaten aus einer ehemaligen Sprengstoffproduktion. Teil 2: Migration und mikrobielle Metabolisierung von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) im Grundwasser. *Forum Städte-Hygiene* 40, 347 - 349.
37. **Löw, E. v.** (1983): Vorkommen und mikrobieller Um- und Abbau von aromatischen Polyzyklen im Boden und in Siedlungsabfällen. *Forum Städte-Hygiene* 34, 263 - 267 (Kurzfassung d. Diss. Giessen 1978).
38. **Mc Connel, W. J. & R. H. Flinn** (1946): *J. Ind. Toxicol.* 28, 76.
39. **Mc Cormick, N. G., F. E. Feeherry & H. S. Levinson** (1976): Microbial tranformation of 2,4,6- Trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31, 945 - 958
40. **Miller, R. & F. Lingens** (1988): Der mikrobielle Abbau von chlorierten Kohlenwasserstoffen. *gwf-Wasser-Abwasser* 129, 55 - 60.
41. **Neumeier, W., R. Haas & E. v. Löw** (1989): Mikrobieller Abbau von Nitroaromaten aus einer ehemaligen Sprengstoffproduktion, Teil 1: Abbau von 2, 4, 6-Trinitrotoluol (TNT). *Forum Städte Hygiene* 40, 32 - 37
42. **Nörtemann, B.; H. J. Knackmuss** (1988): Abbau sulfonierter Aromaten. *gwf-Wasser-Abwasser* 129, 75 - 79.

43. **Noss, L. I. und R. H. Chrynek** (1984): Report USAMBRDL-TR-8308 [Ordner No. AD 141 135].
44. **Osmon, J. L. & C. C. Andrews** (1978): The biodegradation of TNT in enhanced soil and compost systems. Technical report ARLCD-TR-77032, US Army
45. **Osmon, J. L. & R. E. Klausmeier** (1972): The microbial degradation of explosives. Development in Industrial Microbiology, 14, 247 - 252.
46. **Palazzo, A. J.; D. L. Leggett; P. L. Butler; J. H. Graham & B. T. Foley** (1985): Effect and disposition of TNT in a terrestrial plant and validation of analytical methods. Contract Report, US Engineer Cold Regions Research and Engineering Laboratory, Hanover, N.H.
47. **Pereira, W. E.; D. L. Short, D. B. Manigold & P. K. Roscio** (1979): Isolation and characterisation of TNT and its metabolites in ground water by gas chromatograph - mass spectrometer computer techniques. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 21, 554 - 562.
48. **Rickert, D. E.** (1985): Mammalian and bacterial metabolism of nitroaromatic compounds. In: D.E. Rickert: Toxicity of Nitroaromatic Compounds. Mc Graw - Hill, 87 - 101.
49. **Rickert, D. E.; B. E. Butterworth & J. A. Popp** (1984): Dinitrotoluene: acute toxicity, oncogenicity and metabolism. CRC Crit. Rev. Toxicol. 13, 217 - 234.
50. **Schäfer, H.** (1992): Ableitung von Sanierungsrichtwerten für Böden mit spezifischen Belastungen aus der TNT-Produktion, in Spyra et al.: Verfahren zur Sanierung von Rüstungsaltslasten, EF-Verlag, Berlin
51. **Schneider, M. & K. J. Thomé-Kosmiensky** (1992): Biologische Behandlung von Explosivstoffen und explosivstoffbehafteten Böden, in Spyra et al.: Verfahren zur Sanierung von Rüstungsaltslasten, EF-Verlag, Berlin.
52. **Schoberth, S. M.; M. Brunner & H. Sahn** (1988): Anaerober Abbau von Halogenaromaten. gwf-Wasser-Abwasser 129, 86 - 90.
53. **Schott, C. D. & E. G. Worthley** (1974): The Toxicity of TNT and related wastes to an aquatic flowering plant: Lemna perpusilla Torr.. Technical Report Nr. E8-TR-74016, Edgewood Arsenal, Aberdeen Proving Ground, Md..
54. **Schwarzer, H.** (1988): gwf-Wasser-Abwasser 129; 484 und dort zitierte Literatur.
55. **Sheldon, R. A. und J. K. Kochi** (1981): Metal-catalyzed oxidations of organic compounds. Academic Press: New York.
56. **Shimidzu, M. & E. Yano** (1986): Mutagenicity of mononitrobenzene derivatives in the Ames test and rec assay. Mutat. Res. 170, 11 - 22.
57. **Smock, L. A. , D. L. Stoneburner & J. R. Clark** (1976): The toxic effect of trinitrotoluene (TNT) and its primary degradation products on two species of algae and the fathead minnow. Water Research 10, 537 - 543.
58. **Sosnovsky, G. und D. J. Rawlinson** (1970): Organic Peroxides. D. Swern, Hrsg.. BD.2, S. 269; Interscience: New York.

59. **Spangord, R. S.; W. R. Mabey, J. H. Smith & S. Lee** (1980): Environmental fate of selected nitroaromatic compounds in the aquatic environment. In D. E. Rickert: Toxicity of Nitroaromatic compounds. Mc Graw - Hill, 15 - 33.
60. **Stachel, B., B. Gabel, M. Cetinkaya, J. von Düzeln, R. Kozik, U. Lahl, A. Podbielski und W. Thiemann** (1982): gwf-Wasser-Abwasser 123; 190
61. **Stahl, J. D. & S. D. Aust** (1993): Metabolism and detoxification of TNT by *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 192, 477 - 482
62. **Stanier, R. Y.; N. J. Pallerson & M. Doudoroff** (1966): The aerobic pseudomonads - a taxonomic study. J. Gen. Microbiol. 43, 159 - 271.
63. **Tan, E.L., C. H. Ho, W. H. Griest, and R. L. Tyndall** (1992): Mutagenicity of trinitrotoluene and its metabolites formed during composting J. Toxicol. Environ. Health 36(3), 165-175
64. **Urbanski, T.** (1961): Chemie und Technologie der Explosivstoffe, Bd. 1; Leipzig.
65. **Verfahrensberichte zur Abwasserbehandlung.** VCI. 1976 - 1989.
66. **Walling, C.** (1975): Acc. Chem. Res. 8; 125.
67. **Whong, W. Z. & G. S. Edward** (1984): Genotoxic activity of nitroaromatic explosives and related compounds in *Salmonella typhimurium*. Mutat. Res. 136, 209 - 215.
68. **Williams, R. T. & P. J. Marks** (1991): Optimization of composting for explosives contaminated soil. Weston Inc. West Chester PA, USA, CHETHA-TS-CR-91053, DAAA15-88-D-0010.
69. **Won, W. D., L. H. Disalvo & N.G. James** (1976): Toxicity and mutagenity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. Appl. Environm. Microbiol. 31, 76 - 80.
70. **Won, W. D., R. J. Heckly, D. J. Glover & J. C. Hoffsommer** (1974): Metabolic disposition of 2,4,6-trinitrotoluene. Appl. Microbiol. 27, 13 - 66.
71. **Wyman, J. F.; H. E. Guard, W. D. Won & J. H. Quay** (1979): Conversion of 2,4,6-trinitrophenol to a mutagen by *Ps. aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 37, 222 - 226.
72. **Yinon, J. & D. G. Hwang** (1987): Applications of liquid chromatography - mass spectrometry in metabolic studies of explosives. J. Chromatogr. 394, 253 - 257.
73. **Yinon, J.** (1990): Toxicity and metabolism of explosives. CRC Press, Boca Raton.
74. **Zeyer, J.** (1988): Abbau aromatischer Nitroverbindungen. gwf-Wasser-Abwasser 129, 79 - 80.
75. **Zeyer, J.; H. P. Kocher & K. N. Timmis** (1986): Influence of para-Substituents on the Oxidative Metabolism of o-Nitrophenols by *Pseudomonas putida* B2. Appl. Environmental Microbiol. 52, 334 - 339.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.2 Verbundvorhaben 3: Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten

9.2.2 Aerob und anaerob-aerobe Behandlung von TNT-kontaminierten Böden vom Standort "Werk Tanne" (TV 3.1.1)

E. von Löw¹

D. Bruns-Nagel¹

O. Drzyzga¹

J. Fründt¹

B. Casper¹

K. Steinbach²

¹Institut für Immunologie und Umwelthygiene
Philipps Universität Marburg
Pilgrimstein 2, 35037 Marburg

²Fachbereich Chemie
Philipps Universität Marburg
Hans-Meerwein-Straße, 35032 Marburg

Förderkennzeichen: 1450791 12

Laufzeit: 01.06.1996 – 31.12.1998

1 Zusammenfassung und Zielsetzung

2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) ist weltweit als Boden- und Grundwasserkontamination ehemaliger Rüstungsfabriken nachweisbar. Aufgrund seiner toxischen Eigenschaften besteht ein dringender Handlungsbedarf für die Sanierung dieser Altlasten. Mikrobiologische Verfahren sind dabei von großem Interesse, da sie kostengünstig und nachhaltig sind und auf eine große Akzeptanz stoßen.

Wegen seiner chemischen Struktur ist TNT außerordentlich persistent gegenüber einer mikrobiologischen Mineralisation [20]. Es mußte daher nach neuen mikrobiologischen Verfahren zur Sanierung kontaminierter Böden gesucht werden. Seit 1993 wird am Institut für Immunologie und Umwelthygiene im Rahmen eines BMBF geförderten Projektes an der Entwicklung eines biologischen Sanierungsverfahrens für TNT kontaminierte Böden gearbeitet. Alle Arbeiten wurden mit kontaminierten Bodenproben der ehemaligen TNT-Fabrik "Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld, Niedersachsen, durchgeführt. Mikrobiologische Standortuntersuchungen ergaben, daß selbst in Bereichen mit sehr hohen TNT-Belastungen ($>10\text{g TNT/kg TS}$) eine ausreichende mikrobiologische Aktivität für eine biologische Bodensanierung vorhanden war [12; 2; 3]. Ein anaerob/aerob- Kompostierungsverfahren erwies sich für die Dekontamination von TNT belasteten Böden als besonders geeignet.

Ziel der ersten eigenen Untersuchungen war es zunächst, die Möglichkeit einer mikrobiellen Mineralisierung von TNT zu prüfen. Diese konnte wie erwartet mit den eingesetzten Verfahren nicht realisiert werden. Gleichzeitig wurden verschiedene Kompostierungsverfahren getestet, die auf der Basis einer cometabolischen Umwandlung des Schadstoffes eine weitgehende, irreversible Einbindung desselben in die Humusmatrix (Humifizierung) erreichen sollten:

Verglichen wurde ein „klassisches“ aerobes Verfahren mit einer zweiphasigen anaerob-aeroben Behandlung des Bodens. Das zweiphasige Verfahren erwies sich letztendlich als effektiver und zuverlässiger, da eine irreversible Einbindung erreicht wurde, während das rein aerobe Verfahren, trotz eines scheinbar wesentlich schnelleren Abbaus von TNT, dieses nach drastischer Extraktion teilweise wieder freisetzte [2].

Im Gegensatz zu den Verfahren anderer Arbeitsgruppen war jedoch nicht angestrebt, TNT bei niedrigen Redoxbedingungen zu Triaminotoluol (TAT) zu reduzieren, sondern es wurde versucht, die Produkte einer teilweisen Reduktion (v.a. Diaminotoluole: DANT) einer Einbindungsreaktion in die Humusmatrix unter aeroben Bedingungen zu unterziehen [6]. Chemische Analysen und begleitende ökotoxikologische Untersuchungen (z.B. Leuchtbakterientest, Ames-Test) bestätigten diese „Entgiftungsreaktion“.

Ziel der zweiten Projektphase war es, die irreversible Einbindung der TNT-Metabolite zu bilanzieren und deren Remobilisierbarkeit auszuschließen. Außerdem sollte die Strukturen der Humifizierungsprodukte dargestellt werden, um auch so eine Aussage über Remobilisierbarkeit, Fremdstoffcharakter und Langzeitverhalten der Produkte treffen zu können. Zu diesem Zweck wurden Versuche mit radioaktiv und nicht radioaktiv Isotopen-markiertem TNT durchgeführt. Dabei konnte eine weitgehende irreversible Einbindung von TNT in die Humusmatrix nachgewiesen werden. Remobilisierungsexperimente mit drastischen chemischen und physikalischen Verfahren bestätigten dieses. Außerdem wurden, neben mikrobiologischen Untersuchungen, z.B. Identifizierung und Quantifizierung von Nitroreduktase-aktiven Mikroorganismen, auch weitere chemische Analysen durchgeführt, die

bis dahin unbekannte oder wenig beachtete Konjugationsprodukte und von allem mobile, polare Metabolite zum Gegenstand hatten. Zur weiteren Bestätigung einer Entgiftung des behandelten Materials wurde ein neuartiger humantoxikologischer Test mit menschlichen Immunzellen etabliert.

Die Planung der Experimente orientierte sich an einem *Scale up*-Verfahren „dynamisches Beetverfahren“ das im Rahmen einer „Maßstabgerechten Erprobung biologischer Verfahren zur Sanierung von Rüstungsaltslasten“ (TV6) am Standort Clausthal-Zellerfeld“ von der Firma Plambeck-ContraCon, Cuxhaven als Projektpartner durchgeführt wurde. Dieses Verfahren basierte auf Experimenten, die von der Umwelthygiene der Univ. Marburg in der ersten Projektphase durchgeführt wurden [25]. Prozessbegleitend wurde das zweiphasige Kompostierungsverfahren hinsichtlich einer wirtschaftlichen Anwendung optimiert. Dieses betraf v.a. die Bodenbehandlung (Umsetzen, Homogenisierung), die Feuchtigkeitsreduktion in der ersten anaeroben Phase, die Auswahl und vor allem die Reduktion der Zuschlagsstoffe und Substrate und die Optimierung des pH-Wertes während des Prozesses. Eine Übersicht über den aktuellen Stand der Verfahrensentwicklung und der wissenschaftlichen Begleitung von Kompostierungsverfahren bei TNT und anderen Sprengstoffen ist in einem Beitrag von Bruns-Nagel et al [11] in dem Buch von J.C. Spain (Editor): „Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives“ dargestellt.

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

In der ersten Projektphase (1993 – 1996): BMBF-Projekt: „Mikrobielle Sanierung von Rüstungsaltslasten am Beispiel des ehemaligen Sprengstoffwerkes „Tanne“ bei Clausthal-Zellerfeld, Niedersachsen, Teilprojekt 1, Förderkennzeichen 1450791 wurden am Bereich Umwelthygiene, Zentrum für Hygiene der Univ. Marburg, Laboruntersuchungen durchgeführt, die die Basis für ein Technikumsverfahren darstellen sollten [1].

TNT erwies sich als generell „biologiefähig“, wie aus vielfältigen Arbeiten zu entnehmen war [15]. Laboruntersuchungen und später Versuche mit radioaktiver Markierung zeigten jedoch, daß TNT zumindest von Bodenbakterien nicht in signifikanter Menge mineralisiert werden konnte. Deswegen wurde nach einem Verfahren gesucht, mit dem es möglich war, durch cometabolische Prozesse den Schadstoff im Boden so zu verändern, daß eine irreversible Einbindung in die Humus-Struktur während der Humifizierung – *in statu nascendi* – erfolgen konnte.

Zum Zeitpunkt des Projektbeginns wurden verschiedene Strategien angedacht. Neben der strikt aeroben, klassischen Kompostierung wurde in Kooperation mit der Universität Oldenburg (Prof K.-H. Blotevogel) ein zweiphasiges anaerob (anoxisch) -aerobes Verfahren entwickelt

Kompostierungen von TNT-belasteten Böden wurden schon im großen Maßstab in den USA (v.a. durch militärische Einrichtungen) durchgeführt. Es sind „klassische“ aerobe Verfahren mit extrem hohen Zuschlägen an Auxiliarsubstraten.

3 Angewandte Methoden

3.1 Bodeninkubationsversuche (Bodensäulen und anaerob/aerob Kompostierung im Reaktor)

Tab. 1: Übersicht der Versuche

Versuch	(Co)Substrat	Prozess	Kontamination	Besonderes
Bodensäulen	Glucose	Vergl. belüfteter und nicht belüfteter Bodensäulen	TNT	Bei Belüftung nur sehr geringe bis keine Schadstoffmigration
Anaerob/aerob Kompostierung im Reaktor	Zuckerrüben und Stroh	anaerob (geflutet)/aerob (belüftet); on-line pH Regulation während der anaeroben Phase	TNT	Rasche, fast bilanzierbare TNT Reduktion. Nachweis von 3 konjugierten TNT-Metaboliten.
Anaerob/aerob Kompostierung TNT und DNT haltiger Böden	Melasse Schnitzel	anaerob (komprimiert mit wöchentlichem Wenden)/ aerob (täglich wenden)	TNT, 2,4- und 2,6-DNT	Rasche Reduktion aber keine Bilanz. Auch Elimination von DNT. Quantifizierung von 2 konjugierten TNT-Metaboliten.

3.1.1 TNT-Metabolismus in belüfteten und unbelüfteten Bodensäulen

Versuchsdurchführung

Untersuchung von Abbaureaktionen in niedriger kontaminierten Böden bei reduzierter Substratinfiltration:

- Einsatz von Bodensäulen auch zur Simulierung von *in-situ*-Bedingungen [5].
- Drei unterschiedliche mit TNT-kontaminierte Böden wurden mit 1g Glucose/ 100 g Boden vermischt.
- TNT- Startkonzentration: 880 mg/ kg - 350 mg/ kg TS
- In eine Bodensäule (25 cm hoch, 5,5 cm Durchmesser) wurden 150 g TNT-freier Boden gefüllt und mit 300 g TNT-kontaminiertem Boden, der Glucose enthielt, überschichtet.
- Vor Versuchsbeginn wurde die Lebendzellzahl im Boden ermittelt. Je TNT-Boden wurde ein belüfteter und ein nicht belüfteter Ansatz erstellt. Die Luft wurde über einen durchlöchernten Schlauch gepumpt und zur Befeuchtung durch eine wassergefüllte Waschflasche geleitet. Die Säulen auf einen Wassergehalt von ca. 30% (w/w) eingestellt

(Temperatur 22°C). Die Inkubationsdauer betrug 40 Tage. Danach wurden die Lebendzellzahlen in den jeweiligen Ansätzen ermittelt.

3.1.2 Anaerob/aerob Kompostierung TNT und DNT-haltiger Böden im Reaktor

Eine Mischung aus 50 Vol. % kontaminiertem-Boden, 30 Vol. % Zuckerrübenschnitzel und 20 Vol. % Stroh wurde mit einer Startkonzentrationen von 2,4-DNT ca. 450 mg/ kg TS; 2,6-DNT ca. 400 mg/ kg TS; TNT 1.500 mg/ kg TS behandelt:

- **anaerobe Phase:** 30°C und 4 Wochen
- **aerobe Phase:** 45°C für 2 Wochen und 18°C 1 Woche

Das Stauwasser wurde während der anaeroben Phase im Kreislauf perkoliert. Dadurch erfolgte zum einen eine verbesserte Schadstoffverteilung und zum anderen wurden im gesamten Reaktor nahezu gleiche Milieubedingungen erreicht.

Der pH-Wert des Stauwassers wurde on-line auf pH 7 reguliert.

Der TNT-kontaminierte Boden wurde mit DNT dotiert und eine Woche gelagert. Anschließend wurden 20% (w/w) Melasse-Schnitzel zugegeben. Der Kompost wurde auf einen Wassergehalt von ca. 60% eingestellt, in eine temperierbare Säule gefüllt und fest gestampft, um Luft zu entfernen und alle 7-10 Tage durchmischt.

3.2 Nachweis von Nitro- und Aminonitrobenzot in Bodenproben vom Werk Tanne

3.2.1 Bodenextraktion

Zunächst wurden 20 g Boden (aus der Nähe vom Gebäude 110) in 60 ml Puffer suspendiert und 24 h auf einem Horizontalschüttler geschüttelt. Anschließend wurde 20 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels HPLC/DAD analysiert.

In weiteren Versuch wurden vier verschiedene Bodenproben vom Gelände "Tanne" im Rahmen der maßstabsgerechten Erprobung biologischer Sanierungsverfahren in CLZ und aus den laufenden Sanierungsversuchen analysiert. Dabei wurden die Parameter der Probenvorbereitung variiert. Jeweils 5 g Boden wurden mit 10 ml dest. Wasser, bzw. 100 bis 150g Boden mit der doppelten Menge dest. Wasser versetzt und 20 min bei 14.000 rpm zentrifugiert.

3.2.2 HPLC/DAD Messungen

Die Trennung im 1. Versuch erfolgte mit einer Nucleosil 120-3 C18 Säule (3 mm x 25 cm). Die Methode war ähnlich der von Schmidt et al. [21] beschriebenen. Statt eines Puffers wurde jedoch Ameisensäure (pH 3) verwendet.

Die Trennung in den folgenden Versuchen erfolgte mit einer Nucleosil 120-3 C18 Säule (3 mm x 25 cm). TNT und Reduktionsprodukte wurden mit einem Gradienten bestehend aus

Wasser und Methanol getrennt. Die Methode wurde ausführlich von Bruns-Nagel et al. [8] beschrieben. Die oxidierten TNT Metaboliten wurden mit der gleichen Säule getrennt. Es wurde ein isokratischer Eluent aus Methanol und einem 25 mM Phosphatpuffer (pH 7) verwendet. Der Puffer enthielt 20 mM Tetrabutylammoniumhydrogen-Sulfat als Ionenpaarreagenz. Teilweise wurde jedoch ein Gradientenprogramm verwendet.

3.3 Nachweis von Nitroreduktase positiven Bodenmikroorganismen

Es wird vielfach postuliert, daß eine Nitroreduktase Aktivität eine ubiquitäre Eigenschaft von Bodenmikroorganismen ist. Es sollte ein experimenteller Beleg für diese Hypothese erbracht werden.

3.3.1 Erstellen der Bodensuspension und Beimpfen der Mikrotiterplatten:

Die Bodenproben stammten vom ehemaligen Werksgelände "Tanne" bei CLZ und aus dem Botanischen Garten Marburg. 10g Boden (TS) wurden in 90 ml Na-Pyrophosphat-Lösung (0,2%, w/v) suspendiert und 30 min bei 129 rpm geschüttelt. Anschließend wurde in 3 Schritten jeweils 1:10 in 0,9 % (w/v) NaCl verdünnt.

Es wurden Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten verwendet (NUCLON™ Surface). In jede Kavität wurden 100µl steriles Standard II Medium (Merck, Darmstadt) oder Mineralmedium (nach Drewes) gefüllt. Ansätze mit 100, 50, 25 und 0 mg TNT/l Medium wurden erstellt. Mit einer Achtkanal-Kolbenhubpipette wurden die ersten 8 Kavitäten einer Mikrotiterplatte mit der vorverdünnten Bodensuspension beimpft und in 1:2 Verdünnungsschritten weiter verdünnt, bis die gesamte Platte beimpft ist. Die Platten wurden bei 30°C und Dunkelheit 5 Tage inkubiert.

3.3.2 Auswertung:

Zunächst wurden alle bewachsenen Kavitäten ausgezählt. In den Ansätzen, die mit Mineralmedium erstellt wurden, erfolgte anschließend eine Analyse auf aromatische Amine. Die gebildeten aromatischen Amine wurden durch Azo-Kupplung mit 1% N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin (NEDA) nachgewiesen [3]. Die Bildung von aromatischen Aminen war als Rosafärbung erkennbar. Eine entsprechende Färbung belegte eine Nitroreduktase Aktivität der Bodenmikroorganismen. Die Quantitative Auswertung des Mikrotests erfolgte nach Rowe et al. [18].

3.4 Bilanzierung von [¹⁴C]-TNT in 2-Phasen-Kompost

Das Ziel dieser Versuchsreihe war es, den Einbindungsgrad von TNT-Metaboliten anhand der radioaktiven Markierung zu charakterisieren und vor allem zu quantifizieren. Dazu wurden die Proben jeweils nach einer anaeroben und einer anaeroben/aeroben Behandlung und die möglichen verschiedenen Pfade der Metabolitenbildung auf vorhandene Radioaktivität untersucht. Diese Pfade sind:

- die Gasphase (CO₂ und flüchtige organische Verbindungen)
- die Flüssigphase (Extraktionen mit Wasser, Ethylacetat und Methanol) und
- die Festphase (Boden/Melasse-Gemisch).

Die Festphase wurde einer weitgehenden Analyse unterworfen, um zu ermitteln, in welchen Fraktionen des Bodens, welche Radioaktivitätsanteile enthalten sind. Dazu wurde eine alkalische Hydrolyse vorgenommen, nach welcher eine Huminsäurefraktionierung durchgeführt werden konnte. Die Anteile an Radioaktivität, die in der Festphase nach den drei Extraktionen (in der Reihenfolge: Wasser --> Ethylacetat --> Methanol) enthalten sind, wurden als gebundene Rückstände (bound residues) bezeichnet. Sie stellen den fest gebundenen (humifizierten) Anteil dar [13; 14].

In der **Versuchsphase A, B und C** wurden vier bis fünf Ansätze gestartet, welche mit Boden und Melasse im Verhältnis 80:20 Gewichtsprozent (Trockengewicht) versehen waren. Startkonzentration war 590 mg TNT / kg Boden (Trockengewicht) plus 100 mg ¹⁴C-TNT / kg Boden in den markierten Ansätzen bzw. 100 mg TNT / kg in den unmarkierten Ansätzen; d.h. in allen Ansätzen 690 mg TNT / kg Boden. Die Menge an festem Cosubstrat (Melasseschnitzel) war 20% (Trockengewicht).

In der anaeroben Phase wurden alle Gefäße 5 Minuten mit Helium begast und die sauerstoffhaltige Luft herausgetrieben. Anschließend wurden alle Ansätze luftdicht abgeschlossen und inkubiert. In Wochenabständen wurden diese Ansätze kurz entlüftet, um entstandenen Überdruck zu vermeiden bzw. abzubauen. Nach 5 Wochen wurden zwei Ansätze (ein markierter und ein unmarkierter) beendet und ausgewertet, während die anderen Ansätze von dort an durch Luftzufuhr aerobisiert werden. Diese Ansätze wurden nach weiteren 4 Wochen beendet und ausgewertet. Im Gegensatz zur Versuchsphase A wurden die Ansätze B und C an der natürlichen Luft, also offen inkubiert, täglich manuell gerührt und der entstehende Wasserverlust über Gewichtseinstellung reguliert

3.4.1 Übersicht über die Versuchsphasen

Tab. 2: Versuchsphasen

Ansatz	Wassergehalt [%]	TNT [mg/kg TG]	Cosubstrat [% TG]	Dauer [Wochen]	
				aerob	anaerob
A	30	590 + 100*	20%	5	4
B	30	590 + 100*	20%	5	4
C	40	590 + 100*	20%	8	5
D	GoreTex Beutel	590 + 100*	20%	12	17

* ¹⁴C markiert

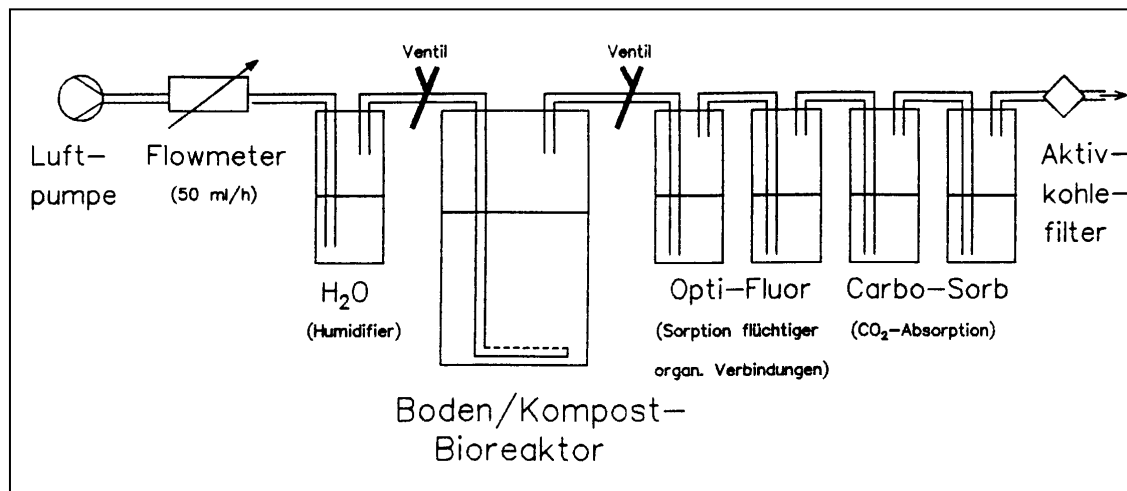


Abb. 1: Übersicht über die Versuchsphasen und Versuchsaufbau zur 2-Phasen-Kompostierung eines Boden/Melasse-Gemisches für die ^{14}C -Bilanzierungsexperimente. Aufbau für anaerobe und anaerob/aerobe Prozeßführung. Bei dem anaeroben Prozeß wurde die Luftzufuhr geschlossen.

In der Versuchsphase C wurden weitere Parameter geringfügig verändert, um den Einbindungsgrad von TNT-Metaboliten im Vergleich zu den Versuchsphasen A und B zu steigern. Die Versuchsdauer der zwei Ansätze (markiert und unmarkiert) war:

- 8 Wochen anaerob, zwei weitere Ansätze (markiert und unmarkiert)
- 8 Wochen anaerob plus 5 Wochen aerob.

Die Durchmischung erfolgte auf einem „Roller“ mit niedriger Umdrehungszahl. Um den Wassergehalt in den Ansätzen konstant zu halten (30-35%), wurden die Ansätze mit „Parafilm“ abgedeckt, um einen Austausch über die Gasphase zu ermöglichen (O_2 -Zufuhr, CO_2 -Abgang), während die Feuchtigkeit erhalten bleibt. Durch wöchentliche Gewichtskontrollen wurde dieser Parameter überprüft

In der Versuchsphase D, dem *GoreTex-Beutel*-Versuch, werden drei Beutel aus GoreTex-Membran mit TNT- und ^{14}C -TNT-haltigem Boden/Melasse-Gemischen in einem großen 50 Liter-Reaktor inkubiert, welcher ebenfalls mit TNT-haltigem Boden ($> 500 \text{ mg TNT / kg Boden}$) beschickt war. Die Startkonzentration war $790 \text{ mg TNT/kg Boden}$ (Trockengewicht) im 50 Liter – Reaktor und $590 \text{ mg TNT/kg Boden}$ in drei GoreTex-Beuteln; in den markierten Ansätzen zusätzlich $50 \text{ mg } ^{14}\text{C-TNT/kg Boden}$. Die Versuchsdauer war 12 Wochen anaerob plus 17 Wochen aerob.

Dieser Versuch sollte in erster Linie zeigen, ob eine Vergleichbarkeit zu den Ergebnissen der Versuchsphasen A bis C möglich ist, bei denen der Einbindungsgrad von TNT-Metaboliten in die organische Bodenmatrix in geschlossenen Kleinreaktoren untersucht wurde. Das Ziel war es, die Bedingungen im GoreTex-Beutel dem Umgebungsmaterial im Großreaktor (50 l) anzupassen.

3.5 ¹⁵N-TNT-Untersuchungen

Ziel des Versuchs war es, Aufschluß über die Bindungsart von nicht extrahierbaren TNT-Rückständen nach einer anaerob/aerob Behandlung zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde ¹⁵N-TNT dotierter Boden einer anaerob/aerob Behandlung unterzogen. Außerdem wurde eine Kinetik der Abnahme der extrahierbaren Nitroaromaten über den Versuchsverlauf erstellt. Ferner wurde regelmäßig die biologische Aktivität des Komposts ermittelt. Letztlich wurden die Böden mittels ¹⁵N-NMR analysiert und die Extraktionsverfahren für Huminfractionen verglichen.

Folgende Analysen wurden durchgeführt:

1. HPLC/DAD-Analysen der Methanol- und Dichlormethanextrakte
2. Flüssigkeits Kern-Resonanz-Spektroskopie (NMR) der HS-Fraktion. Zunächst konnten nur flüssige Proben mit der NMR untersucht werden, später wurde die Festkörper-NMR eingesetzt. Die HS-Fraktion wurde gewählt, weil Untersuchungen mit ¹⁴C-TNT zeigten, daß hier die größte Menge des Sprengstoffes gebundenen war.
3. ¹⁵N Festkörper NMR Analyse der Bodenfraktionen: Die gemörserten und gesiebten Proben (Gesamtboden) sowie die aus Eluat und Dialysaten eingegangenen Fraktionen des anaerob und anaerob/aerob behandelten Bodens wurden entnommen und für die NMR-Analyse vorbereitet.

Zunächst wurde das gewonnene Bodenmaterial mit Methanol extrahiert, um nicht gebundene TNT-Rückstände zu eliminieren. Durch Kochen mit 30% NaOH wurden anschließend Huminstoffe aus dem Boden isoliert. Diese wurden in Humin (fester, unlöslicher Rückstand), Huminsäure (HS, durch Ausfällen mit HCl) und Fulvosäure (FS) fraktioniert. Die so gewonnenen Fraktionen wurden getrocknet und mittels ¹⁵N-Festkörper-NMR vermessen (Frau Dr. H. Knicker, TU München). Später wurden die Fraktionen zusätzlich dialysiert (s.u.) [17; 10].

Die Startkonzentrationen (TNT) und sonstige Versuchsparameter der 3 Versuchsphasen sind in Tabelle 3 dargestellt.

Der ¹⁵N-TNT dotierte Boden wurde 1 Woche gelagert. Anschließend wurden 20% (w/w) Melasseschnitzel zugesetzt. Etwa 400g dieser Mischung wurden in 1 L Weckgläser gefüllt und inkubiert:

Im Überstand des gefluteten Komposts wurde täglich der pH-Wert und das Redoxpotential gemessen. Bei Bedarf wurde der pH-Wert durch Zugabe von Ca(OH)₂ auf 6-7 eingestellt. Das Stauwasser wurde nach Abschluß der anaeroben Phase einer aeroben Nachbehandlung unterzogen.

Um eine Vergleichbarkeit mit dem Dynamischen-Beet-Verfahren der Fa. ContraCon zu erreichen, wurde später der Kompost während der anaeroben Phase ohne zusätzliches Anfeuchten nur verdichtet.

Die Böden wurden nach Beendigung der jeweiligen Phasen zur Bestimmung von Nitroaromaten extrahiert und fraktioniert (in Humin, Huminsäuren, Fulvosäuren).

3.5.1 Extraktion und Huminstoffanreicherung des behandelten Bodens durch Dialyse

Um Störungen der NMR-Analyse durch NaOH-Reste zu vermeiden, wurden die folgenden Ansätze dialysiert. Nach Acetonitril Extraktion und Analyse mittels HPLC/DAD der Fraktionen erfolgten unterschiedliche Huminstoff-Extraktionen:

Tab. 3: Übersicht der Versuche (die Arbeitsschritte wurden zusammengefaßt):

Versuch	¹⁵ N TNT Konzentration im Ausgangsboden	Prozeß	Boden-aufarbeitung	¹⁵ N NMR Spektroskopie
1	1 g/kg TS	Anaerob/aerob in 2 Ansätzen. Typ 1 geflutete anaerobe Phase Typ 2 komprimierte anaerobe Phase	Lösungsmittel-extraktion, kochen mit 7,5N NaOH	Flüssigkeits NMR der NaOH Extrakte, keine Signale meßbar
2	20 g/kg TS	Anaerob/aerob mit komprimierter anaerober Phase	Lösungsmittel-extraktion, kochen mit 7,5N NaOH, Dialyse der NaOH Extrakte, Trocknung der Extrakte bei 50°C	Festkörper NMR, sehr gute Spektren für HS und Humin
3	20 g/kg TS	Anaerob/aerob mit komprimierter anaerober Phase	Lösungsmittel-extraktion, kalte Extraktion mit 0,5 N NaOH, kochen mit 0,5N NaOH, Trocknung der Extrakte, Dialyse der NaOH Extrakte	Festkörper NMR, sehr gute Spektren von Gesamtböden (nicht extrahiert) und allen sechs extrahierten Fraktionen

a.) Milde Huminstoff Extraktion

Der mit Acetonitril extrahierte Boden wurde getrocknet. Anschließend wurde er im Verhältnis 1:4 mit 0,5N NaOH versetzt. Die gewonnene Humin- und Fulvosäure wurde gefriergetrocknet und ein Aliquot von der Huminfraction wurde bei 30°C getrocknet.

Die trockenen Fraktionen wurden gegen dest. Wasser dialysiert (MCO 1000). Nach der Dialyse wurden die Humin- und Fulvosäure erneut gefriergetrocknet, und die Huminfraction bei 30°C getrocknet. Die so gewonnene mild extrahierten Huminstofffraktionen wurden mittels ^{15}N Festkörper NMR analysiert.

b.) Drastische Huminstoff Extraktion

Der aus a.) verbleibende Rest an Bodenmaterial (Humin) wurde im Verhältnis 1:4 mit 0,5 N NaOH versetzt und 3 h mit Rückflußkühlung gekocht. Anschließend wurde wie unter a.) verfahren.

3.5.2 Bestimmung der biologischen Aktivität im anaerob/aerob Kompost

Es wurden regelmäßig Proben entnommen und auf biologische Aktivität bzw. Lebendzellzahl nach MPN untersucht. Dies erschien wichtig, da bei der hohen TNT Konzentration eine toxische Wirkung auf das Bodenleben nicht auszuschließen war.

1 g Boden (TS) wurde in 9 ml 0,2% Natriumpyrophosphat (w/w) suspendiert und 30 min bei 120 rpm geschüttelt und ev. in 0,9% NaCl (w/w) dekadisch verdünnt. Anschließend wurde mittels der Mikromethode nach Rowe et al. [18] die Anzahl an Organismen auf folgenden Medien bestimmt:

- Standard II für aerobe und fakultativ anaerobe Bakterien,
- Malzextrakt Medium für Pilze und
- Differential Reinforced Clostridia broth für Clostridien.

Die Inkubation der Mikroplatten erfolgte / Tage bei 30°C.

3.6 Bewertung von TNT und Metaboliten mit einem Immunotox-Test

Ziel war die Etablierung eines humantoxikologischen Testsystems in Ergänzung zu praktizierten ökotoxikologischen Tests.

3.6.1 Versuchsdurchführung

Die Monozyten wurden aus sogenannten Buffy (Buffy-coats) gewonnen: Reste von Blutkonserven mit 10% Erythrozyten, 90% Leukozyten und 70% Trombozyten. Detaillierte Angaben zum Test: siehe Bruns-Nagel et al. [9] Die buffy-coats wurden mit Ficoll Separation Solution überschichtet und 30 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Das Serum wurde verworfen. Die Zellen wurden 2 mal in PBS (w/o)-Puffer gewaschen, nach jedem Waschen 10 min bei 1400 rpm zentrifugiert und in RPMI 1640+Suppl. (RPMI-Puffer: Seromed Biochrom KG, Berlin) aufgenommen. Die Monozyten wurden isoliert. Anschließend wurden sie in RPMI (+Suppl, +2% AB-Serum) aufgenommen und die Zelldichte auf $5 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt. Verwendet wurden als **Test-Assay**: Costar 96 Mikrottest-Platten (steril). Jede Kavität wurde mit 125 μl Zellsuspension und 100 μl Testsubstanz, die in PBS gelöst ist, gefüllt, anschließend

24 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 10µl Lucigenin-Lsg. und nach weiteren 15 min 10µl Zymosan-Lsg. zugegeben.

3.6.2 Chemielumineszenz-Messung

Die Messung erfolgte mit einem Luminometer (LUMIstar, BMG Lab Technologies). Es wurde in einem 90 Sekundentakt und 30 Meßzyklen gemessen. Die Meßdauer je Einzelmessung betrug 1 Sekunde. Testsubstanzen waren TNT, 4-ADNT, 2-ADNT, 2,4-DANT, 2-Acetylamino-DNT, 4-Acetylamino-DNT, die beiden Azoxyverbindungen: 4,4'-Az, 2,2'-Az sowie Boden- und Komposteluate mit und ohne TNT, behandelte und unbehandelte Bodeneluate.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Bodeninkubationsversuche (Bodensäulen und anaerob/aerob Kompostierung)

4.1.1 Bodensäulen

Die Ergebnisse der Bodensäulenversuche (Tab. 4) zeigten, daß eine belüftete Inkubation eines Bodens, der 1% (wt/wt) Glucose enthielt innerhalb von 40 Tagen zu einer 62-90%igen Abnahme der extrahierbaren Menge an Nitroaromaten führte. Sie war am effektivsten bei der höchsten Konzentration von ca. 880 mg TNT/ TS. Die Migration von TNT und Transformationsprodukten war nur außerordentlich gering.

Tab. 4: TNT-Abbau in glucosehaltigem Boden. Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Bodenextraktionen aus je 5 g Boden. T₀: Versuchsbeginn; T₄₀: Versuchsende nach 40 Tagen

	TNT [mg/kg TS]	4-ADNT [mg/kg TS]	2-ADNT [mg/kg TS]	Lebendzell- zahl [MPN]
Boden1 T ₀	878,9 ± 159,3	n.b.	n.b.	6,8 x 10 ⁴
Boden 1 T ₄₀ Belüftet, kon. ^a	53,9 ± 29,7	17,0 ± 1,9	18,9 ± 2,8	1,5 x 10 ⁵
Boden 1 T ₄₀ Belüftet, nicht kon. ^b	n.n.	0,5 ± 0,3	0,6 ± 0,5	1,4 x 10 ⁴
Boden 1 T ₄₀ Unbelüftet, kon.	586,9 ± 575,8	79,7 ± 6,7	79,9 ± 6,9	1,7 x 10 ⁵
Boden 1 T ₄₀ Unbelüftet, nicht kon.	1,6 ± 0,3	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,6 x 10 ⁵

Tabelle 4: Fortsetzung

Boden	TNT [mg/kg TS]	4-ADNT [mg/kg TS]	2-ADNT [mg/kg TS]	Lebendzell- zahl [MPN]
Boden 2 T ₀	609,4 ± 178,1	n.b.	n.b.	5,6 x 10 ⁴
Boden 2 T ₄₀ Belüftet, kon.	25,5 ± 7,7	25,2 ± 7,4	25,6 ± 8,6	1,1 x 10 ⁵
Boden 2 T ₄₀ Belüftet, nicht kon.	0,525*	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,2	4,6 x 10 ⁴
Boden 2 T ₄₀ Unbelüftet, kon.	89,0 ± 5,0	31,3 ± 16,0	40,5 ± 7,8	1,4 x 10 ⁵
Boden 2 T ₄₀ Unbelüftet, nicht kon.	1,4 ± 1,2	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	7,5 x 10 ⁴
Boden 3 T ₀	353,9 ± 62,2	n.b.	n.b.	8,1 x 10 ⁴
Boden 3 T ₄₀ Belüftet, kon.	56,2 ± 34,6	33,1 ± 24,4	44,2 ± 35,3	2,1 x 10 ⁵
Boden 3 T ₄₀ Belüftet, nicht kon.	n.n.	n.n.	n.n.	2,5 x 10 ⁴
Boden 3 T ₄₀ Unbelüftet, kon.	83,7 ± 51,1	18,2 ± 3,2	19,8 ± 3,2	9,4 x 10 ⁵
Boden 3 T ₄₀ Unbelüftet, nicht kon.	0,1*	0,2*	0,3*	5,3 x 10 ⁴
Unbelasteter Boden vor Versuchsbeginn	n.n.	n.n.	n.n.	0,2 x 10 ⁴

^a Mit Nitroaromaten kontaminierter Boden aus dem oberen Bereich der Säule.

^b Ursprünglich nicht mit Nitroaromaten kontaminierter Boden aus dem unteren Bereich der Säule.

Bei einer Ausgangskonzentration von ca. 350 mg TNT/kg TS war sogar keine Migration festzustellen. Bei unbelüfteten Säulen war die Abnahme der extrahierbaren Menge an Nitroaromaten geringer (15-66%) und die Migration höher als bei den belüfteten Säulen. In jedem Fall führte die Inkubation des Bodens mit Glucose zu einer Erhöhung der Lebendzellzahl um etwa eine halbe Zehnerpotenz und innerhalb von 40 Tagen zu einer signifikanten Abnahme des TNT-Gehaltes im Boden.

Die TNT-Abbau- und Transformationsleistung in den belüfteten Böden war deutlich größer als in den unbelüfteten Böden. In dem am höchsten kontaminierten Boden (ca. 850 mg TNT/kg TS) wurde mit ca. 90% die höchste Abbaurrate erreicht. Ähnlich hoch war die Abbauleistung bei dem mit etwa 600 mg TNT/kg TS belasteten Boden. Dennoch waren die Restkontaminationen mit etwa 25-55 mg TNT/kg TS recht hoch. Niedrigere Werte sind vermutlich durch ein Nachdosieren von Glucose zu erreichen. Eine nennenswerte Migration

von TNT oder Abbauprodukten in den unbelasteten Boden war in keinem Versuch nachweisbar.

Der Versuch zeigt, daß die Einarbeitung einer leicht verwertbaren C-Quelle in TNT-kontaminierten Boden, besonders bei gleichzeitiger Belüftung, zu einer relativ raschen Abnahme der extrahierbaren Menge an TNT führt [4; 5].

4.2 Anaerob/aerob Kompostierung im Reaktor

Die anaerob/aerob Kompostierung in einem Reaktor System, bei dem der pH-Wert während der aeroben Phase (geflutet) on-line auf 7 reguliert wurde, führte zu einer fast bilanzierbaren, sehr raschen (19 Tage), Transformation von fast 90% des TNT v.a. zu Reduktionsprodukten. Eine nachgeschaltete aerobe Phase bewirkte eine weitgehende Eliminierung des restlichen TNT und der Reduktionsprodukte [3; 6].

In Methanolextrakten regelmäßig entnommener Kompostproben konnten erstmals drei unterschiedliche konjugierte TNT Metaboliten gefunden werden. Es handelte sich um 4-N-Acetylamino-2-hydroxylamino-6-nitrotoluol, 4-N-Formylamino-2-amino-6-nitrotoluol und 4-N-Acetylamino-2-amino-6-nitrotoluol. Weitere Untersuchungen zeigten, daß die Acetylierung von 2,4-DANT reversibel war [6; 7]. Bereits in der anaeroben Phase erfolgte ein Abbau der Substanzen. Die Aerobe Phase führte zu einer fast vollständigen Elimination. Ferner wurde die Bildung von 4,4'-Az während der anaeroben Phase nachgewiesen. Es zeigte sich, daß dieser Metabolit kein "dead end product" war.

Die Bedeutung konjugierter TNT Metaboliten und deren toxikologische Wirkung ist zur Zeit noch unbekannt. Aus diesen Gründen sollten diese Verbindungen in Begleituntersuchungen von biologischen Sanierungen mit aufgenommen werden.

4.2.1 Anaerob/aerob Kompostierung TNT und DNT haltiger Böden

Bei dem Kompostierungsverfahren handelt es sich um ein Trockenverfahren, daß dem von der Fa. Plambeck ContraCon entspricht.

Es konnte eine sehr rasche Transformation von TNT erreicht werden (11 Tage), wobei eine Bilanzierung nicht möglich war. Die nachgeschaltete aerobe Phase führte zu einer weiteren Abnahme der extrahierbaren Menge an Nitroaromaten. Insgesamt wurden in dem Verfahren ca. 93% der TNT-Kontamination eliminiert. Das Problem der inhomogenen Schadstoffverteilung wurde durch einen "Ausreißer" am Tag 48 deutlich. Dies zeigt, daß für ein Sanierungsverfahren eine optimale Durchmischung (Homogenisierung) des Materials notwendig ist. Für 2,4- und 2,6-DNT konnte gezeigt werden, daß die anaerob/aerob Kompostierung ebenfalls zu einer Schadstoffeliminierung führt. Es wurde eine Schadstoffabnahme von etwa 99% oder mehr erreicht.

Dargestellt ist in Abb.2 die Transformation von TNT zu aromatischen Aminen und die anschließende Elimination dieser Produkte. Es erfolgte eine weitgehende Transformation des TNT in nur 11 Tagen. Bereits während der anaeroben Phase war eine nahezu vollständige Elimination der Reduktionsprodukte und des TNT nachweisbar. Es wird postuliert, daß es sich hierbei um eine Einbindung der Amine in die Boden-Humus-Matrix handelt, möglicherweise da schon die anaerobe Phase während des Durchmischens kurzfristig aerobisiert wurde. Es

wurde bei diesem Versuch eine Endkonzentration von ca. 10 mg TNT/kg TS erreicht. Die Ausgangskonzentration lag bei etwa 1350 mg/kg TS.

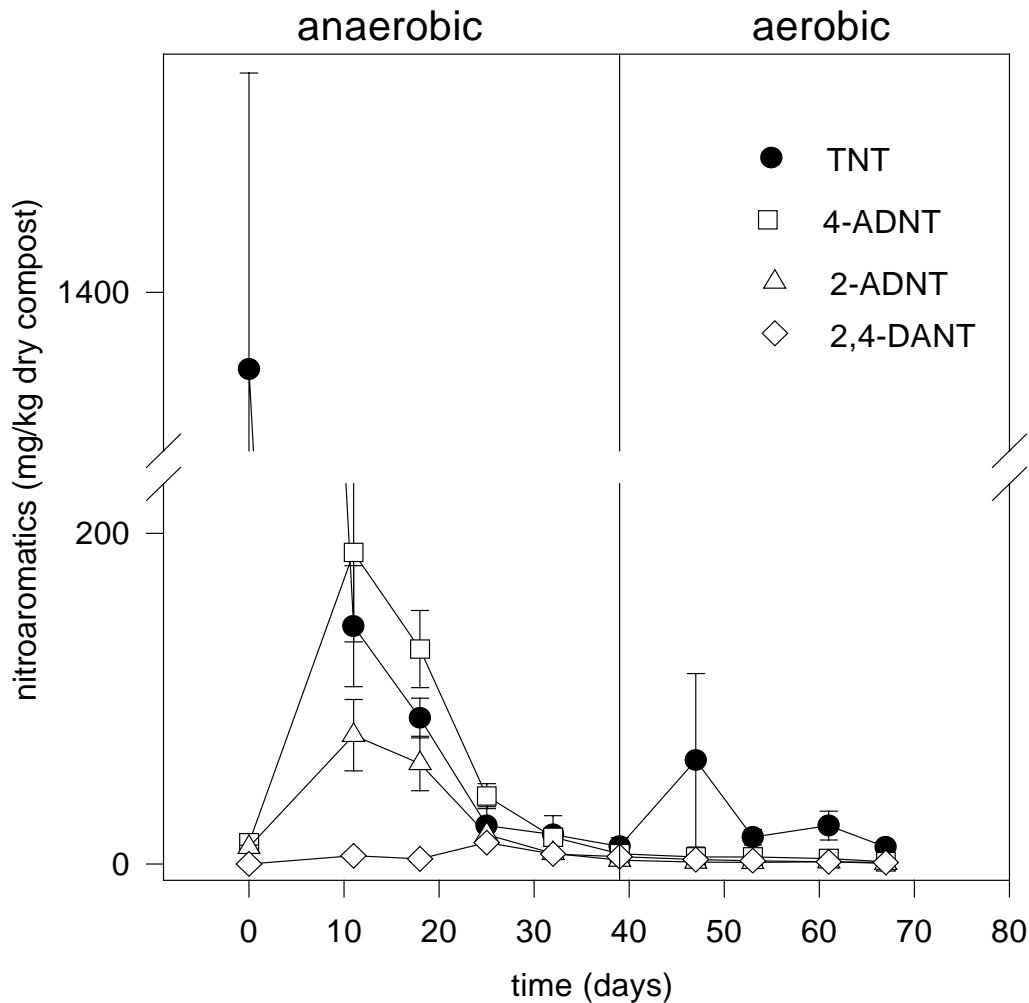


Abb. 2: Gehalt an TNT und Reduktionsprodukten im Verlauf einer 2-phasigen Kompostierung.

In Abbildung 3 ist die Transformation von 2,4- und 2,6-DNT zu aromatischen Aminen und eine anschließende Elimination dieser Produkte dargestellt. Auffällig ist, daß lediglich das 2A-6NT (Transformationsprodukt von 2,6-DNT) in nennenswerten Konzentrationen gebildet wurde. Das gleiche Phänomen wurde bereits in Bodenperkolationsversuchen mit DNT-kontaminiertem Boden gefunden. Eine mögliche Erklärung ist die Tatsache, daß 2,4-DNT relativ gut mikrobiell mineralisierbar ist [23]. Die Endkonzentration für 2,6-DNT lag am Versuchende unter 1 mg/kg TS, und die für 2,4-DNT bei etwa 4 mg/kg TS. Die Anfangskonzentrationen betragen hier etwa 300 bzw. 350 mg/kg TS.

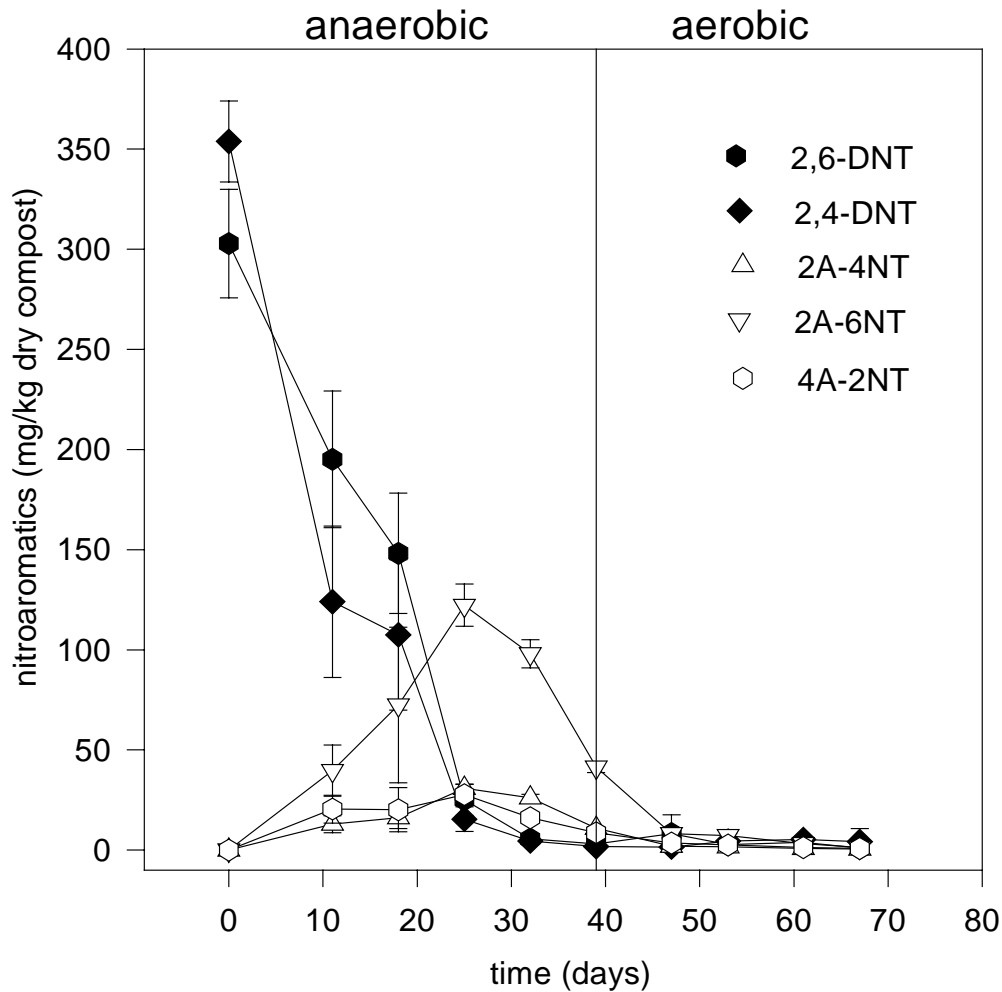


Abb. 3: Gehalt an DNT und Reduktionsprodukten im Verlauf einer 2-phasigen Kompostierung.

4.2.2 Bildung von acetylierten und formylierten Metaboliten

Neben den sehr gut bekannten Transformationsprodukten 2- und 4-ADNT und 2,4-DNT war die Bildung der Konjugationsprodukte 4-Acetylamino-2-amino-6-nitrotoluol (4-N-AcANT), und die von 4-Formamido-2-Amino-6-nitrotoluol (4-N-FAmANT) nachweisbar (Abb.4). Es wurde gezeigt, daß diese Konjugate auch bei der "trockenen" Variante der 2-Phasen-Kompostierung gebildet werden. Die Bildung erfolgte nur unter anaeroben Bedingungen. Ein anschließender, fast vollständiger Abbau erfolgte ebenfalls unter anaeroben Bedingungen. Ursprünglich wurde der Abbau lediglich unter aeroben Bedingungen beschrieben. Der Abbau während der anaeroben Phase ist möglicherweise auf das wöchentliche Durchmischen (kurzfristige Aerobisierung) zurückzuführen. Die dargestellten Versuche deuten darauf hin, daß die Acetylierung eine reversible Reaktion ist. Gleiches kann für die Formylierung angenommen werden [19].

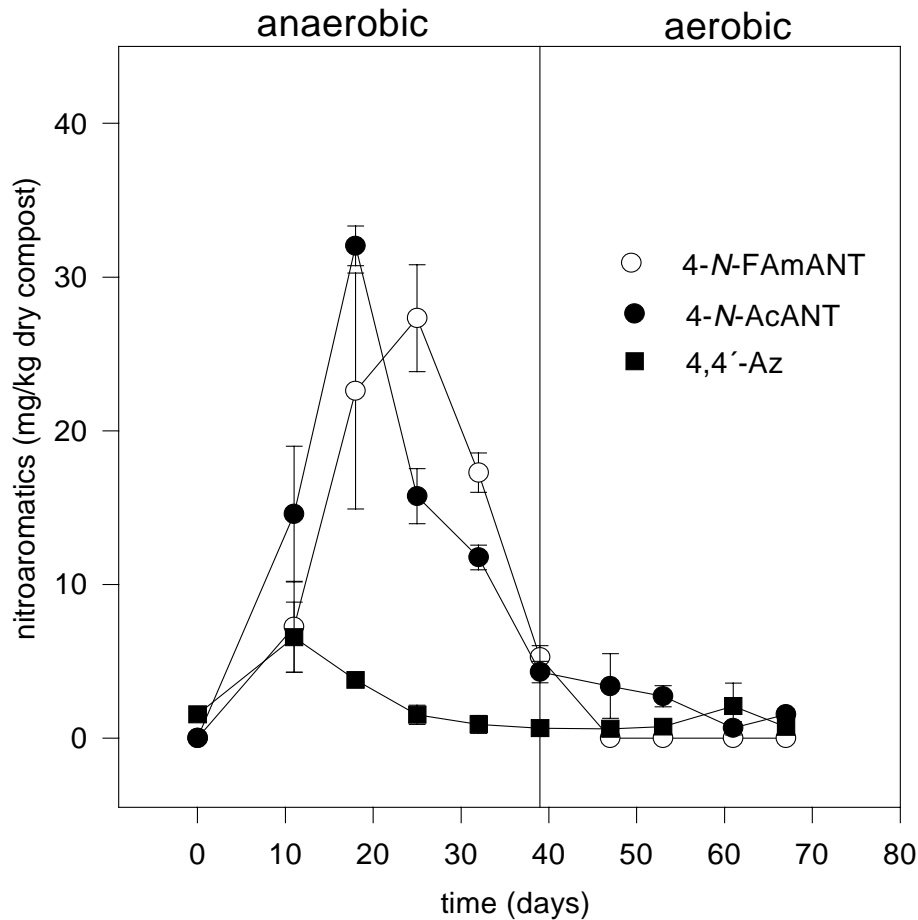


Abb. 4: Gehalt an acetylierten und formylierten TNT-Metaboliten sowie 4,4'-Az im Verlauf einer 2-phasigen Kompostierung.

Neben den Konjugationsprodukten war das Kondensationsprodukt 2,2',6,6'-Tetranitro-4,4'-azoxytoluol (4,4'-Az) nachweisbar. Interessanterweise wurde auch diese Substanz vor allem unter anaeroben Bedingungen gebildet und anschließend zum größten Teil abgebaut.

4.2.3 Nachweis von Nitro- und Aminonitrobenzoat in Bodenproben vom Werk Tanne, Identifizierung neuer Metabolite

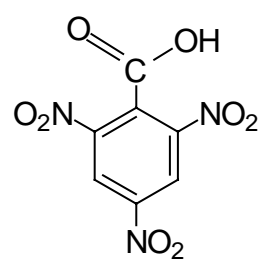
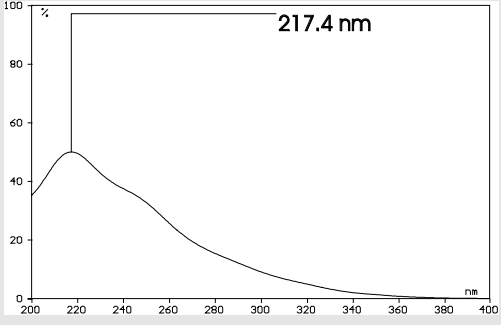
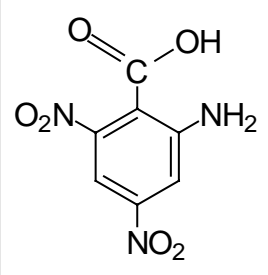
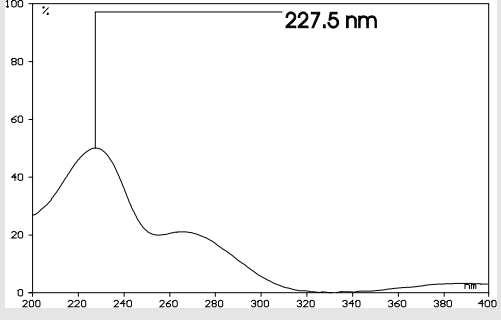
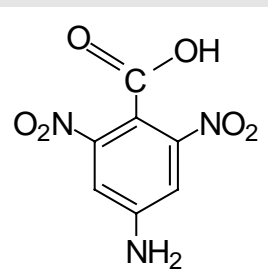
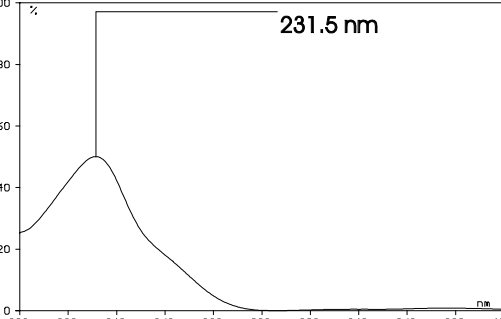
Es konnten zum Teil erhebliche Mengen oxidierten TNT Metabolite in Bodenproben der ehemaligen Sprengstofffabrik "Tanne" nachgewiesen werden.

Im einzelnen wurden folgende Substanzen gefunden: 2,4,6-Trinitrobenzoesäure, 2- und 4-Aminodinitrobenzoesäure, 2,4-Dinitrobenzoesäure, 2,4,6-Trinitrobenzylalkohol, 4-Amino-2,6-dinitro-benzylalkohol. 2-Amino-4,6-dinitrobenzoesäure wurde in Mengen von etwa 6 bis 540 mg/kg TS analysiert und stellte damit die Hauptkontamination dar (Tab.5).

Die Untersuchungen zeigten erstmals, daß oxidierte TNT Metabolite in bedeutenden Mengen als Bodenkontamination von Rüstungsaltslasten vorhanden sind. Ihre Herkunft und das Schadstoffverhalten ist zur Zeit nicht bekannt, ebenso die toxikologische Bedeutung. Aus

diesem Grunde werden hier zukünftig weiter wissenschaftliche Untersuchungen notwendig sein.

Tab. 5: Strukturformeln, UV-Spektren und Retentionszeiten verschiedener Nitrobenzoesäuren.

Substanzname und Abkürzung	Strukturformel	UV-Spektrum und Retentionszeit
2,4,6-Trinitrobenzoesäure TNBA		 8.22 min
2-Amino-4,6-dinitrobenzoesäure 2-ADNBA		 9.62 min
4-Amino-2,6-dinitrobenzoesäure 4-ADNBA		 6.50 min

Es konnte erstmals 2,4,6-Trinitrobenzoat (TNBs) und das Reduktionsprodukt 2-Amino-4,6-dinitrobenzoat (2-ADNBs) in Bodenproben vom Werk Tanne qualitativ nachgewiesen werden. Die Herkunft der Benzoesäuren ist bisher völlig ungeklärt. Es könnte sich um mikrobiologische-, chemische- oder photochemische-Abbauprodukte von TNT oder eventuell auch von TNB handeln, das sich ebenfalls im Boden vom Werk "Tanne" findet. Weiterhin gibt

es zur Zeit keinerlei Angaben zur Toxizität und zur mikrobiologischen Abbaubarkeit von TNBs und 2-ADNBs.

TNBs und 2-ADNBs wurden kürzlich ebenfalls in Bodenproben und Sickerwasser der ehemaligen Rüstungsfabrik in Stadtallendorf gefunden. Hier ist die Bedeutung und Herkunft der Verbindungen ebenfalls ungeklärt. Das Auftreten von Nitrobenzoesäuren ist somit keine lokale Besonderheit. Aus diesem Grunde sollten die Substanzen bei zukünftige Gefahrenabschätzungen und Sanierungsvorhaben mit in das Analyseprogramm aufgenommen werden. Der Einsatz von Ionenpaarreagenz ermöglichte eine höhere Auflösung der Chromatogramme.

Die Quantifizierung der Analysen ergab, daß die Bodenproben teilweise erheblich mit 2-Amino-4,6-dinitrobenzoesäure belastet sind z.B. bei der Probe Tonsil bis über 500 mg/kg. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 6 zusammengestellt.

Tab. 6: Extrahierbare Mengen an Nitrobenzoesäuren, mit Wasser aus Bodenproben vom Werk "Tanne" und aus Bodenmaterial von verschiedenen biologischen Sanierungsverfahren.

Probe	TNBA [mg/kg TS]	2-ADNBA [mg/kg TS]	4-ADNBA [mg/kg TS]
Containerboden	1,1	60,8	n.n.
Rückstellboden	0,3	25,4	n.n.
Miete, ContraCon	n.n.	n.n.	n.n.
Miete, U-Nord	n.n.	n.n.	n.n.
Miete Wisstrans	n.n.	0,61	n.n.

Es zeigte sich, daß der Boden, der für die maßstabgerechte Erprobung biologischer Sanierungsverfahren verwendet wird, ebenfalls mit deutlichen Mengen 2-ADNBA belastet ist (Containerboden).

Die bisherigen Untersuchungsergebnisse zeigen, daß oxidierte TNT-Metaboliten eine bisher unterschätzte Bedeutung bei Rüstungsaltslasten haben. Es wird darum von größter Bedeutung sein, die Herkunft dieser polaren und mobilen Substanzen und deren Schadstoffverhalten zu untersuchen [3; 8; 21; 22].

4.3 Nachweis von Nitroreduktase positiven Bodenmikroorganismen

In Abbildung 5 ist eine Mikrotiterplatte nach 5 tägiger Bebrütung und anschließender Färbung von mikrobiell gebildeten aromatischen Aminen dargestellt.

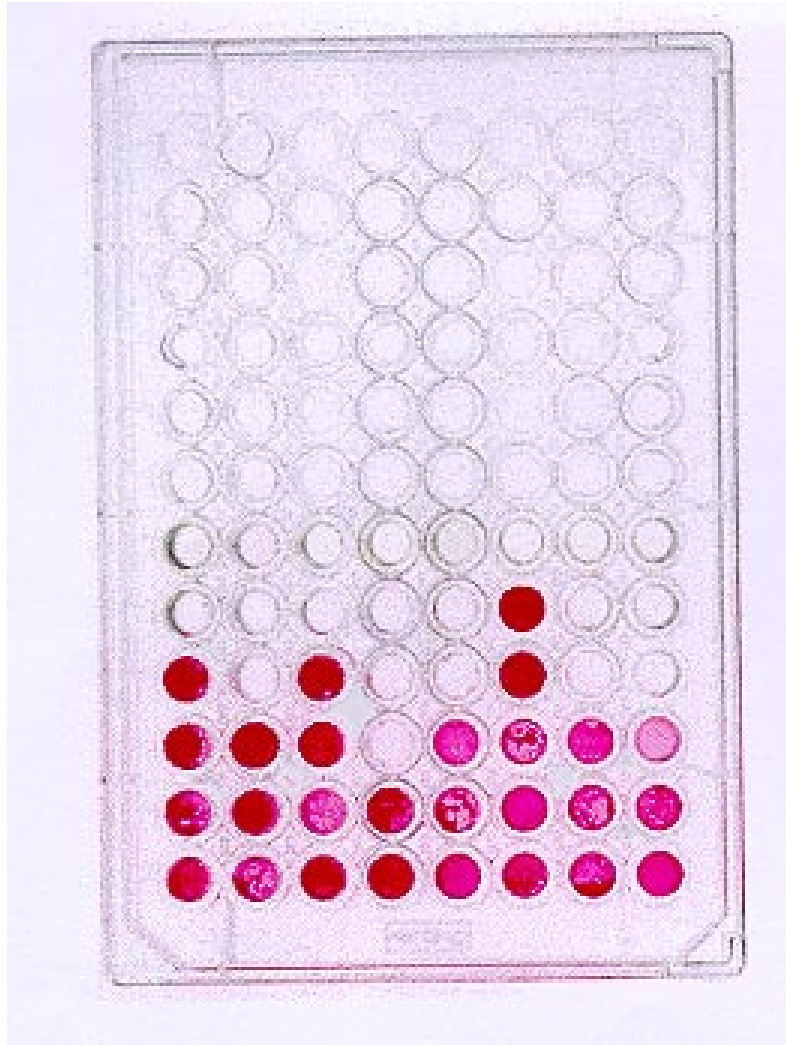


Abb. 5: Qualitativer Nachweis von mikrobiell gebildeten aromatischen Aminen aus TNT. Rot- bzw. rosa gefärbte wells zeigen aromatische Amine an.

Es wurden unterschiedlich hoch mit TNT kontaminierte Böden vom Werk "Tanne" (ca. 1 g bis > 10 g TNT/kg TS) (Abb. 6) und nicht kontaminierte Böden verglichen. Ermittelt wurde die Anzahl der Organismen nach MPN in einem Vollmedium und einem Minimalmedium. Eine Wachstumshemmung durch TNT konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Der Sprengstoff zeigte demnach keine signifikante toxische Wirkung auf die kultivierten Bodenmikroorganismen.

Im Fall der am höchsten mit TNT kontaminierten Böden (Zwischenlager und hoch kontaminierter Boden) wurden mit Standard II Medium etwa 10 mal mehr Organismen gefunden, als mit dem Mineralmedium. Dies deutet auf eine unterschiedliche Mikrobenpopulation in Böden hin.

Die Anzahl der in Mineralmedium kultivierbaren Organismen und der TNT-reduzierenden Organismen korrelierte in allen Fällen sehr gut. Somit konnten mit dem Mikrottest experimentell gezeigt werden, daß die Nitroreduktase Aktivität eine ubiquitäre Eigenschaft von Bodenmikroorganismen ist.

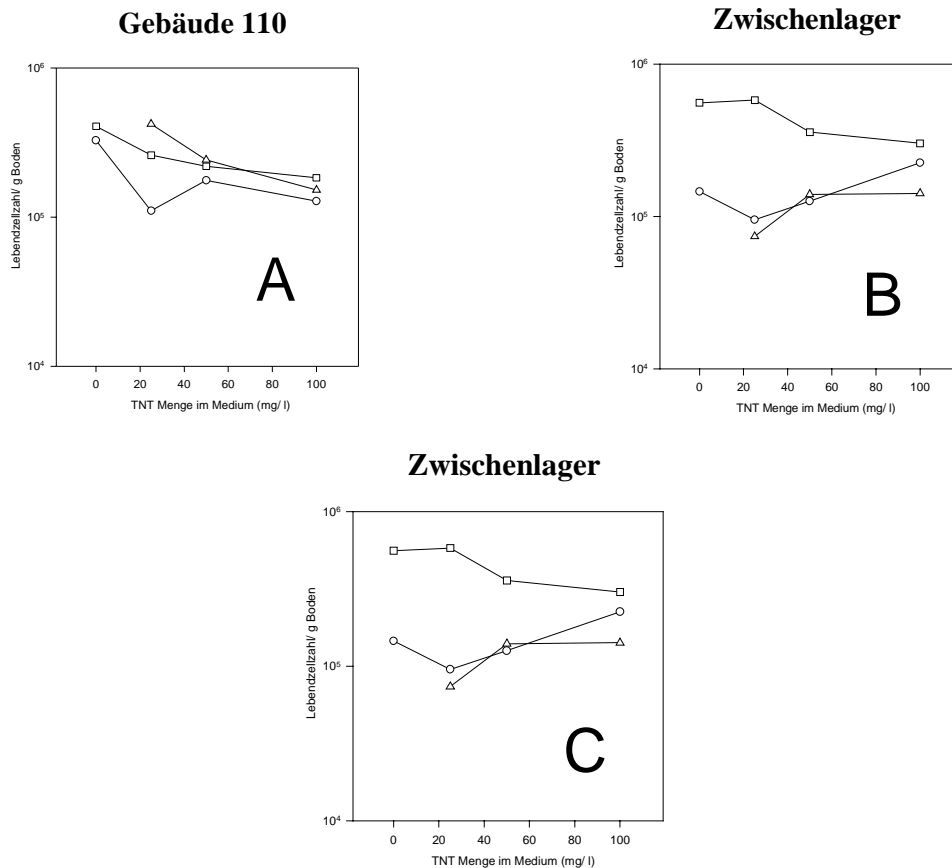


Abb. 6: Quantifizierung von TNT reduzierenden Bodenmikroorganismen mittels MPN Mikrotests. □ Standard II Medium (Merck, Darmstadt); ○ Mineralmedium; △ TNT-reduzierende Organismen. Es wurden TNT kontaminierte Böden vom ehemaligen Sprengstoffwerk "Tanne" bei CLZ untersucht.

4.4 Bilanzierung von [¹⁴C]-TNT in 2-Phasen-Kompost

Die Ergebnisse der verschiedenen Versuchsphasen zeigen die Verteilung der Radioaktivität in den verschiedenen Fraktionen sowie die Metabolitverteilung in den drei Extrakten. In einer Veröffentlichung werden auch ausführlich Versuchsverlauf (also Versuchsbedingungen bzw. Versuchsdurchführung) und zusätzliche Versuchsbeobachtungen geschildert [13; 14].

4.4.1 Optimierung der Einbindung in verschiedenen Versuchsphasen

Die in der *Versuchsphase A* erzielten Resultate sind noch sind in Tab. 7 dargestellt. Der TNT-Transformationsgrad lag nach der anaeroben Phase bei ca. 92% und nach der anschließenden aeroben Phase bei ca. 95,5. Angestrebt wird ein TNT-Transformationsgrad von mindestens 98% (möglichst natürlich von 100%).

Auch die Radioaktivitätswiederfindungen in den lösungsmittelextrahierbaren Fraktionen waren noch zu hoch. Über 53% nach der anaeroben Phase bzw. noch fast 45% der eingesetzten Radioaktivität nach der aeroben Phase waren mit herkömmlichen Lösungsmitteln eluierbar.

Tab. 7: Radioaktivitätsverteilung (in %) in der Versuchsphase A:

	anaerobe Phase (nach 5 Wochen)	anaerob/aerobe Phase (nach 9 Wochen)
extrahierbar gesamt:	53,62	44,71
Festlegung gesamt: nach alkalischer und saurer Hydrolyse ¹	41,34	47,43
Gesamtradioaktivität (= Wiederfindung)	95,46	92,54
Bilanzlücke	4,54	7,46

¹ Die saure Hydrolyse wurde nur in der experimentellen Versuchsphase A durchgeführt.

Dementsprechend niedrig lagen die Raten an eingebundener Radioaktivität in den verschiedenen Bodenfraktionen nach den Hydrolysen (mit ca. 41% nach der anaeroben Behandlung und mit ca. 47,5% nach der aeroben Behandlung). Die Radioaktivitätswiederfindungen im Gesamten mit ca. 95,5% und 92,5% waren recht gut.

Um die Raten an eluierbarer Radioaktivität zu verringern und die der eingebundenen Radioaktivität zu erhöhen, werden in der anschließenden Versuchsphase B mehrere geringfügige Optimierungsmaßnahmen vorgenommen

Die Ergebnisse der Versuchsphase B (Verdichtung des Bodens in der anaeroben Phase und manuelle Durchmischung des Bodens in der aeroben Phase) zeigten ebenfalls die Verteilung der Radioaktivität in den verschiedenen Fraktionen sowie die Metabolitenverteilung in den drei Extrakten.

Tab. 8: Radioaktivitätsverteilung (in %) in der Versuchsphase B:

	anaerobe Phase (nach 5 Wochen)	anaerob/aerobe Phase (nach 9 Wochen)
extrahierbar gesamt:	40,21	9,36
Festlegung gesamt: nach alkalischer Hydrolyse ¹	57,58	83,61
Gesamtradioaktivität (= Wiederfindung)	98,19	93,44
Bilanzlücke	1,81	6,56

¹ Auf die saure Hydrolyse wurde hier verzichtet, da sie sich von der alkalischen Hydrolyse nicht unterschied. Mit Restboden ist hier der Boden gemeint, der zwar ebenfalls Lösungsmittel-extrahiert wurde, aber anschließend nicht alkalisch hydrolysiert wurde.

Die in dieser *Versuchsphase B* erzielten Resultate sind im Vergleich zur ersten Versuchsphase (Phase A) wesentlich zufriedenstellender (Tab. 8). Der TNT-Transformationsgrad lag nach der anaeroben Phase bei ca. 93,5% und konnte in der anschließenden aeroben Phase auf ca. 98% gesteigert werden.

Auch die Radioaktivitätswiederfindungen in den Lösungsmittel-extrahierbaren Fraktionen sind im Vergleich zur Versuchsphase A wesentlich niedriger gewesen. Ca. 40% nach der anaeroben Phase und nur noch ca. 9% der eingesetzten Radioaktivität waren nach der aeroben Phase mit herkömmlichen Lösungsmitteln eluierbar. Dementsprechend höher lagen die Raten an eingebundener Radioaktivität in den verschiedenen Bodenfraktionen nach der alkalischen Hydrolyse.

Um die Raten an eluierbarer Radioaktivität noch weiter zu verringern und die der eingebundenen Radioaktivität zu erhöhen, wurden in der anschließenden Versuchsphase C weitere geringfügige Optimierungsmaßnahmen vorgenommen.

Die *Versuchsphase C* erzielte zweideutige Resultate. Auf der einen Seite konnte die mikrobiell vermittelte Einbindung von TNT-Metaboliten während der verlängerten anaeroben Phase deutlich gesteigert werden (ca. 72% Festlegung von Radioaktivität im Vergleich zu ca. 58% aus Versuchsphase B bzw. ca. 41% aus Versuchsphase A). Andererseits war nach der anschließenden aeroben Phase der Einbindungsgrad bzw. die Festlegungsrate mit ca. 77% etwas niedriger als am Ende der Versuchsphase B aber deutlich höher als Versuchsphase A. Allerdings muß berücksichtigt werden, daß am Ende der Versuchsphase C die bisher größte Bilanzlücke (mit fast 10%) zu verzeichnen war. Aufgrund der „offenen Inkubation“ wurde die Gasphase nicht untersucht.

Die eluierbare Radioaktivität nach der anaeroben Behandlung war bisher mit ca. 16% die niedrigste (ca. 40% in Versuchsphase B und ca. 53.5% in Versuchsphase A). Hier zeigt sich deutlich, daß die anaerobe Durchmischung und Rekomprimierung der Boden/Melasse-Gemische einen enormen Einfluß auf die Festlegung und Eluierbarkeit von markierten TNT-Metaboliten hatte. Mit 12% lag die eluierbare Radioaktivität am Ende der aeroben Behandlung jedoch leicht höher als in der bisher besten Versuchsphase (B mit ca. 9%).

Der TNT-Transformationsgrad lag nach der anaeroben Phase bei ca. 94% und konnte nach der aeroben Behandlungsphase auf ca. 95.5% gesteigert werden. Auch hier zeigt sich der bisher höchste Transformationsgrad nach der anaeroben Behandlung (ca. 92% in Versuchsphase A und ca. 93.5% nach Versuchsphase B), während nach der aeroben Behandlung ein etwas niedriger Wert im Vergleich zur Versuchsphase B erreicht wurde (ca. 98% in Versuchsphase B). Der Wert entspricht dem aus Versuchsphase A (ca. 95.5%).

4.4.2 GoreTex-Beutel-Versuche (Versuchsphase D)

Die Unterschiede in der Versuchsdurchführung der *Versuchsphase D* im Vergleich zu den Versuchsphasen A, B und C sind im Methodenteil dargestellt. Die nach einer Versuchsdauer von 29 Wochen (12 Wochen anaerob plus 17 Wochen aerob) erzielten Ergebnisse sind in Tab.9 zusammengefaßt.

Der TNT-Transformationsgrad des markierten Bodens im GoreTex-Beutel lag nach der anaeroben Behandlung bei ca. 90% und stellt damit den bisher niedrigsten gemessenen Wert dar. Die Gesamteinbindung von radioaktiv markierten TNT-Metaboliten in die organische

Matrix betrug am Ende des Gesamtversuches ca. 81% und bestätigt somit den Wert von ca. 84% der Gesamtfestlegung aus Versuchsreihe C. Der Anteil an eluierbarer Radioaktivität ist mit einem Wert von ca. 8% niedriger als in den Versuchsphasen A und C und fast gleichwertig mit dem Wert aus Versuchsreihe B (9,4%).

Der TNT-Transformationsgrad des markierten Bodens im GoreTex-Beutel lag nach der aeroben Behandlung bei ca. 96% und bestätigt die Transformationsraten der vorgehenden Versuchsreihen mit Werten zwischen 95% und 98%. Im Falle des GoreTexBeutel-Bodens, der stets eine Verzögerung aller Reaktionen von zwei bis drei Wochen aufwies, konnte in diesem Versuch sogar erstmals keine Steigerung der Transformationsrate während der aeroben Phase gemessen werden.

Tab. 9: Radioaktivitätsverteilung (in %) des Bodens in den GoreTex-Membranbeuteln der Versuchsphase D:

	anaerobe Phase (nach 12 Wochen)	anaerob/aerobe Phase (nach 29 Wochen)
extrahierbar gesamt:	28,88	8,32
<u>Alkalische Hydrolyse:</u>		
Ethylacetat-Extrakt	0,52	0,88
Huminsäurefraktion	3,29	8,57
Fulvosäure-/Polyphenolfraktion	3,36	7,42
Rest (als CO ₂)	22,44	27,00
Restboden ¹ (als CO ₂)	24,26	37,16
Festlegung gesamt:	53,87	81,03
Gasphase ² gesamt:	nicht bestimmt	nicht bestimmt
Material ³ gesamt:	0,79	0,97
GoreTex-Beutel:	8,28	5,63
Gesamtradioaktivität (= Wiederfindung)	91,82	95,95
Bilanzlücke	8,18	4,05

¹ Mit Restboden ist hier der Boden gemeint, der zwar ebenfalls Lösungsmittel-extrahiert wurde, aber anschließend nicht alkalisch hydrolysiert wurde.

² Die Radioaktivität der Gasphase wurde nicht gemessen.

³ Hier ist die Radioaktivität gemeint, die in den verschiedenen Glas- und Filtriermaterialien zurückgeblieben war (gemessen wurde die dekontaminierende Reinigungslösung).

Die pH-Werte der Böden zeigten eine starke Versauerung des Milieus während der anaeroben Phase (mikrobielle Säurebildung) bis zu pH 4,6. Nach der Umschaltung auf aerobe Bedingungen kam es zunächst zu einer raschen Erhöhung des pH-Wertes (6,1-6,7), bevor durch immenses Pilzwachstum kurzzeitig eine erneute pH-Absenkung zu beobachten war.

Anschließend (bei abgeschwächtem Pilzwachstum) konnte eine allmähliche Alkalisierung bis zu pH-Werten von 8 gemessen werden.

Die Temperatur der anaeroben Behandlungsphase lag konstant bei ca. 20°C. Es zeigte sich zu Beginn der aeroben Phase ein starkes Ansteigen der Temperatur von anfänglichen 21°C bis zu 42°C nach ca. 14 Tagen. Die Oxidationswärme wurde offenbar durch das ebenfalls starke Pilzwachstum zu dieser Zeit hervorgerufen.

Nach 17 Wochen aerober Behandlung wurde der Versuch beendet, da keine Veränderungen mehr bei den Parametern pH, Temperatur und TNT-Transformation im Reaktorboden zu beobachten waren. Die Melasse war zu diesem Zeitpunkt komplett verbraucht, der Gesamtansatz war durch eine Volumenverringerung gekennzeichnet und der Boden nahm eine grobkörnige Struktur an und war außerdem geruchsneutral.

4.4.3 Vergleich der verschiedenen Ansätze (Versuchsphasen)

In den vier Versuchsphasen wurden folgende Fixierungswerte für gebundene Radioaktivität ermittelt (Tabelle 10–12):

Tab. 10: Fixierte Radioaktivitätsanteile

Versuchsreihe	nach anaerober Behandlung [%]	nach anaerob/aerober Behandlung [%]
A	41,3	47,4
B	57,6	83,7
C	72,0	77,1
D	53,9	81,1

Tab. 11: Extrahierbare Radioaktivitätsanteile

Versuchsreihe	nach anaerober Behandlung [%]	nach anaerob/aerober Behandlung [%]
A	53,5	44,7
B	40,2	9,4
C	15,9	12,0
D	28,9	8,3

In der dargestellten Restfraktion sind folgende Bestandteile enthalten, wobei die Anteile für die Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ (resultierend aus einer Mineralisation von $^{14}\text{C-TNT}$) und anderer flüchtiger radioaktiver Verbindungen nicht berücksichtigt wurden, da diese Anteile vernachlässigbar waren (weniger als 0,05% der eingesetzten Gesamtradioaktivität):

Tab. 12: Restliche Radioaktivitätsanteile

Versuchsreihe	nach anaerober Behandlung [%]				nach anaerob/aerober Behandlung [%]			
	Ethylacetat ¹	Material ²	Beutel ³	Bilanzlücke ⁴	Ethylacetat ¹	Material ²	Beutel ³	Bilanzlücke ⁴
A	0,5	0,5	-	4,6	0,6	0,4	-	7,5
B	0,8	0,4	-	1,8	1,0	0,5	-	6,5
C	1,6	0,7	-	11,4	1,5	0,8	-	10,0
D	0,9	0,8	8,3	8,1	1,6	1,0	5,6	4,0

Erklärungen:

¹ Hier ist der Anteil an Radioaktivität gemeint, welcher nach der alkalischen Hydrolyse des Bodens noch aus dem Hydrolysat mit Ethylacetat extrahiert werden konnte. Dieser Anteil ist in der „Restfraktion“ enthalten. Alle Werte nach der alkalischen Hydrolyse werden der relativ fest gebundenen Fraktion zugerechnet!

² Hier ist die Radioaktivität gemeint, welche in den verschiedenen Glas- und Filtriermaterialien zurückgeblieben war (gemessen wurde die alkalische Dekontaminationslösung).

³ Hier sind die GoreTex-Beutel gemeint, in deren Gewebeschichten relativ hohe Restradioaktivitätslevel gemessen werden. Diese Werte gelten nur für die entsprechende Versuchsreihe D.

⁴ Hier sind die tatsächlichen Bilanzlücken aufgeführt, also Radioaktivitätsanteile, welche im Vergleich zu den Startwerten nicht wiedergefunden werden konnten.

Lässt man die Bilanzlücken unberücksichtigt und nimmt als Bewertungsmaßstab lediglich die wiedergefundenen Radioaktivitätslevel, so können (rechnerisch) folgende, höhere Fixierungswerte gebundener Radioaktivität ermittelt werden (Tab.13):

Tab. 13: Fixierte Radioaktivitätsanteile

Versuchsreihe	nach anaerober Behandlung [%]	nach anaerob/aerober Behandlung [%]
A	43,3	51,2
B	58,6	89,5
C	81,3	85,7
D	58,6	84,6

Die Fixierungswerte für den markierten Gesamtkohlenstoff in der organischen Matrix liegen demnach nach den anaerob/aeroben Behandlungen bei den komprimierten und bearbeiteten Boden/Melasse-Gemischen im Bereich von 85-90% (unterstrichene Werte). Auch mit dem rein

anaeroben Behandlungsverfahren der Versuchsreihe C konnte mit über 81% ein recht hoher Wert der Kohlenstoffeinbindung in den Boden erzielt werden.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich, daß mit dem Verfahren der Bodenkompression während der anaeroben Behandlung bereits hohe Einbindungsgrade von TNT-Metaboliten gemessen werden können. Eine aerobe Nachbehandlung mit zeitweiser Durchmischung und Ausgleich des Feuchtigkeitsverlustes des Boden/Zuschlagstoff-Gemisches ist unerläßlich, wenn hohe Einbindungsgrade erreicht werden sollen. Dabei konnte fast immer wieder festgestellt werden, daß der Anteil der Einbindungswerte in der Fulvosäure- und der Huminsäurefraktion nahezu gleichgewichtig waren, während der Hauptanteil an markierten Substanzen stets in der großen Huminfraction (als die sogenannten „gebundenen Rückstände“) wiederzufinden war.

4.5 ¹⁵N-TNT- Untersuchungen

Erste Analysen mittels Festphasen-¹⁵N-NMR-Spektroskopie von Huminsäuren, Fulvosäuren und auch von Böden, welche mit ¹⁵N-TNT angereichert wurden zeigten, daß kovalente Einbindungen von markiertem Stickstoff (resultierend aus reduziertem ¹⁵N-TNT) möglich sind. Da auch diese Ergebnisse erstmalig mit markiertem TNT (mit dem stabilen Isotop ¹⁵N) erzielt wurden, sind zwei Publikationen in internationalen Fachzeitschriften erschienen [10; 17].

In Tab 12 sind die HPLC-Analysen von TNT und den wichtigsten Metaboliten nach verschiedenen Behandlungsphasen und im kontaminierten Ausgangsboden im Versuch 1 dargestellt. Zu Versuchsbeginn stand nicht mehr als die eingesetzte Menge ¹⁵N-TNT zur Verfügung. Bei dem Versuch 1 wurden die beiden HS-Fractionen, die nach Abschluß der Kompostierung erhalten wurden, mittels Festphasen-NMR analysiert. Es konnten in beiden Fällen keine Signale gemessen werden.

Tab. 14: HPLC/DAD-Analysen: Methanol Extrakte

	TNT	4-ADNT	2-ADNT	2,4-DANT
	[mg/kg TS]			
1. Ausgangsboden	1792,0	40,4	37,9	n.n.
2. n. Ablauf der gefluteten Phase (Typ 1)	68,9	11,7	5,6	1,4
3. n. Ablauf der anaeroben Phase (Typ 2)	272,0	95,1	54,4	n.n.
4. n. Ablauf der aeroben Phase (Typ 1)	42,7	10,8	3,1	1,7
5. n. Ablauf der aeroben Phase (Typ 2)	98,1	36,4	10,5	4,5

Außerdem konnten in DCM-Extrakten der HS und der FS keine Nitro- oder Aminonitroaromaten identifiziert werden.

Die Flutung und anschließende Belüftung (Typ 1) des Komposts war effektiver als Komprimieren und regelmäßiges Durchmischen (Typ 2) während der anaeroben Phase und anschließendes Belüften. Nitro- und Aminonitroaromaten wurden durch die alkalische

Hydrolyse nicht mobilisiert. Die eingesetzte Menge an ^{15}N -TNT war im Versuch 1 nicht groß genug, um ein Signal bei der ^{15}N -MMR Analyse zu erhalten.

Es wurde ein zweiter Versuch (Versuch 2) gestartet, bei dem ca. 20 g ^{15}N -TNT/ kg TS Boden eingesetzt wurde.

Tab. 15: Mit Methanol aus Kompostmaterial extrahierbare Nitroaromaten.

Probe	TNT	4-ADNT	2-ADNT	2,4-DANT	2,6-DANT	4-N-AcDNT	4-N-AcANT	2,2'Az	4,4'Az
	[mg/kg TS]								
T ₀	16.886	33,1	26,9	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n	n.n.
Ende anaerob	1.044	5.279	2.586	10,2	3,8	24,2	58,7	19,0	237
Ende anaerob/aerob	136	2.990	218	665	53,8	n.n.	7,0	3,5	78,7

T₀, Ausgangskonzentration. n.n., nicht nachweisbar

Die Bodenanalysen auf extrahierbare Nitroaromaten zeigten, daß nach Abschluß der anaeroben Phase nur noch ca. 55% der ursprünglichen Menge an Nitroaromaten extrahierbar waren. Nach Abschluß der Gesamtbehandlung (anaerob/aerob) waren nur noch ca. 25% extrahierbar (Tab. 15). Fast die Hälfte des extrahierbaren TNT war nach Abschluß der anaeroben Phase in Aminodinitrotoluol überführt worden.

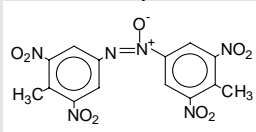
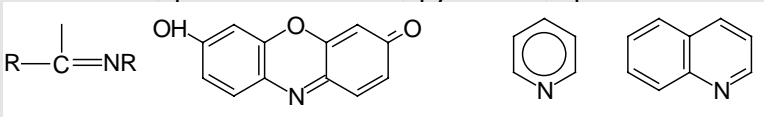

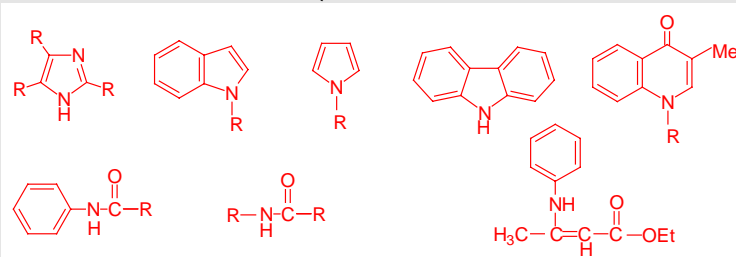
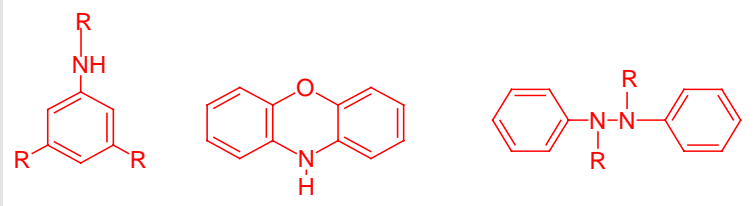
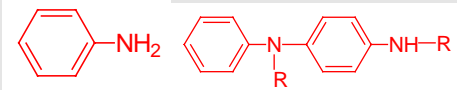
Da die ^{15}N NMR Spektroskopie recht unempfindlich ist, wurde für den Versuch eine Ausgangsmenge eingesetzt, die etwa das 20fache (fast 20 g ^{15}N -TNT/kg TS) dessen ist, was im Boden des Standortes gefunden wurde. Als Folge der Konzentrationserhöhung von TNT um das 20 fache, lag die Abbauleistung deutlich unter dem angestrebten Wert von 99%. Für die Aussage des Versuchs spielt dies jedoch keine Rolle, da es hier zunächst darum ging eine qualitative Aussage zur chemischen Einbindung von nicht extrahierbaren TNT-Rückständen nach einer anaerob/aerob Behandlung zu treffen.

4.5.1 Charakterisierung von ^{15}N -Rückständen mit ^{15}N Festkörper NMR

Die drei mit Methanol extrahierten Fraktionen (Humin, Humin- und Fulvinsäure) wurden mittels ^{15}N -Festkörper-NMR analysiert. Diese NMR-Untersuchungen wurden von Frau Dr. Heike Knicker (TU München) durchgeführt.

Die Meßergebnisse der Festkörper NMR Untersuchungen sind in den Abbildungen 8-11 dargestellt. In Tabelle 16 ist die Zuordnung der verschiedenen Signale zu bestimmten chemischen Strukturen zusammengefaßt.

Tab. 16: Zuordnung von ^{15}N -NMR Signalen zu verschiedenen chemischen Strukturen nach Thorn et al. [24] und Wittanowski et al. [26].

Chemical shift region (ppm)	Assignment
148 to 50	azo compounds 
50 to -25	nitrate, nitrite, nitro groups NO_3^- , NO_2^- , R-NO_2
-25 to -120	imines, phenoxazinones, pyridines, quinolines 
-120 to -165	nitriles, oxazoles, $\text{R-C}\equiv\text{N}$ 
-165 to -270	imidazoles, indoles, pyrroles, carbazoles, quinolone, anilide, amide, enamines 
-270 to -310	anilin derivatives, phenoxazine, bisphenylhydrazine 
-310 to -350	aniline, phenylamine 
-358	Ammonium NH_4^+

In allen drei Huminstofffraktionen waren ^{15}N -NMR Signale meßbar. Das bedeutet, daß der ausgewählte Konzentrationsbereich des ^{15}N -TNT für die Versuche geeignet war. Die Huminsäure zeigte das günstigste Signal/Rausch Verhältnis (Abb. 8a). In der Probe war kein TNT nachweisbar. Die beiden Hauptpeaks sind wahrscheinlich vor allem auf gebundene TNT-Metabolite zurückzuführen.

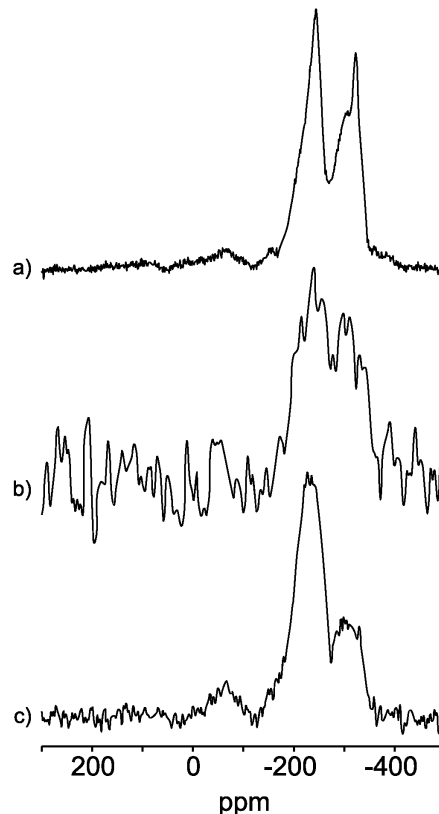


Abb. 8: ^{15}N Festkörper NMR Spektren der Huminsäure (a), Fulvosäure (b) und Humin (c) eines ^{15}N -TNT angereicherten anaerob/aerob kompostierten Bodens. Die Huminstofffraktionen wurden durch kochen mit 30% NaOH extrahiert. a.) = 3.535 Einzelmessungen (scans); b.) = 2.990.182 scans; c.) = 220.175 scans

Über den Abgleich mit Referenzspektren (Tab.16), konnte eine vorläufige Zuordnung der Peaks erfolgen. Bei dem ersten Peak im Bereich von -165 bis -270 ppm, handelt es sich vermutlich um Kondensationsprodukte wie die Heterozyklen Pyrrol, Indol und Chinolon. Anilide, Amide und Enaminone verursachen ebenfalls Signale in diesem Bereich. Diese Strukturen sind unter den gewählten Extraktionsbedingungen jedoch nicht stabil. Der zweite Hauptpeak im Bereich von -270 bis -350 ppm repräsentiert vor allem kovalent gebundene Anilinderivate des TNT. Es könnte sich dabei um Phenoxazin, Anilinohydrochinon, Hydrazin und Aminodiphenylamin-Verbindungen handeln.

Der scharfe Peak bei -320 ppm deutet auf Anilin hin. D.h. es sind vermutlich freie Aminogruppen vorhanden. Das flache Signal im Bereich von -25 bis -140 ppm repräsentiert Imine, Phenoxazine, Pyridine, Chinone oder Oxazole. Wobei erstere vermutlich eine untergeordnete Rolle spielen, weil sie unter den verwendeten Extraktionsbedingungen ebenfalls nicht stabil sind.

Das NMR- Spektrum der Fulvosäure (Abb. 8b) weist ebenfalls Peaks im Bereich von etwa -165 bis -270 ppm auf. Hier ist jedoch wegen dem sehr schlechten Signal/Rausch Verhältnis keine Zuordnung der Peaks möglich. Die geringe ¹⁵N Anreicherung in dieser Fraktion ist auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen. Zum einen stand nur eine sehr geringe Probenmenge von ca. 130 mg zur Verfügung. Zum anderen ging vermutlich während der Dialyse eine erhebliche Menge der relativ niedermolekularen Fulvosäure verloren. Dies war deutlich sichtbar an einer Gelbfärbung des Dialysewassers. Bei den anderen Huminstofffraktionen trat diese Färbung nicht auf.

Das Spektrum der Huminfraktion weist die gleichen Hauptpeaks wie die Huminsäure auf (Abb. 8c). Die Intensitätsverteilung ist jedoch deutlich verschieden. Im Falle des Humins stellt der Peak in Bereich von -165 bis -270 ppm (v.a. heterozyklisch gebundener Stickstoff) das Hauptsignal dar. Wogegen die beiden Hauptpeaks im Spektrum der Huminsäure etwa gleiche Intensitäten haben. Hierbei muß angemerkt werden, daß die Huminfraktion vor der Messung mit 10%iger Flußsäure behandelt wurde, um mineralische Komponenten zu entfernen. Es kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß diese Behandlung zu einer Artefaktbildung führte.

4.5.2 Verlauf der TNT Abnahme

Die Kinetik der extrahierbaren Menge an TNT, 4- und 2-ADNT während der Bodeninkubation zeigte, daß nach 6 Wochen nur noch ca. 2/3 der Ausgangsmenge an Nitroaromaten extrahierbar waren. Die Zugabe von Glucose in den Wochen 9 und 10 führten zu einer weitgehenden Transformation von TNT zu ADNT. Die letzte Glucosegabe in der Woche 17 war dagegen fast ohne Auswirkungen. Aus diesem Grund wurde der Versuch in der Woche 19 beendet. Detailliertere Analysenergebnisse sind in Tabelle 17 dargestellt.

Tab.17: Mit Methanol/Acetonitril aus Kompostmaterial extrahierbare Nitroaromaten.

Probe	TNT	4-ADNT	2-ADNT	2,4-DANT	2,6-DANT	4-N-AcDNT	4-N-AcANT	4,4'Az
	[mg/kg TS]							
T ₀	11.963	12,6	11,0	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Ende anaerob	4.981	197	375	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	58,9
Ende anaerob/aerob	195	1.920	618	3,4	2,0	n.n.	18,2	74,1

T₀, Ausgangskonzentration. n.n., nicht nachweisbar

4.5.3 Biologische Aktivität im Kompost

Da möglicherweise die sehr hohe TNT Konzentration toxisch auf die Bodenorganismen wirkt, wurde in bestimmten Zeitabständen die Gesamtkeimzahl, die Anzahl der Pilze und die der

Clostridien mittels einer MPN Methode ermittelt. Das Ergebnis ist in Abbildung 9 dargestellt. Es konnte klar gezeigt werden, daß die Gesamtkeimzahl im Kompost während des gesamten Versuchs über 10^6 je Gramm Boden lag, was ein reges Bodenleben bedeutet. In der anaeroben Phase kam es zu einer Abnahme der Gesamtkeimzahl um fast zwei Zehnerpotenzen.

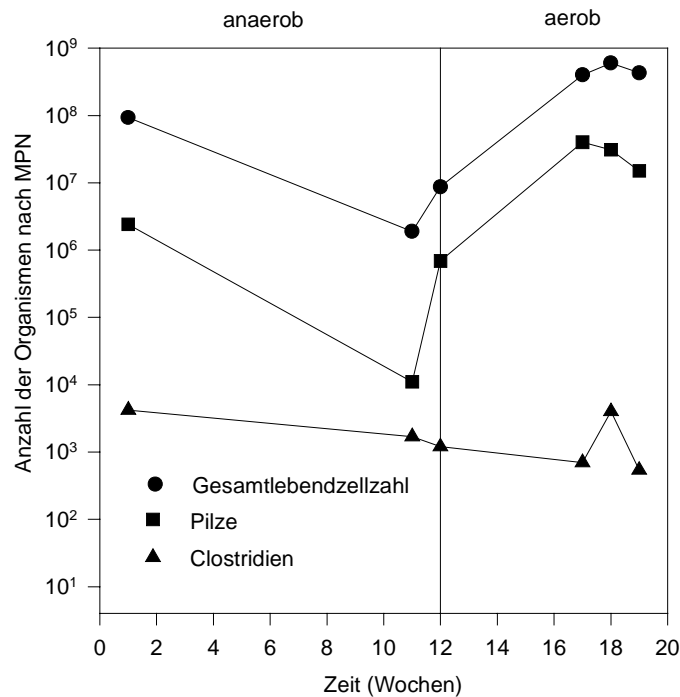


Abb. 9: Biologische Aktivität in einem anaerob/aerob Kompost mit einer TNT Ausgangskonzentration von ca. 20 mg/ kg TS Kompost. Dargestellt ist die Anzahl der Gesamtkeime in Standard II Medium, die Anzahl der Pilze und die der Clostridien. Es wurde ein MPN Verfahren in Mikroplatten mit jeweils acht Parallelen verwendet.

Die Zugabe von Glucose führte dann jedoch zu einer raschen Zunahme, und im Laufe der aeroben Behandlung wurde der Anfangswert von ca. 10^8 Keimen je Gramm Boden sogar deutlich überschritten.

Für die Pilze wurde ein ähnlicher Verlauf festgestellt, wobei die Organismenzahl insgesamt um ca. zwei Zehnerpotenzen unter der der Gesamtkeime lag. Auf die Anzahl der Clostridien hatte die Bodenbehandlung kaum Einfluß. Da Clostridien strikte Anaerobier sind und zu diesem Zeitpunkt aerobe Bedingungen herrschten, ist der sprunghafte Anstieg kurz vor Versuchsende vermutlich ein Artefakt. Das wird auch durch die Tatsache bestätigt, daß nur eine Woche später deutlich weniger Organismen vorhanden waren.

4.5.4 ^{15}N Festkörper NMR Analysen von nicht extrahierten Böden

Ergänzend zum Versuch wurden nicht extrahierte Bodenproben aus dem Kompostierungsexperiment mittels ^{15}N Festkörper NMR analysiert. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 10 dargestellt.

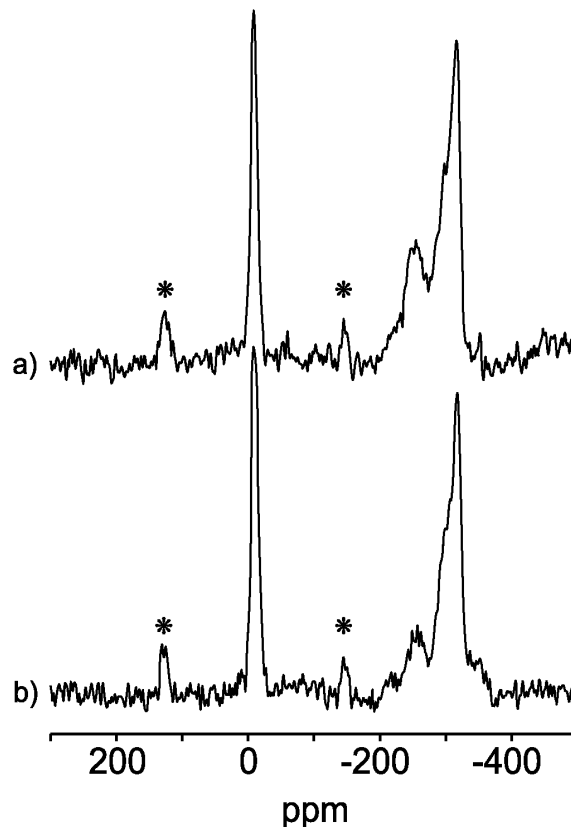


Abb. 10: ^{15}N Festkörper NMR Spektren der nicht extrahierten Böden a.) nach der vollständigen anaerob/aerob Behandlung (271.730 scans) und b.) nach der anaerob Behandlung (363.599 scans). Die mit * markierten Peaks sind *spinning side bands*.

Wie die Huminstofffraktionen vom Versuch 2 zeigen die Spektren der Gesamtböden im Bereich von -165 bis -350 ppm deutliche Peaks. Auffällig ist ein weiteres Signal bei - 8 ppm. Dies wird verursacht durch Nitrogruppen. Die Bodenanalysen ergaben, daß etwa 2500 bis 5000 mg/kg TS TNT bzw. ADNT extrahierbar waren (Tab. 17). Aus diesem Grunde ist es nicht erstaunlich, daß ein deutliche Nitrogruppen-Signal vorhanden ist. Außerdem ist ein sehr deutlicher, scharfer Peak für freie Amino-Gruppen bei -320 ppm zu finden. Dies korreliert ebenfalls sehr gut mit den Meßergebnissen in der Tabelle 17.

Die Tatsache, daß in den Gesamtböden die gleichen Signale für heterozyklisch gebundenes ^{15}N und für kovalent gebundenes ^{15}N wie in den Extrakten vom Versuch 2 gefunden wurden, deutet darauf hin, daß die drastische Extraktionsmethode, die im Versuch 2 verwendet wurde, nicht zu einer Artefaktbildung führte.

Außerordentlich interessant ist auch die Tatsache, daß die aerobe Nachbehandlung nach der anaeroben Phase offensichtlich zu einer verstärkten Bildung von heterozyklischen Systemen führte (Peak bei -165 bis -270 ppm).

4.5.5 Vergleich verschiedener Huminstoff-Extraktionsmethoden

In Abbildung 11 sind die ^{15}N NMR Spektren der verschiedenen Huminstofffraktionen nach einer milden Extraktion (24h schütteln mit 0,5 N NaOH) zusammengefaßt (Versuch 3).

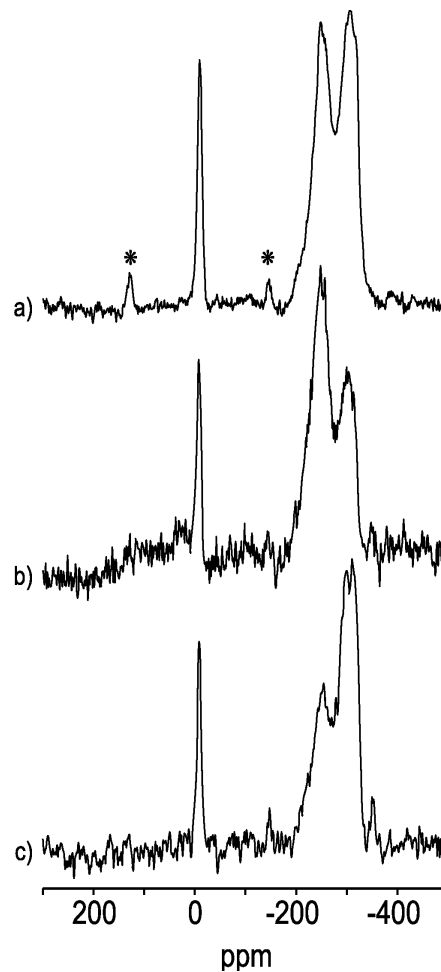


Abb. 11: milde Extraktion, ^{15}N Festkörper NMR Spektren verschiedener Bodenfraktionen eines anaerob/aerob kompostierten ^{15}N TNT-kontaminierten Bodens. Der Boden wurde durch Schütteln mit 0,5 N NaOH unter N_2 -Atmosphäre extrahiert. a.) Huminsäure; b.) Fulvosäure; c.) Humin. Die mit * markierten Peaks sind *spinning side bands*.

Auffällig ist, daß in allen drei Spektren wieder Signale für Nitrogruppen (-8 ppm) vorhanden sind. Es ist möglich, daß die Extraktion mit Acetonitril vor der Huminstoffextraktion nicht erschöpfend war und TNT aber auch ADNT und DANT Rückstände im Boden verblieben. Eine weitere mögliche Erklärung ist, daß partiell reduzierte TNT Metaboliten mit einer Aminofunktion in den Boden eingebunden wurden und noch vorhandene Nitrogruppen ein entsprechendes Signal verursachen. Die Spektren zeigen weiterhin Peaks im Bereich von -165 bis -350 ppm wie bereits in Versuch 2.

Für die Huminsäure wurde eine ähnliche Intensitätsverteilung wie bei Versuch 2 gefunden (Abb. 11a). Die höchste ^{15}N -Anreicherung war wiederum in der Huminsäurefraktion nachzuweisen. Das Spektrum der Fulvosäure zeigt ein deutlich besseres Signal-Rausch-Verhältnis als im Versuch 2 (Abb. 11b). Dies ist vermutlich auf eine geänderte Probenaufbereitung zurückzuführen. Die Fulvosäurefraktion wurde vor der Dialyse gefriergetrocknet. Das führte offensichtlich zu einer Zusammenlagerung kleiner Moleküle, so daß kaum Verluste bei der Dialyse auftraten. Interessanter Weise wurde in dieser Fraktion die höchste Intensität im Bereich heterozyklischer Moleküle gefunden (-165 bis -270 ppm).

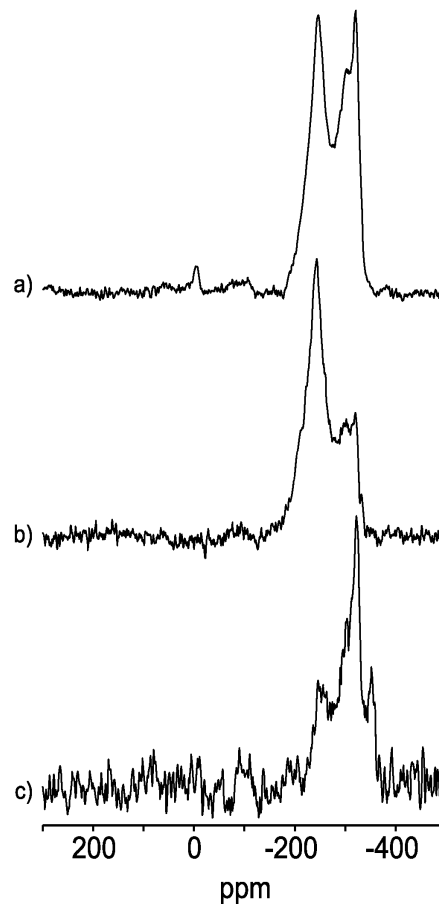


Abb. 12: drastische Extraktion, ^{15}N Festkörper NMR Spektren verschiedener Bodenfraktionen eines anaerob/aerob kompostierten ^{15}N TNT-kontaminierten Bodens. Nach einer NaOH Extraktion wurde der Boden 3h mit 0,5N NaOH gekocht um Huminstoffe zu extrahieren. a.) Huminsäure; b.) Fulvosäure; c.) Humin.

Beim Humin war die Verteilung der Peakintensitäten deutlich anders (Abb. 11c). Hier lag der Hauptpeak bei -270 bis -350 ppm, also im Bereich kovalent gebundener und freier Amine. Weil im Falle des Humin das Ergebnis deutlich von dem Versuch 2 abweicht, ist zu vermuten, daß Einflüsse der Flußsäurebehandlung, auf die im Versuch 3 verzichtet wurde, die Ursache waren.

Der auffälligste Unterschied zwischen den Spektren des Versuches mit drastischer Extraktion in Abb. 12 und den Spektren in Abbildung 11 ist, daß die Signale für Nitrogruppen fehlen. Lediglich bei der Huminsäure (Abb. 12a) ist ein kleiner Peak im Bereich von -8 ppm zu finden. Im Bereich von -165 bis -350 ppm stimmen die Spektren der Abbildungen 11 und 12 recht gut überein. Bei der Fulvosäurefraktion hat sich die Signalintensität dabei in Richtung heterozyklischer Substanzen verschoben. Das Signal-Rausch-Verhältnis des Spektrums der Humin Fraktion zeigt außerdem sehr deutlich, daß die mehrfache Extraktion zu einer deutlichen Anreicherung von ^{15}N führte. Auffällig scheint in den Spektren der Abbildung 12 der scharfe Peak bei -320 ppm, der auf freie Aminogruppen hinweist. Es handelt sich hier sehr wahrscheinlich um Metaboliten, die noch freie Aminogruppen tragen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die verwendete Methode (Einsatz von ^{15}N -TNT und ^{15}N Festkörper-NMR) sehr gut geeignet ist, um nicht extrahierbare TNT Rückstände nach einer anaerob/aerob Kompostierung qualitativ zu beschreiben. Voraussetzung ist aber

der Einsatz einer relativ hohen Konzentration der markierten Substanz (z.B. 20-fach über der ursprünglichen Konzentration). Es konnten deutliche Hinweise auf eine sehr stabile Einbindung von TNT-Metaboliten in Humusstrukturen gefunden werden. Es wurde eine sehr hohe ^{15}N -Anreicherung in der HS festgestellt. In allen Proben wurden Signale im Bereich von -165 bis -350 ppm nachgewiesen. Aufgrund von Vergleichsmessungen anderer Wissenschaftler konnten eine vorläufige Zuordnung dieser Signale zu bestimmten chemischen Strukturen erfolgen.

Durch Kombination von ^{15}N -NMR, Pyrolyse-Gaschromatographie mit Atomemissions-Detection und CHN-Analyse sowie Isotopen-Massenspektroskopie (IRMS) konnte über das $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ -Verhältnis eine annähernde Massenbilanz und quantitative Zuordnung der über NMR ermittelten chemischen Strukturen in den unterschiedlichen Bodenfraktionen erfolgen. Dabei wurde gezeigt, daß der größere Teil des markierten Stickstoffs in den heterozyklischen Strukturen gebunden war. Diese galt vor allem für die Fulvosäuren, während in Huminstoffen und Huminsäuren etwa ein gleicher Teil in anderen, kovalenten Bindungen vorlag.

Über 50% der Signalintensitäten waren heterozyklischen Strukturen zuzuordnen. Als Beispiel sind zu nennen, Imidazole, Indole, Pyrrole, Carbazole und Chinoline. Außerdem waren Anilinderivate (gebunden) und Aniline nachweisbar. Bei letzteren handelt es sich vermutlich um freie Aminofunktionen von Polyaminoaromaten, von denen nicht alle Aminofunktionen Bindungen eingegangen sind.

4.6 Bewertung von TNT und Metaboliten mit einem Immunotox-Test

Es wurde ein Testsystem entwickelt, bei dem primäre humane Monocyten als Testzellen verwendet.

Monocyten haben die Aufgabe Fremdkörper (z.B. Bakterien) zu phagozytieren. Anschließend erfolgt eine "Verdauung" der aufgenommenen Partikel in den Zellen. Dabei werden unter anderem Radikale von der Zelle freigesetzt. Diese Radikale können mit bestimmten Chemikalien reagieren, so daß es zu einer Chemielumineszenz kommt. Diese Lichtreaktion ist meßbar. Werden Monocyten durch Umweltgifte geschädigt, so kann es zu einer Minderung der Phagozytoseaktivität kommen. In dem hier vorgestellten Test werden Monocyten TNT und Abbauprodukten ausgesetzt. Anschließend werden die Zellen durch die Zugabe von Zymosan zum phagozytieren angeregt. Als Meßwert wird die Phagozytosehemmung, ermittelt über die Chemielumineszenz, gegenüber einer Kontrolle ohne Nitroaromaten angegeben.

4.6.1 Einzelsubstanzen

Für TNT und die drei getesteten Reduktionsprodukte konnte mit dem Immunotox-Test eine klare Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit nachgewiesen werden. TNT zeigte in dem Test den größten Effekt. Es wurde gefolgt von 2,4-DANT, 4- und 2-ADNT. Die beiden Azoxyverbindungen wirkten nicht hemmend auf die Phagozytoseaktivität humaner Monocyten. Die Wirkung des 2-Acetylamino-4,6-DNT entsprach der des 2-ADNT, und die vom 4-Acetyl-2,6-DNT der des 4-ADNT. Parallel zu den Chemilumineszenz-Tests wurde eine Vitalitätsprüfung der Zellen durchgeführt. Es zeigte sich, daß die Zellen durch keine der eingesetzten Nitroaromaten abgetötet wurden. Somit war die Hemmung der Chemilumineszenz auf eine Hemmung der Phagozytoseaktivität der Zellen zurückzuführen.

Für die Einzelsubstanzen wurden folgende EC_{50} -Werte ermittelt:

- TNT 8 $\mu\text{g/ml}$
- 2,4-DANT 5 $\mu\text{g/ml}$
- 4-ADNT 38 $\mu\text{g/ml}$
- 2-ADNT 50 $\mu\text{g/ml}$
- 4-Acetyl-2,6-DNT 50 $\mu\text{g/ml}$
- 2-Acetyl-4,6-DNT 50 $\mu\text{g/ml}$.

Bisher gibt es keine Untersuchungen zur Wirkung von sprengstoffspezifischen Nitroaromaten auf humane Zellen. Es wurden lediglich Arbeiten mit unterschiedlichen tierischen Zell-Typen durchgeführt. So wurde erst kürzlich eine Arbeit von Honeycutt et al. [16] publiziert, bei der Rattenleber- und Hamsteroovazellen verwendet wurden. Bei diesen Untersuchungen wurde jeweils der LD_{50} -Wert (letale Dosis für 50% der Zellen) ermittelt. Es zeigte sich, daß diese Zellen wesentlich sensibler reagierten als humane Monocyten. Für TNT wurden LD_{50} -Werte von 4 bzw. 24 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt. Humane Monocyten waren dagegen bei 50 $\mu\text{g/ml}$ noch vital. Andererseits fanden die Autoren eine Abnahme der Cytotoxizität vom TNT zum 2-ADNT, 4-ADNT und 2,4-DANT. Bei den Monocyten war das Diaminonitrotoluol dagegen toxischer als das 2- und 4-ADNT. In der Arbeit von Honeycutt et al. [16] waren 2,2'-Az und 4,4'-Az ebenfalls recht toxisch. Es wurden LD_{50} -Werte von 3-14 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt. Bei der hier vorgestellten Studie waren diese Verbindungen völlig unwirksam.

Es zeigte sich, daß unterschiedliche Zell-Typen sehr verschieden auf sprengstoffspezifische Nitroaromaten reagieren und daß humane Monocyten relativ unempfindlich gegenüber Nitroaromaten sind. Aus diesem Grunde wird es für eine Risikoabschätzung kontaminierter Böden immer wichtig sein, differenzierte Tests einzusetzen. Gleiches gilt für die Bewertung sanierter Böden.

4.6.2 Bodeneluat

Nachdem die Untersuchungen mit Reinsubstanzen die toxische Wirkung von TNT und einigen Metaboliten auf menschliche Monocyten bestätigt hatten, wurden Untersuchungen mit Bodeneluat durchgeführt. Zum einen sollte ermittelt werden, ob es überhaupt möglich ist, Bodeneluat in dem Test einzusetzen. Zum anderen sollte untersucht werden, ob in saniertem Boden (dynamische Beetverfahren) toxische Verbindungen vorhanden sind, die nicht mit der Nitroaromaten-Analytik erfaßt werden. Untersucht wurden Bodeneluat verschiedener Bodentypen. Verwendet wurden sandiger und toniger Boden, Gartenerde und reifer Kompost. Ferner wurde ein Bodeneluat eines von der Fa. Plambeck ContraCon im dynamischen Beet behandelten Bodens untersucht. Als Vergleich wurde ein Eluat eines unbehandelten Bodens verwendet. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 13-14 dargestellt.

Es zeigte sich, daß von Bodeneluat nitroaromatenfreier Böden in jedem Fall eine signifikante toxische Wirkung auf die Monocyten ausging. Dieser Effekt war jedoch im Fall des sandigen und tonigen Bodens und der Gartenerde bis zur Verdünnungsstufe 1:256 fast vollständig aufgehoben (Abb.13). Lediglich das Eluat des Kompost- Bodens bewirkte bei dieser Verdünnungsstufe eine Leuchthemmung von fast 50%.

Der sanierte Boden, der mit 2,7 mg TNT/kg TS; 0,7 mg 4-ADNT/kg TS und 0,7 mg 2-ADNT/kg TS belastet war, zeigte ein etwas anderes Ergebnis (Abb.14). Das Bodeneluat bewirkte in allen Verdünnungsstufen eine Hemmung von etwa 60%. Der unsanierte Boden, der mit etwa 350 mg TNT/ kg TS belastet war, war dagegen deutlich toxischer. Verdünnt im Verhältnis 1:2 verursachte er eine Hemmung von 100%. Durch Verdünnen wurde die Hemmung auf etwa 50% reduziert.

Der Vergleich von saniertem Boden mit Boden (Kompost), der nicht kontaminiert war, zeigt, daß ersterer eine ähnliche Wirkung im Test hatte wie reifer Kompost. Da der sanierte Boden, genauso wie Kompost, einen sehr hohen Anteil an organischen Material enthielt, kann angenommen werden, daß der Hemmeffekt auf Bestandteile des Humus zurückzuführen ist.

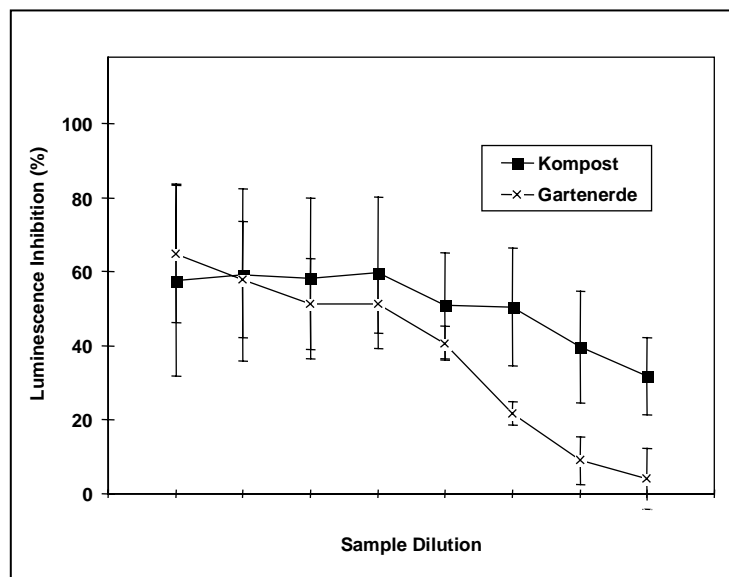


Abb. 13: Wirkung von wässrigen Bodeneluaten unterschiedlicher Böden auf humane Monocyten. Ermittelt wurde die Hemmung der Phagozytoseaktivität mittels Chemielumineszenz. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung von 9 Messungen.

Die Untersuchungen mit dem sanierten Boden lassen nach dem derzeitigen Stand des Wissens den Schluß zu, daß keine toxische Wirkung von wässrigen Eluaten im Monocyten-Test nachweisbar waren. Es wäre jedoch wünschenswert, hier umfassende Untersuchungen durchzuführen.

Die Untersuchungen von wässrigen Bodeneluaten eines TNT kontaminierten Bodens, eines biologisch anaerob/aerob sanierten Bodens und TNT freier Böden zeigten eine klare Detoxifizierung durch die biologische Behandlung. Außerdem wurden deutliche Hinweise auf eine hemmende Wirkung durch Huminstoffe im Boden gefunden.

Für eine Routineanwendung des Testsystems wäre es nützlich, wenn kultivierbare Zell-Linien verwendet werden könnten. Außerdem sollten nähere Untersuchungen zu den Wechselwirkungen von Huminstoffen und Monocyten erfolgen [9].

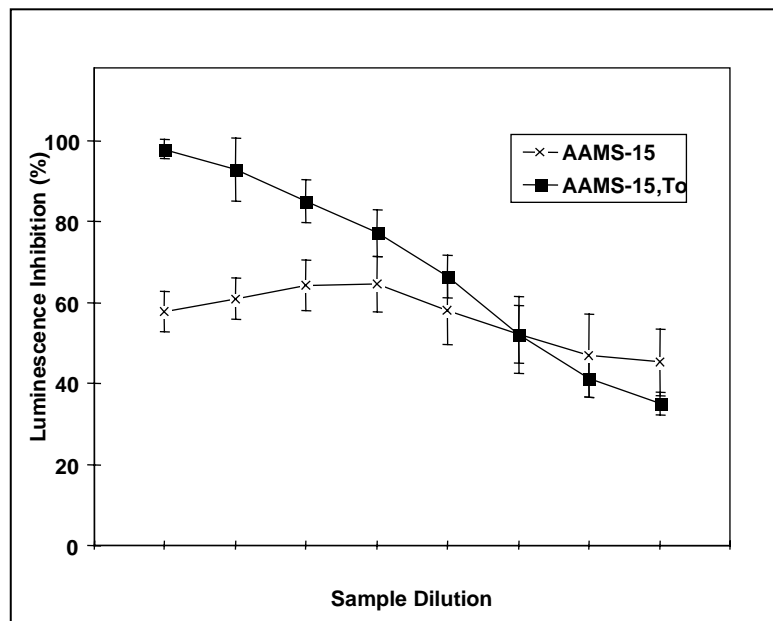


Abb. 14: Wirkung von wäßrigen Bodeneluat eines TNT-kontaminierten Bodens (T_0) und eines mit dem dynamischen Beetverfahrens sanierten Bodens auf humane Monocyten. Ermittelt wurde die Hemmung der Phagozytoseaktivität mittels Chemielumineszenz. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung von 9 Messungen.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Versuche mit Bodensäulen zeigten, daß TNT-Kontaminationen im Boden auch durch Infiltration von geringen Substratmengen abbaubar waren, wobei die Methode unter aeroben Bedingungen besonders effektiv war und außerdem eine Mobilisierung (Migration) der Schadstoffe und deren Metabolite verhinderte. Dieses wurde als ein Hinweis auf eine mögliche *in situ*-Sanierung gewertet. In zwei-Phasen Kompostierungsversuchen wurde eine Dekontamination des belasteten Bodens nachgewiesen. Eine Mineralisation des Sprengstoffs erfolgte nicht. Reaktorversuche mit belastetem Boden erreichten für TNT Abbauraten (extrahierbare Substanzen) von über 99%. Dinitrotoluole (2,4- und 2,6-DNT) wurden ebenfalls weitgehend metabolisiert TNT ist mit Hilfe von Bodenmikroorganismen und durch deren Stimulierung durch Zugabe von Auxiliarsubstraten (wie z.B. Melasse) zu Metaboliten umwandelbar, welche erleichtert der natürlichen Humifizierung zugeführt werden können. Die Dekontamination beruht auf einer Transformation des Sprengstoffs zu aromatischen Aminen, welche bevorzugt unter aeroben Bedingungen, in die Humusmatrix des Bodens eingebunden werden. Obwohl schon unter anoxischen Bedingungen eine deutliche Bindung des Schadstoffes an die Bodenmatrix erzielt wurde, ist eine aerobe Nachbehandlung des Boden/Melasse-Gemisches unerlässlich, wenn hohe Einbindungsgrade erreicht werden sollen.

Untersuchungen mit ^{14}C -TNT bestätigten eine irreversible, nicht mehr extrahierbare und mobilisierbare Einbindung der Metabolite in die Humus-Matrix von etwa 85%. Die extrahierbaren Radioaktivitätsanteile konnten durch die erhöhte Festlegung der TNT-Metabolite deutlich auf unter 10% reduziert werden. Die extrahierte Radioaktivität korrelierte nicht mit den analytisch über HPLC erfaßten Metaboliten. Deren Konzentration war

wesentlich niedriger, so daß von einer teilweisen Mobilisierung niedermolekularer Huminfraktionen, an die die Metaboliten gebunden sind, auszugehen ist. Betrachtet man lediglich die Extrahierbarkeit des Bodens durch Wasser (als Simulation realer Auswascheffekte), so konnten sogar nur Radioaktivitätsanteile von 1-2% wiedergefunden werden. Auf diese Weise könnte man rein theoretisch auf eine 98-99%ige Fixierung des Schadstoffes im Boden schließen.

¹⁵N-NMR-spektroskopische Analysen von mit ¹⁵N-TNT angereichertem Boden bestätigen die Möglichkeit der festen Einbindung von TNT-Metaboliten in die organische Bodenmatrix (im Sinne einer echten Humifizierung). In Untersuchungen mit ¹⁵N-TNT dotierten Böden konnte mittels ¹⁵N Festkörper NMR gezeigt werden, daß die nicht extrahierbaren Sprengstoffrückstände sehr wahrscheinlich in heterozyklischen Systemen und kovalent in den Humus gebunden sind. Langzeituntersuchungen sollten diese Annahme bestätigen.

In bisherigen toxikologischen Untersuchungen erwies sich sanierter Boden als nicht toxisch. Dieses wurde auch mit einem humantoxikologischen Testsystem bestätigt. Dabei muß berücksichtigt werden, daß die „natürlichen“ Produkte des Humifizierungsprozesses biologische Wirkungen zeigen, die den toxikologischen Test offenbar beeinflussen.

Erste Remobilisierungsversuche ergaben keine Freisetzung von Nitro- oder Aminonitroaromaten. Die Art der Einbindung deutet auf eine außerordentlich stabile Bindung der TNT Transformationsprodukte hin. Die Zufuhr von nur 20 Gewichtsprozent Substrat bringt nur wenig organisches Material in das System. Der Gehalt an organischem Kohlenstoff (C org.) steigerte sich von 15,3% vor der Kompostierung des Bodens auf 18,3% nach der Behandlung. Die mikrobiell vermittelte Festlegung (z.B. Humifizierung) von Explosivstoffen in einem zweistufigen Bodenbehandlungsprozeß (anaerob/aerobe Prozeßführung) stellt daher ein erfolversprechendes und preisgünstiges Sanierungsverfahren dar.

6 Verwendete Abkürzungen

TNT	Trinitrotoluol
TNB	Trinitrobenzol
TNBs	Trinitrobezoessäure
ADNT	Aminodinitrotoluol
DANT	Diaminonitrotoluol
TAT	Triaminotoluol
DNT	Dinitrotoluol
ANT	Aminonitrotoluol
Az	Azoxytetranitrotoluol
AcADNT	Acetylamindinitrotoluol
DCM	Dichlormethan
TS	Trockensubstanz

FS	Fulvosäure
HS	Huminsäure
MPN	most propable number
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
DAD	Dioden Array-Detektor
CHN	Kohlenstoff-, Stickstoff-, Wasserstoff-Analyse
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie
rpm	Umdrehung pro Minute
CLZ	Clausthal-Zellerfeld
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
LD50	Letaldosis (50% der Individuen)
EC50	Effektivkonzentration (50%)
% (wt/wt)	Gewichtsprozent

7 Literatur

1. **Abschlußbericht** "Mikrobiologische Sanierung von Rüstungsaltslasten am Beispiel des ehemaligen Sprengstoffwerkes 'Tanne' bei Clausthal-Zellerfeld, Niedersachsen" im Rahmen des F&E Projektes "Mikrobiologische Sanierung sprengstoffkontaminierter Böden": Bruns-Nagel, D.; J. Breitung, E. v. Löw und K. Steinbach (1996). BMBF Förderkennzeichen 1450791
2. **Breitung, J., D. Bruns-Nagel, E.v. Löw, K. Steinbach, L. Kaminski, R. Haas, D. Gemsa** (1995) Mikrobielle Sanierung von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) kontaminierten Böden. UWSF-Z. Umwelttech.Ökotox. 7: 195-200.
3. **Breitung, J., D. Bruns-Nagel, K. Steinbach, L. Kaminski, D. Gemsa, E. v. Löw** (1996) Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soils by two different aerated compost systems. Appl. Microbiol. Biotechnol. 44: 795-800.
4. **Bruns-Nagel, D., J. Breitung, K. Steinbach, D. Gemsa, K.-H. Blotevogel, E. v. Löw** (1995) Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau sprengstoffspezifischer Nitroaromaten in aeroben Bodenperkolationsanlagen. gwf-Wasser/ Abwasser 137: 192-198
5. **Bruns-Nagel, D , J. Breitung, E. v. Löw, K. Steinbach, T. Gorontzy, M. Kahl, K.-H. Blotevogel, and D. Gemsa** (1996) Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene in aerobic soil columns. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2651-2656.
6. **Bruns-Nagel, D., J. Breitung, K. Steinbach, D. Gemsa, E. v. Löw , T. Gorontzy, and K.-H. Blotevogel** (1997) Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil by anaerobic/aerobic and aerobic methods, *in* In Situ and On-Site Bioremediation: Volume 4/2, S. 9-14, Battelle Press, Columbus, Richland

7. **Bruns-Nagel, D., O. Drzyzga, K. Steinbach, T.C. Schmidt, E. v. Löw, , K.-H. Blotevogel und D.Gemsa** (1998) Anaerobic/Aerobic composting of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil in a reactor system. *Environ. Sci. Technol.* 32:1676-1679
8. **Bruns-Nagel, D., T.C Schmidt, O Drzyzga., E. von Löw., and K. Steinbach** (1999a) Identification of oxidized TNT metabolites in soil samples of a former ammunition plant. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 6: 7–10
9. **Bruns-Nagel, D., S. Scheffer, B. Casper, H. Garn, E. v. Löw, and D. Gemsa** (1999b). Effect of 2,4,6-Trinitrotoluene and its Methabolites on Human Monocytes. *Environ. Sci Technol.* 33: 2566-2570
10. **Bruns-Nagel, D., H. Knicker, O. Drzyzga, E. von Löw, and K. Steinbach** (2000a): Characterisation of ¹⁵N-TNT residues after an anaerobic/aerobic treatment of soil/ molasses mixtures by solid-state ¹⁵N NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol* 34: 1549 - 1556.
11. **Bruns-Nagel, D., K. Steinbach, D. Gemsa, E.v. Löw.** 2000. Composting (Humification) of Nitroaromatic Compounds in Spain, J.C., J.B. Hughes, H.-J. Knackmuss(Eds). *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives.* Lewis Publishers, Boca Raton (2000b): 357-393
12. **DECHEMA** (1992) Labormethoden zur Beurteilung der biologischen Bodensanierung. 2. Bericht des Interdisziplinären Arbeitskreises "Umweltbiotechnologie-Boden", Ad-hoc-Arbeitsgruppe "Labormethoden zur Beurteilung der biologischen Bodensanierung".
13. **Drzyzga, O., D. Bruns-Nagel, T. Gorontzy, K.-H. Blotevogel, D. Gemsa and E. von Löw** (1998) Incorporation of ¹⁴C-labeled trinitrotoluene (TNT) metabolites into different soil fractions after anaerobic and anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures *Environ. Sci. Technol.* 32: 3529 - 3535
14. **Drzyzga, O., D. Bruns-Nagel, T. Gorontzy, K.-H. Blotevogel and E. von Löw** (1999) Anaerobic incorporation of the radiolabeled explosive TNT and metabolites into the organic soil matrix of contaminated soil after different treatment procedures“ *Chemosphere* 38: 2081 - 2095
15. **Gorontzy, T., O. Drzyzga, M.W. Kahl, D. Bruns-Nagel, J. Breitung, E. v. Löw, K.-H. Blotevogel** (1994): Microbial Degradation of explosives and related compounds. *Crit. Rev. Microbiol.* 20: 265 – 284
16. **Honeycutt, M. E. A.S. Jarvis, V.A. McFarland** (1996): Cytotoxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35: 282-287
17. **Knicker,H.; D. Bruns-Nagel, O. Drzyzga, E.v. Löw, K. Steinbach** (1999) Application of solid-state ¹⁵N NMR spectroscopy to reveal the nature of bound residues of TNT metabolites in humic material. *Environ. Sci. Technol.*, 33 (2): 343 - 349
18. **Rowe, R., R. Todd, J. Waide** (1977) Microtechnique for Most-Probable-Number Analysis, *Appl. Environ. Microbiol.* 33(3): 675-680
19. **Michels, J. und G. Gottschalk** (1995) Pathway of 2,4,6-trinitrotoluene degradation by *Phanaerochaete chrysosporium*. in *Biodegradation of nitroaromatic compounds* Ed. Spain J., Plenum Press, New York

20. **Preuß, A., P.-G. Rieger** (1995) Anaerobic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds. *in* J.C. Spain (ed.) Biodegradation of Nitroaromatic Compounds. Plenum Press, New York and London. S. 69-85
21. **Schmidt, T.C., M. Petersmann, L. Kaminski, E. v. Löw und G. Stork** (1997) Analysis of aminobenzoic acids in waste water from a former ammunition plant with HPLC and combined diode array and fluorescence detection. *Fresenius J. Anal. Chem.* 357: 121-126
22. **Schmidt, T.C., K. Steinbach, , E. v. Löw, G. Stork** (1998): Highly polar Metabolites of Nitroaromatic Compounds in Ammunition Wastewater. *Chemosphere* 37: 1079 – 1091
23. **Spanggord, R.J., S.F.Spain, S. F. Nishino, K.E.Mortelmans** (1991) Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3200-3205
24. **Thorn, K. A., P. J. Pettigrew, W. S.Goldberg, E. J Weber** (1996) Covalent binding of aniline to humic substances. 2. ¹⁵N NMR studies of nucleophilic addition reactions. *Environmental Science and Technology* 30, 2764-2775.
25. **Winterberg, W., E. von Löw, T. Held** (1998): Dynamisches Beetverfahren zur Sanierung von Rüstungsaltslasten. *TerraTech* 3: 39 – 41
26. **Wittanowski, M., Stefanial, G.A. Webb** (Ed.) Nitrogen NMR Spectroscopy; Academic Press, London (1993). Vol 25 L

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.2 Verbundvorhaben 3: Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten

9.2.3 Anaerobe Extraktion in Perkolationssäulen (TV 3.1.2)

Prof. Dr. K.-H. Blotevogel

Dr. T. Gorontzy

T. Raber

O. Drzyzga

M. Kahl,

U. Neubauer

M. Kleinschmidt

A. Carstens

Carl von Ossietzky-Universität Oldenburg

Fachbereich Biologie – Mikrobiologie

Carl von Ossietzky-Straße 9 – 11

D-26129 Oldenburg

Förderkennzeichen: 14507911

Laufzeit: Phase I: 01.08.93 – 31.01.96, Phase II: 01.10.96 – 31.12.98

1 Zusammenfassung und Zielsetzung

Im Rahmen des Verbundforschungsvorhabens "Entwicklung eines mikrobiologischen Sanierungsverfahrens am Beispiel des ehemaligen Sprengstoffwerkes 'Tanne' bei Clausthal-Zellerfeld" sollte ausgehend von der Tatsache, daß der Explosivstoff 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) mikrobiell in erster Linie reduktiv umgesetzt wird [9], ein Verfahren unter Ausschluß von Luftsauerstoff entwickelt werden. Unter solchen anoxischen Verhältnissen wird das TNT reduktiv zu den entsprechenden Aminodinitro- (ADNT), Diaminonitro- (DANT) oder gar zum Triaminotoluol (TAT) umgesetzt. Diese Produkte weisen eine signifikant höhere Wasserlöslichkeit als die Ausgangssubstanz auf. Außerdem kann unter den genannten Bedingungen die Bildung von Kondensationsprodukten (z.B. Azoxy- oder Azoverbindungen) weitestgehend ausgeschlossen werden. Problematisch gestaltet sich jedoch die Bildung von TAT in Gegenwart von Bodenbestandteilen. Aufgrund seiner Reaktivität kommt es auch unter anoxischen Bedingungen zur Wechselwirkung mit Bodenkomponenten, was dazu führt, daß das TAT nicht quantitativ aus Boden extrahiert werden kann. Bei der Verfahrensführung ist demnach darauf zu achten, daß es nicht zur Bildung von TAT kommen kann.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde ein Verfahrensansatz aufgestellt, der im Prinzip auf einer mikrobiell unterstützten Bodenwäsche basiert [6]. Das TNT wird mikrobiell zu den teilreduzierten Produkten umgesetzt und diese werden, wie auch das TNT selbst, mit der wäßrigen Phase aus dem Bodenmaterial herausgewaschen. Ziel weitergehender Untersuchungen war die Optimierung der Extraktionsleistung sowie die Regeneration der anfallenden Prozeßwässer. Dazu wurde u.a. der Einsatz von verschiedenen Zuschlagstoffen, Lösungsvermittlern und Auxiliarsubstraten untersucht. Die angefallenen Prozesswässer wurden sowohl einer biologischen als auch einer photochemischen Nachbehandlung zugeführt, um anschließend wieder für die Extraktion des Schadstoffes aus dem kontaminierten Bodenmaterial eingesetzt zu werden.

Ergänzend wurde der mikrobielle Abbau des TAT als Zentralintermediat des anaeroben Abbaus von TNT eingehender untersucht. So konnte gezeigt werden, daß das TAT durch fermentierende Bakterien der Gattungen *Clostridium* oder *Pelobacter* cometabolisch weiter abgebaut werden kann.

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

Nach einer umfangreichen Literaturrecherche [3] wurde deutlich, daß zum damaligen Zeitpunkt praktizierte Verfahren zur Dekontamination von Böden, die mit dem Sprengstoff TNT kontaminiert sind, mit hohen Kosten verbunden waren (z.B. Verbrennung oder Extraktion mit Lösungsmitteln), weitere Umweltbelastungen zur Folge hatten ("Verklappung" in Lagunen) oder zur Bildung von unbrauchbaren Produkten (totes Bodenmaterial; lösungsmittel-belasteter, toter Boden) führten.

Mikrobiologische Verfahren haben den Vorteil, daß die Kosten in vielen Fällen relativ gering gehalten werden können und Produkte entstehen, die wiederverwendet werden können.

3 Angewandte Methoden

3.1 Versuchsaufbauten

Der Schwerpunkt der Experimente liegt auf der Untersuchung einer mikrobiell unterstützten Bodenwäsche. In der Abbildung 1 sind die für die Bodenperkolations verwendeten Versuchsaufbauten schematisch dargestellt.

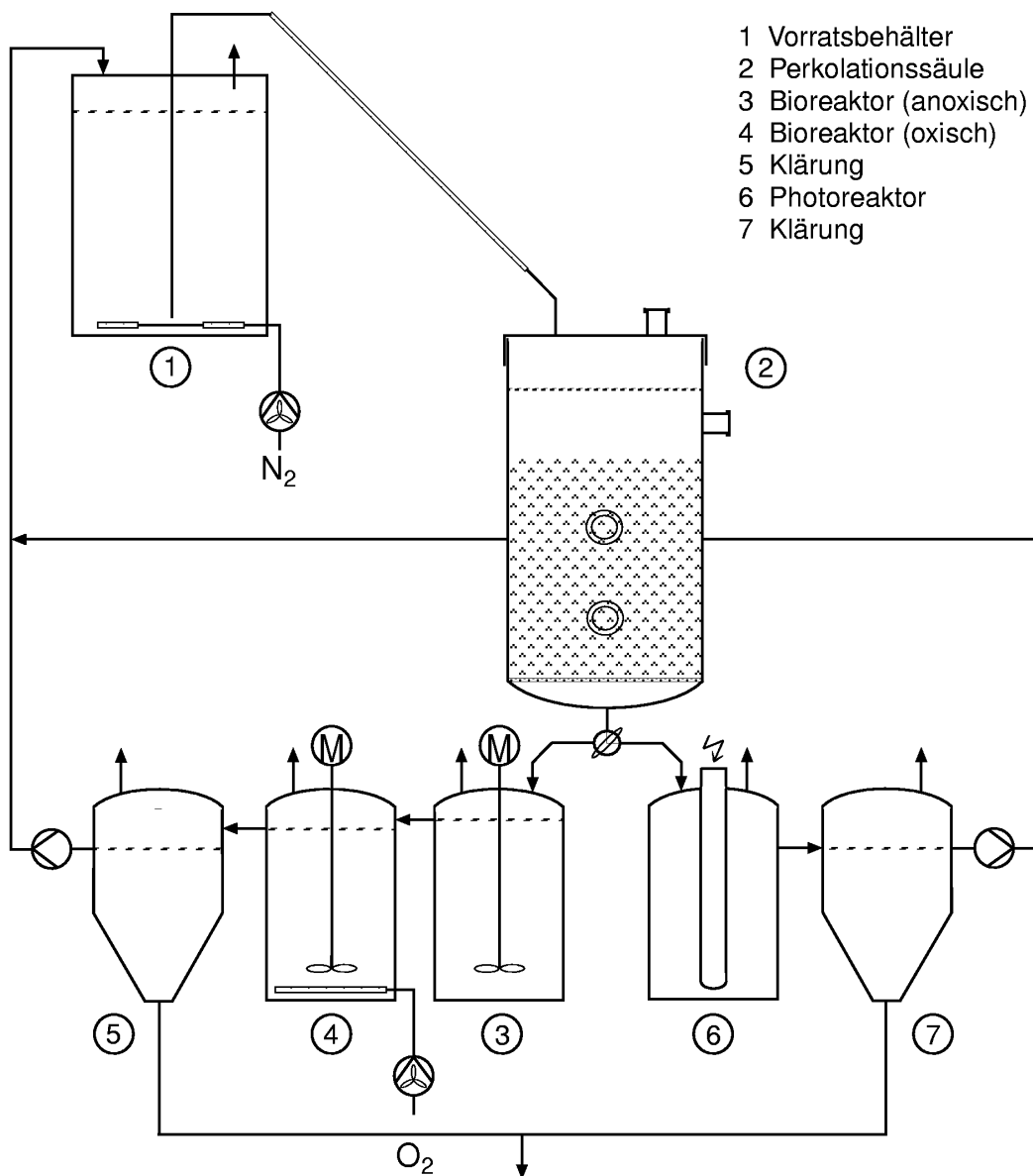


Abb. 1: Schematische Darstellung der Versuchsaufbauten zur Optimierung der mikrobiell unterstützten Bodenwäsche.

Die Perkolationsssäulen werden mit TNT-kontaminiertem Standortmaterial (0,5 bzw. 1 kg TS) befüllt, das zuvor durch Siebung auf Korngrößen ≤ 7 mm eingestellt wurde. Anschließend wird das Material in den Säulen mit durch Aufkochen entgastem Wasser (400 bzw. 600 ml),

dem 1 % NH_4Cl sowie 0,1 % KH_2PO_4 zugefügt wurde, überschichtet. Die für die Elution verwendeten Waschlösungen werden ebenfalls grundsätzlich mit entgastem Wasser (+ N- und P-Quelle) angesetzt und während der Durchführung der Versuchsreihen kontinuierlich mit einem Inertgas (Stickstoff oder Argon) durchspült. Waschlösungen mit gelösten Auxiliarsubstraten werden durch 20minütiges Autoklavieren (121 °C; 1,2 bar) sterilisiert und ebenfalls unter einer Inertgas-Atmosphäre aufbewahrt.

Die Perkolation des Bodenmaterials erfolgt diskontinuierlich. Am unteren Ende der Säule werden täglich 100 bis 200 ml Eluat entnommen (entspricht Verweilzeiten von zwei bis vier Tagen) und die entsprechende Menge unmittelbar danach wieder aufgefüllt.

Nach erfolgreicher Bodenwäsche bzw. nach Abbruch einer Versuchsreihe werden die Perkolationssäulen am oberen und unteren Ende geöffnet und zum Austrocknen (etwa bis zur Wasserhaltekapazität des Materials) stehengelassen. Zuvor wird jeweils eine Probe von etwa 10 g Feuchtgewicht aus den Säulen entnommen, die zur Charakterisierung des Bodenmaterials verwendet wird.

Der in der Abbildung dargestellte Weg der Prozeßwässer (entweder biologische oder photochemische Aufbereitung) richtet sich nach der Qualität der Wässer. Stark gefärbte und/oder trübe Wässer werden biologisch nachbehandelt, da sich diese nicht für eine effiziente Photolyse eignen. Alle anderen Prozeßwässer werden gesammelt, vereinigt und an das Institut für Solarenergieforschung Hameln/Emmerthal, Außenstelle Hannover, (ISFH) zur Nachbehandlung weitergeleitet.

Für die Untersuchungen zur Prozeßoptimierung wurden ergänzend Miniatur-Perkolationssäulen verwendet, deren Aufbau in der Abbildung 2 schematisch dargestellt ist.

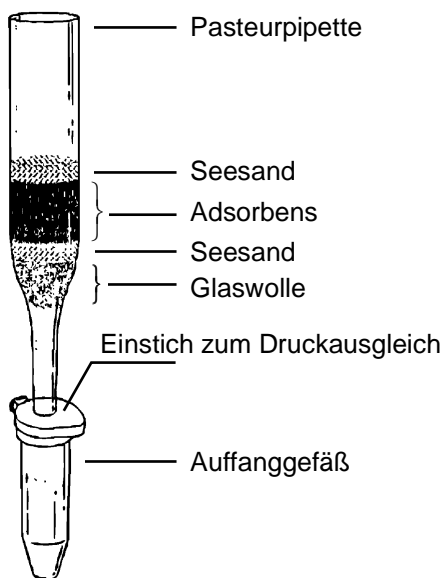


Abb. 2: Schematische Darstellung der Miniatur-Versuchsaufbauten für die Optimierungsversuche der mikrobiell unterstützten Bodenwäsche.

Die Miniatur-Perkolationssäulen werden mit etwa ein bis zwei Gramm TS des kontaminierten Bodenmaterials bestückt, welches zuvor auf eine Korngröße = 2 mm gesiebt wurde. Die Säulen werden anschließend ebenfalls diskontinuierlich mit den jeweiligen Waschlösungen durchspült und die Eluate auf ihre Gehalte an Nitro- und Aminoaromen analysiert. Durch die Verwendung dieser Aufbauten läßt sich bereits nach relativ wenigen Spülgängen absehen, ob die Optimierungsstrategie zum gewünschten Ziel führt. Läßt sich eine Steigerung der

Extraktion von TNT aus dem Bodenmaterial nachweisen, werden die Ansätze in den größeren Maßstab (0,5 bzw. 1 kg TS Boden) übertragen.

Zur Reduzierung der bislang benötigten Wassermengen wurden in einem neuen Verfahrensansatz Untersuchungen mit einem Boden-Suspensions-Reaktor durchgeführt. Dazu wurden 0,2 kg TS des kontaminierten Bodenmaterials (2,5 g TNT / kg TS; Korngröße = 7 mm) in einen Fermenter überführt und mit durch Aufkochen entgastem Wasser (2 l) überschichtet, dem neben 0,3 Vol.% Melasse 1 % NH_4Cl sowie 0,1 % KH_2PO_4 zugefügt wurde. Der Ansatz wurde anschließend mit Stickstoff überschichtet, verschlossen und unter kontinuierlichem Rühren bei 37 °C inkubiert.

Nach dem Übergang der Kontaminanten in die wässrige Phase kann diese in einen nachgeschalteten Reaktor überführt und somit vom Bodenmaterial getrennt werden. An dieser Stelle wird dem Reaktor mit der wässrigen Phase 1 Vol.% Melasse zugeführt und diese weiter inkubiert. In der Abbildung 3 sind die Versuchsaufbauten für diesen Ansatz schematisch dargestellt.

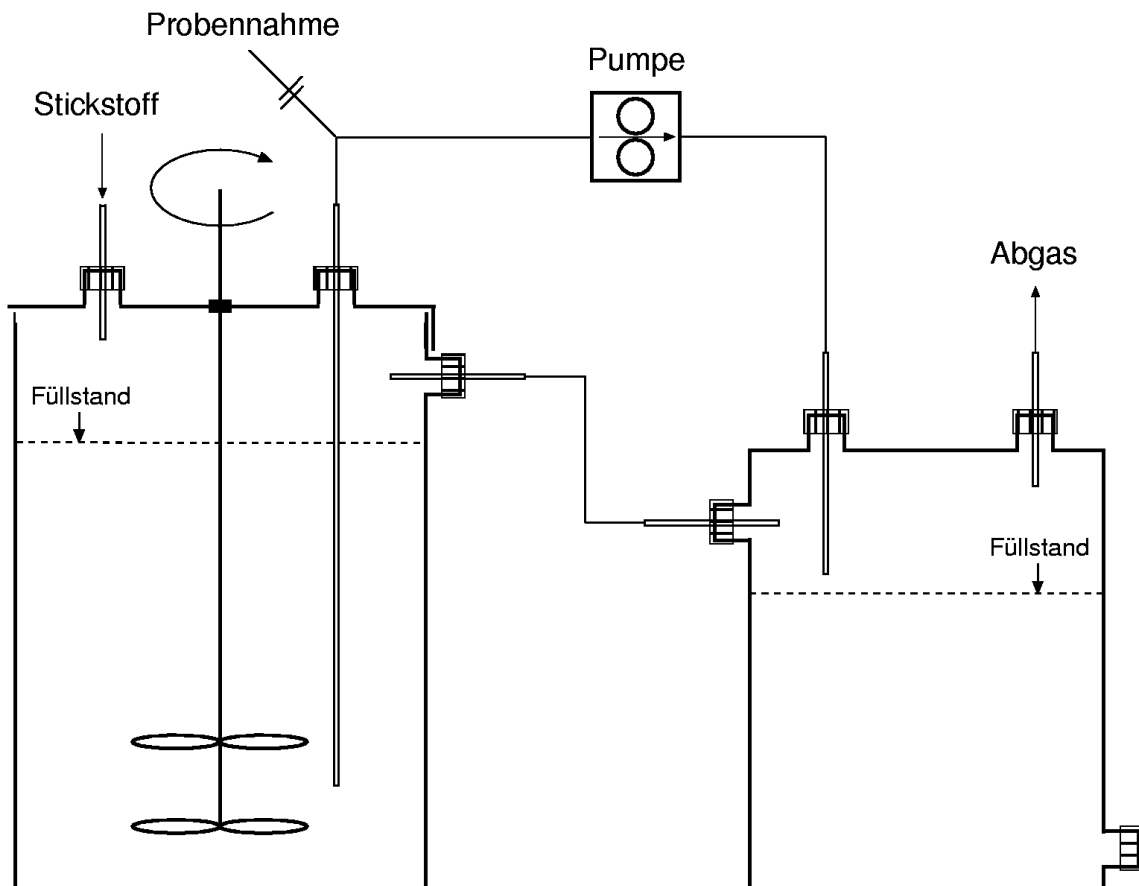


Abb. 3: Schematische Darstellung der Versuchsaufbauten für die mikrobiell unterstützte Bodenwäsche in einem Suspensionsreaktor (links) mit nachgeschaltetem Bioreaktor (rechts) für die Prozeßwasserbehandlung.

3.2 Laborspezifika

Soweit existent wurden alle chemischen Analysen nach standardisierten Einheitsverfahren (DIN, DEV [1]) an der Universität Oldenburg durchgeführt. Für die Extraktion und die Analyse von TNT, seinen Transformationsprodukten und mikrobiellen Metaboliten gab es zum Zeitpunkt der Analysen noch keine Vorschrift. Die entsprechenden flüssig- und gaschromatographischen Methoden (siehe Abschnitt 3.4.1 dieses Beitrages) wurden daher im Rahmen des Projektes an der Univ. Oldenburg entwickelt. Gleiches gilt für die gaschromatographische Analyse von Gärungsprodukten. Die toxikologischen Untersuchungen wurden in Anlehnung an die "Methoden zur toxikologischen/ökotoxikologischen Bewertung von Böden" einer Ad-Hoc-Arbeitsgruppe der DECHEMA e.V. durchgeführt [7]. Die Ermittlung weiterer Bodenparameter (z.B. pH-Wert) wurden einer Monographie des Springer-Verlages entnommen. Entsprechende Verweise sind bei den entsprechenden, nachfolgend aufgeführten Methoden erwähnt.

Für flüssigchromatographische Methoden (HPLC) wurde eine Anlage der Firma GYNKOTEK verwendet. Gaschromatographische Analysen (GC) wurden mit VARIAN-Geräten durchgeführt. Alle anderen Geräte (Pumpen, Schüttler, Zentrifugen, Waagen, etc.) stammten von verschiedenen Herstellern und wurden über einen Laborfachhandel bezogen.

3.3 Ergänzende verfahrensspezifische Probenahme-Methoden

3.3.1 Boden/Feststoffe

Das vom Standort Werk "Tanne" stammende Bodenmaterial wurde soweit möglich aus einer Tiefe von ca. 15 – 50 cm entnommen. Auf die Verwendung der oberen 15 cm wurde verzichtet, da diese in der Regel stark durchwurzelt waren. Große Partikel (Steine, Schutt) wurden bereits während des Aushubs verworfen. Die Probenahmen wurden stets mit einem Schnelltest für TNT (Aceton plus KOH) begleitet. Für die Untersuchungen mit den Perkolationssäulen wurde ausschließlich Bodenmaterial verwendet, das auch von den Projektpartnern untersucht wurde.

3.3.2 Wasser/Suspensionen

Wässriges Probenmaterial wurde täglich aus den Perkolationsexperimenten erhalten. Pro Säule wurden täglich ca. 100 – 200 ml am unteren Ende der Bodensäulen abgenommen (entspricht einer Verweilzeit von ca. 2 - 4 Tagen). Das Material wurde anschließend bis zur Weiterverwendung bzw. bis zur Analyse kühl und dunkel gelagert. Wässriges Probenmaterial für die Untersuchungen zur photochemischen Prozeßwasserbehandlung wurden in 25 l Kanistern gesammelt, ebenfalls kühl und dunkel gelagert und in regelmäßigen Abständen gekühlt an das ISFH weitergeleitet.

Probenmaterial, in welchem TAT zu erwarten war, wurde unmittelbar nach der Probenahme analysiert.

3.4 Ergänzende verfahrensspezifische Analytik-Methoden

3.4.1 TNT, Nitroaromaten und Abbauprodukte

3.4.1.1 Extraktion nitroaromatischer Verbindungen aus Bodenmaterial

Nach der Trocknung (24 h bei 60 °C) wird das Bodenmaterial auf eine Korngröße = 5 mm gesiebt und diese Fraktion im Mörser homogenisiert. Von diesem Material werden 5 g in verschließbare Zentrifugengläser überführt und mit 10 ml Extraktionsmittel (Methanol zur Rückstandsanalytik) versetzt. Anschließend erfolgt eine 30minütige Extraktion im Ultraschallbad. Vor der flüssigchromatographischen bzw. gaschromatographischen Analyse wird partikuläres Material durch 10minütige Zentrifugation entfernt. Verbliebene Trübstoffe werden gegebenenfalls durch Filtration (Porengröße 0,2 µm) entfernt. Es werden mindestens drei Parallelen extrahiert und (ggf. nach Verdünnung) analysiert.

3.4.1.2 Nachweis und Quantifizierung nitro- und aminoaromatischer Verbindungen

HPLC I (Nitro-, Aminonitro- und Diaminonitroaromaten; Azoxytoluole, Acetylamide)

- Säule: RP-C₁₈ (HYPERASIL-ODS; 250 x 4 mm; 5 µm Partikelgröße)
- Eluent: Methanol–Wasser (35:65, Vol.:%:Vol.:%); 1,25 ml/min
- Injektionsvolumen: 10 bis 50 µl (je nach Konzentrationsbereich)
- Detektion per UV/DAD bei den jeweiligen Absorptionsmaxima der untersuchten Verbindungen

HPLC II (2,4,6-Triaminotoluol, Methylphloroglucin und Abbauprodukte)

- Säule: RP-C₁₈ (HYPERASIL-ODS; 250 x 4 mm; 5 µm Partikelgröße)
- Eluent: 0,9 % Ammoniumacetat–Methanol (94:6, Vol.:%:Vol.:%); 1,0 ml/min
- Injektionsvolumen: 20 µl
- Detektion per UV/DAD simultan bei 230 und 254 nm

HPLC III (Toluol, Toluidine und Kresole)

- Säule: RP-C₈ (NUCLEOSIL-C8; 250 x 4 mm; 5 µm Partikelgröße)
- Eluent: Methanol–Wasser (50:50, Vol.:%:Vol.:%); 0,8 ml/min
- Injektionsvolumen: 20 µl
- Detektion per UV/DAD simultan bei 230 und 254 nm

HPLC IV (Mononitrotoluole, Dinitrotoluole und Reduktionsprodukte)

- Säule: RP-C₁₈ (LICHROSORB; 250 x 4 mm, 5 µm Partikelgröße)
- Eluent: Methanol–0,01 %ige Phosphorsäure (45:55, Vol.%, Vol.%; pH = 4); 0,9 ml/min
- Injektionsvolumen: 10 µl
- Detektion per UV-Absorption bei 230 nm

GC I (Nitro- und Nitroaminoaromaten)

- Phenyl-Methyl-desaktivierte Vorsäule (5 m, 0,25 mm ID)
- DB-5 Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm ID)
- Trägergas: Wasserstoff (2,5 ml/min)
- Injektor: Split/Splitless (Split 16:1); Temperatur: 300 °C
- Injektionsvolumen: 1 µl
- Säulentemperatur: 100 °C (4 min), 8 °C/min, 260 °C (10 min)
- Detektor: ECD; Temperatur: 300 °C

3.4.2 Weitere chemische Parameter**3.4.2.1 Extraktion von Fettsäuren und Alkoholen aus Kompostmaterial**

Je 2 g des Kompostmaterials werden in verschließbare Zentrifugengläser überführt und mit je 5 ml Wasser (H₂O bidest.) versetzt. Die Extraktion erfolgt über Nacht bei 4 °C im Rotationsschüttler. Anschließend wird partikuläres Material abzentrifugiert und 0,5 ml des Überstandes in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Vor der gaschromatographischen Analyse (GC II) wird der Überstand (ggf. nach Verdünnung) im Eisbad mit 0,5 ml einer 4 %igen Phosphorsäure versetzt. Für enzymatische Untersuchungen wird der Überstand direkt eingesetzt. Es werden mindestens drei Parallelen extrahiert und vermessen.

3.4.2.2 Bestimmung von kurzkettigen, flüchtigen Fettsäuren und AlkoholenGC II (Fettsäuren [C2 - C5] und Alkohole [C1 - C3])

- NUKOL-Megabore-Säule (15 m, 0,53 mm ID)
- Trägergas: Helium (3 ml/min)
- Injektor: Split/Splitless (Split 30:1); Temperatur: 160 °C
- Injektionsvolumen: 0,5 µl
- Säulentemperatur: 90 °C (0,5 min), 10 °C/min, 160 °C (2 min)
- Detektor: FID; Temperatur: 220 °C

3.4.2.3 Bestimmung von Ethanol

Ethanol wird enzymatisch mittels eines Fertigtests der Fa. BOEHRINGER MANNHEIM (Best.-Nr. 176 290) nachgewiesen und quantifiziert.

3.4.2.4 Bestimmung von Laktat

Der Nachweis und die Quantifizierung von Laktat erfolgt enzymatisch mit Hilfe eines Fertigtests der Fa. BOEHRINGER MANNHEIM (Best.-Nr. 139 084).

3.4.2.5 Bestimmung des pH-Wertes und des Standard-Redoxpotentials von Böden und Wässern

Der pH-Wert der anfallenden Prozeßwässer wird unmittelbar nach der Probenahme mit Hilfe einer Einstabmeßkette ermittelt. Die Bestimmung des pH-Wertes von Böden bzw. Bodenlösungen erfolgt nach [8].

Das Redoxpotential wäßriger Lösungen wird mit Hilfe einer Redox-Einstabmeßkette mit Silber/Silberchlorid-Bezugselektrode und Platin-Meßelektrode, die mit einem Standard nach DIN 38404 Teil 6 geeicht wird, ermittelt.

3.4.2.6 Bestimmung der Summe kupplungsfähiger aromatischer Amine

Die Summe der kupplungsfähigen aromatischen Amine wird kolorimetrisch nach Kupplung mit NEDA (N-1-Naphthylethylendiamin) bei einer Wellenlänge von 546 nm bestimmt [4].

3.4.2.7 Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs

Der chemische Sauerstoffbedarf wäßriger Lösungen (Prozeßwässer) wird nach den DEUTSCHEN EINHEITSVERFAHREN ZUR WASSER-, ABWASSER- UND SCHLAMMUNTERSUCHUNG nach DIN 38409 Teil 43 bestimmt.

3.4.2.8 Bestimmung des Nitrat-Ions

Die Nitrationen-Konzentration wird kolorimetrisch nach den DEUTSCHEN EINHEITSVERFAHREN ZUR WASSER-, ABWASSER- UND SCHLAMMUNTERSUCHUNG nach DIN 38405 Teil 10 ermittelt.

3.4.2.9 Bestimmung des Nitrit-Ions

Die Nitritionen-Konzentration wird kolorimetrisch nach den DEUTSCHEN EINHEITSVERFAHREN ZUR WASSER-, ABWASSER- UND SCHLAMMUNTERSUCHUNG nach DIN 38405 Teil 9 ermittelt.

3.4.2.10 Bestimmung des Ammonium-Ions

Ammoniumionen werden mittels eines enzymatischen Fertigtests der Fa. BOEHRINGER MANNHEIM (Best.-Nr. 1 112 732) bestimmt und quantifiziert.

Hinweis: Stark getrübbte und/oder gefärbte Proben werden unter Verwendung der Ionenchromatographie auf ihren Ammonium-Gehalt untersucht. Dazu wurde eine Anlage der Firma MERCK (Standort: Univ. Bremen; Durchführung: Prof. Dr. K.-H. Blotevogel) mit folgender Spezifikation verwendet:

HPLC V (Ammonium-Ionen)

- Säule: Kationenaustauscher (LICHROSIL IC CA2; sphärisch)
- Eluent: 3 mM Phosphorsäure (35 °C); 1,0 ml/min
- Injektionsvolumen: 20 µl
- Leitfähigkeitsdetektor

3.4.2.11 Wassergehalt und Trockensubstanz

Die Bestimmung des Wassergehaltes und des Trockenrückstandes bzw. der Trockensubstanz erfolgt nach den DEUTSCHEN EINHEITSVERFAHREN ZUR WASSER-, ABWASSER- UND SCHLAMMUNTERSUCHUNG nach DIN 38414 Teil 2.

3.4.2.12 Glührückstand und organische Trockensubstanz

Die Bestimmung des Glührückstandes und des Glühverlustes der Trockenmasse eines Bodens wird in Anlehnung an die DEUTSCHEN EINHEITSVERFAHREN ZUR WASSER-, ABWASSER- UND SCHLAMMUNTERSUCHUNG (DIN 38414 Teil 3) durchgeführt.

3.4.3 Mikrobiologische und ökotoxikologische Parameter

3.4.3.1 Herstellung von Bodeneluaten für aquatische Testsysteme

Die Herstellung der Eluate erfolgt in Anlehnung an DIN 38414 Teil 4 "Bestimmung der Eluierbarkeit mit Wasser"

3.4.3.2 Überprüfung der Rückhaltefunktion von Böden

Zur Ermittlung dieses Parameters wird die Hemmung der Lumineszens von *Vibrio fischeri* durch wässrige Bodeneluaten und Prozeßwässer (nach DIN 38414 Teil 4) im Leuchtbakterientest nach DIN 38412 Teil 34 bzw. Teil 341 bestimmt. Für diese Untersuchungen wird ein Gerät der Fa. Dr. Lange GmbH mit entsprechenden Fertigtest-Kits verwendet.

3.4.3.3 Überprüfung der Lebensraumfunktion des Bodens als Pflanzenstandort

Die ökotoxische Wirkung von Böden auf frühe Wachstumsstadien der Kresse (*Lepidium sativum*) wird nach ISO/DIS 11269-2 bestimmt.

Hinweis: Vor der Durchführung des Kresstests muß das Bodenmaterial mindestens zwei Wochen lang in Gegenwart von Luftsauerstoff inkubiert werden (zum Abbau von Fäulnis-Produkten aus der anaeroben Phase). Dazu wurde das Untersuchungsmaterial in offene Plastiktöpfe überführt und täglich einmal durchmischt.

Die toxikologischen Untersuchungen erfolgten in Anlehnung an eine Monographie der Ad-hoc-Arbeitsgruppe "Methoden zur toxikologischen/ökotoxikologischen Bewertung von Böden" von der DECHEMA e.V. [7].

4 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der ersten Projektphase werden im folgenden kurz zusammengefaßt: Durch anaerobe Mikroorganismen aus 2,4,6-Trinitrotoluol sowie dessen teilreduzierten Kongeneren gebildetes 2,4,6-Triaminotoluol kann cometabolisch weiter zu noch nicht identifizierten Produkten umgesetzt werden. Eine angereicherte Mischkultur, die aus gärenden sowie sulfatreduzierenden Sporenbildnern und methanogenen Bakterien bestand, vermag unter anaeroben Bedingungen mit diesem Produktgemisch als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle langsam zu wachsen. Später ist gezeigt worden, daß aus dem kontaminierten Bodenmaterial des Standortes angereicherte anaerobe Sporenbildner (später charakterisiert als *Clostridium butyricum*) in der Lage sind das unter den gegebenen Bedingungen gebildete TAT soweit umzusetzen, daß letztlich keine UV-absorbierenden (200 bis 450 nm) Verbindungen mehr nachweisbar waren.

Hoch mit TNT belastetes Bodenmaterial konnte durch einen Waschprozeß mit Wasser als Lösungsmittel nahezu vollständig gereinigt werden. Mikrobielle Aktivität, höhere Temperaturen und die Zugabe eines Auxiliarsubstrates beschleunigten diesen Vorgang. Die Anwesenheit verschiedener, ebenfalls an Rüstungsalstandorten nachweisbaren Kontaminanten wie Nitrat oder 2,6-Dinitrotoluol können diesen Prozeß inhibieren.

Der Versuch die Effektivität des Elutionsprozesses durch die Zugabe eines leicht oxidierbaren Auxiliarsubstrates (Melasse) zu steigern, stellte weitere Anforderungen an die Prozeßsteuerung, wie Batchversuche gezeigt haben. So ist die Kontrolle des Redoxpotentials zwingend notwendig, damit keine Unzulänglichkeiten bei der Bilanzierung auftreten. Das Redoxpotential sollte demnach nicht weiter als $E_h = -200$ mV sinken.

Die Zugabe von Strukturverbesserern wie z.B. Torf oder Holzspäne hatte einen deutlich positiven Einfluß auf die maximal möglichen Durchflußraten. So kann es ohne Zusatz dieser Materialien zur Bildung von unerwünschten Kanälen im Bodenmaterial oder gar zum Verstopfen der Bodensäulen kommen, insbesondere wenn höhere Mengen eingesetzt werden.

Ein eindeutig fördernder Effekt auf die Reinigungsleistung konnte der Beteiligung von Mikroorganismen zugeordnet werden, indem die Kontaminanten durch diese in leichter

wasserlösliche Produkte umgewandelt werden. Es ist gezeigt worden, daß durch die Verwendung von Bodenreaktoren eine erhebliche Beschleunigung des Dekontaminationsprozesses erreicht werden kann. Die Gestaltung der Prozeßführung erwies sich jedoch ungleich schwieriger als bei der Verwendung von Perkolationssäulen.

Es konnte zudem gezeigt werden, daß die sorptive Kapazität verschiedener Bodenmaterialien für Nitro-, Aminonitro- und Aminoaromaten durch die Ausbildung mikrobieller Biofilme signifikant herabgesetzt wird.

Hauptsächliches Ziel der zweiten Projektphase war die Optimierung des in der ersten Projektphase entwickelten Verfahrens zur mikrobiell unterstützten Extraktion des Sprengstoffes TNT aus Boden. Damit verbunden waren Untersuchungen zur Aufbereitung der anfallenden Prozeßwässer entweder durch eine biologische oder durch eine photochemische Abwasserbehandlung. Ein weiterer Schwerpunkt wurde in diesem Zusammenhang auf die Aufklärung des Abbaus des Zentralintermediats 2,4,6-Triaminotoluol (TAT) durch fermentierende Mikroorganismen gesetzt. Die Qualität der erfolgreich dekontaminierten Böden wurde chemisch-analytisch und toxikologisch bewertet.

Die für die beschriebenen Untersuchungen verwendeten Versuchsaufbauten lassen sich dem Abschnitt 3.1 dieses Beitrags entnehmen.

4.1 Einsatz verschiedener Auxiliarsubstrate und Zuschlagstoffe

Im Rahmen dieser Versuche wurden neben der TNT-Konzentration des eingesetzten Bodenmaterials die Art und Konzentration verschiedener Auxiliarsubstrate und Zuschlagstoffe variiert, um zuvor beobachtete Schwierigkeiten bei der Langzeitstabilität des Prozesses zu verhindern bzw. um den benötigten Wasserbedarf zu verringern. Letzteres ist nach neueren Überlegungen nicht mehr von besonderer Bedeutung, da ein Verfahrenskonzept erstellt wurde, in welchem das Wasser im Kreislauf verwendet werden soll.

Aus den Ergebnissen der letzten Projektphase geht hervor, daß sich hoch belastete Böden (2,5 g TNT/kg TS) sehr gut durch die verwendete Methode reinigen lassen. Extrem belastete Böden (10 g TNT/kg TS) lassen sich zwar ebenfalls signifikant dekontaminieren, jedoch können relativ hohe Restkonzentrationen des Sprengstoffes in dem Material verbleiben, die erst nach einer intensiven Homogenisierung des Bodenmaterials weiter dezimiert werden konnten.

Die besten Resultate hinsichtlich Durchführbarkeit, Bilanzierbarkeit und auch in Bezug auf entstehende Kosten wurden letztlich bei den Extraktionsversuchen mit Wasser (ohne Auxiliarsubstrate) als Extraktionsmittel sowie Stroh (als Zuschlagstoff; 4 Gew.%) erzielt.

Bei der Perkolation eines extrem (ca. 10 g/kg TS) mit TNT kontaminierten Bodens mit 5 oder 10%iger Melasselösung wurden nur relativ geringe Extraktionsraten erzielt (45 bis 63 mg/Woche), so daß selbst nach etwa 13 wöchiger Behandlung nur etwa 7 bis 10 % des ursprünglich in dem Boden vorhandenen TNT herausgewaschen werden konnten (Abb. 4). Aufgrund des offensichtlich unvollständigen Umsatzes der Melasse in dieser Versuchsreihe sowie der "schlechten" Qualität der anfallenden Prozeßwässer (hoher CSB, unangenehmer Geruch, dunkelbraune Färbung, starke Trübung) wurde die Versuchsreihe nach 13 Wochen abgebrochen.

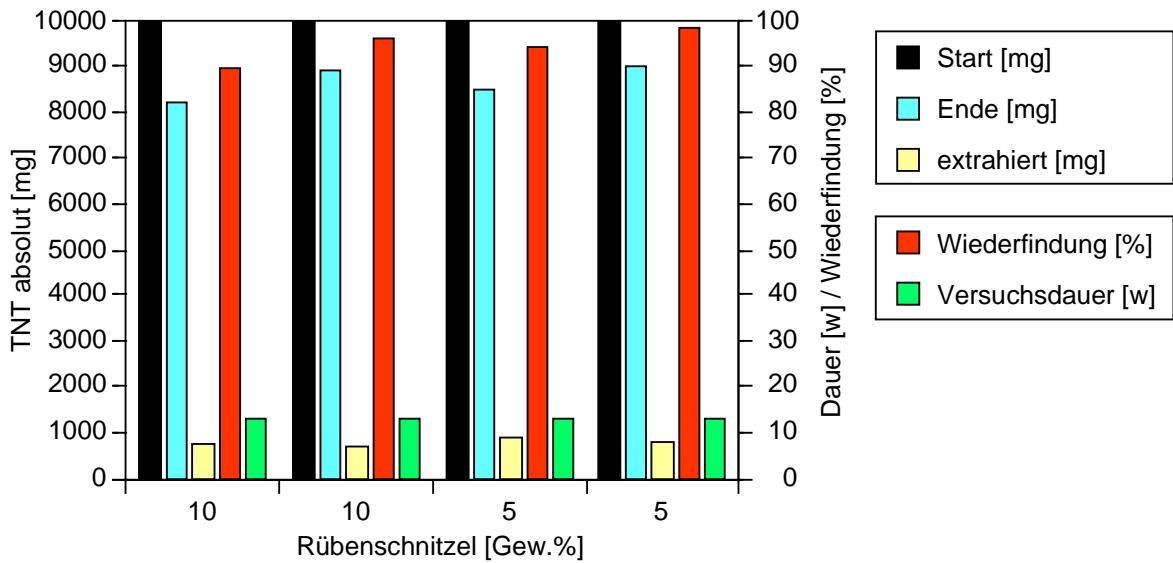


Abb. 4: Ergebnisse der Perkolation eines extrem (ca. 10 g TNT/kg TS) mit TNT kontaminierten Bodens mit 5 bzw. 10%iger Melasselösung. Der Versuch wurde nach 13 Wochen abgebrochen. Angabe von Mittelwerten aus drei Parallelen.

Ähnliche Resultate wurden auch bei der Perkolation eines hoch (ca. 2,5 g TNT/kg TS) mit TNT belasteten Bodens mit 10%iger Melasselösung beobachtet (Abb. 5). Auch hier wurden nur sehr geringe Extraktionsraten von etwa 30 bis 65 mg/w erzielt. Nach einer 24wöchigen Behandlungszeit waren im Schnitt 50 % des ursprünglich im Boden vorhandenen TNT in den Prozeßwässern nachweisbar. Die nachträglich durchgeführte Analyse des Bodenmaterials wies auf TNT-Restkonzentrationen von etwa 1200 mg TNT/kg TS hin. Eine Bilanzierung des Rest-TNT mit dem eluierten TNT (inkl. den teilreduzierten Produkten) gegenüber der Ausgangskonzentration war somit zu etwa 98 % möglich.

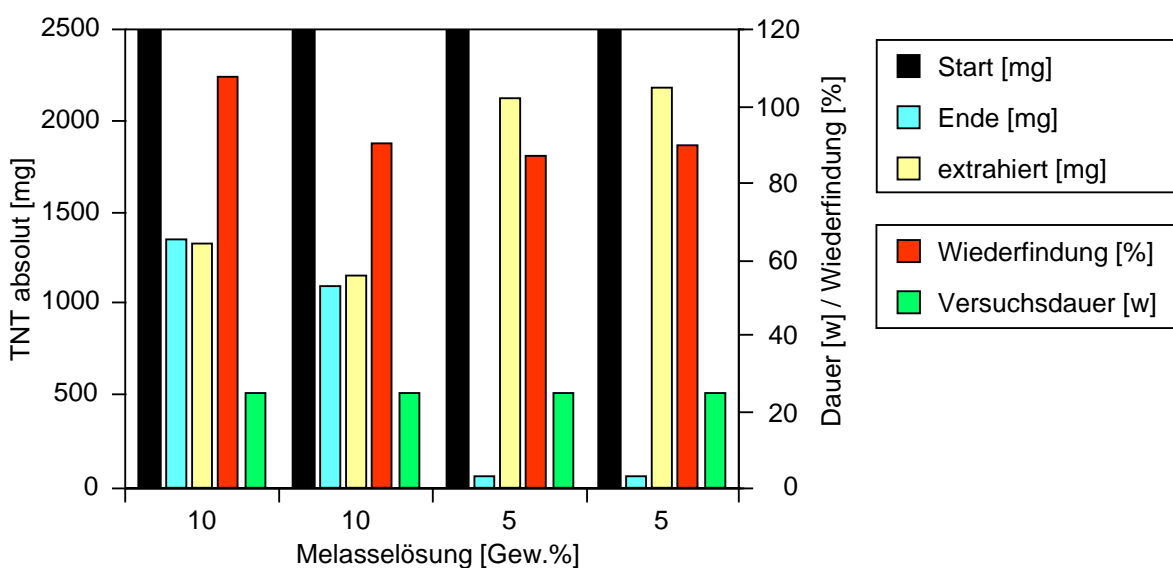


Abb. 5: Ergebnisse der Perkolation eines hoch (ca. 2,5 g TNT/kg TS) mit TNT kontaminierten Bodens mit 5 bzw. 10%iger Melasselösung. Angabe von Mittelwerten aus drei Parallelen.

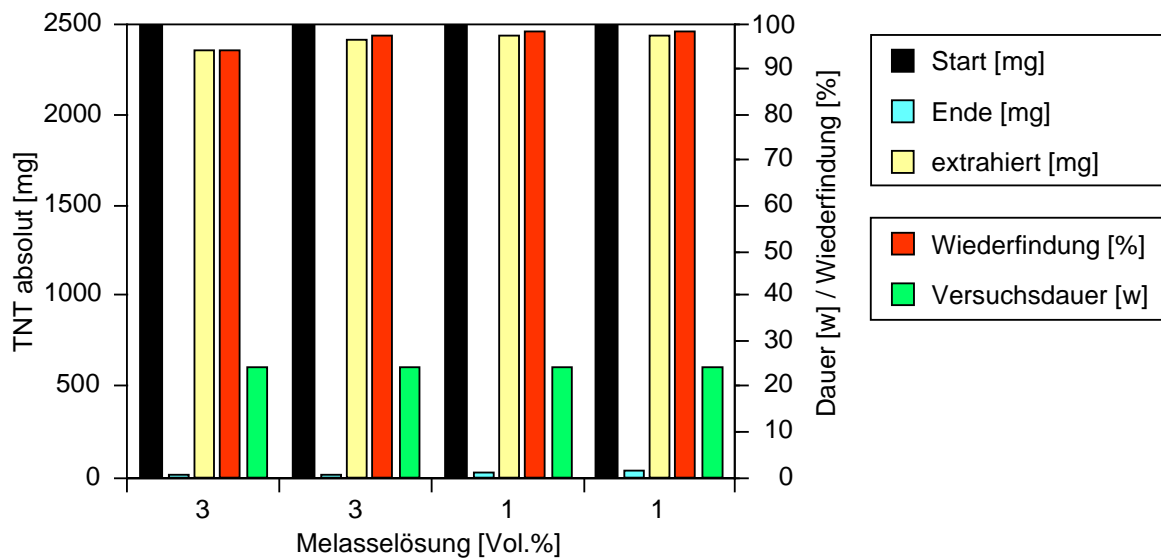


Abb. 6: Ergebnisse der Perkolation eines hoch (ca. 2,5 g TNT/kg TS) mit TNT kontaminierten Bodens mit 1 bzw. 3%iger Melasselösung. Angabe von Mittelwerten aus drei Parallelen.

Verglichen mit den Ergebnissen der Versuchsreihen mit geringeren Melassekonzentrationen scheint es in dem Fall mit 10%iger Melasselösung zu einer Inhibierung der Extraktion gekommen zu sein für die es jedoch keine logische Erklärung gibt.

Wesentlich bessere Ergebnisse auf die Effektivität des Verfahrens konnten jedoch in den Ansätzen mit 5%iger Melasselösung erreicht werden. Hier wurde das TNT auch in signifikanten Mengen in die teilreduzierten Produkte überführt und mit Raten von etwa 65 bis 85 mg/w aus dem Material eluiert. Nach 24wöchiger Behandlungszeit waren etwa 85 % des ursprünglich in dem Boden vorhandenen TNT in Form von TNT und den Aminodinitrotoluolen in den Prozeßwässern nachweisbar (Abb. 5). Die Wiederfindung lag hier jedoch nur bei etwa 88 %.

Die besten Ergebnisse wurden bei Verwendung von 1 bzw. 3 %iger Melasselösung als Waschlösung erreicht. Nach 24wöchiger Behandlungszeit konnten in dem Bodenmaterial nur noch wenige Milligramm an TNT wiedergefunden werden. In den Prozeßwässern konnten etwa 95 % (3 Vol.% Melasselösung) bzw. 98 % (1 Vol.% Melasselösung) des ursprünglich in dem Boden vorhandenen TNT im Form von TNT und den teilreduzierten Produkten des TNT nachgewiesen werden (Abb. 6). Die Wiederfindungen der vier Versuchsreihen lagen zwischen 94 und 98 %. Die Extraktionsraten lagen bei 95 bis 115 mg TNT/w.

Sehr schnell zum Scheitern verurteilt waren die Extraktionsversuche mit festen Auxiliarsubstraten, die eigentlich auch die Funktion von Strukturverbesserern erfüllen sollten. Diese Experimente mußten bereits nach acht bzw. 10 Wochen abgebrochen werden, da die Extraktionsraten von etwa 100 mg TNT/w innerhalb von wenigen Extraktionszyklen gegen Null sanken. Zudem sind die festen, getrockneten Auxiliarsubstrate während der Behandlung extrem stark aufgequollen und haben die Perkolationssäulen verstopft bzw. gesprengt. Nach etwa 10 Wochen konnten bis zu 10 % des ursprünglich in dem Bodenmaterial vorhandenen TNT in den Eluaten nachgewiesen werden (Abb. 7 und Abb. 8). Die Wiederfindungen bei

diesen Experimenten lagen mit nur 65 bis 85 % in einem ungünstigen Bereich. Aus diesem Grunde wurde auf weitere Versuche mit festen Auxiliarsubstraten verzichtet.

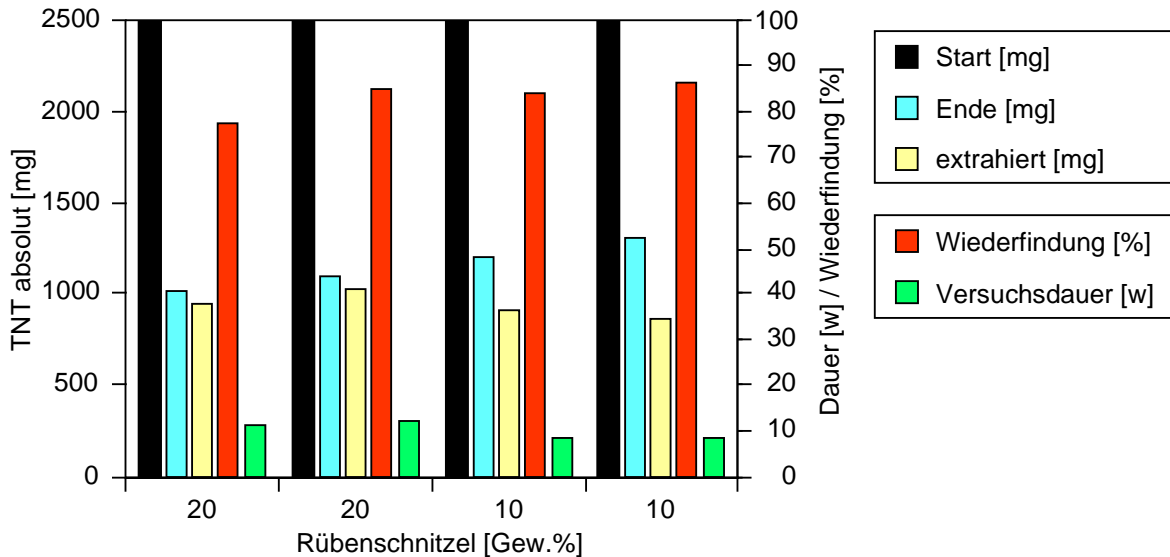


Abb. 7: Ergebnisse der Perkolations eines hoch (ca. 2,5 g TNT/kg TS) mit TNT kontaminierten Bodens, dem 10 bzw. 20 Gew.% Rübenschnitzel als Auxiliarsubstrat und Strukturverbesserer zugefügt wurden. Angabe von Mittelwerten aus drei Parallelen.

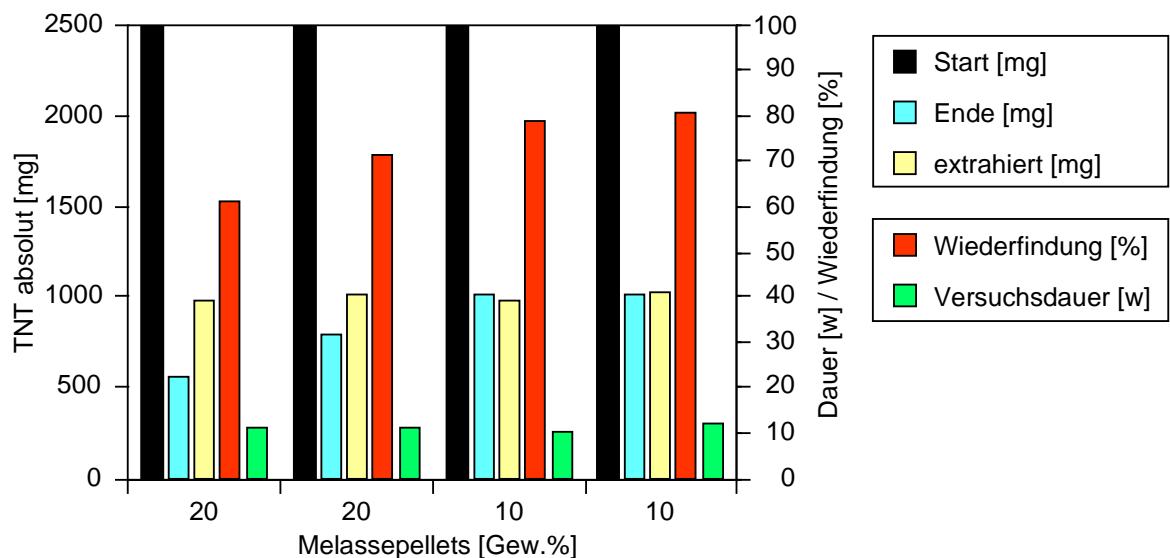


Abb. 8: Ergebnisse der Perkolations eines hoch (ca. 2,5 g TNT/kg TS) mit TNT kontaminierten Bodens, dem 10 bzw. 20 Gew.% Melassepellets als Auxiliarsubstrat und Strukturverbesserer zugefügt wurden. Angabe von Mittelwerten aus drei Parallelen.

Auch durch die Zugabe von Strohhäckseln konnte das Verstopfen der Versuchsaufbauten bei der Verwendung fester Auxiliarsubstrate nicht verhindert werden (nicht dargestellt).

Die Experimente mit unterschiedlichen Mengen an Strohhäckseln sind hier ebenfalls nicht graphisch dargestellt, da die Ergebnisse weitestgehend denen in der Abbildung 6 (Perkolation mit 1 bzw. 3%iger Melasselösung) entsprechen. Erwähnenswert ist jedoch die Tatsache, daß bei der Verwendung von Strohhäckseln als Strukturverbesserer wesentlich häufigere Extraktionszyklen möglich waren. Wurden die Eluate jedoch häufiger aus den Perkolationssäulen abgezogen und neue Waschlösung zugeführt kam es sehr schnell (nach der dritten Abnahme) zu einer signifikanten Abnahme der Konzentration an TNT und erst recht den teilreduzierten Produkten des TNT in den Prozeßwässern. Die Effektivität der Bodenwäsche ist somit deutlich von der Verweilzeit der Waschlösung in dem Bodenmaterial abhängig. Die besten Resultate hinsichtlich der Reduktionsraten wurden bei einer durchschnittlichen Verweilzeit von drei bis vier Tagen erreicht. Dies entspricht in etwa auch den Verweilzeiten, wie sie bei den anderen Perkolationsexperimenten (s.o.) angewendet wurden.

Auf die Ergebnisse mit den Boden-Suspensionsreaktoren soll hier nicht näher eingegangen werden, da diese selbst nach mehrfachen Anpassungen und Modifikationen zu keinem zufriedenstellendem Ergebnis führten. Ein Großteil des in dem Bodenmaterial vorhandenen TNT (ca. 70 %) wurde zunächst in die wäßrige Phase überführt und ebenfalls zu den teilreduzierten Produkten umgesetzt. Eine weitergehende Extraktion des TNT war nicht möglich, da offensichtlich gar kein TNT mehr in dem Bodenmaterial vorhanden war. Somit ergibt sich eine Bilanzierungslücke von mindestens 30 %, was gegen den Einsatz einer solchen Methode spricht. Zudem wurden bei diesen Experimenten erhebliche Materialzerstörungen verzeichnet.

Aus den genannten Ergebnissen wird zusammenfassend deutlich, daß die Extraktion von TNT aus Boden lediglich durch die Verwendung flüssiger Auxiliarsubstrate beschleunigt werden konnte. Bei der Verwendung fester Auxiliarsubstrate konnte zwar zunächst ein gesteigerter Umsatz des TNT in die teilreduzierten Produkte beobachtet werden, eine Beschleunigung des Prozesses konnte hier jedoch nicht erreicht werden. Durch das Aufquellen der Substrate während der Perkolation verstopften die Bodensäulen bereits nach wenigen Tagen und die Experimente konnten nicht weiter durchgeführt werden.

Eine nahezu vollständige Bilanzierung der ursprünglich in dem Bodenmaterial vorhandenen Menge an TNT gegenüber der eluierten Menge (Summe TNT und teilreduzierte Produkte) war nur bei dem Einsatz von 1 bzw. 3 %iger Melasselösung möglich. Die Gründe für die geringeren Wiederfindungsraten bei den anderen genannten Untersuchungen sind nicht ermittelt worden. Es liegt jedoch nahe, daß in diesen Fällen das Redox-Potential in den Perkolationssäulen durch mikrobielle Stoffwechselaktivitäten stark negativ wurde und dadurch Produkte gebildet wurden, die mehr oder weniger spontan mit Bodenbestandteilen interagierten (z.B. das TAT) und sich somit der zur Verfügung stehenden Analytik entziehen konnten.

In weiteren Experimenten wurde mit Miniatur-Versuchsaufbauten untersucht, wie sich die Verwendung von verschiedenen Tensiden (als Lösungsvermittler) und Harnstoff (als "Verdränger" von Adsorptionsplätzen) auf die Extraktionsraten auswirken. Die in den nachfolgenden Abbildungen aufgeführten Kontrollen wurden wie in den Perkolationsexperimenten mit Leitungswasser perkoliert. Die entsprechenden Konzentrationen der Tenside und des Harnstoffs wurde anhand von Hinweisen aus der Literatur über die Bodenwäsche von PAK-belasteten Böden gewählt. In einer Arbeit zur Bodenwäsche von TNT-kontaminierten Böden ist gezeigt worden, daß durch die Verwendung sehr hoher Konzentrationen (mehr als

10 Vol.%) an Tensiden eine beschleunigte Extraktion der Zielsubstanz erreicht werden kann [10]. Aus wirtschaftlichen Überlegungen heraus wurde jedoch auf die Verwendung solcher großer Mengen verzichtet.

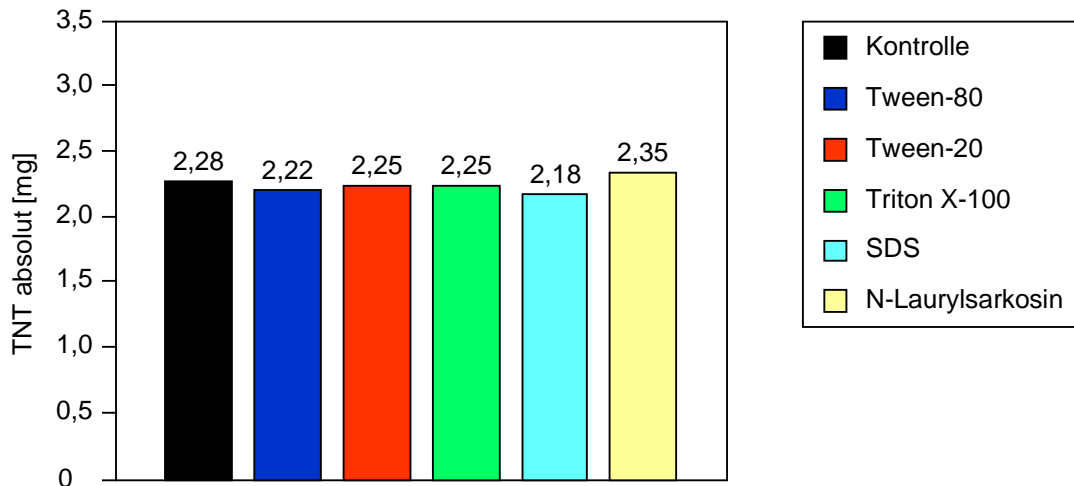


Abb. 9: Einfluß verschiedener Tenside (Einsatzkonzentration: 0,1%ig) auf die Extraktion von TNT aus kontaminiertem Boden. Darstellung von Mittelwerten aus drei Parallelen von zwei Versuchsreihen.

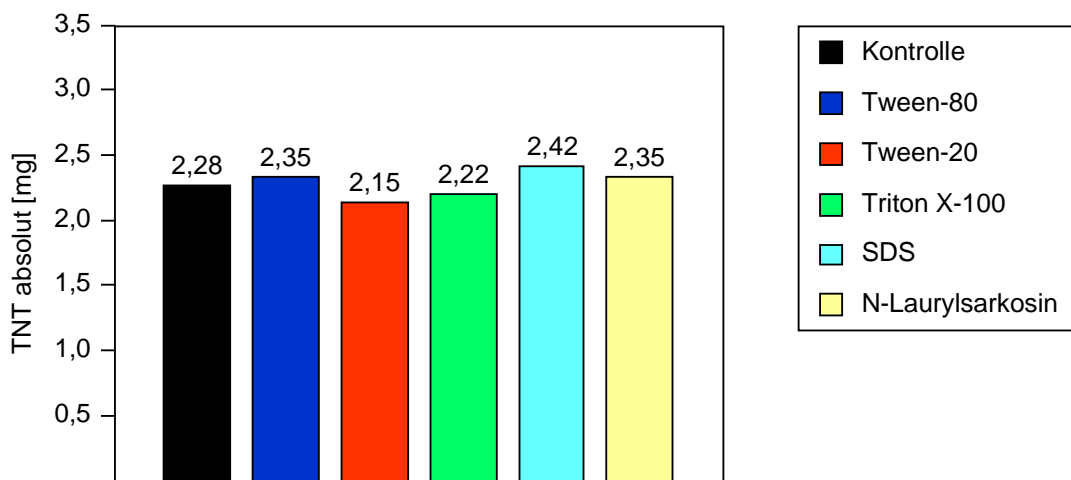


Abb. 10: Einfluß verschiedener Tenside (Einsatzkonzentration: 0,05%ig) auf die Extraktion von TNT aus kontaminiertem Boden. Darstellung von Mittelwerten aus drei Parallelen von zwei Versuchsreihen.

Aus den Abbildungen 9 und 10 wird deutlich, daß sich nach 10 Extraktionszyklen im Vergleich zu den Kontrollexperimenten keine Unterschiede in den untersuchten Ansätzen feststellen ließen. Der Einsatz von Tensiden in den getesteten Konzentrationsbereichen hat demnach weder einen fördernden noch einen hemmenden Einfluß auf die Effektivität des Prozesses. Interessant ist in diesem Zusammenhang vielleicht noch die Beobachtung, daß in

den gewonnenen Eluaten keine Produkte des mikrobiellen TNT-Umsatzes nachgewiesen werden konnten (Inhibierung der Biologie?).

Auch die Verwendung von Harnstoff (mit dem sich an anorganisches Material adsorbierte organische Verbindungen wie z.B. Pestizide von den Adsorptionsplätzen verdrängen lassen können [2]) hatte keinen Einfluß auf die Effektivität des Perkolationsprozesses. Bei der Verwendung von 0,5 Gew.% Harnstoff konnte vielmehr, verglichen mit allen anderen Ansätzen, eine Abnahme der Extraktionsrate verzeichnet werden (s. Abb. 11).

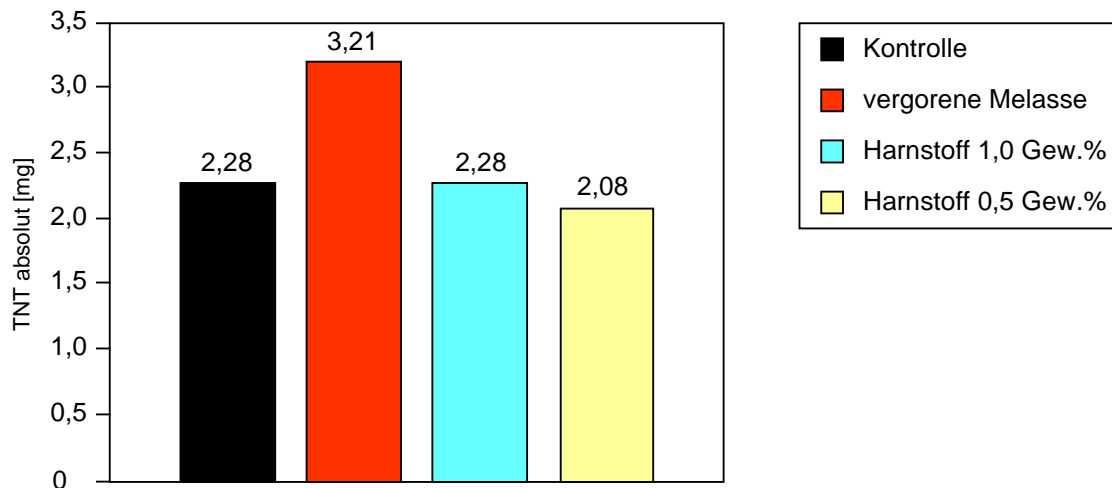


Abb. 11: Einfluß von Harnstoff und vergorener Melasselösung auf die Extraktion von TNT aus kontaminiertem Boden. Darstellung von Mittelwerten aus drei Parallelen von zwei Versuchsreihen.

Eine signifikante Steigerung der Extraktion konnte jedoch bei dem Einsatz von durch Bäckerhefe vergorene Melasselösung gemessen werden. In diesen Versuchsreihen wurden etwa 40 % mehr TNT aus dem Boden eluiert als in den Kontrollansätzen oder den Ansätzen mit Tensiden und Harnstoff. Die gesteigerte Extraktion ist vermutlich auf den Ethanol-Gehalt (ca. 3 Vol.%) der vergorenen Melasselösung zurückzuführen. Die Vergärung einer Melasselösung durch Bäckerhefe gestaltete sich als unproblematisch. Eine Kontamination mit Bakterien, die den Ethanol bzw. den eventuell vorhandenen Restzucker der Melasse metabolisieren können, wurde nicht beobachtet.

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß bei einer "Wäsche" TNT-kontaminierten Bodens wegen oben genannter Befunde und aus Gründen der Wirtschaftlichkeit auf die Verwendung von Tensiden als Lösungsvermittlern zu verzichten ist. Auch die Verwendung von Harnstoff hat keinen fördernden Effekt auf den Prozeß. Interessant ist jedoch der Einsatz von durch Hefen vergorener Melasselösung. Hier müßte jedoch noch geprüft werden inwieweit sich die Herstellung einer solchen "Waschlösung" technisch realisieren läßt.

4.2 Behandlung der anfallenden Prozeßwässer

Für die Aufbereitung der in dem beschriebenen Verfahren anfallenden Prozeßwässer sind zwei Variationen eingehender untersucht worden. Zum einen wurden Möglichkeiten zur

biologischen Behandlung (anaerob – aerob) in Betracht gezogen, zum anderen wurden die Wässer an das ISFH für eine photochemische Aufarbeitung weitergeleitet.

4.2.1 Biologische Abwasserbehandlung

Es konnte gezeigt werden, daß sich die Inhaltsstoffe der bei der mikrobiell unterstützten Bodenwäsche anfallenden Prozeßwässer (TNT und teilreduzierte Produkte) leicht in einem Bioreaktor unter anoxischen Bedingungen in das sehr reaktive TAT überführen lassen. Eine Voraussetzung ist lediglich das Vorhandensein einer geeigneten Kohlenstoff- und Energiequelle (z.B. Melasse) sowie einer geeigneten Mikroflora (z.B. *Clostridium*-Spezies).

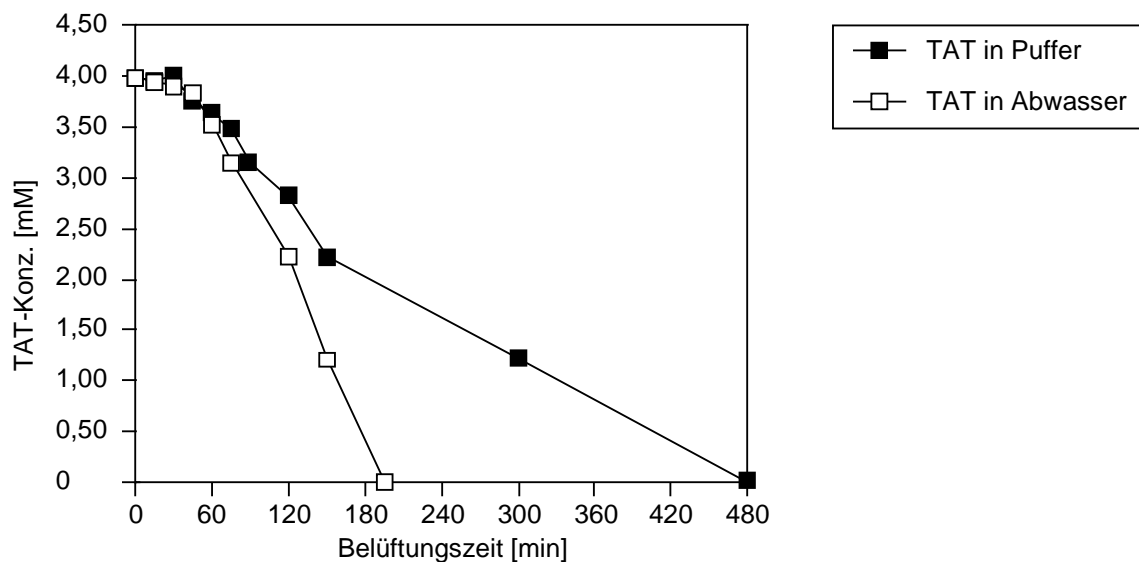


Abb. 12: Elimination von TAT aus einem Prozeßwasser bzw. einem Puffer durch intensive Belüftung mit Luftsauerstoff.

Das TAT läßt sich anschließend beispielsweise durch die Belüftung in einem nachgeschalteten Bioreaktor unter oxischen Bedingungen zu einem Polymerisat kondensieren, das z.B. durch Adsorption oder Sedimentation von der wäßrigen Phase getrennt werden kann (s. Abb. 12). Die gewonnenen Sedimente bzw. das entsprechende Trägermaterial sind anschließend von der wäßrigen Phase zu trennen und einer angemessenen Entsorgung (z.B. Verbrennung) zuzuführen.

Alternativ zu der genannten physiko-chemischen, ebenfalls mikrobiell unterstützten, Aufbereitung der Prozeßwässer könnten rein mikrobiell vermittelte Mechanismen des weitergehenden Abbaus von TAT zum Recycling der Prozeßwässer verwendet werden. Auf diesen Aspekt wird weiter unten in dem Abschnitt 4.3 dieses Beitrages eingehender eingegangen.

4.2.2 Photochemische Abwasserbehandlung

Ein sehr effektives und auch schon im technischen Maßstab erprobtes Verfahren zur Aufbereitung von Prozeßwässern, die mit TNT und dessen teilreduzierten Produkten kontaminiert sind, beruht auf der Photo-Fenton-Reaktion oder der Photooxidation. Dieses wurde vom ISFH entwickelt. Eingehende Informationen zur photochemischen Behandlung von Wässern aus Rüstungsaltlasten sollten daher dem entsprechenden Beitrag in diesem Leitfaden (s. TV 3.1.3, Kapitel 9.2.4 des Leitfadens) bzw. dem Abschlußbericht des Projektpartners entnommen werden.

An dieser Stelle sei jedoch noch darauf hingewiesen, daß sich das genannte Verfahren nur für nicht gefärbte bzw. nur leicht gefärbte und vor allem nicht getrübe Prozeßwässer eignet. Die bei dem oben genannten Verfahren anfallenden Wässer sind demnach gut für das photochemische Verfahren geeignet. Wird jedoch Melasselösung als Waschlösung eingesetzt, kann es z.B. bei nur unvollständigem Umsatz der Melasse oder durch Wachstum von Bakterien in den Eluaten zur Trübung des Wassers kommen. Wie eben beschrieben können diese in einem herkömmlichen Bioreaktorverfahren, welche standardmäßig in kommunalen Kläranlagen eingesetzt werden, weiter aufbereitet werden.

4.3 Metabolismus von TNT bzw. TAT

Während der Untersuchungen zur biologischen Aufbereitung der anfallenden Prozeßwässer und im Rahmen der Experimente zum Abbau von TNT bzw. TAT durch mikrobielle Reinkulturen anaerober Bakterien wurde schon in der ersten Projektphase deutlich, daß das als Zentralintermediat bei der anaeroben Metabolisierung von TNT auftretende TAT durch fermentierende Bakterien (*Clostridium*-Spezies) weiter umgesetzt wird. Ziel dieser Untersuchungen war daher den Abbauweg bzw. die Abbaumechanismen weiter zu charakterisieren.

Die ersten Hinweise auf einen mikrobiellen Abbau des TAT wurden mit Spezies der Gattung *Clostridium* erhalten, die aus dem Standortmaterial isoliert wurde. Das Isolat wurde charakterisiert und anhand von 16S-rRNA-Analysen als das nicht-humanpathogene *Cl. butyricum* identifiziert. Da in diesen Fällen lediglich das "Verschwinden" des TAT, unter intermediärer Bildung von zwei Metaboliten, beobachtet werden konnte und der Abbau-mechanismus wegen analytischer Schwierigkeiten nur unzureichend aufgeklärt werden konnte, wurde der Einsatz dieser Mikroorganismen in einem Bioreaktorverfahren zur Aufbereitung der Prozeßwässer aus der "Bodenwäsche" später nicht weiter untersucht. Interessant ist in diesem Zusammenhang jedoch die Tatsache, daß dieser Organismus in Kläranlagen gefunden werden und überleben kann und daß der Organismus Bestandteile der Melasse als Kohlenstoff- und Energiequelle für einen cometabolischen Umsatz von TAT nutzen kann.

Deutlichere Hinweise auf den Mechanismus des anaeroben mikrobiellen Abbaus von TAT wurden jedoch mit einem Stamm der Gattung *Pelobacter* (*Pelobacter acidigallici*) erhalten. Dieser Stamm ist wie der Typenstamm in der Lage verschiedene aromatische Verbindungen zu vergären. Nach bisherigen Erkenntnissen ist dieser Organismus in der Lage das TAT cometabolisch unter Freisetzung von Ammonium, welches als Stickstoffquelle verwertet wird, abzubauen. Der cometabolische Umsatz von TAT mit Phloroglucin als Wachstumssubstrat erfolgte vollständig. Geringere Umsatzraten wurden bei Verwendung von Gallussäure als

Kohlenstoff- und Energiequelle gemessen. Erstaunlicherweise wurde das TAT durch diesen Organismus nicht umgesetzt, wenn das als Zentralintermediat vorgeschlagene Methylphloroglucin als Kohlenstoff- und Energiequelle angeboten wurde.

Während des Abbaus von TAT konnte Ammonium in signifikanten Mengen in dem Medium nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der in den entsprechenden Kontrollansätzen für das Wachstum verbrauchten Menge an Ammoniumionen ergibt sich im Mittel eine Freisetzung von mehr als zwei Mol Ammoniumionen pro Mol TAT.

Zudem konnte während der flüssigchromatographischen Analyse des Kulturüberstandes die intermediäre Bildung geringer Mengen eines Metaboliten registriert werden, der nur bei Zugabe von TAT zu beobachten war. Laut Dr. K. Steinbach vom Fachbereich Chemie der Universität Marburg war die Identität der Verbindung nur schwer zu charakterisieren, es handelte sich dabei jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit um eine Verbindung mit der Massenzahl m/z 140.

Der Versuch das erhaltene Massenspektrum mit denen verschiedener Referenzsubstanzen zu vergleichen schlug fehl, da die Spektren in Frage kommender Referenzen nicht verfügbar waren. Es gibt jedoch mehrere Indizien für die Identität des Metaboliten. Zum einen konnten von einer amerikanischen Arbeitsgruppe bei der sauren Hydrolyse von TAT Hydroxydiamino- und Dihydroxyaminotoluole als Abbauprodukte nachgewiesen werden [5]. Diese weisen im protonierten Zustand (entsprechend der Ionisierungsmethode für die Detektion im Massenspektrometer) eine Massenzahl von m/z 140 auf. Zudem ließ sich das in der entsprechenden Publikation dargestellte Chromatogramm mit den in unseren Untersuchungen erhaltenen Chromatogrammen vergleichen. In beiden Fällen hatten die entsprechenden Peaks ähnliche Retentionszeiten.

Aus den oben genannten Erkenntnissen und den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen (mit z.B. *Clostridium*-Spezies) zum anaeroben mikrobiellen Abbau von TAT sowie den bekannten Abbaumechanismen des TNT unter anaeroben Bedingungen wurde das in der Abbildung 13 dargestellte Modell zum mikrobiellen Abbau von TNT vorgeschlagen.

Anmerkungen: TAT kann von diesem Stamm auch als alleinige Kohlenstoff-, Energie- und Stickstoffquelle verwertet werden, jedoch konnten hier nur relativ geringe Umsatzraten gemessen. Wie in späteren Untersuchungen gezeigt werden konnte, kommt es unter den genannten Bedingungen vermutlich durch die Bildung von 2,4,6-Trihydroxytoluol (Methylphloroglucin, MPG) als ein Intermediat zu einer Inhibierung des Enzymsystems, das für den Abbau des TAT verantwortlich ist. Ein ähnliches Phänomen konnte beobachtet werden, wenn MPG als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle angeboten wurde. Das Wachstum des Stammes kam zum Erliegen nachdem erst ca. 50 % des Substrates umgesetzt worden waren.

Inwieweit sich die Verwendung dieses Organismus für eine mikrobiologische Aufbereitung der bei dem Extraktionsverfahren anfallenden Prozeßwässer eignet, bleibt ebenfalls noch zu prüfen. Erstens müßten die Bestandteile der Prozeßwässer (TNT und teilreduzierte Produkte) zunächst zum TAT umgewandelt werden, da der Organismus empfindlich auf die Gegenwart von Nitroaromaten reagierte, und zweitens muß geprüft werden, ob es phloroglucin-haltige Abwässer aus der chemischen Industrie gibt, die für das Wachstum des genannten Organismus geeignet sind.

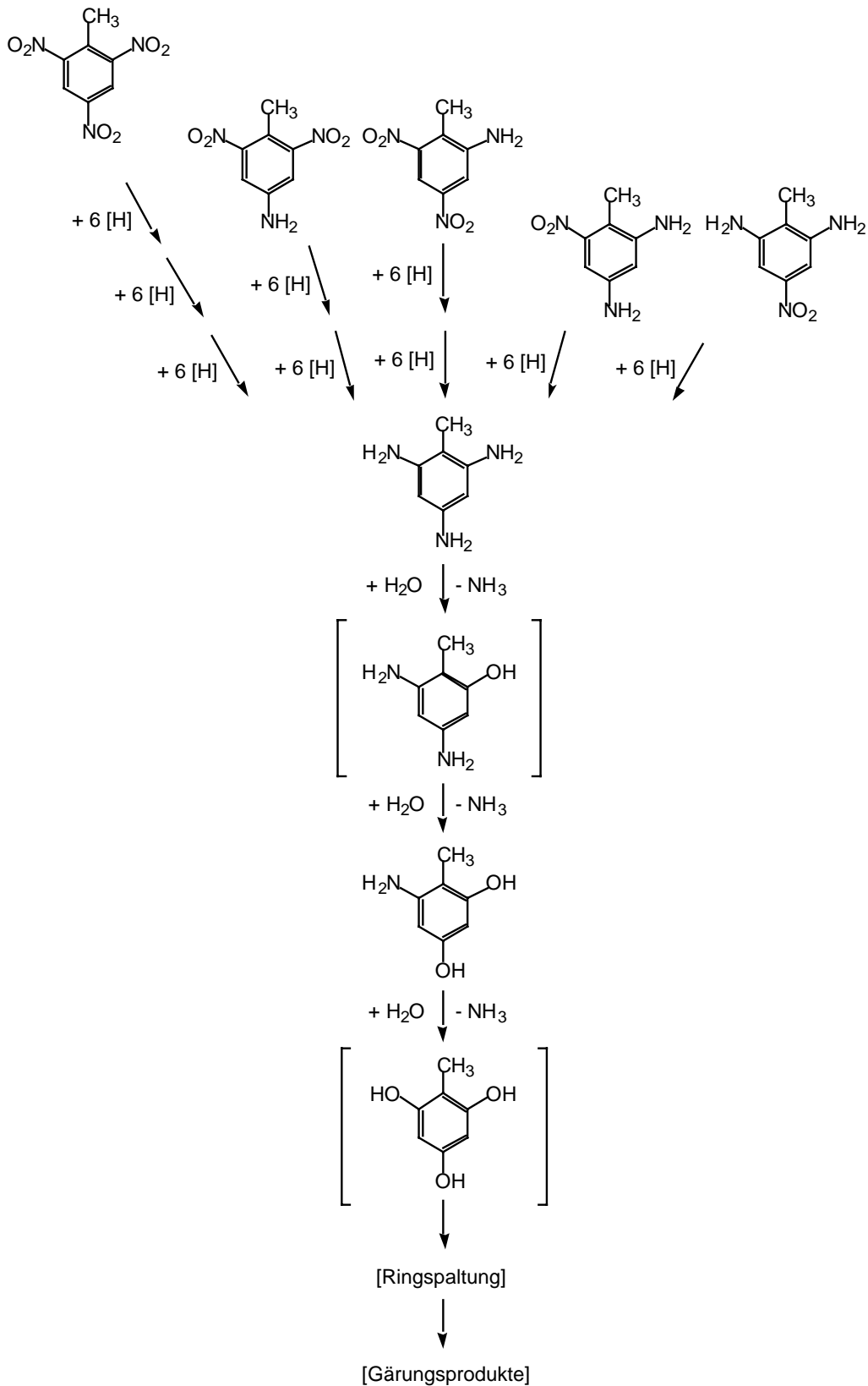


Abb. 13: Vorschlag eines Schemas zum anaeroben mikrobiellen Abbau von TNT und Umwandlungsprodukten über TAT und 2,4-Dihydroxy-6-aminotoluol als Intermediaten.

4.4 Toxikologische Untersuchungen

Das Bodenmaterial, welches mit dem oben beschriebenen Verfahren auf eine TNT-Restkonzentration von 0 bis 5 % der ursprünglich in dem Material vorhandenen Menge an TNT gereinigt werden konnte, wurde in zwei verschiedenen Testsystemen toxikologisch charakterisiert. Während das Bodenmaterial für die Herstellung von Eluaten für den Leuchtbakterien-Hemmtest (DIN 38412 Teil 34) nicht weiter aufbereitet werden mußte, war vor der Durchführung des "Kressetests" eine etwa drei- bis vierwöchige Nachbehandlung an der Luft notwendig. In dieser Zeit wurde der Boden regelmäßig durchmischt und Fäulnisprodukte (Geruch!) durch aerobe Mikroorganismen sowie Pilze abgebaut.

In Abhängigkeit von der anfänglichen TNT-Konzentration der behandelten Bodenmaterialien (ca. 2,5 bzw. 10 g TNT/kg TS Boden) konnte in den verwendeten Toxizitätstests eine unterschiedliche Reaktion der Testorganismen beobachtet werden.

Tab. 1: Ermittlung des toxikologischen Potentials des unbehandelten, des behandelten sowie eines Kontrollbodens im Leuchtbakterien-Hemmtest (G_L -Werte).

Einsatzstoff	Versuchsbeschreibung	TNT [mg/kg]	GL-Wert
Boden I, unbehandelt	Kontrolle 1, 2 Parallelen	ca. 10.000	464
Boden II, unbehandelt	Kontrolle 2, 2 Parallelen	ca. 2.500	456
Boden III	Kontrolle 3, 2 Parallelen	n.n.	2

Boden II, behandelt	v411el01 - ela02-3	55,2	8
	v411el01 - ela02-4	31,6	4
	v411el01 - ela02-5	2,5	1
	v411el01 - ela02-6	5,8	1
	v411el01 - ela02-7	18,1	1
	v411el01 - ela02-8	28,9	2

Boden I, behandelt	v422el01 - elv01-1	286	218
	v422el01 - elv01-2	416	300
	v422el01 - elv01-3	312	200
	v422el01 - elv01-4	335	212
	v422el01 - elv01-5	466	300
	v422el01 - elv01-6	255	256

Boden I: kontaminierter Boden vom Standort Werk "Tanne" (TNT: c = 10.000 mg/kg), der in den Perkolationsexperimenten eingesetzt wurde.

Boden II: kontaminierter Boden vom Standort Werk "Tanne" (TNT: c = 2.500 mg/kg), der in den Perkolationsexperimenten eingesetzt wurde.

Boden III: unkontaminierter Boden vom Standort Werk "Tanne"

n.n.: nicht nachweisbar

Im Leuchtbakterien-Hemmtest (vergleiche Tabelle 1) war nur Bodenmaterial mit einer Start-Konzentration von etwa 2,5 g TNT/kg TS, welches auf Restkonzentrationen von etwa 2 bis 55 mg TNT/kg TS dekontaminiert werden konnte, als nicht-toxisch einzustufen. Das mit

10 g TNT/kg TS belastete Bodenmaterial war im Gegensatz dazu nach Durchführung dieses Tests nach wie vor als sehr-toxisch einzustufen. Der Grund für diese Beobachtung liegt vermutlich in der Vorbereitung des Bodenmaterials für die Herstellung der entsprechenden Eluate. Durch das Trocknen und Homogenisieren des Materials wurde (partikulär vorliegendes?) TNT wieder verfügbar, welches mit dem oben genannten Verfahren nach einem Vorgang nicht mehr extrahiert werden konnte.

Das toxische Potential des Kontrollbodens III, welcher ebenfalls vom Standort Werk "Tanne" stammte und nachweislich nicht mit TNT und anderen Nitroaromaten belastet war, ist vermutlich auf die Gegenwart anderer toxischer Produkte wie z.B. PAK's und/oder Schwermetallen zurückzuführen, die an verschiedenen Stellen des Geländes nachgewiesen werden konnten. Der Kontrollboden III ist jedoch nicht auf diese Parameter hin analysiert worden.

Tab. 2: Ermittlung des toxikologischen Potentials des unbehandelten, des behandelten sowie eines Kontrollbodens im Kressetest (Gewicht der oberirdischen Pflanzenteile nach 7tägigem Wachstum).

Einsatzstoff	Versuchsbeschreibung	TNT [mg/kg]	Gewicht [g]
Boden I, unbehandelt	Kontrolle 1, 2 Parallelen	ca. 10.000	k.W.
Boden II, unbehandelt	Kontrolle 2, 2 Parallelen	ca. 2.500	k.W.
Boden III	Kontrolle 3	n.n.	4,2
Boden III	Kontrolle 4	n.n.	5,2

Boden II, behandelt	v411el01 - ela02-3	55,2	3,6
	v411el01 - ela02-4	31,6	4,8
	v411el01 - ela02-5	2,5	4,4
	v411el01 - ela02-6	5,8	3,9
	v411el01 - ela02-7	18,1	5,5
	v411el01 - ela02-8	28,9	4,8

Boden I, behandelt	v422el01 - elv01-1	286	4,5
	v422el01 - elv01-2	416	4,5
	v422el01 - elv01-3	312	3,8
	v422el01 - elv01-4	335	4,2
	v422el01 - elv01-5	466	5,0
	v422el01 - elv01-6	255	3,7

Boden I: kontaminierter Boden vom Standort Werk "Tanne" (TNT: c = 10.000 mg/kg), der in den Perkolationsexperimenten eingesetzt wurde.

Boden II: kontaminierter Boden vom Standort Werk "Tanne" (TNT: c = 2.500 mg/kg), der in den Perkolationsexperimenten eingesetzt wurde.

Boden III: unkontaminierter Boden vom Standort Werk "Tanne"

n.n.: nicht nachweisbar

k.W.: kein Wachstum

Im Gegensatz zu den Schlußfolgerungen aus dem Leuchtbakterien-Hemmtest konnten im "Kresstest" alle "erfolgreich" behandelten Böden verglichen mit den Kontrollböden als nicht-toxisch eingeschätzt werden (s. Tabelle 2).

5 Ausblick

Im Rahmen des hier vorgestellten Teilvorhabens wurde ein Verfahren zur Reinigung TNT-kontaminierter Böden entwickelt, das auf einer durch mikrobielle Stoffwechselaktivitäten geförderten Extraktion des Sprengstoffes aus dem Bodenmaterial beruht. Die Zielsubstanzen werden dabei (abiotisch und biotisch) zu wasserlöslicheren Produkten umgesetzt und diese letztlich in eine wäßrige Phase überführt, welche nach der Separation von dem Bodenmaterial entweder durch ein photochemisches oder ein biologisches Verfahren zu unbedenklichen Produkten aufbereitet werden kann. Problematisch war bislang lediglich die in manchen Fällen (Versuche mit extrem hoch belasteten Material; 10 g TNT/kg TS) wohl vorliegende, inhomogene Verteilung des TNT in Boden. Eine Homogenisierung von Bodenmaterial vom Standort Werk "Tanne" gestaltete sich auch im großtechnischen Maßstab bei Anwendung üblicher Verfahren (Brechen) als nur selten realisierbar. Gegebenenfalls muß solches Material mehrfach perkoliert, homogenisiert und wieder perkoliert werden.

Aus Gründen der Verfahrenskontrolle sollte auf die Verwendung von Auxiliarsubstraten verzichtet werden, auch wenn damit in einigen Fällen eine gesteigerte Elution der Zielsubstanzen aus dem Boden erreicht werden kann. Das sich in den Säulen einstellende Redoxpotential hat jedoch einen entscheidenden Einfluß auf die Bildung der Umwandlungsprodukte des TNT (vergl. auch die Untersuchungen mit den Boden-Suspensionsreaktoren). So kann es in Abhängigkeit von der Verweilzeit der Waschlösung in den Bodensäulen und der Verwertung von z.B. Melasse als Auxiliarsubstrat zur Bildung von TAT in dem Material kommen, das sich nur unvollständig aus dem Boden eluieren läßt. Dadurch wiederum kommt es zu den unerwünschten Bilanzierungslücken, die bei der Verwendung von Wasser als Waschlösung in keinem Fall beobachtet wurden.

Das bei dem für einen Labormaßstab beschriebenen Verfahrensansatz anfallende Prozeßwasser kann bis zu etwa 70 mg TNT/l und in geringeren Mengen die teilreduzierten Produkte des TNT (Aminodinitro- und Diaminonitrotoluole) enthalten und bedarf somit einer weitergehenden Aufbereitung. Dieses kann durch photochemische oder handelsübliche, biologische Verfahren erreicht werden.

Die Extraktion von Schadstoffen aus kontaminiertem Boden stellt unseres Erachtens nach eine gute Alternative zu den herkömmlichen (z.B. Verbrennung) bzw. den aktuell untersuchten (Kompostierung) Verfahren dar. Dies ist mit dem hier vorgestellten Verfahren möglich, auch wenn bislang der Versuch der Umsetzung in ein großtechnisch durchführbares Verfahren in einem Fall mißlungen ist.

6 Formeln und Abkürzungen

ADNT	Aminodinitrotoluol(e)
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
d	Tag(e)
DANT	Diaminonitrotoluol(e)
E_h	Redoxpotential
EC ₅₀	Stoffkonzentration, die 50 % eines maximal erreichbaren Effektes bewirkt
Fa.	Firma
g	Gramm, Fallbeschleunigung der Erde
Gew.%	Gewichtsprozent
GC	Gaschromatographie
h	Stunde
HPLC	high performance liquid chromatography
ISFH	Institut für Solarenergieforschung Hameln/Emmerthal, Außenstelle Hannover,
k.W.	kein Wachstum
l	Liter
λ	Wellenlänge
M	Molarität
m	meter
m-	milli-
μ -	mikro-
min	Minute
MPG	Methylphloroglucin
n.n.	nicht nachweisbar
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
R_t	Retentionszeit
Σ	Summe
s	Sekunde
TAT	2,4,6-Triaminotoluol

TNT	2,4,6-Trinitrotoluol
TS	Trockensubstanz
u.a.	unter anderem; und andere
UV	ultravioletter Spektralbereich des Lichtes
u.N.	unterhalb der Nachweisgrenze
VFA	volatile fatty acids (flüchtige, organische Fettsäuren)
VIS	sichtbarer Spektralbereich des Lichtes
Vol.%	Volumenprozent
w	Woche

7 Eigene Veröffentlichungen und Diplomarbeiten

Gorontzy, T., J. Küver, and K.-H. Blotevogel. 1993. Microbial transformation of nitroaromatic compounds under anaerobic conditions. *J. Gen. Microbiol.* **139**:1331-1336.

Gorontzy, T., O. Drzyzga, M.W. Kahl, D. Bruns-Nagel, J. Breitung, E. von Löw, and K.-H. Blotevogel. 1994. Microbial degradation of explosives and related compounds. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **20**:265-284.

Kleinschmidt, M. 1994. Abbau und Toxizität von ausgewählten Toluidinen unter sulfatreduzierenden und denitrifizierenden Bedingungen. Diplomarbeit. Universität Oldenburg.

Drzyzga, O., T. Gorontzy, A. Schmidt, and K.-H. Blotevogel. 1995. Toxicity of explosives and related compounds to the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **28**:229-235.

Neubauer, U. 1995. Adsorption und Desorption nitro- und aminoaromatischer Verbindungen an belebten und unbelebten Oberflächen am Beispiel von 2,6-Dinitrotoluol, 2-Amino-6-nitrotoluol und 2,6-Diaminotoluol. Diplomarbeit. Universität Oldenburg.

Kahl, M.W., T. Gorontzy, and K.-H. Blotevogel. 1996. Reinigung TNT-kontaminierter Böden durch anaerobe Prozeßführung. *gwf - Wasser/Abwasser* **137**:140-146.

Blotevogel, K.-H., T. Gorontzy, and M. Kahl. 1996. Biological treatment of TNT contaminated soils in anaerobic soil columns. In: W. Sand, G. Kreysa (ed.). *Biodeterioration and biodegradation: Papers of the 10th International Symposium on Biodeterioration and Biodegradation*, Hamburg, 15-18 September 1996 organized by DECHEMA, pp. 529-534. VCH-Verlag, Weinheim.

Gorontzy, T., M.W. Kahl, and K.-H. Blotevogel. 1996. Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene and its primary transformation products by *clostridia*. In: W. Sand, G. Kreysa (ed.). *Biodeterioration and biodegradation: Papers of the 10th International Symposium on Biodeterioration and Biodegradation*, Hamburg, 15-18 September 1996 / organized by DECHEMA, pp. 651-654. VCH-Verlag, Weinheim.

Neubauer, U., T. Gorontzy, M.W. Kahl, and K.-H. Blotevogel. 1996. Adsorption and desorption of nitro- and aminoaromatic compounds to mineral and organic surfaces. In: W. Sand, G. Kreysa (ed.). Biodeterioration and biodegradation: Papers of the 10th International Symposium on Biodeterioration and Biodegradation, Hamburg, 15-18 September 1996 / organized by DECHEMA, pp. 733-740. VCH-Verlag, Weinheim.

Blotevogel, K.-H., O. Drzyzga, and T. Gorontzy. 1997. Fate of nitroaromatics derived from explosives in anoxic environments, In: B.C. Alleman, and A. Leeson (ed.), In Situ and On-Site Bioremediation: Papers from the Fourth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium, New Orleans, April 28 - May 1, 1997, pp. 39-40. Battelle Press, Columbus, Ohio, USA.

Gorontzy, T., T. Raber, D. Bruns-Nagel, O. Drzyzga, and K.-H. Blotevogel. 1997. Transformation of the explosive TNT by *clostridia*, In: B.C. Alleman, and A. Leeson (ed.), In Situ and On-Site Bioremediation: Papers from the Fourth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium, New Orleans, April 28 - May 1, 1997, pp. 49-52. Battelle Press, Columbus, Ohio, USA.

Raber, T. 1997. Transformation und Modifikation von aminierten Aromaten durch das sulfatreduzierende Bakterium *Desulfobacula toluolica*, Diplomarbeit, Universität Oldenburg.

Gorontzy, T. 1998. Untersuchungen zur biologischen Sanierung von Rüstungsaltslasten, Cuvillier Verlag, Göttingen.

Raber, T., T. Gorontzy, M. Kleinschmidt, K. Steinbach, and K.-H. Blotevogel. 1998. Anaerobic degradation and transformation of *p*-toluidine by the sulfate-reducing bacterium *Desulfobacula toluolica*. Curr. Microbiol. **37**:172-176.

Blotevogel, K.-H., and T. Gorontzy. 1999. Microbial degradation of compounds with nitro-functions, *Biotechnology Vol. 11b*, VCH-Wiley, Weinheim. (Im Druck)

Carstens, A., T. Gorontzy, O. Drzyzga, D. Bruns-Nagel, E. von Löw, and K.-H. Blotevogel. 1999. Transformation and degradation of 2,4,6-triaminotoluene by the anaerobic bacterium *Pelobacter acidigallici*, Arch. Microbiol. (In Vorbereitung)

Gorontzy, T., O. Drzyzga, D. Bruns-Nagel, E. von Löw, and K.-H. Blotevogel. 1999. Microbially supported washing of soil contaminated with the explosive 2,4,6-trinitrotoluene and recycling of process waters, Environ. Sci. Technol. (In Vorbereitung)

Gorontzy, T., G. Sagawe, R. Dillert, D.W. Bahnemann, und K.-H. Blotevogel. 1999. Reinigung sprengstoff-kontaminierter Böden, Chemie-Ingenieur-Technik, VCH-Wiley, Weinheim. (In Vorbereitung)

8 Literaturverzeichnis

1. **DEV.** 1974 ff. Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker in Gemeinschaft mit dem Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.; Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung: physikalische, chemische, biologische und bakteriologische Verfahren, VCH, Weinheim.

2. **Flemming, H.-K.** 1997. Persönliche Mitteilung.
3. **Gorontzy, T., O. Drzyzga, M. W. Kahl, D. Bruns-Nagel, J. Breitung, E. von Löw, and K.-H. Blotevogel.** 1994. Microbial degradation of explosives and related compounds. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **20**:265-284.
4. **Haas, R.** 1992. Konzepte zur Untersuchung von Rüstungsaltslasten, Erich Schmidt Verlag, Berlin.
5. **Hawari, J., A. Halsz, L. Paquet, E. Zhou, B. Spencer, G. Ampleman, and S. Thiboutot.** 1998. Characterization of metabolites in the biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene with anaerobic sludge: role of triaminotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 2200-2206.
6. **Kahl, M. W., T. Gorontzy, and K.-H. Blotevogel.** 1996. Reinigung TNT-kontaminierter Böden durch anaerobe Prozeßführung. *gwf - Wasser/Abwasser* **137**:140-146.
7. **Kreysa, G., and J. Wiesner.** 1995. Biologische Testmethoden für Böden / Ad-hoc-Arbeitsgruppe Methoden zur toxikologischen/ökotoxikologischen Bewertung von Böden, DECHEMA e.V., Frankfurt.
8. **Öhlinger, R.** 1993. Bestimmung der Acidität, p. 346. *In* F. Schinner, R. Öhlinger, E. Kandeler, and R. Margesin (eds.), *Bodenbiologische Arbeitsmethoden*. Springer-Verlag, Berlin.
9. **Rieger, P. G., and H.-J. Knackmuss.** 1995. Basic knowledge and perspectives on biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene and related nitroaromatic compounds in contaminated soil, p. 1-18. *In* J. C. Spain (ed.), *Biodegradation of nitroaromatic compounds*, vol. 49. Plenum Press, New York.
10. **Taha, M. R., I. H. Soewarto, Y. B. Acar, R. J. Gale, and M. E. Zappi.** 1997. Surfactant enhanced desorption of TNT from soil. *Water, Air, Soil Poll.* **100**:33-48.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.2 Verbundvorhaben 3: Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten

9.2.4 Nasschemische Behandlung von TNT-belasteten Prozesswässern (TV 3.1.3)

Dr. Ralf Dillert

Gerd Sagawe
Detlef Bahnemann

Institut für Solarenergieforschung GmbH Hameln/Emmerthal
Aussenstelle Hannover
Sokelantstraße 5
30165 Hannover

Förderkennzeichen: 14507911

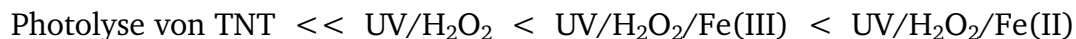
Laufzeit: 01.06.1996 - 31.03.1999

1 Zusammenfassung und Zielsetzung

Die Extraktion von Nitroaromaten und deren biotischen und abiotischen Transformationsprodukten (hauptsächlich Aminoaromate) aus belasteten Böden mit Wasser oder wässrigen Lösungen wird zur Zeit intensiv untersucht [2; 3; 4; 13; 16; 18; 19; 20; 21]. Diese Methode der Bodensanierung macht eine Behandlung der mit Nitro- und Aminoaromaten kontaminierten wässrigen Extrakte erforderlich.

In dieser Arbeit wird über die Behandlung von Abwässern aus der mikrobiell unterstützten Bodenwäsche (Perkolation) von mit 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) und anderen Nitroaromaten belasteten Böden der Arbeitsgruppe Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie der *Carl von Ossietzky Universität Oldenburg* mit verschiedenen photochemischen Verfahren berichtet (s. TV 3.1.2, Kapitel 9.2.3 des Leitfadens). Ziel der Arbeiten ist die Entwicklung eines kostengünstigen Verfahrens, mit dem mono-, di- und trinitrierte Aromaten in Perkulationsabwässern aus der biologischen Bodenbehandlung zu weniger toxischen, biologisch abbaubaren Verbindungen oder zu den thermodynamisch stabilsten Endprodukten umgesetzt werden können.

Im ersten Teil der Arbeit wird vom photochemischen Abbau von TNT als Modellsubstanz bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen berichtet, wobei sich zeigt, dass die Geschwindigkeit des TNT- sowie des TOC-Abbaus in folgender Reihe der photochemischen Verfahren zunimmt:



Dabei wird beobachtet, dass vor allem in Anwesenheit von H_2O_2 das sehr toxische Trinitrobenzol (TNB) in Konzentrationen von bis zu 15% der TNT-Anfangskonzentration entsteht. Die Untersuchungen zeigen ebenfalls, dass TNB als Modellsubstanz deutlich langsamer durch photochemische Oxidationsverfahren abgebaut wird als TNT. Als effektivstes Verfahren zum Abbau von TNB sowie zu dessen Mineralisierung erwiesen sich der Photo-Fenton-Prozess (UV/ H_2O_2 /Fe(III)) und der Ferrioxalat-Prozess (UV/ H_2O_2 /Fe(III)/ $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$).

Bei Untersuchungen zur photochemischen Behandlung von Prozesswasser der Bodenextraktion aus Oldenburg wurde festgestellt, dass die Abbaugeschwindigkeit von TNT nahezu unabhängig von den untersuchten Zugabemengen an H_2O_2 , Eisen(III) sowie Oxalat und im Fall des UV/ H_2O_2 -Prozesses unabhängig vom pH-Wert ist. Demgegenüber zeigt sich, dass sich der TOC- sowie der 2A46DNT- und 4A26DNT-Abbau erheblich durch H_2O_2 beschleunigen lässt, wobei eine zusätzliche Zugabe von Eisen(III) oder Eisen(III) und Oxalat nur geringfügig die Abbaugeschwindigkeiten beeinflussen.

Auch bei der photochemischen Aufbereitung des Prozesswassers wurde die Bildung von TNB beobachtet. Relativ zur photolytischen Behandlung nahm die TNB-Bildung durch den UV/ H_2O_2 -Prozess und noch mehr durch den Photo-Fenton-Prozess zu. Beim Photo-Fenton-Prozess werden zwischenzeitlich bis zu 37% der TNT-Anfangskonzentration ($c_0(\text{TNT}) = 0,2 \text{ mM}$) als TNB detektiert, woraufhin sich nur ein sehr langsamer Abbau von TNB einstellt. Das Problem der TNB-Bildung im Fall der Prozesswässer konnte nur durch die Kombination von Photolyse und anschließendem UV/ H_2O_2 -Prozess unterdrückt werden. Durch diese Kombination der Verfahren ist jedoch ein deutlich erhöhter Energieeintrag nötig, um einen erheblichen TOC-Abbau zu erreichen. Einen möglichen Kompromiss zwischen TNB-Bildung sowie schneller Mineralisierung durch H_2O_2 -Zugabe stellt die Möglichkeit der kontinuierlichen H_2O_2 -Zudosierung bei $\text{pH}_0 = 7$ dar. Hierbei werden weniger als 2% des ursprünglichen TNT als TNB detektiert, wobei ein deutlicher TOC-Abbau festgestellt werden kann. Dennoch kann

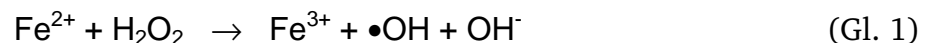
auch nach sehr hohem Energieeintrag TNB in einer Konzentration von ca. 2 μM und damit immerhin 1% der TNT-Anfangskonzentration nachgewiesen werden.

Insgesamt zeigt sich, dass eine photochemische Aufbereitung des untersuchten Prozesswassers wegen dem Problem der TNB-Bildung einen sehr hohen Energieeintrag erfordert. Deshalb müssen die untersuchten photochemischen Verfahren zum bisherigen Stand der Erkenntnisse als energieintensiv und damit sehr kostenaufwendig eingestuft werden.

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

In einer vergleichenden Untersuchung verschiedener photochemisch-oxidativer Verfahren der Wasserbehandlung wurde gezeigt, dass Nitro- und Aminoaromaten durch den sogenannten Photo-Fenton-Prozess besonders wirkungsvoll und kostengünstig zerstört werden [8; 10; 11].

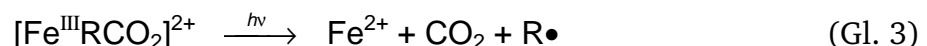
Der Photo-Fenton-Prozess basiert auf der Bildung von Hydroxylradikalen ($\bullet\text{OH}$) aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2) in einer durch im Wasser gelösten Eisen(II)-Ionen katalysierten Reaktion (Gl. 1).



Um die kontinuierliche Bildung von Hydroxylradikalen zu gewährleisten, müssen die in dieser Reaktion gebildeten Eisen(III)-Ionen wieder zu Eisen(II) reduziert werden. Diese Reduktion erfolgt beim Photo-Fenton-Prozess überwiegend durch Absorption von ultraviolettem (UV) Licht durch die aquatisierten Eisen(III)-Ionen (Gl. 2), wodurch ein zusätzliches Hydroxylradikal gebildet wird



oder aber durch eine Photodecarboxylierung von Carbonsäuren, die mit Eisen(III)-Ionen Komplexe bilden (Gl. 3):



Da die Photodecarboxylierung der Oxalsäure nach Gl. 3 sehr effizient verläuft, kann diese dem Photo-Fenton-Prozess zugesetzt werden, um die Fe^{2+} -Rückbildung zu beschleunigen. Da bei der Photodecarboxylierung von Oxalsäure ausschließlich CO_2 entsteht, werden hierbei keine bedenklichen Abbauprodukte der Oxalsäure gebildet.

Hydroxylradikale können auch durch die direkte photolytische Spaltung von Wasserstoffperoxid (UV/ H_2O_2 -Prozess) im Wellenlängenbereich unter 280 nm gebildet werden (Gl. 4). Der Absorptionskoeffizient von Wasserstoffperoxid ist jedoch sehr niedrig, so dass nur eine sehr ineffiziente Ausnutzung der Photonen erfolgt, wenn das zu behandelnde Wasser eine erhebliche Eigenfärbung aufweist [31].



Die entsprechend den Reaktionsgleichungen 1, 2, und 4 gebildeten Hydroxylradikale reagieren rasch mit organischen Wasserinhaltsstoffen unter Bildung kohlenstoffzentrierter Radikale (Gl. 5), die mit dem im Wasser gelösten molekularen Sauerstoff zu Peroxylradikalen umgesetzt werden (Gl. 6).



Die weiteren Reaktionen der aromatischen Peroxylradikale führen zu hydroxylierten Aromaten und acyclischen Carbonsäuren als Intermediate. Über zahlreiche Folgereaktionen werden die organischen Verbindungen unter Beteiligung weiterer Hydroxylradikale vollständig zu Kohlendioxid, Wasser und im Fall der Nitroaromaten zu Nitrat umgesetzt.

In der Literatur wird die Auffassung vertreten, dass der oxidative Abbau mehrfach nitrierter Toluole durch den Angriff eines Hydroxylradikals an der Methylgruppe des Toluols eingeleitet wird [1; 14; 15; 24; 25]. In einer Folge von Reaktionen wird die Methylgruppe zur Carboxylgruppe oxidiert. Die Benzoesäure decarboxyliert anschliessend unter Bildung des korrespondierenden Nitrobenzols, das durch weitere Reaktionen mit Hydroxylradikalen und molekularem Sauerstoff über Phenole sowie ringgeöffneten Carbonsäuren und Aldehyde mineralisiert wird. Entsprechende Zwischen- und Endprodukte wurden für die durch Hydroxylradikale (generiert durch Photolyse von Wasserstoffperoxid) eingeleitete Oxidation von 2,4-Dinitrotoluol (24DNT) nachgewiesen [15]. Für TNT fehlen bislang Nachweise der zweifelsfrei durch Angriff von Hydroxylradikalen gebildeten hydroxylierten Intermediate. In Transformationsprozessen des TNT, an denen Hydroxylradikale beteiligt sind (Fenton-Prozess, Photo-Fenton-Prozess, UV/H₂O₂-Prozess), wurden die in Tabelle 1 genannten Verbindungen als Intermediate und Endprodukte nachgewiesen.

Tab. 1: Intermediate und Produkte der TNT-Transformation in Anwesenheit von Hydroxylradikalen.

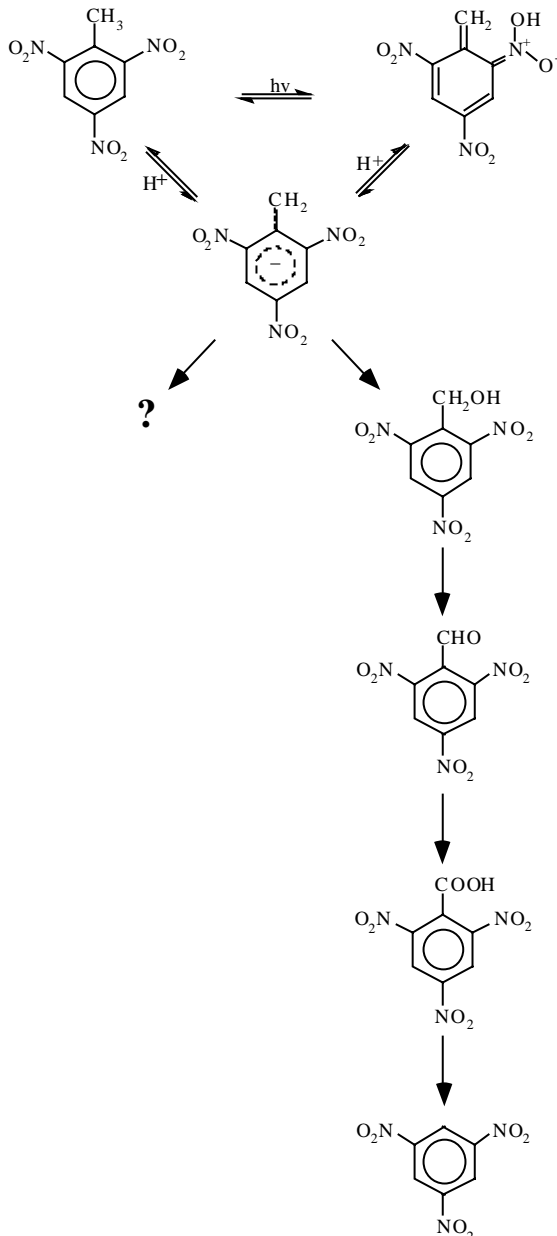
Prozess	Intermediate	Endprodukte	Lit.
Fenton	TNB ¹	≈ 2 mol Oxalat / mol TNT ≈ 3 mol Kohlendioxid / mol TNT ≈ 3 mol Nitrat / mol TNT	[6]
Photo-Fenton		> 6,3 mol Kohlendioxid / mol TNT	[6]
UV/H₂O₂	TNB		
	TNB	Nitrat	[11; 25]
	TNB		[1]

¹ 2,4,6-Trinitrobenzoesäure

Kürzlich wurde vermutet, dass der lichtinduzierte Abbau von TNT in Anwesenheit von Hydroxylradikalbildenden Oxidationsmitteln auf zwei parallelen Wegen erfolgt, einem Abbau durch Angriff von Hydroxylradikalen und einem rein photolytischen Transformationsweg, der nach Ansicht der Autoren gegenüber dem erst genannten Weg dominiert [25]. Für die Quantenausbeute (mol umgesetztes TNT/ mol absorbierte Photonen) der photolytischen

Transformation des TNT wurde ein Wert von 9×10^{-4} angegeben [7]. Damit liegen die Quantenausbeuten in der für die Photolyse von Nitroaromaten typischen Größenordnung [28].

Aus Untersuchungen zur direkten Photolyse durch Absorption von Licht ist bekannt, dass TNT zu 2,4,6-Trinitrobenzylalkohol oxidiert wird [5; 17]. Dieser Alkohol wird über das korrespondierende Benzaldehyd zu 2,4,6-Trinitrobenzoesäure oxidiert, die anschliessend zu dem sehr persistenten TNB decarboxyliert (Formelschema 1) [5; 17].



Formelschema 1: Photochemische Transformation von 2,4,6-Trinitrotoluol (nach [5; 17]); an der Umsetzung beteiligte Spezies (H_2O , O_2 , $\cdot OH$), sind nicht mit aufgenommen.

Diese Untersuchungen zeigen, dass die Reaktionsgeschwindigkeiten der Nitrotoluole bei Verwendung des Photo-Fenton-Prozesses in der Reihe



zunehmen [10; 11; 20]. Diese Ergebnisse wurden mit der Elektrophilie des Hydroxylradikals erklärt [11]. Aufgrund dieser Elektrophilie der Hydroxylradikale weist deren Reaktion mit einem organischen Substrat eine deutliche Regioselektivität auf. Bei der Umsetzung mit einem substituierten Toluol ist die Addition des Hydroxylradikals an eine aromatische Doppelbindung unter Bildung eines Hydroxycyclohexadienylradikals in der Regel schneller als die Abstraktion eines benzylichen Wasserstoffs [29]. Die stark elektronenziehenden Nitrogruppen vermindern die Reaktivität des aromatischen Kerns gegenüber der elektrophilen Addition des Hydroxylradikals. Dieser Einfluss ist um so ausgeprägter, je grösser die Zahl der Nitrogruppen ist. Ausserdem ist die Bildung des Peroxylradikals (Gleichung 6) aus dem Hydroxycyclohexadienylradikal, das durch Addition eines Hydroxylradikals an einen aromatischen Ring gebildet wird, reversibel [12]. Die Lage des Gleichgewichts ist dabei von der Art des Substituenten abhängig. Mit zunehmender elektronenziehender Wirkung des Substituenten wird das Gleichgewicht in Richtung auf das Hydroxycyclohexadienylradikal verschoben [12]. Die durch Addition eines Hydroxylradikals an den aromatischen Kern eingeleitete Oxidation eines mehrfach nitrierten Aromaten durch molekularen Sauerstoff scheint also ein unwahrscheinlicher Prozess. In Tabelle 2 sind für einige ausgewählte Verbindungen die Geschwindigkeitskonstanten der bimolekularen Reaktionen mit Hydroxylradikalen dargestellt.

Tab. 2: Geschwindigkeitskonstanten der bimolekularen Reaktionen des Hydroxylradikals mit ausgewählten Verbindungen [6].

Reaktand	k [L/(mol·s)]	k' [L/(mg·C·s)]	Bemerkung	Lit.
Oxalsäure (pH 0,5)	$1,4 \cdot 10^6$			[6]
Hydrogenoxalat (pH 3)	$4,7 \cdot 10^7$			[6]
1,3,5-Trinitrobenzol	$1,8 \cdot 10^7$		Mittelwert (N = 7)	[7]
	$1,1 \cdot 10^7$			[28]
	$1,0 \cdot 10^8$		Mittelwert (N = 3)	[7]
Toluol	$3,0 \cdot 10^9$	$3,6 \cdot 10^4$ (a)		[6]
2,4,6-Trinitrotoluol	$5,5 \cdot 10^7$	$6,5 \cdot 10^2$ (a)	Mittelwert (N = 3)	[7]
<u>Natürliches Organisches Material</u>		$1,9 \cdot 10^4$		[25]
H ₂ O ₂	$2,7 \cdot 10^7$			[6]

(a) aus k berechnet

3 Angewandte Methoden

3.1 Analytik

Die Konzentration der Nitroaromaten und Aminonitroaromaten wurden mit einem HPLC-Messgerät vom Typ Dionex Series 4500i und einem Dionex Variable Wavelength Detektor (Series 4500i) bei einer Detektionswellenlänge $\lambda_{\text{det}} = 254 \text{ nm}$ bestimmt. Als Eluent wurde eine Mischung aus Methanol (50%) und Wasser (50%) verwendet. Der Volumenstrom betrug 1ml/min. Es wurde ein Volumen von 25 μl injiziert. Die Trennung erfolgte entweder an LiChrospher 100 RP-18, 5 μm (Säule 250×4 mm mit Vorsäule 4×4 mm) oder an NUCLEOSIL 100-10 C18 (Säule 250×4 mm mit Vorsäule 30×4 mm).

Der Gehalt des gesamten organischen Kohlenstoffs (TOC) einer Wasserprobe wurde mit einem TOC-5000-Analyser von Shimadzu und der pH-Wert mit einer Ross 81-15-pH Einstabglaselektrode der Firma Orion sowie einem pH-Meter 691 von Metrohm bestimmt.

Der Chemische Sauerstoffbedarf (CSB) wurde mit dem Küvetten-Test LCK 614 bei Verwendung des Thermostaten LT 100 THERMOSTAT, die Nitratkonzentration mit dem Küvetten-Test LCK 339 und die Konzentration an $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ sowie des Gesamteisens mit dem 50 mm Küvetten-Test LCK 521 der Firma Dr. Lange ermittelt, wobei ein ISiS 6000 MDA PHOTOMETER der Firma Dr. Lange verwendet wurde.

Extinktionsspektren wurden mit einem Omega 10 UV/VIS- Zweistrahlsspektralphotometer der Firma Bruins aufgenommen.

3.2 Verwendete Chemikalien

Das in dieser Arbeit verwendete Wasser wurde mit einem Wasserreinigungssystem Milli-Q/RO von Millipore aufbereitet und hatte eine spezifische Leitfähigkeit $< 18 \mu\text{S}/\text{cm}$. TNT und TNB wurden HPLC--rein verwendet. Alle weiteren Chemikalien waren von p.a.-Reinheit. Zum Ansäuern der Lösungen wurde konzentrierte H_2SO_4 verwendet. Eisen(III) wurde als $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ (78 Gew.-% Eisensulfat), Eisen(II) als $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und Oxalat als $\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$ zugegeben.

3.3 Zusammensetzung des Perkulationswassers

In Tabelle 3 sind ausgewählte Ergebnisse der Analysen des Perkulationswassers, welches von der Universität Oldenburg zur Verfügung gestellt wurde, zusammengestellt. Dieses Abwasser besitzt mit einer Konzentrationen von 0,20 mM eine sehr hohe TNT-Belastung. Mit 0,018 mM 2A46DNT und 0,013 mM 4A26DNT sind die Konzentrationen der primären mikrobiologischen Reduktionsprodukte des TNT deutlich geringer.

Tab. 3: Analysendaten des Prozesswassers

pH	7,1			
el. Leitfähigkeit	6130	$\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$		
TOC	82	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	6,8	mM C
CSB	200	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	6,3	mM O_2
TNT	45,2	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	0,2	mM
2A46DNT	3,5	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	0,018	mM
4A26DNT	2,6	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	0,013	mM
$\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$	0,9	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	0,016	mM

Die Konzentration des organisch gebundenen Kohlenstoffs (TOC) liegt mit $82 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (= 6,8 mM Kohlenstoff) deutlich höher als die Summe des in sprengstofftypischen Verbindungen gebundenen Kohlenstoffs. Mehr als 75% des organisch gebundenen Kohlenstoffs muss daher nicht-sprengstofftypischen Verbindungen zugeordnet werden.

In Abbildung 1 ist das Extinktionsspektrum des Perkolationswassers bei 10-facher Verdünnung und einer Schichtdicke von 1cm dargestellt. Es ist zu erkennen, dass das Abwasser eine erhebliche Absorption im ultravioletten Bereich (200 - 400 nm) aufweist. Bei einer Schichtdicke von 1 cm werden deutlich mehr als 90% der Photonen in diesem Wellenlängenbereich absorbiert.

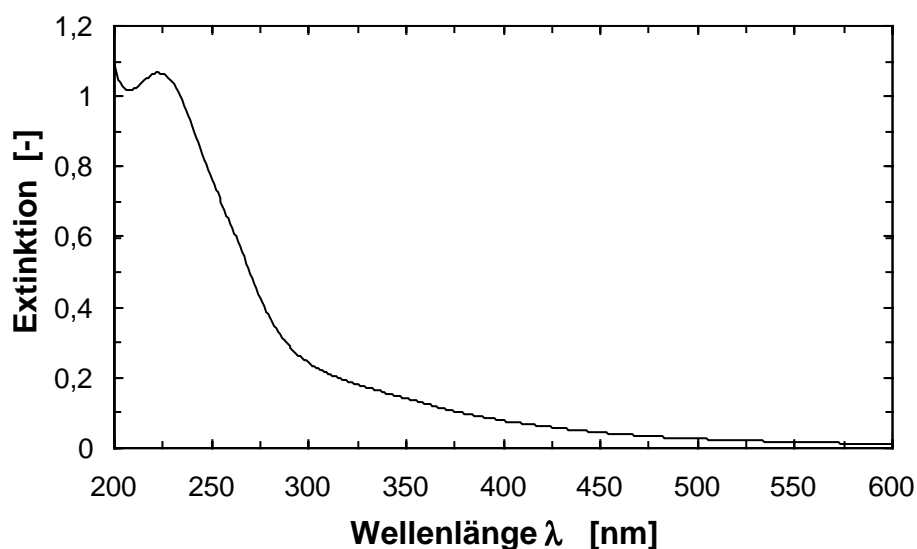


Abb. 1: Extinktionsspektrum des Perkolationswassers bei 10-facher Verdünnung (Schichtdicke $d = 1 \text{ cm}$).

3.4 Beschreibung der Technikumsanlagen

Die Untersuchungen zur Behandlung von Abwässern aus der Bodenextraktion und Modellabwässern wurden in zwei Anlagen entsprechend der in Abbildung 2 dargestellten Skizze im diskontinuierlichen Betrieb durchgeführt. In der Anlage mit der Bezeichnung "Anlage-HgND" wurde ein Photoreaktor mit einem Quecksilberniederdruckstrahler mit einer Hauptemissionslinie bei einer Wellenlänge von $\lambda = 254 \text{ nm}$ eingesetzt. Bei der "Anlage-HgMD" wurde ein Quecksilbermitteldruckstrahler verwendet, dessen Emissionsspektrum in Abbildung 3 dargestellt ist. Weitere technische Daten zu diesen Anlagen können der Tabelle 4 (Anlage-HgND) und Tabelle 5 (Anlage-HgMD) entnommen werden.

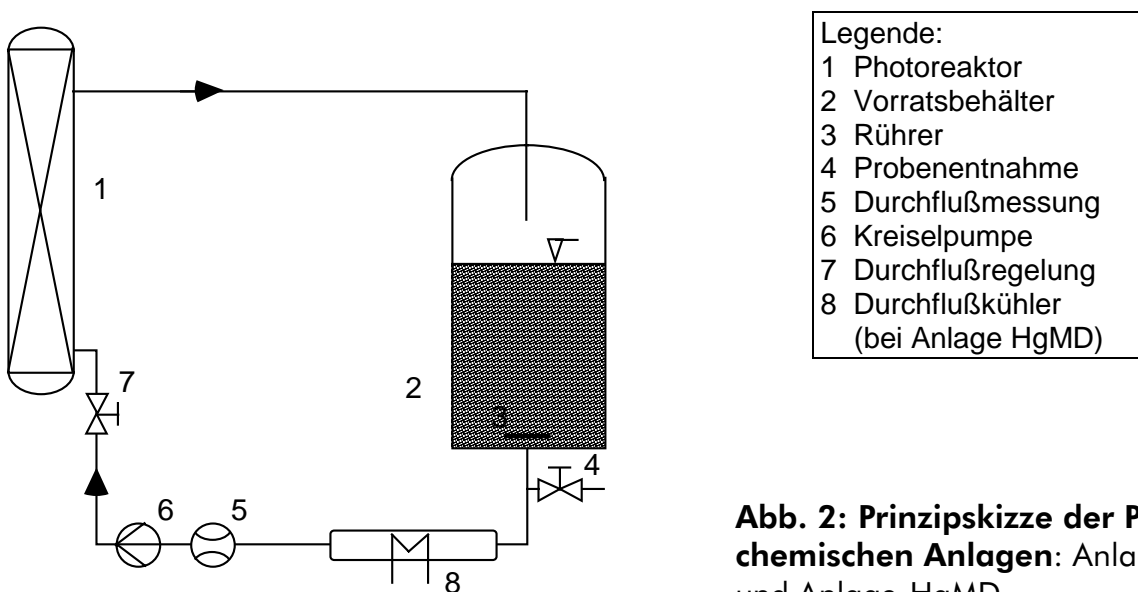


Abb. 2: Prinzipskizze der Photochemischen Anlagen: Anlage-HgND und Anlage-HgMD.

In beiden Anlagen wurde das zu behandelnde Abwasser zwischen dem Photoreaktor und einem Rührkessel im Kreislauf geführt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur (22°C) durchgeführt, wobei bei der Anlage-HgMD eine Erwärmung des Wassers auf 35°C während der Bestrahlung trotz intensiver Kühlung nicht vermieden werden konnte. Die für die Behandlung notwendigen Chemikalien (Säure, wässrige Lösungen des Eisensalzes und des Wasserstoffperoxids) wurden in den Rührkessel dosiert. Die Proben wurden an den jeweiligen Probenentnahmehähnen am Ausgang der Rührkessel genommen. Das Wasser in den Rührkesseln wurde mit Magnetrührern durchmischt und Luftsauerstoff durch intensiven Kontakt mit Luft bis zum Löslichkeitsgleichgewicht eingetragen.

Tab. 4: Technische Daten der Anlage-HgND

Quecksilberniederdruck-Strahler	: TUV 36W/G36T8 (Philips)
Hauptemissionswellenlänge	: 254 nm
UV-Leistung (Aktinometrie mit Ferryoxalat)	: $1,1 (\pm 0,2) \cdot 10^{-5}$ Einstein/s (= 5,4 W)
Bestrahltes Volumen d. Photoreaktors	: 0,270 l
Behandeltes Gesamtvolumen	: 5,0 l
Volumenstrom	: $3,0 \text{ l} \cdot \text{min}^{-1}$

Tab. 5: Technische Daten der Anlage-HgMD

Photochemische Anlage (mit Quecksilbermitteldruck-Strahler)	Laboclean [®] der Firma a.c.k. aqua concept GmbH Karlsruhe
elektrische Anschlussleistung (Strahler)	1050 W
UVC-Leistung (Herstellerangabe)	≈ 100 W
UV-Leistung (Aktinometrie mit Ferryoxalat)	$2,1 (\pm 0,2) \cdot 10^{-4}$ Einstein·s ⁻¹
Bestrahltes Volumen d. Photoreaktors	0,935 L
Behandeltes Gesamtvolumen	5,0 L
Volumenstrom	$16,7 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$

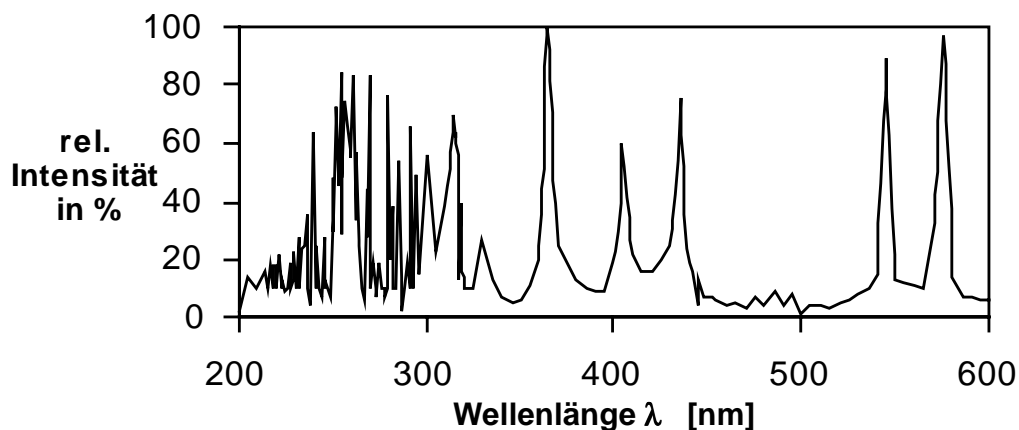


Abb. 3: Relatives Emissionsspektrum der Hg-Mitteldruckdampfampe (Anlage-HgMD)

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Photochemischer Abbau von TNT und TNB als Modellsubstanzen

4.1.1 UV/H₂O₂-Prozess mit TNT und TNB (Anlage-HgND)

Da beim Abbau von TNT mit Hilfe des UV/H₂O₂-Prozesses TNB [11; 21] als Folgeprodukt entsteht, wurden sowohl für TNT als auch für TNB Untersuchungen zum Einfluss der H₂O₂-Konzentration auf die jeweilige Abbaugeschwindigkeit durchgeführt. Die Ergebnisse sind für TNT in Abbildung 4 und für TNB in Abbildung 5 dargestellt.

Abbildung 4 zeigt, dass die Abbaugeschwindigkeit von TNT durch Erhöhung der H₂O₂-Konzentration deutlich gesteigert wird. Je höher jedoch die H₂O₂-Konzentration ist, desto geringer ist dieser Effekt. Dies kann auf die vermehrte Reaktion zwischen Hydroxylradikalen und H₂O₂ bei höheren H₂O₂-Konzentrationen zurückgeführt werden, wodurch die Hydroxylradikale nicht mehr zur Reaktion mit TNT zur Verfügung stehen. Dieser Einfluss des H₂O₂ wird auch bei anderen Modellsubstanzen beobachtet [30]. TNB konnte bei TNT-Abbauversuchen in Konzentrationen von bis zu ca. 15% der TNT-Anfangskonzentrationen nachgewiesen werden (im Diagramm nicht dargestellt). Der TOC wurde bei der höchsten H₂O₂-Konzentrationen ($c_0(\text{H}_2\text{O}_2) = 2,5 \text{ mM}$) um bis zu ca. 50% innerhalb von 350 min reduziert (im Diagramm nicht dargestellt).

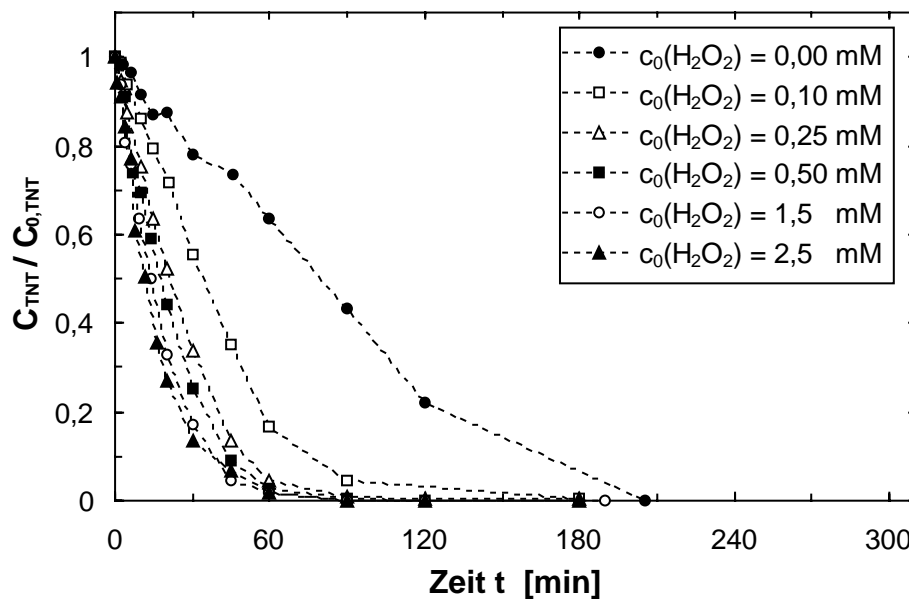


Abb. 4: Relativer Konzentrationsverlauf von TNT beim UV/H₂O₂-Prozess bei unterschiedlichen H₂O₂-Anfangskonzentrationen (Anlage-HgND, $c_0(\text{TNT}) = 0,05 \text{ mM}$, pH neutral)

Wie in Abbildung 5 zu erkennen ist, nehmen auch die Abbaugeschwindigkeiten des TNB mit zunehmender H₂O₂-Konzentration zu. Der Abbauprozess verläuft jedoch um ein Vielfaches langsamer (über ca. 30-fach) als der TNT-Abbau (vgl. Abb. 4). Auch der TOC konnte im untersuchten Zeitraum bei keinem TNB-Abbauversuch um mehr als 20% vermindert werden (im Diagramm nicht dargestellt).

Diese Ergebnisse zeigen, dass das beim photochemischen Abbau von TNT entstehende TNB erhebliche Aufbereitungsprobleme verursachen kann, da TNB im Vergleich zu TNT nur sehr langsam mit dem UV/H₂O₂-Prozess abgebaut werden kann.

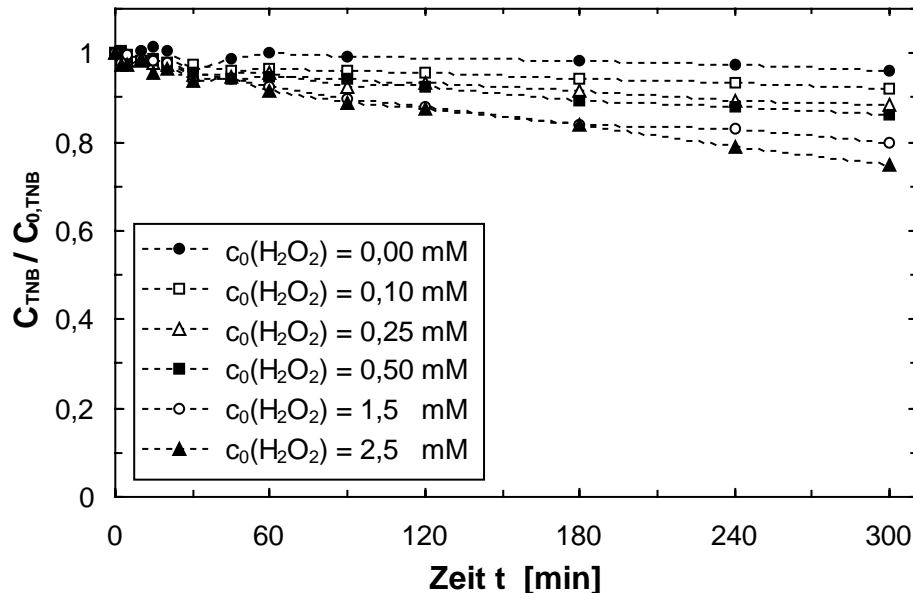


Abb. 5: Relativer Konzentrationsverlauf von TNB beim UV/H₂O₂-Prozess bei unterschiedlichen H₂O₂-Anfangskonzentrationen (Anlage-HgND, $c_0(\text{TNB}) = 0,05 \text{ mM}$, pH neutral)

4.1.2 Photo-Fenton-Prozess mit TNT (Anlage-HgND)

Zur Untersuchung des Photo-Fenton-Prozesses (UV/H₂O₂/Fe(II) bzw. UV/H₂O₂/Fe(III)) wurden die Anfangskonzentrationen von Eisen(II) bzw. Eisen(III) sowie die von H₂O₂ bei der photochemischen Behandlung von TNT-Lösungen variiert. Die wesentlichen Ergebnisse des TNT-Abbaus und des dazugehörigen TOC-Abbaus sind in den Abbildungen 6 und 7 dargestellt.

Den Abbildungen ist zu entnehmen, dass die Abbaugeschwindigkeiten sowohl für TNT als auch für den TOC entsprechend folgender Reihe zunehmen:



Hierbei erweist sich der Photo-Fenton-Prozess sowohl mit Eisen(II) als auch mit Eisen(III) als besonders effektiv zur Mineralisation des TNT zu CO₂, was an den TOC-Umsätzen von ca. 80% (Abb. 7) im Gegensatz zu nur 50% im Falle des UV/H₂O₂-Prozesses zu erkennen ist.

Durch Verwendung von Eisen(II) anstatt Eisen(III) wird beim Photo-Fenton-Prozess bei gleichen Konzentrationen zu Versuchsbeginn eine erhöhte Abbaugeschwindigkeit beobachtet (Abb.6). Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass bei Verwendung von Eisen(II) durch die Fenton-Reaktion (Gl. 1) Hydroxylradikale entstehen, ohne dass Eisen(III) photolytisch nach Gleichung (Gl. 2) zu Eisen(II) reduziert werden muss. Nach längeren Bestrahlungszeiten (30 bis 60 min) ist der Unterschied der Umsätze jedoch sehr gering.

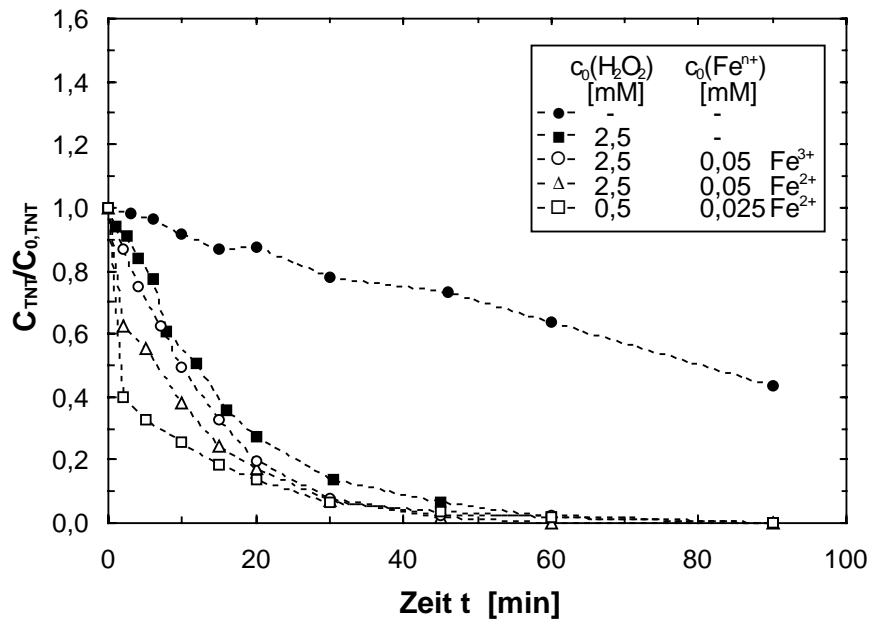


Abb. 6: Relativer TNT-Konzentrationsverlauf beim photochemischen Abbau von TNT bei unterschiedlichen Bedingungen (Anlage-HgND, $c_0(TNT) = 0,05$ mM, pH_0 3)

Bei einer Verringerung der Eisen(II)-Anfangskonzentration von 0,05 mM auf 0,025 mM sowie der H_2O_2 -Anfangskonzentration von 2,5 mM auf 0,5 mM kann die Abbaugeschwindigkeit des TNT zu Versuchsbeginn deutlich gesteigert werden (Abb. 6). Durch die geringere Anfangskonzentration von Eisen(II) und H_2O_2 verringert sich jedoch der TOC-Umsatz von 80% auf nur ca. 50% innerhalb der ersten 240 min (Abb. 7).

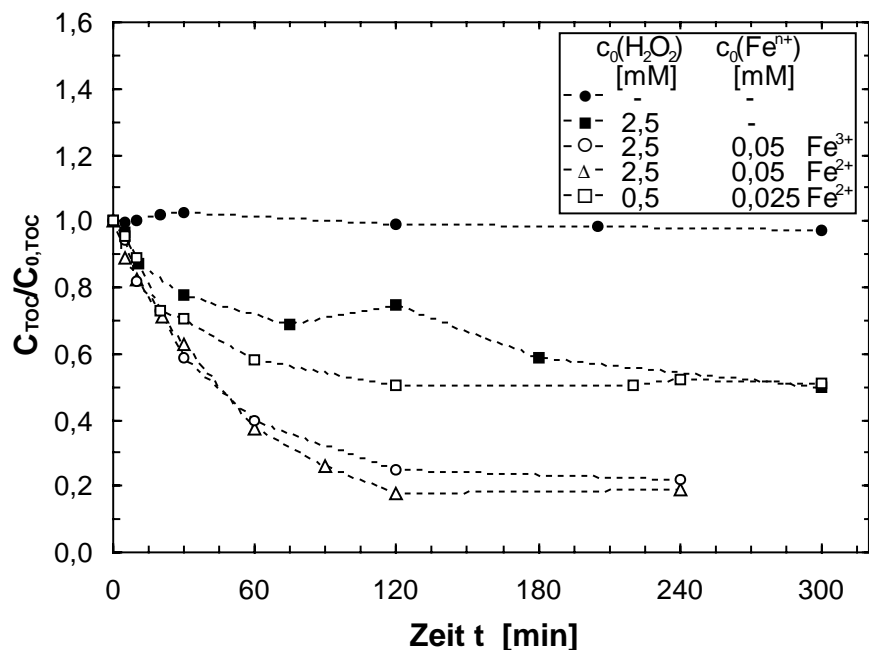


Abb. 7: Relativer TOC-Konzentrationsverlauf beim photochemischen Abbau von TNT bei unterschiedlichen Bedingungen (Anlage-HgND, $c_0(TNT) = 0,05$ mM, pH_0 3)

Bei diesen Versuchen in der Anlage-HgND zum Photo-Fenton-Prozess konnte TNB in Konzentrationen von bis zu 10% der Anfangskonzentration des TNT nachgewiesen werden.

4.1.3 UV/H₂O₂-Prozess mit TNT (Anlage-HgMD)

In Abbildung 8 ist das Abbauverhalten von TNT als Modells substanz in der Anlage-HgMD bei reiner Photolyse und bei Behandlung mit dem UV/H₂O₂-Prozess dargestellt. Es ist zu erkennen, dass TNT mit dieser Anlage in beiden Fällen innerhalb von ca. 3 min nahezu vollständig abgebaut wird. Ein Vergleich der Abbaugeschwindigkeiten ist für derart hohe Abbaugeschwindigkeiten bei dieser Anlage nur bedingt möglich, da die Voraussetzung eines differentiellen Photoreaktors (geringer Abbau zwischen Einlauf und Auslauf des Photoreaktors) nicht gewährleistet ist. Der Abbildung 8 kann desweiteren entnommen werden, dass sowohl bei der Photolyse als auch beim UV/H₂O₂-Prozess TNB aus TNT entsteht. Dabei entsteht beim UV/H₂O₂-Prozess im untersuchten Zeitraum mehr TNB (bis zu 10 % der TNT-Anfangskonzentration) als bei der Photolyse (ca 4 %). Beim UV/H₂O₂-Prozess wird das entstandene TNB innerhalb von 30 min jedoch teilweise wieder abgebaut (bis auf 5 %). Dennoch reicht der Abbau von TNB unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht aus, um die erhöhte Bildung von TNB bei H₂O₂-Zugabe zu kompensieren. Bei reiner Photolyse sind in den HPLC-Chromatogrammen aber deutlich mehr Abbauprodukte als beim UV/H₂O₂-Prozess zu erkennen, die jedoch nicht identifiziert werden konnten.

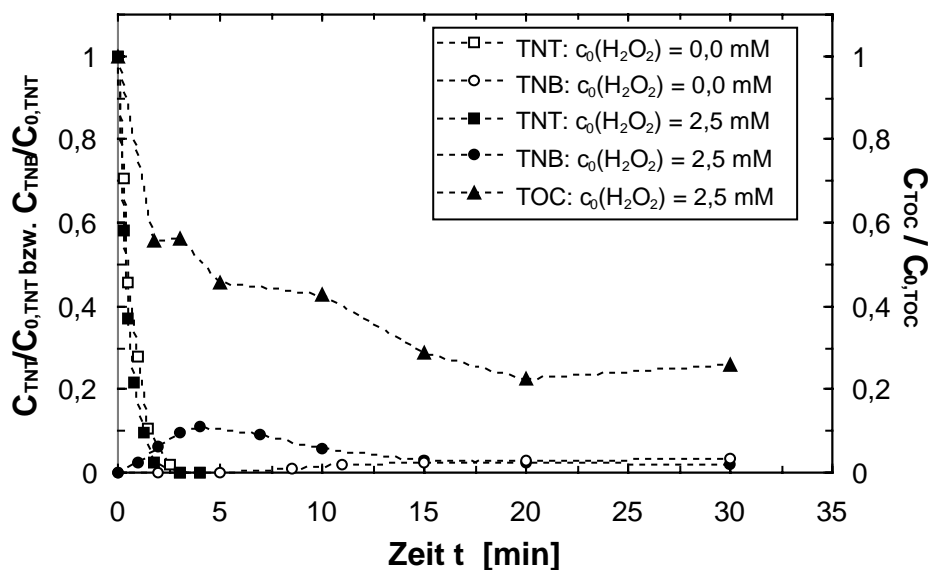


Abb. 8: Relative Konzentration ($c_{\text{TNT}}/c_{0,\text{TNT}}$ bzw. $c_{\text{TNB}}/c_{0,\text{TNT}}$) von TNT und TNB sowie die relative Konzentration des TOC ($c_{\text{TOC}}/c_{0,\text{TOC}}$) als Funktion der Bestrahlungszeit beim UV/H₂O₂-Prozess und reiner Photolyse (Anlage-HgMD, $c_0(\text{TNT}) = 0,05 \text{ mM}$, (pH neutral))

Der hohe TOC-Umsatz von ca 80% innerhalb von 30 min bei Zugabe von H₂O₂ verdeutlicht, dass neben der Bildung von TNB eine erhebliche Mineralisierung des TNT stattfindet.

4.1.4 Photo-Fenton-Prozess mit TNB (Anlage-HgMD)

Da TNB beim photochemischen Abbau von TNT als relativ unreaktives Abbauprodukt entsteht, ist es von besonderem Interesse die Abbaugeschwindigkeit von TNB bei unterschiedlichen photochemischen Verfahren zu untersuchen. In Abbildung 9 sind Ergebnisse von TNB-Abbauversuchen bei reiner Photolyse (UV), bei Photolyse unter Zugabe von Eisen(III) (UV/Fe(III)), beim Photo-Fenton-Prozess (UV/H₂O₂/Fe(III)) und beim Ferrioxalat-Prozess (UV/H₂O₂/Fe(III)/C₂O₄²⁻) dargestellt (Versuchsbedingungen siehe Abb. 9). Die Abbaugeschwindigkeiten von TNB nehmen dabei in folgender Reihe zu:

$$UV < UV/Fe(III) < UV/H_2O_2 < UV/H_2O_2/Fe(III) \approx UV/H_2O_2/Fe(III)/C_2O_4^{2-}$$

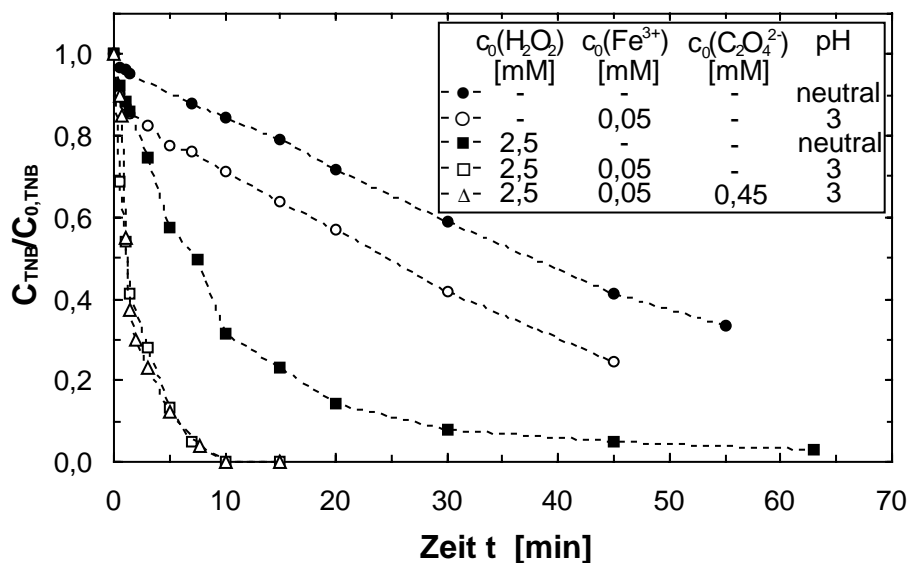


Abb. 9: Relativer Konzentrationsverlauf von TNB bei photochemischer Behandlung unter verschiedenen Versuchsbedingungen als Funktion der Bestrahlungszeit (Anlage-HgMD, $c_0(TNB) = 0,05$ mM)

Diese Abbauxperimente zeigen, dass der Photo-Fenton-Prozess und der Ferrioxalat-Prozess am ehesten geeignet sind, um TNB als Modellsubstanz abzubauen.

In Abbildung 10 sind für die gleichen Versuchsparameter wie in Abbildung 9 die relativen TOC-Konzentrationen ($c_{TOC}/c_{0,TOC(TNB)}$) bezogen auf die TOC-Anfangskonzentrationen, die ausschließlich aus TNB resultieren, als Funktion der Bestrahlungszeit aufgetragen (ausgenommen ist der Photo-Fenton -Prozess). Hierbei zeigt sich, dass nur im Falle des UV/H₂O₂- und des Ferrioxalat-Prozesses eine nahezu vollständige Mineralisierung des TNB innerhalb der Versuchszeit von ca. 65 min erreicht wird.

Damit erweist sich sowohl der UV/ H₂O₂- als auch der Ferrioxalat-Prozess als geeignetes Verfahren um TNB als Modellsubstanz nicht nur abzubauen, sondern auch nahezu vollständig zu mineralisieren.

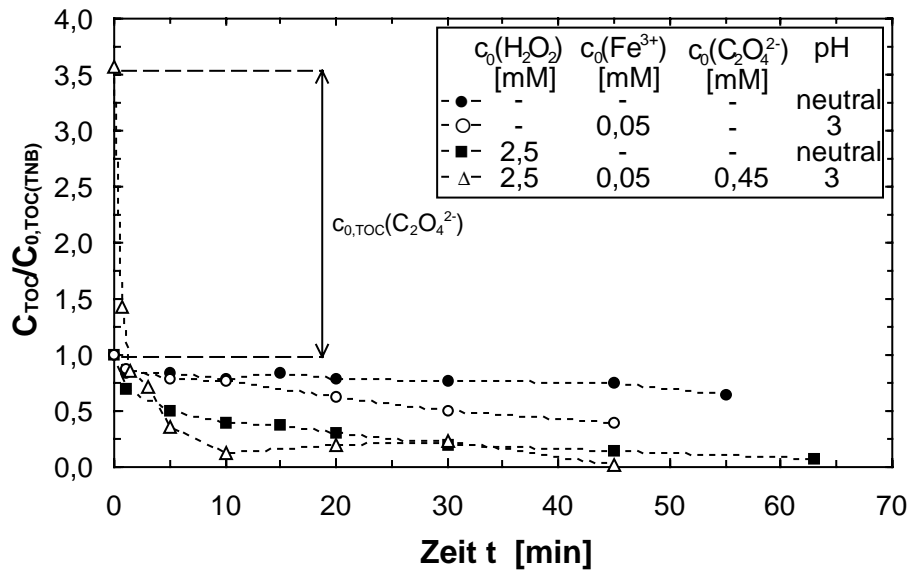


Abb. 10: Relative Konzentrationen des TOC ($c_{\text{TOC}}/c_{0,\text{TOC}(\text{TNB})}$) bei photochemischer Behandlung von TNB unter verschiedenen Versuchsbedingungen als Funktion der Bestrahlungszeit (Anlage-HgMD, $c_0(\text{TNB}) = 0,05 \text{ mM}$)

4.2 Photochemische Behandlung von Prozesswasser

Das Abbauverhalten von TNT, 2A46DNT, 4A26DNT und des TOC sowie die Bildung von TNB bei photochemischer Behandlung (Anlage-HgMD) des von der Universität Oldenburg durch Bodenextraktion erhaltenen Prozesswassers wird im folgenden beschrieben. In den Abbildungen 11 bis 17 sind die Versuchsergebnisse der photolytischen Behandlung bei $\text{pH}_0 = 7,1$ (Abb. 11), beim UV/ H_2O_2 -Prozess bei $\text{pH}_0 = 7,1$ (Abb. 12), beim UV/ H_2O_2 -Prozess bei $\text{pH}_0 = 7,1$ und kontinuierlicher H_2O_2 -Zudosierung (Abb. 13), beim UV/ H_2O_2 -Prozess bei $\text{pH}_0 = 3$ (Abb. 14), beim Photo-Fenton-Prozess bei $\text{pH}_0 = 3$ sowie zwei unterschiedlichen Eisen(III)-Konzentrationen (Abb. 15 und Abb. 16) und beim Ferrioxalat-Prozess bei $\text{pH}_0 = 3$ (Abb. 16) dargestellt (Versuchsbedingungen siehe Abbildungsunterschriften). Als Versuchszeiten wurden 120 min gewählt, was bei der verwendeten Anlage-HgMD einem elektrischen Energiebedarf des Hg-Mitteldruckstrahlers von 2,1 kWh pro 5 l behandeltes Prozesswasser entspricht. Um den Verlauf der Konzentrationen von TNT, 2A46DNT, 4A26DNT, TNB und des TOC miteinander vergleichen zu können, sind in den Abbildungen jeweils die relativen Konzentrationen aufgetragen. Dies bedeutet, dass die molaren Konzentrationen von TNT, 2A46DNT, 4A26DNT und TNB jeweils durch die Anfangskonzentration von TNT dividiert wurden ($c/c_{0,\text{TNT}}$). Bei den relativen TOC-Konzentrationen wurden die TOC-Konzentrationen jeweils auf die Anfangskonzentration des TOC, im Falle des Ferrioxalat-Prozesses vor der Oxalat-Zugabe, bezogen ($c_{\text{TOC}}/c_{0,\text{TOC}}$ bzw. $c_{\text{TOC}}/c_{0,\text{TOC}(\text{ohne Oxalat})}$). Des weiteren sind in den Diagrammen für einen einfachen Vergleich die kürzesten Zeiten für TNT, 2A46DNT und 4A26DNT eingetragen, bei denen ein Abbau von mehr als 90% erreicht wurde ($t_{90\%}$ -Werte).

In den Abbildungen 11 bis 17 ist zu erkennen, dass die Geschwindigkeit des TNT-Abbaus nahezu unabhängig von den untersuchten Versuchsbedingungen ist. Ein 90%-iger Abbau wird

jeweils innerhalb von ca. 15 min ($t_{90\%} \approx 15$ min) erreicht, nur bei den Versuchen zum Photo-Fenton-Prozess (Abb. 15 und 16) liegen die Werte bei $t_{90\%} \approx 20$ min und damit etwas über den anderen Werten. Ein im Rahmen der Messgenauigkeit vollständiger Abbau wird in allen Fällen in weniger als 30 Minuten erreicht.

Für 2A46DNT und 4A26DNT zeigt sich jedoch ein anderes Verhalten. Bei photolytischer Behandlung des Prozesswassers (Abb. 11) werden beide Aminonitroaromaten innerhalb von 45 min um 90% abgebaut ($t_{90\%} \approx 45$ min). Durch Zugabe von H_2O_2 ($c_0(\text{H}_2\text{O}_2) = 20$ mM) ergibt sich der gleiche Umsatz sowohl bei $\text{pH}_0 = 7,1$ als auch bei $\text{pH}_0 = 3$ schon nach weniger als 5 min (Abb. 12 und 14). Nur bei kontinuierlicher Zudosierung der gleichen Menge an H_2O_2 über die ersten 80 min ergeben sich 90%-ige Umsätze für 2A46DNT und 4A26DNT erst nach ca. 30 min (Abb. 13). Durch Zugabe von H_2O_2 und Eisen(III) bzw. H_2O_2 , Eisen(III) und Oxalat wird ein 90%-iger Abbau schon in weniger als 2,5 min erreicht (Abb. 15 bis 17, Versuchsbedingungen siehe Abbildungsunterschriften), womit der Aminonitroaromaten-Abbau schneller als bei ausschließlicher Zugabe von H_2O_2 ist.

Bei photolytischer Behandlung ist innerhalb von 120 min nahezu kein TOC-Abbau zu erkennen. Erst nach Zugabe von H_2O_2 ($c_{\text{zu}}(\text{H}_2\text{O}_2) = 20$ mmol·l⁻¹) nach 120 min kann eine deutliche TOC Abnahme beobachtet werden (Abb. 11). Bei allen Versuchen, bei denen H_2O_2 zugegeben wurde, ergibt sich nach 120 min Bestrahlungszeit ein ungefähr 80%-iger Abbau des TOC (Abb. 12 bis 17). Lediglich der Verlauf der Abbaukurven ist geringfügig unterschiedlich. Nur bei kontinuierlicher Zudosierung von H_2O_2 ist ein deutlich verlangsamter TOC-Abbau in den ersten 60 min des Versuches zu erkennen. Für einen erheblichen TOC-Abbau ist damit in allen untersuchten Fällen ein deutlich höherer Energieeintrag erforderlich, als für den Abbau von TNT.

Neben dem TNT- und dem TOC-Abbau ist die Entwicklung der TNB-Konzentration ein wichtiger Parameter. Es zeigt sich, dass durch photolytische Behandlung des Prozesswassers bei $\text{pH}_0 = 7,1$ innerhalb von 120 min und damit der 4-fachen Zeit des TNT-Abbaus kein TNB in messbaren Konzentrationen entsteht (Abb. 11). Auch durch Zugabe von H_2O_2 ($c_{\text{zu}}(\text{H}_2\text{O}_2) = 20$ mmol·l⁻¹) nach 120 min kann keine Bildung von TNB beobachtet werden, wobei eine deutliche Verringerung des TOC zu erkennen ist, was als deutlicher Hinweis für die Bildung von Hydroxylradikalen aufgefasst werden kann. Beim UV/ H_2O_2 -Prozess bei $\text{pH}_0 = 7,1$ (Abb. 12) entstehen in den ersten 60 min ca. 5% TNB bezogen auf die TNT-Anfangskonzentration. Damit zeigt sich, dass H_2O_2 die Bildung von TNB auch beim Prozesswasser begünstigt, wobei die relative TNB-Konzentration nach 120 min wieder auf 2,5% verringert wird. Durch kontinuierliche Zugabe der gleichen Menge H_2O_2 wird die Bildung von TNB auf unter 2% reduziert (Abb. 13). Wird der UV/ H_2O_2 -Prozess bei $\text{pH}_0 = 3$ durchgeführt (Abb. 14) entstehen bis zu 13% TNB und damit deutlich mehr als bei $\text{pH}_0 = 7,1$ (Abb. 12). Nach 120 min sind immerhin noch 6% der TNT-Anfangskonzentration als TNB detektierbar. Durch die Zugabe von Eisen(III) und H_2O_2 ($c_0(\text{H}_2\text{O}_2) = 20$ mM) wird die Bildung von TNB bei $\text{pH}_0 = 3$ zusätzlich begünstigt. Bei einer zugegebenen Eisen(III)-Menge von 0,1 mmol·l⁻¹ (Abb. 15) werden bis zu 26% TNB bei 0,54 mmol·l⁻¹ Eisen(III) (Abb. 16) bis zu 37% TNB gebildet, welches bis 120 min nur auf Werte von 16% bzw. 33% abgebaut wird. Nur durch Zugabe von Oxalat ($c_0(\text{C}_2\text{O}_4^{2-}) = 0,45$ mM) kann die Bildung von TNB auf 11% reduziert werden, wenn Eisen(III) und H_2O_2 als Zusatzstoffe verwendet werden (Abb. 17), wobei nach 120 min noch 7% TNB detektierbar sind.

Da die Abbaugeschwindigkeit von TNT im Prozesswasser nahezu unabhängig von der Zugabe von H_2O_2 ist, scheint der TNT-Abbau über Hydroxylradikale bei den untersuchten Versuchsbedingungen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Vermutlich ergibt sich auf Grund der starken Braunfärbung des Prozesswassers, sowie der Fähigkeit der Huminstoffe mit Hydroxylradikalen zu reagieren, eine so niedrige Hydroxylradikalkonzentration, dass der photolytische Abbauweg des TNT dominiert. Hierbei kann neben dem Abbau von TNT durch direkte Photolyse eine Sensibilisierung des TNT-Abbaus durch Huminstoffe eine Rolle spielen, wie in der Literatur berichtet wird; [22]. Dennoch begünstigt H_2O_2 auch bei Prozesswasser die Bildung von TNB, besonders bei niedrigem pH-Wert ($pH_0 = 3$). Da die Entstehung von TNB durch Zugabe von H_2O_2 und Eisen(III), was relativ zum UV/ H_2O_2 -Prozeß zu einer verstärkten Hydroxylradikalbildung führt, desweiteren gefördert wird, liegt die Vermutung nahe, dass Hydroxylradikale für die erhöhte Bildung von TNB verantwortlich sind. Da die Abbaugeschwindigkeit von TNT jedoch nahezu unbeeinflusst bleibt, scheint der erste Schritt des TNT-Abbaus nur unwesentlich über Hydroxylradikale abzulaufen, wobei ein oder mehrere Abbauprodukte in Anwesenheit von H_2O_2 wahrscheinlich durch vermehrte Reaktion mit Hydroxylradikalen TNB bilden.

Der Einfluss der Hydroxylradikale ist auch an der erheblichen Verminderung des TOC innerhalb der ersten 120 min bei H_2O_2 -Zugabe zu erkennen, wobei in Abwesenheit von H_2O_2 nahezu keine Abnahme des TOC zu beobachten ist.

Ein weiterer Hinweis auf den Einfluss von Hydroxylradikalen sind die erhöhten Abbaugeschwindigkeiten von 2A46DNT und 4A26DNT bei Zugabe von H_2O_2 . Da die Abbaugeschwindigkeit der beiden Aminonitroaromaten durch Hydroxylradikale deutlich höher ist als bei TNT [8], reicht die vermutlich sehr niedrige Hydroxylradikalkonzentration dennoch aus, um die Abbaugeschwindigkeit von 2A46DNT und 4A26DNT deutlich zu steigern, wobei die TNT-Abbaugeschwindigkeit nahezu unbeeinflusst bleibt.

Der effektivste der untersuchten Prozesse zur photochemischen Aufbereitung der Prozessabwässer scheint damit der UV/ H_2O_2 -Prozess bei original pH-Wert ($pH_0 = 7,1$) sowie kontinuierlicher Zudosierung von H_2O_2 zu sein. Hierbei wird nur geringfügig mehr TNB gebildet, als bei photolytischer Behandlung, jedoch ist ein erheblicher Abbau des TOC sowie ein vollständiger Abbau des TNT und der Aminonitroaromaten innerhalb von 120 min möglich. Dennoch muss auch bei diesem Verfahren der notwendige Energieeinsatz als sehr hoch eingestuft werden.

Das Problem der TNB Bildung konnte aber nur im Fall der photolytischen Behandlung mit nachfolgendem UV/ H_2O_2 -Prozess unterdrückt werden, jedoch ist bei dieser Kombination der Energieaufwand besonders hoch.

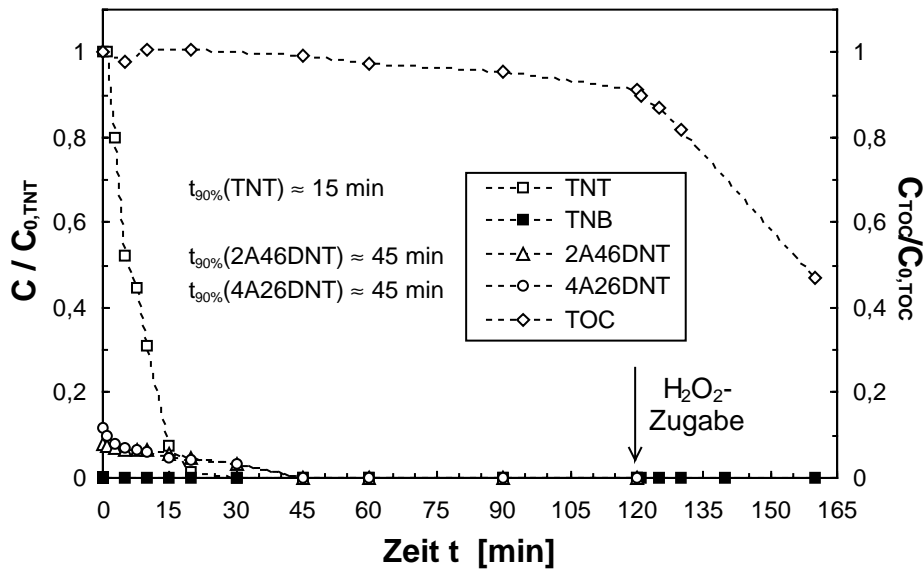


Abb. 11: Relative Konzentration ($c/c_{0,TNT}$) von TNT, 2A46DNT, 4A26DNT und TNB sowie die relative Konzentration des TOC ($c_{TOC}/c_{0,TOC}$) als Funktion der Bestrahlungszeit bei Prozessabwasser (Anlage-HgMD, Photolyse bis 120 min, dann $c_{zu,120min}(H_2O_2) = 20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $pH_0 7,1$)

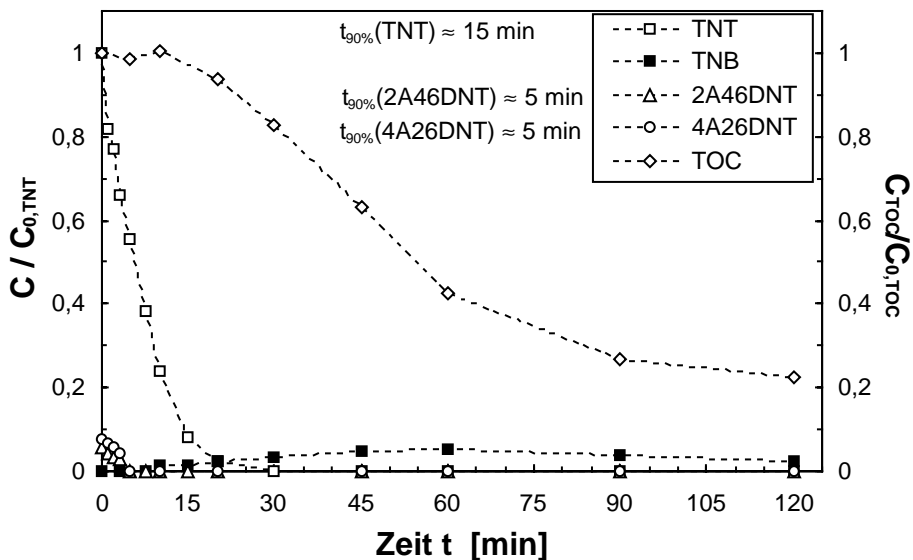


Abb. 12: Relative Konzentration ($c/c_{0,TNT}$) von TNT, 2A46DNT, 4A26DNT und TNB sowie die relative Konzentration des TOC ($c_{TOC}/c_{0,TOC}$) als Funktion der Bestrahlungszeit bei Prozessabwasser (Anlage-HgMD, $c_0(H_2O_2) = 20 \text{ mM}$, $pH_0 7,1$)

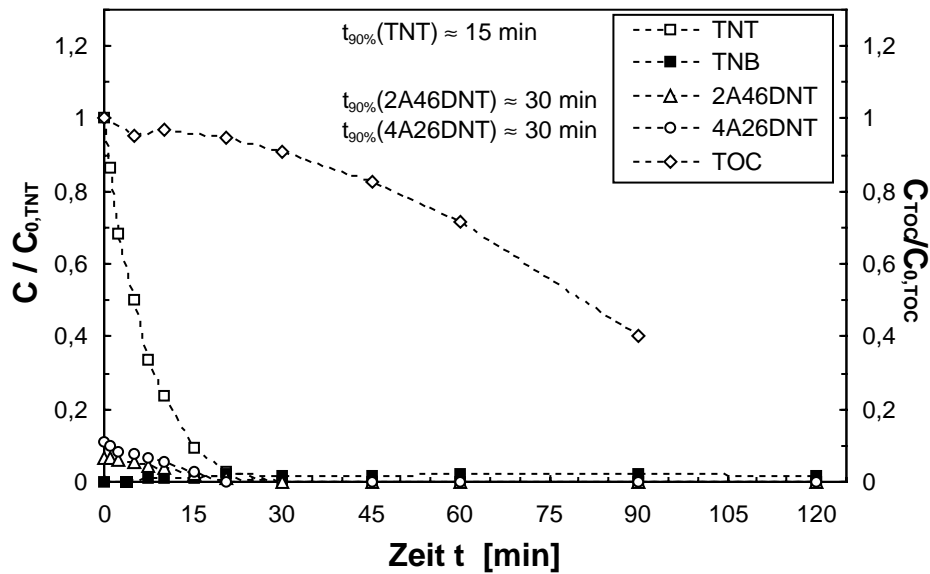


Abb. 13: Relative Konzentration ($c/c_{0,TNT}$) von TNT, 2A46DNT, 4A26DNT und TNB sowie die relative Konzentration des TOC ($c_{TOC}/c_{0,TOC}$) als Funktion der Bestrahlungszeit bei Prozessabwasser (Anlage-HgMD, $c_{zu}(H_2O_2) = 20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ (kontinuierlich von 0 bis 80 min), $\text{pH}_0 7,1$)

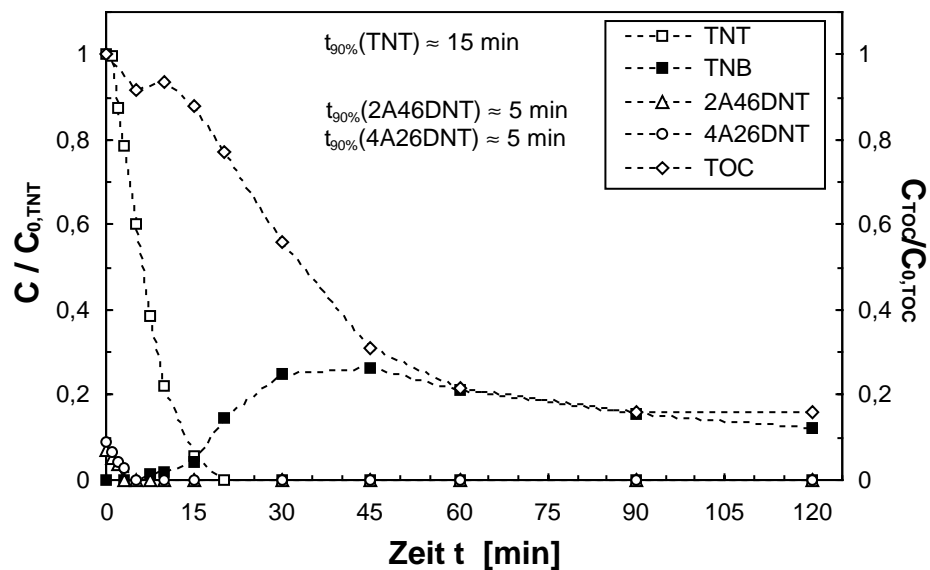


Abb. 14: Relative Konzentration ($c/c_{0,TNT}$) von TNT, 2A46DNT, 4A26DNT und TNB sowie die relative Konzentration des TOC ($c_{TOC}/c_{0,TOC}$) als Funktion der Bestrahlungszeit bei Prozessabwasser (Anlage-HgMD, $c_0(H_2O_2) = 20 \text{ mM}$, $\text{pH}_0 3$)

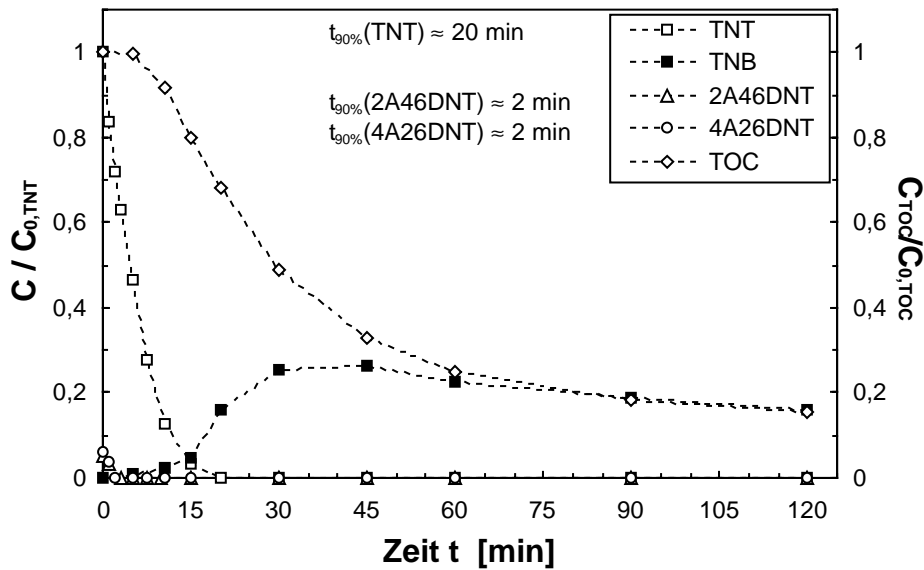


Abb. 15: Relative Konzentration ($c/c_{0,TNT}$) von TNT, 2A46DNT, 4A26DNT und TNB sowie die relative Konzentration des TOC ($c_{TOC}/c_{0,TOC}$) als Funktion der Bestrahlungszeit bei Prozessabwasser (Anlage-HgMD, $c_0(H_2O_2) = 20$ mM, $c_{zu}(Fe^{3+}) = 0,1$ mM, pH_0 3)

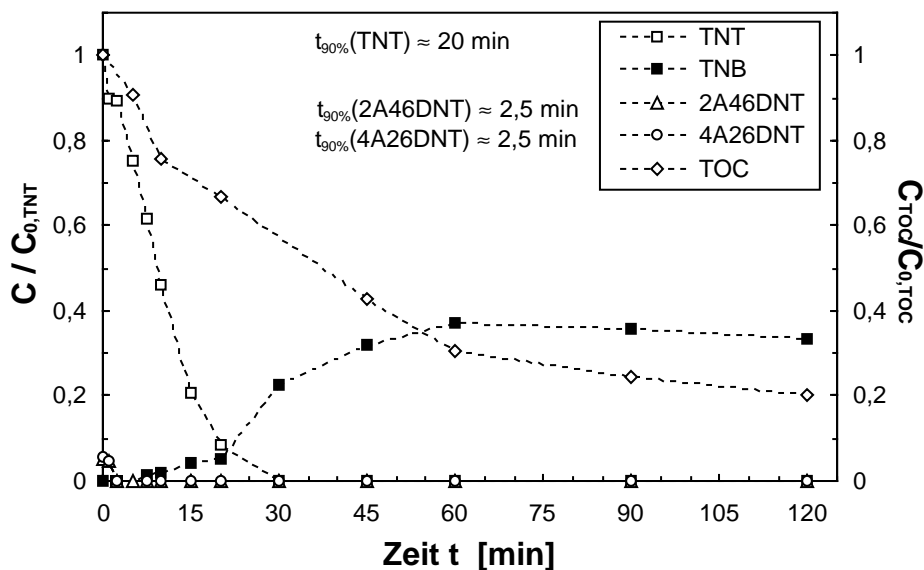


Abb. 16: Relative Konzentration ($c/c_{0,TNT}$) von TNT, 2A46DNT, 4A26DNT und TNB sowie die relative Konzentration des TOC ($c_{TOC}/c_{0,TOC}$) als Funktion der Bestrahlungszeit bei Prozessabwasser (Anlage-HgMD, $c_0(H_2O_2) = 20$ mM, $c_{zu}(Fe^{3+}) = 0,54$ mM, pH_0 3)

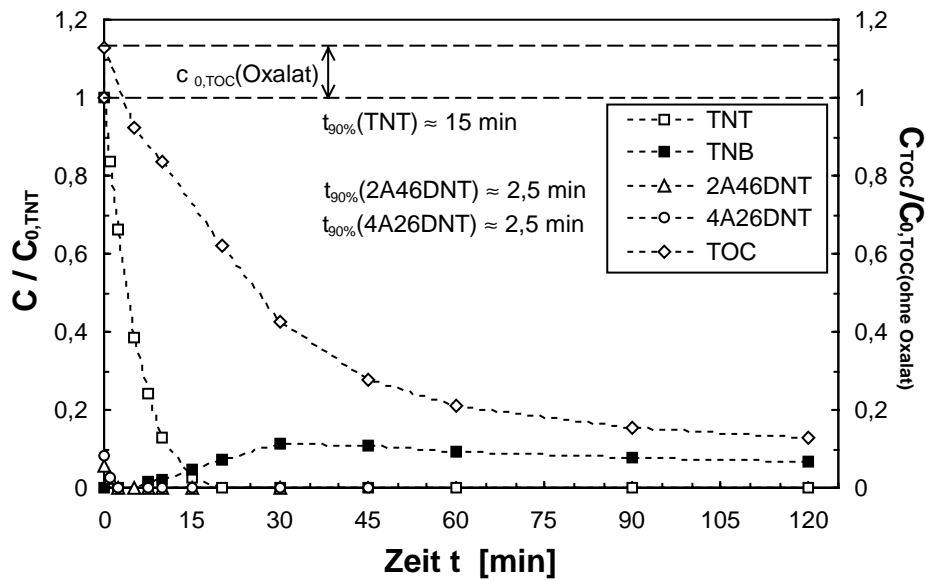


Abb. 17: Relative Konzentration ($c/c_{0,TNT}$) von TNT, 2A46DNT, 4A26DNT und TNB sowie die relative Konzentration des TOC ($c_{TOC}/c_{0,TOC}$) als Funktion der Bestrahlungszeit bei Prozessabwasser (Anlage-HgMD, $c_0(H_2O_2) = 20$ mM, $c_{zu}(Fe^{3+}) = 0,1$ mM, $c_0(C_2O_4^{2-}) = 0,45$ mM, $pH_0 = 3$)

5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei den untersuchten oxidativen photochemischen Aufbereitungsverfahren UV/ H_2O_2 -Prozess, Photo-Fenton-Prozess und Ferrioxalat-Prozess ein wesentliches noch unzureichend gelöstes Problem die Bildung von TNB in realen Wässern darstellt. Obwohl eine Minimierung der TNB-Bildung gelungen ist, scheint es nötig, weitere Verfahren zu entwickeln, um entweder die TNB-Bildung effektiv und vollständig zu unterdrücken, oder einen schnellen Abbau von TNB zu erreichen. Möglichkeiten könnten dabei reduktive Abbauprozesse bei der photochemischen Behandlung nitroaromaten-belasteter Wässer aufzeigen [23; 26; 27]. Intensive Untersuchungen wären hierfür jedoch nötig, wobei voraussichtlich nur die Kombination aus reduktiven und oxidativen Verfahren vielversprechend ist. Diese Kombination aus reduktiven und oxidativen Abbauprozessen spielen beispielsweise bei der Photokatalyse (ebenso bei der strahlenchemischen Behandlung) eine Rolle [23; 26; 27].

Danksagung

Die Untersuchungen wurden im Auftrag der Industrieverwaltungsgesellschaft (IVG) durchgeführt.

Wir danken dem Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) für die Finanzierung des Forschungsvorhabens.

Ali Amir-Hosseini, Karsten Theuerkauf und Stephan Vollmer danken wir für die sorgfältige experimentelle Arbeit.

Herrn André Dahn und seinen Mitarbeitern (Industrieanlagen-Betriebsgesellschaft mbH, Niederlassung Berlin) danken wir für das Projektmanagement.

6 Formeln und Abkürzungen

24DNT	2,4-Dinitrotoluol
2A46DNT	2-Amino-4,6-dinitrotoluol
4A26DNT	4-Amino-2,6-dinitrotoluol
c	Konzentration
c ₀	Anfangskonzentration
c _{CSB}	Konzentration des CSB
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
c _{TOC}	Konzentration des TOC
c _{zu}	zugegebene Stoffmenge pro Volumen
λ _{det}	Detektionswellenlänge
t _{90%}	Zeit bis zum 90%-igen Abbau
TNB	1,3,5-Trinitrobenzol
TNT	2,4,6-Trinitrotoluol
TOC	gesamter organischer Kohlenstoff

7 Eigene Veröffentlichungen und Diplomarbeiten

Amir-Hosseini, A. 1998. Photochemische Aufbereitung nitroaromatenbelasteter Abwässer. Wissenschaftliche Abschlußarbeit, TU Braunschweig.

Dillert, R. 1996. Oxidation von Nitro- und Aminoaromaten mit Wasserstoffperoxid, Anlage 6, p. 1-35. In: Entwicklung eines mikrobiologischen Sanierungsverfahrens, am Beispiel des ehemaligen Sprengstoffwerkes "Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld, Schlußbericht nach 9.2 NKFT 88 FZ 14 507 91

8 Literaturverzeichnis

1. **Andrews, C. C.** 1980. Photooxidative treatment of TNT contaminated wastewaters. Weapons Quality Engineering Center - Naval Weapons Support Center, Crane, Indiana; Report WQEC C-80-137 (AD A084684).
2. **Bruns-Nagel, D., J. Breitung, E. von Löw, K. Steinbach, T. Gorontzy, M. Kahl, K.-H. Blotevogel, und D. Gemsa.** 1996. Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene in aerobic soil columns. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2651 - 2656.
3. **Bruns-Nagel, D., J. Breitung, K. Steinbach, D. Gemsa, K.-H. Blotevogel, und E. von Löw.** 1996. Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau sprengstoffspezifischer Nitroaromaten in aeroben Bodenperkolationsanlagen. *gwf-Wasser/Abwasser.* **137**: 192 - 198.
4. **Bruns-Nagel, D., O. Drzyzga, K. Steinbach, T. C. Schmidt, E. von Löw, T. Gorontzy, K.-H. Blotevogel, und D. Gemsa.** 1998. Anaerobic/ aerobic composting of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil in a reactor system. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 1676 - 1679.
5. **Burlinson, N. E., M. E. Sitzmann, L. A. Kaplan, und E. Kayser.** 1979. Photochemical generation of the 2,4,6-trinitrobenzyl anion. *J. Org. Chem.* **44**: 3695 - 3698.
6. **Buxton, G. V., C. L. Greenstock, W. P. Helman, und A. B. Ross.** 1988. Critical reviews of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms, and hydroxyl radicals in aqueous solution. *J. Phys. Chem. Ref. Data.* **17**: 513 - 586.
7. **DeBerry, D. W., A. Viehbeck, und D. Meldrum.** 1984. Basic mechanisms of explosive compounds in wastewater. SumX Corporation, Austin, Texas, Report DRXTH-TE-CR-84279 (AD A141703).
8. **Dillert, R.** 1996. Oxidation von Nitro- und Aminoaromaten mit Wasserstoffperoxid, Anlage 6, p. 1-35. *In: Entwicklung eines mikrobiologischen Sanierungsverfahrens, am Beispiel des ehemaligen Sprengstoffwerkes "Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld, Schlußbericht nach 9.2 NKFT 88 FZ 14 507 91, vorgelegt durch die Industrieanlagenbetriebsgesellschaft mbH, Berlin 1997.*
9. **Dillert, R., G. Sagawe, und D. Bahnemann.** Chemisch-oxidative Behandlung von Prozesswässern aus der biologischen Bodenbehandlung, p. E1 - E39. *In: Verbundvorhaben Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten. Tagungsband zum 4. Statusseminar am 7. Mai 1998 in Clausthal-Zellerfeld. CD-ROM, ISBN 3-88135-326-7*
10. **Dillert, R., J. Huppatz, A. Renwranz, U. Siebers, und D. Bahnemann.** Light-induced degradation of nitroaromatic compounds in aqueous systems: Comparison between titanium dioxide photocatalysis and Foto-Fenton reactions. *J. AOTs.* (zur Veröffentlichung angenommen)
11. **Dillert, R., U. Siebers, A. Renwranz, und D. Bahnemann.** 1998. Oxidation von Nitro- und Aminoaromaten mit Wasserstoffperoxid, p. G1 - G35. *In: Verbundvorhaben Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten. Tagungsband zum 3. Statusseminar am 26. und 27. Februar 1997 in Berlin. Umweltbundesamt Fachgebiet III 3.6 (PT AWAS). Berlin.*
12. **Fang, X., X. Pan, A. Rahmann, H.-P. Schuchmann, und C. von Sonntag.** 1995. Reversibility in the reaction of cyclohexadienyl radicals with oxygen in aqueous solution. *Chem. Eur. J.* **1**: 423 - 429.

13. **Gorontzy, T., T. Raber, und K.-H. Blotevogel.** 1998. Anaerobe Extraktion in Perkolations Säulen. p. F1 - F16. In Verbundvorhaben Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten. Tagungsband zum 3. Statusseminar am 26. und 27. Februar 1997 in Berlin. Umweltbundesamt Fachgebiet III 3.6 (PT AWAS). Berlin.
14. **Ho, P. C.** 1984. Degradation mechanisms of 2,4-dinitrotoluene in aqueous solution (Photooxidation studies). Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN; Final report AMXTH-TE-TR-85001 (AD A150956).
15. **Ho, P. C.** 1986. Photooxidation of 2,4-dinitrotoluene in aqueous solution in the presence of hydrogen peroxide. *Environ. Sci. Technol.* **20**: 260 - 267.
16. **Kahl, M. W., T. Gorontzy, und K.-H. Blotevogel.** 1996. Reinigung TNT-kontaminierter Böden durch anaerobe Prozessführung. *gwf-Wasser/Abwasser.* **137**: 140 - 146.
17. **Kaplan, L. A, N. E. Burlinson, und M. E. Sitzmann.** 1975. Photochemistry of TNT: Investigation of the Pink Water Problem, Part II. Explosives Chemistry Branch - Naval Surface Weapons Center, White Oak, Silver Spring, Maryland; Report NSWC/WOL/ TR 75-152.
18. **Li, Z. M., M.M. Peterson, S.D. Comfort, G.L. Horst, P.J. Shea, und B.T. Oh.** 1997. Remediating TNT-contaminated soil by soil washing and Fenton oxidation. *Sci. Tot. Environ.* **204**: 107 - 115.
19. **Li, Z. M., P.J. Shea, und S.D. Comfort.** 1997. Fenton oxidation of 2,4,6-trinitrotoluene in contaminated soil slurries. *Environ. Eng. Sci.* **14**: 55 - 66.
20. **Li, Z. M., P.J. Shea, und S.D. Comfort.** 1998. Nitrotoluene destruction by UV-catalyzed Fenton oxidation. *Chemosphere.* **36**: 1849 - 1865.
21. **Li, Z. M., S.D. Comfort, und P.J. Shea.** 1997. Destruction of 2,4,6-trinitrotoluene by Fenton oxidation. *J. Environ. Qual.* **26**: 480 - 487.
22. **Mabey, W. R., D. Tse, A. Baraze, und T. Mill.** 1983. Photolysis of Nitroaromatics in aquatic systems. I. 2,4,6-Trinitrotoluene. *Chemosphere.* **12(1)**: 3-16.
23. **Nahen, M., D. Bahnemann, R. Dillert, und G. Fels.** 1997. Photocatalytic degradation of trinitrotoluene: reductive and oxidative pathways. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry.* **110**: 191-199.
24. **Noss, C. I., und R. H. Chyrek.** 1984. Tertiary treatment of effluent from Holston AAP (Army Ammunition Plant) industrial liquid waste treatment facility. 4. Ultraviolet radiation and hydrogen peroxide studies: TNT, RDX, HMX, TAX, and SEX. US Army Medical Bioengineering Research and Development Laboratory, Fort Detrick, Frederick, MD; Report USAMBRDL-TR-8308 (AD A141135).
25. **Peyton, G. R., O. J. Bell, und M. H. Lefavre.** 1997. Kinetic modeling for process optimization during the free-radical treatment of nitro compounds in aqueous solution. *J. Adv. Oxid. Technol.* **2**: 424 - 434.
26. **Peyton, G. R., O. J. Bell, E. Girin, und M. H. Lefavre.** 1995. Reductive destruction of water contaminants during treatment with hydroxyl radical processes. *Environ. Sci. Technol.* **29**: 1710-1712.

27. **Schmelling, D. C., K. A. Gray, und P. V. Kamat.** 1996. Role of Reduction in the Photocatalytic Degradation of TNT. *Environ. Sci. Technol.* **30**: 2547-2555.
28. **Simmons, M. S. und R. G. Zepp.** 1986. Influence of humic substances on photolysis of nitroaromatic compounds in aqueous systems. *Wat. Res.* **20**: 899 - 904.
29. **Sonntag von, C.** 1995. Chemische Grundlagen der Oxidationsverfahren und neuere Erkenntnisse bei der Bildung von Zwischenprodukten. *In* Tagungsband der 2. Fachtagung "Nassoxidative Abwasserbehandlung " CUTEC-Schriftenreihe, 20.. A. Vogelpohl. Clausthal-Zellerfeld.
30. **Sörensen, M., G. Sagawe, und F.H. Frimmel.** 1996. Influence of Irradiation Wavelength on the Photochemical Degradation of Aromatic Sulfonates. *Vom Wasser.* **87**: 335-343.
31. **Sörensen, M., U. Tanner, G. Sagawe, und F.H. Frimmel.** 1996. Photochemical Degradation of Hydrophilic Xenobiotics in UV/H₂O₂-prozess. Influence of Humic Matter on the Degradation Rate of 2-Amino-1-naphthalenesulfonate and Ethylenediaminetetraacetate. *Acta hydrochim. hydrobiol.* **24(3)**: 132-136.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.2 Verbundvorhaben 3: Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten

9.2.5 Technikumsversuche zur Optimierung und zum scale up der Sanierungsverfahren (TV 3.1.4)

Dr. Ralf Winterberg

Plambeck ContraCon GmbH
Peter-Henlein-Str. 2-4
27472 Cuxhaven

Förderkennzeichen: 14507911

Laufzeit: 01.06.1996 – 31.03.1999

1 Zusammenfassung und Zielsetzung

Das Ziel der Arbeiten dieses Projektes war die Auswahl geeigneter Entwicklungsansätze der beteiligten Universitäten Marburg und Oldenburg zur Sanierung von Standorten der Militärproduktion und des Militärbetriebes (vgl. Kapitel 9.2.2 (TV 3.1.1) und 9.2.3 (TV 3.1.2) des Leitfadens). Ausgewählte Verfahrenskonzepte sollten verfahrenstechnisch optimiert und im Hinblick auf ein scale up weiterentwickelt werden. Die Untersuchungen erfolgten mit Bodenmaterial des ehemaligen Sprengstoffwerkes "Tanne" (Clausthal-Zellerfeld), das mit Trinitrotoluol (TNT) und anderen Nitroaromaten kontaminiert war.

Die Entwicklung eines preisgünstigen Sanierungsverfahrens beruht auf folgenden Voraussetzungen:

- Der Boden wird detoxifiziert.
- Das Wiederverwertungsspektrum des behandelten Bodens ist möglichst weit.
- Das Verfahren ist ökonomisch attraktiv.

Diese Voraussetzungen sollen durch die folgenden Eigenschaften des Verfahrens gewährleistet werden:

- Durch die Minimierung des Prozeßwassergehaltes des behandelten Bodens soll als Technologie die verfahrenstechnisch einfache und zuverlässige dynamische Miete in leicht modifizierter Form eingesetzt werden können. Technisch aufwendige und kostenintensive Anlagen sowie die kostenintensive Bodenentwässerung entfallen bei Anwendung dieser Technik.
- Die Minimierung der Konzentrationen organischer Substrate oder anderer Zuschlagstoffe soll ein möglichst weites Wiederverwertungsspektrum des Bodens gewährleisten. Die strukturellen Eigenschaften des Bodens sollen möglichst wenig verändert werden.

Die Verfahren sollten zur Behandlung von Böden mit Nitroaromatenkonzentrationen von ca. 250 bis 2.500 mg/kg TS eingesetzt werden.

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

Mineralisierung von Nitroaromaten. Zahlreiche Untersuchungen zur biologischen Behandlung von Sprengstoffen behandeln die Mineralisierung der Schadstoffe. Gelingt die vollständige oder weitgehende Mineralisierung (z. B. analog der Umsetzung von BTX-Aromaten oder Mineralölkohlenwasserstoffen), sind Überlegungen zum Langzeitverhalten des behandelten Bodens nicht erforderlich. Die Mineralisierung des TNT gelang jedoch bisher in Bodensystemen in nur unerheblichem Ausmaß. In Ansätzen zur bakteriellen Umsetzung von Trinitrotoluol in Böden, in Flüssigkulturen oder in Kompostierungsansätzen konnte radioaktiv markierter TNT-Kohlenstoff nur zu wenigen Prozentanteilen in der Form des Kohlendioxid nachgewiesen werden. Selbst in optimierten Laborsystemen konnte eine nennenswerte bakterielle Mineralisierung des Trinitrotoluol bis heute nicht sicher nachgewiesen werden. Lediglich Pilze waren in der Lage, in Flüssigkulturen höhere Anteile (maximal ca. 40 %) des radioaktiv markierten TNT-Kohlenstoffs als Kohlendioxid freizusetzen [4; 8]. In

Bodensystemen waren derart hohe Mineralisierungsgrade aber auch dann nicht nachweisbar, wenn die Kultivierungsbedingungen auf das Wachstum von Pilzen abgestimmt waren.

Immobilisierung von Nitroaromaten. Auf Grund der unvollständigen Mineralisierung von Trinitrotoluol in Böden stehen zur Zeit die mikrobiologischen Immobilisierungsverfahren im Mittelpunkt der Entwicklung biologischer Verfahren der Sanierung sprengstoffkontaminierter Böden. Die Untersuchungen zur Umsetzung von TNT hatten wiederholt gezeigt, daß im Verlauf der TNT-Transformation eine Einbindung von Metaboliten erfolgte, die mit einer Detoxifizierung verbunden war. Diese Beobachtung wurde systematisch zu biologischen Immobilisierungsverfahren ausgebaut, die mittlerweile interessante Alternativen zu nicht biologischen Verfahren darstellen. Die mikrobielle Transformation des TNT wurde intensiv untersucht und in Reaktionsmodellen dargestellt, die in mehreren Literaturübersichten ausführlich beschrieben werden [6; 11]. Allgemein geht man von einer sukzessiven Reduktion der Nitrogruppen des TNT zu Aminogruppen aus. Es wird vermutet, daß die Aminogruppen für die Einbindung der TNT-Transformationsprodukte in die Bodenmatrix verantwortlich sind. Die Einbindungsreaktionen werden als Humifizierungsprozesse beschrieben, die exakte chemische Natur der gebildeten Produkte ist bislang nicht aufgeklärt. Erste Ergebnisse zur Charakterisierung der chemischen Eigenschaften dieser Stoffe sowie ihr Langzeitverhalten unter verschiedenen Umweltbedingungen liegen bereits vor (s. Kapitel 9.4 des Leitfadens).

Verfahren zur biologisch induzierten Immobilisierung von Nitroaromaten. Die bisher entwickelten Kompostierungsverfahren sowie die auf der Aktivität von Pilzen beruhenden Verfahren haben den erheblichen Nachteil der signifikanten, mit der Einengung des Verwertungsspektrums verbundenen Veränderung der Bodenstruktur. Außerdem ist das Problem der nicht vollständigen Immobilisierung von Metaboliten der TNT-Transformation nicht gelöst [3].

Das durch Lenke et al. [7] entwickelte und bereits im Pilotmaßstab erprobte [10] anaerob/aerobe Reaktorverfahren hat diese Nachteile nicht. Es basiert jedoch auf der Reduktion des TNT zum Triaminotoluol (TAT), die auf Grund der relativ langsamen Transformation der Diamino-Nitrotoluole zum TAT [7] zu einer langen Sanierungsdauer führt. Zudem ist die Bildung des TAT auf sehr geringe Redoxpotentiale angewiesen, die sich unter technischen Bedingungen nur in einer Suspension oder Bodenaufschlammung erreichen lassen. Der hohe Wassergehalt erfordert aber die kostenintensive Trennung des Wassers vom Boden vor der aeroben Behandlung oder spätestens vor der Bodenwiederverwertung.

Seit 1993 verfolgt die Universität Marburg einen ebenfalls anaerob/aeroben Ansatz, in dem der Boden jedoch nicht suspendiert wird, sondern während der anaeroben Phase lediglich staunäß gehalten und während der anschließenden aeroben Phase analog der Kompostierung belüftet wird. Das Verfahren ist daher als *2-Phasen-Kompostierung* oder *anaerob/aerobe Kompostierung* veröffentlicht worden [1; 2]. Ein wesentlicher Unterschied zum o. g. Suspensionsverfahren liegt in der Art der typischen Zwischenprodukte der TNT-Transformation: Nicht Triaminotoluol (TAT) ist das typische und angestrebte Zwischenprodukt, sondern Amino-Dinitrotoluole sowie Diamino-Nitrotoluole. Dem Verfahren liegt die Hypothese zugrunde, daß auch diese Zwischenprodukte irreversibel immobilisiert werden können.

Die Arbeiten der Plambeck ContraCon GmbH konzentrierten sich auf die Weiterentwicklung dieses Verfahrens der Universität zu einem anaerob/aeroben dynamischen Mietenverfahren, das eine Bodenbearbeitung mit Standardgeräten der Landwirtschaft, der Kompostierung oder des Tiefbaus gestattet und das somit preisgünstig eingesetzt werden kann.

Chemie und Biologie der Immobilisierung. Das dynamische Beetverfahren beruht auf der in Abb. 1 dargestellten Transformation des TNT zu Amino-Dinitrotoluolen (ADNT) und Diamino-Nitrotoluolen (DANT) unter anaeroben Bedingungen und der anschließenden Immobilisierung dieser Produkte unter aeroben Bedingungen. Die mikrobiologischen und chemischen Teilreaktionen, die dem Immobilisierungskonzept zugrunde liegen, sind ausführlich beschrieben worden [5; 6; 11].

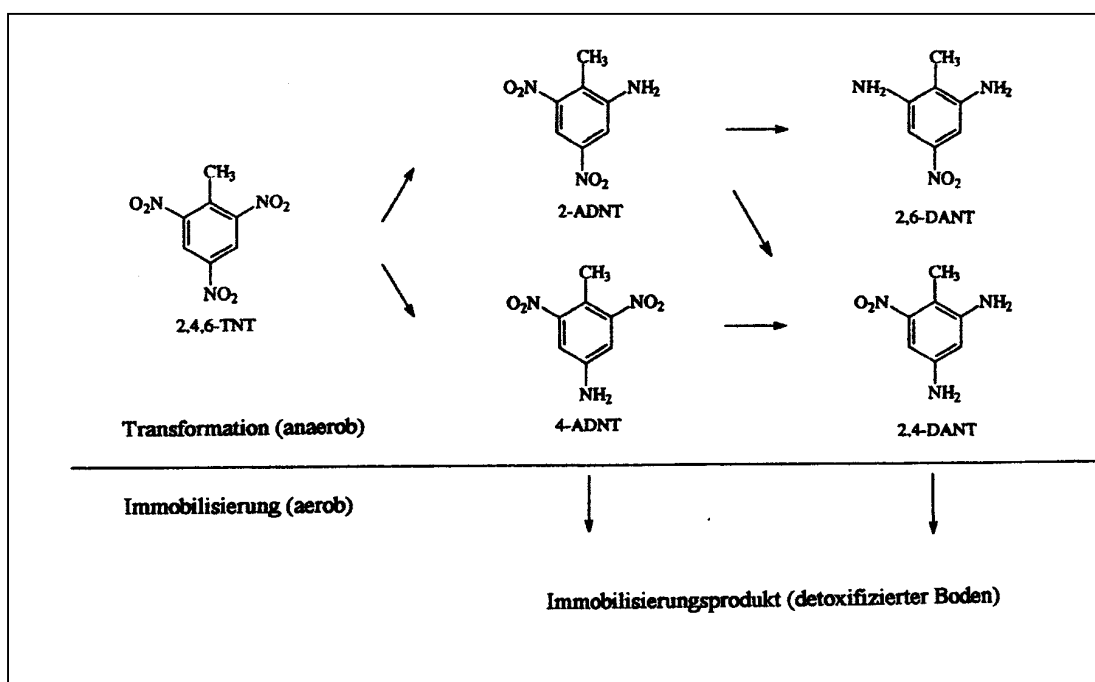


Abb. 1: Modellvorstellung der Immobilisierung von Nitroaromaten durch anaerob/aerobe Behandlung TNT-kontaminierter Böden

Die Untersuchung der Behandlung eines hoch mit TNT kontaminierten Bodens in Gegenwart hoher Substratkonzentrationen hat gezeigt, daß sich das angestrebte anaerob/aerobe Verfahrensprinzip realisieren läßt: Während der anaeroben Phase lag bei nahezu vollständiger TNT-Transformation der Wiederfindungsgrad der Nitroaromaten bei nahezu 100 %. Er sank erst während der aeroben Behandlung auf 1 %, so daß unter Berücksichtigung der nachgewiesenen Detoxifizierung die Immobilisierung der Nitroaromaten angenommen werden konnte. Diese saubere verfahrenstechnische Trennung zwischen der Transformation zu extrahierbaren und identifizierbaren Produkten unter anaeroben Bedingungen einerseits und der Senkung des Wiederfindungsgrades während der aeroben Phase andererseits war jedoch bei gering kontaminierten Böden nicht zu beobachten. Hier kam es bereits während der anaeroben Phase zu einer signifikanten Verringerung des Wiederfindungsgrades der Nitroaromaten (Daten im Ergebnisteil nicht dargestellt), ohne daß der Gesamterfolg der Bodenbehandlung nachweislich beeinträchtigt worden ist.

Es konnte wiederholt gezeigt werden, daß das beschriebene Verfahrenskonzept zu einer signifikanten, teilweise auch zur angestrebten vollständigen Detoxifizierung des kontaminierten Bodens führt. Bedeutend für die Akzeptanz eines Immobilisierungsverfahrens ist jedoch auch die möglichst weitgehende Charakterisierung der gebundenen Rückstände sowie der Nachweis eines unbedenklichen Langzeitverhaltens. Zu diesen Fragen liegen jedoch bisher kaum Erkenntnisse vor [6]. Weitergehende Untersuchungen, die die Verfahrensentwicklung begleiten, sind daher zu empfehlen.

3 Angewandte Methoden

Die Versuche im Technikumsmaßstab wurden vorwiegend in den unten beschriebenen Reaktoren durchgeführt. Versuche im Labormaßstab fanden während der gesamten Bodenbehandlung in 2-l-Weckgläsern bzw. 250 ml Braungläsern statt.

Zur Übertragung der Prozeßbedingungen einer großtechnischen Anlage in den Technikumsversuch wurden spezielle Glassäulenreaktoren (Spezialanfertigung, Fa. Glasgerätebau Ochs) mit einem Fassungsvermögen von 40 l entwickelt. Diese Reaktoren stellen den vertikalen Ausschnitt in der dynamischen Miete während der anaeroben Phase der Bodenbehandlung dar.

Zur Bodenbearbeitung während der anaeroben Phase wurde der Boden aus der Säule entnommen, in einer offenen Wanne intensiv durchmischt und anschließend wieder in die Säule überführt. Die Abb. 2 zeigt das Technikumsmodell ($h = 1,2 \text{ m}$, $d = 0,2 \text{ m}$).

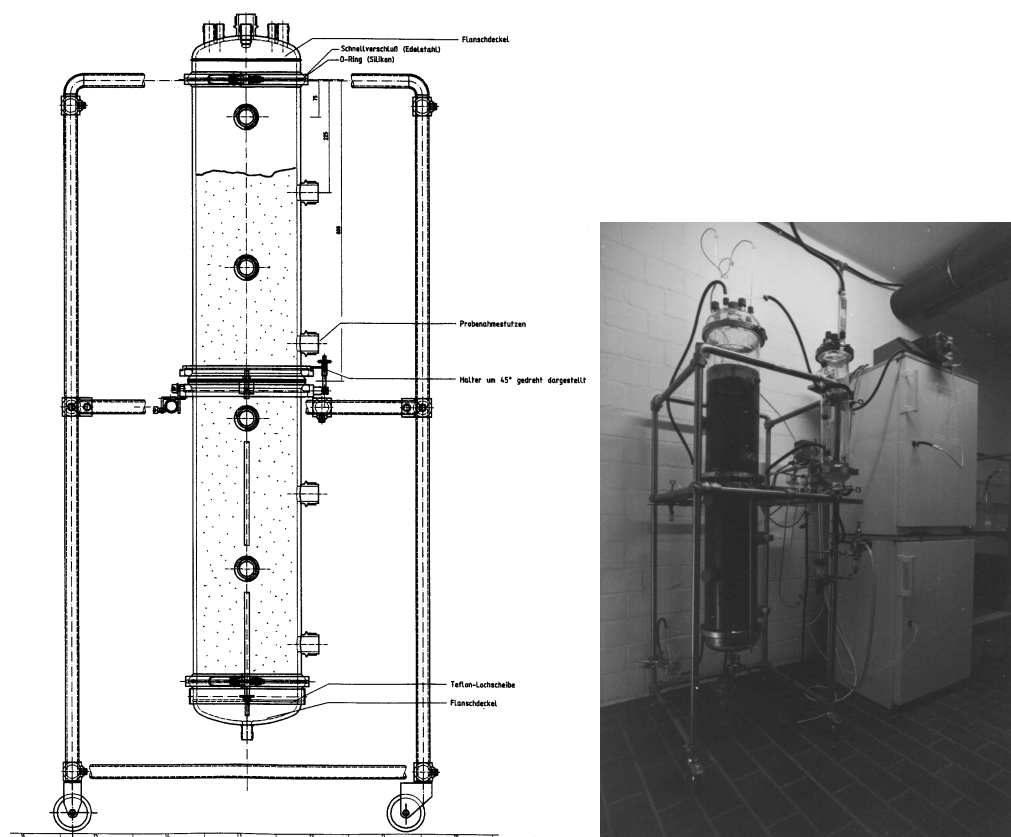


Abb. 2: Zeichnung und Foto des Glassäulenreaktors (anaerobe Behandlungsphase)

Als belüftete Reaktoren für die Bodenbehandlung während der aeroben Phase wurden selbst entwickelte Technikums-Kompostboxen verwendet. Sie bestehen jeweils aus einem 33-l-Plastikbehälter, der an allen Seiten mit einer 4 cm Styroporschicht isoliert ist. Für die Belüftung wurde im Deckel des Behälters ein Zu- und Abluftschlauch verlegt. Der Zuluftschlauch ist in einem im Boden befindlichen Kiesbett (Drainageschicht) eingebaut. Die Luft wird gleichmäßig durch das perforierte Schlauchende am Boden der Box verteilt. Die gleichmäßige Luftversorgung wird über einen Kompressor und einen Druckminderer gewährleistet. Um eine Abkühlung des Ansatzes während der aeroben Behandlung durch Verdunstung entgegenzuwirken, ist dem Druckminderer ein Luftbefeuchter nachgeschaltet, der die Luft bereits mit Wasser sättigt. Abbildung 3 zeigt die belüfteten Reaktoren.

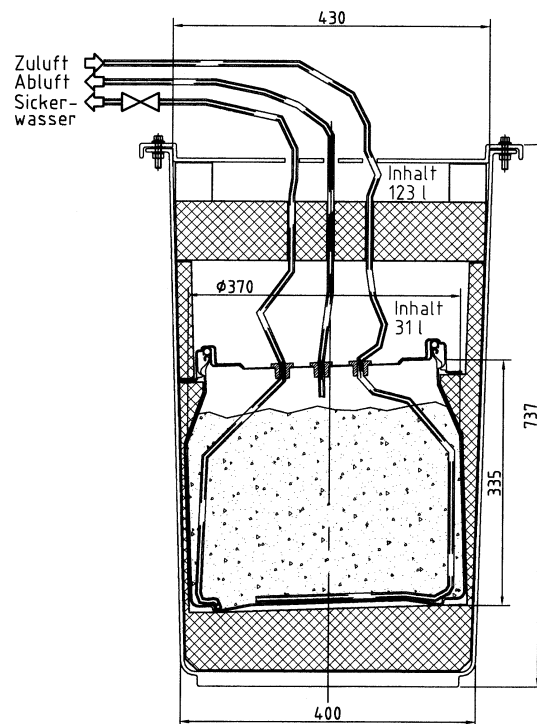


Abb. 3: Technische Zeichnung der Kompostbox (aerobe Behandlungsphase)

4 Ergebnisse und Diskussion

Auf der Basis der Ergebnisse des abgeschlossenen FuE-Projektes Entwicklung eines mikrobiologischen Sanierungsverfahrens am Beispiel des ehemaligen Sprengstoffwerkes "Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld (s. Kapitel 9.2.2 des Leitfadens) konzentrierten sich die Arbeiten der Plambeck ContraCon GmbH im Rahmen des hier beschriebenen Folgeprojektes nahezu ausschließlich auf den sehr erfolgversprechenden Ansatz der Universität Marburg, der als anaerob/aerobe Kompostierung bekannt geworden und durch die Plambeck ContraCon zum anaerob/aeroben dynamischen Mietenverfahren weiterentwickelt wird.

Das Entwicklungsziel, die Anpassung eines erfolgversprechenden Entwicklungsansatzes der Hochschulpartner an die Anforderungen der Sanierungspraxis, konnte erreicht werden. Das ausgewählte Verfahren führt im Labor- und Technikumsmaßstab innerhalb eines

praxisrelevanten Zeitraumes zur Detoxifizierung Trinitrotoluol (TNT)-kontaminierter Böden, ist in der großtechnischen Anwendung preisgünstig und läßt ein weites Bodenverwertungsspektrum zu.

Die erzielten Ergebnisse zeigen allerdings auch, daß der gewählte Versuchsmaßstab einen erheblichen Einfluß auf die erzielten Behandlungserfolge hat. Die Erprobung des Verfahrens in einem größeren Maßstab erschien daher zwingend notwendig, bevor ein großtechnischer Einsatz erfolgt. Sie wurde mittlerweile im Rahmen des BMBF-Verbundes 6 realisiert.

4.1 Verfahrensentwicklung

Das Verfahren bewirkt unter Substratzugabe und unter anaeroben Bedingungen die Transformation des TNT zu verfahrenstypischen Produkten, die in einer anschließenden aeroben Phase immobilisiert werden.

Die nicht haltbaren und nicht ganzjährig verfügbaren Substrate, die im Rahmen des vorangegangenen Projektes eingesetzt wurden, konnten durch ein handelsübliches, lagerbares Substrat ersetzt werden. Mit diesem Substrat wurden Böden mit geringen bis mittleren TNT-Konzentrationen (250-750 mg/kg TS) erfolgreich behandelt. Die TNT-Transformationsgrade erreichten Werte von bis zu 99,2 %, die Wiederfindungsgrade der Nitroaromaten konnten auf bis zu 1,1 % gesenkt werden. Die durchschnittliche Behandlungsdauer im Technikumsmaßstab betrug etwa 4 Monate. Auf der Basis des Leuchtbakterientests und des Kresse-Wachstumstests konnte eine sehr weitgehende, teilweise sogar vollständige Detoxifizierung der Böden nachgewiesen werden (auf der Basis der Eluate nach DIN 38414 S4).

Versuche, ähnlich gute Behandlungsergebnisse mit flüssigen Substraten zu erzielen, schlugen fehl.

Die erreichbaren TNT-Transformationsgrade und Immobilisierungsgrade der Nitroaromaten werden deutlich von der gewählten Substratkonzentration beeinflusst: Die besten Abbauleistungen wurden mit der höchsten untersuchten Substratkonzentration von 20 Gew.-% erzielt. Eine darüber hinausgehende Steigerung der Substratkonzentration dürfte zu einer weiteren Erhöhung der Transformations- und Immobilisierungsgrade führen.

Auch die Substratart hat einen signifikanten Einfluß auf die Abbauleistungen: Bei vergleichbaren Substratkonzentrationen lieferten Versuche mit verschiedenen Substrattypen sehr unterschiedliche Behandlungsergebnisse. Einzelne Substrate dürften jedoch aufgrund extremer Geruchsemissionen während der anaeroben Phase ausscheiden.

Mit steigender Bodenfeuchte werden die erreichten Transformations- und Immobilisierungsgrade erhöht. Dies ist sehr wahrscheinlich auf die erhöhte Bioverfügbarkeit der Schadstoffe zurückzuführen. Die Erhöhung der Bodenfeuchte wird jedoch durch die Notwendigkeit der mechanischen Bodenbearbeitung zwecks Homogenisierung und/oder Belüftung eingeschränkt. Die o. g. Behandlungsergebnisse wurden mit einem Boden erreicht, der mit Standardgeräten der Landwirtschaft, der Kompostierungstechnik oder des Tiefbaus bearbeitet werden kann.

Die durchgeführten Untersuchungen liefern deutliche Hinweise auf einen ausgeprägten Einfluß der während der aeroben Phase der Bodenbehandlung erreichten Bodentemperatur auf die Behandlungsergebnisse. Für eine nahezu vollständige Transformation und

Immobilisierung der Nitroaromaten scheint neben der hinreichend hohen Substratkonzentration auch eine hohe und möglichst lang anhaltende Erhitzung des Bodens notwendig zu sein. Einer beliebigen Verkleinerung von Modellsystemen des anaerob/aeroben dynamischen Mietenverfahrens sind damit Grenzen gesetzt.

4.2 Umweltauswirkungen

Durch die Sanierung sprengstoffbelasteter Böden durch Einsatz des anaerob/aeroben dynamischen Mietenverfahrens wird ein hoch toxischer Boden detoxifiziert und kann wiederverwertet werden. Langfristige Umweltbelastungen werden so verhindert. Die bei der Sanierung auftretenden Emissionen können durch gängige Maßnahmen des Umweltschutzes vermieden oder zumindest reduziert werden. Eine ganzheitliche Bewertung muß allerdings auch den Energieaufwand berücksichtigen, der für die Bodenbearbeitung benötigt wird.

4.3 Großtechnische Anlage

Die großtechnische Bearbeitung sprengstoffkontaminierter Böden soll mit einer möglichst weitgehenden Anlehnung an Standardverfahren der biologischen Bodenbehandlung oder der Kompostierung erfolgen, um eine wirtschaftliche Betriebsweise zu gewährleisten. Die Details der Verfahrensentwicklung im technischen Maßstab sind Gegenstand der Arbeiten des BMBF-Verbundes 6, Teilvorhaben 6.1.

4.4 Wirtschaftlichkeit

Auf der Basis der zur Zeit marktrelevanten Kalkulationsgrundlagen wurden für verschiedene hypothetische Sanierungsprojekte Richtpreisberechnungen für die Behandlung TNT-kontaminierter Böden vorgenommen. Transportkosten wurden beim Einsatz eines off site-Verfahrens nicht in die Kalkulation integriert. Für eine mikrobiologische Behandlung TNT-kontaminierter Böden mit dem dynamischen Mietenverfahren fallen, je nach Bodenmenge, TNT-Konzentration und Sanierungsort, Behandlungspreise von DM 115,- bis 195,- pro Tonne an. Unter günstigen Rahmenbedingungen dürften geringere Preise realisierbar sein.

5 Übertragbarkeit und Anwendung

Die angestrebte Dekontamination von Böden mit TNT-Kontaminationen von bis zu 2.500 mg/kg TS in einem praxisrelevanten Zeitraum ist nach den erzielten Ergebnissen möglich.

Nachzuweisen bleibt, daß die entstandenen gebundenen Rückstände auch bei Anwendung eines breiteren Spektrums toxikologischer und ökotoxikologischer Testorganismen als nicht toxisch eingestuft werden können und daß auch langfristig oder unter extremen Extraktionsbedingungen toxische Verbindungen nicht freigesetzt werden. Diese Untersuchungen werden zur Zeit durch verschiedene Forschungsinstitute parallel zur

Maßstabsgerechten Erprobung biologischer Verfahren (Kapitel 9.5 des Leitfadens (VV 6)) durchgeführt und durch Untersuchungen zur Strukturaufklärung ergänzt.

Im untersuchten Bereich der TNT-Konzentrationen in Böden von 100 bis 4.400 mg/kg TS (unter Einbeziehung der Ergebnisse der vorangegangenen Projektes [9]), wurde der erreichte Immobilisierungsgrad der Nitroaromaten offensichtlich stärker durch die gewählten Versuchsbedingungen, z. B. den Versuchsmaßstab, als durch die Höhe der TNT-Konzentration beeinflusst. Eine prinzipielle Grenze des Verfahrens hinsichtlich der TNT-Maximalkonzentration ist bei ca. 5.000 mg/kg TS also noch nicht erreicht.

Es ist allerdings zu erwarten, daß die erreichbare Zielkonzentration der Schadstoffe durch die Ausgangskonzentration beeinflusst wird. Dies kann z. B. durch die Belegung von Bindungsplätzen im behandelten Material bedingt werden. Eine TNT-Maximalkonzentration kann sich somit aus der tolerierten Restkonzentration der Nitroaromaten ergeben. Eine verlässliche Abschätzung der Möglichkeiten der biologischen Verfahren werden im konkreten Sanierungsfall nur auf der Basis einer Machbarkeitsstudie möglich sein. Dies gilt auch für die Behandlung von Böden, die andere als die hier untersuchten Schadstoffe enthalten.

Die angestrebte großtechnische Anlage soll eine wirtschaftliche Bodenbehandlung mit Geräten der Landwirtschaft, der Kompostierung oder des Tiefbaus ermöglichen. Sie unterscheidet sich damit nicht von herkömmlichen Anlagen zur biologischen Bodensanierung. Das Verfahrensfliießbild ist Abb. 4 zu entnehmen.

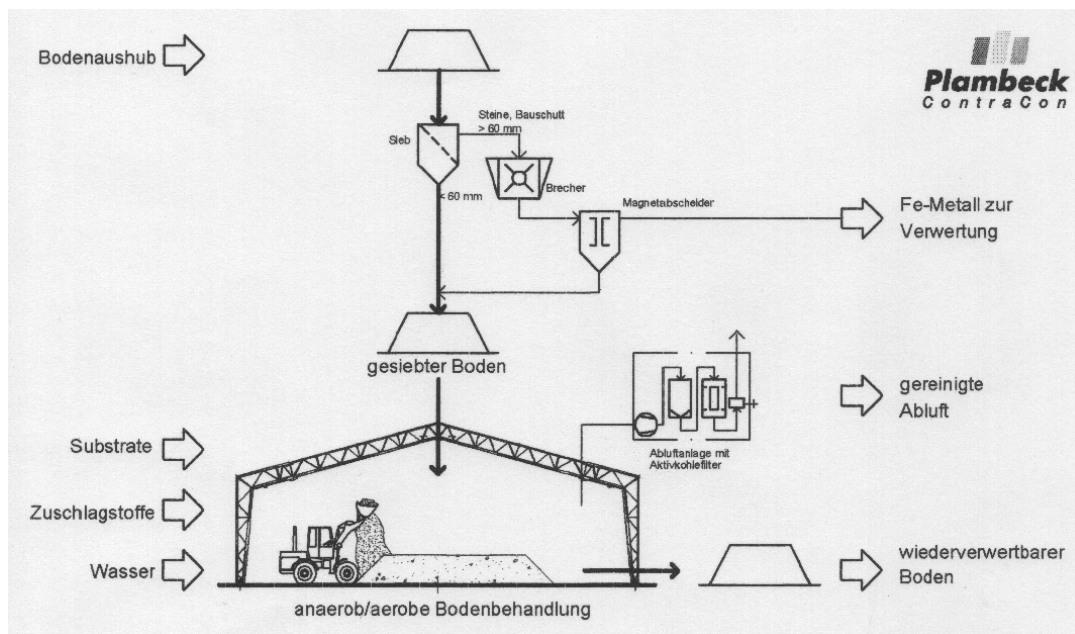


Abb. 4: Verfahrensfliießbild des anaerob/aeroben dynamischen Mietenverfahrens

Die für das scale-up notwendigen Anpassungen erfolgen im Rahmen der Maßstabsgerechten Erprobung biologischer Verfahren (Kapitel 9.5.2 des Leitfadens).

Bei der Anwendung des anaerob/aeroben dynamischen Beetverfahrens als on site-Sanierungsverfahren ist die Wiederverwertung des Bodenmaterials am Standort vorgesehen. Ist das Bodenmaterial off site in einem Bodenbehandlungszentrum saniert worden, bietet sich

das Bodenmaterial für Deponieabdeckungen, Grubenverfüllungen und Haldenrekultivierungen an. Da die Bodenstruktur durch die biologische Behandlung mit dem anaerob/aeroben dynamischen Mietenverfahren nicht signifikant verändert wird, kann das Bodenmaterial gegebenenfalls auch für den Wegebau oder die Anlage von Wällen verwendet werden.

6 Abkürzungen

2,4,6-TNT	2,4,6-Trinitrotoluol
2,4-DANT	2,4-Diamino-6-nitrotoluol
2,6-DANT	2,6-Diamino-4-nitrotoluol
2-ADNT	2-Amino-4,6-dinitrotoluol
4-ADNT	4-Amino-2,6-dinitrotoluol
BMBF	Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie
Gew.-%	Gewichtsprozent
TNT	Trinitrotoluol
TS	Trockensubstanz

7 Eigene Veröffentlichungen

Winterberg, R.; von Löw, E.; Held, T.: Dynamisches Mietenverfahren zur Sanierung von Rüstungsaltslasten. TerraTech 3, 1998, 39-41

8 Literatur

1. **Bruns-Nagel, D., J. Breitung, E. von Löw, K. Steinbach, D. Gemsa:** Bioremediation of soils contaminated with nitroaromatics, a residue of the former TNT production plant "Werk Tanne". Environmental restoration opportunities conference. München, 25.-27. Oktober 1994
2. **Bruns-Nagel, D., O. Drzyzga, K. Steinbach, T. C. Schmidt, E. von Löw, T. Gorontzy, K.-H. Blotvogel, D. Gemsa:** Anaerobic/aerobic composting of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil in a reactor system. Environ. Sci. Technol. 1998 32, 1676-1679
3. **Crawford, R. L.:** Biotreatment of nitroaromatic compounds. Tibtech 11, 1993, 5-6
4. **Eilers, A. und G. Gottschalk:** Using the white rot fungus *Bjerkandera adusta* for bioremediation of TNT-contaminated soils. Poster, "Gemeinsame Frühjahrstagung der VAAM und der GDHM", Hannover, 07.-09.03.1994 A

5. **Gorontzy, T., O. Drzyzga, M. W. Kahl, D. Bruns-Nagel, J. Breitung, E. von Löw, K.-H. Blotevogel:** Microbial Degradation of explosives and related compounds. *Critical Reviews in Microbiology* 20 (4), 1994, 265-284
6. **Held, T.:** Möglichkeiten zur mikrobiellen Sanierung explosivstoffkontaminierter Böden. in: *Handbuch Rüstungsaltslasten*, D. Martinetz, G. Rippen (Hrsg.), ecomed, 1996
7. **Lenke, H., G. Daun, D. Bryniok:** Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten. *Spektrum der Wissenschaft* 10, 1993, 106-108
8. **Stahl, J. D., S. D. Aust:** Metabolism and detoxification of TNT by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Comm.* 192, 477-482
9. **Stoffers, H., R. Winterberg:** Entwicklung eines mikrobiologischen Sanierungsverfahrens am Beispiel des ehemaligen Sprengstoffwerkes "Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld. Teilprojekt: Übertragung der Erkenntnisse der Grundlagenforschung des mikrobiologischen TNT-Abbaus auf Modelluntersuchungen unter Berücksichtigung der Erfordernisse eines technischen Sanierungsverfahrens. Abschlußbericht zum BMBF-Pojekt, Förderkennzeichen 14 507 91, 1996
10. **Warrelmann, J., H. Lenke, G. Daun, U. Walter, K. Hund, H.-J. Knackmuss:** Mikrobiologische Sanierung Explosivstoff-kontaminierter Böden. *Terratech* 2, 1996, 44-47
11. **Yinon, J.:** Toxicity and metabolism of explosives. CRC Press, Boca Raton, 1990

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.2 Verbundvorhaben 3: Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten

9.2.6 Entwicklung eines Kompostierungsverfahrens mit Pilzen. - Bilanzierung und Qualitätskontrolle – (TV 3.3)

Dr. A. Spreinat

Dr. A. Eilers
Dipl. Biol. N. Sabbarth
Dr. H.-J. Abken

WISSTRANS Umwelt GmbH
Am Leinekanal 4; 37073 Göttingen

Förderkennzeichen: 1450779/A

Laufzeit: 01.07.1996 - 30.06.1998

1 Zusammenfassung und Zielsetzung

Das Ziel des Forschungsvorhabens war die quantitative und qualitative Erfassung der Produkte, die durch biologische Aktivität im Bodensystem aus TNT entstehen können. Neben der chemischen Analytik sollte der Boden nach der biologischen Behandlung auch toxikologisch beurteilt werden, so daß bei einer abschließenden Bewertung des Verfahrens alle von den Schadstoffen ausgehenden Effekte berücksichtigt werden können.

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

Die toxische Wirkung von TNT auf Mikroorganismen ist in einer Vielzahl von Arbeiten beschrieben worden. So wurde für Algen (*Chlamydomonas spec.*) eine toxische Konzentration von 2,5 ppm ermittelt. Mit Hilfe des Ames-Tests wurden Rasterschub-mutationen bei *Salmonella typhimurium* festgestellt. Bei vielen Mikroorganismen konnte eine inhibierende Wirkung von TNT bei Konzentrationen von 50 ppm beobachtet werden [28; 16]. In einer Liste der Environmental Protection Agency (USA) mit den 129 gravierendsten Kontaminationen unserer Umwelt sind sieben Nitroaromaten aufgeführt [16].

Untersuchungen zur Verstoffwechslung von TNT ließen die Reduktion zumindest einer der Nitrogruppen als ubiquitär erscheinen. Neben der Entstehung von Amino-Dinitrotoluol und Diamino-Nitrotoluol wurden auch Azoxy- oder Azoverbindungen als Dimerisierungsprodukte nachgewiesen [14]. Mit Hilfe von radioaktiv markiertem TNT konnte ein vollständiger Abbau zu CO₂ durch den Weißfäulepilz *Phanaerochaete chrysosporium* nachgewiesen werden [10]. Mit diesem Weißfäulepilz wurde auch der Abbau von weiteren Xenobiotika, wie z. B. DDT [4]; PAK [11] oder auch PCP [21] beobachtet.

Konkrete Anwendungen dieser Erkenntnisse waren zu Beginn der Arbeiten teilweise noch nicht bekannt, obwohl die U. S. Army schon zu diesem Zeitpunkt Kompostierungen durchführte, diese aber noch nicht veröffentlichte.

3 Angewandte Methoden

Bei der Behandlung von Rüstungsaltslasten durch Weißfäulepilze wird ihre Fähigkeit, Nitroaromaten unter Verwendung ihres ligninolytischen Enzymsystems cometabolisch abzubauen, genutzt. So wurde für den Weißfäulepilz *Bjerkandera adusta* die Fähigkeit zum vollständigen Abbau von 2,4,6-Trinitrotoluol nachgewiesen [7].

Für den Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* konnte gezeigt werden, daß der initiale Angriff des TNT über die Intermediate Nitrosodinitrotoluol und Hydroxylamino-dinitrotoluol zu den beiden Isomeren des Aminodinitrotoluol verläuft [19] und daß durch die Reduktion der zweiten Nitrogruppe isomere Formen des Diaminonitrotoluols entstehen. Die Reduktion der zweiten Nitrogruppe erfolgt erst nach Einführung einer "Schutzgruppe", einem Formylrest an der Aminogruppe, so daß das Intermediat 2-Amino-4-Formamido-Nitrotoluol entsteht [20]. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, daß dieses Intermediat das Substrat für die Lignin-Peroxidase darstellt. Demgegenüber berichten BUMPUS und TARTARKO [5], daß

4-Hydroxyl-amino-2,6-Dinitrotoluol, ein Intermediat der initialen TNT-Reduktion, ein Substrat für die Lignin-Peroxidase H8 darstellt.

Während in Flüssigkultur ein Großteil der Nitroaromaten durch Weißfäulepilze mineralisiert wird, konkurrieren im Bodensystem Mineralisierungs- und Humifizierungsreaktionen um die reduzierten Intermediate des TNT-Stoffwechsels. Zur umfassenden Beurteilung des Sanierungserfolges wurde unter Verwendung von radioaktiv markiertem TNT zunächst der Metabolismus des TNT in Flüssigkultur bilanziert. Anschließend erfolgte die Erfassung der Verteilung der bei der Metabolisierung von TNT durch Weißfäulepilze im Boden entstehenden Produkte auf verschiedene Bodenkomponenten und Eluate.

Um die Ergebnisse der Bilanzierung mit denen der chemischen Analytik und ökotoxikologischen Experimenten vergleichen zu können, wurden parallele Versuche mit unmarkiertem TNT durchgeführt. Beide Ansätze dienten auch zur Bestimmung der Langzeitstabilität der sanierten Böden mittels Perkolationsexperimenten und Langzeitinkubation bei wechselnden Temperaturen (Simulation des jahreszeitlichen Wechsels).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Schadstoffbilanzen

4.1.1 Bilanzierung des TNT-Stoffwechsels in Flüssigkultur

Untersuchungen zur Verstoffwechslung von TNT mit Hilfe der radioaktiv-markierten Verbindung waren nicht nur unternommen worden, um die vollständige Mineralisierung durch *Bjerkandera adusta* nachzuweisen, sondern auch um den Verbleib der nicht als $^{14}\text{CO}_2$ freigesetzten Radioaktivität zu klären. Um Weißfäulepilze für ein Sanierungsverfahren von TNT-Kontaminationen einsetzen zu können, mußte sichergestellt werden, daß das nicht mineralisierte TNT durch den Stoffwechsel festgelegt wurde und nicht in Form von toxischen „dead end“-Produkten zurückbleibt.

Die Weißfäulepilze wurden in 10-ml-Flüssigkulturen in Malzextrakt-Medium (20 g Malzextrakt pro l $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$) angezogen und mit $87 \mu\text{M}$ [^{14}C]TNT versetzt. Die Verteilung der Radioaktivität in den Kulturen sollte in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer beobachtet werden. Dazu wurden die Kulturen bei 30°C im Schüttelwasserbad bei 120 rpm (Radius: 2,5 cm) inkubiert. Die Zugabe der Radioaktivität erfolgte am 6. Inkubationstag. Die Kulturen wurden alle 3-4 Tage für 20 min mit einem Luftstrom von 50 ml/min begast, wobei die Abluft durch zwei Gefäße mit Szintillationsflüssigkeiten geleitet wurde, die zur Absorption flüchtiger organischer Verbindungen (Opti-Fluor) und $^{14}\text{CO}_2$ (Opti-Fluor/Carbo-Sorb; Verh. 5 : 2; Fa. Packard, Dreieich) dienten.

Entnommene Proben wurden vom Zeitpunkt der Probenahme an bis zur Extraktion bei -20°C gelagert. Die Nullprobe wurde sofort nach der Zugabe der Radioaktivität eingefroren. Zur Beurteilung der Radioaktivitätsverteilung in den Kulturen wurden diese jeweils einer apolar-organischen und einer polar-organischen Extraktion mit Hexan bzw. Dichlormethan unterzogen.

Nach dem Auftauen wurde hierzu das Myzelpellet in dem Kulturüberstand mit einem Ultra-Turrax bei 30000 rpm homogenisiert. Das Homogenisat wurde auf zwei verschließbare Röhrcen aufgeteilt. Zur apolar-organischen Extraktion wurde jeweils 1 ml Hexan zugesetzt, durch intensives Mischen auf dem Vortex extrahiert und zur Phasentrennung 5 min bei 2300 x g zentrifugiert. Die obere Hexanphase wurde abgenommen und die Extraktion einmal wiederholt. Die Hexanphasen wurden vereinigt. Zur polar-organischen Extraktion wurde die wässrige Phase in einen 100-ml Scheidetrichter überführt und der pH-Wert mit 6 N HCl von 5 auf 1,5 abgesenkt. Anschließend wurde 3 x mit 2 ml Dichlormethan ausgeschüttelt. Die homogenisierte Biomasse wurde von der wässrigen Phase durch Filtration über Glasfaser-Filter getrennt. Alle Extrakte einschließlich der Biomasse wurden nach der Extraktion quantifiziert.

Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden die organischen Phasen durch Stickstoff-Übergasung bis zur Trockene eingeengt und die Rückstände in jeweils 0,5 ml Methanol aufgenommen. Die wässrige Phase wurde uneingeengt eingesetzt. Die Aktivität von jeweils 50 µl Probe wurde in 5 ml Szintillationsflüssigkeit Optima-Gold für 2 min in einem Szintillationszähler (Fa. Packard, Dreieich) gezählt. Die Bestimmung der nicht-extrahierbaren Radioaktivität in der Biomasse erfolgte über die Quantifizierung von $^{14}\text{CO}_2$, das bei der Verbrennung des markierten Materials freigesetzt wird [1]. Die Verteilung der Radioaktivität wurde nach der Inkubation von 0, 12, 24 und 38 Tagen ermittelt, in denen 0, 13, 17 und 28 % der Radioaktivität als $^{14}\text{CO}_2$ freigesetzt wurden (s. Abb. 1.).

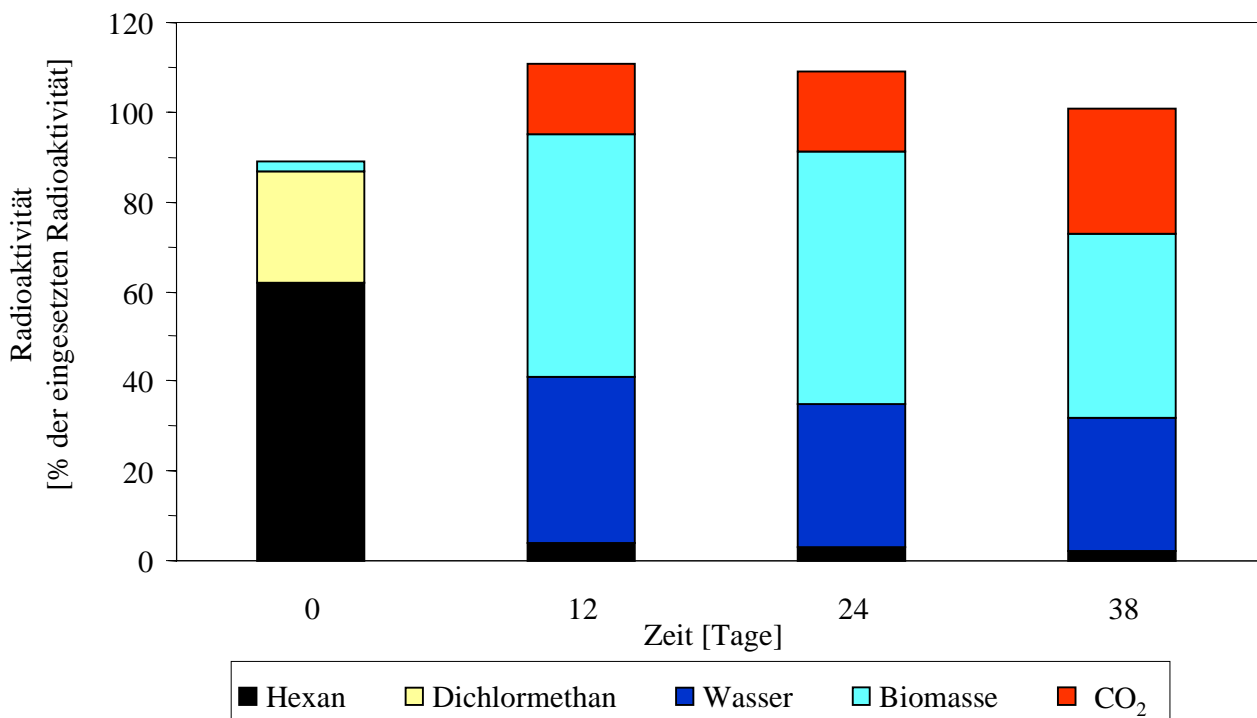


Abb. 1: Bilanzierung des [^{14}C]TNT-Stoffwechsels von *Bjerkandera adusta* in Flüssigkultur. Der Anteil an Radioaktivität wurde im Hexan- und Dichlormethan-Extrakt, in der wässrigen Phase und in der Biomasse bestimmt. Während der Inkubation wurde die Freisetzung von $^{14}\text{CO}_2$ gemessen.

Die Gesamtwiederfindungsraten in den Proben betragen 88,7 % bei der Nullprobe, 111,1 % nach 12 Tagen, 109,1 % nach 24 Tagen und 100,7 % nach 38 Tagen. Die Wiederfindung

weicht damit bei den Proben um bis zu 11 % von der eingesetzten Radioaktivität ab, was aber im Vergleich zu anderen Massenbilanzen mit Abweichungen bis zu 33 % [16; 21] durchaus akzeptabel ist und den Vergleich der Proben ermöglicht.

Hexan und Dichlormethan wurden zur Extraktion gewählt, da davon auszugehen war, daß das organische Substrat TNT im Zuge eines vollständigen biologischen Abbaus in die wäßrige Phase übergeht, so daß mit der organischen Extraktion mögliche „*dead end*“-Produkte erfaßt werden sollten.

Während in der Nullprobe 87,7 % der Radioaktivität in den organischen Extrakten nachweisbar waren und 1 % mit der Biomasse assoziiert war, konnte in den organischen Extrakten der inkubierten Kulturen nur maximal 3,9 % der Radioaktivität nachgewiesen werden. Es zeigte sich somit ein nahezu vollständiger Übergang der Radioaktivität von der organischen Phase in die Biomasse sowie zu polaren, wasserlöslichen Produkten und zu CO₂.

Trotz den nach 38 Tagen in der organischen Fraktion verbleibenden 2 % ist nicht von der Bildung von „*dead end*“-Produkten auszugehen, da dieser Anteil schon während des Versuchs von 3,9 % auf 2 % halbiert und damit weiter verstoffwechselt wurde. Ebenso zeigte sich bei den Anteilen in der Biomasse und der wäßrigen Fraktion während des beobachteten Zeitraumes eine leichte Abnahme, die auf die zunehmende Freisetzung von CO₂ zurückzuführen war.

4.1.2 Bilanzierung der Metabolisierung des TNT im Boden durch Weißfäulepilze

Es wurden luftdicht abschließende Fermenter konstruiert, die begasbar sind und deren Abluft zur Erfassung flüchtiger radioaktiv markierter Metabolite direkt durch Szintillationsflüssigkeit geleitet wurde (s. 4.1.1.). 100 g Boden wurde mit ringmarkiertem ¹⁴C-TNT dotiert und mit unmarkiertem TNT auf eine Endkonzentration von 300 mg/kg TS gebracht. Zwecks Strukturverbesserung wurde der Boden zudem mit autoklavierten, feuchten (5 g; ca. 35 % TS) Buchenholzspänen versetzt.

Zur Simulation von Alterungsprozessen wurde der Boden nach dem Dotieren für 2 Wochen bei 4 °C im Dunkeln gelagert, da die Einflüsse durch biologische Prozesse unter diesen Bedingungen minimiert werden.

Zum Versuchsstart wurden 10 g eines Pilz/Stroh-Inokulums mittig in einer Lage in den Boden geschichtet. Es wurden jeweils vier Fermenter mit *Bjerkandera adusta* auf Stroh und mit sterilem Stroh (zur Kontrolle der Auswirkungen der Zugabe von Weißfäulepilzen) angesetzt. Zur Untersuchung der Stabilität bei -18 °C wurde ein Kontrollansatz, der dotierten Boden ohne weitere Zusätze enthielt, für die gesamte Behandlungszeit eingefroren. Die Kulturen wurden einmal wöchentlich für 40 min mit synthetischer Luft mit 5 ml/min belüftet wobei die Abluft zur Erfassung der gasförmigen, radioaktiven Metabolite durch zwei mit verschiedenen Szintillationsflüssigkeiten gefüllten Röhrchen geleitet wurde (s. 4.1.1.).

Zum Ende der einjährigen Behandlung wurden jeweils 10 g Boden (TS) aus den Reaktoren und zwei Proben à 10 g aus der -18 °C Kontrolle aufgearbeitet. Um die Unterschiede zwischen frisch dotiertem und bei -18 °C gelagertem, dotierten Boden zu ermitteln, wurde ein Kontrollboden direkt vor der Extraktion mit ¹⁴C-TNT versetzt.

Zur Beurteilung des Überganges der Radioaktivität vom ^{14}C -TNT (geringe Löslichkeit in Wasser) vor der Behandlung zu leicht metabolisierbaren, polaren Produkten wurde eine Extraktion der Böden mit Acetonitril durchgeführt, bevor wässrig eluiert wurde. Anschließend erfolgte eine weitere Auftrennung in eine Huminsäure- und eine Fulvinsäurefraktion sowie eine aus Mineralboden und unlöslichen organischen Komponenten bestehende Fraktion.

Vor der Durchführung der Bilanzierung wurden die Unterschiede zwischen einer Extraktion durch Inkubation mit dem doppelten Volumen Wasser auf einem Über-Kopf-Schüttler und einer 20minütigen Ultraschallbehandlung untersucht. Durch wiederholtes Extrahieren wurde die Zahl der Schritte, die zur erschöpfenden Extraktion der Radioaktivität nötig sind, ermittelt. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Experimente ergab sich für die Bilanzierung das folgende Extraktionsschema:

- Gefriertrocknen des Bodens für 24 h.
- Einfüllen von 10 g (TS) Boden in Schraubdeckelflaschen.
- Dreimalige Extraktion mit 20 ml Acetonitril für 20 min im Ultraschallbad, jeweils anschließend Zentrifugation bei 2000 x g für 5 min (Swing-out-Rotor; Glas-Zentrifugenröhrchen); Vereinigen der Überstände, Einengen mittels Rotationsverdampfer.
- Gefriertrocknen des Bodens für 12 h.
- Dreimalige Extraktion mit 20 ml Wasser für 20 min im Ultraschallbad, jeweils anschließend Zentrifugation bei 2000 x g für 5 min (Swing-out-Rotor; Glas-Zentrifugenröhrchen); Vereinigen der Überstände, Einengen mittels Rotationsverdampfer.
- Milde Präparation der Humin- und Fulvinsäuren durch dreimalige Inkubation des Pellets mit 50 ml 0,2 N NaOH und Abtrennung vom übrigen Bodenmaterial (Mineralboden und unlösliche organische Bestandteile) durch Zentrifugation bei 2000 x g für 5 min (Swing-out-Rotor; Glas-Zentrifugenröhrchen); Aus den erhaltenen Überständen wurden die Huminsäuren durch Ansäuern auf pH 1 ausgefällt und durch Zentrifugation pelletiert, während die Fulvinsäuren in Lösung blieben.
- Präparation der Humin- und Fulvinsäuren und anderer Alkali-labiler, organischer Verbindungen, die durch den vorigen Extraktionsschritt nicht erfaßt wurden durch dreimalige Inkubation des Pellets mit 50 ml 2 N NaOH und Aufarbeitung wie oben beschrieben.
- Gefriertrocknen des Bodens für 12 h.
- Freisetzung der Radioaktivität aus der festen Fraktion in Form von radioaktivem CO_2 durch Veraschung von jeweils 0,5 g der Fraktion mit Chromschwefelsäure für 1 h bei 130 °C und Absorption des CO_2 in 1 M NaOH.

Die Bestimmung der Radioaktivität in den Extrakten erfolgte durch Szintillations-zählung. Konnte aufgrund von Quenching-Effekten nicht der gesamte eingeeengte Extrakt eingesetzt werden, wurde ein Aliquot benutzt und die in der Messung erhaltene Radioaktivität entsprechend hochgerechnet. Die Huminpellets wurden vor der Bestimmung der Radioaktivität in 2 M NaOH resuspendiert.

Ergebnisse

Die Wiederfindungsrate der eingesetzten Radioaktivität lag bei durchschnittlich 93 %. In Abb. 2 ist die Verteilung der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen vor und nach der Behandlung mit *Bjerkandera adusta* und in den Kontrollen dargestellt.

Zur Bilanzierung wurde dem Boden 0,012 MBq/ kg Boden (TS) mit ¹⁴C ringmarkiertes TNT, das mit unmarkiertem TNT auf eine Endkonzentration von 300 mg/kg Boden (TS) gebracht worden war, eingesetzt. Es wurde als methanolische Lösung (30 mg TNT/ml Lösung) unter starkem Rühren jeweils auf 100-g-Portionen des Bodens aufgetropft.

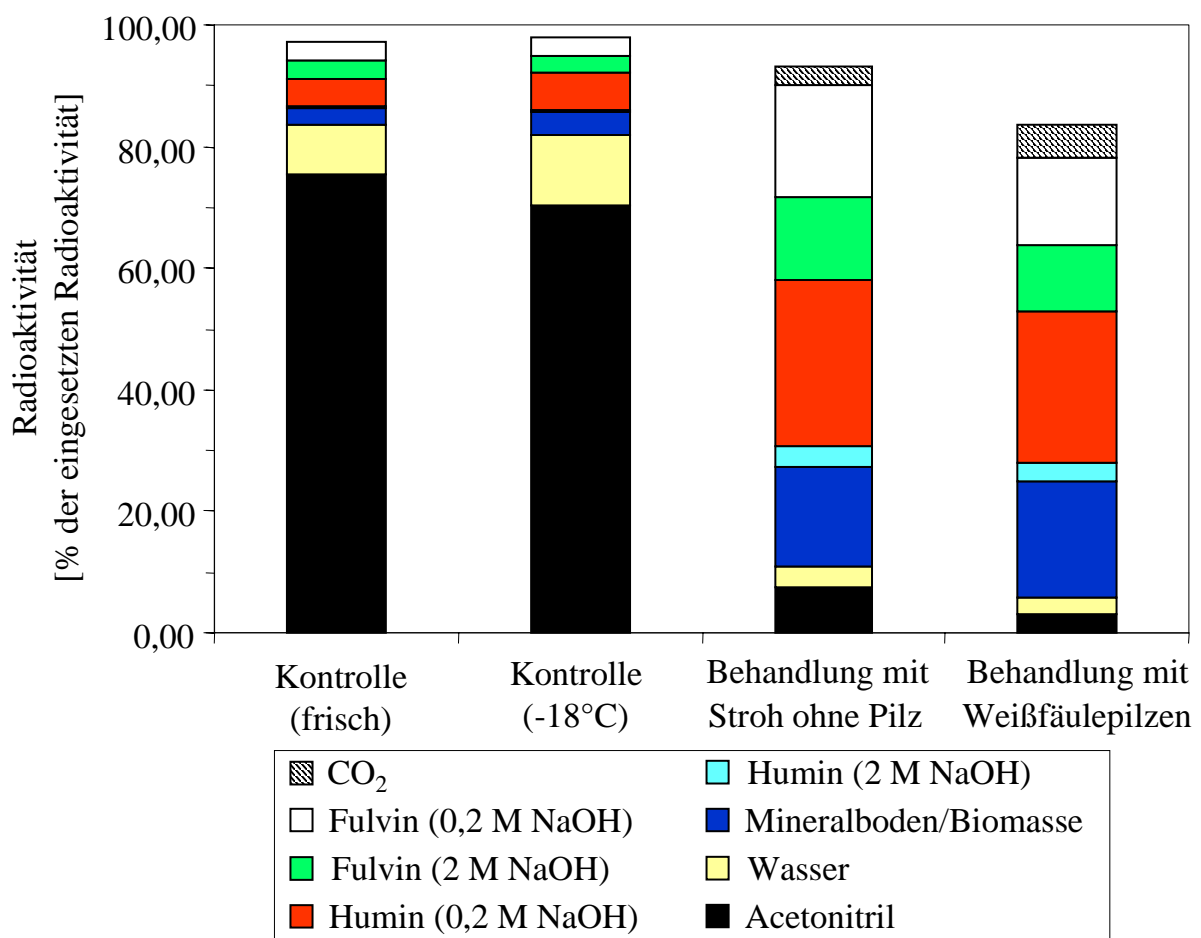


Abb. 2: Bilanzierung der Verteilung des mit ¹⁴C radioaktiv ringmarkierten TNT in dotierten Böden nach einjähriger Behandlung mit Weißfäulepilzen

Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels für 12 h unter dem Abzug wurde der Boden für die Behandlungen mit Stroh bzw. Pilz/Strohgemisch eingesetzt, bzw. bei -18 °C gelagert. Zur Überprüfung der Auswirkungen der Lagerung bei -18 °C wurde direkt vor der Bilanzierung eine Bodencharge wie oben beschrieben frisch angesetzt und direkt nach der Dotierung für 12 h gefriergetrocknet. Der Anteil der Radioaktivität wurde im Acetonitril-Extrakt, in der wässrigen Phase, in Humin- und Fulvinfraktionen, die durch Extraktion mit 0,2 M NaOH und

2 M NaOH erhalten wurden, und in der Biomasse bestimmt. Während der Inkubation wurde die Freisetzung von $^{14}\text{CO}_2$ gemessen.

Der unbehandelte, für ein Jahr bei $-18\text{ }^\circ\text{C}$ gelagerte Kontrollboden unterschied sich in seinem ^{14}C -TNT Bindungs- und Elutionsverhalten nicht wesentlich von der direkt vor der Extraktion frisch dotierten Kontrolle. Aus dem frisch dotierten Boden ließen sich mit Acetonitril 83 % und aus dem gelagerten Boden 81 % der eingesetzten Radio-aktivität extrahieren. Beim frisch dotierten Boden wurden 14 % der Radioaktivität innerhalb der zum Dotieren, Gefriertrocknen und Extrahieren nötigen Zeit an die unterschiedlichen Bodenfraktionen gebunden, eine Lagerung des Bodens bei $-18\text{ }^\circ\text{C}$ für ein Jahr erhöhte diesen Wert nur um 2 % auf 16 %. Hinsichtlich der Bindung von TNT an den Boden ist eine Lagerung bei $-18\text{ }^\circ\text{C}$ als unbedenklich einzustufen.

Diese Versuche erlauben allerdings keine direkten Rückschlüsse hinsichtlich der strukturellen Aufrechterhaltung des TNT-Moleküls, da bei Quantifizierung der Radioaktivität nicht zwischen TNT und seinen Metaboliten unterschieden werden kann. Da sich die während der Metabolisierung des TNT entstehenden Produkte durch eine gute Wasserlöslichkeit auszeichnen, läßt sich aufgrund der Beibehaltung der prozentualen Verteilung auf die Acetonitril- und Wasserfraktion allerdings indirekt auf den Erhalt des TNT-Moleküls schließen.

Vergleicht man den frisch dotierten Boden mit den behandelten Böden, so war eine drastische Reduktion der Eluierbarkeit der Radioaktivität erkennbar. In der mit Stroh supplementierten Kontrolle war nur noch 10 % der eingesetzten Radioaktivität mit Acetonitril und Wasser extrahierbar, in den mit Weißfäulepilzen behandelten Ansätzen nur noch 6 %. Die gesamte, verbleibende Radioaktivität ließ sich in den gebundenen Rückständen und als in Form von radioaktivem CO_2 freiwerdendem, gasförmigen Produkt nachweisen.

Die Menge der gebundenen Rückstände („bound residues“) wird durch den Anteil der Radioaktivität in der Huminsäure-, der Fulvinsäure- und der Mineralboden-/Biomasse-fraktion wiedergegeben. Zur Extraktion der Humin- und Fulvinsäuren aus dem Boden wurde zunächst eine 0,2 M NaOH-Lösung benutzt, mit der aus der Kontrolle 7 % der eingesetzten Radioaktivität extrahiert werden konnte. Unter Benutzung einer 2 M NaOH-Lösung wurden weitere 4 % der Radioaktivität aus dem Boden extrahiert. Durch die Veraschung des Bodens ließen sich weitere 3 % der Radioaktivität detektieren. Im frisch dotierten Boden waren bereits insgesamt 14 % der Radioaktivität aus dem ^{14}C -TNT festgelegt.

Für die mit sterilem Stroh versetzte Kontrolle ergab sich nach der Behandlung eine Immobilisierung von 79 %, bei einer Festlegung von 45 % der eingesetzten Radio-aktivität als mit 0,2 M NaOH extrahierbare Humin- und Fulvinbestandteile. Weitere 18 % waren durch 2 M NaOH extrahierbar, die restlichen 16 % lagen fest an den Mineralboden/Biomasse gebunden vor. Nach einer Behandlung mit Weißfäulepilzen ließen sich 72 % der eingesetzten Radioaktivität als gebundene Rückstände identifizieren, wobei 39 % auf die mit 0,2 M NaOH extrahierte Humin/Fulvinfraktion entfielen, 14 % mit 2 M NaOH extrahiert wurden und 19 % bei der Veraschung des Mineralbodens und der Biomasse freigesetzt wurden.

Der Einbau von Nitroaromaten in das Huminstoffgerüst konnte bereits anhand der Bindung von 2,4-Diamino-6-Nitrotoluol an Guaiacol, einer Modellsubstanz für Huminstoffe, durch eine Laccase unter Bildung eines Chinons gezeigt werden [6]. Für *Bjerkandera adusta* konnten außerdem durch die Oxidation des Farbstoffes Poly R-478 extrazelluläre oxidative

Enzymsysteme nachgewiesen werden [8], die den Einbau von TNT-Metaboliten in das Huminstoffgerüst katalysieren könnten.

Die Beteiligung von Bodenenzymen wurde auch bei der Entstehung von gebundenen Rückständen von Anilinen und phenolischen Komponenten dargelegt [23; 2]. HELD et al. [13] konnten keine Adsorption von TNT, 4-ADNT oder 2-ADNT an Huminsäuren anhand der Methode der Gleichgewichtsdialyse feststellen, bei der Kompostierung von TNT-kontaminiertem Boden wurde jedoch mit steigendem Anteil von Huminsubstanzen die Wiederfindung der löslichen Nitroaromaten geringer und damit die Bildung gebundener Rückstände größer. Die verlangsamte Mineralisierung von Schadstoffen im Boden aufgrund der Bildung von gebundenen Rückständen konnte auch von ESCHENBACH et al. [9] beobachtet werden.

Diese ähnlichen Ergebnisse wurden wahrscheinlich durch die autochthone mikrobielle Gemeinschaft des unsterilen Bodens verursacht. Durch Belüftung, Feuchtigkeit und Nährstoffzugabe in Form von Stroh konnten die Mikroorganismen des Standorts aktiviert und zur Metabolisierung des TNT veranlaßt werden, wie dies auch bei der Kompostierung von TNT-belasteten Böden möglich ist [15; 13]. Diese These wurde durch die Beobachtung von schwachem Bewuchs des ursprünglich sterilen Strohs durch Pilzmycel bei den Kontrollen bestätigt.

Bei der wöchentlichen Belüftung der Reaktoren wurde eine Analyse der Abluft auf gasförmige, radioaktive Metabolite durchgeführt. Während sich bei der Analytik auf organische Produkte keine Radioaktivität detektieren ließ, führte die Untersuchung auf radioaktives CO₂ bei allen Messungen zu signifikanten Werten. Insgesamt konnte so für die Kontrolle mit Stroh eine Freisetzung von 3 % der eingesetzten Radioaktivität nachgewiesen werden. Eine Behandlung mit Weißfäulepilzen führte zur Freisetzung von 6 % der Radioaktivität in Form von ¹⁴CO₂ im Verlauf eines Jahres.

4.1.2.1 Bestimmung von TNT und TNT-Metaboliten

Aufbau und Durchführung

Zur Bestimmung von TNT und TNT-Metaboliten in den methanolischen und wäßrigen Eluaten wurden die während der ersten Bilanzierung des TNT-Abbaus im Boden behandelten Böden benutzt. Die methanolischen und die wäßrigen Fraktionen wurden mittels HPLC auf TNT, 2-ADNT und 4-ADNT untersucht. Die methanolischen Extrakte konnten direkt eingesetzt werden, während Aliquots der wäßrigen Eluate eingeengt wurden, indem sie einer Gefriertrocknung unterzogen und anschließend in einem Methanol/Wassergemisch (25-60 % Wasser) aufgenommen wurden, so daß sich ein Konzentrationsfaktor von 1:20 ergab.

Ergebnisse

Wie anhand von Abb. 3 ersichtlich, fiel die TNT-Konzentration in der Methanolfraktion exponentiell um 98 % bei der Behandlung mit dem Pilz, aber auch bei den Kontrollen. Bei ADNT stiegen die Konzentrationen innerhalb der ersten 14 Tage auf 10-15 % der Ausgangskonzentration des TNT, um dann wieder leicht abzusinken.

In der wässrigen Fraktionen sank die TNT-Menge ebenfalls mit exponentiellem Verlauf auf 3 % des Ursprungswertes bei dem Ansatz mit Pilz und bei den Kontrollen. Die ADNT-Konzentrationen lagen in bezug auf die Ausgangskonzentration von TNT ebenfalls bei maximal 6-15 % und zeigten einen ähnlichen zeitlichen Verlauf wie bei den methanolischen Fraktionen (Daten nicht gezeigt).

Es konnte also eine effektive Eliminierung von wässrig bzw. organisch löslichem TNT und seiner Metabolite erreicht werden, wie dies auch schon bei den Experimenten zur Bodensanierung im Laborreaktor und in der Bodenmiete gezeigt wurde.

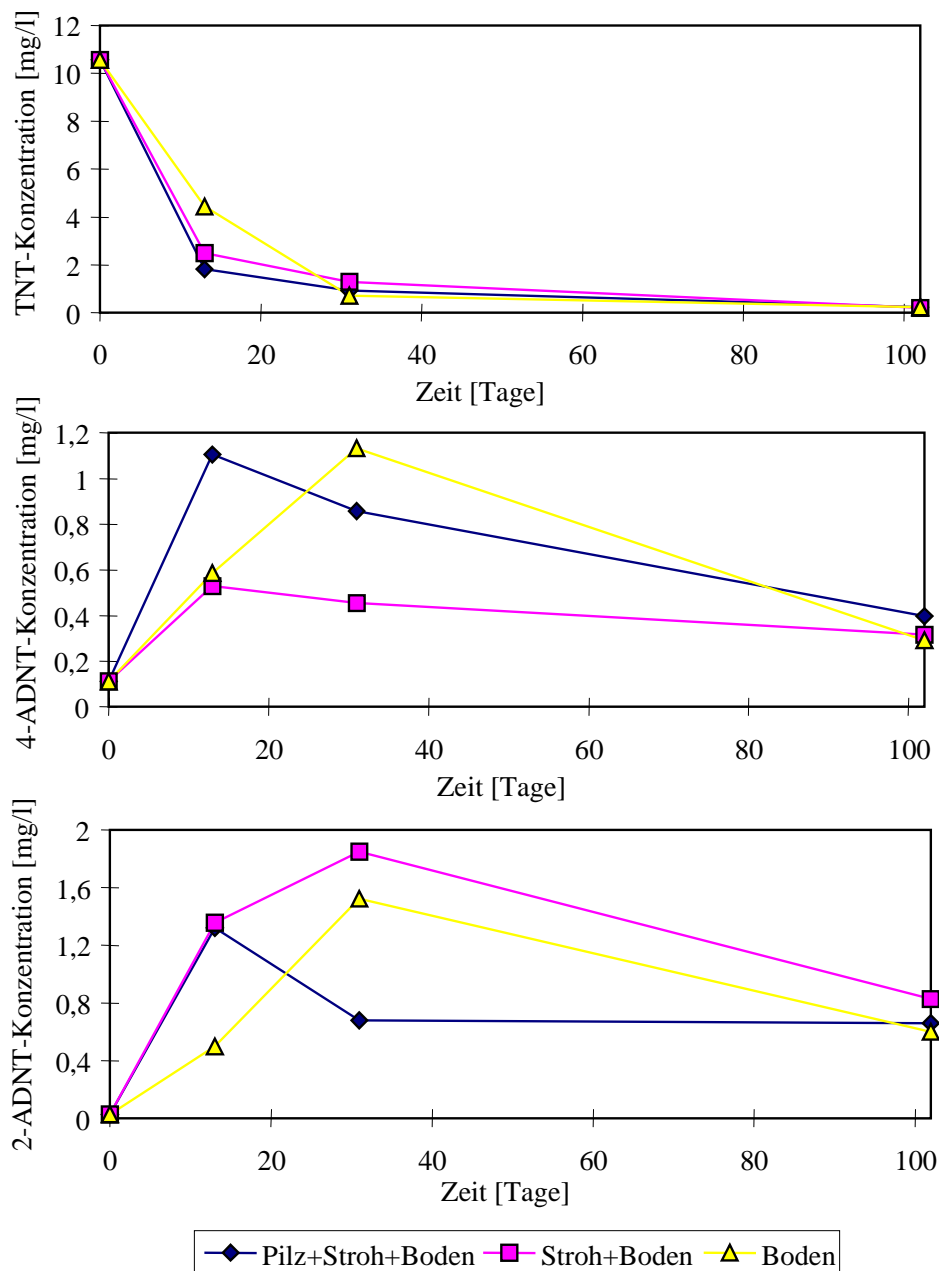


Abb. 3: Konzentration von TNT, 4-ADNT und 2-ADNT in der Methanolfraction, die bei der Bilanzierung des ^{14}C -TNT-Verbleibs in Bodenkultur erhalten wurde.

4.1.2.2 Elutionsprofile und Verteilung der Radioaktivität nach HPLC

Um mögliche weitere, unbekannte TNT-Metabolite zu identifizieren, wurden Proben der Methanolfraktion und der Wasserfraktion einer Analyse mittels HPLC unterzogen, das Eluat fraktioniert und die Radioaktivität der jeweiligen Fraktionen durch Szintillationszählung quantifiziert. Das Profil der Absorption bei 254 nm bei der Auftrennung der Bodeneluat durch HPLC konnte so mit dem Profil der eluierten Radioaktivität verglichen werden.

Aufbau und Durchführung

Aliquots der methanolischen Fraktionen wurden im Rotationsverdampfer bei 35° C eingengt, in Methanol gelöst in Fläschchen überführt und erneut unter Übergasung mit Stickstoff eingengt. Die so erhaltenen Rückstände wurden mit definierten Mengen Methanol wieder in Lösung gebracht. Es ergaben sich Konzentrationsfaktoren von 1:20 bis 1:170. Die wässrigen Fraktionen wurden zunächst gefriergetrocknet, in einem Wasser/Methanol-Gemisch resuspendiert und dann ebenfalls durch Übergasung mit Stickstoff eingengt, so daß sich Konzentrationsfaktoren bis zu 1:170 ergaben. Um eine optimale Auftrennung auch noch im Bereich längerer Retentionszeiten, also im Bereich großer bzw. polarer Substanzen zu erhalten, wurde in Vorversuchen der Säulentyp und die Stufen des Gradienten der Elution variiert. Für den besagten Zweck erwies sich eine RP-C-18-Säule mit Lichrospher-Material (5 µm Partikeldurchmesser, 100 mm Säulenlänge) als am besten geeignet.

Der Wasser/Methanol-Gradient hatte folgenden Verlauf:

1. 0-2 min von 40 % auf 49 % MeOH
2. 2-20 min 49 % MeOH
3. 20-40 min von 49 % auf 100 % MeOH
4. 40-45 min von 100 % auf 40 % MeOH

Ergebnisse

Wie aus Abb. 4 ersichtlich, lag zum Zeitpunkt Null der Inkubation in der methanolischen Fraktion der weitaus überwiegende Teil der Radioaktivität in Form von TNT (Peak bei 17 min) vor. Der Absorptionspeak mit einer Retentionszeit von 8,73 min wies keine erhöhte Aktivität auf. Es handelte sich bei der zu diesem Zeitpunkt detektierten Substanz also nicht um ein TNT-Derivat. Bei längeren Retentionszeiten (> 38 min) war ein leicht erhöhtes Niveau der Volumenaktivität zu finden und verschiedene Absorptionspeaks auszumachen, jedoch ließ sich kein Peak mit eindeutig verstärkter Radioaktivität identifizieren. Innerhalb der ersten 4 Minuten lag die Radioaktivität in den Eluaten ebenfalls höher, konnte aber keiner Absorptions-spitze zugeordnet werden, wie bei Vorversuchen mit anderen, den anfänglichen Bereich des Chromatogramms entzerrenden Elutionsgradienten festgestellt wurde.

Nach 102 Tagen konzentrierte sich beim Ansatz mit *Bjerkandera adusta* der Hauptanteil der Radioaktivität auf die Substanzen TNT, 4-ADNT und 2-ADNT (bei 16,38 min; 17,95 min; 18,88 min; s. Abb. 5). Weiterhin war ebenfalls bei kurzen (< 4 min) und längeren (> 38 min) Retentionszeiten eine Erhöhung der Radioaktivität festzustellen, die jedoch gleichfalls mit keinem Absorptionspeak erkennbar in Relation zu setzen war. Auch bei der Kontrolle (nur

Boden, Abb. 6) lag der Großteil der Aktivität in Form von TNT, 2-ADNT und 4-ADNT vor, während zwischen 4 und 10 min und zwischen 36 und 51 min eine leichte Anhebung erkennbar war, die aber nicht eindeutig einem einzelnen Peak zuzuordnen war. Bei dem großen, nach 23,28 min eluierenden Absorptionspeak handelte es sich aufgrund der fehlenden Radioaktivität im Eluat um keinen TNT-Metaboliten.

Insgesamt konnten also neben den meist zu findenden ADNTs [3] keine anderen TNT-Intermediate identifiziert werden. Bei den Peaks mit kurzen bzw. langen Retentionszeiten könnte es sich um polare bzw. große Substanzen handeln, die im Zuge der methanolischen Extraktion aus dem Boden herausgelöst wurden und zum Huminstoffgerüst gehören. Durch Einbau oder Adsorption von TNT/TNT-Metaboliten könnte die leicht erhöhte Radioaktivität dieser Stoffe erklärbar sein [17].

Bei wässrigen Fraktionen, die einer HPLC-Analyse mit Fraktionierung und Quantifizierung der Aktivität unterzogen wurden, ließ sich eine anteilmäßig größere Absorption bei kurzen (< 4 min) gegenüber längeren Retentionszeiten (> 38 min) feststellen, d. h. der Anteil polarer Substanzen im Eluat war größer. Aber auch in den wässrigen Fraktionen konnten neben den ADNTs keine weiteren TNT-Metabolite anhand der Verteilung der Radioaktivität in den Fraktionen nach der Auftrennung durch HPLC gefunden werden.

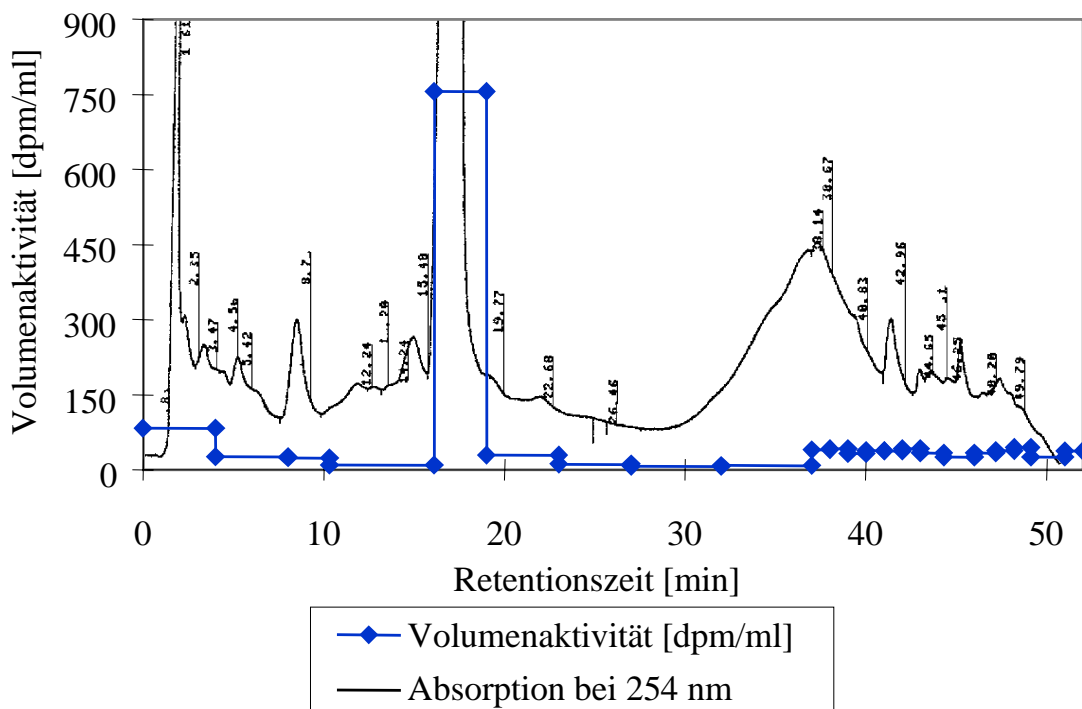


Abb. 4: HPLC-Elutionsprofil und Verteilung der Radioaktivität im Methanol-Extrakt einer Bodenkultur von *Bjerkandera adusta* nach 0 Tagen Inkubation.

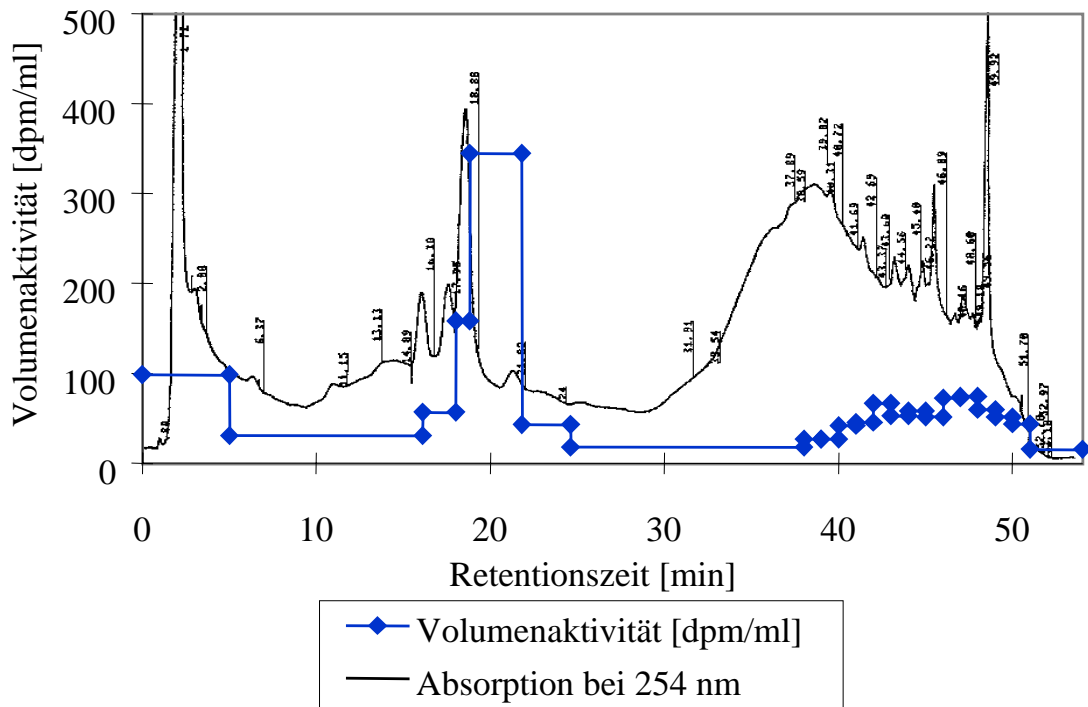


Abb. 5: HPLC-Elutionsprofil und Verteilung der Radioaktivität im Methanol-Extrakt einer Bodenkultur von *Bjerkandera adusta* nach 102 Tagen Inkubation

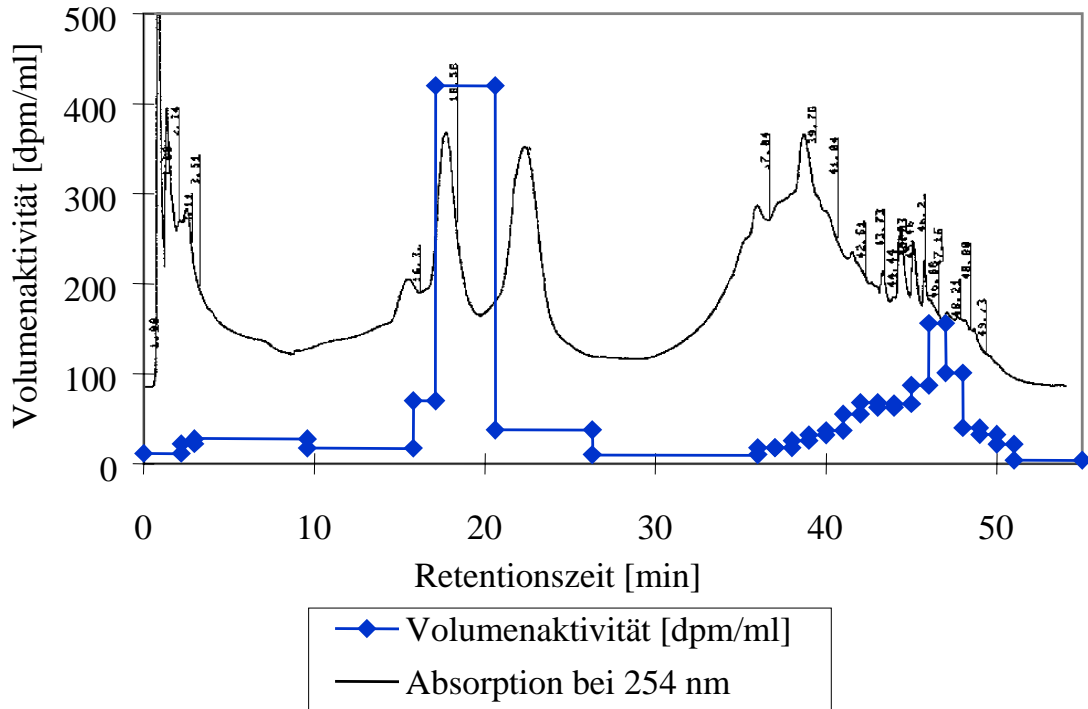


Abb. 6: HPLC-Elutionsprofil und Verteilung der Radioaktivität im Methanol-Extrakt einer Bodenkultur (Kontrolle, nur Boden) nach 102 Tagen Inkubation.

4.2 Qualitätssicherung des sanierten Bodenmaterials

4.2.1 Sanierung durch vollständige Metabolisierung oder Immobilisierung

Wie aus den Ergebnissen des Teilvorhabens 5.1 (Kapitel 9.4.1 des Leitfadens) hervorgeht bzw. wie bekannt ist [12], adsorbieren Schadstoffe bzw. TNT/TNT-Metabolite an Huminsäuren, Fulvinsäuren und an andere unlösliche organische Bestandteile des Bodens oder lagern sich in unzugängliche Feinstporen ein, so daß nicht extrahierbare Rückstände entstehen. Eine zentrale Frage zur Beurteilung eines Sanierungserfolges ist, ob die Xenobiotika im Zuge des natürlichen Ab- und Umbaus des Huminstoffgerüsts wieder freigesetzt werden können. Dabei können Temperaturschwankungen, wechselnde Feuchtigkeitsgrade des Bodens u. a. Einfluß auf diese Alterungsprozesse haben.

4.2.1.1 Perkolationsexperimente

Entsprechend dem Teilvorhaben 5.1 wurden einzelne Reaktoren eingesetzt, die mit 100 g ^{14}C -TNT dotiertem Boden und einem Pilz/Stroh-Inokulum sowie nur mit sterilem Strohs substrat zur Kontrolle beschickt worden waren. Die Reaktoren wurden für einen Zeitraum von 150 Tagen regelmäßig einmal pro Woche für 40 min mit 5 ml/min belüftet. Nach Abschluß der Behandlung wurden jeweils 10 g (TS) des Bodens in Perkulationsröhrchen gefüllt, in denen der Boden für 28 Tage mit 100 ml Wasser berieselt wurde. Um die Möglichkeit der Extraktion durch Perkolation mit organischem Lösungsmittel zu untersuchen, wurden Kontrollexperimente mit Acetonitril angesetzt. Durch Verdunstung verloren gegangene Flüssigkeitsmengen wurden täglich ergänzt. Nach 1, 7, 14, 21 und 28 Tagen erfolgte eine Probenahme aus der Perkulationsflüssigkeit mit anschließender Detektion der aus dem Boden eluierten Radioaktivität mittels Szintillationszählung (Abb. 7).

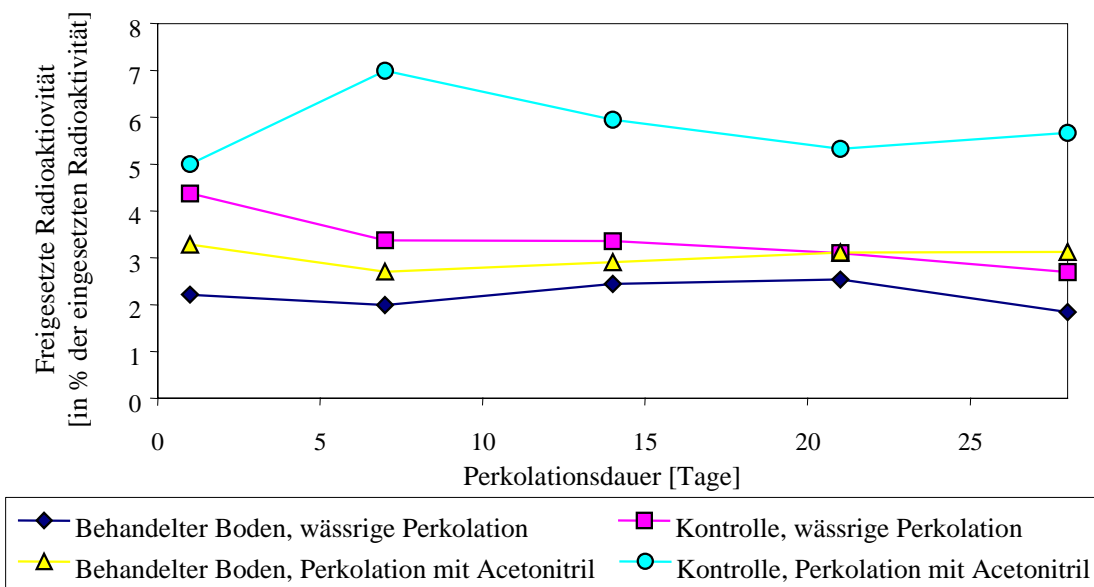


Abb. 7: Freisetzung von Radioaktivität aus mit ^{14}C -TNT dotiertem und anschließend mit Weißfäulepilzen behandeltem Boden im Perkulationsversuch mit Wasser und Acetonitril im Vergleich zur Kontrolle, die statt mit Pilz/Stroh-Substrat mit sterilem Stroh beschickt wurde.

Durch die Perkolation des sanierten Bodens mit Wasser ließen sich während einer Zeit von 28 Tagen nur ca. 2,2 % der zum Start der Behandlung in Form von ^{14}C -TNT eingesetzten Radioaktivität remobilisieren. Die Remobilisierung erfolgte in den ersten 24 Stunden des Versuches. Die prozentuale Menge der freigesetzten Radioaktivität im Verhältnis zur Ausgangsaktivität blieb beim mit Weißfäulepilzen behandelten Boden und bei der nur mit sterilem Stroh behandelten Kontrolle während des gesamten, restlichen Perkolationsversuches annähernd konstant. Allerdings lag die Remobilisierungsrate bei der Kontrolle mit ca. 3,6 % der Ausgangsradioaktivität höher als beim behandelten Boden.

Mit Acetonitril als Lösungsmittel ließen sich 3,0 % der eingesetzten Radioaktivität durch Perkolation aus dem behandelten Boden extrahieren. Die Extraktionsrate lag bei der Kontrolle bei 5,8 % der Ausgangsradioaktivität.

4.2.1.2 Stabilitätskontrolle der Schadstoff-Bodenkomplexe durch Langzeit-inkubation unter Simulation jahreszeitlicher Schwankungen

Um das Langzeitverhalten des mit Weißfäulepilzen behandelten Bodens zu untersuchen, wurden nach der Behandlung (s. 4.2.1.1) jeweils 100 g Boden für 48 Stunden bei -18 °C eingefroren und anschließend für 120 Stunden bei 20 °C aufgetaut und gelagert. Dieser Vorgang wurde 7 x wiederholt. Anschließend erfolgte eine Elution mit der 10 fachen Menge Wasser für 24 Stunden auf einem Über-Kopf-Schüttler. Nach der Zentrifugation bei $2000 \times g$ im Glaszentrifugenröhrchen für 15 min wurde die Radioaktivität im Eluat mittels Szintillationszählung quantifiziert. Zur Kontrolle wurden Ansätze, die mit sterilem Stroh inkubiert worden waren, nach derselben Methode untersucht.

Die Untersuchungen zur Stabilitätskontrolle der Schadstoff-Bodenkomplexe ergaben für den zuvor mit Weißfäulepilzen behandelten Boden eine Remobilisierung von 2,6 % der eingesetzten Radioaktivität durch achtmaliges Einfrieren und Auftauen. Die Kontrollen, denen statt Pilz/Stroh-Substrat nur sterilisiertes Stroh-Substratgemisch zugesetzt wurde, zeigten eine Freisetzung von durchschnittlich 3,4 % der Ausgangsradioaktivität durch wässrige Elution im Anschluß an das Stabilitätsexperiment.

4.2.2 Ökotoxikologische Untersuchungen

TNT und seine Metabolite zeigen ein komplexes Bild von Schadwirkungen [24]. Im menschlichen Organismus verändern sie das Blutbild, führen zu Störungen des Zentralnervensystems und schädigen die Reproduktionsorgane. Im Tierversuch sind einige Verbindungen krebserregend bzw. stehen diesbezüglich im Verdacht. Auch beim Menschen wurden nach beruflicher Exposition gegenüber 2,6-Dinitrotoluol erhöhte Krebsmortalitäten gefunden [25]. Über die chemische Analytik können die Konzentrationen von TNT und anderen Nitroaromaten, die wässrig oder organisch extrahierbar sind, im Zuge einer Sanierung verfolgt werden. Wie aus den Bilanzierungsversuchen jedoch hervorging, kommt es zu einer Adsorption bzw. zu einem Einbau von TNT-Derivaten in das Huminstoffgerüst und in andere Bodenbestandteile. Um den Erfolg einer Sanierung überprüfen zu können, ist daher

eine zusätzliche ökotoxikologische und toxikologische Kontrolle des Bodens sinnvoll, die auch der chemischen Analytik nicht zugängliche Substanzen erfaßt. Es wurde daher durch den Ames-Test die Mutagenität und durch den MTT-Test die Cytotoxizität von Bodenextrakten ermittelt.

4.2.2.1 Leuchtbakterien-Hemmtests

Zur Einschätzung des vom sanierten Boden ausgehenden, ökotoxikologischen Potentials wurden Leuchtbakterien-Hemmtests an Eluaten von mit Weißfäulepilzen behandelten TNT-dotierten Boden und an Kontrollen, die nur mit sterilem Stroh-Substrat beimpft wurden, durchgeführt. Im Unterschied zu der unter 4.1 beschriebenen radioaktiven Dotierung wurde in diese Experimenten ausschließlich mit unmarkiertem TNT (300 mg/kg Boden TS) dotiert. Die Experimente mit radioaktiv-markiertem und unmarkiertem TNT wurden zeitlich parallel durchgeführt, um möglichst identische Bedingungen einzuhalten.

Die anschließende Inkubation des Bodens erfolgte analog zu den Perkolationsexperimenten (s. 4.2.1.1.) und den Stabilitätsuntersuchungen (s. 4.2.1.2.). Direkt nach dem Dotieren und Abdampfen des Lösungsmittels wurde anhand von Kontrollböden die Ausgangsökotoxizität ermittelt. Sie lag bei Werten zwischen $GL_{20}=512$ und $GL_{20}=256$. Der Durchschnittswert lag bei $GL_{20}=384$.

HPLC-Analytik der behandelten Böden

Im Anschluß an die Behandlung mit *Bjerkandera adusta* bzw. der Inkubation mit sterilem Stroh-Substrat wurden die Böden einer Analyse auf Nitroaromaten unterzogen. Die Ergebnisse sind aus der Tabelle 1 zu entnehmen. Die Analyse erfolgte nach dem NLÖ-RV92 Verfahren, wobei die Extraktion mit der 10fachen Menge Acetonitril für 18 Stunden bei Raumtemperatur abgedunkelt im Ultraschallbad durchgeführt wurde.

Wie aus Tab. 1 ersichtlich, lagen die TNT-Gehalte nach der Behandlung der dotierten Böden mit Weißfäulepilzen bei durchschnittlich 3,1 mg/kg TS. Dies entspricht ca. 1 % der eingesetzten TNT-Menge. Die mit sterilem Stroh inkubierten Ansätze enthielten durchschnittlich 3,7 mg TNT/kg TS. Die durchschnittlichen Nitroaromatengehalte der behandelten Böden lagen bei 27 mg/kg TS; bei den Kontrollen bei 32 mg/kg TS. Die Behandlung des Bodens mit Weißfäulepilzen für 150 Tage führte also zur fast vollständigen initialen Reduktion des TNT, wobei dieser Zeitraum nicht zur weiteren Metabolisierung der primären Produkte 2-Amino-4,6-Dinitrotoluol und 4-Amino-2,6-Dinitrotoluol ausreichte. Die Zugabe von sterilem Stroh führte zur Stimulation der autochthonen Bodenflora, so daß in den derart behandelten Reaktoren ein ähnlicher Abbau des TNT erfolgte.

Tab. 1: Nitroaromatengehalte der mit Weißfäulepilzen behandelten bzw. mit zuvor sterilisiertem Stroh inkubierten Böden

Probenbezeichnung	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5	B-6
	Stroh-Substrat	Stroh-Substrat	<i>B. adusta</i> + Stroh-Substrat	<i>B. adusta</i> + Stroh-Substrat	<i>B. adusta</i> + Stroh-Substrat	<i>B. adusta</i> + Stroh-Substrat
Substanz [mg/kg TS]	14.10.98					
2,4,6-Trinitrotoluol	3,1	4,3	3,4	2,8	3,4	2,8
4-Amino-2,6-Dinitrotoluol	7,9	8,4	6,9	6,9	8,6	7,6
2-Amino-4,6-Dinitrotoluol	18	21	12	13	21	19
Hexogen	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
1,3,5-Trinitrobenzol	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
2-Amino-6-Nitrotoluol	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
2-Amino-4-Nitrotoluol	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
1,3-Dinitrobenzol	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
2,6-Dinitrotoluol	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
2,4-Dinitrotoluol	0,65	1	0,6	< 0,5	< 0,5	< 0,5
2-Nitrotoluol	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
4-Nitrotoluol	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
6-Nitrotoluol	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Summe Nitroaromaten	30	35	23	23	33	29

Perkolationsexperimente

Die Versuche wurden analog 4.2.1.1. mit den oben genannten Veränderungen durchgeführt. Zur Durchführung der Leuchtbakterien-Hemmtests wurde die Perkolationsflüssigkeit entnommen, bei 2000 x g in Edelstahl-Zentrifugenbechern für 15 min abzentrifugiert und anschließend direkt für den Test eingesetzt. Die Entnahme der Perkolationsflüssigkeit erfolgte nach 1, 7, 14, 21 und 28 Tagen.

Sowohl die mit Weißfäulepilzen behandelten Böden als auch die nur mit sterilem Stroh inkubierten Ansätze erzielten im Perkolationsversuch zu allen Probenahmezeitpunkten im Leuchtbakterien-Hemmtest GL_{20} -Werte von 2.

Stabilitätsprüfung

Die Versuche wurden analog 4.2.1.2. mit den oben genannten Veränderungen durchgeführt. Im Anschluß an den 8. Gefrier- und Auftauzyklus wurde der Boden mit 200 ml Wasser überschichtet und für 24 Stunden auf dem Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Feststoffe wurden durch Zentrifugation bei 2000 x g für 15 min im Edelstahl-Zentrifugenbecher entfernt.

Die Leuchtbakterien-Hemmtests ergaben für die mit Weißfäulepilzen behandelten Böden G_{L20} -Werte zwischen 2 und 3 mit einem Durchschnittswert von $G_{L20}=2,75$. Die nur mit sterilem Stroh inkubierten Böden wiesen G_{L20} -Werte von 3 auf. Allerdings waren die Eluate dieser Bodenproben stark braun gefärbt. Da eine Farbkorrektur bei diesen niedrigen G_{L20} -Werten nicht möglich war, ist anzunehmen, daß die leichte Erhöhung des G_{L20} -Wertes durch die Verminderung der Leuchtintensität durch die Färbung der Eluate bedingt war und sich bei ungefärbtem Eluat der niedrigste G_{L20} -Wert von 2 einstellen würde.

4.2.2.2 Toxikologische Untersuchungen

Für die toxikologischen Untersuchungen wurden bei -20°C gelagerte Bodenproben eingesetzt, die während einer Sanierung TNT-belasteten Bodens durch *Bjerkandera adusta* im Labor- und im Technikumsmaßstab (Bodenmiete) zu verschiedenen Zeitpunkten genommen wurden. Die ermittelten Konzentrationen von TNT, 2-ADNT und 4-ADNT sind in Abb. 8 und Abb. 9 wiedergegeben.

Versuchsdurchführung zur Herstellung der wäßrigen Eluate

Eine Gefährdung von Mensch und Umwelt durch bodengebundene Schadstoffe findet u.a. über den Wasserpfad statt. Daher wurden je 15 g der Bodenproben nach DIN 38414 S4 eluiert, d. h. mit 150 ml Wasser versetzt und 24 h auf einem Über-Kopf Schüttler inkubiert. Eine Konzentration der Eluate erfolgte durch Festphasenextraktion über Styroldivinylbenzol-Säulen (Firma Baker) nach Vorschrift des Herstellers. Das erhaltene Eluat wurde durch Begasung mit Stickstoff eingengt und wieder in Acetonitril aufgenommen, so daß 1 ml Eluat dem Äquivalent von 20 g Boden entsprach.

Versuchsdurchführung zur Herstellung der methanolischen Extrakte

5 g Boden wurden mit 10 ml Methanol durch Ultraschall 20 min extrahiert und der Extrakt zunächst im Rotationsverdampfer und dann durch Begasung mit Stickstoff eingengt. 1 ml der so konzentrierten methanolischen Lösung entsprach einem Äquivalent von 5 g Boden.

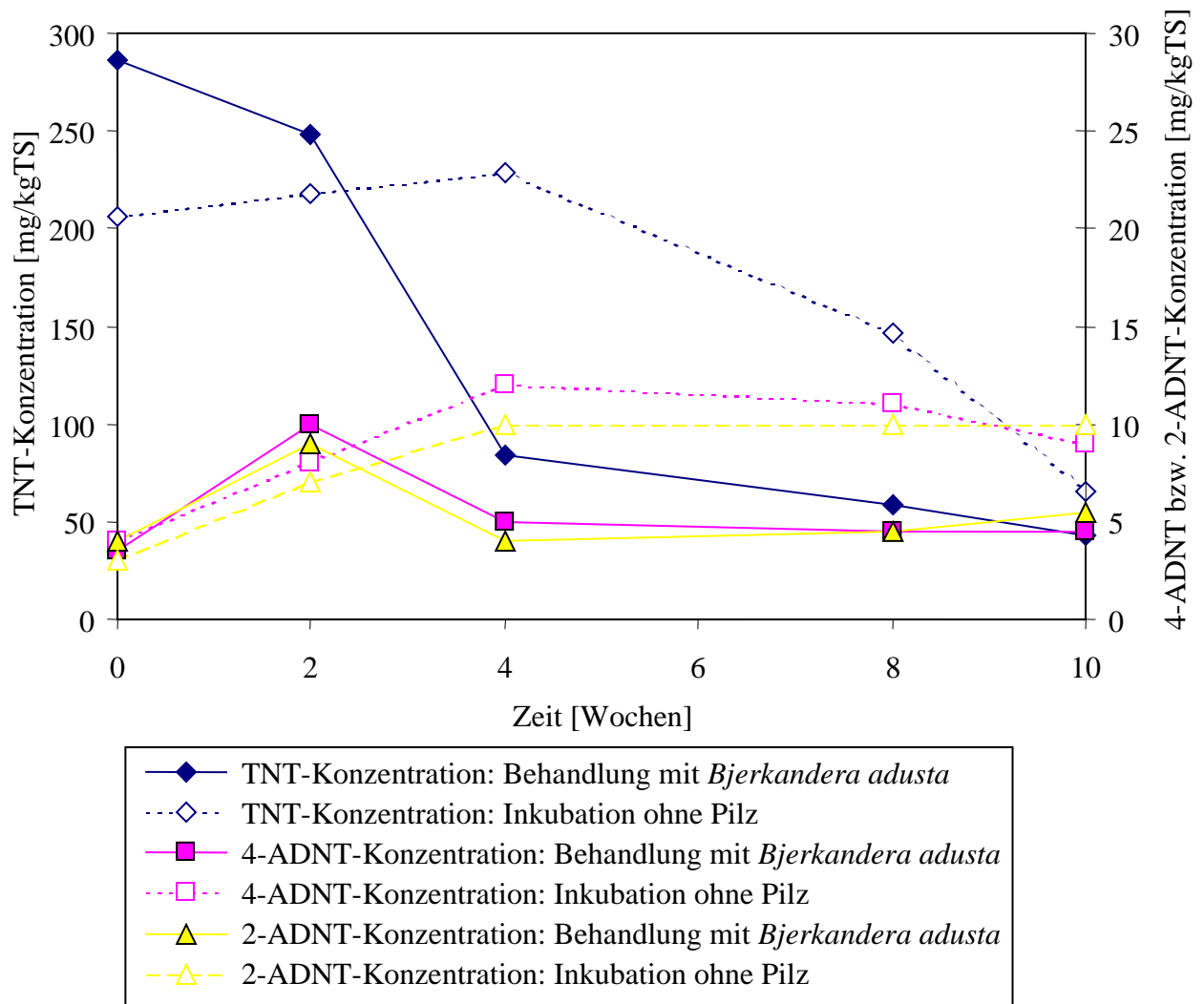


Abb. 8: Konzentration von TNT, 4-ADNT und 2-ADNT in kontaminiertem Boden während der Sanierung im Laborfermenter mit *Bjerkandera adusta* bzw. ohne Pilz.

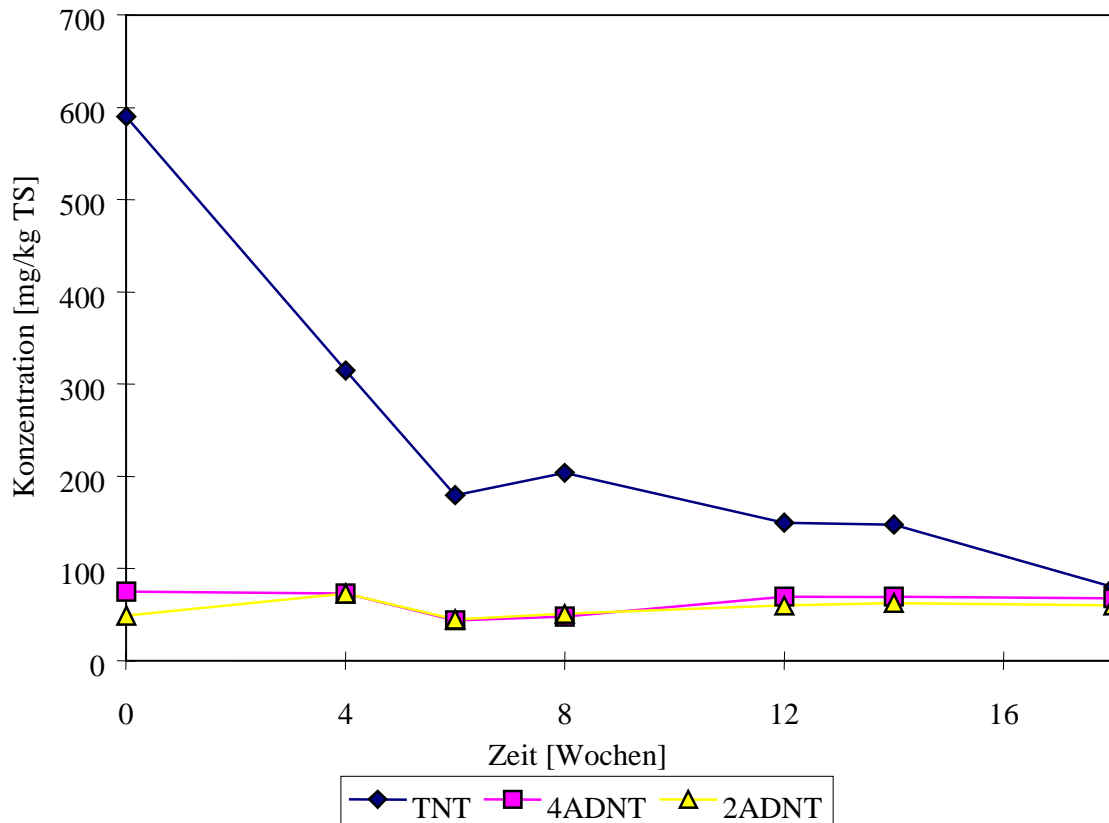


Abb. 9: Konzentration von TNT und dessen primären Metaboliten in kontaminiertem Boden während der Sanierung mit *Bjerkandera adusta* in einer Bodenmiete.

4.2.2.3 Der Ames-Test zur Beurteilung der Mutagenität

Das Prinzip des Ames-Tests beruht auf der Reversion von Histidin-auxotrophen Zellen zu Histidin-prototrophen Zellen von *Salmonella typhimurium*. Diese Reversionen werden durch mutagene Substanzen verursacht. Eine Quantifizierung der Mutagenität eines Stoffes erfolgt über die Zahl der auf Histidin-freiem Medium wachsenden Kolonien von *S. typhimurium*. Durch den Einsatz verschiedener Stämme von *S. typhimurium* kann auf die Art der Mutation geschlossen werden.

Die Zugabe eines metabolisch aktiven Systems wie dem Rattenleberextrakt (S9-Mix), bei dem Fremdstoff abbauende Enzyme induziert sind, kann den eukaryontischen Stoffwechsel nachahmen.

Aufbau und Durchführung

Der Ames-Test wurde nach der Vorschrift von MARON und AMES [18] durchgeführt. Als Teststämme kamen *S. typhimurium* TA100, der Basenpaar-Substitutionen detektiert, und TA98, der Frameshift-Mutationen detektiert, zum Einsatz. Pro Agar-Platte wurden 50 μ l Bodenextrakt eingesetzt, was 0,25 bis 1 g Boden entsprach. Die Toxizität der Proben wurde durch Kontrolle des Hintergrunds von auxotrophen Minikolonien auf der Platte überprüft. Als Kontrollen dienten ein Ansatz mit Lösungsmittel (Methanol bzw. Acetonitril), eine

Positivkontrolle mit Methylmethansulfonat bzw. 2-Aminofluoren, reines TNT und unbelasteter, keinem Sanierungsprozeß unterzogener Standortboden aus Clausthal-Zellerfeld.

Ergebnisse

In einem Vorversuch wurde zunächst ein Ames-Test ohne Präinkubation durchgeführt, der jedoch bei den Laborfermenter-Eluaten auch bei den hoch belasteten Proben (vgl. Abb. 8) zu keiner Erfüllung des Mutagenitätskriteriums - Erhöhung der Revertanten-zahl um das Doppelte in bezug auf die Zahl der Spontanrevertanten - führte (Abb. 10). Daher wurde im folgenden der Ames-Test mit stärker konzentrierten Proben und mit Präinkubation durchgeführt. Bei der Vorinkubation werden die Bakterien vor der Ausplattierung für 30 min und bei 30° C direkt der Probe ausgesetzt, was eine erhöhte Sensitivität des Verfahrens bewirkt [18].

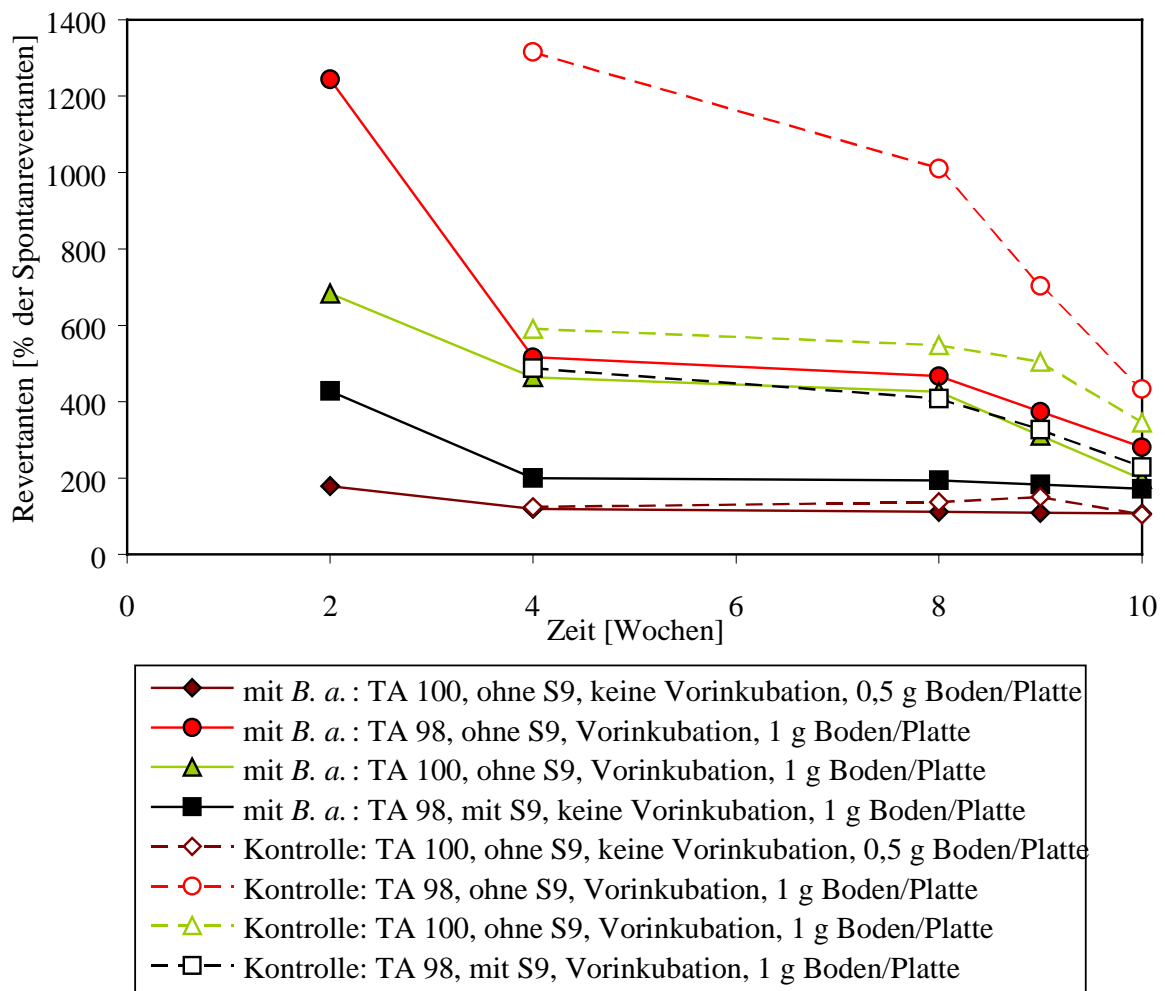


Abb. 10: Mutagenität der Laborfermenter-Eluate im Ames-Test während des Sanierungsverlaufes.

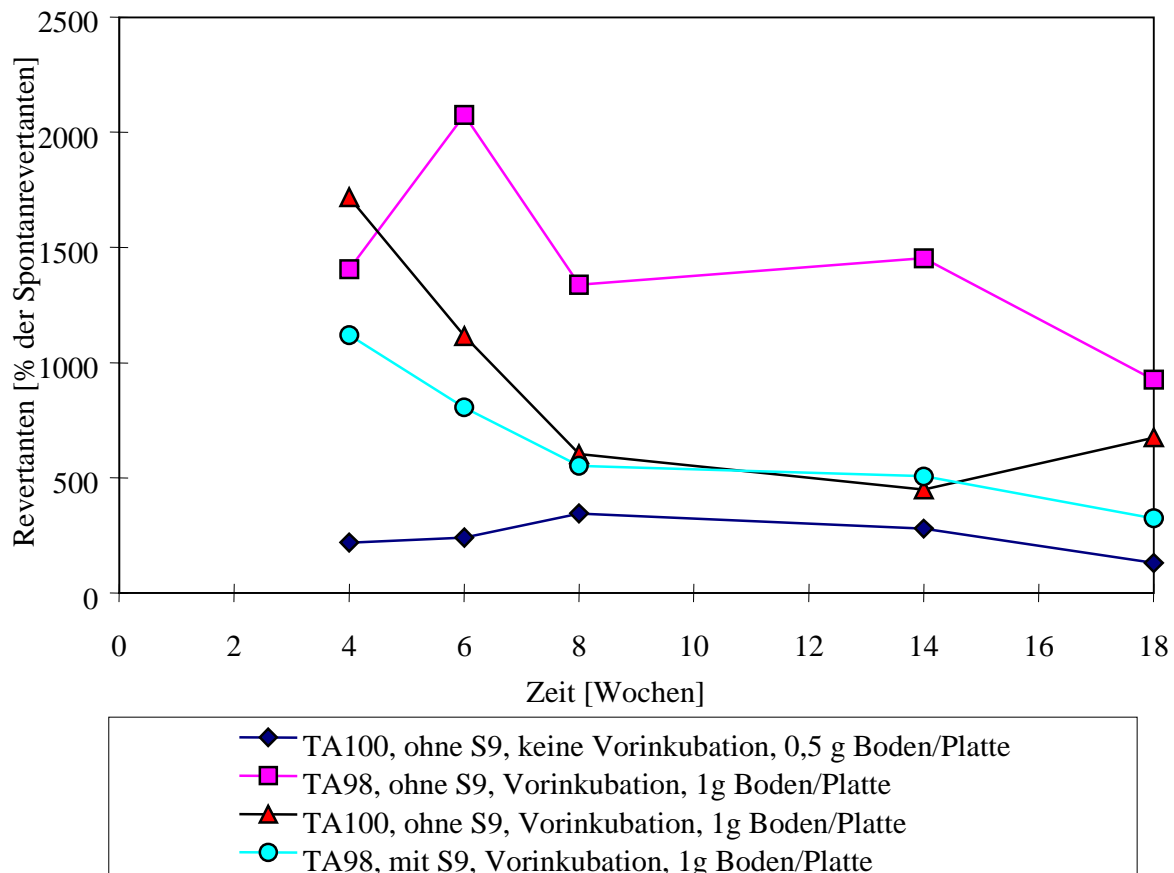


Abb. 11: Mutagenität der Bodenmiete-Eluate im Ames-Test während des Sanierungsverlaufes

Aus Abb. 10 und Abb. 11 ist ein Absinken der Mutagenität der wässrigen Bodeneluete sowohl im Laborfermenter als auch in der Bodenmiete erkennbar.

Die Eluate waren auch nach der Bodenbehandlung noch mutagen, was jedoch im hohen Konzentrationsgrad der Eluate begründet lag. Eine Bodensanierung mit *Bjerkandera adusta* führte auf jeden Fall zu einem stärkeren Abbau von mutagenen Substanzen als ein Verfahren ohne diesen Pilz, wie anhand des höheren Niveaus der Mutagenität in den Eluaten der Kontrolle sichtbar ist. Der Stamm TA98 zeigte gegenüber TA100 höhere Mutationsraten, d. h. er besaß eine größere Empfindlichkeit als TA100. Dieses Resultat einer relativ zur Zahl der Spontanrevertanten höheren Zahl von Revertanten bei T98 gegenüber TA100 wurde auch bei reinem TNT festgestellt [27].

Die Zugabe des Leberextraktes (S9) führte zu einem Absinken der Revertanzahl, was bereits von TAN et al. [26] beschrieben wurde. Aufgrund der Nitroreduktasen der beiden verwendeten Stämme ist kein Einsatz eines exogenen metabolisierenden Systems notwendig.

Ein Vergleich der Abb. 10 und Abb. 11 zeigt, daß die höheren Konzentrationen der Nitroaromaten in den Eluaten der Böden aus der Bodenmiete eine höhere Mutagenität gegenüber den Eluaten der Böden aus den Laborfermentern verursachte.

Weiterhin wurden methanolische Bodenextrakte aus der Bodenmiete und dem Laborfermenter einem Ames-Test unterzogen. Auch hier zeigte sich ein abnehmende Tendenz der Mutagenität während des Sanierungsverlaufes und eine größere Mutagenität der Kontrolle gegenüber dem

mit Pilz behandelten Boden, insgesamt lag jedoch das Niveau der Mutagenität höher als bei den wässrigen Eluaten.

Zusammenfassend betrachtet hat die Bodenbehandlung mit *Bjerkandera adusta* also eine detoxifizierende Wirkung wie sich anhand der Abnahme der Mutagenität im Zuge der Dekontamination erkennen läßt. Außerdem zeigten die Eluate der Kontrollen ohne den Pilz insgesamt ein höheres Niveau der Mutagenität der Eluate. Eine Bodenbehandlung mit *Bjerkandera adusta* führte also zu einer stärkeren Detoxifizierung als ohne den Pilz, obwohl die Bilanzierung des TNT-Verbleibs (s. 4.1.2) im Boden und die Nitroaromatenkonzentrationen (s. 4.2.2) keinen signifikanten Unterschied zwischen einem Prozeß mit oder ohne Pilz zeigten.

4.2.2.4 MTT-Test zur Beurteilung der Cytotoxizität

Um die direkte Wirkung von Bodenmaterial auf den menschlichen Organismus einschätzen zu können, ist die Anwendung humantoxikologischer Methoden wie Zellkulturtests sinnvoll. Der MTT-Test wurde ausgewählt, da er schnell und einfach durchzuführen, aber dennoch empfindlich ist. Der MTT-Test [22] beruht auf der Reduktion des löslichen 3 (4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromids zu einem unlöslichen blauen Formazan-Salz durch die Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen. Mit dem Test kann die akute Cytotoxizität und die Proliferationshemmung einer Substanz oder Probe beurteilt werden.

Aufbau und Durchführung

Der MTT-Test wurde nach Vorschrift des Herstellers (Cell Proliferation Kit I, Boehringer Mannheim) durchgeführt: Die Zellen wurden auf Mikrotiterplatten ausgesät (4000 Zellen/Cavität), mit den Proben bzw. Substanzen für 24-96 h inkubiert und mit MTT versetzt. Nach 4 h Inkubation bei 37° C wurden die Zellen aufgeschlossen, das Reaktionsprodukt Formazan solubilisiert und photometrisch quantifiziert. Als Zelllinie wurden Zellen eines humanen Bronchialkarzinoms eingesetzt (Zelllinie A549), wodurch das toxische Potential von Stoffen bei Aufnahme durch Inhalation besonders berücksichtigt wird.

Jede Probe wurde in sieben Verdünnungsstufen eingesetzt und dreifach bestimmt. Bei den eingesetzten Laborfermenter- bzw. Bodenmieten-Proben handelte es sich um dieselben Eluate, die auch für den Ames-Test verwendet wurden, allerdings wurden sie in einer Vakuumzentrifuge weiter eingeeengt, so daß sie schließlich in einer Endkonzentration von bis zu 2000 mg Boden/ml eingesetzt werden konnten.

Ergebnisse

In Vorversuchen wurde zunächst die Toxizität von TNT, 2-ADNT und 4-ADNT bei Inkubationszeiten der Zellen mit den jeweiligen Substanzen von 24, 48, 72 und 96 h ermittelt. Mit steigender Inkubationszeit erhöhte sich auch die Toxizität, vor allem durch den vermehrten Einfluß der Proliferationshemmung, die sich mit steigender Generationszahl stärker bemerkbar machte (Abb. 12). Weiterhin erwies sich TNT als weit cytotoxischer als 2-ADNT und 4-ADNT. In den weiteren Ansätzen mit den Laborreaktor- und Bodenmieten-

Proben wurde eine Verweildauer von 72 h eingehalten, da diese Zeitspanne einerseits eine hohe Testempfindlichkeit versprach, andererseits noch keine Störeffekte durch zu hohe Zelldichten befürchten ließ. Die wäßrigen Bodenmiete-Eluate zeigten tendenziell einen Anstieg der ED₅₀-Werte von 200 mg/ml auf 500 mg/ml im Sanierungsverlauf (Abb. 13). Dies zeigt die detoxifizierende Wirkung der Bodenbehandlung mit *Bjerkandera adusta*.

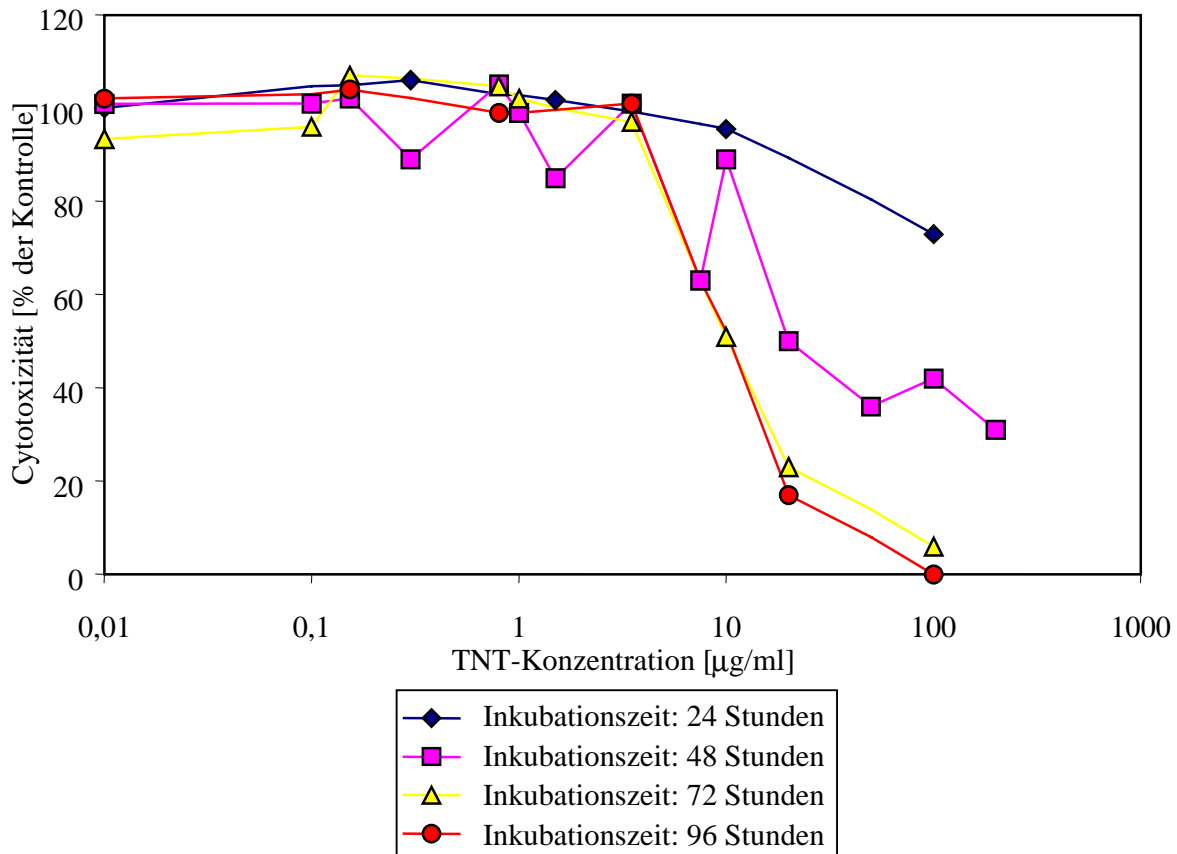


Abb. 12: Einfluß der Inkubationszeit im MTT-Test auf die cytotoxische Wirkung von TNT.

Bei den wäßrigen Laborfermenter-Eluaten konnte ebenfalls eine Entgiftung des Bodens durch den Pilz im Zeitverlauf festgestellt werden: Innerhalb von 8 Wochen hatte sich der ED₅₀-Wert von 5 mg/ml (nach 2 Wochen Inkubation) auf 275 mg/ml (nach 10 Wochen Inkubation) erhöht, d. h. die Cytotoxizität war innerhalb dieses Zeitraumes stark gesunken.

Bei der Kontrolle ohne Pilz hingegen zeigten die Bodeneluete eine im Zeitverlauf etwa gleichbleibende Cytotoxizität und waren verglichen mit den Eluaten der Behandlung mit Pilz zum Ende des Prozesses auch toxischer als diese.

Die erhaltenen Toxizitäts-Werte der Eluate und Extrakte konnten in einem zweiten unabhängigen Versuch mit einer durchschnittlichen Abweichung von 16 % vom Mittelwert reproduziert werden. Neben den wäßrigen Eluaten wurden auch methanolische Laborfermenter- und Bodenmiete-Extrakte im MTT-Test eingesetzt, der erhaltene Verlauf der Cytotoxizität ergab jedoch keinen eindeutigen Trend. Dennoch läßt sich anhand der Ergebnisse aus dem Ames-Test und aus dem MTT-Test zusammenfassen, daß bei der Bodenbehandlung mit *Bjerkandera adusta* sowohl die Mutagenität als auch die Cytotoxizität der Bodenextrakte im Sanierungsverlauf abnahm.

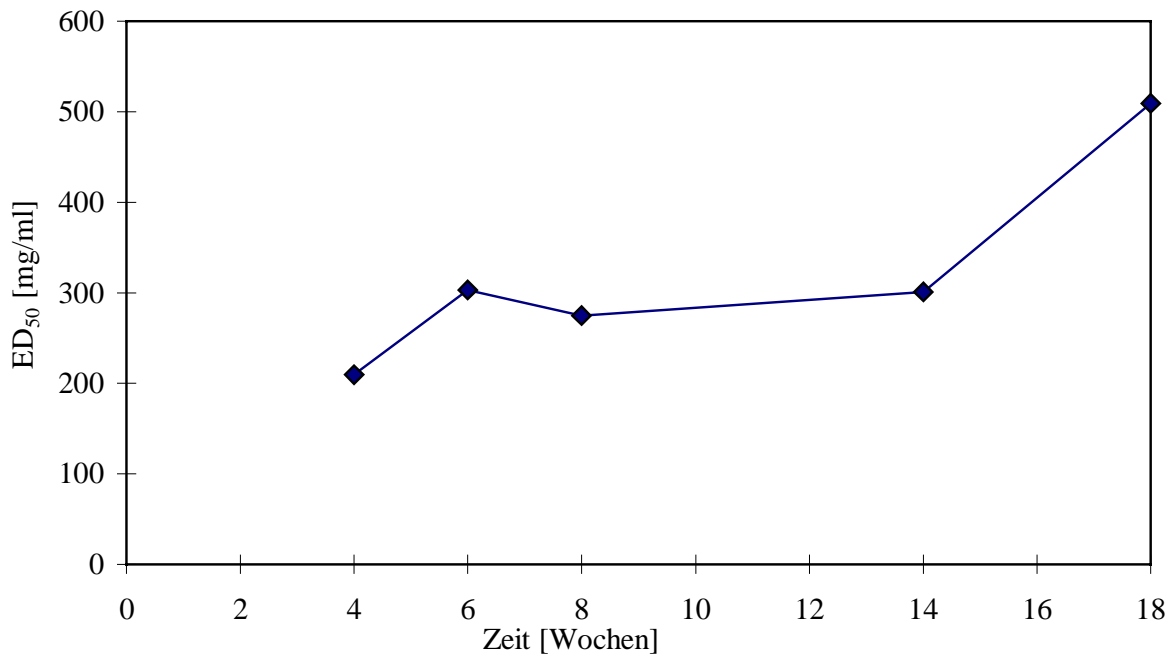


Abb. 13: Cytotoxizität der Bodenmiete-Eluate im MTT-Test im Sanierungsverlauf.

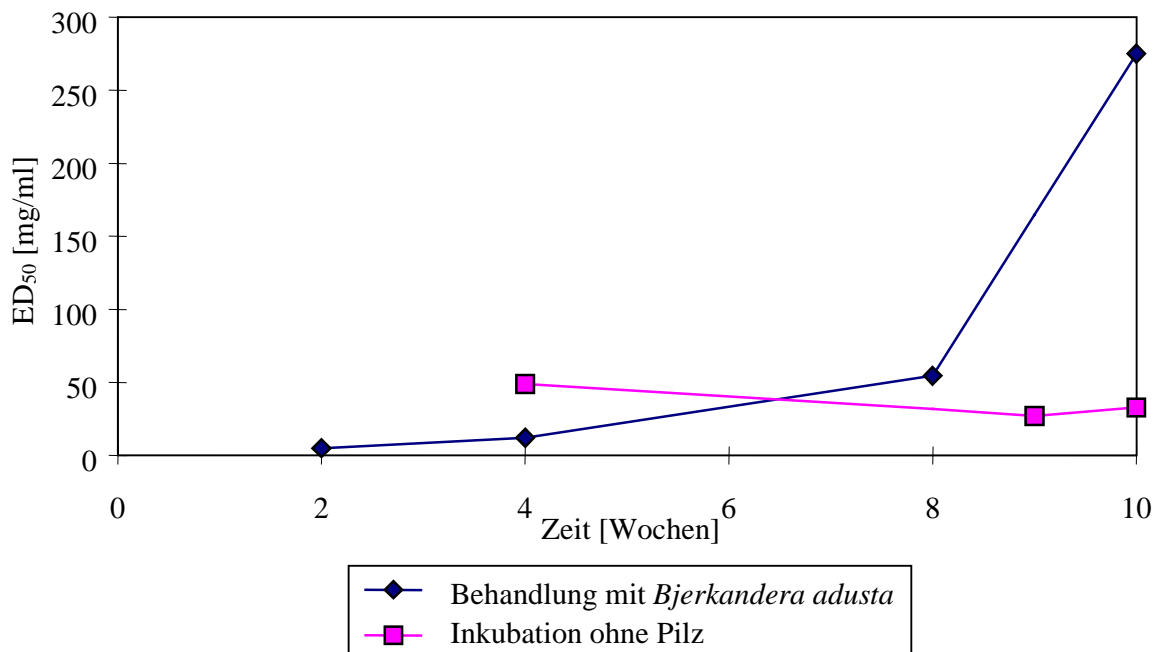


Abb. 14: Cytotoxizität der Laborfermenter-Eluate im MTT-Test während des Sanierungsverlaufes.

Außerdem war der mit dem Pilz inkubierte Boden weniger mutagen und cytotoxisch als der ohne Pilz inkubierte Boden, obwohl sich beide Ansätze in Bezug auf die Bilanzierung des TNT-Verbleibs im Boden (s. 4.1.2) und den Verlauf der Nitroaromatenkonzentration (s. 4.2.2) im wesentlich entsprachen. Dies wurde auch durch die stärkere Abnahme der Toxizität im Leuchtbakterien Hemmtest bei der Bodenbehandlung mit Pilz gegenüber der Behandlung ohne Pilz im Laborfermenter-Maßstab deutlich [8].

5 Ausblick

Durch die Bilanzierung des TNT-Metabolismus durch Weißfäulepilze in Flüssigkultur und im Boden konnten Erkenntnisse über die Aufteilung der Metabolite auf die unterschiedlichen Fraktionen gewonnen werden. Die Ergebnisse können bei der Beurteilung hinsichtlich des Grades des Schadstoffabbaus und des Schadstoffeinbaus in die Bodenmatrix durch das Weißfäulepilzverfahren dienen. Die parallelen Analysen der Rückstellproben lassen Aussagen über die Lagerfähigkeit von TNT-belasteten Böden zu. Die zur Untersuchung der Qualität des sanierten Bodens durchgeführten Versuche erlauben eine Einschätzung der Remobilisierung der festgelegten Metabolite durch Temperaturwechsel oder wässrige Elution. Die toxikologischen und ökotoxikologischen Tests zeigen ebenso wie die chemische Analytik einen Rückgang des Gefährdungspotentials durch eine Behandlung von TNT-belasteten Böden mit Weißfäulepilzen.

6 Formeln und Abkürzungen

^{14}C -TNT	mit ^{14}C radioaktiv ringmarkiertes Trinitrotoluol
2-ADNT	2-Amino-4,6-Dinitrotoluol
4-ADNT	4-Amino-2,6-Dinitrotoluol
ED ₅₀ -Wert	Substanzmenge, die eine 50 %ige Hemmung bewirkt
GL ₂₀ -Wert	Verdünnungsstufe, die eine 20 %ige Hemmung im Leuchtakterien-Hemmtest bewirkt
HPLC	High performance liquid chromatography
MeOH	Methanol
MTT-Test	3 (4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-Bromid-Test
NLÖ-RV92	Ringversuch des Niedersächsischen Landesamtes für Ökologie 1992
RP	reversed phase
TNT	Trinitrotoluol
TS	Trockensubstanz

7 Eigene Veröffentlichungen und Diplomarbeiten

Abken, H.-J., Spreinat, A., Gottschalk, G. (1998): Abbau von Nitroaromaten durch Pilze. In: Verbundvorhaben „Langzeit und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen“; Tagungsband zum Statusseminar; Umweltbundesamt (Hrsg.) M 1-8

Abken, H.-J. (1998): Sanierung von Rüstungsaltslasten durch Weißfäulepilze-Schadstoffbilanzierung und Qualität des sanierten Bodens. In: Verbundvorhaben „Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten“; Tagungsband zum 4. Statusseminar; Umweltbundesamt (Hrsg.): G 1-22

Eilers, A. (1997): Abbau von TNT durch *Bjerkandera adusta* unter Beteiligung von Cytochrom P-450 und Entwicklung eines biologischen Verfahrens zur Sanierung TNT-belasteter Böden. Dissertation, Göttingen 1996, Cuvillier Verlag Göttingen.

Eilers, A. (1997): Entwicklung eines Kompostierungsverfahrens mit Pilzen. In: Verbundvorhaben „Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten“; Tagungsband zum 3. Statusseminar; Umweltbundesamt (Hrsg.): I 1-6

Spreinat, A. (1998): Maßstabgerechte Erprobung: „Weißfäulepilzverfahren“ In: Verbundvorhaben „Biologische Verfahren zur Bodensanierung“; Tagungsband zum Statusseminar; Umweltbundesamt (Hrsg.): 71-77

Spreinat, A., Abken, H.-J., Tölle, K., Gottschalk, G. (1998): Sanierung von Rüstungsaltslasten durch Pilze. Terratech 3, 46-49

8 Literaturverzeichnis

1. **Amato, M.** (1983): Determination of carbon ^{12}C and ^{14}C in plant and soil. Soil Biol. Biochem. 15: 611-612
2. **Bollag, J.-M., Myers, C., Minard, R. D.** (1992): Biological and chemical interactions of pesticides with soil organic matter. Sci. Total. Environ. 123/124: 205-217.
3. **Breitung, J., Bruns-Nagel, D., Löw, E., Steinbach, K., Kaminski, L., Haas, R., Gemsa, D.** (1995): Mikrobielle Sanierung von TNT kontaminierten Böden. Z. Umweltchem. Ökotox. 7(4): 95-200.
4. **Bumpus, J. A., Aust, S. D.** (1987): Biodegradation of DDT [1,1,1-Trichloro-2,2-Bis (4-Chlorophenyl) Ethane] by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 53 (9): 2001-2008.
5. **Bumpus, J. A. and Tartarko, M.** (1994): Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium*: Identification of initial degradation products and the discovery of a TNT metabolite that inhibits lignin peroxidase. Curr. Microbiol. 28: 185-190.
6. **Dawel, G., Kästner, M., Michels, J., Poppitz, W., Günther, W., Fritsche, W.** (1997): Structure of a laccase-mediated product of coupling of 2,4-diamino-6-nitrotoluene to guaiacol, a model for coupling of TNT metabolites to a humic organic soil matrix. Appl. Environ. Microbiol. 63: 2560-2565.
7. **Eilers, A.** (1993): Metabolisierung von 2,4,6-Trinitrotoluol durch *Bjerkandera adusta* und andere Weißfäulepilze. Diplom-Arbeit, Universität Göttingen

8. **Eilers, A.** (1997): Abbau von TNT durch *Bjerkandera adusta* unter Beteiligung von Cytochrom P-450 und Entwicklung eines biologischen Verfahrens zur Sanierung TNT-belasteter Böden. Dissertation, Göttingen 1996, Cuvillier Verlag Göttingen.
9. **Eschenbach, A., Kästner, M., Mahro, B.** (1995): Microbial PAH-degradation in soil material from a contaminated site. Mass balance experiments with *pleurotus ostreatus* and different ¹⁴C-PAH, p. 377-378. In: Van den Brink W. J., Bosmann R., Arendt F. (ed.): Contaminated soils. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
10. **Fernando, T., Bumpus, J. A., Aust, S. D.** (1990): Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 56 (6): 1666-1671
11. **Field, J. A., de Jong, E., Feijoo Costa, G., de Bont, J. A.** (1992): Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. Appl. Environ. Microbiol. 58 (7): 2219-2226
12. **Haider, K.** (1996): Biochemie des Bodens. F. Entze Verlag, Stuttgart.
13. **Held, T., Draude G., Schmidt F. R. J., Brokamp, A., Reis, K. H.** (1996): Enhanced humification as an in-situ bioremediation technique for TNT contaminated soils. Environ. Technol. 18: 479-487.
14. **Kanekar, P. Godbole, S. H.** (1984): Microbial degradation of trinitrotoluene. Ind. J. Environ. Hlth, 26 (2): 89-101
15. **Kaplan, D. L. and Kaplan, A. M.** (1982): Thermophilic biotransformation of TNT under simulated composting conditions. Appl. Environ. Microbiol. 44: 757-760
16. **Keith, L. H. and Telliard, W. A.** (1979): Priority pollutants I. A perspective view. Env. Sci. Technol. 13, 416-423 (1990): Comparative biodegradation of alkyl halide insecticides by the white rot fungus *Phanaerochaete chrysosporium* (BKM-F-1767). Appl. Environ. Microbiol. 56: 2347-2353 (1974): The effect of trinitrotoluene on microorganisms. Dev. Ind. Microbiol. 15, 309-317
17. **Lenke, H., Daun, G., Bryniok, D., Knackmuss, H.-J.** (1993): Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten. Spektrum der Wissenschaften (10) 106-108.
18. **Maron, D. M. and Ames, B. N.** (1983): Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Res. 113 (3-4): 173-215
19. **Michels, J. and Gottschalk, G.** (1994): Inhibition of the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* by hydroxylamino-dinitrotoluene, an early intermediate in the degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. Appl. Environ. Microbiol. 60: 187-194.
20. **Michels, J.** (1994): Abbau von 2,4,6-Trinitrotoluol durch den Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium*. Dissertation, Göttingen 1993, Cuvillier Verlag Göttingen.
21. **Mileski, G. J., Bumpus, J. A., Jurek, M. A., Aust, S. D.** (1988): Biodegradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanaerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 54 (12): 2885-2889

22. **Mosmann, T.** (1983): Rapid colormetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Meth.* 65: 55-63.
23. **Nannipieri, P. and Bollag, J.-M.** (1991): Use of enzymes to detoxify pesticide-contaminated soils and waters. *J. Environ. Qual.* 20: 510-517.
24. **Schneider, K., Hassauer, M., Kalberlah, F.** (1994): Toxikologische Bewertung von Rüstungsaltslasten. *Z. Umweltchem. Ökotox.* 6 (6): 333-340.
25. **Stayner, L. T., Dannenberg, A. L., Bloom, T., Thun, M.** (1993): Excess hepatobiliary cancer mortality among munitions workers exposed to dinitrotoluene. *Journal of Occupational Medicine* 35: 291-296.
26. **Tan, E. L., Ho, C. H., Griest, W. H., Tyndall, R. L.** (1992): Mutagenicity of TNT and its metabolites formed during composting. *J. Toxicol Environ. Health* 36:1 65-175.
27. **Whong, W.-Z. and Edwards, G. S.** (1984): Genotoxic activity of nitroaromatic explosives and related compounds in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.* 136: 209-215
28. **Won, W. D., DiSalvo, L. H., NG, J.** (1976): Toxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 31 (4): 576-580

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.2 Verbundvorhaben 3: Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten

9.2.7 Bioremediation von TNT-belasteten Böden mit Pilzen; Untersuchungen zur Metabolisierung, Mineralisierung und Humifizierung (TV 3.4)

Prof. Dr. Wolfgang Fritsche

Dr. Katrin Scheibner

Dipl.-Ing. Angela Herre

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Institut für Mikrobiologie

Lehrstuhl für Angewandte und Ökologische Mikrobiologie

Philosophenweg 12

07743 Jena

Förderkennzeichen: 1450821 A2

Laufzeit: 01. 03. 1996 – 30. 04. 1999

1 Zielsetzung und Zusammenfassung

Das Forschungsvorhaben "Bioremediation von TNT-belasteten Böden mit Pilzen; Untersuchungen zur Metabolisierung, Mineralisierung und Humifizierung" hatte zur Aufgabe, neue Methoden der biologischen Reinigung von Böden ehemaliger Standorte der Rüstungsindustrie zu entwickeln und praktisch umzusetzen.

Kernpunkt der Arbeiten bildeten Verfahrensansätze auf der Basis des Abbaupotentials gezielt selektierter Pilze und ihrer Enzyme.

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung waren Untersuchungen zu grundlegenden biochemischen Mechanismen, welche den TNT-Abbau von streu- und holzbesiedelnden Basidiomyceten hauptsächlich bestimmen, notwendig. In diesem Rahmen sollten die Reaktionsabläufe der Mineralisierung, Humifizierung und der mikrobiellen Remobilisierung von TNT und seiner Metaboliten geklärt werden.

Parallel dazu wurde der TNT-Abbau im Boden unter Standortbedingungen untersucht (Freilandmieten). Eine aussagekräftige Bearbeitung dieser Thematik erforderte weiterhin die Simulierung des Langzeitverhaltens gebildeter Metabolite. Die Analyse gebildeter Rückstände erfolgte in geeigneten Pilzmietensystemen unter Verwendung spezifisch markierter TNT-Isotope.

Untersuchungsschwerpunkte waren:

1. in vitro Untersuchungen zur Mineralisierung von TNT durch selektierte Pilze,
2. Identifizierung der Schlüsselenzyme,
3. Charakterisierung des biochemischen Prinzips des TNT-Abbaus durch Mangan-Peroxidase,
4. Übertragbarkeit der enzymatischen "Verbrennung" unter besonderer Berücksichtigung natürlicher makromerer Bestandteile der Humusmatrix des Bodens,
5. scale-down des Freilandmieten-Versuchssystems,
6. Erbrütung des radioaktiv markierten Modellbodens zur Bilanzierung des Verbleibs von TNT im Boden bei Einsatz von streuabbauenden Basidiomyceten,
7. Ermittlung der Bioverfügbarkeit der im Modellboden befindlichen TNT-Abbauprodukte und ihrer potentiellen enzymatischen Abbaubarkeit.

In der Zusammenfassung der Ergebnisse zum Abbau von TNT und seiner Metaboliten im Flüssigsystem wurde der Nachweis erbracht, daß extrazelluläre ligninolytische Pilzenzyme die entscheidende Voraussetzung für die direkte Mineralisierung von TNT und seiner Metaboliten sind. Durch den Einsatz von Mangan-Peroxidasen (MnP) verschiedener streu- oder holzbesiedelnder Basidiomyceten, wie *Stropharia rugosoannulata* oder *Nematoloma frowardii*, konnten die Fremdstoffe erstmalig im Flüssigsystem ohne aktives Pilzmycel vollständig zu CO₂ und organischen Säuren abgebaut werden.

Ausgangspunkt dieser Erkenntnisse war, daß von mehr als 100 untersuchten Pilzen nur Holz- und Streu-abbauende Pilze TNT effektiv mineralisierten. Ein charakteristisches Merkmal dieser Gruppen ist die Bildung extrazellulärer ligninolytischer Enzyme. Unter Verwendung von isolierten MnP-Präparaten von *N. frowardii* und *S. rugosoannulata* konnten die TNT-Reduktionsprodukte 2-Amino-4,6-dinitrotoluol, 4-Amino-2,6-dinitrotoluol und 2,6-Diamino-4-

nitrotoluol zellfrei umgesetzt werden. TNT selbst wurde durch isolierte Mangan-Peroxidasen in geringerem Umfange umgesetzt, da ein elektrophiler Angriff aufgrund der drei Nitrogruppen am Molekül erschwert ist. Schließlich gelang der Nachweis, daß das MnP-System Aminodinitrotoluole im zellfreien Ansatz direkt zu CO₂ und untoxischen niedermolekularen organischen Säuren (Acetat, Glyoxalat, Formiat) mineralisiert. Die Oxidationskraft der MnP wurde erheblich durch Thiol-Mediatoren gesteigert. Vergleichende Untersuchungen ergaben, daß das Abbauprinzip der MnP von universeller Bedeutung für den Xenobiotikaabbau durch ligninolytische Basidiomyceten sein könnte, da in Weiterführung der vorliegenden Untersuchungen die direkte MnP-katalysierte Mineralisierung weiterer aromatischer Verbindungen, wie chlorierter und nicht chlorierter Phenole, Dioxine, PAK und Arsenorganika nachgewiesen werden konnte.

Für die praktische Erprobung und Anwendung dieser Pilze ist neben der Bildung des ligninolytischen Enzymsystems, vor allem die Fähigkeit zum Wachstum auf niedermolekularen Ligninen, wie sie in der Streuschicht des Bodens vorkommen, von entscheidender Bedeutung.

Eine Auswahl TNT-abbauender Basidiomyceten wurde auf das substratabhängige Wachstum in TNT-kontaminierten Boden getestet. Insbesondere Vertreter der Streuschicht bewohnenden Basidiomyceten konnten als Strohinokulum im kontaminierten Boden stabil etabliert werden. Im Ergebnis dieser Untersuchungen wurde der abbauaktive Streuschicht besiedelnde Basidiomycet *Stropharia rugosoannulata* ausgewählt und auf seine Eignung zur Bodensanierung innerhalb eines Freiland- und Labormietenversuches validiert. Die Standortmietenversuche haben gezeigt, daß sich *S. rugosoannulata* im TNT-kontaminierten Boden unter Freilandbedingungen etabliert und bereits nach 70 Tagen eine 90 %-ige Abminderung des im Boden befindlichen TNT's bewirkt. Dabei kam es weder zur Akkumulation noch zur Auswaschung der bekannten TNT-Reduktionsprodukte. Zudem führte die Anwesenheit von *S. rugosoannulata* zu einer Homogenisierung des inhomogen im Boden verteilten TNT's, was bedeutet, daß insbesondere die "hot spots" angegriffen und vermindert wurden.

Die Inkubation von ¹⁴C-TNT-dotiertem Boden mit dem Pilz im Bodenreaktor erbrachte, daß TNT nach drei Wochen weder in der wasser- noch in der organisch-extrahierbaren Bodenfraktion mehr nachweisbar ist. Die Bilanzierung der Versuchsreihe erbrachte, daß 86 % der ¹⁴C-Aktivität in der Huminstofffraktion des Bodens als gebundene Rückstände festgelegt war, 10 % der zugegebenen ¹⁴C-Aktivität konnten in der organisch-extrahierbaren Fraktion als Aminodinitrotoluole und unbekannte Abbauprodukte bestimmt werden und 3 % des eingesetzten ¹⁴C-TNT wurde zu ¹⁴CO₂ mineralisiert.

Aus der gesamtheitlichen Betrachtung dieser Ergebnisse lassen sich folgende Schlußfolgerungen postulieren: Die aus den radikalischen Abbauprozessen der ligninolytischen Pilzperoxidasen resultierenden TNT-Metabolite binden an die Bodenmatrix. Diese Kopplungsreaktionen laufen gegenüber der vollständigen Mineralisierung des ¹⁴C-TNT zu ¹⁴CO₂ wesentlich schneller ab und stellen somit die bestimmende Reaktionsform von TNT - Abbauprodukten im Boden dar.

Der biotechnologische Ansatz eines Pilzkompostierungsverfahrens mit *Stropharia rugosoannulata* bewirkt somit die Detoxifizierung des Bodens durch radikalische Festlegung der TNT-Metabolite in der Bodenmatrix und Abnahme ihrer biologischen Verfügbarkeit. In der wasser- oder organischlöslichen Bodenfraktion, d. h. "mobilen" Bodenphasen enthaltene TNT-

Metabolite sind wie im Flüssigkeitssystem ohne Pilz durch extrazelluläre Mangan-Peroxidasen mineralisierbar.

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

Seit über zwei Jahrzehnten untersuchen Mikrobiologie und Biotechnologie intensiv das Umweltverhalten und insbesondere die Abbaubarkeit von Fremdstoffen durch Mikroorganismen (Bakterien; Pilze). Dabei zeigte sich, daß Mikroorganismen zwei grundsätzliche Strategien besitzen, um Fremdstoffe abzubauen und zu entgiften. Zum einen können die Verbindungen in die Mikrobienzelle aufgenommen und über spezifische Enzymsysteme stufenweise aerob reduziert (Hauptmetabolite der TNT- Reduktion durch Eukaryonten sind Aminodinitrotoluole) und transformiert werden, wobei es letztlich über Atmungsprozesse (Zitronensäurezyklus) zu einer geringen Freisetzung von Kohlendioxid kommt. Dieser intrazelluläre Weg wird in erster Linie von Bakterien, Hefen und bestimmten Schimmelpilzen beschritten, welche TNT über diesen Weg nur in sehr geringen Raten mineralisieren [24; 25]. Daneben ist im Verlauf der Evolution innerhalb der kleinen Gruppe der holzabbauenden Pilze (Weißfäulepilze; Basidiomyceten) ein einzigartiges Enzymsystem entstanden, das außerhalb der Zelle (extrazellulär) wirksam ist und unspezifisch eine große Zahl von organischen Verbindungen angreift [28].

Durch die symmetrische Anordnung der drei Nitrosubstituenten am aromatischen Ring von TNT wird die Elektronendichte herabgesetzt und ein elektrophiler Angriff beispielsweise durch Oxygenasen stark erschwert [23]. Die bevorzugte Reaktion der mikrobiellen Umsetzung von TNT besteht deshalb in einer Reduktion [48]. Unter aeroben Bedingungen erfolgt die Reduktion einer Nitrogruppe des TNT-Moleküls in einem dreistufigen Prozeß über die Bildung von Nitrosodinitrotoluol \rightarrow Hydroxylaminodinitrotoluol \rightarrow und schließlich Aminodinitrotoluol [40; 70]. Spontane Kondensationsreaktionen von Nitroso- bzw. Hydroxylaminogruppen können dabei zur Entstehung von Dimeren wie Azoxytetranitrotoluolen führen [41; 42]. Zu Beginn der vorliegenden Arbeiten war bekannt, daß die Fähigkeit TNT zu Aminodinitrotoluol zu reduzieren unter Pilzen, wie auch aeroben und anaeroben Bakterien, verbreitet ist [3; 17; 44]. Während 2-AmDNT und 4-AmDNT sowie 2,6-DiAmNT und 2,4-DiAmNT unter aeroben Verhältnissen auftreten [17; 47; 58], ist eine weitere Reduktion nur unter strikt anaeroben Bedingungen (Redoxpotential < -200 mVolt) möglich [16; 38]. Die vollständige TNT-Reduktion führt dabei zur Bildung von TAT und erfordert ausreichende Mengen eines oxidierbaren Substrates, das als Elektronen-Donator fungiert [9; 46]. Die Bildung von TAT ist für Pilze nicht bekannt.

Die Reduktion von TNT, Aminodinitrotoluolen und anderen Nitroaromaten erfolgt durch intrazelluläre Nitroreduktasen [68; 71]. Daneben wurde bei *Phanerochaete chrysosporium* eine Membran-assoziierte Nitroreduktase beschrieben, welche neben TNT auch Nitrobenzole reduziert [47]. In anderen Arbeiten wurde für diesen Organismus die Reduktion von TNT und Aminodinitrotoluolen durch ein Cytoplasmamembran-abhängiges Redoxsystem beschrieben [56]. In nicht ligninolytischen Kulturen von *P. chrysosporium* wurde die Reduktion einer zweiten Nitrogruppe beobachtet [7; 57]. Es wird angenommen, daß die Bildung von 2,4-DiAmNT über eine reversible Formylierung von 4-AmDNT erfolgt, wobei zunächst das Formylierungsprodukt 4-Formamido-2,6-Dinitrotoluol entsteht [42]. In Arbeiten zum

bakteriellen TNT-Abbau wurde die Acylierung einer Aminogruppe von 2,4-DiAmNT beschrieben, 2,6-DiAmNT wurde als persistentes Reduktionsprodukt nicht weiter transformiert [6; 17]. Die für den bakteriellen TNT-Abbau beschriebene Entstehung eines Meisenheimer-Komplexes, wobei unter reduktiver Nitritabspaltung 2,4-Dinitrotoluol gebildet wird [64] ist bei Pilzen bisher nicht gefunden worden.

Der Idealweg Xenobiotika wie TNT aus der Umwelt zu entfernen, besteht jedoch in ihrem vollständigen Abbau zu Kohlendioxid, Wasser und anorganischen Stickstoffverbindungen bzw. zu niedermolekularen, nichtaromatischen Kohlenstoffverbindungen. Auch eine irreversible Festlegung der Nitroaromaten und ihrer Reduktionsprodukte im Humus könnte zu einer dauerhaften Detoxifikation führen [11; 35; 67].

Zusammenfassend ergaben die Untersuchungen zur cometabolischen Mineralisierung von TNT durch Bakterien, daß ein Abbau von TNT zu CO₂ nur in sehr geringem Umfang erfolgt (maximale ¹⁴CO₂-Freisetzung 3,1 % [2; 3; 4]).

Es wurde deutlich, daß die Reduktion von TNT nicht auf eine effektive TNT-Mineralisierung schließen läßt. Eine Mineralisierung des Sprengstoffs durch Bakterien erscheint bei dem derzeitigen Wissensstand unwahrscheinlich [5; 6; 18; 48].

Vergleichsweise wenige Erkenntnisse lagen zu Beginn der vorliegenden Arbeiten zur TNT-Mineralisierung durch Pilze vor. Der überwiegende Teil dieser Untersuchungen wurde mit dem Weißfäulepilz *P. chrysosporium* durchgeführt [1; 7; 56; 57]. Die Mineralisierung von TNT durch *P. chrysosporium* konnte erstmals durch die Arbeitsgruppe um Fernando [14] gezeigt werden. Dabei wurde allerdings nur ein Abbau geringer Mengen TNT nachgewiesen. In nachfolgenden Arbeiten konnte die Freisetzung von mehr als 20 % ¹⁴CO₂ durch ligninolytische Kulturen von *P. chrysosporium* nachgewiesen werden [58]. Demgegenüber war in nicht ligninolytischen Pilzkulturen ein 50 %-iger Rückgang der TNT-Mineralisierung zu verzeichnen. Im Fall von *P. chrysosporium* werden ligninolytische Kulturbedingungen durch Stickstoff-, Kohlenstoff- oder Schwefel-Mangel im Medium induziert [35] und führen zu einer verstärkten Ausscheidung von extrazellulären Peroxidasen (LiP, MnP). In weiteren Untersuchungen wurde jedoch festgestellt, daß keine direkte Umsetzung der Aminodinitrotoluole durch die, bis dahin als wesentliches ligninolytisches Enzym angesehene, Lignin-Peroxidase erfolgt. Basierend auf dieser Erkenntnis wurde angenommen, daß TNT, 2-Am-DNT und 4-AmDNT keine direkten Substrate der LiP sind [7; 42]. In anderen Arbeiten wurden jedoch die Aminodinitrotoluole als Substrate der extrazellulären Peroxidasen von *P. chrysosporium* vorgeschlagen [57; 61].

In der Summe der Erkenntnisse konnte lediglich die effektive Mineralisierung von TNT durch den Weißfäulepilz *P. chrysosporium* nachgewiesen werden. Es wurde postuliert, daß extrazelluläre, ligninolytische Peroxidasen von *P. chrysosporium* an der Umsetzung von primären TNT-Reduktionsprodukten beteiligt sein könnten, der Mechanismus der TNT-Mineralisierung blieb jedoch ungeklärt.

Neben den Weißfäulepilzen besitzen auch Vertreter aus der Gruppe der **streuabbauenden Basidiomyceten** dieses leistungsfähige extrazelluläre Enzymsystem zur Lignozelluloseverwertung [59]. Diese Pilze sind jedoch nicht an das Wachstum auf Holz gebunden, sondern besiedeln die oberen Bodenschichten mit einem hohen Anteil unzersetzten Pflanzenmaterials (Streuschicht [13]) und waren daher für den Einsatz im kontaminierten Standortboden besonders geeignet [19; 21; 51]. Zu dieser Pilzgruppe gehört die Mehrzahl der Basidiomyceten in Wäldern, Wiesen und Weiden. Es wird allgemein angenommen, daß

streuabbauende Basidiomyceten durch ihre ligninolytischen Enzyme maßgeblich am "Humus-Turnover" beteiligt sind [8]. Zum Abbau von TNT im Boden durch ligninolytische Basidiomyceten der Streuschicht lagen zu Beginn der Untersuchungen keine Arbeiten vor.

3 Angewandte Methoden

3.1 Organismen

Insgesamt wurden 120 Pilzstämme aus 32 Gattungen auf ihr Potential zur Metabolisierung bzw. Mineralisierung von TNT getestet. Die Mehrheit der Organismen wurde von Stammsammlungen bezogen, weitere Pilze waren Eigenisolate, welche in die Stammsammlung des Lehrstuhls für Technische Mikrobiologie aufgenommen und zum Teil in der DSMZ hinterlegt wurden [52].

Unter Einbeziehung der ökologischen Verbreitung und der damit verbundenen physiologischen Eigenschaften [43] wurde die taxonomische Gruppe der Basidiomyceten in holz- und streuabbauende Basidiomyceten untergliedert und intensiv untersucht. Parallel dazu wurden Pilze der Klassen Zygo-, Asco- und Deuteromyceten (unter dem Gruppenbegriff Mikromyceten zusammengefaßt) getestet, da es sich bei diesen Organismen um ubiquitär verbreitete Kosmopoliten handelt.

3.2 Mineralisierung von TNT durch Pilze

Alle Untersuchungen zum cometabolischen Abbau von TNT durch Pilze [15] erfolgten als Submerskulturen. Die Experimente zur Mineralisierung von uniform ringmarkiertem (UR) ^{14}C -TNT wurden in gasdicht verschlossenen Serumflaschen mit Kulturfiltrat durchgeführt. Neben den Parallelansätzen mit aktiven Pilzmycelien wurden entsprechende unbeimpfte Kontrollansätze mitgeführt. Die eingesetzte TNT-Konzentration betrug 0,25 bis 0,1 mM sowie in Abhängigkeit vom jeweiligen Versuch ca. $5 \mu\text{Ci/l}$ UR- ^{14}C -TNT. Diese wurden im Intervall von vier bis sechs Tagen mit Luft begast. Die Begasungsdauer war abhängig vom Gasstrom und dem Gasvolumen über der Kulturflüssigkeit. Die Ableitung des Gases erfolgte direkt in ein Szintillationszählgefäß mit Opti-Fluor zum Auffangen der radioaktiv markierten, flüchtigen organischen Verbindungen. Anschließend wurde der Gasstrom einen basischen Szintillations-Cocktail, bestehend aus Opti-Fluor und 3 ml Carbo-Sorb weitergeleitet, in welchem $^{14}\text{CO}_2$ unter Bildung von Carbamin gebunden wurde. Die Bestimmung der Radioaktivität in den Szintillationszählgefäßen erfolgte nach zweistündiger Aufbewahrung zur Senkung der Chemilumineszenz in einem Flüssigszintillationszähler (LSC Wallac Model 1410, Pharmacia, Wallac, Turku, Finland). Die Effizienz wurde über einen Gerät-internen Standard bestimmt.

Zur Massenbilanzierung wurde neben der $^{14}\text{CO}_2$ -Bildung und der Detektion flüchtiger organischer Verbindungen in den Szintillationszählgefäßen die verbliebene Radioaktivität im Reaktionsansatz sowie die in die Biomasse aufgenommene Radioaktivität ermittelt. Dazu wurde das Pilzmycel vom Kulturmedium abgetrennt, und zur Bestimmung der adsorbierten Radioaktivität in einem Verbrennungsofen (Biological Oxidizer OX 500, Zinsser Analytik, Frankfurt) vollständig verascht. Der Anteil an verbliebener Gesamtradioaktivität im

Kulturfiltrat wurde mittels HPLC und manueller Fraktionssammlung separiert und identifiziert.

3.3 Enzyminduktion und Mangan-Peroxidase Gewinnung

Der Einfluß einzelner ligninolytischer Enzyme auf den pilzlichen Abbau von U_R - ^{14}C -TNT wurde durch Zugabe geeigneter Elicitoren stimuliert [21].

Zur Gewinnung des in der vorliegenden Arbeit am häufigsten eingesetzten Enzyms Mangan-Peroxidase wurden *N. frowardii* und *S. rugosoannulata* verwendet. Die Kultivierung erfolgte in Flüssigmedium mit Manganzusatz. Die Kulturfiltrate wurden in zwei Ultrafiltrationsschritten aufkonzentriert und in 2 Stufen diafiltriert [55]. Daneben wurden die partiell gereinigten Isoenzyme der Mangan-Peroxidase verwendet, welche nach der Methode von Schneegaß et al. [55] über Anionen-Austauschchromatographie und präparative Isoelektrofokussierung hergestellt wurden. Die Gewinnung der Lignin-Peroxidase und Laccase Präparationen erfolgte analog zur Mangan-Peroxidase Herstellung.

3.4 Zellfreie Mineralisierung von U_R - ^{14}C -TNT durch Mangan-Peroxidase

Die enzymatische Umsetzung von U_R - ^{14}C -TNT (spezifische Radioaktivität: 2,2 mCi/mmol), U_R - ^{14}C -2-AmDNT (spezifische Radioaktivität: 2,2 mCi/mmol) wurde in luftdicht verschlossenen "Hungate"-Röhrchen durchgeführt. Für den enzymatische Abbau wurde reduziertes Glutathion oder L-Cystein als Thiol-Mediator eingesetzt. Die Ansätze enthielten MnP, Mangan-Ionen, ein Wasserstoffperoxid-generierendes System und Malonat-Puffer als Chelator. Als Kontrolle dienten u.a. Versuchsansätze mit hitzedenaturierten Enzymen. Die $^{14}CO_2$ -Bildung wurde analog zu den Pilzkulturen verfolgt. Der Gasstrom wurde wiederum direkt in hintereinander geschaltete Zählgefäße mit dem Szintillator zur Absorbtion flüchtiger organischer Bestandteile des Gasstromes und dem spezifischen "Trapper" zur Absorption des gebildeten $^{14}CO_2$ geleitet.

3.5 Enzymaktivitätsbestimmung

Die Enzymaktivität wurde, bezogen auf das Volumen, in Units (U) pro Liter oder Milliliter angegeben. 1 Unit katalysiert die Umsetzung von 1 μ mol Substrat pro Minute (1 U = 1000 mU = 1 μ mol Substratumsatz/min). Auf die Angabe spezifischer Aktivitäten (U/mg Protein) der Enzyme wurde verzichtet, da der Proteingehalt auf Grund von Autolyseprozessen stark schwankt und die Aktivitäten der ligninolytischen Enzyme bezogen auf das Gesamtprotein somit wenig aussagekräftig ist.

Die Aktivität der Mangan-Peroxidase wurde nach Wariishi et al. [66] über die direkte Bildung des Mn- Chelat-Komplexes bestimmt. Der Aktivitätsbestimmung der Ligninperoxidase lag die Methode von Tien und Kirk [60] zugrunde und zur Messung der Laccaseaktivität wurde eine Methode von Wolfenden und Wilson [69] genutzt.

3.6 Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie

Eine HPLC-Anlage der Firma MERCK-HITACHI (Darmstadt) diente als Hauptnachweissystem zur qualitativen und quantitativen Beurteilung der pilzlichen TNT-Abbauprozesse. Zur Trennung der aromatischen Verbindungen und ihrer Umsatzprodukte wurden "reversed-

phase"-Säulen (LiChrospher RP-18 Säule) verwendet. Als mobile Phase wurde Wasser/Methanol im linearen Gradienten eingesetzt. Das Gradientenprogramm startete mit 100 % Wasser und ersetzte es innerhalb von 45 Minuten durch 100 % Methanol. Die Detektionswellenlänge betrug 254 nm. Für die Bilanzierung der Radioaktivitätsverteilung in den Reaktionsansätzen wurden im Abstand von zwei Minuten die Fraktionen gesammelt und im Flüssigszintillator vermessen. Die quantitative Bestimmung der Fremdstoffe erfolgte über externe Standards.

Die Restradioaktivität nach der enzymatischen Umsetzung der Nitrotoluole zu $^{14}\text{CO}_2$ wurde zusätzlich mit einer Polymersäule analysiert, die ursprünglich in der Lebensmittelchemie zur Identifizierung niedermolekularer, organischer Säuren entwickelt wurde. Die zugrundeliegende Methode entspricht dem von Hofrichter et al. [28] beschriebenen Verfahren zur Charakterisierung polarer Produkte des Fremdstoffabbaus.

3.7 Gelpermeationschromatographie

Mit Hilfe der beschriebenen HPLC Anlage (MERCK, Darmstadt) und einer Gelpermeationschromatographiesäule (PSS Gel HEMA Bio. Lin., $40\ \mu\text{m}$, $8 \times 300\ \text{mm}$, Firma: POLYMER STANDARD SERVICE, Mainz) wurden die Bodenfraktionen nach Enzymbehandlung zur Remobilisierung auf ihre Molekulargewichtsverteilung untersucht. Die Eichung der Säule erfolgte mittels Polystyrolsulfonsäuren, welche sich durch ähnliche physikochemische Eigenschaften wie Humin- und Fulvinsäuren auszeichnen [26; 27]. Als mobile Phase diente ein Laufmittel (80 % Wasser, 20 % Acetonitril, 0,5 % Natriumnitrat, 0,2 % di-Kaliumhydrogenphosphat), das mit 0,1 N NaOH auf pH 10 eingestellt wurde.

Die GPC erfolgte unter isokratischen Bedingungen bei einer Flußrate von 1 ml/min. Die Salze dienten der Minimierung intermolekularer Wechselwirkungen, die zur Messung zu hoher Molekulargewichte (MGW) führen können. Die Chromatogramme wurden durch einen Diodenarray-Detektor (L-4500 Diode-Array-Detektor, MERCK-HITACHI) aufgezeichnet.

3.8 Gaschromatographie

Daneben dienten GC-MS-Untersuchungen der Identifizierung von Metaboliten des TNT-Abbaus. Verwendet wurde ein Gaschromatograph der Firma FINNIGAN (Massenspektrometer: SS Q710, Quadropolgerät). Als stationäre Phase diente eine unpolare Universalsäule DB-5MS. Die Massenspektren wurden durch Elektronenionisation (EI) bei 70 eV und einer "scan"-Zeit von einer Sekunde über einen Molmassenbereich von 40 bis 450 kDa aufgenommen. Die Steuerung und Auswertung der Analyse erfolgte rechnergestützt.

3.9 Bodendotierung

Der Bodenwassergehalt wurde auf 60 % der maximalen Wasserhaltekapazität (WHK_{max}) eingestellt. Nach einer Quellzeit von fünf Tagen konnte der Boden mit einer Mischung aus kaltem und radioaktiv markiertem TNT versetzt werden. Dabei wurden jeweils Chargen zu je einem Kilogramm Boden (TM) dotiert, indem die entsprechende Menge TNT-Gemisch unter Rühren mit einer elektrischen Rührmaschine zupipettiert wurde. Nach Vereinigung der Chargen erfolgte deren Homogenisierung durch kräftiges Durchmischen.

Die Aktivität des Bodens zum Versuchsbeginn betrug 600,4 MBq / kg Boden TM und die TNT-Konzentration 200 mg TNT/ kg Boden TM.

3.10 Immobilisierung von TNT und Metaboliten im Boden

Die Untersuchung zur Bilanzierung des mikrobiellen Abbaus von ^{14}C -TNT wurden in geschlossenen Bodenreaktoren aus Glas durchgeführt. Ein Reaktor hatte ein verfügbares Reaktorvolumen von 3,5 l und wurde schichtweise mit ca. 1,0 kg dotiertem Boden und Pilz/Stroh-Substrat im Volumenverhältnis 2:1 (v/v) beschickt (siehe Abb. 1)

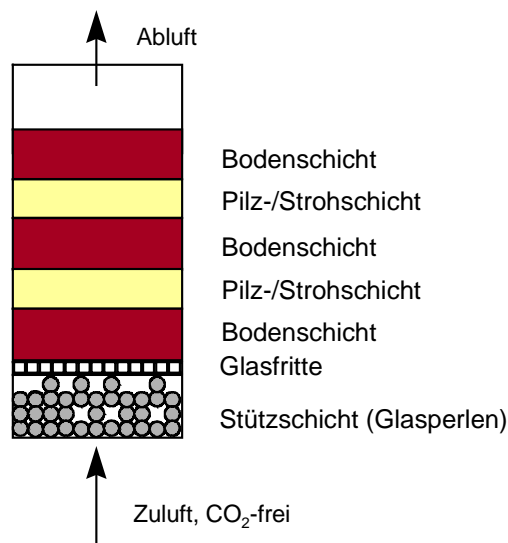


Abb. 1: Aufbau der geschlossenen Bodenreaktoren zur Bilanzierung des mikrobiellen Abbaus von ^{14}C -TNT.

3.11 $^{14}\text{CO}_2$ - Analytik

Die Reaktoren wurden kontinuierlich mit 2 l/h CO_2 - freier Luft durchströmt. Die Reaktorabluft wurde durch Waschflaschen mit je 150 ml Dimethylformamid und anschließend durch je zwei hintereinandergeschaltete Waschflaschen mit je 150 ml 4N Natronlauge geleitet. In den Dimethylformamidflaschen sollten eventuell entstehende flüchtige Organika sorbiert werden. Entstehendes $^{14}\text{CO}_2$ wurde in der Natronlauge gebunden. Die Bestimmung der ^{14}C -Aktivität dieser Lösungen erfolgte β -szintillatorisch.

3.12 Bilanzierung der ^{14}C -Verteilung im Boden

Die Bilanzierung der ^{14}C -Verteilung im Boden erfolgte einerseits durch die vollständige Oxidation der Gesamtprobe, andererseits durch eine Fraktionierung des Bodens und die summarische Erfassung der ^{14}C -Aktivitäten der einzelnen Fraktionen:

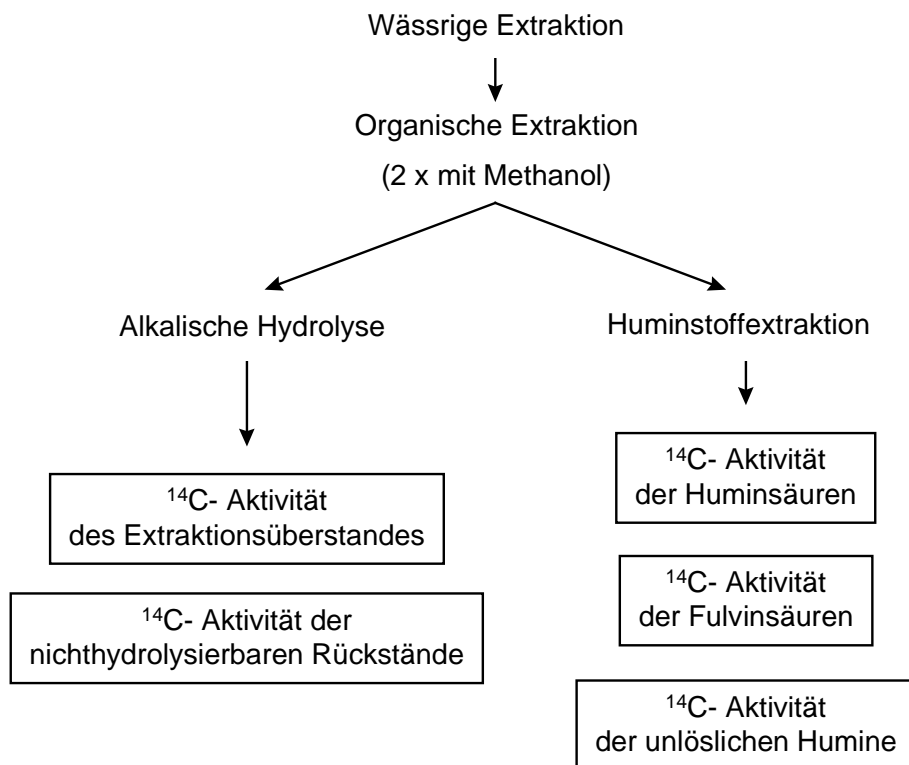
Oxidation der Gesamtprobe

Die Bodenproben wurden getrocknet und Aliquots eingewogen. Diese sind im Sauerstoffstrom der Apparatur Biological Oxidizer der Firma ZINNSER ANALYTIC bei 900°C vollständig verbrannt wurden. Die entstehenden Gase wurden im Oxysolve-Szintillator absorbiert und im

Liquid-Szintillation-Counter (LSC) der Firma PHARMACIA vermessen. Anhand der Trockenmassebestimmung und der eingesetzten Bodenmenge konnte die Gesamtaktivität der Bodenprobe bestimmt werden.

Bodenfraktionierung

Die Bilanzierung der ^{14}C -Komponenten in den einzelnen Bodenfraktionen erfolgte nach folgendem Schema:



Die Bilanzierung erfolgte auf der massenbezogenen Erfassung der ^{14}C -Aktivitäten der einzelnen Bodenfraktionen mit Hilfe des Liquid-Szintillation-Counters (LSC) der Firma PHARMACIA.

3.13 TNT-Abbaukinetik im Bodenreaktor

Um die Metabolisierung des im Boden befindlichen TNT zu analysieren, wurden die Extrakte der Bodenproben mittels HPLC-Analytik chromatographisch untersucht.

3.14 Remobilisierungsuntersuchungen

Für die Remobilisierungsversuche wurde das vorliegende Bodenmaterial einer Extraktion unterzogen, um lösliche ^{14}C -Anteile weitestgehend zu eliminieren.

Der vorextrahierte Boden wurde mit nativem Boden im Verhältnis 1:1 vermischt, um die biologische Aktivität des Bodens wiederherzustellen.

3.14.1 Remobilisierung (physiko-chemisch) durch Gefügebrauch

Der Rückstandboden wurde in einer Kugelmühle bei 76 U/min. 20 min. gemahlen. Die Bilanzierung vor und nach dem Gefügebrauch erfolgt mittels der Bodenextraktion und deren β -szintillatorischer Auswertung.

3.14.2 Remobilisierung (physiko-chemisch) durch Auflösung metallorganischer Komplexe

Durch die Behandlung des rückstandhaltigen Bodenmaterials mit Hilfe von EDTA werden die metallorganischen Komplexe der Huminstoffe aufgespalten. Es besteht so die Möglichkeit der Freisetzung der in den Huminstoffen eingeschlossenen oder an ihnen gebundenen Rückständen.

Für diesen Versuch wurde der Boden mit EDTA-Lösungen verschiedener Konzentrationen versetzt und 20 Stunden geschüttelt. Im Anschluß wurde freigesetztes CO_2 in der Gasphase vermessen und die Probe zentrifugiert. Der Überstand wurde im LSC vermessen, das Zentrifugat einer fraktionierten Bodenextraktion unterworfen und die ^{14}C -Bilanz erstellt.

3.14.3 Remobilisierung (physiko-chemisch) durch Temperatureinflüsse

Diese Methode soll über die Remobilisierbarkeit gebundener Rückstände durch den Einfluß von Temperaturschwankungen (jahreszeitlich bedingt) geben. Es wurden jeweils 30 g Boden TM in eine 250 ml Schottflasche gegeben und mit Wasser angefeuchtet. Drei der sechs Parallelen standen unter Luftabschluß (Chloroformatmosphäre). Die Proben werden im 12 Stunden-Takt bei -30°C eingefroren und bei 40°C aufgetaut. Nach fünf solcher Zyklen wurde der $^{14}\text{CO}_2$ -Gehalt der Gasphase untersucht, der Boden extrahiert und die ^{14}C -Aktivitäten bilanziert.

3.14.4 Remobilisierung (physiko-chemisch) durch Wassergehaltsänderungen

Eine mögliche Remobilisierung gebundener Rückstände durch Schwankungen im Wassergehalt des Boden soll mit dieser Methode untersucht werden.

Jeweils 30 g TM Rückstandsboden und 20 g Wasser werden in 75 ml-Erlmeyerkolben gefüllt. Diese wurden 24 h im Trockenschrank bei 45°C temperiert. Danach wurde das verdunstete Wasser wieder aufgefüllt und die Proben im Kühlschrank bei 4°C 24 h gelagert. Nach fünf solcher Zyklen wurde der Boden extrahiert und die ^{14}C -Aktivitäten bilanziert.

3.14.5 Remobilisierung (biologisch) durch Zusatz von Huminstoff-abbauenden, ligninolytischen Pilzen

Eine biologische Methode zur Schaffung von *worst-case* Bedingungen ist der Einsatz von Huminstoff-abbauenden Pilzen. Diese besitzen aufgrund ihres ligninolytischen Enzymsystems die Fähigkeit, polymere Komponenten der Bodenstreuenschicht wie Huminstoffe und Lignin zu spalten [29; 30; 32]. Eine mögliche Wiederfreisetzung gebundener Rückstände durch die natürliche Pilzflora im Boden sollte damit simuliert und untersucht werden. In den Remobilisierungsversuchen kamen vier Weißfäulepilze und vier streuabbauende Basidiomyceten zum Einsatz.

Die Pilze wurden auf sterilem Stroh in 250 ml Schottflaschen vorinkubiert. Nach Anwachsen der Pilze wurde jeweils 10 g TM ^{14}C -Rückstandsboden zugegeben und ein Röhrchen mit 2N KOH-Lösung. Die Lauge wurde während der Versuchsdauer von 44 Tagen regelmäßig ausgetauscht und β -szintillatorisch analysiert, so daß Aussagen über die CO_2 -Freisetzungen gemacht werden konnten. Zum Versuchsende wurde der Boden extrahiert, die ^{14}C -Aktivitäten bestimmt und die Bilanz erstellt.

Eine Modifikation dieser Methode war die Induktion der pilzlichen extrazellulären Enzyme, welche an einer Remobilisierung von Rückständen aus dem Boden maßgeblich beteiligt sein können. Die Pilze wurden dazu in sterilem Kulturmedium angezogen. Nach fünf Tagen wurde der Rückstandsboden zugegeben und elf Tage kultiviert. Während dieser Zeit wurde der Gasraum auf entstandenes $^{14}\text{CO}_2$ analysiert (s.o.). Zum Versuchsende wurde der wässrige Überstand vom Bodenpellet getrennt und einer fraktionierten Huminstoffextraktion unterzogen. Die Bilanzierung erfolgte anhand der ^{14}C -Aktivitätsmessung des Überstandes, der einzelnen Fraktionen und des freigesetzten $^{14}\text{CO}_2$.

3.14.6 Remobilisierung (biologisch) durch Zusatz Radikal-bildender Enzyme

Eine weitere Methode zur Abschätzung des Langzeitverhaltens immobilisierter TNT-Abbauprodukte beruht auf der Überlegung, nicht den gesamten Pilz im Boden einzusetzen, sondern gezielt das für den Huminstoffabbau und somit für die Remobilisierung verantwortliche extrazelluläre Enzymsystem der holz- und streuabbauenden Pilze dem Boden zugeben. Für die Simulation der Umweltbedingungen wurde die häufigste extrazelluläre Peroxidase streubesiedelnder Basidiomyceten, die Mangan-Peroxidase, ausgewählt. Der verwendete ^{14}C -Rückstandsboden wurde direkt und in Form der jeweiligen Bodenfraktionen nach der Extraktion des Bodens eingesetzt. Nach Zugabe der MnP wurde die $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung im Abstand von 24 Stunden über sieben Tage gemessen. Strukturelle Veränderungen innerhalb der Bodenfraktionen durch den Einfluß der MnP konnten über Molekülgrößenveränderung des Bodens mit Hilfe der GPC analysiert werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

Innerhalb des Projektes "Bioremediation von TNT-belasteten Böden mit Pilzen; Untersuchungen zur Metabolisierung, Mineralisierung und Humifizierung" wurde nachgewiesen, daß unter einer Vielzahl von Stämmen der taxonomischen Gruppen Deuteromyceten, Ascomyceten, Zygomyceten und Basidiomyceten nur ligninolytische holz- und streuabbauende Basidiomyceten das Potential zur effektiven Mineralisierung von TNT besitzen (Abb. 2 [52]).

Der cometabolische Abbau von TNT beginnt mit der sukzessiven Reduktion einer der drei Nitrogruppen [9]. Als Hauptmetabolite werden durch Pilze 2-Amino-4,6-dinitrotoluol und 4-Amino-2,6-dinitrotoluol gebildet. Die Reduktion von TNT zu den Aminodinitrotoluolen erfolgte nicht stöchiometrisch, so daß Bilanzlücken, besonders ausgeprägt bei holz- und streuabbauenden Basidiomyceten, auftraten. Wie die Bilanzierung der TNT-Mineralisierung zeigte, waren sie auf den Abbau der Reduktionsprodukte zu CO₂ und nicht aromatischen Spaltprodukten sowie auf TNT-Metabolite zurückzuführen, die in die Biomasse eingebaut wurden.

Aus den Untersuchungen zum TNT-Abbau durch *P. chrysosporium* war bekannt, daß die Transformation von TNT zu 4-AmDNT und 2-AmDNT auch bei diesem Pilz nur kurzzeitig quantitativ verläuft und nachfolgend durch den Folgeabbau der AmDNT zu unbekanntem Intermediaten eine Bilanzlücke von über 70 % auftritt [58]. Es wird davon ausgegangen, daß die weitere AmDNT-Umsetzung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im TNT-Abbau ist und durch die Folgemetabolisierung von AmDNT die Akkumulation persistenter Azoxyverbindungen gering gehalten wird [7]. Diese Dimerisationsprodukte konnten in den vorliegenden Untersuchungen nicht detektiert werden.

Untersuchungen zur Mineralisierung von uniform ring-markiertem ¹⁴C-TNT ergaben, daß ausschließlich holz- und streuabbauende Basidiomyceten zum effektiven Abbau von U_R-¹⁴C-TNT befähigt waren (Abb. 2).

Mit einer Freisetzung von über 50 % ¹⁴CO₂ wurde die bisher höchste für TNT beschriebene Mineralisierung (eingesetzte Konzentration 0,1 mM = 22,7 mg/l) durch *Clitocybula dusenii* erzielt. Es konnte weiterhin der Abbau von TNT durch eine Reihe bisher nicht untersuchter Pilze demonstriert werden. Dabei erwiesen sich holzabbauende Basidiomyceten der Arten *Clitocybula dusenii*, *Nematoloma frowardii*, *Hypholoma fasciculare*, *Kuehneromyces mutabilis* und *Trametes versicolor* sowie die streuabbauenden Pilzarten *Stropharia rugosoannulata* und *Agrocybe praecox* als besonders aktiv [50; 51; 52]. Keiner der untersuchten Mikromyceten war zur Mineralisierung von TNT befähigt (siehe Abb. 2).

In dem vorgestellten Projekt fanden infolge dessen Pilze besondere Berücksichtigung, die auf Grund ihres Vorkommens, ihrer ökologischen Merkmale und ihrer physiologisch-biochemischen Fähigkeiten ein hohes Potential zum Abbau substituierter aromatischer Verbindungen, einschließlich Fremdstoffe, erwarten lassen:

Holzabbauende Basidiomyceten, sowie Streuschicht bewohnende Großpilze. Holzabbauende Basidiomyceten wachsen auf lignozellulosehaltigen Substraten (Laub- und Nadelholz, Stroh), wobei sie den Kohlenhydratanteil (Hemizellulosen, Zellulosen) als Wachstumssubstrat nutzen. Der Abbau der komplexen Ligninpolymerscheide erfolgt dabei durch ein in der Natur einmaliges Enzymsystem, da das dreidimensionale Heteropolymer (Molekulargewicht 600-

100000 kDalton) nicht in die Zelle aufgenommen werden kann [37]. Zu den Bestandteilen des ligninolytischen, extrazellulären Enzymsystems zählen Laccase, Lignin-Peroxidase, Mangan-Peroxidase und Wasserstoffperoxid-generierende Enzyme, wie z. B. Glukose-Oxidase, Glyoxalat-Oxidase und Arylalkohol-Oxidase [37; 63].

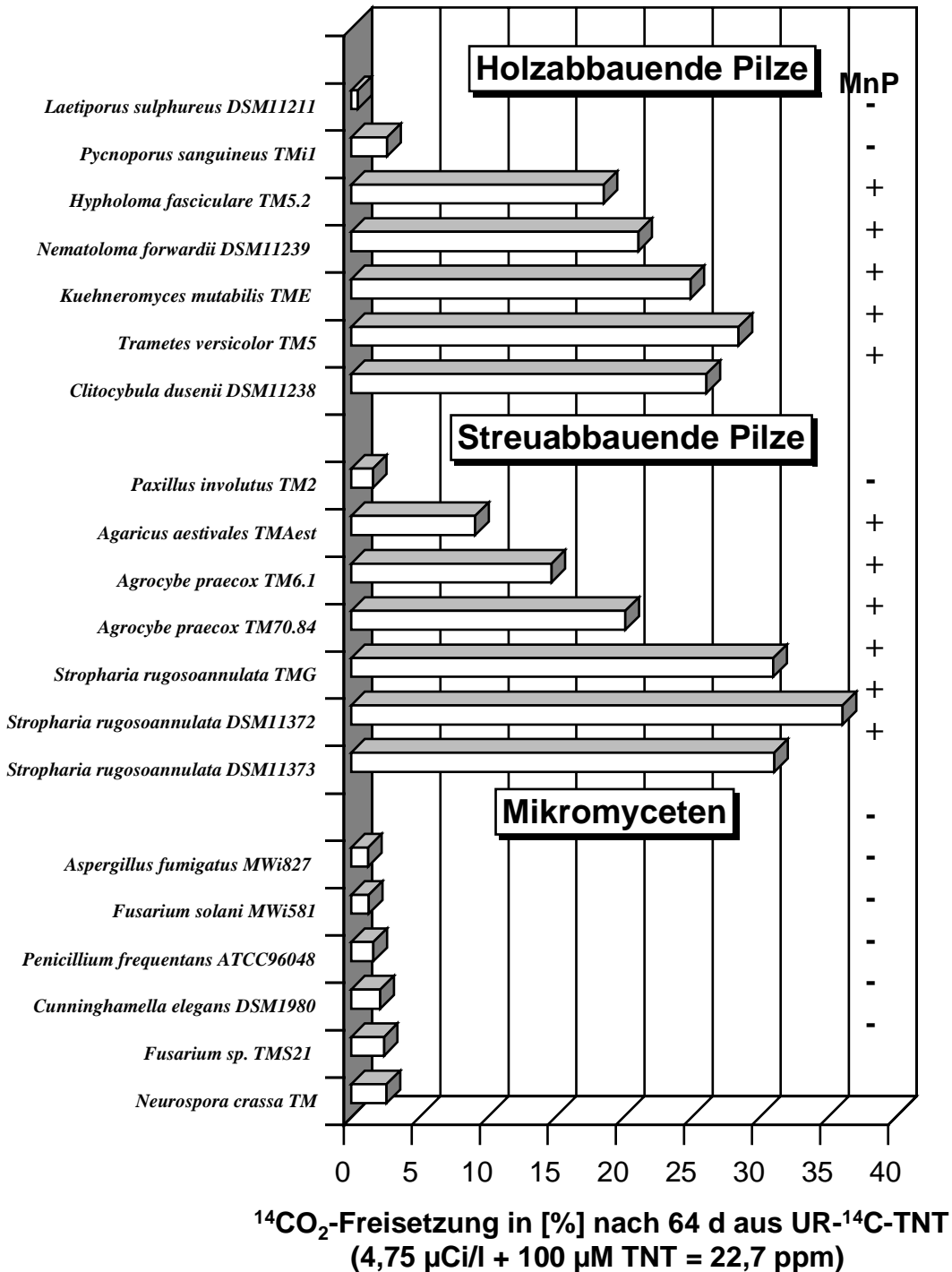


Abb. 2: Mineralisierung von uniform ringmarkiertem TNT durch Pilzstämmen verschiedener Pilzgruppen, Bildung von Mangan-Peroxidase (MnP) bei Pilzen.

Lediglich bei der Überführung abbauaktiver Basidiomyceten in Bodensanierungs-verfahren traten deutliche Unterschiede im Wachstum der Pilze im kontaminierten Boden auf. Holzabbauende Basidiomyceten siedelten sich im Gegensatz zu streuabbauenden Stämmen schlechter oder nicht in Standortböden an und erforderten den Zusatz spezieller Substrate wie Holz [21; 51]. Diese Befunde hatten einen entscheidenden Einfluß auf die Wahl der Organismen, welche für Mietenverfahren zur Sprengstoffelimierung aus kontaminierten Böden unter Standortbedingungen in Clausthal-Zellerfeld zum Einsatz kamen [19; 20].

Es wird allgemein angenommen, daß streuabbauende Basidiomyceten maßgeblich am "Humus-Turnover" beteiligt sind [8]. Die Streuschicht wird ebenfalls von einer großen Zahl von Mikromyceten besiedelt, die jedoch im Gegensatz zu den erwähnten Basidiomyceten kein effektives ligninolytisches extrazelluläres Enzymsystem besitzen [12] und TNT nicht mineralisierten.

Wie in Abb. 2 dargestellt ist ein charakteristisches Merkmal aller TNT-mineralisierenden Basidiomyceten die Bildung von Mangan-Peroxidase [21; 54]. In Pilzkulturen, die gezielt zur Bildung der MnP angeregt wurden, erfolgte eine signifikante Erhöhung der Mineralisierung von ^{14}C -TNT. Die gesteigerte Bildung der MnP wurde durch den Zusatz von Mangan(II)-Ionen erreicht und führte sowohl bei den holzabbauenden Basidiomyceten *Nematoloma frowardii* und *Clitocybula dusenii* als auch bei den streuabbauenden Stämmen dieser Pilzgruppe - *Stropharia rugosoannulata* Stamm Gelbkappe und *Stropharia rugosoannulata* Stamm Braunkappe - zu einer Steigerung der $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung um 50-100 % in vergleichbaren Zeiträumen [21; 50]. Hieraus wurde geschlußfolgert, daß die Mangan-Peroxidase einen entscheidenden Einfluß auf die TNT- Mineralisierung durch ligninolytische Basidiomyceten hat.

Schon im Vorfeld dieser Arbeiten wurden AmDNT als Substrate der MnP vorgeschlagen [7; 57]. Allerdings konnte nicht aufgeklärt werden, auf welche Weise ein Abbau erfolgt. Obwohl der Abbau von TNT-Metaboliten durch Peroxidasen damit nicht direkt nachgewiesen werden konnte, lagen vergleichbare Informationen zum Abbau von 2,4-Dinitrotoluol durch ligninolytische Enzyme von *P. chrysosporium* vor [6]. Die Autoren schlußfolgerten, daß die MnP auch reduzierte Metabolite des TNT-Stoffwechsels umsetzten sollte, entsprechende Experimente wurden jedoch nicht durchgeführt.

Schlußfolgernd aus den vorliegenden Resultaten wurde im vorliegenden Projekt verschiedene Mangan-Peroxidasen isoliert und im Pilz-freien Ansatz auf die Umsetzung von TNT und seiner reduzierten Hauptmetabolite untersucht. Durch die Mangan-Peroxidase von *N. frowardii* und *S. rugosoannulata* gelang es, die TNT-Reduktionsprodukte 2-Amino-4,6-dinitrotoluol, 4-Amino-2,6-dinitrotoluol und 2,6-Diamino-4-nitrotoluol im zellfreien Flüssigsystem vollständig umzusetzen (Abb. 3 [54]).

Diese enzymatische Reaktion führte jedoch im zellfreien System nicht zur Bildung quantifizierbarer, neuer Metabolite [53]. Infolge dessen wurden die Experimente mit Hilfe uniform ringmarkierter Aminonitrotoluole im Detail verfolgt. Erstmalig wurde der Nachweis erbracht, daß Aminodinitrotoluole durch isolierte Mangan-Peroxidasen von *N. frowardii* oder *S. rugosoannulata* (ohne Organismus) bis zu CO_2 mineralisiert werden können (Abb. 4 [28; 53; 54]).

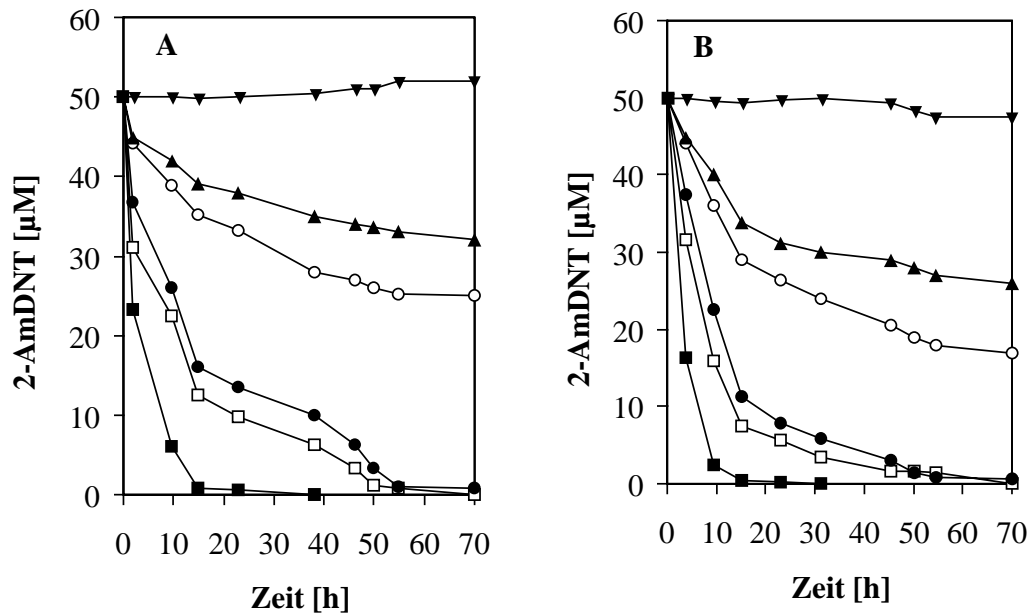


Abb. 3: Enzymatische Umsetzung von 2-Amino-4,6-Dinitrotoluol durch isolierte Mangan-Peroxidase von *Nematoloma frowardii* (A) und *Stropharia rugosoannulata* (B) im zellfreien System unter Zusatz verschiedener Thiolmediatoren. Legende: ■ GSH (10 mM), □ GSH (1 mM), ● L-Cystein (10 mM), ○ L-Cystein (1 mM), ▲ ohne Thiol, ▼ Kontrolle (hitzedenaturierte MnP).

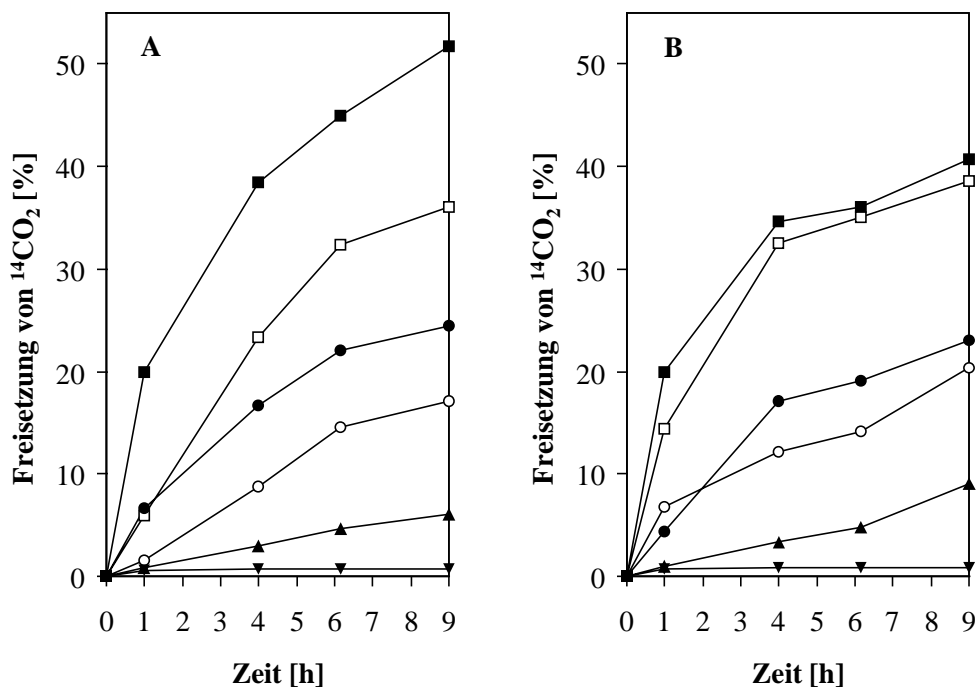


Abb. 4: Mineralisierung von $\text{U}_R\text{-}^{14}\text{C}$ -2-AmDNT ($0,9 \mu\text{Ci/ml}$, $40,4 \mu\text{M}$) durch isolierte Mangan-Peroxidase (2 U/ml) von *Nematoloma frowardii* (A) und *Stropharia rugosoannulata* (B). Legende: ■ GSH (10 mM), □ GSH (1 mM), ● L-Cystein (10 mM), ○ L-Cystein (1 mM), ▲ ohne Thiol, ▼ Kontrolle (hitzedenaturierte MnP).

Als Reaktionsprodukte des enzymatischen Abbauprozesses wurden mittels radioaktiv markierter Aminodinitrotoluole Kohlendioxid und niedermolekulare, nichtaromatische Spaltprodukte (hochpolare organische Säuren wie Acetat, Glyoxalat und Formiat) bestimmt [28]. Vergleichende Untersuchungen ergaben, daß die enzymatische Mineralisierung von ^{14}C -2-AmDNT sowohl durch die Mangan-Peroxidase des holzbesiedelnden Pilzes *N. frowardii* als auch des Streupilzes *S. rugosoannulata* erfolgt [54]. Unter Verwendung der gereinigten Isoformen der MnP von *N. frowardii* konnte ebenfalls eine Freisetzung von nahezu 40 % $^{14}\text{CO}_2$ aus ^{14}C -2-AmDNT erreicht werden [28]. Jüngste Untersuchungen unter Verwendung der MnP des gut charakterisierten Weißfäulepilzes *Phlebia radiata* haben die Mineralisierung von U_R - ^{14}C -2-AmDNT bestätigt und führten zu einem 80 %-igem Abbau zu $^{14}\text{CO}_2$. TNT selbst wurde zu 10 % zu $^{14}\text{CO}_2$ mineralisiert [62].

Die Mangan-Peroxidase ist ein Hämprotein, daß die Zielmoleküle nicht direkt angreift, sondern über einen niedermolekularen "Vermittler" (Mediator) - das Mangan-Ion wirksam wird. Mangan(III) ist ein außerordentlich starkes Oxidationsmittel, das insbesondere phenolische Verbindungen oxidiert und makromolekulare Stoffe spaltet. Die Oxidationskraft des Systems kann noch erheblich durch sekundäre Mediatoren gesteigert werden. Hierbei handelt es sich um organische Schwefelverbindungen (Thiole), die in Gegenwart von Mangan-Peroxidase zu extrem aggressiven Mangan(III)-Thiylradikal-Komplexen werden [34; 50]. Bei dem Weißfäulepilz *P. chrysosporium* wurden bis zu 1 mg GSH pro g Myceltrockenmasse beschrieben [45]. Von großer Bedeutung ist, daß Thiole zwar einen deutlich stimulierenden Effekt auf die CO_2 -Bildung haben, letztlich aber nicht unbedingt notwendig für den Mineralisierungsprozeß sind.

Durch die Bildung hochreaktiver Chelatkomplexe, in denen die Thiylradikale relativ stabil vorliegen [65], wurden über 40 % U_R - ^{14}C -2-AmDNT direkt zu CO_2 abgebaut. Dabei erfolgt die eigentliche Stabilisierung der Komplexe (wie auch des Mn(III) allgemein) über Dicarbonsäuren, die über ihre Carboxylgruppen koordinative Bindungen zum Mangan ausbilden. Unter natürlichen Bedingungen scheiden holzabbauende Basidiomyceten vor allem Malat, in für die Wirksamkeit der MnP ausreichend hohen Konzentrationen (40 mM) aus. Damit werden alle Komponenten für eine effektive MnP-Katalyse vom Pilz selbst gebildet und liegen außerhalb der Hyphen vor [33].

Bezugnehmend auf die Literatur und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wird angenommen, daß hochreaktive Mangan-Chelatkomplexe die Oxidation von U_R - ^{14}C -2-AmDNT unter Bildung von Ringspaltungsprodukten bewirken. Letztere werden über sukzessive Decarboxylierungsreaktionen bis zum $^{14}\text{CO}_2$ abgebaut. [28; 31]. Ungeklärt ist allerdings noch die Frage, auf welche Weise der Sauerstoff in die Moleküle gelangt. Weiterführende Untersuchungen belegen, daß neben molekularem Sauerstoff auch dessen Radikale (Peroxyl-Radikale, Superoxid-Anion-Radikale) beteiligt sind [31].

Die Wirkung des MnP-Systems auf U_R - ^{14}C -2-AmDNT weist im Ergebnis gewisse Ähnlichkeit mit der von Li et al. [39] beschriebenen Naßoxidation von TNT durch die Fentons-Reaktion auf. Die UV-unterstützte Naßoxidation von TNT wurde im TV 3.1.3 untersucht (Kap. 9.2.4 des Leitfadens).

Da es sich auch bei den Produkten des radikalischen Mechanismus der MnP um ein komplexes Gemisch organischer Säuren (Glyoxalat, Oxalat, Formiat, Acetat) handelt wird zudem die Annahme gestützt, daß Decarboxylierungsreaktionen den letzten Schritt im MnP-katalysierten Mineralsierungsprozeß bilden [28]. Es muß jedoch darauf hingewiesen werden, daß im Falle

der enzymatischen Mineralisierung bereits eine ca. tausendfach geringere H_2O_2 -Menge ausreichend ist, um vergleichbare Umsätze zu katalysieren. Entsprechend neuester Untersuchungen kann auf die Zugabe von Wasserstoffperoxid völlig verzichtet werden, da es autokatalytisch durch die Chelatorradikale gebildet wird [31; 32].

Dieses zellfreie Prinzip der MnP-katalysierten enzymatischen "Verbrennung" konnte bei einer Vielzahl weiterer aromatischer und aliphatischer Verbindungen, darunter umweltrelevante Fremdstoffe wie Pentachlorphenol, [28] arsenorganische Kampfstoffe [34] und polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe [49] sowie makromolekulare Naturstoffe wie Huminsäuren [29] und Lignozellulosen [30; 33] nachgewiesen werden.

Von besonderer Bedeutung für die Bioremediation von TNT-kontaminierten Böden ist die Tatsache, daß auch durch die MnP des streuabbauenden Pilzes *S. rugosoannulata* Aminodinitrotoluole mineralisiert werden können, da diese die TNT-Hauptabbauprodukte von ubiquitären, bodenbewohnenden Bakterien und Mikromyceten auf kontaminierten Standorten sind. Streuabbauende Basidiomyceten besiedeln die obersten Bodenschichten und sind somit problemlos und stabil in Böden etablierbar. Damit unterscheiden sie sich von holzabbauenden Basidiomyceten, die für die Bodensanierung weniger geeignet sind. [21; 50; 51].

Für die **praktische Erprobung** des Reinigungspotentials bestimmter Pilze ist neben der Bildung ligninolytischer Enzyme die Fähigkeit zum Wachstum auf niedermolekularen Lignozellulosen, wie sie in der Streuschicht des Bodens vorkommen, von entscheidender Bedeutung. Innerhalb eines Mietenansatzes auf dem Rüstungsalblastenstandort Clausthal-Zellerfeld wurde der streuabbauende Basidiomycet *Stropharia rugosoannulata* unter **Freilandbedingungen** in TNT-kontaminiertem Boden getestet [19; 20; 21]. Der Versuch führte zu folgenden Ergebnissen:

1. Der streuzersetzende Basidiomycet *Stropharia rugosoannulata* hat sich erfolgreich in TNT-kontaminiertem Standortboden unter Freilandbedingungen etabliert.
2. *Stropharia rugosoannulata* bewirkte eine 72 %-ige Abnahme der TNT-Ausgangskonzentration (78 mg TNT/ kg Boden TM) innerhalb der ersten Woche nach Inokulation des Pilz-Stroh-Substrates. Nach einem Jahr war TNT im Boden nicht mehr nachweisbar ($< 0,1$ mg TNT/ kg Boden TM) (Abb. 5).
3. *Stropharia rugosoannulata* bewirkte eine 75 %-ige Reduktion der ADNT-Ausgangskonzentration (27 mg ADNT/ kg Boden TM) im Versuchszeitraum.
4. In der mit Pilz beimpften Miete konnte keine Akkumulation von TNT oder seiner Metabolite im Sickerwasser bzw. in den Fruchtkörpern der auf der Miete gewachsenen Pilze nachgewiesen werden. Im Boden der Pilzmiete war ebenfalls keine Akkumulation von TNT-Reduktionsprodukten nachweisbar. Eine Auswaschung der Schadstoffe fand nicht statt.

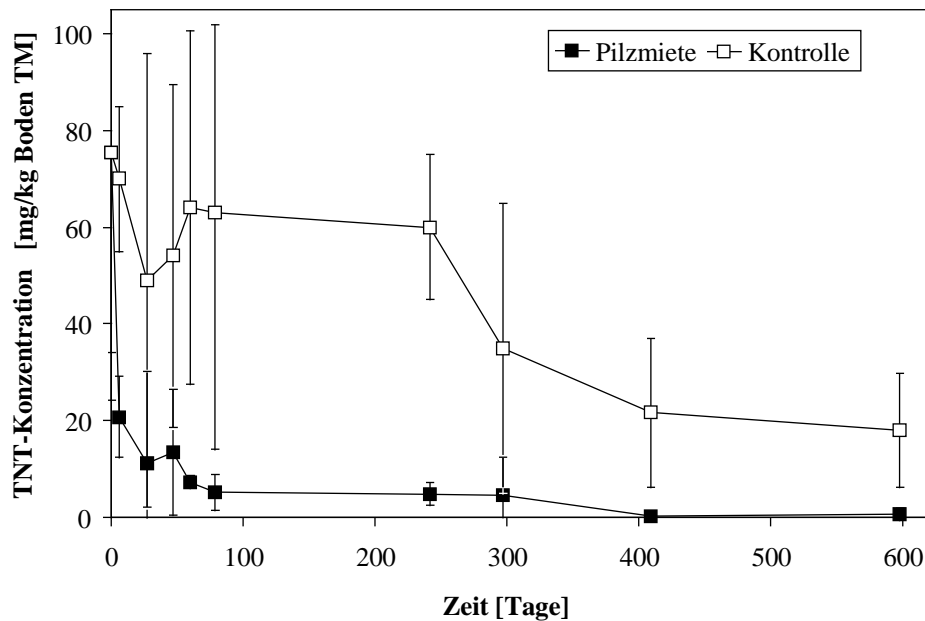


Abb. 5: Freilandmietensystem mit *Stropharia rugosoannulata*. TNT-Konzentration im Boden der Pilz- und der Kontrollmiete mit Standardabweichung

Auf der Basis der Untersuchungen zur Etablierbarkeit von *S. rugosoannulata* unter Freilandbedingungen und der Fähigkeit zur effektiven Abminderung von TNT in kontaminiertem Boden wurden vertiefende Untersuchungen zum Verbleib des TNT und seiner Metaboliten unter Laborbedingungen mit Radioisotopen durchgeführt [22; 50].

Die Frage nach dem Verbleib des TNT nach Zusatz des Streuschichtpilzes *S. rugosoannulata* wurde durch ein *scale-down* des Freilandversuches und durch eine künstliche radioaktive Markierung des Bodens mit $U_R\text{-}^{14}\text{C-TNT}$ geklärt. In einem geschlossenen System von Bodenreaktoren (Abb. 1), in denen vorinkubiertes Pilz/Stroh-Substrat schichtweise zwischen $^{14}\text{C-TNT}$ -dotierten, unsterilen Boden eingebracht wurde, konnten die Transformationsvorgänge der zugegebenen ^{14}C -Aktivität innerhalb des Bodens und in der gasförmigen Phase bilanziert werden. Die Umverteilung der ^{14}C -Aktivität während der aeroben Inkubation im Reaktorsystem geht aus Abb. 6 hervor.

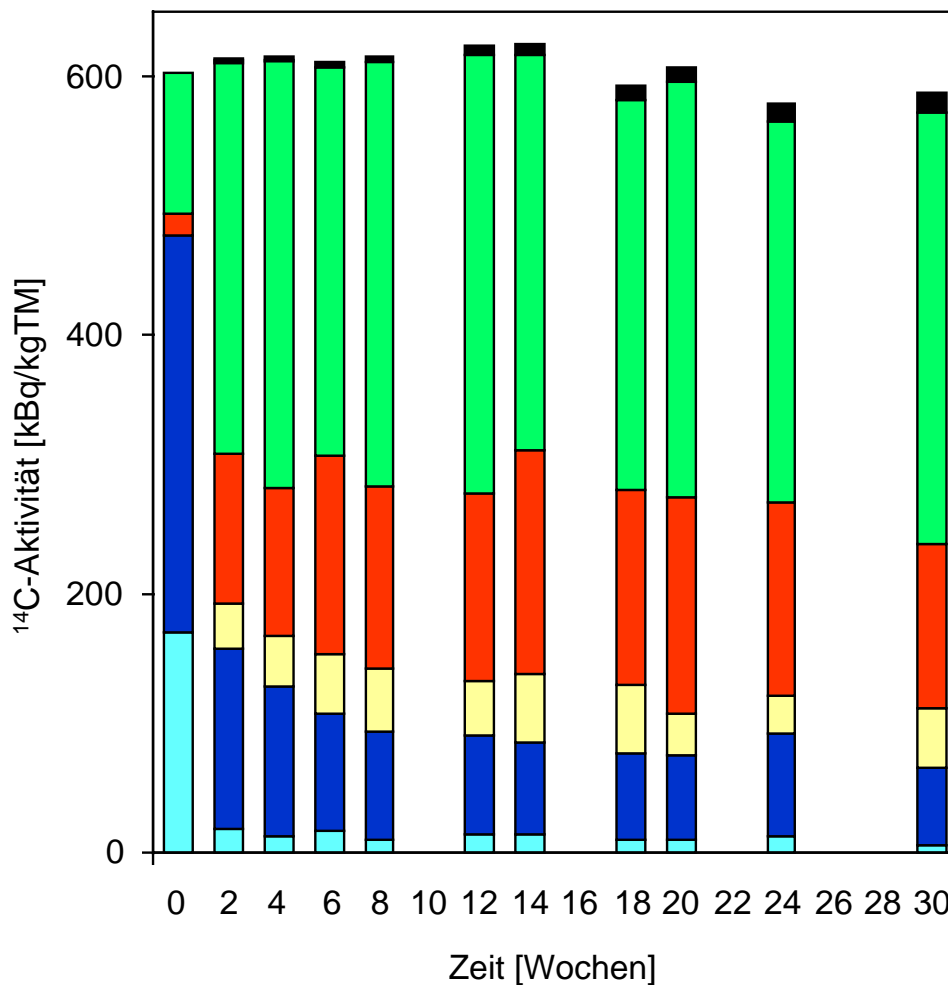


Abb. 6: Immobilisierung von ¹⁴C-TNT im Bodenreaktorsystem. Bilanz der ¹⁴C-Aktivität nach aerober Inkubation mit *S. rugosoannulata*. Legende: ■ wasserlöslich, ■ organisch löslich, ■ in Fulvosäuren, ■ in Huminsäuren, ■ in unlöslichen Huminen, ■ als CO₂ freigesetzt.

Die maßstabsgerechte Übertragung des Freilandmieten-Versuchs auf ein Laborreaktorsystem führte zu folgenden Ergebnissen:

1. TNT war in der wasser- und organisch- extrahierbaren Bodenfraktion nach drei Wochen nicht mehr nachweisbar
2. 86 % der ¹⁴C-Aktivität wurden in den Bodenfraktionen der Huminstoffe als gebundene Rückstände festgelegt
3. 1 % der zugegebenen Aktivität lag in Wasser-extrahierbarer Form vor
4. 10 % der zugegebenen Aktivität lagen in der organisch-extrahierbaren Bodenfraktion vor, davon die Hälfte in Form von Aminodinitrotoluolen
5. 3 % des zugegebenen ¹⁴C-TNT wurden im Versuchszeitraum mineralisiert.

Damit bewirkte die Behandlung von ^{14}C -TNT-dotiertem Boden mit dem streuabbauenden Basidiomyceten *Stropharia rugosoannulata* im Bodenreaktor über einen Zeitraum von 30 Wochen eine Immobilisierung des zugegebenen ^{14}C -TNT.

Die biologisch leicht verfügbaren Bodenextrakte der wasser- und organisch löslichen Bodenfraktion wurden mittels HPLC noch detaillierter untersucht. In der wasserlöslichen Bodenfraktion konnten neben der TNT-Abnahme keine weiteren Metabolite detektiert werden (Abb. 7a). In der organisch löslichen Bodenfraktion wurde die Abnahme von TNT und die Entstehung der TNT-Reduktionsprodukte AmDNT und geringer Mengen DiAmNT gemessen. Nicht detektierte Substanzen in der Größenordnung von 5 % der eingesetzten Gesamtaktivität lagen als niedermolekulare Verbindungen vor (Abb. 7b).

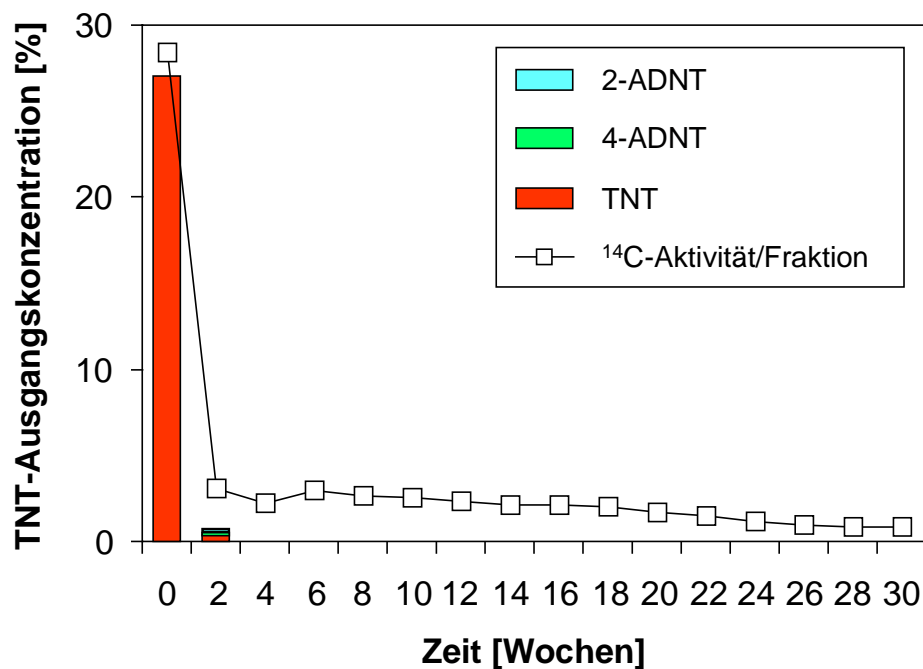


Abb. 7a: Chromatographische Auftrennung der wässrig-extrahierbaren Bodenfraktion nach Immobilisierung im Reaktor

Die Inkubation des dotierten Bodens in Laborreaktoren führte zu einer exponentiellen Abnahme der zugegebenen ^{14}C -Aktivität in der wasser- und methanolextrahierbaren Fraktion. Nach 15 Wochen Inkubation hat sich der wasserlösliche Anteil von 28 % auf 2 % der eingesetzten ^{14}C -Gesamtaktivität und der methanollösliche Anteil von 51 % auf 13 % verringert.

Während der Inkubation des dotierten Bodens erhöhte sich der Anteil der ^{14}C -Aktivität, welcher durch Esterbindungen an die organische Substanz des Bodens gebunden war und/oder sich innerhalb von Bodenkompartmenten befand und durch alkalische Hydrolyse extrahiert werden konnte. Dieser Anteil hat sich nach 15-wöchiger Inkubation von 4 % auf 13 % der Ausgangsaktivität erhöht. Der nicht-extrahierbare Rückstand nach der alkalischen Hydrolyse nahm innerhalb dieser Zeit von 17 % auf 76 % der eingesetzten ^{14}C -Gesamtaktivität zu.

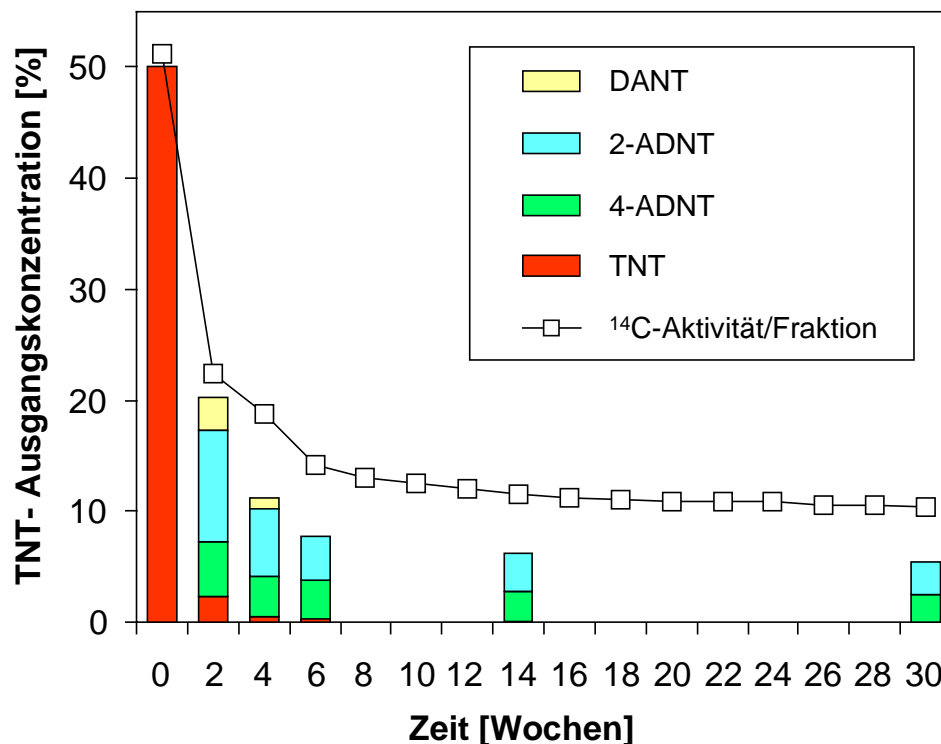


Abb. 7b: Chromatographische Auftrennung der organisch-extrahierbaren Bodenfraktion nach Immobilisierung im Reaktor

Mit Hilfe der Huminstoffextraktion konnte gezeigt werden, daß sich während der Bodeninkubation die zugegebene ^{14}C -Aktivität zu einem geringen Anteil von 9 % an die Fulvinsäuren gebunden wurde. An Huminsäuren gebundene ^{14}C -Aktivität erhöhte sich von 3 % auf 25 % innerhalb von 15 Wochen. Die in der nichtextrahierbaren Fraktion der unlöslichen Humine fixierte ^{14}C -Aktivität erhöhte sich von 18 % auf 56 %.

Die Umverteilung der zugegebenen ^{14}C -Aktivität von den löslichen in die unlöslichen Bodenfraktionen und somit die Bildung nichtextrahierbarer Rückstände erfolgte hauptsächlich in den ersten zwei Wochen der Inkubation. Im Versuchszeitraum konnte eine $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung von 3 % während der Inkubation in den Laborreaktoren gemessen werden. Die insgesamt eingesetzte ^{14}C -Aktivität verblieb zu 98 % im Boden. Die ^{14}C -Bilanzierung der Bodenproben des Reaktorsystems, einschließlich der Gasphase, führte zu einer Wiederfindung der ^{14}C -Aktivität von $99,2 \pm 4$ %.

Im Gegensatz zur vollständigen Mineralisierung von ^{14}C -TNT im Flüssigsystem liegt damit der überwiegende Teil der TNT-Abbauprodukte im Boden in Form gebundener Rückstände vor.

Die gezielte Festlegung der TNT-Abbauprodukte in die organische Bodenmatrix soll bei der Sanierung von kontaminierten Böden als Sicherungs- und Sanierungsmaßnahme eingesetzt werden. Um die ökologische Nachhaltigkeit dieser Maßnahmen zu gewährleisten, muß eine Remobilisierung der gebundenen Bestandteile ausgeschlossen werden. Aufgrund der makromolekularen Struktur der Humine kann von extrazellulären enzymatischen Mechanismen für deren Ab- und Umbau ausgegangen werden.

4.1 Langzeitverhalten der ^{14}C -Rückstände

Daher wurden anschließend Versuche zum Langzeitverhalten der ^{14}C -Rückstände durch *worst-case*-Simulationen durchgeführt. Zur Abschätzung des Langzeitverhaltens der immobilisierten TNT-Abbauprodukte im Boden hinsichtlich ihrer Wiederfreisetzung durch den mikrobiellen Umsatz der Bodenmatrix wurden folgende physiko-chemische und biologische Remobilisierungsexperimente durchgeführt :

Physiko-chemische Behandlungsmethoden:

1. Auflösung metall-organischer Komplexe mit Hilfe von EDTA
2. Simulation jahreszeitlicher Temperaturschwankungen
3. Simulation jahreszeitlicher Feuchtigkeitsschwankungen

Biologische Behandlungsmethoden:

1. Zusatz von Huminstoff- abbauenden bzw. ligninolytischen Pilzen
Boden/ Pilz- System
Boden/ Pilz- Submerskultur
2. Untersuchungen des Remobilisierungspotentials durch Zusatz von Radikal-bildenden Enzymen

4.1.1 Einfluß von EDTA

Das immobilisierte ^{14}C -Bodenmaterial wurde mit dem Mangan-Peroxidase-System von *Nematoloma frowardii* behandelt. Aus den biologisch leicht verfügbaren Bodenfraktionen (wässrig bzw. organisch extrahierbar) konnten durch die Mangan-Peroxidase 16 % bzw. 18 % der enthaltenen ^{14}C -Aktivität als $^{14}\text{CO}_2$ freigesetzt werden. Im nicht extrahierten Boden und in den Huminfraktionen des Bodens lag die $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung im Bereich von maximal 1 %, das entspricht den Kontrollwerten ohne Mangan-Peroxidase.

Unter dem Einfluß von EDTA kam es zu einer partiellen Umlagerung der Rückstände aus der Huminstofffraktion in die löslichen Bodenfraktionen [22]. Die entstandenen Verbindungen entsprechen strukturell nicht mehr den Ausgangsstoffen TNT bzw. AmDNT. Sie sind durch mikrobielle Aktivität angreifbar, was durch die Mineralisierung dieser gelösten Verbindungen deutlich wird.

4.1.2 Temperatur

Die Simulation der Temperaturschwankungen führte weder zu einer $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung ($< 0,01\%$), noch zu Veränderungen der biologisch verfügbaren Anteile (wässrige und organische Bodenfraktionen). Die Temperaturschwankungen bewirkten eine Depolymerisierung der gebundenen Rückstände, was sich in einer Abnahme der ^{14}C -Bestandteile der Huminstofffraktion von 72 auf 57 % und einer Zunahme der Fulvinsäurefraktion (von 3 auf 8 %) und der Huminsäurefraktion (von 17 auf 27 %) widerspiegelt. Die Kontrollproben mit Chloroformatmosphäre zeigten die gleichen Werte als die Proben unter Luftatmosphäre.

4.1.3 Feuchtigkeit

Die Simulation der Feuchtigkeit bewirkte keine signifikante $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung ($< 1\%$). Die biologisch verfügbaren Anteile (wässrige und organische Bodenfraktionen) und die Fulvinsäurefraktion blieben unverändert. Innerhalb der Huminfraktion konnten Depolymerisationsprozesse festgestellt werden (Abnahme der ^{14}C -Aktivität von 72 auf 61 %), die sich in einem Anstieg der ^{14}C -Aktivität von 18 auf 29 % in der Huminsäurefraktion widerspiegelten.

4.1.4 Zusatz von Huminstoff-abbauenden bzw. ligninolytischen Pilzen

Durch die Zugabe von Pilzen zum rückstandshaltigen Boden sollte der Einfluß der natürlichen Pilzflora auf die gebundenen Rückstände untersucht werden. In den Remobilisierungsversuchen kamen vier Weißfäulepilze und vier streuabbauende Basidiomyceten zum Einsatz.

Im **Boden/Pilz-System** wurden die auf Stroh vorkultivierten Pilze dem rückstandshaltigem Boden zugesetzt und inkubiert. Die beiden Stropharia-Stämme *S. rugoso-annulata* Gelbkappe und Braunkappe bewirkten innerhalb von 56 Tagen Freisetzungen von 2,4 % bzw. 2,7 % $^{14}\text{CO}_2$. Der Kontrollansatz zeigte keine $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung.

Im System **Boden/Pilz- Submerskultur** war im Vergleich zur unbeimpften Kontrolle keine signifikante Veränderung durch den Einfluß der Huminstoff-abbauenden Pilze in der Verteilung der ^{14}C -Aktivität in den einzelnen Bodenfraktionen zu erkennen. Freigesetztes $^{14}\text{CO}_2$ konnte nicht nachgewiesen werden.

Um den *worst-case* Effekt zu verschärfen, wurden Parallelansätze der oben genannten Huminstoff-abbauenden Pilze mit induzierter Enzymproduktion realisiert. Das heißt, die Enzyme, die vom jeweiligen Pilz ins Medium ausgeschieden werden und für den Huminstoffabbau von Bedeutung sind, wurden durch entsprechende Zusätze in ihrer Bildung gefördert.

Der Zusatz von Huminstoff-abbauenden Pilzen zu rückstandshaltigem Bodenmaterial bewirkte nachweislich keine signifikante Remobilisierung der gebundenen Rückstände im Flüssigkultursystem.

Ein weiterer Versuch zur Abschätzung des Langzeitverhaltens immobilisierter TNT-Abbauprodukte beruhte auf der Überlegung, nicht den gesamten Pilz im Boden einzusetzen, sondern gezielt das für den Huminstoffabbau und somit für die Remobilisierung verantwortliche extrazelluläre Enzymsystem der holz- und streuabbauenden Pilze zu untersuchen. Für die Simulation der Umweltbedingungen wurde die **Mangan-Peroxidase** von *N. frowardii*, ausgewählt, da bekannt ist, daß Mangan-Peroxidasen die häufigsten Enzyme der streuabbauenden Weißfäulepilze sind. Der verwendete Boden war ^{14}C -Rückstandsboden nach der Reaktorbehandlung. Er wurde im Original eingesetzt und in Form der jeweiligen Bodenfraktionen nach der Extraktion des Bodens.

In Abb. 8a ist der Einfluß des Enzyms auf die einzelnen Fraktionen des ^{14}C -Bodenmaterials dargestellt. Aus den biologisch leicht verfügbaren Bodenfraktionen (wässrig bzw. organisch extrahierbar) konnten durch die Mangan-Peroxidase 17 % bzw. 19 % der enthaltenen ^{14}C -Aktivität als $^{14}\text{CO}_2$ freigesetzt werden. Im nicht extrahierten Boden (Original) und in den

Huminstofffraktionen des Bodens lag die $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung im Bereich von maximal 1 %, das entspricht den Kontrollwerten ohne Mangan-Peroxidase (Abb. 8b).

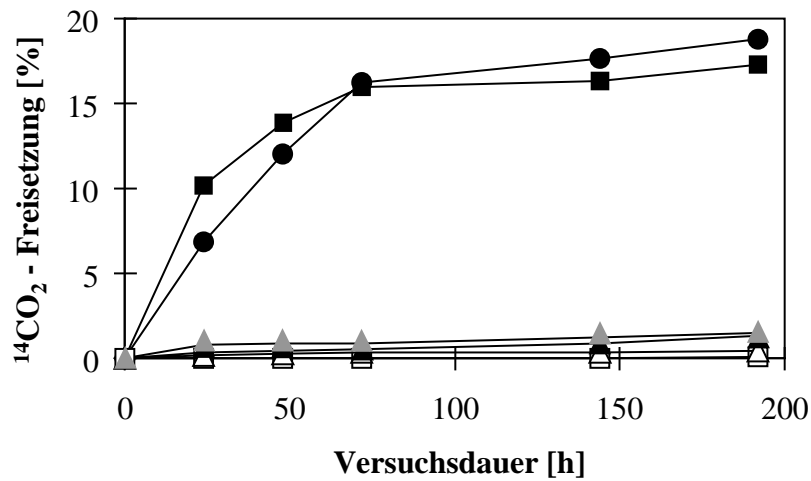


Abb. 8a: Enzymatische Remobilisierung: Freisetzung von $^{14}\text{CO}_2$ aus verschiedenen Bodenfraktionen, die festgelegte Rückstände enthalten nach Zugabe von 5,8 U/ml Mangan-Peroxidase von *Nematoloma frowardii*. Legende: ● wässrige Fraktion, ■ Dioxanfraktion, ▲ Fulvinsäuren, ▲ Huminsäuren, △ unlösliche Humine, □ Boden.

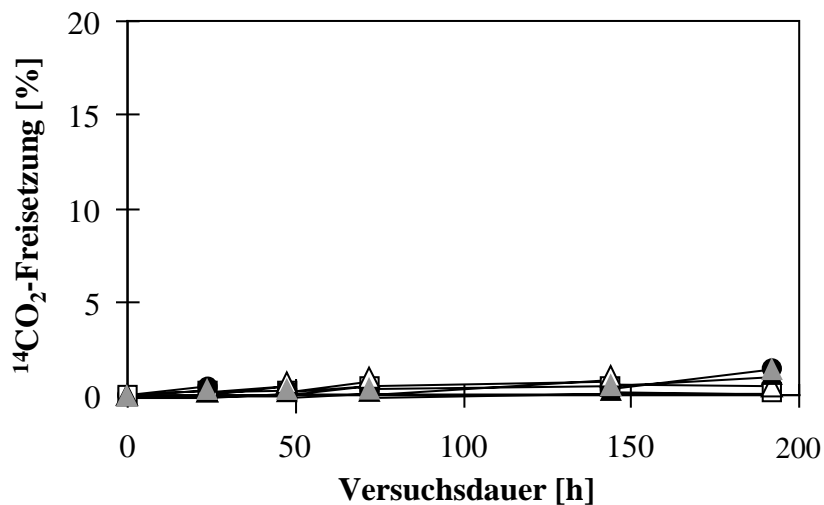


Abb.8b: Kontrolle (Enzymatische Remobilisierung). Ansätze wie Abb. 8a, ohne Enzym. Legende: siehe Abb. 8a.

Die Ergebnisse zeigen, daß durch die Mangan-Peroxidase biologisch verfügbare ^{14}C -Rückstände in der wässrigen und organischen Fraktion mineralisiert und die gebundenen Rückstände in den Fulvinsäuren, Huminsäuren und Huminen enzymatisch depolymerisiert wurden.

Die Anwendung von worst-case-Methoden auf das rückstandshaltige ^{14}C -Bodenmaterial bewirkte keine Remobilisierung gebundener Rückstände. Im Ergebnis dieser Versuche konnte gezeigt werden, daß die enzymatische Depolymerisation der Huminsäuren und des Humusmakromoleküls zu einer Erhöhung des Anteils radioaktiv markierter Rückstände in den

niedermolekularen Fulvosäurefraktionen führt, nicht aber eine $^{14}\text{CO}_2$ - Freisetzung aus dem immobilisierten ^{14}C -Bodenmaterial verursacht. Innerhalb der Rückstände der enthaltenden Bodenfraktionen konnte eine enzymatische Depolymerisation der gebundenen ^{14}C -Rückstände und die enzymatisch bedingte Mineralisation biologisch verfügbarer ^{14}C -Rückstände nachgewiesen werden.

Nach dem jetzigen Stand der Erkenntnisse führt das pilzliche Sanierungsverfahren TNT-kontaminierter Böden zur Humifizierung der Schadstoffe in Form fest gebundener Rückstände.

Durch radikalische Prozesse ligninolytischer Enzyme umgesetzte TNT-Metabolite werden sofort an die Bodenmatrix gebunden (Humifizierung der TNT-Metabolite). Diese Kopplungsreaktionen verlaufen gegenüber der vollständigen Mineralisierung des ^{14}C -TNT zu $^{14}\text{CO}_2$ wesentlich schneller ab und sind somit die bestimmende Reaktionsform beim TNT-Abbau im Boden.

5 Ausblick

Innerhalb des Verbundvorhabens "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten" konnte gezeigt werden, daß die Intermediate des mikrobiellen TNT-Metabolismus bei Pilzen wie auch bei Bakterien in der Bodenmatrix verbleiben und festgelegt werden. Entscheidende Unterschiede bestehen jedoch in der chemischen und toxikologischen Klassifizierung dieser festgelegten Metabolite, welche auf die unterschiedlichen Mechanismen der Bildung dieser Verbindungen zurückzuführen sind. Bei Bakterien wurden hauptsächlich Reduktionen beschrieben, welche zur Sanierungsstrategie der Einbindung von Aminonitroverbindungen bis zum Triaminotoluol führten.

Erst in neueren Arbeiten wurde ein oxydativer Angriff von TNT beschrieben. Als ein Transformationsprodukt entstand 4-Amino-2,6-dinitrobenzoesäure. Dieses Ergebnis ist insbesondere von Interesse, weil erst kürzlich 2-Amino-4,6-dinitrobenzoesäure in Bodenproben der ehemaligen Sprengstoffwerke in Stadtallendorf und Clausthal-Zellerfeld nachgewiesen wurde [10].

Nur bei höheren ligninolytischen Pilzen war es möglich extrazellulär einen Ringaufbruch von TNT und seinen Metaboliten durch unspezifische, radikalisch- wirksame Peroxidasen zu induzieren. Dieser führte jedoch nur im Flüssigsystem bis zur vollständigen Mineralisierung von ^{14}C -TNT zu $^{14}\text{CO}_2$ und organischen Säuren. Im Boden wurde der Hauptanteil der ^{14}C -Aktivität in der Bodenhumusmatrix festgelegt. Es wird davon ausgegangen, daß durch die radikalisierende Wirkung der Mangan-Peroxidasen gebildete TNT-Metabolite unmittelbar an die Bodenmatrix koppeln. Offen blieb bislang die Frage nach der chemischen Struktur und Langzeitstabilität dieser Metabolite. In Analogie zu den Flüssiguntersuchungen liegt die Vermutung nahe, daß es sich im Gegensatz zu den bakteriellen Festlegungsprodukten um nichtaromatische untoxische Ringbruchstücke handelt, welche sehr schnell an die Bodenmatrix binden und auch auf lange Sicht unbedenklich sind. Zukünftige Forschungen müssen klären, ob diese Kopplungsreaktionen gegenüber einer möglichen $^{14}\text{CO}_2$ -Freisetzung

wesentlich schneller erfolgen und damit die bestimmende Reaktionsform beim TNT-Abbau durch Basidiomyceten im Boden sind.

Damit könnte nachgewiesen werden, daß die mikrobiellen Bodenreinigungsprozesse unter natürlichen Bedingungen auf der Festlegung verschiedener mikrobieller Umwandlungsprodukte beruhen, wobei nur durch streubesiedelnde Basidiomyceten und ihres einmaligen ligninolytischen Enzymsystems ein oxidativer Ringaufbruch möglich ist und es zur Einbindung nichtaromatischer, untoxischer TNT-Bruchstücke kommen kann.

6 Formeln und Abkürzungen

2,4-DiAmNT	2,4-Diamino-6-nitrotoluol
2,6-DiAmNT	2,6-Diamino-4-nitrotoluol
2-AmDNT	2-Amino-4,6-dinitrotoluol
4-AmDNT	4-Amino-2,6-dinitrotoluol
Aminodinitrotoluol	Summe aus 2-Amino-4,6-dinitrotoluol und 4-Amino-2,6-dinitrotoluol
Ci	Curie ($0,1 \mu\text{Ci} = 220\ 000 \text{ dpm} = 3,7 \text{ kBq}$)
CO ₂	Kohlendioxid
Diaminonitrotoluol	Summe 2,4-Diamino-6-nitrotoluol und 2,6-Diamino-2-nitrotoluol
dpm	"disintegrations per minute", absolute Anzahl der Atomzerfälle pro Minute
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GSH	reduziertes Glutathion
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hydroxylaminodinitrotoluol	Summe aus 2-Hydroxylamino-4,6-dinitrotoluol und 4-Hydroxylamino-2,6-dinitrotoluol
LiP	Lignin-Peroxidase
LSC	"Liquid scintillation counter", Flüssigszintillationszähler
M	Molarität
MeOH	Methanol
Mn	Mangan
MnP	Mangan-Peroxidase
n	Probenzahl

Nitrosodinitrotoluol	Summe aus 2-Nitroso-4,6-dinitrotoluol und 4-Nitroso-2,6-dinitrotoluol
OH-AmDNT	siehe Hydroxylaminodinitrotoluol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RP	"reversed phase", Umkehrphase
TAT	2,4,6-Triaminotoluol
TM	Tockenmasse
TNT	2,4,6-Trinitrotoluol
U	Internationale Units (IU)
U _R - ¹⁴ C	uniform ringmarkierte Verbindung mit dem Kohlenstoff- Radioisotop der Massenzahl 14
v/v	Volumen pro Volumen

7 Eigene Veröffentlichungen

7.1 In referierten Zeitschriften

Scheibner, K., M. Hofrichter, A. Herre, J. Michels, and W. Fritsche. 1997. Screening for fungi intensively mineralizing 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 452-458.

Scheibner, K., M. Hofrichter, and W. Fritsche. 1997. Mineralization of 2-amino-4,6-dinitrotoluene by manganese peroxidase of the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Biotechnol. Lett.* 19: 835-839.

Schneegaß, I., M. Hofrichter, K. Scheibner, and W. Fritsche. 1997. Purification of the main manganese peroxidase isoenzyme MnP2 from the white-rot fungus *Nematoloma frowardii* b19. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 602-605.

Scheibner, K. and M. Hofrichter. 1998. Conversion of aminonitrotoluenes by fungal manganese peroxidases. *J. Basic Microbiol.* 38: 51-59.

Hofrichter, M., K. Scheibner, I. Schneegaß, and W. Fritsche. 1998. Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 399-404.

Hofrichter, M., K. Scheibner, I. Schneegaß, D. Ziegenhagen, and W. Fritsche. 1998. Mineralization of synthetic humic substances by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49: 584-588.

Hofrichter, M., K. Scheibner, F. Bublitz, I. Schneegaß, D. Ziegenhagen, R. Martens, and W. Fritsche. 1999. Depolymerization of straw lignin by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii* is accompanied by release of carbon dioxide. *Holzforschung* 52: 161-166.

Hofrichter, M., T. Vares, K. Scheibner, S. Galkin, J. Sipilä, and A. Hatakka. 1999. Mineralization and solubilization of synthetic lignin (DHP) by manganese peroxidases from *Nematoloma frowardii* and *Phlebia radiata*. *J. Biotechnol.* 67: 217-228.

Hofrichter, M., T. Vares, M. Kalsi, S. Galkin, K. Scheibner, W. Fritsche and A. Hatakka. 1999. Production of ligninolytic enzymes and organic acids, and mineralization of ¹⁴C-labeled lignin during solid state fermentation of wheat straw with the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1864-1870.

VanAken, B., M. Hofrichter, K. Scheibner, A. Hatakka, H. Naveau, and S.N. Agathos. 1999. Enzymatic in vitro combustion of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. *Biodegradation*, eingereicht.

7.2 In nicht referierten Zeitschriften, Fachbücher und Tagungsbände

Scheibner, K., A. Herre, J. Michels, und W. Fritsche. 1995. Einsatz von Pilzen bei der Sanierung von Böden mittels Kompostierung. Beiträge der Autoren. II. Satusseminar (9. 10. Okt., Jena), BMBF-Verbundvorhaben "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten. TV IV.

Herre, A., J. Michels, K. Scheibner, und W. Fritsche. 1996. Untersuchungen zur biologischen In-situ-Sanierung von TNT-kontaminierten Böden mit Pilzen. In: In-situ-Sanierung von Böden, 11. DECHEMA-Fachgespräch Umweltschutz, Frankf./Main. PO 2.10.

Herre, A., K. Scheibner, and W. Fritsche. 1997. Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) contaminated soil by a litter decaying fungus. VAAM Frühjahrstagung 16.-19. März, Hamburg, Biospektrum Sonderausgabe 97: 59 (PU006).

Scheibner, K., M. Hofrichter, and W. Fritsche. 1997. Mineralization of 2,4,6-trinitro-toluene by fungal manganese peroxidases. VAAM Frühjahrstagung 16.-19. März 1997, Hamburg, Biospektrum Sonderausgabe 97: 59 (PU004).

Herre, A., J. Michels, K. Scheibner, and W. Fritsche. 1997. Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) contaminated soil by a litter decaying fungus. In: Preprints of the fourth international in situ and on-site bioremediation symposium. April 28-May 1, 1997. New Orleans 2, 493-498.

Hofrichter, M., K. Scheibner, U. Sack, and W. Fritsche. 1997. Degradative capacities of white-rot and litter decaying fungi for persistent natural and xenobiotic compounds. In: Rai, R.D, Dhar, B.L., Vermar, R.N. (eds.) *Advances in mushroom biology and production*. Mushroom Society of India, Solan (India), pp. 271-280.

Herre, A., K. Scheibner, und W. Fritsche. 1997. Untersuchungen zur Etablierung von *S. rugosoannulata* im kontaminierten Boden, Ligninolytische Enzyme TNT-mineralisierender Pilze. In: Beiträge der Autoren zum III. Satusseminar (26.-27. Febr. Berlin), BMBF-Verbundvorhaben "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten". TV IV: Bioremediation von Böden mit Pilzen; Metabolisierung, Mineralisierung und Humifizierung.

Scheibner, K., A. Herre, und W. Fritsche. 1998. Abbau von 2,4,6-Trinitrotoluol durch Basidiomyceten-Einfluß des Mangan-Peroxidase-Systems und Schadstoffbilanzierung im Boden. In: Beiträge der Autoren zum IV. Satusseminar (5. Mai Clausthal-Zellerfeld), BMBF-Verbundvorhaben "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten. TV IV: Bioremediation von Böden mit Pilzen; Metabolisierung, Mineralisierung und Humifizierung.

Scheibner, K. 1998. Abbau von 2,4,6-Trinitrotoluol durch Pilze unter besonderer Berücksichtigung ligninolytischer Basidiomyceten und des Mangan-Peroxidase-Systems. Dissertation. Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Herre, A., K. Scheibner, und W. Fritsche. 1998. Bioremediation von 2,4,6-Trinitrotoluol-kontaminiertem Boden durch Pilze auf einem Rüstungsaltslasten-standort. TerraTech 4, 52-55.

Haas, R., K. Scheibner, A. Krippendorf, und M. Hofrichter. 1998. Enzymatischer Abbau von Arsen-Kampfstoffen. In: Proceedings der Fachtagung "Sanierung kontaminierter Böden" (registriertes Projekt der EXPO 2000), Munster, pp. V23-1 - V23-15.

Fritsche W., A. Herre, und K. Scheibner. 1998. Mikrobiologische Sanierung von Rüstungsaltslasten. In: Proceedings der Fachtagung "Sanierung kontaminierter Böden" (registriertes Projekt der EXPO 2000), Munster.

Herre, A., K. Scheibner, M. Kästner, und W. Fritsche. 1998. Aerobe Behandlung von $U_R-^{14}C$ -TNT-dotiertem Boden mit ligninolytischen Pilzen- Bildung und Remobilisierbarkeit der gebundenen Rückstände. In: Beiträge der Autoren zum Satustreffen (22.-23. Sept. Hamburg), BMBF-Verbundvorhaben "Langzeitverhalten und Remobilisierbarkeit. TV IV: Bioremediation von Böden mit Pilzen; Metabolisierung, Mineralisierung und Humifizierung.

Hofrichter, M., K. Scheibner, R. Haas, J. Nüske, und W. Fritsche. 1999. Die Mangan-Peroxidase ligninolytischer Pilze: Ein innovatives biokatalytisches System zur Eliminierung von Umwelt-Schadstoffen. In: Innitiativen im umweltschutz. Bd. 12. Biotechnologie im Umweltschutz, Munster Mai 1999. Erich Schmidt Verlag. 108-117.

7.3 Forschungsberichte

Scheibner, K., A. Herre, J. Michels, und W. Fritsche. 1996. Abschlußbericht des BMFT-Teilvorhabens IV: "Einsatz von Pilzen bei der Sanierung von Böden mittels Kompostierung" (Förderkennzeichen: 1450821) innerhalb des Verbundprojektes "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten", Deutsche Forschungsberichte, Universitätsbibliothek Hannover und Technische Informationsbibliothek.

[weiterhin wurden 5 Zwischenberichte zum oben genannten Vorhaben sowie den Folgeprojekten beim BMFT/BMBF hinterlegt, die abschließende Projektdokumentation liegt Sept. 1999 vor]

8 Literaturverzeichnis

1. **Barr, D. P. and S. D. Aust.** 1994. Mechanisms of white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 2: 78 A - 87 A.
2. **Boopathy, R., C. F. Kulpa, and M. Wilson.** 1993. Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Desulfovibrio* sp. (B-strain). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 270-275.
3. **Boopathy, R., M. Wilson, C. D. Montemagno, J. F. Manning, Jr., and C. F. Kulpa.** 1994. Biological transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by soil bacteria isolated from TNT-contaminated soil. *Bioresource-Technol.* 47: 19-24.
4. **Boopathy, R., J. Manning, C. D. Montemagno, and C. F. Kulpa.** 1994. Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by a *Pseudomonas* consortium under aerobic conditions. *Current Microbiol.* 28: 131-137.
5. **Breitung, J., D. Bruns-Nagel, E. von Löw, K. Steinbach, L. Kaminski, R. Haas, and D. Gemsa.** 1995. Mikrobielle Sanierung von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) kontaminierten Böden. *UWSF-Z Umwelttech. Ökotox.* 7:, 195-200.
6. **Bruns-Nagel, D., J. Breitung, E. von Löw, K. Steinbach, T. Gorontzy, M. Kahl, K.-H. Blotevogel, and D. Gemsa.** 1996. Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene in aerobic soil columns. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2651-2656.
7. **Bumpus, J.A. and M. Tatarko.** 1994. Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium*: identification of initial degradation products and the discovery of TNT metabolite that inhibits lignin peroxidases. *Curr. Microbiol.* 28: 185-190.
8. **Caroll, G.C. and D.T. Wicklow.** 1992. The fungal community; its organisation and role in the ecosystem. ISBN 0-8247-8605-X; 2. Aufl., Marcel Dekker, INC. New York.
9. **Crawford, R.L.** 1995. Biodegradation of nitrated munition compounds and herbicides by obligately anaerobic bacteria. In: *Biodegradation of nitroaromatic compounds*. Spain, J.C. (ed.). Plenum Press, New York: 87-98.
10. **Dahn, A., J. Karutz, and J. Thieme.** 1998. Vorbereitende Maßnahmen zur Sicherstellung einer Vergleichbarkeit verschiedener biologischer Verfahren im Rahmen des Verbundvorhabens 6. In: *Proceedings der Fachtagung "Sanierung kontaminierter Böden" (registriertes Projekt der EXPO 2000)*, Munster: V23-1 - V23-15.
11. **Dawel, G., M. Kästner, J. Michels, J. Poppitz, W. Günther, and W. Fritsche.** 1997. Structure of a laccase-mediated coupling product of 2,4-diamino-6-nitrotoluene (2,4-DANT) to guaiacol- a model for coupling of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) metabolites to humic organic soil matrix. *Appl. Env. Microbiol.* 63: 2560-2565.
12. **Domsch, K.H., W. Gams, and T.-H. Anderson.** 1993. *Compendium of soil fungi*. JWH Verlag, Reprint. ISBN 3-9803083-8-3.
13. **Dörfelt, H.** 1988. *Mycologie-Pilzkunde*. 1. Aufl. BI-Lexikon. VEB Bibliographisches Institut Leipzig. ISBN-3-323-00187-7.

14. **Fernando, T., J. A. Bumpus, and S. D. Aust.** 1990. Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1666-1671.
15. **Fritsche, W.** 1990. Mikrobiologie. Gustav-Fischer-Verlag, Jena.
16. **Funk, S.B., D.J. Roberts, D.L. Crawford, and R.L. Crawford.** 1993. Initial phase optimization for bioremediation of munition compounds-contaminated soils. Appl. Environ. Microbiol. 59: 2171-2177.
17. **Gilcrease, P.C. and V. G. Murphy.** 1995. Bioconversion of 2,4-diamino-6-nitrotoluene to a novel metabolite under anoxic and aerobic conditions; trinitrotoluene degradation of *Pseudomonas fluorescens*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 4209-4214.
18. **Gorontzy, T., O. Drzyzga, M. W. Kahl, D. Bruns-Nagel, J. Breitung, E. von Löw, and K.-H. Blotevogel.** 1994. Microbial degradation of explosives and related compounds. Critical. Review in Microbiology. 20: 265-284.
19. **Herre, A., J. Michels, K. Scheibner, and W. Fritsche.** 1997. Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) contaminated soil by a litter decaying fungus. In: Preprints of the fourth international in situ and on-site bioremediation symposium. April 28-May 1, 1997. New Orleans 2: 493-498.
20. **Herre, A., K. Scheibner, and W. Fritsche.** 1998. Bioremediation von 2,4,6-Trinitrotoluol-kontaminiertem Boden durch Pilze auf einem Rüstungsaltslastenstandort. TerraTech 4: 52-55.
21. **Herre, A., K. Scheibner, and W. Fritsche.** 1997. Untersuchungen zur Etablierung von *S. rugosoannulata* im kontaminierten Boden, Ligninolytische Enzyme TNT-mineralisierender Pilze. In: Beiträge der Autoren zum III. Satusseminar (26.-27. Febr. Berlin), BMBF-Verbundvorhaben "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten". TV IV: Bioremediation von Böden mit Pilzen; Metabolisierung, Mineralisierung und Humifizierung.
22. **Herre, A., K. Scheibner, M. Kästner, and W. Fritsche.** 1998. Aerobe Behandlung von $U_R^{-14}C$ -TNT-dotiertem Boden mit ligninolytischen Pilzen- Bildung und Remobilisierbarkeit der gebundenen Rückstände. In: Beiträge der Autoren zum Statustreffen (22.-23. Sept. Hamburg), BMBF-Verbundvorhaben "Langzeitverhalten und Remobilisierbarkeit. TV IV: Bioremediation von Böden mit Pilzen; Metabolisierung, Mineralisierung und Humifizierung.
23. **Higson, F.K.** 1992. Microbial degradation of nitroaromatic compounds. Adv. Appl. Microbiol. 37: 1-19.
24. **Hofrichter, M. and K. Scheibner.** 1993. Utilization of aromatic compounds by *Penicillium* strain Bi 7/2. J. Basic. Microbiol. 33: 227-233.
25. **Hofrichter, M. and K. Scheibner.** 1995. Rolle der Bodenpilze beim Fremdstoffabbau. TerraTech 3: 69-71.
26. **Hofrichter, M. and W. Fritsche.** 1996. Depolymerization of low-rank coal by extra-cellular fungal enzyme systems. I. Screening for low-rank coal depolymerizing activities. Appl. Microbiol. Biotechnol. 46: 220-225.

27. **Hofrichter, M. and W. Fritsche.** 1997. Depolymerization of low-rank coal by extra-cellular fungal enzyme systems. III. *In-vitro* depolymerization of coal humic acids by a crude preparation of manganese peroxidase of the white-rot fungus *Nematoloma frowardii* b19. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47: 566-571.
28. **Hofrichter, M., K. Scheibner, I. Schneegaß, and W. Fritsche.** 1998. Enzymatic combustion of aromatic and aliphatic compounds by manganese peroxidase. Appl. Environ. Microbiol. 64: 399-404.
29. **Hofrichter, M., K. Scheibner, I. Schneegaß, D. Ziegenhagen, and W. Fritsche.** 1998. Mineralization of synthetic humic substances by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 584-588.
30. **Hofrichter, M., K. Scheibner, F. Bublitz, R. Martens, and W. Fritsche.** 1999. Depolymerization of straw lignin by manganese peroxidase from *Nematoloma frowardii* is accompanied by release of carbon dioxide. Holzforschung 53: 161-166.
31. **Hofrichter, M., D. Ziegenhagen, T. Vares, M. Friedrich, M.G. Jäger, W. Fritsche, and A. Hatakka.** 1998. Oxidative decomposition of malonic acid as basis for the action of manganese peroxidase in the absence of hydrogen peroxide. FEBS Lett. 434: 362-366
32. **Hofrichter, M., T. Vares, K. Scheibner, S. Galkin, J. Sipilä, and A. Hatakka.** 1999. Mineralization and solubilization of synthetic lignin (DHP) by manganese peroxidases from *Nematoloma frowardii* and *Phlebia radiata*. J. Biotechnol. 67: 217-228.
33. **Hofrichter, M., T. Vares, M. Kalsi, S. Galkin, K. Scheibner, W. Fritsche and A. Hatakka.** 1999. Production of ligninolytic enzymes and organic acids, and mineralization of ¹⁴C-labeled lignin during solid state fermentation of wheat straw with the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1864-1870.
34. **Hofrichter, M., K. Scheibner, R. Haas, A. Krippendorff, and W. Fritsche.** 1999. Die Mangan-Peroxidase ligninolytischer Pilze: Ein innovatives biokatalytisches System zur Eliminierung von Umwelt-Schadstoffen. In: S. Heiden, R. Erb, J. Warrelmann, R. Dierstein (Hrsg.). Biotechnologie im Umweltschutz. Bioremediation: Entwicklungsstand - Anwendungen - Perspektiven. Erich-Schmidt Verlag. ISBN 3-503-04848-0
35. **Kaplan, D. L. and A. M. Kaplan.** 1983. Reactivity of TNT and TNT-microbial reductionproducts with soil components. U.S. Army natick research and development labs., MA, AD-A 135 512/2, NATICK/TR-83/041.
36. **Kirk, T.K., E. Schulze, W.J. Connors, L.F. Lorenz, and J.G. Zeikus.** 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. 117: 277-285.
37. **Kirk, T.K. and R.L. Farrel.** 1987. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. Ann. Rev. Microbiol. 41: 465-505.U
38. **Lenke, H., B. Wagener, G. Daun, and H.-J. Knacknuss.** 1994. TNT-contaminated soil: a sequential anaerobic/aerobic process for bioremediation, abstr. Q-383, p. 456. Abstr. 94th Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1994.

39. **Li, Z.M., S.D. Comfort, and P.J. Shea.** 1997. Destruction of 2,4,6-trinitrotoluenen (TNT) by Fenton Oxidation. *J. Environ. Qual.* 26: 480-487.
40. **McCormick, N.G., F.E. Feherry, and H.S. Levinson.** 1976. Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 949-958.
41. **Michels, J., and G. Gottschalk.** 1994. Inhibition of lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* by hydroxylaminodinitrotoluene, an early intermediate in the degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 187-194.
42. **Michels, J., and G. Gottschalk.** 1995. Pathway of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Phanerochaete chrysosporium*. In: *Biodegradation of nitroaromatic compounds*. Spain, J.C. (ed.) Plenum Press, New York: 135-149.
43. **Moser, M. and W. Jülich.** 1995. *Colour atlas of basidiomycetes*. Gustav Fischer Verlag. ISSN 0177-9508.
44. **Parrish, F.W.** 1977. Fungal transformation of 2,4-dinitrotoluene and 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 232-233.
45. **Paszczynski, A., V.B. Huynh, and R.L. Crawford.** 1985. Enzymatic activities of an extrazellular manganese dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 29: 37-41.
46. **Preuß, A., J. Fimpel, and G. Diekert.** 1993. Anaerobic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Arch. Microbiol.* 159: 345-353.
47. **Rieble, S., D.K. Joshi, and M.H. Gold.** 1994. Aromatic nitroreductase from basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 205: 298-304.
48. **Rieger, P-G., and H.-J. Knackmuss.** 1995. Basic knowledge and perspectives on bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene and related nitroaromatic compounds in contaminated soil. In: *Biodegradation of nitroaromatic compounds*. Spain, J.C. (ed.) Plenum Press, New York: 1-18.
49. **Sack, U., M. Hofrichter, and W. Fritsche.** 1997. Degradation of PAHs by manganese peroxidase of *Nematoloma frowardii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 152: 227-234.
50. **Scheibner, K., A. Herre, and W. Fritsche.** 1998. Abbau von 2,4,6-Trinitrotoluol durch Basidiomyceten-Einfluß des Mangan-Peroxidase-Systems und Schadstoffbilanzierung im Boden. In: *Beiträge der Autoren zum IV. Satusseminar (7. Mai 1998, Clausthal-Zellerfeld), BMBF-Verbundvorhaben "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten. TV IV: Bioremediation von Böden mit Pilzen; Metabolisierung, Mineralisierung und Humifizierung.*
51. **Scheibner, K., A. Herre, J. Michels, and W. Fritsche.** 1995. Einsatz von Pilzen bei der Sanierung von Böden mittels Kompostierung. *Beiträge der Autoren. II. Satusseminar (Okt. Jena), BMBF-Verbund "Biol. Sanierung von Rüstungsaltslasten. TV IV.*
52. **Scheibner, K., M. Hofrichter, A. Herre, J. Michels, and W. Fritsche.** 1997. Screening for fungi intensively mineralizing 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 47: 452-457.

53. **Scheibner, K., M. Hofrichter, and W. Fritsche.** 1997. Mineralization of 2-amino-4,6-dinitrotoluene by manganese peroxidase of the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Biotechnol Lett.* 19: 835-839.
54. **Scheibner, K. and M. Hofrichter.** 1998. Conversion of aminonitrotoluenes by fungal manganese peroxidase. *J. Basic Microbiol.* 38: 63-71.
55. **Schneegaß, I., M. Hofrichter, K. Scheibner, and W. Fritsche.** 1997. Purification of the main manganese peroxidase isoenzyme MnP2 from the white-rot fungus *Nematoloma frowardii* b19. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 602-605.
56. **Stahl, J.D. and S. D. Aust.** 1993. Plasma membrane-dependent reduction of 2,4,6-trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192: 471-476.
57. **Stahl, J.D. and S. D. Aust.** 1993. Metabolism and detoxification of TNT by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192: 477-482.
58. **Stahl, J.D. and S. D. Aust.** 1995. Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. In: *Biodegradation of nitroaromatic compounds*. Spain, J.C. (ed.). Plenum Press, New York: 117-134.
59. **Tanesaka, E., H. Masuda, and K. Kinugawa.** 1993. Wood degrading ability of basidiomycetes that are wood decomposers, litter decomposers, or mycorrhizal symbionts. *Mycologia* 85: 347-354.
60. **Tien, M. and T.K. Kirk.** 1988. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymol.* 161: 238-249.
61. **Valli, K., B.J. Brock, D.K. Joshi, and M.H. Gold.** 1992. Degradation of 2,4-dinitrotoluene by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 221-228.
62. **Van Aken, B., M. Hofrichter, K. Scheibner, A. Hatakka, H. Naveau, and S. N. Agathos.** 1998. Enzymatic in vitro combustion of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by the white-rot basidiomycete *Phlebia radiata*. *Biodegradation*. *Submitted*.
63. **Vares, T.** 1996. Ligninolytic enzymes and lignin-degrading activity of axonomically different white-rot fungi. *Microbiol. Publ.* 44/1996. Academic Diss. in Microbiol. Dep. of Appl. Chem. and Microbiol. University of Helsinki.
64. **Vorbeck, C., H. Lenke, P. Fischer, J.C. Spain, and H.- J. Knackmuss.** 1998. Initial reductive reactions in aerobic microbial metabolism of 2,4,6-Trinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 246-252.
65. **Wariishi, H., K.V. Valli, V. Reganathan, and M.H. Gold.** 1989. Thiol-mediated oxidation of nonphenolic lignin model compounds by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 264: 4185-4191.
66. **Wariishi, H., K.V. Valli, and M.H. Gold.** 1992. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* 267: 23688-23695.

67. **Weissmahr, K.W., S.B. Haderlein, and P.R. Schwarzenbach.** 1997. In situ spektroskopie investigations of absorption mechanisms of nitroaromatic compounds at clay minerals. *Environ. Sci. Technol.* 31: 240-247.
68. **Westfall, B.B.** 1943. The reduction of symmetrical trinitrotoluene by a succinic dehydrogenase preparation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 79: 23-26.
69. **Wolfenden, B.S. and R.L. Wilson.** 1982. Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions. *J. Chem. Soc. Trans.* 2: 805-812.
70. **Yamashina, I., S Shikata, and F. Egami.** 1954. Enzymatic reduction of aromatic nitro, nitroso and hydroxyl amino compounds. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 27: 42-45.
71. **Zucker, M. and A. Nason.** 1955. Nitroaryl reductase from *Neurospora crassa*. In: *Methods of enzymology* Vol. 2. Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (eds.). Academic Press, New York. 406-411.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.2 Verbundvorhaben 3: Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten

9.2.8 Aufnahme von 2,4,6-TNT in krautige Pflanzen (TV 3.7)

Prof. Dr. Dietrich Werner

Dr. Christian Sens

Dr. Petra Scheidemann

FG Zellbiologie und Angewandte Botanik

Fachbereich Biologie der

Philipps-Universität Marburg

Karl-von-Frisch-Str.

35043 Marburg

Förderkennzeichen: 14589689

Laufzeit: 01.08.1995 bis 30.09.1998

1 Zusammenfassung und Zielsetzung

Rüstungsaltlasten und speziell deren Gefährdungspotential sind seit Jahren im Blickpunkt der Öffentlichkeit. Einen großen Teil an kontaminierten Bereichen stellen Flächen der ehemaligen TNT-Rüstungsproduktion aus dem II. Weltkrieg dar.

Wichtige Punkte bei der Sanierung dieser kontaminierten Flächen sind zum einen die Erhaltung des Bodens zum anderen die Finanzierbarkeit. Durch die Größe der zu sanierenden Flächen sind die Kosten enorm hoch. Der Einsatz von Pflanzen könnte eine kostengünstige Alternative zu herkömmlichen Methoden darstellen [4]. Das Sanierungspotential von Pflanzen ergibt sich vor allem durch die:

- a) Aufnahme und Metabolisierung von TNT in Pflanzen
- b) Förderung der bakteriellen TNT-Metabolisierung im wurzelnahen Bereich (Rhizosphäre)

Aufbauend auf eigenen Vorarbeiten und Ergebnissen anderer Forschungsgruppen, wurden Transferversuche von TNT aus kontaminierten Boden bzw. Nährlösung in Pflanzen durchgeführt. Ziel war es, Aussagen über den Verbleib und die Verteilung von TNT/TNT-Metaboliten im Boden und verschiedenen Pflanzenarten treffen zu können.

Durch die Analyse von Rhizosphärenboden wurden die Veränderungen des Schadstoffgehaltes in Wurzelnähe untersucht. Ein Screening geeigneter Pflanzen im Hinblick auf eine Sanierung wurde in TNT-kontaminierten Boden unterschiedlicher Konzentrationsstufen durchgeführt. Mit der Etablierung eines Hydrokultursystems als Modellsystem für die Rhizosphäre konnte die TNT-Metabolisierung unter sterilen Bedingungen untersucht werden.

Eine Methode zur Analyse von ^{14}C -TNT-Metaboliten in verschiedenen biochemischen Kompartimenten der Pflanzen (Zellwand- und Cytoplasmafraktionen) wurde entwickelt. In diesem Extraktionsverfahren mit polaren und unpolaren Lösungsmitteln ebenso wie mit Enzymen wurden Wurzel, Stamm und Blatt getrennt untersucht. Die Zellwandfraktion beinhaltet u. a. die Ligninfraktion in die aromatische Schadstoffe eingebunden und langfristig immobilisiert werden können. Mit Hilfe dieser Ergebnisse konnten Aussagen zu chemischen Eigenschaften und zur Bioverfügbarkeit der TNT-Metabolite gemacht werden.

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

Aufnahme und Metabolisierung von Nitroaromaten in Pflanzen wurden zuerst in amerikanischen Armeelabors untersucht [5; 12; 13]. Dabei wurde bei *Cyperus esculentus* eine überwiegende Aufnahme in die Wurzeln festgestellt und als Hauptkomponente 4-ADNT nachgewiesen. Diese Untersuchungen wurden fortgesetzt von [3] mit Versuchen an *Phaseolus vulgaris* und *Triticum aestivum*. Auch mit diesen Pflanzen wurde gefunden, daß mehr als Dreiviertel der aufgenommenen ^{14}C -TNT-Radioaktivität in der Wurzel verblieb und nur ein geringer Teil in Blätter und Früchte transportiert wurde. Nur ein sehr geringer Teil der Radioaktivität konnte identifizierbaren Metaboliten zugeordnet werden. Einen besonderen Schwerpunkt bei diesen Arbeiten bildete die Pflanzenverfügbarkeit und die Aufnahme von TNT aus unterschiedlichen Böden. Ein hoher Anteil von organischem C im Boden korrelierte mit einer geringen Verfügbarkeit und Aufnahme in die Pflanzen.

Ökotoxikologische Wirkungen wurden auf Grünalgen [19], aquatische Pflanzen [11], terrestrische Pflanzen [6; 12] und Fische [2] in Konzentrationsbereichen von 2 bis 10 mg TNT/l nachgewiesen.

Auf diesen Arbeiten aufbauend wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Werner Untersuchungen zur Anreicherung von TNT-Metaboliten an einer größeren Zahl von Kulturpflanzen durchgeführt, sowie Arbeiten zur Abreicherung in den wurzelnahen Bodenschichten der gleichen Pflanzenarten. Dabei wurde insbesondere erkannt, daß *Phaseolus vulgaris* durch einen hohen Pool von nachweisbarem 2,6-DNT und 2,4-DNT, die mutagen und karzinogen sind, eine Sonderstellung einnimmt. Generell ist der Abbau aromatischer Verbindungen durch Pflanzen, verglichen mit Mikroorganismen, wenig untersucht. Artsspezifische Unterschiede bei der Metabolisierung aromatischer Verbindungen wurden für Salizylsäure bei *Vicia faba* und *Fagopyrum esculentum* nachgewiesen [16]. Unter Beteiligung von Peroxidasen können phenolische Verbindungen wie 2-Nitrophenol und 2,4-Dichlorphenol mit sehr unterschiedlicher Effizienz an Wurzeloberflächen polymerisieren [1]. Langjährige Untersuchungen liegen zum Abbau von einzelnen aromatischen Pflanzenschutzmitteln vor [15].

3 Angewandte Methoden

Für die Versuche wurden folgende Pflanzen eingesetzt:

Tab. 1: In den Versuchen eingesetzte Pflanzen

Art	Sorte	Deutscher Name
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Saxa	Buschbohne
<i>Medicago sativa</i>	Europe	Luzerne
<i>Lupinus angustifolius</i>		Bitterlupine
<i>Trifolium repens</i>	Huia	Weißklee
<i>Phacelia seicea</i>		Büschelschön
<i>Triticum aestivum</i>	Apollo, Athlet, Contra, Haven, Monopol, Rektor	Weizen
<i>Lolium perenne</i>		Weidelgras
<i>Phleum spec.</i>		Lieschgras
<i>Aleopecurus pratensis</i>	Alko	Wiesenfuchsschwanz
<i>Bromus inermis</i>		Wehrlose Trespe
<i>Festuca rubra</i>	Pernlille	Ausläufer-Rohrschwengel

3.1 Teilvorhaben I

Die verwendeten Pflanzen wurden in Standortboden bzw. selbstkontaminierten Standardboden (LUFA 1) im Gewächshaus kultiviert [14]. Nach acht Wochen wurden die Pflanzen geerntet, die Wurzeln abgetrennt, gefriergetrocknet und TNT bzw. TNT-Metabolite mit Lösungsmitteln nach der Methode von [6] extrahiert. Im Gaschromatographen mit einem Elektroneneinfangdetektor wurden die Extrakte auf 15 verschiedene TNT-Metabolite (u.a. 2- und 4-Aminodinitrotoluol; 2,4- und 2,6- Dinitrotoluol; 2,4,6-TNT) untersucht und diese quantifiziert.

In einem weiteren Versuchsansatz wurden Pflanzen unter sterilen Bedingungen in einer Nährlösung, die mit 10 mg TNT/l dotiert worden war, angezogen (Hydrokultur). Damit wurden mikrobielle Einflüsse auf die TNT-Metabolisierung ausgeschlossen. Nach der Pflanzenanzucht wurde die Nährlösung flüssigkeitschromatographisch (HPLC) auf polare, bisher nicht bekannte TNT-Metabolite untersucht.

Die von den Pflanzen in die Nährlösung abgegebenen Wurzelexsudate wurden zudem auf ihre Peroxidaseaktivität und Nitritkonzentration hin untersucht. Als Modellsubstanz für die außerhalb der Pflanze stattfindenden Prozesse wurde 2,4-Diaminotoluol mit einer pflanzlichen Peroxidase behandelt und die entstehenden Reaktionsprodukte und -produkte gelpermeationschromatographisch untersucht.

3.2 Teilvorhaben II

Buschbohne und Weizen wurden unter sterilen Bedingungen in einer ^{14}C -TNT-haltigen Nährlösung für zwei Wochen angezogen [18]. Das erhaltene radioaktive Pflanzenmaterial wurde in Wurzel, Stamm und Blätter aufgeteilt, gefriergetrocknet und biochemisch fraktioniert (Abb. 1).

- Die in den Fraktionen vorhandene Menge an Radioaktivität wurde durch die katalytische Verbrennung zu $^{14}\text{CO}_2$ im Oxidizer bestimmt und somit eine Gesamtbilanz erstellt.
- Die Cytoplasmafraktion wurde zudem dünnschichtchromatographisch aufgetrennt und die radioaktiv markierten TNT-Metabolite mit einem Phospho-Imager quantifiziert. Eine massenspektrometrische Untersuchung mit einem MALDI-TOF schloß sich an.
- Die Ligninfraktion wurde gelpermeationschromatographisch aufgetrennt und das Molekulargewicht der radioaktiven ligningebundenen TNT-Metabolite bestimmt.
- Für die autoradiographische Untersuchung ganzer in ^{14}C -TNT-haltiger Nährlösung gewachsenen Pflanzen wurden 1 μm dicke Längs- und Querschnitte angefertigt. Auf die Schnitte wurde anschließend ein Röntgenfilm aufgelegt und dieser nach mehreren Tagen ausgewertet.

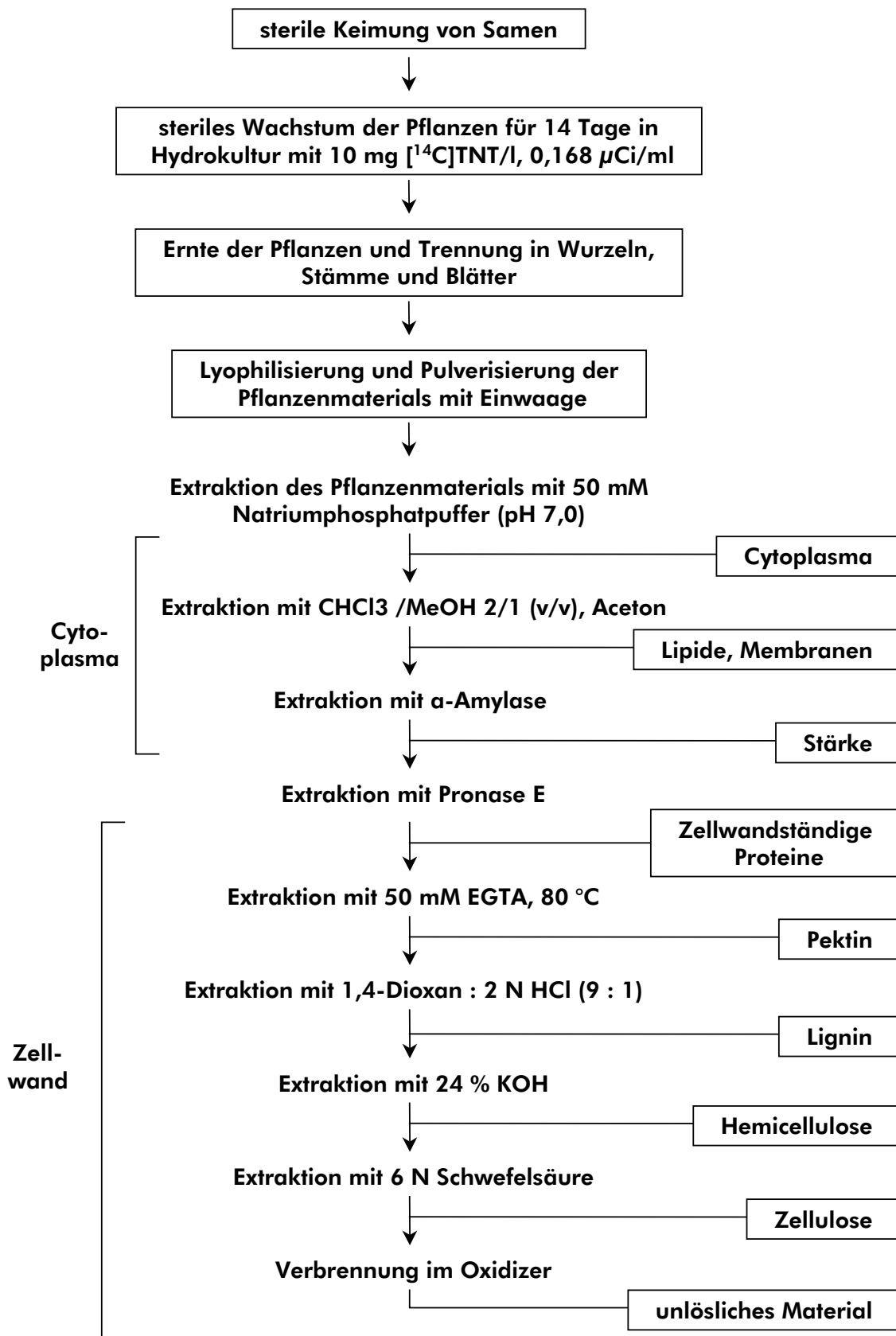


Abb. 1: Biochemische Fraktionierung pflanzlicher Organe in verschiedene Zellkompartimente.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Teilvorhaben I

Für die Untersuchung der Metabolisierungsvorgänge von TNT in der Rhizosphäre und einem Pflanzenscreening wurden folgende drei Kultursysteme eingesetzt [14]: TNT-belasteter Standortboden, TNT-dotierter Standardboden und ein steriles Hydrokultursystem.

Die Untersuchung des Rhizosphärenbodens (Boden, der an der Wurzel haftet) im Vergleich zum wurzelfernen Boden wurde modellhaft bei verschiedenen *Triticum*-Sorten (Weizen) untersucht. Der Rhizosphärenboden betrug etwa 10 % des Gesamtbodens und war nach einer neunwöchigen Kultivierungsdauer von *Triticum* signifikant in seiner Nitroaromaten-Konzentration reduziert (Abb. 2). Unter Nitroaromaten werden in diesem Zusammenhang 2-Amino-4,6-dinitrotoluol (2-ADNT), 4-Amino-2,6-dinitrotoluol (4-ADNT), 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT), 2,4-Dinitrotoluol (2,4-DNT) und 2,6-Dinitrotoluol (2,6-DNT) verstanden.

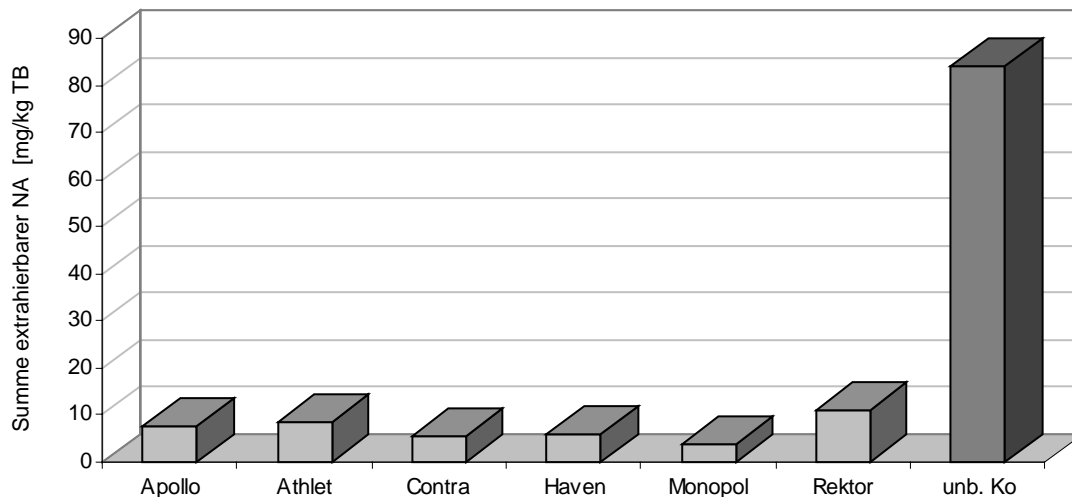


Abb. 2: Summe der extrahierbaren Nitroaromaten in den Rhizosphärenböden verschiedener *Triticum aestivum* Sorten und in dem un bepflanzten Kontrollboden.

In einem zweiten Schritt wurde erstmals ein Pflanzenscreening mit einer relativ großen Anzahl an krautigen Pflanzen durchgeführt, um geeignete Pflanzen in Hinblick auf den Einsatz in der Phytoremediation von TNT-belasteten Böden zu finden. Fünf dikotyledone Pflanzen [*Phaseolus vulgaris* (Buschbohne), *Lupinus angustifolius* (Bitterlupine), *Medicago sativa* (Luzerne), *Phacelia seicea* (Büschelschön), *Trifolium repens* (Weißklee)] und sechs monokotyledone Pflanzen [*Triticum aestivum* (Weizen), *Lolium perenne* (Weidelgras), *Phleum spec.* (Lieschgras), *Alopecurus pratensis* (Wiesenfuchsschwanz), *Bromus inermis* (Wehrlose Trespe), *Festuca rubra* (Ausläufer-Rohrschwengel)] wurden in Hinblick auf die Aufnahme von TNT/TNT-Metaboliten untersucht. Da aus Vorversuchen bekannt war, daß über 80 % der Nitroaromaten in den Wurzeln verbleiben und mit nicht-radioaktiven Methoden die Nitroaromaten-Konzentrationen in Blättern äußerst gering sind, wurden die Pflanzenwurzeln analysiert. Bei allen Pflanzenarten war die nachweisbare Nitroaromaten-Konzentration um so höher, je höher die TNT-Kontamination des Bodens (10, 100, 500 mg TNT/kg Standardboden) war (Abb. 3).

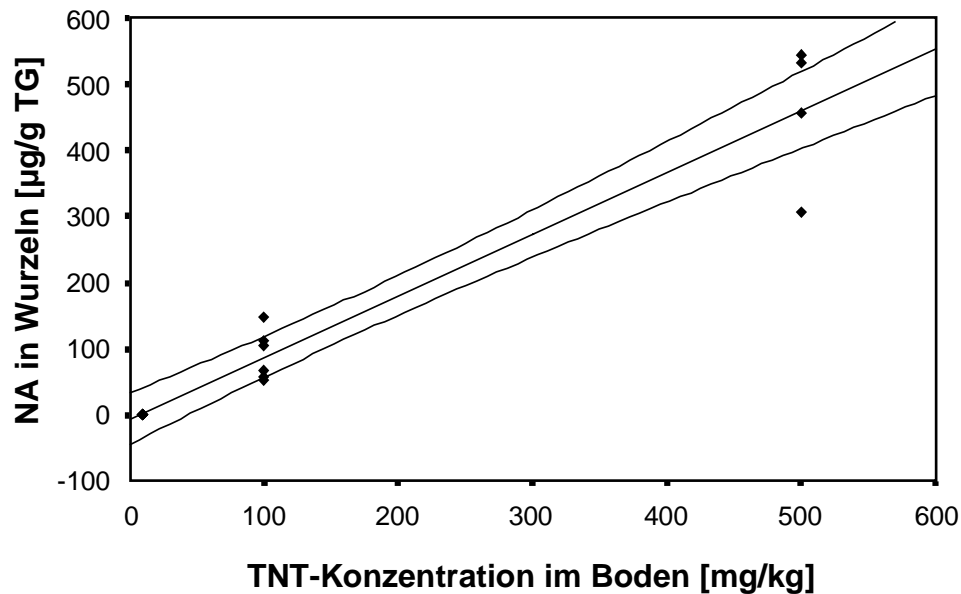


Abb. 3: Korrelation zwischen der TNT-Konzentration im Boden und der Konzentration der nachweisbaren Nitroaromaten in den Wurzeln von *Phaseolus vulgaris*. Kultivierung der Pflanzen in dotiertem Standardboden (Lufa Typ 2.2) acht Wochen im Gewächshaus. Pearson-Korrelationskoeffizient $r = 0,96$ (Signifikanz $p < 0,001$).

In den Wurzeln aller Pflanzenarten wurden fast ausschließlich 2-ADNT und 4-ADNT nachgewiesen. Ausnahmen bildeten *Phaseolus vulgaris*, *Medicago sativa* und *Phleum spec.*, bei denen zusätzlich Dinitrotoluole detektiert wurden. In der Konzentrationsstufe 100 mg TNT/kg Boden konnten in den Wurzeln von *Phaseolus vulgaris* und *Triticum aestivum* die höchsten Nitroaromaten-Konzentrationen im Vergleich zu den anderen Pflanzenarten nachgewiesen werden (Abb. 4).

Triticum aestivum zeigt Eigenschaften, die für die Phytoremediation wichtig sind: Hohe Nitroaromaten-Konzentrationen in den Wurzeln, ein gut entwickeltes Wurzelsystem, Toleranz gegenüber Nitroaromatenkonzentrationen bis zu 500 mg TNT/kg Boden und keinen Nachweis kanzerogener Dinitrotoluole (DNT) in den Wurzeln.

Die unterschiedlich hohen Konzentrationen der Nitroaromaten in den Wurzeln der verschiedenen Pflanzenarten und die unterschiedlichen Mengenverhältnisse von 2-ADNT zu 4-ADNT weisen auf artspezifische Metabolisierungen in den Pflanzen hin. Ein Zusammenhang mit Gruppeneigenschaften wie den Leguminosen, Dikotylen oder Monokotylen konnte nicht beobachtet werden.

Die Toleranz der Pflanzen gegenüber TNT-Kontaminationen des Bodens ist verschieden. Während *Medicago sativa* schon in dem Boden mit 100 mg TNT/kg nicht mehr keimte, konnte sich *Phaseolus vulgaris* in Boden mit 500 mg TNT/kg noch entwickeln.

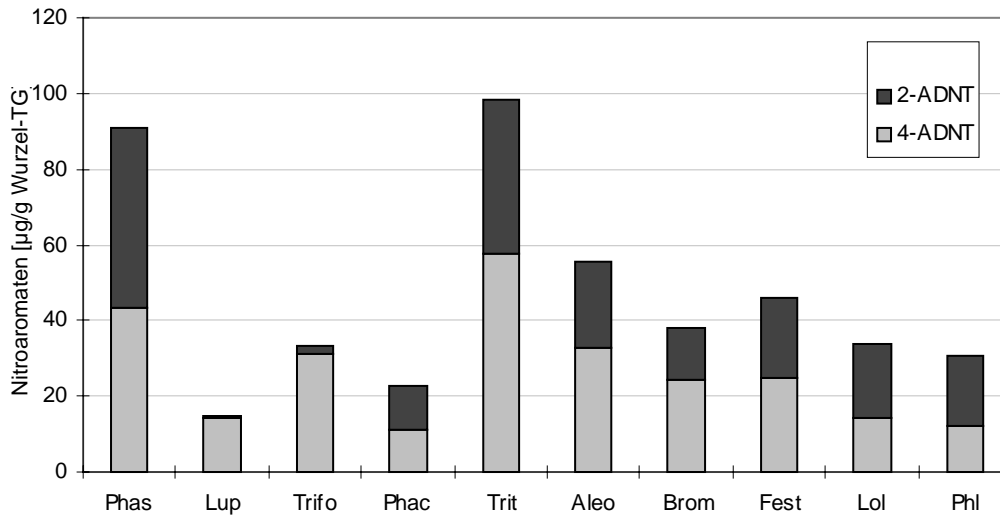


Abb. 4: Konzentrationen der extrahierbaren Nitroaromaten aus den Wurzeln mono- und dikotyler Pflanzenarten, die in dotiertem Standardboden (100 mg TNT/kg) kultiviert wurden. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert von vier bis sechs Proben. Phas = *Phaseolus vulgaris*; Lup = *Lupinus angustifolius*; Trifo = *Trifolium repens*; Medi = *Medicago sativa*; Phac = *Phacelia seicea*; Trit = *Triticum aestivum*; Aleo = *Aleopecurus pratensis*; Brom = *Bromus inermis*; Fest = *Festuca rubra*; Lol = *Lolium perenne*; Phl = *Phleum spec.*

Das Hydrokultursystem stellte ein geeignetes Modellsystem der Rhizosphäre dar. Die pflanzenbedingten Metabolisierungen des TNT konnten ohne Einfluß der Bodenmikroorganismen untersucht werden. Ähnlich den Ergebnissen des Rhizosphärenbodens nahm die TNT-Konzentration in der Nährlösung nach der Kultivierung mit *Phaseolus vulgaris* und *Lupinus angustifolius* innerhalb weniger Tage von 10 mg TNT/l auf weniger als 0,5 mg/l ab.

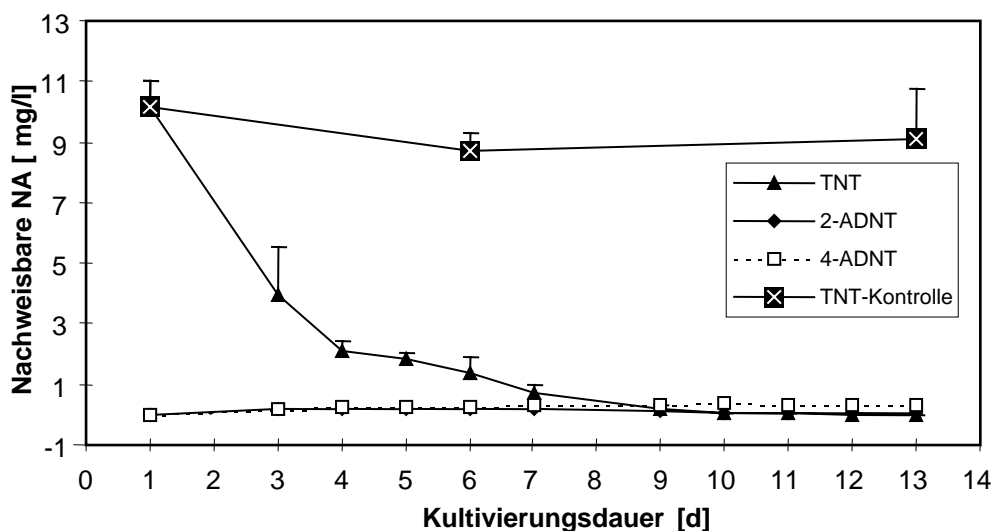


Abb. 5: Veränderung der Nitroaromatenkonzentrationen in der Nährlösung von *Lupinus angustifolius*. TNT-Kontrolle = Nährlösung mit 10 mg TNT/l ohne Pflanzen (n = 3)

Aus ^{14}C -TNT-Versuchen (Teilvorhaben II) war bekannt, daß nicht das gesamte TNT in die Wurzeln aufgenommen wird, sondern ca. 20 % in der Nährlösung metabolisiert werden. Diese Metabolite sind wenig untersucht und können aufgrund ihrer meist höheren Polarität im Vergleich zu TNT ggf. das Grundwasser gefährden. Die Nährlösungen wurden ankonzentriert und mit drei verschiedenen HPLC-Gradienten untersucht, um TNT-Metabolite verschiedener Polarität auftrennen zu können. In *Phaseolus vulgaris* wurden insgesamt 15 aromatische Substanzen aufgetrennt und charakterisiert. Zwei polare Substanzen (bezeichnet als Komponente 1 und 2) wiesen Ähnlichkeiten mit einem TNT-Hydrid-Meisenheimer-Komplex auf. Die Bildung polarer Substanzen in der Nährlösung könnte einen artspezifischen Detoxifikationsmechanismus darstellen, da nur lipidlösliche Substanzen über die Membranen in die Pflanzen gut aufgenommen werden können. Die Nährlösung von *Lupinus angustifolius* wurde ebenfalls mittels HPLC analysiert. 16 aromatische Substanzen wurden aufgetrennt und charakterisiert. Mit hoher Wahrscheinlichkeit konnte 2,6-Diamino-4-Nitrotoluol (2,6-DA-4-NT) nachgewiesen werden.

Die Wurzelexsudate, die von den Versuchspflanzen in die Nährlösung abgegeben wurden, zeigten eine hohe Peroxidaseaktivität (Abb. 5). Peroxidase ist als Enzym des Ligninstoffwechsels in der Lage, in Gegenwart von Wasserstoffperoxid aromatische Verbindungen zu polymerisieren.

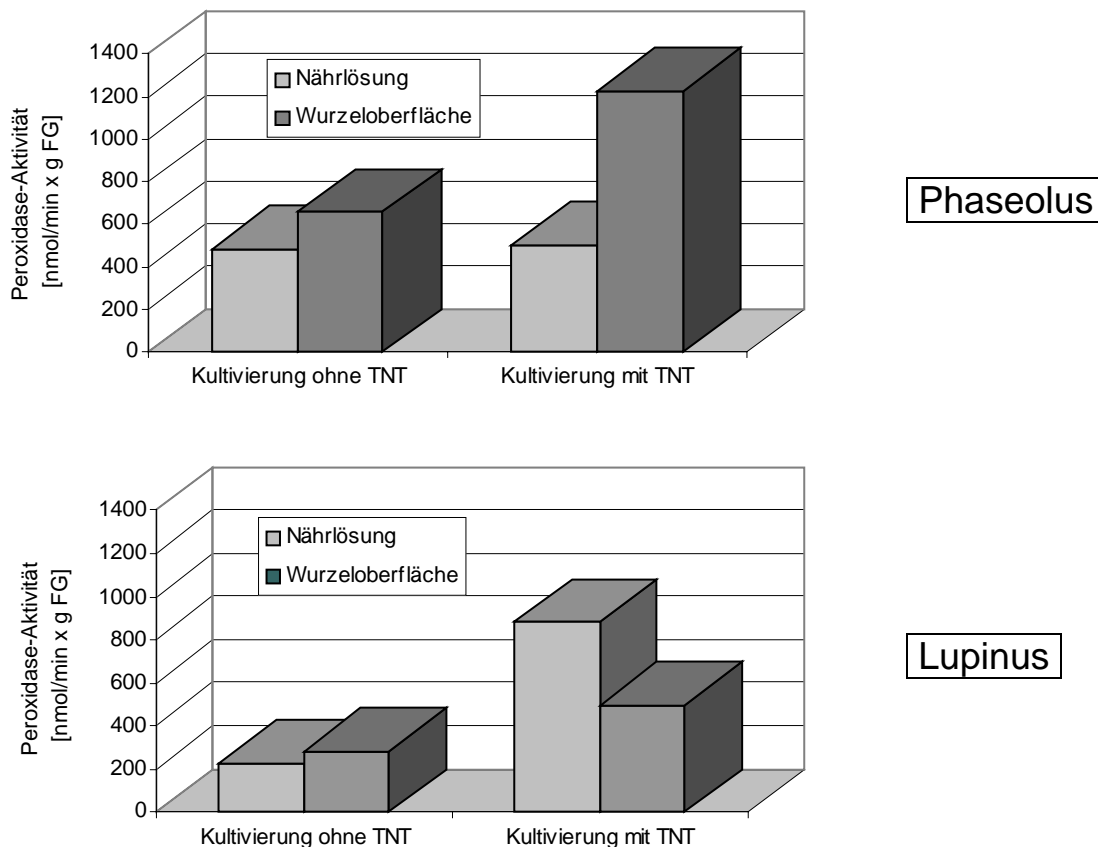


Abb. 6: Peroxidase-Aktivität, die pro g Wurzelfrischgewicht in die Nährlösung abgegeben wurde bzw. von der Wurzeloberfläche mit einem Niedrig-Salz-Extraktionspuffer extrahiert werden konnte. Die Aktivität ist angegeben als nmol Tetraguaiacol, das pro Minute im Enzymtest gebildet wurde.

Da die Reaktion unspezifisch verläuft, können auch die TNT-Metabolite polymerisiert werden, deren Nitrogruppen zu Aminogruppen reduziert worden sind. Aus diesem Grunde wurde 2,4-Diaminotoluol (2,4-DAT) als Modellschubstanz für eine Peroxidase katalysierte Reaktion eingesetzt, die zu einer Polymerisierung oder einer Bindung an makromolekulare Strukturen wie Lignin führen können. Die Eliminierung dieser Schubstanz aus der Testlösung und die Bildung von Schubstanzen mit einem hohen Molekulargewicht konnte mittels Gelpermeationschromatographie gezeigt werden. Die Peroxidaseaktivität ist sowohl bei *Phaseolus vulgaris* als auch bei *Lupinus angustifolius* bei einer Kultivierung in TNT-haltiger Nährlösung erhöht. *Phaseolus* weist insbesondere eine höhere Aktivität an der Wurzeloberfläche auf. *Lupinus* gibt vermehrt Peroxidase als Exoenzym in die Nährlösung ab. Möglicherweise ist dies ein artspezifischer Detoxifikationsmechanismus, der die Metabolisierung der Nitroaromaten außerhalb der Wurzeln ermöglicht.

Die Nitritkonzentration erhöhte sich während der Kultivierungsdauer besonders in der Nährlösung von *Phaseolus vulgaris*. Möglicherweise wurde das TNT durch den Einfluß der Pflanzen denitriert. Eine Detoxifikation der ursprünglich mit 10 mg TNT/l kontaminierten Nährlösung von *Phaseolus vulgaris* konnte mit dem Wurzelsymbiose-Toxizitätstest nachgewiesen werden.

4.2 Teilvorhaben II

Im Mittelpunkt der Arbeiten zum vorliegenden Forschungsvorhaben standen zunächst methodische Fragen zur Aufnahme und Metabolisierung von Nitroaromaten durch Pflanzen, wie die Auswahl der Kultursysteme (Hydrokulturen, Bodenkulturen unterschiedlicher Bodenzusammensetzungen), Optimierungen der Extraktionsverfahren und Nachweisverfahren. Als Modellpflanzen wurden aufgrund der Arbeiten von [7; 8; 9] *Phaseolus vulgaris* L. cv. Saxa (Buschbohne) und *Triticum aestivum* L. cv. Haven (Weizen) ausgewählt.

In einem ersten Schritt wurden zur Entwicklung einer ¹⁴C-TNT Methodik Wurzelkulturen von den beiden Modellpflanzen angelegt, da diese eine einfache Möglichkeit darstellen, steriles Pflanzenmaterial zu erhalten. Im Falle der Buschbohne konnte genügend Pflanzenmaterial, welches unter nachweislich sterilen Bedingungen gewachsen war, gewonnen werden, um ein biochemisches Kompartimentierungsverfahren in Anlehnung an die Arbeiten von [17] und [10] zu entwickeln. In acht verschiedenen Extraktionsschritten mit Lösungsmitteln und Enzymen, die in der Routineanalytik von TNT/TNT-Metaboliten bis zu diesem Zeitpunkt nicht eingesetzt wurden, konnte das Wurzelmaterial aufgeschlossen werden. Die erhaltenen acht Fraktionen, die biochemische Kompartimente der Wurzeln mit verschiedenen chemischen Eigenschaften darstellen, wurden anschließend auf das Vorkommen von fünf bekannten TNT/TNT-Metaboliten [2-Amino-4,6-dinitrotoluol (2-ADNT), 4-Amino-2,6-dinitrotoluol (4-ADNT), 2,4-Dinitrotoluol (2,4-DNT), 2,6-Dinitrotoluol (2,6-DNT), 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT)] mittels Gaschromatographie (GC-ECD) untersucht (Tabelle 2).

Tab. 2: Verteilung von fünf Nitroaromaten in biochemischen Fraktionen von *Phaseolus*-Wurzeln nach Anzucht in 10 mg TNT/l.

Fraktion	Nitroaromaten						[nmol/g Wurzel- frisch-gewicht]
	[nmol/g Wurzeltrockengewicht]						
	2,6- DNT	2,4- DNT	TNT	4- ADNT	2- ADNT	Summe	Summe
KP ¹	n.d. ²	n.d.	n.e.	n.e.	n.e.	–	–
Fett	n.e. ³	n.e.	1,162 ± 0,430	48,679 ± 8,461	31,037 ± 2,983	80,878	8,168
Amylose	n.d.	n.d.	n.d.	1,131 ± 0,233	2,688 ± 0,218	3,819	0,386
Proteine	n.d.	n.e.	n.e.	0,619 ± 0,208	1,846 ± 0,243	2,465	0,249
Pektin	n.d.	n.d.	0,075 ± 0,048	12,736 ± 4,174	21,988 ± 3,500	34,799	3,514
Lignin	n.e.	n.d.	2,170 ± 1,189	9,404 ± 6,254	21,973 ± 15,856	33,547	3,388
"Hemi- cellulose"	n.e.	n.d.	n.d.	0,517 ± 0,254	0,619 ± 0,593	1,136	0,115
Cellulose	n.e.	n.d.	n.d.	22,749 ± 15,389	13,447 ± 3,084	36,196	3,656
Gesamt	–	–	3,407	95,835	93,598	192,84	19,476

¹ KP: Kaliumphosphatpuffer

² n.d.: unter dem Detektionslimit von 1 ng Nitroaromaten/g Trockengewicht;

³ n.e.: nicht eindeutig identifizierbar;

Nach dem erfolgreichen Abschluß der Vorarbeiten zur Entwicklung der ¹⁴C-TNT Methodik wurde ein Anzuchtkasten entworfen und erprobt, in dem *Phaseolus vulgaris* und *Triticum aestivum* unter sterilen Bedingungen in ¹⁴C-TNT-haltiger Nährlösung (10 mg TNT/l bzw. 14 mg TNT/l) wuchsen (Abb. 7).

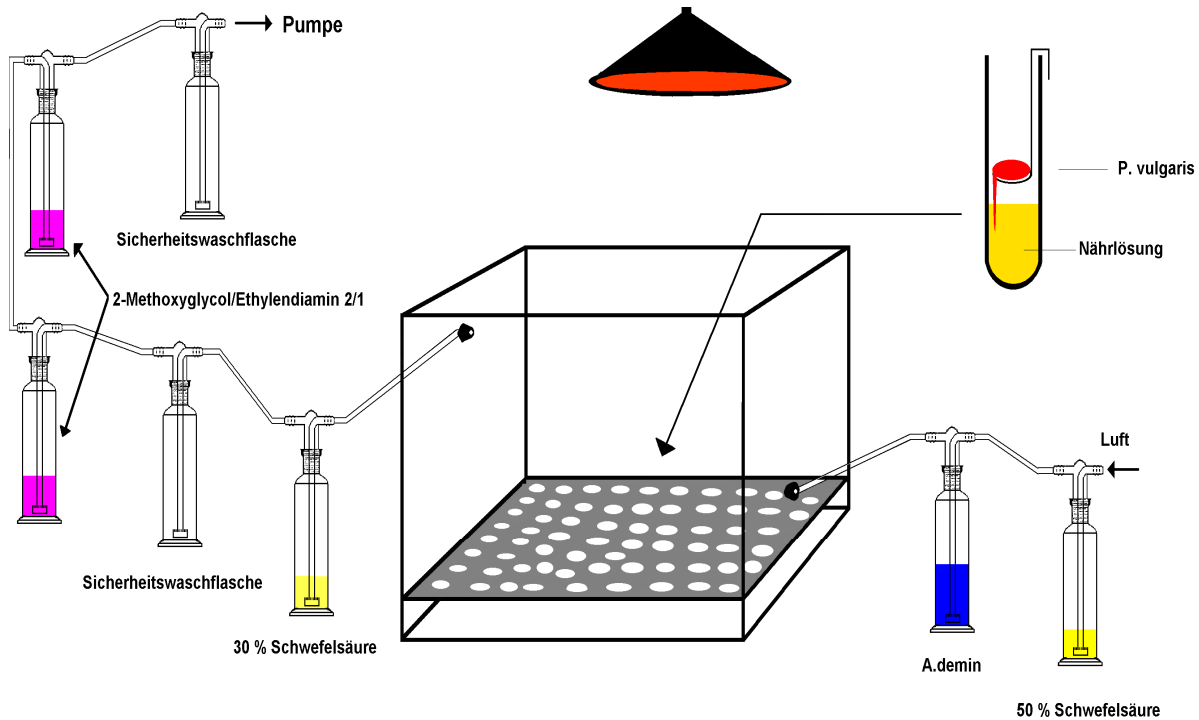


Abb. 7: Behälter, der für die sterile Anzucht von Pflanzen konstruiert wurde. In den Behälter wurde ein Lochblech eingelassen, um Reagenzgläser mit Pflanzenkeimlingen hineinzustellen.

Das erhaltene Pflanzenmaterial wurde in Wurzeln, Stämme und Blätter (*Phaseolus*) bzw. Wurzeln und Sprosse (*Triticum*) getrennt, bevor eine biochemische Fraktionierung nach der oben beschriebenen Methode durchgeführt wurde.

Insgesamt konnte eine Bilanzierung der Aufnahme und Verteilung von ^{14}C -TNT/TNT-Metaboliten in den biochemischen Fraktionen von *Phaseolus vulgaris* und *Triticum aestivum* durchgeführt werden. Bei *Phaseolus* betrug die Wiederfindungsrate 80,8 %, bei *Triticum* 101 % im Gegensatz zu nicht radioaktiv durchgeführten Versuchen mit einer Wiederfindungsrate von 25 % in Hydrokultursystemen. In Bodensystemen lag die Wiederfindungsrate im Boden und Pflanzen insgesamt bei 6 %. Eine Mineralisierung des ^{14}C -TNT durch die beiden Modellpflanzen wurde nicht festgestellt.

In den Wurzeln von *Phaseolus* wurden 87 %, in den Stämmen 9 % und in den Blättern 4 % der insgesamt in den Pflanzen nachgewiesenen Radioaktivität detektiert. Dieses entsprach einem Anteil von $21 \mu\text{mol}$ TNT-Äquivalent/g Trockengewicht (d.h. 4,8 mg TNT-Äquivalent/g Trockengewicht) in den Wurzeln. Ähnliche Werte wurden für *Triticum* mit 95 % der in den Wurzeln und 5 % der in dem Sproß vorhandenen Gesamtradioaktivität nachgewiesenen. Mit $16 \mu\text{mol}$ TNT-Äquivalent/g Trockengewicht (d.h. 3,6 mg TNT-Äquivalent/g Trockengewicht) lag die spezifische Radioaktivität in den *Triticum*-Wurzeln niedriger als in den *Phaseolus*-Wurzeln.

In Hinblick auf den Einsatz von Pflanzen in der Phytoremediation wird somit deutlich, daß vor allem die Wurzeln der Pflanzen TNT/TNT-Metabolite enthalten.

Die Untersuchung der acht biochemischen Fraktionen ergab, daß bei *Phaseolus* 50 % des ^{14}C -TNT/TNT-Metabolite wasserlöslich und weitere 50 % in den Zellwänden gebunden sind. Ähnliche Werte wurden für *Triticum* mit 45 % wasserlöslichen und 55 % zellwandgebundenen TNT/TNT-Metaboliten nachgewiesen. Der in den Zellwänden gebundene Anteil an Nitroaromaten macht nach dem Absterben der Pflanzen eine längerfristige Immobilisierung wahrscheinlich. Um hier exakte Werte zu erhalten, sollten Lysimeterversuche mit Bodensäulen durchgeführt werden, in denen entsprechende Modellpflanzen nach der Anzucht in TNT-haltigem Boden einem Abbau durch Bodenmikroorganismen unterliegen.

Zur Identifizierung von TNT-Metaboliten in den beiden Modellpflanzen *Phaseolus vulgaris* und *Triticum aestivum* wurden jeweils die Kaliumphosphatfraktion und Ligninfraktion untersucht. Diese beiden Fraktionen zusammen enthielten zusammen etwa 70 % der insgesamt in den Pflanzen vorkommenden TNT-Metabolite.

Unter Verwendung der Dünnschichtchromatographie wurde die Kaliumphosphatfraktion in eine "unpolare", eine "polare" und eine "sehr polare" Fraktion aufgetrennt. In *Phaseolus* wurden 10 "unpolare" TNT-Metabolite mit einem Anteil von 5,5 % bezogen auf die Gesamtradioaktivität in der Kaliumphosphatfraktion, 17 "polare" TNT-Metabolite mit einem Anteil von 85 % und 3 "sehr polare" TNT-Metabolite mit einem Anteil von 2,5 % nachgewiesen. In *Triticum* hingegen wurden 3 "unpolare" TNT-Metabolite mit einem Anteil von 15 %, 13 "polare" TNT-Metabolite mit einem Anteil von 84 % und keine "sehr polaren" TNT-Metabolite detektiert. Die vier bisher bekannten TNT-Metabolite 2-ADNT, 4-ADNT, 2,4-DNT und 2,6-DNT wurden in dem "unpolaren" Anteil der Kaliumphosphatfraktion nachgewiesen. Damit wird deutlich, daß der überwiegende Anteil an wasserlöslichen TNT-Metaboliten in den Modellpflanzen unbekannt ist und diese Metabolite eine polare Natur besitzen. Aufgrund der geringen TNT-Metabolitkonzentrationen war eine HPLC-Auftrennung nicht möglich.

Neben den bekannten TNT-Metaboliten 2-ADNT, 4-ADNT, 2,4-DNT und 2,6-DNT wurden in *Phaseolus vulgaris* zwei TNT-Metabolite nachgewiesen, bei denen es sich wahrscheinlich um 1,3,5-Trinitrobenzol und 2,4-Diamino-6-nitrotoluol handelt. In *Triticum aestivum* wurden 2-ADNT, 4-ADNT und 2,4,6-TNT nachgewiesen. Insgesamt wurden 25 verschiedene Nitroaromaten als Standards eingesetzt und mit den pflanzlichen TNT-Metaboliten verglichen (GC-ECD). Für die Identifizierung von TNT-Metaboliten wurden massenspektroskopische Messungen mit einem MALDI-TOF Massenspektrometer) durchgeführt. Aufgrund des hohen unspezifischen Hintergrundes und der zu geringen TNT-Metabolitkonzentrationen konnten keine Massenspektren von TNT-Metaboliten erhalten werden.

Die Untersuchung der Ligninfraktion von Buschbohne und Weizen zeigten, daß über 20 % der in der Zellwand vorliegenden TNT-Metabolite in gelpermeationschromatographischen Untersuchungen im Vergleich zu Polystyrolstandards ein Molekulargewicht > 1000 g/mol besaßen (Abbildung 8, 9).

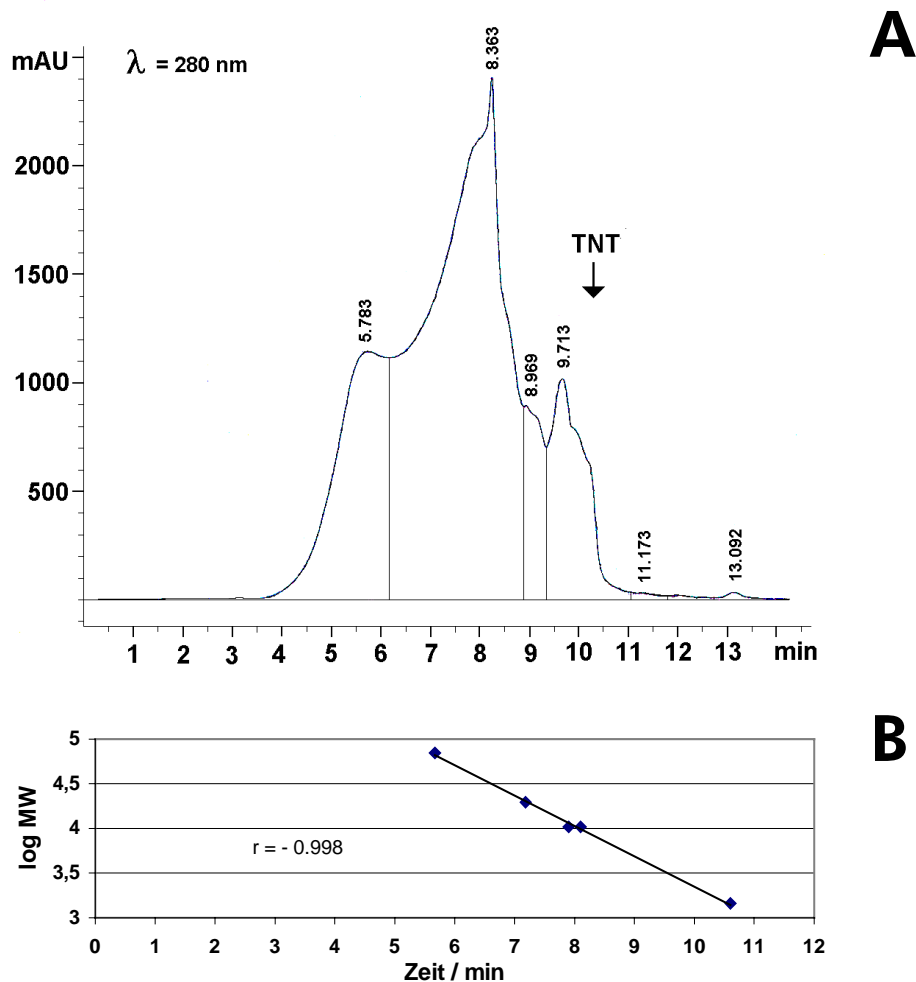


Abb. 8: A) Gel-Permeationschromatographie der Lignin-Fraktion von *Phaseolus vulgaris* nach Anzucht in ^{14}C -TNT dotierter Nährlösung (10 mg TNT/l). Das Elutionsprofil wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda=280 \text{ nm}$ aufgenommen. Die Elutionszeit von TNT ist eingezeichnet. **B) Eichung der NUCLEOGEL 500-5 Säule** mit Polystyrolstandards bekannten Molekulargewichts. Das Molekulargewicht wurde gegen die Elutionszeit aufgetragen und kann direkt mit der Elutionszeit der Lignin-Fraktion verglichen werden. Verbindungen mit einem hohen Molekulargewicht wurden zuerst eluiert. (r = Korrelationskoeffizient nach PEARSON)

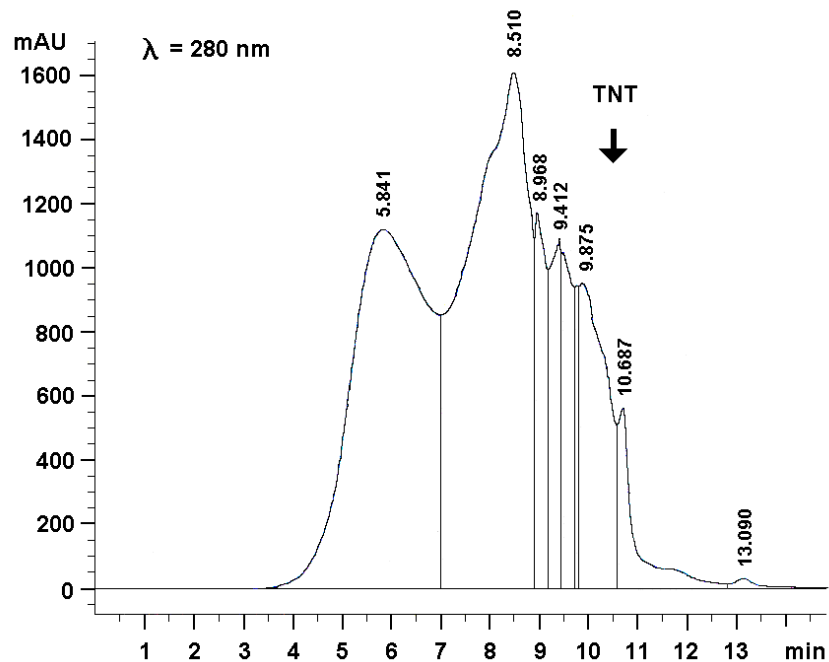


Abb. 9: Gel-Permeationschromatographie der Lignin-Fraktion von *Triticum aestivum* nach Anzucht in mit ^{14}C -TNT dotierter Nährlösung (14 mg TNT/l). Das Elutionsprofil wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda=280$ nm aufgenommen. Die Elutionszeit von TNT ist eingezeichnet. Die Eichkurve der NUCLEOGEL 500-5 Säule mit Polystyrolstandards ist in Abb. 8 dargestellt.

Eine kovalente Verbindung zwischen ^{14}C -TNT-Metaboliten und Ligninbausteinen ist damit wahrscheinlich, so daß dieser Anteil an TNT-Metaboliten nach dem Absterben der Pflanzen eine längerfristige Immobilisierung ermöglichen könnte.

Der Transport von TNT-Metaboliten aus der Wurzel in den Sproß und weiter in die Blätter fand in Buschbohne und Weizen im Xylem statt.

5 Ausblick

In diesem Projekt wurde die Aufnahme, Metabolisierung und Festlegung von 2,4,6-TNT in Pflanzen untersucht. Die Festlegung von TNT in der Zellwand und die damit verbundene längerfristige Immobilisierung ist nach den durchgeführten Versuchen wahrscheinlich. Für eine vollständige Untersuchung sollten Lysimeterversuche durchgeführt werden, in denen der Abbau von TNT-kontaminierten Pflanzenmaterial untersucht wird. Damit sollte zudem die Frage geklärt sein, inwiefern pflanzenständige TNT-Metabolite Auswirkungen auf die Grundwasserbelastung haben.

Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen, daß im Bodenwasser gelöste TNT-Metabolite in Pflanzen aufgenommen bzw. an der Wurzeloberfläche fixiert werden. Eine dichte Durchwurzelung gewährleistet einen engen Wurzel-Bodenkontakt, der den Abbau von TNT in der

pflanzlichen Rhizosphäre bzw. der Pflanze ermöglicht. Die Wurzeln stellen eine aktive Oberfläche dar. Sowohl eine aktive Metabolisierung des TNT durch die Abgabe von pflanzlichen Exoenzymen als auch Umsetzungen von TNT in den Wurzeln konnten gezeigt werden. Über enzymatische Reaktionen können TNT-Metabolite kovalent in die Zellwand eingebaut werden. Im Gegensatz zur Humifizierung ist dieses ein gerichteter Prozeß, dessen Steuerungsmechanismen weiter erforscht werden sollten.

Neben der Metabolisierung und Festlegung von TNT/TNT-Metaboliten werden durch eine dichte Pflanzendecke Erosionen durch Wind und Wasser verhindert, so daß eine Ausbreitung von TNT-kontaminierten Boden vermindert wird. Bei einer geringen TNT-Kontamination des Bodens kann somit eine dichte Bepflanzung einen Beitrag zur Sicherung und Sanierung des Bodens leisten.

6 Formeln und Abkürzungen

2-ADNT:	2-Amino-4,6-dinitrotoluol
¹⁴ C:	radioaktives Isotop des Kohlenstoffs
Ci:	Curie, Maßeinheit für Radioaktivität (1 μ Ci = 37000 Bequerel)
CHCl ₃ :	Chloroform; Trichlormethan
2,4-DNT:	2,4-Dinitrotoluol
ECD:	electron capture detector (Elektroneneinfangdetektor)
EGTA:	Komplexbildner [1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N',-tetraessigsäure]
GPC:	Gel Permeation Chromatography
HCl:	Salzsäure
HPLC:	High Performance Liquid Chromatography.
MALDI-TOF:	matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight-Massenspektrometer
MeOH:	Methanol

7 Eigene Veröffentlichungen und Doktorarbeiten

Klunk, A., E. Görge und D. Werner. 1996. Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten: Abreicherung von 2,4,6-Trinitrotoluol in Rhizosphärenböden. Z. Umweltchem. Ökotox. 8 (5): 243-247.

Scheidemann, P. 1998. Aufnahme und Metabolisierung von Trinitrotoluol im System Pflanze/Boden. Dissertation Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie.

Scheidemann, P., Klunk, A., Sens, C., and Werner, D. 1998. Species dependent uptake and tolerance of nitroaromatic compounds by higher plants. *J. Plant Physiol.* 152: 242-247.

Scheidemann, P., C. Sens, and D. Werner. 1998. Uptake of 2,4,6-trinitrotoluene in herbaceous plants. In: *Contaminated Soil '98: Proceedings of the 6th International FZK/TNO Conference on Contaminated Soil*, Edinburgh; Verlag Thomas Telford

Sens, C. 1998. Metabolisierung und Lokalisierung von ¹⁴C-TNT in *Phaseolus vulgaris* und *Triticum aestivum*. Dissertation Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie.

Sens, C., P. Scheidemann, A. Klunk and D. Werner. Distribution of ¹⁴C-TNT and derivatives in different biochemical compartments of *Phaseolus vulgaris*. *Environ. Sci. & Pollut. Res.* (im Druck).

Sens, C., P. Scheidemann and D. Werner. The distribution of ¹⁴C-TNT in different biochemical compartments of the monocotyledonous *Triticum aestivum*. *Environ. Pollut.* (im Druck).

Werner, D., P. Scheidemann und C. Sens. 1998. Phytoremediation von Nitroaromaten. In: Tagungsband der Fachtagung "Sanierung kontaminierter Böden" vom 05. – 07.10.1998 der Arbeitsgemeinschaft EXPO 2000 in Munster; Abschnitt V 12, S. 1-26.

8 Literaturverzeichnis

1. **Adler, P. R., R. Arora, A. E. Ghaouth, D. M. Glenn and J. M. Solar.** 1994. Bioremediation of phenolic compounds from water with plant root surface peroxidases. *J. Environ. Qual.* 23: 1113-1117.
2. **Bauer, D., R. Hempfling und N. Simuleit.** 1991. Ökochemische Eigenschaften und umweltchemisches Verhalten von Explosivstoffen in Rüstungsaltslasten. Fresenius Consult GmbH, Taunusstein-Neuhof.
3. **Cataldo, D. A., S. D. Harvey, R. J. Fellows, R. M. Beam and B. D. McVeety.** 1989. An evaluation of the environmental fate and behaviour of munitions material (TNT, RDX) in soil and plant systems. Pacific Northwest Laboratories, Richland, Report AD-A223 546.
4. **Cunningham, S. D: and D. W. Ow.** 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology* 110, 715-719.
5. **Folsom, B. L., J. C. Pennington, S. L. Teeter, M. R. Barton and J. A. Bright.** 1988. Effects of soil pH and treatment level on persistence and plant uptake of 2,4,6-trinitrotoluene. Waterways Experiment Station, Corps of Engineers, Vicksburg, MS, Technical Report EL-88-22.
6. **Görge, E.** 1993: Aufnahme von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) in Pflanzen unter besonderer Berücksichtigung von Freilandversuchen auf dem Gelände einer ehemaligen Sprengstofffabrik in Stadtallendorf. Dissertation an der Philipps Universität Marburg.
7. **Görge, E., S. Brandt and D. Werner.** 1994: Uptake and metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene in higher plants. *Environ. Sci & Pollut. Res.* 1: 229-233.

8. **Görge, E., S. Brandt und D. Werner.** 1995. Aufnahme von 2,4,6-Trinitrotoluol in Pflanzen. Z. Umweltchem. Ökotox. 7: 139-148.
9. **Klunk, A., E. Görge und D. Werner.** 1996. Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten. Abreicherung von 2,4,6-Trinitrotoluol in Rhizosphärenböden. Z. Umwelt-chem. Ökotox. 8: 243-247.
10. **Langebartels, C. and Harms, H.** 1985. Analysis of nonextractable (bound) residues of pentachlorophenol in plant cells using a cell wall fractionation procedure. Ecotoxicology and Environmental Safety 10: 268-279.
11. **Palazzo, A. J. and D. C. Leggett.** 1983. Toxicity, uptake, translocation, and metabolism of TNT by plants. Technical Report, US Army Cold regions Research and Engineering Laboratory, Hanover.
12. **Palazzo, A. J. and D. C. Leggett.** 1986. Effect and disposition of TNT in a terrestrial plant. J. Environ. Qual. 15: 49-52.
13. **Pennington, J. C.** 1988. Plant uptake of 2,4,6-trinitrotoluene, 4-amino-2,6-dinitrotoluene and 2-amino-4,6-dinitrotoluene using ¹⁴C-labeled and unlabeled compounds. US Army Engineer Waterways Experiment Station, Technical Report EL-88-20th Miss. Vicksburg.
14. **Scheidemann, P.** 1998. Aufnahme und Metabolisierung von Trinitrotoluol im System Pflanze/Boden. Dissertation Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie.
15. **Scheinflug, H. und R. Pontzen.** 1995. Fungizide. In: Schadwirkungen auf Pflanzen (Hrsgs. B. Hock und E.F. Elstner), 3. Aufl., S. 187-217, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
16. **Schulz, M., H. Schnabl, B. Manthe, B. Schweinhofen and I. Casser.** 1993. Uptake and detoxification of salicylic acid by *Vicia faba* and *Fagopyrum esculentum*. Phytochemistry 33: 291-294.
17. **Schuphan, I., A. Haque and W. Ebing.** 1984. Ecotoxicological assesment of environmental chemicals. Part I: Standard screening procedure to evaluate chemicals in plant cell cultures. Part II: Standard supplementary screening procedure to evaluate more volatile and less persistent chemicals in plant cultures. Chemosphere 13: 301-320.
18. **Sens, C.** 1998. Metabolisierung und Lokalisierung von ¹⁴C-TNT in *Phaseolus vulgaris* und *Triticum aestivum*. Dissertation Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie.
19. **Won, W. D., L. H. Disalvo and N. G. James.** 1976. Toxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. Appl. Environ. Microbiol. 31: 576-580.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.2 Verbundvorhaben 3: Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten

9.2.9 Abbau der Sprengstoffe Hexogen und Hexyl durch Pilze (TV 3.8)

Dr. U. Lauer¹
Prof. Dr. H. Anke²

Dr. I. Le Dren¹
Dr. A. Bongartz¹
Dipl. Biol. A. Kuhn²

¹Industrieanlagen-Betriebsgesellschaft
Umweltengineering
Einsteinstr. 20, 85521 Ottobrunn

²Universität Kaiserslautern
Lehrbereich Biotechnologie
Paul-Ehrlichstraße 23, 67663 Kaiserslautern

Förderkennzeichen: 145 1070

Laufzeit: 01.06. 1997 – 31.08. 1998

1 Zusammenfassung und Zielsetzung

Ziel des Vorhabens war die Untersuchung des biologischen Abbaus der Sprengstoffe Hexogen und Hexyl durch Pilze für die Entwicklung eines biologischen Verfahrens zur Reinigung von sprengstoffbelasteten Wasser.

In ersten Schritten wurden verschiedene Pilzstämmen isoliert und hinsichtlich Abbauleistungen untersucht. Parallel dazu fand auch ein Screening mit einheimischen Hexogen- und Hexyl-metabolisierenden Basidiomyceten statt. Da der aerobe Abbauweg von Hexogen in Pilzen bislang unbekannt ist, wurde im Rahmen der Untersuchungen der Abbauprozess bilanziert und toxikologisch bzw. ökotoxikologisch charakterisiert.

Die Ergebnisse des Vorhabens zeigen, daß einige der Pilzstämmen ein großes Potential zum Abbau von Hexogen und Hexyl sowie anderer sprengstofftypischer Verbindungen besitzen. Beim Abbau von Hexogen und Hexyl durch bestimmte Pilzstämmen erfolgte keine biologische Toxifizierung, sondern eine Entoxifizierung insbesondere des Hexyls.

In Experimenten mit belasteten Originalgrundwasserproben wurde die Fähigkeit ausgewählter Pilzstämmen, sprengstofftypische Verbindungen in Grundwasser abzubauen, nachgewiesen. Dies war eine wesentliche Voraussetzung für weitere Anpassungen und Optimierungen des Verfahrens und die Umsetzung des Sanierungsverfahrens für die Reinigung von Hexogen-/Hexyl-kontaminiertem Grundwasser und anderen Wässern. Die weiteren Verfahrensentwicklungen werden derzeit im Rahmen eines FuE-Folgevorhabens, daß vom BMBF gefördert wird, bis August 2000 durchgeführt.

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

2.1 Ausgangssituation

Die Bestandsaufnahme von Rüstungsaltslastenverdachtsstandorten in der Bundesrepublik Deutschland ergab (Stand Oktober 1992) 4336 Verdachtsstandorte für Rüstungsaltslasten [36]. Darunter befinden sich 941 Standorte, auf denen mit umweltrelevanten Kontaminationen durch Explosivstoffe zu rechnen ist. Zu diesen gehören Produktionsstätten von Sprengstoffen oder Vorprodukten, Munitionsanstalten, Füllstellen, Delaborierungsplätze und Sprengplätze. Ungefähr 200 Standorte weisen Bodenverunreinigungen durch Trinitrotoluol (TNT), Hexogen (RDX) und Oktogen (HMX) sowie andere sprengstofftypische Verbindungen auf [25]. Unter diesen befinden sich auch insbesondere 60 ehemalige Produktionsstandorte von Sprengstoffen [36], für die ein hohes Gefahrenpotential für die Umwelt - insbesondere des Grundwassers - zu erwarten bzw. bereits nachgewiesen ist.

Diese Altslasten führen zu finanziellen und administrativen Belastungen der Eigentümer, insbesondere von Bund, Ländern und Kommunen. Daraus leitet sich die Notwendigkeit für eine wirtschaftliche und sachgerechte Vorgehensweise ab, die u.a. in der Förderung der Entwicklung von geeigneten kostengünstigen, umweltfreundlichen und nutzungsbezogenen Techniken liegt.

Während zu Bodensanierungsverfahren bereits auf breiterer Basis Erfahrungen zusammengetragen wurden, ist die Problematik der Grundwasserkontaminationen durch die

genannten Rüstungsaltslasten bislang noch weniger Gegenstand der Betrachtungen gewesen. Erfolgversprechende Verfahrensansätze sind jedoch sowohl bei Böden als auch bei Wässern einige umweltbiotechnologische Sanierungstechniken.

Im Rahmen des vom BMBF geförderten Forschungsverbunds wurden unter der Projekträgerschaft des Umweltbundesamts zum Thema "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten" Teilvorhaben zur Entwicklung mikrobiologischer Sanierungsverfahren für Sprengstoffkontaminationen gefördert. Zu diesen zählt auch dieses Vorhaben mit dem Thema "Abbau der Sprengstoffe Hexogen und Hexyl durch Pilze". Ziel ist, ein biotechnologisches Sanierungsverfahren für Hexogen- und Hexyl-kontaminierte Grund- oder Oberflächenwässer zu entwickeln.

2.2 Standort und Kontamination

Als Beispielstandort für das FuE-Vorhaben wurde das ehemalige Sprengstoffwerk "WASAG-Elsnig" (Westfälisch-Anhaltinische Sprengstoff AG) gewählt. Dieser liegt im Bundesland Sachsen in der unmittelbaren Nähe der Städte Elsnig und Torgau und umfaßt eine Gesamtfläche von ca. 560 ha. Während des zweiten Weltkrieges wurden die Sprengstoffe TNT (113.000 t), Hexyl (3.900 t) und Hexogen (2.600 t) produziert und vor allem in der benachbarten MUNA-Süptitz zu Heeresmunition, Granaten, Bomben, Unterwasserwaffen und Leuchtgranaten verarbeitet. Derzeit wird das Gelände teilweise gewerblich/industriell genutzt, der größte Teil dient der Bundeswehr als Munitionsdepot.

Durch die ehemaligen Nutzungen während des zweiten Weltkrieges und infolge der anschließenden Demontage sind Kontaminationen mit Hexogen/Hexyl sowie mit TNT im Bereich der ehemaligen Produktionsanlagen, der Trocken- und Lagerhäuser, der Abwasseranlagen und im Kanalsystem, und vor allem im Bereich der Verbrennungsplätze entstanden.

Stichprobenartige von der IABG durchgeführte Untersuchungen belegten sprengstofftypische Kontaminationen des Bodens am Standort der "MUNA-Süptitz". Am Standort "WASAG Elsnig" sind Bodenbelastungen durch Hexogen und Hexyl vor allem im Bereich der sog. Brandplatzhalde nachgewiesen. Sicherungsmaßnahmen wurden hier durch das zuständige Landratsamt vorgenommen.

Im Rahmen eines Monitoringprogramms des Landes Sachsen erfolgt eine regelmäßige Beprobung der Belastung der Grundwasserleiter des Gebietes mit 15 sprengstofftypischen Verbindungen. Das Grundwasser im Einzugsbereich der Brandplatzhalde ist hauptsächlich mit Hexogen, sowie mit Hexyl, TNT und weiteren sprengstofftypischen Verbindungen belastet. Diese bedeuten eine Gefährdung für die im Grundwasserabstrombereich liegenden Wasserwerke "Elsnig" (Entfernung von der hochkontaminierten Brandplatzhalde etwa 1,5 km) und Mockritz (Entfernung von der Brandplatzhalde etwa 5 km). Beide Wasserwerke liegen im Grundwasserabstrombereich des kontaminierten Geländes. In einigen Vorwarnpegeln der Wasserwerke wurden zeitweise Konzentrationen von etwa 2 bis 60 $\mu\text{g/l}$ Hexogen gemessen. In den Pegeln an der Brandplatzhalde wurden zeitweise Hexogenwerte über 3300 $\mu\text{g/l}$ gefunden. Infolge der hohen Migrationsfähigkeit des Hexogens im Grundwasserleiter wurde dieses auch in entfernter liegenden Pegeln in erhöhten Werten im Grundwasser gemessen. Hexyl wurde in der Nähe der Brandplatzhalde in Konzentrationen zwischen 100 und 300 $\mu\text{g/l}$ nachgewiesen.

2.3 Mikrobiologischer Abbau von Nitroaromaten

TNT ist der am meisten verwendete Sprengstoff, so daß es zusammen mit seinen Transformationsprodukten zu den Hauptkontaminanten auf Rüstungsaltslasten zählt. Die anfängliche Annahme, daß TNT aufgrund der Ökotoxizität und langen Persistenz biologisch nicht abbaubar ist, wurde unterdessen durch zahlreiche Untersuchungen [10; 39; 31] mit Mikroorganismen verschiedener Gattungen verworfen. So gilt die Metabolisierbarkeit von Nitroaromaten und einigen Metaboliten heute als gesichert [37], jedoch sind noch unzureichende Erkenntnisse über Wechselwirkungen und mikrobielle Abbaureaktionen im Boden und in festen Rückständen bzw. Schlämmen [21] sowie über das Verhalten der "sprengstoff-spezifischen" Nitroaromaten und Anilinderivaten während der Aufbereitung belasteter Gewässer, an der Mikroorganismen beteiligt sein können [3; 22], verfügbar. Ein vollständiger Abbau von Nitroaromaten konnte bisher nur unter sehr spezifischen Bedingungen gezeigt werden [37], allerdings sind die postulierten Abbauewege unter natürlichen Bedingungen noch nicht nachgewiesen worden.

Die meisten Bakterien bauen Nitroaromaten nur unvollständig ab. Nur bei wenigen konnte ein vollständiger Abbau zu CO_2 , H_2O und NO_2^- bzw. NH_3 unter spezifischen Laborbedingungen nachgewiesen, wobei für eine solche Mineralisation eine Spaltung des aromatischen Rings notwendig ist. Theoretisch ist eine oxidative Decarboxylierung via Alkohol-, Aldehyd-, Säurebildung und CO_2 -Abspaltung möglich, allerdings wurde dies bislang nicht nachgewiesen. Somit kann der Abbau nur über den Angriff an der Nitrogruppe erfolgen. Hierfür wurden aufgrund verschiedener Untersuchungen unterschiedliche Abbauewege für Bakterien postuliert und durch die Identifikation charakteristischer Metabolite bestätigt:

- Eine oxidative Nitritabspaltung wurde beim Abbau von Nitrophenolen durch *Pseudomonas putida* nachgewiesen [42]. Das notwendige hierfür benötigte Enzym, die 2-Nitrophenol-Dioxygenase, weist eine breite Substratspezifität auf und benötigt Sauerstoff und NADPH. Die Ringspaltung erfolgt anschließend über Dihydroxyverbindungen (Catechol) mit nachfolgender Mineralisierung [3];
- Stufenweise Reduktion der Nitrogruppe über Nitroso- und Hydroxylaminverbindungen zu aromatischen Aminen, die entweder Substrate eines weiteren mikrobiellen (über reduktive Desaminierung, Catechol etc.) bzw. abiotischen Abbaus sind oder neben anderen Metaboliten, Ausgangsprodukte neuer Verbindungen darstellen [30; 42], so z. B. Azoxytoluole., die durch spontane Kondensation von Hydroxylamino- und Nitroso-Zwischenprodukten entstehen. Die Autoren fanden jedoch keinen Hinweis auf ringspaltende Mechanismen [5; 18].
- Die oxidative Ammoniumabspaltung mittels Anilin-Oxygenase [42] wurde beim Abbau von Anilin untersucht. Das relevante Enzym, Anilin-Oxygenase, zeigte bei *Moraxella sp.* eine breite Substratspezifität. Es wurde angenommen das dieser Mechanismus bei der Umwandlung der reduzierten TNT-Metabolite eine Rolle spielt.
- Die reduktive Ammoniumabspaltung wurde nach der Carboxylierung von Anilin durch *Desulfobacterium anilini* beobachtet [27].

Durch die Abbauvorgänge können Metabolite, die nicht oder nur gering abbaubar sind, entstehen (Dead-end-Metabolite). So können z. B. im Wasser und im Boden über

Polymerisierung sowie durch Adsorptionswirkungen stabile, nicht oder wenig abbaubare Endprodukte gebildet werden. Grundsätzlich ist festzuhalten, daß die Einführung von Chlor-, Nitro- und Sulfogruppen zu einer verminderten Abbaurate, wenn nicht zur Persistenz führt. Auch Anzahl und Stellung der Substituenten beeinflussen den biologischen Abbau erheblich [23]. Neben dem Umbau zu persistenten Verbindungen können auch Metabolite mit einer höheren Toxizität entstehen. Insbesondere der Abbau zu aromatischen Aminen muß unter diesem Gesichtspunkt betrachtet werden [17], zumal erhöhte Polarität und teilweise verstärkte Mobilität im Untergrund (Wasserlöslichkeit) zusätzlich das Grundwasser gefährden können [3; 17].

TNT kann sowohl anaerob als auch aerob durch sukzessive Reduktion der Nitrogruppe transformiert werden, wobei unter aeroben Bedingungen der Abbau oftmals zur Entstehung toxischer Dead-End- Metabolite führt [34]. Der bedeutendste Abbauprozess stellt die sukzessive anaerobe Reduktion der Nitrogruppe zu dem aromatischen Amin 2,4,6-Triaminotoluol (TAT) dar. Diese neigen zur Polymerisation oder binden sich in Form von Anilinen verstärkt an Bodenpartikel [23]. Polymerisationsreaktionen nitroaromatischer Verbindungen sind weitgehend nur unter Beteiligung von Sauerstoff zu erwarten. So sollten strikt anaerobe Verhältnisse diesen Prozess verhindern und nach einer Reduktion der nitroaromatischen Substituenten und deren Elimination zu einer kompletten Mineralisation des Ringmoleküls führen [28]. Die Metabolisierung von Trinitrotoluol erfolgt im allgemeinen cometabolisch, d.h. unter Verwendung zusätzlicher C- und N-Quellen. Hierbei gewinnt der Organismus aus der Transformation weder Energie noch Zellbausteine.

Außer Bakterien sind auch Pilze zur Transformation von TNT fähig. Für den am Besten untersuchten Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* wurde eine Mineralisierung von TNT beobachtet [7], aber auch bei anderen Pilzen konnte eine vollständige Mineralisierung eines Teils des TNT nachgewiesen werden [33]. Die meisten Untersuchungen korrelierten den TNT-Abbau mit dem lignin-abbauenden Enzymsystem des Sekundärstoffwechsels, bei dem extrazelluläre Ligninperoxidasen (LiP), manganabhängige Peroxidasen, Phenoloxidasen (Laccasen) und H₂O₂-liefernde Enzyme beteiligt sind [35]. Dieses Enzymsystem weist eine geringe Substratspezifität auf und wird unter Nährstoff-limitierenden Bedingungen, insbesondere Stickstoffmangel, induziert [16]. Lignin, der Hauptbestandteil des Holzes, ist ein schwer abbaubares, aromatisches Polymer unregelmäßiger Struktur. Weißfäulepilze haben sich auf den Lignin-Abbau spezialisiert, der zur "Weißfäule" des Holzes führt. Nach einer initialen oxidativen Depolymerisierung, die durch Radikale bewerkstelligt wird, erfolgt die Spaltung der aromatischen Ringe. Neben diesen oxidativen Vorgängen kommen aber auch, ähnlich wie bei den Bakterien, reduktive Mechanismen vor. Auch für *P. chrysosporium* wurde die Bildung der reduzierten Metabolite 4-Amino-2,6-dinitrotoluol und 2-Amino-4,6-dinitrotoluol während des Mineralisierungsprozesses beobachtet [4]. Während des Abbaus kann es zur Hemmung der am Abbau beteiligten Lignin-Peroxidasen durch die gebildeten Hydroxylamino-dinitrotoluol-Zwischenprodukte kommen. Dies führt zu einer Verlangsamung des Abbauprozesses. Für TNT konnte außerdem festgestellt werden, daß die Reduktion anscheinend unabhängig von dem ligninolytischen System abläuft. Allerdings können zwischenzeitlich Metabolisierungsprodukte akkumulieren, die das Lignin-Enzymsystem beeinflussen und die Mineralisierungsrate erniedrigen [20].

2.4 Mikrobiologischer Abbau von Nitraminen

Bislang ist der Kenntnisstand über den biologischen Abbau von Nitraminen gering. Man geht davon aus, daß aufgrund des hohen Stickstoffanteils in Nitraminen, wie Hexogen (Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin; Royal Demolition Explosive=RDX), einem heterocyclischen Sechsring mit insgesamt sechs Stickstoffatomen, diese von einigen Mikroorganismen als Stickstoffquelle genutzt werden können. So konnten einige Corynebakterien aus hexogenkontaminiertem Boden mehr als 90% Hexogen innerhalb von 3 Tagen abbauen. Bei Zugabe von Ammonium-Salzen fand allerdings kein Hexogenabbau statt, d.h. Hexogen wurde in der Abwesenheit von Ammoniumionen als Stickstoffquelle genutzt [40]. Auch freie Nitrat- und Nitritionen hemmten den Hexogenabbau [13].

Unter anaeroben Bedingungen im Labor kann eine vollständige Ringspaltung und Mineralisierung stattfinden [9; 19], wie beispielsweise für *Enterobacteriaceen* nachgewiesen, wobei Nitroso-RDX-Zwischenprodukte gebildet werden und CO₂ freigesetzt wird [14]. Im bisher postulierten Hexogen-Abbaupfad [19] werden die Nitrogruppen zunächst sukzessiv zu Nitroso- bzw. Hydroxylamingruppen reduziert. Die postulierten Metabolite werden bei der weiteren Reduktion eines Substituten zu einer Aminogruppe instabil und schließlich hydrolytisch gespalten. Durch Umlagerungen und weitere Reduktionsreaktionen werden anschließend Formaldehyd, Methanol, Nitrosamine und Hydrazinderivate gebildet. Allerdings ist ungeklärt, welche der Reaktionen biotisch oder abiotisch (z.B. durch photolytische und hydrolytische Reaktionen) katalysiert werden. Einige der Abbauprodukte zeigten in Tierversuchen karzinogene Wirkungen [19] bzw. stehen aufgrund ihrer Struktur (N-Nitroso-Verbindungen) in einem entsprechenden Verdacht.

Unter aeroben Bedingungen zeigen Bakterien im allgemeinen ein geringes Hexogen-Abbaupotential. Ein aerober Hexogenabbau wurde in *Stenotrophomonas maltophilia* nachgewiesen [2]. Hier erfolgte der Abbau während des Wachstums, wobei Hexogen und NH₄NO₃ als Stickstoffquellen dienten. Das Wachstum fand zweiphasig statt (Diauxie), wobei Hexogen in der zweiten Phase genutzt wurde. Mit Hexogen als einziger Stickstoffquelle war der Wachstumsertrag geringer und nur die Hälfte der Stickstoffatome im Hexogen wurden genutzt. Das gebildete Abbauprodukt Methyl-N-(hydroxymethyl)-hydroxylamin-N'-(hydroxylmethyl)-Nitrosamin wird in Mischkulturen nicht akkumuliert, sondern von anderen Organismen metabolisiert. Weitere Untersuchungen zeigten, daß Hexogen durch ein spezifisches, induzierbares Enzymsystem und unter Zusatz einer Kohlenstoffquelle (Glukose) metabolisiert wurde [2]. In Hexogenabbauversuchen mit Oktogen (HMX) wurde nach Zugabe von TNT, sowie anderen Nitro-, Amino-, und Nitroaminoaromaten, eine Erhöhung der RDX-Reduktion durch das Bodenbakterium *Morganella morganii* festgestellt. In diesen Untersuchungen zeigte sich auch, daß die RDX-Reduktion unabhängig von der HMX-Nitraminreduktaseaktivität induziert wird, so daß wahrscheinlich zwei verschiedene Enzyme für die Reduktion von RDX und HMX verantwortlich sind [14]. Andere Studien ergaben, daß unter thermophilen Bedingungen in einem Kompostierungssystem Hexogen innerhalb von 6 Wochen fast vollständig abgebaut wurde [38]. Allerdings konnte der Einbau der Ausgangsverbindung oder der Zwischenprodukte in die Humusstruktur des Bodens, wie auch beim Abbau von TNT nachgewiesen wurde, nicht ausgeschlossen werden [7].

Andere Untersuchungen zeigten, daß der biologische Abbau von Hexogen im Boden stattfindet, allerdings gibt es nur sehr geringe Informationen über die involvierten Organismen

und Abbauvorgänge. Hingegen scheint das Hexogen im Grundwasserleiter persistent gegenüber mikrobiologischen Abbauvorgängen zu sein [26; 29].

In Bezug auf Pilze existieren Resultate mit dem in Amerika beheimateten Weißfäulepilz *Phaenerochaete chrysosporium* [7]. In einer aeroben Flüssigkultur mit Glukose und NH_4 -Tartrat wurden innerhalb von 30 Tagen 67% des ^{14}C -markierten Hexogens zu $^{14}\text{CO}_2$ abgebaut; 20% wurden als wasserlösliche Metabolite, 2,1% als mycelgebunden und 4,8% als dichlormethanextrahierbar nachgewiesen. Im Boden wurden in der gleichen Zeit 76% zu $^{14}\text{CO}_2$ mineralisiert. Weitere 4,5% wurden in einem Acetonitril-Extrakt nachgewiesen und 9,7% waren irreversibel an die Bodenmatrix gebunden. Untersuchungen mit einheimischen Pilzstämmen gab es bislang noch nicht.

Für das aromatische Nitroamin, Hexyl (2,2',4,4',6,6'-Hexanitrodiphenylamin), wurden bislang kaum Untersuchungen hinsichtlich der Abbauvorgänge durchgeführt.

2.5 Derzeitiger Stand der Dekontaminationstechniken

Für die Entsorgung kontaminierter Böden gelten aus technischer Sicht drei Verfahren als praktikabel: thermische Verfahren, Waschverfahren und biologische Verfahren.

Mittelbelastete sprengstoffverunreinigte Böden (bis 100 mg/kg) können in geschlossenen Anlagen thermisch behandelt werden. Höher belastete Böden (> 100 mg/kg) dürfen nur in Spezialanlagen thermisch behandelt werden. Derzeit existieren in der BRD in Munster eine stationäre Anlage für höher belastete Böden sowie weitere mobile Anlagen, die nach dem Drehrohrofenverfahren arbeiten. Diese Anlagen verfügen jedoch über geringe Kapazitäten. In den USA wurden nach Drehrohrofenprinzip auch TNT-kontaminierte Böden mit Belastungen zwischen 3.000 und 5.400 mg/kg behandelt. Mit Hilfe des sog. Reibwäscheverfahrens können gering kontaminierte Böden mechanisch behandelt und gewaschen werden. Im Anschluß muß das Prozeßwasser durch andere Verfahren gereinigt werden.

Mit sprengstofftypischen Verbindungen kontaminierte Wässer fallen im Bereich der militärischen Altlasten als Standortwässer (Grund- und Oberflächenwässer) an. Außerdem sind sie als Prozeßwässer der Bodensanierung bei großtechnischen Sanierungen zu erwarten, wenn Extraktionsverfahren oder biologische Suspensionsverfahren verwendet werden. Stand der Technik der Reinigung von Standortwässern ist die Aktivkohlefiltration, die meist mit einer thermischen Entsorgung der schadstoffbeladenen Aktivkohle verbunden ist. Problematisch stellt sich hierbei die Adsorption der Explosivstoffe an die Aktivkohle dar. So können durch die Aktivkohlereinigung die derzeitigen Richtlinien für TNT eingehalten werden [11], allerdings Erfahrungen am Standort WASAG-Elsnig sowie bei anderen Sanierungen zeigten, daß sich insbesondere Hexogen mittels Aktivkohlereinigung nur schwer aus dem Wasser entfernen läßt.

Eine im Hinblick auf die Reststoffminimierung entwickelte großtechnische verfahrenstechnische Lösung, die ähnlich niedrige Betriebskosten aufweist, ist bislang nicht vorhanden.

Trotz vieler Untersuchungen zur mikrobiellen Transformation bzw. Abbau von TNT und anderer Explosivstoffe seit über mehr als 20 Jahren wurde bislang kein geeignetes biologisches Verfahren zur Dekontamination von RDX-kontaminierten Böden und Standortwässern entwickelt. Die größten Bemühungen wurden für kontaminierte Böden im

Bereich der Kompostierung unternommen. In den USA wurde im Pilotverfahren und auch im technischen Einsatz eine Kompostierungsanlage für die Behandlung von Böden aus Altlasten und Rüstungsaltslasten betrieben [6]. Für das Verfahren wird das kontaminierte Material ausgekoffert, homogenisiert und mit anderem kompostierfähigem Material gemischt und als Miete aufgeschüttet. Während der Maßnahme wird die Belüftung, Temperatur und der Feuchtegehalt vom Kompost reguliert. Anschließend wird das Kompostmaterial in einer Nachrotte nachbehandelt. Allerdings wird durch diese Behandlung keine Mineralisierung erreicht, sondern die Metaboliten werden im wesentlichen an die Humusmatrix gebunden. Zwar reduziert das Verfahren den Gehalt an eluierbaren toxischen und mutagenen Substanzen, bislang jedoch ist das Langzeitverhalten der gebundenen Substanzen ungewiß. In der BRD erfolgte bislang keine technische Umsetzung von Laborergebnissen in die Praxis.

Zur Zeit werden bzw. wurden im Pilotmaßstab im Rahmen des Forschungsverbunds „Maßstabsgerechte Erprobung“ zwei biologische Bodenbehandlungsverfahren für TNT getestet, ein Kompostierungs- und zwei Mietenverfahren.

Neuere Entwicklungen untersuchen den Einsatz von Pflanzen für oberflächige TNT-Kontaminationen [26]. Obwohl einige Pflanzen in der Lage sind, TNT zu metabolisieren, ist es unwahrscheinlich, daß TNT oder dessen Metabolite in metabolische Reaktionswege eingeschleust werden. Außerdem haben spezifische Studien gezeigt, daß das TNT und die Metabolite bevorzugt in den Wurzeln akkumulieren. Somit ist selbst durch das Ernten der Pflanzen die Kontamination nicht leicht vom Standort zu entfernen. Wie für das Kompostierungsverfahren muß die langfristige Fixierung bzw. Transformation in unbedenkliche Metabolite gegeben sein.

Erste biologische Ansätze zur Reinigung von Abwässern wurden in der USA mit *P. chrysosporium* in einem Reaktorverfahren durchgeführt. Ein großer Nachteil des in Amerika beheimateten Weißfäuleerregers *P. chrysosporium* sind die benötigten hohen Temperaturen (> 39°C), um gute Wachstums- und Abbauraten zu erzielen. Außerdem wurde von verschiedenen Autoren [12] über die extreme Empfindlichkeit dieses Pilzes gegenüber Bewegung sowie Schwierigkeiten bei der Kultivierung berichtet. Auch ist der Stamm bezüglich des Hexogen-Abbaupotentials nicht eindeutig.

3 Angewandte Methoden

3.1 Entnahme und Aufbereitung der Bodenproben

Die Entnahme und Aufbereitung der Bodenproben sowie die Isolierung der Pilze erfolgte in Anlehnung nach DECHEMA [15].

3.2 Fermentationen

Die Pilze wurden in Submerskulturen kultiviert. Die Hexogenkonzentration in den Kulturen zur Bestimmung der Hexogenumsetzung betrug 22,22 mg/l und bei den Hexylumsetzungsversuchen 43,92 mg Hexyl/l. Kontrollansätze ohne Inokulum wurden zur Erfassung abiotischer Verluste über die gesamte Inkubationsdauer mitgeführt. Ebenso wurden Kontrollen mit abgetötetem Mycel zur Erfassung eventueller Adsorptionseffekte mitgeführt.

Die Quantifizierung des Hexogenabbaus erfolgte mittels HPLC. Die Untersuchung des Hexylabbaus erfolgte aus Mangel an Reinsubstanz (Hexyl ist käuflich nicht mehr beziehbar und wurde aus kontaminierten Bodenproben angereichert) mittels Dünnschichtchromatographie.

3.3 Bilanzierung des Abbaus ausgewählter Stämme mit ¹⁴C-markiertem RDX

Zur Bilanzierung des Abbaus wurden spezifische Untersuchungen mit ausgewählten Pilzen und ¹⁴C-markiertem RDX durchgeführt. Dazu wurden die jeweiligen Pilzkulturen mit 5 µCi markiertem Hexogen inkubiert. Das gebildete CO₂ wurde aufgefangen und die Menge an freigesetztem radioaktiv markiertem CO₂ und eventuell anderer leicht flüchtiger Abbauprodukte bestimmt. Anschließend wurden die gesamten Kulturen aufgearbeitet und die Mycel- und Kulturfiltratextrakte mittels HPLC aufgetrennt. Die HPLC-Eluate wurden fraktioniert aufgefangen und im Liquid Szintillation Counter (LSC) die Radioaktivität bestimmt.

Für weitere Bilanzierungsexperimente wurden die Versuchsbedingungen hinsichtlich der Sauerstoffversorgung modifiziert.

3.4 Abbauversuche mit kontaminiertem Grundwasser des Standorts WASAG-Elsnig

Für die Untersuchung des Abbaus der sprengstofftypischen Verbindungen (STV) im Grundwasser des Standorts wurde das kontaminierte Grundwasser nach Medienzugabe mit spezifischen Stämmen angeimpft. Die Inkubation erfolgte 24 Tage bei 23°C und 120 rpm im Dunkeln. Bei Versuchsabbruch wurde der pH, der Glukosegehalt und das Mycelgewicht sowie die STV mittels HPLC bestimmt. Als biotische Kontrolle diente Grundwasser mit Medienzusätzen ohne Inokulum. Vor Beginn der Versuche wurde der Ammonium-, Nitrat-, und Phosphatgehalt bestimmt (colorimetrische Testkits, Fa. Merck, Darmstadt).

3.5 Toxikologische Charakterisierung

Extrakte der untersuchten Pilzkulturen wurden während des Abbauperlaufs toxikologisch charakterisiert. Hierzu wurden folgende Tests eingesetzt:

1. Cytotoxizitätstest
Der Cytotoxizitätstest wurde mit Monolayerkulturen der Zelllinie HeLa-S3 (menschliches Cervixkarzinom) entsprechend Zapf [41] durchgeführt.
2. Mutagenitätstest nach AMES
Eine Erhöhung der Mutationsrate durch den Einfluß einer Verbindung während des Abbauperlaufs wurde mit Hilfe des bei Ames [1] beschriebenen Tests untersucht. Die Tests wurden mit und ohne metabolischer Aktivierung durch Rattenlebermikrosomen (S9-mix) durchgeführt.
3. Pflanzenkeimungstests:
Die fraglichen Extrakte aus Kulturfiltraten wurden auf Filterpapierrondellen aufgetragen, diese getrocknet und in ein zylindrisches Gefäß gelegt. Pro Gefäß wurden 6 Samen der

jeweiligen Testpflanze eingefüllt und 150 μl Wasser zugegeben. Die Ansätze wurden 24 Stunden im Dunkeln und anschließend bis zu 96 Stunden unter Dauerlicht inkubiert. Ausgewertet wurden die Keimungsraten, Sproß- und Wurzeldefekte sowie Chlorosen.

4. Test auf Nematizidität

Die nematizide Wirkung der Kulturfiltratextrakte wurde mit dem freilebenden saprophytischen Nematoden *Caenorhabditis elegans* in Anlehnung an Stadler [32] durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mikroskopisch. Der Anteil letaler sowie bewegungsunfähiger Nematoden wurde hierbei ermittelt.

5. Test auf antibakterielle/antifungische Wirkung

Hierfür wurde der Agardiffusionstest mit diversen Bakterien und Pilzen als Testkeimen eingesetzt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Untersuchung von Mischkulturen

Es wurden Versuche durchgeführt, mit Schlammproben sowie hochkontaminiertem Grundwasser stabile Mischkulturen zu etablieren. Während in den Grundwasseranreicherungskulturen nach einer 14-tägigen Inkubation eine Hexogenmetabolisierung von 20% zu verzeichnen war, konnte in den Schlammanreicherungskulturen ein Hexogenabbau bis zu 50% festgestellt werden. Es war jedoch nicht möglich, das Metabolisierungspotential für Hexogen über mehrere Generationen hinweg in den Mischkulturen des Grundwassers aufrecht zu erhalten.

4.2 Isolierung und Screening der Pilzstämmen

Aus den z.T. sprengstoffkontaminierten Originalproben des Standortes WASAG-Elsnig und der MUNA-Süptitz konnten insgesamt etwa 100 Pilzstämmen isoliert werden. Davon wurde bei 60 Pilzisolaten die Fähigkeit festgestellt, Hexogen als Stickstoff-Quelle zu verwerten.

Aus einer sehr stark hexylkontaminierten Schürfprobe konnten aufgrund der hohen Hexylkonzentration im Boden nur 4 Pilze, die an diese hohen Schadstoffkonzentrationen angepaßt waren, isoliert und in den Metabolisierungsversuchen eingesetzt werden.

Zusätzlich wurden im Rahmen des Vorhabens 35 Gattungen von verschiedenen Stämmen einheimischer Basidiomyceten aus der Stammsammlung des Lehrbereichs Biotechnologie der Universität Kaiserslautern auf ihre Hexogen-/Hexylverwertung hin untersucht.

4.3 Abbau von Hexogen durch Deuteromyceten, Zygomyceten und Basidiomyceten

Unter den Deuteromyceten und Zygomyceten zeigten einige Stämme hohe spezifische Abbauraten (Abbildung 1). Auch bei den Basidiomyceten konnten hohe spezifische Abbauraten verzeichnet werden, die außerdem sehr gut reproduzierbar waren (Abbildung 2).

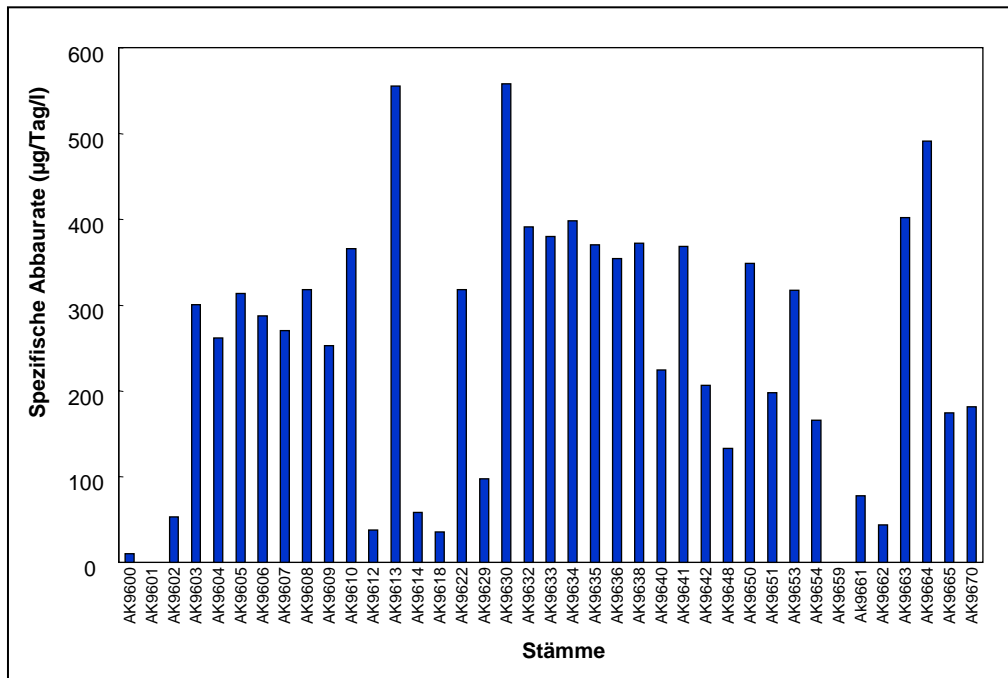


Abb. 1: Spezifische Abbauraten der gescreenten Deuteromyceten und Zygomyceten

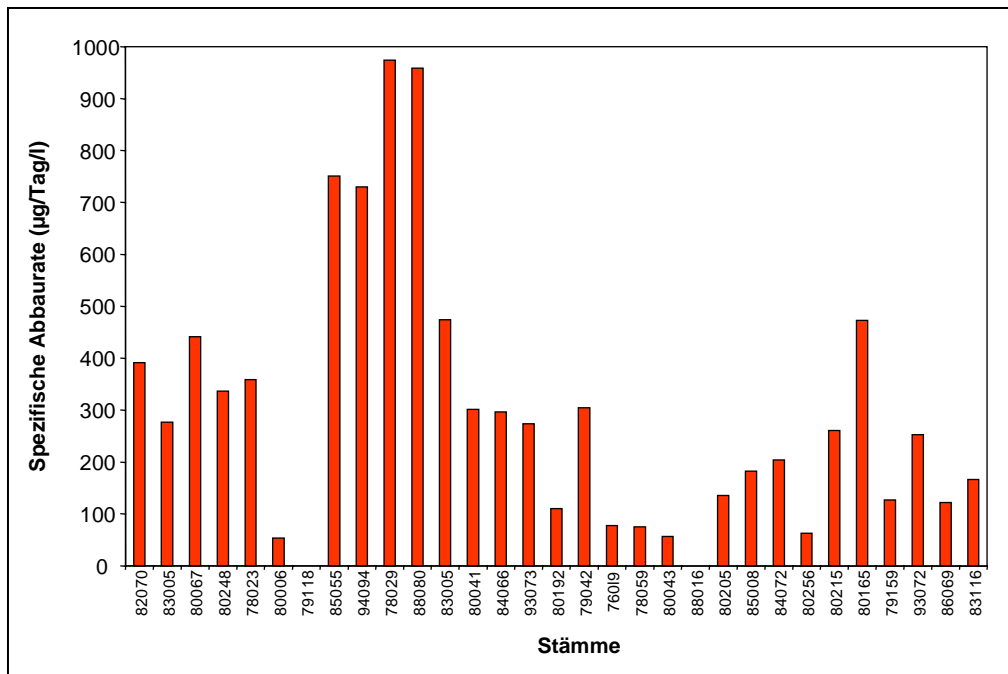


Abb. 2: Spezifische Abbauraten der gescreenten Basidiomyceten aus der Stammsammlung des Lehrbereichs Biotechnologie

4.4 Vergleich der Metabolisierungsraten und Auswahl der Stämme für weitere Untersuchungsschritte

In den weiteren Untersuchungsschritten wurden die Pilzstämme ausgewählt, die über eine stabile bzw. reproduzierbare, hohe und schnelle Metabolisierung von Hexogen verfügten. Abbildung 3 zeigt einen Vergleich der Metabolisierungsraten pro Zeiteinheit.

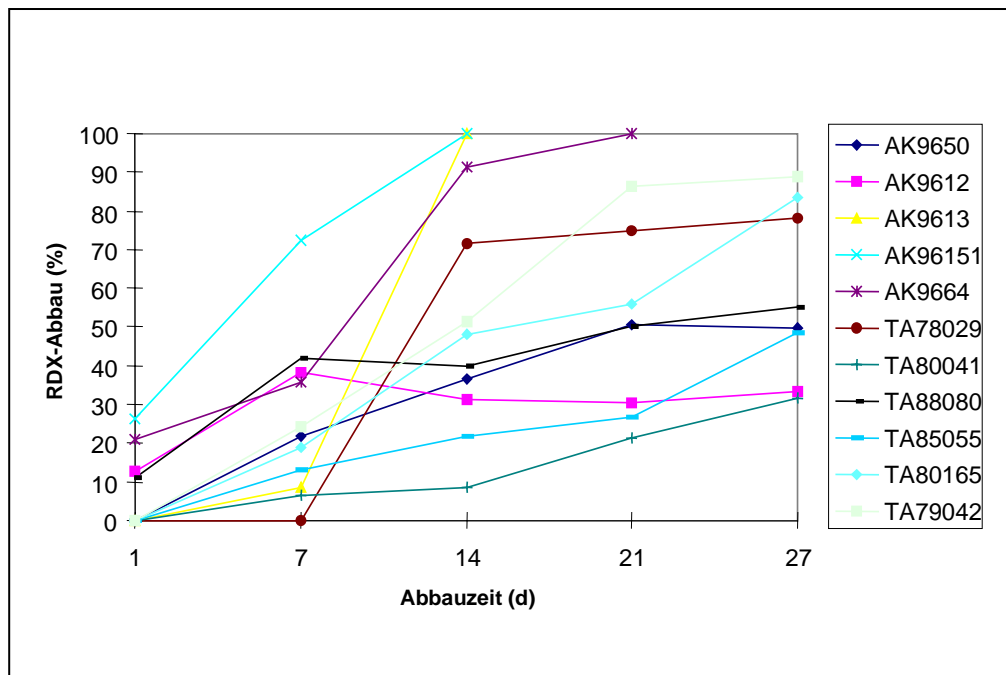


Abb. 3: Vergleich der Metabolisierungsraten (%) für Hexogen bei Deuteromyceten und Basidiomyceten.

Wie aus Abbildung 4 hervorgeht, ist der Hexogenabbau bei dem Stamm AK9613 mit der exponentiellen und der stationären Wachstumsphase gekoppelt. Im Gegensatz dazu fand bei einigen anderen untersuchten Pilzen der Hexogenabbau vermehrt in der stationären oder in der Absterbephase der Kultur statt. In dieser Phase werden auch häufig Sekundärmetabolite produziert. Eine Ausnahme hiervon stellte der Pilzstamm TA 80165 dar. Bei diesem Stamm wurde Hexogen von Beginn der Inkubationszeit bis zum vollständigen Verbrauch nur in der exponentiellen Wachstumsphase metabolisiert (Abbildung 5).

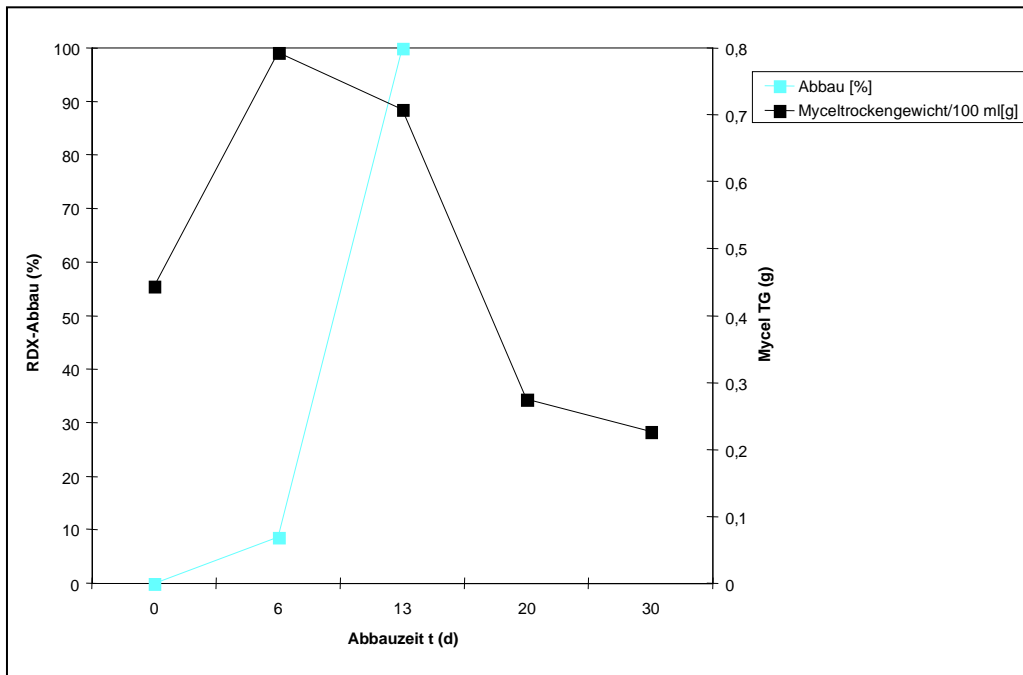


Abb. 4: Abbaukinetik des Stammes AK 9613 im 2-l-Maßstab mit 0,1 mM RDX als N-Quelle

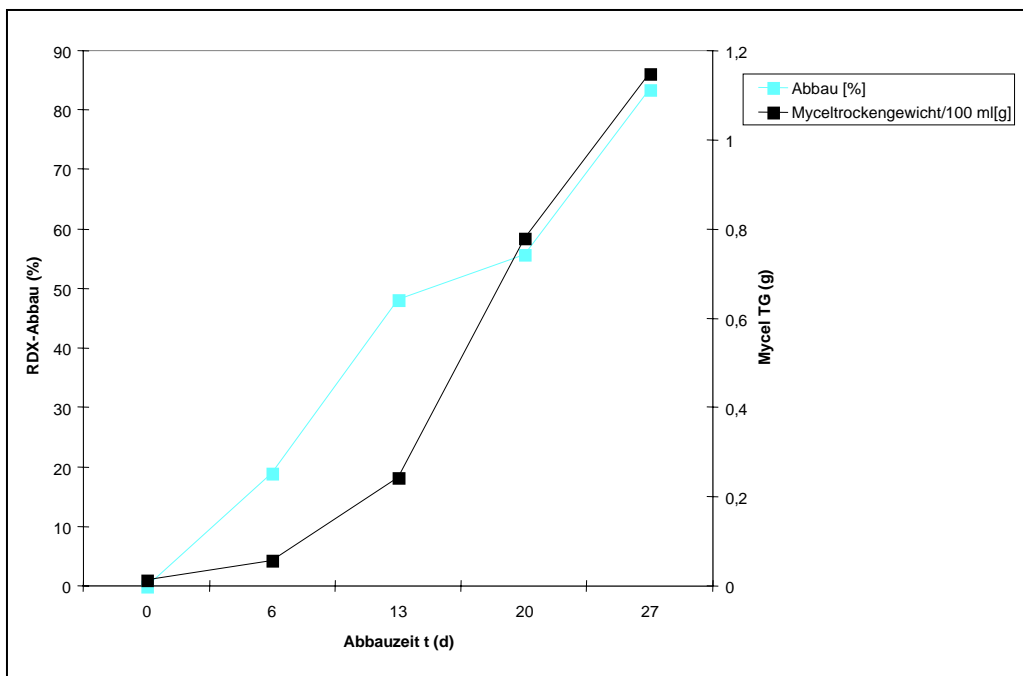


Abb. 5: Abbaukinetik des Stammes TA 80165 im 2-l-Maßstab mit 0,1 mM RDX als N-Quelle

4.5 Abbau von Hexyl durch Deuteromyceten, Zygomyceten und Basidiomyceten

Für die Untersuchung des Hexylabbaus durch Pilze stand nur eine begrenzte Menge an reinem Hexyl zur Verfügung. Deshalb wurden bereits ausgewählte Stämme aus dem Screening auf Hexogenabbau sowie isolierte Stämme von der Schürfprobe getestet.

Die Ergebnisse zeigten, daß das Potential zur Hexylmetabolisierung überwiegend bei den eingesetzten Stämmen anzutreffen ist, die sich bereits durch die Metabolisierung von Hexogen auszeichneten.

4.6 Abbaubilanzierung ausgewählter Stämme mit ¹⁴C-markiertem RDX

Untersuchungen zur Bilanzierung der Hexogenmetabolisierung wurde mittels ¹⁴C-markiertem RDX mit besonders leistungsstarken Stämmen durchgeführt. Die Tabellen 1 und 2 zeigen die Bilanzierungsergebnisse der Versuche.

Tab. 1: Wiederfindungsraten und Radioaktivitätsverteilung in Kulturen von AK96151 mit ¹⁴C-markiertem Hexogen

Fraktionen		Verteilung der Radioaktivität (%) nach		
		2 Std.	7 Tage	14 Tage
Kulturfiltrat	Kulturfiltratextrakt	86,4	86,2	77,7
	Wäßrige Phase	0,6	0,9	1,1
Mycel	Mycelextrakt	13,9	13,4	15,4
	Mycelbiomasse	0,05	0,2	0,09
Abgasfallen		0	0,3	5,42
Wiederfindung (gesamt)		100,1	101,0	99,7

Vergleicht man die Bilanzierung der Hexogenmetabolisierung beider Stämme, so fällt auf, daß die Belüftungsrate je nach Pilzstamm den Hexogenabbau maßgeblich zu beeinflussen scheint. Wird der Abbau mit geringer Belüftungsrate durchgeführt, so ist die Metabolisierungsleistung stark eingeschränkt. In dem Versuch war die Sauerstoffzufuhr zunächst diskontinuierlich. So war im Falle von AK 96151 nach 14 Tagen Inkubationszeit noch 78 % nicht umgesetztes RDX im Kulturfiltrat vorhanden, während bei AK 9613 nur noch 26 % nicht metabolisiertes RDX detektiert wurde. Nach 20 Tagen sank die Radioaktivität im Kulturfiltrat auf 43% bei Stamm AK9613. Gleichzeitig wurde 35% des RDX als CO₂ freigesetzt und die Mycelbiomasse zeigte nur sehr geringe Konzentrationen an radioaktivem Hexogen. Somit wird das Hexogen nicht in die Biomasse bzw. in Dead-end Metabolite eingebaut sondern mineralisiert. Die Erhöhung der Radioaktivität in der wäßrigen Phase des Kulturfiltrats weist auf Zwischenmetabolite des Abbauprozesses hin, wobei diese wieder von dem Pilz verwertet werden.

Tab. 2: Wiederfindungsraten und Radioaktivitätsverteilung in Kulturen von AK9613 mit ¹⁴C-markiertem Hexogen

Fraktionen		Verteilung der Radioaktivität (%) nach		
		2 Std.	7 Tage	14 Tage
Kulturfiltrat	Kulturfiltratextrakt	86,4	56,6	43,4
	Wäßrige Phase	0,7	8,0	5,0
Mycel	Mycelextrakt	12,8	13,8	15,3
	Mycelbiomasse	0,07	0,06	0,41
Abgasfallen		0	23,2	35,84
Wiederfindung (gesamt)		99,97	101,3	99,95

4.7 Abbauversuche mit kontaminiertem Grundwasser des Standorts WASAG-Elsnig

Generell sind Boden bzw. Wasser des Standorts WASAG-Elsnig mit verschiedenen sprengstofftypischen Verbindungen kontaminiert. In den folgenden Untersuchungen wurde die Metabolisierung von sprengstofftypischen Verbindungen in Originalgrundwasserproben des Standorts WASAG-Elsnig durchgeführt.

Abb. 3: Abbauversuche mit Grundwasserproben des Pegels 515/90 OP bei 120 UpM, 23°C für 23 Tage im Dunkeln

Die Grundwasserproben waren außer mit Hexogen, Octogen und Hexyl auch auch mit TNT, Trinitrobenzol und Dinitrotoluolen kontaminiert. Als Inoculum dienten Pilzstämmen, die sich im Screening durch hohe spezifische Abbauraten ausgezeichnet hatten und deren Abbauleistung gut reproduzierbar war. In der folgenden Abbildung 6 sind die Ergebnisse der Analytik im Einzelnen dargestellt.

Wie aus der Abbildung ersichtlich, waren einige der eingesetzten Pilzstämmen im Vergleich zur unbeimpften Kontrolle in der Lage, alle sprengstofftypischen Kontaminationen in der Grundwasserprobe vollständig zu eliminieren.

4.8 Toxikologische Charakterisierung des Abbaus

Extrakte aus Pilzkulturen, die reproduzierbar in der Lage waren, Hexogen bzw. Hexyl zu metabolisieren, wurden toxikologisch während der Kultivierung charakterisiert und der Abbauverlauf toxikologisch überwacht.

Tab. 3: Cytotoxizität und Mutagenität (AMES-Test) von Hexogen, Hexyl und nach Fermentation ausgewählter Stämme (- negativ, + positiv, (+) schwach positiv, ? fraglich)

Stamm/Kontrolle	Cytotoxizität Hela S3		Mutagenität - AMES-Test TA98, TA100, ohne/mit S9-mix	
	Hexogen	Hexyl	Hexogen ohne/mit S9	Hexyl ohne/mit S9
Reinsubstanz	-	-	- / +	+ / +
78029	-	-	- / -	- / ?
88080	-	-	- / -	- / -
79042	(+)		- / ?	
80041	n.b.	-	n.b.	- / -
80165	-	-	- / -	- / +
85055	n.b.	-	n.b.	- / -
AK 9612	n.b.	+	n.b.	- / -
AK9613	-	-	- / -	- / (+)
AK9664	+	n.b.	- / -	n.b.
AK96151	?	-	- / -	- / -
Kontrollmutagene:	Daunomycin, ICR 191 and Benzo(a)pyren			

Für *Phaenerochaete chrysosporium* konnte ein hemmender Effekt durch hohe TNT-Konzentrationen (> 100 ppm TNT) nachgewiesen werden. Dies ist eventuell auf die Inhibition der Ligninperoxidase durch die Akkumulation von Metaboliten zurückzuführen [20], wodurch der Einsatz dieses Pilzes auf kontaminierten Böden grundsätzlich eingeschränkt ist. Aus diesem Grunde wurden im Rahmen des Vorhabens spezifische toxikologische Untersuchungen für die Bodenflora sowie hinsichtlich Genotoxizität mit Hexogen und Hexyl durchgeführt und deren Ausgangstoxizität sowie der Abbauverlauf toxikologisch überwacht. Die Ergebnisse sind in Tabellen 3 und 4 zusammengefasst.

Tab. 4: Phytotoxizität, nematizide, antibakterielle und antifungische Wirkung von Hexogen, Hexyl und abbauenden Stämme(- negativ, + positiv, (+) schwach positiv)

Stamm/ Kontrolle	Nematizide Wirkung		Phytotoxizität		Anti- bakterielle Wirkung		Anti- fungische Wirkung	
	RDX	Hexyl	RDX	Hexyl	RDX	Hexyl	RDX	Hexyl
Reinsubstanz	-	+	-	Wurzelmiß- bildungen, Chlorosen	-	+	-	-
78029	-	(+)	-	-	-	-	-	-
88080	(+)	-	-	-	-	-	-	-
79042	(+)	-	+	n.b.	-	-	-	-
80041	-	-	n.b.	-	-	-	-	-
80165	-	(+)	+	-	+	-	-	-
85055	n.b.	-	n.b.	-	-	-	-	-
AK9613	-	-	(+)	-	-	-	-	-
AK9664	(+)	-	+	n.b.	-	-	+	-
AK96151	-	-	(+)	-	-	-	-	-

Wie aus den Tabellen hervorgeht, erfolgt im Zuge des Hexogen-/Hexylabbaus im wesentlichen keine Toxifizierung sondern eine Enttoxifizierung in den gewählten Testsystemen. Hexyl selber zeigte nematizide, stark phytotoxische und mutagene Wirkungen in den verwendeten Testsystemen.

5 Ausblick

Das Ziel des Folgevorhabens ist die Entwicklung eines biotechnologischen Verfahrens für die umweltfreundliche und kostengünstige Reinigung von Hexogen-Hexyl-belasteten Wässern. Aufbauend auf den Forschungsergebnissen des FuE-Projektes „Abbau der Sprengstoffe Hexogen und Hexyl durch Pilze“ (Teilvorhaben 3.8) werden im derzeit laufenden Forschungsvorhaben (Förderkennzeichen: 145 1070A) die Verfahrensgrundlagen zunächst im Labormaßstab weiterentwickelt und anschließend auf halbtechnischen Maßstab unter realen Bedingungen am Modellstandort des ehemaligen Sprengstoffwerks der "Westfälisch-Anhaltinischen Sprengstoff AG-Elsnig" übertragen.

Im Rahmen des derzeitigen Vorhabens werden die ausgewählten Stämme an reale Verfahrensbedingungen angepaßt. Hierzu wurden u.a. Untersuchungen durchgeführt, um die Stämme auszuwählen, die auch bei niedrigen Temperaturen (ca. 15°C) hohe Abbauleistungen zeigten. Derzeit werden die notwendigen Zusatzstoffe sowie die physikalisch-chemischen Randbedingungen des Prozesses in diskontinuierlichen und kontinuierlichen System ermittelt und optimiert. Im Herbst 1999 sollen die ermittelten Bedingungen auf ein kontinuierliches System im halbtechnischen Maßstab übertragen werden.

Begleitend zur Verfahrensoptimierung werden zuverlässige, aussagefähige und routinefähige ökotoxikologische und toxikologische Testsysteme sowie Analysemethoden erprobt, die für eine Erfolgskontrolle im Vorhaben und für das Verfahren schnell und kostengünstig eingesetzt werden können.

Das biologische Verfahren zur Dekontamination von sprengstoffkontaminierten Wässern wird voraussichtlich ab Herbst 2000 einsatzbereit sein.

6 Formeln und Abkürzungen

HMX	Oktogen, Cyclotetramethylentetranitramin
HPLC	High-performance liquid chromatography
LSC	Liquid Szintillation Counter
RDX	Hexogen, Cyclotrimethylentrinitramin
STV	sprengstofftypischen Verbindungen
TNT	2,4,6-Trinitrotoluene

7 Eigene Veröffentlichungen und Diplomarbeiten

- **Kuhn, A., U. Lauer, und H. Anke.** 1998. Degradation of the explosives Hexogen and Hexyl by Imperfect Fungi and Basidiomycetes. Poster bei Tagung der VAAM, Hamburg.
- **Lauer, U., und H. Anke.** 1998. Abbau der Sprengstoff Hexogen und Hexyl durch Pilze. Poster beim Statusseminar des BMBF-Forschungsverbunds „Biologische Verfahren zur Bodensanierung, Clausthal-Zellerfeld.

8 Literaturverzeichnis

1. **Ames, B. N., J. McCann, und E. Yamasaki.** 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.* **31**: 347-364.
2. **Binks, P. R., S. Nicklin, und N. C. Bruce.** 1995. Degradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) by *Stenotrophomonas maltophilia* PB1, *Appl. Environ. Microbiol.* **61(4)**: 1318-1322.
3. **Bruhn, C. H., H. Lenke, und H. J. Knackmuss.** 1987. Nitrosubstituted aromatic compounds as nitrogen source for bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **53(1)**: 208 – 210.
4. **Bumpus, J.A. und M. Tatarko.** 1994. Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium*: Identification of initial degradation products and the discovery of a TNT metabolite that inhibits lignin peroxidases. *Curr. Microbiol.* **28**: 185-190.
5. **Carpenter, D. F., N. G. McCormick, J. H. Cornell, und A. M. Kaplan.** 1978. Microbial transformation of ¹⁴C-labeled 2,4,6-trinitrotoluene in an activated sludge system. *Appl. Environ. Microbiol.* **35(5)**: 949-954.
6. **EPA.** 1994. VISITT – Vendor Information System for Innovative Treatment Technologies. *EPA 542-R-94-003*, No. 3.
7. **Fernando, T. und S. D. Aust.** 1991. Biodegradation of munition waste, TNT (2,4,6-trinitrotoluene) and RDX (hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine) by *Phanerochaete chrysosporium*, p. 214-232. In D.W. Tedder und F.G. Pohland (eds.), *Emerging Technologies in Hazardous Waste Management II*, American Chemical Society Symposium Series 468
8. **Fernando, T., J. A. Bumpus und S. D. Aust.** 1990. Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1666-1671.
9. **Garg, R., D. Grasso, und G. Hoag.** 1991. Treatment of explosives contaminated sludge. *Haz. Waste Haz. Mat.* **8**: 319-340.
10. **Hallas, L. E. und M. Alexander.** 1983. Microbial transformation of nitroaromatic compounds in sewage effluent. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**:1234-1241.
11. **Hinshaw, G. D., Fanska, C. B., Fiscus, D. E. und S. A. Sorensen.** 1987. In Granular activated carbon (GAC) system performance capabilities and optimization. Midwest Research Institute, Kansas City, MO.
12. **Jäger, A. und C. Wandrey.** 1990. Bildung von Ligninperoxidase durch den Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* im Festbettumlaufreaktor. *Forum Mikrobiologie* 9: 410-417.
13. **Kitts, C. L., D. P. Cunningham, und P. J. Unkefer.** 1994. Isolation of three Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine-degrading species of the family Enterobacteriaceae from Nitramine explosive-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 4608-4711.

14. **Kitts, C. L., E. A. Margiotta, und P. J. Unkefer.** 1994. Morganella morganii nitramine reductas activity is induced by nitroaromatic compounds. In Symposium on Biodegradation of nitroaromatic compounds, 21-23. May 1994, San Diego, Abstract Booklet.
15. **Klein, J.** 1992. In Labormethoden zur Beurteilung der biologischen Bodensanierung. 2. Bericht des Interdisziplinären Arbeitskreises „Umweltbiotechnologie – Boden“, Ad-hoc-Arbeitsgruppe „Labormethoden zur Beurteilung der biologischen Bodensanierung“, DECHEMA, Frankfurt am Main.
16. **Leisola, M.S.A. und A. Fiechter.** 1985. New trends in lignin biodegradation. *Adv. Biotechnol. Process.* **5**: 59-89.
17. **Löw, E. von, L. Kaminski, W. Neumeier, R. Haas, und K. Steinbach.** 1989. Mikrobieller Abbau von Nitroaromaten aus einer ehemaligen Rüstungsproduktion. II. Migration und mikrobielle Metabolisierung von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) im Grundwasser. *Forum Städte Hyg.* **40**: 347-349.
18. **McComick, N. G., F. E. Feeherry, und H. S. Levinson.** 1976. Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **31(6)**: 949-958.
19. **McCormick, N. G., J. H. Cornell, und A. M. Kaplan.** 1981. Biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 817-823.
20. **Michels, J. und G. Gottschalk.** 1994. Inhibition of the ligning peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* by hydroxylamino-dinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* **60(1)**: 187-194.
21. **Naumova, R. P., T. O. Belousova, und R. M. Gilyazova.** 1982. Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Prikl. Biokhim. Mikrobiology.* **18(1)**:85-90.
22. **Neumeier, W., R. Haas, und E., von Löw.** 1989. Mikrobieller Abbau von Nitroaromaten aus einer ehemaligen Sprengstoffproduktion. I. Abbau von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT). *Forum Städte Hyg.* **40**:32-37.
23. **Parris, G. E.** 1980. Environmental and metabolic transformations of primary aromatic amines and related compounds. *Residue Rev.* **76**:1-30.
24. **Preuss, A., J. Fimpel, und G. Diekert.** 1993. Anaerobic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Arch Microbiol.* **159**: 345-353.
25. **Preuss, J. und R. Haas.** 1987. Die Standorte der Pulver-, Sprengstoff-, Kampf- und Nebelerzeugung im ehemaligen deutschen Reich. *Geogr. Rundschau* **39**: 378-584.
26. **Rippen, G.** 1994. Handbuch Umweltchemikalien – Stoffdaten, Prüfverfahren, Vorschriften 3. Ecomed Verlag, Landsberg.
27. **Schink, B., A. Brune und A. Schnell.** 1992. Anaerobic degradation of aromatic compounds. p. 220-242. In G. Winkelmann (ed.), *Microbial Degradation of Natural Products*, VHC, Weinheim.
28. **Schnell, S. und B. Schink.** 1991. Anaerobic aniline degradation via reductive deamination of 4-aminobenzoyl-CoA in *Desulfobacterium anilini*. *Arch. Microbiol.* **155**: 183-190.

29. **Spaldings, R. F. und J. W. Fulton.** 1988. Groundwater munition residues and nitrate near Grand Island, Nebraska USA. *J. Contam. Hydrol.* **2(1)**: 139-153.
30. **Spanggord, R. J., T. Mill, T. Chuo, W. Mabey, J. H. Smith, and S. Lee.** 1980b. In Environmental Fate Studies on Certain Munition Wastewater Constituents – Lab Studies. ADA 099256. SRI International, Menlo Park, CA.
31. **Spanggord, R. J., T. Mill, T. Chuo, W. Mabey, J. H. Smith, and S. Lee.** 1980a. In Environmental Fate Studies on Certain Munition Wastewater Constituents. Final Report. Phase I – Literature Review. ADA 082372. SRI International, Menlo Park, CA.
32. **Stadler, M.** 1993. Untersuchungen zum Sekundärstoffwechsel nematodenfangender Pilze und Nematizide Wirkstoffe aus Kulturen höherer Pilze. Dissertation Universität Kaiserslautern.
33. **Stahl, J. D., und S. D. Aust.** 1993. Metabolism and detoxification of TNT by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **192**: 477-482
34. **Tan, E.L., C. H. Ho, W. H. Griest, und R. L. Tyndall.** 1992. Mutagenicity of trinitrotoluene and its metabolites formed during composting. *J. Toxicol. Environ. Health* **36**: 165-175.
35. **Thelen, R.** 1996. Anzucht und Einsatz von *Phanerochaete chrysosporium* (Weißfäulepilz). *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.* **8(1)**: 16-22.
36. **Thieme, J.** 1993. In Bestandsaufnahme von Rüstungsaltslastenverdachtsstandorten in der Bundesrepublik Deutschland, (2. Erweiterte Auflage), Forschungsbericht 103 40 102/02, UBA-Texte Nr. 25/96 – 30/96, 6 Bände.
37. **Walsh, M. E.** 1990. In Environmental Transformation Products of Nitroaromatics and Nitramines. Literature Review and Recommendations for Analytical Method Development. ADA 220610. U.S. Army Corps of Engineers – Cold Regions Research and Engineering Laboratory, Hanover, NH.
38. **Williams, R. T., P. S. Ziegenfuss, und W. E. Sisk.** 1992. Composting of explosives and propellant contaminated soils under thermophilic and mesophilic conditions. *J. Ind. Microbiol.* **9**: 137-144.
39. **Won, W. D., L. H. DiSalvo, und J. Ng.,** 1976. Toxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 576-580.
40. **Yang, Y. X., X. Wang, P. Yin, W. H. Li, und P. J. Zhou.** 1983. Studies on three strains of *Corynebacterium* degrading cyclotrimethylene-trinitramine (RDX). *Acta Microbiol. Sin.* **23(3)**: 251-256.
41. **Zapf, S.** 1994. Neue antifungische Antibiotika aus Pilzen, Dissertation Universität Kaiserslautern.
42. **Zeyer, J.** 1988. Abbau aromatischer Nitroverbindungen. *Gwf Wasser- Abwasser* **129**: 25-27.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.3 Verbundvorhaben 4: Ökotoxikologische Testbatterien

Prof. Dr. Dr. B.-M. Wilke¹
S. Fleischmann²

Technische Universität Berlin
Institut für Landschaftsentwicklung
Albrecht-Thaer-Weg 4
14195 Berlin

Tel.: ¹030/314 711 93

²030/314 711 85

E-Mail: ¹bmwilke@ile.tu-berlin.de

²fleinheh@sp.zrz.tu-berlin.de

Förderkennzeichen: 1491031

Laufzeit: 01.05.1996 – 30.12.1999

Vorwort

Der Boden erfüllt natürliche Funktionen "als Lebensgrundlage und Lebensraum für Menschen, Tiere, Pflanzen und Bodenorganismen, Bestandteil des Naturhaushalts und Abbau-, Ausgleichs- und Aufbaumedium für stoffliche Einwirkungen auf Grund der Filter-, Puffer- und Stoffumwandlungseigenschaften, insbesondere zum Schutz des Grundwassers" (BBodSchG § 2 Abs. 2). Zur Bewertung von Verdachtsflächen, schädlichen Bodenveränderungen, altlastenverdächtigen Flächen und Altlasten wurden in der Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung (BBodSchV 1999) im Anhang 2 Maßnahmen- und Prüfwerte für die Pfade Boden - Mensch, Boden - Grundwasser und Boden - Nutzpflanze festgelegt. Bodenorganismen und von ihnen gesteuerte Prozesse blieben dagegen bisher unberücksichtigt.

Grundsätzlich lassen sich für die Beurteilung, ob an einen speziellen Standort eine schädliche Bodenveränderung vorliegt oder bei Verwertung von Bodenmaterialien (ausgehobene, abgeschobene oder behandelte Substrate) zu erwarten ist, zwei Strategien verfolgen. Es kann eine Einzelstoffbewertung (Prüf-, Maßnahmenwerte) oder anhand geeigneter Testverfahren das toxische Potential aller in einem Boden/Bodenmaterial vorhandenen Schadstoffe einschließlich der nicht in der Kontrollanalytik erfassten überprüft werden. Die DECHEMA Ad-hoc-Arbeitsgruppe "Methoden zur toxikologischen/ökotoxikologischen Bewertung von Böden" hat in ihrer Broschüre "Biologische Testmethoden von Böden" [14] erste Vorschläge für die umfassende Bewertung von Böden/Bodenmaterialien vorgelegt. Dabei wurde vorwiegend auf bereits bei der Chemikalienprüfung verwendete Verfahren zurückgegriffen. Ein wesentlicher Nachteil dieser Tests besteht darin, dass für die Bewertung der Ergebnisse keine echten Kontrollen zur Verfügung stehen. Im Forschungsverbund 4 Ökotoxikologische Testbatterien wurden für die natürlichen Bodenfunktionen in Abhängigkeit von der geplanten Nutzung der Böden/Bodenmaterialien Testverfahren weiter- bzw. neu entwickelt und ihre Praxiseignung überprüft. Außerdem befasste sich ein Teilprojekt mit der Gewinnung von Bodeneluat und ein weiteres mit der Probenlagerung. Erste Ergebnisse des Forschungsverbundes sind bereits Gegenstand der internationalen Normung im ISO TC 190 "Soil Quality".

1 Zielsetzung und Zusammenfassung

Ziel dieses Forschungsverbundes war die Erarbeitung einer Handlungsanleitung für Behörden und Sanierungsunternehmen zur ökotoxikologischen Prüfung von Böden und Bodenmaterialien und zur Erfolgskontrolle von Sanierungen.

Im Forschungsverbund 4 "Ökotoxikologische Testbatterien" wurden aquatische, genotoxikologische, mikrobiologische, bodenzoologische und botanische Testmethoden auf ihre Eignung, bioverfügbare (Rest-)Kontaminationen anzuzeigen, untersucht und zu "Testbatterien" zusammengestellt. Abb. 1 zeigt die Struktur des Verbundes. Folgende Arbeitspakete wurden bearbeitet:

- Ermittlung optimaler Lagerungsbedingung für Bodenrückstellproben und Entwicklung eines optimalen Bodenextraktionsverfahrens zur Bewertung des ökotoxikologischen Potentials für Böden.
- Modifizierung und Praxiserprobung bestehender und Prüfung neuentwickelter biologischer Testmethoden für die Bewertung MKW-, PAK- und TNT-kontaminierter und sanierter Böden (Tab. 1) und Bewertung von Biotestergebnissen bei Fehlen unbelasteter Kontrollen.

- Zusammenstellung von Testbatterien zur Erfolgskontrolle bei der Sanierung von Altlasten bzw. der Bewertung kontaminierter Standorte und Mitarbeit am Leitfaden zur ökotoxikologischen Prüfung von Böden und Bodenmaterialien zur Erfolgskontrolle bei Sanierungen für Behörden und Sanierungsfirmen.

Alle Untersuchungen wurden an realen Altlasten/Bodensanierungen mit den Hauptkontaminanten MKW, PAK oder TNT durchgeführt. Im Folgenden sind die Ergebnisse des Verbundes "Ökotoxikologische Testbatterien" zusammengefaßt:

1. Lagerung: Jede Lagerung von Bodenproben führt zu Veränderungen im Schadstoffgehalt mit dementsprechenden Änderungen der Testergebnisse. Lagerungsbedingungen und Probengeschichte müssen exakt und nachvollziehbar dokumentiert werden, um diese Einflüsse für die Dateninterpretation berücksichtigen zu können.
2. Eluate: Die Ergebnisse der Eluattests werden im Wesentlichen von der Löslichkeit und Bioverfügbarkeit der Schadstoffe bestimmt. Nur die sorgfältige Herstellung geeigneter Bodenextrakte garantiert aussagekräftige Ergebnisse. Ein Boden-Wasser-Verhältnis von 1:2 hat sich bewährt. Das Extraktionsverfahren wird bereits im ISO TC190 genormt.
3. Aquatische Ökotoxizitätstests/Genotoxizitätstests: Besonders empfindlich reagieren Leuchtbakterientest (Lumineszenz) und Algentest. Der ToxiChromo-Pad-Test ist nur bei Verwendung von Bodensuspensionen geeignet. Der Ames-Test ist prinzipiell empfindlicher als der umu-Test. Hohe DOM-Gehalte bzw. hohe Nährstoffgehalte im Eluat können zu falschen Interpretationen der Befunde im Algentest und Leuchtbakterientest führen. Ergänzend zum Lumineszenztest sollte dann der Leuchtbakterienwachstumshemmtest durchgeführt werden.
4. Mikrobiologische Tests: Bodenatmung (Atmungskurven) und pot. Nitrifikation haben sich bewährt für die Beurteilung von Oberböden. Die neuentwickelten Reporterbakterien sind empfindlich gegenüber PAK und TNT.
5. Pflanzentests: Kresse und Rübe reagieren sehr empfindlich.
6. Bodenfauna: Reproduktionstests mit Bodeninvertebraten und Regenwurm sind empfindlicher als Akutttests. Der Enchytraeentest ist besonders pH-empfindlich. Der neuentwickelte Protozoen-Test reagiert empfindlich auf alle hier untersuchten Schadstoffbelastungen.

"Terrestrische" Tests werden von den physikalischen und chemischen Eigenschaften der Böden beeinflusst. Sie sind jedoch in weiten Bereichen abiotischer Bodeneigenschaften einsetzbar. Wenn die Eigenschaften eines Testmaterials erheblich von natürlicherweise vorkommenden Bodeneigenschaften abweichen (extreme pH-Werte, hohe Nährstoff- und/oder Salzgehalte), muß sorgfältig die sinnvolle Anwendung von Testverfahren geplant werden. Mischungen des kontaminierten Materials mit unbelastetem Boden bekannter Qualität ermöglichen es, den Einfluß abiotischer Bodeneigenschaften im Pflanzenwachstumshemmtest und der pot. Nitrifikation zu kalkulieren. Für Böden aus Kompostsanierungsverfahren wird eine Erfolgskontrolle nach einer Nachreife des Materials empfohlen.

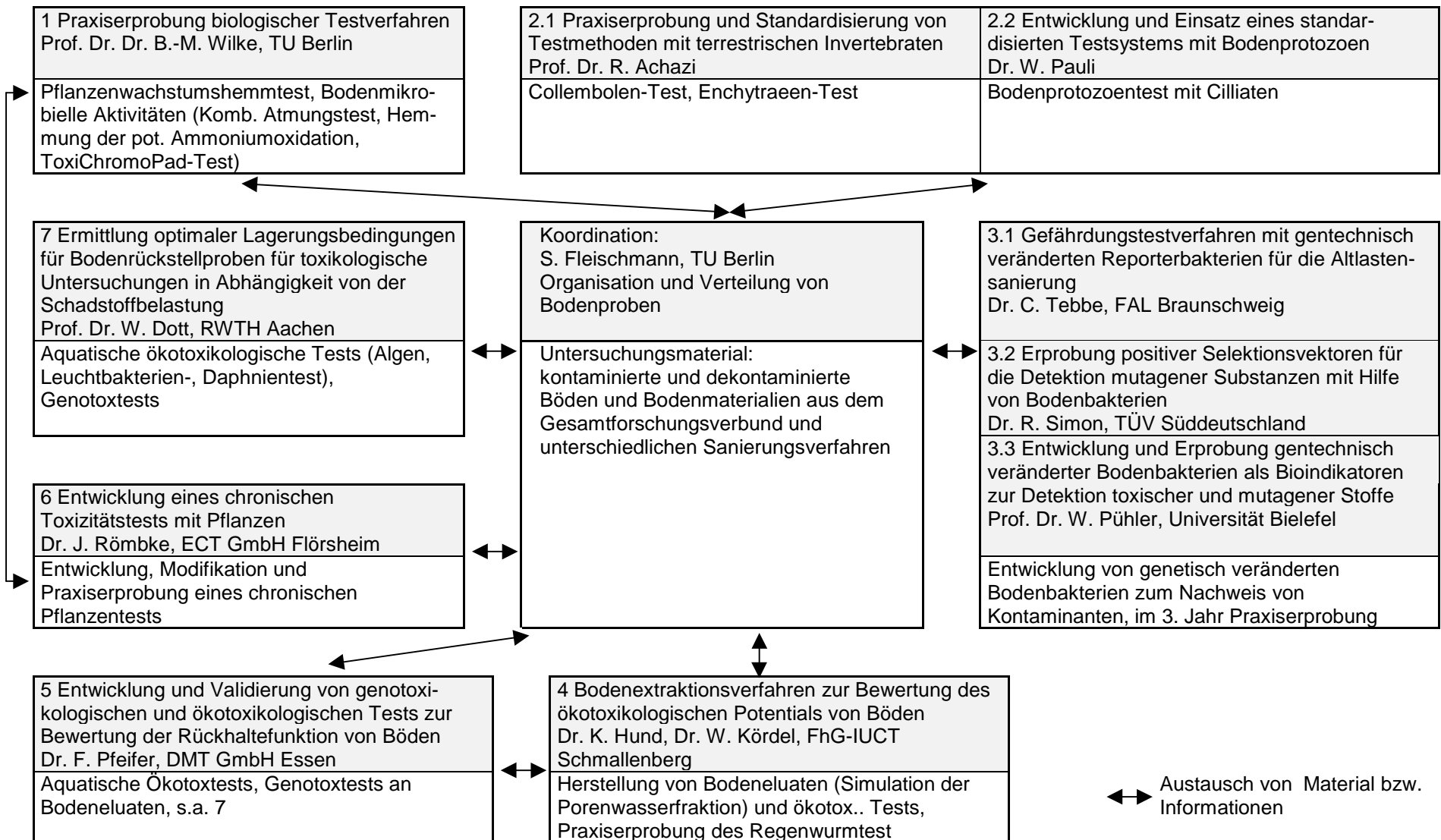


Abb. 1: Struktur des Verbundes "Ökotoxikologische Testbatterien"

Tab. 1: Ausgewählte Testverfahren für ökotoxikologische Testbatterien

	Testsystem	Testorganismus	Standardisierung	TV
Rückhaltefunktion - Tests mit Bodeneluaten				
"Aquatische Tests"	Algen-Zellvermehrungshemmtest	<i>Scenedesmus subspicatus</i>	DIN 38412-33	4.5 4.7
	Daphnien-Kurzzeittest	<i>Daphnia magna</i>	DIN 38412-30	4.5 4.7
	Leuchtbakterientest (Lumineszenz)	<i>Vibrio fischeri</i>	DIN EN ISO 11348	4.5 4.7
	Leuchtbakterien-Zellvermehrungshemmtest	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	DIN 38412-37	4.5 4.7
	ToxiChromoPad-Test	<i>Escherichia coli</i>	[15]	4.1
Genotoxikologische Tests	AMES-Test	<i>Salmonella typhimurium</i> TA 98 u. TA 100	DIN Entwurf 38415-4 (Stand 1/1998)	4.5 4.7
	umu-Test	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535/pSK1002	DIN 38415-3	4.5 4.7
	SOS-Test	<i>Escherichia coli</i> PQ37	in Anlehnung an das Protokoll des umu-Tests (DIN 38415-3)	4.5 4.7
	NM2009-Test	<i>Salmonella typhimurium</i> TA1535/pSK1002/pNM12		
Lebensraumfunktion - Tests mit Boden				
Pflanzen	akuter Pflanzenwachstumshemmtest	<i>Avena sativa, Brassica rapa, Lepidum sativum</i>	ISO 11269-2 (mod.), 1995	4.1
	chronischer Pflanzenwachstumshemmtest*	<i>Avena sativa, Brassica rapa</i>	ISO/TC 190/SC 4/WG 3 N 58 (Entwurf), 2000	4.6
Mikroorganismen	Bodenatmungskurven	Bodenmikroflora	ISO-Entwurf	4.1 4.7
	pot. Nitrifikation	ammoniumoxid. Bakterien	ISO/CD 15685 (Entwurf), 1999	4.1
	Reporterbakterien*	gentechnisch veränderte Bakterien		4.3
	ToxiChromoPad-Test	<i>Escherichia coli</i>	[15]	4.1
Bodeninvertebraten	Collembolentest	<i>Folsomia candida</i>	DIN ISO 11267 (mod.)	4.2
	Enchytraeentest	<i>Enchytraeus crypticus</i>	ISO WD 16387 (mod.)	4.2
	Regenwurmtest	<i>Eisenia fetida</i>	DIN ISO 11268-1+2, 1997	4.4
	Test mit Bodenprotozoen*			4.2

*Tests in Entwicklung, DIN/ISO siehe entsprechende Kapitel 9.4.1 – 9.4.7
 TV: Teilvorhaben

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

Erprobte und validierte biologische Testsysteme für die Erfolgskontrolle von Bodensanierungen sowie die Bewertung kontaminierter Böden sind bislang nicht verfügbar gewesen. Dies gilt mit Einschränkungen auch für die von [10] entwickelten biologischen Testsysteme. Von der DECHEMA-ad-hoc-Arbeitsgruppe "Validierung biologischer Testmethoden für Böden" (Leitung Prof. W. Dott, Frau Dr. K. Hund), an der der Leiter der ausführende Stelle des Projektleiters (Prof. Wilke) auch beteiligt war, wurden Testmethoden zur biologisch/ökotoxikologischen Bewertung von Böden vorgeschlagen [14]. Fast alle Verfahren wurden für die Chemikalienprüfung bzw. die Untersuchung von Wasser und Abwasser und nicht für die ökotoxikologische Bewertung von Bodenmaterialien bzw. kontaminierten Böden entwickelt. Ihre Verwendbarkeit bei der Bodenbegutachtung bedurfte deshalb einer eingehenden Prüfung. Besonders problematisch erweist sich die Bewertung von Untersuchungsergebnissen für Testverfahren, bei denen eine unkontaminierte Kontrolle mitgeführt werden muß. Zu diesen Verfahren zählen alle bodenmikrobiologischen und bodenzoologischen Testverfahren. Hier bestand erheblicher Forschungs- und Entwicklungsbedarf.

3 Angewandte Methoden

Tab. 2 faßt die Methoden zur Bodencharakterisierung zusammen:

Tab. 2: Methoden zur physikalisch-chemischen Charakterisierung der Testböden

Parameter	Methode
Allgemeine Vorgaben zur Probennahme	DIN ISO 11464 Bodenbeschaffenheit-Probenvorbehandlung für physikalisch-chemische Untersuchungen [9] DIN ISO 10381-6 Bodenbeschaffenheit-Probennahme-Teil 6: Anleitung zur Entnahme, Behandlung und Lagerung von Boden für die Bestimmung aerober mikrobieller Prozesse unter Laboratoriumsbedingungen [4] ISO/TC 190/SC 7 WG 3 Guidance paper (ecotoxicological tests for soil assessment) [11]
pH _(CaCl₂)	DIN ISO 10390 Bodenbeschaffenheit-Bestimmung des pH-Werts [5]
C _{org}	Bestimmung des C-Gehaltes durch nasse Veraschung. [16]
Leitfähigkeit/ Salzgehalt	DIN ISO 11265 Bodenbeschaffenheit-Bestimmung der spez. elektrischen Leitfähigkeit [7]
WHK _{max}	ISO 14238 Annex A Bestimmung der WHK [12]
P _{CAL} , K _{CAL}	Phosphor und Kalium im CAL-Auszug. [17]
N _{min}	DIN 38405 / Teil9 /4 Bestimmung des mobilen NO ₃ (N _{min}) [2]
N _{tot}	DIN ISO 11261 Bodenbeschaffenheit-Bestimmung von Gesamt-Stickstoff-Modifiziertes Kjeldahl-Verfahren Ersatz für DIN 19684-4 [6]

Tab 2: (Fortsetzung)

Parameter	Methode
Textur	DIN 19683-2 und 3 Bodenuntersuchungsverfahren im Landwirtschaftlichen Wasserbau- Bestimmung der Korngrößenzusammensetzung nach Vorbehandlung mit Natriumpyrophosphat bzw. nach Vorbehandlung mit Wasser [1]
Schwermetalle	DIN ISO 11466 Extraktion in Königswasser löslicher Spurenelemente [8]
PAK/PCB	Organische Analytik VDLUFA [18]
2,4,6-TNT	Fremdlabor
MKW	Fremdlabor, DIN 38409/18 [3], ISO/TR 11046 [13]

4 Ergebnisse und Diskussion

An dieser Stelle werden Ergebnisse der zentralen Bodenvorbereitung und -charakterisierung präsentiert. Einzelheiten zu den Projekten sind den entsprechenden Kapiteln 9.3.1 ff. zu entnehmen.

Im Rahmen der Probenorganisation wurden MKW, PAK und TNT-kontaminierte Böden/Bodenmaterialien vorbereitet, chemisch-physikalisch charakterisiert und den Projekten zur Verfügung gestellt (Tab. 3). Nur so konnte sichergestellt werden, daß alle Tests zeitgleich an vergleichbarem Probenmaterial stattfanden. In einem verbundinternen Ringversuch wurde die Vergleichbarkeit des verteilten Probenmaterials verifiziert.

Tab. 3: Böden/Bodenmaterialien

Herkunft/Altlast	Bezeichnung	Sanierungsmethode
MKW		
ehem. Tankstellengelände in Osnabrück	OMKW0 <i>schwach belast. Kontr.</i> OMKW 1	dynamisches Mietenverfahren
ehem. Raffineriegelände in Bremen	BMKW0 <i>schwach belast. Kontrolle</i> BMKW1	dynamisches Mietenverfahren
PAK		
ehemalige Zeche im Ruhrgebiet, übergeben durch DMT GmbH Essen	EPAK1 <i>unbel. Kontrolle</i> EPAK2 EPAK3	Suspensionsreaktor
ehemalige Kokerei, übergeben durch DMT GmbH Essen	EPAK4	Suspensionsreaktor

Tab. 3: (Fortsetzung)

Herkunft/Altlast	Bezeichnung		Sanierungsmethode
PAK (Fortsetzung)			
Bodenwaschanlage	CWPAK1 CWPAK2 CWPAK1a CWPAK1b CWPAK1c	Ausgangsmaterial Sandfraktion Feinkorn	Bodenwäsche
Verbund 2 "Kontrollierte Humifizierung von PAK"	SPAK1		Kontrollierte Humifizierung (Kompostierung)
TNT			
Standort "Werk Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld	CTNT0 CTNT1	<i>unbel. Kontrolle</i>	dynamisches Regenerationsmietenverfahren mit anaerob/aerob Wechsel
Verbund 6 "Maßstabsgerechte Erprobung biologischer Verfahren mit Erfolgskontrolle"	CTNT04 CTNT4	<i>unbel. Kontrolle</i>	
Bodenwaschanlage	LTNT1 LTNT1a LTNT1b LTNT1c	Ausgangsmaterial Sandfraktion Feinkorn	Bodenwäsche
Kontrollboden			
LUFA Speyer	LUFA 2.2	Ackerboden	
Zusätzliche Kontrollböden			
ehemalige Zeche im Ruhrgebiet, Übergabe DMT GmbH	EPAK1b	unbelasteter Boden	Suspensionsreaktor, Einfluß des Sanierungsverfahrens auf Bodenqualität
"Werk Tanne"	CTNT04b	unbelasteter Boden	Regenerationsmiete in Rottebox, Einfluß des Sanierungsverfahrens auf Bodenqualität

Aufgrund der Zeitvorgaben für TV 7 wurde für dieses Projekt zusätzlich zu den gemeinsam zu bearbeitenden Bodenproben weiteres hoch kontaminiertes Material aus Hallschlag vermittelt (Rüstungsaltlast) und schwermetallhaltige Versuchsböden aus einer Versuchsanlage in Berlin und von den Rieselfeldern Großbeeren organisiert. Für CWPAK-, LTNT-, und SPAK-Böden stand keine unbelastete Kontrolle zur Verfügung.

Die chemisch-physikalischen Parameter der untersuchten Böden und Bodenmaterialien sind in Tab. 4 zusammengefaßt:

Tab. 4: Chemisch-physikalische Eigenschaften der Böden und Bodenmaterialien

Boden ¹	pH	C _{org}	WHK _{max}	K _{CAL}	P _{CAL}	N _{min}	N _{tot}	Bodenart [%]		
	(CaCl ₂)	[%]	[%]	[mg /100 g]				T	U	S
BMKW 0	7,1	0,4	21	1,1	0,9	0,1	14	2	3	95
BMKW1a	7,2	1,6	23	4,6	4,9	0,2	41,4	6	1	94
OMKW 0	6,9	1,2	38	9,7	2,3	0,28	119	22	49	29
OMKW1a	6,7	0,9	28	9,5	1,0	0,38	70	6	37	57
OMKW1b	6,7	1,1	17	5,0	0,6	1,68	74	15	32	53
EPAK1a ²	7,6	0,4	19	27	1,1	0,11	18	10	84	6,2
EPAK1b ²	7,7	0,4	25	30	1,0	0,11	13	6	69	2,7
EPAK4a	7,8	0,8	32	43	0,7	0,1	39	13	35	52
EPAK4b	7,2	0,8	62	30	0,9	0,67	28	26	34	40
SPAK1a	6,3	0,76	13	110	4,5	0,49	28	7	17	76
SPAK 1b	5,8	5,4	41,5	316	31	12	449	12	19	69
CWPAK1a	7,7	1,7	22	5,5	3,6	0,31	42	3,7	4,4	92
CWPAK1b	8,9	0,2	23	15	3,7	0,99	6,0	4	1	95
CWPAK1c	7,8	4,3	36	85	2,9	6,7	157	22	60	18
CWPAK2a	7,5	2,5	22	5,4	3,5	0,35	54	5	3	92
CTNT0	3,3	5,3	90	6,0	0,7	1,6	458	28	61	11
CTNT04a	4,1	6,3	99	3,5	0,36	4,1	341	23	58	19
CTNT04b	7,6	9,4	104	750	221	83	925	25	46	29
CTNT1	4,5	2,9	47	9,0	1,8	3,0	230	18	55	27
CTNT4a	6,7	5,6	54	12	1,2	6,8	321	16	45	39
CTNT4b	8,0	7,7	90	483	161	4,9	787	24	32	44
LTNT1a	7,4	1,2	22	8,0	2,3	1,2	66	1	3	96
LTNT1b	7,4	0,1	19	1,4	0,84	0,3	1,1	0,5	1,5	98
LTNT1c	7,8	18	182	21	5,4	3,8	660	13	58	29
LUFA 2.2	5,6	2,5	45	19	0,9	0,13	206	7	16	77

¹ a: vor Sanierung, b: nach Sanierung

² EPAK1a/b, EPAK2a/b, EPAK3a/b sind in ihren chem.-phys. Eigenschaften vergleichbar

Alle schwach bzw. nicht kontaminierten Kontrollböden von Altlastenstandorten unterschieden sich in ihren Eigenschaften von den kontaminierten Böden.

LUFA2.2 wurde deshalb für alle Testverfahren als Referenzboden verwendet. Tab. 5 faßt die Gehalte ausgewählter Schadstoffe zusammen.

Tab. 5: Schadstoffe in den untersuchten Böden und Bodenmaterialien

Boden (-material)	Schwermetalle [mg/kg]						Organ. Schadstoffe [mg/kg]				
	Blei	Cadmium	Chrom	Kupfer	Nickel	Zink	EPA-PAK	TVO-PAK	PCB	2,4,6-TNT	MKW (DIN 38409/18)
BMKW 0	6,0	0,7	2,4	3,8	3,8	81	0,21	0,12	<0,01	n.b.	468
BMKW1a	41	0,5	20	43	11	159	4,4	0,55	0,013	n.b.	5445
OMKW0	228	<0,2	n.b.	56	20	168	2,1	1,1	0,008	n.b.	n. n.
OMKW1a	211	<0,2	n.b.	27	16	152	2,9	1,7	0,003	n.b.	1420
OMKW1b	108	<0,2	n.b.	34	35	45	1,8	0,9	<0,01	n.b.	353
EPAK 1a	23	<0,01	n.b.	11	n.b.	46	1,3	0,4	0,008	n.b.	n.b.
EPAK 1b	21	<0,01	n.b.	14	27	73	6,5	3,1	0,006	n.b.	n.b.
EPAK 2a	11	<0,01	n.b.	6,8	14	24	2,5	0,76	0,012	n.b.	287
EPAK 2b	14	<0,01	n.b.	6,8	13	20	2,0	0,83	0,002	n.b.	n.b.
EPAK 3a	25	<0,01	n.b.	8,8	23	83	294	180	0,03	n.b.	154
EPAK 3b	23	<0,01	n.b.	14	23	86	267	178	0,01	n.b.	n.b.
EPAK 4a	29	<0,01	n.b.	7,8	31	72	563	83	0,049	n.b.	111
EPAK 4b	30	1,2	n.b.	14	36	73	9,36	3,0	0,021	n.b.	n.b.
SPAK 1a	24	<0,2	885	4,4	7,2	44	1102	157	0,01	n.b.	218
SPAK 1b	20	<0,01	751	19	20	80	33	10	<0,01	n.b.	190
CWPAK 1a	36	7,1	17	43	40	145	152	80	0,005	n.b.	597
CWPAK 1b	26	1,7	5,6	19	17	92	24	9,5	0,006	n.b.	132
CWPAK 1c	250	4,9	200	96	74	560	371	168	0,057	n.b.	499
CWPAK2a	62	2,4	24	76	31	195	158	85	0,006	n.b.	709
CTNT 0	785	<0,2	27	31	19,6	136	1,2	0,7	0,005	0,1	n.n.
CTNT 04a	490	0,9	21	24	17	202	0,72	0,39	0,016	0,049	n.b.
CTNT 04b	431	2,3	24	49	16	375	2,7	1,7	0,007	n.n.	n.b.
CTNT 1a	254	0,8	19	102	29	875	18	7,4	0,01	1600	n.b.
CTNT 4a	1000	4,6	25	84	27	920	32	17	0,14	3100	n.b.
CTNT 4b	772	4,0	32	83	24	747	28	14	0,13	n.n.	n.b.
LTNT 1a	36	<2	22	36	3,9	75	2,7	1,0	0,32	1700	n.b.
LTNT 1b	24	<2	4,1	19	0,7	22	0,78	0,11	0,22	80	n.b.
LTNT 1c	121	<2	18	48	8,5	111	54,5	21	0,754	30	n.b.
LUFA 2.2	21	<0,01	n.b.	6,5	1,5	20	0,54	0,30	0,002	n.b.	n.b.

n.b.: nicht bestimmt; n.n. nicht nachweisbar

Zusätzlich zur PAK-Belastung wiesen die Böden EPAK2, EPAK3 und SPAK1 eine mittlere Belastung mit Mineralölkohlenwasserstoffen auf, SPAK1 ist außerdem hoch chrombelastet. Die Clausthal-Zellerfelder Böden sind harztypisch schwermetallbelastet, CTNT1 ist schwach bis mäßig PAK-belastet und wies hohe Zinkgehalte auf, CTNT0 ist hoch bleikontaminiert.

5 Ausblick

Die Untersuchungen mit "terrestrischen" Testverfahren zeigten, daß die Bewertung in Bezug zu einer Kontrolle (vom gleichen Standort) in vielen Fällen mangels geeigneter Böden nicht möglich ist. Hier müssen alternative Bewertungsstrategien (weiter-)entwickelt werden. Dies kann zum einen durch die Festlegung allgemeingültiger Kriterien für die Auswahl unabhängiger Referenzböden als Bezugsgröße geschehen, zum anderen durch die Bestimmung der charakteristischen ökotoxikologischen Kennwerte natürlicher unkontaminierter Böden im Sinne von Hintergrundwerten.

Weiterhin ist die Untersuchung von mäßig belasteten Böden/Bodenmaterialien sinnvoll, um hier Entscheidungshilfen für und wider der Notwendigkeit einer Bodensanierung zu entwickeln.

6 Formeln und Abkürzungen

MKW:	Mineralölkohlenwasserstoffe
PAK:	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
TNT:	2,4,6-Trinitrotoluol
WHK:	Wasserhaltekapazität
Bodenbezeichnungen:	enthalten Schadstoffkürzel MKW, PAK bzw. TNT gemäß Hauptkontamination, Kleinbuchstabe a kennzeichnet Ausgangsmaterial, b saniertes Material, c Reststoff aus der Bodenwäsche, Großbuchstaben bezeichnen Herkunftsort (gleiche Buchstaben = gleiche Herkunft)

7 Eigene Veröffentlichungen und Diplomarbeiten

Fleischmann, S.; B.-M. Wilke. 1998. Ökotoxikologische Testbatterien. TerraTech 4: 56-59.

Fleischmann, S., B.-M. Wilke. 1997. Test batteries for the Assessment of the Ecotoxicological Potential of Soils and Soil Materials. In J. Gottlieb, H. Hötzl, K. Huck, R. Niessner (ed.), Field Screening Europe. Proceedings of the First International Conference on Strategies and Techniques for the Investigation and Monitoring of Contaminated sites. S. 197-198. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Boston, London.

Fleischmann, S.; B.-M. Wilke. 1998. Ökotoxikologische Tests zur Bodenbewertung. Poster SETAC-Deutschland "Ökosystemare Ansätze in der Ökotoxikologie", Zittau 1998

Fleischmann, S. 1999. Ecotoxicological Test Strategies for the Assessment of the Toxic Potential of Soils and Soil Materials. Lecture hold on the 9th Annual Meeting of SETAC-Europe Leipzig 1999

Wilke B.-M., B. Winkel, S. Fleischmann, P. Gong. 1998. Higher Plant growth and microbial toxicity tests for the evaluation of ecotoxic potential of soils. *In* Contaminated soil '98 (Proceedings of the sixth International FZK/TNO Conference). S. 345 – 354. Thomas Telford. London.

Wilke B.-M., P. Gong, J. Papassotiriou, E. Strozzi, M. Fuchs, S. Fleischmann. 1998. Bioassays for soils: Evaluation of higher plant growth and microbial toxicity tests. *In* Zhihong Cao (ed.) Proceedings of the International Symposium on Soil, Human and Environment Interactions, May 4-11, Nanjing, China. China Science and Technology Press. Beijing.

Wilke, B.-M. 1997. Ökotoxikologische Testbatterien für Böden - Stand des BMBF-Vorhabens. *In* S. Heiden, W. Dott (ed.), Initiativen zum Umweltschutz 7. Miniaturisierte und automatisierte Testverfahren zur human- und ökotoxikologischen Bewertung von Schadstoffen in Umweltproben. S. 127-146. Zeller Verlag Osnabrück.

8 Literaturverzeichnis

Testverfahren siehe Kapitel 9.4.1 – 9.4.7

1. **DIN 19683-2 und 3.** 1997/1998. Bodenuntersuchungsverfahren im Landwirtschaftlichen Wasserbau- Bestimmung der Korngrößenzusammensetzung nach Vorbehandlung mit Natriumpyrophosphat bzw. nach Vorbehandlung mit Wasser
2. **DIN 38405/ Teil9 /4** Bestimmung des mobilen NO₃ (N_{min})
3. **DIN 38409/18.** 1981. Bestimmung von Kohlenwasserstoffen.
4. **DIN ISO 10381-6.** 1998. Bodenbeschaffenheit-Probennahme-Teil 6: Anleitung zur Entnahme, Behandlung und Lagerung von Boden für die Bestimmung aerober mikrobieller Prozesse unter Laboratoriumsbedingungen
5. **DIN ISO 10390.** 1997. Bodenbeschaffenheit-Bestimmung des pH-Werts
6. **DIN ISO 11261.** 1997. Bodenbeschaffenheit-Bestimmung von Gesamt-Stickstoff-Modifiziertes Kjeldahl-Verfahren Ersatz für DIN 19684-4
7. **DIN ISO 11265.** 1993 Bodenbeschaffenheit-Bestimmung der spezifischen elektrischen Leitfähigkeit
8. **DIN ISO 11466.** 1997. Extraktion in Königswasser löslicher Spurenelemente
9. **DIN ISO 11464.** 1996. Bodenbeschaffenheit-Probenvorbehandlung für physikalisch-chemische Untersuchungen

10. **HUND, K.** 1993. Entwicklung von biologischen Testsystemen zur Kennzeichnung der Bodenqualität. Abschlußbericht F+E-Vorhaben UFO-Plan-Nr. 23-10.
11. **ISO/TC 190/SC 7 WG 3** Guidance paper (ecotoxicological tests for soil assessment)
12. **ISO 14238.** 1997. Soil quality – Biological methods – Determination of nitrogen mineralization and nitrification in soils and the influence of chemicals on these processes. **Annex A** Method for measurement of the water-holding capacity of soil.
13. **ISO/ TR 11046.** 1994. Soil quality - Determination of mineral oil content - Methods by infrared spectrometry and gas chromatographic method
14. **Kreysa, G. und J. Wiesner** (eds.). 1995. Bioassays for soils. DECHEMA (Deutsche Gesellschaft für Chemisches Apparatewesen, Chemische Technik und Biotechnologie e.V.), Frankfurt. 45 pp.
15. **Kwan, K.K.** 1991. Qualitative Direct sediment toxicity testing procedure (DSTTP). NWRI Contribution No. 91-90.
16. **Schlichting, E., H.-P. Blume, K. Stahr.** 1995. Bestimmung des C-Gehaltes durch nasse Veraschung. Bodenkundliches Praktikum. 2. Auflage. Parey Studentexte 81. Blackwell Wissenschaft-Verlag Berlin, Wien, 295 S.
17. **Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).** 1991. Phosphor und Kalium im CAL-Auszug. Methodenbuch, Band I. Die Untersuchung von Böden. 4. Auflage. VDLUFA-Verlag Darmstadt.
18. **Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten (VDLUFA).** 1996. Methodenbuch, Band VII Umweltanalytik, VDLUFA-Verlag Darmstadt

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.3 Verbundvorhaben 4: Ökotoxikologische Testbatterien

9.3.1 Praxiserprobung biologischer Testverfahren (TV 4.1)

Prof. Dr. Dr. Bernd-Michael Wilke¹

Birgit Winkel²

Technische Universität Berlin
Institut für Landschaftsentwicklung

¹Albrecht-Thaer-Weg 4

²Lentzeallee 76

14195 Berlin

Förderkennzeichen: 1491031

Laufzeit: 01.05.1996 – 31.07.1999

1 Zusammenfassung

Das Teilvorhaben "Praxiserprobung biologischer Testverfahren" untersucht die Einsetzbarkeit biologischer Testmethoden zur Beurteilung des ökotoxischen Potentials von Böden und Bodenmaterialien (definiert in der BBodSchV §2Nr.1 [1]) auf Bodenmikroorganismen und Pflanzen.

Die Nutzung des Bodens als Pflanzenstandort wird mit Hilfe des Pflanzenwachstumshemmtests nach ISO 11269-2 [3] für die Pflanzen Hafer (*Avena sativa*), Kresse (*Lepidium sativum*) und Stoppelrübe (*Brassica rapa*) beurteilt. Mikrobiologische Tests (potentielle Ammoniumoxidation nach ISO/CD 15685 [4] und die Aufnahme von Bodenatmungskurven nach Palmborg und Nordgren [8]) bewerten die Lebensraumfunktion des Bodens.

Als Schnelltest wird zusätzlich der ToxiChromoPad-Tests nach Kwan [6] eingesetzt. Dieser nimmt eine gesonderte Stellung ein, da er die Toxizität des Bodens auf das Enzym β -Galaktosidase erfaßt.

Bodenatmungskurven zeigen schädliche Wirkungen organikabelasteter Böden an. Sowohl der respiratorische Aktivierungsquotient (Q_R) als auch die Lag-Phase und der Zeitpunkt des Auftretens des Peakmaximums werden durch die Kontaminationen beeinflusst. Dabei stellte sich der Q_R als sensitivstes Kriterium zur Bewertung von kontaminierten Böden heraus. Inerte Böden (hier definiert als Böden mit einem organischen Kohlenstoffgehalt $< 1\%$) konnten mit Hilfe der Bodenatmungskurven nicht bewertet werden. Ihr Einsatz als Lebensraum Bodenbiozönose wäre ohnehin fragwürdig, da es sich zumeist um Unterböden handelt.

Im Pflanzentest zeigte sich, daß schon die Erträge auf den schlechtesten unbelasteten Böden um das zehnfache geringer als auf den besten waren. Einige unkontaminierte Böden zeigten keine nitrifizierende Aktivität. Die Ergebnisse dieser Tests waren demnach von den abiotischen Eigenschaften der Böden und Bodenmaterialien abhängig und ließen keinen Rückschluß auf die Kontamination zu. Es wurde überprüft, ob der Einfluß der Eigenschaften der Testböden auf das Testergebnis, durch das Verschneiden mit einem Kontrollboden bekannt guter Qualität (hier LUFA 2.2) verringert werden kann.

Die Aussagefähigkeit des Pflanzenwachstumshemmtests und des Tests auf potentielle Ammoniumoxidation konnte durch die Mischung mit LUFA-Böden verbessert werden. Die Mischungsversuche können den Einfluß der abiotischen Bodeneigenschaften auf das Testergebnis minimieren. Daher ist es nicht notwendig einen Kontrollboden mit den gleichen physikalisch-chemischen Eigenschaften wie der Testboden einzusetzen.

Der ToxiChromoPad-Test erscheint als Schnelltest für eine qualitative Aussage über einen kontaminierten Boden sinnvoll. Da zum Teil große Schwankungen innerhalb der Parallelen auftreten, kann er die anderen Tests nicht ersetzen.

2 Kenntnisstand zu Beginn des Projekts

Die hier angewandten Methoden wurden bis zu Beginn des Projekts zur Chemikalienprüfung eingesetzt. Die Anwendbarkeit auf die Beurteilung kontaminierter Böden und Bodenmaterialien sollte überprüft werden. Insbesondere das häufige Fehlen eines geeigneten Kontrollbodens mit den gleichen physikalisch-chemischen Eigenschaften wie der zu

beurteilende Boden bzw. das Bodenmaterial und die Bewertung schadstoffbelasteter "inertere" Böden (Böden mit einem organischen Kohlenstoffgehalt < 1%, zumeist Unterböden) erforderte weitere Anpassungen der Verfahren.

3 Material und Methoden

3.1 Böden

Es wurden mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK), Mineralöl (MKW) und mit 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) kontaminierte Böden von Altlasten vor und nach Sanierung getestet. Zur Kontrolle wurde bei allen Versuchen ein Standardboden der LUFA Speyer (LUFA 2.2) mitgeführt. Vorversuche wurden mit unterschiedlichen belasteten und unbelasteten Böden durchgeführt, um eine möglichst allgemeingültige Aussage über das Verhalten der Biotests treffen zu können. Dadurch soll die Möglichkeit geschaffen werden kontaminierte von unkontaminierten Böden zu trennen. Tabelle 1 enthält die Spannweiten der chemisch-physikalischen Eigenschaften der Böden. Dabei werden nicht nur belastete von unbelasteten Böden, sondern - ausgehend von der Annahme, daß Böden mit einem geringen organischen Kohlenstoffgehalt (C_{org}) biologisch nur wenig aktiv sind - auch inerte also inaktive ($C_{org} < 1\%$) von anderen Böden unterschieden.

Tab.1: Abiotische Eigenschaften der Böden

Böden	pH (CaCl ₂)	C _{org} [%]	K _{CAL}	P _{CAL}	N _{tot}	Bodenart[%]		
						[mg/100g]		
unkontaminierte Böden (n=14)	4,5 - 7,6	1,1 - 8,5	2 - 82	0,15 - 28	54 - 28,4	3 - 54	8 - 78	2 - 83
unkontaminierte inerte Böden (n=9)	3,4 - 8,0	0,04 - 0,9	0,7 - 39	0 - 8,5	3 - 88	0,4 - 49	2 - 66	4 - 98
Organika belastete Böden (n=27)	4,5 - 7,8	1,2 - 5,6	4,6 - 86	0,2 - 8,4	30 - 321	1 - 22	1 - 82	9 - 97
belastete inerte Böden (n= 9)	6,3 - 7,8	0,1 - 0,9	1,1 - 110	0,7 - 4,5	14 - 70	2 - 26	3 - 37	40 - 95

n: Anzahl der getesteten Böden; C_{org}: organischer Kohlenstoffanteil; K_{CAL}: pflanzenverfügbares Kalium; P_{CAL}: pflanzenverfügbare Phosphor, N_{tot}: Gesamtstickstoffgehalt

Insbesondere bei der Auswahl der unbelasteten Proben wurde Wert auf eine große Variabilität der Bodeneigenschaften, wie Textur und organischer Kohlenstoffgehalt gelegt. Dadurch sollte eine allgemeingültige Aussage über das Verhalten der Biotests auf nicht kontaminierte Böden möglich werden.

Tab.2a: Schadstoffgehalte an Schwermetallen der Versuchsböden

Böden	Schwermetalle [mg/kg TS]					
	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Unkontaminierte Böden (n=14)	<0,1 - 0,8	<0,1 - 23	<1 - 98	<1 - 106	<1 - 162	<1 - 264
Unkontaminierte inerte Böden (n=9)	<0,2 - 0,4	<1	<0,6 - 22	<1 - 68	<10 - 166	<7,8 - 182
Organika belastete Böden (n=27)	<0,1 - 3,8	<0,1 - 200	<1 - 98	<1 - 40	<1 - 1000	<1 - 920
belastete inerte Böden (n= 9)	<0,1 - 0,7	<0,1 - 885	<1 - 20	<1 - 31	<1 - 211	<1 - 152

n: Anzahl der getesteten Böden; n.n.:

Tab.2b: Gehalte an organischen Schadstoffen der Versuchsböden

Böden	organische Schadstoffe [mg/kg TS]			
	$\Sigma_{16}\text{PAK}$	ΣPCB	MKW	TNT
Unkontaminierte Böden (n=14)	0,047 – 0,7	<0,001 – 0,0016	n.b.	n.b.
Unkontaminierte inerte Böden (n=9)	<0,01 – 0,08	n.n.	n.b.	n.b.
Organika belastete Böden (n=27)	2,92 – 2200	<0,001 – 0,05	n.n. – 43.000	n.n. – 3100
belastete inerte Böden (n= 9)	2,08 – 1102	<0,001 – 0,32	n.n. – 1420	n.n – 80

nicht nachweisbar; n.b.: nicht bestimmt;

In Tabelle 2a/b sind die Schadstoffgehalte der Testböden zusammengefaßt. Auch Böden mit Zink- und Bleigehalten von bis zu 200 mg/kg wurden als unkontaminiert eingestuft, da diese Konzentrationen sich erfahrungsgemäß nicht auf die ökotoxikologische Bewertung auswirken. Die Belastung der kontaminierten Böden mit organischen Schadstoffen ist zum Teil sehr hoch, sie enthielten bis zu 2 g PAK oder TNT und 40 g MKW/kg Boden.

Da häufig kein geeigneter Kontrollboden mit identischen abiotischen Eigenschaften wie der kontaminierte vorhanden ist, fehlte damit die Bezugsgröße für die Bewertung der Tests. Daher wurde überprüft, ob die Kontrolle für die Bewertung von Bodenmaterialien durch das Verschneiden des Testbodens mit unbelastetem Boden ersetzt werden kann. Dabei wäre dann der Kontrollboden, in diesem Fall LUFA 2.2, die Bezugsgröße. Zunächst wurde dazu der Einfluß des Verschneidens auf die Nitrifikation und den Pflanzenwachstumshemmtest unbelasteter Böden getestet. Die Eigenschaften der dazu verwendeten Böden sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tab. 3: Physikalisch-chemischen Eigenschaften der unbelasteten Böden aus den Mischungsversuchen

Boden-bez.	Bodenart	C _{org} [%]	P _{CAL} [mg/kg]	N _{tot} [g/kg]	pH-Wert (CaCl ₂)	El.Leitfähigkeit [μs/cm]
1	Sl2	2,6	43	1,7	5,3	92
3	Ss	1,4	<10	1,4	5,3	148
4	Ss	2,0	69	2,0	7,2	158
5	Ss	0,4	50	0,5	6,7	13
6	Ss	<0,1	<10	0,007	4,5	19
7	Sl4	2,2	187	2,2	7,2	232
8	Ut3	1,5	201	1,8	7,2	236
9	Ut3	0,1	11	0,2	7,7	154
10	Sl2	1,2	340	1,7	6,6	128
12	Lt2/Lu	0,9	<10	1,4	6,1	88
13	Ss	<0,1	<10	n.n.	7,6	43

Ss: reiner Sand; Ut3: mittel toniger Schluff;
 Sl2: schwach lehmiger Sand; Lt2: schwach toniger Lehm;
 Sl4: stark lehmiger Sand; Lu: schluffiger Lehm
 n.n. nicht nachweisbar

Alle von der Koordination zur Verfügung gestellten Bodenproben wurden hinsichtlich ihrer Toxizität für die Testorganismen geprüft. Zusätzliche Tests wurden an den in den Tabellen 4 und 5 aufgeführten Böden vorgenommen.

Tab.4: Abiotische Eigenschaften zusätzlich bewerteter Böden

Boden-bez.	Bodenart	C _{org} [%]	P _{CAL} [mg/kg]	N _{tot} [g/kg]	pH-Wert (CaCl ₂)	El.Leitfähigkeit [μs/cm]
Eb	Ut3	1,7	105	0,2	7,2	116
Mü	Ut3	1,0	79	1,1	7,3	122
DTNT1a	Ut2	2,2	40	1,4	5,3	53

Ut3: mittel toniger Schluff Ut2: schwach toniger Schluff

Tab.5: Schadstoffe der zusätzlich bewerteten Böden

Bodenbez.	Schwermetalle [mg/kg TS]						organ. Schadstoffe [mg/kg TS]			
	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn	Σ_{16} PAK	Σ PCB	MKW	Σ NT
Eb	n.n.	22	21	14	27	60	0,82	n.n.	n.b.	n.b.
Mü	n.n.	27	17	21	12	50	0,05	0,001	n.b.	n.b.
DTNT1a	0,7	11	106	7,4	58	164	0,42	n.b.	n.b.	5
Eb200	n.n.	22	21	14	27	60	0,82	n.n.	n.b.	145
n.n.	nicht nachweisbar			n.b.			nicht bestimmt			

Bei Eb 200 handelt es sich um den mit TNT aufdotierten Boden Eb, der zur Alterung des TNT 3 Monate bei 4-6°C gelagert wurde. Die abiotischen Eigenschaften sind demnach mit denen von Eb identisch.

Die Böden LH, CZ, IL und GW wurden für die Überprüfung der Wirkung des Wassergehalts auf die Bodenatmung in kontaminierten Böden eingesetzt. Daher war es nicht notwendig, sie auf ihre Eigenschaften zu analysieren. Eine hohe Kontamination war für alle vier Böden bekannt.

Vor Versuchsansatz wurden die Böden gesiebt (< 5mm für die Pflanzentests; < 2mm für die mikrobiologischen Tests). Für die mikrobiologischen Testverfahren wurde der Wassergehalt auf 60% WHK_{max} eingestellt. Die Einstellung auf den Wassergehalt erfolgte durch allmähliches Hinzufügen von destilliertem Wasser, bzw. schonendem Trocknen des Bodens.

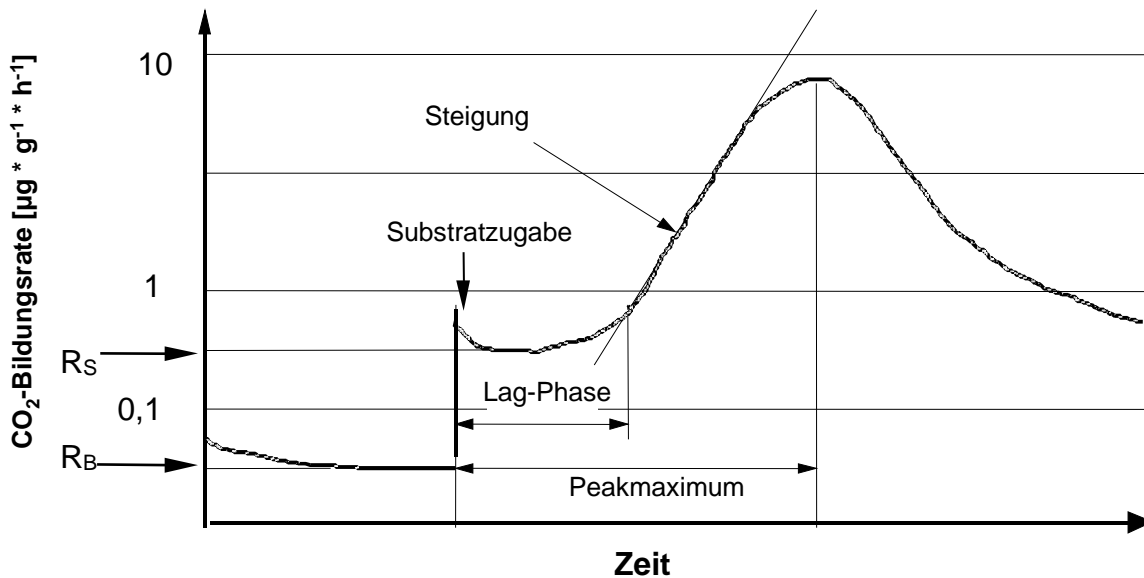
3.2 Bodenatmung

Zur Erfassung der Lebensraumfunktion Bodenmikrobiozönose wurden Bodenatmungskurven nach Palmborg und Nordgren aufgenommen. Sie sind geeignet die mikrobielle Biomasse von Böden, ihre Aktivität und Vitalität sowie die Wirkung von Chemikalien auf die Bodenmikroflora zu bestimmen [8]. Die Methode wird im ISO TC 190 SC4/WG4 N63 standardisiert [5].

Die Aufnahme der Atmungskurven erfolgte mit Hilfe einer coulometrischen Kohlendioxid-Meßeinrichtung [2]. Das Gerät mißt die durch Kohlendioxid hervorgerufene Leitfähigkeitsänderung in Kalilauge. Die Leitfähigkeitsdaten werden im angeschlossenen Meßauswertungssystem automatisch in die Kohlendioxidbildungsrate [$\mu\text{g CO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$] umgerechnet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms "Snoop-Plot".

Zum Erfassen der Basalatmung wird der Boden <2mm gesiebt, die gewünschte Feuchte eingestellt und die einem Gramm organischer Substanz äquivalente Menge Boden in die Probengefäße eingefüllt (maximal 20g). Nachdem die Atmungsrate konstant ist, werden 0,2 g des Substrats unter den Boden gemischt und zur Aufnahme der substratinduzierten Atmung die Messung erneut gestartet. Als Substrat wird ein Gemisch aus Glucose, Ammoniumsulfat und Kaliumdihydrogenphosphat verwendet [8]. 80 g Glucose (wasserfrei) werden mit 13 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 2 g KH_2PO_4 im Mörser verrieben und homogenisiert.

Abbildung 1 zeigt beispielhaft eine Atmungskurve und deren Auswertung (halblogarithmische Darstellung der Kohlendioxidproduktion pro Stunde [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$] über die Zeit).



R_B	Aktuelle oder Basalatmung
R_S	Substrat induzierte (SIR) oder potentielle Atmung
Q_R	Respiratorischer Aktivierungsquotient $=R_B / R_S$
Lag-Phase	Zeit von Substratzugabe bis zum Auftreten des exponentiellen Wachstums (bei halblogarithmischer Darstellung als Gerade zu erkennen)
Steigung	Ein Maß für die maximale Zunahme der CO_2 -Bildungsrate (maximales Wachstum der Mikroorganismenpopulation)
t_{max}	Zeitraum von Substratzugabe bis zum Auftreten des Peakmaximums

Abb. 1: Beispiel der Auswertung einer Bodenatmungskurve

Erfasst werden die Basalatmung (R_B), die substratinduzierte Atmung (R_S), der respiratorische Aktivierungsquotient (Q_R), die Lag-Phase, die maximale Wachstumsrate (Steigung) und der Zeitpunkt des Auftretens des Peakmaximums (t_{max}). Überprüft wurde, welche der Parameter für die Bewertung kontaminierter Böden einzusetzen sind.

3.3 Potentielle Ammoniumoxidation

Die potentielle Ammoniumoxidation oder Nitrifikation nach ISO/CD 15685 [4] erfasst die Nitritbildung eines Bodens bei Zugabe einer Ammoniumquelle bei optimaler Temperatur. Die Analyse auf Nitrit erfolgt am Photometer (530nm). Es handelt sich hierbei um einen sehr sensitiven Test, da die Umsetzung von Ammonium zu Nitrit im Boden im Wesentlichen durch eine einzige Bakterienspezies erfolgt. Da in vorangegangenen Versuchen deutlich wurde, daß

selbst schonendes Trocknen die potentielle Ammoniumoxidation beeinflusst, wurden die Böden wenn möglich ohne Vortrocknen durch die Siebe gedrückt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Vor Versuchsansatz wurden die Böden auf mindestens 60% WHK_{max} eingestellt und 24 h bei 20 °C im Dunkeln vorinkubiert. Da viele Böden unabhängig von ihrem Kontaminationsgrad eine geringe bis keine potentielle Ammoniumoxidation aufweisen, wurden die Testböden mit unkontaminiertem Boden bekannt guter Qualität versetzt. Das Mischen erfolgte einen Tag vor Versuchsbeginn. Es sollte überprüft werden, ob, ausgehend von der Annahme eines linearen Zusammenhangs zwischen Mischungsverhältnis und Aktivität bei unkontaminierten Böden, eine wesentlich geringere Aktivität auf eine Hemmung durch Kontamination hindeutet.

3.4 Pflanzenwachstumshemmtest

Der Pflanzenwachstumshemmtest nach ISO 11269-2 [3] erfaßt die Wirkung der Schadstoffe auf die frühe Wachstumsperiode (14-21 Tage) einschließlich der Keimung der Versuchspflanzen. Es werden jeweils 10 Samen in die mit den Testboden gefüllten Blumentöpfe ausgesät. Nachdem in der Kontrolle 5 Samen aufgegangen sind, werden sämtliche Töpfe auf 5 Keime ausgedünnt. Die Auswertung erfolgt durch Auswiegen der oberirdischen Biomasse. Es wurden Kresse (*Lepidum sativum*) und Stoppelrübe (*Brassica rapa*) als Dicotyledonen und Hafer (*Avena sativa*) als Monocotyledone eingesetzt.

Da in den Versuchen deutlich wurde, daß Hafer gegenüber TNT, PAK und MKW sehr unsensibel ist, wurde später als weitere monocotyle Pflanze Hirse (*Eleusine coracana*) getestet. Als Kontrollboden wurde der Standardboden LUFA 2.2 in allen Tests mit untersucht.

Ein wichtiger Aspekt der Verbesserung von Biotests in Bezug auf ihre Anwendbarkeit ist nicht zuletzt die Minimierung des Arbeitsaufwands. Dies gilt besonders für den sehr zeitintensiven Pflanzentest. Es wurde der Einsatz eines halbautomatischen Bewässerungssystems in Anlehnung an Stalder und Pestemer [9] mit der vorgeschriebenen Handbewässerung verglichen. Das Prinzip der automatischen Bewässerung beruht darauf, daß ein durch die Probengefäße gezogener Glasfaserdocht durch Adhäsionskräfte das Wasser aus einem Untersetzer in den Boden zieht. So müssen die Untersetzer nur alle zwei bis drei Tage neu mit Wasser gefüllt werden. Das aufwendige Auswiegen der Töpfe und Einstellen auf den vorgeschriebenen Wassergehalt entfällt dadurch. Es wurde die Biomasse (Trockengewicht) in parallelen Versuchen verglichen (Abb.2).

Die oft geringen Biomassen der Pflanzen (besonders bei Kresse und Rübe) werden durch das in ISO [3] vorgeschlagene Trocknen der Pflanzen so gering, daß Unterschiede im Ertrag oft nur als Schwankungen erscheinen. Um zu überprüfen, ob das Trocknen zusätzliche Informationen liefert, wurden Versuche zur Korrelation des Frischgewichts mit dem Trockengewicht angesetzt.

Der Ertrag der Pflanzen auf den unkontaminierten Böden variierte so stark, daß bei kontaminierten Böden kein Rückschluß vom Ertrag auf den Grad der Kontamination möglich war. Ursache dafür ist sicher der unterschiedliche Nährstoffgehalt der Böden. Daher wurde überprüft, ob die Kontrolle für die Bewertung von Bodenmaterialien durch das Verschneiden des Testbodens mit unbelastetem Boden ersetzt werden kann. Zunächst wurden unkontaminierte Böden (Tab.3) einen Tag vor Versuchsansatz im Verhältnis 1:1 mit LUFA2.2

vermischt. Dieser Versuch sollte Aufschluß über das Verhalten von ungestörten Böden im Mischungsversuch geben.

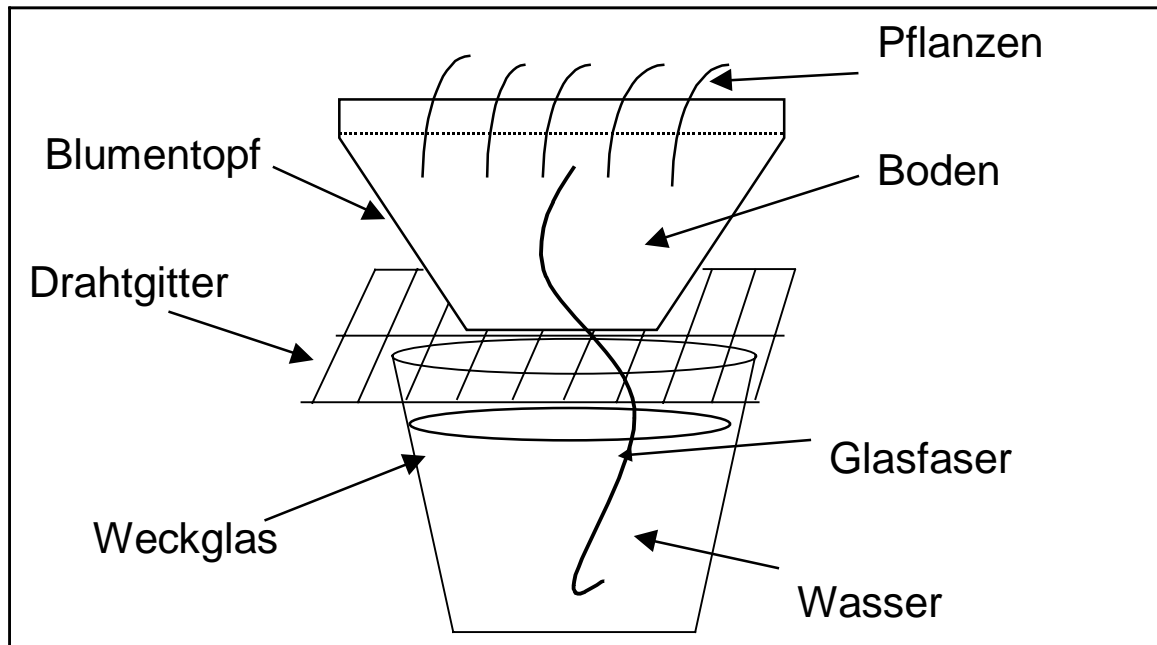


Abb.2: Schematische Darstellung eines halbautomatischen Bewässerungssystems

3.5 ToxiChromoPad-Test

Zusätzlich wurde der ToxiChromoPad-Test nach Kwan [6] durchgeführt. Das Prinzip dieses Schnelltests beruht auf der Hemmung der β -Galaktosidaseaktivität einer E. coli-Spezies durch Schadstoffe. Es wurden Verdünnungsreihen von Bodensuspensionen und -eluatn mit der Bakterienkultur angesetzt und diese auf Hemmung der β -Galaktosidase-Aktivität (Nachweis durch geringere Blaufärbung des zur Testausstattung gehörenden Pads) überprüft. Es wird abgelesen, ob und bis zu welcher Verdünnung eine Hemmung der Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (destilliertes Wasser) stattgefunden hat. Dieser Test ist als Test-Kit erhältlich und kann wegen seiner Einfachheit auch von Personen mit geringer Laborerfahrung ausgeführt werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Bodenatmung

4.1.1 Vorversuche zur Aufnahme der Bodenatmungskurven

Zunächst wurde überprüft, ob es sinnvoll ist, außer dem leicht abbaubaren Substrat (Glukose), auch Stickstoff und Phosphat zur Erfassung der Atmungskurven zum Boden zu geben.

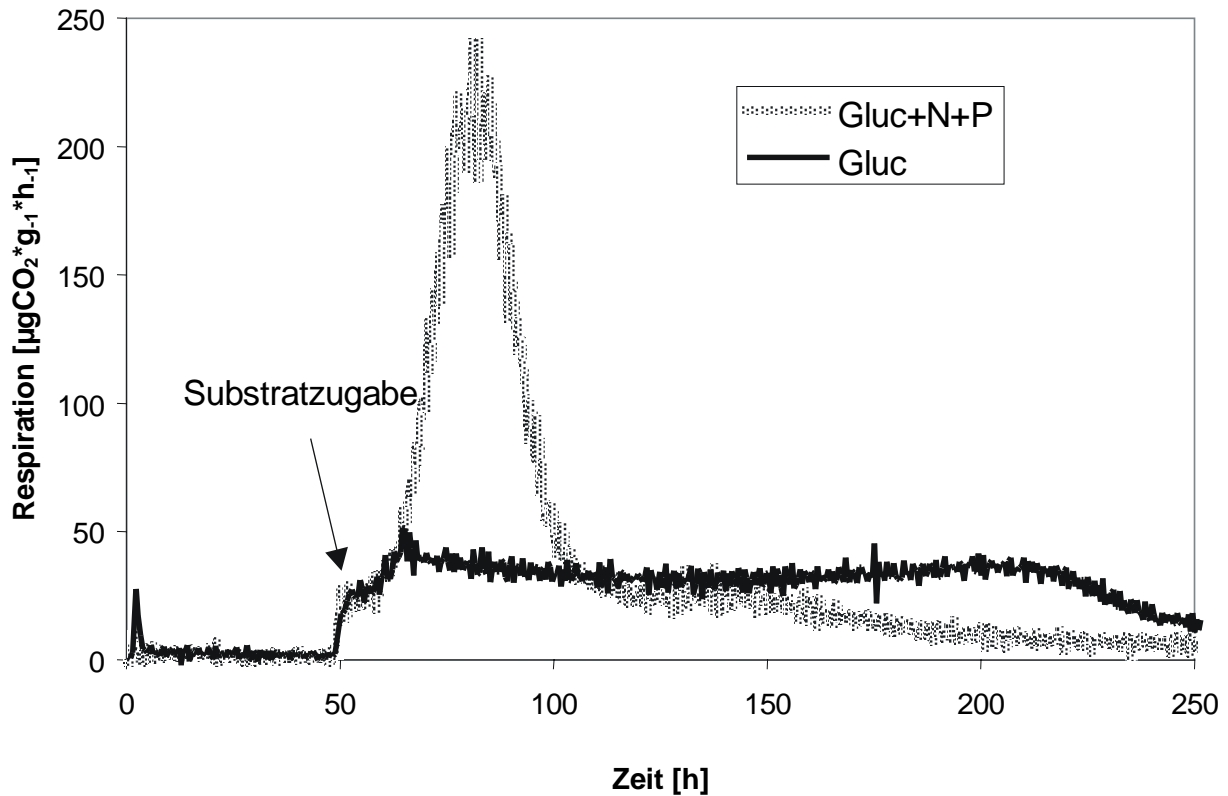


Abb. 3: Einfluß der Stickstoff- und Phosphatgabe auf die Atmungskurve des Standardboden LUFA2.2

Abbildung 3 zeigt die Atmungskurve eines unbelasteten Bodens nach Zugabe von Glukose (Gluc) im Vergleich zur Kurve bei gleichzeitiger Zugabe einer Stickstoff- und Phosphat-Quelle (Gluc+N+P). Es wird deutlich, daß die Zugabe eines leicht abbaubaren Substrats nicht ausreicht, um einen deutlichen Peak zu erhalten. Insbesondere armen Böden müssen Nährstoffe hinzugefügt werden, um vollständige Atmungskurven zu erlangen.

Mikrobiologische Vorschriften erlauben oft einen Wassergehalt von 40-60 % der maximalen Wasserhaltekapazität (WHK_{max}). Um auch im Hinblick auf die Anwendung bei der Bewertung von Böden vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde überprüft, ob es notwendig ist, den Wassergehalt der Bodenproben für die Messungen exakt festzulegen. Gleichzeitig wurden die Atmungskurven bei zwei verschiedenen Glukosekonzentrationen erfaßt, um den eventuell toxisch wirkenden osmotischen Druck durch die hohe Glukosemenge beurteilen zu können. Abbildung 4 und 5 stellen den respiratorischen Aktivierungsquotienten Q_R und die Lag-Phase von drei unbelasteten Böden bei Wassergehalten von 40, 50 und 60 % WHK_{max} und Substratmengen von 0,1 und 0,2g Substratgemisch je 1g organischer Substanz, bzw. je 20 g Boden (siehe Methodenteil) dar.

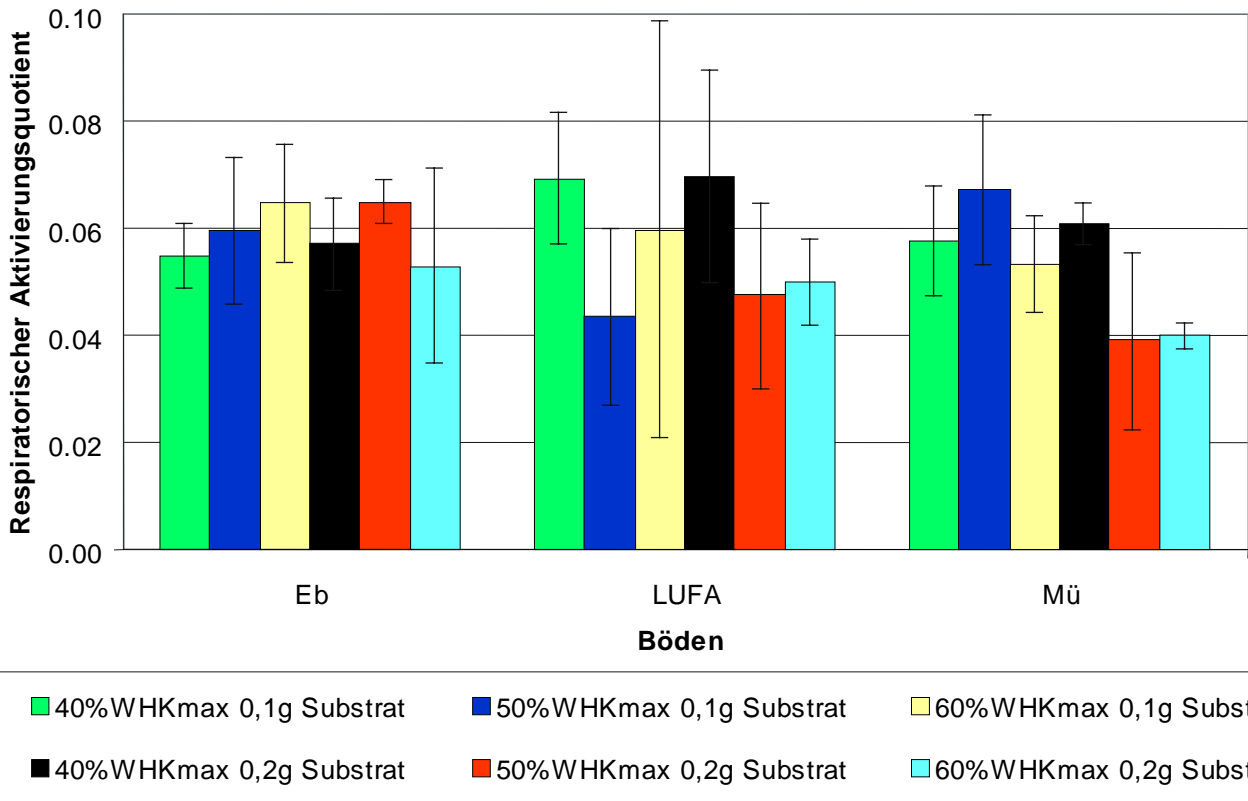


Abb.4: Einfluß des Wassergehalts auf den respiratorischen Aktivierungsquotienten von drei unbelasteten Böden

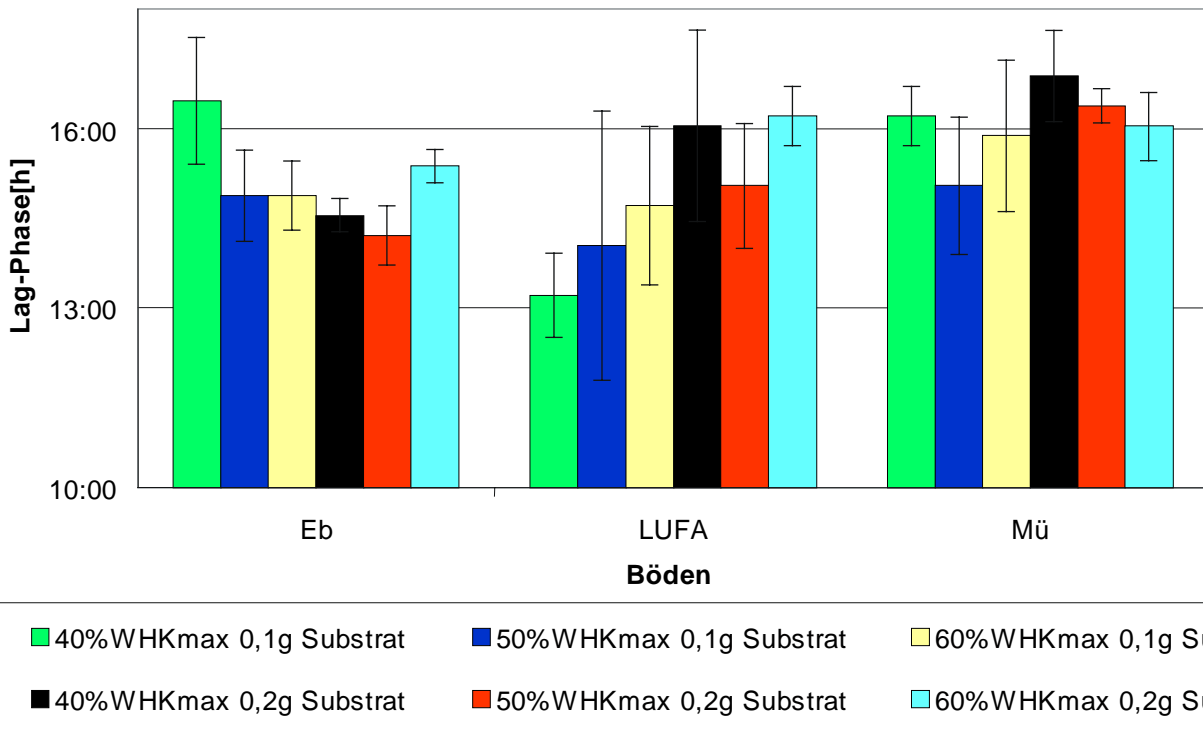


Abb. 5: Einfluß des Wassergehalts auf die Länge der Lag-Phase von drei unbelasteten Böden.

Die vierte (40 % WHK_{max}, 0,2 g Substrat) und die sechste Säule (60 % WHK_{max}, 0,2 g Substrat) zeigen bei den Böden LUFA und Mü, daß bei unbelasteten Böden der respiratorische Aktivierungsquotient in Abhängigkeit vom Wassergehalt schwanken kann (Abb. 4). Auch die Lag-Phase variiert geringfügig mit Wassergehalt und Substratmenge (Abb. 5). Für die Glukosekonzentration stellte sich heraus, daß die vorgeschriebenen 8100 ppm (0,2g Substrat/20 g Boden) zu einer geringfügigen Verlängerung der Lag-Phase führen können. Dadurch läßt sich die SIR besser erfassen. Deshalb wurde in allen folgenden Versuchen die Konzentration beibehalten. Da sich der Einfluß der großen Glukosemenge bei feuchterem Boden relativiert, wurden die Böden in allen weiteren Versuchen auf 60 % der maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt.

Wesentlich stärker ist der Einfluß von Wassergehalt und Substrat auf die Atmungskennwerte von belasteten Böden (Abb. 6&7).

Die Böden LH, IL und GW zeigen deutlich, daß der Q_R durch die höhere Substratmenge vergrößert (Säulen 40 % WHK_{max}, 0,1 und 0,2 g Substrat) und durch größere Feuchtigkeit (Säulen 0,2 g Substrat, 40, 50 und 60 % WHK_{max}) verkleinert werden kann. Auch die Lag-Phase verlängert sich durch höhere Substratgabe und verkürzt sich durch höhere Feuchte bei den Böden LH, CZ und IL. Die Sensitivität der Mikroorganismen in kontaminierten Böden gegenüber Feuchtigkeit und Substratmenge ist stärker als bei unkontaminierten Böden. Um vergleichbare Ergebnisse bei der Bewertung der Ökotoxikologie von Böden zu erhalten, muß demnach unbedingt der Wassergehalt, bei dem die Atmungskurven aufgenommen werden sollen, klar festgelegt werden.

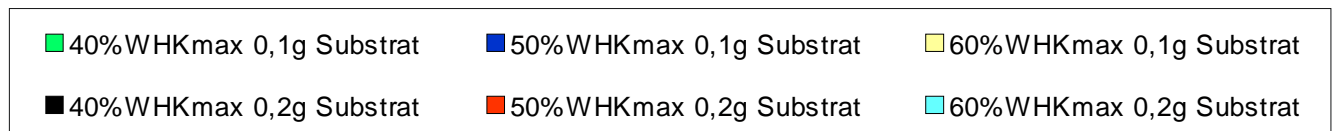
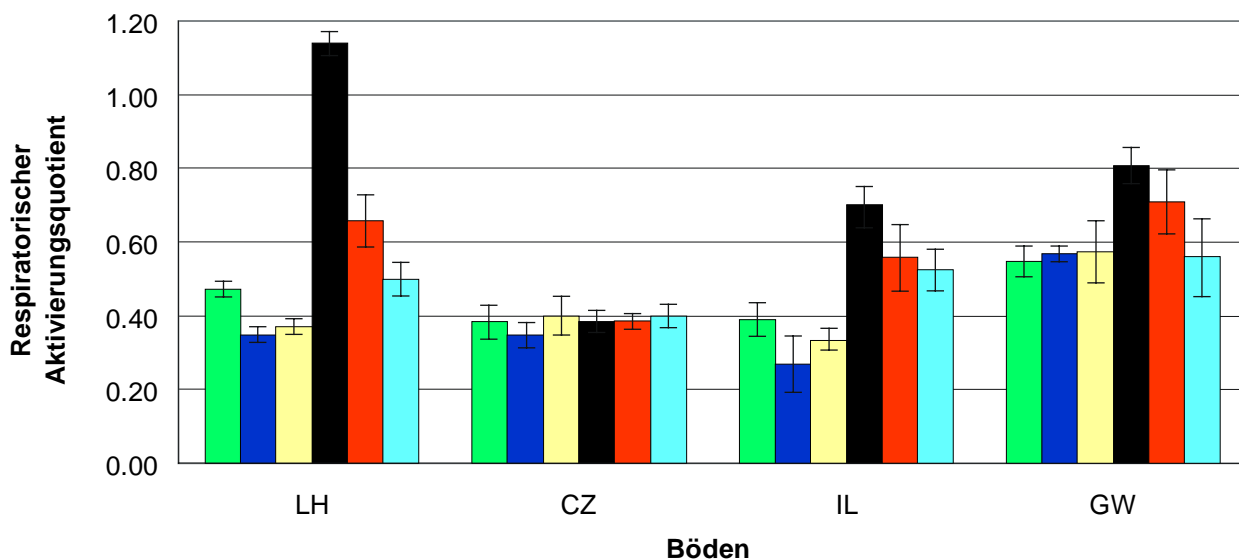


Abb. 6: Einfluß von Substratmenge und Wassergehalt auf den respiratorischen Aktivierungsquotienten von belasteten Böden

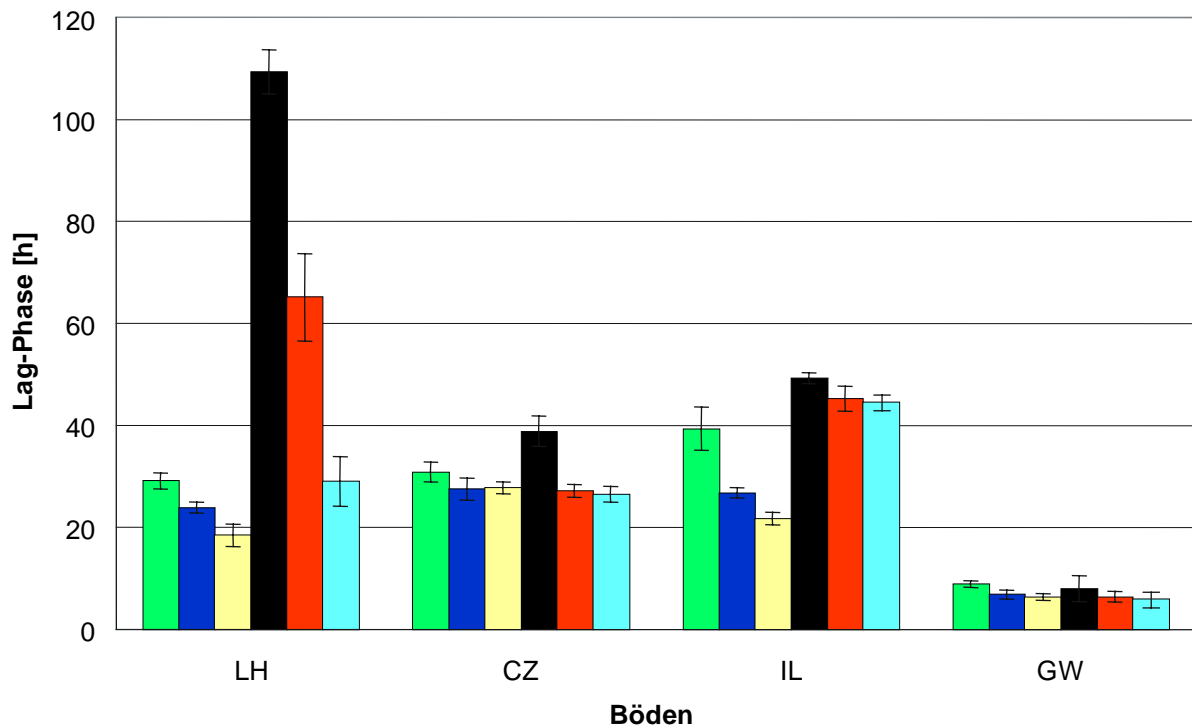


Abb. 7: Einfluß von Substratmenge und Wassergehalt auf die Länge der Lag-Phase in belasteten Böden

4.1.2 Aufnahme der Bodenatmungskurven der Testböden

Um zu beurteilen welche Parameter geeignet sind, das ökotoxikologische Potential von Böden zu bestimmen, wurden zunächst die Atmungskoeffizienten belasteter und unbelasteter Bodenproben erfaßt und miteinander verglichen. Tabelle 6 zeigt, daß sich unkontaminierte und kontaminierte Böden in den Atmungsparametern, insbesondere in Q_R , Lag-Phase und Zeitraum bis zum Auftreten des Peakmaximums (t_{max}) unterscheiden. Als Toxizitätskriterien ergaben sich: $Q_R > 0,3$; Lag-Phase > 20 h und $t_{max} > 50$ h. Die beiden unbelasteten Böden mit einer Lag-Phase von mehr als 20h und t_{max} von mehr als 50 h hatten beide einen pH-Wert von $< 4,5$. Demnach sind die Kriterien Lag-Phase und t_{max} für saure Böden nur bedingt anzuwenden. Inerte Böden (hier definiert als Böden mit $C_{org} < 1\%$) sind aufgrund ihrer Eigenschaften nicht mit Hilfe der Atmungskurven als unbelastete Böden erkennbar.

Die Bewertung der Ökotoxizität von Böden aus Altlasten und des Erfolgs bei ihrer Sanierung erfolgte durch Erfassung der Parameter Q_R , Lag-Phase und Zeit bis zum Auftreten des Peakmaximums. In Abbildung 8 ist der respiratorische Aktivierungsquotient der Böden aus TNT-Altlasten aufgeführt.

Tab. 6: Bandbreiten der Bodenatmungskoeffizienten

Böden	Respiration [$\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$]		Q_R (R_A/R_P)	Lag-Zeit [h]	t_{max} [h]
	Basal- atmung RA	Substrat- atmung RP			
unkontaminierte Böden (n=14)	0,57 – 3,88	3,47 – 66,29	0,05 - 0,27	<0,4 - 32	22 - 61
unkontaminierte inerte Böden (n=9)	0,12 – 1,87	0,79 - 649	0,18 - 0,60	14 - 66	44 - 153
Organikabelastete Böden (n=27)	0,42 – 11,37	0,23 - 23,58	0,25 - 1,81	6 - >60	18 - >100
belastete inerte Böden (n= 9)	0,21 - 5,58	0,80 - 9,98	0,20 - 1,16	4 - >100	37 - >100

n: Anzahl der getesteten Böden; Q_R : Respiratorischer Aktivierungsquotient;
 t_{max} : Zeit bis zum Auftreten des Peakmaximums

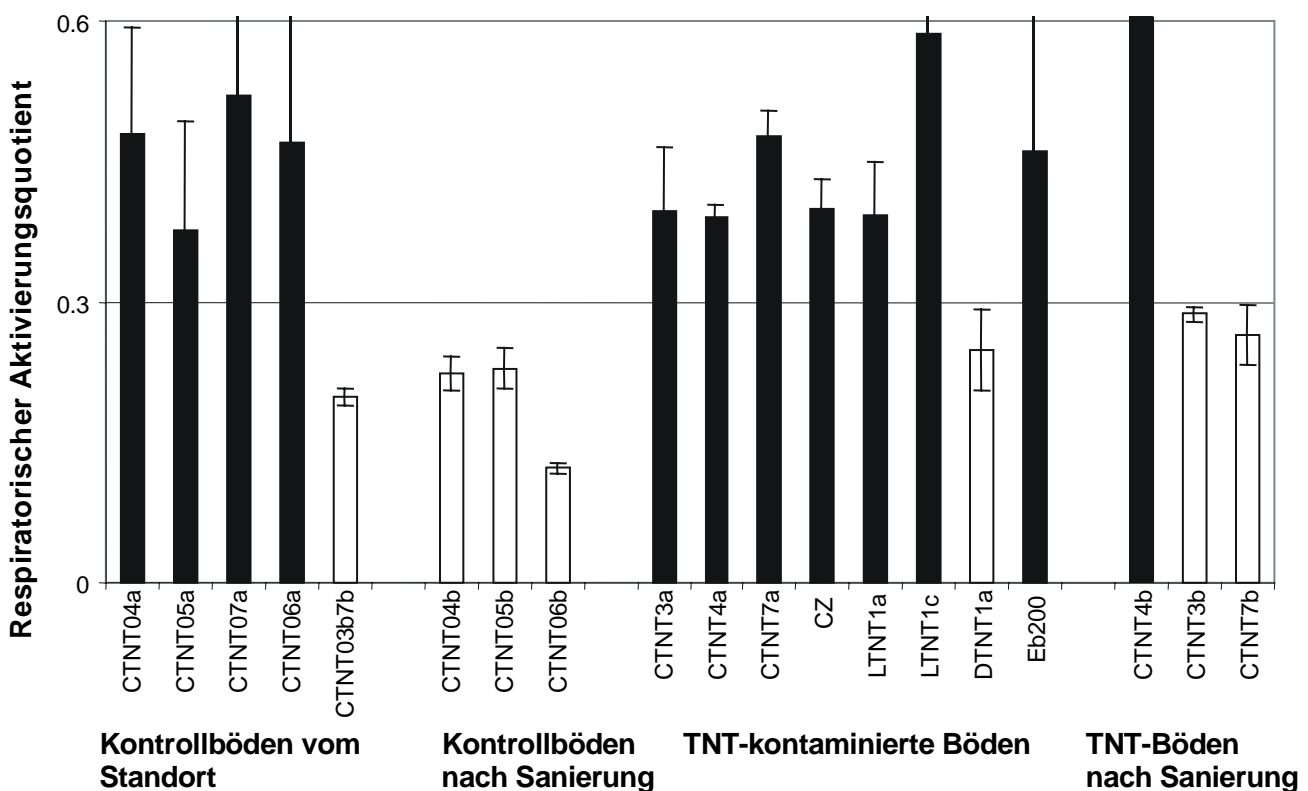


Abb. 8: Respiratorischer Aktivierungsquotient von unsanierten und sanierten Böden aus TNT-Altlasten

In den ersten fünf Säulen wird der Q_R der Kontrollböden dargestellt. Die folgenden drei Säulen zeigen die Ergebnisse auf Kontrollböden, die zur Überprüfung der Auswirkung der Verfahren auf unbelastete Böden "saniert" wurden. Es folgen acht Säulen von den belasteten Böden vor Sanierung (1a-7a), einem Boden dessen Schadstoffgehalt durch Bodenwäsche aufkonzentriert (LTNT1c) sein sollte und einem mit TNT dotierten, im Kühlschrank gealterten, Boden (EB200). Die letzten drei Säulen zeigen Böden aus unterschiedlichen biologischen Sanierungsverfahren. Die hellen Säulen zeigen die als nicht toxisch bewerteten Böden, die dunklen die Böden, die einen $Q_R > 0,3$ aufweisen und so als ökotoxikologisch bedenklich einzustufen sind. Auffällig ist dabei, daß bis auf den Boden CTNT03b7b alle Kontrollen toxisch sind. Die Ursache hierfür ist sicher in den hohen Schwermetallgehalten an diesem Altlastenstandort zu suchen. Das dennoch eine Detoxifizierung der Kontrollböden durch Sanierung zu erkennen ist, liegt wahrscheinlich im Prinzip der Verfahren begründet. Die angewandten Sanierungsverfahren beruhen auf einer Bindung des TNT durch Humifizierung. Dazu werden große Mengen organischer Zuschlagstoffe zum Boden gegeben, die auch eine Immobilisierung der Schwermetalle verursachen können. Alle kontaminierten Böden bis auf den Boden DTNT1a sind nach dem Bewertungskriterium Q_R toxisch. DTNT1a stellte sich nach Analyse als nur gering mit Nitrotoluolen belastet (5ppm) heraus. Daher ist keine toxische Reaktion zu erwarten. Der dennoch für einen unbelasteten Boden relativ hohe Quotient ist wahrscheinlich auf den hohen Kupfergehalt zurückzuführen. Bei den sanierten Böden CTNT3b und 7b zeigt der Test eine deutliche Detoxifizierung, was den vollständigen Umbau des TNT zu nicht extrahierbaren Rückständen bestätigt. Die dennoch hohe Toxizität von CTNT4b, der keine nachweisbaren TNT-Gehalte aufweist, findet ihre Ursache in dem durch das Sanierungsverfahren hervorgerufenen hohen Anteil an mineralischem Stickstoff. Dieser wurde bei den Böden 3b und 7b durch längere Vorauslagerung bereits abgebaut oder ausgewaschen. Der Boden LTNT1c ist das aufkonzentrierte Feinkorn des Bodens LTNT1a aus der Bodenwaschanlage. Die Analyse zeigte, entgegen den Erwartungen, nur eine geringe Konzentration von 30 mg TNT/kg auf, wobei die Möglichkeit besteht, daß durch das Waschverfahren eine Bindung des TNT zu nicht extrahierbaren Rückständen erfolgt ist. Der hohe Humus- und Feinkornanteil spricht für diese Möglichkeit. Der hohe respiratorische Aktivierungsquotient liegt demnach nicht in der TNT-Kontamination begründet, sondern wahrscheinlich ähnlich wie bei CTNT4b im hohen N_{\min} -Gehalt.

Es wird deutlich, daß die Lag-Phase als Kriterium nicht ausreicht, um die Toxizität der Böden zu bestimmen (Abb. 9). Sie ist ein wenig sensitiver Faktor und kann nur zusätzliche Aussagen zur Bewertung machen. Das Auftreten von Doppelpeaks, insbesondere bei TNT-kontaminierten Böden, ist eine Ursache für die geringe Aussagekraft der Lag-Phase. Da offensichtlich der zweite Peak wichtiger in Bezug auf die Toxizität ist, dessen Lag-Phase aber oft vom ersten Peak überlagert wird, führt das zu einer Verfälschung der Ergebnisse (siehe Abb.10). Aus diesem Grund wurde der Zeitpunkt des Auftretens des Peakmaximums (bei zwei Maxima wird das zweite bewertet) als zusätzliches Bewertungskriterium erfaßt.

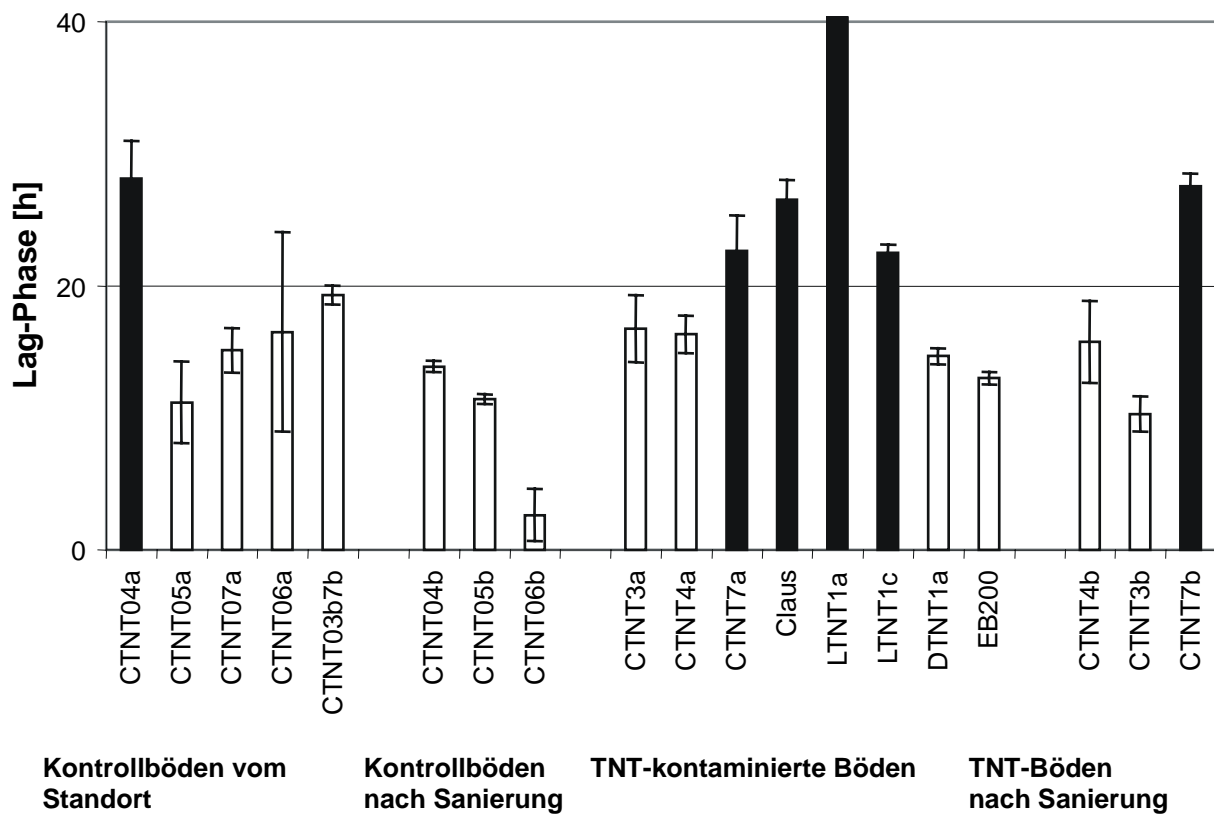


Abb. 9: Lag-Phase von unsanierten und sanierten Böden aus TNT-Altlasten

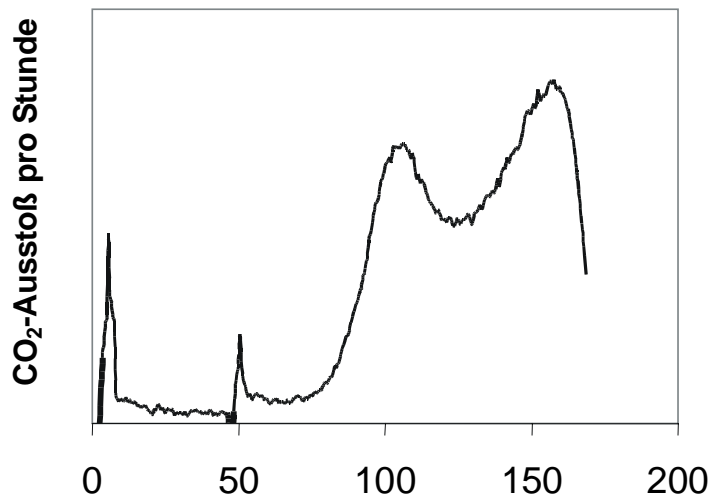


Abb. 10: Atmungskurve von CTNT7a

Abbildung 11 zeigt, daß t_{max} ein sensibles Kriterium zur Bewertung der Toxizität von TNT kontaminierten Böden ist. Die dunklen Säulen sind als toxisch, die hellen als nicht toxisch zu bewerten. Die Bewertung ist mit der aus dem Resultat der respiratorischen Aktivierungsquotienten identisch, mit Ausnahme von den Böden CTNT07a und 4b, deren Toxizität hier nicht angezeigt wird.

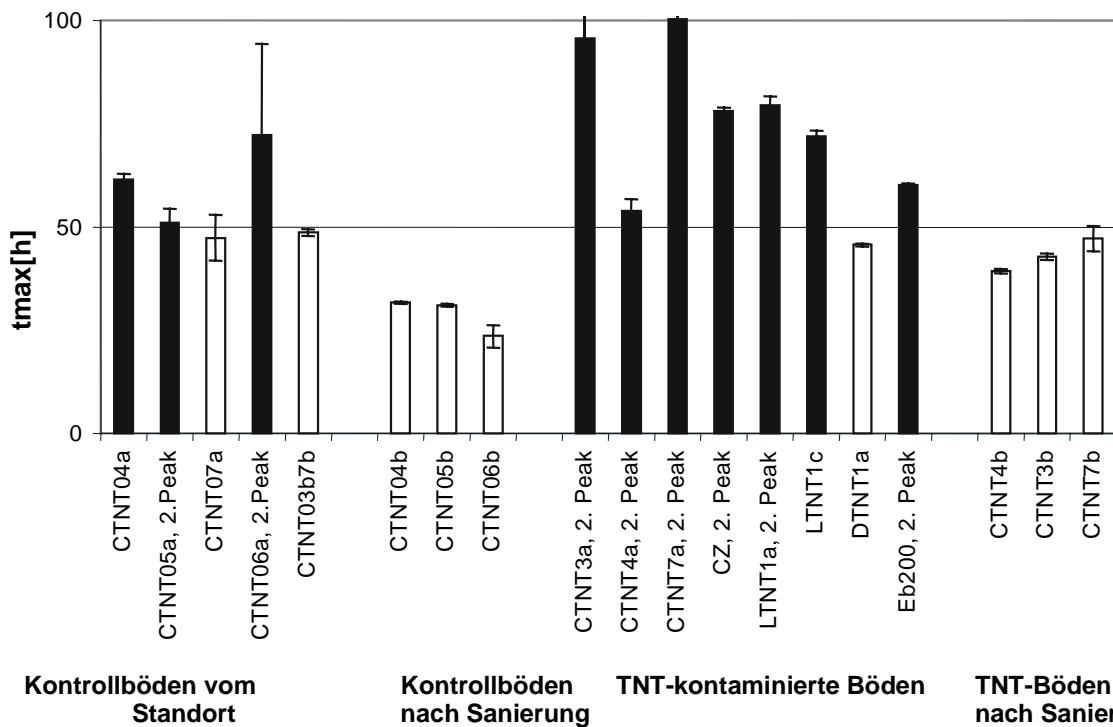


Abb. 11: Zeitspanne bis zum Auftreten des Peakmaximums (t_{max}) in unsanierten und sanierten Böden aus TNT-Altlasten

Neben dem Phänomen der Doppelpeaks gibt es auch Böden, bei denen kein exponentielles Wachstum eintritt. Grundsätzlich läßt sich sowohl für Böden mit Doppelpeaks, als auch für solche ohne exponentielle Wachstumsphase sagen, daß sie in ihrer Lebensraumfunktion Bodenbiozönose beeinträchtigt sind.

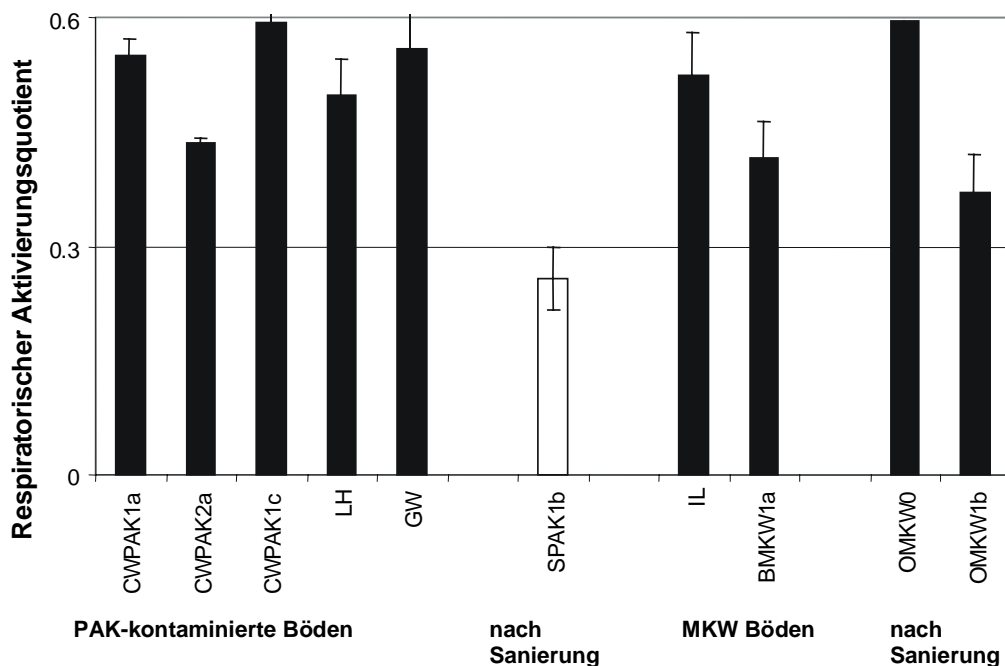


Abb. 12: Respiratorischer Aktivierungsquotient von unsanierten und sanierten Böden aus mit PAK und Mineralöl belasteten Altlasten

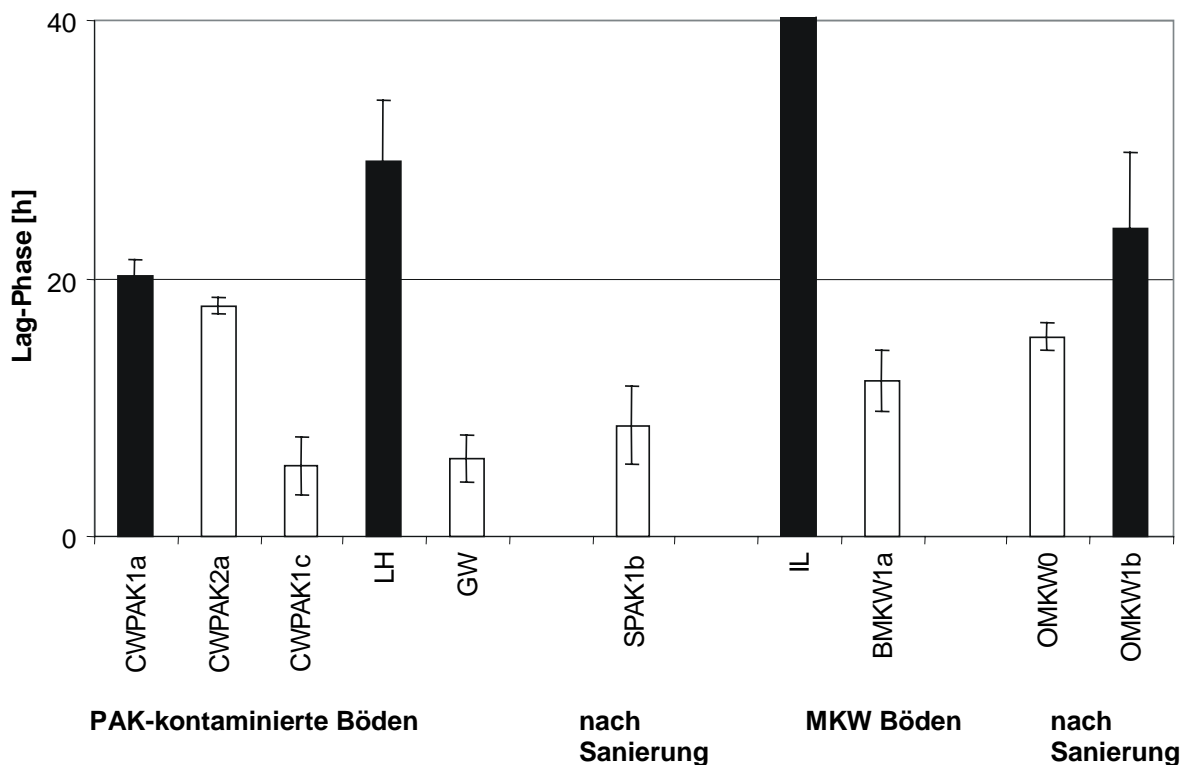


Abb. 13: Lag-Phase von unsanierten und sanierten Böden aus mit PAK und Mineralöl belasteten Altlasten

In den Abbildungen 12 und 13 sind der respiratorische Aktivierungsquotient und die Lag-Phase von PAK- und MKW-belasteten Böden dargestellt. Auch hier wird deutlich, daß Q_R ein wesentlich sensitiveres Instrument zur ökotoxikologischen Bewertung darstellt als die Lag-Phase. Unter das Toxizitätskriterium $Q_R > 0,3$ fallen alle Böden vor Sanierung und die Böden OMKW0 und 1b. Diese sind so gering belastet, daß es keine sichtbare Ursache für die Toxizität gibt. Der Test deutet auf eine analytisch nicht erfaßte Kontamination hin.

4.2 Potentielle Ammoniumoxidation

Die potentielle Ammoniumoxidation der meisten getesteten Böden zeigte eine im Vergleich zu LUFA2.2 stark verminderte Aktivität. Eine mögliche Ursache dafür ist der Einfluß von Trocknung und Lagerung, der auch bei der Anwendung später nicht ausgeschlossen werden kann. Es besteht kein Zusammenhang zwischen Kontamination und Hemmung. Die Aussagefähigkeit des Tests sollte durch Untersuchungen von Bodenmischungen verbessert werden. Zunächst wurde dazu die Auswirkung der Mischung mit LUFA auf die Nitrifikation in unbelasteten Böden getestet.

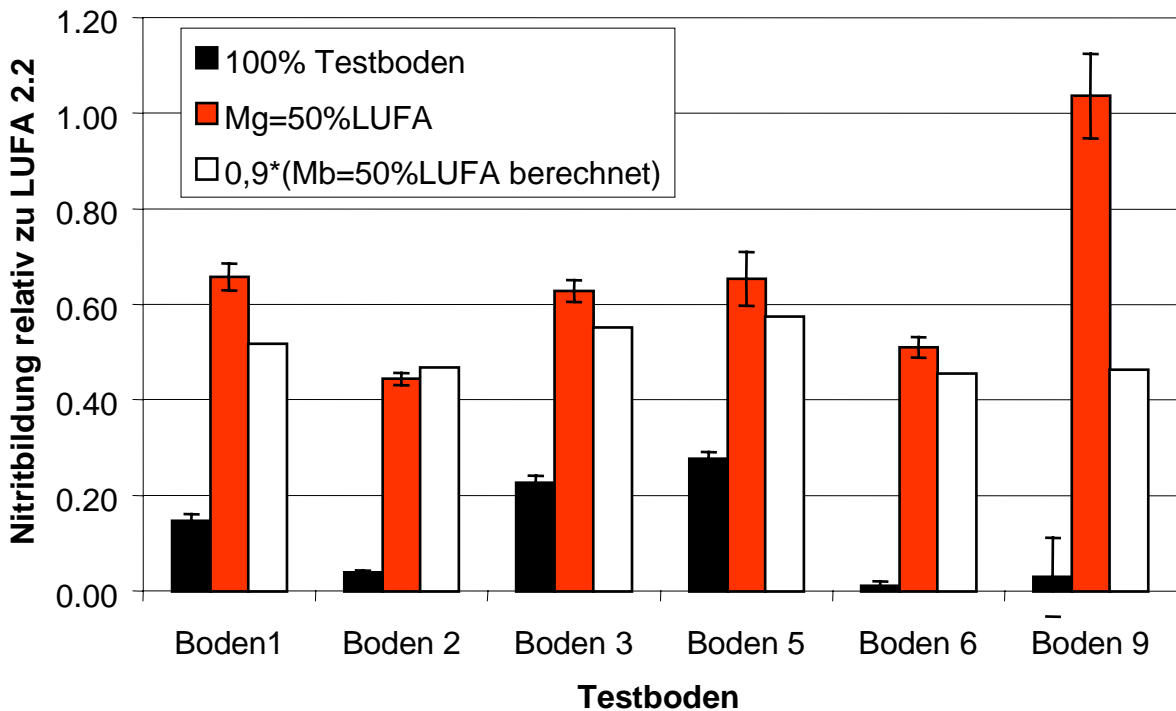


Abb. 14: Nitrifikation unbelasteter Böden und ihrer Mischung mit LUFA2.2

Abbildung 14 zeigt die potentielle Ammoniumoxidation in sechs unkontaminierten Böden (1. Säule) und in ihrer 50 %-Mischung mit LUFA2.2 (2.Säule) relativ zur Aktivität in LUFA2.2, die 1,0 ist. Die dritte Säule stellt den berechneten Mittelwert aus der Nitritbildung des jeweiligen Testbodens und des LUFA-Bodens dar. Aus der Abbildung wird deutlich, daß die Aktivität auf den 1:1 - Mischungen unkontaminierter Böden immer mindestens 90% des Mittelwerts der Aktivitäten auf den ungemischten Böden ergaben. Boden 9 ist ein Beispiel dafür, daß sich die abiotischen Eigenschaften von zwei Böden so gut ergänzen können, daß in der Mischung eine wesentlich stärkere Förderung als erwartet entsteht. Es ergab sich das Toxizitätskriterium :

Negative Abweichung des gemessenen Werts vom errechneten (Mittelwert) um mehr als 10%:

$$M_g + SD_{M_g} < 0,9 M_b$$

- M_g = gemessener Wert der Mischung
- SD_{M_g} = Standardabweichung des gemessenen Werts
- M_b = berechneter Wert für die Mischung

Im folgenden wurden alle zu bewertenden Böden wie oben gemischt und ihre ökotoxikologische Bedenklichkeit dadurch eingeschätzt. Abbildung 15 zeigt die Ergebnisse aus den Mischungsversuchen.

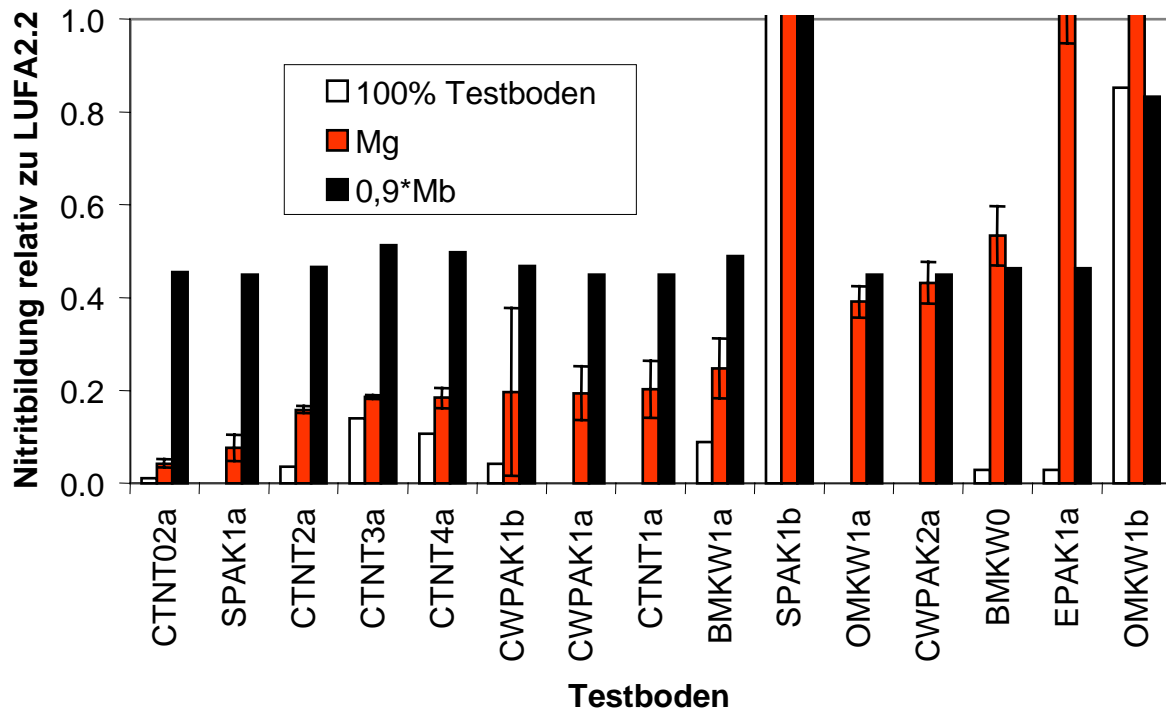


Abb. 15: Nitritbildung der TNT-, PAK- und MKW- kontaminierten Böden aus Altlasten und ihrer Mischungen mit LUFA2.2

Es wird deutlich, daß die potentielle Ammoniumoxidation der Testböden durch Zugabe von unkontaminiertem Boden (hier LUFA2.2) gesteigert werden kann. Vergleicht man die erreichte Aktivität der Mischung mit dem errechneten Wert, der hier bereits abzüglich 10% eingezeichnet ist, so zeigen sich zum Teil erhebliche negative Abweichungen. Die Böden, die in der Mischung mit LUFA um mehr als 10% vom erwarteten Wert abweichen, sind also als ökotoxikologisch bedenklich einzustufen. Dazu gehören CTNT02a, SPAK1a, CTNT2a, 3a, 4a, CWPAK1b, 1a, CTNT1a, BMKW1a und OMKW1a. CWPAK1c konnte wegen seines hohen Nitritgehalts, der die Analyse auf gebildetes Nitrit stört, nicht bewertet werden. CWPAK2a, BMKW0, EPAK1a und OMKW1b werden als nicht toxisch eingestuft. CWPAK1b zeigt in der Mischung eine so hohe Standardabweichung, daß eine Bewertung nicht möglich war. Eine Förderung der Aktivität liegt bei EPAK1a und OMKW1b vor. Die Ursache hierfür ist in der Optimierung der abiotischen Eigenschaften der Böden durch die Mischung der beiden Böden zu suchen. Die starke Hemmung durch den Boden CTNT02a liegt in dem niedrigen pH-Wert begründet. Die Ammoniumoxidation ist sehr pH-Wert abhängig, wobei der zugegebene Puffer nicht ausreicht, um stark saure Böden abzufuffern. Der Test ist daher für stark saure Böden nicht oder nur bedingt einsetzbar.

4.3 Pflanzentest

4.3.1 Vorversuche zum Pflanzentest

Durch die Bewässerung mit dem Glasfaserdocht wurde nicht der vorgeschriebene Wassergehalt von 60, bzw. 80 % der WHK_{max} erreicht, sondern er lag deutlich darüber und

erreichte zum Teil sogar mehr als 100 % WHK_{max} . Anhand des Vergleichs der Erträge sollte nun bestimmt werden, ob der Unterschied vernachlässigbar ist.

In 80% der Fälle wichen die Erträge nicht voneinander ab. Zum Teil gab es signifikante Unterschiede zwischen dem Ertrag der Trockenmasse bei Handbewässerung und bei automatischer Bewässerung. Da aber bei beiden Bewässerungsarten zum Teil höhere Erträge entstanden, kann davon ausgegangen werden, daß diesen Abweichungen nicht die Art der Bewässerung zugrunde liegt. Es kann also davon ausgegangen werden, daß die wesentlich anwendungsfreundlichere Bewässerung mit dem Glasfaserdocht eine akzeptable Lösung ist, so daß im folgenden immer auf diese Art bewässert wurde.

Ein Vergleich des Frischgewichts der Pflanzen mit dem Trockengewicht zeigte eine sehr gute Korrelation zueinander. Es reicht demnach durchaus aus, die Frischgewichte der Testpflanzen miteinander zu vergleichen, was in den folgenden Versuchen beibehalten wurde.

Der Ertrag der Pflanzen auf unkontaminierten Böden variierte zwischen 20 und 240 % des Ertrags auf LUFA. Selbst der Ertrag auf LUFA2.2 ist abhängig vom Lagerungszustand des Bodens. Daher wurden auch hier Mischungsversuche angesetzt, um ein Bewertungskriterium zu erhalten, das weitgehend unabhängig von den Eigenschaften des Bodens ist. In Abbildung 16 wird das Frischgewicht der Kresse auf den unkontaminierten Böden (1. Säule) und ihren Mischungen mit 50 % LUFA relativ zur Kontrolle (LUFA) dargestellt (2. Säule). Die dritte Säule zeigt den Wert, der sich rechnerisch aus den Ausgangserträgen der Böden ergibt, wenn man den Mittelwert bildet. In den ersten beiden Säulen entsprechen die eingezeichneten Fehlerindikatoren den Standardabweichungen. In der dritten Säule ist eine Toleranz von 10% negativer Abweichung von dem errechneten Wert gekennzeichnet.

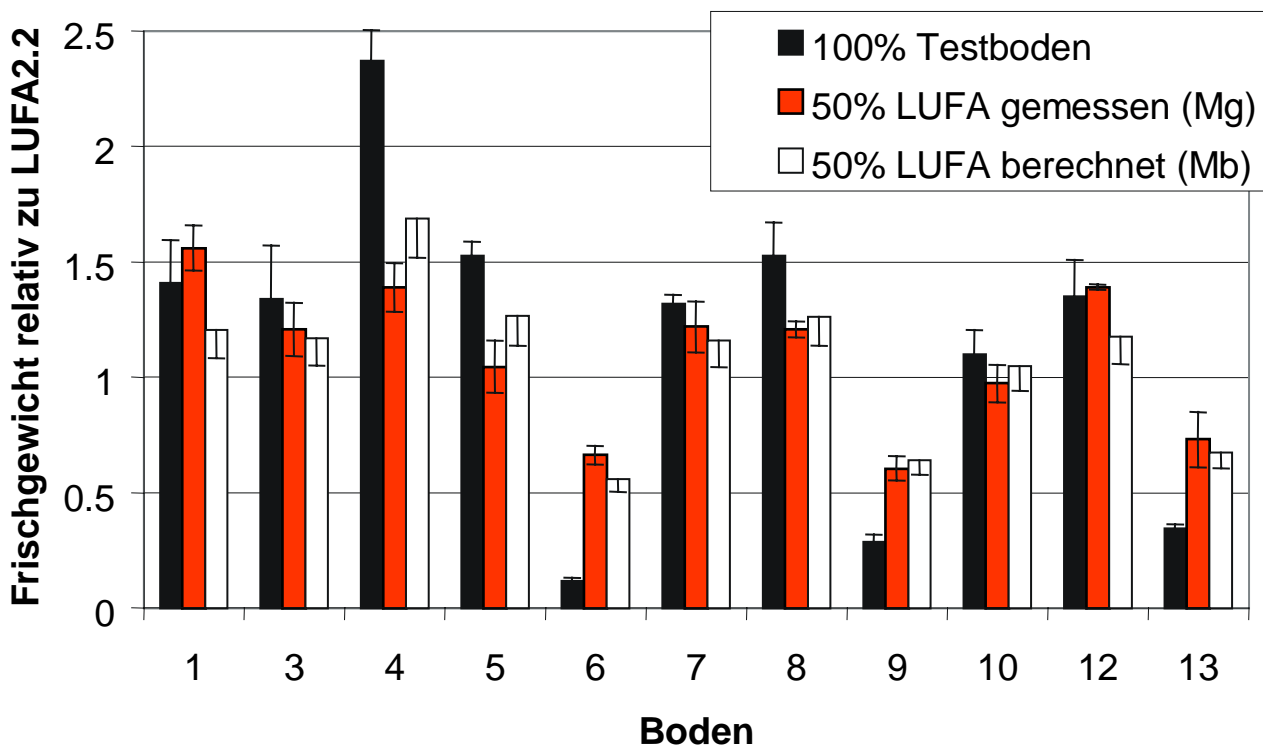


Abb. 16: Ertrag der Kresse auf unbelasteten Böden und in einer 50%-Mischung mit LUFA2.2 (M_g) im Vergleich zum errechneten Wert (M_b)

Die 50%-Mischung von LUFA bei den elf unkontaminierten Böden ergab, daß die Mischung mit Boden 4 signifikant einen um mehr als 10 % verminderten Ertrag im Vergleich zum Mittelwert der Erträge beider Böden zeigte. Bei Rübe (hier nicht dargestellt) war nur auf der Mischung mit Boden 8 ein geringerer Ertrag als 90 % des Mittelwerts der Erträge von LUFA und Boden 8 zu verzeichnen. Auf keiner der Mischungen mit den unkontaminierten Böden wich der Ertrag beider Pflanzen um mehr als 10 % von dem errechneten Mittelwert ab. Eine stärkere Hemmung des Pflanzenwachstums deutet demnach auf eine ökotoxikologische Bedenklichkeit des Bodens für Pflanzen hin.

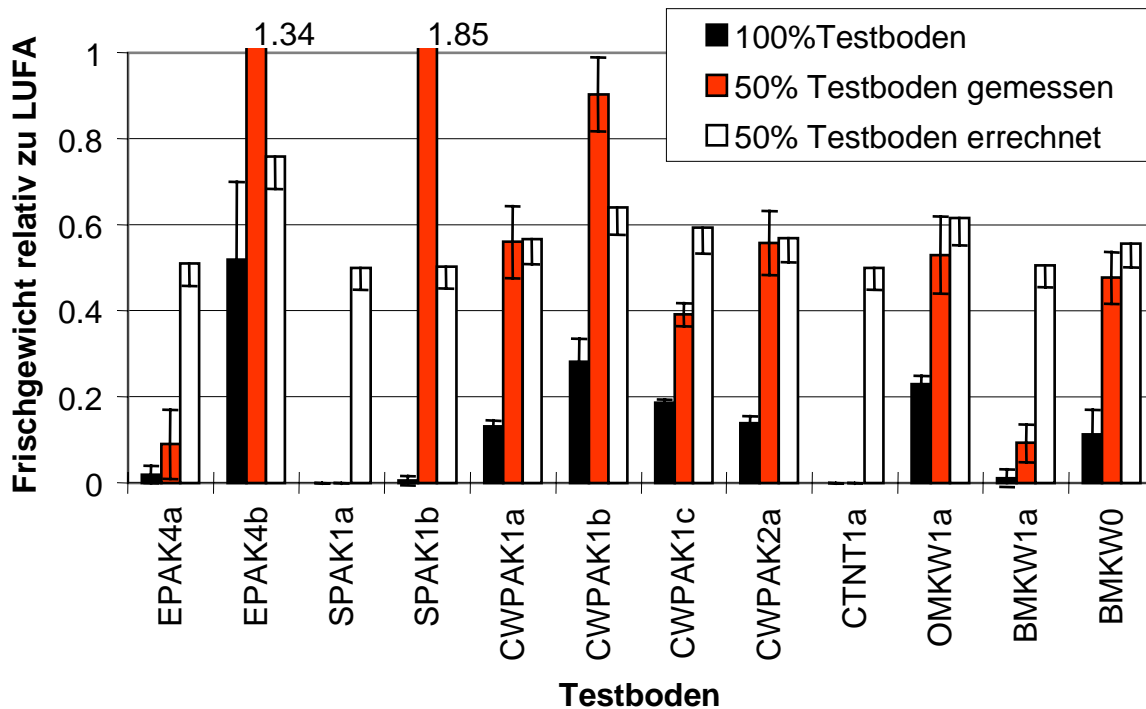


Abb. 17: Ertrag der Kresse auf den Testböden mit einer 50%-Mischung von LUFA im Vergleich zum errechneten Wert

In Abbildung 17 ist der Ertrag von Kresse auf den kontaminierten Böden und ihren Mischungen mit LUFA2.2 dargestellt. Die Aussagefähigkeit des Pflanzenwachstumshemmtests konnte durch 1:1-Mischungen mit LUFA erhöht werden. Man erhält durch die Mischung eine für jeden Boden spezifische Bezugsgröße, nämlich den Mittelwert von LUFA- und Testbodenertrag, die erreicht werden muß. So kann für jeden Boden unabhängig davon, ob es eine geeignete Kontrolle vom Standort gibt, die Toxizität bestimmt werden. Als toxisch sind demnach die Böden EPAK4a, SPAK1a, CWPAK1c, CTNT1a und BMKW1a zu bewerten. Nicht toxisch für den Pflanzentest sind die Böden EPAK4b, SPAK1b, CWPAK2a, OMKW1a und BMKW0. Die Ergebnisse der Bewertung entsprechen dem Kontaminationsgrad der Testböden. Allerdings läßt sich im Vergleich zum Test auf potentielle Ammoniumoxidation feststellen, daß der Pflanzentest weniger sensitiv auf Mineralöle reagiert. Nachteilig ist der Verdünnungseffekt, der durch die Mischung auftreten kann und eventuelle Kontaminationen verdeckt. So wurde zum Beispiel beim Boden SPAK1b durch die Mischung die keimungshemmende Wirkung abgeschwächt und dadurch der Ertrag gesteigert.

4.4 ToxiChromoPad-Test

In der Tabelle 5 sind die Ergebnisse des ToxiChromoPad-Tests im Vergleich der Bodensuspension zu dem Eluat dargestellt. Bei einer 100 %igen Hemmung schon in der kleinsten Verdünnungsstufe ist der Boden als toxisch zu bewerten.

Tab. 7: Ergebnisse der Hemmung der β -Galaktosidaseaktivität (ToxiChromoPad-Test)

Boden	Größte Verdünnungsstufe mit 100%iger Hemmung	
	Bodensuspension	Eluat
CWPAK1b	keine	keine
CWPAK2a	keine	keine
BMKW0	keine	keine
LUFA	keine	keine
LTNT1b	keine	keine
EPAK1a	1:2	keine
SPAK1b	1:2	1:4
CWPAK1a	1:2	keine
OMKW1b	1:2	keine
BMKW1a	1:2	keine
CWPAK1c	1:4	keine
OMKW1a	1:4	keine
SPAK1a	1:8	1:2
CTNT1a	1:8	>1:16
CTNT2a	1:8	keine
CTNT3a	1:8	1:4
CTNT02a	1:8	1:2
LTNT1a	1:8	keine
LTNT1c	1:8	keine
OMKW0	1:16	keine
OK0	1:16	keine
CTNT4a	1:16	1:4
CTNT0	1:16	1:4

In der Bodensuspension zeigen sämtliche Böden außer CWPAK1b, 2a, BMKW0, LUFA und LTNT1b zumindest eine Toxizität in der geringsten Verdünnungsstufe an. Wie erwartet ist die Toxizität im Eluat wesentlich geringer. Der Test erscheint als Schnelltest für eine qualitative Aussage über die Belastung eines Bodens sinnvoll. Für eine quantitative Aussage sind die Schwankungen in den Blaufärbungen zwischen den Parallelen zu stark. Der Eluat-Test verlangt aufgrund des Testdesigns eine zu starke Verdünnung, was zu einer zu geringen Erfassung der Toxizität führt. Bei den Böden OK0 und CTNT0 handelt es sich um sehr saure Böden, was zu einer falsch positiven Aussage führt.

5 Ausblick

Für die hier aufgeführten Tests ist die Anwendbarkeit in der ökotoxikologischen Bewertung von real kontaminierten Böden bestätigt worden. Wichtigstes Bewertungskriterium bei der Bodenatmung ist der respiratorische Aktivierungsquotient (Q_R). Die Lag-Phase und die Zeit bis zum Auftreten des Peakmaximums (t_{max}) geben zusätzliche Informationen, die zur Bewertung der Böden beachtet werden sollten. Da sie durch die abiotischen Bodeneigenschaften beeinflusst werden und dadurch zu einer falschen Aussage führen können, müssen die Eigenschaften bei der Interpretation berücksichtigt werden.

Die Bewertung von Böden und Bodenmaterialien mittels potentieller Ammoniumoxidation und Pflanzenwachstumshemmtest erfolgt durch Mischung des zu testen Bodenmaterials mit einem unbelasteten Boden bekannt guter Qualität. Die Abweichungen von Aktivität bzw. Ertrag in der Mischung vom erwarteten Wert, zeigen deutlich das ökotoxikologische Potential der Böden. Berücksichtigt werden muß ein eventueller Verdünnungseffekt der Schadstoffe durch die 1:1-Mischung mit dem unbelasteten Boden.

Problematisch ist der Einsatz der Testverfahren immer noch bei Böden mit einem pH-Wert $< 4,5$. Für den Pflanzentest gilt daher, daß in Zukunft ein besonderes Augenmerk auf die Suche nach gegenüber Schadstoffen sensitiven Pflanzen, deren pH-Optimum im sauren Bereich liegt, gerichtet werden muß. Da die eingesetzten mikrobiologischen Tests die autochthone, das heißt die natürlich vorhandene Mikroflora erfassen, ist es hier nicht möglich, auf andere Organismengruppen zurückzugreifen. Daher ist es insbesondere für saure Böden sicher sinnvoll, mikrobiologische Tests zu entwickeln, die das Verhalten von pH-toleranten Organismen (eventuell zugesetzt) bewerten.

6 Eigene Veröffentlichungen

Fleischmann, S., Wilke, B.-M. 1997. Ecotoxicological Test Methods – Characterisation of Soils from a Coal Spill Using Plant Growth Inhibition and Microbial Activity Tests. In J. Gottlieb, H. Hötzl, K. Huck, R. Niessner (ed.): Field Screening Europe. Proceedings of the First International Conference on Strategies and Techniques for the Investigation and Monitoring of Contaminated sites. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Boston, London. pp.199-203.

Gong P., Wilke B.-M., Strozzi E., Fleischmann S. 1997. Higher Plant seed germination and early seedling growth test: Evaluation and refinement for the use in ecotoxicological assessment of soils. poster at the International Symposium on Soil, Human and Environmental Interactions, May 4-11, Nanjing

Wilke B.-M., Winkel B., Fleischmann S., Gong P. 1998. Higher Plant growth and microbial toxicity tests for the evaluation of ecotoxic potential of soils. Proceedings of the sixth International FZK/TNO Conference on Contaminated Site

Wilke B.-M., Gong P., Papassotiriou J., Strozzi E., Fuchs M., Fleischmann S. 1998. Bioassays for soils: Evaluation of higher plant growth and microbial toxicity tests. In: Proceedings of the International Symposium on Soil, Human and Environment Interactions, May 4-11, Nanjing, China (in Press)

Winkel, B., Wilke, B.-M. 1997. Wirkung von TNT (2,4,6-Trinitrotoluol) auf Bodenatmung und Nitrifikation, Mitteilungen der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft, 85, II, 631-634

Winkel, B., Wilke B.-M. 1998. Biotests zur Bewertung von mit 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) kontaminierten Böden aus Altlasten-Standorten in: Tagungsband der Fachtagung "Sanierung kontaminierter Böden" 1998 in Munster, V10 S.1-11

Winkel, B., Saeger,T., Wilke,B.-M. 1999: Bewertung kontaminierter Böden mit Hilfe von potentieller Nitrifikation, veröffentl. in Oehlmann; Markert;(Hrsg.) Ökotoxikologie-Ökosystemare Ansätze und Methoden; ECOMED-Verlag; S.67-72

Winkel, B., Fuchs, M., Wilke, B.-M. 1999. Soil Respiration Curves: A Biotest to estimate the Ecotoxicity of soils, poster at SETAC-Europe 1999 in Leipzig, Germany

Winkel, B., Wilke, B.-M. 1999. Bodenatmungskurven: Ein Biotest zur Erfolgskontrolle von Bodensanierungen, Mitteilungen der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft, 91, II, 727-730

Diplom-und Projektarbeiten

Saeger, T. Februar 1998. Ökotoxikologische Bewertung kontaminierter Böden mit Ammonifikations- und Nitrifikationstest, Diplomarbeit, Berlin

Gawin, B., Bonilla-Lück, M. I. Juni 1998. Einsatz von Bodenmischungen im Pflanzenwachstumshemmtest, Projektarbeit, Berlin

Brandt, B. Dezember 1999. Wirkungen von 2,4,6-Trinitrotoluol auf den Ertrag von *Lepidum sativum* und *Avena sativa* l. im Pflanzenwachstumshemmtest, Diplomarbeit, Berlin

7 Literatur

1. **BBodSchV (Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung)** Juli 1999. Bundesgesetzblatt Jahrgang 1999 Teil I Nr. 36

2. **DIN (Deutsches Institut für Normung e. V.)** 1999. Bodenbeschaffenheit: Laborverfahren zur Bestimmung der mikrobiellen Bodenatmung, DIN 19737
3. **ISO (International Organization for Standardization)** December 1995. Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora, Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants. ISO 11269-2 (1st edition).
4. **ISO (International Organization for Standardization)** 1999. Ammonium oxidation - a rapid method to test potential nitrification in soil ISO/CD 15685,
5. **ISO (International Organization for Standardization)** 1999. Soil respiration curves in ISO TC 150 SC4 /WG4 N63
6. **Kwan, K.K.** 1991. Qualitative: Direct sediment toxicity testing procedure (DSTTP). NWRI Contribution No. 91-90.
7. **Nordgren, A., Bååth, E. und Söderström, B.** 1988. Evaluation of soil respiration characteristics to assess heavy metal effects on soil microorganisms using glutamic acid as a substrate, *Soil Biol. Biochem.*, 20(6): p. 949-954.
8. **Palmborg, C., Nordgren, A.** 1993. MATS Guideline Test 16: soil respiration curves, a method to test the abundance, activity and vitality of the microflora in forest soils. In: Torstensson, L. (ed.), *MATS Guidelines: Soil Biological Variables in Environmental Hazard Assessment*, Swedish Environmental Protection Agency, Uppsala. p. 149-155.
9. **Stalder, L. und Pestemer, W.** 1980. Availability to plants of herbicide residues in soil. Part I: A rapid method for estimating potentially available residues of herbicides. *Weed Research*, 20: 341-347.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.3 Verbundvorhaben 4: Ökotoxikologische Testbatterien

9.3.2 Neuentwicklung und Praxiserprobung bodenzologischer Testmethoden zur Erfolgskontrolle bei der Sanierung von Altlasten - Praxiserprobung und Standardisierung von Testmethoden mit terrestrischen Invertebraten – (TV 4.2.1)

Prof. Dr. Rudolf K. Achazi

G. Chroszcz

W. Mierke

R. Schäfer

R. Faccin

Freie Universität Berlin

Institut für Biologie, Ökotoxikologie und Biochemie

Ehrenbergstraße 26-28

14195 Berlin

Förderkennzeichen: 1491032

Laufzeit: 01.07.1996 – 30.09.1999

1 Zusammenfassung und Zielsetzung

Ziel des Vorhabens war die (a) Weiterentwicklung und Standardisierung von Biotest-Systemen mit terrestrischen Invertebraten zur Bewertung von unkontaminierten, belasteten und sanierten Bodenmaterialien und (b) die Einbindung dieser Biotests in eine Testbatterie, die die wesentlichen Ökosystemebenen des Teilökosystems Boden widerspiegelt.

Der Collembohlen- und der Enchytraeen-Biotest entsprechen den Anforderungen an ökotoxikologische Testsysteme in besonderem Maße, da *Folsomia candida* und *Enchytraeus crypticus* repräsentative Vertreter der Destruenten-Biozönose mit kurzer Generationszeit und hoher Reproduktivität sind, die unter Laborbedingungen das gesamte Jahr über in ausreichender Anzahl als synchronisierte Testpopulation zur Verfügung stehen.

Es wurden komplementäre Standardprüfanleitungen (SOP) mit definierten Endpunkten entwickelt, die jeweils einen 7tägigen Mortalitäts-Test (Akut-Test) und einen 28tägigen bzw. 21tägigen Reproduktions-Test (Life cycle Test, chronischen Test) umfassen.

Die Testsicherheit wurde durch Erstellung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung für die Referenzsubstanz Betanal(+), sowie für PAK-, TNT- und MKW-belastete Bodenmaterialien nachgewiesen. Die Eignung der optimierten Biotests zur Bewertung unkontaminierter, kontaminierter und sanierter Böden wurde in Testreihen mit 46 Bodenmaterialien überprüft. Es wurde ein Bewertungsschema entwickelt, mit dem die Toxizität von Bodenmaterial bzw. seine Habitatqualität beurteilt werden kann.

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

Kontaminierte und sanierte Böden werden in der Regel auf Grund chemischer und physikalischer Analysen beurteilt. Ein Boden gilt dann als "sauber", wenn sein Schadstoffgehalt die, für die jeweilige Nutzung vorgegebene Restkontamination nicht überschreitet. Ein solches Beurteilungsverfahren ist vom bodenbiologischen Standpunkt aus unzureichend. Es berücksichtigt nicht, daß

- (a) Böden von Altlaststandorten in der Regel mit einer Kombination von Schadstoffen belastet sind, deren mögliche synergistische Wirkungen bislang unbekannt sind;
- (b) das Gefährdungspotential von Schadstoffen bzw. Schadstoffkombinationen von den Eigenschaften der Bodenmatrix (pH-Wert, Humusgehalt, Tongehalt etc.) abhängt, die z.B. die Mobilisierbarkeit der Schadstoffe und ihre Verfügbarkeit für biologische Systeme bestimmen;
- (c) durch Abbauprozesse im Boden und bei mikrobiologischen Sanierungsverfahren Schadstoffmetabolite entstehen können, die durch die Analytik nicht erfaßt werden und deren Toxizität unbekannt ist;
- (d) bei der Sanierung Zuschlagsstoffe in das Bodenmaterial gelangen, die schon allein auf Grund ihrer Konzentration toxisch auf Organismen wirken können.

Im Gegensatz zu chemischen und physikalischen Prüfverfahren integrieren biologische Testverfahren die Effekte aller wirksamen Komponenten und zeigen deren Wirkung exemplarisch auf den getesteten biologischen Ebenen. Biologische Testverfahren können daher nachweisen,

ob Böden oder Bodenmaterialien in ihrer Leistungsfähigkeit, d.h. ihrer Güte eingeschränkt oder geschädigt sind.

Die Überprüfung der Leistungsfähigkeit von unbelasteten nativen Böden, sowie von belasteten und sanierten Bodenmaterial kann nicht mit Hilfe einzelner Biotests erfolgen. Dazu ist eine Batterie biologischer Testverfahren erforderlich, die mehrere biologische Ebenen des Bodens an Hand nachprüfbarer Parameter erfaßt. Geeignete Testverfahren müssen spezifische Vorbedingungen erfüllen, die von Westheide & Bethke-Beilfuss [13] für den Enchytraeen-Biotest definiert wurden. Dazu zählt u.a. genetisch einheitliches, schadstoffsensitives, ganzjährig in ausreichender Menge verfügbares, synchronisiertes Testmaterial, einfache Testdurchführung und eindeutige Testendpunkte.

Die freie Auswahl zwischen verschiedenen Testsystemen wird durch ein weiteres Kriterium eingeschränkt. Es besagt, daß es sich bei den zur Prüfung eingesetzten Testsystemen um standardisierte bzw. in der Standardisierung befindliche Systeme handeln sollte. Dieses Kriterium war für den Bereich Boden schwer erfüllbar, da z.B. zum Zeitpunkt des Untersuchungsbeginns nur der Regenwurm-Akutttest mit *Eisenia fetida* standardisiert war (ISO 11268-1, 1993).

Die Auswahl, der auf ihre Eignung für eine Testbatterie zu prüfenden Biotestsysteme, wurde daher auf Grund von Informationen über den Standardisierungsgrad von Testsystemen mit Bodeninvertebraten getroffen. Die Wahl fiel auf den Collembolen-Biotest mit *Folsomia candida* und den Enchytraeen-Biotest mit *Enchytraeus crypticus*. Für den Collembolen-Biotest lagen (a) ein Standardisierungsentwurf von Riepert [7] und (b) eine Testvorschrift von Jepson et al. [4] vor. Ein Enchytraeen-Biotest mit *E. crypticus* war von Westheide und Bethke-Beilfuss [13] und vom Rijksinstituuts voor Volksgezondheid en Milieuhygiene (RIVM) als SOP Nr. ECO/273/00 [8] ausgearbeitet. Dieser Biotest gehört seit 1993 zum Testrepertoire der Arbeitsgruppe [1].

Ausschlaggebend für die Wahl dieser beiden Biotestsysteme war vor allem, dass beide Organismen, *Folsomia candida* und *Enchytraeus crypticus*, bei 20°C eine Generationszeit von 17 bis 20 Tagen sowie eine ausreichend hohe Reproduktion aufweisen [5; 7; 14]. Die für Biotests ebenfalls geeignete Art *E. albidus* hat eine Generationszeit zwischen 38 und 74 Tagen [4] und entspricht in der Dauer etwa dem Regenwurm-Test. Auf Grund dieser Vorauswahl war es möglich eine weitgehend übereinstimmende Testvorschrift für beide Arten mit Mortalitäts- und Reproduktionstests gleicher Dauer auszuarbeiten. Da in den 28-Tage-Reproduktionstests neben Tieren der F1-Generation auch solche der F2-Generation vorhanden sind, sind diese Biotests als Life-cycle-Tests anzusehen. Die entwickelten Testvorschriften wurde in der Folge auf der Grundlage der Untersuchungsergebnisse weiter optimiert.

3 Angewandte Methoden

Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die standardisierten Testanleitungen. Beide Biotests arbeiten mit synchronisierten Tieren, d.h. Tieren die sich im Alter nur um ± 24 Stunden unterscheiden und von der gleichen Elternpopulation stammen. Die Testtiere werden auf unbelastetem Substrat (Collembolen: Gips-Kohle-Substrat; Enchytraeen: Agar-Agar) mit unbelastetem Standardfutter gezüchtet. Sie werden aus den Zuchtgefäßen ohne Adaptation direkt in das Bodentestsystem überführt. Die Futtermenge für *F. candida* wurde im Vergleich zur ISO/Cd

11267 erhöht, um eine optimale Vermehrung zu gewährleisten. Eine ausführliche Testanleitung liegt als Anhang bei.

Tab. 1: Kurze Übersicht über standardisierte Testanleitung für den Enchytraeen-Biotest und den Collembolen-Biotest

Testsystem	Enchytraeen-Biotest		Collembolen-Biotest	
Art	<i>Enchytraeus crypticus</i>		<i>Folsomia candida</i>	
Test-Endpunkt	Mortalität	Reproduktion	Mortalität	Reproduktion
Testdauer	7 d	28 d	7 d	28 d
Alter der Testpopulation	16 ± 1 bis 21 ± 1 Tage nach dem Schlüpfen			
Tiere/Test	10 Individuen pro Replik			
Replikate/ Konzentration	5			
Testgefäß	100 ml Duran Weithalsflasche, Schraubdeckel mit Tefloneinsatz, verschraubt während des Versuchs			
Belüftung	2/Woche			
Bodenmaterial (FG)/ Replik	15 g	30 g	15 g	30 g
Standardboden	LUFA 2.2			
Bodenfeuchte	60% maximale Wasserhaltekapazität			
Fütterung	0,5% Haferflocken im Boden	2 % Haferflocken im Boden	20 mg Trockenhefe bei Versuchs- beginn	20 mg Trockenhefe bei Versuchs- beginn & nach 14 d
Testtemperatur	20 ± 1 °C			
Beleuchtung	Dauerdunkel		natürliches Tageslicht	

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Untersuchungen zur Standardisierung der Testbedingungen

4.1.1 Die Reproduktionsraten im Collembolen- und Enchytraeen-Biotest im Standardboden LUFA 2.2

Für die Bestimmung der Toxizität und der Habitatqualität von Bodenmaterial muss in jedem Testdurchgang die Mortalität und die Reproduktion der Testtiere in unbelastetem Standardbodenmaterial erfaßt werden, da Schwankungen in den Mortalitäts- und Reproduktionsraten auch unter standardisierten Testbedingungen zu erwarten sind. Als unbelastetes Standardbodenmaterial wurde LUFA 2.2, ein Freilandboden der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt Speyer, eingesetzt. LUFA 2.2 ist mittelsaurer, lehmiger Sand (Sl2), dessen organischer Kohlenstoffgehalt bei 2,3% liegt. Mit ihm wurden im Rahmen des Projekts zwischen Oktober 1996 und September 1999 weit über hundert Testansätze durchgeführt. Im Akut-Test lag die Mortalität von *F. candida* bei $2,4 \pm 7,5$ % (n = 155) und von *E. crypticus* bei $1,8 \pm 5,7$ % (n = 152). Die mittlere Reproduktionsrate lag im Collembolen-Biotest bei $79,6 \pm 25,1$ Nachkommen/Elterntier \times 28 d (Median: 80,8; Minimum: 23,8; Maximum 142,3; n=160 Testansätze) und im Enchytraeen-Biotest bei $147,0 \pm 54,3$ Nachkommen/Elterntier \times 28d (Median: 141,4; Minimum: 27,2; Maximum 273,7; n=128 Testansätze).

Die Embryonalentwicklung von *F. candida* und *E. crypticus* bei 20°C ist in unbelastetem Medium kürzer als 10 Tage. Dies ermöglicht es, die Dauer des Reproduktionstests von 28 auf 21 Tage zu verkürzen. Zu diesem Zeitpunkt sind die Juvenilen der Kokons geschlüpft, die während der ersten 11 Tage abgelegt wurden. In dem verkürzten Test liegt die Reproduktionsrate von *F. candida* um 62,6 % und die von *E. crypticus* um 57,4 % unter den Werten der 28-Tage-Tests. Wie in Abb. 1 gezeigt wird, verändert sich bei Verkürzung des Reproduktionstests die Konzentrations-Wirkungsbeziehung in den Positivkontrollen nicht.

4.1.2 Einfluß der Bodenart auf die Reproduktionsraten

Im Rahmen des Projekts stand für die Überprüfung des Erfolgs der Sanierungsmaßnahmen in der Regel kein unbelasteter Kontrollboden, d.h. Bodenmaterial vom gleichen Standort (gleiche Bodenart mit gleichem Humusgehalt und pH-Wert) zur Verfügung. Für die Beurteilung des Sanierungserfolgs mußten daher die in Parallelansätzen ermittelten Reproduktionsraten im Standardboden LUFA 2.2 herangezogen werden. Dieses Vorgehen ist unbefriedigend, so lange nicht bekannt ist, wie die Reproduktion der Testorganismen von der Bodenart beeinflusst wird.

Gegen Ende der Projektlaufzeit wurde daher eine Versuchsreihe mit 19 nativen Bodenmaterialien (Tab. 2) unterschiedlicher Herkunft und OECD-Kunsterde durchgeführt, die Hinweise auf die Abhängigkeit der Reproduktionsraten von der Bodenart geben sollte. Die Versuche wurden unter Standardbedingungen durchgeführt, d.h. bei einer Bodenfeuchte von 60% WHK_{max}.

Im Enchytraeen-Biotest wurden 17 Bodenarten geprüft. Im Vergleich mit LUFA 2.2 lagen in 4 Bodenarten die Reproduktionsraten im Bereich des Standardbodenmaterials, in 1 signifikant höher und in 11 signifikant niedriger. In 5 dieser 11 Bodenmaterialien war die Reproduktion

sogar um über 50% reduziert. Im Collembolen-Biotest wurden 20 Böden getestet. In 9 Bodenmaterialien lag die Reproduktionsrate im gleichen Bereich wie im Standardbodenmaterial, in 4 signifikant höher und in 6 signifikant niedriger. In 4 von diesen 6 Bodenmaterialien war die Reproduktion um über 50% reduziert.

Tab. 2: Mittlere prozentuale Reproduktion von *E. crypticus* und *F. candida* in unbelasteten Bodenmaterialien im Vergleich zur Reproduktion im Standardbodenmaterial LUFA 2.2., geordnet nach Bodenart.

Bodenmaterial	Ursprung	Bodenart*	pH	Ench.-Biotest Repr. [%]	Coll.-Biotest Repr. [%]
Lufa2.1	Rheinzabern (Dt)	Ss	6,0	107,0	103,4
Lufa2.2	Hahnhofen (Dt)	Sl2	5,6	100,0	100,0
Lufa2.3	Offenbach (Dt)	Sl3	6,6	93,1	12,5
Berge	Berge (Dt)	Sl3	6,7	26,3	114,2
Thy St I	Thyrow (Dt)	Su2	7,0	98,9	93,4
Thy St 0	Thyrow (Dt)	Su2	6,9	66,6	112,6
Thy St II	Thyrow (Dt)	Su2	5,6	71,6	100,7
Dahlem	Berlin (Dt)	Su2	7,1	81,4	70,7
Blumberg	Blumberg (Dt)	Su3	5,6	29,9	139,7
OECD	Kunstaboden	tS	6,0	31,8	68,0
IP5	München (Dt)	Ls3/4	6,2	nb	105,1
Euro3	Wales (GB)	Sl4/Ls3	5,9	53,7	107,6
IP2	München (Dt)	Ls2/3	6,4	nb	89,5
LA	München (DT)	Lu	6,9	136,2	46,8
Euro2	Peloponnes (Gr)	Lu	7,5	54,5	27,4
EPAK1a	Essen (Dt)	Ut2	7,6	56,0	100,0
Mü	Bayern (Dt)	Ut3	7,3	nb	94,1
Euro6	Normandie (Fr)	Ut3	7,3	2,5	117,2
Euro4	Normandie (Fr)	Ut4	7,1	84,3	6,6
Euro1	Sizilien (It)	Tt	5,4	4,5	102,1

*Bodenarten: siehe Abkürzungsverzeichnis

Bei einer Reihe von Bodenmaterialien zeigten sich in beiden Testsystemen keine signifikanten Unterschiede zu den Reproduktionsraten im Standardbodenmaterial, so z.B. in den Böden LUFA 2.1 und LUFA 2.3, die ebenfalls als Standardböden angeboten werden. Auch in den schluffigen Sanden aus Thyrow (Thyst 0, Thyst I, Thyst II) waren nur geringe Unterschiede in den Reproduktionsleistungen feststellbar.

Dagegen vermehrt sich *E. crypticus* im lehmigen Sand von Berge sehr schlecht, während *F. candida* hier sogar eine erhöhte Reproduktionsrate aufweist. Die Reproduktionsleistung beider Arten wird von den Eurosoils 1, 2, 3, 4 und 6 unterschiedlich beeinflusst. Zum Beispiel vermehren sich die Collembolen in Eurosoil 1 und Eurosoil 6 sehr gut, während die Enchytraeen ihre Vermehrung praktisch einstellen. Leider stand von den Eurosoils nur wenig Material zur Verfügung, so daß weitergehende Untersuchungen nicht möglich waren. Von besonderer Wichtigkeit für die Chemikalienprüfung ist der Befund, daß die Reproduktionsraten beider Arten in OECD-Kunsterde, einem "tonigen Sand", stark reduziert sind.

4.1.3 Der Einfluß der Bodenfeuchte auf die Reproduktionsrate

Die Primärbesiedler *E. crypticus* und *E. albidus* sind Bewohner der Bodenwasserphase. Sie vermehren sich in LUFA 2.2 bei einem Feuchtgehalt zwischen 40 und 95% WHK_{max} am besten. Bei niedrigeren und höheren Feuchten sinkt ihre Reproduktion. Auch *E. buchholzi* zeigt in LUFA 2.2 zwischen 40 und 90% Feuchte eine fast gleichbleibend hohe Reproduktionsrate [3] ebenso wie *E. albidus* in OECD-Kunsterde. Im Gegensatz dazu vermehrt sich *E. crypticus* in diesem Material bei niedrigeren Feuchten (35%) besser als bei hohen [4].

Tab. 3: Einfluss der Bodenfeuchte auf die Reproduktion von *Folsomia candida* in unkontaminierten Bodenmaterialien. Mittelwerte ± Standardabweichung, n = 5

Bodenmaterial (Bodenart)	Reproduktionsrate (Nachkommen/Elterntier nach 28 Tagen)				
	WHK _{max} 40%	WHK _{max} 50%	WHK _{max} 60%	WHK _{max} 70%	WHK _{max} 80%
LUFA 2.2 (SI2)	53,7 ± 2,5	58,7 ± 14,5	56,2 ± 8,3	n.b.	n.b.
LUFA 2.3 (SI3)	37,3 ± 7,9	35,9 ± 11,2	32,7 ± 4,8	32,8 ± 8,7	9,5 ± 7,9*
IP2 (Ls2/3)	104,8 ± 17,1	121,3 ± 19,8	121,9 ± 6,1	n.b.	n.b.
IP5 (Ls3/4)	92,8 ± 22,7	105,5 ± 20,8	89,9 ± 11,5	59,2 ± 12,8*	77,3 ± 28,0
EPAK1a (Ut2)	53,9 ± 23,2*	110,0 ± 11,9	110,5 ± 11,6	94,1 ± 20,3	101,1 ± 14,6
EPAK1a (Ut2)	118,0 ± 21,0	136,9 ± 39,1	138,3 ± 20,5	n.b.	n.b.
Blumberg (Su3)	59,9 ± 12,2*	98,5 ± 3,9*	122,2 ± 8,1	134,0 ± 12,2	129,0 ± 6,8
Blumberg (Su3)	31,5 ± 10,4*	35,9 ± 8,9*	78,6 ± 10,8	n.b.	n.b.

n.b. nicht bestimmt. *): signifikanter Unterschiede zur Reproduktion bei 60% WHK_{max}.

Die Collembolenart *F. candida* ist eine euedapische Art, die feuchte, luftgefüllte Hohlräume des Bodens bewohnt. Es wurde daher geprüft, ob *F. candida* auf Veränderungen der Bodenfeuchte ähnlich reagiert wie *E. crypticus*. Diese Untersuchung wurde mit 6 Bodenmaterialien durchgeführt (Tab. 3). In den Sand- und Lehmböden kommt es bei hohen Feuchten zur Verminderung der Reproduktion, in den Schluffböden dagegen bei geringen Feuchten. Die Untersuchungen mit dem Bodenmaterial EPAK1a und Blumberg wurde zweimal zu unterschiedlichen Zeiten durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen die gleiche Tendenz.

4.1.4 Einfluß des pH-Werts auf Mortalität und Reproduktion

Der optimale pH-Bereich für Überleben und Fortpflanzung von *E. crypticus* liegt zwischen pH 5,3 und 6,8. Außerhalb dieses pH-Bereichs steigt die Mortalität an und die Reproduktion sinkt. Unter pH 4,7 ist die Mortalität stark erhöht. Da diese Werte z.T. mit Hilfe des Agar-agar-Testsystems ermittelt wurden, können Schwermetalleffekte ausgeschlossen werden [2].

Tab. 4: Einfluß des pH-Wertes auf Mortalität und Reproduktion von *Folsomia candida*.

Aufkalken und Ansäuern sowie die Einstellung der Feuchte (60% WHK_{max}) erfolgte 6 Monate vor Versuchsbeginn. Die Proben wurden bei Zimmertemperatur gelagert. Mittelwert ± Standardabweichung, n = 5;

Bodenmaterial	pH	Zusatz	Mortalität [%]	Reproduktion ¹ [%]
LUFA 2.2				
Kontrolle	5,2	---	0,0	86,0 ± 4,1
Ansäuerung	4,3	2,2 ml/kg 32% HCl	0,0	53,1 ± 3,9 *
Kontrolle	5,6	---	4,0 ± 4,9	77,0 ± 8,1
Aufkalkung (a)	6,1	5g/kg CaCO ₃	8,0 ± 7,5	81,5 ± 5,4 *
Aufkalkung (b)	6,9	50g/kg CaCO ₃	0	66,8 ± 13,4
CTNT0	3,4	---	2,0 ± 3,7	33,5 ± 5,6
Aufkalkung (a)	4,6	5g/kg CaCO ₃	4,0 ± 4,9	67,1 ± 6,1 *
Aufkalkung (b)	6,4	50g/kg CaCO ₃	16,0 ± 8,0	33,4 ± 12,7

* sign. Unterschied zur Kontrolle (t-Test)

¹ Reproduktion (Individuen/Elterntier × 28d)

Auch die Reproduktion von *Folsomia candida* wird durch den pH-Wert des Bodens beeinflusst (Tab. 4). Während eine Ansäuerung von LUFA 2.2 die Mortalitätsrate nicht erhöht, wird die Reproduktion um ca. 40% reduziert. Bei einer Aufkalkung von LUFA 2.2 erhöht sich die Re-

produktionsrate zunächst signifikant. Bei höheren Werten sinkt sie wieder. Bei der Aufkalkung des sauren, stark schwermetallbelasteten Bodens CTNT0 verdoppelt sich die Reproduktionsrate bei einer Erhöhung des pH-Werts von 3,4 auf 4,6 und sinkt bei höherem pH-Wert wieder.

4.1.5 Die LC50- und EC50-Werte für die Referenzsubstanz Betanal(+)

Vergleichsuntersuchungen zeigen, daß die Referenzsubstanz für den Collembolen-Biotest Betanal(+) (Wirkstoff Phenmedipham: 3-[Methoxycarbonyl-aminophenyl]-N-[3'-methyl-phenyl]-carbamat) auch im Enchytraeen-Biotest verwendet werden kann. Dieses Blattherbizid beeinflusst sowohl die Mortalität als auch die Reproduktion von *E. crypticus*, während Derosal 60 Spritzpulver (Wirkstoff Carbendazim) nur die Reproduktionsrate reduziert. Die vorliegenden LC50- und EC50-Werte für *E. crypticus* und *F. candida* (Tab. 5) zeigen, daß die Unterschiede zwischen den Meßreihen, die zwischen Herbst 1996 und Frühjahr 1999 wurden, nur gering sind. Die Empfindlichkeit der beiden Arten veränderte sich also während des dreijährigen Untersuchungszeitraums nicht. *F. candida* reagiert auf Betanal(+) wesentlich sensibler als *E. crypticus*.

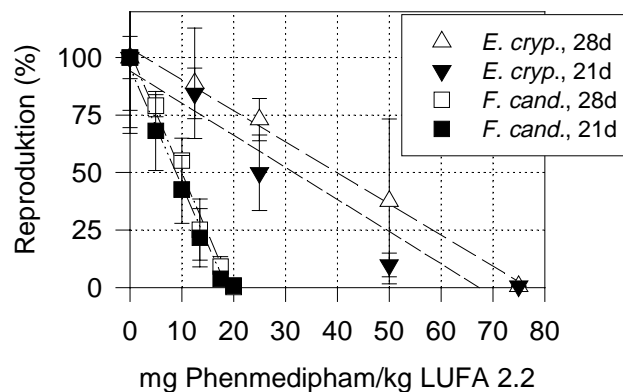


Abb. 1: Collembolen- und Enchytraeen-Biotest, Positivkontrolle mit Betanal+ (Expositions-dauer 21 bzw. 28 Tage)

Tab. 5: Wirkkonzentrationen der Substanzen für die Positivkontrollen in mg Wirkstoff/kg LUFA 2.2 im Collembolen- und Enchytraeen-Test unter Standardbedingungen zwischen Juni 1996 und März 1999.

Testsystem	LC 50 (7d)	EC 50 (28d)	Testperiode
Chloracetamid			
Enchytraeen-Test	172	177	10/1996
Derosal 60 Spritzpulver (Wirkstoff: Carbendazim)			
Enchytraeen-Test	nicht wirksam	10	5/1997
Collembolen-Test	nicht wirksam	nicht wirksam	12/1997

Tab. 5: (Fortsetzung)

Testsystem	LC 50 (7d)	EC 50 (28d)	Testperiode
Betanal(+) (Wirkstoff: Phenmedipham)			
Collembolen-Test	16,5	14	6/1997
Collembolen-Test	15	9,5	12/1997
Collembolen-Test	13	9,5	11/1998
Collembolen-Test	n.b.	10	3/1999
Collembolen-Test	n.b.	9 (21d)	3/1999
Enchytraeen-Test	72	25	2/1998
Enchytraeen-Test	90	35	11/1998
Enchytraeen-Test	n.b.	39	3/1999
Enchytraeen-Test	n.b.	32 (21d)	3/1999

n.b.: nicht bestimmt; (21d): Testdauer: 21 Tage

Tab. 6: Übersicht über die Ergebnisse mit verschiedenen Bodenmaterialien. Die Angaben zur Mortalität und Reproduktion sind Mittelwerte aus Mehrfachbestimmungen. Sie sind auf die zugehörigen Bestimmungen mit Standardbodenmaterial LUFA 2.2 bezogen.

Probe	Bodenmaterial		Enchytraeen-Biotest		Collembolen-Biotest	
	Bodenart ¹	Zustand	Mortalität (%)	Reprodukt. (%)	Mortalität (%)	Reprodukt. (%)
OMKW 0	Ls2	K	4,0	82,6	4,0	4,2*
OMKW1a	Su3	bel.	28,0*	54,7*	2,0	133,9
OMKW1b	Sl4	san.	10,0	7,6*	10,0*	9,3*
BMKW 0	Ss	K	0,0	40,4*	18,4*	6,0*
BMKW1a	St2	bel.	0,0	9,5*	100,0*	0,0*
EPAK1a	Ut2	K	-8,9	69,4	12,8	88,0
EPAK1b	Uu	K/san.	6,7	49,9*	2,1	31,0*
EPAK2a	Us	bel.	12,0	40,1*	34,0*	6,5*
EPAK2b	Us	san.	18,0*	66,3*	8,0*	25,4*
EPAK3a	Ut2	bel.	11,1	18,1*	8,5	72,0

Tab. 6: (Fortsetzung)

Probe	Bodenmaterial		Enchytraeen-Biotest		Collembolen-Biotest	
	Bodenart ¹	Zustand	Mortalität [%]	Reprodukt. [%]	Mortalität [%]	Reprodukt. [%]
EPAK3b	Ut2	san.	2,2	30,0*	2,1	57,5*
EPAK4a	Sl4	bel.	100,0*	0,0*	100,0*	0,0*
EPAK4b	Lt2	san.	14,0	27,5*	6,0	81,0
SPAK1a	Sl2	bel.	100,0*	0,0*	100,0*	0,0*
SPAK1b	Sl3/4	san.	-2,0	2,8*	-2,1	3,4*
CWPAK1a	Ss	bel.	10,2	46,7*	75,5*	3,6*
CWPAK1b	Ss	san. (SF)	55,1*	4,7*	93,9*	0,0*
CWPAK1c	Lu	san. (FF)	22,4*	0,0*	0,0	57,3
LTNT1a	Ss	bel.	18,0	26,1*	100,0*	0,0*
LTNT1b	Ss	san. (SF)	0,0	0,1*	82,0*	0,0*
LTNT1c	Uls	san. (FF)	0,0	94,1	14,0*	59,5*
CTNT0	Lu	K	68,0*	0,5*	0,0	84,2
CTNT1a	Lu	bel.	28,0*	13,3*	100,0*	0,0*
CTNT02a	Lu	K/unsan.	-2,0	0,9*	-2,0	128,5
CTNT2a	Slu	bel.	-1,0	22,3*	100,0*	0,0*
CTNT04b	Ls2	K/san.	4,0	6,3*	6,1	0,8*
CTNT4a	Slu	bel.	10,2	3,0*	100,0*	0,0*
CTNT4b	Ls3	san.	3,0	63,0*	6,1	69,3*

¹ Bodenarten: siehe Abkürzungsverzeichnis

K= Kontrolle, bel.= belastet, san.= saniert, K/unsan.= unsanierte Kontrolle, K/san.= sanierte Kontrolle; SF= Sandfraktion, FF= Feinkornfraktion, *): signifikante Abweichung zum Ergebnis in LUFA 2.2.

Auch die Verkürzung der Expositionsdauer von 28 auf 21 Tagen beeinflusst die EC50-Werte in beiden Testsystemen nur unwesentlich (Abb. 1), obwohl die Anzahl der Nachkommen nach 28 Tage um ca. 60% höher ist als nach 21 Tagen. Dieser Befund ist von besonderer Bedeutung, da nach 21 Tagen im wesentlichen nur Tiere der Eltern- und F1-Generation vorhanden sind (Reproduktions-Test), während nach 28 Tagen ein Teil der Tiere schon zur F2-Generation zählt (Life cycle Test).

4.2 Untersuchungen zur Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Schadstoffen in Altlastböden

Die Bodenmaterialien, ihre Klassifizierung an Hand der Körnungsart und ihr Sanierungszustand sind zusammen mit Angaben zur Mortalität und Reproduktion im Vergleich zu den Werten in LUFA 2.2 in Tabelle 6 angeführt. Die Kontamination der Bodenmaterialien kann dem Bericht der Koordination entnommen werden.

4.2.1 Untersuchungen mit PAK-belasteten Böden

Die Konzentrations-Wirkungsbeziehung für die PAK-Belastung wurde mit den Bodenmaterialien EPAK3a, EPAK4a und SPAK1a durchgeführt. Da EPAK3a nur eine geringe Toxizität aufweist (Tab. 9), erfolgte die Analyse mit EPAK4a und SPAK1a. Für den Mortalitätstest wurde der Boden EPAK4a sowohl mit dem Standardboden LUFA 2.2 als auch mit dem Kontrollboden EPAK1a verdünnt. Die Verdünnungen mit diesen unterschiedlichen Bodenmaterialien resultierten in unterschiedlichen LC50-Werten (Tab. 7; Abb. 2).

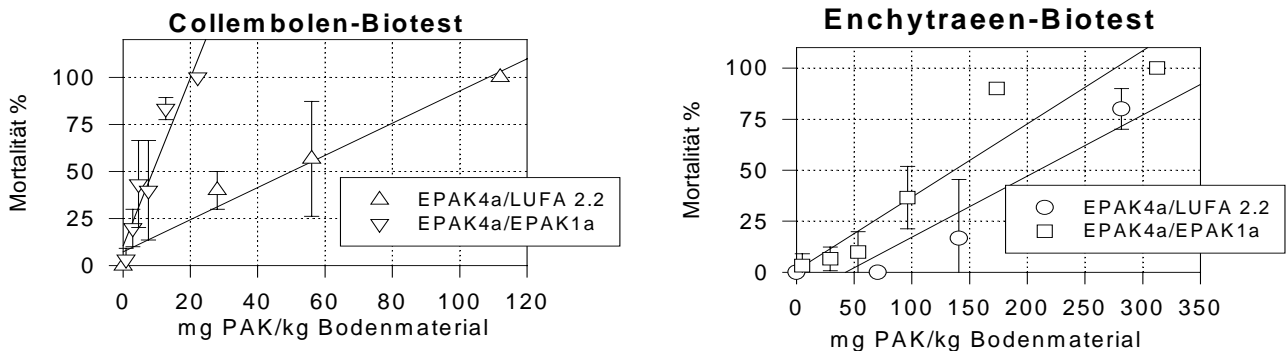


Abb. 2: Konzentrations-Wirkungsbeziehung für PAK-belastetes Bodenmaterial EPAK4a, bei Verdünnung mit LUFA 2.2 oder EPAK1a

Tab. 7: LC 50- und EC 50-Werte für PAK in den Altlastböden EPAK4a und SPAK1a bei Verdünnung mit LUFA 2.2 bzw. EPAK1a.

Bodenmaterial	Collembohlen-Biotest		Enchytraeen-Biotest	
	LC 50 (7d) [mg PAK/kg]	EC 50 (28d) [mg PAK/kg]	LC 50 (7d) [mg PAK/kg]	EC 50 (28d) [mg PAK/kg]
EPAK4a/EPAK1a	10	n.b.	130	n.b.
EPAK4a/LUFA 2.2	50	n.b.	210	n.b.
EPAK4a/EPAK1a	20	10,2	135	65
SPAK1a/LUFA 2.2	220	260	550	380

n.b.: nicht bestimmt.

In den Reproduktionstests mit EPAK4a und SPAK1a erwies sich *F. candida* als wesentlich empfindlicher als *E. crypticus* (Abb. 3). In SPAK1a, der für diese Versuche mit LUFA 2.2 verdünnt wurde, sind die LC- und EC-Werte für *F. candida* mehr als 20-fach höher als in EPAK4a/EPAK1a-Mischung, während sie für *E. crypticus* ca. 5-fach höher sind (Tab. 7).

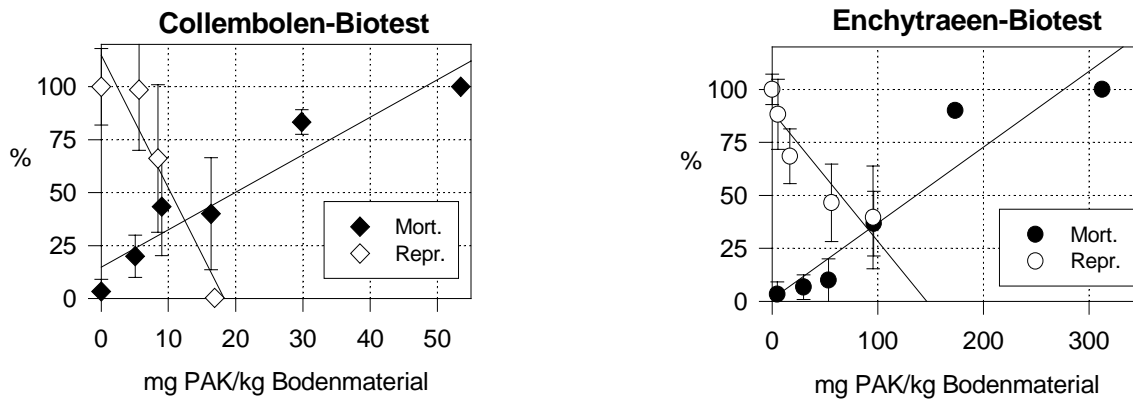


Abb. 3: Konzentrations-Wirkungsbeziehung für PAK-belastetes Bodenmaterial EPAK4a, bei Verdünnung mit EPAK1a

4.2.2 Untersuchungen für TNT-belastete Böden

Die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für TNT wurde mit dem aufdotierten Standardboden LUFA 2.2, mit Bodenmaterial aus dem ehemaligen Sprengstoffwerk Tanne CTNT1a, den Altlasten TETNT1a und LTNT1a sowie dem sanierten Material LTNT1b, einer Sandfraktion aus einem Bodenwaschverfahren, bestimmt. Da kein brauchbarer Kontrollboden zur Verfügung stand, wurden alle Verdünnungen mit Standardbodenmaterial LUFA 2.2 durchgeführt. Im Gegensatz zu den übrigen Proben enthielt TETNT1a neben TNT (4577 mg/kg) noch weitere Explosivstoffe wie Hexogen (482 mg/kg) und Octogen (56 mg/kg).

Sowohl für den TNT-aufdotierten Standardboden, als auch für die Altlastböden (Abb. 4) ließen sich Konzentrations-Wirkungskurven erstellen, aus denen die in Tab. 8 angeführten LC50- und EC50-Werte abgeleitet wurden. Die hohe Toxizität von TETNT1a läßt sich nicht auf seinen Gehalt an anderen Explosivstoffen zurückführen, da diese in den vorhandenen Konzentrationen weder im Collembolen- noch im Enchytraeen-Biotest toxisch wirken (Schäfer & Achazi 1999 [12]). Die durch den Waschprozess aus LTNT1a gewonnene Sandfraktion LTNT1b war im Mortalitätstest mit *E. crypticus* nicht toxisch. Durch die Sanierung stieg jedoch die Toxizität im Reproduktionstest um das 19-fache. Im Collembolen-Biotest wurde die Toxizität durch die Sanierung im Mortalitäts-Test 9-fach und im Reproduktionstest 6,5-fach erhöht.

Tab. 8: LC50 und EC50 für TNT im Standardboden LUFA 2.2 und in den sprengstoff-kontaminierten Bodenmaterialien CTNT1a, TETNT1a und LTNT1a, sowie mit dem durch Waschen sanierten Bodenmaterial LTNT1b.

Bodenmaterial	Collembolen-Biotest		Enchytraeen-Biotest	
	LC50 (7d) mg TNT/kg	EC50 (28d) mg TNT/kg	LC50 (7d) mg TNT/kg	EC50 (28d) mg TNT/kg
LUFA 2.2	420 ¹	315 ¹	1290	480
CTNT1a/LUFA 2.2	630	280	> 1600	1150
LTNT1a/LUFA 2.2	720	460	nm ²	1340
LTNT1b/LUFA 2.2	77	70	nm	70
TETNT1a/LUFA 2.2	185	110	570	360

¹ Bodenmaterial 1 Monat gealtert;

² nm: nicht meßbar

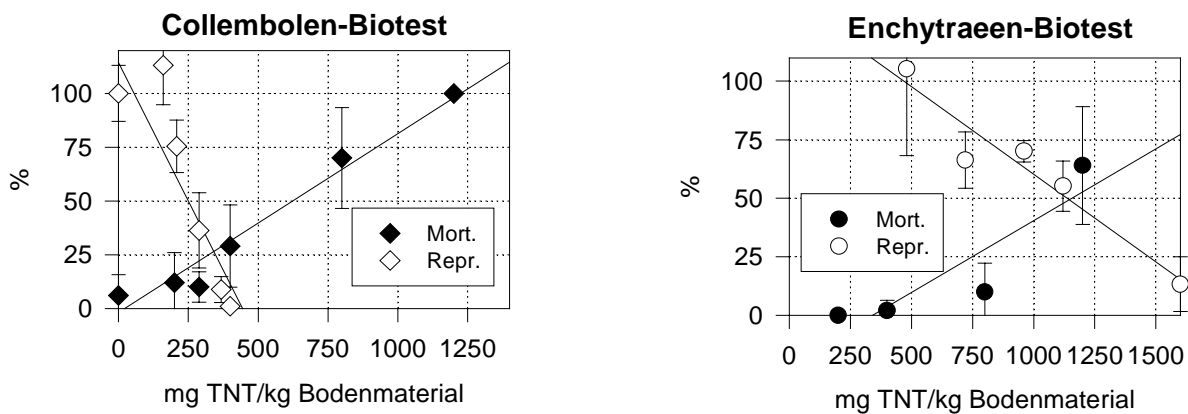


Abb. 4: Konzentrations-Wirkungsbeziehung für TNT-belastetes Bodenmaterial CTNT1a, bei Verdünnung mit LUFA 2.2

4.2.3 Untersuchung mit einem MKW-belasteten Bodenmaterial

Für das hochbelastete Bodenmaterial BMKW1a wurde die Konzentrations-Wirkungsbeziehung nur für den Collembolen-Biotest ermittelt. Die LC50 lag hier bei ca. 2230 mg MKW/kg Bodenmaterial, die EC50 bei ca. 1150 mg MKW/kg.

4.3 Überprüfung der Habitatqualität von Bodenmaterial vor und nach der Sanierung

Für diese Untersuchungen standen Bodenmaterialien von Altlastenstandorten zur Verfügung, die auf Grund der jeweiligen Hauptkontamination in MKW-, PAK- und TNT-belastetes Bodenmaterial unterteilt wurden (Tab. 6; Tab. 9). Nach Abschluß der Sanierungsmaßnahmen war die Konzentration der organischen Schadstoffkomponenten reduziert, während sich die Schwermetallbelastung nur unwesentlich verändert hatte. Eine genaue Verfahrensbeschreibung für die Sanierungsmethoden stand nicht zur Verfügung, da diese ebenso wie die Art und Menge der Zuschlagsstoffe als Firmengeheimnis behandelt werden. In keinem einzigen Fall stand adäquates Kontrollboden-Material zur Verfügung. Der Erfolg der Sanierungsmaßnahmen wurde daher immer an Hand der gleichzeitig bestimmten Mortalitäts- und Reproduktionsdaten in LUFA 2.2 beurteilt.

Tab. 9: Toxizität des geprüften Bodenmaterials und die Veränderung seiner Habitateigenschaften durch die Sanierung. (Ausgangsmaterial und saniertes Bodenmaterial sind schwarz eingrahmt).

Bodenmaterial	Zustand	Enchytraeen-Biotest				Collembolen-Biotest				Störung
		Mort.-Test		Repr.-Test		Mort.-Test		Repr.-Test		
		Tox. ¹	SE ²	Tox.	SE	Tox.	SE	Tox.	SE	
MKW										
OMKW 0	K	--		--		--		++		
OMKW1a	bel.	+		+		--		--		
OMKW1b	san.	--	↑	++	↓	+	↓	++	↓	
BMKW 0	K	--		++		+		++		
BMKW1a	bel.	--		++		+++		+++		
PAK										
EPAK1a	K	--		--		--		--		
EPAK1b	K/san.	--	↔	++	↓	--	↔	++	↓	
EPAK2a	bel.	--		++		+		++		
EPAK2b	san.	+	↓	+	↑	+	↔	++	↔	
EPAK3a	bel.	--		++		--		--		
EPAK3b	san.	--	↔	++	↔	--	↔	+	↓	

Tab. 9: (Fortsetzung)

Boden- material	Zustand	Enchytraeen-Biotest				Collembolen-Biotest				Störung
		Mort.-Test		Repr.-Test		Mort.-Test		Repr.-Test		
		Tox. ¹	SE ²	Tox.	SE	Tox.	SE	Tox.	SE	
PAK (Fortsetzung)										
EPAK4 a	bel.	+++		+++		+++		+++		
EPAK4 b	san.	--	↑	++	↑	--	↑	--	↑	
SPAK1a	bel.	+++		+++		+++		+++		
SPAK 1b	san.	--	↑	++	↑	--	↑	++	↑	
CWPAK1a	bel.	--		+		++		++		
CWPAK1b	san./SF	++	↓	++	↓	++	↔	+++	↓	pH 9,2
CWPAK1c	san./FF	+	↓	+++	↓	--	↑	+	↑	
TNT										
LTNT1a	bel.	--		++		+++		+++		
LTNT1b	san./SF	--	↔	+++	↓	++	↑	+++	↔	
LTNT1c	san./FF	--	↔	--	↑	+	↑	++	↑	
CTNT0	K	++		+++		--		--		pH 3,8
CTNT1a	bel.	+		++		+++		+++		
CTNT02a	K/unsan.	--		+++		--		--		pH 4,1
CTNT2a	bel.	--		++		+++		+++		
CTNT04b	K/san.	--		++		--		+++		
CTNT4a	bel.	--		++		+++		+++		
CTNT4b	san.	--	↔	+	↑	--	↑	+	↑	

¹ Toxizität: --: nicht toxisch; +: mäßig toxisch; ++: toxisch; +++: hoch toxisch;

² SE: Sanierungseffekt: ↑ : verbessert; ↔ : unverändert; ↓ : verschlechtert

³ K= Kontrolle, bel.= belastet, san.= saniert, K/unsan.= unsanierte Kontrolle, K/san.= sanierte Kontrolle; SF= Sandfraktion, FF= Feinkornfraktion

4.3.1 Der Einfluß des dynamischen Mietenverfahrens auf die Habitatqualität des MKW belasteten Bodens OMKW

Für diese Untersuchung stand das Altlastmaterial OMKW1a und das daraus gewonnene sanierte Bodenmaterial OMKW1b zur Verfügung sowie BMKW0, ein Bodenmaterial von einem naheliegenden Acker. OMKW0 eignete sich jedoch nicht als Kontrollboden, da sich *F. candida* darin nicht vermehrte.

Im Enchytraeen-Test betrug die Mortalität in OMKW1a im Mittel 28% und sank durch die Sanierung auf 10%. Die Reproduktionsrate war dagegen im sanierten Material wesentlich stärker reduziert als im unsanierten. Im Collembolen-Biotest war die Mortalität nur in OMKW1b signifikant erhöht. Die Reproduktionsrate lag im unsanierten Bodenmaterial OMKW1a höher als in LUFA 2.2, war aber im sanierten Material auf 9% reduziert. Das dynamische Mietenverfahren verbesserte also die Habitatqualität des OMKW-Bodens nicht.

4.3.2 Mortalität und Reproduktion im MKW belasteten Material BMKW

Für eine weitere Untersuchung standen die mit Mineralöl unterschiedlich stark kontaminierten Bodenmaterialien BMKW0 und BMKW1a aus Bremerhaven zur Verfügung. Im Mortalitätstest mit *E. crypticus* waren die beiden Bodenmaterialien nicht toxisch, wohl dagegen im Reproduktionstest. Im Collembolen-Biotest betrug die Mortalität in BMKW0 20 %, in BMKW1a sogar 100%. In BMKW0 ließ sich noch eine geringfügige Reproduktion nachweisen. In BMKW1a wurden erwartungsgemäß keine Nachkommen gefunden. Saniertes Material stand nicht zur Verfügung.

4.3.3 Einfluss des Sprudelbett-Verfahrens auf die Lebensraumqualität von PAK-belastetem Bodenmaterial

Der PAK-Gehalt des Bodenmaterials EPAK1a, EPAK2a und EPAK3a wurde durch das Biodyn-Sprudelbett-Verfahren nicht wesentlich verändert. Im Vergleich zu LUFA 2.2 ist die Mortalität von *E. crypticus* in den drei Ausgangsböden und den sanierten Proben EPAK1b und EPAK3b nur geringfügig erhöht und damit ökotoxikologisch nicht relevant. Im sanierten Material EPAK2b lag dagegen die Mortalität bei 18%.

In EPAK4a betrug die Mortalität 100%. Die Sanierung verbessert jedoch die Bodenqualität soweit, daß in EPAK4b nur noch 14% der Tiere starben. *E. crypticus* vermehrte sich im sanierten Material nicht, nach Sanierung, d.h. in EPAK4b, lag die Reproduktion bei 27% des LUFA 2.2-Wertes. Die Ergebnisse des Collembolen-Biotest sind mit dem des Enchytraeen-Biotests vergleichbar und die Reproduktion liegt im sanierten Material ähnlich hoch wie im Standardbodenmaterial. Mit Hilfe der Biotest-Systeme läßt sich also eine beträchtliche Verbesserung der Habitatqualität durch die Sanierung nachweisen.

4.3.4 Einfluß der PAK-Humifizierung auf die Lebensraumqualität eines PAK- und Chrom-belasteten Bodens

Durch die Humifizierung kam es zu einer Reduktion des PAK-Gehalts in SPAK1a um über 95%. Vor der Sanierung lag die Mortalität in beiden Biotests bei 100%. Eine Reproduktion ließ sich nicht nachweisen. Nach der Sanierung überlebten dagegen alle eingesetzten Tiere. Eine Reproduktion fand jedoch praktisch nicht statt. Die Habitatqualität von SPAK1a verbesserte sich also durch Humifizierung der PAK nicht wesentlich.

4.3.5 Einfluß der Bodenwäsche auf die Lebensraumqualität eines mit PAK, MKW, Kupfer und Zink belasteten Bodens

Bei der Bodenwäsche wurde das kontaminierte Bodenmaterial CWPAK1a unter Zusatz von Reagenzien in die schwach kontaminierte Sandfraktion CWPAK1b und die hoch kontaminierte Feinkornfraktion CWPAK1c aufgetrennt. Im Enchytraeen-Test war die Mortalität im Ausgangsmaterial im Vergleich zu LUFA 2.2 nur geringfügig erhöht, lag aber in der Sand- bzw. Feinkornfraktion bei 55% bzw. bei 22% des LUFA 2.2-Wertes. Die Reproduktionsrate war in CWPAK1a um ca. 53%, in CWPAK1b um 95% und die in CWPAK1c um 100% reduziert.

Im Collembolen-Biotest war die Mortalität in der Sandfraktion höher als im Ausgangsmaterial, während in der Feinkornfraktion alle Tiere überlebten. Die Reproduktionsraten verhielten sich dementsprechend, d.h. nur in der Feinkornfraktion fand eine nennenswerte Vermehrung statt.

4.3.6 Untersuchungen zum Sanierungserfolg von sprengstoffbelasteten Bodenmaterialien

4.3.6.1 Einfluß des Bodenwaschverfahrens auf die Lebensraumqualität von TNT belastetem Bodenmaterial

Durch das Bodenwaschverfahren wurde das Ausgangsmaterial LTNT1a in die Sandfraktion LTNT1b und die Feinkornfraktion LTNT1c aufgetrennt. Unmittelbar nach Abschluß des Trennverfahrens enthielt, die mit organischen Material stark angereicherte Feinkornfraktion LTNT1c 7274 mg TNT/kg (TS), nach 6wöchiger Lagerung jedoch nur noch 30 mg/kg (TS). Die Konzentration in der Sandfraktion LTNT1b lag zu diesem Zeitpunkt bei 80 mg/kg. Der starke Rückgang der TNT-Konzentration in LTNT1c könnte auf eine hohe mikrobiologische Aktivität und eine Adsorption an die organischen Matrix hinweisen.

Im Collembolen-Biotest lag die Mortalität in LTNT1a bei 100% und in LTNT1b bei 82%. In beiden Bodenmaterialien fand keine Reproduktion statt. In der Feinkornfraktion LTNT1c betrug die Mortalität dagegen nur 14,0% und die Reproduktion lag bei 59,5% des LUFA 2.2-Vergleichswerts. Im Enchytraeen-Biotest lag die Mortalität im Ausgangsmaterial LTNT1a bei 18 %, während weder in der Sand- noch der Feinkornfraktion Enchytraeen starben. Die Reproduktion erwies sich als der sensitivere Parameter. Sie lag in LTNT1a bei 26%, in LTNT1b bei 0% und in LTNT1c bei 94 %. Durch das Waschverfahren verbesserte sich also nur die Habitatqualität der Feinkornfraktion, nicht dagegen die der für die Verwendung vorgesehenen Sandfraktion.

4.3.6.2 Die Auswirkung der Sanierung auf die Habitatqualität von Bodenmaterial aus dem ehemaligen Sprengstoffwerk Tanne

Der Boden des ehemaligen Sprengstoffwerks Tanne ist teilweise hoch mit TNT belastet. Weitere Kontaminanten sind PAK und Schwermetalle, besonders Blei und Zink. Mit Bodenmaterial dieses Standorts wurden Pilotverfahren zur Sanierung durchgeführt. Den Projektteilnehmern wurden bis zum Projektschluß 7 verschiedene Bodenchargen zur Verfügung gestellt.

Das gering mit TNT belastete Material CTNT0 war als Kontrollmaterial für CTNT1a vorgesehen. Auf Grund seines niedrigen pH-Wertes (pH 3,8) war es jedoch für den Enchytraeen-Biotest ungeeignet. Das kontaminierte Bodenmaterial CTNT1a war in beiden Biotests toxisch.

Als Kontrollmaterial für die besonders hoch belastete Charge CTNT2a stand CTNT02a zur Verfügung. In CTNT02a überlebten alle Enchytraeen und Collembolen. Im Reproduktionstest mit *E. crypticus* wurden jedoch fast keine Nachkommen gefunden, was möglicherweise auf den sauren pH-Wert (pH 4,1) dieses Bodenmaterials zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu vermehrten sich die Collembolen in CTNT02a besonders gut. Der mit 7600 mg TNT/kg belastete Boden CTNT2a war im Mortalitätstest für *E. crypticus* nicht toxisch, hemmte jedoch die Reproduktion stark, während die Collembolen in diesem Bodenmaterial nicht überlebten. Saniertes CTNT2-Material stand nicht zur Verfügung.

Nur für das Bodenmaterial CTNT4 standen drei unterschiedliche behandelte Chargen zur Verfügung. CTNT4a, das belastete Ausgangsmaterial, war im Enchytraeen-Mortalitäts-Test nicht toxisch, unterband aber die Reproduktion fast vollständig. Im Collembolen-Biotest war es absolut toxisch. Nach der Sanierung im Mietenverfahren war dieses Material (CTNT4b) in den Mortalitäts-Tests nicht mehr toxisch. Im Enchytraeen-Biotest verbesserte sich die Reproduktionsrate auf 63%, im Collembolen-Biotest auf 69%.

Das nicht mit TNT belastete Kontrollboden-Material CTNT04b war dem gleichen Sanierungsverfahren unterzogen worden wie CTNT4b. Es konnte also damit geprüft werden, ob das Sanierungsverfahren selbst die Habitatqualität beeinträchtigt. Im Mortalitätstest war CTNT04b nicht toxisch, die Reproduktion wurde jedoch in beiden Testsystemen fast vollständig unterdrückt. Da kein unsaniertes Ausgangsmaterial zur Verfügung stand, konnte nicht geklärt werden, ob die hohe Toxizität auf das Sanierungsverfahren zurückzuführen ist.

4.4 Diskussion der Ergebnisse

4.4.1 Einfluß von Bodenart, Bodenfeuchte und Boden-pH-Wert auf Mortalität und Reproduktion der Testorganismen

Die Lebensbedingungen von Organismen im Boden werden von den bodenkundlichen Parametern der Matrix (Bodenart, Humusgehalt, pH-Wert, maximale Wasserhaltekapazität), von klimatischen (Licht, Temperatur, Feuchte) und biologischen Faktoren (Nahrungsquellen, Konkurrenten, Predatoren) sowie den vorhandenen Umweltchemikalien bestimmt. In standardisierten Labortestsystemen für die Chemikalienprüfung, wie dem Regenwurm-Test (ISO 11268-1,2) oder dem Collembolen-Test (ISO/CD 112679), werden alle Parameter konstant gehalten, mit Ausnahme der Konzentration des zu prüfenden Schadstoffes. Für diese Tests ist

artifizielles Bodenmaterial vorgeschrieben. In der Ökotoxikologie wird jedoch natürliches Bodenmaterial verwendet, das in Abhängigkeit vom Standort sehr unterschiedliche Eigenschaften aufweisen kann. Die verschiedenen Bodenmaterialien zeigen daher eine spezifische Bioverfügbarkeit für Schadstoffe [6]. Daraus wiederum resultieren matrixtypische LC- und EC-Werte [11]. Wie sich diese Unterschiede auf die Mortalität und Reproduktion in den Biotests auswirken ist nicht bekannt. Diese Kenntnisse sind aber Voraussetzung dafür, daß die Habitatqualität von unbelasteten Freilandböden, von Altlastböden und von saniertem Bodenmaterial mit Hilfe dieser Biotests bewertet werden kann, wenn kein unbelastetes Kontrollmaterial zur Verfügung steht.

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurde eine Testreihe mit 20 unkontaminierten Bodenmaterialien unterschiedlicher Herkunft konzipiert, darunter 5 Eurosoils. Dabei zeigte sich deutlich, daß *E. crypticus* sensitiver auf die Bodenmatrix reagiert als *F. candida*. Die unterschiedlichen Reaktionen der beiden Arten können nicht auf die höhere pH-Sensitivität von *E. crypticus* zurückgeführt werden, da der pH-Wert der verwendeten Bodenmaterialien im Toleranzbereich von *E. crypticus* lag [2]. Auch bei *F. candida* kann die verringerte Reproduktion in einzelnen Bodenmaterialien nicht auf pH-Effekte zurückgeführt werden.

Ein wichtiger Faktor für die Reproduktion von Bodenorganismen ist die Bodenfeuchte. Durch Versuche mit sechs ausgewählten Bodenmaterialien wurde nachgewiesen, daß die Bedingungen für eine Reproduktion bei einer Bodenfeuchte von 60% WHK_{max} hinreichend gut sind.

4.4.2 Nachweis der Konzentrations-Wirkungsbeziehung für belastetes Bodenmaterial

Ein wesentliches Kriterium für die Validität von Biotests ist, daß eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung zwischen der Schadstoffkonzentration im Boden und dem spezifischen toxischen Endpunkt besteht. Mit beiden Testsystemen ließen sich solche Konzentrations-Wirkungsbeziehungen für Betanal(+)-, PAK-, TNT- und MKW-belastetes Bodenmaterial nachweisen. Da sich die LC50- und EC50-Werte für die Referenzsubstanz Betanal(+) zwischen 1996 und 1999 nicht ändern, kann davon ausgegangen werden, dass die Sensitivität der beiden Arten über viele Generationen hin konstant bleibt. Zugleich zeigen diese Tests, daß *F. candida* im Mortalitäts-Test ca. 5mal und im Reproduktions-Test ca. 3mal empfindlicher ist als *E. crypticus*. Vergleichsdaten für Betanal(+) als Referenzsubstanz werden in Kürze vorliegen, da es zur Zeit als Positivkontrolle in einem Ringtest eingesetzt wird.

Für PAK-, TNT und MKW-kontaminierte Bodenmaterialien ließ sich in allen Fällen die Konzentrationsabhängigkeit der Schadstoffwirkung nachweisen, vorausgesetzt die Schadstoffkonzentration im Bodenmaterial war ausreichend hoch. Aus den Kurven lassen sich LC- und EC-Werte ableiten. Die Zuordnung dieser Werte zu einer bestimmten Substanz ist jedoch kritisch zu betrachten, da die Bodenmaterialien in der Regel mehrere potentiell toxische Substanzen enthalten.

Die Untersuchung zeigt deutlich die Matrixabhängigkeit der LC- und EC-Werte. So ist z.B. EPAK4a viel toxischer, wenn es für die Erstellung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung mit EPAK1a anstatt mit LUFA 2.2 verdünnt wurde. Eine ähnliche Matrixabhängigkeit zeigen auch die Untersuchungen mit TNT-belasteten Bodenmaterialien. Wissenschaftlich begründete Vergleichswerte für PAK im Boden finden sich in der Literatur nicht. Sogar die Hollandliste [9] greift bei Vorsorgewerten für BaP im Boden auf Untersuchungen zurück, die nicht mit Hilfe

einer Konzentrations-Wirkungskurve ermittelt wurden [1]. Für TNT können zum Vergleich Daten nur für *Eisenia andrei* herangezogen werden. Für diese Art beträgt die LC50 für aufdotierten OECD-Kunstaboden 365 mg TNT/kg und aufdotierten Waldboden 222 mg/kg [10].

4.4.3 Die Toxizität der Böden und die Veränderung der Habitatqualität durch die Sanierung

Tabelle 9 faßt Daten zur Toxizität von 28 Bodenmaterialien und zum Erfolg von neun Sanierungsmaßnahmen zusammen. Die Kriterien zur Bewertung der Toxizität von Böden auf Grund von Biotests werden in Tabelle 10 vorgestellt.

Tab. 10: Definition der Toxizität zur Bewertung von Bodenmaterialien. Die Kontrolle wird in Standardboden LUFA 2.2 oder Kontrollbodenmaterial durchgeführt.

Toxizität	Mortalitäts-Test (7d)	Reproduktions-Test (21 oder 28 d)
nicht toxisch (--)	kein signifikanter Unterschied zum Wert in der Kontrolle	kein signifikanter Unterschied zum Wert in der Kontrolle
mäßig toxisch (+)	Unterschied zur Kontrolle signifikant, Mortalität <49%	Unterschied zur Kontrolle signifikant, Reproduktion >50%
toxisch (++)	Mortalität liegt zwischen 50% und 99%	Reproduktion liegt zwischen 49% und 1%
hoch toxisch (+++)	Mortalität > 99%	Reproduktion < 1%

Im Mortalitäts-Test mit *E. crypticus* sind 20 der 28 Böden als nicht toxisch einzustufen, im Reproduktions-Test dagegen nur 3. Im Reproduktions-Test sind 4 der Böden mäßig toxisch, die restlichen toxisch oder hoch toxisch. Der Collembolen-Biotest zeigt ein ähnliches Bild. Auf Grund des Mortalitäts-Tests können allerdings nur 13 Böden als nicht toxisch bezeichnet werden, auf Grund des Reproduktions-Tests nur 6. Im Reproduktionstest sind 3 Bodenmaterialien mäßig toxisch und 19 toxisch oder hoch toxisch. Da die Verringerung der Reproduktionsrate wesentlich größere ökologische Bedeutung hat, als eine erhöhte Mortalität, ist das Ergebnis des Reproduktionstests ausschlaggebend für die Beurteilung von Bodengüte und Habitatqualität.

Werden die Ergebnisse der Mortalitäts- und Reproduktions-Tests für das gleiche Bodenmaterial miteinander verglichen, kommt es in keinem Fall zu einem Widerspruch in der Bewertung, da einer hohen Toxizität im Mortalitäts-Test immer eine gleich hohe oder höhere Toxizität im Reproduktions-Test entspricht. Einzelne Bodenmaterialien können auf Grund des einen Testsystems als nicht toxisch, gemäß des anderen jedoch als toxisch bezeichnet werden. So ist EPAK4b, daß durch Sanierung aus dem hoch toxischen EPAK4a entsteht im Collembolen-Biotest nicht toxisch, im Enchytraeen-Biotest jedoch toxisch. Bei LTNT1c zeigt dagegen nur der Collembolen-Biotest Toxizität an.

Der Einfluss der Sanierung auf die Habitatqualität ist mit einem Pfeil angedeutet. Die Pfeilrichtung nach Oben zeigt eine Verbesserung, nach Unten eine Verschlechterung, ein waagerechter Pfeil bedeutet keine Veränderung (Tab. 9). In drei Fällen kommt es zu einer Verschlechterung der Habitatqualität für beide Testorganismen, bei BMKW1a/1b, bei EPAK1a/1b (einem Kontrollmaterial) und bei der Sandfraktion CWPAK1b, die durch Waschen aus CWPAK1a entstand. In 5 Fällen verbessert sich die Habitatqualität durch die Sanierung, so bei EPAK4a/4b, SPAK1a/1b, CWPAK1a/1c, LTNT1a/1c und CTNT4a/4b. Keine eindeutigen Veränderungen lassen sich für die Bodenmaterialien EPAK2a/2b und EPAK3a/b nachweisen. In diesen Fällen zeigen die beiden Testsysteme eine unterschiedliche Tendenz an.

5 Bewertung der Ergebnisse und Ausblick

Der Enchytraeen- und der Collembolen-Biotest sind zur Beurteilung der Toxizität von Bodenmaterialien geeignet. Beide erlauben die Einschätzung der Habitatqualität von unbelastetem Bodenmaterial, Altlasten und saniertem Bodenmaterial. Es ist sinnvoll beide Testsysteme parallel anzuwenden, da beide zu unterschiedlichen Bewertungen des Materials führen können. Eine Bewertung unter Heranziehung beider Testverfahren ist immer dann zu empfehlen, wenn das sanierte Material an Stellen eingebaut werden soll, die für die Öffentlichkeit zugänglich sind.

Für eine schnelle Abschätzung der Toxizität von Bodenmaterial ist der Mortalitätstest ausreichend. Wenn er positiv ausfällt, d.h. der Boden als toxisch erkannt ist, braucht kein Reproduktionstest durchgeführt werden. Wenn er negativ ausfällt, ist vor Verwendung des Materials die Durchführung eines Reproduktions-Tests erforderlich.

Beide Biotests sind nicht zur Beurteilung von extrem saurem oder basischem Bodenmaterial geeignet. Eine Aufkalkung oder Ansäuerung ist nur dann zu empfehlen, wenn das behandelte Material ausreichend lange altern kann.

Eine Verkürzung der Reproduktionstests von 28 auf 21 Tage ist grundsätzlich möglich. Der 21-Tage-Test muß jedoch noch durch weitere Untersuchungen validiert werden.

Ein kritischer Punkt ist die Verfügbarkeit von Kontrollböden, da in der Regel ein solcher nur in wenigen Fällen beschafft werden kann. Es ist daher zwingend erforderlich eine größere Studie über den Einfluß der Bodenart auf die toxischen Endpunkte der Testsysteme durchzuführen. Weitere Variablen, die in einer solchen Untersuchung berücksichtigt werden müssen sind z.B. Humusgehalt, Bodenfeuchte und pH-Wert, sowie deren Auswirkung auf die Toxizität von Modellsubstanzen wie PAK, Biozide und Schwermetalle.

6 Formeln und Abkürzungen

TNT:	2,4,6-Trinitrotoluol
Hexogen:	Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin
Octogen:	Octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocin
PAK:	polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
MKW:	Mineralölkohlenwasserstoffe
Bodenarten:	L: Lehm, l: lehmig; S: Sand, s: sandig; T: Ton, t: tonig; U: Schluff, u: schluffig Ls2: schwach sandiger Lehm; Ls3: mittel sandiger Lehm Lt2: schwach toniger Lehm Lu: schluffiger Lehm Sl2: schwach lehmiger Sand; Sl3/4: mittel bis stark lehmiger Sand; Sl4: stark lehmiger Sand Slu: lehmiger schluffiger Sand Ss: Sand St2: schwach toniger Sand Su3: mittel schluffiger Sand Uls: lehmiger sandiger Schluff Us: sandiger Schluff Ut2: schwacher toniger Schluff Uu: schluffiger Schluff

7 Veröffentlichungen und Examensarbeiten

Achazi R.K., G. Chroszcz, W. Mierke (1997) Standardization of test methods with terrestrial invertebrates for assessing remediation procedures for contaminated soils. ECO-INFORMA **12**, 284 – 289

Beylich A., R.K. Achazi (1999) Influence of low soil moisture on enchytraeids. Newsletter on Enchytraeidae **6**: 49 – 58

Faccin R. Einfluß äußerer Faktoren auf die Reproduktionsleistung von drei Enchytraeidenarten (Diplomarbeit)

Schäfer R., G. Chroszcz, W. Mierke, R.K. Achazi (1998) Terrestrische Verfahren mit Bodentieren zur Bewertung von Rüstungsallasten. Tagungsband der Fachtagung "Sanierung kontaminierter Böden" Munster 1998, V09, 1-17

Schäfer R., R.K. Achazi (1999) The toxicity of soil samples containing TNT and other ammunition derived compounds in the enchytraeid- and the collembola-biotest. Environ. Sci. & Pollut Res. **6**, 231-219

Schäfer R. Ökotoxikologische Untersuchungen zur Gefährdung des Lebensraums Boden durch sprengstofftypischen Verbindungen (Dissertation, nicht abgeschlossen)

Treschau A. Einfluß der Bodenfeuchte auf Mortalität und Reproduktion von *Folsomia candida* in verschiedenen Bodenarten (Staatsexamen)

8 Literaturverzeichnis

1. **Achazi R. K., M. Henneken M., B. Rothe** (1995) Einfluß von anthropogenen Schadstoffen auf terrestrische Invertebraten: II. Einfluß von BaP, Fla und Cd auf Lebenszyklusparameter von *Enchytraeus crypticus* in Labor-Testsystemen. Verh. Ges. Ökol. **24**, 535 – 540
2. **Achazi R.K. G. Chroszcz, C. Pilz, B. Rothe, I. Steudel, C. Throl** (1996) Der Einfluß des pH-Wertes und von PCB52 auf Reproduktion und Besiedlungsaktivität von terrestrischen Enchytraeen in PAK-, PCB- und schwermetallbelasteten Riselfeldböden. Verh. Ges. Ökol. **26**, 37 – 42
3. **Beylich A., R.K. Achazi** (1999) Influence of low soil moisture on enchytraeids. Newsletter on Echytraeidae **6**: 49 – 58
4. **Driven-van Breemen E. M., R. Baerselman, J. Notenboom** (1994) Onderzoek naar de geschiktheid van de potwormsoorten *Enchytraeus albidus* en *E. crypticus* (Oligochaeta. Annelida) in bodemecotoxicologisch onderzoek. RIVM Rapportnr. 719102025, 46 Seiten
5. **Jepson P.C., J.A. Wiles J.A., N. Reader** (1994) Sublethal toxicity test with the springtail *Isotoma viridis* (Bourlet, 1839) and *Folsomia candida* (Willem, 1902) (Collembola: Isotomidae). SECOFASE, Progress Report 1994, 3th Technical Report, 103-124
6. **Lokke H., C.A.M. van Gestel** (1998) Soil Toxicity Tests in Risk Assessment of New and Existing Chemicals. In Lokke & van Gestel "Handbook of soil invertebrate Toxicity tests, John Wiley & Sons, Chichester, p. 3 – 19
7. **Riepert F.** (1992) Effects of soil pollutants on Collembola: determination of the inhibition of reproduction. Paris ISO/AFNOR, ISO document 92/51653, working draft)
8. **RIVM - Rijksinstituuts vor Volksgezondheid en Milieuhygiene** (1995) SOP Nr. ECO/273/00
9. **RIVM** (1999) Environmental Risk Limits in the Netherlands, Vol. 3
10. **Robidoux P.Y., J. Hawari, S. Thiboutot., G. Ampleman , G.I. Sunahara** (1999) Acute toxicity of 2,4,6,-trinitotoluene in earthworm (*Eisenia andrei*). Ecotoxicol. Environ. Saf. **44**, 311-321

11. **Rundgren S., C.A.M. van Gestel** (1998) Comparison of Species Sensitivity. In Lokke & van Gestel "Handbook of soil invertebrate Toxicity tests, John Wiley & Sons, Chichester, p. 41 – 55
12. **Schäfer R., R.K. Achazi** (1999) The toxicity of soil samples containing TNT and other ammunition derived compounds in the enchytraeid- and the collembola-biotest. *Environ. Sci. & Pollut Res.* **6**, 231-219
13. **Westheide W., D. Bethke-Beilfuß** (1991) The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results. *Modern Ecology: Basic and applied aspects.* eds. G. Esser & D. Overdiek, Elsevier, Amsterdam, 497-508)
14. **Westheide W., U. Graefe** (1992) Two new terrestrial Enchytraeus species (Oligochaeta, Annelida). *J. Natural History* **26**, 479 – 488

Anhang A

Standardisierte Prüfanleitung zur ökotoxikologischen Bewertung von unkontaminiertem Bodenmaterial, von Altlasten und saniertem Bodenmaterial mit terrestrischen Invertebraten

Mortalitäts- und Reproduktionstests mit *Folsomia candida* (Collembolen-Biotest)

und

Mortalitäts- und Reproduktionstests mit *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeen-Biotest)

1 Einleitung

Die beschriebenen Methoden wurden zur Beurteilung der biologischen Beschaffenheit von Böden (Bodengüte) entwickelt. Sie ermöglichen die Erfassung der Lebensraumqualität von unbelastetem und nutzungsbedingt belastetem Bodenmaterial für terrestrische Invertebraten, die Indikatorgruppen angehören. Die Methoden eignen sich auch zur Erfassung der Wirkung von Schadstoffen (z.B. Schwermetalle, polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, polychlorierte Biphenyle, Mineralölkohlenwasserstoffe, sprengstofftypische Verbindungen, Pflanzenschutzmittel), die natürlichem unbelastetem Bodenmaterial (LUFA 2.2) zugefügt wurden.

2 Anwendungsbereich

Diese standardisierten Durchführungsvorschriften (standard operation procedures - SOP) beschreiben Methoden zur Erfassung der Wirkung von unbelasteten, nutzungsbedingt belasteten und willkürlich belasteten Böden auf die Mortalität und Reproduktion von Invertebraten. Die Substanzen bzw. Substanzkombinationen können dabei über das Integument, den Magendarmtrakt und/oder den Luftweg wirken.

Die Stabilität der Substanzen oder Substanzkombinationen während der Testdauer kann sich verändern, speziell dann, wenn es sich um leicht flüchtige oder abbaubare Substanzen handelt, wie z.B. Mineralölkohlenwasserstoffe. (vergl. auch "Biol. Testmethoden für Böden", Punkt 1.1)

3 Probenaufbereitung und -lagerung

3.1 Aufbereitung des Bodenmaterials

Das feldfrische Bodenmaterial (LUFA 2.2, Testböden, Kontrollböden) wird nach Entfernen von größeren Steinen, Wurzeln und Tieren durch ein Sieb mit einer Maschenweite von ca. 5 mm gesiebt. Ist das Bodenmaterial zum Sieben zu naß, dann kann eine leichte Vortrocknung unter

Wenden im Luftstrom erfolgen (vergl. "Biol. Testmethoden für Böden", Punkt 3.1.2). Vor Testbeginn wird der Boden auf 60% (oder nach Angabe) der maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt und 24 h bei Raumtemperatur gelagert.

3.2 Lagerung des Bodenmaterials

Standardbodenmaterial (LUFA 2.2): Lagerung in Holzkiste oder Kunststoffsack bei ca. 4° C im Dunkeln.

Kontrollbodenmaterial: Lagerung im verschlossenen Kunststoffeimer (mit Aluminiumfolie ausgekleidet) bei ca. 4° C im Dunkeln.

Kontaminiertes Bodenmaterial: Lagerung in verschlossenem Glasgefäß (Weithalsflasche aus Duranglas mit Schraubdeckel und Teflondichtung oder Weckglas) bei ca. - 20°C, mindestens aber bei ca. 4°C (Kühlraum).

Lagerung der Rückstellproben: Lagerung in verschlossenem Glasgefäß (Weithalsflasche aus Duranglas mit Schraubdeckel und Teflondichtung), bei ca. - 20°C.

3.3 Bestimmung der Trockenmasse (TM) und des aktuellen Wassergehalts (WG) des Bodenmaterials

Die Bestimmung der Trockenmasse (TM) und des aktuellen Wassergehalts (WG) des Bodenmaterials erfolgt durch Differenzwägung mit einer Oberschaligen Waage (Doppelprobe) von ca. 50 g Boden vor und nach Trocknung.

Die Trocknung von unkontaminiertem und schwermetallkontaminiertem Bodenmaterial erfolgt im Trockenschrank mindestens 2 h bei 105°C (vergl. ISO 11465). Die Trocknung von Bodenmaterial, das mit Organika belastet ist, erfolgt für 24h bei Raumtemperatur im Exsikkator über Blaugel. Eventuell muß das Bodenmaterial bei niedriger Temperatur unter dem Abzug vorgetrocknet werden.

3.4 Bestimmung der maximalen Wasserhaltekapazität (WHK_{max})

Die Bestimmung der maximalen Wasserhaltekapazität (WHK_{max}) des Bodenmaterials erfolgt durch Differenzwägung von ca. 100g Boden (vergl. ISO 11274, 11465). Das gesiebte frische Bodenmaterial wird in ein feinmaschiges Sieb (ca. 50 μ m Gaze) überführt. Das Bodenmaterial wird 1h mit Wasser gesättigt und anschließend 3h auf einem feuchten Sandbad equilibriert. (Wägung und Trocknung vergl. 3.3)

3.5 Bestimmung des pH-Wertes von Bodenmaterial

Die Bestimmung erfolgt im $CaCl_2$ -Extrakt. Dazu wird der Boden 2h in der 2,5fachen Menge 0,01 mol/l $CaCl_2$ -Lösung (w/v) bei Zimmertemperatur geschüttelt. Der pH-Wert des Überstandes wird nach Absetzen des Bodens mit einem geeichten pH-Meter bestimmt (vergl. ISO 10390).

3.6 Defaunieren der Bodenproben

Das Abtöten der Bodentiere (Nematoden, Raubmilben, Insektenlarven etc.) erfolgt durch 2x Einfrieren für 48h (-20° C). Zwischen den beiden Einfrierphasen wird das Bodenmaterial 10 Tage bei ca. 20°C im Dunkeln aufbewahrt, damit noch vorhandene Eier oder Ruhestadien zum Schlüpfen veranlaßt werden.

4 Definitionen

Bewertungsgröße: Reduktion der Überlebensrate (Mortalität) im Kurzzeittest sowie der Reproduktionsrate (Anzahl der Nachkommen pro eingesetztem Elterntier am Ende des Langzeittests), ab der ein Bodenmaterial als toxisch oder hochtoxisch bezeichnet werden muß.

LC 50/LC 10: Konzentration einer Testsubstanz bzw. einer Substanzkombination, die eine Mortalität von 50% bzw. 10% im Kurzzeittest hervorruft.

EC 50/EC 10: Konzentration einer Testsubstanz bzw. einer Substanzkombination, die eine Reduktion der Reproduktionsrate von 50 % bzw. 10% im Vergleich zur Kontrolle im Langzeittest bewirkt.

Konzentrationsangaben: mg Substanz (Substanzkombination)/kg Bodenmaterial (TM).

5 Testprinzip

5.1 Collembolen- und Enchytraeen-Biotest

5.1.1 Mortalitätstest / Akutttest

10 geschlechtsreife, synchronisierte Individuen (16 ± 1 bis 21 ± 1 Tage nach dem Schlüpfen) werden in Standardbodenmaterial (LUFA 2.2), Kontrollbodenmaterial und belastetem Bodenmaterial (Testboden) 7 Tage exponiert. Die Mortalitätsrate wird auf die Anzahl der überlebenden Tiere im Standardboden bezogen.

5.1.2 Reproduktionstest / Life cycle Test

10 geschlechtsreife, synchronisierte Individuen (16 ± 1 bis 21 ± 1 Tage nach dem Schlüpfen) werden in Standardbodenmaterial (LUFA 2.2), Kontrollbodenmaterial und belastetem Bodenmaterial (Testboden) 21 oder 28 Tage exponiert. Die Anzahl der nach 21 oder 28 Tagen vorhandenen Individuen wird ermittelt, und die Reproduktionsrate mit der im Standardbodenmaterial verglichen.

6 Reagenzien/Materialien

6.1 Testorganismen

Collembolen-Biotest: Es werden synchronisierte, geschlechtsreife Tiere der Art *Folsomia candida* (Willem) 16 ± 1 bis 21 ± 1 Tage nach dem Schlüpfen verwendet.

Enchytraeen-Biotest: Es werden synchronisierte, geschlechtsreife Tiere (mit gut ausgebildetem Clitellum) der Art *Enchytraeus crypticus* (Westheide & Graefe) 16 ± 1 bis 21 ± 1 Tage nach dem Schlüpfen verwendet.

6.2 Testsubstrate

Standardboden: LUFA 2.2, natürliches, unbelastetes Bodenmaterial der "Land- und forstwirtschaftlichen Versuchsanstalt Speyer" oder Bodenmaterial der gleichen Art (lehmiger Sand).

Testbodenmaterial: nutzungsbedingt belastetes, natürliches Bodenmaterial.

Kontrollbodenmaterial: unbelastetes Bodenmaterial vom gleichen Standort wie das Testbodenmaterial.

Verdünntes Testbodenmaterial: Abhängig von der Toxizität des Testbodenmaterials müssen die Biotests zur genaueren Beurteilung der Toxizität, gegebenenfalls mit Verdünnungsreihen durchgeführt werden. Hierfür wird sowohl das Testbodenmaterial als auch der Verdünnungsboden (LUFA2.2 oder Kontrollboden) auf 60% der maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt und in einer Verdünnungsreihe (1 Teil Verdünnungsbodenmaterial + 1 Teil Testbodenmaterial) mit einem Rührgerät (5 min unter dem Abzug) miteinander vermischt. Die Bodenmischungen sollten mindestens 1 Woche bei 4°C altern. Das weitere Vorgehen entspricht dem oben dargestellten.

6.3 Referenzsubstanzen (Substanzen für die Positivkontrolle)

Betanal(+) (a.i.: Phenmedipham; 3-(Methoxy-carbonyl-aminophenyl)-N-(3'-methyl-phenyl)-carbammat) ist als Referenzsubstanz sowohl für den Collembolen- als auch für den Enchytraeen-Biotest geeignet.

Die Tests mit den Referenzsubstanzen sollten mindestens zweimal pro Jahr durchgeführt werden.

Tabelle 1: LC 50 und EC 50-Werte für die Testorganismen unter Standard-Testbedingungen

Testsystem	Kurzzeittest (7d) LC 50*	Langzeittest (28d) EC 50*
Enchytraeen-Test	70 – 90	20 – 40
Collembolen-Test	10 - 20	5 - 15

* Angaben in mg Phenmedipham/kg Boden Trockenmasse).

7 Apparate/Geräte

Standardmäßige Laborausrüstung ist erforderlich.

Glasbehälter:

- (a) Weithalsflaschen aus Duran-Glas mit Schraubdeckel und Teflondichtung: 100ml, 1000ml;
- (b) Glasschüsseln (Petrischalen mit ca. 14 cm Durchmesser)

pH-Meter

Fein- und Grobwaage

Exhauster zum Transferieren von Collembolen

Artemia-Sieb (Siebkombination, Sieb Nr. 4, Dohse Aquaristik, Auf der Kaiserführ 39, Bonn, Best. Nr. 21630) zum Abtrennen der Enchytraeen

Handmixer (z.B. Krups 3 Mix 1003) zum Mischen von Böden und Einmischen der Referenzsubstanzen

Reproduktionsanlage zur Erfassung der Collembolenzahl im Reproduktionstest bestehend aus (a) Fotoapparat: z.B. NIKON F70 mit Nahobjektiv (60 mm), (b) Beleuchtung 4×36 Watt (TC-L Leuchtstoffröhren), Diapositivfilm (Kodak-Elite Chrome 100; Belichtung: Zeit 1/15 bis 1/60 Sek., Blende 5,6)

Diaprojektor; halbtransparente **Projektionswand** (Plastikplatte)

Kolonienzähler

8 Kulturraum/Kulturvorrichtung

Enchytraeen-Biotest: Kühlbrutschrank oder temperierbarer Raum ($20\pm 2^\circ\text{C}$), Dauerdunkel

Collembolen-Biotest: Kühlbrutschrank ($20\pm 2^\circ\text{C}$) mit Fenster für Tageslichtbeleuchtung bzw. Kühlbrutschrank mit Lichtquelle (Lichtstärke 400-800 Lux, Hell-Dunkelzyklus 16:8 h).

9 Testdurchführung

9.1 Vorbereitungen für den Test

9.1.1 Wirkkonzentrationen

Konzentrations-Wirkungsbeziehung für nutzungsbedingt belastetes Bodenmaterial: Sie wird durch einen Test mit nutzungsbedingt belastetem Testboden und 5 Verdünnungen des Testbodenmaterials mit Kontrollbodenmaterial ermittelt. Wenn kein unbelastetes Standortmaterial vorhanden ist wird die Bodenverdünnung mit LUFA 2.2 durchgeführt.

Konzentrations-Wirkungsbeziehung für die Referenzsubstanz (Positivkontrolle): Sie wird mit Standardbodenmaterial ermittelt, in das die Referenzsubstanz (z.B. Betanal(+)) eingemischt ist. Als Bodenmaterial wird LUFA 2.2 verwendet. Die Konzentrationen der

Referenzsubstanzen orientieren sich an 6.3. Bei einem Verdünnungsfaktor von 2 oder 1,8 sind 5 Verdünnungsschritte sowie eine Kontrolle mit je 5 Replikaten erforderlich. Diese Kontrolltests sollten zweimal pro Jahr durchgeführt werden.

Das Einmischen der Referenzsubstanz (bzw. einer Testsubstanz, z. B. Reinstoff) erfolgt in der Regel trocken. Dazu wird die vorgewogene Menge der Substanz in ein kleines Bodenvolumen oder in Quarzsand (max. 5% des Endvolumens) eingerührt und gleichmäßig verteilt (eventuell Reibschale benutzen). Anschließend wird diese Ausgangsmischung entsprechend der erforderlichen Konzentration in das Standard-Bodenmaterial eingemischt (Rührgerät, 5 min unter dem Abzug). Von der Stammischung ausgehend wird die Verdünnungsreihe (Verdünnungsfaktor 2 oder 1,8) mit dem Standardbodenmaterial hergestellt.

Aus flüssigen oder suspendierten Substanzen, wie z.B. Betanal+, wird eine Stammlösung mit Wasser hergestellt. Diese wird dann in entsprechender Menge dem lufttrockenem Bodenmaterial zugefügt und mit dem Rührgerät eingemischt (5 min unter dem Abzug). Von der Stammischung ausgehend wird die Verdünnungsreihe (Verdünnungsfaktor 2 oder 1,8) durch Einmischen in Standardbodenmaterial hergestellt.

Wenn erforderlich muß eine gasdichte Maske benutzt werden.

10 Durchführung der Biotests

Jede Testserie umfaßt eine Testreihe mit Standardboden (LUFA 2.2) sowie entsprechende Testreihen mit nutzungsbedingt belastetem Bodenmaterial. Pro Testreihe werden 5 Replikate angesetzt.

10.1 Collembolen-Biotest mit *Folsomia candida* (vergl. ISO/CD11267)

10.1.1 Mortalitätstest / Akuttest

Einsetzen der Tiere: 10 geschlechtsreife Jungtiere (16 ± 1 bis 21 ± 1 Tage nach dem Schlüpfen) werden mit einem Exhauster in ein Rollrandgläschen (ca. 10 ml) überführt und dann in das Testgefäß (100 ml Duran-Weithalsflasche) eingesetzt, in dem sich 15 g feuchtes Bodenmaterial (60% WHK_{max}) befindet. Zur Fütterung werden ca. 20 mg Trockenhefe auf der Oberfläche des Bodens gleichmäßig verteilt. Das Testgefäß wird mit dem Deckel fest verschlossen.

Je Konzentrationsstufe werden 5 Replikate angesetzt.

Exposition/Hälterung: Die Testgefäße mit den Tieren werden im Kühlbrutschrank bei 20 ± 2 °C 7 Tage inkubiert. Am 3. Tag wird kurz belüftet.

Extraktion der Tiere und Auszählen: Am 7. Tag wird das Bodenmaterial mit ca. 70 ml Leitungswasser in ein Becherglas (250 ml) oder eine Glasschale gespült. Das Bodenmaterial wird ca. 3mal aufgerührt, damit alle Tiere aufgeschwemmt werden. Nach dem Absetzen des Bodenmaterials schwimmen die noch lebenden Tiere auf der Oberfläche und können (mit Hilfe einer Leuchtlupe) direkt gezählt werden.

10.1.2 Reproduktionstest / Life cycle Test

Einsetzen der Tiere: 10 geschlechtsreife Jungtiere (16 ± 1 bis 21 ± 1 Tage nach dem Schlüpfen) werden mit einem Exhauster in ein Rollrandgläschen (ca. 20 ml) überführt und dann in das Testgefäß (100 ml Duran-Weithalsflasche) eingesetzt, in dem sich 30 g feuchtes Bodenmaterial (60% WHK_{max}) befindet. Zur Fütterung werden ca. 20 mg Trockenhefe auf der Oberfläche verteilt. Das Testgefäß wird mit dem Deckel fest verschlossen. Die fertig gefüllten Testgefäße werden gewogen und das Gewicht auf den Testgefäßen notiert. Je Konzentrationsstufe werden 5 Replikate angesetzt.

Exposition/Hälterung: Die Testgefäße mit den Tieren werden im Kühlbrutschrank bei $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 28 Tage inkubiert. Alle 3 bis 4 Tage wird kurz belüftet. Nach ca. 14 Tagen wird das Gewicht nachgeprüft und eventuell mit Wasser nachgestellt. Zu diesem Zeitpunkt wird mit Trockenhefe (ca. 20 mg) nachgefüttert.

Extraktion der Tiere und Auszählen: Nach 28 Tagen wird der Versuch beendet. Bei geringer Reproduktionsrate erfolgt die Extraktion und das Auszählen wie beim Mortalitätstest beschrieben. Bei hoher Reproduktionsrate wird das Bodenmaterial mit den Juvenilen (F1-, F2-Generation) und Adulten (P-Generation) mit Leitungswasser (ca. 100 ml) in ein 250 ml Becherglas überführt. Das Bodenmaterial wird ca. dreimal gerührt, um alle Tiere aufzuschwemmen. Zum Absetzen des Bodenmaterials wird die Probe mindestens 2h in den Kühlschrank gestellt. Anschließend schwimmen die bewegungslosen Tiere auf der Oberfläche. Das Wasser wird durch Zugabe von ca. 2 ml Tinte königsblau angefärbt.

Die juvenilen und adulten Tiere sind nun auf dem dunkelblauen Wasser gut sichtbar. Zur Erleichterung der Auswertung wird das Testgefäß von oben mit einer Reoproanlage unter Verwendung eines Diapositivfilms fotografiert. Nach Entwicklung des Films wird das Bild auf eine Projektionsfläche (z.B. semitransparente weiße Plastikscheibe) projiziert und mit einem Kolonienzähler ausgezählt. Es wird die Anzahl der vorhandenen Tiere pro eingesetztem Elterntier berechnet.

10.2 Enchytraeen-Biotest mit *Enchytraeus crypticus*

10.2.1 Mortalitätstest / Akutttest

Einsetzen der Tiere: Für den Test werden geschlechtsreife Jungtiere (16 ± 1 bis 21 ± 1 Tage nach dem Schlüpfen) eingesetzt. Dazu werden die Tiere einer synchronisierten Stammkultur mit Leitungswasser in eine kleine Petrischale gespült. Zehn Jungtiere werden mit einem Glashaken in ein Blockschälchen mit Wasser überführt. Mit dem Binokular wird geprüft, ob die Tiere unbeschädigt sind. Anschließend werden sie mit einer Pateurpipette mit großer Öffnung in das Testgefäß (100 ml Duran-Weithalsflasche) pipettiert. In dem Testgefäß befinden sich 15 g feuchtes Bodenmaterial (60% WHK_{max}), in das 0,5% fein gemörserte Haferflocken (w/w) als Futter gleichmäßig eingemischt sind. Das Testgefäß wird mit dem Deckel fest verschlossen. Je Bodenmaterial (Testboden) bzw. Konzentrationsstufe werden fünf Replikate angesetzt.

Exposition/Hälterung: Die Testgefäße mit den Tieren werden im Kühlbrutschrank bei $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 7 Tage inkubiert. Am 3. Tag wird kurz belüftet und das Bodenmaterial leicht geschüttelt.

Extraktion der Tiere und Auszählen: Am 7. Tag wird das Bodenmaterial mit den Tieren in eine Petrischale (Durchmesser ca. 14 cm) gespült. Die Duran-Weithalsflasche wird mit Wasser ausgespült und dieses ebenfalls in die Petrischale gefüllt. Der Boden wird aufgerührt, so daß er sich gleichmäßig in der Petrischale verteilt. Nach dem Absetzen des Bodenmaterials befinden sich die Tiere auf dessen Oberfläche und können mit Hilfe einer Leuchtlupe oder einem Binokular (10-fach) direkt gezählt werden.

10.2.2 Reproduktionstest / Life cycle Test

Einsetzen der Tiere: Das Einsetzen der zehn geschlechtsreifen Jungtiere in das Testgefäß mit Boden erfolgt wie unter 10.2.1 beschrieben. In dem Testgefäß befinden sich 30 g feuchtes Bodenmaterial (60% WHK_{max}), in das 2% fein gemörserte Haferflocken (w/w) als Futter gleichmäßig eingemischt sind. Das Testgefäß wird mit dem Deckel verschlossen. Die fertig gefüllten Testgefäße werden gewogen und das Gewicht auf den Testgefäßen notiert. Je Bodenmaterial (Testboden) und Konzentrationsstufe werden 5 Replikate angesetzt.

Exposition/Hälterung: Die Testgefäße mit den Tieren werden im Kühlbrutschrank bei $20 \pm 2^\circ\text{C}$ sieben Tage inkubiert. Alle 3 bis 4 Tage wird kurz belüftet und das Bodenmaterial leicht aufgeschüttelt. Nach 14 Tagen wird das Gewicht des Testgefäßes nachgeprüft und der Gewichtsverlust mit Wasser ausgeglichen.

Extraktion der Tiere und Auszählen: Nach 28 Tagen wird der Versuch beendet. Bei geringer Reproduktionsrate erfolgt die Extraktion und das Auszählen wie beim Mortalitätstest. Bei hoher Reproduktionsrate (z.B. im Standardbodenmaterial und unbelasteten Bodenmaterial) wird das Bodenmaterial mit den Tieren mit ca. 70 ml Leitungswasser im Testgefäß aufgespült. Der Boden wird 3mal vorsichtig durchgerührt. Anschließend wird das Testgefäß in einen Kühlschrank bei genau 8°C gestellt. Über Nacht wandern die Tiere auf die Oberfläche des abgesetzten Bodens und sammeln sich dort. Von dort werden sie vorsichtig mit einer Meßpipette mit großer Öffnung in eine Petrischale (ca. 14 cm Durchmesser) überführt und unter dem Binokular ausgezählt. Anschließend wird kontrolliert, ob sich noch weitere Tiere im Bodenmaterial befinden. Deren Zahl wird ebenfalls ermittelt. Für jedes Replikat wird die Anzahl der vorhandenen Tiere pro eingesetztem Elterntier berechnet.

Alternativ dazu können die Tiere mit Bengal Rosa angefärbt werden. Dadurch lassen sie sich besser von feinem Pflanzenmaterial (z.B. Wurzelstückchen) unterscheiden. Dazu werden die Tiere nach dem Austreiben und Abtrennen von der Hauptmenge des Bodens in eine Schale mit Leitungswasser (ca. 50 ml) überführt und durch Zugabe des gleichen Volumens 80% Äthanol fixiert. Nach ca. 30 Minuten werden $500 \mu\text{l}$ einer 1% Lösung von Bengal Rosa (Sigma, Bestell-Nr.: R 4507) in Äthanol zugegeben und die Probe gut durchgemischt. Nach 24 Stunden (Kühlschrank) sind die Tiere gefärbt und werden durch Abgießen über ein Artemia-Sieb ($40 \mu\text{m}$) von der Färbelösung getrennt. Die gesammelten Tiere werden in eine Petrischale mit Wasser überführt. Sie können dann direkt ausgezählt werden. Soll die Auszählung zu einem späteren Zeitpunkt erfolgen, werden die Tiere in 60% Alkohol konserviert.

Eine andere Möglichkeit ist das Auszählen eines Aliquots nach Auftrennen der Probe im Probenteiler nach Jensen (siehe Anhang).

11 Berechnung und Darstellung der Ergebnisse

11.1 Berechnungen

Die Ergebnisse werden in Tabellenform (Excel) dargestellt. Die Tabellen enthalten in der Legende Angaben zum Bodenmaterial: Identifikationsnummer, Belastung (mg/kg TM) sofern bekannt, Verdünnungsgrad, Art des Verdünnungsbodens, pH-Wert, WHK_{max} , eingestellte Feuchte, Expositionstemperatur, Lichtverhältnisse, Testdauer und Auffälligkeiten während der Testperiode. Die Tabellen enthalten für jede Testreihe die Anzahl der Replikate, die Anzahl der eingesetzten Tiere pro Replikat, die Anzahl der Tiere pro Replikat nach Testabschluß.

Die Ergebnisse der Testreihen mit belasteten Böden werden mit dem Testergebnis im Standardbodenmaterial LUFA 2.2 oder im Kontrollbodenmaterial verglichen. Bei normal verteilten Proben erfolgt der Vergleich mit dem t-Test, bei nicht normal verteilten Proben mit dem U-Test.

11.2 Angabe der Ergebnisse

Die Ergebnisse mit Reinstoffen (Referenzsubstanz) werden als LC50 bzw. EC50 in mg Reinstoff/kg Bodenmaterial (TM) angegeben.

Die Ergebnisse mit nutzungsbedingt belastetem Bodenmaterial erlauben die Einstufung des Bodenmaterials nur als gering toxisch, toxisch, hoch toxisch oder nicht toxisch. Konzentrationsangaben sind nur in klar definierbaren Fällen möglich, z.B. bei Belastung mit nur einer Substanz (Referenzsubstanz).

11.3 Definition der Toxizität

Toxizität im Mortalitätstest: Ein Boden wird als mäßig toxisch definiert, wenn die Mortalitätsrate der eingesetzten Tiere am Ende des Kurzzeittests signifikant höher ist als in der Kontrolle (Test im Standardboden oder Kontrollboden), als toxisch, wenn die Mortalität > 50% ist und als hoch toxisch wenn keine Tiere überleben.

Toxizität im Reproduktionstest: Ein Boden wird als mäßig toxisch definiert, wenn die Reproduktionsrate (Anzahl Nachkommen pro eingesetztem Elterntier) signifikant niedriger ist als in der Kontrolle und höher als 50% des Kontrollwertes ist (Test im Standardboden oder Kontrollboden), als toxisch wenn die Reproduktionsrate zwischen 49 und 1% liegt und als hochtoxisch, wenn die Reproduktionsrate <1% ist.

12 Validität der Tests

Kurzzeittest (Mortalitätstest)

Collembolen- und Enchytraeen-Biotest:

Die Ergebnisse werden als gültig angesehen, wenn die Mortalität im Standardbodenmaterial (LUFA 2.2) am Ende des Tests nicht >10% ist.

Langzeittest (Reproduktionstest):

Collembolen-Biotest: Reproduktionsrate (Anzahl der Individuen/Elterntier am Ende des Langzeittests) im Standardbodenmaterial (LUFA 2.2) muß > 60 sein.

Enchytraeen-Biotest: Reproduktionsrate (Anzahl der Individuen/Elterntier am Ende des Langzeittests nach 28 Tagen) im Standardbodenmaterial (LUFA 2.2) muß > 90 sein.

Anhang B

A. Zucht- und Hälterungsmethoden

1. Collembolen-Biotest mit *Folsomia candida* (vergl. ISO/CD 11267, 1996)

1.1 Erhaltungszucht

Zuchtgefäß: 1,5l Kunststoffbehälter mit Klarsichtdeckel (18×13×6 cm);

Zuchtsubstrat: Gips-Aktivkohlesubstrat (Mischung aus 75 ml destillierten Wassers, 10g Aktivkohle und 110g Modellgips ergibt eine Schichtdicke von ca. 0,5 cm dicke Schicht im Kunststoffbehälter);

Zuchttemperatur: 20±2°C

Feuchte: Nachstellen der Feuchte mit destilliertem Wasser 2mal wöchentlich (Gewichtsverlust ausgleichen);

Beleuchtung: gedämpftes Tageslicht;

Standplatz: Labor;

Fütterung: zweimal wöchentlich mit Trockenhefe nach Bedarf (ca. 20 bis 40 mg).

Anlegen der Zucht: Durch Übertragen von adulten Tieren in ein frisches Zuchtgefäß wird die Eiablage stimuliert. Die rötlich-braun gefärbten Eipakete, die im Verlauf der nächsten 3 - 5 Tage abgelegt wurden, werden mit einem feuchten Pinsel auf ein Gips-Aktivkohle-Plättchen übertragen, das in ein frisches Zuchtgefäß gelegt wird. Nach dem Schlupf der Tiere wird das Gips-Aktivkohle-Plättchen entfernt. Die Tiere werden alle 6-8 Wochen durch Abklopfen bzw. Pusten mittels Schlauch in ein frisches Zuchtgefäß überführt.

Anlegen von neuen Stammzuchten: 1 bis 2mal wöchentlich

1.2 Synchronzucht

Anlegen der Synchronzucht: wie unter 1.1 (Anlegen der Zucht) beschrieben. Die Eipakete werden jedoch nur über einen Zeitraum von 3 Tagen gesammelt. Der Schlupfzeitpunkt wird genau registriert. Die Tiere können 16 ± 1 bis 21 ± 1 Tage nach dem Schlupf für Tests eingesetzt werden.

2. Enchytraeen-Biotest mit *Enchytraeus crypticus*

2.1 Erhaltungszucht

Zuchtgefäß: Kunststoff-Petrischale (d = 9 cm);

Zuchtsubstrat: 1,7% Agar-Agar in artifiziellem Süßwasser (294 mg $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 123mg $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 65mg NaHCO_3 , 5,8mg KCl pro 1l dest. Wasser, pH 7,8) lösen, 17g high strength Agar-Agar einmischen und 2 Stunden im Wasserbad bei 100°C lösen);

Zuchttemperatur: $20 \pm 2^\circ\text{C}$

Beleuchtung: Dauerdunkel oder schwaches Tageslicht;

Fütterung: Haferflocken (4 - 6mal wöchentlich einige Flocken);

Standplatz: Kühlbrutschrank (oder im Labor);

Anlegen der Dauerzucht: Übertragen von Kokons auf frisches Agar-Agar-Substrat;

Anlegen von neuen Stammzuchten: 1 oder 2mal wöchentlich.

2.2 Synchronzucht

Anlegen der Synchronzucht: Es wird eine Dauerzucht mit ca. 25 gut genährten, geschlechtsreifen Adulten gestartet. Die frisch abgelegten Kokons werden alle 2 Tage mit einem Glashaken entnommen und auf neues Zuchtsubstrat übertragen. Die Kokons werden im Brutkühlschrank bei $20 \pm 2^\circ\text{C}$ inkubiert. Der Schlupfzeitpunkt wird registriert und die Tiere wie unter 2.1 beschrieben weiter gehalten. Die Synchronzucht muß 3 - 4 Wochen vor dem geplanten Versuchsbeginn angelegt werden.

B. Bibliographie

1 Collembolen-Biotest

- ISO (1996) Soil Quality- Effects of soil pollutants on collembola (*Folsomia candida*): Methods for the determination of effects on reproduction. ISO/CD 11267
- RIEPERT F., C. KULA (1996) Development of laboratory methods for testing effects of chemicals and pesticides on Collembola and earthworms. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, 320, 4- 47

- WILES J.A. , P.H. KROGH (1998) Tests with the collembolans *Isotoma viridis*, *Folsomia candida* and *Folsomia fimetaria*. In: Lokke, H. & C.A.M. van Gestel "Handbook of invertebrate toxicity tests" Wiley & Sons Chichester, 131- 156

2 Enchytraeen-Biotest

- rivm (1995) Methode voor het bepalen van het effect van chemische verbindingen op de reproductie van *Enchytraeus crypticus*
- RÖMBKE J. (1989) Entwicklung eines Reproduktionstests mit Bodenorganismen – Enchytraeen, UBA, FE-Vorhaben 106 03 051/01
- RÖMBKE J. (1989) *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta) as a test organism in terrestrial laboratory systems. Arch. Toxicol. Suppl. 13, 402-405
- RÖMBKE J., T. KNACKER (1989) Aquatic toxicity test for enchytraeids. Hydrobiologia
- WESTHEIDE W., D. BETHKE-BEILFUß (1991) in Esser, G., Overdiek D. (eds.), The sublethal enchytraeid test system: guidelines and some results. In: Modern Ecology: Basic and Applied Aspects. Elsevier, Amsterdam, 497 – 508
- JENSEN P. (1982) A new meiofauna sample splitter. Annales Zoologici Fennici 19, 233-236

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.3 Verbundvorhaben 4: Ökotoxikologische Testbatterien

9.3.3 Entwicklung und Einsatz eines standardisierten Testsystems mit Bodenprotozoen (TV 4.2.2)

Dr. W. Pauli

A. Louis
S. Kühnel
S. Berger
V. Poka

Freie Universität Berlin
Institut für Biologie – Ökotoxikologie/Biochemie
Ehrenbergstraße 26-28
14195 Berlin

Förderkennzeichen: 1491032

Laufzeit: 01.07.1996 – 30.09.1999

1 Zusammenfassung und Zielsetzung

Im Rahmen des Vorhabens sollten praxisnahe Bodentests mit typischen Vertretern der autochthonen terrestrischen Protozoenbiozönose entwickelt werden. Die Tests sollten sich zur Abschätzung des ökotoxikologischen Risikopotentials von Altlasten eignen und in eine Testbatterie zur biologischen Bewertung des Sanierungserfolges von Boden-Altlasten eingebunden werden. Mit der Entwicklung von Tests mit Protozoen sollte eine – hinsichtlich Trophieebene, Funktionalität und Schadstoffexposition - bestehende Lücke innerhalb der verfügbaren Bodentests geschlossen werden. Als Testmerkmale sollten zentrale, für die ökologische Funktion dieser Tiergruppe ausschlaggebende Eigenschaften ausgewählt werden. Die toxikologischen Endpunkte sollten mit geringem Aufwand und einfachen Nachweismethoden erfasst werden können.

Als Testorganismen wurde die weitverbreitete und in hoher Zahl im Boden anzutreffende Spezies *Colpoda inflata* herangezogen. Bei dieser Art handelt es sich um einen typischen Vertreter der Gattung *Colpoda*, welche aufgrund ihrer Dominanz und Verbreitung prägend für die bodenökologisch bedeutende Ciliatengemeinschaft ist. Als akutes Testmerkmal wurde auf die Excystierungsfähigkeit (Testzeitraum: 3 h) zurückgegriffen; als chronisches Testmerkmal, mit dessen Hilfe Schadefekte über mehrere Generationen hinweg verfolgt werden können, wurde die Zellvermehrung (20-stündiger Versuchszeitraum) der Organismen ausgewählt. *Colpoda inflata* ist ein typisch bakterienfressender Ciliat, der wie alle Bodenprotozoen als Schutz gegen Austrocknung, unter extremen Klimabedingungen und bei geringem Nahrungsangebot Dauerformen (Cysten) bildet. Unter günstigen Bedingungen "schlüpfen" (excystieren) die Zellen in nur wenigen Stunden und reagieren auf bakterielles Nahrungsangebot mit schneller Vermehrung.

Beide Testmerkmale, Excystierung und Zellvermehrung, sind hinsichtlich der bodenbiologischen Funktion von Protozoen als entscheidend anzusehen. Zugleich werden mit den biologischen Merkmalen der Excystierung und Reproduktionsfähigkeit zwei toxikologische Summenparameter erfasst, welche die Gesamtintegrität der Zelle widerspiegeln und ein breites Spektrum physiologischer und genetischer Schädigungen des Organismus anzuzeigen helfen.

Obwohl bei einigen aquatischen Vertretern von Protozoen auf eine Fülle an Literatur zurückgegriffen werden kann, und ökotoxikologische Tests mit Süßwasser-Protozoen einen hohen Grad der Standardisierung erfahren haben, liegen nur sehr unzulängliche Kenntnisse über die Biologie von terrestrischen Protozoen vor. Ein wesentlicher Teil der Testentwicklung konzentriert sich daher auf das Einengen der physikalisch-chemischen Randbedingungen, die Auswahl geeigneter, d.h. praxisnaher, einfacher Nachweismethoden zur Bestimmung der Testmerkmale Excystierung und Vermehrung, sowie die Festlegung des generellen Testdesigns (Milieubedingungen, Zeitspanne der Tests, toxikologische Endpunkte). Durch Einbeziehung verschiedener Bodenarten mit unterschiedlichen organischen Gehalten wurde sichergestellt, dass die eingesetzten Organismen nicht primär auf Nährstoff- oder Bodenstrukturveränderungen reagieren.

Anhand von 6 unbelasteten Standard- und Referenzböden sowie 13 besonders mit Mineralölkohlenwasserstoffen (MKW), Trinitrotoluol (TNT) bzw. polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) kontaminierten Böden wurden die Testsysteme auf ihre Anwendbarkeit im Hinblick auf eine ökotoxikologische Bewertung von Bodenaltlasten überprüft. Um Einflüsse des Sanierungsverfahrens bzw. den Erfolg der Sanierungsmassnahme zu dokumen-

tieren, d.h. die ökotoxikologische Unbedenklichkeit zu bestätigen, wurden darüber hinaus Tests mit 13 Proben sanierter Böden durchgeführt. Drei davon stellten unbelastete Referenzböden dar, die dennoch einem Sanierungsverfahren unterzogen wurden; bei 10 der Proben handelte es sich um kontaminierte Böden, die eine Sanierungsmassnahme durchlaufen hatten. Um eine weitergehende Quantifizierung des Gefahrenpotentials vornehmen zu können, wurden zusätzlich Testprotokolle zur Herstellung von Verdünnungsreihen erstellt. Zur Abschätzung der Bioverfügbarkeit und zur Bestimmung des Expositionspfades von Kontaminanten in der Bodenmatrix wurden außerdem Tests an Eluaten der Böden vorgenommen und den Ergebnissen der Bodenuntersuchungen gegenübergestellt.

In den unbehandelten Kontroll- bzw. Referenzböden zeigten sich keine negativen Einflüsse auf die beiden Testparameter Zellvermehrung und Excystierung. Deutliche Hemmwirkungen waren jedoch im Falle der kontaminierten Böden zu beobachten, wobei der Testparameter Excystierung die durchschnittlich höhere Testempfindlichkeit aufwies. Durch die jeweiligen Sanierungsmassnahmen konnten diese Schadeffekte z.T. erheblich verringert und in einigen Fällen sogar aufgehoben werden. Nur im Falle eines Bodens konnte anhand des Testparameters Excystierung gezeigt werden, dass von einer Sanierungsmassnahme auch negative Einflüsse auf die Bodenbiozönose ausgehen können. Dass die Anwesenheit der Bodenmatrix im Versuch von Bedeutung ist, konnte durch Tests mit Bodeneluaten belegt werden.

Aus den Untersuchungen geht hervor, dass sich mit den beiden Protozoen-Tests für dieses bodenartige Spektrum sowohl akute als auch chronische Gefahrenpotentiale von Böden in nur geringen Testzeiträumen von 3 bzw. 20 Stunden zuverlässig nachweisen lassen.

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

2.1 Bodenprotozoen

90 % der Abbauarbeit in Böden werden von Bakterien und Pilzen geleistet, und nur etwa 10% entfallen auf die Bodentiere (Abb. 1). Jedoch sind es gerade die Bodentiere, die sehr effektiv den mikrobiellen Abbau beschleunigen und damit die Bereitstellung von Nährstoffen im Boden um bis zu 50% erhöhen können. Aus Freilanduntersuchungen geht hervor, dass eine Verringerung ihres Bestandes die Abbauleistung von Böden um bis zu 40% reduziert. Einzeller, "Würmer" und Arthropoden stellen in der Regel je ein Drittel der tierischen Biomasse im Boden. Ein Maß für die Stoffwechselaktivität und somit den Stoffumsatz der jeweiligen Organismen ist die Atmung. Protozoen veratmen im Durchschnitt etwa 70%, also erheblich mehr als ihrem Biomasseanteil von ca. einem Drittel entspricht. Kaum bekannt ist, dass von diesen bodenbewohnenden tierischen Mikroorganismen etwa gleich viel Biomasse wie von Regenwürmern produziert wird. Im Nahrungskreislauf stellen Protozoen eine ökologisch bedeutende Verbindung zwischen Bakterien und kleinen Metazoen (z.B. Rotatorien und Nematoden) her und entfalten hierdurch eine deutlich katalytische Wirkung auf bakterielle Prozesse und Remineralisationsvorgänge im Boden ([31- 33] u. Übersichtsartikel von [3; 5; 18]). Bodenprotozoen sind als Hauptkonsumenten der Bakterien anzusehen: Schätzungen von Stout und Heal [31] ergaben einen Verbrauch an Bakterien in Ackerböden von 150-900 g/Quadratmeter und Jahr, dies entspricht etwa dem 15 bis 85-fachen der bakteriellen Biomasse (standing crop). Bekannt ist, dass Bodenprotozoen einen deutlich stimulierenden Effekt auf das Wurzelwachstum ausüben ("Rhizosphäreneffekt": [7; 13; 31]).

In Mikrokosmosexperimenten konnte gezeigt werden, dass Bodenprotozoen zu einer Steigerung des Pflanzenwachstums um etwa 80% beitragen [9].

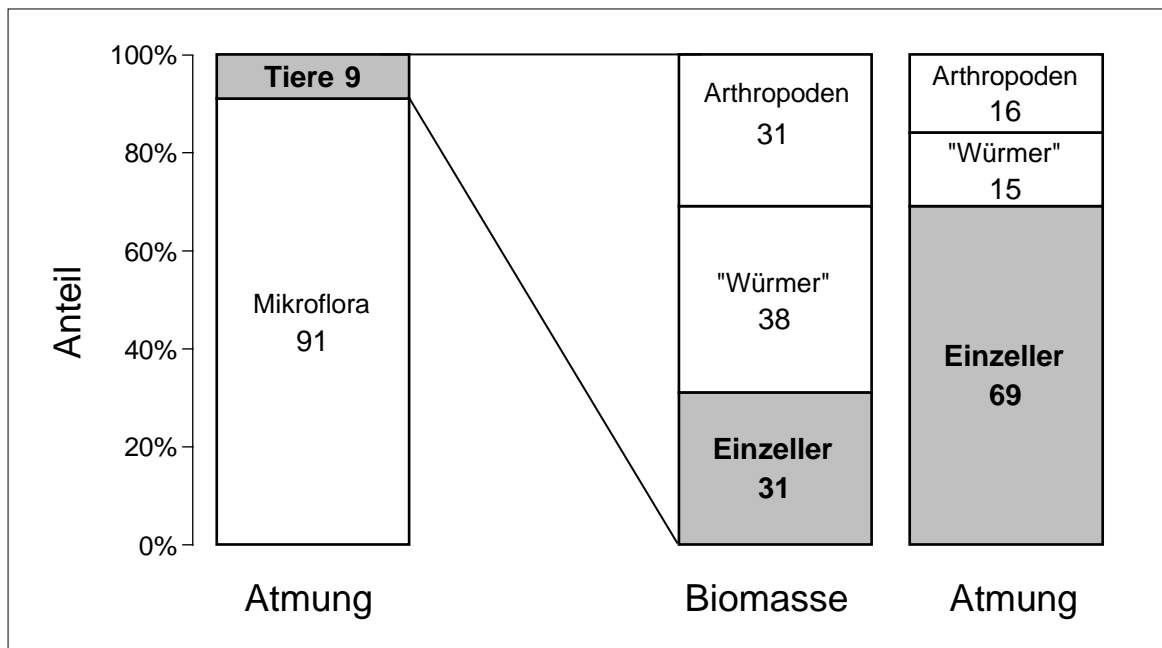


Abb. 1: Biomasse und Atmung der Bodenorganismen. Mittelwerte von 14 Ökosystemstudien über verschiedene Standorte der Welt, aus [18].

Taxonomisch lassen sich die Bodenprotozoen in drei Hauptgruppen untergliedern: kleine Flagellaten mit einer Größe von 3-10 μm , Amöben (2 μm flache Nacktamöben mit Durchmessern von 10- 300 μm und Schalenamöben mit Größen zwischen 20 und 200 μm), sowie 20-300 μm große Ciliaten [1; 4; 9; 34]. Ihr Vorkommen beschränkt sich hauptsächlich auf die oberen 0-10 cm des Bodens, wobei Flagellaten und Nacktamöben aufgrund ihrer geringen Größe bzw. flachen und flexiblen Form selbst in die Feinstporen des Bodens (= 2 μm) vordringen können.

Während es sich bei Schalenamöben (Testacea) um "K"-Strategen (hohe Individuendichte, niedrige Wachstumsraten) mit Präferenz für Habitate geringer Dekompostierungskapazität handelt, sind Ciliaten, Flagellaten und Nacktamöben als typische "r"-Strategen mit hohen Wachstumsraten besonders in Bereichen hoher Abbauaktivität anzutreffen.

Bodenprotozoen unterscheiden sich von marinen und Süßwasserprotozoen besonders durch ihre allgemeine Fähigkeit zur Encystierung. Sie sind damit bestens an die für den terrestrischen Bereich typischen Nass-/Trockenzyklen angepasst. Nach Befeuchten des Bodens beginnt die Zahl aktiver Protozoen als Folge vermehrter bakterieller Aktivität stark anzusteigen ("peak germination", [4; 8; 18], Abb. 2). Für den Streuschichtbereich des Bodens ist dabei eine typische Artensukzession von Zooflagellaten über Nacktamöben und Ciliaten beschrieben [4].

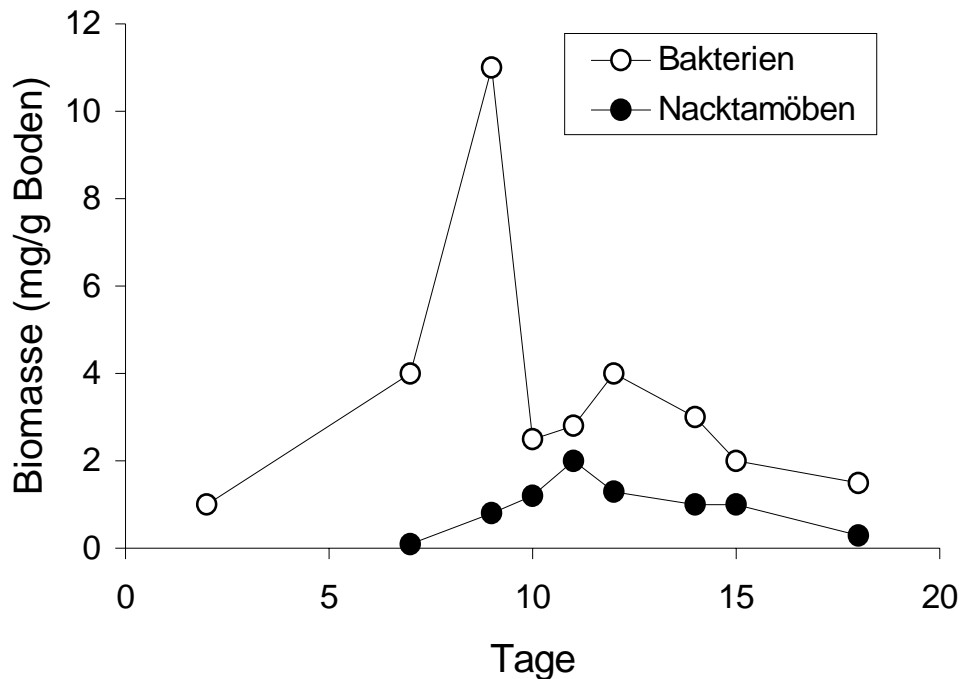


Abb. 2: Räuber-Beute-Dynamik zwischen Protozoen am Beispiel der Nacktamöben und Bakterien in einem natürlichen Boden [8].

Hinsichtlich ihrer ökologischen Funktion, ihrer Biomasse (Tab. 1) sowie Verbreitung sind alle drei Gruppen der Protozoen (Flagellaten, Amöben und Ciliaten) als gleichbedeutend anzusehen [12; 18].

Tab.1: Häufigkeiten "nackter" Protozoen in verschiedenen Böden und in der Rhizosphäre (Individuen/g Trockenboden [34] bzw. relativer Biomasseanteil der jeweiligen Hauptgruppe, berechnet nach [2])

	Ackerboden		subtropischer Waldboden	
	unbepflanzter Boden		Rhizosphäre	Boden (gesamt)
Flagellaten	570 – 14000	1600 – 65000	22000 – 3127000	4000 – 8231000
% Biomasse	4 – 16	8 – 15	19 – 58	12 – 16
Nacktamöben	105000 – 50000	18000–181000	148000 – 823000	1100–30750000
% Biomasse	79 – 56	43 – 92	5 – 39	3 – 61
Ciliaten	30 – 280	0 – 1750	10 – 132600	280 – 132600
% Biomasse	17 – 29	0 – 41	3 – 76	23 – 84

2.2 Bodenprotozoen als *in situ*-Indikatororganismen

In einer Reihe von Arbeiten wird die Eignung von Bodenprotozoen zur Bioindikation der Bodengüte und zur Überwachung von Regenerationsprozessen in geschädigten Böden hervorgehoben. In situ-Untersuchungen zeigen die zum Teil drastischen und langfristigen Effekte physikalischer Veränderungen (z.B. Verdichtung, Abtrag oberer Bodenschichten) und chemischer Belastungen des Bodens durch Düngung und Pestizideinsatz auf das Artenspektrum und die Individuendichte von Bodenprotozoen. So führt etwa das früher häufig und z.T. immer noch eingesetzte Insektizid Lindan in praxisüblicher Dosierung zu einem fast vollständigen Verschwinden von Ciliaten und Schalenamöben im Boden, während Nematoden kaum beeinflusst werden [24]. Die praxisübliche Anwendung der Insektizide Duplitox, Aldrin, Heptachlor und des bis Anfang der 70er Jahre weltweit eingesetzten DDT's sowie der Herbizide 2,4-D, NaTA, Simazin, Diuron, Monuron und Cotoran bewirkt ebenfalls eine nachhaltige Abnahme der Bodenprotozoen [15; 22; 27]. Freiland- und Laboruntersuchungen zeigen übereinstimmend eine starke Reduktion der Protozoen nach bereits geringer Bodenverdichtung von 0,48 auf 0,51 kg/dm³ [6; 10; 11]. Yeates et al. [38] konnten nachweisen, dass sich Protozoen neben Nematoden gut zur mittelfristigen Indikation von Regenerationsprozessen devastierter Standorte und geschädigter Böden eignen.

2.3 In vitro-Tests mit Bodenprotozoen

Gemessen an ihrer allgemein anerkannten Schlüsselfunktion für das Ökosystem Boden und obwohl eine Reihe typischer Repräsentanten der Bodenciliaten, Bodenflagellaten und Bodenamöben unter standardisierten Bedingungen und mit kurzen Generationszeiten im Labor leicht kultiviert werden können, wurden Bodenprotozoen als Testobjekte ökotoxikologischer Untersuchungen bisher weitgehend vernachlässigt. Während in der aquatischen Ökotoxikologie eine Fülle über mehrere Jahrzehnte zurückreichender Literatur über Protozoentests existiert, datieren beinahe alle vorliegenden Arbeiten zu ökotoxikologischen Tests mit Bodenprotozoen aus den letzten Jahren. Zur Prüfung des toxischen Potentials von Stoffen für den Boden werden hierbei überwiegend Flüssigphasen-Wachstumstests, meist mit Reinkulturen typischer Bodenprotozoen, durchgeführt [16; 17; 20; 21; 25; 28]. Festphasentests bezüglich der Vermehrung einer Einzelspezies in behandelten, definierten Böden (z.B. artificial soil) oder gar unter Verwendung natürlicher, nicht sterilisierter Böden, wurden bisher nicht entwickelt.

2.4 Colpoda als Testorganismus

Ciliaten der Gattung *Colpoda* werden als Kosmopoliten unter den Bodenprotozoen angesehen. Aufgrund ihrer Dominanz und hinsichtlich ihrer allgemeinen Verbreitung wird die gesamte Bodenciliatengemeinschaft als "Colpodetea" bezeichnet [4; 18]. *Colpoda*-Arten sind sowohl in der Wurzelzone des Bodens als auch in der Streuschicht bzw. den oberen Bodenschichten anzutreffen, wo sie den Großteil (50-95%) der Ciliaten stellen [4]. Sie gelten dort als typische und effektive Bakterienfiltrierer [2]. Wie der Großteil terrestrischer Protozoen besitzen auch sie die Fähigkeit, Cysten als Schutz gegen Austrocknung und extreme Klimabedingungen zu bilden [29]. Bei einem Wassergehalt von etwa 20% (0.01 MPa, pF 2) und mehr können sie excystieren und sich vermehren [14]. Ihre kurzen Generationszeiten von nur wenigen Stun-

den zeichnen sie als typische "r"-Strategen aus, die sehr kurzzeitig mit hohen Zelldichten auf bakterielles Nahrungsangebot im Boden reagieren können [4].

Die weit verbreitete und in hoher Individuendichte vorkommende autochthone Spezies *Colpoda inflata* [2; 4; 18; 30; 36], Abb. 3, ist als vielversprechender Testorganismus hinsichtlich bodentoxikologischer Fragestellungen anzusehen: Ihre einzellige Struktur und das Fehlen von Zellwänden ermöglicht Schadstoffen ein schnelles und leichtes Erreichen von Wirkorten im Zellinneren; aufgrund ihrer kurzen Generationszeiten von 3-4 h vermag sie schneller als die meisten übrigen Eukaryoten chronische Umwelteinflüsse anzuzeigen - Eigenschaften, die sie besonders zur Kurzzeitindikation von Belastungen prädestinieren. Ihr Lebensraum - Porenwasser und oftmals nur hauchdünne Wasserfilme um Bodenpartikel - sowie ihre effektive Filtrationsleistung exponiert sie nicht nur in der Wasserphase gelösten Stoffen, sondern besonders auch solchen Kontaminanten, die an anorganische und organische Partikel gebunden bzw. adsorbiert vorliegen. Aufgrund ihrer Größe und Schwimmfähigkeit sind sie - anders als die auf Partikeln kriechenden Amöben und die sehr kleinen Flagellaten - leicht aus der Bodenphase zu isolieren und zu zählen [37]. Als eukaryotische Organismen besitzen sie eine Vielzahl komplexer Eigenschaften, wie sie normalerweise nur bei höheren Tieren anzutreffen sind. Protozoen können deshalb als ökotoxikologisches Modellsystem angesehen werden, das vielfältige Expositionspfade von Schadstoffen in der Bodenmatrix abbildet und das in vielen Punkten differenzierte Leistungen tierischer Organismen mit der einfachen Handhabung von Mikroorganismen [23; 26; 35] verbindet.

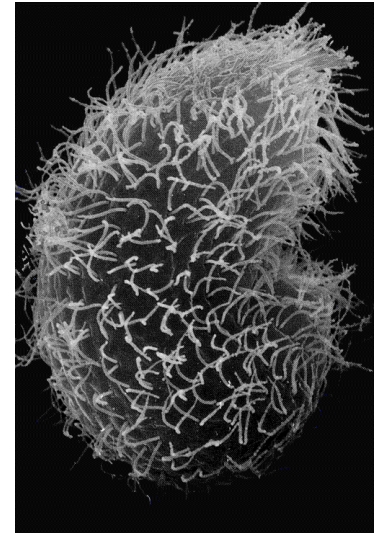


Abb. 3: REM-Aufnahme von *Colpoda inflata* (Länge ca. 60 μm), entnommen [19].

3 Material und Methoden

3.1 Testorganismus

Colpoda inflata (CCAP No.: 1615/2), Ciliata, Protozoa (CCAP, Cumbria, GB)

3.1.1 Wachstumsmedium

Organisches Substrat: 0,6 mg/ml E.coli (ATCC 11303, Sigma, zur Hemmung bakterieller Aktivität 2-fach lyophilisiert).

Salze: 12,5 mg/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 25 mg/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 5 mg/l KCl.

pH-Puffer: Um die Böden bzw. Eluate auf einen physiologisch optimalen pH-Wert um pH 6,5 einzustellen (vgl. Abb. 8) und damit inhibitorische Effekte besonders geringer oder hoher pH-Werte des Testmaterials weitgehend auszuschließen, wird den Ansätzen zusätzlich ein biologischer pH-Puffer (20 mM PIPES, Piperazin-N,N'-bis (2-ethansulfonsäure), Sigma, D; pH

6,5, NaOH) zugesetzt, der in den hier eingesetzten Konzentrationen ohne negativen Einfluss auf die Vermehrungsfähigkeit bleibt.

3.1.2 Excystierungsmedium

Organisches Substrat: Vollmedium auf der Basis von Proteose/Pepton-Hefeextrakt: 1,25 g/l Proteose/Pepton (0,125% w/v, Difco); 2,5 g/l Hefeextrakt (0,25% w/v, Difco), 5 g/l Glucose (0,5% w/v)

Salze: 12,5 mg/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 25 mg/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 5 mg/l KCl.

pH-Puffer: Analog zum Wachstumsmedium wird zur Stabilisierung des pH-Wertes hier ebenfalls ein biologischer Puffer (20 mM Aces, N-(2-Acetamino)-2-aminoethansulfonsäure, Sigma, D; pH 6,5, NaOH) eingesetzt, der in dieser Konzentrationen keinen negativen Effekt auf die Excystierungsfähigkeit zeigt.

3.1.3 Dauerkulturen

Die Dauerkultivierung der Zellen erfolgt unter Raumtemperaturbedingungen in Wachstumsmedium in 250-ml-Gewebekulturflaschen (Greiner Labortechnik, D). Das Kulturvolumen beträgt 40 ml. Als Inokulum werden jeweils ca. 50-100 μl einer Suspension aktiver oder encystierter Zellen herangezogen. Nach etwa 3-4 Tagen erreicht die Kultur ihre maximale Populationsdichte und nach einem weiteren Zeitraum von ca. 3-4 Tagen beginnen die Zellen Cysten (Dauerstadien) zu bilden (vgl. Abb. 4).

Während dieses Encystierungsprozesses haften sich die Organismen an die wasserbenetzten Oberflächen des Kulturgefäßes an. Nach einem weiteren 1-2 wöchigen Zeitraum, in dem die Organismen vollständig encystieren, werden die Cysten von den Oberflächen der Gewebekulturschale entfernt und durch einfaches Absedimentieren über einen Zeitraum von ca. 2 Stunden sowie Entfernen des Überstandes auf etwa ein 1/6 des Ursprungsvolumens eingengt. Zur Vereinzelung der z.T. auftretenden Cystenverbände, d.h. um eine homogene Cystensuspension zu erreichen, wird die eingengte Suspension 8-10 Mal durch eine 1 ml-Injektionsspritze (Nadeldurchmesser 0,33 mm, entspr. 29 G) gezogen, in Eppendorf-Gefäße aliquotiert (je ca 0.5-1ml) und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die so erhaltene homogene Cystensuspension kann über mehrere Monate als Ausgangsmaterial für Vorkulturen (Wachstumstest) bzw. für Excystierungstests eingesetzt werden.

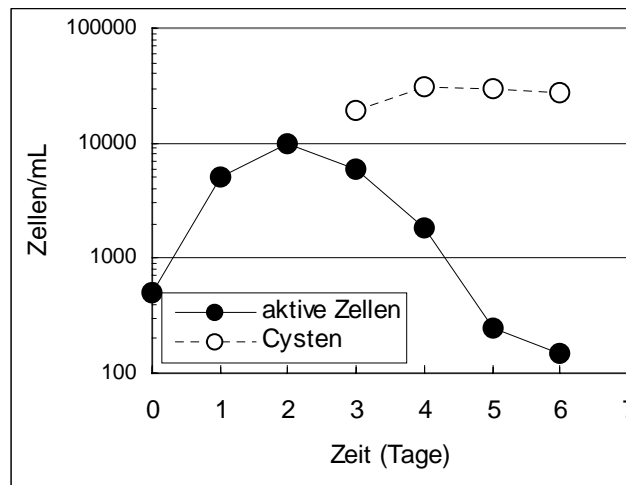


Abb. 4: Typische Wachstums- und Encystierungskinetik von *C. inflata*

3.2 Wachstumstest

Testgefäße: Die Vorkultivierung sowie die Wachstumstests werden in 10 ml-Klarglas-Schraubkappengläschen mit Flachboden (25×52 mm, Supelco, D, Schraubkappen mit Teflon-Einlage) durchgeführt.

Vorkulturen: Im Wachstumstest werden aktive (excystierte), exponentiell wachsende Zellen eingesetzt. Um aus den encystierten Dauerkulturen aktive Zellen zu gewinnen, werden 10 µl Cystensuspension der Dauerkultur in 2 ml Wachstumsmedium überführt und über einen Zeitraum von 20-24 Stunden bei 28°C kultiviert. In dieser Zeitspanne "schlüpfen" die Zellen und beginnen sich exponentiell zu teilen.

Testdurchführung: Der wässrige Volumenanteil des Testansatzes beträgt 1 ml (1 ml Eluat bzw. Bodenanteil von max. 0,25 g + 1 ml wässrige Phase). Zur Durchführung des Tests wird dem jeweiligen Testgut (Eluat bzw. geschütteltes Boden-/ Wassergemisch) in einem ersten Schritt 50-fach konzentriertes Wachstumsmedium zugegeben; anschließend werden die Testansätze mit Organismen beimpft (Anfangs-Titer: 350/ml) und bei 28°C inkubiert. Nach 20 Stunden wird der Zelltiter mikroskopisch bestimmt und als Maß der Vermehrungsfähigkeit bzw. zur Quantifizierung inhibitorischer Wirkungen, bezogen auf einen Kontrollansatz ohne Boden (Wachstumsmedium + Zellen), herangezogen (vgl. Abb. 5). Dieser 20 h-Endpunkt hat sich als geeigneter und im Vergleich zu den üblichen Größen wie Biomasseproduktion und maximale Populationsgröße wesentlich einfacher zu bestimmender Parameter zur Beschreibung wachstumshemmender Einflüsse erwiesen (s. Abb. 6).

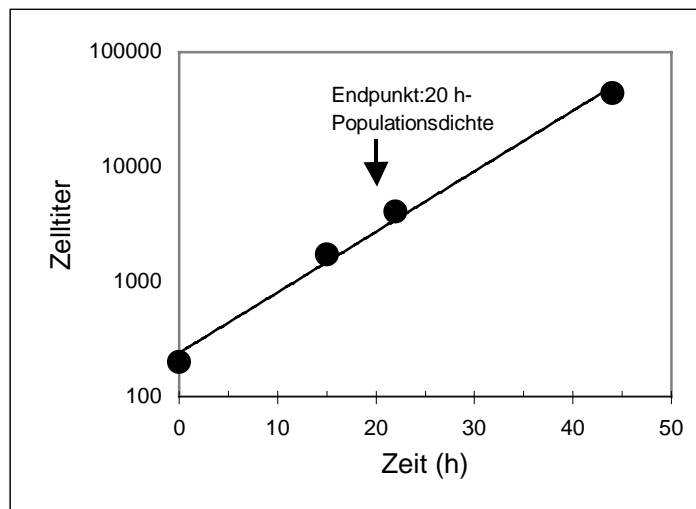


Abb. 5: Wachstumskinetik von *C. inflata*-Kontrollkulturen unter Testbedingungen. Nach 20-stündigem Wachstum wird die Populationsdichte ermittelt. Sie dient als Grundlage zur Quantifizierung der Vermehrungsfähigkeit.

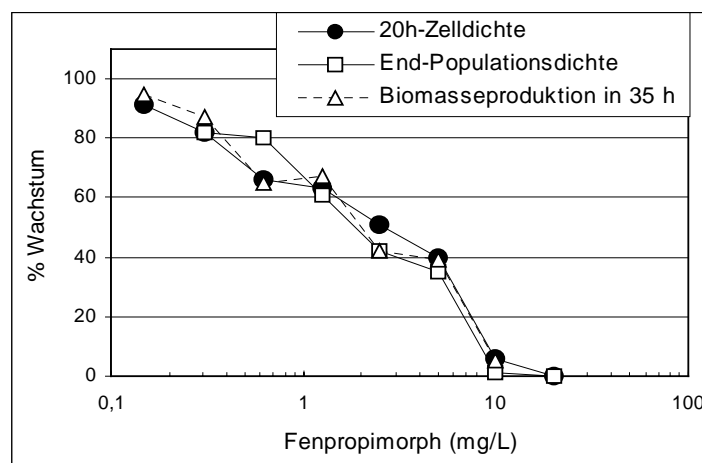


Abb. 6: Vergleich der wachstumshemmenden Wirkung von Fenpropimorph auf die zur Beschreibung reproduktionstoxischer Effekte häufig herangezogenen Endpunkte Biomasseproduktion und maximale Populationsdichte sowie die hier zur Bewertung zugrunde gelegte Größe der Zelldichte von *C. inflata* nach 20-stündigem Kulturwachstum.

Zellzählung: Zur Bestimmung des Titors aktiver Organismen in den Vorkulturen sowie bei den Eluattests werden jeweils 50 µl-Aliquots in Mikrotiterplatten überführt, die mit 1%-iger Glutardialdehydlösung (200 µl) befüllt sind. Nach etwa 10-minütiger Sedimentation der so fixierten Zellen wird bei 4-10-facher Objektiv-Vergrößerung ein Teil der Bodenfläche der Mikrotiterplatten-Vertiefungen ausgezählt und der Zelltitler berechnet. Anders als in den reinen Wasserphasen-Ansätzen erfolgt die Ermittlung der Zelldichten in den trüben, partikelreichen Boden-/Wasser-Mischungen nicht an Hand fixierter Organismen, sondern durch die Zählung aktiver, schwimmender Zellen: Die Boden-/Wasser-Lösungen werden

hierzu mit der Salz-/Puffer-Lösung des Wachstumsmediums (s.o.) im Verhältnis 1:4 verdünnt, anschließend werden von diesem verdünnten Ansatz jeweils 50 µl auf einem Objektträger dünn ausgestrichen und die Zellen unter dem Mikroskop (2-fach Objektiv) ausgezählt.

3.3 Excystierungstest

Testgefäße und -volumen: Mit den Testgefäßen des Wachstumstests (s.o.) identisch. Der wässrige Volumenanteil des Testansatzes beträgt jeweils 1,0 ml (Gesamtvolumen um den jeweiligen Bodenanteil, max. 0,5 g, vergrößert).

Vorkulturen: Die Herstellung von Vor- bzw. Starterkulturen wie im Falle des Wachstumstests entfällt; die Cysten der Dauerkulturen werden direkt im Test eingesetzt.

Testdurchführung: Nach dem Schütteln der mit H₂O versetzten Bodenproben werden dem Testansatz zunächst 4-fach konzentriertes Excystierungsmedium und anschließend 50 µl Cystensuspension der Dauerkulturen (entspr. einem Zelltitert um 10000/ml im Ansatz) zugegeben. Der Ansatz wird anschließend über einen Zeitraum von 3 h bei 28°C inkubiert.

Excystierungsgrad: Die Bestimmung excystierter Zellen in der Bodenprobe erfolgt nach dieser Inkubationsperiode von 3 Stunden an Hand der aktiven, schwimmenden, d.h. excystierten Zellen (Abb. 7) - wie unter "Wachstumstest" beschrieben - unter dem Mikroskop bei 4-facher Objektiv-Vergrößerung. Als Kontrolle (100 % Excystierung) dient ein Ansatz ohne Bodenanteil (Excystierungsmedium + Cysten).

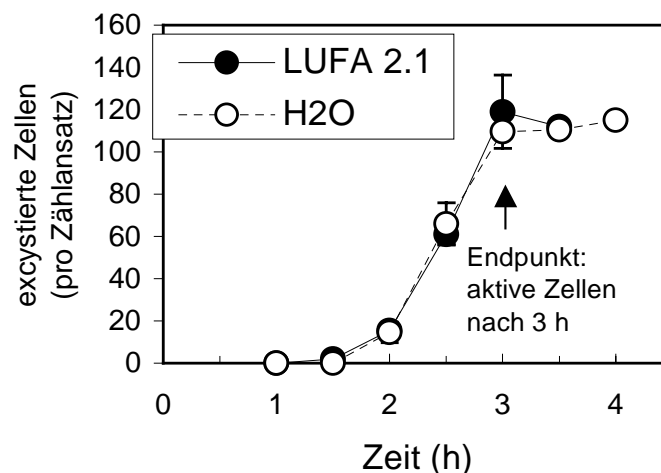


Abb. 7: Excystierungskinetik von *C. inflata* im Kontrollansatz (H₂O) und in einem der Kontrollböden (LUFA 2.1), angegeben als Zahl excystierter, aktiver Zellen in der Probe. Die Zahl aktiver Organismen nach 3-stündiger Inkubation dient als Grundlage zur Beschreibung von Hemmeffekten.

3.4 Testgut

Eluate: Die Bodeneluate wurden in Anlehnung an den Methodenvorschlag von W. Kördel und K. Hund (FhG Schmalleberg) hergestellt: Die Böden werden hierbei mit A. dest. versetzt

(höchste Konzentration: 1 Teil Boden + 2 Teile Wasser) und über einen Zeitraum von 20-24 Stunden geschüttelt. Abweichend von den Vorgaben wurde die Boden-Wasser-Suspension allerdings nicht bei Raumtemperatur, sondern bei 4°C geschüttelt. Durch das Eluieren bei niedrigeren Temperaturen sollten mikrobielle Aktivitäten, besonders eine Excystierung im Boden vorhandener, autochthoner Protozoen vermieden werden. Nach der Elutionsphase wurden die Boden-Wassersuspensionen bei 15000 × g abzentrifugiert und der Überstand im Test eingesetzt.

Bodenproben: Die Böden werden mit Wasser versetzt (Wachstumstest: größtes Boden/Wasser-Verhältnis: 1+4 bzw. Excystierungstest: größtes Boden/Wasser-Verhältnis: 1+2) und über einen Zeitraum von 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend werden die Boden-Wassergemische im Test eingesetzt.

pH-Einstellung: Die Pufferkapazität der in den Testmedien vorhandenen pH-Puffer reichte aus, um in der überwiegenden Zahl der Eluate sowie der Boden-Wassersuspensionen einen für die biologische Aktivität (Zellvermehrung, Excystierung) optimalen pH-Wert zwischen 6 und 7 zu erreichen (vgl. hierzu Abb. 8). Nur beim Auftreten extremer Werte wurde der pH-Wert durch Zugabe von NaOH bzw. HCl nachreguliert (im Falle des stark acidischen Bodens CTNT0, pH 3,3, sowie der alkalischen Böden CTNT4b, pH 8,0 und CTNT02a, pH 4,1; diese drei Böden weisen neben ihren extremen pH-Werten hohe C_{org} -Gehalte von mehr als 5% und damit hohe eigene Pufferkapazitäten auf).

4 Ergebnisse und Bewertung

4.1 Physikalisch/chemische Randbedingungen der biologischen Testparameter

4.1.1 pH-Wert und pH-Stabilisierung

Im pH-Bereich von pH 4-7 lassen sich für die Testspezies *C. inflata* nur geringe Abweichungen von der optimalen Wachstumsgeschwindigkeit feststellen. Erst oberhalb von pH 7 sind deutlich hemmende Effekte auf die Proliferationsgeschwindigkeit von *C. inflata* zu erkennen, s. Abb. 8 (für diese Untersuchungen wurde das exponentielle Wachstum in Kulturmedium ohne Pufferzusatz über einen Zeitraum von 24 Stunden verfolgt und der sich infolge der Zellvermehrung verändernde pH-Wert durch kontinuierliche Zudosierung von HCl bzw. NaOH konstant gehalten).

Im Vergleich zur Zellvermehrung reagiert das Testmerkmal Excystierung empfindlicher auf pH-Veränderungen – besonders im Bereich niedriger pH-Werte (Abb. 8). Optimale Excystierungsfähigkeit lässt sich hier zwischen pH-Werten von 5,5 und 7,2 beobachten. Abweichungen des pH-Wertes von diesen Eckdaten um etwa 0,5 pH-Einheiten führen bereits zu einer deutlich messbaren Verringerung oder sogar vollständigen Unterdrückung der biologischen Aktivität.

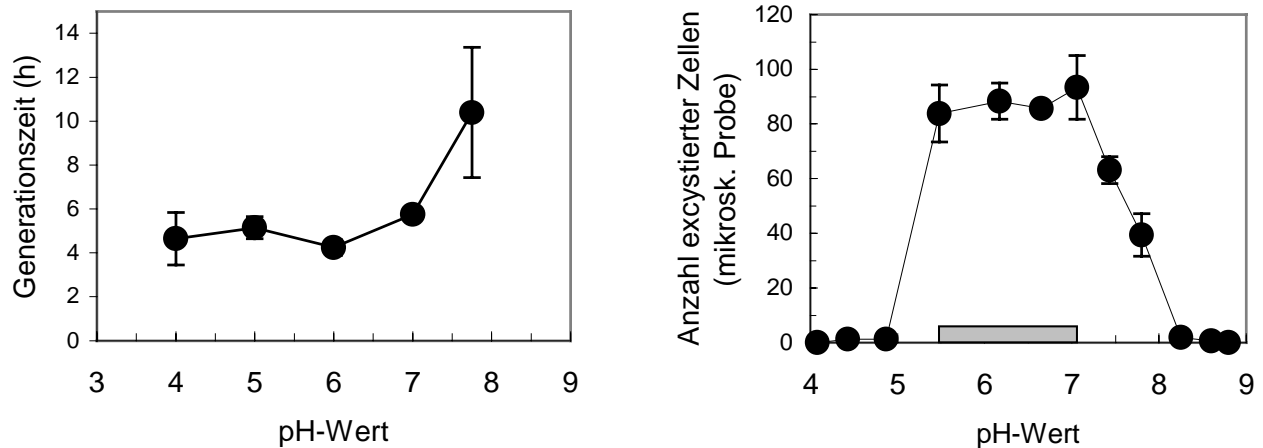


Abb. 8: Wachstum und Excystierung von *C. inflata* in Abhängigkeit des pH-Wertes (pH-Wert mit HCl bzw. NaOH eingestellt).

Um Veränderungen der biologischen Reaktion ausschließlich infolge von pH-Schwankungen des Bodenmaterials zu minimieren, sind die jeweiligen Testmedien pH-stabilisiert. Deshalb ist nur bei den Böden CTNT0 (pH 3,3), CTNT4b (pH 8,0) und CTNT02a (pH 4,1) mit extremen pH-Werten und gleichzeitig hohen C_{org} -Gehalten (>5%) in den Testansätzen ein pH-Wert außerhalb des Optimums zu beobachten.

4.1.2 Einfluß der Temperatur auf Wachstum und Excystierung

Die folgende Abbildung (Abb. 9) verdeutlicht den Zusammenhang zwischen Temperatur und Generationszeit bzw. Excystierungsgeschwindigkeit. Für beide Testparameter liegt das Temperaturoptimum bei 28°C. Die Zellen teilen sich bei dieser Temperatur etwa alle 4,2 h, so dass sich mit einem 20-stündigen Wachstumstest bereits chronische Effekte auf beinahe 5 Generationen erfassen lassen. Und bereits nach 3 Stunden lassen sich anhand der hohen Excystierungsraten bei dieser Temperatur deutliche Aussagen zur Akutwirkung von Schadstoffen treffen.

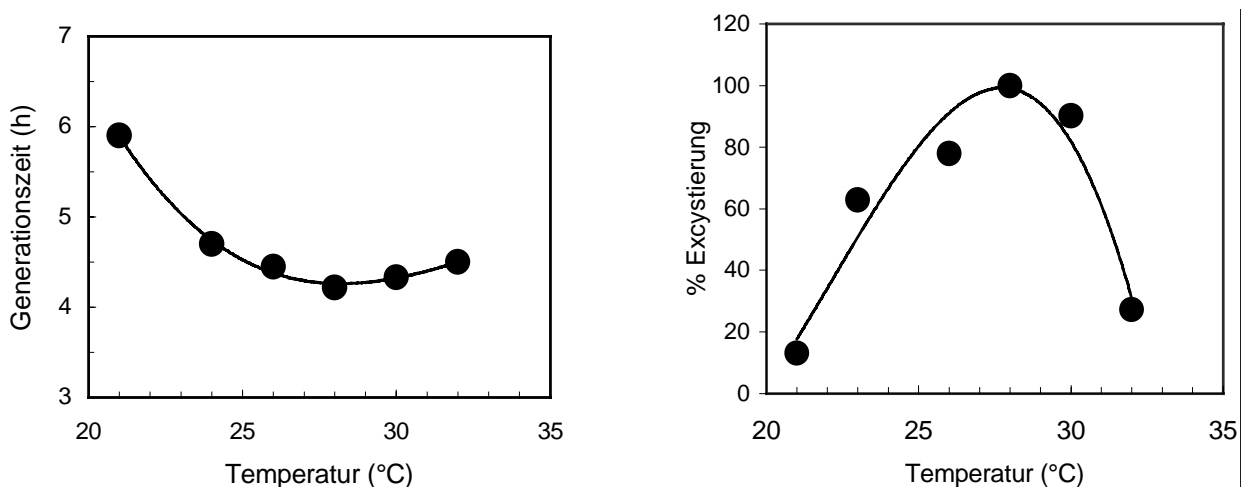


Abb. 9: Temperaturabhängigkeit der Zellvermehrungs- und Excystierungsgeschwindigkeit.

4.1.3 Einflüsse des Ionengehaltes

Bei Sanierungsmassnahmen wird häufig durch Zugabe von Zuschlagstoffen/Nährstoffen das Ionenmilieu stark verändert (vgl. Tab. 2). So liegt die Leitfähigkeit bzw. der Kaliumgehalt der sanierten Böden um z.T. eine Größenordnung über den Werten des Ausgangsmaterials.

Tab. 2: Veränderung der bodenchemischen Parameter Leitfähigkeit ($\mu\text{S}/\text{cm}$) und Kaliumgehalt ($\text{mg}/100\text{ g}$ Boden) als Folge von Sanierungsmassnahmen.

Boden	Leitfähigkeit [$\mu\text{S}/\text{cm}$]		Kaliumgehalt [$\text{mg}/100\text{g}$ Boden]	
	vor Sanierung	nach Sanierung	vor Sanierung	nach Sanierung
SPAK1a/b ¹	326	1122	110	316
CTNT4a/b ²	138	663	12	483
CTNT02a/04b ²	65	1842	3,5	750
LTNT1a/c ³	704	816	8	21
CWPAK1a/c ³	234	1806	5,5	85

¹: PAK-Humifizierung, 1/3 Kompost + Zuschlagstoffe

²: Mietverfahren mit Zuschlagstoffen

³: Bodenwäsche mit Zuschlagstoffen

Um eine Abschätzung der biologischen Folgen solcher Veränderungen des Bodenchemismus vornehmen zu können, wurden der Zusammenhang zwischen den Testparametern und der Leitfähigkeit untersucht (Abb. 10). Die Leitfähigkeit wurde hierbei durch die Zugabe von KCl verändert. Während keine Hemmeffekte bei der Zellvermehrung bis in hohe Konzentrationsbereiche von 50 mM KCl (entspr. 3,7 g KCl/l bzw. 1,9 g K⁺/l) und Leitfähigkeiten von mehr als 7000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ auftreten, kann bei dem akuten Testparameter Excystierung eine inhibitorische Wirkung bereits ab einer zusätzlichen Konzentration von 10 mM KCl (entspr. 0,74 g KCl/l bzw. 0,39 g K⁺/l) und einer Zunahme der Leitfähigkeit des Testmediums um ca. 1300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ beobachtet werden. Werte in diesen Bereichen treten hier nur bei sanierten Böden auf. Hemmende Einflüsse gegenüber der Excystierung allein aufgrund des künstlich erhöhten Salzgehaltes liegen damit nahe.

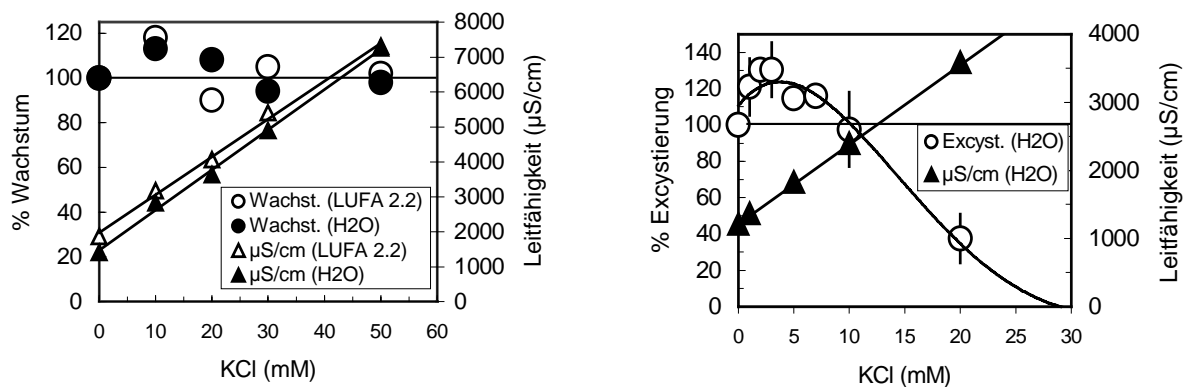


Abb. 10: Abhängigkeit der Zellvermehrung bzw. der Excystierungsfähigkeit vom Kaliumchloridgehalt. Im Testmedium selbst sind – neben weiteren Salzen - $67 \mu\text{M}$ KCl enthalten (vgl. Material & Methoden). Die Ausgangsleitfähigkeiten (KCl-Zugabe = 0 mM) geben den Wert des jeweiligen Testmediums (bzw. die Bodenlösung: LUFA 2.2 mit Testmedium, im Verhältnis 1 + 4) wieder.

4.1.4 Boden/Wasser-Verhältnis

Im trockenen Boden liegt *Colpoda* in Ruhestadien encystiert vor. Nach Befeuchten vermögen die Organismen innerhalb weniger Stunden ihre schützenden Cystenwänden zu verlassen (Excystierung). Die aktiven, hüllenlosen Zellen besiedeln das Bodenwasser, wo sie frei umherschwimmend als effektive Filtrierer Partikel zwischen $0,5$ und $3 \mu\text{m}$ Größe aufnehmen und hiervon die organischen Bestandteile als Nahrungsquelle nutzen. Dies exponiert sie nicht nur den in der Wasserphase gelösten Stoffen, sondern besonders auch solchen Chemikalien, die an anorganische sowie organische Partikel gebunden bzw. adsorbiert vorliegen.

Zur Festlegung eines hinsichtlich der beiden Testmerkmale Excystierung und Vermehrung geeigneten Boden-Wasser-Verhältnisses wurden verschiedene Standardböden in verschiedenen Verhältnissen mit Wasser versetzt und die biologische Aktivität verfolgt. Der Wassergehalt reichte dabei von der maximalen Wasserhaltekapazität bis zu einem Boden-Wasser-Verhältnis von 1+4 (1 Teil Boden + 4 Teile Wasser). Ausgehend von den Ergebnissen mit diesen Standardböden zeigen die Zellen sowohl sehr ähnliche Excystierungs- als auch Vermehrungsgeschwindigkeiten in wassergesättigten Böden (eingestellt auf max. Wasserhaltekapazität) wie auch in Boden-Wassersuspensionen, vgl. Abb. 11. Die Generationszeiten liegen hier weitgehend unabhängig vom Wassergehalt zwischen 4 und 4,5 Stunden. Der prozentuale Anteil excystierter Zellen nach 3-stündigem Versuchszeitraum schwankt zwischen 80 % und 104 % im Vergleich zur Kontrolle in reinem Excystierungsmedium ohne Boden (=100%).

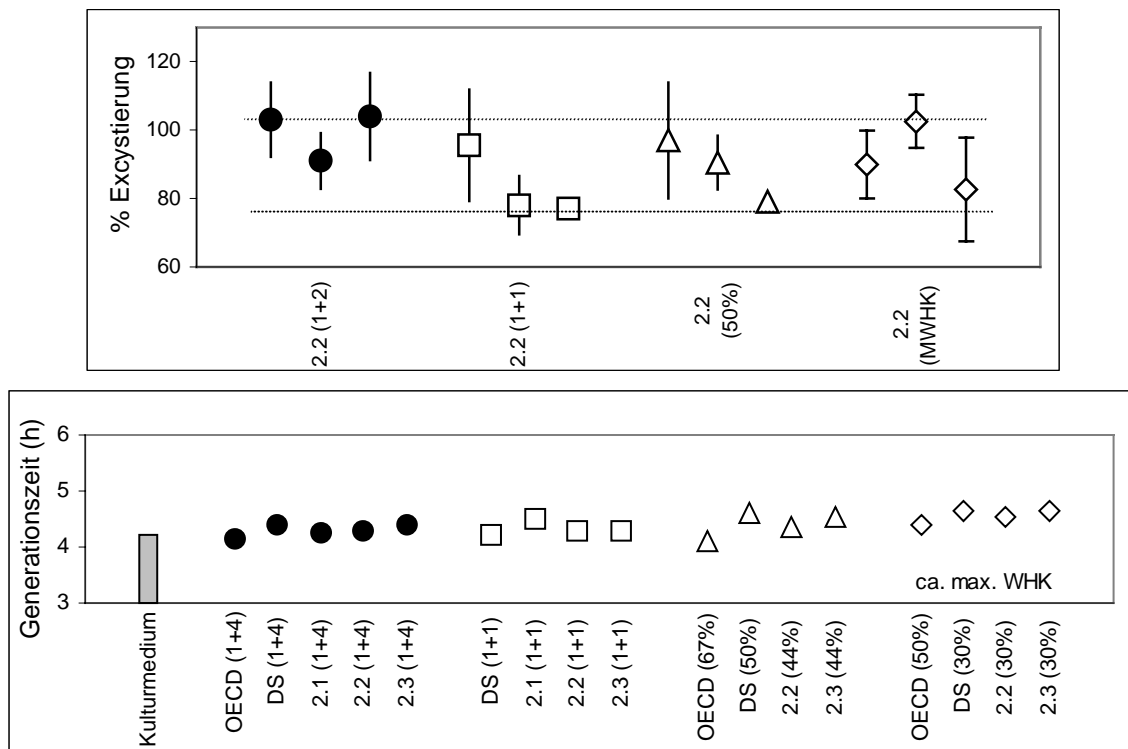


Abb. 11: Excystierte Zellen in Prozent nach 3 Stunden und Generationszeiten von *C. inflata* in verschiedenen Standardböden bei verschiedenen Wassergehalten (max. WHK - 80%), Wassergehalt bzw. Boden-Wasserverhältnis in Klammern angegeben. Zum Vergleich ist die Excystierung als 100%-Wert bzw. die Generationszeit der Zellen in reinem Testmedium (optimale Bedingungen in wässriger Lösung) angeführt. OECD: OECD-Erde; 2.1, 2.2, 2.3: LUFA 2.1, 2.2, 2.3; DS: Dänischer Referenzboden.

4.1.5 Probenvorbereitung

Ein geringer Wasseranteil der Probe hat zwar den Vorteil, den natürlichen Verhältnissen angefeuchteter oder nasser Böden nahe zu kommen, für Testzwecke ergibt sich aber der Nachteil, die Wasserhaltekapazität für jeden Boden - aufgrund der unterschiedlichen Fähigkeit Wasser aufzunehmen - ermitteln zu müssen und dementsprechend den Wassergehalt einzustellen. Ein nur angefeuchteter oder nasser Boden lässt sich zudem nicht oder kaum durch die übliche Methode des Schüttelns durchmischen, was eine "worst case" Simulation des ökotoxischen Potentials von Böden (Durchmischen der Probe, Aufschließen der Bodenpartikel, Freisetzen feiner Partikel und daran gebundener Schadstoffe, Gleichgewichtseinstellung zwischen gebundenen und gelösten Chemikalienanteilen) erschwert.

Inwiefern sich ein Durchmischen der wässrigen Bodenprobe auf die Hemmwirkung auswirkt, wird aus Abbildung 12 ersichtlich. In den nicht durch Schütteln durchmischten CTNT4a- und SPAK1a-Verdünnungsstufen nimmt die Hemmwirkung deutlich schneller ab als in den durchmischten Ansätzen: die äquipotenten Konzentrationen unterscheiden sich dabei im getesteten Konzentrationsbereich um etwa den Faktor 2 (CTNT4a) bis 6 (SPAK1a), d.h. die Toxizität der jeweiligen Verdünnungsstufen verdoppelt bis versechsfacht sich hier durch gutes Durchmischen der Proben.

4.1.6 Verdünnungsmedium

Neben dem toxizitätssteigernden Effekt des kräftigen Durchmischens der wässrigen Bodenprobe geht aus Abb. 12 zudem hervor, dass - im Vergleich zu Verdünnungsreihen in Wasser - die Toxizität des TNT-belasteten Bodens durch Verdünnen mit dem Referenzboden LUFA 2.2 um etwa die Hälfte reduziert wird. Um diesen häufig beim Mischen von Böden zu beobachtenden "schadstoffpuffernden" Effekt zu vermeiden, sind im Testprotokoll nur Verdünnungen des jeweiligen Testbodens mit Wasser vorgesehen.

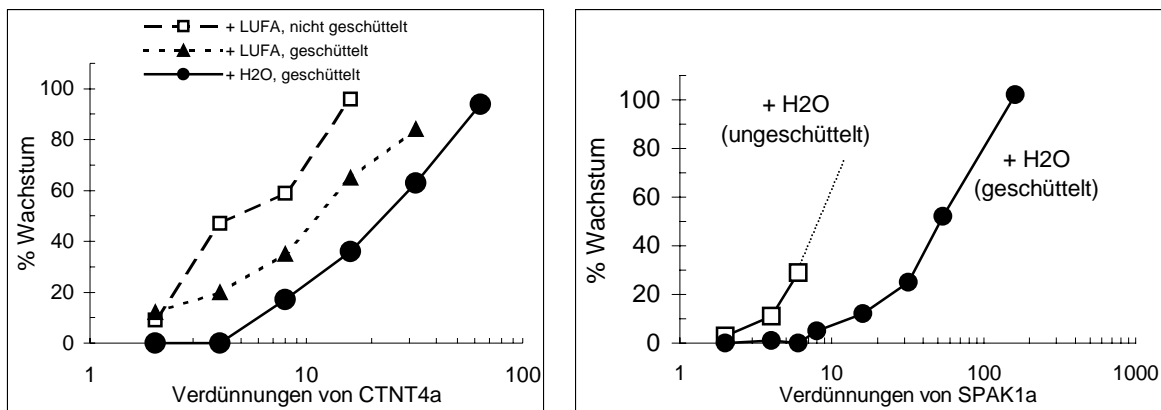


Abb. 12: Abhängigkeit der Wirkung der belasteten Böden CTNT4a und SPAK1a von der Probenvorbehandlung (geschüttelt/nicht geschüttelt) und vom Verdünnungsmedium (LUFA 2.2 bzw. H₂O). Im Falle des Bodens CTNT4a wurde sowohl mit LUFA 2.2 als auch mit Wasser verdünnt, der SPAK1a wurde ausschließlich in den angegebenen Verhältnissen in Wasser suspendiert (g Boden zu ml Wasser), geschüttelt und anschließend im Wachstumstest eingesetzt. Alle Werte sind auf eine Kontrollkultur in Wachstumsmedium ohne Bodenanteil (100%) bezogen.

4.2 Untersuchung des Testmaterials

4.2.1 Vergleich Boden-/Eluattest

Aus der folgenden Abbildung (Abb. 13) wird ersichtlich, inwieweit die Anwesenheit der Bodenmatrix im Testansatz für die ökotoxikologische Bewertung von Bedeutung ist oder ob zur Klassifizierung der Schadwirkung kontaminierter Böden der allgemein erheblich einfacher zu handhabende Einsatz von Boden-Eluaten ausreicht. Während bei allen MKW-haltigen und bei 4 von 5 PAK-kontaminierten Böden im Eluat keine Wirkung auf die Zellvermehrung auftritt, zeigen die Tests mit Bodenmaterial hier durchweg stärkere, z.T. extreme Hemmeffekte (EPAK4a). Nur im Falle der TNT-Böden lässt sich kein wesentlicher Unterschied der Wachstumsinhibition zwischen Eluat- und Bodentest feststellen (s. hierzu auch Abb. 14). Keine Wirkung, ob Eluat oder Boden, ist bei den unbelasteten Böden zu beobachten.

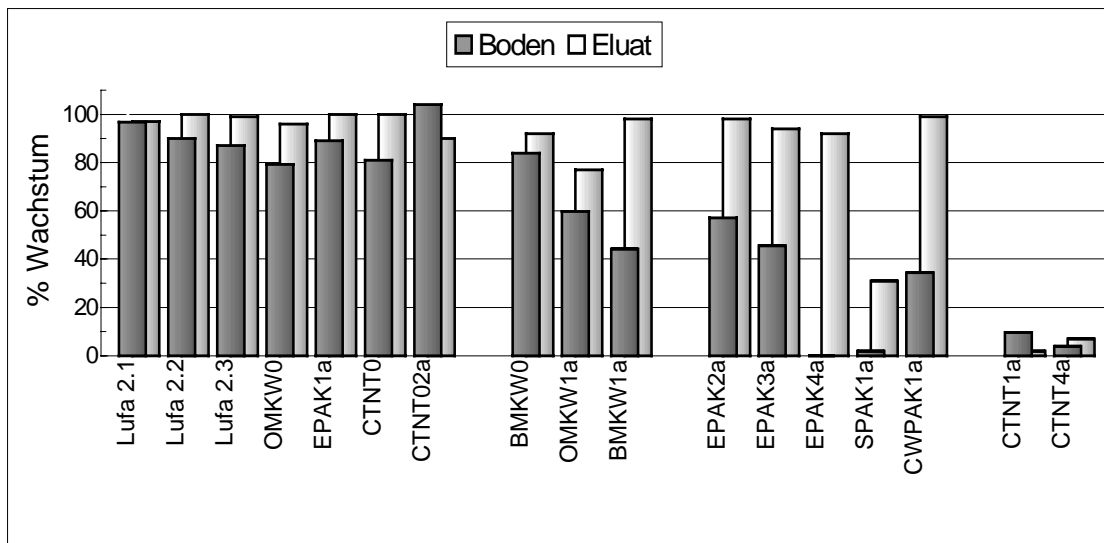


Abb. 13: Vergleich des Wachstumstests mit Boden und mit Eluat. Alle Werte sind auf einen Kontrollansatz in reinem Testmedium (100%) bezogen. MKW: Böden mit Mineralölkohlenwasserstoffen, PAK: mit polyaromatischen Kohlenwasserstoffen, TNT: mit Trinitrotoluol kontaminiert. Als Kontrollböden sind die Standardböden LUFA 2.1-2.3 sowie verschiedene unbelastete Referenzböden angegeben.

Der Unterschied in der Wirkung zwischen Boden und Eluat in Abhängigkeit vom Kontaminanten wird bei Betrachtung von Verdünnungsreihen noch deutlicher (illustriert für drei Böden mit unterschiedlichen Hauptkontaminanten in Abb. 14).

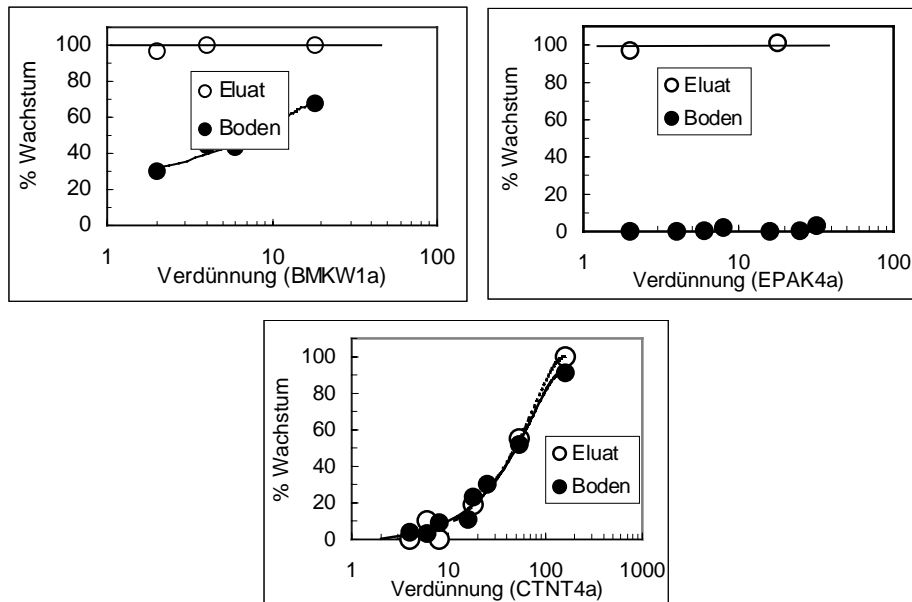


Abb. 14: Vergleich des Wachstumstests mit Boden und mit Eluat anhand von Verdünnungsreihen. Alle Werte sind auf die Vermehrungsfähigkeit in reinem Testmedium (100%) bezogen. BMKW1a: Boden mit Mineralkohlenwasserstoffen, EPAK4a: mit polyaromatischen Kohlenwasserstoffen, CTNT4a: mit Trinitrotoluol kontaminiert.

Im Falle des TNT-haltigen Bodens CTNT4a ist es gleichgültig, ob im Test das Eluat oder die Bodenmatrix eingesetzt wird. In der Abbildung ist ein identischer Kurvenverlauf für die Verdünnungsreihen erkennbar. Deutliche Differenzen ergeben sich aber für die MKW- und PAK-kontaminierten Böden BMKW1a und EPAK4a. Hier reagieren die Organismen auf das Bodenmaterial um Größenordnungen empfindlicher als auf das Boden-Eluat.

4.2.2 Kontrollböden

Anhand von 9 unbelasteten Standard- und Referenzböden wurde untersucht, inwieweit die Testsysteme von physikalisch/chemischen Eigenschaften des Bodens beeinflusst werden (Abb. 15). Drei dieser Böden (OMKW0, EPAK1b, CTNT04b) dienten zugleich zur Überprüfung der Auswirkung von Sanierungsverfahren auf die biologische Aktivität der Protozoen. Bei diesen Böden handelt es sich um unbelastete Referenzböden, die einem Sanierungsverfahren unterzogen wurden. Zur Sanierung der Böden waren Mietenverfahren (OMKW0, CTNT04b) bzw. eine Suspensionsreaktorbehandlung (EPAK1b) durchgeführt worden.

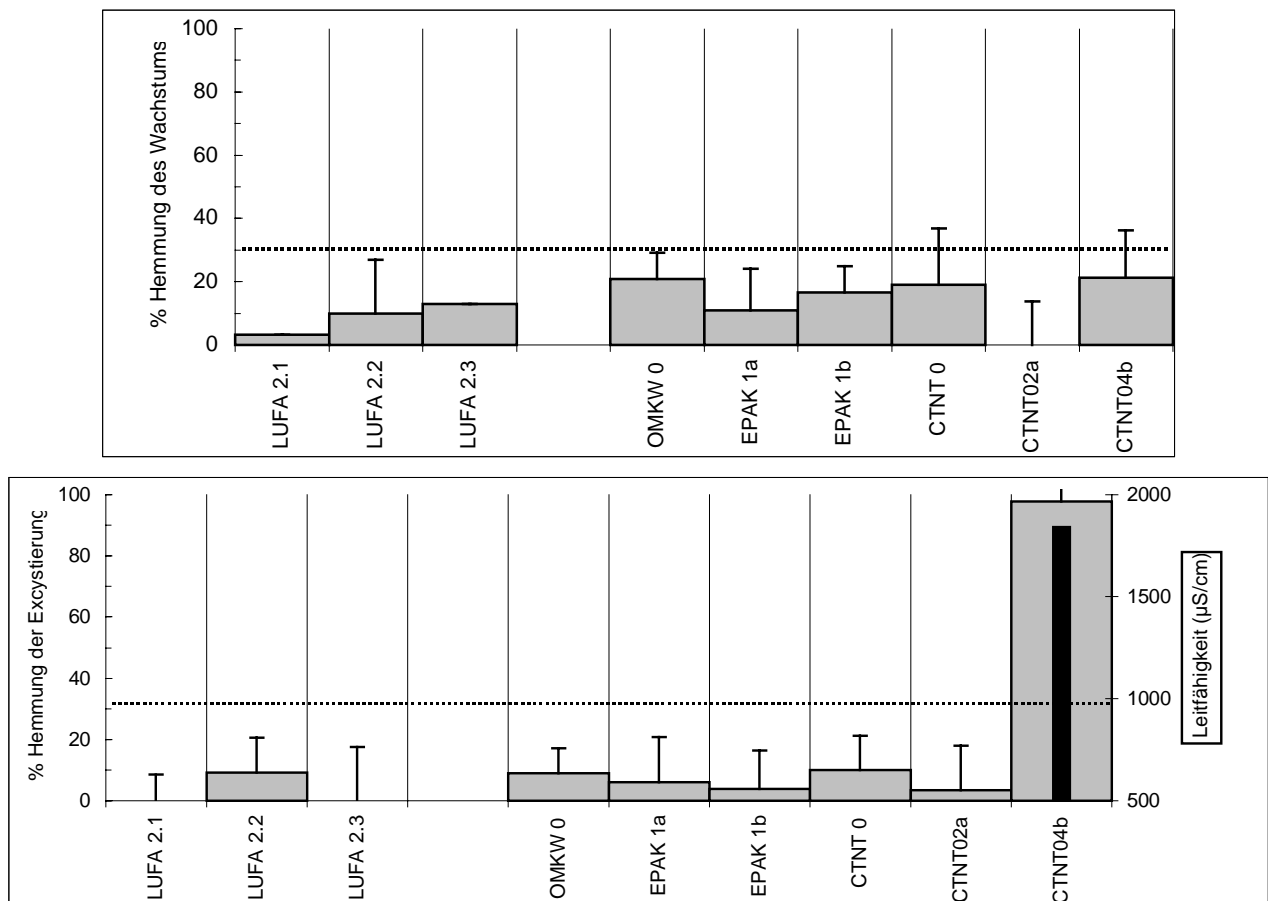


Abb. 15: Effekte der Standard und Referenzböden auf die Testparameter Zellvermehrung (Wachstum) und Excystierung. Als Toxizitätsschwelle wurde ein Wert von 30% (gestrichelte Linie) festgelegt, d.h. im Falle einer Hemmwirkungen von mehr als 30% wurde eine Probe als toxisch eingestuft. Alle Werte sind auf die Vermehrungsfähigkeit in Kulturmedium (0% Hemmung) bezogen. Angegeben sind die Mittelwerte der Messungen und ihre Standardabweichungen. Die Leitfähigkeit ist als schwarzer Balken (s. Boden CTNT04b) eingetragen.

In den unbehandelten Kontroll- bzw. Referenzböden zeigen die Organismen normale, mit den optimalen Bedingungen im reinen Testmedium vergleichbare Vermehrungs- und Excystierungsgeschwindigkeiten. Die maximalen Hemmeffekte liegen bei 20% - was in etwa der maximalen biologischen Schwankungsbreite der Testsysteme (um +/- 15%) entspricht. Auch von den behandelten, sanierten Böden gehen keine erkennbaren, außerhalb der Streuung liegenden, negativen Wirkungen aus. Nur im Falle des sanierten Bodens CTNT04 ist ein stark hemmender Einfluss auf die Excystierungsfähigkeit zu beobachten. Korreliert mit dieser Hemmung ist ein extrem hoher Leitfähigkeitswert von 1842 $\mu\text{S}/\text{cm}$, der um ca. eine Größenordnung über den Werten der restlichen Kontrollböden liegt (vgl. Tab. 3). Erklärt werden kann diese Leitfähigkeit durch den hohen Kalium-Gehalt von 750 mg/100 g Boden. Da mit einer KCl-bedingten Zunahme der Leitfähigkeit um über 1300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ eine einsetzende Hemmung der Excystierung einhergeht (s.o. unter: Einflüsse des Ionengehaltes), liegt es nahe, die von diesem Boden ausgehende starke Excystierungshemmung dem hohen Kalium-Ionengehalt des Boden zuzuschreiben.

Die physikalisch/chemischen Eigenschaften, die mit der vorliegenden Bodenauswahl erfasst werden, sind in Tabelle 3 aufgeführt. Bei den Kontrollböden handelt es sich um sandige bis lehmige Böden mit C_{org} -Gehalten zwischen 0,4 und 9,4%, pH-Werten zwischen pH 3,3 und 7,7, maximalen Wasserhaltekapazitäten bis 104%, Leitfähigkeiten zwischen 65 und 1842 $\mu\text{S}/\text{cm}$, Kaliumgehalten zwischen 3,5 und 750 mg/100 g Boden und Gesamtstickstoffgehalten von 13-925 mg/100 g Boden.

Tab. 3: Eigenschaften der Standard-(LUFÄ) und unbelasteten Referenzböden. Die kleinsten und größten Werte sind jeweils unterstrichen.

Boden	pH (CaCl ₂)	C _{org} [%]	Sand [%]	Schluff [%]	Ton [%]	Boden- art	WHK _{max} [%]	Leitfähigk. [$\mu\text{S}/\text{cm}$]	K _{cal} (mg/100 g)	N _{tot}
LUFÄ 2.1	5,9	0,62	<u>88,4</u>	<u>9,8</u>	<u>1,9</u>	S	-	-	-	-
LUFÄ 2.2	5,6	2,5	81,2	13,4	5,5	l'S	-	97	19	206
LUFÄ 2.3	6,4	1,22	60,9	29,6	9,5	uS	-	-	-	-
OMKW 0	6,9	1,2	29	49	22	UL	38	319	9,7	119
EPAK 1a	7,6	<u>0,4</u>	6,2	84	10	IU	<u>29</u>	127	27	18
EPAK 1b	<u>7,7</u>	0,4	<u>2,7</u>	<u>91</u>	6	U	31	147	30	<u>13</u>
CTNT 0	<u>3,3</u>	5,3	11	61	<u>28</u>	uL	102	73	6	458
CTNT02a	4,1	6,3	19	58	23	uL	92	<u>65</u>	<u>3,5</u>	341
CTNT04b	7,62	<u>9,4</u>	28,8	46,5	24,7	L	<u>104</u>	<u>1842</u>	<u>750</u>	<u>925</u>

C_{org}: organischer Kohlenstoffgehalt; WHK_{max}: maximale Wasserhaltekapazität; K_{cal}: Gesamtkaliumgehalt; N_{tot}: Gesamtstickstoffgehalt; S: Sand; l'S: schwach lehmiger Sand; uS: schluffiger Sand; uL: schluffiger Lehm U: Schluff; L: Lehm; -: keine Angaben

Für den Testparameter Zellvermehrung lassen sich für dieses Spektrum an Bodeneigenschaften keine Anwendungseinschränkungen hinsichtlich einer typisch kontaminationsorientierten biologischen Analytik angeben. Umgekehrt weisen aber auch die Excystierungstests darauf hin, dass ein Überangebot von Nährstoffen wie etwa Kalium zur Einschränkung wichtiger bodenbiologischer Funktionen führen kann.

4.2.3 Sanierungserfolg

Mit Ausnahme der Kontrollböden EPAK1a und CTNT02a geht von allen in der Abbildung 16 angeführten Böden "vor Sanierung" (mit "a" gekennzeichnete Böden) ein wachstumshemmender Effekt aus: Im Falle der Böden OMKW1a, EPAK2a, EPAK3a und CWPAK1a ist die Vermehrung um 40-70% - bezogen auf den Kontrollansatz im Testmedium - reduziert, durch die Böden EPAK4a, SPAK1a, CTNT4a und LTNT1a wird das Wachstum praktisch vollständig inhibiert. Ein prinzipiell ähnliches Bild zeigt sich beim Excystierungstest (Abb. 16). Allerdings lässt sich hier eine im Vergleich zum Zellvermehrungstest geringfügig höhere Sensitivität feststellen.

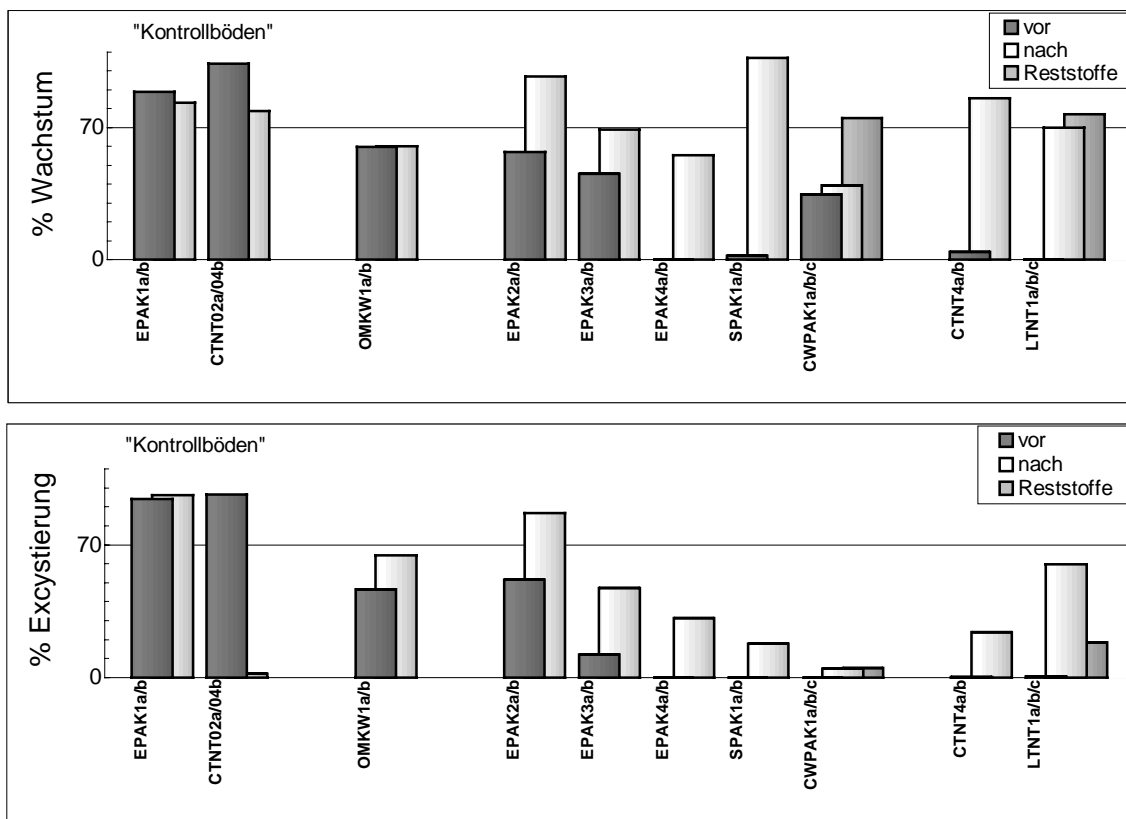


Abb. 16: Vermehrungsfähigkeit und Excystierung von *Colpoda inflata* in den Böden vor (gekennzeichnet mit "a") und nach durchgeführter Sanierung, mit "b" gekennzeichnet. OMKW-Böden: dynamisches Mietverfahren; EPAK-Böden: Suspensionsreaktor; SPAK-Böden: Humifizierung; CWPAK- und LTNT-Böden: Bodenwäsche mit Zusatzstoffen, wobei "b" für die gereinigte Sandfraktion und "c" für die aufkonzentrierten Reststoffe (Sedimentschlamm) stehen. Bei den "Kontrollböden" handelt es sich um schadstoffunbelastete Böden, die dennoch einer Sanierung unterzogen wurden.

Mit der Sanierung der kontaminierten Böden geht in der überwiegenden Zahl der Fälle eine anhand der Vermehrungsfähigkeit nachweisbare Verbesserung der Bodenqualität einher. Nur von den Böden OMKW1b, EPAK3b, EPAK4b und CWPAK1b geht noch eine Wachstumshemmung zwischen 30 und 60% aus, in den restlichen Böden nach Sanierung (EPAK2b, SPAK1b, CWPAK1c, CTNT4b, LTNT1b und 1c) entspricht das Wachstum der Organismen dem der Kontrollböden, bzw. liegt über der als Toxizitätskriterium festgelegten Schwelle von 70% (30% Hemmung). In welchem Ausmaß sich dabei manche Böden in ihrem ökotoxischen Potential vor bzw. nach Sanierung unterscheiden, lässt sich anhand von Verdünnungsreihen darstellen (Abb. 17): Im behandelten Boden SPAK1b können sich die Organismen praktisch ungehemmt vermehren, dagegen muss der unbehandelte Boden SPAK1a etwa 1+150 (Boden + Wasser) verdünnt werden, um keine wachstumsschädigende Wirkung mehr zu entfalten. Eine ähnlich starke Hemmwirkung geht von dem Boden CTNT4a aus. Erst bei einer Verdünnung von 1+100 nähert sich die Verdünnungskurve Werten an, wie sie im sanierten Boden gemessen werden.

Tendenziell zeigt sich auch im Excystierungstest eine Abschwächung des toxischen Potentials der kontaminierten Böden durch die Sanierung. Im Durchschnitt verbessert sich die Excystierungsfähigkeit nach einer Sanierung um 20-40%. Mit Ausnahme des sanierten Bodens EPAK2b, der im Vergleich zum unbehandelten Ausgangsmaterial keine Beeinträchtigung der Excystierung mehr aufweist, sind aber die restlichen behandelten Böden aufgrund ihrer - trotz Sanierung - vorhandenen Hemmwirkung von 35-95% als immer noch deutlich toxisch einzustufen. Ein stark hemmender Effekt (>90%) geht hier auch von dem im chronischen Vermehrungstest nicht auffälligen, sanierten Kontrollboden CTNT04b aus. Naheliegende Ursache für die hohe Wirkung im akuten Testsystem Excystierung ist – wie bereits unter Punkt "Kontrollböden" erörtert – der sehr hohe Kaliumgehalt dieses sanierten, einem Mietverfahren mit Zuschlagstoffen unterzogenen Bodens.

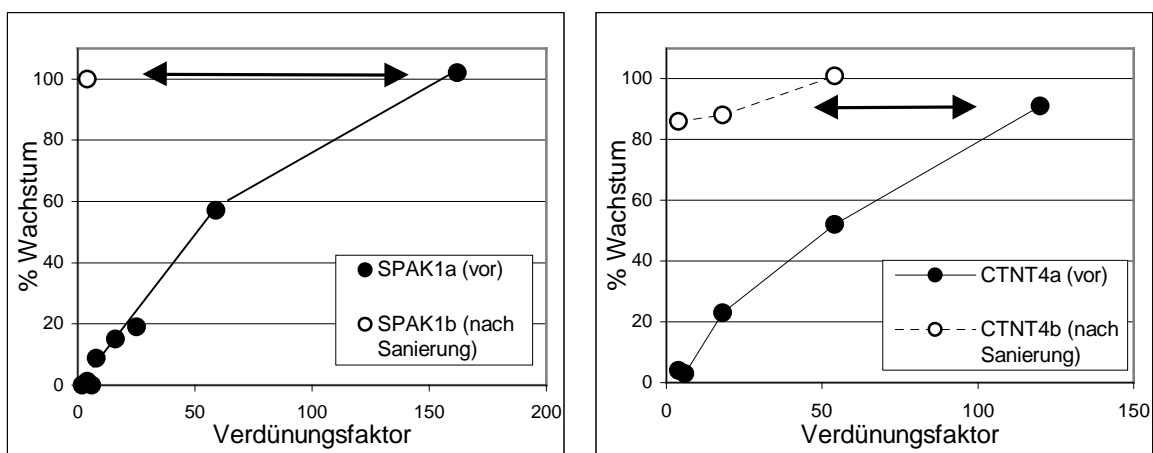


Abb. 17: Quantifizierung der wachstumshemmenden Effekte von Böden durch Verdünnungsreihen am Beispiel von SPAK1a/b (vor/nach Sanierung) und CTNT4a/b (vor/nach Sanierung). Die Verdünnungsreihen wurden mit H₂O hergestellt, das angegebene Verdünnungsverhältnis bezeichnet die Anteile Wasser zu Bodenmaterial (v/w). 100% Wachstum gibt die Vermehrungsfähigkeit unter optimalen Bedingungen in Kulturmedium wieder. Die Pfeile deuten an, wie stark der unbehandelte Boden verdünnt werden muss, um der Wirkung des sanierten Bodens zu entsprechen.

4.2.4 Vergleich der Testsysteme anhand aller Wirkdaten

Abbildung 18 stellt die Ergebnisse der beiden Testparameter Zellvermehrung und Excystierung vergleichend gegenüber und illustriert eine Reihe der wichtigsten Analysedaten zu den Testböden. Die Böden sind hier nach ansteigendem Effekt im Vermehrungstest angeordnet. Im linken Teil der Einzelabbildungen sind alle unbehandelten (sowohl kontaminierte als auch unbelastete Kontrollböden) aufgelistet, auf der rechten Seite sind all die Testböden angeführt, die einer Sanierung unterzogen worden waren.

Bei den unbehandelten Proben lässt sich ein klarer Zusammenhang zwischen beiden biologischen Reaktionen erkennen. Einem ansteigenden negativen Effekt auf die Zellvermehrung entspricht eine Zunahme der Wirkung im Excystierungstest. Beide Testsysteme scheinen hier eindeutig (Überschreiten eines 30%-igen Effektes) auf nachgewiesene organische Bodenkontaminanten anzusprechen (vgl. 2. Teilbild v.o.) - im Falle der Excystierung mit einer geringfügig höheren Nachweisempfindlichkeit, die auf Basis von Verdünnungsreihen der kontaminierten Böden SPAK1a und CTNT4a (Abb. 19) mit einem Faktor von 2-3 angegeben werden kann.

Anders bei den behandelten Böden. Eine Korrelation der Testergebnisse von Zellvermehrung und Excystierung ist im Falle dieser Böden nicht mehr zu erkennen. Durch die Vielzahl der im Verlaufe einer Sanierung zugesetzten - und mit der vorgegebenen chemischen Analytik kaum erfassten - organischen und anorganischen Substrate und Hilfsmittel (die bspw. von Rinderdung über Nährsalze bis hin zu Tensiden reichen) lassen sich hier ebenso nur noch schwer Zusammenhänge zwischen biologischer Reaktion und analytisch nachgewiesenem Schadstoffgehalt herstellen. Im Excystierungstest scheint, abgesehen von Restkontaminationen, besonders von hohen Leitfähigkeiten (vgl. die Böden SPAK1b, CTNT04b und CWPAK1c) ein negativer Einfluss auszugehen. Im Falle der Böden SPAK1b und CTNT04b sind es hohe Kaliumgehalte von 316 bzw. 750 mg/100 g, die diese Leitfähigkeit mit verursachen und für die hemmende Wirkung auf die Excystierung verantwortlich sein könnten (vgl. Punkt "Kontrollböden").

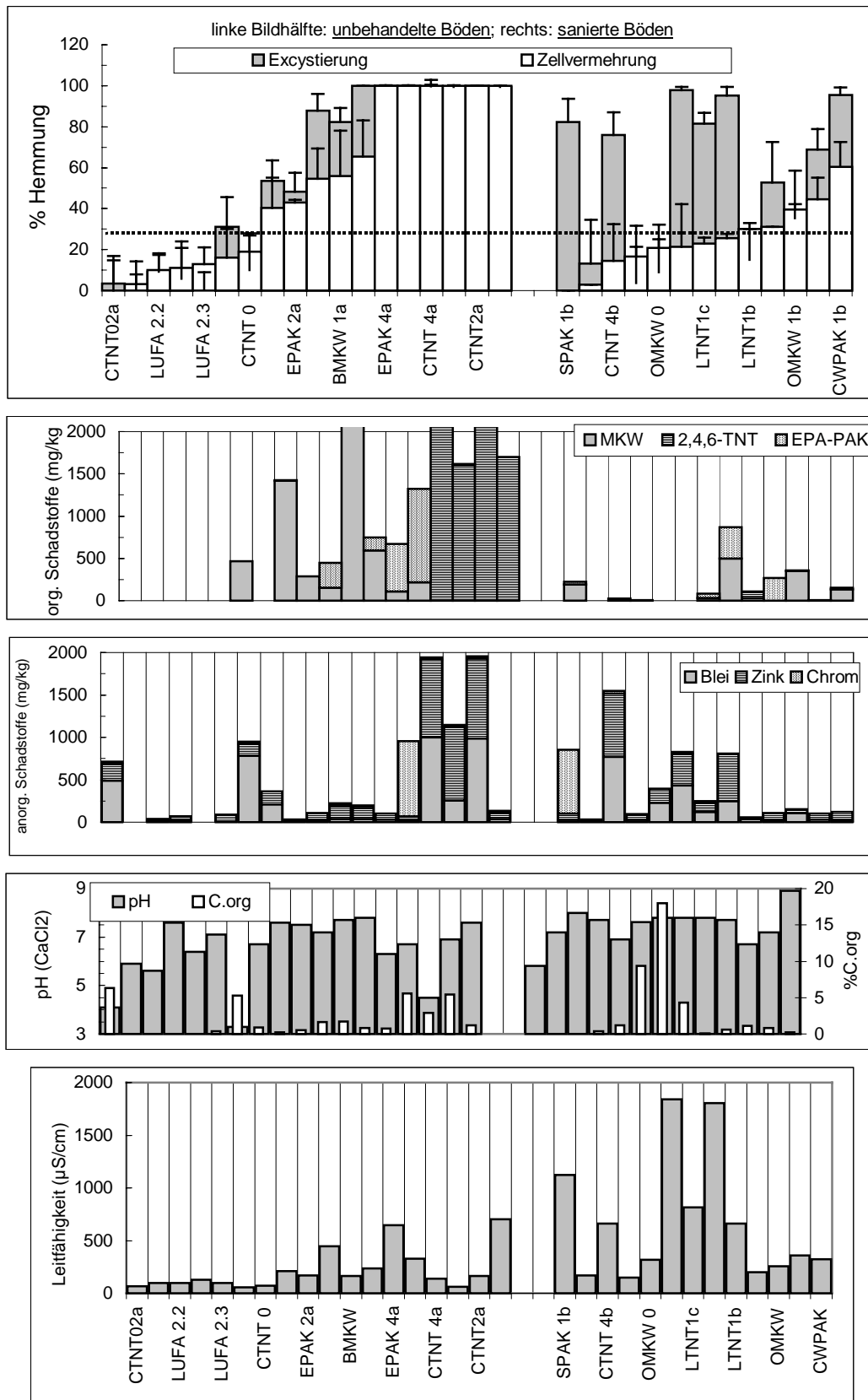


Abb. 18: Zusammenfassung aller Testergebnisse (Mittelwert mit StAbw.) sowie Angaben zu den Schadstoffgehalten und physikalisch-chemischen Eigenschaften der Testböden.

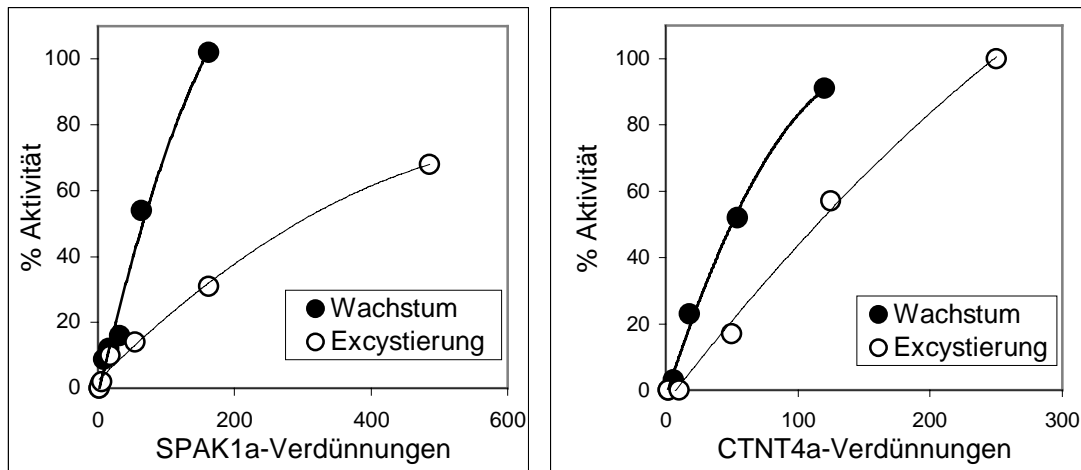


Abb. 19: Vergleich der Testsysteme Zellvermehrung und Excystierung anhand von Verdünnungsreihen der Böden SPAK1a und CTNT4a. Die Verdünnungen wurden mit H₂O hergestellt und sind als Anteile Wasser zu Boden (v/w) angegeben. Alle Werte sind auf Kontrollansätze mit reinem Testmedium bezogen.

5 Übertragbarkeit / Anwendung

Im Rahmen des Vorhabens wurden beide Bodenprotozoen-Tests mit 31 verschiedenen Testböden durchgeführt. Anhand von 6 unbelasteten und unbehandelten Kontrollböden (LUFA-Standardböden bzw. Referenzböden, die nicht durch ein Sanierungsverfahren verändert wurden) wurden potentielle Anwendungsbeschränkungen aufgrund spezifischer Bodeneigenschaften evaluiert. Das Spektrum der Kontrollen umfasste hierbei sandige bis lehmige Böden (vgl. Abb. 20) mit organischen Kohlenstoffgehalten von 0,4-6,3% und pH-Werten zwischen 3,3 und 7,7. In keiner der Kontrollen waren Abweichungen von mehr als 20% von der optimalen biologischen Aktivität festzustellen. Als toxisch wurde – mit einem weiteren 10%-igen Sicherheitsabstand – ein Effekt von größer als 30% definiert. Anhand dieses Bewertungsmusters wurden mit beiden Testsystemen alle PAK- und TNT-belasteten sowie mit dem Excystierungstest alle MKW-haltigen Standortproben als toxisch identifiziert. Im Vermehrungstest überschritten dagegen nur 2 der 3 MKW-kontaminierten Böden die Toxizitätsschwelle von 30% Hemmung. Mit beiden Testsystemen lässt sich eine Abschwächung des toxischen Potentials dieses "Ausgangsmaterials" nach durchgeführter Sanierung feststellen. Allerdings zeigt sich im Excystierungstest auch, dass vom Sanierungsverfahren selbst bodenbiologische Gefährdungen ausgehen können. Dieser biologische Nachweis bietet umgekehrt die Möglichkeit, zur ökotoxikologischen Kontrolle spezifischer Verfahrensschritte eingesetzt werden zu können und als Instrumentarium zur Optimierung der Umweltverträglichkeit von Sanierungsmassnahmen zu dienen.

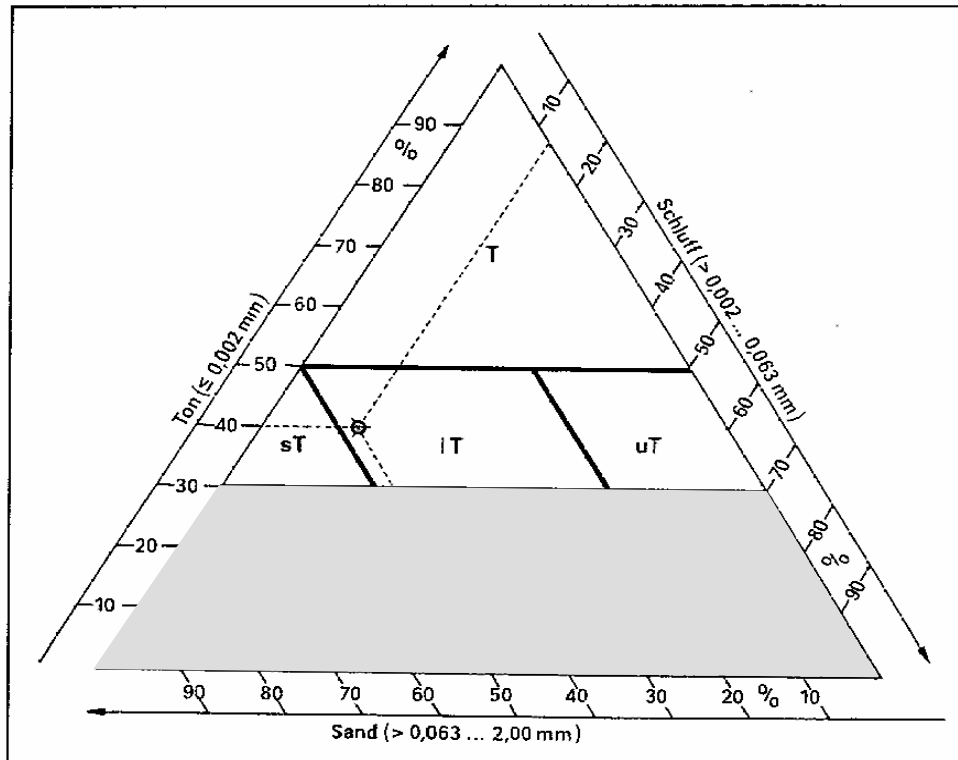


Abb. 20: Körnungsartendreieck (nach Lieberoth, 1982). Der grau eingefärbte Bereich deckt die Kontroll-Bodenarten ab (Standard-LUFA-Böden sowie Referenzböden der verschiedenen Altlasten-Standorte)

Die ökotoxikologische Einstufung unbehandelter, schadstoffbelasteter Böden durch die Tests mit Protozoen entspricht weitgehend der Bewertung durch weitere Tests, die im Rahmen des Verbundvorhabens an Bodenorganismen (Collembolen, Enchytraeen) und aquatischen Organismen (Leuchtbakterien, Daphnien, Algen) durchgeführt wurden. In allen Fällen, in denen einer der zusätzlichen Tests ein ökotoxikologisches Gefährdungspotential anzeigt, reagiert mindestens auch einer der Protozoentests mit einem toxischen Befund (vgl. Tab. 4). Ein heterogenes Bild der Testergebnisse bietet sich dagegen im Falle der sanierten Böden. Während einige Proben durch einzelne der zusätzlichen Tests als toxisch eingestuft werden, ist bei den Tests mit Protozoen kein signifikanter Effekt zu beobachten. Demgegenüber lassen sich mit den Protozoentests Hemmwirkungen nachweisen, die durch keinen der weiteren Tests detektiert werden. Gerade hier wird die Notwendigkeit zur Anwendung einer biologischen Testbatterie deutlich, mit deren Hilfe ein breites Spektrum unterschiedlicher Einflüsse auf die Bodenbiozösen erfasst werden und die die Gewähr für die zuverlässige Abschätzung von Gefährdungspotentialen für die Lebensraumfunktion Boden bieten.

Tab.4: Ökotoxikologische Bewertung der unbehandelten, kontaminierten sowie sanierten Testböden durch die verschiedenen biologischen Testsysteme.

Testboden	Protozoen (<i>C.inflata</i>)		Weitere Testverfahren									
	a	chr	Regw		Enchy		Col		Leuchtb		Alg	D
			a	chr	a	chr	a	chr	a	chr	chr	a
unbehandelt und kontaminiert												
BMKW 0	+	-			-	+	-	+	-	-	-	-
EPAK 3a	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
CWPAK 1a	+	+			-	+	+	+	-	-	+	-
EPAK 2a	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-
BMKW 1a	+	+			-	+	+	+	+	+	-	-
EPAK 4a	+	+			+	+	+	+	+	+	-	-
CTNT2a	+	+			-	+	+	+				
SPAK 1a	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
LTNT1a	+	+			-	+	+	+	+	+	+	+
CTNT 4a	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
CTNT 1a	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
saniert												
CTNT 4b	+	-			-	-	-	-				
LTNT1c	+	-			-	-	-	-	-	-	-	-
EPAK 4b	+	+			-	+	-	-	-	-	-	-
EPAK 1b	-	-	-	-	-	-	-	+				
EPAK 3b	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
OMKW 0	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
EPAK 2b	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
OMKW 1b	+	+	-	-	-	+	-	+				
SPAK 1b	+	-			-	+	-	+	-	+	-	-
CWPAK 1c	+	+			+	+	-	-	-	-	+	-
CWPAK 1b	+	+			+	+	+	+	-	-	-	-
CTNT04b	+	-			-	+	-	+				
LTNT1b	+	-			-	+	+	+	+	+	+	+

+ : toxisch; - : keine Toxizität; Regw.: Regenwurm; Enchy: Enchytraeen; Col: Collembolen; Leuchtb: Leuchtbakterien; Alg: Algen; D: Daphnien; a: Akuttest; chr: chronischer Test.

6 Diplomarbeiten, die im Rahmen des Vorhabens angefertigt wurden

Andreas Louis (1997). Validierung geeigneter Testbedingungen für die Ciliaten *Colpoda inflata* und *Colpoda steinii*.

Viktoria Poka (2000). Einfluss kontaminierter Böden auf die Excystierungsfähigkeit des Bodenciliaten *Colpoda inflata* – Entwicklung eines Testsystems.

7 Literatur

1. **Aescht E, Foissner W** (1991). Bioindikation mit mikroskopisch kleinen Bodentieren. VDI Berichte 901, 985-1002.
2. **Aescht E, Foissner W** (1992). Effects of mineral and organic fertilizers on the microfauna in a high-altitude reforestation trial. Biol Fertil Soils 13, 17-24.
3. **Anderson O R** (1988). Comparative Protozoology. Ecology, Physiology and Life History. Springer Verlag, NY.
4. **Bamforth S S** (1980). Terrestrial protozoa. J Protozool 27 (1), 33-36.
5. **Bamforth S S** (1985). Symposium on protozoan ecology: the role of protozoa in litters and soils. J Protozool 32 (3), 404-409.
6. **Berger H, Foissner W, Adam H** (1985). Protozoologische Untersuchungen an Almböden im Gasteinertal (Zentralalpen, Österreich). IV. Experimentelle Studien zur Wirkung der Bodenverdichtung auf die Struktur der Testaceen- und Ciliatenzönose. Veröff Österr Maß-Programms 9, 97-112.
7. **Biczók F** (1979). Importance of protozoa in the dynamic changes of the rhizosphere. Acta biol szeged N S 25, 121-132.
8. **Clarholm M** (1981). Protozoan grazing of bacteria in soil-impact and importance. Microb Ecol 7, 343-350.
9. **Clarholm M** (1984). Microbes as predators or prey; heterotrophic, free-living protozoa: Neglected mikroorganisms with an important task in regulation bacterial populations. In: Curent Persp in Microb Eco 1984.
10. **Coûteaux M-M** (1985a). The effects of compressing forest litter (H layer) on the populations of testate amoebae. Revue Écol Biol Sol 22, 447-461.
11. **Coûteaux M-M** (1985b). Relation entre le densité apparente d'un humus et l'aptitude à la croissance de les ciliés. Pedobiologia 28, 289-303.
12. **Coûteaux M-M, Palka L** (1988). A direct counting method for soil ciliates. Soil Biol Biochem 20 (1), 7-10.

13. **Darbyshire J F, Greaves M P** (1973). Bacteria and protozoa in the rhizosphere. *Pestic Sci* 4, 349-360
14. **Darbshire** (1976). Effect of water suction on the growth in soil of the ciliate *Colpoda steini* and the bacterium *Azotobacter chroococum*. *J Soil Sci* 27, 369-376.
15. **Deshmukh V A, Shrikhande J G** (1974). Effect of herbicides on protozoa in the soil. *Indian J Microbiol*
16. **Dive D, Fourmeux M N, Vasseur P, Pussard M, Pons R, Marais B** (1984). *Environ Pollut Ser A* 36, 121-131.
17. **Ekelund F, Ronn R, Christensen S** (1994). The effect of three different pesticides on soil protozoan activity. *Pestic Sci* 41.
18. **Foissner W** (1987). Soil protozoa: fundamental problems, ecological significance, adaptations in ciliates and testaceans, bioindicators, and guide to the literature. *Progr Protistol* 2, 69-212.
19. **Foissner W** (1993). Colpodea (Ciliophora). *Protozoenfauna Volume 4/1* (Matthes D, ed.). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York, 798 S.
20. **Forge T A, Berrow M L, Darbyshire J F, Warren A** (1993). Protozoan bioassays of soil amended with sewage sludge and heavy metals, using the common soil ciliate *Colpoda steinii*. *Biol Fertil Soil* 16, 282-286.
21. **Krawczynska W, Pivovarova N N, Sobota A** (1989). Effects of cadmium on growth, ultrastructure and content of chemical elements in *Tetrahymena pyriformis* and *Acanthamoeba castellanii*. *Acta Protozoologica* 28 (3-4), 245-252.
22. **MacRae I C, Vinckx E** (1973). Effect of lindane and DDT on populations of protozoa in a garden soil. *Soil Biol Biochem* 5, 245-247.
23. **Palacios G, Martin-Gonzalez A, Gutierrez J C** (1994). Macronuclear DNA demethylation is involved in the encystment process of the ciliate *Colpoda inflata*. *Cell Biol Int* 18 (3), 201-206.
24. **Petz W, Foissner W** (1989). The effects of mancozeb and lindane on the soil microfauna of a spruce forest: a field study using a completely randomized block design. *Biol Fertil Soils* 7, 225-231.
25. **Prescott L M, Kabovek M K, Tryggstad D** (1977). The effects of pesticides, polychlorinated biphenyls and metals on the growth and reproduction of *Acanthamoeba castellanii*. *Bull Environ Contam Toxicol* 18, 29-33.
26. **Proper G, Garver J C** (1966). Mass culture of the Protozoa *Colpoda steinii*. *Biotechnology and Bioengineering* 8, 287-296.
27. **Radu V G, Popovici I, Stefan V, Tarta A, Tomescu R** (1974). Actinua insecticidelor cloroderivate asupra faunei folositoare din sol. *Stud Cercet Biol (Zool)* 26, 143-151. (Rumänisch mit engl. Summary).
28. **Schreiber W, Brink N** (1989). Pesticide toxicity using protozoans as test organisms. *Biol Fertil Soils* 7, 289-296.

29. **Sleigh M A** (1973). The Biology of Protozoa, Edward Arnold, London.
30. **Stout J D** (1955). Environmental factors affecting the life history of three soil species of *Colpoda* (Ciliata). Trans R Soc NZ 82, 1165-1188.
31. **Stout J D, Heal O W** (1967). Protozoa. In: Soil Biology, Burges A & Raw F (eds), Academic Press, New York, 149-195.
32. **Stout J D** (1973). The relationship between protozoan populations and biological activity in soils. Am Zool 13, 193-201.
33. **Stout J D** (1980). The role of protozoa in nutrient cycling and energy flow. Adv Microb Ecol 4, 1-50.
34. **Stout J D, Bamforth S S, Lousier J D** (1982). Protozoa. In: Methods of soil analysis 2 - Chemical and Microbiological Properties. Agronomy Monographs. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA.
35. **Tibbs J, Marshall B J** (1970). Cyst wall protein synthesis and some enzyme changes on starvation and encystment in *Colpoda steinii*. J Protozool 17 (1), 125-128.
36. **Tirjakow E** (1988). Structure and dynamics of communities of ciliated protozoa (ciliophora) in field communities. I. Species composition, group dominance, communities. Biologia 43 (6). 497-503.
37. **Vargas R, Hattori T** (1991). The distribution of Protozoa within soil aggregates. J Gen Microbiol 37, 515-518.
38. **Yeates G W, Bamforth S S, Ross D J, Tate K R, Sparling G P** (1991). Recolonisation of methyl bromide sterilized soils under four different field conditions. Biol Fertil Soils 11, 181-189.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.3 Verbundvorhaben 4: Ökotoxikologische Testbatterien

9.3.4 Gefährdungstestverfahren mit Reporterbakterien für die Altlastensanierung: Detektion toxischer Substanzen in Bodenkontakttests (TV 4.3.1)

Dr. Christoph C. Tebbe

Heiko Sendrowski
Katrin Schulze

Institut für Agrarökologie
Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL)
Bundesallee 50
38116 Braunschweig

Förderkennzeichen: 1490914

Laufzeit: 01.05.1995 – 31.10.1998

1 Zusammenfassung & Zielsetzung

Im Rahmen eines dreijährigen Forschungsprojekts sollten mikrobiologische Verfahren mit Bodenbakterien als Indikatoren für toxische oder mutagene Substanzen (Schadstoffe) in Böden entwickelt und überprüft werden. Das Prinzip der Indikation beruhte auf der Nutzung von Marker- bzw. Reporter-Genen, die den jeweiligen Organismen mit Hilfe gentechnischer Verfahren eingebaut wurden. Drei unterschiedliche Konstruktionstypen wurden auf ihre Anwendbarkeit zur Schadstoffdetektion überprüft:

1. *Sinorhizobium meliloti* Stämme, chromosomal mit konstitutiv exprimierendem Luciferase (*luc*-) Gen markiert (RecA⁻ und RecA⁺);
2. Bodenbakterien (*Pseudomonas* spp., *Brevibacterium* spp.) mit positiven Selektionsvektoren, die nach Mutationen Antibiotikaresistenz verleihen;
3. *Pseudomonas fluorescens*-Stämme, die eine Autobiolumineszenz vermittelnde Genkassette durch Transposon-Mutagenese an unterschiedlichen Stellen im bakteriellen Chromosom enthielten und dadurch unterschiedlich auf Schadstoffe reagieren.

Weiterhin sollte ein Verfahren entwickelt und erprobt werden, das die metabolische Sofortantwort von Bodenbakterien auf Ebene der "community" (mikrobielle Gemeinschaft) erfasst (Biolog[®]).

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

Zu Projektbeginn waren Testverfahren bekannt, in denen durch Extraktionen mit wässrigen oder auch organischen Lösungen die toxischen oder mutagenen Aktivitäten von Bodenproben bestimmt werden sollen [2; 7; 9; 17]. Dies ist insbesondere beim Leuchtbakterien-Hemmtest (DIN 38412-L34), beim Daphnientest (DIN 38412-L30) oder dem Ames-Test [1] der Fall. Toxische oder mutagene Substanzen unterscheiden sich jedoch zum Teil deutlich in ihrer Löslichkeit in Wasser oder organischen Lösungsmitteln, so dass sich bei Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel deutlich andere Bewertungen ergeben [12]. Ziel unserer Arbeiten war daher, Verfahren zu entwickeln, mit deren Hilfe bei direkter Exposition der Reportersysteme mit der Bodenmatrix das toxische bzw. mutagene Potential abgeschätzt werden kann.

Ein einfaches Merkmal, an dem eine schädigende Wirkung nachgewiesen werden kann, ist der Einfluss auf das Wachstum von Testorganismen. Bodenbakterien, die durch gezielte Mutagenese und Selektion in ihrer Fähigkeit zur DNA-Reparatur eingeschränkt wurden, sollten daher die Entwicklung und Erprobung eines robusten Testsystems ermöglichen. Voraussetzung dazu ist, dass die Testorganismen von der endogenen Mikroflora sicher und ohne großen Aufwand zu unterscheiden sind. Bodenbakterien, die mit einem Lumineszenz-Gen ausgestattet sind, erfüllen diese Voraussetzung auf vorteilhafte Weise. Dieser Marker ermöglicht die Identifizierung und Quantifizierung auch bei starkem Wachstum (hoher Hintergrund) der natürlichen Bodenbakterien [13].

Weiterhin waren, insbesondere für Schwermetalle, spezielle Resistenzmechanismen gegen toxische Umwelteinwirkungen bei Bakterien bekannt [10]. Seit längerem wird vermutet, dass mutagene Agenzien transponierbare Elemente mobilisieren können. Die Veränderung der Transpositionsfrequenz [14] sollte durch ein System zu erfassen sein, das auf mutagene Wirkungen reagiert. Bei *Escherichia coli* und einigen Bodenbakterien lösen mutagene, DNA-schä-

digende Substanzen eine SOS-Antwort durch Aktivierung spezifischer Gene aus. Durch Kopplung eines Reporter-Gens mit einem SOS-responsiven Element von *Salmonella typhimurium* wurde bereits ein im Mikrotiterplatten-Maßstab zu betreibendes Testsystem entwickelt [11].

3 Angewandte Methoden

Aufgrund der unterschiedlichen Meßmethoden für die jeweiligen Reportersysteme sind wichtige methodische Hinweise in den jeweils relevanten Abschnitten der Ergebnisse dargestellt.

4 Ergebnisse & Bewertung

4.1 Überprüfung der Eignung von *Sinorhizobium meliloti* L1 und L33 als Reporterbakterien

4.1.1 Untersuchungen von Reinkulturen und Vergleich der Empfindlichkeiten der *S. meliloti* Stämme mit *Pseudomonas fluorescens*

Um Reporterbakterien zum Nachweis von Schadstoffwirkungen einsetzen zu können, müssen diese ein gewisses Maß an Überlebensfähigkeit gegenüber Schadstoffen aufweisen.

Zur Untersuchung der Frage, ob Bodenbakterien, deren DNA-Reparatursystem in seiner Funktion beeinträchtigt ist, als Reporterorganismen zur Detektion bodengebundener Schadstoffe einsetzbar sind, wurden die *S. meliloti*-Stämme L1 und L33 (zur Verfügung gestellt von der Universität Bielefeld) eingesetzt. Diese unterscheiden sich darin, dass in L1 das Lumineszenz-Gen (*luc*) aus Glühwürmchen so eingebaut ist, dass das bei der DNA-Reparatur bedeutsame *recA*-analoge Gen inaktiviert ist [13]. Der Stamm L33 enthält hingegen das *luc*-Gen unmittelbar hinter dem *recA*-Gen, so dass beide, *recA* und Marker-Gen, funktionsfähig bleiben [3].

Der Einfluss von Schwermetallen und des aromatischen Mutagens 4-Nitrochinolin-n-oxid (4-NQO) auf das Wachstum wurde untersucht. Ein Medium zur Kultivierung von Bakterien für unsere spezielle Anwendung wurde entwickelt. Dieses zeichnete sich infolge der Verringerung des Phosphat-Gehalts durch gute Metallionen-Verfügbarkeit bei gleichzeitig gutem Wachstum der Indikatorbakterien aus. Kulturen von *S. meliloti* L1, L33 und Wildtyp (wt) sowie *Pseudomonas fluorescens* in der späten exponentiellen Phase des Wachstums wurden in frisches Medium mit unterschiedlichen Metallionen- bzw. 4-NQO-Konzentrationen inokuliert und bei 28°C inkubiert. Die optische Dichte bei 550 nm (OD_{550}) wurde nach 16 h bestimmt. Als Maßstab für die Sensitivität der Indikatororganismen diente das Verhältnis der OD_{550} von schadstoffhaltigem und schadstofffreiem Medium (Abb. 1, 2).

Die minimalen Hemmkonzentration (MHK) für die drei *S. meliloti*-Stämme unterschieden sich nicht. Entgegen den Erwartungen gab es auch keine unterschiedlichen Sensitivitäten bei 4-NQO-Exposition. Dieses Mutagen erzeugt in einzelsträngiger DNA Punkt-Mutationen [5], auf die Zellen gewöhnlich durch *recA*-Expression reagieren. Auch der Einsatz verschiedener Lösungsvermittler führte zu keinen Unterschieden. *P. fluorescens* war im Vergleich zu den *S. meliloti*-Stämmen gegenüber Cadmium und Kupfer empfindlicher, gegenüber Zink jedoch weniger empfindlich.

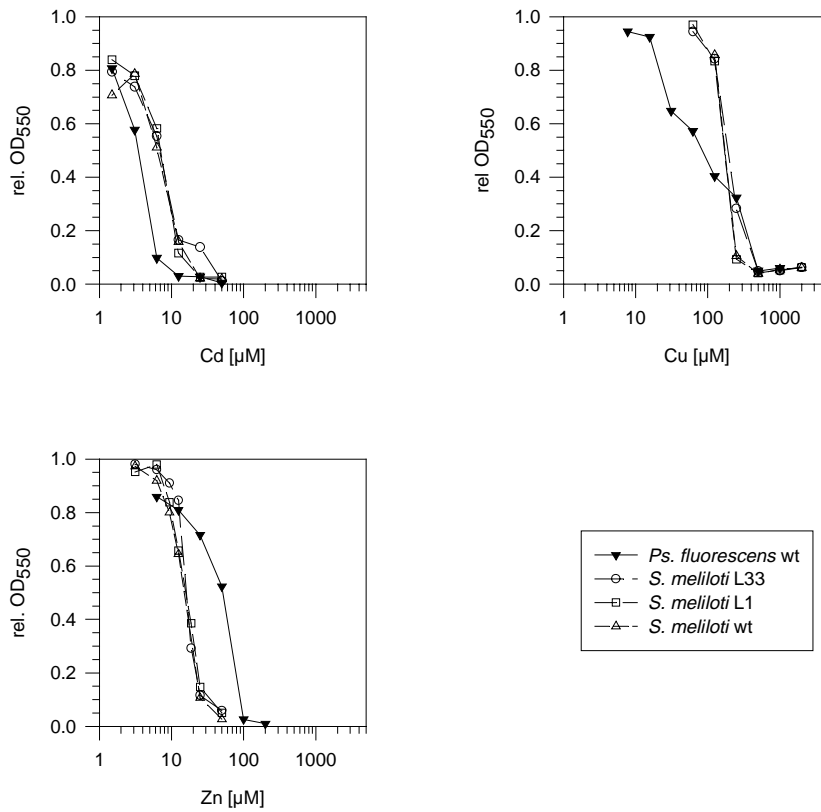


Abb. 1: Einfluss der Schwermetallkonzentration auf das Wachstum von *S. meliloti* L1, *S. meliloti* L33, *S. meliloti* Wildtyp (wt) und *P. fluorescens*

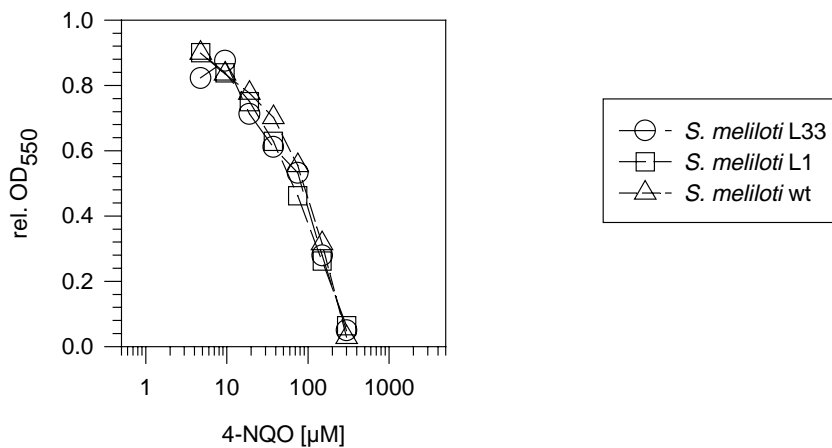


Abb. 2: Einfluss von 4-NQO auf das Wachstum von *S. meliloti* L1, *S. meliloti* L33 und *S. meliloti* Wildtyp (wt)

4.1.2 Untersuchungen in Bodenkontakt-Tests

Die Reporterbakterien wurden jeweils 16 h lang bei 28 °C in Flüssigmedium vorinkubiert, so dass sie die späte exponentielle Phase ihres Zellwachstums erreichten. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (1.000 rpm, 1 min) und in 0,85%iger NaCl-Lösung aufgenommen. Zu 2,5 g Bodentrockenmasse wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension zugegeben. Der Boden wurde auf 40-60 % seiner maximalen Wasserhaltekapazität befeuchtet und bei 28 °C für 24 h inkubiert.

Das Extraktionsverfahren wurde optimiert, so dass möglichst hohe Zelltitel schonend und unter möglichst geringer Koextraktion von Bodenschwebstoffen erreicht werden konnten. Dazu wurden 2 g Bodenmaterial mit 10 ml einer 0,85%igen NaCl-Lösung bzw. Hexameta-phosphat-Lösung (0,1 % HMP) versetzt und 1 h bei 1000 rpm in einem Überkopfschüttler bei 4°C suspendiert. Der Überstand wurde anschließend 2 min bei 700 g zentrifugiert, um die Bodenschwebstoffe abzutrennen. Die extrahierten Bakterien wurden auf Standard-Nährboden (PCA) kultiviert und die Koloniezahl (cfu) bestimmt. Bei Verwendung von HMP wurden geringfügig höhere Zelltitel erreicht. Allerdings war eine deutliche Erhöhung der OD₅₅₀ festzustellen, die Messungen im Luminometer erschwerte.

Um die Bakterienfraktion besser aufzureinigen zu können, wurde der Zentrifugationsschritt durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation mit Nycodenz [8] ersetzt. Die erreichten Zelltitel änderten sich dadurch nicht signifikant. Außerdem verlängerte sich die lag-Phase des Wachstums um 24 h, so dass die Kolonien erst später zählbar wurden und auch ihre Lumineszenz nicht sofort messbar war. Diese Modifikation des Extraktionsverfahrens wurde daher nicht weiter verwendet.

Als Maß für die Schadstoffbelastung wurde die Wiederauffindungsrate gewählt. Diese ist das Verhältnis aus eingesetzter zu rückextrahierter Zellzahl pro Gramm Boden und reflektiert den Anteil der durch toxische Wirkung zerstörten Zellen.

Tabelle 1 zeigt, dass sich die Rückextraktionsraten der Reporterbakterien bei verschiedenen Böden stark unterschieden. Die Wiederauffindungsraten für die Stämme L1 und L33 wichen nicht signifikant voneinander ab. Die CTNT-Böden zeigten eine deutlich geringere Wiederauf-findungsrate als die Vergleichsböden FAL und Lufa 2.2. Dies ist jedoch nicht auf die toxische Wirkung des TNT zurückzuführen, das eine Konzentration von 0,1 mg×kg⁻¹ im unbelasteten Vergleichsboden aufwies. Vielmehr war der Boden-pH (CaCl₂) mit 3,3 bzw. 4,5 für das Überleben der *S. meliloti*-Stämme zu niedrig. Bei den belasteten Böden sowie beim sanierten Boden SPAK1b wurde ein Wachstum während der Inkubation im Boden festgestellt. Dies war besonders bei den OMKW-Böden überraschend, da die Lebendkeimzahl, bestimmt durch Plattierung auf PCA, weniger als 104 cfu×g⁻¹ Boden betrug.

Insgesamt konnte kein Boden aufgrund der Mortalitätsdaten als belastet klassifiziert werden, da die TNT-belasteten Böden einen pH-Wert außerhalb des für das Überleben der Reporterbakterien notwendigen Bereiches aufwiesen.

Unmittelbar nach der Extraktion der Reporterbakterien aus den Bodenproben wurde die Lumineszenz nach Zugabe von Luciferin bestimmt. Bis zu einer OD₅₅₀ von 0,7 wirkte sich die Trübung nicht auf die Lumineszenz-Messung aus. Die sichere Messung der Lumineszenz gelang jedoch nicht reproduzierbar. Art und Menge der mitextrahierten Bodenschwebstoffe führten durch Bindung, z.B. durch Adsorption, dazu, dass die verfügbare Luciferinkonzentration zu stark schwankte. Dieser Befund wurde dadurch untermauert, dass bei unterschied-

lichen unbelasteten Bodenproben bei gleicher OD₅₅₀ deutlich unterschiedliche Lumineszenzen gemessen wurden.

Tabelle 1: Wiederauffindungsraten von *S. meliloti* L1 aus unterschiedlich kontaminierten Böden.

Boden	Belastung ¹	inokulierte Zellzahl [cfu/g Boden]	extrahierte Zellzahl [cfu/g Boden]	Wiederauffindungsrate
EPAK1a	-	$4,13 \cdot 10^7 \pm 2,3 \cdot 10^6$	$4,35 \cdot 10^6 \pm 9,8 \cdot 10^5$	11%
EPAK4a	+	$4,33 \cdot 10^8 \pm 3,13 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^8 \pm 2,7 \cdot 10^7$	30,2%
EPAK4b	(-)	$4,33 \cdot 10^8 \pm 3,13 \cdot 10^7$	$3,3 \cdot 10^7 \pm 4,2 \cdot 10^6$	7,62%
OMKW0	-	$1,24 \cdot 10^7 \pm 2,58 \cdot 10^6$	$7,13 \cdot 10^7 \pm 3,12 \cdot 10^7$	575%
OMKW1a	+	$1,24 \cdot 10^7 \pm 2,58 \cdot 10^6$	$4,13 \cdot 10^7 \pm 1,59 \cdot 10^7$	333%
SPAK1b	(+)	$2,93 \cdot 10^7 \pm 8,33 \cdot 10^6$	$6,23 \cdot 10^7 \pm 1,87 \cdot 10^7$	212%
CTNT0	-	$2,13 \cdot 10^7 \pm 3,77 \cdot 10^5$	$8,55 \cdot 10^2 \pm 1,09 \cdot 10^3$	0,004%
CTNT1a	+	$4,27 \cdot 10^7 \pm 2,31 \cdot 10^6$	$7,93 \cdot 10^3 \pm 2,28 \cdot 10^3$	0,018%
FAL	-	$4,33 \cdot 10^8 \pm 3,13 \cdot 10^7$	$9,9 \cdot 10^7 \pm 3,5 \cdot 10^7$	22%
Lufa2.2	-	$4,27 \cdot 10^7 \pm 2,31 \cdot 10^6$	$4,34 \cdot 10^6 \pm 4,2 \cdot 10^5$	11%

¹ Belastung: Belastungsgrad des Hauptschadstoffs. -: gering belastet bzw. nicht nachweisbar, (+) nach biologischer Sanierung nur noch geringe Belastung, + hoch belastet

4.2 Analyse der metabolischen Sofortantwort bodenextrahierter Bakterienkonsortien mit der "Biolog-Methode"

In diesem Untersuchungsschwerpunkt ging es darum zu ermitteln, ob als alternative zu Reporterbakterien, die von außen einer Bodenprobe zugesetzt werden, nicht auch die Aktivität der natürlich im Boden vorkommenden Mikroorganismen als Indikator für eine Schadstoffbelastung verwendet werden kann. Hierzu wurde ein auf Mikrotiterplatten und C-Quellenverwertung basierendes Verfahren eingesetzt. Dieses Verfahren hatte sich bereits in anderen Untersuchungen bewährt, beispielsweise um die Reaktion der Bodenmikroflora auf zugesetzte Substrate zu messen [15; 16].

Zur Extraktion der endogenen Bodenbakterien wurde dieselbe Methode wie zur Rückextraktion der Reporterbakterien eingesetzt. Auf den Einsatz von Nycodenz zur Dichtezentrifugation wurde verzichtet. Die Zentrifugation führte zu einer Verlängerung der lag-Phase um 24 h und hätte somit eine Bestimmung der metabolischen Sofortantwort verhindert.

Für jeden Boden wurden jeweils drei unabhängige Parallelproben extrahiert und auf Biolog-GN-Mikrotiterplatten wurde die Fähigkeit der extrahierten Konsortien untersucht, 95 unter-

schiedliche Kohlenstoffquellen zu metabolisieren [6]. Die durch Stoffwechselaktivität hervorgerufene Oxidation des Tetrazolium-Farbstoffs, erkennbar an seiner Rotfärbung, wurde über einen Zeitraum von 118 h kontinuierlich photometrisch bei 498 nm aufgezeichnet.

Zur Datenreduktion der C-Quellen Verwertungskinetiken wurden die Ergebnisse der photometrischen Messungen nach einer Inkubationszeit von 69 h einer Hauptkomponentenanalyse (HKA) unterzogen. Dabei wurden von den gemessenen Extinktionen zunächst die Extinktionen der jeweiligen substratfreien Kavitäten abgezogen und mit der mittleren Farbentwicklung (AWCD), wie von Garland und Mills [6] beschrieben, korrigiert. So wurde erreicht, dass die Korrelation zwischen erster Hauptkomponente und AWCD verringert wurde.

Die Abbildung 3 zeigt die Trennung zweier TNT-belasteter Böden durch Hauptkomponentenanalyse nach 69 h. Beide Böden konnten in der ersten Hauptkomponente getrennt werden. Im Vergleich dazu waren die Unterschiede zwischen den TNT-haltigen Böden verschiedener Belastungsstufen gering. Da bei Abschluss des Forschungsvorhabens die Ergebnisse der von den Verbundpartnern vorzunehmende Bodenanalyse noch nicht vorlag, ist eine Diskussion dieser Befunde noch nicht möglich.

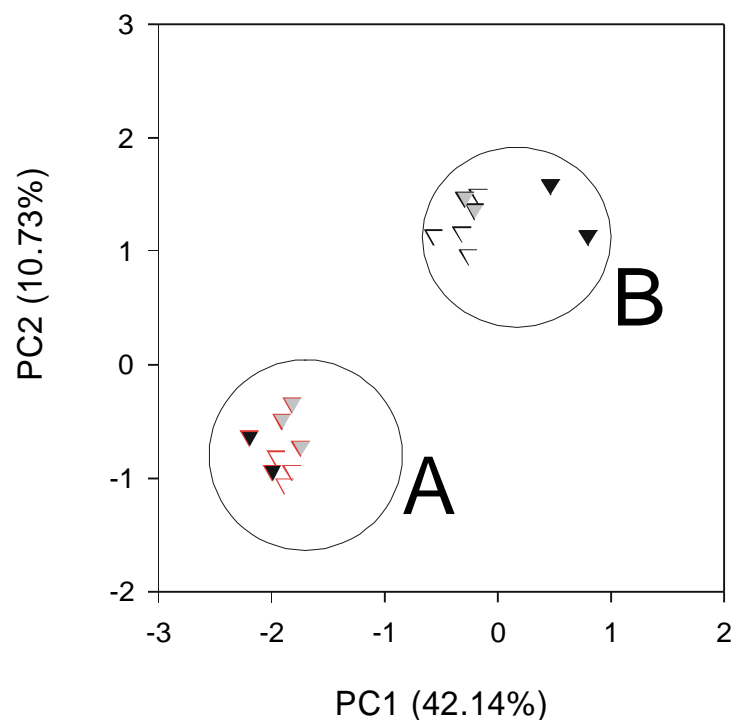


Abb. 3: Hauptkomponenten der TNT-belasteten Böden nach 69 h für LTNT-Böden (A) und CTNT-Böden (B). Leere Symbole: unbelastete Kontrollen, graue Symbole: Böden nach Sanierung, schwarze Symbole: höchster Kontaminationsgrad des Standortes. An den Achsen sind die Eigenwerte der jeweiligen Hauptkomponenten angegeben

Abbildung 4 zeigt die durch Hauptkomponentenanalyse gewonnene Unterscheidung zwischen Bodenproben zweier belasteter Standorte mit unterschiedlichem Kontaminationsgrad am jeweiligen Standort. Auch hier ist die Trennung zwischen den beiden Standorten ausgeprägt,

daneben ist jedoch eine deutliche Trennung der standortspezifischen Belastungsniveau festzustellen. Tendenziell haben die höher belasteten Proben eines Standortes einen niedrigeren Wert der ersten Hauptkomponente als die jeweiligen Vergleichsproben, wobei keine stetige Abhängigkeit zwischen Belastungsstärke oder Lebendkeimzahl (nach Kultivierung auf PCA) und erster oder zweiter Hauptkomponente feststellbar ist.

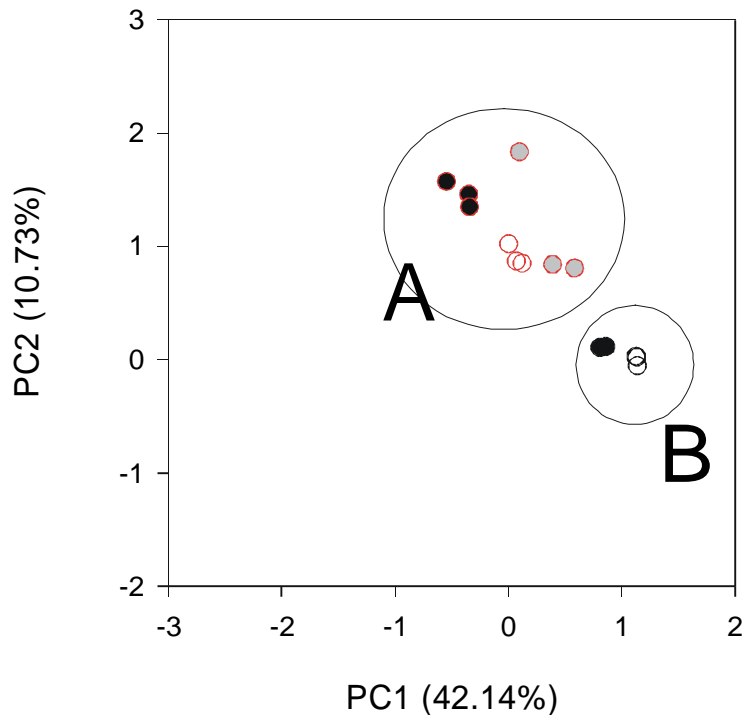


Abb. 4: Hauptkomponenten der Kohlenwasserstoff-belasteten Böden nach 69 h. A. OMKW-Böden, B. BMKW-Böden. Leere Symbole: unbelastete Kontrollen, graue Symbole: Böden nach Sanierung, schwarze Symbole: höchster Kontaminationsgrad des Standortes. An den Achsen sind die Eigenwerte der jeweiligen Hauptkomponenten angegeben

Schließlich zeigt die Abbildung 5 das Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse mit PAK-belasteten Böden. Hier ist festzustellen, dass die belasteten Böden in der Hauptkomponente zusammen gruppiert wurden, während die jeweils unbelasteten Proben von diesen und von einander entfernt liegen.

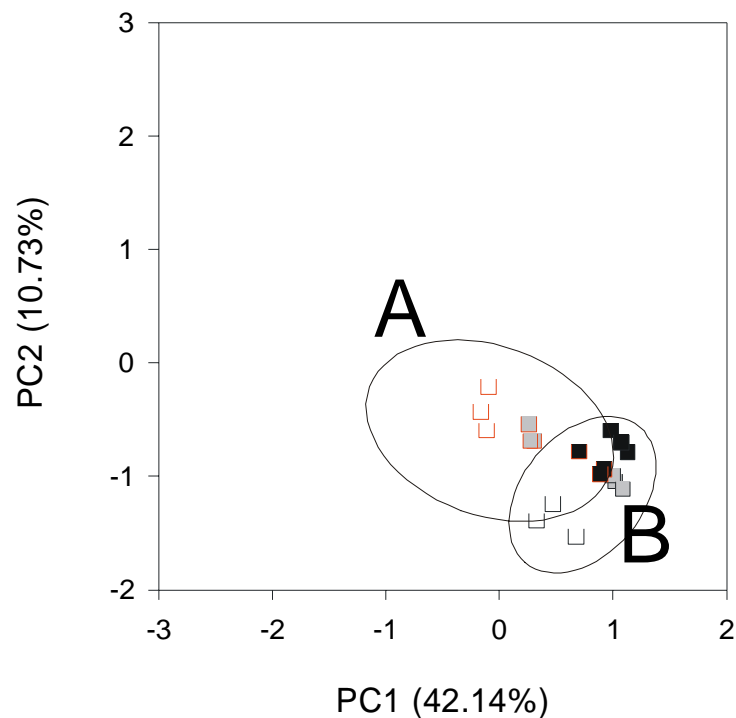


Abb. 5: Hauptkomponenten der PAK-belasteten Böden nach 69 h. A. EPAK-Böden, B. CWPAK-Böden. Leere Symbole: unbelastete Kontrollen, graue Symbole: Böden nach Sanierung, schwarze Symbole: höchster Kontaminationsgrad des Standortes. An den Achsen sind die Eigenwerte der jeweiligen Hauptkomponenten angegeben

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Biolog-Methode ein sehr vielversprechendes Verfahren ist, die Belastung von Böden auf Grundlage der im Boden selektierten, veränderten Mikroorganismen-Gesellschaften anzuzeigen. Ein wichtiges Kriterium ist jedoch der Vergleich zwischen Belastung und einer nicht belasteten Kontrolle. Solche Proben stehen jedoch bei Sanierungen nicht immer zur Verfügung. Zukünftige Untersuchungen zur weiteren Optimierung der Biolog-Methode scheinen jedoch notwendig, bevor an eine Anwendung zu denken ist. Solche Untersuchungen sollten sich mit der Bewertung von Randparametern, wie zum Beispiel Inokulumdichte, Inkubationstemperatur oder auch mit der Optimierung von Auswertungsverfahren beschäftigen.

4.3 Erprobung positiver Selektionsvektoren in *Pseudomonas putida* und *Brevibacterium* sp. für den Nachweis von Schadstoffwirkungen

Vier Stämme mit positiven Selektionsvektoren wurden von unserem Projektpartner in Freiburg zur Verfügung gestellt (vgl. Tabelle 2). Spontane Mutationen unter dem Einfluss von bodengebundenen Schadstoffen dieser Stämme sollten dazu führen, dass die Mutanten auf Selektionsmedien wachsen können.

Ein geeignetes Selektionsmedium wurde gesucht. Dieses sollte Kohlenstoffquellen enthalten, die möglichst spezifisch von den jeweiligen Reporterbakterien verwendet werden können, da

eine ausschließliche Selektion auf Grund der Vektor-vermittelten Antibiotikaresistenz einen zu hohen Hintergrundtiter der endogenen Bodenbakterien zeigte. Für die *Brevibacterium*-Stämme konnte kein geeignetes Selektivmedium gefunden werden, da diese Stämme so langsam wuchsen, dass sie häufig von den in geringem Umfang mitextrahierten Pilzen trotz Verwendung von Antibiotika überwuchert wurden. Die Arbeiten wurden deshalb nur mit den *Pseudomonas*-Stämmen vertieft.

Die Reporterbakterien wurden wie die beschriebenen *S. meliloti*-Stämme in Bodenproben inokuliert und extrahiert. Zwischen den Stämmen P1 und P6 waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse der Bodenkontakttests.

Die Mutationsrate war im Fall des kontaminierten Bodens EPAK4a leicht erhöht, jedoch lag sie noch immer im Rahmen der experimentellen Streuung. Auch durch Änderung der Inkubationsparameter (Zusatz von C-, N- oder P-Quellen, Verlängerung der Inkubationszeit) waren keine Änderungen der Mutationsrate zu erreichen.

Es wurde von unserem Projektpartner in Freiburg festgestellt, dass die Kopienzahl der positiven Selektionsvektoren einen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber mutagenen Agenzien ausübt. Um das Potential dieses Systems zu verbessern, wurden die Vektoren so optimiert, dass eine geringe Kopienzahl pro Wirtszelle erreicht wird. Diese Arbeiten waren erst kurz vor Ablauf des Verbundprojektes abgeschlossen, so dass die Erprobung der verbesserten Konstrukte in Bodenkontakttests nicht mehr im Rahmen dieses Projekts durchgeführt werden konnte.

Tabelle 2: Übersicht über die getesteten Stämme mit positiven Selektionsvektoren

Stamm	allgemeines Selektionsmedium	Mutanten-Selektionsmedium	Selektionsmechanismus
<i>P. putida</i> (P1)	Tet	Tet Sm	dominantes Allel für S12-ribosomale Untereinheit überdeckt chromosomales Allel für Sm-Resistenz
<i>P. putida</i> DSM 50026 (P6)	Tet	Tet Sm	
<i>B. divaricatum</i> DSM 20297 (B33-1)	Km	Km Sac	plasmidgebundenes Gen für Levansucrase macht Wirt sensitiv für erhöhte Sac-Konzentrationen
<i>B. liliun</i> DSM 20137 (B33-3)	Km	Km Sac	

P.-*Pseudomonas*, B. - *Brevibacterium*; Tet - Tetracyclin, Sm - Streptomycin, Km - Kanamycin, Sac - 10% Saccharose

Tabelle 3: Ergebnisse der Bodenkontakttests mit *P. putida* P1

Boden	Belastung ¹	Zellzahl extrahierter P1 (cfu/g Boden)	Zellzahl extrahierter Mutanten (cfu/g)	Mutationsrate
FAL	-	$9,0 \times 10^6$	$4,7 \times 10^2$	$5,2 \times 10^{-5}$
EPAK4a	+	$4,7 \times 10^7$	$6,2 \times 10^3$	$1,3 \times 10^{-4}$
EPAK4b	(+)	$9,9 \times 10^7$	$2,1 \times 10^3$	$2,1 \times 10^{-5}$

¹ Belastung: - unbelastet, (+) nach biologischer Sanierung nur gering belastet, + hoch belastet

4.4 Entwicklung und Erprobung Stress-induzierbarer, biolumineszenter Reporterbakterien aus *P. fluorescens* nach Transposon-Mutagenese

4.4.1 Transposon-Mutagenese und Screening nach Stress-induzierbaren Klonen

Insgesamt wurden 2000 biolumineszente *P. fluorescens*-Stämme durch Transposon-Mutagenese erzeugt. Dazu wurde das Plasmid pUTminiTn5lux [4] in den Wildtyp-Stamm transformiert. Dieses Plasmid war in *P. fluorescens* nicht replikationsfähig. Es enthielt einen transponierbaren Abschnitt, in den das promotorlose *lux*-Operon aus *Xenorhabdus luminescens* sowie ein konstitutiv aktives Kanamycin-Resistenzgen. Der Einbau des transponierbaren Abschnitts brachte das *lux*-Operon unter die Kontrolle von zufälligen chromosomalen Genabschnitten, so dass die Expression der Lumineszenz die Regulation der für den jeweiligen chromosomalen Abschnitten verantwortlichen Promotoren widerspiegelte.

Die Stämme aus der Transposon-Mutagenese wurden auf ihr Antwortverhalten bei Cadmium-Exposition ($10 \mu\text{M}$, in Nährmedium) untersucht. Dazu wurde die Lumineszenz der Stämme zwei Stunden lang nach Beginn der Exposition gemessen und mit der in cadmiumfreiem Medium verglichen. Auf diese Weise wurden 17 Klone gefunden, deren Lumineszenz während der Messzeit bis zu zehnfach gegenüber der unbelasteten Kontrolle stieg, bei vier Klonen änderte sich die Lumineszenz nicht, während sie bei 43 Klonen um bis zu 90 % abnahm. Alle anderen Klone verhielten sich unauffällig. Konstitutiv stark lumineszent waren 45 Klone (vgl. Abb. 6).

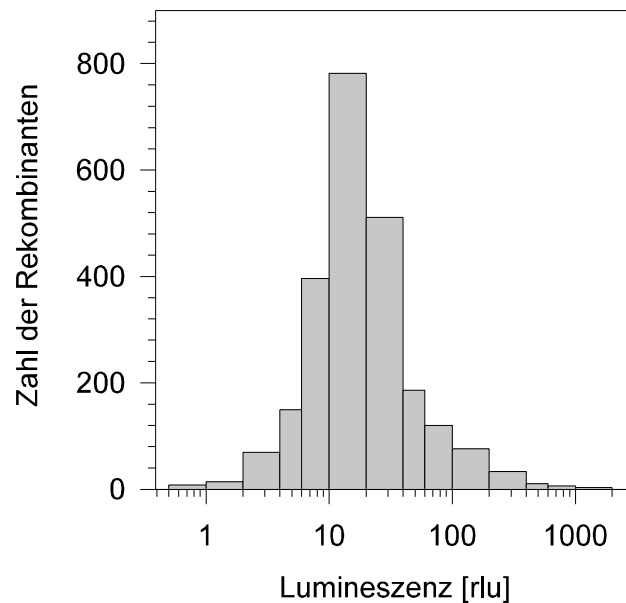


Abb. 6: Verteilung der Autolumineszenz-Intensitäten der *P. fluorescens*-Rekombinanten. Die Lumineszenz wurde nach 2 h Inkubation in Nährmedium bei 2.000 Klonen gemessen

4.4.2 Charakterisierung der Cd-, Zn-, Cu- oder TNT-responsiven Klone in Reinkultur

Die 21 Cadmium-toleranten bzw. induzierbaren Klone wurden auf ihre Sensitivität gegenüber den Schwermetallen Kupfer und Zink sowie TNT getestet, um zu überprüfen, ob die Stämme als universelle Bioindikatoren zu nutzen sind.

Für die Untersuchung des Antwortverhaltens der Reporterbakterien unter Schwermetall-Belastung musste die Phosphatkonzentration des Nährmediums gesenkt werden. Als Lösungsvermittler für TNT wurde Aceton gewählt, dessen Endkonzentration von 0,1 % keinen Einfluss auf das Lumineszenzverhalten ausübte. Bei jeweils vier Klonen war innerhalb von drei Stunden ein Anstieg der Lumineszenz im Vergleich mit der jeweiligen unbehandelten Kontrolle bei Kupfer- und TNT-Exposition festzustellen, während für Zink nur zwei auf gleiche Weise responsive Klone gefunden wurden. Die Abbildungen 7 und 8 zeigen beispielhaft die Entwicklung der Lumineszenz der Klone B9 und B13 bei Cadmium-, Kupfer- und TNT-Exposition. Durch Southern-Blotting wurde sichergestellt, dass beide Stämme nur eine Kopie des *lux*-Operons chromosomal inseriert enthielten.

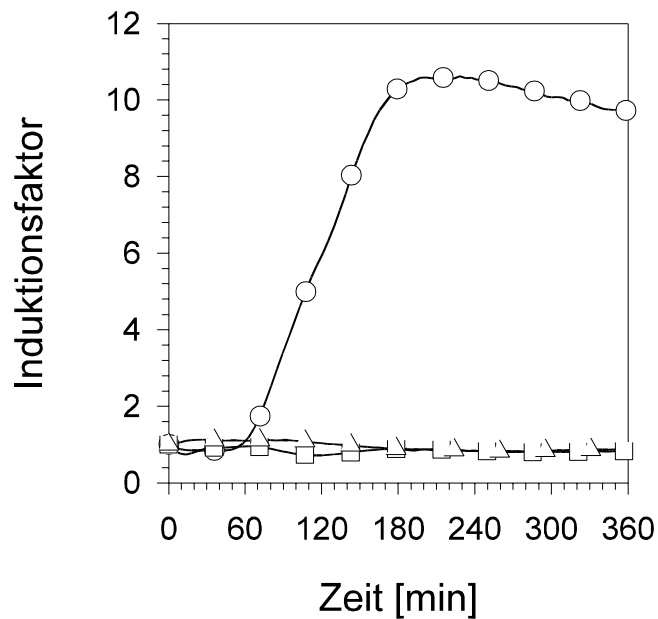


Abb. 7: Entwicklung der Lumineszenz von *P. fluorescens* B9 nach Exposition mit Cadmium ($10 \mu\text{M}$, Kreise), Kupfer ($100 \mu\text{M}$, Quadrate) und TNT ($440 \mu\text{M}$, Dreiecke). Induktionsfaktor: Verhältnis der Lumineszenz zwischen belasteter und unbelasteter Kultur

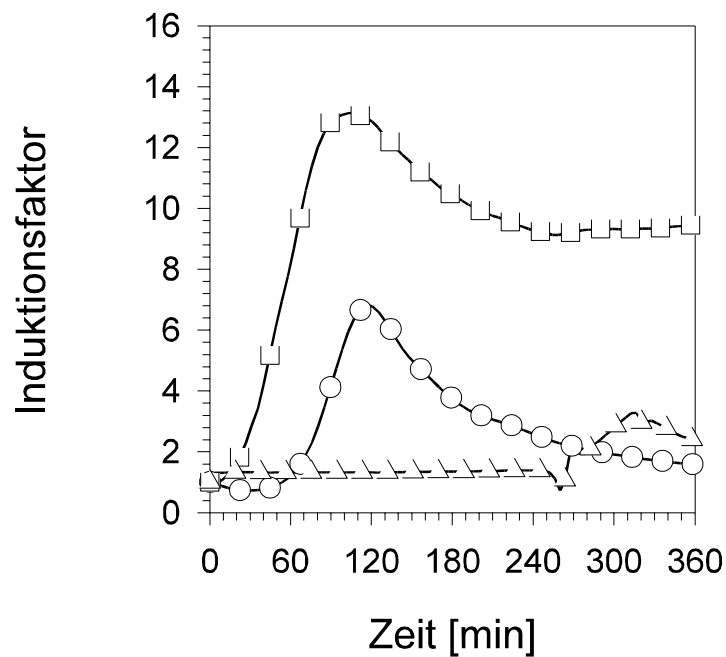


Abb. 8: Entwicklung der Lumineszenz von *P. fluorescens* B13 nach Exposition mit Cadmium ($10 \mu\text{M}$, Kreise), Kupfer ($100 \mu\text{M}$, Quadrate) und TNT ($440 \mu\text{M}$, Dreiecke). Induktionsfaktor: Verhältnis der Lumineszenz zwischen belasteter und unbelasteter Kultur

4.4.3 Untersuchungen in Bodenmikrokosmen mit künstlichen Kontaminationen

Für die weiteren Untersuchungen wurde zunächst der Stamm *P. fluorescens* B9 ausgewählt, da dieser in Reinkulturuntersuchungen die stärkste Induzierbarkeit mit Cadmium gezeigt hatte.

Im Bodensuspensionstest wurden zu 1 g Boden 9 ml Nährmedium und 1 ml einer Reporterbakterien-Kultur in der späten exponentiellen Wachstumsphase gegeben. Da die verwendeten Stämme von *P. fluorescens* aktiv beweglich sind, konnten die Reporterbakterien auch nach der Sedimentation der Bodenpartikel mit diesen in Kontakt treten. Die Reporterbakterien wurden 24 h im Bodensuspensionstest bei 28 °C im Rotationsschüttler (100 rpm) inkubiert. Nach einstündiger Sedimentation der Bodenpartikel wurde 1 ml des Überstandes (OD₅₅₀: 1,0 bei Lufa-2.2-Boden) abgenommen. Die Lumineszenz wurde gemessen und die Zellzahl durch Ausplattieren auf Selektivmedium (Citrat als alleinige C-Quelle + Kanamycin) bestimmt.

Um den Einfluss mitextrahierter Bodenpartikel und gelöster Bodenbestandteile abschätzen zu können, wurde ein Verfahren entwickelt, die Bodenbelastung durch Zudosierung von Cadmium zum vermessenen Überstand abzuschätzen. Abbildung 9 zeigt die Änderung der Lumineszenz bei unterschiedlichen Cadmiumgaben in Abhängigkeit von der Bodenbelastung. Die Verringerung der Induzierbarkeit mit steigender Bodenbelastung ist zu erkennen.

In Anlehnung an den Leuchtbakterientest wurde ein Bewertungsschema entworfen, das auf der Basis der Verringerung der Induzierbarkeit beruht. Ein H-Wert wurde definiert als das Verhältnis aus der Lumineszenz mit und ohne Cadmium-Zugabe nach 200 min, bezogen auf das entsprechende Verhältnis bei Beginn der Cadmium-Zudosierung. Tabelle 4 zeigt die Werte für künstlich kontaminierten Lufa-Boden. Es zeigte sich, dass im künstlichen System ein H-Wert unter 5 eine Bodenbelastung sicher anzeigen konnte.

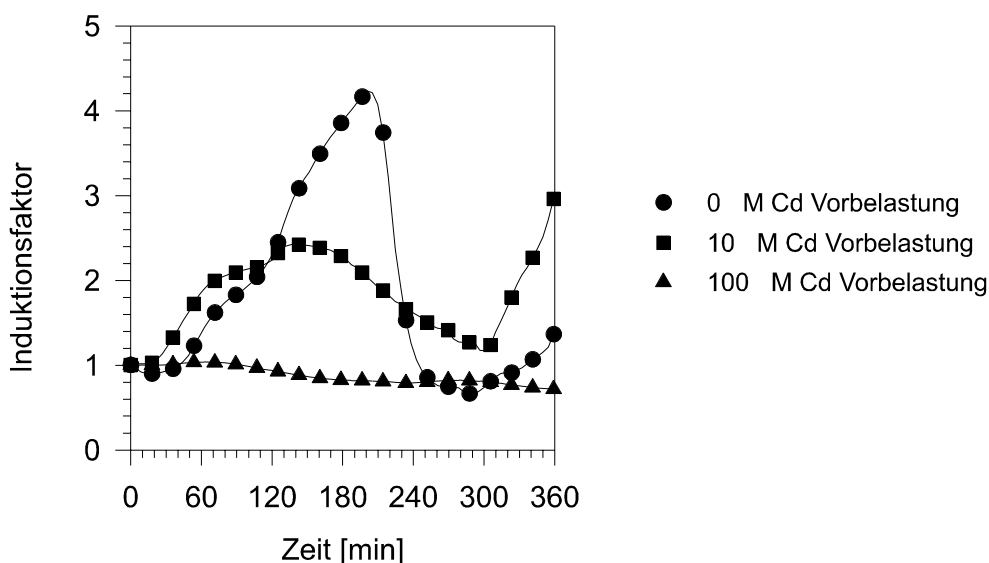


Abb. 9: Lumineszenz von *P. fluorescens* B9 in Abhängigkeit von der Bodenbelastung. Zur Bodensuspension wurden 10 µM Cadmium bei Beginn der Messung zudosiert.

Tabelle 4: Charakteristische Größen des Bodensuspensionstests mit künstlich kontaminiertem Lufa 2.2-Boden

Cd-Konzentration im Lufa-Boden (μM)	Lebendzellzahl (cfu/ml)	Lumineszenz (rlu)	max. Induktion	H-Wert
0	$4 \cdot 10^8 \pm 3 \cdot 10^7$	$22,7 \pm 2$	4	$5,7 \pm 0,5$
10	$1 \cdot 10^8 \pm 4 \cdot 10^7$	$30,1 \pm 5$	2	$6,8 \pm 0,5$
100	$1 \cdot 10^7 \pm 1 \cdot 10^6$	$53,1 \pm 5$	1	$2,3 \pm 1,1$

4.4.4 Untersuchungen in realen Schadensfällen

Ausgehend von den Befunden in künstlich kontaminierten Böden wurde das Testsystem schließlich an Böden von realen Schadensfällen erprobt. Die von der Verbundkoordination (S. Fleischmann, TU Berlin) zur Verfügung gestellten Böden wurden auf 2 mm Korngröße gesiebt und wie beschrieben in Bodensuspensionstests eingesetzt. Tabelle 5 fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 5: Maximale Induktion und H-Wert in unterschiedlichen kontaminierten Böden bei Untersuchung mit *P. fluorescens* B9.

Boden	Belastung ¹	Induktion	H-Wert
OMKW0	-	$4,9 \pm 0,6$	$7,0 \pm 0,3$
OMKW1a	+	$9,0 \pm 1,1$	$4,9 \pm 0,6$
EPAK4a	+	$11,2 \pm 1,8$	$3,3 \pm 0,2$
EPAK4b	(+)	$8,5 \pm 0,8$	$2,6 \pm 0,3$
SPAK1a	+	$5,4 \pm 0,9$	$3,8 \pm 0,8$
SPAK1b	(+)	$3,9 \pm 0,8$	$4,5 \pm 0,3$
CTNT0	-	$5,0 \pm 0,3$	$5,3 \pm 0,9$
CTNT1a	+	$2,9 \pm 0,6$	$3,9 \pm 0,2$
Lufa	-	$4,3 \pm 0,7$	$5,7 \pm 0,5$

¹ Belastung: Belastungsgrad des Hauptschadstoffs. - unbelastet, (+) nach biologischer Sanierung gering belastet, + hoch belastet

Mit Ausnahme von OMKW1a wurden alle belasteten Böden korrekt identifiziert. Die Festlegung, dass bei H-Werten kleiner als 5 ein Boden als belastet anzusehen sei, hat sich bewährt. Entgegen den Erwartungen fiel auch der sanierte Boden EPAK4b unter diesen

Schwellenwert. Ein für diese Schädigung verantwortlicher Schadstoff konnte bisher anhand der Schadstoff-Datenblätter nicht festgestellt werden.

Die Zugabe von 10 μM Cadmium zum Überstand des Bodensuspensionstests bewirkt bei belasteten Böden nicht, wie zu erwarten war, eine Verringerung der Induktion im Vergleich zu Lufa-Böden. In Reinkultur führten Zinkkonzentrationen von 50 μM ($3,25 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$) bei *P. fluorescens* B9 zu einer Reduzierung der Lumineszenz um 80%. Deshalb ist besonders das Verhalten der OMKW- und CTNT-Bodensuspensionstests überraschend.

5 Übertragbarkeit / Anwendung

Die im Rahmen dieser Untersuchungen erarbeiteten Ergebnisse liefern Datenmaterial, das für die Einstufung von Böden in unterschiedliche Schadenskategorien und der Bewertung der damit verbundenen Risiken relevant ist. Dabei konnte gezeigt werden, dass entgegen den Erwartungen die Fähigkeit zur recA-vermittelten DNA-Reparatur unter den von uns gewählten Testbedingungen keinen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber Bodenbelastungen durch PAKs, aliphatische Kohlenwasserstoffe oder TNT ausübt. Ebenso erwiesen sich positive Selektionsvektoren bisher als zu unempfindlich. Jedoch können hier gezielte Optimierungen, z.B. bezüglich des Aufnahmeverhaltens der Schadstoffe, den entscheidenden Fortschritt bieten. Von uns selbst konnten, ausgehend vom typischen Bodenbakterium *P. fluorescens*, Stämme konstruiert werden, deren Lumineszenz durch Schadstoffeinwirkung induziert wurde. Diese unterschieden sich in ihren Sensitivitäten gegenüber Schwermetallen und TNT. Von einem ausgewählten Stamm konnte gezeigt werden, dass sich dieser in Bodensuspensionstests zur Bestimmung des Kontaminationsgrades bei einer Reihe verschiedener Schadstoffe (PAK, Kohlenwasserstoffe, TNT) einsetzen lässt. Die Bestimmung der metabolischen Sofortantwort extrahierter Bodenbakterien auf Ebene der "community" zeigte, dass mit aliphatischen Kohlenwasserstoffen und PAK belastete Böden von ihren unkontaminierten Vergleichsböden durch multivariate statistische Auswertung der Messergebnisse getrennt werden konnten. Die differenzierenden Komponenten sind dabei in den Substratverwertungsspektren und nicht in der Gesamtaktivität der Mikroflora zu suchen.

Keines der erprobten Systeme kann für die unmittelbare Anwendung als alternatives Verfahren empfohlen werden. Für jedes der erprobten Systeme lassen sich jedoch Empfehlungen aussprechen, wie die Systeme jeweils optimiert werden können, um als neuartige Bioindikatoren eine Anwendung zu finden. Zwei von uns untersuchte Strategien erscheinen uns besonders attraktiv für eine Weiterentwicklung, 1. die Charakterisierung der natürlich im Boden vorkommenden Mikroorganismen-Gesellschaft und 2. die Nutzung von Bodenmikroorganismen mit Reporter-Genen, die durch Stress-induzierbare Promotoren reguliert werden.

6 Abkürzungen

4-NQO	4 Nitrochinolin-n-oxid
AWCD	Durchschnittliche Farbentwicklung pro Mikrotiterplatte und Reaktion
Cd	Cadmium
cfu	Koloniebildende Einheiten (colony forming units)
Cu	Kupfer
h	Stunde(n)
HMP	Hexametaphosphat
Km	Kanamycin
PAK	polyaromatische Kohlenwasserstoffe
Lufa	Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt (Standard-Boden)
MHK	Minimale Hemmkonzentration (für das Wachstum von Bakterien)
min	Minute(n)
NaCl	Natriumchlorid
OD ₅₅₀	Optische Dichte bei 550 nm
PCA	Plate Count Agar: Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien
rlu	relative Lichteinheiten (relative light units)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
Sac	Saccharose
Sm	Streptomycin
Tet	Tetracyclin
TNT	Trinitrotoluol
Zn	Zink

7 Eigene Veröffentlichungen

Sendrowski, H., J. C. Munch, and C. C. Tebbe. 1997. Establishment of soil contact bioassays involving novel genetically engineered microorganisms. VAAM Tagung 1997. Hamburg. Biospektrum Sonderausgabe. p.94.

Sendrowski, H., R. Simon, W. Selbitschka, A. Pühler, J. C. Munch, and C. C. Tebbe. 1997. Utilization of genetically engineered reporter bacteria and indigenous soil bacteria for the detection of toxic or mutagenic substances in soil. International Conference on Microbial Response to Stress. Sesimbra, Portugal. Abstract book, p. 92.

Sendrowski, H. and C. C. Tebbe. 1998. Use of novel genetically engineered microorganisms in soil contact bioassays. VAAM Tagung 1998. Frankfurt. Biospektrum Sonderausgabe. Seite 132.

Sendrowski, H., and C. C. Tebbe. 1998. Use of novel genetically modified reporter bacteria for the detection of soil-bound contaminants. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent 63/4b: 1893-1896.

8 Literaturverzeichnis

1. **Ames, B. N., J. McCann, and E. Yamasaki.** 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutation Research*. **31**:347-364.
2. **Bartha, R., J. Shen, and X. Wang.** 1992. Effects of bioremediation on toxicity and mutagenicity of soil contaminated with hydrocarbon fuel, p. 168-175, Soil decontamination using biological processes. Dechema e.V., Frankfurt/ M.
3. **Dammann-Kalinowski, T., S. Niemann, M. Keller, W. Selbitschka, C. C. Tebbe, and A. Puhler.** 1996. Characterization of two bioluminescent *Rhizobium meliloti* strains constructed for field releases. *Appl Microbiol Biotechnol.* **45**(4):509-12.
4. **Forde, C. B., R. Parton, and J. G. Coote.** 1998. Bioluminescence as a reporter of intracellular survival of *Bordatella bronchioseptica* in murine phagocytes. *Infection and Immunity.* **66**:3198-3207.
5. **Fronza, G., P. Campomenosi, R. Iannone, and A. Abbondandolo.** 1992. The 4-nitroquinoline 1-oxide mutational spectrum in single stranded DNA is characterized by guanine to pyrimidine transversions. *Nucleic Acids Res.* **20**:1283-1287.
6. **Garland, J. L., and A. L. Mills.** 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level-sole-carbon-source-utilization. *Applied and Environmental Microbiology.* **57**:2351-2359.
7. **Hund, K., A. Fliedner, P. Lepper, B. Schenk, W. Traunspurger, R. Jacob, and V. Schulz-Berendt.** 1992. Ecotoxicological assessment of a decontamination method for a PAH contaminated site, p. 176-183, Soil decontamination using biological processes. Dechema e.V., Frankfurt.
8. **Lindahl, V., and L. R. Bakken.** 1995. Evaluation of Methods For Extraction of Bacteria From Soil. *Fems Microbiology Ecology.* **16**(2):135-142.
9. **Matthews, E., and L. Hastings.** 1987. Evaluation of a toxicity test procedure for screening treatability potential of waste in soil. *Toxicity Assessment.* **2**:261-281.
10. **Mergeay, M.** 1991. Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance. *Trends in Biotechnology.* **9**:17-24.
11. **Reifferscheid, G., J. Heil, Y. Oda, and R. K. Zahn.** 1991. A microplate version of the SOS/umu-test for rapid detection of genotoxicity of contaminated marine sediments. *Mutation Research.* **253**:215-222.

12. **Schiewe, M. H., E. G. Hawk, D. I. Actor, and M. M. Krahn.** 1985. Use of bacterial bioluminescence assay to assess toxicity of contaminated marine sediments. *Can. J. Fish Aquatic. Sci.* **42**:1244-1248.
13. **Selbitschka, W., A. Pühler, and R. Simon.** 1992. The construction of recA deficient containment *Rhizobium meliloti* and *R. leguminosarum* strains marked with gusA or luc cassettes for use in risk assessment studies. *Molecular Ecology.* **1**:9-19.
14. **Simon, R., B. Hötte, B. Klauke, and B. Kosier.** 1991. Isolation and characterization of insertion sequence elements from gram-negative bacteria using new broad host range positive selection vectors. *Journal of Bacteriology.* **173**:1502-1508.
15. **Smalla, K., U. Wachtendorf, H. Heuer, W. T. Liu, and L. Forney.** 1998. Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology.* **64**(4):1220-1225.
16. **Vahjen, W., J. C. Munch, and C. C. Tebbe.** 1995. Carbon source utilization of soil extracted microorganisms as a tool to detect the effects of soil supplemented with genetically engineered and non-engineered *Corynebacterium glutamicum* and a recombinant peptide at the community-level. *Fems Microbiology Ecology.* **18**(4):317-328.
17. **Xu, H., B. J. Dutka, and K. Schnurr.** 1989. Microtitration SOS chromotest: a new approach in genotoxicity testing. *Toxicity Assessment.* **4**:105-141.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.3 Verbundvorhaben 4: Ökotoxikologische Testbatterien

9.3.5 Bodenextraktionsverfahren zur Bewertung des ökotoxikologischen Potentials von Böden

Teil A: Entwicklung und Erprobung eines Verfahrens zur Herstellung von Bodeneluaten für chemische Analytik und ökotoxikologische Tests (TV 4.4)

Dr. Werner Kördel

Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie
Postfach 1260
57377 Schmallenberg

Förderkennzeichen: 1491058

Laufzeit: 01.10.1996 – 31.08.1999

1 Zusammenfassung und Zielsetzung

Ein wesentliches Schutzziel in der Bodenschutzgesetzgebung ist der Grundwasserschutz; d. h. vom Boden sollten keine Schadstofffrachten ausgehen können, die zu einer Überschreitung der hinsichtlich des Grundwasserschutzes festgelegten Geringfügigkeitsschwellen für definierte Stoffe führen können. Die Beurteilung, ob ein Boden oder Substrat grundwassergefährdend ist, beruht somit auf der Analyse von einzelnen ausgewählten Schadstoffen. Diese Beurteilung gewinnt aus Sicht des Verbundes erheblich an Sicherheit, wenn zusätzlich ökotoxikologische Tests zur Erfassung des Ökotoxizitätspotentials von Bodeneluaten eingesetzt werden.

Zur Erfassung einer möglichen Grundwassergefährdung durch kontaminierte und behandelte Böden galt es, somit eine Methode zu entwickeln und zu erproben mit der Bodeneluat routinemäßig hergestellt werden können, die für die chemische Analyse und ökotoxikologischen Tests eingesetzt werden können. Die Bodeneluat sollten folgende Kriterien erfüllen:

- möglichst realitätsnahe Abbildung der Quellstärke, d. h. der Schadstoffkonzentration im Porenwasser
- trotzdem ausreichende Volumina für ökotoxikologische Tests
- möglichst keine bzw. nur geringfügige Veränderung der Bodeneigenschaften während der Eluatherstellung
- Eignung der Eluate für ökotoxikologische Tests bezüglich Salz- und Nährstoffkonzentrationen, pH-Wert, Trübung u.s.w.
- geeignete Separationsschritte zum Erhalt einer ausreichend klaren Lösung
- Abklärung der Bioverfügbarkeit der Schadstoffe im Eluat
- einfache und gut standardisierbare Durchführung, die für eine große Bandbreite von Böden geeignet ist und auch von ökotoxikologischen Labors durchgeführt werden kann.

2 Kenntnisstand

§ 12 der Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung (BBodSchV) befasst sich mit Anforderungen an das Aufbringen und Einbringen von Materialien auf oder in Böden. Hingewiesen wird dabei auf DIN 19731 (Verwertung von Bodenmaterialien). Mit einer Verwertung von Materialien und einer damit verbundenen möglichen Grundwasserbelastung beschäftigen sich des weiteren Papiere der LAWA: Grundsätze des Grundwasserschutzes bei Abfallverwertung und Produkteinsatz, Stand Januar 1999 [7], Anforderungen an die Stoffliche Verwertung von mineralischen Reststoffen/Abfällen [6] sowie Anforderungen an die Verwertung von kultivierbarem Bodenmaterial; Technische Regeln [5].

Bei der Abschätzung einer möglichen Grundwassergefährdung durch die Verwertung von Bodenmaterial und anderen Materialien bedarf es einer realistischen Bestimmung der Quellstärke von Schadstoffen aus diesen Materialien. Die Quellstärke selbst hängt z. B. ab

- von den Schadstoffen, ihren Konzentrationen und Zusammensetzungen,

- den Eigenschaften der belasteten Böden/Materialien,
- der Zusammensetzung (Eigenschaften) des die Böden/Materialien durchströmenden Porenwassers bzw. des gewählten Eluenten.

In der Fachliteratur besteht Konsens, dass der Quellterm durch Versuche, die die realen Bedingungen abbilden, in Abhängigkeit von den obigen Parametern untersucht werden muss (siehe z. B. [3; 4; 9]). Prinzipiell kommen als Labormethoden Schüttelversuche und/oder Säulenversuche in Betracht. In der Literatur wird ein breites Methodenspektrum vorgeschlagen, dessen Vielfalt auch durch die unterschiedlichen Fragestellungen begründet ist. Wesentliche Verfahren sind z. B. bei Blankenhorn [1] und v. d. Sloop [11] zusammengestellt. Die überwiegende Anzahl der Methoden wurde für Metalle entwickelt und erprobt. Dies gilt z. B. auch für die DIN-Methoden DIN-EN 12457 1-4.

Zur Ermittlung der Quellstärke sollten möglichst enge Feststoff/Wasser-Verhältnisse gewählt werden, um die Bedingungen des Porenwassers zu simulieren. So zeigen z. B. Utermann et al. [10], dass der Bodensättigungsextrakt die Stoffkonzentrationen im Sickerwasser weitaus präziser als die S-4-Methode mit einem weiten Feststoff/Wasser-Verhältnis von 1 : 10 wiedergibt.

Neben Schüttelversuchen werden insbesondere für schwerlösliche organische Kontaminanten Säulenversuche vorgeschlagen [siehe DIN V 19736]. Von Pfeifer et al. [9] wird darauf hingewiesen, dass eine Versuchsauswertung schwierig ist, solange nicht bekannt ist, ob bei sorptiv gebundenen Schadstoffanteilen annähernd Gleichgewichtsbedingungen erreicht werden. Des Weiteren können die derzeit vorgeschlagenen Fließgeschwindigkeiten in der Säule nur bei sandigen Böden erfüllt werden.

Für die Herstellung von Bodeneluaten, die gleichzeitig für eine chemische Analyse der Eluate und für ökotoxikologische Tests eingesetzt werden sollen, eignen sich Schüttelversuche, die sich z. B. eng an DIN-EN 124571 anlehnen, also mit einem Feststoff/Wasser-Verhältnis von 1 : 2 arbeiten. Bei der Einbeziehung organischer Schadstoffe müssen jedoch clean-up-Schritte, insbesondere Filtrationsschritte, auf organische Kontaminanten ausgelegt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Böden

Für die Untersuchungen wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Böden verwendet. Da zu Beginn des Vorhabens nur die Böden 3 EPAK von der Projektkoordination zur Verfügung gestellt wurden und die Böden niedrige Corg-Gehalte hatten, wurden den Böden EPAK2 und EPAK3 Fertigkompost zugemischt, um den Corg-Gehalt zu erhöhen. Die so modifizierten Böden wurden mit EPAK2k und EPAK3k bezeichnet. Des Weiteren wurden die Böden HTNT1 und 2 sowie LMKW1 und 2 von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Dott, Dr. A. Eisenträger, RWTH Aachen freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.2 Methoden-Kurzbeschreibung

3.2.1 Herstellung von Bodeneluaten mit der Schüttelmethode

Die Herstellung kleinerer Mengen an Bodeneluaten für chemische Analysen erfolgte in 80 ml Zentrifugengläser mit Schliffstopfen. X g (bezogen auf Trockengewicht) wurden in das Zentrifugenglas eingewogen und mit soviel ml des jeweiligen Eluenten versetzt, um das gewünschte Boden/Wasser-Verhältnis zu erreichen. Dann wurde die Probe – sofern nichts anderes angegeben – über 24 h geschüttelt (entweder Horizontalschüttler Gerhardt LS 30 oder Überkopfschüttler). Nach dem Schütteln empfiehlt es sich, die Probe 1 – 3 h absetzen zu lassen und dann zu zentrifugieren und den Überstand nach der Zentrifugation zu filtrieren.

Für die Herstellung größerer Mengen an Bodeneluaten wurden 1 bis 2 l Flaschen mit Schraubverschluss und der Überkopfschüttler verwendet.

3.2.2 Herstellung von Bodensättigungsextrakten

Die Herstellung von Bodensättigungsextrakten erfolgte in Anlehnung an DIN V 19735.

3.2.3 Herstellung von Bodeneluaten mit der Säulenmethode

Die Durchführung der Säulenversuche erfolgte in Anlehnung an DIN V 19736.

3.2.4 Bestimmung der Trübung

Die Messungen erfolgten gemäß DIN EN 27027.

3.2.5 PAK-Bestimmung

Die Bestimmung der Gesamtgehalte erfolgte in Anlehnung an E-DIN ISO 13877 Verfahren B. Die Extraktion erfolgte mit Toluol in einer Soxhletapparatur über 18 h mit anschließender Aufreinigung der Proben über eine Kieselgel-Chromatographie. Die Quantifizierung erfolgte über HPLC mit Fluoreszenz-Detektor. Die Auswertung erfolgt als Summe PAK nach EPA (16 Einzelverbindungen) sowie nach TVO (Trinkwasserverordnung).

3.2.6 Bestimmung der PAK-Gehalte im Eluat

PAKs werden an Festphasensäulen (NH₂/C₁₈-Material der Fa. Macherey-Nagel) angereichert, mit Dichlormethan eluiert und über HPLC quantifiziert.

3.2.7 Bestimmung von Nitroaromaten

Die Bestimmung des Gesamtgehaltes erfolgte in Anlehnung an die EPA-Methode 8330. 10 g Boden wurden mit 50 ml Methanol versetzt und in einem Ultraschallbad unter Kühlung über 16 h extrahiert. Nach Zentrifugation wird der Überstand für HPLC-Messungen verwendet.

3.2.8 Bestimmung der Nitroaromaten-Gehalte im Eluat

Die Nitroaromaten werden an Festphasensäulen (C₁₈-Material) ankonzentriert, mit Methanol extrahiert und über HPLC quantifiziert.

3.2.9 Bestimmung von Mineralökohlenwasserstoffen

Die Bestimmung der Gesamtgehalte erfolgte analog DIN 38 409 H 18. Zur Bestimmung der MKW-Gehalte in Eluaten wurden diese auf pH 2,0 angesäuert und mit Trichlortrifluorethan (TCTFE) extrahiert. Die Aufreinigung der Extrakte erfolgte über Aluminiumoxid-Säulen.

3.2.10 Bestimmung der Schwermetallen

Die Bestimmung erfolgte analog DIN 38 414 S7 (Aufschluss mit Königswasser) und DIN 38 406 E22.

3.2.11 Leuchtbakterientest

Die Durchführung erfolgte analog DIN 38 412 – Teil 34.

3.2.12 Daphnientest

Die Durchführung erfolgte analog DIN 38 412 – Teil 30.

Tab. 1: Physikalisch-chemische Eigenschaften und Schadstoffgehalte der in die Untersuchung einbezogenen Böden

Boden/ -material	pH (CaCl ₂)	C _{org} [%]	WHK _{max} [%]	Bodenart [%]			Pb	Cd	Cr	Cu	Ni	Zn	EPA-PAK	TVO-PAK	MKW	TNT
				T	U	S										
EPAK2a/2ak	7,6	0,2/1,5	18	6	65	27	1,1	< 0,01	n.b.	6,8	14	24	2,5	< 1,0	2,87	n.b.
EPAK3/3k	7,5	0,5/1,7	22	11	78	11	25	< 0,01	n.b.	8,8	23	83	294	180	154	n.b.
EPAK3b/3k	7,7	0,6/1,8	24	11	79	10	23	< 0,01	n.b.	14	23	86	267	187	n.b.	n.b.
EPAK4a	7,8	0,8	32	13	35	52	29	< 0,01	n.b.	7,8	31	72	563	83	n.b.	n.b.
SPAK1a	6,3	0,8	13	7	17	76	24	< 0,2	885	4,4	7,2	44	1102	157	218	n.b.
SPAK1b	5,8	5,4	42	12	19	69	20	< 0,01	751	19	20	80	33	10	190	n.b.
HTNT1	4,7	9,9	76		Sand		2136	0,3	53,6	16	9,4	514,3	816,6	268,5	n.b.	16
HTNT2	4,1	25,7	78		Sand		748	0,2	55,1	10,7	6,5	74,1	1153	447,2	n.b.	15,4
LTNT1a	7,4	1,2	22	1	3	96	36	< 2	22	36	3,9	75	2,7	1	n.b.	1700
LTNT1c	7,8	18	182	13	58	29	121	< 2	18	48	8,5	111	54,5	21	n.b.	30
CTNT1a	4,5	2,9	47	18	55	27	254	0,8	19	102	29	875	18	7,4	n.b.	1600
LMKW1	7,5	1,1	41		Sand		137,5	0,2	10,4	54,2	29,9	167,4	8,5	0,2		n.b.
LMKW2	7,7	3,4	43		lehmgiger Sand		64,9	0,2	34	108,8	41,4	473	39,9	10,5		n.b.
CW PAK 1c	7,8	4,3	36	22	60	18	250	4,9	200	96	74	560	371	168	499	n.b.
BMWK1a	7,2	1,6	23	6	1	94	41	0,5	20	43	11	159	4,4	0,6	5445	n.b.

n.b.: nicht bestimmt; n.n.: nicht nachweisbar

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Untersuchungsstrategie

Da die Schadstoffkonzentrationen in den Bodeneluaten von der angewandten Methodik stark beeinflusst werden können, galt es bei der Entwicklung und Erprobung der Elutionsmethode den Einfluss der einzelnen Schritte auf die Schadstoffkonzentration im Eluat abzuklären. Wesentliche Parameter dabei sind:

- Herstellung der Eluate
 - Boden/Wasser-Verhältnis
 - Zeitabhängigkeit der Gleichgewichtseinstellung
 - Wahl des Eluenten
 - pH-Wert-Einstellung
 - Schüttel- und/oder Säulenversuch
- Abtrennung von Bodenpartikeln
 - geeignete Filtermaterialien für anorganische und organische Schadstoffe
 - Kombination von Zentrifugation und Filtration
 - Bedeutung der Kontrolle der Trübung
- Ankonzentrierung von Bodeneluaten
- Bioverfügbarkeit der Schadstoffe im Eluat

Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitsschritte und ihre Festlegung innerhalb einer Testvorschrift zur Herstellung von Bodeneluaten erläutert und exemplarisch anhand ausgewählter Versuchsergebnisse begründet.

4.2 Variation des Boden/Wasser-Verhältnisses

Arbeitsziel war es, Bodeneluate herzustellen, deren Schadstoffgehalte möglichst realitätsnah die Konzentration im Sickerwasser abbildet. Die Herstellung eines Bodensättigungsextraktes schied jedoch aus, da für ökotoxikologische Tests bis zu 1 l Bodeneluat benötigt werden. Zudem lässt sich die Herstellung von Bodensättigungsextrakten nur schwer standardisieren.

Abbildung 1 zeigt ein "typisches" Beispiel wie in der Regel die PAK-Konzentration im Eluat mit zunehmendem Boden/Wasserverhältnis abnimmt. Diese Abnahme kann noch stärker ausgeprägt sein, wenn die PAK-Konzentration im Boden deutlich niedriger liegt, wie z. B. beim Boden SPAK 1b, der nach der biologischen Sanierung getestet wurde (Abbildung 3). Gleichzeitig wurde die Schüttelmethode mit einer einfachen Suspendierung des Bodens mit dem zugegebenen Wasser und weiterem Stehenlassen für 24 h verglichen, also einem analogen Vorgehen wie bei der Herstellung von Bodensättigungsextrakten. Die Abbildungen 1 und 2 verdeutlichen, dass die Schadstoffkonzentration in den nicht geschüttelten Proben signifikant unter denen der geschüttelten Proben liegt. Dies ist zu erwarten, da bei der Einbeziehung eines Überkopfschüttlers mit geringen Umdrehungen eine bessere Durchmischung aber auch ein teilweises Aufbrechen von Bodenaggregaten erfolgt. (Zu vermeiden ist ein heftiges Schütteln der Bodensuspension, das zu einem Zermahlen von Bodenpartikeln führt.) Die PAK-Konzentrationen im Bodeneluat der Schüttelmethode bei einem Boden/Wasser-Verhältnis von 1 : 2 liegen in der Regel oberhalb der Konzentration des Bodensättigungsextraktes, überschreiten jedoch nur in Ausnahmefällen einen Faktor von 2.

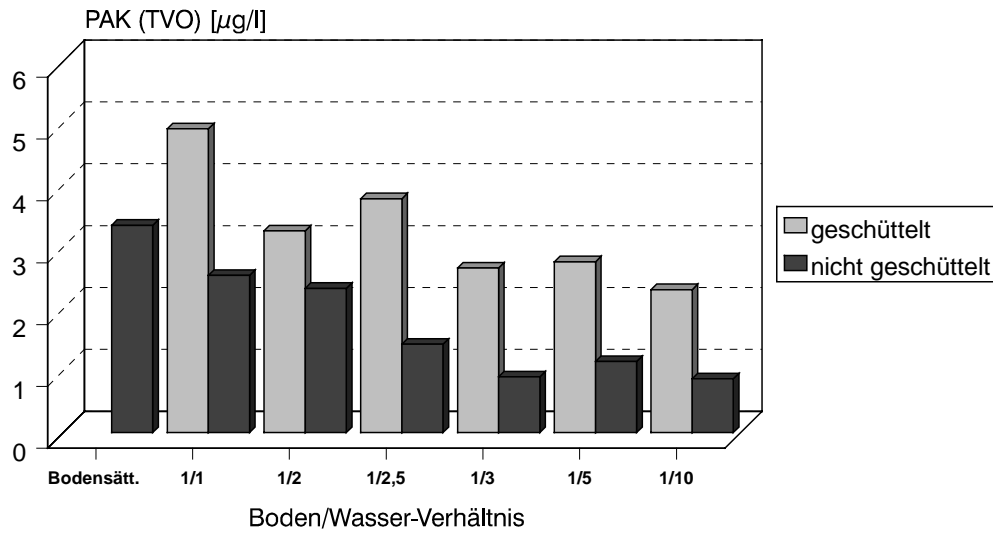


Abb. 1: Variation der Boden/Wasserverhältnisse – Boden: EPAK 3K

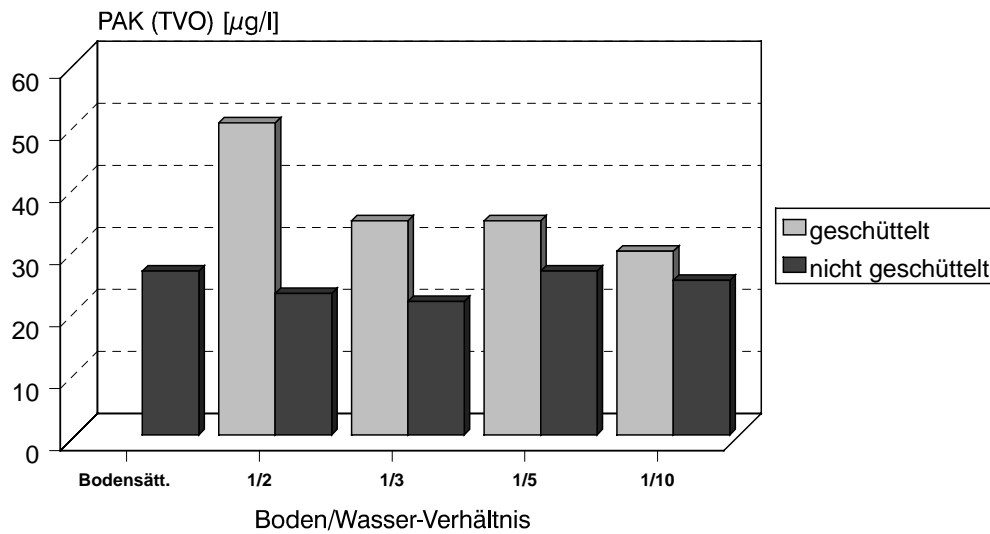


Abb. 2: Variation der Boden/Wasserverhältnisse – Boden: SPAK 1a

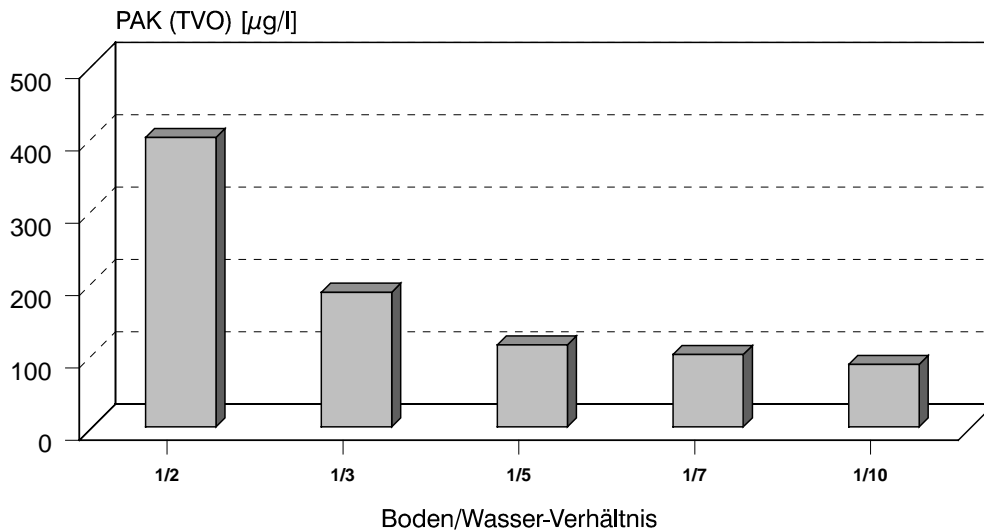


Abb. 3: Variation der Boden/Wasserverhältnisse – Boden: SPAK 1b

Bei der Herstellung der Bodeneluate werden die löslichen PAKs verstärkt aus dem Boden herausgelöst. Die Summe der PAK nach TVO (Trinkwasserverordnung) wird daher maßgeblich vom Gehalt des Fluoranthen bestimmt. Die Tabelle 2 verdeutlicht am Beispiel des DOC, dass bei einem Boden/Wasser-Verhältnis von 1 : 10 die im Porenwasser vorliegenden natürlichen Verbindungen verdünnt werden. Diese können wiederum wie DOC lösungsvermittelnde Eigenschaften für Kontaminanten haben. Die Tabelle 2 zeigt weiterhin, dass vergleichbare K_{OC} -Werte berechnet werden können. Dabei liegen die K_{OC} -Werte für ein Boden/Wasser-Verhältnis von 1 : 2 bedingt durch den höheren DOC-Gehalt des Eluats etwas niedriger als bei einem Boden/Wasser-Verhältnis von 1 : 10.

Tab. 2: Vergleich der Elutionsausbeute verschiedener Böden am Beispiel von Fluoranthen

	Eluat (Boden/Wasser-Verhältnis 1:2)				Eluat (Boden/Wasser-Verhältnis 1:10)			
	Konz. [$\mu\text{g/l}$]	DOC [mg/l]	log K'	log K_{OC}	Konz. [$\mu\text{g/l}$]	DOC [mg/l]	log K'	log K_{OC}
EPAK 3a	17,27	20,1	3,25	5,62	8,96	9,0	3,53	5,90
EPAK 3aK	1,78	33,1	4,19	5,97	1,86	15,1	4,17	5,95
HTNT1	1,47	287,5	4,61	5,62	1,06	187,5	4,76	5,76
HTNT2	2,74	75,4	4,66	5,25	1,93	53,2	4,81	5,40

Ein analoges Bild ergibt sich bei den Nitroaromaten. Da die Nitroaromaten erheblich besser wasserlöslich als die PAKs sind, sind die Unterschiede in der Regel nicht so stark ausgeprägt wie Abbildung 4 verdeutlicht. Da eine Kontamination mit Nitroaromaten jedoch teilweise

inhomogen als kleine Klumpen im Boden verteilt vorliegt, werden auch Ergebnisse wie in Abbildung 5 dargestellt erhalten.

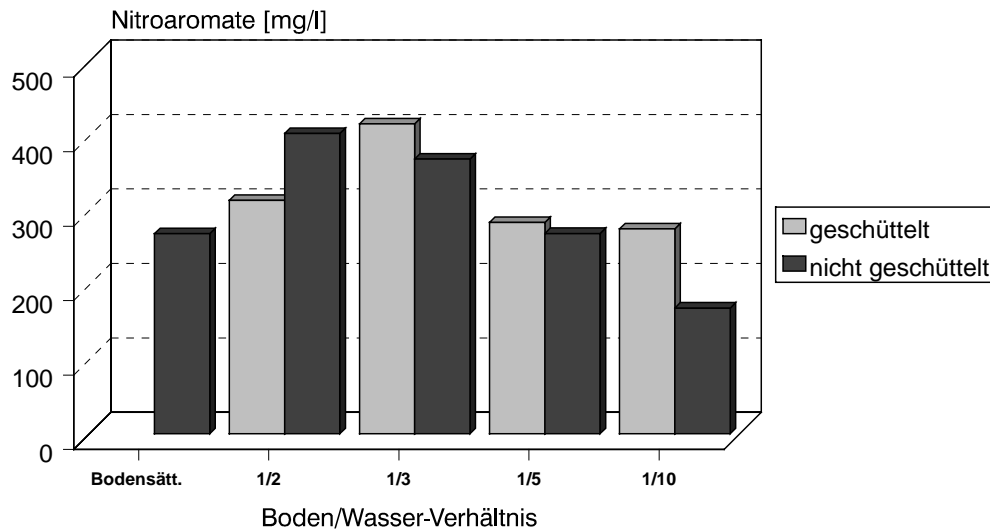


Abb. 4: Variation der Boden/Wasserverhältnisse – Boden: HTNT1

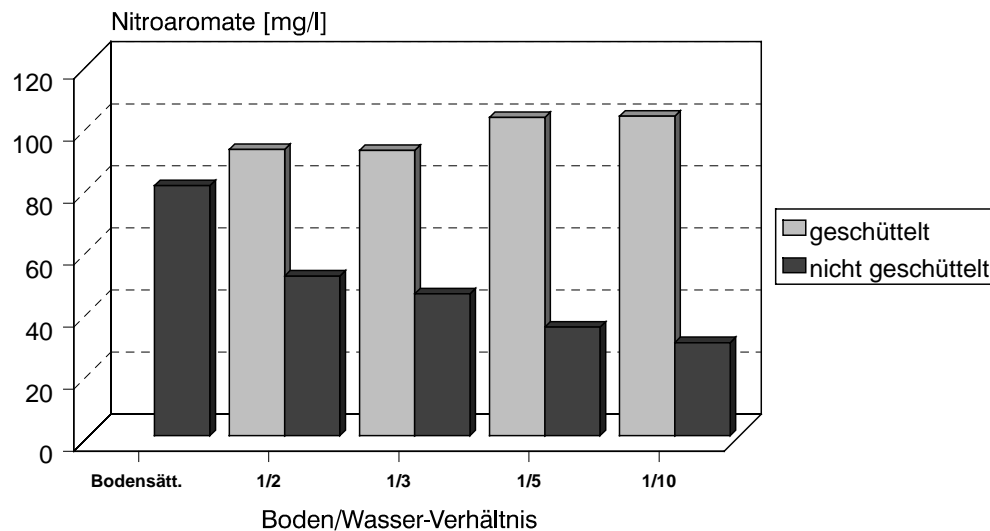


Abb. 5: Variation der Boden/Wasserverhältnisse – Boden: HTNT2

Die Tabellen 3 und 4 verdeutlichen, dass bei Nitroaromaten signifikante Mengen ins Eluat transferiert werden, während bei den PAKs nur sehr geringe Mengen des im Boden vorhandenen Schadstoffpools eluiert werden. Deutlich ist auch hier eine Abstufung gemäß der Wasserlöslichkeit bzw. der Sorptionskonstante der einzelnen Verbindungen.

Tab. 3: Extrahierte PAK-Gehalte

PAK	Gesamtgehalt an PAK im Testgefäß [µg]	Konzentration im Eluat [µg/l]	Gesamtgehalt im Eluat [µg]	eluiert [%]
Fluoranthen	307,00	10,27	0,211	0,069
Benz[b]fluoranthen	436,60	0,87	0,018	0,004
Benz[k]fluoranthen	105,50	0,22	0,005	0,005
Benz[a]pyren	288,90	0,44	0,009	0,003
Benz[g,h,i]perylen	279,50	0,00	0,000	0,000
Indeno[1,2,3,c,d]pyren	331,50	0,30	0,006	0,002

Tab. 4: Extrahierte Nitroaromaten-Gehalte

Nitroaromate	Gesamtgehalt Nitroaromate im Testgefäß [mg]	Konzentration im Eluat [mg/l]	Gesamtgehalt im Eluat [mg]	eluiert [%]
1,3-Dinitrobenzol	1,70	0,16	0,004	0,235
TNT	186,80	92,20	2,131	1,141
4-Amino-2,6-dinitrotoluol	0,20	0,41	0,009	4,500
2-Amino-4,6-dinitrotoluol	0,30	0,20	0,005	1,667
2,6-Dinitrotoluol	0,90	0,62	0,014	1,556
2,4-Dinitrotoluol	9,50	8,81	0,204	2,147
4-Nitrotoluol	0,60	0,01	0,000	0,033

4.3 Zeitabhängigkeit der Gleichgewichtseinstellung

Eine Reihe von Methoden zur Herstellung von Eluaten oder Extrakten nutzt aus pragmatischen Gründen eine Schüttel- oder Elutionszeit von 24 h (siehe z. B. E-DIN EN 12457-1). Es wird davon ausgegangen, dass bei feinkörnigerem Material (z. B. < 4 mm) eine Gleichgewichtseinstellung nach dieser Inkubationszeit weitgehend erfolgt ist. Natürlich sind dabei

langsame Diffusionsprozesse aus größeren Partikeln ausgeschlossen. Die Abbildungen zeigen exemplarisch an einem mit PAK und TNT kontaminierten Boden, dass die Annahme für die im Vorhaben untersuchten Böden erfüllt ist. Erwartungsgemäß erfolgt die Gleichgewichtseinstellung bei den besser löslichen Nitroaromaten schneller als bei den PAK-Böden. Des Weiteren kann eine recht gute Parallelität zwischen den Schadstoffgehalten im Eluat und der DOC-Konzentration beobachtet werden.

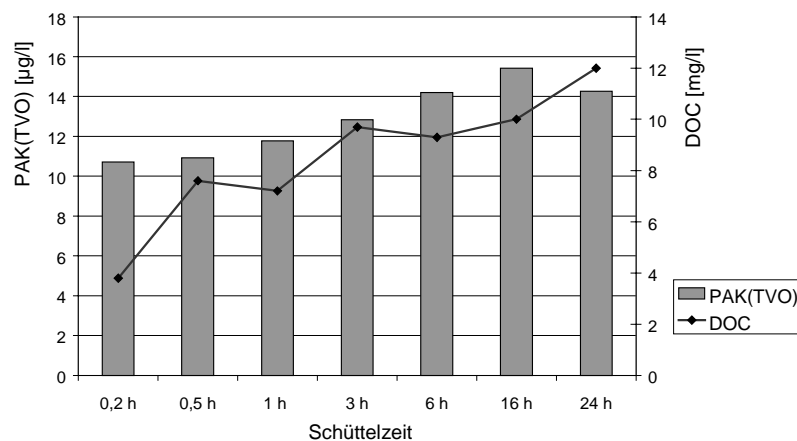


Abb. 6: Zeitabhängigkeit der Gleichgewichtseinstellung – Boden: EPAK 3

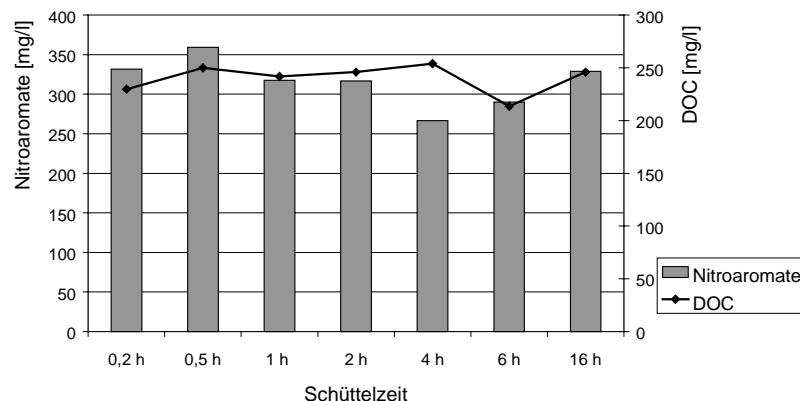


Abb. 7: Zeitabhängigkeit der Gleichgewichtseinstellung – Boden: HTNT 1

4.4 Einfluss des Eluenten und einer mehrfachen Elution auf die Schadstoffgehalte im Eluat

Unter der Prämisse, dass

- die Schadstoffkonzentration im Sickerwasser möglichst realitätsnah abgebildet werden soll und
- die Eluate für chemische und ökotoxikologische Analytik gleichermaßen geeignet sein sollen

verbietet sich der Einsatz von Nährsalzen wie NH_4NO_3 . Des Weiteren erhöhen zwar DOM (dissolved organic matter) die Löslichkeit und somit die Konzentration im Eluat insbesondere von schwerlöslichen Schadstoffen wie B(a)P, können jedoch deren Bioverfügbarkeit verringern (siehe Kap. 4.10). Darüberhinaus wird bei der biologischen Bodensanierung mit Zuschlagstoffen gearbeitet, die zum Teil zu so hohen DOC-Konzentrationen in den Eluaten führen, die bereits die biologischen Tests beeinträchtigen.

Der Einsatz von Lösungsvermittlern – gleichgültig ob DOM, Detergentien oder wassermischbare Lösungsmittel – führt immer zu einer Veränderung der Bodenmatrix. Dies ist offensichtlich für Detergentien und Lösungsmittel, die zum einen an die Bodenmatrix sorbieren und zum anderen Bestandteile aus der Bodenmatrix herauslösen. Eine Interpretation der mit diesen Lösungsvermittlern erhaltenen Ergebnisse ist schwierig, da keine eindeutige Korrelation der Schadstoffkonzentration in dem Bodensättigungsextrakt mit der Konzentration in dem Eluat mit Lösungsvermittler hergestellt werden kann. Auch lösliche Huminstoffe in der Elutionslösung üben gleichzeitig zwei gegenläufige Effekte aus. Zum einen erhöht eine höhere DOM-Konzentration in der Elutionslösung die Löslichkeit schwerlöslicher Kontaminanten; zum anderen wird ein Teil des DOM an die Bodenmatrix gebunden, erhöht somit den Kohlenstoffgehalt des Bodens und seine Sorptionskapazität.

Der Einsatz von Neutralsalzen wie CaCl_2 ist prinzipiell möglich, wie Abbildung 8 verdeutlicht. Die Schadstoffgehalte im Eluat sind denen von Wasser vergleichbar. Sie liegen teilweise etwas unter den Werten von Wasser als Elutionsmittel, da CaCl_2 zur besseren Flockung und damit zu klareren Eluaten beiträgt. Da CaCl_2 jedoch die Bodenlösung manipuliert und die Einflüsse nur gering sind, sollte Wasser als Elutionsmittel bevorzugt werden, sofern aus wissenschaftlichem Interesse keine Mehrfachelution geplant ist.

Mehrfachelutionen können Anhaltspunkte dafür geben, wie sich die Quellstärke mit der Zeit verändern kann. Abbildung 8 zeigt z. B. dass die PAK-Konzentration bei der 6. Elution deutlich abnimmt. Ein weiterer wesentlicher Punkt wird aus der Abbildung 8 ersichtlich. Mit zunehmender Anzahl der Elutionsschritte wird bei der Verwendung von Wasser als Elutionsmittel der Boden entsalzt. Dies führt bereits beim dritten Elutionsschritt zur Verringerung der Aggregatstabilität und zu einer deutlich erhöhten Trübung der Eluate, so dass weitere Elutionsschritte nicht mehr durchführbar waren. Der Punkt der Entsalzung von Böden sollte auch bei Säulenversuchen, die über längere Zeiträume betrieben werden, beachtet werden. Für Nitroaromaten ergibt sich ein vergleichbares Bild. Da Nitroaromaten besser löslich sind, geht eine größere Schadstoffmenge in das Eluat, so dass bei wiederholter Elution die Schadstoffkonzentration im Boden abnimmt. Dies führt zu einer deutlichen Konzentrationsabnahme im Eluat bei wiederholter Elution (Abbildung 9).

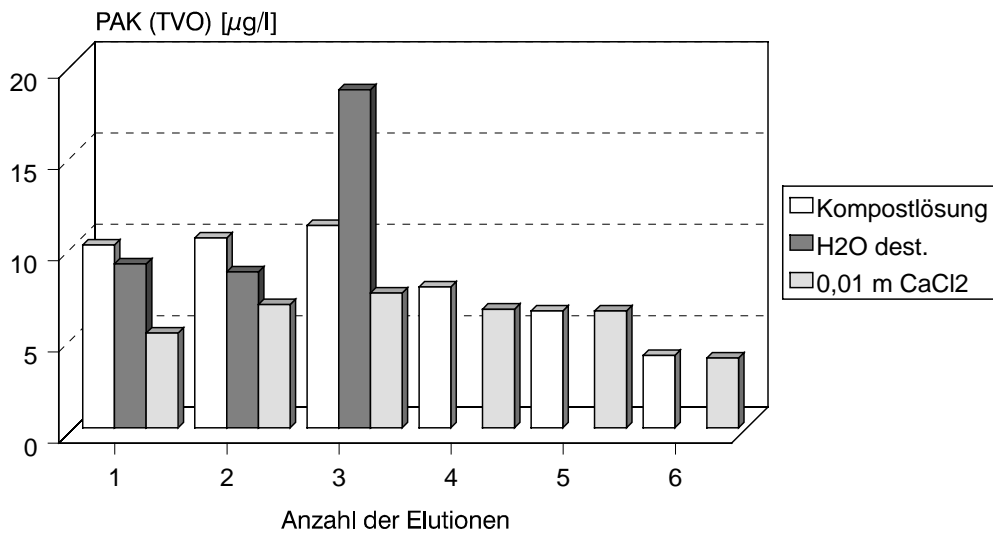


Abb. 8: Mehrfachelution – Boden: EPAK 3

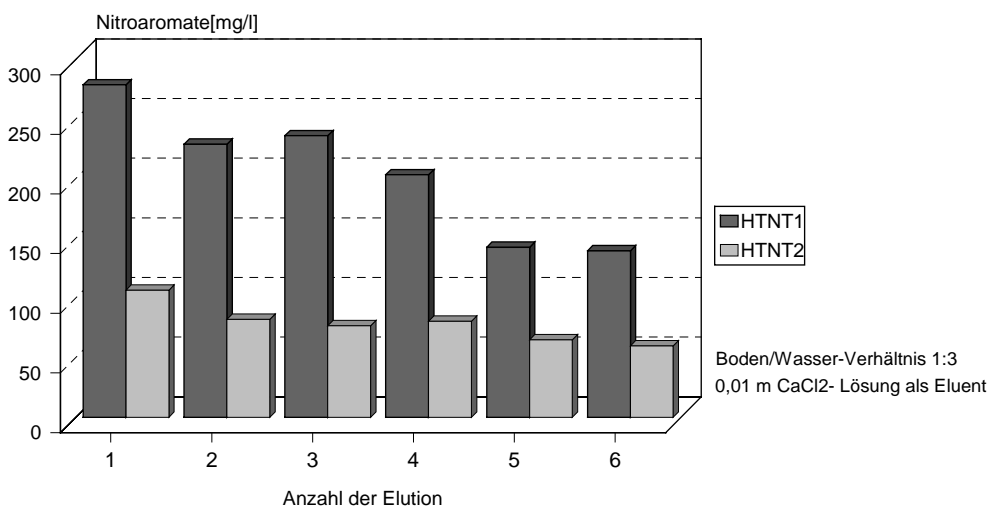


Abb. 9: Mehrfachelution – Boden/Wasser Verhältnis 1:3, 0,01 m CaCl₂-Lösung als Eluent

4.5 pH-Wert-Einstellung

Bei der biologischen Bodensanierung wird in der Regel ein pH-Wert um 7,0 eingestellt, um optimale Sanierungsraten zu erzielen. Bei der Wiederverwertung der Böden, z. B. als Lärmschutzwand, kann es relativ schnell zu einer Versauerung kommen. Dieser Versauerungsprozess ist mit der Veränderung einer Reihe von Bodeneigenschaften einschließlich der Veränderung des Humus verbunden, so dass eine definierte pH-Einstellung während der Elution diese Prozesse nicht vollständig abbilden kann, trotzdem können erste Hinweise auf eine verstärkte Mobilisierung von z. B. Schwermetallen und dissoziierende organische Schadstoffe erhalten werden. Technisch kann problemlos eine pH-Einstellung durch mehrmalige Säure- oder Laugenzugabe während der Elution realisiert werden.

4.6 Vergleich der Schüttelmethode mit Säulenversuchen

In der Bundes-Bodenschutzverordnung wird bei der Ermittlung einer möglichen Grundwasserkontamination durch organische Schadstoffe auf die Schüttelmethode nach DIN V 19736 "Ableitung von Konzentrationen organischer Schadstoffe im Bodenwasser" verwiesen. Daher wurden im Vorhaben vergleichend die Schüttelmethode und die Säulenmethode eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen (Abbildungen 10 - 12), dass bei sandigen Böden mit ausreichend hoher Porosität die Säulenmethode eingesetzt werden kann. Allerdings werden Versuchszeiten bis zu mehreren Tagen benötigt, um im Eluat ein Konzentrationsplateau zu erreichen. Grundsätzlich werden mit der Säulenmethode signifikant niedrigere Schadstoffkonzentrationen im Eluat als mit der Schüttelmethode oder mit der Bodensättigungsmethode erhalten (Tabelle 5). Im Allgemeinen wurde eine gute Parallelität zwischen Schadstoffkonzentration und DOC-Werten im Eluat beobachtet. Tabelle 6 fasst die Vor- und Nachteile von Säulenmethode und Schüttelmethode kurz zusammen. Aus der Zusammenstellung wird deutlich, dass für eine erste Beurteilung von Böden hinsichtlich ihrer Quellstärke und einer möglichen Gefährdung des Grundwassers die Schüttelmethode die schnellere und für die Bandbreite der Böden einsetzbare Methode darstellt.

Tab. 5: Vergleich verschiedener Methoden zur Eluatherstellung – Boden HTNT 2

Eluatherstellung	Fluoranthen [µg/l]	TNT [mg/l]
Schüttelversuch	2,8	92
Bodensättigungsextrakt	1,7	80
Säulenelution	0,9	55

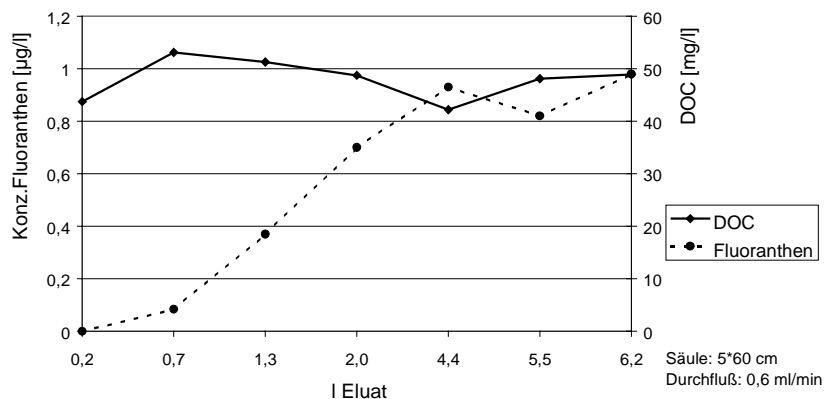


Abb. 10: Säulenelution – Boden: HTNT2

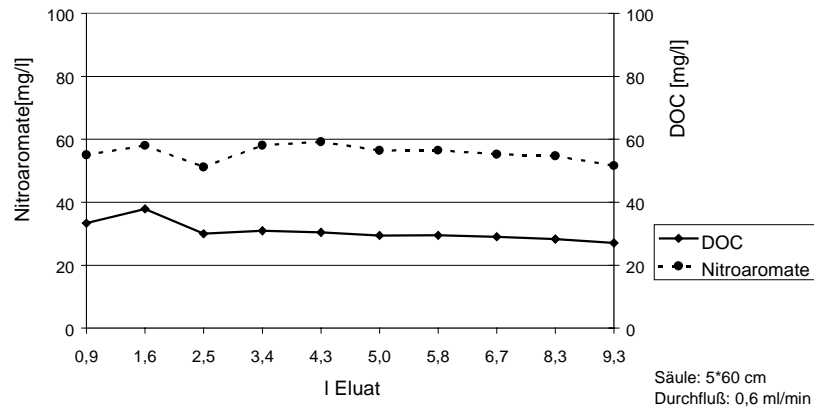


Abb. 11: Säulenelution – Boden HTNT2

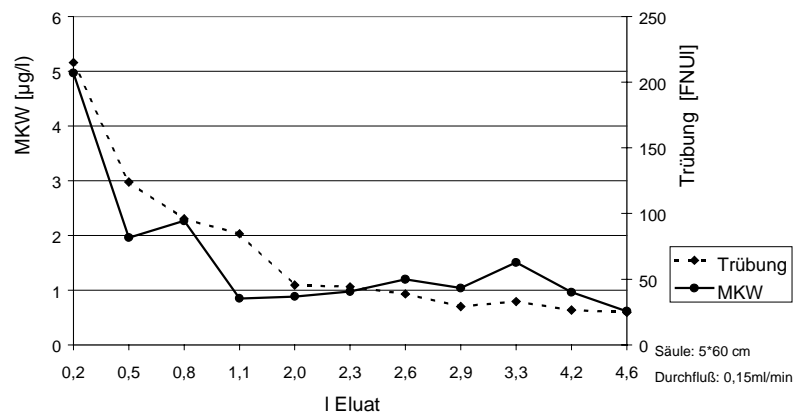


Abb. 12: Säulenelution – Boden: SPMKW1, vermischt mit Sand im Verhältnis 3:2

Tab. 6: Vergleich der Schüttel- und Säulenmethode zur Bestimmung der Quellstärke

Schüttelmethode	Säulenmethode
<ul style="list-style-type: none"> ▪ schnell und einfach durchzuführendes Verfahren ▪ ausreichende Eluatmengen für ökotoxikologische Tests ▪ teilweise Zerstörung der Bodenaggregate durch das Schütteln daher: ▪ Schadstoffkonzentrationen im Eluat liegen etwas oberhalb von denen des Bodensättigungsextraktes (konservative Abschätzung) ▪ In der Regel reichen einfache und schnelle clean-up Schritte (Laborzentrifuge und Filtration an Glasfasermikrofilter) ▪ Bei hohen Ton- und Humusgehalten muss bei höheren Geschwindigkeiten zentrifugiert und/oder eine Sandwichfiltration durchgeführt werden 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ dynamisches Verfahren ▪ in der Regel keine clean-up Schritte notwendig ▪ sofern nur eine Durchflussgeschwindigkeit gewählt wird, kann nicht entschieden werden, wie weit die Schadstoffkonzentration im Eluat vom Gleichgewicht entfernt ist daher: ▪ gemessene Konzentrationen im Eluat signifikant niedriger als im Bodensättigungsextrakt ▪ relativ lange Elutionszeiten ▪ ein inhomogener Wasserfluss durch Makroporen ist möglich, der zu niedrigen Eluatkonzentrationen führt ▪ die Methode ist nur für sandige Böden anwendbar, für die bei der Schüttelmethode in der Regel keine Probleme bei den clean-up Schritten auftreten ▪ vermischen von schluffigen oder humusreichen Böden mit Sand führt zu einer eindeutigen Veränderung des Ausgangsbodens

4.7 Geeignete Filtermaterialien

Ziel dieses Untersuchungsabschnittes war es, Filtermaterialien zu testen, um Filter zu finden, die sowohl für Metalle als auch für organische Schadstoffe geeignet sind. Dabei ist bekannt, dass organische Filtermaterialien Schadstoffe sorbieren können. Tabelle 7 zeigt Ergebnisse für PAK-kontaminierte Böden am Beispiel des Bodens EPAK 3b. Als Ausgangslösung wurde durch hochtourige Zentrifugation ein klares Bodeneluat sehr geringer Trübung hergestellt. Somit war sichergestellt, dass Substanzverluste nicht durch das Ausfiltrieren von Partikeln herrühren können. Die Tabelle zeigt das erwartete Bild und stimmt z. B. mit Ergebnissen der LfU-BW überein. Am besten geeignet sind Glaserfasermikrofilter. Diese zeichnen sich darüberhinaus durch eine geringe Verstopfungsneigung aus. Gefolgt werden die Glasfaserfilter von regenerierter Cellulose, die jedoch schon signifikante Sorptionseffekte zeigt. Organische Fasern wie Nylonfilter entfernen fast quantitativ die PAKs aus dem Eluat.

Nitroaromaten zeigen bedingt durch die bessere Wasserlöslichkeit keine so deutlichen Sorptionseffekte am Filtermaterial (Tabelle 8). Cellulose-Acetat erweist sich hier als ungeeignet.

Tab. 7: Sorption von PAK an Filtermaterialien – Boden: EPAK 3b

Probenvorbehandlung: Die Eluate wurden für 1 h bei 27.000 × g zentrifugiert.
Die Trübung betrug 1,3 FNU.

Filtermaterial	PAK-Konzentration im Eluat [µg/l]	Wiederfindung nach Filtration [%]
Eluat nach Zentrifugation	832	-
Glasfasermikrofilter 0,45 µm	674	81
Regenerierte Cellulose 0,45 µm	541	65
Cellulose-Acetat 0,45 µm	77	9
Cellulose-Nitrat 0,45 µm	121	14
Nylonfilter 0,45 µm	36	4
Polycarbonatfilter 0,40 µm	418	50
Polysulfonfilter 100.000 Dalton	16	2

Tab. 8: Sorption von TNT an Filtermaterialien – Boden: HTNT2

Probenvorbehandlung: Die Eluate wurden für 1 h bei 27.000 × g zentrifugiert.
Die Trübung betrug 3,8 FNU.

Filtermaterial	Nitroaromaten-Konzentration im Eluat [mg/l]	Wiederfindung nach Filtration [%]
Eluat nach Zentrifugation	793	-
Glasfasermikrofilter 0,45 µm	782	98,6
Regenerierte Cellulose 0,45 µm	765	96,5
Cellulose-Acetat 0,45 µm	182	23,0
Cellulose-Nitrat 0,45 µm	730	92,1
Nylonfilter 0,45 µm	709	89,4
Polycarbonatfilter 0,40 µm	765	96,5
Polysulfonfilter 100.000 Dalton	759	95,7

Die Überprüfung geeigneter clean-up Schritte für MKWs erwies sich als deutlich schwieriger. Beim Schütteln können sich Mikroemulsionen bilden, die über Zentrifugation nicht getrennt werden können. Falls die Emulsionen an den Filtermaterialien hängen bleiben, sollte die Filtration zu hohen MKW-Verlusten führen, wenn zuvor das Eluat "nur" zentrifugiert wurde. Dies wurde auch bei allen Filtermaterialien beobachtet. Die MKW-Konzentration im Eluat konnte somit nur mit den Konzentrationen im Säulenversuch verglichen werden, nachdem sich bei der Säulenelution ein Konzentrationsplateau eingestellt hatte. Dabei sollten jedoch die Erkenntnisse aus den PAK- und TNT-Versuchen mit einbezogen werden, die zeigen, dass die Konzentrationen im Säuleneluat deutlich unter denen des Bodensättigungsextraktes oder des Schüttelversuches liegen.

Tabelle 9 verdeutlicht am Beispiel des Bodens BMKW1a die einzelnen clean-up-Schritte. Die routinemäßige Zentrifugation mit der Laborzentrifuge führt zu recht hohen MKW-Gehalten. Deutlich ist ein Ankonzentrieren der suspendierten Tröpfchen im oberen Teil des Zentrifugenglases zu erkennen. Auch eine Zentrifugation bei hohen Umdrehungen und längerer Zeit - ein Zentrifugationsschritt, der bei allen Böden zu klaren Eluaten führte - verringert die MKW-Konzentration nicht signifikant. Die Kombination von Laborzentrifuge und Glasfasermikrofilter führt zu Konzentrationen, die um den Faktor 2 bis 3 über denen der Säulenversuche liegen und somit ein vergleichbares Bild zu PAK- und TNT-Schadensfällen zeigen.

Tab. 9: Aufarbeitung von MKW-Eluaten – Boden: BMKW 1a

Methoden	MKW-Konzentration [mg/l]
Laborzentrifuge 3.500 × g, 20 h	2,2 (oberes Drittel) 1,0 (unteres Drittel)
Sorvall 27.000 × g, 1 h	0,7
Laborzentrifuge + Glasfasermikrofilter	0,18
Sorvall + Glasfasermikrofilter	0,14
Säulenversuch	0,07

Tabelle 10 zeigt, dass bei anderen Böden analoge Ergebnisse erhalten wurden. Vergleicht man die gemessenen Trübungswerte, so wird deutlich, dass die einfachen clean-up-Schritte (Laborzentrifuge und Glasfasermikrofilter) zu geringeren Trübungen als bei den Säuleneluaten führten (siehe auch Kap. 4.5).

Da sich für organische Kontaminanten Glasfasermikrofilter als die am besten geeigneten Materialien herausgestellt hatten, wurde ihre Eignung für Metalle überprüft. Tabelle 11 verdeutlicht am Beispiel von Nickel und vier Böden, dass Glasfasermikrofilter auch für die Metallanalytik verwendet werden können.

Tab. 10: Aufarbeitung von MKW-Eluaten

Boden	Säulenversuch		Schüttelversuch	
	MKW [mg/l]	Trübung [FNU]	MKW [mg/l]	Trübung [FNU]
SPMKW 1	1,10	36	1,20	8
BMKW 1a	0,07	6	0,18	6
LMKW	0,02	7	0,04	2

Tab. 11: Einfluss der *clean-up* Schritte auf die Metallkonz. am Beispiel von Nickel

Boden	Methode		
	absetzen lassen, Druckfiltration (Cellulose-Nitrat) Ni [mg/l]	Laborzentrifuge, Druckfiltration (Cellulose-Nitrat) Ni [mg/l]	Laborzentrifuge, Glasfasermikrofilter Ni [mg/l]
EPAK 2a	0,51 schnelles Verstopfen des Filters	0,42	0,46
EPAK 2ak	schnelles Verstopfen des Filters	0,33	0,36
EPAK 3a	0,15	0,16	0,16
EPAK 3k	0,18	0,17	0,18

4.8 Einfluss der Trübung auf die Schadstoffgehalte im Eluat

Insbesondere schwerer lösliche Schadstoffe sind an den Partikeloberflächen sorbiert. Bei der Analyse des Eluats wird die gesamte Schadstoffkonzentration erfasst, also bei trüben Eluaten der gelöste, mobile Schadstoffanteil und die Anteile, die an Partikel im Eluat sorbiert waren. Dies wird besonders am Beispiel der beiden Böden deutlich, die fein suspendierte Partikel im Eluat enthielten, die die Filter zum Teil passierten. Das Ergebnis zeigt Tabelle 12. Deutlich wird auch, dass selbst bei diesen Böden über Zentrifugation und Filtration ausreichend klare Lösungen erhalten werden. Weitere Beispiele des Einflusses der Trübung auf die Schadstoffkonzentration im Eluat sind in Kap. 4.10 aufgeführt.

Tab. 12: Einfluss der Partikelabtrennung auf den Schadstoffgehalt im Eluat

Boden	Partikelabtrennung über	Trübung [FNU]	PAH (EPA) [$\mu\text{g/l}$]	PAH (TVO) [$\mu\text{g/l}$]
HTNT2	Zentrifugation ($2100 \times g$) und Filtration (Glasfasermikrofilter, $0,45 \mu\text{m}$)	230	945	444
	Zentrifugation ($27000 \times g$) und Filtration (Glasfasermikrofilter, $0,45 \mu\text{m}$)	5	44	13
SPAK 1a	Zentrifugation ($2100 \times g$) und Filtration (Glasfasermikrofilter, $0,45 \mu\text{m}$)	215	26172	4745
	Zentrifugation ($27000 \times g$) und Filtration (Glasfasermikrofilter, $0,45 \mu\text{m}$)	15	1130	159

4.9 Ankonzentrierung von Bodeneluaten für ökotoxikologische Tests

Um die Empfindlichkeit ökotoxikologischer Tests mit Bodeneluaten zu steigern wäre eine Ankonzentrierung der Eluate wünschenswert. Daher wurden die folgenden Methoden überprüft bzw. erprobt:

- Ankonzentrierung durch Gefriertrocknung
- Ankonzentrierung über Rotationsverdampfer
- Ankonzentrierung über flüssig/flüssig Verteilung
- Ankonzentrierung über Säulen mit verschiedenen Adsorptionsmaterialien
- Ankonzentrierung über Adsorbermaterialien im Batch-Verfahren.

Bodeneluaten enthalten neben den Kontaminanten größere Mengen an bodeneigenen Stoffen (z. B. DOM, Salze) und stellen somit labile Lösungen bzw. Mikrosuspensionen dar. Dementsprechend führen die ersten beiden Verfahren zu keinem Erfolg, da bei der Ankonzentrierung gelöste Bestandteile ausfallen bzw. nach Gefriertrocknung nicht wieder in Lösung gehen.

Eine Ankonzentrierung über die nächsten beiden Verfahren (flüssig/flüssig-Verteilung oder Säulen) hat den Nachteil, dass neben den organischen Schadstoffen wiederum größere Mengen z. B. an DOM mit in die organische Phase gehen, so dass Schad- und Begleitstoffe bei der Ankonzentrierung der organischen Phase ausfallen. Dieser Effekt ist stark von den jeweiligen Bodeneigenschaften abhängig und somit nicht standardisierbar.

Für biologische Tests, die hohe Konzentrationen an Lösungsmittel (z. B. DMSO) im Testansatz tolerieren wie z. B. Mutagenitätstests, ist eine Ankonzentrierung über Batch-Verfahren möglich, wie es von Ehrlichmann et al. (2000) veröffentlicht ist.

4.10 Einfluss von DOM auf die Verfügbarkeit von Schadstoffen im Eluat

Höhere Konzentrationen an DOM (dissolved organic matter) können bei Böden auftreten, die für die Sanierung mit größeren Mengen an organischen Zuschlagstoffen versetzt wurden. Eluate dieser Böden können DOC-Gehalte über 200 mg/l aufweisen. Von DOM-Konzentrationen ist bekannt, dass sie als kompetente Lösungsvermittler für schwerlösliche organische Schadstoffe wirken, also deren Konzentration in dem Eluat erhöhen. Durch die Bindung der Schadstoffe an DOM kann zum ändern deren Bioverfügbarkeit signifikant verringert werden. Um dies zu verdeutlichen, wurde das folgende Experiment durchgeführt.

Der Boden SPAK 1a wurde mit Wasser und mit einer DOM-Lösung mit DOC-Werten von 206 mg/l und 459 mg/l eluiert. Wie Tabelle 13 verdeutlicht steigt der PAK-Gehalt im Eluat von 3,1 mg/l bis auf 14,6 mg/l an. Da der Boden selbst Humus enthält wird DOM bei der Elution herausgelöst und man erhält im Eluat 1a einen DOC-Wert von 46 mg/l bodeneigener löslicher Huminstoffe. Mit den drei Eluaten wurden in zwei Versuchsreihen Daphnientests durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe wurde gemäß Testrichtlinie eine Konzentrationsreihe mit Verdünnungswasser hergestellt. Dies bedeutet, dass bei jeder Verdünnungsstufe nicht nur die PAK-Konzentration sondern auch die DOC-Konzentration abnahm. Das Ergebnis zeigt, dass das Eluat 3 mit der höchsten PAK-Konzentration auch die höchste Wirkung im Daphnientest zeigt und somit deutlich toxischer ist als Eluat 1a; d. h. weniger als 1 % des Ausgangseluates 3a reichen aus, um die Hälfte der Daphnien zu immobilisieren während von dem Eluat 1a 15,6 % der Ausgangslösung in der Testlösung nötig waren, um 50 % der Daphnien zu immobilisieren.

Tab. 13: Einfluss von DOM auf die Verfügbarkeit – Boden: SPAK 1a

Eluat	Extraktion	PAK-Gehalt [mg/l]	DOC-Gehalt im Eluat [mg/l]	Daphnientest [EC ₅₀]	DOC bei EC ₅₀ [mg/l]
Probenverdünnung mit Verdünnungswasser					
1a	Wasser	3,1	46	15,6	7
2a	DOM-Lösung DOC 206 mg/l	12,9	206	1,0	2
3a	DOM-Lösung DOC 459 mg/l	14,6	459	< 1,0	< 5
Probenverdünnung mit DOM-Lösung					
1b	Wasser	3,1	46	22,7	46
2b	DOM-Lösung DOC 206 mg/l	12,9	206	12,7	206
3b	DOM-Lösung DOC 459 mg/l	14,6	459	17,6	459

Im zweiten Versuchsansatz wurden nun die jeweiligen DOC-Konzentrationen bei den Verdünnungsschritten konstant gehalten; d. h. das Verdünnungswasser enthielt zusätzlich DOM. Die Ergebnisse zeigen keine deutlichen Unterschiede in den EC₅₀-Werten; d. h. Eluat 1 mit einem PAK-Gehalt von 3,1 mg/l zeigt eine vergleichbare Toxizität wie Eluat 3 mit einem PAK-Gehalt von 14,6 mg/l. Dieser Versuch belegt somit die komplexierende Wirkung von DOM verbunden mit einer signifikanten Reduktion der Bioverfügbarkeit der PAKs.

4.11 Einfluss der Trübung auf die Verfügbarkeit von Schadstoffen

Insbesondere schwer lösliche Schadstoffe sind an die Oberfläche von Partikeln gebunden. Je nach Intensität und Effektivität von clean-up-Schritten können somit deutlich unterschiedliche Konzentrationen in Bodeneluaten gemessen werden. Da insbesondere bei tonigen und humusreichen Böden eine Filtrierung der Eluate über Filter mit einer Porengröße < 0,45 µm teilweise zu einer Trübung > 10 FNU führen kann, sollte zur Qualitätskontrolle eine Trübungsmessung nach DIN EN 27027 obligatorisch sein. Um die Abhängigkeit der Schadstoffkonzentration im Eluat von der Trübung aufzuzeigen, wurden Eluate unterschiedlich hoch zentrifugiert. Die folgende Tabelle 14 belegt eindeutig, dass leicht ein Faktor von 10 in der Eluatkonzentration erhalten werden kann. Durch seine gute Wasserlöslichkeit verhält sich TNT und generell die Nitroaromaten problemlos, da die überwiegende Stoffmenge im Eluat gelöst und nicht an Partikel sorbiert vorliegt.

Mit diesen Eluaten wurden ökotoxikologische Tests durchgeführt um festzustellen, ob der an Partikel gebundene Schadstoffanteil signifikant weniger bioverfügbar ist als der gelöste Anteil. Wie die Ergebnisse der Tab. 14 verdeutlichen, zeigen sowohl die Ergebnisse mit Leucht-bakterien als auch mit Daphnien, dass die Trübung und somit die an Partikel gebundenen Schadstoffanteile wenig Einfluss auf das Testergebnis haben; d.h. bioverfügbar ist in den aquatischen Tests im Wesentlichen nur der gelöste Schadstoffanteil. Diese Ergebnisse haben uns veranlasst vorzuschlagen, dass für aquatische Tests mit Bodeneluaten eine höhere Trübung (Vorschlag ≤ 50 FNU) toleriert werden kann um für biologische Labors gegebenenfalls die Herstellung der Eluate und insbesondere die Trübungsmessung zu vereinfachen.

Tab. 14: Einfluss der Trübung auf Schadstoffkonzentration und Bioverfügbarkeit

a) Boden: SPAK 1b

Trübung [FNU]	PAK-Gehalt im Eluat [µg/l]	Leuchtbakterientest EC ₅₀ [%]
11	16,8	30,3
43	40,4	25,8
94	377,0	8,9

Tab. 14: (Fortsetzung)

b) Boden: EPAK 3a

Trübung [FNU]	PAK-Gehalt im Eluat [µg/l]	Leuchtbakterien G _L -Wert
< 0,5	6,7	12
10,1	13,3	8
31,4	25,9	8

c) Boden: CTNT 1a

Trübung [FNU]	TNT-Gehalt im Eluat [mg/l]	Leuchtbakterientest EC ₅₀ [%]	Daphnien EC ₅₀ [%]
1,8	57,3	1,0	26,7
9,6	56,7	0,9	25,0
32,9	62,4	1,2	28,4

d) Boden: BMKW 1a

Trübung [FNU]	MKW-Gehalt im Eluat [µg/l]	Leuchtbakterientest EC ₅₀ [%]
1,67	103	34,70
9,54	418	40,03
32,15	1479	47,15

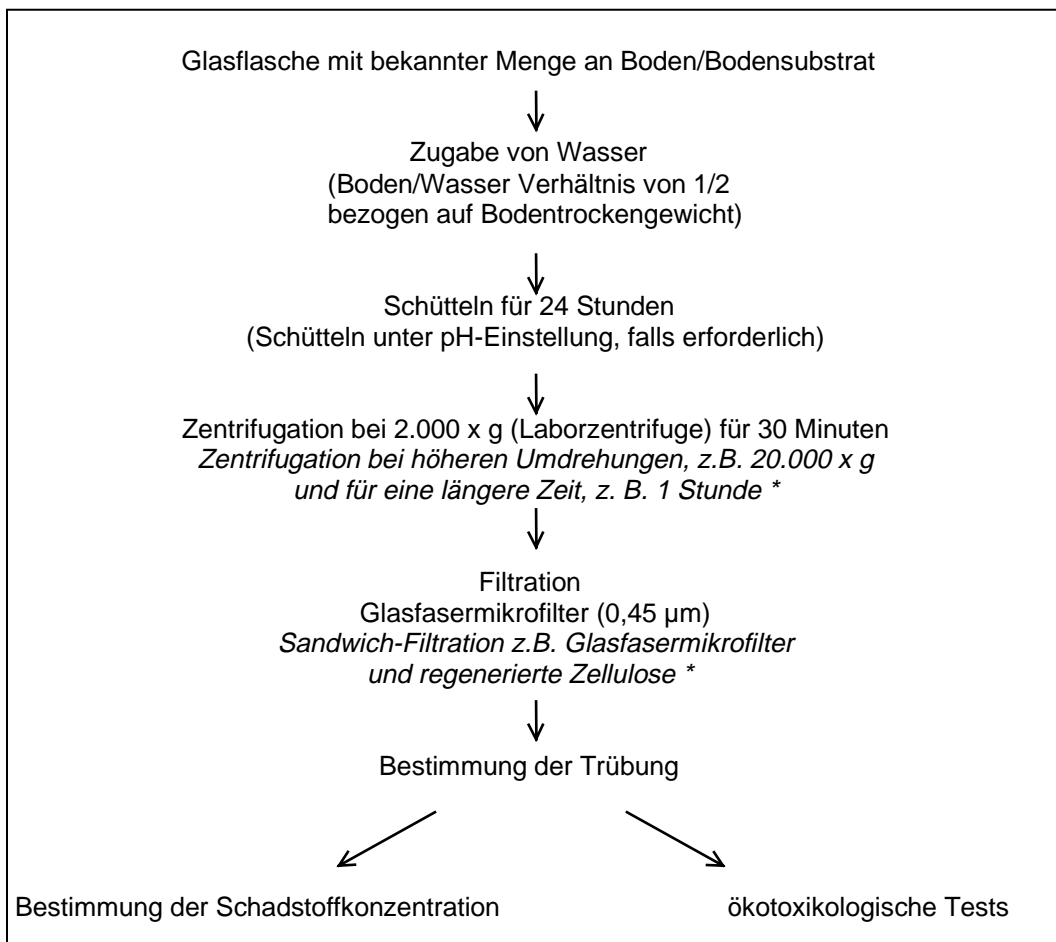
4.12 Methodenbeschreibung

Aufbauend auf den kurz beschriebenen Untersuchungen und Ergebnissen kann für die Herstellung von Bodeneluaten, die gleichermaßen für anorganische und organische Analytik als auch für ökotoxikologische Tests geeignet sind, eine einfache und schnell durchführbare Schüttelmethode vorgeschlagen werden.

Bodenmaterial wird bezogen auf Trockengewicht mit 2 Teilen Wasser versetzt und für 24 h vorzugsweise auf einem Überkopfschüttler bei Zimmertemperatur geschüttelt. Nur bei sehr humusreichen Materialien (z. B. zu Beginn einer biologischen Sanierung mit hohen Anteilen an organischen Zuschlagstoffen) kann es vorkommen, dass der Wasseranteil vergrößert werden muss, um ausreichende Eluatmengen zu erhalten. Nach dem Schütteln lässt man für 1 bis 3 Stunden absetzen, dekantiert den Überstand und zentrifugiert in der Laborzentrifuge (z. B. bei 2000×g für 30'). Danach wird der Überstand durch Glasfasermikrofilter (0,45 µm) gemessen.

In dem Filtrat wird die Trübung nach DIN EN 27027 bestimmt. Wie die Ergebnisse zur Bioverfügbarkeit von partikelgebundenen Schadstoffen im Eluat gezeigt haben, ist im Wesentlichen nur der gelöste Schadstoffanteil bioverfügbar. Daher erscheint es tolerierbar für die ökotoxikologischen Test eine Trübung bis zu 50 FNU zuzulassen. Für die chemische Analyse sollte die Trübung ≤ 10 FNU sein. Werden diese Werte durch Zentrifugation mit der Laborzentrifuge und Filtration an Glaserfasermikrofilter nicht erreicht, so empfiehlt sich eine Zentrifugation bei höheren g-Werten (z. B. Sorvall-Zentrifuge, $20.000 \times g$ für 1 h) und/oder eine Sandwichzentrifugation mit Glasfasermikrofilter und regenerierter Zellulose. Abbildung 13 zeigt das Ablaufschema.

Wie die Tabellen 15 und 16 zeigen, wurden bei der Eluatherstellung zufriedenstellende Standardabweichungen erhalten. Tabelle 17 zeigt des Weiteren, dass nur bei wenigen Böden die Routinemethodik nicht ausreicht, um ausreichend klare Eluate zu erhalten. Dies lässt sich durch den Einsatz eines Zentrifugationsschrittes mit höheren Umdrehungen beheben.



* mögliche Modifikation falls die Trübung zu hoch ist

Abb. 13: Methodenvorschlag

Tab. 15: Standardabweichung bei der Elution von PAK-kontaminierten Böden

PAK	Boden EPAK3		Boden EPAK3K	
	MW ¹ [µg/l] n = 6	Std.-Abw. ² [µg/l]	MW ¹ [µg/l] n = 6	Std.-Abw. ² [µg/l]
Fluoranthen	9,73	± 0,76	3,85	± 0,37
Benzo(b)fluoranthen	0,50	± 0,21	0,43	± 0,03
Benzo(k)fluoranthen	0,14	± 0,07	0,06	± 0,02
Benzo(a)pyren	0,31	± 0,14	0,14	± 0,07

¹ Mittelwert² Standardabweichung

Tab. 16: Standardabweichung bei der Elution von Rüstungsalzlasten

Nitroaromaten	Boden HTNT1	
	Mittelwert [mg/l] n = 6	Standardabweichung [mg/l]
1,3,5-Trinitrobenzol	4,2	± 0,3
1,2-Dinitrobenzol	8,3	± 0,5
1,3-Dinitrobenzol	102,1	± 5,4
1,3,5-Dinitrotoluol	68,8	± 3,6
2,6-Dinitrotoluol	42,6	± 2,5
2,4-Dinitrotoluol	110,1	± 6,3
2-Nitrotoluol	0,7	± 0,1
DOC	270	± 16

Tab. 17: Erfahrungen bei der Eluatherstellung

Boden	clean-up Schritt		Trübung [FNU]
	Laborzentrifuge und Glaserfasermikrofilter	Sorvallzentrifuge (27.000 × g, 1 h) und Glasfasermikrofilter	
EPAK 1a	•		2
EPAK 1b	•		3
EPAK 2a	•	•	23 9
EPAK 2b	•		9
EPAK 3	•		< 1
EPAK 3k	•		5
EPAK 3b	•		< 1
EPAK 3bk	•		6
EPAK 4	•		< 1
CWPAK	•		< 1
SPAK 1a	•	•	215 5
HTNT 1	•		10
HTNT 2	•	•	230 15
SPMKW 1	•		8
BMKW 1a	•		6
LMKW	•		2
LTNT 1c	•		3

5 Schlussfolgerungen

Aufgrund der Ergebnisse lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Die mobile Schadstoffkonzentration im Bodenwasser lässt sich relativ schnell und einfach mit der erarbeiteten Schüttelmethode erfassen.

- Die Abtrennung von Bodenpartikeln über Zentrifugation und Glasfasermikrofilter bzw. Sandwichfiltration führte bei allen untersuchten Proben zu ausreichend klaren Bodeneluaten.
- Die beschriebene Elutionsmethode ist für Böden und Bodensubstrate unterschiedlicher Eigenschaften einschließlich eines hohen Schluff- und Tonanteils sowie höherer Humusanteile einsetzbar.
- Eine Kontrolle der Trübung im Eluat ist essentiell, da Analysenergebnisse stark von der Trübung abhängen.
- Die Methode erlaubt Eluate herzustellen, die gleichzeitig zur Bestimmung von Metallen, organischen Schadstoffen und für ökotoxikologische Tests genutzt werden können.
- Ökotoxikologische Tests ergänzen die auf definierte Schadstoffe ausgerichtete chemische Analyse durch die Erfassung des Ökotoxizitätspotentials als Summenparameter.

6 Ausblick

Die vorgeschlagene Methode wird derzeit im Zusammenhang mit der Testung von Bodeneluaten mit ökotoxikologischen Tests einem ersten Ringtest unterzogen. In weiteren Untersuchungen sollte abgeklärt werden, ob

- die Elution bei definierten pH-Werten zu Ergebnissen führt, die eine Vorhersage mobiler Schadstoffanteile nach der Verwertung der Bodenmaterialien ermöglicht.
- die Methode auch für andere Materialien, die auf Böden eingebracht werden sollen, problemlos einsetzbar ist
- die längerfristige Elution von organischen Schadstoffen sich aus dem Gesamtgehalt und der aktuellen Konzentration im Eluat abschätzen lässt.

Die im Rahmen des Vorhabens erarbeitete Methode wird zur Normung vorgeschlagen, ihre Grenzen und Einsatzmöglichkeiten sollten jedoch weiter abgeklärt werden.

7 Eigene Veröffentlichungen und Diplomarbeiten

Diplomarbeiten

Bianca Schneider (1998): Ankonzentrierung von Bodeneluaten und Beeinflussung der Bioverfügbarkeit von Schadstoffen durch DOM, Fachhochschule Osnabrück.

Petra Schmidt (1999): Einfluss der Trübung wässriger Bodeneluate auf ökotoxikologische Testsysteme, Fachhochschule Bingen

Veröffentlichungen

Kördel, W. und K. Hund (1998): Soil extraction methods for the assessment of the ecotoxicological risk of soils. Conference proceedings, Con Soil 98, S. 241-250.

Kördel, W. und K. Hund (1999): Ziele und Bewertung biologischer Sanierungsverfahren – Gefahrenpotentiale und Bewertung umweltrelevanter Schadstoffe in Biotechnologie im Umweltschutz, Heiden/Erb/ Warrelmann/Dierstein (Hrsg.), Erich Schmidt Verlag.

Kördel, W., K. Hund und W. Klein (1999): Erfassung und Bewertung von Mobilität und Bioverfügbarkeit bei der Beurteilung kontaminierter und gereinigter Böden in: Innovative Techniken der Bodensanierung, Stefanie Heiden (Hrsg.). Spektrum Akademischer Verlag.

8 Literaturverzeichnis

1. **Blankenhorn, J.** (1994): Derzeitige Anwendung und Entwicklung von Eluationsverfahren. Texte und Berichte zur Altlastenbearbeitung. LFU-Baden-Württemberg.
2. **Ehrlichmann, H., W. Dott, A. Eisenträger** (2000): Assessment of the water extractable genotoxic potential of contaminated soil samples, EEC in press.
3. **Förstner, U.** (1999): Neues Bodenschutzrecht – Herausforderung an die Wasserchemie . Nachr. Chem. Tech. Lab. 47 Nr. 10.
4. **Kerndorff, H., R. Schleyer und U. Müller-Wegener** (1998): Beeinflussungen, Schäden und Gefahren für das Grundwasser und seine Nutzung durch Altlasten. Altlastenspektrum 1/98, 27-36.
5. **LABO – Bund/Länderarbeitsgemeinschaft Bodenschutz (Hrsg.)** (1995): Anforderungen an die Verwertung von kultivierbarem Bodenmaterial Technische Regeln (Entwurf, Stand: August 1995).
6. **LAGA – Länderarbeitsgemeinschaft Abfall.** (1995): Anforderungen an die stoffliche Verwertung von mineralischen Reststoffen/Abfall. Technische Regeln.
7. **LAWA – Länderarbeitsgemeinschaft Wasser,** ad-hoc-AK „Prüfwerte“ (1998): Geringfügigkeitsschwellen (Prüfwerte) zur Beurteilung von Grundwasserschäden und ihre Begründung.
8. **LAWA – Länderarbeitsgemeinschaft Wasser** (1999): Grundsätze des Grundwasserschutzes bei der Abfallverwertung und Produkteinsatz, Stand Januar 1999.
9. **Pfeifer, R., M Odensaß und S. Schroers** (1999): Abschätzung des Stoffeintrages in das Grundwasser nach Bodenschutz- und Altlastenverordnung – Ergebnisse von Säulenversuchen und anderen Verfahren. Altlastenspektrum 3/99, 144-154.
10. **Utermann, J., H.-E. Gäbler, R. Hindel, J. Kues, J. Mederer und E. Pulquet** (1998): Schwermetallgehalte im Bodenwasser – Ein Vergleich von drei Extraktionsverfahren. Z. angew. Geol. 44, 24-29.
11. **v. d. Sloot** (1997): Harmonization of leaching / extraction tests. H.A. van der Sloot et al.: in Studies in environmental science, Volume 70, Elsevier Science Amsterdam.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.3 Verbundvorhaben 4: Ökotoxikologische Testbatterien

9.3.5 Bodenextraktionsverfahren zur Bewertung des ökotoxikologischen Potentials von Böden

Teil B: Validierung des Testes mit *Eisenia fetida* (TV 4.4)

Dr. Kerstin Hund-Rinke

Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie
Postfach 1260
57377 Schmallenberg

Förderkennzeichen: 1491058

Laufzeit: 01.10.1996 – 31.08.1999

1 Zusammenfassung und Zielsetzung

Während aquatische Testverfahren Informationen über die Rückhaltefunktion von Böden bzw. die potentielle Verlagerung von Schadstoffen in das Grundwasser liefern, dienen terrestrische Verfahren zur Erfassung der Lebensraumfunktion von Böden.

Aus der Chemikalienprüfung steht als standardisiertes Testsystem u.a. der Mortalitäts- sowie der Reproduktionstest mit *Eisenia fetida* (Kompostwurm) zur Verfügung. Im Rahmen des Verbundes wird in diesem Projekt die Eignung des Regenwurmtests für die Beurteilung von kontaminierten bzw. behandelten Böden und Substraten näher untersucht. Dabei sind folgende Fragestellungen zu beantworten:

1. Kann der Kompostwurm *Eisenia fetida* generell als Testorganismus eingesetzt werden oder ergeben sich Einschränkungen im Hinblick auf chemisch-physikalische Bodeneigenschaften?
2. Ist die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse gegeben?
3. Ist ein Kontrollboden notwendig? Wenn ja, welche Empfehlung kann ausgesprochen werden?
4. Wie ist die Sensitivität des Reproduktionstestes im Vergleich zum Akut-Test?
5. Welche Schwellenwerte werden im Hinblick auf die Mortalität im Akut-Test und hinsichtlich der Reproduktionsrate im Repro-Test zur Beurteilung der Lebensraumfunktion vorgeschlagen?
6. Bieten Verdünnungsreihen des zu beurteilenden Bodens mit einem unbelasteten Boden für die Bodenbeurteilung einen Vorteil?

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

Zur Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden für Tiere steht u.a. als standardisiertes Testsystem aus der Chemikalienprüfung der Test mit dem Kompostwurm *Eisenia fetida* zur Verfügung. Der Testorganismus gehört zur Familie der Regenwürmer, so daß der Test häufig als Regenwurmtest bezeichnet wird. Dieser Test kann sowohl als Akut-Test (Untersuchungsparameter: Mortalität; ISO 11268-1 [4]) als auch als Repro-Test (Untersuchungsparameter: Mortalität der adulten Würmer, Abundanz der Jungtiere; ISO 11268-2 [6]) durchgeführt werden. Da die Untersuchungsdauer im Repro-Test deutlich länger (56 d) als im Akut-Test (14 d) und auch der Arbeitsaufwand deutlich höher ist, wird in dem DECHEMA-Leitfaden "Biologische Testmethoden für Böden" [11] aus pragmatischen Gründen der Akut-Test empfohlen. Als Bewertungsmaßstab dient in diesem Fall eine Überlebensrate von mindestens 80 %. Dieser Wert sollte überschritten werden, wenn der Boden als Oberboden eingesetzt werden soll.

Auch in den kanadischen Empfehlungen zur Bodenbeurteilung wird der Regenwurm als geeigneter Testorganismus angesehen. Dabei wird in der Grundstufe der Akut-Test empfohlen. Eine erweiterte Testbatterie enthält den Reproduktionstest [8]. Keine Hinweise werden dabei im Hinblick auf die Ergebnisbewertung oder mögliche Einschränkungen gegeben.

3 Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden mit geschlechtsreifen *Eisenia fetida* (Akut-Test: 300 – 600 mg; Repro-Test: 250 – 600 mg) durchgeführt, wobei sich die Würmer pro Test um nicht mehr als 100 mg unterschieden und der Altersunterschied nicht mehr als 4 Wochen betrug.

Die Böden wurden auf 60 % der maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt und vor Testbeginn 24 h bei Raumtemperatur gelagert.

Die **Testdurchführung im Akut-Test** erfolgt nach ISO 11268-1 [4]. Der Prüfboden sowie alle Kontrollböden / Substrate wurden in Vierfach-Parallelen locker in die Testgefäße (2-l-Weckgläser, hohe Form) gefüllt (Inhalt mind. 500 g Trockenmasse).

Die **Testdurchführung im Repro-Test** erfolgte nach ISO 11268-2 [5]. Alle Ansätze wurden als Dreifach-Parallelen durchgeführt. Die Böden wurden bis zu einer Füllhöhe von 5 - 6 cm in Glasschalen (16 cm Ø) gefüllt und mit 50 g feuchtem Dung (ca. 10 g Trockengewicht) vermischt. Damit ergab sich eine Dungzugabe von 1 – 2 % bezogen auf Bodentrockenmasse. Zusätzlich wurden in jedem Behälter 5 g trockenes Futter auf die Bodenoberfläche gegeben und mit 5 - 6 ml Trinkwasser befeuchtet. (Nach der Richtlinie ISO 11268-2 [6], die im Juli 1998 erschienen ist, werden 1 % trockener Rinderdung bezogen auf Bodentrockenmasse zugesetzt, zusätzlich werden 5 g trockenes Futter auf die Oberfläche gegeben und angefeuchtet.) Nur bei dem Ansatz mit CTNT0 bzw. CTNT1 wurde feuchter Rinderdung entsprechend 50 g Trockenmasse zugesetzt. Bei Bedarf wurde wöchentlich mit angefeuchtetem Rinderdung (entsprechend 5 g trockenem Dung) gefüttert.

Für **Untersuchungen mit Verdünnungsreihen** wurde sowohl der zu testende Boden als auch der Verdünnungsboden (Regenwurmtestsubstrat, LUFA2.2 oder unkontaminierter Standortboden) auf 60 % Wassergehalt eingestellt und in einer dualen Verdünnungsreihe miteinander vermischt. Das weitere Vorgehen entsprach dem oben dargestellten.

Exemplarisch wurden Untersuchungen zum **Wassergehalt** durchgeführt. Hierfür wurden die Böden auf 40, 60 bzw. 100 % WHK_{max} eingestellt.

3.1 Böden

Für die Untersuchungen wurden die in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgeführten Böden verwendet. Mit allen Böden wurden sowohl der Akut- als auch der Repro-Test durchgeführt. Mit dem Boden SPAK1a sowie dem Boden CTNT1 wurden des weiteren Verdünnungsreihen angesetzt. Die Böden wurden hierfür sowohl mit LUFA 2.2 als auch mit dem künstlichen Regenwurmtestsubstrat (artificial soil gemäß ISO 11268-1, -2 [4; 6]) vermischt. Mit dem Boden CTNT1 wurde des weiteren eine Verdünnungsreihe mit CTNT0 durchgeführt.

Tab. 1: Chemisch-physikalische Eigenschaften der für die Validierung der Regenwurmtests verwendeten Böden

Boden ¹	pH	C _{org}	WHK _{max}	K _{CAL}	P _{CAL}	N _{min}	N _{tot}	Bodenart [%]		
	(CaCl ₂)	[%]	[%]	[mg /100 g]				T	U	S
OMKW 0	6,9	1,2	38	9,7	2,3	0,28	119	22	49	29
OMKW1a	6,7	0,9	28	9,5	1,0	0,38	70	6	37	57
OMKW1b	6,7	1,1	17	5,0	0,6	1,68	74	15	32	53
EPAK1a	7,6	0,4	19	27	1,1	0,11	18	10	84	6,2
EPAK1b	7,7	0,4	25	30	1,0	0,11	13	6	91	2,7
EPAK2a	7,6	0,2	18	14	0,55	0,09	20	6	65	27
EPAK2b	7,2	0,1	17	13	17	0,15	18	6	61	34
EPAK3a	7,5	0,5	22	44	0,4	0,50	60	11	78	11
EPAK3b	7,7	0,6	24	21	0,4	0,11	50	11	79	10
SPAK1a	6,3	0,76	13	110	4,5	0,49	28	7	17	76
CTNT0	3,3	5,3	90	6,0	0,7	1,6	458	28	61	11
CTNT02a	4,1	6,3	99	3,5	0,36	4,1	341	23	58	19
CTNT1	4,5	2,9	47	9,0	1,8	3,0	230	18	55	27
CTNT4a	6,7	5,6	54	12	1,2	6,8	321	16	45	39
CTNT4b	8,0	7,7	90	483	161	4,9	787	24	32	44
LMKW1³	7,5	1,1	41	-	-	6,2	-	(Sand) ²		
LUFA 2.2	5,6	2,5	45	19	0,9	0,13	206	7	16	77
RWTS	5,6	3,2	55	-	-	0,07	-	11	10	79
Ebbinghof	7,0	1,9	54	-	-	0,24	-	26	47	27

¹ **fett:** als unkontaminierte Böden von den jeweiligen Standorten zur Verfügung gestellte Kontrollböden;

kursiv: unbelastete Böden, die jeweils als Kontrollen in allen Untersuchungen eingesetzt wurden;

unterstrichen: unbelasteter landwirtschaftlicher Kontrollboden für eine Vergleichsuntersuchung.

² keine genaueren Angaben vorliegend

³ Daten von RWTH Aachen, IHU; Übrige Daten von TU Berlin, ILE

Tab. 2: Schadstoffgehalte in den für die Validierung der Regenwurmtests verwendeten Böden

Boden	Schwermetalle [mg/kg]						Organ. Schadstoffe [mg/kg]				
	Blei	Cadmium	Chrom	Kupfer	Nickel	Zink	EPA-PAK	TVO-PAK	PCB	2,4,6-TNT	MKW (DIN 38409/18)
OMKWO	228	<0,2	n.b.	56	20	168	2,1	1,1	0,008	n.b.	n. n.
OMKW1a	211	<0,2	n.b.	27	16	152	2,9	1,7	0,003	n.b.	1420
OMKW1b	108	<0,2	n.b.	34	35	45	1,8	0,9	<0,01	n.b.	353
EPAK 1a	23	<0,01	n.b.	11	n.b.	46	1,3	0,4	0,008	n.b.	n.b.
EPAK 1b	21	<0,01	n.b.	14	27	73	6,5	3,1	0,006	n.b.	n.b.
EPAK 2a	11	<0,01	n.b.	6,8	14	24	2,5	0,76	0,012	n.b.	287
EPAK 2b	14	<0,01	n.b.	6,8	13	20	2,0	0,83	0,002	n.b.	n.b.
EPAK 3a	25	<0,01	n.b.	8,8	23	83	294	180	0,03	n.b.	154
EPAK 3b	23	<0,01	n.b.	14	23	86	267	178	0,01	n.b.	n.b.
SPAK 1a	24	<0,2	885	4,4	7,2	44	1102	157	0,01	n.b.	218
CTNT 0	785	<0,2	27	31	19,6	136	1,2	0,7	0,005	0,1	n.n.
CTNT 02a	490	0,9	21	24	17	202	0,72	0,39	0,016	0,049	n.b.
CTNT 1a	254	0,8	19	102	29	875	18	7,4	0,01	1600	n.b.
CTNT 4a	1000	4,6	25	84	27	920	32	17	0,14	3100	n.b.
CTNT 4b	772	4,0	32	83	24	747	28	14	0,13	n.n.	n.b.
LMKW1 ¹	138	0,184	10	54	30	167	8,42	-	n.b.	n.b.	687 ²
LUFA 2.2	21	<0,01	n.b.	6,5	1,5	20	0,54	0,30	0,002	n.b.	n.b.
Ebbinghof	44	<0,5	60	28	43	139	0,5	0,02	n.b.	n.b.	n.n.

n.b.: nicht bestimmt; n.n.: nicht nachweisbar

¹ Daten von RWTH Aachen, IHU; übrige Daten von TU-Berlin, ILA

² VOC: (MHE mit GC-MS)

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Kontrollböden

Die als unkontaminierte Kontrollen vom Standort zur Verfügung gestellten Böden unterschieden sich teilweise deutlich in den chemisch-physikalischen Parametern von den entsprechenden Testböden (Tabelle 1; z.B.: CTNT0 / CTNT1: pH 3,3 / pH 4,5; EPAK1 / EPAK2: U / Su), was die Schwierigkeit zeigt, wirklich vergleichbare, unkontaminierte Kontrollen zur Verfügung zu haben.

4.2 Akut-Test

4.2.1 Mortalität

Nur in 4 der untersuchten Böden wurde eine deutliche Mortalität beobachtet (Tabelle 3: EPAK2a; SPAK1a, CTNT1, CTNT4a). Mit Ausnahme des Bodens EPAK2a, der vergleichsweise gering mit MKW belastet ist (287 mg/kg), weisen die Böden hohe Konzentrationen an Kontaminanten auf. Die Ursache für die hohe Mortalität in dem Boden EPAK2a kann nicht mit Sicherheit angegeben werden. Die Gesamtbelastung an MKW ist vergleichsweise niedrig, doch ist nichts über deren genaue Zusammensetzung bekannt. Die erfassten bodenchemischen und bodenphysikalischen Parameter scheiden als Ursache aus, da sie keinerlei Besonderheiten im Vergleich zu den anderen Böden, speziell aber auch zu EPAK2b, in dem keine Mortalität zu verzeichnen war, aufweisen.

Bei dem Testparameter "Mortalität" im Rahmen der Bodenbewertung scheint es sich um eine "alles oder nichts-Reaktion" zu handeln. So wird entweder eine hohe Mortalitätsrate (90 – 100 %) oder keine Mortalität (0 – 3 %) erhalten. Dies trifft auch auf die Testansätze mit Verdünnungsreihen zu (Tabelle 4). So ergibt sich beispielsweise bei dem Ansatz von 50 % CTNT1 und 50 % künstliches Regenwurmtestsubstrat eine Mortalität von 100 %, in der nächsten Verdünnungsstufe (25 % CTNT1; 75 % RWTS) von 0 %. Analoges gilt für die Mischung mit LUFA-Boden sowie in den Ansätzen mit SPAK1a.

Tab. 3: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse für die Böden ohne Verdünnungsreihen

Boden- bezeichnung	Boden- art	C _{org} [%]	Haupt- kontaminanten	Biomasseverlust [%]		Mortalität [%]		Nachkommenanzahl [%] bezogen auf	
				Akut	Repro ¹	Akut	Repro	RWTS	LUFA 2.2
LMKW1	Su	1,1	MKW / Pb, Zn	33 ± 6	-26 ± 30	0	17	44	31
EPAK1a	Ut2	0,4	–	8 ± 2	-35 ± 3	0	0	70	65
EPAK1b	Us	0,4	–	9 ± 4	-39 ± 7	0	0	76	72
EPAK2a	Us	0,2	MKW	76 ± 30	-14 ± 2	90	67	1	1
EPAK2b	Us	0,1	–	16 ± 2	-31 ± 1	0	0	6	6
EPAK3a	Ut2	0,5	PAK, MKW	29 ± 1	-41 ± 4	0	0	15	14
EPAK3b	Ut2	0,6	PAK	14 ± 3	-40 ± 7	0	0	61	58
SPAK1a	Sl2	0,8	PAK, Cr	–	–	100	100	0	0
CTNT0	Lu	5,3	Pb, Zn	20 ± 7	-80 ± 6	3	0	106	98
CTNT1	Lu	2,9	TNT, Pb, Zn	–	-49 ± 6	100	17	3	2
CTNT02a	Lu	6,3	Pb, Zn	8 ± 6	-100 ± 11	0	0	54	56
CTNT4a	Slu	5,6	TNT, Pb, Zn	–	–	100	100	0	0
CTNT4b	Ls2	7,7	Pb,Zn	-13 ± 4	-64 ± 1,3	0	0	11	10
OMKW0	Ls2	1,2	Pb, Zn	23 ± 4	-22 ± 3	3	0	21	21
OMKW1a	Su3	0,9	MKW, Pb, Zn	27 ± 2	-30 ± 7	3	3	68	68
OMKW1b	Sl4	1,1	MKW, Pb, Zn	22 ± 4	-22 ± 9	0	0	72	73

¹ negative Werte : Biomassezunahme

Tab. 4: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse für die Böden mit Verdünnungsreihen

Boden- bezeichnung	Mischung im Test	Haupt- kontaminanten	Biomasseverlust [%]		Mortalität [%]		Nachkommenanzahl [%] bezogen auf		
			Akut	Repro ¹	Akut	Repro	RWTS	LUFA2.2	CTNT 0
CTNT1	–	TNT, Pb, Zn	–	-49 ± 6	100	17	3	2	2
CTNT1 : RWTS	50 : 50	TNT, Pb, Zn	–	-69 ± 12	100	0	43	–	–
CTNT1 : RWTS	25 : 75	TNT, Pb, Zn	29 ± 3	-62 ± 13	0	0	86	–	–
CTNT1 : RWTS	12,5 : 87,5	TNT, Pb, Zn	20 ± 1	-72 ± 8	0	0	97	–	–
CTNT1 : LUFA	50 : 50	TNT, Pb, Zn	–	-54 ± 8	100	3	–	63	–
CTNT1 : LUFA	25 : 75	TNT, Pb, Zn	29 ± 4	-78 ± 8	0	0	–	111	–
CTNT1 : LUFA	12,5 : 87,5	TNT, Pb, Zn	20 ± 3	-71 ± 22	0	0	–	100	–
CTNT1 : CTNT0	50 : 50	TNT, Pb, Zn : Pb, Zn	–	-59 ± 4	100	0	–	–	61
CTNT1 : CTNT0	25 : 75	TNT, Pb, Zn : Pb, Zn	35 ± 3	-83 ± 10	0	0	–	–	82
CTNT1 : CTNT0	12,5 : 87,5	TNT, Pb, Zn : Pb, Zn	31 ± 5	-75 ± 6	0	0	–	–	68
SPAK1α	–	PAK, Cr	–	–	100	100	0	0	–
SPAK1α : RWTS	50 : 50	PAK, Cr	–	–	100	100	0	–	–
SPAK1α : RWTS	25 : 75	PAK, Cr	–	–	100	100	0	–	–
SPAK1α : RWTS	12,5 : 87,5	PAK, Cr	–	70 ± 52	100	87	6	–	–
SPAK1α : LUFA	50 : 50	PAK, Cr	–	–	100	100	–	0	–
SPAK1α : LUFA	25 : 75	PAK, Cr	37 ± 11	-41 ± 4	17	0	–	69	–
SPAK1α : LUFA	12,5 : 87,5	PAK, Cr	11 ± 3	-42 ± 1	0	0	–	105	–

¹ negative Werte : Biomassezunahme

Tab. 5: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse in den Kontrollen der einzelnen Versuchsansätze

Boden- bez.	Boden- art	C _{org} [%]	Biomasseverlust		Mortalität [%]		Nachkommenanzahl pro Testgefäß	
			Akut ¹	Repro ¹	Akut	Repro	Mittelwert	Stabw
Versuch I (EPAK)								
RWTS	Sl3	3,2	0 ± 4	-56 ± 3	0	0	126	18
LUFA 2.2	Sl2	2,3	-14 ± 2	-63 ± 5	0	0	133	38
EPAK1a	Ut2	0,4	8 ± 2	-34 ± 3	0	0	87	11
EPAK1b	Us	0,4	9 ± 4	-39 ± 6	0	0	96	10
Versuch II (CTNT)								
RWTS	Sl3	3,2	14 ± 3	-65 ± 11	0	0	400	30
LUFA 2.2	Sl2	2,3	-4 ± 2	-64 ± 2	0	0	435	67
CTNT0	Lu	5,3	20 ± 7	-80 ± 6	3	0	426	16
Versuch III (LMKW1)								
RWTS	Sl3	3,2	5 ± 6	-70 ± 8	0	0	322	59
LUFA 2.2	Sl2	2,3	-3 ± 2	-63 ± 24	0	0	461	114
Versuch IV (SPAK)								
RWTS	Sl3	3,2	5 ± 1	-41 ± 12	0	0	217	23
LUFA 2.2	Sl2	2,3	-5 ± 1	-44 ± 11	0	0	188	37
Versuch V (OMKW)								
RWTS	Sl3	3,2	9 ± 5	-41 ± 13	0	0	184	39
LUFA 2.2	Sl2	2,3	10 ± 2	-35 ± 1	0	0	182	13
OMKW0	Ls2	1,2	23 ± 4	-22 ± 3	0	0	39	10
Versuch VI (CTNT)								
RWTS	Sl3	3,2	2 ± 2	-94 ± 11	0	0	127	19
LUFA 2.2	Sl2	2,3	-6 ± 3	-97 ± 7	0	0	124	22
CTNT02a	Lu	6,3	8 ± 6	-100 ± 11	0	0	69	24

¹ negative Werte: Biomassezunahme

Tab. 5: (Fortsetzung)

Boden- bez.	Boden- art	C _{org} [%]	Biomasseverlust		Mortalität [%]		Nachkommenanzahl pro Testgefäß	
			Akut ¹	Repro ¹	Akut	Repro	Mittelwert	Stabw
Versuch VII (Ebbinghof)								
RWTS	Sl3	3,2	–	-52 ± 3	–	0	199	33
LUFA 2.2	Sl2	2,3	–	-66 ± 8	–	0	254	45
Ebbinghof	Lt2	1,9	–	-51 ± 14	–	0	300	21
Versuch VIII (Böden mit versch. WHK)								
LUFA 2.2 (60% WHK)	Sl2	2,3	–	-100 ± 0	–	0	155	6
Ebbinghof (60% WHK)	Lt2	1,9	–	-74 ± 11	–	0	125	20
Versuch IX (CTNT 4b)								
RWTS	Sl3	3,2	19 ± 2	-36 ± 8	0	0	160	23
LUFA 2.2	Sl2	2,3	4 ± 2	-41 ± 11	0	0	165	27

¹ negative Werte: Biomassezunahme

4.2.2 Biomasseveränderung

Im Akut-Test wird kein Futter zugesetzt, so daß die Würmer während der 14-tägigen Inkubationszeit häufig an Gewicht verlieren (Tabelle 3, Tabelle 4, Tabelle 5). Der Biomasseverlust betrug in den Ansätzen, die nur kontaminierten Boden enthielten (keine Verdünnungsansätze), schwerpunktmäßig 33 % bis 8 %. Nur in dem Ansatz, in dem nur 10 % der Würmer überlebten, wiesen diese eine Gewichtsabnahme von 76 % (EPAK2a) auf. Der Boden CTNT4b führte – neben dem Kontrollboden LUFA 2.2 – als einziger zu einer Biomassezunahme von 13 %. Beim Boden CTNT4b handelt es sich um einen Boden nach der Sanierung, wobei das Sanierungsverfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß ein hoher Anteil an organischen Zuschlagsstoffen zugesetzt wird. Möglicherweise befinden sich noch Anteile in dem Boden, die für die Würmer eine gute Nahrungsquelle darstellen.

4.2.3 Toxizitätskriterium

In dem DECHEMA-Leitfaden "Biologische Testmethoden für Böden" [11] wird als Toxizitätskriterium eine Mortalitätsrate > 20 % angesetzt. In der vorliegenden Untersuchung erweist sich dieser Wert als akzeptabel.

4.3 Reproduktionstest

4.3.1 Mortalitätsrate

Als erster Toxizitätsindikator wird im Reproduktionstest die Mortalitätsrate nach 28 Tagen erfaßt (Tabelle 3, Tabelle 4, Tabelle 5). Mit Ausnahme des CTNT1-Bodens, bei dem im Reproduktionstest eine deutlich geringere Mortalität erzielt wurde als im Akut-Test, entsprechen sich die Werte ungefähr. Der Ansatz mit CTNT1 war der einzige, bei dem 250 g feuchter Rinderdung (entsprechend ca. 50 g Trockenmasse) zugesetzt wurde. Die geringe Mortalität kann zum einen auf einer geringeren Verfügbarkeit der Schadstoffe infolge einer stärkeren Sorption an die organische Matrix beruhen. Zum anderen können sich bei hohen Konzentrationen an Rinderdung Nester von organischer Substanz ergeben, die prinzipiell die Möglichkeit bieten, daß sich die Würmer aus toxischen Bodenbereichen zurückziehen können.

Da bei nicht zu reichlicher Fütterung (1 bis 2 % bezogen auf Trockengewicht zu Beginn des Tests) die Mortalitätsrate von Akut- und Repro-Test einander ungefähr entsprechen, kann somit bei der Durchführung des Repro-Testes auf den Akut-Test verzichtet werden.

4.3.2 Biomasseveränderung

Im Hinblick auf die Biomasseveränderung der Würmer (Tabelle 3, Tabelle 4, Tabelle 5) ist bei dem Reproduktionstest aufgrund der Futterzugabe generell eine Zunahme bei den überlebenden Wurmern zu verzeichnen. Dabei beträgt die Zunahme bei den unverdünnten Ansätzen (100 % Testboden) zwischen 14 und 100 %. Bei den Ansätzen mit Verdünnungsreihen ergibt sich eine Biomassezunahme von 41 bis 83 %. Nur bei dem Ansatz mit 12,5 % SPAK1a und 87,5 % Regenwurmtestsubstrat ist eine deutliche Biomasseabnahme bei den 13 % der verbliebenen Würmer zu verzeichnen. Wie aus Abb. 1 ersichtlich, scheint kein Zusammenhang zwischen Biomasseveränderung und Nachkommenanzahl zu bestehen. Daß es sich bei dem Gewicht um einen vergleichsweise insensitiven Parameter handelt, zeigten auch Kula und Larink [9].

Die Biomasseveränderung scheint somit als Toxizitätskriterium weniger geeignet zu sein.

4.3.3 Nachkommenanzahl: Kontrollböden

Im Hinblick auf die Anzahl an Nachkommen ist ersichtlich, daß unter den gewählten Bedingungen in den beiden Kontrollböden LUFA2.2 und RWTS mit Ausnahme der Versuchsansätze III und VII eine vergleichbare Nachkommenanzahl erhalten wurde (Abbildung 2, Tabelle 5). Die erhaltenen Unterschiede in den Versuchsansätzen III und VII erwiesen sich jedoch als nicht statistisch signifikant. Kula und Larink [9] beobachteten eine deutlich niedrigere Anzahl an Jungtieren in LUFA2.2 als im künstlichen Boden. So betrug die Kokon-Produktion im LUFA-Boden nur ca. 50 % derjenigen im künstlichen Substrat, auch war die Anzahl an unfruchtbaren Kokons im LUFA-Boden deutlich höher. Im Unterschied zu der vorliegenden Untersuchung wurde von Kula und Larink jedoch mit einem Wassergehalt von 50 % der maximalen Wasserhaltekapazität gearbeitet. Daß der Wassergehalt die Reproduktionsrate signifikant beeinflußt und der optimale Wassergehalt jeweils substratabhängig ist, ist vielfach beschrieben [2].

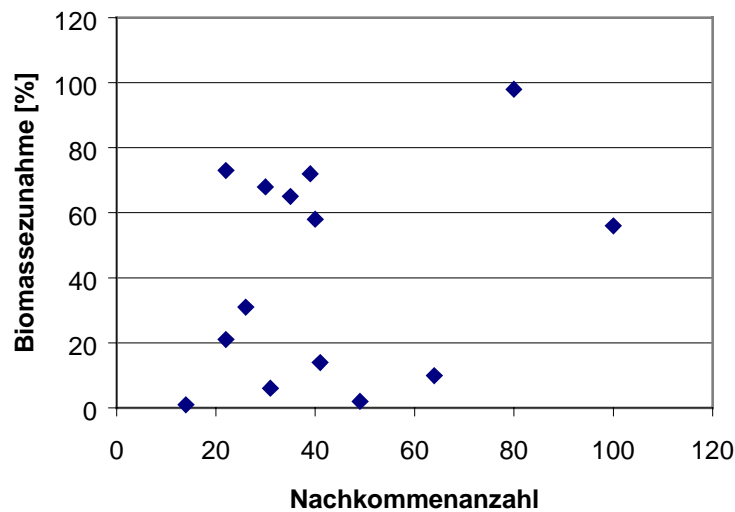


Abb. 1: Zusammenhang zwischen Biomassezunahme und Nachkommenanzahl im Repro-Test (Ergebnisse der Ansätze mit 100 % Testboden)

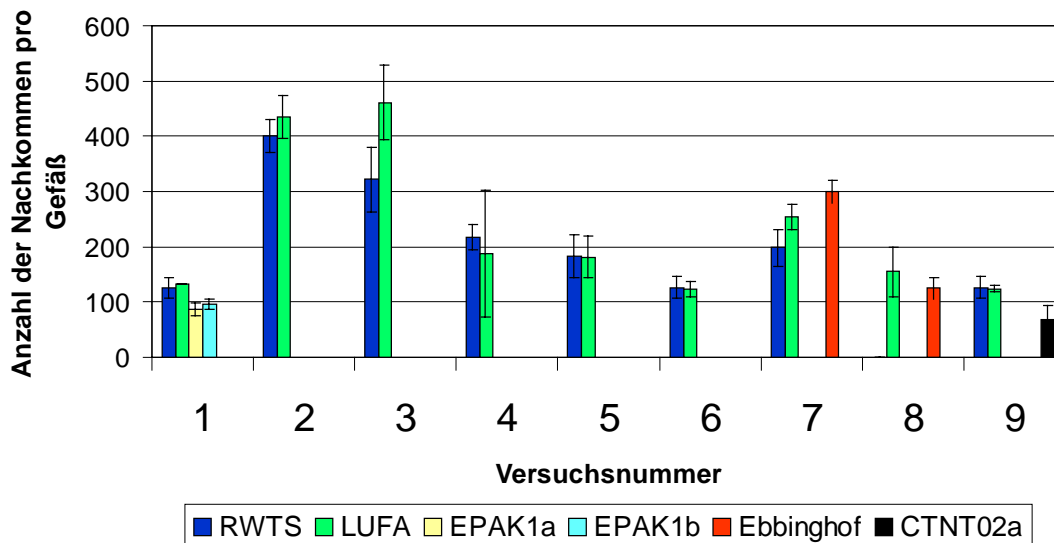


Abb. 2: Anzahl an Nachkommen in den Kontrollböden der verschiedenen Versuchsansätze (LUFA 2.2; künstliches Regenwurmtestsubstrat, Kontrollböden vom Standort)

Trotz hoher Standardisierung der Inkubationsbedingungen (Temperatur, Wassergehalt) variierte die Anzahl an Nachkommen bei den einzelnen Versuchen, was sich jedoch mit den Ergebnissen von Kula und Larink [9] deckt. Die hohe Anzahl an Jungtieren bei Versuch II ist möglicherweise auf den höheren Futtergehalt (50 g trockener Rinderdung statt 10 g) zurückzuführen. Doch auch bei Versuch III mit geringerer Fütterung ergibt sich eine ähnlich hohe Nachkommenanzahl. Bei den übrigen Versuchen mit gleichen Versuchsbedingungen schwankte die Nachkommenanzahl zwischen 120 und 220 Tieren pro Versuchsgefäß.

Aus diesen Resultaten kann somit gefolgert werden, daß trotz standardisierter Versuchsbedingungen (Temperatur, Wassergehalt, Futter) eine Variabilität in den Ergebnissen zu beobachten ist, so daß bei der Beurteilung von Böden immer ein Referenzansatz mitgeführt werden muß, auf den die Ergebnisse bezogen werden können.

4.3.4 Nachkommenanzahl: Einfluß verschiedener Bodeneigenschaften

Neben dem LUFA-Boden und dem künstlichen Regenwurmtestssubstrat wurden einige Kontrollböden von verschiedenen Standorten eingesetzt. Alle zur Verfügung stehenden Böden unterschieden sich in ihren chemisch-physikalischen Eigenschaften teilweise deutlich. So variierten die Bodenart, der pH-Wert sowie der C_{org} -Gehalt. Da die Böden sich immer in mehreren Eigenschaften unterschieden, ist eine Aussage über den Einfluß einzelner Parameter auf die Nachkommenanzahl nicht unproblematisch. Im folgenden soll auf die Parameter "pH", "organischer Kohlenstoff-Gehalt" und "Bodenart" ansatzweise näher eingegangen werden.

Im Reproduktionstest wird Rinderdung in einer Anfangskonzentration von 1 % zugesetzt und wöchentlich gefüttert. Es ist daher davon auszugehen, daß der originäre Gehalt an organischem Kohlenstoff im Testboden auf die Reproduktionsrate eher von untergeordnetem Einfluß sein sollte.

Sowohl der LUFA-Boden als auch das künstliche Substrat wiesen einen hohen Sandanteil auf. Exemplarisch wurde daher die Nachkommenanzahl in einem weiteren landwirtschaftlich genutzten Boden (Ebbinghof) untersucht, der als toniger Lehm klassifiziert wird. In dem ersten Ansatz (Versuch VII in Tabelle 5), in dem sowohl das künstliche Substrat, LUFA und Ebbinghof untersucht wurde, ergab sich zwischen allen drei Böden eine vergleichsweise große Streubreite. Auch LUFA und das Regenwurmtestssubstrat differierten um 28 %. Die Nachkommenanzahl in Ebbinghof überstieg die von LUFA um weitere 18 %. Im zweiten Ansatz (Versuch VIII in Tabelle 5) lag die Nachkommenanzahl 20 % unter derjenigen von LUFA.

Die pH-Werte in den Testansätzen sind in Tabelle 6 aufgeführt. Der niedrigste pH-Wert im Test ergab sich bei dem Ansatz mit CTNT0. Hier lag der pH-Wert über den gesamten Testzeitraum bei ca. 5,2. Bei diesem Ansatz wurde nahezu die gleiche Nachkommenanzahl erhalten wie bei LUFA und RWTS. Einschränkend muß jedoch aufgeführt werden, daß bei diesem Ansatz ein höherer Gehalt an Rinderdung zugegeben worden war als bei den Versuchsansätzen I und III bis IX. pH-Werte im Test bei ca. 8,4 ergaben sich bei den Böden EPAK1a und 1b. In den Testansätzen mit diesen Böden wurde eine Nachkommenanzahl von 65 – 76 % der Kontrolle ermittelt. Gleichzeitig besteht jedoch die Vermutung, daß auch die bindigere Bodenstruktur einen negativen Einfluß auf die Reproduktionsrate ausgeübt haben könnte, so daß diese nicht primär einen pH-Wert-Effekt darstellt. Danach ließe sich der Schluß zu, daß pH-Werte im Test von zumindest ca. 5,2 – 8,4 (bezogen auf H_2O) tolerierbar wären, was auf der Basis der zugrunde liegenden Böden pH-Werten im Boden von 3,3 bis 7,7 (bezogen auf $CaCl_2$) entspräche. Da bei dem Ansatz mit dem Boden CTNT0 ein erhöhter Gehalt an Rinderdung zugesetzt wurde, wodurch möglicherweise beeinträchtigende Effekte aufgrund des niedrigen pH-Wertes kompensiert wurden, erscheint eine geringere pH-Wertspanne (z.B. von ca. 4,5 – 7,7 bezogen auf $CaCl_2$) als Anhaltspunkt geeigneter zu sein. Daß ein Überleben der Würmer unterhalb von pH 5 nicht möglich ist [7], konnte bei der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden.

Deutlich niedrigere Nachkommenanzahlen als in den Kontrollansätzen ergaben sich bei den Böden CTNT02a (54 – 56 % der Kontrolle) und OMKW0 (21 % der Kontrolle). Beide Böden wiesen eine bindigere Struktur auf als der LUFA-Boden und das Regenwurmtestsubstrat und etwas höhere pH-Werte im Test (ca. 1 – 2 Einheiten; der pH von CTNT02a liegt zunächst im Bereich der Kontrollböden, steigt im Test jedoch im Gegensatz zu den übrigen Versuchen stark an). Ob dies jedoch die Ursache ist, kann nicht mit Sicherheit ausgesagt werden. Die Böden EPAK1a und 1b weisen ebenfalls eine bindigere Bodenstruktur auf, besitzen zusätzlich einen sehr geringen Gehalt an organischem Kohlenstoff (0,4 %) und im Test einen deutlich alkalischeren pH-Wert (ca. 8,4 im Vergleich zu 6,5 – 7,0) und führten nur zu einer um 24 – 35 % reduzierten Nachkommenanzahl im Vergleich zu LUFA und dem künstlichen Regenwurmsubstrat. Auffallend ist im Fall des MKW-Bodens auch, daß die Nachkommenanzahl deutlich niedriger liegt als in dem als kontaminiert eingestuften Boden des gleichen Standortes OMKW1a und dem Boden nach Sanierung MKW1b. Dies legt die Vermutung nahe, daß in dem Boden weitere für die Toxizität verantwortliche Stoffe vorliegen sollten.

Wie bereits erwähnt, werden mit EPAK1a und 1b geringfügig reduzierte Nachkommen erhalten. Dieser Wert deckt sich mit dem Ansatz VIII (Ebbinghof / LUFA). Möglicherweise ist die bindigere Bodenstruktur im Vergleich zu dem sandigeren LUFA und Regenwurmtestsubstrat hierfür verantwortlich.

Aufgrund der geringen Anzahl an Kontrollböden lassen sich Rückschlüsse auf den Einfluß der Bodenparameter pH-Wert, organischer Kohlenstoffgehalt und Bodenart nur ansatzweise ziehen: So scheinen bindigere Böden im Vergleich zu dem sandigen LUFA2 .2 und dem sandigen künstlichen Regenwurmtestsubstrat eher zu einer etwas niedrigeren Nachkommenanzahl zu führen. Aufgrund der Zugabe von Rinderdung im Reproduktionstest sollte der organische Kohlenstoffgehalt eher von untergeordneter Bedeutung sein. Geeignete pH-Werte von Testböden könnten zumindest im Bereich von ca. 4,5 – 7,7 (bezogen auf CaCl₂) liegen.

Tab. 6: pH-Werte [H₂O] in den Versuchsansätzen zum Repro-Test

Bodenbezeichnung	Tag 0 [pH]	Tag 56 [pH]
LMKW 1	7,3	7,3
RWTS	6,7	6,3
LUFA 2.2	6,3	6,2
EPAK1a	8,3	8,3
EPAK1b	8,5	8,4
EPAK2a	8,2	8,1
EPAK2b	8,3	7,9
EPAK3a	7,7	7,9
EPAK3b	8,1	8,0
RWTS	7,0	6,5
LUFA 2.2	6,5	6,6

Tab. 6: (Fortsetzung)

Bodenbezeichnung	Tag 0 [pH]	Tag 56 [pH]
CTNT02a	5,9	7,7
CTNT4a	7,6	4,9
RWTS	6,0	6,5
LUFA 2.2	6,3	6,4
CTNT4b	8,7	8,6
RWTS	6,2	5,6
LUFA 2.2	5,9	5,7
OMKW0	7,7	7,6
OMKW1a	7,2	7,4
OMKW1b	7,8	7,4
RWTS	5,6	5,4
LUFA 2.2	6,3	6,2
SPAK1a	8,1	8,0
SPAK1a : LUFA 50 : 50	7,4	7,6
SPAK1a : LUFA 25 : 75	7,2	7,4
SPAK1a : LUFA 12,5 : 87,5	6,6	6,4
SPAK1a : RWTS 50 : 50	6,3	6,2
SPAK1a : RWTS 25 : 75	5,8	6,0
SPAK1a : RWTS 12,5 : 87,5	5,6	5,9
RWTS	6,5	6,3
LUFA 2.2	6,6	6,4
CTNT0	5,3	5,0
CTNT1	6,2	5,9
CTNT1 : CTNT0 50 : 50	5,7	5,2
CTNT1 : CTNT0 25 : 75	5,5	4,9
CTNT1 : CTNT0 12,5 : 87,5	5,4	4,9
CTNT1 : RWTS 50 : 50	7,4	7,2
CTNT1 : RWTS 25 : 75	7,7	7,0
CTNT1 : RWTS 12,5 : 87,5	7,8	7,2
CTNT1 : LUFA 50 : 50	7,1	6,3
CTNT1 : LUFA 25 : 75	7,4	6,5
CTNT1 : LUFA 12,5 : 87,5	7,3	6,4
RWTS	7,9	7,3
LUFA 2.2	7,6	6,5

4.3.5 Nachkommenanzahl: kontaminierte Böden

Mit Ausnahme vom LMKW1 und OMKW1a war in den belasteten Böden, die ein Überleben der adulten Würmer ermöglichten (EPAK2a, EPAK3a, CTNT1, CTNT2a) eine Reduktion der Nachkommenanzahl von über 90 % (Bezugsgröße: LUFA 2.2; RWTS) zu verzeichnen (Tabelle 3). Diese Reduktion liegt damit deutlich über derjenigen der Kontrollböden von den Standorten. Nach erfolgter Sanierung werden die verschiedensten Ergebnisse erzielt. So ergab sich kaum eine Veränderung bei dem Boden EPAK2b im Vergleich zu EPAK2a. Ein Vergleich mit den chemischen Analysendaten legt nahe, daß die Konzentration der erfaßten Schadstoffe für diese Reaktion nicht verantwortlich sein kann. Die Nachkommenanzahl von EPAK3b liegt deutlich über der von EPAK3a. Ein Sanierungserfolg scheint gegeben zu sein. Im Vergleich zu LUFA und RWTS ist die Nachkommenanzahl jedoch in Abhängigkeit von der Bezugsgröße (LUFA oder RWTS) um 42 – 39 % reduziert. Möglicherweise spielt hier jedoch auch eine Rolle, daß es sich bei den EPAK um einen bindigeren Boden handelt. Wie es sich bereits bei der Untersuchung der Kontrollböden gezeigt hat, könnte in bindigerem Boden die Nachkommenanzahl etwas niedriger liegen als in sandigerem Boden. So lag die Nachkommenanzahl bei dem Boden EPAK1a und 1b auch um ca. 30 % unter LUFA und dem künstlichen Regenwurmtestsubstrat. Bei CTNT4b wiederum ergaben sich trotz vollständigem Rückgang des TNT-Gehaltes im Hinblick auf die Nachkommenanzahl kaum Unterschiede zum Boden vor der Sanierung. Hier könnte die Bodenstruktur jedoch das Ergebnis beeinflußt haben. So war der Boden fast betonartig, was die Entwicklung der Würmer behindert haben könnte.

Bei den Böden mit MKW-Belastung (LMKW und OMKW) war eine vergleichsweise geringe Reduktion der Nachkommenanzahl zu verzeichnen, die sich auch nach der Sanierung (OMKW1b) nicht signifikant veränderte. Auffallend ist dabei, daß die MKW-Belastung beispielsweise in LMKW1a deutlich über der von EPAK2a lag, in EPAK2a jedoch eine deutlich geringere Reproduktionsrate auftrat. Dies bestärkt die bereits oben erwähnte Vermutung, daß bei EPAK2a und auch 2b nicht die ermittelten chemischen Parameter für die Toxizität verantwortlich waren. Einschränkend muß jedoch dazu gesagt werden, daß es sich bei allen Schadstoffanalysen nur um Summenparameter handelt. Für eine detailliertere Interpretation der Ergebnisse wären differenziertere Analysen notwendig, die im Rahmen des Verbundvorhabens jedoch nicht durchgeführt wurden.

4.3.6 Wassergehalt

Der Wassergehalt übt einen Einfluß auf die Reproduktionsrate aus [2; 10], wobei der optimale Wassergehalt jeweils substratabhängig ist. Exemplarisch wurde der Einfluß des Wassergehaltes sowohl in einem bindigen als auch in einem sandigen Boden untersucht (Tabelle 7).

In der Testvorschrift zur Chemikalienprüfung wird eine Spanne von 40 - 60 % von WHK_{max} angegeben. Bei 40 % WHK_{max} wurden im Rahmen der exemplarischen Untersuchungen niedrigere Biomassezuwächse und Reproduktionsraten erzielt, so daß ein höherer Wassergehalt (z.B.: 60%) besser geeignet erscheint. Wassersättigung ist erneut zu vermeiden, was aufgrund der aeroben Lebensweise der Würmer zu erwarten war.

In weiterführenden Untersuchungen sollte der Einfluß des Wassergehaltes auf die Reproduktionsrate in Abhängigkeit von der Bodenart näher untersucht werden. Des Weiteren sollte geprüft werden, ob eine Einstellung des Wassergehaltes über pF-Werte, die auch für

andere biologische Untersuchungen diskutiert wird, nicht besser geeignet ist als die Einstellung über die Wasserhaltekapazität.

Tab. 7: Einfluß des Wassergehaltes auf die Ergebnisse im Repro-Test mit unbelasteten Böden

Boden- bezeichnung	WHK _{max} [%]	Mortalität der Adulten nach 28 d [%]	Biomasseverlust nach 28 d ¹ [%]	Nachkommen- anzahl [%]
Ebbinghof	40	6,7	-20 ± 28	1 ± 1,7
	60	0	-74 ± 11	125 ± 20,2
	100	66,7	-60 ± 69	0 ± 0
LUFA 2.2	40	0	-56 ± 5	51 ± 8,6
	60	0	-100 ± 0	155 ± 5,6
	100	100	–	–

¹ negative Werte: Biomassezunahme

4.3.7 Toxizitätskriterium: Nachkommenanzahl

Ziel ökotoxikologischer Tests soll sein, nur Böden oder Substrate zuzulassen, die eine ausreichende Lebensraumfunktion für Bodenorganismen ermöglichen. Gemäß BbodSchG sind schädliche Bodenveränderungen zu vermeiden. Einschränkungen können sowohl durch organische Schadstoffe und Schwermetalle, aber auch durch ungünstige Bodenstruktur oder beispielsweise hohe Salzgehalte auftreten. Bei der Ergebnisinterpretation sollte bei einer eingeschränkten Lebensraumfunktion die mögliche Ursache mitberücksichtigt werden, da davon weitergehende Maßnahmen im Hinblick auf eine Verbesserung abhängen. Es hat sich gezeigt, daß in Böden mit einem höheren Sandgehalt die Anzahl der Nachkommen etwas höher zu liegen scheint als in bindigeren Böden. Höhere Salzgehalte wirken sich ungünstig auf die Reproduktionsrate aus [3]. Bei der Ergebnisinterpretation ist des weiteren zu berücksichtigen, daß die Reproduktionsrate deutlich durch den Wassergehalt beeinflusst wird, wobei der jeweils optimale Wassergehalt vom Substrat abhängig ist [2; 10]. Speziell dieser Sachverhalt bedeutet, daß entweder für jedes Substrat in Vorversuchen der jeweils optimale Wassergehalt zu ermitteln ist oder bei der Festlegung von Schwellenwerten zu berücksichtigen ist, daß möglicherweise geringere Reproduktionszahlen auch auf eine nicht optimale Versuchsführung zurückzuführen sind. Im Rahmen von Routineuntersuchungen spricht gegen die Ermittlung des optimalen Wassergehaltes für jedes Testsubstrat der hohe Zeitaufwand. So werden der Ergebnisse von Vorversuchen nach 8 Wochen (normale Versuchszeit) erhalten, die eigentlichen Untersuchungen dauern erneut 8 Wochen.

Prinzipiell sind drei Bewertungsansätze denkbar:

- I. Analog zum Akut-Test: Festlegung einer prozentualen Nachkommenanzahl im Vergleich zur Kontrolle, die überschritten werden muß, um die Lebensraumfunktion in dem Testboden als "gegeben" einzustufen.
- II. Auswertung analog der Beurteilung im Pflanzentest und in der mikrobiellen Nitrifikation (siehe Teilvorhaben 4.1, Kap. 9.3.1 des Leitfadens): Testung eines Referenzbodens, des Testbodens und einer 1:1-Mischung von beiden Böden. Die experimentell ermittelte Nachkommenanzahl in der 1:1-Mischung sollte mindestens die Höhe der rechnerisch ermittelten Nachkommenanzahl im Mischungsansatz (arithmetisches Mittel aus der Testung des Referenzbodens und des Testbodens) aufweisen.
- III. Statistische Signifikanz zu den Kontrollböden

Im folgenden wird auf die einzelnen Ansätze näher eingegangen.

I. Beurteilung auf der Basis einer mindestens zu erreichenden prozentualen Nachkommenanzahl

In Tabelle 8 ist die Beurteilung der Böden in Abhängigkeit von verschiedenen Toxizitätswerten (prozentuale Nachkommenanzahl im Vergleich zum Kontrollansatz) aufgeführt. Ein "+" bedeutet, daß die prozentuale Nachkommenanzahl über dem Wert lag und die Lebensraumfunktion des Bodens als "gegeben" eingestuft wird. Ein "-" deutet auf eine eingeschränkte Lebensraumfunktion hin. Die Werte beziehen sich auf das Regenwurmtestsubstrat als Kontrolle. Weichen die Werte bezogen auf LUFA2.2 ab, sind diese Ergebnisse in Klammern angegeben. CTNT0 wurde aufgrund der hohen Dung-Zugabe in die Auswertung nicht mit einbezogen.

Tab. 8: Beurteilung der Böden in Abhängigkeit vom Toxizitätswert

Boden	Toxizitätswert						
	20 %	30 %	40 %	50 %	60 %	70 %	80 %
LMKW1	+	+	+ (-) ¹	-	-	-	-
EPAK1a	+	+	+	+	+	+ (-)	-
EPAK1b	+	+	+	+	+	+	-
EPAK2a	-	-	-	-	-	-	-
EPAK2b	-	-	-	-	-	-	-
EPAK3a	-	-	-	-	-	-	-
EPAK3b	+	+	+	+	+ (-)	-	-
SPAK1a	-	-	-	-	-	-	-
CTNT1a	-	-	-	-	-	-	-
CTNT02a	+	+	+	+	-	-	-
CTNT4a	-	-	-	-	-	-	-
CTNT4b	-	-	-	-	-	-	-
OMKW0	+	-	-	-	-	-	-
OMKW1a	+	+	+	+	+	-	-
OMKW1b	+	+	+	+	+	+	-
Ebbinghof	+	+	+	+	+	+	+

+ = Boden klassifiziert als "Lebensraumfunktion gegeben"

- = Boden klassifiziert als "Lebensraumfunktion eingeschränkt"

¹ Werte in Klammern geben die Beurteilung auf der Basis der Daten, bezogen auf LUFA 2.2 an, wenn sie von der auf der Basis des künstlichen Regenwurmtestsubstrates abgeleiteten abweicht.

Bei der Bezugsgröße "Regenwurmtestsubstrat" bzw. LUFA 2.2 bietet sich als Toxizitätswert ein Wert von 50 % an. Dieser Wert ermöglicht, daß Böden, die aufgrund ihrer etwas bindigeren Struktur eine geringfügig reduzierte Nachkommenanzahl aufweisen, akzeptiert würden (in der vorliegenden Untersuchung: EPAK1a und EPAK1b). Zum anderen werden jedoch Böden als auffällig klassifiziert, die aufgrund der vorliegenden chemischen Daten eine Einschränkung der Lebensraumfunktion nicht hätten vermuten lassen (OMKW1b, EPAK2a, EPAK2b, EPAK3a, CTNT4b, OMKW0). Des weiteren wird durch die höhere Toleranzbreite die Wahrscheinlichkeit verringert, daß ein Boden als toxisch deklariert wird, bei dem aufgrund eines nicht ganz optimalen Wassergehaltes eine reduzierte Nachkommenanzahl erhalten wird.

Der Forderung des BBodSchG, schädliche Bodenveränderungen zu vermeiden, wird mit einem Schwellenwert von 50 % jedoch nur unzureichend Rechnung getragen. Durch eine Modifi-

kation der Kontrollböden könnte dies jedoch verbessert werden. So handelt es sich bei der in dieser Auswertung zugrunde gelegten Bezugsgröße "Regenwurmtestsubstrat" bzw. "LUF2.2-Boden" um sandige Böden. Wie es sich gezeigt hat, liegt in bindigeren Böden die Reproduktionsrate möglicherweise etwas niedriger als in sandigen Böden. Je vergleichbarer der Kontrollboden und der zu testende Boden sind, desto genauer kann festgelegt werden, ab wann ein Boden als toxisch zu bezeichnen ist, da Einflüsse durch die Bodenstruktur damit minimiert wären. Die tolerierbaren Abweichungen würden in diesem Fall geringer ausfallen. Dies setzt jedoch voraus, daß probenspezifisch hohe Sorgfalt auf die Auswahl der Kontrollböden gelegt wird. Speziell bei Böden nach erfolgter Sanierung wird es aufgrund der dabei auftretenden Veränderungen teilweise auch nicht möglich sein, ideale Vergleichsmaterialien zu finden. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, bei der Testvorschrift für die Bodentestung mehrere Böden (z.B.: 3 – 5) als Kontrollböden festzulegen. Als Bezugsgröße ist in fraglichen Fällen immer das Bodenmaterial heranzuziehen, das dem Testboden in den chemisch-physikalischen Bodeneigenschaften am nächsten kommt. Bei einer derartigen Vorgehensweise könnte beispielsweise der Schwellenwert auf 30 % Reduktion der Nachkommenanzahl gelegt werden. Vor der Festlegung dieses Schwellenwertes sollte jedoch noch der Einfluß des Wassergehaltes auf die Nachkommenanzahl in Abhängigkeit von der Probe näher untersucht werden.

II. Beurteilung auf der Basis von Mischungsansätzen

Im Rahmen der Pflanzentests und der Nitrifikation (s. TV 4.1, Kap. 9.3.1 des Leitfadens) wird der Ansatz durchgeführt, durch eine 1:1-Mischung von Kontrollboden und Testboden und einen Vergleich mit Ansätzen aus reinem Kontrollboden bzw. reinem Testboden Informationen über die Toxizität zu erhalten. Als toxisch wird in diesem Fall ein Testboden gewertet, bei dem das arithmetische Mittel der produzierten pflanzlichen Biomasse bzw. der Nitrifikation in der 1:1-Mischung um mehr als 10 % bzw. um mehr als die Standardabweichung niedriger liegt als das arithmetische Mittel der Ergebnisse in den Ansätzen mit 100 % Testboden bzw. 100 % Kontrollboden. Ob dieser Ansatz auch für den Reproduktionstest mit *Eisenia fetida* geeignet ist, kann exemplarisch am Beispiel der Verdünnungsreihen demonstriert werden (Tabelle 9). Da Informationen über die Lebensraumfunktion erhalten werden sollen, werden im Fall des Tests mit *Eisenia fetida* experimentell ermittelte Ergebnisse in den Mischungsansätzen, die über den rechnerisch ermittelten liegen, als "Lebensraumfunktion gegeben" gewertet.

Im Fall des CTNT1-Bodens und der Mischung mit LUF2.2 bzw. RWTS würde sich auf der Basis der geschilderten Auswerteform in Zwei Fällen ergeben, daß die Lebensraumfunktion des Testbodens gegeben ist, obwohl bei dem 100 %-Testansatz nahezu keine Nachkommen produziert wurden und somit offensichtlich die Lebensraumfunktion nicht gegeben ist. Diese Bewertungsform scheint somit für den Test mit *Eisenia fetida* nicht geeignet zu sein. Einschränkend muß jedoch gesagt werden, daß die dargestellten Beispiele Extrembeispiele darstellen, indem in den Testböden nahezu keine Nachkommen produziert wurden. Vor der endgültigen Ablehnung dieses Auswertungsansatzes für den Test mit *Eisenia fetida* sollten daher noch Testansätze mit weniger toxischen Böden durchgeführt werden.

Tab. 9: Bewertung der Toxizität im Regenwurmtest aufgrund der Nachkommenanzahl in Verdünnungsreihen

Anzahl an Nachkommen (Mittelwert)						Wertung
Kontrollboden		Testboden		Mischung (50 % : 50 %)		Lebensraum- funktion gegeben
Boden	exp. ermittelt	Boden	exp. ermittelt	experimentell ermittelt	rechnerisch ermittelt	
LUFA	435 ± 67	CTNT1	10 ± 13	274 ± 5	223	ja
RWTS	400 ± 30	CTNT1	10 ± 13	173 ± 39	205	nein
CTNT0	426 ± 16	CTNT1	10 ± 13	261 ± 10	218	ja
RWTS	217 ± 23	SPAK1 α	0	0	108	nein
LUFA	188 ± 37	SPAK1 α	0	0	94	nein

III. Beurteilung auf der Basis von statistischer Signifikanz

In Tabelle 10 ist die statistische Signifikanz der Abweichung in der Nachkommenanzahl von den Testböden im Vergleich zu den Kontrollböden auf der Basis des t- bzw. u-Testes aufgeführt.

In ca. 30 % der Fälle weicht die Beurteilung bei Verwendung des Regenwurmtestsubstrates von der Beurteilung bei Verwendung von LUFA-Böden als Kontrollboden in der Form ab, daß bei einem Boden statistische Signifikanz, bei dem anderen Boden dagegen keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Eine Ursache dafür spielt sicher auch die Anzahl an Parallelen, die jedoch aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes im Reproduktionstest nicht beliebig gesteigert werden kann. Des weiteren zeigte es sich, daß die Bodenstruktur einen Einfluß auf die Nachkommenanzahl auszuüben scheint. Bei der Beurteilung der Testergebnisse auf der Basis von statistisch signifikanten Unterschieden bedeutet dies, daß der Auswahl des Kontrollbodens sehr hohe Bedeutung zukommt. In diesem Fall sollte weitgehende Übereinstimmung in den chemisch-physikalischen Parametern von Kontroll- und Testboden bestehen. Speziell bei Böden nach der Sanierung dürfte dies sehr schwierig sein, wenn beispielsweise Zuschlagsstoffe in signifikanten Mengen zugesetzt werden oder eine Reinigung über Bodenwäsche erfolgt. Des weiteren ist es bei Anwendung dieses statistischen Ansatzes erforderlich, den für das jeweilige Testsubstrat optimalen Wassergehalt einzustellen, was entsprechende Voruntersuchungen bedingen würde. Für eine Routineanwendung erscheint daher der Ansatz über eine statistische Auswertung als weniger praktikabel.

Tab. 10: Statistische Signifikanz der Abweichungen in der Nachkommenanzahl der Testböden von den Kontrollböden

Boden	Kontrollboden: RWTS	Kontrollboden: LUFA
LMKW1	• •	n.s.
EPAK1a	•	n.s.
EPAK1b	n.s.	n.s.
EPAK2a	•	•
EPAK2b	•	•
EPAK3a	• • •	•
EPAK3b	•	n.s.
SPAK1a	•	•
CTNT0	n.s.	n.s.
CTNT1	•	•
CTNT02a	•	•
CTNT4a	•	•
CTNT4b	•	•
OMKW0	• •	• • •
OMKW1a	n.s.	• •
OMKW1b	n.s.	•

•: $0,05 \geq p > 0,01$; ••: $0,01 \geq p > 0,001$; •••: $p \geq 0,001$;
n.s.: nicht signifikant

4.3.8 Sensitivität von Akut- und Repro-Test

In vier der untersuchten Böden wird eine deutliche Mortalitätsrate erzielt, drei der Böden ließen aufgrund der chemischen Analyse ein Gefahrenpotential erkennen.

Werden die Ergebnisse des Akut-Testes (Mortalität) mit denen des Repro-Testes (Reproduktion) verglichen, zeigt es sich, daß bei vier Böden (EPAK2b, EPAK3a, CTNT4b und OMKW0) der Repro-Test deutlich anspricht, wohingegen der Akut-Test keine Wirkung erkennen läßt. In diesem Fall erweist sich der Repro-Test als sensitiver, wobei jedoch teilweise keine Rückschlüsse auf die Ursache für die verminderte Reproduktionsrate gezogen werden können.

In anderen Ansätzen entsprechen sich die Ergebnisse beider Verfahren. Dies soll am Beispiel der Ansätze mit Verdünnungsreihen näher erläutert werden. Für einen Vergleich der

Sensitivität eignet sich primär der Ansatz mit SPAK1a und LUFA. In dem Ansatz, in dem 100 % Überlebensrate im Akut-Test detektiert wird, steigt auch die Nachkommenanzahl signifikant an. Eine Verdünnungsstufe später wird jedoch erst die der Kontrolle entsprechende Nachkommenanzahl erreicht.

Bei der Mischung mit RWTS ergab sich in allen getesteten Konzentrationen eine Mortalitätsrate von 100 %. Worauf die deutlich stärkere Mortalitätsrate in diesem Ansatz im Vergleich zu dem Ansatz mit LUFA zurückzuführen ist, kann nicht ausgesagt werden.

Bei den Verdünnungsreihen mit CTNT1 wurde in der Konzentrationsstufe, in der zum letzten Mal 100 % Mortalität auftrat, bereits eine höhere Nachkommenanzahl beobachtet. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß bei diesen Ansätzen eine erhöhte Rinderdungzugabe erfolgt war.

Generell läßt sich feststellen, daß der Repro-Test empfindlicher reagieren kann als der Akut-Test, wobei neben Schadstoffgehalten jedoch auch ungünstige Bodeneigenschaften eine Rolle spielen können. Da es sich bei dem Toxizitätskriterium "Mortalität" um die äußerste Schädigung handelt, die ein Organismus aufweisen kann, sollte eine Beurteilung der Lebensraumfunktion nie ausschließlich auf diesem Kriterium beruhen.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

➤ **Einfluß von Bodeneigenschaften auf die Testergebnisse**

Aufgrund der geringen Anzahl an Kontrollböden lassen sich Rückschlüsse auf den Einfluß von den Bodenparametern pH-Wert, organischer Kohlenstoffgehalt und Bodenart nur ansatzweise ziehen:

So scheinen bindigere Böden im Vergleich zu dem sandigen LUFA2 .2 und dem sandigen künstlichen Regenwurmtestsubstrat eher zu einer etwas niedrigeren Nachkommenanzahl zu führen. Aufgrund der Zugabe von Rinderdung im Reproduktionstest sollte der organische Kohlenstoffgehalt eher von untergeordneter Bedeutung sein. Geeignete pH-Werte von Testböden könnten im Bereich von ca. 4,5 – 7,7 (bezogen auf CaCl₂) liegen. Generell scheint *Eisenia fetida* jedoch als Testorganismus geeignet zu sein.

➤ **Reproduzierbarkeit der Testergebnisse**

- Das Regenwurmtestsubstrat nach Vorschrift ISO 11268-1, -2 [4; 6] sowie der LUFA 2.2-Boden als Kontrollboden ergaben vergleichbare Testergebnisse.
- Trotz standardisierter Versuchsbedingungen (Temperatur, Wassergehalt, Futter) ist jedoch eine Variabilität in der Reproduktionsrate zu beobachten, so daß bei der Beurteilung von Böden immer ein Referenzansatz mitgeführt werden muß, auf den die Ergebnisse bezogen werden können.

➤ **Kontrollsubstrat**

Die Art des Kontrollsubstrates bedingt die Schärfe, mit der Böden als toxisch bzw. untoxisch für Regenwürmer klassifiziert werden können. Je stärker die chemisch-physika-

lischen Bodeneigenschaften von Kontroll- und Testboden übereinstimmen, desto präziser läßt sich eine Einschränkung der Lebensraumfunktion erkennen.

➤ **Akut-Test**

- weniger empfindlich als der Repro-Test
- angezeigt wurden schwerpunktmäßig Böden, die aufgrund der chemischen Analytik bereits eindeutig als belastet erkannt wurden
- Beurteilung der Toxizität: > 20 % Mortalität (analog DECHEMA 1995 [11]. Biologische Testmethoden für Böden; alle unkontaminierten Böden werden als solche erkannt).

➤ **Repro-Test**

- höhere Empfindlichkeit als der Akut-Test
- im Vergleich zur chemischen Analytik werden Zusatzinformationen erhalten
- Dargestellt wurden drei verschiedene Bewertungsansätze. Dabei scheint der praktikabelste die Festlegung einer prozentualen Nachkommenanzahl im Vergleich zur Kontrolle zu sein. Dabei bestimmt die Ähnlichkeit in den chemisch-physikalischen Parametern von Kontrollmaterial und Testsubstrat die Höhe der maximal zu tolerierenden Abweichung.

➤ **Verdünnungsreihen**

Da die Aussage getroffen werden soll, ob die Lebensraumfunktion gewährleistet ist, erscheint eine Aussage für den unverdünnten Boden in der Praxis als ausreichend. Eine differenzierte Aussage ist eher von akademischem Interesse, so daß die routinemäßige Durchführung von Verdünnungsreihen als nicht notwendig erachtet wird.

5 Ausblick

Der Akut-Test erscheint aufgrund seiner geringen Empfindlichkeit eher als Screening-Test geeignet. Für die Beurteilung von Böden nach der Sanierung erscheint er aufgrund seiner geringen Empfindlichkeit eher ungeeignet. Zu beachten ist ferner, daß Mortalität die stärkste Reaktion eines Organismus auf schädliche Umwelteinwirkungen darstellt. Gemäß BBodSchG sind schädliche Veränderungen zu vermeiden, so daß ein früheres Signal notwendig ist.

Detailliertere Informationen werden mit dem Reproduktionstest erhalten. Wünschenswert wäre jedoch bei diesem Test eine genauere Festlegung der Spanne bei den chemisch-physikalischen Bodenparametern (z.B.: pH-Wert, Bodenart, Salzgehalt), innerhalb derer der Test problemlos angewendet werden kann. Dies kann durch die Testung einer Reihe weiterer unbelasteter Böden erfolgen, die sich in ihren chemisch-physikalischen Parametern unterscheiden. Genaueres Augenmerk sollte auch auf die Bezugsgröße gelegt werden. Auf der Basis der vorliegenden Untersuchungen scheint als Bewertungsmaßstab für die Beurteilung

der Ergebnisse eine mindestens zu erreichende Reproduktionsrate als erfolgversprechendster Ansatz. In diesem Zusammenhang sollten die Vorgaben für die Kontrollböden sowie die mindestens zu erzielenden Reproduktionsraten noch genauer festgelegt werden.

Des Weiteren konnten im Rahmen des vorliegenden Projektes Untersuchungen zum Einfluß des Wassergehaltes auf die Reproduktionsraten nur exemplarisch durchgeführt werden. Weitere Untersuchungen zur Ermittlung einer optimalen Spanne in Abhängigkeit von Bodenart und organischem Gehalt wären wünschenswert. Des Weiteren sollte abgeklärt werden, ob die Einstellung des Wassergehaltes auf der Basis der maximalen Wasserhaltekapazität ausreichend ist, oder ob die aufwendigen pF-Kurven zugrunde gelegt werden sollten.

6 Literaturverzeichnis

1. **Blankenhorn, J.** (1994): Derzeitige Anwendung und Entwicklung von Eluationsverfahren. Texte und Berichte zur Altlastenbearbeitung. LFU-Baden-Württemberg.
2. **Domiguez, J., C.A. Edwards** (1997): Effects of stocking rate and moisture content on the growth and maturation of *Eisenia andrei* (Oligochaeta) in pig manure. Soil Biol. Biochem. 29, 743-746.
3. **Edwards, C.A.** (1988): Breakdown of animal, vegetable and industrial organic wastes by earthworms. In: Earthworms in waste and environmental management. C.A. Edwards, E.F. Neuhauser (eds.). 21 – 31. Academic Press, The Hague, The Netherlands.
4. **ISO 11268-1** (1993): Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate.
5. **ISO/DIS 11268-2** (1993): Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 2: Determination of effects on reproduction.
6. **ISO 11268-2** (1998): Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 2: Determination of effects on reproduction.
7. **Kaplan, D.L., R. Hartenstein, E.F. Neuhauser, M.R. Malecki** (1980): Physicochemical requirements in the environment of the earthworm *Eisenia fetida*. Soil Biol. Biochem. 12, 347-352.
8. **Keddy, C.J., J.C. Greene, M.A. Bonnell** (1995): Review of whole-organism bioassays: soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. Ecotox. Environ. Safety 30, 221-251.
9. **Kula, H., O. Larink** (1997): Development and standardization of test methods for the prediction of sublethal effects of chemicals on earthworms. Soil Biol. Biochem. 29, 635-639.
10. **Reinecke, A.J., J.M. Venter** (1985): The influence of moisture on the growth and reproduction of the compost worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). Rev. Ecol. Biol. Sol. 22, 473-481.
11. **Kreysa, G., Wiesner, J.** (1995): Bioassays for soils, 4th report of the interdisciplinary DECHEMA-committee "Environmental Biotechnology – Soil", Ad hoc committee "Methods for soil toxicological/ecotoxicological assessment of soils" DECHEMA e.V., ISBN 3-926959-52-5

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.3 Verbundvorhaben 4: Ökotoxikologische Testbatterien

9.3.6 Entwicklung und Validierung von genotoxikologischen und ökotoxikologischen Tests zur Bewertung der Rückhaltefunktion von Böden (TV 4.5)

Dr. Frank Pfeifer

Felix Haake
Peter Hach
Roland Otte
Heidemarie Otten
Dr. Sigrid Schacht

Deutsche Montan Technologie GmbH
Geschäftsbereich GUC
Am Technologiepark 1
45307 Essen

Förderkennzeichen: 1491076

Laufzeit: 01.11.1996 – 31.10.1999

Das hier beschriebene Forschungsprojekt war eines von insgesamt 9 Teilvorgaben des Forschungsverbundes "Ökotoxikologische Testbatterien", welcher von der TU Berlin, Institut für Landschaftsentwicklung, koordiniert wurde. Die Zusammenarbeit und der Erfahrungsaustausch innerhalb des Forschungsverbundes war durch regelmäßige Projektbesprechungen sichergestellt. Im Rahmen des Projektes wurden größtenteils identische Bodenproben für die Untersuchungen eingesetzt, welche von der Projektkoordination, der RWTH Aachen, Institut für Hygiene und Umweltmedizin, und von DMT (vergl. Kap. 5.1) zur Verfügung gestellt wurden.

Eine besonders enge Zusammenarbeit, welche durch zusätzliche interne Projektbesprechungen und den Austausch und Abgleich von Methoden dokumentiert ist, wurde im Rahmen des Projektes mit der RWTH Aachen, Institut für Hygiene und Umweltmedizin, und dem Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie, Schmallenberg, gepflegt.

1 Zusammenfassung

Ziel des Vorhabens war es, biologische Testverfahren zur Bewertung des über den "Wasserpfad" mobilisierbaren genotoxischen und ökotoxikologischen Potentials von Böden für die Erfolgskontrolle bei der Sanierung von Altlasten sowie die Gefahrenbeurteilung im Rahmen von orientierenden, Sanierungs- und Detailuntersuchungen zu validieren und eine Strategie für die Bewertung der Ergebnisse abzuleiten. Es wurden verschiedene für die Wasser-/Abwasser- und Chemikalienprüfung entwickelte Biotest mit hohem Normierungsstandard (Leuchtbakterien-, Daphnien-, Algen-, umu- und Ames-Test) auf ihre Eignung überprüft und der Aufgabenstellung entsprechend modifiziert. Die Validierung der im Eluat durchzuführenden Biotests erfolgte durch Untersuchung von unbelasteten Referenzböden und belasteten Böden mit den analytisch nachgewiesenen Hauptkontaminationen PAK (polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe), MKW (Mineralölkohlenwasserstoffe) und rüstungsstämmige Nitroaromaten (u. a. TNT), welche verschiedene für die Praxis relevante Sanierungsverfahren durchlaufen haben. Dabei wurden die toxikologischen Befunde mit umfangreichen chemischen Analysen im Feststoff und im wässrigen Eluat abgeglichen. Es wurden Vorschriften zur Durchführung der Tests erstellt sowie Empfehlungen für eine Bewertung der Befunde unter Berücksichtigung des aktuellen Entwicklungsstandes [11; 15] abgeleitet (siehe Kap. 6).

Nunmehr steht als ein wesentliches Projektergebnis eine validierte und praxistaugliche Strategie zum Einsatz und zur Bewertung der ökotoxikologischen und genotoxikologischen Testsysteme zur Verfügung, welche eine über die rein chemisch/stoffliche Analyse von Böden deutlich hinausgehende Charakterisierung des für den Wasserpfad bioverfügbaren Schadstoffanteils ermöglicht. Die hier dokumentierten Ergebnisse können als allgemeine Orientierungshilfe und konkrete Handlungsempfehlung sowohl für die Anbieter von Sanierungsverfahren als auch für Sanierungspflichtige, planende Ingenieurbüros sowie beteiligte Fachbehörden von Kommunen, Ländern und Bund dienen.

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

Das Bundesbodenschutzgesetz (BBodSchG) dient dem Zweck, die Funktion des Bodens im Sinne einer Vorsorge nachhaltig zu sichern bzw. im Sinne einer Gefahrenabwehr bei Altlasten und sonstigen belasteten Flächen wiederherzustellen. Schädliche Bodenveränderungen sind

dabei als Beeinträchtigungen der Bodenfunktion definiert, die geeignet sind, Gefahren, erhebliche Nachteile oder erhebliche Belästigungen für den einzelnen oder die Allgemeinheit herbeizuführen. Ziel von Bodensanierungsmaßnahmen im Sinne des BBodSchG muss somit eine dauerhafte Gefahrenabwehr sein, welche nutzungsbezogen zu bewerten ist.

Zur Zeit basiert die Beurteilung des Gefährdungspotentials von kontaminierten und durch verschiedene Sanierungstechniken behandelten Böden im wesentlichen auf der durch chemische Analyse nachweisbaren Gesamtmenge an Schadstoffen. Nur für wenige organische Stoffe und Schwermetalle liegen im untergesetzlichen Regelwerk zum BBodSchG (Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung vom 17.07.1999) [1] für die Wirkungspfade "Boden → Mensch", "Boden → Pflanze" und "Boden → Grundwasser" abgeleitete Werte vor. Da die Mobilisierbarkeit und Verfügbarkeit der bodengebundenen Schadstoffe für biologische Systeme (Bioverfügbarkeit) stark variieren kann, ist häufig über die Bestimmung der Gesamtgehalte nur eine unzureichende Abschätzung des schutzgutspezifischen Gefährdungspotentials möglich. Weiterhin ist anzumerken, dass durch die chemische Analytik i. d. R. nur die vermuteten Hauptkontaminanten, nicht aber unvermutete Begleitkontaminationen oder biologische Stoffwechselprodukte bzw. chemische/thermische Zerfallsprodukte nachgewiesen werden.

Zur Beurteilung der Mobilisierbarkeit und Bioverfügbarkeit von Schadstoffen in Böden setzt sich daher in Ergänzung zur "klassischen, chemisch/stofflichen" Charakterisierung zunehmend der Einsatz von ökotoxikologischen Testsystemen durch. Biotests ermöglichen die integrale Erfassung aller bioverfügbaren Schadstoffe, also auch jener, welche durch chemische Analytik nicht oder nur schwer nachzuweisen sind (z. B. Begleitkontaminationen, mikrobielle Metabolite).

Der Überprüfung des ökotoxikologischen/toxikologischen Status kontaminierter Böden liegt somit die zentrale Fragestellung zugrunde, ob unter Berücksichtigung des Nutzungsbezuges eine Beeinträchtigung der Schutzgüter Boden, Grundwasser, Pflanze, Tier und Mensch über die unterschiedlichen Transferpfade möglich erscheint. Dazu soll das Verhältnis der bioverfügbaren Schadstoffanteile zu den durch chemische Analysen bestimmten Gesamtgehalten abgeschätzt werden.

Obwohl in der Praxis häufig unterschiedliche ökotoxikologische Testverfahren zur Bodencharakterisierung herangezogen wurden, war der Stand der Erprobung und Validierung entsprechender Testmethoden für die Bewertung kontaminierter und sanierter Böden zu Beginn des Forschungsprojektes noch unzureichend. Folglich war auch keine praxiserprobte Strategie für die toxikologische/ökotoxikologische Bewertung von Bodenkontaminationen verfügbar. Diese ist jedoch dringend einzufordern, um mehr Entscheidungssicherheit im Rahmen der Gefahrenbeurteilung bei orientierenden Untersuchungen, Detailuntersuchungen und Sanierungsuntersuchungen bzw. bei der Abwicklung von Sanierungsvorhaben (z.B. bei der Beurteilung der Sanierungsnotwendigkeit, der Festlegung von Sanierungszielwerten und der Erfolgskontrolle bei Sanierungsmaßnahmen) zu erlangen.

Eine zur Zeit des Beginns dieses F+E-Projektes aktuelle Darstellung des Wissensstandes zur nutzungsbezogenen toxikologischen/ökotoxikologischen Bewertung von Böden ist in der unter Federführung des DECHEMA-Arbeitskreises 'Umweltbiotechnologie Boden' erarbeiteten Broschüre 'Biologische Testmethoden für Böden' zusammengestellt [15]. Dabei wurde bei der Auswahl der Methoden dem damaligen Stand der Standardisierung und den praktischen Erfahrungen Rechnung getragen. Es wurde weiterhin eine 2-stufige Vorgehensweise empfohlen, welche in einem ersten Schritt die Überprüfung der Rückhaltefunktion des Bodens

und in einem zweiten Schritt gegebenenfalls die Beurteilung der Lebensraumfunktion vorsieht. Zur Überprüfung der Rückhaltefunktion von Böden (Möglichkeit einer Schadstoffausbreitung über den Wasserpfad) werden z. B. im wässrigen Eluat durchzuführende aquatische Biotests mit Leuchtbakterien, Daphnien und Algen als Testorganismen nach entsprechenden Vorschriften der DIN-Reihe 38412 empfohlen.

Die angeführten Testverfahren und Bewertungskonzepte bedurften jedoch noch einer eingehenden Validierung zur Belegung ihrer Praxistauglichkeit. Dabei war im besonderen die Querempfindlichkeit der Biotests gegenüber natürlichen organischen und anorganischen Bodenbestandteilen, die Plausibilität der Ergebnisse durch Vergleich mit der chemischen Schadstoffanalytik im wässrigen Eluat und die Aussagefähigkeit bezüglich des Langzeit-Mobilisierungsverhaltens der Schadstoffe zu klären.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Abschätzung des Gefährdungspotentials von Bodenkontaminationen stellt das über den Wasserpfad mobilisierbare erbgutverändernde Potential dar. Hierfür standen zu Projektbeginn ausschließlich Testverfahren zur Verfügung, welche für die Chemikalienprüfung entwickelt und genormt wurden. Über die Anwendbarkeit dieser Testverfahren zur Beurteilung von kontaminierten und sanierten Böden lagen nur sehr wenig Erkenntnisse vor, so dass hier noch grundlegende Untersuchungen zur Standardisierung und Validierung notwendig waren.

3 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Ziel des Vorhabens war es, in enger Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen des Verbundvorhaben "Ökotoxikologische Testbatterien", biologische Testverfahren zur Bewertung des über den "Wasserpfad" mobilisierbaren genotoxischen und ökotoxikologischen Potentials von Böden auf ihre Praxistauglichkeit zu überprüfen, gegebenenfalls zu optimieren und zu validieren. Schwerpunktmäßiger Anwendungsbereich war dabei der Einsatz zur Erfolgskontrolle bei der Sanierung von kontaminierten Böden, welche mit PAK, MKW und Nitroaromaten als Hauptkontaminanten belastet waren. Dazu sollten Böden unterschiedlicher Textur, welche verschiedene für die Praxis relevante Sanierungsverfahren durchlaufen haben, mit den in Vorversuchen an die Aufgabenstellung angepassten und als geeignet befundenen Biotests untersucht werden. Ein Schwerpunkt sollte bei dem Einsatz der Biotests im Rahmen der Erfolgskontrolle bei der maßstabgerechten Erprobung von biologischen Verfahren zur Sanierung TNT-belasteter Böden am Standort "Werk Tanne" liegen. Bei der Auswahl der Biotests sollte weiterhin der Praxisrelevanz und dem Stand der Normung Rechnung getragen werden.

Die übergeordneten wissenschaftlichen und technischen Arbeitsziele des Vorhabens gliedern sich wie folgt:

1. Auswahl und Beschaffung einer begrenzten Anzahl von PAK-belasteten Bodenproben aus laufenden Sanierungsvorhaben zur Verteilung an die Projektpartner zwecks gemeinsamer Untersuchung.
2. Auswahl, sofern notwendig Modifizierung und Validierung von Biotests zur Beurteilung des über den Wasserpfad mobilisierbaren genotoxischen Potentials von Bodenproben einschließlich Entwicklung einer Bewertungsstrategie. Hierzu wurden im Rahmen des

Projektes Untersuchungen mit dem Ames-Test gemäß DIN-Entwurf 38415-4 [8] und dem umu-Test gemäß DIN 38415-3 [7] durchgeführt.

3. Erprobung und, sofern notwendig, Modifizierung von aquatischen Biotests zur Beurteilung des über den Wasserpfad mobilisierbaren ökotoxischen Potentials von Bodenproben einschließlich Aufzeigung von Störfaktoren sowie Überprüfung der von der DECHEMA [15] vorgeschlagenen Bewertungsstrategie. Im Rahmen des Projektes wurden hierzu der Leuchtbakterien-Hemmtest gemäß DIN 38412-34 [4] bzw. DIN EN ISO 11348-2 [10], der Zellvermehrungs-Hemmtest mit *Vibrio fischeri* gemäß DIN 38412-37 [5], der *Scenedesmus*-Zellvermehrungs-Hemmtest gemäß DIN 38412-33 [3] und der Daphnien-Kurzzeittest in Anlehnung an DIN 38412-30 [2] auf ihre Praxistauglichkeit überprüft.
4. Ableitung einer praxistauglichen Strategie zur Bewertung der ökotoxikologischen und genotoxikologischen Befunde im Hinblick auf eine nutzungsbezogene Gefahrenbeurteilung sowie Dokumentation der Arbeiten im BMBF-Leitfaden "Biologische Verfahren zur Bodensanierung".

4 Angewandte Methoden

In den folgenden Abschnitten werden die im Rahmen dieses Projektes eingesetzten Methoden zur ökotoxikologischen, genotoxikologischen und chemisch/analytischen Charakterisierung von Böden sowie zur Herstellung von Bodeneluaten beschrieben. Dabei wird, soweit möglich und sinnvoll, auf entsprechende Normen und Regelwerke verwiesen. Weiterhin werden im Rahmen des Projektes erarbeitete Modifikationen und Weiterentwicklungen der entsprechenden Methoden angeführt.

4.1 Herstellung der Bodeneluate

Die Herstellung der wässrigen Bodeneluate und die Aufbereitung der Eluate für die chemisch/analytischen und ökotoxikologischen Bestimmungen erfolgte in Anlehnung an DIN 38414-4 [6] sowie den im Rahmen des Teilvorhabens 4.4 (Kap. 9.3.5 des Leitfadens) vom Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie entwickelten Methodenvorschlag nach folgendem Schema:

- Elution durch 24 h Überkopf Schütteln bei einem Feststoff/Wasserverhältnis von 1 : 2.
- Zentrifugation in Behältnissen aus Stahl (Vermeidung von Sorptionsverlusten) für 20 min bei 20.000×g.
- Filtration durch Glasfasermikrofilterfilter (0,45 µm) oder Sandwich-Filtration über regenerierte Zellulose/Glasfasermikrofilterfilter (bei hohen Eluatrübungen).

Mit dieser Methode wurden bei allen im Rahmen des Projektes untersuchten Böden Trübungswerte im Eluat von < 10 FNU (DIN EN 27027) [9] erreicht, wie sie i. d. R. auch unter natürlichen Bedingungen für Sickerwässer/Grundwässer zu erwarten sind.

Vor Durchführung des Ames-Tests wird zusätzlich eine Bestimmung der Keimzahl im filtrierten Eluat durchgeführt, da bakterielle Kontaminationen eine Auswertung der Mutantenhäufigkeit erschweren oder unmöglich machen können. Die vorliegenden Erfahrungen zur

Verfahrensauswertung belegen, dass eine hinreichende Reduzierung der Keimzahl in Bodeneluaten durch Glasfaserfiltration $< 0,45 \mu\text{m}$ erfolgt.

4.2 Ökotoxikologische Testverfahren

Für die ökotoxikologische Bewertung der Bodenrückhaltefunktion wurden die im Folgenden aufgeführten biologischen Testverfahren eingesetzt. Die Bewertung der Ergebnisse erfolgte zunächst nach den von der DECHEMA [15] vorgeschlagenen Kriterien. Etwaige Änderungen oder Modifikationen werden in Kapitel 6 dargelegt.

Leuchtbakterientest mit *Vibrio fischeri* in Anlehnung an DIN 38412-34 [4] bzw. DIN EN ISO 11348-2 [10] (gültig ab 4/1999) unter Verwendung flüssig getrockneter Bakterien bei einer Kontaktzeit von 30 min. Als Ergebnis wird die Verdünnungsstufe G_L mit Hilfe einer statistischen Analyse bestimmt, die innerhalb einer Verdünnungsreihe erstmals eine Hemmung der Lichtemission von $< 20 \%$ bewirkt. Bei stark gefärbten Bodeneluaten wurde eine Farbkorrektur entsprechend den Vorgaben der Norm durchgeführt. Ein Bodeneluat gilt als toxisch bei G_L -Werten > 8 . Bei G_L -Werten zwischen 3 und 8 erfolgt eine Bewertung unter Hinzuziehung des Zellvermehrungs-Hemmtests mit *Vibrio fischeri*.

Zellvermehrung-Hemmtest mit *Vibrio fischeri* in Anlehnung an DIN 38412-37 [5] als miniaturisierte Ansätze unter Verwendung von 96-well Microtiterplatten, wobei aufgrund von Vorversuchen zur Schadstoffsorption ausschließlich Quarzglas als Plattenmaterial zum Einsatz kam. Als Ergebnis wird die Verdünnungsstufe G_{LW} bestimmt, die innerhalb einer Verdünnungsreihe bei einer Inkubationszeit von 7 h erstmals eine Hemmung des Bakterienwachstums von $< 20 \%$ bewirkt. Bei G_{LW} -Werten > 2 gilt ein Bodeneluat als toxisch.

Daphnien-Kurzzeittest mit *Daphnia magna* in Anlehnung an DIN 38412-30 [2]. Als Ergebnis wird die Verdünnungsstufe G_D bestimmt, bei der innerhalb einer Verdünnungsreihe erstmals 9 von 10 Daphnien ihre Schwimmfähigkeit behalten. Bei G_D -Werten > 4 gilt ein Bodeneluat als toxisch.

Zellvermehrungs-Hemmtest mit der einzelligen Grünalge *Scenedesmus subspicatus* in Anlehnung an DIN 38412-33 [3] bei einer Inkubationszeit von 72 h. Die Auswertung erfolgte über Bestimmung der Zellzahl. Als Ergebnis wird die Verdünnungsstufe G_A bestimmt, die innerhalb einer Verdünnungsreihe erstmals eine Hemmung des Algenwachstums von $< 20 \%$ bewirkt. Bei G_A -Werten > 4 gilt ein Bodeneluat als toxisch.

4.3 Genotoxikologische Testverfahren

Für die Bewertung des über den Wasserpfad mobilisierbaren genotoxikologischen Potentials von Böden wurden folgende Biotests eingesetzt:

Ames-Test mit den Stämmen *Salmonella typhimurium* TA 98 und TA 100 in Anlehnung an DIN Entwurf 38415-4 (Stand 1/1998) [8]. Der Test wurde grundsätzlich für beide Stämme in den Testvarianten ohne S9-Mix und mit S9-Mix durchgeführt. Als Ergebnis wird die Verdünnungsstufe G_{EA} ermittelt, bei welcher innerhalb einer Verdünnungsreihe erstmals eine Induktionsdifferenz $I < 80$ (Stamm TA 100) bzw. < 20 (Stamm TA98) vorliegt. Ein Bodeneluat gilt als mutagen, wenn bei mindestens einem der beiden verwendeten Stämme

mit oder ohne Zugabe von S9-Mix ein G_{EA} -Wert > 3 bestimmt wird. Die Verdünnungsstufe 3 stellt die testbedingt kleinstmögliche Verdünnung der Probe dar.

Umu-Test mit dem Stamm *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 in Anlehnung an DIN 38415-3 [7]. Der Test wurde grundsätzlich in den Testvarianten ohne S9-Mix und mit S9-Mix durchgeführt, wobei aufgrund von Vorversuchen zur Schadstoffsorption ausschließlich Quarzglasmikrotiterplatten zum Einsatz kamen. Als Ergebnis wird die Verdünnungsstufe G_{EU} ermittelt, bei welcher innerhalb einer Verdünnungsreihe erstmals eine Induktionsrate des umuC-Gens $< 1,5$ im Vergleich zur Kontrolle vorliegt. Ein Bodeneluat gilt als mutagen, wenn bei mindestens einer der beiden Testvarianten (mit oder ohne Zugabe von S9-Mix) ein G_{EU} -Wert $> 1,5$ bestimmt wird. Die Verdünnungsstufe 1,5 stellt die testbedingt kleinstmögliche Verdünnung der Probe dar. Der mittlerweile als Entwurf vorliegende internationale Standard ISO FDIS 13829 [14] unterscheidet sich von der zitierten DIN 38415-3 im wesentlichen dadurch, dass eine Probe bei einer Induktionsrate $> 1,3$ (anstelle $> 1,5$) als mutagen eingestuft wird.

4.4 Chemisch/analytische Bestimmungen

In Tab. 1 sind die für die Bestimmung der chemisch/analytischen Parameter in Bodenproben und wässrigen Eluaten im Rahmen des Forschungsvorhabens eingesetzten Methoden aufgeführt. Sofern standardisierte Analysenverfahren eingesetzt wurden, wird auf die entsprechenden Normen oder Zitatstellen verwiesen. Alle im Rahmen dieses Berichtes angegebenen Analysenergebnisse von Bodenproben beziehen sich auf die Trockensubstanz. Alle Böden wurden für die Untersuchungen eingehend homogenisiert und < 6 mm gesiebt. Alle analytischen und ökotoxikologischen Untersuchungen wurden mit den derart vorbehandelten Böden durchgeführt.

Tab. 1: Analysenmethoden für Feststoffe und wässrige Proben

Parameter	Analyseverfahren	
	Feststoff	wässrige Lösungen
PAK (EPA)	Referenzmethode MURL-NRW (Extraktion mit THF im Ultraschallbad)	analog DIN 38407 F8
BTEX und Methylnaphthaline	LWA-Merkbl. Nr.12, Methode 13	DIN 38407-F9-2
Phenolindex	analog DIN 38409-H16-2	DIN 38409-H16-2
MKW	LAGA Richtl. KW85	DIN 38409 H18
Nitroaromaten	in Anlehnung an EPA 8330 HPLC-Detektion	Festphasenextraktion HPLC-Detektion
Arsen, Blei, Cadmium, Chrom, Kupfer, Nickel, Zink	DIN EN ISO 11885	DIN EN ISO 11885

Tab. 1: (Fortsetzung)

Parameter	Analyseverfahren	
	Feststoff	wässrige Lösungen
Quecksilber	DIN EN 1483	DIN EN 1483
Cyanid gesamt	E DIN ISO 11262	E EN ISO 14403
DOC	–	DIN 38409-H3
TOC	analog LWA-Merkbl. Nr. 12, Methode 69	–
Trübung	–	DIN EN 27027 (quantitatives Verfahren)

5 Ergebnisse und Bewertung

5.1 Chemisch/analytische Charakterisierung der Böden

In den folgenden Kapiteln 5.1.1 bis 5.1.4 werden die im Rahmen dieses Projektes untersuchten Böden bezüglich ihres Schadstoffinventars chemisch/analytisch charakterisiert, wobei Böden mit der gleichen Hauptkontaminante zusammenfassend behandelt werden. Bezüglich einer eingehenden Herkunftsbeschreibung und bodenkundlichen Charakterisierung wird auf den Abschlussbericht der Projektkoordination (TU Berlin) verwiesen.

5.1.1 Unbelastete Referenzböden

Es wurde eine Auswahl unbelasteter Referenzböden untersucht, um die Bewertungsstrategie für die ökotoxikologischen und genotoxikologischen Tests zu validieren bzw. weiterzuentwickeln und um mögliche Matrixeffekte oder "falsch-positive" Ergebnisse aufzuzeigen. Hierfür wurden die Böden Lufa2.1, 2.2 und 2.3 sowie die standortspezifischen Referenzböden CTNT0 (Werk Tanne), EPAK1, OMKW0 und BMKW0 eingesetzt. Die Lufa-Böden wurden von der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt Speyer bezogen, die übrigen Böden wurden über die Projektkoordination (TH Berlin) angeliefert oder von DMT in das Projekt eingebracht. Die Daten zur chemisch/analytischen Charakterisierung weisen alle untersuchten Böden bei den erfassten Parametern als weitgehend unbelastet und somit für die geplanten Experimente als geeignet aus. Lediglich für die Böden OMKW0 und CTNT0 wurden geringfügig erhöhte Bleigehalte festgestellt.

5.1.2 PAK-belastete Böden

Den Projektpartnern wurden verschiedene bindige, mit PAK kontaminierte und biologisch behandelte Böden (Suspensionsbioreaktor) zur Verfügung gestellt. Die Analysendaten zur chemisch/analytischen Charakterisierung der Böden sind Tab. 2 zu entnehmen.

Tab. 2: Chemisch/analytische Charakterisierung von PAK-belasteten Böden (EPAK-Proben)

Parameter [mg/kg]	Boden EPAK 2a	Boden EPAK 2b	Boden EPAK 3a	Boden EPAK 3b	Boden EPAK 4a	Boden EPAK 4b
∑ PAK nach EPA	3,7	1,5	277	196	351	18,6
∑ PAK nach TVO	1,3	0,6	171	146	45,1	11,1
∑ Methylnaphth.	0,1	< 0,05	0,2	0,3	132	< 0,05
∑ BTEX	< 0,05	< 0,01	< 0,05	< 0,05	4,05	4,15
MKW	100	10	50	< 10	25	< 10
Phenolindex	0,6	0,2	0,7	0,8	1,6	1,2
Cyanid (gesamt)	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2	0,3	1,6
Arsen	< 5	< 5	11	8	11	11
Blei	9	12	14	15	21	31
Cadmium	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5
Chrom	21	18	24	34	81	122
Kupfer	6	6	9	14	3	16
Nickel	11	10	19	25	19	39
Quecksilber	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,5	0,8
Zink	29	25	37	57	64	90
TOC [%]	0,29	0,25	0,54	0,57	0,8 ¹	0,8 ¹

¹Analysen übernommen von TU Berlin (Projektkoordination)

Die Analysendaten weisen die Böden EPAK3a, EPAK3b und EPAK4a als erheblich mit PAK kontaminiert aus. Bei den analytisch erfassten Begleitkontaminationen wurden nur vereinzelt leicht erhöhte Werte (in Tab. 2 fett hervorgehoben) detektiert. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die Böden EPAK2a und EPAK3a (vor biologischer Sanierung) zum Zeitpunkt der biologischen Behandlung Ende 1995/Anfang 1996 erheblich höhere PAK-Gehalte (EPAK2a ca. 90 mg/kg, EPAK3a ca. 920 mg/kg) aufwiesen, welche im Zuge der Probenlagerung (80 l Gebinde, Raumtemperatur) durch Verflüchtigung und/oder biologischen Abbau teils erheblich reduziert wurden. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit, optimale und

standardisierte Lagerungsbedingungen für Bodenproben zu ermitteln und einzusetzen (siehe Beitrag des Teilvorhaben 4.7 der RWTH Aachen (Kap. 9.3.8 des Leitfadens).

Weiterhin wurden im Rahmen des Projektes Untersuchungen mit den PAK-belasteten Böden CWPAK1a, CWPAK1b, CWPAK1c, SPAK1a und SPAK1b durchgeführt, welche alle von der TU Berlin angeliefert wurden. Die Böden mit der Herkunftsbezeichnung CW stammen von einem Gaswerksgelände, wobei CWPAK1a das Ausgangsmaterial, CWPAK1b die durch Bodenwäsche abgetrennte und "gereinigte" Sandfraktion und CWPAK1c die Reststofffraktion mit den aufkonzentrierten Schadstoffen bezeichnet. Die in Tab. 3 zusammengefassten Daten der analytischen Bestimmungen belegen, dass neben den PAK besonders in der Bodenprobe CWPAK1c erhöhte Gehalte an MKW, EOX und Schwermetallen als Begleitkontaminationen zu verzeichnen sind. Die bei allen Parametern geringste Belastung wurde erwartungsgemäß für die Probe CWPAK1b festgestellt.

Tab. 3: Chemisch/analytische Charakterisierung von PAK-belasteten Böden (CWPAK- und SPAK-Proben)

Parameter [mg/kg]	Boden CWPAK1a	Boden CWPAK1b	Boden CWPAK1c	Boden SPAK1a	Boden SPAK1b
Σ PAK nach EPA	141	12,5	344	589	12,0
Σ PAK nach TVO	81,6	5,6	162	135	6,1
Σ Methylnaphth.	n.b.	n.b.	n.b.	2,2	0,5
Σ BTEX	59,3	< 0,05	0,14	0,1	n.b.
MKW	340	110	2900	230	n.b.
Phenolindex	< 1,0	n.b.	n.b.	2,1	n.b.
Cyanid (gesamt)	78	4,5	17	< 0,1	< 0,1
EOX	< 1,0	< 1,0	4,9	n.b.	n.b.
Arsen	8,0	5,0	14	130	130
Blei	36 ¹	26 ¹	250¹	10	17
Cadmium	7,1¹	1,7 ¹	4,9¹	1,1	0,5
Chrom	17 ¹	5,6 ¹	200 ¹	620	490
Kupfer	43 ¹	19 ¹	96 ¹	3	14
Nickel	40 ¹	17 ¹	74 ¹	5	20
Quecksilber	0,3	0,4	3,4	0,1	< 0,1
Zink	145 ¹	92 ¹	560¹	30	97
TOC [%]	3,3	0,2 ¹	4,3 ¹	0,7	4,9

¹Analysen übernommen von TU Berlin (Projektkoordination);
n.b. = nicht bestimmt

Bei dem Boden SPAK1a handelt es sich um PAK-belastetes Ausgangsmaterial von einem Imprägnierwerk, welches nach biologischer Behandlung (Humifizierung) als Boden SPAK1b in das Untersuchungsprogramm aufgenommen wurde. Der Boden SPAK 1a weist neben den PAK eine erhebliche Chrom-Belastung auf, welche erwartungsgemäß auch in dem biologisch behandelten Boden SPAK1b in vergleichbarer Größenordnung nachweisbar ist. Bemerkenswert ist weiterhin der mit 4,9 % deutlich erhöhte TOC-Gehalt von Boden SPAK1b, welcher auf die Zumischung von C_{org} -reichen Zuschlagsstoffen im Zuge der biologischen Behandlung hindeutet.

5.1.3 MKW-belastete Böden

Bezüglich der Schadstoffklasse der Mineralölkohlenwasserstoffe (MKW) wurden im wesentlichen Untersuchungen mit den belasteten Böden OMKW1a, BMKW1a, SPMKW1, LMKW2 und LMKW3 durchgeführt. Die entsprechenden unbelasteten, standortspezifischen Kontrollböden OMKW0 und BMKW0 sind in Kap. 5.1.1 behandelt. Der SPMKW-Boden und die LMKW-Böden wurden freundlicherweise von der RWTH Aachen zur Verfügung gestellt. Die OMKW- und BMKW-Böden wurden über die TU-Berlin (Projektkoordination) angeliefert. Die Böden wurden einer eingehenden chemisch/analytischen Charakterisierung unterzogen. Die wichtigsten Analysendaten sind Tab. 4 zu entnehmen.

Die MKW-belasteten Böden weisen Mineralölgehalte zwischen 670 mg/kg (LMKW3) und 4.400 mg/kg (BMKW1a) auf. Von den analytisch erfassten Begleitkontaminationen weisen nur die Böden LMKW3 (PAK), LMKW2 (BTEX) und OMKW1a (Blei) leicht erhöhte Werte auf. Zur weiteren Charakterisierung der Kohlenwasserstoffe wurde zusätzlich die Siedebereichsverteilung der MKW mittels Gaschromatographie bestimmt. Die MKW-Kontaminationen der Böden werden wie folgt charakterisiert:

- OMKW1a: stark modifizierte Diesel-Kontamination oder Kontamination mit leichtem Heizöl, Siedebereichsverteilung der n-Alkane C12-C20, sehr geringer n-Alkan-Anteil.
- BMKW1a: stark modifizierte Mischkontamination aus Diesel oder leichtem Heizöl sowie geringem Schmierölanteil, Siedebereichsverteilung der n-Alkane C10-C27, sehr geringer n-Alkan-Anteil.
- SPMKW1: modifizierte Diesel-Kontamination oder Kontamination mit leichtem Heizöl, Siedebereichsverteilung der n-Alkane C10-C23, geringer n-Alkan-Anteil.
- LMKW2: modifizierte Mischkontamination aus Kerosin oder Benzin, Diesel und Schmieröl, Siedebereichsverteilung der n-Alkane C10-C30, moderater n-Alkan-Anteil.
- LMKW3: stark modifizierte Schmieröl-Kontamination, Siedebereichsverteilung der n-Alkane C18-C27, sehr geringer n-Alkan-Anteil.

Tab. 4: Chemisch/analytische Charakterisierung der MKW-belasteten Böden

Parameter [mg/kg]	Boden OMKW1a	Boden BMKW1a	Boden SPMKW1	Boden LMKW2	Boden LMKW3
Σ PAK nach EPA	0,87	4,55	3,61	4,70	28,5
Σ PAK nach TVO	0,18	2,51	2,20	2,20	13,5
Σ BTEX	< 0,05	< 0,05	< 0,05	8,3	< 0,05
MKW	1000	3700	4400	1160	670
Phenolindex	< 0,10	< 0,10	< 0,10	0,40	0,45
Cyanid (gesamt)	< 0,1	0,4	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Arsen	7,0	7,0	3,0	5,0	14
Blei	370	52	59	49	46
Cadmium	< 0,1	0,1	0,2	< 0,1	< 0,1
Chrom	39	32	7,0	18	58
Kupfer	43	53	26	n.b.	n.b.
Nickel	13	9	6,0	17	34
Quecksilber	0,2	0,4	0,3	0,1	0,4
Zink	66	120	62	133	100
TOC [%]	1,4	2,1	0,97	0,91	2,5

n.b. = nicht bestimmt

5.1.4 TNT-belastete Böden

Im Rahmen des Projektes wurden Untersuchungen mit TNT-belasteten Bodenproben von 3 verschiedenen Standorten durchgeführt. Vom Standort "Werk Tanne" in Clausthal-Zellerfeld stammen die mit Nitroaromaten belasteten Böden CTNT1a und CTNT4a, wobei letztere Probe nach Durchlaufen eines biologischen Sanierungsverfahrens als CTNT4b geführt wird. Die Bodenprobe CTNT02a stellt eine weitgehend unbelastete Kontrolle vom Standort dar, welche nach Behandlung durch o. g. Sanierungsverfahren als behandelte Kontrolle die Bezeichnung CTNT04b trägt. Von einem anderen Standort stammen die LTNT-Böden, wobei Boden 1a das kontaminierte Ausgangsmaterial und die Böden 1b und 1c die Sandfraktion bzw. die Feinkornfraktion aus der Bodenwäsche darstellen. Die Böden HTNT1 und HTNT2 stammen von einem dritten ehemaligen Rüstungsstandort.

Die erhobenen Analysendaten sind in Tab. 5 und Tab. 6 zusammengefasst.

Tab. 5: Chemisch/analytische Charakterisierung der TNT-belasteten Böden (CTNT-Proben)

Parameter [mg/kg]	Boden CTNT1a	Boden CTNT02a	Boden CTNT04b	Boden CTNT4a	Boden CTNT4b
∑ PAK nach EPA	8,4	0,7 ¹	2,7 ¹	32	28
∑ PAK nach TVO	4,8	0,4 ¹	1,5 ¹	17	14
2,4,6-TNT	1300	< 0,1 ¹	< 0,1	3100¹	0,3
∑ Nitrotoluole ²	0,4	0,1 ¹	< 0,1	0,2 ¹	< 0,1
∑ Dinitrotoluole ³	24	< 0,1 ¹	< 0,2	1,5 ¹	< 0,2
Nitrobenzol	0,04	< 0,1 ¹	< 0,2	< 0,1 ¹	< 0,2
∑ Dinitrobenzole ⁴	6,7	< 0,1 ¹	< 0,2	0,4 ¹	< 0,2
1,3,5-Trinitrobenzol	2,2	< 0,1 ¹	< 0,1	1,8 ¹	< 0,1
∑ Aminodinitrotoluol ⁵	n.b.	< 0,1 ¹	< 0,1	560¹	< 0,1
Arsen	17	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Blei	210	490¹	431¹	1000¹	772¹
Cadmium	1,3	0,9 ¹	2,3 ¹	4,6 ¹	4,0 ¹
Chrom	39	21 ¹	24 ¹	25 ¹	32 ¹
Kupfer	93	24 ¹	49 ¹	84 ¹	83 ¹
Nickel	26	17 ¹	16 ¹	27 ¹	24 ¹
Quecksilber	0,7	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Zink	750	202 ¹	375 ¹	920¹	747¹
TOC [%]	2,9	6,3 ¹	10,0	5,6 ¹	7,7

¹ Analysen übernommen von TU Berlin (Projektkoordination)

² 2-; 3-; 4-Nitrotoluol;

³ 2,3-; 2,4-; 2,6-; 3,4-Dinitrotoluol

⁴ 1,2-; 1,3-; 1,4-Dinitrobenzol;

⁵ 2-Amino-4,6-Dinitrotoluol, 4-Amino-2,6-Dinitrotoluol

n.b. = nicht bestimmt

Die Analysendaten weisen die Böden CTNT 1a und 4a als erheblich und die Böden HTNT1 und HTNT2 als drastisch mit sprengstoffbürtigen Nitroaromaten kontaminiert aus, wobei in allen Fällen 2,4,6-TNT die Hauptkontaminante darstellt. Es wurden jedoch teils auch erheblich Gehalte an Aminodinitrotoluolen (CTNT4a) bzw. Dinitrotoluolen und -benzolen (HTNT1) nachgewiesen. Die Böden HTNT1 und 2 sind zusätzlich mit PAK, Blei und Zink (nur HTNT1) belastet. Der biologisch behandelte Boden CTNT4b sowie die Referenzböden

CTNT02a und CTNT02b sind bezüglich der Nitroaromatenbelastung als unkontaminiert einzustufen. Auch der Boden LTNT1a ist erheblich mit sprengstoffbürtigen Nitroaromaten kontaminiert, wobei neben 2,4,6-TNT die Aminodinitrotoluole (ANT) als Hauptkontaminanten auftreten. Die Bodenwaschfraktionen LTNT1b und LTNT1c weisen deutlich niedrigere TNT-Gehalte auf, wobei sich LTNT1c wiederum durch einen erheblichen ANT-Gehalt auszeichnet. Bemerkenswert ist weiterhin der bei LTNT1c mit 22% deutlich erhöhte TOC-Gehalt im Boden.

Tab. 6: Chemisch/analytische Charakterisierung der TNT-belasteten Böden (LTNT- und HTNT-Proben)

Parameter [mg/kg]	Boden LTNT1a	Boden LTNT1b	Boden LTNT1c	Boden HTNT 1	Boden HTNT 2
Σ PAK nach EPA	n.b.	n.b.	n.b.	106	918
Σ PAK nach TVO	n.b.	n.b.	n.b.	48	443
2,4,6-TNT	350	42	30	13400	13800
Σ Nitrotoluole ¹	< 0,05	< 0,05	< 0,05	9,7	40
Σ Dinitrotoluole ²	0,17	0,09	0,19	3715	345
Nitrobenzol	< 0,05	< 0,05	< 0,05	6,2	3,2
Σ Dinitrobenzole ³	0,10	0,05	0,07	398	84
1,3,5-Trinitrobenzol	< 0,05	< 0,05	< 0,05	69	12
Σ Aminodinitrotoluol ⁴	46	1,61	119	n.b.	n.b.
Arsen	5,0	3,0	8,0	18	19
Blei	29	75	140	4500	570
Cadmium	0,1	< 0,1	0,6	0,5	0,5
Chrom	19	5,0	23	40	20
Kupfer	19	21	47	30	17
Nickel	4,0	3,0	12	33	14
Quecksilber	0,2	< 0,1	0,6	2,5	2,4
Zink	41	31	120	410	110
TOC [%]	1,2	0,07	22	n.b.	n.b.

¹ 2-; 3-; 4-Nitrotoluol;

² 2,3-; 2,4-; 2,6-; 3,4-Dinitrotoluol

³ 1,2-; 1,3-; 1,4-Dinitrobenzol;

⁴ 2-Amino-4,6-Dinitrotoluol, 4-Amino-2,6-Dinitrotoluol

n.b. = nicht bestimmt

5.2 Untersuchungen zur Optimierung der Testdurchführung

Im Zuge der Fehleranalyse und Methodenentwicklung für die Anwendung der in den Norm(entwürfen) für die Testung von Wasser/Abwasser weitgehend festgelegten Testprotokolle auf Bodeneluat ergaben sich für alle eingesetzten Testsysteme mit Ausnahme des Leuchtbakterientests und des Daphnien-Tests verfahrensspezifische Schwierigkeiten, welche die Erarbeitung von spezifischen Lösungskonzepten erforderlich machen. Hier sind insbesondere zu nennen:

1. Sorptionsverluste von Schadstoffen bei der Probenaufarbeitung (insbesondere Filtration),
2. bakterielle Verunreinigungen im Bodeneluat als Störfaktor (Ames-Test),
3. Sorptionsverluste von Schadstoffen bei der Durchführung der miniaturisierten Tests (umu-Test, Leuchtbakterien-Wachstumshemmtest),
4. mögliche Förderung des Algenwachstums durch Eluatbestandteile und
5. Stabilität und Aktivität des Rattenleberhomogenats (S9-Fraktion) zur Simulation der metabolischen Aktivierung von Promutagenen beim Ames- und umu-Test.

Die ersten beiden Problempunkte wurden durch Abstimmung und Übernahme des Probenaufbereitungsprotokolls der FHG-IUCT Schmalleben (Kap. 4.1) und routinemäßige Referenzbestimmung der Zellzahl an Bakterien im Eluat für den Ames-Test gelöst. Das Auftreten von Sorptionsverlusten (3. Position) wurde durch die ausschließliche Verwendung von Microtiterplatten aus Glas minimiert (Kap. 4.2, 4.3).

Im Rahmen des Projektes wurde eine mögliche Förderung des Algenwachstums (Pos. 4) durch natürliche Eluatbestandteile (u. a. Fe, DOC) aufgezeigt, so dass eine Überlagerung von aktivierenden und hemmenden Einflüssen nicht auszuschließen ist. Der Algentest ist jedoch weiterhin trotz der aufgezeigten möglichen Stimulation des Wachstums durch Bodeneluat aufgrund seines fortgeschrittenen Standardisierungs- und Validierungsstandes (vergl. Kap. 6) als integraler Bestandteil der ökotoxikologischen Testbatterie zur Beurteilung der Bodenrückhaltefunktion anzusehen.

Weiterhin wurde im Rahmen von umfangreichen Untersuchungen die Möglichkeit einer partiellen Inaktivierung, jedoch keinesfalls einer vollständigen Hemmung, des S9-Mixes durch komplex zusammengesetzte Bodeneluat aufgezeigt. Die Anwendbarkeit des für die genotoxikologische Bewertung komplexer Proben (hier Bodeneluat) mittels in vitro-Tests notwendigen S9-Mix ist zusammenfassend jedoch nach gegenwärtigem Kenntnisstand nicht prinzipiell in Frage gestellt.

5.3 Ökotoxikologische Untersuchung der Bodeneluat

In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse der ökotoxikologischen Untersuchungen, welche mit den in Kap. 4.2 beschriebenen Testverfahren erzielt wurden, aufgeführt. Dabei werden die untersuchten unbelasteten Referenzböden und belasteten Böden entsprechend ihren jeweiligen Hauptkontaminanten zusammenfassend in Unterkapiteln behandelt. Die Bewertung der ökotoxikologischen Befunde erfolgte zunächst entsprechend den Empfehlungen der DECHEMA [15] (vergl. Kap. 4.2). Es wurde generell ein Abgleich der ökotoxikologischen Befunde mit den in den Eluat bestimmten Konzentrationen an

relevanten organischen und anorganischen Schadstoffen durchgeführt. Die Parameterauswahl für die chemische Analytik erfolgte anhand der im Feststoff bestimmten Kontaminanten (Kap. 5.2). Durch das Aufzeigen einer Korrelation zwischen ökotoxikologischem Potential und mobilisierbaren Schadstoffgehalten wurde ein Beitrag zur Validierung der Biotests und der Bewertungsstrategie angestrebt.

5.3.1 Unbelastete Referenzböden

Die Untersuchung der weitgehend unbelasteten Referenzböden diene dem Zweck, mögliche Matrixeffekte durch natürliche, lösliche Bodenbestandteile aufzuzeigen, somit mögliche "falsch-positive" Ergebnisse zu erkennen und den Rahmen für die Ergebnisbewertung der einzelnen Testsysteme abzusichern bzw. neu festzulegen.

Bei den 7 im Rahmen des Projektes untersuchten unbelasteten Referenzböden wurde bei der Bewertung entsprechend DECHEMA-Broschüre [15] keine erhöhte Ökotoxizität bezüglich der Bodenrückhaltefunktion und somit keine falsch-positiven Ergebnisse erzielt. Beim Algen-Test, Daphnien-Test und Leuchtbakterien-Wachstumshemmtest wurden durchgehend G-Werte von 1 und damit keinerlei Effekte festgestellt, während beim Leuchtbakterien-Test in 2 Fällen bei G-Werten von 3-4 die Überprüfung durch den Wachstumshemmtest zur Bewertung "nicht toxisch" führte.

Zur weitergehenden Absicherung wurden bereits bei DMT vorliegende Daten mit weiteren unbelasteten Referenzböden in die Auswertung integriert. Mit bislang insgesamt 15 ausgewerteten Referenzböden (n=9 beim Leuchtbakterien-Wachstumshemmtest) wurden bei Bewertung entsprechend [15] folgende Ergebnisse erhalten:

Leuchtbakterientest:	15 von 15 Proben G_L -Wert = 1-6	→ nicht toxisch
Leuchtbakterienwachstumshemmtest:	9 von 9 Proben G_{LW} -Wert = 1-2	→ nicht toxisch
Daphnien-Test:	15 von 15 Proben G_D -Wert = 1-4	→ nicht toxisch
Algen-Test:	14 von 15 Proben G_A -Wert = 1-4 1 von 15 Proben G_A -Wert = 6	→ nicht toxisch → toxisch

Die Ergebnisauswertung zeigt zusammenfassend, dass die eingesetzte ökotoxikologische Testbatterie zur Bewertung der Bodenrückhaltefunktion nur in einem von 15 untersuchten unbelasteten Böden, bedingt durch das Ergebnis des Algen-Tests mit $G_A = 6$, ein "falsch" positives Ergebnis liefert. Bei diesem Boden handelt es sich um einen landwirtschaftlich genutzten und somit stark anthropogen beeinflussten (Düngung) Pseudogley, wodurch das Ergebnis im Algen-Test zu relativieren ist.

Es bleibt somit festzuhalten, dass sich die von der DECHEMA vorgeschlagenen Grenzwerte (Verdünnungsstufen) für die einzelnen Testsysteme zur Unterscheidung von "toxischen" und "nicht toxischen" Bodeneluataten mit Bezug auf die untersuchten Referenzböden weitgehend abgesichert sind.

5.3.2 PAK-belastete Böden

Die Ergebnisse der ökotoxikologischen Untersuchungen sind in Tab. 7 für die EPAK-Böden und in Tab. 8 für die CWPAK- und SPAK-Böden zusammen mit den im wässrigen Eluat bestimmten chemisch/analytischen Parameter aufgeführt.

Tab. 7: Ergebnisse der ökotoxikologischen Untersuchungen der Eluate PAK-belasteter Böden (EPAK-Böden)

Parameter		Boden EPAK 2a	Boden EPAK 2b	Boden EPAK 3a	Boden EPAK 3b	Boden EPAK 4a	Boden EPAK 4b
PAK (EPA)	[$\mu\text{g/l}$]	3,03	1,09	29,6	12,4	1860	10,8
Cyanid	[$\mu\text{g/l}$]	50	40	20	50	< 10	< 10
DOC	[mg/l]	33	12	15	15	60	28
Leuchtbakterien-Hemmtest	[G_L]	7	1	4	2	54	5
Leuchtbakterien-Wachstumshemmtest	[G_{LW}]	1	1	1	1	4	2
Daphnien-Test	[G_D]	1	2	3	2	2	2
Algen-Test	[G_A]	128	32	24	64	4	1
Bewertung Ökotoxikologie ¹		toxisch	toxisch	toxisch	toxisch	toxisch	nicht toxisch

¹ Entsprechend DECHEMA [15]

Das Eluat des PAK-belasteten Ausgangsmaterials EPAK4a wird aufgrund des stark erhöhten G_L -Wertes im Leuchtbakterientest als toxisch bewertet, wobei dieser Befund mit einem sehr hohen Gehalt an über den Wasserpfad mobilisierbaren PAK korreliert. Die biologische Behandlung dieses Bodens im BIODYN-Suspensionsreaktor führt zu einer drastischen Reduzierung des PAK-Gesamtgehaltes (Tab. 2) und der mobilisierbaren Schadstofffraktion, was mit einer Abnahme der Leuchtbakterien-Toxizität auf nicht mehr kritische Werte korreliert. Die Böden EPAK2a, 2b, 3a und 3b zeigen hingegen bei geringen bis allenfalls moderaten PAK-Eluat-Gehalten ein erhebliches, auf Begleitkontaminationen hindeutendes, ökotoxikologisches Potential im Algen-Test. Daraufhin durchgeführte umfangreiche chemisch/analytische Bestimmungen zeigten u.a. geringe Konzentrationen an Cyaniden in den o.g. Bodeneluat auf. Da der Testorganismus *Scenedesmus subspicatus* sehr empfindlich auf Cyanid reagiert (der EC_{20} -Wert wurde für freies Cyanid auf < 10 $\mu\text{g/l}$ bestimmt), kann die in den Eluaten der Böden EPAK2a, EPAK2b, EPAK3a und EPAK3b bestimmte Algen-Toxizität zumindest teilweise auf über den Wasserpfad mobilisierbares Cyanid zurückgeführt werden.

Tab. 8: Ergebnisse der ökotoxikologischen Untersuchungen der Eluate PAK-belasteter Böden (CW- und SPAK-Böden)

Parameter		Boden CWPAK1a	Boden CWPAK1b	Boden CWPAK1c	Boden SPAK1a	Boden SPAK1b
PAK (EPA)	[$\mu\text{g/l}$]	15,1	67,5	30,5	248	32,1
Kohlenwasserstoffe	[mg/l]	< 0,1	< 0,1	< 0,1	n.b.	n.b.
EOX	[$\mu\text{g/l}$]	70	60	20	n.b.	n.b.
Cyanid	[$\mu\text{g/l}$]	3400	300	1100	< 10	< 10
Σ Schwermetalle ¹	[$\mu\text{g/l}$]	421	160	210	10400	17800
DOC	[mg/l]	50	15	90	270	1.208
Leuchtbakterien- Hemmtest	[G _L]	6	5	7	91	38
Leuchtbakterien- Wachstums- hemmtest	[G _{LW}]	1	1	1	1	1
Daphnien-Test	[G _D]	2	1	1	3	1
Algen-Test	[G _A]	32	4	8	384	4
Bewertung Ökotoxikologie ²		toxisch	nicht toxisch	toxisch	toxisch	toxisch

¹ Σ Schwermetalle nach AbfKlärV+Arsen

² Entsprechend DECHEMA [15]

n.b. = nicht bestimmt

Die Bodenproben CWPAK1a (Ausgangsmaterial) und 1c (Reststofffraktion Bodenwäsche) wurden anhand der Ergebnisse des Algen-Tests als "toxisch" eingestuft. Dieser Befund korreliert mit stark erhöhten Cyanid-Gesamtgehalten im Eluat, welche nur vom Testorganismus *Scenedesmus subspicatus* empfindlich detektiert werden (siehe oben). Bei den Bodenproben CWPAK1a und 1c ist andererseits unter Berücksichtigung der hohen PAK-Gehalte im Feststoff (141 mg/kg bzw. 344 mg/kg, Tab. 3) die geringe PAK-Konzentration im Eluat (15,1 $\mu\text{g/l}$ bzw. 30,5 $\mu\text{g/l}$, Tab. 8) auffällig. Bei den CWPAK-Proben sind aus ökotoxikologischer Sicht somit nicht die PAK als Hauptkontaminanten entscheidend, sondern die bioverfügbare Cyanid-Fraktion. Aus diesem Ergebnis ist der Nutzen einer ökotoxikologischen Bewertung der Bodenrückhaltefunktion eindeutig ersichtlich, da Cyanide im Rahmen der routinemäßig durchgeführten chemischen Analytik i. d. R. nicht erfasst werden.

Als Ursache für die geringe Verfügbarkeit der organischen Schadstoffe in der Probe CWPAK1a wurde deren sorptive Festlegung an die Bodenmatrix, insbesondere an Koks, Pechkoks und Petrolkokspartikel, aufgezeigt.

Der Boden SPAK1a (Ausgangsmaterial) weist einen hohen mobilisierbaren PAK-Gehalt im Eluat auf. Entsprechend wurden im Leuchtbakterien-Hemmtest und im Algen-Test stark erhöhte G-Werte aufgezeigt, die zudem auf Begleitkontaminationen hinweisen, welche zumindest teilweise auch chemisch/analytisch in Form von Schwermetallen (Chrom und Arsen) nachgewiesen werden konnten. Der durch eine Humifizierungstechnik biologisch behandelte Boden SPAK1b weist trotz deutlicher Reduzierung der mobilisierbaren PAK-Gehalte im Leuchtbakterientest mit $G_L = 38$ noch ein erhebliches ökotoxikologisches Gefährdungspotential auf. Dies kann auf analytisch erfasste (Chrom, Arsen) oder nicht analysierte Begleitkontaminationen hinweisen. Weiterhin ist bei Boden SPAK1b zu beachten, dass dieser für die Biosanierung mit Zuschlagstoffen (28 % w/w Kompost) versetzt wurde, was im Vergleich zum Ausgangsmaterial SPAK1a zu einer drastischen Erhöhung des Boden-TOC (Tab. 3) und des DOC im Eluat (1.208 mg/l, Tab. 8) führte. Somit ist nicht auszuschließen, dass der durch den Zuschlagsstoff eingebrachte eluierbare Kohlenstoff (DOC) zu einer unspezifischen Hemmreaktion im Leuchtbakterientest führt, wie sie auch für andere extrem DOC-haltige Eluate beobachtet wurde. Eine Klärung ist hier und in vergleichbaren Fällen nur durch eine zusätzliche Kontrolluntersuchung des Kompostmaterials herbeizuführen.

5.3.3 MKW-belastete Böden

Für die Untersuchungen wurden die unter 5.1.3 näher charakterisierten MKW-belasteten Böden eingesetzt. Die Ergebnisse der mit den entsprechenden Eluaten durchgeführten ökotoxikologischen Untersuchungen und chemisch/analytischen Bestimmungen sind Tab. 9 zu entnehmen.

Bei 3 von insgesamt 5 untersuchten MKW-belasteten Böden wurden mit dem Leuchtbakterien-Hemmtest bei G_L -Werten > 8 positive Befunde bezüglich der Möglichkeit eines Schadstoffaustrags über den Wasserpfad erhalten. Diese Ergebnisse wurden analytisch durch Bestimmung des MKW-Gehaltes in den Eluaten bestätigt und belegen erhebliche Unterschiede im Mobilitätsverhalten der MKW in den untersuchten Böden. Weiterhin deuten die doch deutlich erhöhten G_L -Werte bei den Böden SPMKW1 und LMKW2 auf mobilisierbare Begleitkontaminationen hin, welche bei Boden SPMKW1 chemisch/analytisch in Form von Schwermetallen (Blei, Kupfer, Zink) und PAK nachgewiesen wurden. Auffällig erscheint, dass mit dem Daphnien- und Algen-Test bei G-Werten von 1 keinerlei toxische Effekte festzustellen waren, was auf eine geringe Empfindlichkeit dieser Biotests gegenüber MKW-Kontaminationen schließen lässt.

Tab. 9: Ergebnisse der ökotoxikologischen Untersuchungen der Eluate MKW-belasteter Böden

Parameter		Boden OMKW1a	Boden BMKW1a	Boden SPMKW1	Boden LMKW2	Boden LMKW3
PAK (EPA)	[$\mu\text{g/l}$]	n.b.	0,28	32,5	n.b.	0,30
Kohlenwasserstoffe	[mg/l]	< 0,1	0,2	0,1	0,1	< 0,1
Σ BTEX	[$\mu\text{g/l}$]	n.b.	n.b.	< 0,5	6,3	< 0,5
Cyanid	[$\mu\text{g/l}$]	< 10	10	< 10	< 10	< 10
Σ Schwermetalle ¹	[$\mu\text{g/l}$]	42	80	1191	n.b.	n.b.
DOC	[mg/l]	35	55	142	60	83
Leuchtbakterien- Hemmtest	[G _L]	3	8	21	16	4
Leuchtbakterien- Wachstums- hemmtest	[G _{LW}]	2	4	1	1	1
Daphnien-Test	[G _D]	1	1	1	1	1
Algen-Test	[G _A]	1	1	1	1	1
Bewertung Ökotoxikologie ²		nicht toxisch	toxisch	toxisch	toxisch	nicht toxisch

¹ Σ Schwermetalle nach AbfklärV+Arsen

² Entsprechend DECHEMA [15]

n.b. = nicht bestimmt

5.3.4 TNT-belastete Böden

Die Ergebnisse der ökotoxikologischen Untersuchungen sind in Tab. 10 für die CTNT-Böden und in Tab. 11 für die LTNT- und HTNT-Böden zusammen mit den im wässrigen Eluat bestimmten chemisch/analytischen Parameter aufgeführt.

Die untersuchten TNT-belasteten Böden CTNT1a und CTNT4a vom Standort "Werk Tanne" weisen in Korrelation mit hohen Nitroaromaten-Gehalten in den Eluaten und in Übereinstimmung mit Untersuchungen an anderen TNT-belasteten Böden in allen Testsystemen eine stark erhöhte Ökotoxizität auf. Bei dem biologisch behandelten Boden CTNT4b, welcher keine nennenswerten TNT-Gehalte im Feststoff mehr aufweist (Tab. 5), ist bei allen Testsystemen eine deutliche Verringerung der G-Werte zu verzeichnen. Bezüglich der jedoch weiterhin deutlich über der Bewertungsgrenze liegenden G-Werte im Leuchtbakterien- und Algen-Test ist wiederum auf mögliche unspezifische Effekte durch den hohen DOC im Eluat (3.660 mg/l) zu verweisen, welcher auf den Zusatz von erheblichen Mengen an organischen Zuschlagsstoffen im Zuge der biologischen Behandlung zurückzuführen sein wird.

Tab. 10: Ergebnisse der ökotoxikologischen Untersuchungen der Eluate Nitroaromaten-belasteter Böden (CTNT-Proben)

Parameter		Boden CTNT1a	Boden CTNT02a	Boden CTNT04b	Boden CTNT4a	Boden CTNT4b
2,4,6-Trinitrotoluol	[$\mu\text{g/l}$]	43000	3,6	< 0,1	63000	< 0,1
Σ Nitroaromaten ²	[$\mu\text{g/l}$]	200	< 0,1	< 0,1	84,2	< 0,1
Cyanid	[$\mu\text{g/l}$]	< 10	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Σ Schwermetalle ¹	[$\mu\text{g/l}$]	2710	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
DOC	[mg/l]	181	55	1220	125	3660
Leuchtbakterien-Hemmtest	[G _L]	260	2	16	190	160
Leuchtbakterien-Wachstumshemmtest	[G _{LW}]	256	2	1	> 24	1
Daphnien-Test	[G _D]	8	1	2	8	2
Algen-Test	[G _A]	> 512	1	4	> 256	32
Bewertung Ökotoxikologie ³		toxisch	nicht toxisch	? toxisch	toxisch	? toxisch

¹ Σ Schwermetalle nach AbfKlärV+Arsen

² 2-; 3-; 4-Nitrotoluol, 2,3-; 2,4-; 2,6-; 3,4-Dinitrotoluol, 1,2-; 1,3-; 1,4-Dinitrobenzol

³ Entsprechend DECHEMA [15]

n.b. = nicht bestimmt

Zur weitergehenden ökotoxikologischen Charakterisierung des biologischen Sanierungsverfahrens wurde die unbelastete Referenzprobe CTNT02a von dem Verfahrensanbieter in vergleichbarer Weise wie die TNT-belastete Probe CTNT4a behandelt und dem Forschungsverbund als Probe CTNT04b zur Verfügung gestellt. Zunächst ist jedoch festzustellen, dass in Übereinstimmung mit den in Kap. 5.3.1 dargestellten Ergebnissen bei dem unbelasteten Referenzboden CTNT02a kein erhöhtes ökotoxikologisches Potential bezüglich der Bodenrückhaltefunktion und somit kein "falsch-positives" Ergebnis ermittelt wurde. Die mittels Kompostierverfahren behandelte Probe CTNT04a weist hingegen im Leuchtbakterien-Hemmtest bei $G_L=16$ eine erhöhte Toxizität auf. Dieser Befund ist korreliert mit einer drastischen Erhöhung des eluierbaren DOC von 55 mg/l auf 1.220 mg/l (Tab. 10). Somit erscheint es wahrscheinlich, dass der durch den Zuschlagsstoff eingebrachte eluierbare Kohlenstoff zu einer unspezifischen Hemmreaktion der Leuchtbakterien geführt hat, wie sie auch für andere extrem DOC-haltige Bodeneluate beobachtet wurde (z. B. Boden SPAK1b, Kap. 5.3.2). Eine endgültige Klärung ist auch hier jedoch nur durch Untersuchung der Zuschlagsstoffe mit den relevanten Testverfahren möglich.

Die untersuchten TNT-belasteten Böden LTNT1a und 1b weisen in allen Testsystemen eine stark erhöhte Ökotoxizität auf, wobei TNT und die analytisch erfassten Aminonitrotoluole (ANT) bei Boden LTNT1b durch die Elution nahezu vollständig mobilisiert wurden. Für den

Boden LTNT1c (Feinstkornfraktion aus der Bodenwäsche) wurde hingegen kein akutes Gefährdungspotential bezüglich einer Schadstoffausbreitung über den "Wasserpfad" ermittelt, was auf eine sorptive Festlegung der Schadstoffe im Boden hindeutet (erhöhter TOC-Gehalt, vergl. Kap. 5.1.4). Wie schon für PAK und MKW aufgezeigt, kann somit auch im Fall von sprengstoffbürtigen Kontaminanten die Bodenmatrix eine stark verminderte Verfügbarkeit für den "Wasserpfad" und damit eine Verringerung des ökotoxikologischen Potentials bewirken.

Tab. 11: Ergebnisse der ökotoxikologischen Untersuchungen der Eluate Nitroaromaten-belasteter Böden (LTNT- und HTNT-Proben)

Parameter		Boden LTNT1a	Boden LTNT1b	Boden LTNT1c	Boden HTNT1	Boden HTNT2
2,4,6-Trinitrotoluol	[$\mu\text{g/l}$]	13000	20000	170	67000	57000
Σ Nitroaromaten ²	[$\mu\text{g/l}$]	37,0	10,1	2,1	302000	9300
Σ Aminonitroaromaten ³	[$\mu\text{g/l}$]	8100	1060	0,11	n.b.	n.b.
PAK (EPA)	[$\mu\text{g/l}$]	n.b.	n.b.	n.b.	6,36	81,2
Cyanid	[$\mu\text{g/l}$]	n.b.	n.b.	n.b.	40	20
Σ Schwermetalle ¹	[$\mu\text{g/l}$]	n.b.	n.b.	n.b.	3890	1160
DOC	[mg/l]	85	35	180	238	101
Leuchtbakterien-Hemmtest	[G _L]	430	76	5	430	290
Leuchtbakterien-Wachstumshemmtest	[G _{LW}]	128	64	1	> 256	> 512
Daphnien-Test	[G _D]	16	6	3	48	12
Algen-Test	[G _A]	96	12	1	1024	1536
Bewertung Ökotoxikologie ⁴		toxisch	toxisch	nicht toxisch	toxisch	toxisch

¹ Σ Schwermetalle nach AbfKlärV+Arsen

² 2-; 3-; 4-Nitrotoluol, 2,3-; 2,4-; 2,6-; 3,4-Dinitrotoluol, 1,2-; 1,3-; 1,4-Dinitrobenzol

³ 2-Amino-4,6-Dinitrotoluol, 4-Amino-2,6-Dinitrotoluol

⁴ Entsprechend DECHEMA [15]

n.b. = nicht bestimmt

Auch für die kontaminierten HTNT-Böden 1 und 2 wurde in allen Testsystemen eine drastisch erhöhte Ökotoxizität aufgezeigt, wobei sich der Daphnien-Test auch für sprengstoffbürtige Schadstoffe als mit Abstand am unempfindlichsten erwies. Für den Algen- und Leuchtbakterien-Wachstumshemmtest wurden hingegen mit die höchsten bislang bei DMT bestimmten G-Werte ermittelt. Diese Befunde weisen mit Bezug auf die Nachweisempfindlichkeit der Testsysteme gegenüber TNT (EC_{20} Leuchtbakterien-Wachstumshemmtest = 0,48 mg/l, EC_{20}

Algentest = 1,4 mg/l) auf erhebliche Begleitkontaminationen hin. Hierfür kommen neben den analytisch erfassten Schwermetallen und PAK (nur Boden HTNT2) vor allem die analytisch nur schwer nachweisbaren Abbauprodukte von TNT (z. B. Amino-Nitro-Toluole) in Betracht.

Anhand der mit sprengstoffbürtigen Nitroaromaten-belasteten Böden erzielten Ergebnisse bleibt zusammenfassend festzuhalten, dass bei derartigen Schadstoffen mit einer prinzipiell hohen Mobilität zu rechnen ist. Aufgrund der hohen Toxizität von TNT und besonders seiner möglichen Abbauprodukte ist hier mit teils drastischen ökotoxikologischen Befunden zu rechnen. Aufgrund der Vielzahl an möglichen Metaboliten, welche chemisch/analytisch bislang nur mit erheblichem Aufwand oder gar nicht zu erfassen sind, bietet sich hier besonders der Einsatz ökotoxikologischer Testverfahren zur Gefahrenermittlung an.

5.3.5 Bewertung der Ergebnisse zu den ökotoxikologischen Untersuchungen

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurden insgesamt 7 weitgehend unbelastete Referenzböden und 26 belastete Böden, welche PAK, MKW und/oder TNT als analytische erfasste Hauptkontaminanten aufwiesen, bezüglich ihrer Schadstoffrückhaltefunktion ökotoxikologisch untersucht. Ziel war es einerseits, die 4 eingesetzten Testsysteme mit Leuchtbakterien, Daphnien und Algen als Testorganismen auf ihre Einsetzbarkeit und Aussagekraft zu überprüfen und andererseits die von der DECHEMA [15] vorgeschlagene Strategie zur Bewertung der Ergebnisse zu validieren.

Die Ergebnisauswertung für die unbelasteten Referenzböden (Kap. 5.3.1) hat gezeigt, dass die Bewertungsfenster für die einzelnen Testsysteme für nicht-toxische Effekte mit $G = 1-4$ für den Algen- und Daphnien-Test, $G = 1-2$ für den Leuchtbakterien-Wachstumshemmtest und $G = 1-8$ für den Leuchtbakterientest mit Überprüfung im Bereich $G = 3-8$ durch den Wachstumshemmtest das Auftreten von "falsch-positiven" Ergebnissen weitgehend ausschließt. Andererseits kann aus den vorliegenden Ergebnissen auch keine Änderung der Bewertungsgrößen in Richtung niedrigere Verdünnungsstufen abgeleitet werden, so dass die o. g. Grenzwerte für toxische Effekte beibehalten werden sollten (siehe auch Kap. 6).

Die mit den 4 Biotests bei Untersuchung der kontaminierten Ausgangsmaterialien und behandelten Böden erzielten Ergebnisse sind in Tab. 12 zusammengefasst und ausgewertet. Dabei wurde für jeden Test die prozentuale Übereinstimmung der Ergebnisse mit der Gesamtbewertung und die Relevanz der einzelnen Ergebnisse für die Gesamtbewertung ermittelt.

Tab. 12: Übereinstimmung der Ergebnisse der einzelnen Testsysteme mit der ökotoxikologischen Gesamtbewertung für die untersuchten kontaminierten und behandelten Böden

Boden	Leucht- bakterien- Hemmtest	Leucht- bakterien- Wachstums- hemmtest	Daphnien- Test	Algen- Test	Ökotoxikologische Bewertung (Gefahr eines Schadstoffaustrages)
EPAK2a	(-)	-	-	+	gegeben
EPAK2b	-	-	-	+	gegeben
EPAK3a	(-)	-	-	+	gegeben
EPAK3b	-	-	-	+	gegeben
EPAK4a	+	-	-	-	gegeben
EPAK4b	-	-	-	-	gering
SPAK1a	+	-	-	+	gegeben
SPAK1b	+	-	-	-	gegeben
CWPAK1a	(-)	-	-	+	gegeben
CWPAK1b	(-)	-	-	-	gering
CWPAK1c	(-)	-	-	+	gegeben
OMKW1a	-	-	-	-	gering
BMKW 1a	(+)	+	-	-	gegeben
SPMKW1	+	-	-	-	gegeben
LMKW2	+	-	-	-	gegeben
LMKW3	-	-	-	-	gering
CTNT1a	+	+	+	+	gegeben
CTNT4a	+	+	+	+	gegeben
CTNT4b	+	-	-	+	gegeben
LTNT1a	+	+	+	+	gegeben
LTNT1b	+	+	+	+	gegeben
LTNT1c	-	-	-	-	gering
HTNT1	+	+	+	+	gegeben
HTNT2	+	+	+	+	gegeben
Übereinstimmung mit der Gesamtbewertung	75,0%	54,2%	45,8%	75,0%	
Ausschlaggebend für die Gesamtbewertung	20,8%	4,2%	0%	25,0%	

(+), (-) G_L -Wert 3-8, ökotoxikologische Bewertung erfolgt aufgrund des im Leuchtbakterien-Wachstumshemmtest erzielten Ergebnisses

Die Aufstellung zeigt, dass die Ergebnisse des Leuchtbakterientests und des Algen-Tests in 75 % der Fälle mit der ökotoxikologischen Gesamtbewertung übereinstimmt. Weiterhin sind die mit diesen beiden Tests ermittelten Ergebnisse in 20,8 % bzw. 25,0 % der Fälle alleine ausschlaggebend für die Gesamtbewertung, was sie als unverzichtbaren Bestandteil der Testbatterie zur Bewertung der Bodenrückhaltefunktion ausweist. Gleiches gilt für den Leuchtbakterien-Wachstumshemmtest, da dieser zumindest in 6 der 24 in Tab. 12 aufgeführten Fällen zur Validierung der Ergebnisse des Leuchtbakterientests unverzichtbar war. Die mit dem Daphnientest erzielten Ergebnisse waren hingegen in keinem Fall für die ökotoxikologische Gesamtbewertung ausschlaggebend. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich die Daphnien als Testorganismen bei den hier untersuchten Böden mit PAK, MKW und TNT als Hauptkontaminanten durchweg als vergleichsweise unempfindlich erwiesen haben. Da mit dem Daphnien-Test auch unter Einbeziehung von weiteren 18 belasteten Böden von Standorten des Kohlenwertstoffbereichs (PAK, BTEX und Schwermetalle als Hauptkontaminanten) im Rahmen der ökotoxikologischen Gesamtbewertung (Rückhaltefunktion) keine zusätzlichen Erkenntnisse erzielt wurden, erscheint sein Einsatz im Rahmen der Testbatterie bei den hier relevanten prioritären Schadstoffen nicht zwingend erforderlich. Diese Aussage ist jedoch bis zum Vorliegen weiterer Untersuchungsergebnisse nicht zu verallgemeinern bzw. nicht auf andere Schadstoffgruppen zu übertragen.

Bezüglich der Störanfälligkeit, Praktikabilität und Reproduzierbarkeit erwiesen sich alle im Rahmen des Vorhabens eingesetzten Biotests als prinzipiell geeignet zur Untersuchung von Bodeneluaten. Beim Leuchtbakterientest ist einschränkend anzumerken, dass es bei Testung von Bodeneluaten mit stark erhöhtem DOC zu einer unspezifischen Hemmung der Lumineszenz kommen kann, welche nicht auf Schadstoffeinflüsse, sondern auf leicht verwertbare C-Quellen zurückzuführen ist [4; 10]. Im Fall von Bodenproben ist immer dann mit einem stark erhöhten Anteil an mobilisierbarem Kohlenstoff zu rechnen, wenn im Zuge von biologischen Sanierungsmaßnahmen C_{org} -reiche Zuschlagsstoffe (z. B. Kompost) in erheblichen Mengen eingesetzt werden. Wie bereits für die biologisch behandelten Böden SPAK1b und CTNT04b diskutiert (Kap. 5.3.2, 5.3.4), ist bei diesbezüglichem Verdacht eine endgültige Klärung nur durch vergleichende Untersuchung der Zuschlagsstoffe möglich. Beim Algen-Test ist die bereits in Kap. 5.2 diskutierte mögliche Stimulierung des Algenwachstums durch eluierbare Bodenbestandteile anzuführen, wodurch es zur Überlagerung von stimulierenden (eutrophierenden) und hemmenden Effekten kommen kann, was aber die Anwendbarkeit und Aussagekraft dieses Tests nicht generell in Frage stellt.

Weiterhin ist abschließend hervorzuheben, dass bei allen untersuchten Böden mit Ausnahme des bereits mehrfach als Ausnahme erwähnten extrem DOC-reichen Eluates CTNT04b durch teils sehr umfangreiche chemisch/analytische Bestimmungen organische oder anorganische Schadstoffe identifiziert werden konnten, welche für die beobachteten ökotoxikologischen Effekte verantwortlich sein können. Damit konnte im Rahmen der hier relevanten Bodenproben und Schadstoffgruppen ein wichtiger Beitrag zur Validierung der Testsysteme und der Bewertungsstrategie zur ökotoxikologischen Beurteilung der Rückhaltefunktion von Böden erbracht werden.

5.4 Genotoxikologische Untersuchung der Bodeneluate

In den folgenden Abschnitten sind die Ergebnisse der genotoxikologischen Untersuchungen, welche mit dem umu-Test und dem Ames-Test gemäß den in Kap. 4.3 beschriebenen

Methoden erzielt wurden, aufgeführt. Dabei werden analog der Vorgehensweise bei den ökotoxikologischen Tests die untersuchten unbelasteten Referenzböden und belasteten Böden entsprechend ihren jeweiligen Hauptkontaminanten zusammenfassend in Unterkapiteln behandelt. Die Bewertung der genotoxikologischen Befunde erfolgte entsprechend den Vorgaben der DIN-Vorschriften [7; 8] (vergl. Kap. 4.3). Neben der Untersuchung von Bodeneluaten wurde im Rahmen von Vorversuchen die prinzipielle Empfindlichkeit der Testsysteme gegenüber der Schadstoffgruppe der PAK ermittelt (Kap. 5.4.2).

Im Zuge der Bewertung der genotoxikologischen Befunde wurde generell wiederum ein Vergleich mit den in den Eluaten bestimmten Konzentrationen an relevanten organischen und anorganischen Schadstoffen durchgeführt, um gegebenenfalls Korrelationen zwischen genotoxikologischem Potential und mobilisierbaren Schadstoffgehalten aufzeigen zu können.

5.4.1 Unbelastete Referenzböden

Die Eluatuntersuchungen der weitgehend unbelasteten Referenzböden diente analog den ökotoxikologischen Experimenten dem Zweck, mögliche Matrixeffekte durch natürliche, lösliche Bodenbestandteile aufzuzeigen, Informationen zu einer möglichen "Hintergrund-Genotoxizität" zu erlangen und somit die Grenzwerte für die Bewertung der einzelnen Testsysteme abzusichern bzw. neu festzulegen.

Für die 7 im Rahmen des Projektes untersuchten weitgehend unbelasteten Referenzböden wurden im umu- und im Ames-Test durchweg G-Werte von 1,5 und 3 bestimmt, was unter den gegebenen Testbedingungen kein mobilisierbares genotoxisches Potential im Sinne einer "Hintergrund-Genotoxizität" erkennen lässt. Daraus ist abzuleiten, dass die in den DIN-Vorschriften angeführten Bewertungsgrundlagen für die Bestimmung eines mutagenen Potentials von wässrigen Proben auf Bodeneluaten anwendbar sind. Im Rahmen der untersuchten Bodenproben ist es somit weitgehend abgesichert, dass positive Befunde auf anthropogen eingetragene Schadstoffe und nicht auf natürliche, eluierbare Bodenbestandteile zurückzuführen sind.

5.4.2 Referenzsubstanzen

Bei der genotoxikologischen Testung von Bodeneluaten und anderen wässrigen Lösungen kann sich prinzipiell das Problem der Nachweisempfindlichkeit der eingesetzten Testsysteme ergeben, da insbesondere hydrophobe Substanzen mit mutagenem Potential (z. B. Benzo(a)pyren, Benzo(a)anthracen) sehr geringe Wasserlöslichkeiten aufweisen können. Daher wurde im Vorfeld der Untersuchungen mit den Bodeneluaten die Empfindlichkeit des umu- und Ames-Tests durch den Einsatz von ausgewählten Modellsubstanzen mit bekanntermaßen mutagenem Potential abgeschätzt. In Tab. 13 sind die mit den wässrigen Lösungen der Modellsubstanzen erzielten Ergebnisse zusammengefasst. Neben Benzo(a)pyren wurden aus der Substanzklasse der PAK die Mischsubstrate Anthracenöl und Steinkohlenteerpech eingesetzt, welche Siedefractionen der Steinkohlenteerdestillation darstellen, wobei Anthracenöl überwiegend 2-4 Ring PAK und Steinkohlenteerpech primär 4-6 Ring PAK enthält. Rohkondensat enthält hingegen neben der gesamten PAK_{EPA}-Palette auch erhebliche Anteile an BTEX-Aromaten. Die wässrigen Lösungen dieser PAK-Gemische repräsentieren annähernd den unter den gegebenen Elutionsbedingungen maximal löslichen Anteil.

Tab. 13: Ergebnisse (G-Werte) der genotoxischen Untersuchungen wässriger Lösungen von Modellsubstanzen

Probe	nachgewiesene Kontaminanten	umu-Test		Ames-Test			
		- S9	+ S9	TA 98 - S9	TA98 + S9	TA 100 - S9	TA 100 + S9
Benzo(a)pyren	1,0 µg/l	1,5	1,5	3	3	3	3
Steinkohlenteerpech	PAK _{EPA} (7,8 µg/l)	1,5	1,5	3	3	3	3
Anthracenöl	PAK _{EPA} (7.690 µg/l)	1,5	1,5	3	3	3	3
Rohkondensat	PAK _{EPA} (12.700 µg/l) BTEX (20.000 µg/l)	1,5	12	3	12	3	12

kleinste Verdünnungsstufe G im umu-Test = 1,5;

kleinste Verdünnungsstufe G im Ames-Test = 3

Die mit ausgewählten Substanzgemischen erzielten Ergebnisse belegen, dass der Nachweis der mutagenen Wirkung von PAK in wässriger Lösung schwierig ist, da durch deren begrenzte Löslichkeit die Nachweisgrenze der eingesetzten Testverfahren unterschritten wird. Dies wird deutlich am Beispiel von Benzo(a)pyren, wo eine mutagene Wirkung im Ames-Test (TA 98, TA 100) bei einer Konzentration von 2-10 µg/Platte (Lösungsmittel DMSO) nachweisbar ist. Für wässrige Lösungen bedeutet dies bei einem maximalen Probenvolumen von 1 ml im Ames-Test eine erforderliche Konzentration von ≥ 2 mg/l, welche die maximale Löslichkeit von Benz(a)pyren (3,8 µg/l) um einen Faktor von ca. 500 übersteigt. Entsprechend konnte für Benzo(a)pyren und auch für Steinkohlenteerpech und Anthracenöl in wässriger Lösung kein mutagenes Potential aufgezeigt werden. Positive Befunde wurden in beiden Testsystemen lediglich für das Rohkondensat ermittelt, wobei hier neben den PAK auch die BTEX-Aromaten oder weitere, analytisch nicht erfasste aromatische Substanzen für die beobachteten Effekte verantwortlich sein könnten. Möglich erscheint hier auch eine Konzentrationssteigerung der PAK durch Lösungsvermittlung z. B. der BTEX-Aromaten, wie sie prinzipiell in kontaminierten Bodenproben auch zu erwarten ist.

5.4.3 PAK-belastete Böden

Die Ergebnisse der genotoxikologischen Untersuchungen sind in Tab. 14 für die EPAK-, CWPAK- und SPAK-Böden zusammen mit den im wässrigen Eluat bestimmten relevanten Schadstoffen aufgeführt.

Von den insgesamt 11 PAK-belasteten Ausgangsmaterialien und biologisch behandelten (EPAK2b, EPAK3b, EPAK4b, SPAK1b) bzw. durch Bodenwäsche fraktionierten Böden (CWPAK1b, CWPAK1c) wurde nur im Fall der Ausgangsmaterialien EPAK4a und CWPAK1a mit dem Ames-Test in Gegenwart von S9-Mix ein mobilisierbares mutagenes Potential nachgewiesen. Dieser Befund korreliert bei Boden EPAK4a mit einem sehr hohen Gehalt an mobilisierbaren PAK im Eluat (1.860 µg/l). Für die verbliebenen EPAK- und SPAK-Böden wurde hingegen mit beiden Testsystemen kein mutagenes Potential festgestellt, was unter

Bezug auf die Ergebnisse mit den Modellsubstanzen (Kap. 5.4.2) mit der relativ geringen Nachweisempfindlichkeit der Testsysteme bzw. der stofflichen Zusammensetzung der PAK in den Eluaten (primär hochkondensierte und damit nur sehr gering wasserlösliche PAK weisen mutagenes Potential auf) zu erklären ist.

Tab. 14: Ergebnisse (G-Werte) der genotoxischen Untersuchungen der Eluate PAK-belasteter Böden

Probe	nachgewiesene Kontaminanten (Eluat)	umu-Test		Ames-Test			
		- S9	+ S9	TA 98 - S9	TA98 + S9	TA 100 - S9	TA 100 + S9
EPAK2a	PAK (3,03 µg/l)	1,5	1,5	3	3	3	3
EPAK2b	PAK (1,09 µg/l)	1,5	1,5	3	3	3	3
EPAK3a	PAK (29,6 µg/l)	1,5	1,5	3	3	3	3
EPAK3b	PAK (12,4 µg/l)	1,5	1,5	3	3	3	3
EPAK4a	PAK (1.860 µg/l)	1,5	1,5	3	6	3	3
EPAK4b	PAK (10,8 µg/l)	1,5	1,5	3	3	3	3
SPAK 1a	PAK (248 µg/l)	1,5	1,5	3	3	3	3
SPAK 1b	PAK (32 µg/l)	1,5	1,5	3	3	3	3
CWPAK1a	PAK (15,1 µg/l) EOX (70 µg/l)	1,5	1,5	3	3	3	6
CWPAK1b	PAK (67,5 µg/l) EOX (60 µg/l)	1,5	1,5	3	3	3	3
CWPAK1c	PAK (30,5 µg/l)	1,5	1,5	3	3	3	3

kleinste Verdünnungsstufe G im umu-Test = 1,5;

kleinste Verdünnungsstufe G im Ames-Test = 3

Für die wässrigen Eluate der CWPAK-Böden wurde nur für das Ausgangsmaterial 1a, nicht jedoch für die Reststofffraktion mit den aufkonzentrierten Schadstoffen, im Ames-Test ein genotoxisches Potential aufgezeigt. Aufgrund der geringen PAK-Konzentrationen im Eluat kann gefolgert werden, dass das Ausgangsmaterial CWPAK1a mobile Begleitkontaminationen mit genotoxischem Potential enthält, welche in der Reststofffraktion CWPAK1c entweder nicht mehr vorhanden sind oder in wenig mobiler Form vorliegen. Als mutagene Begleitkontaminationen kommen als EOX-Summenparameter analytisch erfasste Organohalogenverbindungen in Betracht.

Im Vergleich der beiden zur Erfassung des mobilisierbaren genotoxischen Potentials PAK-belasteter Böden eingesetzten Biotests erscheint der Ames-Test empfindlicher.

5.4.4 MKW-belastete Böden

Die unter 5.2.3 näher charakterisierten MKW-belasteten Böden wurden in Form der wässrigen Eluate im umu- und Ames-Test analysiert. Die erzielten Ergebnisse sind in Tab. 15 zusammengefasst.

Tab. 15: Ergebnisse (G-Werte) der genotoxischen Untersuchungen der Eluate MKW-belasteter Böden

Probe	nachgewiesene Kontaminanten (Eluat)	umu-Test		Ames-Test			
		- S9	+ S9	TA 98 - S9	TA98 + S9	TA 100 - S9	TA 100 + S9
OMKW1a	keine	1,5	1,5	3	3	3	3
BMKW1a	MKW (0,2 mg/l)	1,5	1,5	3	3	3	3
SPMKW1	MKW (0,1 mg/l) PAK (32,5 µg/l) Arsen (50 µg/l)	1,5	1,5	3	3	3	6
LMKW2	MKW (0,1 mg/l)	1,5	1,5	3	3	3	3
LMKW3	keine	1,5	1,5	3	3	3	3

kleinste Verdünnungsstufe G im umu-Test = 1,5;
kleinste Verdünnungsstufe G im Ames-Test = 3

Für die wässrigen Eluate der untersuchten MKW-kontaminierten Böden wurden mit Ausnahme von SPMKW1 bei den genotoxischen Untersuchungen negative Befunde erzielt. Diese Ergebnisse konnten erwartet werden, da auch Rohöle und Kohlenwasserstofffertigprodukte sowie deren dominante Einzelkomponenten, soweit untersucht, im Ames-Test mit wenigen Ausnahmen (z. B. Butadien) keine mutagene Wirkung zeigen. Im Umkehrschluss erscheint es möglich, dass der Boden SPMKW1 mobile Begleitkontaminationen enthält, welche die positive Response bei Stamm TA100 im Ames-Test bewirken. Als mögliche Begleitkontamination mit mutagenem Potential wurde bei Boden SPMKW1 Arsen nachgewiesen.

Bei MKW-belasteten Böden ergibt sich analog zur Schadstoffklasse der PAK das Problem der Nachweisempfindlichkeit, da es sich um überwiegend hydrophobe Einzelsubstanzen mit geringer bis sehr geringer Wasserlöslichkeit handelt.

5.4.5 TNT-belastete Böden

Die Ergebnisse der genotoxikologischen Eluatanalysen für die Nitroaromaten-belasteten Böden und die biologisch behandelten (CTNT4b, CTNT04b) bzw. aus der Bodenwäsche erhaltenen Materialien sind in Tab. 16 zusammengefasst. Die im Eluat analytisch nachgewiesenen mobilisierbaren Kontaminanten mit potentiell mutagenem Potential sind mit aufgeführt.

Die genotoxikologischen Analysen ergaben unabhängig von der Herkunft (Standort C, H, oder L) für alle TNT-belasteten Ausgangsböden (CTNT1, CTNT4a, LTNT1a, HTNT1 und HTNT2) in beiden Testsystemen eindeutig positive Befunde, wobei sich der Ames-Test in allen Fällen als empfindlicher im Vergleich zum umu-Test erwies (höhere G-Werte). Dabei korrelieren die Befunde mit in der Summe hohen Gehalten an Nitroaromaten und teils auch Aminonitroaromaten im Eluat, wobei jedoch insgesamt kein direkter Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Einzelkomponenten und den ermittelten G-Werten aufzuzeigen war. Aus diesen Befunden ist eine prinzipiell hohe Verfügbarkeit von sprengstoffbürtigen Nitroaromaten für den Wasserpfad abzuleiten, woraus aufgrund des sehr hohen genotoxischen Potentials dieser Substanzklasse ein erhebliches Gefahrenpotential resultieren kann. Dabei können eine Vielzahl von analytisch nur schwer erfassbaren Abbauprodukten der Hauptkontaminante 2,4,6-TNT für die beobachteten genotoxischen Effekte verantwortlich zeichnen, was wiederum die Notwendigkeit des Einsatzes von Biotests zur Gefährdungsabschätzung unterstreicht.

Tab. 16: Ergebnisse (G-Werte) der genotoxischen Untersuchungen der Eluate Nitroaromaten-belasteter Böden

Probe	nachgewiesene Kontaminanten (Eluat)	umu-Test		Ames-Test			
		- S9	+ S9	TA 98 - S9	TA98 + S9	TA 100 - S9	TA 100 + S9
CTNT1a	Nitroaromaten (43,2 mg/l)	12	6	48	3	12	12
CTNT02a	keine	1,5	1,5	3	3	3	3
CTNT04b	(DOC, 1.220 mg/l)	3	1,5	6	24	3	6
CTNT4a	Nitroaromaten (63,1 mg/l)	6	3	12	3	12	12
CTNT4b	(DOC 3.660 mg/l)	3	1,5	3	3	3	3
LTNT1a	Nitroaromaten (13,0 mg/l) Aminonitroarom. (8,1 mg/l)	6	6	12	24	24	24
LTNT1b	Nitroaromaten (20,0 mg/l) Aminonitroarom. (1,1 mg/l)	3	3	3	6	6	6
LTNT1c	Nitroaromaten (0,17 mg/l)	1,5	1,5	3	3	3	3
HTNT 1	Nitroaromaten (369 mg/l)	12	24	12	12	48	48
HTNT 2	Nitroaromaten (66,3 mg/l)	12	48	192	24	192	96

kleinste Verdünnungsstufe G im umu-Test = 1,5;

kleinste Verdünnungsstufe G im Ames-Test = 3

Nitroaromaten = Σ 2-, 3-, 4-Nitrotoluol, 2,3-, 2,4-, 2,6-, 3,4-Dinitrotoluol, 1,2-, 1,3-, 1,4-Dinitrobenzol, 2,4,6-Trinitrotoluol

Aminonitrotoluole = Σ 2-Amino-4,6-Dinitrotoluol, 4-Amino-2,6-Dinitrotoluol

Der durch biologische Behandlung aus dem Boden CTNT4a hervorgegangene Boden CTNT4b weist im Ames-Test bei $G = 3$ kein genotoxisches Potential auf. Auch im umu-Test wurde eine Reduzierung der G-Werte ermittelt, wobei die Testvariante ohne S9 auch nach biologischer Behandlung noch ein genotoxisches Restpotential aufweist.

Der Referenzboden CTNT02a zeigt bei G-Werten von 1,5 (umu-Test) und 3 (Ames-Test) erwartungsgemäß und übereinstimmend mit vorherigen Untersuchungen weiterer Referenzböden (Kap. 5.4.1) kein genotoxisches Potential bezüglich der Bodenrückhaltefunktion. Überraschenderweise wurden jedoch nach Zusatz der Zuschlagsstoffe und biologischer Behandlung mittels Kompostierverfahren für Bodenmaterial CTNT04b in beiden Testverfahren ein eindeutiges und reproduzierbares genotoxisches Potential aufgezeigt. Als mögliche Erklärung ist, wie schon bei der Bewertung der ökotoxikologischen Tests (Kap. 5.3.4), die auf den Zuschlagsstoff zurückzuführende drastische Erhöhung des eluierbaren DOC anzuführen. Dieser DOC könnte folgerichtig auch (natürliche?) Komponenten mit genotoxischem Potential enthalten. Eine diesbezügliche Klärung kann nur über eine aufwendige Fraktionierung des DOC mit anschließender genotoxikologischer und chemisch/analytischer Charakterisierung erfolgen.

Auch für die durch Bodenwäsche aus dem Ausgangsmaterial LTNT1a hervorgegangene Sandfraktion LTNT1b wurden mit beiden Testsystemen eindeutig positive Befunde erhalten. Diese Ergebnisse korrelieren mit hohen analytisch bestimmten Nitroaromaten- und Aminonitroaromatengehalten im Eluat und deuten auf eine sehr hohe Mobilität der verbliebenen Schadstoffe. Für das Bodenmaterial LTNT1c (Feinstkornfraktion aus der Bodenwäsche) wurden hingegen in beiden Testsystemen negative Befunde erzielt. Dies erklärt sich durch die für diesen Boden im Vergleich zu LTNT1a und 1b im Eluat um 2 Zehnerpotenzen niedrigeren Nitroaromaten-Gehalte sowie im Bereich der Nachweisgrenze liegende Aminonitroaromaten-Gehalte. Der bei LTNT1c mit 22% deutlich erhöhte TOC-Gehalt bewirkt somit durch sorptive oder chemische Festlegung eine stark verminderte Verfügbarkeit der Nitroaromaten für den Wasserpfad. Somit ist an diesem Beispiel belegt, dass neben hydrophoben Substanzen wie PAK (Boden CWPak1a) auch relativ mobile Substanzen wie Nitroaromaten in ihrer Verfügbarkeit für den Wasserpfad und damit auch in ihrer Bioverfügbarkeit in Abhängigkeit von der Bodenmatrix stark eingeschränkt sein können.

5.4.6 Untersuchungen zur Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit

Da für die Auslösung mutagener Effekte Schwellenkonzentrationen generell nicht oder nur schwer zu definieren sind, kann bei den genotoxikologischen Tests die Forderung nach einer möglichst geringen Nachweisgrenze für genotoxische Verbindungen abgeleitet werden. Wie in den Kap. 5.4.1 – 5.4.3 aufgezeigt wurde, gilt dies insbesondere für hydrophobe organische Stoffe mit geringer Wasserlöslichkeit wie PAK und aliphatische KW bei Analyse von wässrigen Bodeneluaten. Hinsichtlich einer möglichen Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit des umu-Tests und des Ames-Tests wurde daher das von der RWTH Aachen entwickelte Verfahren zur Anreicherung der Schadstoff-Fraktion aus Bodeneluaten mittels Festphasenextraktion [11; 12] auf Praktikabilität überprüft. Die Arbeitsanweisung zur Festphasenextraktion umfasst im wesentlichen folgende Arbeitsschritte:

- 2,5 h Schütteln von Eluat und Festphase (Serdolit PAD-1) in definiertem Verhältnis,
- Abtrennung, Trocknung und Extraktion (Dichlormethan/Methanol 9:1) der Festphase,

- Überführung der extrahierten Substanzen in DMSO/Wasser (1:24) und Einstellung eines definierten Konzentrationsfaktors.

Gemäß dieser Arbeitsanweisung wurde eine Auswahl an Eluaten unbelasteter Referenzböden und MKW-, PAK- und TNT-belasteter Böden aufkonzentriert (Faktor 30) und im umu-Test auf Genotoxizität getestet. In Tab. 17 sind die Ergebnisse der Eluat-Extrakte zusammengefasst und den mit den wässrigen Eluaten erzielten Befunden gegenübergestellt.

Tab. 17: Ergebnisse (G-Werte) von Bodeneluaten und Eluatextrakten im umu-Test

Probe	nachgewiesene Kontaminanten (Eluat)	Eluat		Extrakt aus Eluat (30-fach konzentriert)	
		- S9	+ S9	- S9	+ S9
Lufa 2.1	keine	1,5	1,5	3	1,5
Lufa 2.2	keine	1,5	1,5	1,5	1,5
Lufa 2.3	keine	1,5	1,5	1,5	1,5
OMKW0	keine	1,5	1,5	3	3
BMKW0	keine	1,5	1,5	1,5	1,5
OMKW1α	MKW (gering)	1,5	1,5	3	1,5
BMKW1α	MKW (gering)	1,5	1,5	6	3
SPMKW1	MKW, PAK, Arsen	1,5	1,5	3	1,5
CWPAK1α	PAK (gering), CN, EOX	1,5	1,5	6	3
LTNT1α	TNT, ANT	6	6	128	> 192
CTNT1α	TNT, ANT	12	6	> 192	128

kleinste Verdünnungsstufe G im umu-Test = 1,5

Die Ergebnisse werden wie folgt zusammengefasst:

- Bei den TNT-belasteten Böden wurden im Eluat-Extrakt im Vergleich zum Eluat stark erhöhte G-Werte ermittelt, wodurch eine erfolgreiche Aufkonzentrierung des im Eluat vorhandenen genotoxischen Potentials durch die eingesetzte Methode zur Festphasenextraktion belegt ist.
- Für alle untersuchten PAK- und MKW-belasteten Böden, welche im Eluat negative Befunde lieferten, konnte mit dem umu-Test im 30-fach konzentrierten Eluat-Extrakt bei G-Werten zwischen 3 und 6 ein genotoxisches Potential aufgezeigt werden.
- Die 30-fach aufkonzentrierten Eluat-Extrakte der unbelasteten Referenzböden zeigen in 2 Fällen (Lufa 2.1, OMKW0) bei G-Werten von 3 einen positiven Befund. Somit ergibt sich bei dem gewählten Konzentrationsfaktor von 30 die Schwierigkeit, zwischen Schadstoffbedingtem und durch natürliche, eluierbare Bodenbestandteile hervorgerufenem mutagenen Potential zu unterscheiden (Hintergrund-Genotoxizität). Dieser Schwierigkeit

bei der Interpretation der Befunde kann nach den vorliegenden Ergebnissen durch Reduzierung des Konzentrationsfaktors von 30 auf z. B. 15 oder durch Festlegung eines höheren Grenzwertes (G_{EU}) im umu-Test begegnet werden.

Die im Rahmen dieses Vorhabens erzielten Ergebnisse zur genotoxischen Untersuchung von Eluat-Extrakten zeigen gute Übereinstimmung mit Literaturdaten [11; 12] und werden in Kap. 5.4.7 und 6 bei der Ableitung einer Untersuchungsstrategie berücksichtigt.

5.4.7 Bewertung der Ergebnisse zu den genotoxikologischen Untersuchungen

Im Rahmen des Forschungsvorhabens wurden insgesamt 7 weitgehend unbelastete Referenzböden und 26 mit PAK, MKW und/oder TNT als analytisch erfasste Hauptkontaminanten belastete Böden, auf über den Wasserpfad mobilisierbare Schadstoffe mit genotoxischem Potential untersucht. Ziel war es einerseits, den für die Testung von Chemikalien und Wasser/Abwasserproben genormten Ames-Test und umu-Test auf ihre Einsetzbarkeit und Aussagekraft im Hinblick auf die Untersuchung von Bodeneluaten zu überprüfen und andererseits Vorschläge für eine Bewertung der Ergebnisse zu unterbreiten.

Die Ergebnisauswertung für die unbelasteten Referenzböden (Kap. 5.4.1) hat gezeigt, dass die in den jeweiligen DIN-Vorschriften vorgesehenen Bewertungsgrundlagen, welche bei den jeweiligen testbedingt kleinstmöglichen Verdünnungsstufen von $G_{EU} = 1,5$ (umu-Test) und $G_{EA} = 3$ (Ames-Test) keinen signifikanten mutagenen Effekt zulassen, prinzipiell auf Bodeneluat anwendbar sind. In keinem Fall wurde mit den Referenzböden in den kleinstmöglichen Verdünnungsstufen ein mobilisierbares genotoxisches Potential aufgezeigt, so dass G_{EU} -Werte im umu-Test $> 1,5$ und G_{EA} -Werte im Ames-Test > 3 im Bodeneluat auf anthropogen eingetragene Schadstoffe mit genotoxischem Potential hindeuten.

Die mit den 2 genotoxikologischen Testsystemen bei der Untersuchung der kontaminierten Ausgangsmaterialien und der behandelten Böden erzielten Ergebnisse sind in Tab. 18 zusammengefasst und ausgewertet. Dabei wurde für jeden Test neben dem Gesamtergebnis auch die für die Bewertung ausschlaggebende Versuchsvariante angeführt und die Relevanz der einzelnen Testergebnisse für die Gesamtbewertung ermittelt.

Die Aufstellung zeigt, dass beide Testsysteme in der Mehrzahl der Fälle zu einer gleichen Beurteilung der Bodeneluat geführt haben. Die Ergebnisse des Ames-Tests und des umu-Tests stimmen in 95,8 % bzw. 87,5 % der Fälle mit der aus beiden Testsystemen abgeleiteten genotoxikologischen Gesamtbewertung überein. Andererseits waren die mit dem Ames-Test ermittelten Ergebnisse in 12,5 % der Fälle (umu-Test nur 4,2 %) alleinig ausschlaggebend für die Gesamtbewertung, was zusammen mit den teilweise deutlich höheren G-Werten eine höhere Empfindlichkeit des Ames-Tests im Vergleich zum umu-Test für die hier relevanten Kontaminanten aufzeigt. Weiterhin sprechen die Vielzahl an verfügbaren Referenzdaten für Einzelchemikalien und Substanzgemische für den Ames-Test, während der umu-Test eine deutlich weniger aufwendige Versuchsdurchführung erlaubt. Obwohl der Ames-Test die genannten Vorteile aufweist, kann eine allgemeingültige Empfehlung für die Auswahl eines der beiden untersuchten Testsysteme jedoch anhand der vorliegenden limitierten Erfahrungen noch nicht gegeben werden. Eindeutig als notwendig und sinnvoll hat sich jedoch die Durchführung aller gemäß DIN-Vorgaben vorgesehenen Testvarianten erwiesen, d. h. beim umu-Test ohne/mit S9-Fraktion und beim Ames-Test ohne/mit S9-Fraktion für die Stämme TA 98 und TA 100.

Tab. 18: Zusammenfassung der Ergebnisse der genotoxikologischen Testsysteme und der abgeleiteten Gesamtbewertung für die untersuchten kontaminierten und behandelten Böden

Boden	Ames-Test		umu-Test		Genotoxikologische Gesamtbewertung (akute Gefahr eines Schadstoffaustrages) ¹
	G _{EA} - Wert	für Bewert. maßgebende Variante	G _{EU} - Wert	für Bewert. maßgebende Variante	
EPAK2a	3	–	1,5	–	gering
EPAK2b	3	–	1,5	–	gering
EPAK3a	3	–	1,5	–	gering
EPAK3b	3	–	1,5	–	gering
EPAK4a	6	TA 98 + S9	1,5	–	gegeben
EPAK4b	3	–	1,5	–	gering
SPAK1a	3	–	1,5	–	gering
SPAK1b	3	–	1,5	–	gering
CWPAK1a	6	TA 100 + S9	1,5	–	gegeben
CWPAK1b	3	–	1,5	–	gering
CWPAK1c	3	–	1,5	–	gering
OMKW1a	3	–	1,5	–	gering
BMKW 1a	3	–	1,5	–	gering
SPMKW1	6	TA 100 + S9	1,5	–	gegeben
LMKW2	3	–	1,5	–	gering
LMKW3	3	–	1,5	–	gering
CTNT1a	48	TA98 – S9	12	– S9	gegeben
CTNT4a	12	TA 98 – S9 TA 100 +/- S9	6	– S9	gegeben
CTNT4b	3	–	3	– S9	gegeben
LTNT1a	24	TA 98 + S9 TA 100 +/- S9	6	+/- S9	gegeben
LTNT1b	6	TA 98 + S9 TA 100 +/- S9	3	+/- S9	gegeben
LTNT1c	3	–	1,5	–	gering
HTNT1	48	TA 100 +/- S9	24	+ S9	gegeben
HTNT2	192	TA 98 – S9 TA 100 – S9	48	+ S9	gegeben
Ausschlaggebend für die Gesamtbewertung	12,5 %		4,2%		

¹ Akute Gefahr eines Schadstoffaustrages gilt als gegeben, wenn mindestens einer der beiden genotoxikologischen Tests einen positiven Befund liefert

In Übereinstimmung mit Ergebnissen zur Untersuchung von Modellsubstanzen (Kap. 5.4.2) wurden für beide Testsysteme relative geringe Nachweisempfindlichkeiten für die Detektion des über den Wasserpfad verfügbaren genotoxikologischen Potentials von PAK- (Kap. 5.4.3) und MKW-belasteten Böden (Kap. 5.4.4) ermittelt. Dies ist ursächlich primär auf die sehr geringe Wasserlöslichkeit der relevanten mutagenen Einzelkomponenten (z. B. Benzo[a]pyren ca. $3,8 \mu\text{g/l}$) zurückzuführen. Da jedoch im Gegensatz zur Ökotoxikologie für die Auslösung mutagener Effekte Schwellenkonzentrationen generell nicht oder nur schwer zu definieren sind, kann bei den genotoxikologischen Tests die Forderung nach einer möglichst geringen Nachweisgrenze für genotoxische Verbindungen abgeleitet werden. Für eine umfassende Bewertung der Bodenrückhaltefunktion kann somit neben der Untersuchung der Bodeneluat in einem zweiten Schritt die Aufkonzentrierung der im Eluat vorhandenen Schadstoffe durch Festphasenextraktion mit anschließender Testung der Eluat-Extrakte sinnvoll sein. Für eine Anreicherung der verfügbaren Schadstoffe aus den Bodeneluat hat sich das von der RWTH Aachen entwickelte Protokoll zur Festphasenextraktion [11; 12] bewährt. Einschränkungen sind hier lediglich bei der Aufkonzentrierung extrem schadstoffbelasteter Eluate zu machen (Ausfällungen, Ölphasenbildung), wobei es bei solchen Eluat i. d. R. zum Nachweis genotoxischer Effekte überhaupt keiner Aufkonzentrierung bedarf.

Anhand der derzeit vorliegenden Ergebnisse (Kap. 5.4.6, [11; 12]) wird bei Anwendung des o. g. Bewertungsschemas ($G_{EA} > 3$ bzw. $G_{EU} > 1,5$ = genotoxisch) derzeit eine theoretische Aufkonzentrierung der Bodeneluat um den Faktor 15 vorgeschlagen. Bei höherer Konzentrierung können auch "unbelastete Referenzböden" positive Befunde liefern (Hintergrund-Genotoxizität), welche nicht durch anthropogen eingetragene Schadstoffe bedingt sind, wodurch eine Bewertung der Ergebnisse deutlich erschwert wäre. Die aus den durchgeführten und hier zusammengefassten Ergebnissen abgeleitete Strategie zur Untersuchung und Bewertung des mobilisierbaren genotoxikologischen Potentials von Böden ist in Kap. 6 dargelegt.

6 Praxistaugliche Strategie zur Bewertung der ökotoxikologischen und genotoxikologischen Befunde

Die Auswahl der ökotoxikologischen Testverfahren und die Risikoabschätzung bezüglich der Bodenrückhaltefunktion erfolgt in Anlehnung an die Empfehlungen der DECHEMA [15].

Sowohl die Einsetzbarkeit der empfohlenen Testsysteme zur Untersuchung von Bodeneluat als auch die Interpretierbarkeit und Aussagekraft der Bewertungsstrategie (Tab. 19) wurde im Rahmen dieses Forschungsvorhabens auch anhand der Ergebnisse anderer Teilvorhaben des Forschungsverbundes "Ökotoxikologische Testbatterien" anhand zahlreicher unbelasteter, kontaminierter und biologisch bzw. mittels Bodenwaschverfahren behandelte Bodenproben eingehend überprüft bzw. validiert. Für eine sichere und umfassende Bewertung der Bodenrückhaltefunktion ist der Einsatz einer Testbatterie prinzipiell sinnvoll und wünschenswert. Es ist jedoch anhand der konkreten Vorgaben und Bedingungen im Einzelfall zu entscheiden, ob die Durchführung aller empfohlener Tests notwendig erscheint. Eine praktikable Untersuchungsstrategie kann z. B. darin bestehen, im Sinne eines Screenings zunächst den Leuchtbakterientest durchzuführen, welcher bei G_L -Werten > 8 i.d.R. eine eindeutige Bewertung zulässt. Bei derartigen Ergebnissen könnten weitere ökotoxikologische Tests zur Bewertung der Rückhaltefunktion entfallen. Auch sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass sich der Daphnien-Test bei den im Rahmen des o.g. Forschungsverbundes

untersuchten Böden mit PAK, MKW und Nitroaromaten als Hauptkontaminanten als vergleichsweise unempfindlich erwies, so dass mit diesem Test im Rahmen der Gesamtbewertung keine zusätzlichen Erkenntnisse erzielt wurden. Diese Aussage darf jedoch ohne weitergehende Untersuchungen zur statistischen Absicherung nicht verallgemeinert werden, so dass bis zum Vorliegen weiterer Erkenntnisse insbesondere bei der Untersuchung von Bodenproben mit unbekanntem Schadstoffinventar nicht generell auf den Daphnien-Test zu verzichten ist.

Tab. 19: Bewertung der ökotoxikologischen Befunde zur Beurteilung der Rückhaltefunktion von Böden

Ergebniskombinationen der aquatischen Testsysteme				Gefährdung für den Wasserpfad
Algen-Test ¹	Daphnien-Test ²	Leuchtbakterien-Test ³	Leuchtbakterien-Wachstumshemmtest ⁴	
[G _A -Wert]	[G _D -Wert]	[G _L -Wert]	[G _{LW} -Wert]	
≤ 4	≤ 4	≤ 2	n. e.	gering
≤ 4	≤ 4	3 - 8	≤ 2	
> 4	≤ 4	> 8 / ≤ 8	n. e.	gegeben
≤ 4	> 4	> 8 / ≤ 8	n. e.	
> 4	> 4	> 8 / ≤ 8	n. e.	
≤ 4	≤ 4	> 8	n. e.	
≤ 4	≤ 4	3 - 8	> 2	

n. e. = nicht erforderlich

¹ Scenedesmus-Zellvermehrungs-Hemmtest in Anlehnung an DIN 38412-33

² Daphnien-Kurzzeitest in Anlehnung an DIN 38412-30

³ Leuchtbakterientest in Anlehnung an DIN EN ISO 11348

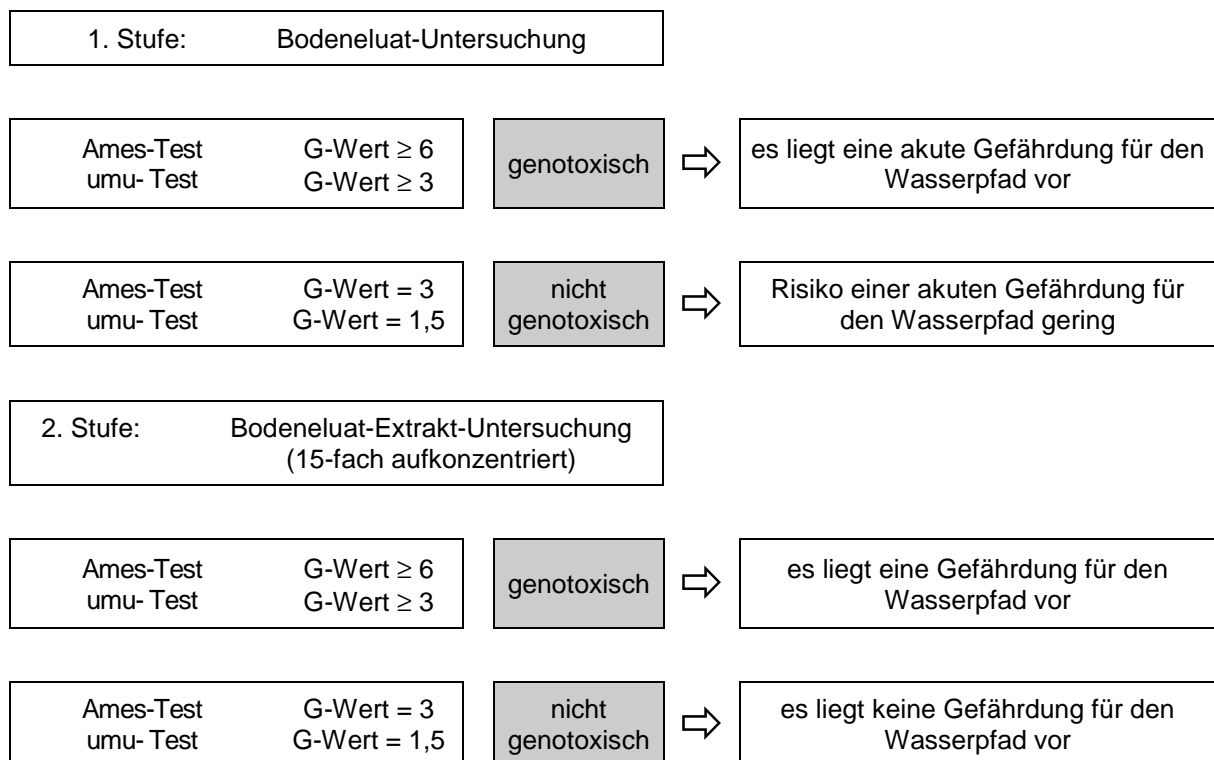
⁴ Zellvermehrungs-Hemmtest mit *Ph. phosphoreum* in Anlehnung an DIN 38412-37

Für die Beurteilung des über den Wasserpfad mobilisierbaren genotoxikologischen Potentials von Böden wurden im Rahmen dieses Forschungsvorhabens der Ames-Test mit den Stämmen *Salmonella typhimurium* TA 98 und TA 100 in Anlehnung an DIN Entwurf 38415-4 [8] und der umu-Test mit dem Stamm *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 in Anlehnung an DIN 38415-3 [7] eingesetzt und für die Untersuchung von Bodeneluat als prinzipiell geeignet befunden. Für die Bewertung der mit Bodeneluat erzielten Ergebnissen haben sich für beide Testsysteme anhand der Testung zahlreicher Bodenproben die Vorgaben der o. g. Normen als praktikabel und interpretierbar erwiesen. Die vorgeschlagene Bewertungsstrategie ist in Tab. 20 für die Bodeneluat-Untersuchungen (Stufe 1) zusammengefasst.

Da für die Auslösung mutagener Effekte Schwellenkonzentrationen generell nicht oder nur schwer zu definieren sind, wurde entsprechend einem an der RWTH Aachen entwickeltem Vorschlag [11; 12] für eine umfassende Bewertung des mobilisierbaren genotoxischen Potentials von Bodenproben eine 2. Untersuchungsstufe optional vorgesehen. Hier erfolgt eine Aufkonzentrierung der im Eluat vorhandenen Schadstoffe durch Festphasenextraktion [11; 12]. Die 15-fach aufkonzentrierten Eluat-Extrakte werden anschließend mit den genotoxikologischen Tests untersucht und die Ergebnisse entsprechend Tab. 20 (2. Untersuchungsstufe) bewertet.

Bei der Analyse der Testergebnisse erwies sich der Ames-Test im Vergleich zum umu-Test bei den im Rahmen des Projektes untersuchten Bodenproben mit PAK, MKW und Nitroaromaten als Hauptkontaminanten als teilweise deutlich empfindlicher. Dennoch wird eine allgemeingültige Empfehlung für die Auswahl eines oder beider Genotoxizitätstests aufgrund der vorliegenden Erfahrungen nicht gegeben. Es ist anhand der konkreten Vorgaben und Bedingungen im Einzelfall zu entscheiden, welcher Test/welche Testbatterie einzusetzen ist und welche Teststrategie zu fordern ist (z. B. nur Stufe 1 oder Stufe 1 + Stufe 2). Auch sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass für weitere genotoxikologische Testsysteme der Nachweis ihrer Eignung zur Untersuchung von Bodeneluaten erbracht werden konnte [11; 12; 13].

Tab. 20: Bewertung der genotoxikologischen Befunde zur Beurteilung der Rückhaltefunktion von Böden (abgeändert nach [11; 12])



Zusammenfassend konnte im Rahmen dieses Forschungsvorhabens die Eignung verschiedener Biotests zur Beurteilung des über den Wasserpfad mobilisierbaren ökotoxikologischen und genotoxikologischen Potentials von Böden aufgezeigt bzw. bestätigt und Strategien zur Bewertung der Befunde entwickelt bzw. validiert werden. Die Bewertungsstrategie wurde

dabei so ausgelegt, dass Matrixeffekte und damit "falsch-positive" Befunde weitgehend auszuschließen sind. Alle in diesem Abschnitt aufgeführten Testverfahren sind als ausreichend erprobt und praxistauglich einzustufen und können somit im Rahmen von Gefahrenbeurteilungen wertvolle Ergänzungen zur chemisch-stofflichen Charakterisierung von belasteten Bodenproben sowohl bei orientierenden Untersuchungen, Detailuntersuchungen und Sanierungsuntersuchungen als auch bei der Erfolgskontrolle von Bodensanierungsmaßnahmen liefern. Somit stehen Instrumente zur Erfassung des über den Wasserpfad verfügbaren ökotoxikologischen und genotoxikologischen Potentials von Bodenproben für den Einsatz in der Untersuchungspraxis zur Verfügung.

7 Eigene Veröffentlichungen und Diplomarbeiten

Haake, F. (1998). Untersuchungen zum Einsatz von ökotoxikologischen und genotoxikologischen Tests zur Bewertung der Rückhaltefunktion von Böden. Diplomarbeit Fachhochschule Niederrhein, Krefeld.

Hach, P. (in Druck). Untersuchungen zum Einsatz von ökotoxikologischen Biotests zur Bewertung von Böden. Diplomarbeit Fachhochschule Niederrhein, Krefeld.

Pfeifer, F. (1998). Toxikologische Bewertung von Böden. Posterbeitrag zum Statusseminar des Forschungsverbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung" am 6.-7.5.1998 in Clausthal-Zellerfeld.

8 Literaturverzeichnis

1. **BBodSchV** (1999). Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung. altlasten spektrum 4/99: 235-249.
2. **DIN 38412-30** (1989). Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Daphnien über Verdünnungsstufen. Beuth Verlag Berlin.
3. **DIN 38412-33** (1991). Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen über Verdünnungsstufen. Beuth Verlag Berlin.
4. **DIN 38412-34** (1991). Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von *Photobacterium phosphoreum* - Leuchtbakterien-Abwassertest mit konservierten Bakterien. Beuth Verlag Berlin.
5. **DIN 38412-37** (1999). Bestimmung der Hemmwirkung von Wasser auf das Wachstum von Bakterien. Beuth Verlag Berlin.
6. **DIN 38414-4** (1984). Bestimmung der Eluierbarkeit mit Wasser. Beuth Verlag Berlin.
7. **DIN 38415-3** (1996). Bestimmung des erbgutverändernden Potentials von Wasser mit dem umu-Test. Beuth Verlag Berlin.

8. **DIN 38415-4** (Entwurf 1998). Bestimmung des erbgutverändernden Potentials mit dem Salmonella-Mikrosomen-Test. Beuth Verlag Berlin.
9. **DIN EN 27027** (1994). Bestimmung der Trübung. Beuth Verlag Berlin.
10. **DIN EN ISO 11348-2** (1999). Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri*. Teil 2: Verfahren mit flüssig getrockneten Bakterien. Beuth Verlag Berlin.
11. **Ehrlichmann, H.** (1999). Entwicklung eines Konzepts zur Bewertung des wässrig extrahierbaren genotoxischen Potentials kontaminierter Böden mit optimierten und miniaturisierten prokaryontischen Testverfahren. Dissertation RWTH Aachen, Shaker Verlag Aachen.
12. **Ehrlichmann, H., Dott, W., Eisenträger A.** (in press). Assessment of the water extractable genotoxic potential of contaminated soil samples. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.
13. **Grummt, T.** (1996). Genotoxikologische Bewertung von komplexen Gemischen aus Rüstungsaltslasten. Beiträge zum 2. Statusseminar des BMBF-Verbundvorhabens "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten" am 9.-10.10.1995 in Jena.
14. **ISO/FDIS 13829** (final draft 1999). Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test. Beuth Verlag Berlin.
15. **Kreysa, G. and Wiesner J.** (1995). Biologische Testmethoden für Böden/Ad-hoc-Arbeitsgruppe "Methoden zur toxikologischen/ökotoxikologischen Bewertung von Böden" der DECHEMA. Schön & Wetzel Verlag Frankfurt a. M.
16. **Pfeifer, F. und Sinder C.** (1998). Mikrobieller Abbau von PAK an real kontaminierten Böden im Sprudelbett-Bioreaktor. Abschlussbericht zum BMBF-Forschungsvorhaben FKZ 1480891.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.3 Verbundvorhaben 4: Ökotoxikologische Testbatterien

9.3.7 Entwicklung eines chronischen Toxizitätstests mit Pflanzen (TV 4.6)

Dr. Jörg Römbke
Dr. Wolfgang Kalsch

ECT Oekotoxikologie GmbH
Böttgerstraße 2-14
65439 Flörsheim

Förderkennzeichen: 1491077

Laufzeit: 01.01.1997 – 31.12.1999

1 Zusammenfassung und Zielsetzung

Die Aufgabe des F+E-Vorhabens war die Entwicklung und teilweise Validierung eines chronischen Labortests mit höheren Pflanzen für die Prüfung des toxischen Potenzials natürlicher bzw. sanierter Böden (Qualitätsbeurteilung bzw. -kontrolle von Böden, engl. soil quality assessment). Zugleich sollte dieser Test für die Einzelstoffprüfung einsetzbar sein. Von existierenden akuten Tests unterscheidet sich das entwickelte Verfahren zum Einen durch eine verlängerte Testdauer, um einen wesentlichen Abschnitt der Lebensspanne der Testpflanzen zu erfassen. Der Test wurde so konzipiert, dass er die Entwicklung von der Samenkeimung bis zur Blüte und soweit möglich auch bis zur Bildung von Samen umfasst. Auf diese Weise können anders als in akuten Tests neben den wachstumsrelevanten auch reproduktionsrelevante Parameter erfasst werden.

Zum Anderen waren die bisher verwendeten Pflanzentests primär für die Einzelstoffprüfung konzipiert. Um den chronischen Pflanzentest für die Prüfung belasteter Böden bzw. für die Qualitätskontrolle bei der Bodensanierung einsetzen zu können, mussten daher wichtige Eigenschaften der bekannten akuten Tests modifiziert werden. Insbesondere galt zu berücksichtigen, dass in der Regel Vergleichsböden, die sich von den Testböden ausschließlich hinsichtlich der Schadstoffbelastung unterscheiden (Referenzböden) fehlen und meist nur Standardböden als Kontrolle zur Verfügung stehen.

Unter Einsatz einer mono- und einer dikotyledonen Testpflanze wurden Labortests mit ausgewählten Modellschadstoffen und unterschiedlichen kontaminierten oder sanierten Testböden durchgeführt. Zusätzlich wurde eine Vielzahl Testbedingungen variiert, um so eine weitgehende Absicherung des Tests, seiner Durchführbarkeit und Interpretierbarkeit zu ermöglichen. Die Ergebnisse wurden benutzt, um einen Richtlinienvorschlag für eine standardisierte Durchführung zu entwerfen. Dieser nun vorliegende Entwurf folgt den Vorgaben der ISO, da von dieser Organisation derzeit ein chronischer Test zur Bodenbeurteilung gefordert wird.

Als Biotest mit ganzem Boden kann der chronische Pflanzentest damit in zweifacher Hinsicht als Instrument zur Bewertung der Lebensraumfunktion von Böden, wie sie in §2 des Gesetzes zum Schutz des Bodens [6] aufgeführt wird, eingesetzt werden. Dort werden Anweisungen für den Umgang mit schädlichen Bodenveränderungen und damit assoziierten Gefahren, wie sie z.B. bei Altlastenflächen auftreten können, gegeben. Zur Bewertung einzelner Kontaminanten bzw. zur Erkennung der von ihnen ausgehenden Schäden und Gefahren werden entsprechend §8 des Gesetzes bisher nur Bodenwerte (Vorsorge-, Prüf- und Maßnahmenwerte; d.h. zu messende Konzentrationen) verwendet. Für bestimmte Schutzziele (z.B. den Pfad Boden-Nutzpflanze) und wenige Stoffe können diese Werte der Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung [7] entnommen werden. Zur Ableitung von weiteren Bodenwerten, speziell zu der bisher nicht näher berücksichtigten Funktion des Bodens als Lebensraum für Organismen, werden neben bekannten Verfahren chronische Biotests benötigt, um belastbare Daten zu liefern.

Unabhängig von der einzelstofforientierten Bewertung mittels Bodenwerten sind Biotests ein geeignetes Werkzeug für die Beurteilung der Bodenqualität potenziell belasteter Böden. Hier liegen in den meisten Fällen Mischkontaminationen vor, häufig aus bekannten Schadstoffen mit nicht charakterisierten Metaboliten. Der Biotest zeigt in solchen Fällen direkt das Gefährdungspotenzial aller im Boden vorhandenen Schadstoffe auf, die ihrerseits durch spezifische Eigenschaften der zu prüfenden Böden verstärkt oder abgeschwächt werden können. Der Bio-

test ist folgerichtig kein geeignetes Instrument, um direkt den Gehalt eines bestimmten Schadstoffes in einem Boden abzuschätzen. Chemische Analytik und Biotests ergänzen sich damit gegenseitig bei der Beurteilung der Bodenqualität. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Entwicklung eines Pflanzentests unter Einbeziehung reproduktionsrelevanter Endpunkte primär für die Beurteilung der Bodenqualität (Tab. 1). Der als Ergebnis dieses Projekts entstandene Richtlinienentwurf wurde inzwischen bei der ISO eingereicht.

2 Kenntnissstand zu Beginn der Arbeiten

Tests mit Pflanzen können in zwei Kategorien eingeteilt werden. Zum Einen in Verfahren mit wässrigen Medien, zum Anderen in solche mit Böden als Testsubstrat. Tests mit wässrigen Medien können zum Einsatz kommen, um Gefährdungen aquatischer Ökosysteme bzw. von Böden (über den Wasserpfad) abzuschätzen. Bei solchen Tests können unterschiedliche Testpflanzen herangezogen werden:

- Algen und submerse Wasserpflanzen [26]
- Wasserpflanzen, die in zu prüfenden Sedimenten wurzeln [8]
- aufschwimmende Pflanzen wie z. B. Wasserlinsen oder
- terrestrische Pflanzen in Hydrokultur [19; 22; 36].

Auf diese Testverfahren wird in diesem Bericht nicht weiter eingegangen. Einen Übergang zu den Tests mit ganzen Böden stellt ein Test mit Bodenalgen dar [11].

Alle Tests mit Boden als Substrat für die Testpflanzen wurden ursprünglich für die Einzelstoffprüfung konzipiert, d.h. es werden künstliche oder natürliche Standardböden verwendet, in die eine Prüfsubstanz eingemischt oder aufgesprüht wird [34]. Die wichtigsten der bisher veröffentlichten Testrichtlinien bzw. Testideen mit Pflanzen sind im folgenden aufgelistet (zu Details jedes Tests siehe [25]):

EPA (1982):	Effekte auf die Samenkeimung, das Auflaufen und das Wachstum höherer Pflanzen [44]
ASTM (1984):	Effekte auf das Wachstum von Keimlingen [2]
BBA (1984):	Phytotoxizität [5]
OECD 1984:	Wachstumshemmung bei terrestrischen Pflanzen [30]
Ratsch et al. (1986):	"Life cycle"-Test zur Bestimmung subletaler Effekte bei <i>Arabidopsis thaliana</i> [35]
ISO (1992):	Effekte auf die Wurzellänge [23]
Sheppard et al. (1993):	Plant-Life-Cycle Bioassay [39]
ISO (1994):	Effekte auf Keimung und Wachstum höherer Pflanzen [24]
Pestemer & Günther (1997):	Herbizid-Hemmung bei mehreren Pflanzenarten [33]
ASTM (1997):	Brassica Life-Cycle Test [3]
Aquaterra (1998):	(Chronischer) Pflanzenwachstumstest [1]

Arbeiten, die nur physiologische, zelluläre oder genetische Effekte betrachten, wurden nicht berücksichtigt.

Tab. 1: Chronischer Pflanzentest (Kalsch & Römbke 2000) [25]

Richtlinie:	Richtlinienvorschlag als Ergebnis des vorliegenden Berichts
Prinzip:	Labortest zur Bestimmung der akuten und chronischen Toxizität von Chemikalien oder Böden für höhere Pflanzen
Testspezies:	<i>Avena sativa</i> (L.), Hafer und <i>Brassica rapa</i> , Stoppelrübe (schnellwüchsige Variante CrGC 1-33 oder Rbr)
Testansatz:	10 Samen pro Testgefäß (Plastikdosen, z.B. mit einer Fläche von $6,5 \times 9$ cm und einer Höhe von 9 cm), gefüllt mit jew. 400 g Boden
Substrat:	Variabel: LUFA Sp 2.2, OECD-Kunsterde oder unbelasteter Referenzboden, der dem Testboden weitgehend gleicht (C_{org} , pH, Partikelgröße, Wasserkapazität, Nährstoffe)
Messparameter:	Bestimmung der Auflauftrate innerhalb der ersten Woche, nach 14 Tagen erste Bonitur an einer Teilernte, zweite Bonitur bei der Stoppelrübe mit Erfassung der Samenschoten und bei Hafer unter Berücksichtigung der Blütenbildung
Dauer:	<i>B. rapa</i> : ca. 35 – 40 Tage; <i>A. sativa</i> : 56 – 64 Tage nach Aussaat
Durchführung:	12000 – 20000 lx \pm 15 %, mittels Mehrbanden-Leuchtstoffröhren, Metalldampfhalogenlampen oder andere für Pflanzenwachstum geeignete Leuchtmittel. Bewässerung manuell auf 80 % (Hafer) oder 60 % (Stoppelrübe) der WHK_{max} oder passiv über Dochte (Vortest). Regelmäßiges Neuankorden der Testgefäße im Leuchtfeld. Bei der Stoppelrübe mindestens zweimaliges Bestäuben der Blüten (z.B. zwischen Tag 14 und 25)
Referenzsubstanz:	Keine Angabe
Validität:	Auflaufen von mindestens 8 von 10 Kontrollpflanzen
Auswertung:	Chemikaliertestung: grafische Konzentrations-Wirkungsbeziehung, Bestimmung von EC_x oder LOEC/NOEC mit etablierten Verfahren; Bodentestung: grafische Mischungs-Wirkungsbeziehung, Bestimmung von Effekt-Mischungsverhältnissen, angegeben in % Testboden analog EC_x oder LOEC/NOEC mit etablierten Verfahren.
Einschätzung:	Möglicher Standardtest (eingereicht bei der ISO)
Besonderes:	Primär für die Beurteilung der Bodenqualität entwickelt

Mit den aufgelisteten Testverfahren steht damit eine ausreichende Zahl an akuten Pflanzentests für die Einzelstoffprüfung zur Verfügung, auch wenn einige der Standardprotokolle, insbesondere der OECD-Test 208, einer Überarbeitung bedürfen [37]. Trotz einzelner Ansätze [3; 40] bestehen dagegen Defizite bei länger dauernden Tests mit chronischen Endpunkten, speziell Reproduktionstests.

Nur wenige standardisierte Testverfahren gehen detailliert auf die Probleme bei der Prüfung des Belastungsgrads von natürlichen Böden unterschiedlicher Zusammensetzung ein. Allerdings wurden in Nordamerika mehrere, nur leicht unterschiedliche Pflanzentestmethoden zur Beurteilung potentiell belasteter Standorte ("soil quality assessment of hazardous wastes") empfohlen, die vor allem im Auftrag von Behörden (US-EPA, Environment Canada) entwickelt wurden [21]. Es handelt sich dabei um akute Tests, die dem weitverbreiteten OECD-Test No. 208 ähneln. Inzwischen wurde dieser Ansatz zu einer standardisierten Testbatterie weiterentwickelt [1]. Mit Ausnahme der letztgenannten Beispiele aus Kanada ist diesen Verfahren deutlich anzumerken, dass sie aus der Einzelstoffprüfung übernommen wurden; d.h. die vielfältigen Probleme bei der Testung heterogener natürlicher Böden werden entweder kaum oder gar nicht angesprochen. Darüber hinaus gibt es noch keine international akzeptierte Herangehensweise bei der Beurteilung der Testergebnisse, wofür vor allem das Fehlen einer eindeutigen Kontrolle als Bezugsrahmen verantwortlich ist.

3 Material und Methoden

Im Rahmen des Vorhabens wurde eine Vielzahl von Tests mit Standard- und Testböden durchgeführt. Dabei wurden die für die Versuchsdurchführung wichtigsten Faktoren in verschiedenen Variationen untersucht, um eine optimale Testanleitung zu erarbeiten. Die Ergebnisse dieser Versuche zur Optimierung der Testmethodik werden in diesem Kapitel beschrieben (für Details siehe [25]).

3.1 Testdesign

Drei verschiedene Ansätze wurden in dem Vorhaben untersucht:

A) Dosis-Wirkungs-Tests (Modellschadstoffe in Standardböden)

TNT und Pyren wurden als Modellschadstoffe in 6 Dosis-Wirkungstests in 4 Versuchsläufen in Anlehnung an das in gängigen Akuttests verwendete Testdesign (z.B. OECD 208, [30]) eingesetzt. Um das TNT in den LUFA Sp2.2 Standardboden bzw. die OECD-Kunsterde einzubringen, wurde es mit Aceton gelöst und mit Quarzsand vermischt. Von dem so dotierten Sand wurden Aliquots entnommen und mit den Böden vermischt (maximal 1 % der Trockenmasse). Pyren wurde über eine Cyclohexanlösung auf Sand aufgebracht. Nach Eindampfen des Cyclohexans wurden wie beim TNT Aliquots des beschichteten Sandes in die Böden gemischt.

B) Mischungs-Wirkungs-Tests (Testböden in Standard- oder Referenzböden)

Im Rahmen der Prüfung der Bodenqualität wurden 19 Tests in 12 Versuchsläufen durchgeführt. Bei diesen Tests wurden kontaminierte oder sanierte Testböden (geliefert von der TU Berlin), in einer Mischungsreihe in die Standardböden OECD-Kunsterde und/oder LUFA Sp2.2 Boden oder in den Testböden ähnliche Referenzböden gemischt.

Das Testdesign entsprach dem von Einzelstoffprüfungen; d.h. 4 – 5 Mischungen zwischen Test- und Kontrollböden wurden jeweils verwendet.

C) Zusätzliche Versuche

Zusätzlich Experimente dienten der Absicherung experimenteller Randbedingungen (Faktoren). Zum Teil wurden sie als Varianten im Rahmen der bereits aufgelisteten Versuche und zum Teil in separaten Tests durchgeführt. Einige Versuche wurden als faktorenanalytische Tests nach [28] gestaltet und ausgewertet. Die Auswertung dieser faktorenanalytischen Tests beruht auf der Varianzanalyse, mit der festgestellt wird, wie groß die Einflüsse der Faktoren und deren Kombinationen auf die jeweiligen Endpunkte sind (Signifikanzniveau: 95 %).

3.2 Statistische Auswertung

Bei der Chemikalienprüfung wurden die höchste eingesetzte Konzentration, bei der noch kein signifikanter Effekt gegenüber den Kontrollen auftritt (NOEC) bzw. die nächsthöhere Konzentration (LOEC) oder EC_x -Werte ermittelt. Auch bei Mischungs-Wirkungstests, bei denen Testböden in andere Böden eingemischt werden, wird in diesem Bericht von NOEC/LOEC bzw. EC_x gesprochen, obwohl statt einer Effektkonzentration hier ein Effekt-Mischungsverhältnis, angegeben in % Testbodenanteil, ermittelt wird. Zur Berechnung von NOEC bzw. LOEC Werten wurden Mittelwertvergleiche mit einfaktorierter ANOVA durchgeführt. Hierzu wurden die Messwerte der Einzelpflanzen verwendet, um signifikante Unterschiede (Hemmung als auch Förderung) zu den jeweiligen Kontrollen ausfindig zu machen (zweiseitiger Dunnett-Test; $P = 0,95$). Ein Hemmeffekt wurde dann angenommen, wenn eine signifikante Abnahme des Ertrags, der Blütenbildung etc. gegenüber der Kontrolle gefunden wurde. Die Varianzen der Stichproben wurden mit dem Levene-Test und in einigen Fällen mit Cochran-C und dem Bartlett-Box (F) Test auf Homogenität überprüft. Zur Berechnung von EC_x -Werten mittels Probit-Analyse wurden die Mittelwerte der einzelnen Behandlungsstufen (Konzentrationen bzw. Bodenmischungen) als logarithmische prozentuale Hemmung gegenüber der Kontrolle verwendet. In die Probit-Auswertung wurde der Wert der höchsten Konzentration (Mischung) ohne Hemmwirkung und die darauf folgenden höheren Konzentrationen verwendet.

3.3 Testspezies

Unter der Vorgabe, je eine monokotyledone und eine dikotyledone Pflanzenart zu testen, wurde die Stoppelrübe, *Brassica rapa*, und der Hafer, *Avena sativa*, ausgewählt. Damit sind Vertreter zweier wichtiger Pflanzengruppen vertreten und es ist möglich, insbesondere mit der schnellwüchsigen Variante CrGC von *B. rapa*, in kurzer Zeit Wirkungen auf reproduktionsrelevante Endpunkte zu erfassen. Die Beschränkung auf je eine mono- und eine dikotyledone Pflanze ist letztlich ein pragmatischer Ansatz. Eine Analyse der in der PHYTOTOX Datenbank enthaltenen Daten aus einer Vielzahl von Tests mit Algen und höheren Pflanzen belegte keine systematischen Unterschiede zwischen mono- und dikotyledonen Pflanzen [15].

Die bekannten Richtlinien und Entwürfe für Tests mit höheren Pflanzen machen unterschiedliche Vorschläge, was die Testspezies und deren Zahl betrifft. In einigen Fällen (ASTM, EPA, ISO, OECD) gibt es verhältnismäßig umfangreiche Listen von Kulturpflanzen. Es wurde gefor-

dert, bis zu 10 Arten aus 6 Familien für die Testung von Effekten auf Nichtzielpflanzen zu verwenden, weil verschiedene Spezies sehr unterschiedlich auf Schadstoffe reagieren können [9]. Die Erweiterung der EPA-Liste um Wildpflanzen bis hin zu Bäumen wurde ebenfalls diskutiert [16]. Dies sei erforderlich, wenn z.B. ein "ortsspezifischer" Test die Lebensraumfunktion von Waldböden prüfen soll. Das Umweltbundesamt fordert für die Bewertung von Pflanzenschutzmitteln Tests mit 6 Arten aus 6 Familien, darunter 3 mono- und 3 dikotyledone, eine Stickstoff fixierende Leguminose, sowie *Avena* und *Brassica* [17]. Beim Vergleich von 30 Arten in Akuttests mit Borsäure in zwei Standardböden zeigte sich, dass das Sensitivitätsmuster in den beiden Böden unterschiedlich war [1]. Unter Berücksichtigung einer Reihe weiterer Kriterien (Bedeutung, ökologische Rolle, Verfügbarkeit, Biochemie etc.) wurden dort schließlich 12 Testspezies empfohlen, zu denen weder Hafer noch die Stoppelrübe zählen.

Zur Prüfung des Erfolgs einer Bodensanierung wäre die Forderung nach einer hohen Zahl gleichzeitig zu testender Pflanzen unverhältnismäßig. Wichtig ist in solchen Fällen, rasche Ergebnisse mit bewährten Tests, also solchen mit gut charakterisierten Testpflanzen, zu erhalten. Insofern ist der Ansatz des BBA-Entwurfs, der nur die Stoppelrübe und Hafer vorsieht, eine gute Grundlage. Pestemer & Auspurg (1986) untersuchten 15 Pflanzenarten und bestätigten die gute Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit bei Stoppelrübe und Hafer gegenüber bodenbürtigen Schadstoffen [32]. In der Literatur finden sich nicht viele Untersuchungen über die Verwendbarkeit alternativer Arten. Gurke (*Cucumis sativus*) und Radieschen (*Raphanus sativus*) wurden in einer kleinen Testbatterie zur Bodenbewertung eingesetzt [41]. Vor allem wurde aber *Arabidopsis thaliana* anfangs als Kandidat für den chronischen Pflanzentest angesehen, da Erfahrungen mit dieser Spezies in der Literatur vorlagen [35; 36]. Die gleiche Arbeitsgruppe empfahl später die Verwendung der auch hier eingesetzten schnellwachsenden *B. rapa* [40].

Von *B. rapa* wurde die schnellwachsende Variante CrGC 1-33 erprobt, die schon früh beschrieben wurde [47]. Saatgut wurde von der Crucifer Genetics Cooperation an der Universität von Madison, Wisconsin (USA) bezogen (derzeitiger Lieferant: Carolina Biological Supply Company, Burlington, NC; USA). Saatgut für Hafer der Sorte Lutz wurde von der Raiffeisen Genossenschaft (Frankfurt/Main) zur Verfügung gestellt. Die Wachstumsphasen des Hafers wurden nach [4] und [43] beschrieben.

3.4 Test-, Kontroll-, Referenzböden und deren Behandlung

Kontaminierte oder sanierte Testböden wurden im Verlauf des Projekts von der TU Berlin zur Verfügung gestellt (Tab. 2 und Tab. 3). Darunter waren Böden mit Belastungen an TNT, Mineralölen oder polyzyklischen Kohlenwasserstoffen, wobei typischerweise Mischbelastungen vorlagen, z. B. in Verbindungen mit Schwermetallbelastungen. So enthielt der Boden SPAK1a neben polyzyklischen Kohlenwasserstoffen noch Chrom in einer deutlich über dem in der Bundesschutzverordnung genannten Vorsorgewert liegenden Konzentration. Alle Böden wurden im Kunststoffeimern, die mit Aluminiumfolie ausgeschlagen waren, geliefert, und wurden darin bis zur Verwendung im Kühlschrank bzw. gekühlten Kellern gelagert. Lagerungszeiten über 3 Wochen hinaus wurden vermieden, um die Bindung von Schadstoffen an Bodenbestandteile (Schadstoffalterung) bzw. Behälter, möglichen Abbau und die Verflüchtigung der im Boden enthaltenen Schadstoffe gering zu halten.

Der Standardböden LUFA Sp2.2 und die OECD-Kunsterde [29] wurden als Kontrollböden verwendet. Sie dienten zum einen als Substrat für die Dosis-Wirkungstests mit Pyren und TNT und zum anderen als Substrat für Mischungs-Wirkungstests mit den diversen Testböden. In einigen Fällen wurden von der TU Berlin Referenzböden zu einzelnen Testböden zur Verfügung gestellt. Entweder wurden sie wie Testböden behandelt und mit LUFA Sp2.2 oder OECD-Kunsterde vermischt oder sie dienten ihrerseits als Mischsubstrat für belastete Testböden.

Die Böden wurden bei einer Maschenweite von 5 mm gesiebt. Sehr stark bindige Böden mussten dafür zunächst luftgetrocknet werden. Unmittelbar vor den jeweiligen Versuchen wurden die Bodenmischungen hergestellt, von denen dann jeweils 400 g in ein Testgefäß zu füllen waren. Da Bodenverdichtung im allgemeinen eine negative Wirkung auf die Samenkeimung und das Wachstum der Pflanzen hat [18], wird empfohlen, die gesiebten Böden lufttrocken zu verwenden. Die Aussaat sollte vor dem Befeuchten der Böden erfolgen.

3.5 Düngung

Die Böden wurden meist nicht gedüngt (demineralisiertes Wasser diente zum Gießen bzw. für die Wasserreservoirs). Zwei Varianten der Düngung dienten der Überprüfung des Einflusses des Nährstoffangebots auf das Testergebnis:

- A) Düngung mit einer mineralischen Nährlösung (modifiziert nach [12]) über das Gießwasser (Herstellung einmalig bei Versuchsbeginn).
- B) Düngung durch manuelle Einarbeitung von Floraself Blaukorn NPK-Dünger in den Boden in drei Versuchen. Entsprechend einer in der Landwirtschaft üblichen Aufwandmenge von 100 g/m² wurden je Becher (75 cm² Bodenoberfläche; 400 g Boden) 750 mg Dünger eingebracht.

Ausgehend von den Ergebnissen dieser Versuche und theoretischen Überlegungen ist eine Angleichung der Nährstoffgehalte zwischen Kontroll- und Testböden nicht praktikabel, da die verfügbaren Mengen mehrerer Ionen eingestellt werden müssten. Es ist nicht zu empfehlen, generell alle Böden aufzudüngen, da einzelne Testböden bereits sehr nährstoffreich sein können und so eine Überdüngung möglich ist.

Sind die Testböden nährstoffärmer als die Kontrollen, kann das Wachstum der Pflanzen in diesen Testböden hinter der Kontrolle zurückbleiben. Diese "Hemmung" des Wachstums kann nur schwer von Schadstoffeffekten unterschieden werden. Durch die Verwendung relativ nährstoffärmer Standardböden als Mischsubstrat für die Testböden tritt dieser Fall aber nur selten ein. Sind die Testböden nährstoffreicher als die Kontroll- bzw. Mischsubstrate, kann bei niedrigen Mischungsverhältnissen eine Wachstumsförderung auftreten. Bei hohem Kontaminationsgrad spielen die Nährstoffunterschiede nur eine untergeordnete Rolle und es kann kaum erwartet werden, dass die Hemmwirkung deutlich sichtbar wird.

3.6 Testgefäße

Als Testgefäße dienten Einweg-Polystyrolbecher mit einer Höhe von ca. 10 cm bei einer Grundfläche von 5 × 8 cm (unten) bzw. 7,5 × 10 cm (oben). Bei Bewässerung mit einem Glasfaserdocht (meist aus umflochtenen GLS-Silan; Durchmesser 10 ± 2 mm) wurde zentral in den Becherboden ein Loch gestanzt und ein 5,5 cm langer Docht so eingesetzt, dass dieser

etwa 0,5 – 1,0 cm in den Becher ragte. Das andere Ende befand sich in einer als Wasserreservoir dienenden Polystyrolschale. Es wurden stets nur Replikate gleicher Behandlungsvarianten in ein gemeinsames Reservoir gestellt. Handelsübliche Blumentöpfe haben oft zusätzliche Bodenlöcher. Dies vermeidet zwar Staunässe, andererseits kann es mit dem rückfließenden Wasser zu einem Verlust von Nähr- oder Schadstoffen kommen. Ebenso können während der langen Versuchsdauer Wurzeln in die Reservoirs auswachsen. Daher sind solche Gefäße nicht zu verwenden.

Die hier und in der Literatur gemachten Erfahrungen belegen, dass unter einigermaßen günstigen Bedingungen, d.h. solange weder Licht, Wasser oder Nährstoffe das Wachstum limitieren, die Dichte der Pflanzen auf einem Standort bzw. in einem Gefäß nicht sehr stark den Ertrag individueller Pflanzen beeinflusst. In Hinblick auf die statistische Absicherung der chronischen Endpunkte sollten stets vier Pflanzen je Gefäß bis zum Versuchsende kultiviert werden, auch wenn dann in einigen Fällen am Tag 14 nur eine beschränkte Zwischenernte möglich ist. Auch dann sollte sich die Auswertung auf die geernteten Pflanzen und nicht auf die Erträge pro Gefäß beziehen.

Tab. 2: Im Teilvorhaben verwendete Böden (Datenquelle: TU Berlin)

Boden	pH	C _{org} [%]	WHK [%]	K _{CAL}	P _{CAL} [mg /100 g]	N _{min}	N _{tot}	Bodenart [%]			Leitfähig- keit [μS/cm]	Salz- gehalt [%]
								T	U	S		
OMKW0	6,9	1,2	38	9,7	2,3	0,28	119	22	49	29	319	0,21
OMKW1a	6,7	0,9	28	9,5	1,0	0,38	70	6	37	57	209	0,14
OMKW1b	6,7	1,1	17	5,0	0,6	1,68	74	15	32	53	256	0,17
BMKW 0	7,1	0,4	21	1,1	0,9	0,1	14	2	3	95	54	0,04
BMKW1a	7,2	1,6	23	4,6	4,9	0,2	41,4	6	1	94	164	0,11
SPAK1a	6,3	0,76	13	110	4,5	0,49	28	7	17	76	326	0,21
SPAK1b	5,8	5,4	41,5	316	31	12	449	12	19	69	1122	0,7
CTNT0	3,3	5,3	90	6,0	0,7	1,6	458	28	61	11	73	0,05
CTNT04a	4,1	6,3	99	3,5	0,36	4,1	341	23	58	19	–	–
CTNT04b	7,6	9,4	104	750	221	83	925	24	47	29	1842	1,14
CTNT1	4,5	2,9	47	9,0	1,8	3,0	230	18	55	27	63	0,05
CTNT4a	6,7	5,6	54	12	1,2	6,8	321	16	45	39	138	0,09
CTNT4b	8,0	7,7	90	483	161	4,9	787	24	32	44.	663	0,42
LUFA 2.2	5,6	2,5	45	19	0,9	0,13	206	7	16	77	97	0,07

Der 1. Buchstabe der Bodenbezeichnung steht für den Ort der Entnahme. Böden mit Mineralölen als Hauptkontaminanten werden mit MKW, solche mit Trinitrotoluol mit TNT und solche mit polyzyklischen Kohlenwasserstoffen mit PAK bezeichnet. Die Zahl 0 wird bei unbelasteten Referenzböden eingesetzt, weitere Zahlen dienen der Nummerierung von Böden vom gleichen Standort. Das Kürzel a wird bei belasteten, b bei sanierten Böden angewandt.

Tab. 3: Schadstoffgehalte der im Teilvorhaben verwendeten Böden (Datenquelle: TU Berlin)

Boden (-material)	Bodenart	Schwermetalle [mg/kg]						Organ. Schadstoffe [mg/kg]				
		Blei	Cadmium	Chrom	Kupfer	Nickel	Zink	EPA-PAK	TVO-PAK	PCB	2,4,6-TNT	MKW (DIN 38409/18)
OMKW0	SI3	228	<0,2	n.b.	56	20	168	2,1	1,1	0,008	n.b.	n.n.
OMKW1a	Su3	211	<0,2	n.b.	27	16	152	2,9	1,7	0,003	n.b.	1420
OMKW1b	SI4	108	<0,2	n.b.	34	35	45	1,8	0,9	<0,01	n.b.	353
BMKW 0	Ss	6,0	0,7	2,4	3,8	3,8	81	0,2	0,12	<0,01	n.b.	468
BMKW1a	St2	41	0,5	20	43	11	159	4,4	0,55	0,013	n.b.	5445
SPAK 1a	SI2	24	<0,2	885	4,4	7,2	44	1102	157	0,01	n.b.	218
SPAK 1b	SI4	20	<0,01	751	19	20	80	33	10	<0,01	n.b.	190
CTNT 0	Lu	785	<0,2	27	31	19,6	136	1,2	0,7	0,005	0,1	n.n.
CTNT 04a	Lu	490	0,9	21	24	17	202	0,72	0,39	0,016	0,049	n.b.
CTNT 1a	Lu	254	0,8	19	102	29	875	18	7,4	0,01	1600	n.b.
CTNT 4a	Ls2	1000	4,6	25	84	27	920	32	17	0,14	3100	n.b.
CTNT 4b	Ls2	772	4,0	32	83	24	747	28	14	0,13	n.n.	n.b.
LUFA 2.2	SI2	21	<0,01	n.b.	6,5	1,5	20	0,54	0,30	0,002	n.b.	n.b.

Kurzbezeichnungen der Bodenarten in Spalte 2 nach [10]. Sekundärkontaminanten, die die Vorsorgewerte der entsprechenden Bodenart nach der Bodenschutzverordnung (BBodSchV 1999) überschreiten, sind fett gedruckt. Je nach pH-Wert wurden teilweise strengere Vorsorgewerte verwendet. Lehmige Sande wurden als Sande eingestuft.

n. b.: nicht bestimmt; n.n.: nicht nachweisbar, i. U.: in Untersuchung

3.7 Durchführung der Versuche

3.7.1 Inkubationsbedingungen

Die Versuche fanden in klimatisierten Labors bei einer Temperatur von 22 ± 3 °C statt. Teilweise wurden Leuchtstoffröhren, teilweise Metaldampf-Halogenlampen verwendet, wobei der Abstand zu den Testgefäßen: 50 cm bzw. 150 cm betrug. Die Beleuchtungsstärke lag in beiden Fällen bei ca. 12000 lx an der Bodenoberfläche. Ein Hell/Dunkel-Rhythmus von 16:8 h wurde immer eingehalten.

3.7.2 Aussaat

Im vorliegenden Vorhaben wurden die Effekte der Aussaatmethode, insbesondere die Saattiefe, bei *B. rapa* die Vorkeimung im Vergleich zur Direktsaat und bei Hafer der Einfluss der Größe der Samenkörner auf die Pflanzenentwicklung untersucht. Bei Direktsaat wurden mit Ausnahme eines Versuchs mit Hafer (Vorsortierung nach Gewicht) zufällig ausgewählte Samenkörner ausgelegt. Bei lockeren Böden wurden die Samen direkt in den Boden gesteckt, während bei bindigen Böden die Samen in vorbereitete Löcher ausgelegt und dann überschichtet wurden. Bei *B. rapa* müssen die Samen nicht nach Größe oder Farbe unterschieden werden. Bei Hafer ist es möglich, aber nicht erforderlich, nach der Größe zu sortieren, um gleichmäßig wachsende Pflanzen zu erhalten. Beschädigte oder sehr unregelmäßig geformte Körner sollten nicht verwendet werden. Die Samen werden nicht vorgekeimt, sondern direkt in definierter Tiefe ausgelegt. Dabei genügen in der Regel 10 Samen, um in den Kontrollen 8 Pflanzen je Topf zu erhalten. Eine zu tiefe Aussaat kann das Auflaufen verzögern oder verhindern, bei flacher Aussaat ist dagegen Sorge zu tragen, dass die Befeuchtung der Bodenschicht, in der die Samen liegen, gewährleistet ist. Eine Tiefe von 10 mm ist daher zu empfehlen.

3.7.3 Bewässerung

In den meisten Fällen wurde mit demineralisiertem Wasser und selten mit einer Nährsalzlösung [12] gegossen.

- A) Dochtbewässerung: Wie beschrieben wurden die Testgefäße mit Glasfaserdochten versehen und über ein Wasserreservoir versorgt. Dochtbewässerung führt, wenn der Boden hinreichend saugkräftig ist, zu einer Bodenfeuchte, die etwa 100 % der Wasserhaltekapazität entspricht.
- B) Handbewässerung: Die Testgefäße erhielten keine Dochte (und auch keine untere Öffnung). Wasser wurde mit einer Spritzflasche auf dem Boden verteilt, bis ein Wassergehalt, der 60 % der Wasserhaltekapazität entsprach, erreicht war. Bei kleinen Pflanzen (Wuchshöhe < ca. 10 cm) genügte zweitägliches Gießen, später musste täglich gegossen werden.
- C) Kombinierte Bewässerung: In wenigen Versuchen (vor allem bei Böden, die schlecht über Dochte Wasser aufnehmen), meist mit *B. rapa* CrCG, wurden Testgefäße mit Dochten versehen und zusätzlich von Hand gegossen.

Bei manueller Bewässerung kommt es zu periodischen Schwankungen der Bodenfeuchte, deren Amplitude vom Wasserverbrauch durch die Pflanzen (und in geringerem Maße durch Verdunstung) abhängt. Bei Dochtbewässerung stellt sich dagegen eine weitgehend stabile Bodenfeuchte ein. Zwar können die Testpflanzen Schwankungen der Feuchte ertragen, solange der Welkepunkt nicht unterschritten wird. Allerdings kann die Verfügbarkeit von Schadstoffen von der Feuchte der Böden abhängen. Die Verfügbarkeit von Phenanthren und Di(2-Ethylhexyl)Phtalat verändert sich durch wiederholtes Trocknen und Wiederbefeuchten des Bodens [45].

Aufgrund dieser Erfahrungen wird die Bewässerung über Dochte empfohlen. Dabei ist sicherzustellen, dass es bei deren Verwendung in schlecht Wasser aufnehmenden Böden nicht zu einer Mangelbewässerung kommt. Daher sollte mit einem Vortest die Fähigkeit der Böden, Wasser über Dochte aufzunehmen geprüft werden. Bei Problemböden kann zusätzlich manuell gegossen werden. Hilfreich ist auch ein anfängliches Eintauchen der Testgefäße in Wasser. Ein Aufschwimmen der Samen muss verhindert werden und es muss darauf geachtet werden, dass insbesondere während der Frühphase des Versuchs die oberen Bodenschichten feucht bleiben. Ansonsten kann es zu einer versuchsbedingten Hemmung kommen, die unter Umweltbedingungen so nicht zu erwarten wäre. Es wurde beschrieben, dass mineralölbelastete Böden so wasserabweisend sein können, dass Pflanzen schlecht darin gedeihen [38]. Die Autoren beobachteten auch, dass die Fähigkeit von Böden, Wasser aufzusaugen, durch zu starkes Abtrocknen verloren gehen kann.

3.7.4 Bestäubung

Die Blüten der schnellwachsenden *B. rapa* CrGC wurden einmal oder mehrmals mit einem weichen Zeichenpinsel bestäubt. Dies ist notwendig, um gleichmäßige und hohe Erträge an Samenschoten zu erhalten. Mit dem Bestäuben sollte bald nach dem Aufblühen, also nach etwa zwei Wochen, begonnen werden. Bei mehrfacher Bestäubung verringerte sich die Variabilität der Schotenerträge zwischen den einzelnen Pflanzen. Haferblüten wurden während der Versuche nicht bestäubt, da die Haferpflanzen bereits kurz nach dem Ausschleichen der Rispen geerntet wurden.

3.7.5 Probennahme und Endpunkte

Der zeitliche Ablauf des Tests ist Abb. 1 und die Zahl der Endpunkte Tab. 4 zu entnehmen. Die Versuche dauerten 32 – 40 Tage bei *B. rapa* bzw. 56 – 64 Tage bei *A. sativa*. Der Wachstumsverlauf der Testpflanzen folgt keiner einfachen Funktion und wird durch Bodeneigenschaften wie den Nährstoffgehalt beeinflusst. Kontrollpflanzen und solche aus belasteten Ansätzen können sich hinsichtlich des Entwicklungsstadiums unterscheiden. Insbesondere bei der schnellwachsenden Stoppelrübe können erhebliche Unterschiede im Wassergehalt und der Zahl der an der Pflanzen verbliebenen Blätter bestehen. Daher sollte stets die Trockenmasse bestimmt werden und der Reifezustand der Pflanzen sollte dokumentiert werden. Gut nährstoffversorgte Pflanzen blühen im allgemeinen später. Die Versuche sollten erst beendet werden, wenn Blüten oder Samenschoten gleichmäßig vorhanden sind.

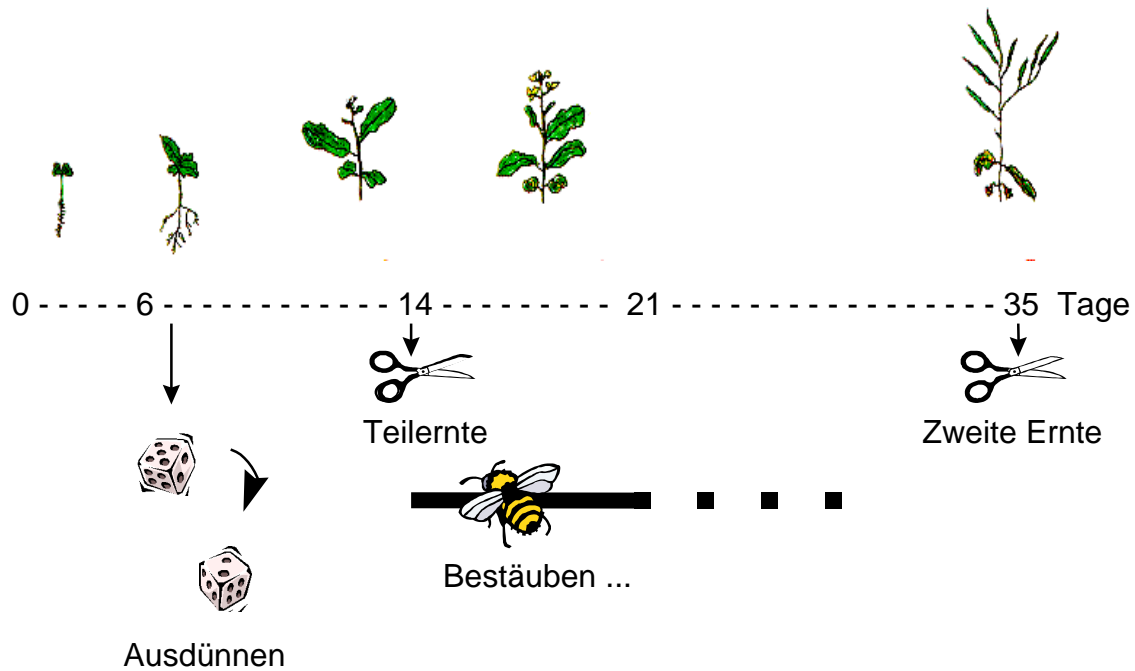


Abb. 1: Zeitliches Arbeitsschema für den chronischen Pflanzentest mit der schnellwachsenden *Brassica rapa* CrGC. Tag 7: Ausdünnung von den maximal 10 Keimlingen auf 8. Tag 14: Ernte und Bonitur des 1. Teils der Pflanzen. Danach manuelle Bestäubung. Tag 35: Bonitur des 2. Teils der Pflanzen. Bei Hafer dauern die Versuche ca. 8 Wochen bis zum Blühen. Eine Bestäubung erfolgt dort nicht.

Tab. 4: Messparameter und Zeitpunkte der Messungen während des Tests.

Messparameter	B. rapa, A. sativa 3 – 7 Tage	B. rapa, 14 Tage	B. rapa, ca. 35 Tage	A. sativa, 14 Tage	A. sativa, ca. 60 Tage
Anzahl aufgelaufene Pflanzen	•				
Sprosslänge		•	•	•	•
Sprossfrisch- und –trockengewicht		•	•	•	•
Anzahl der Blüten bzw. Knospen		•			•
Anzahl der Blätter				•	•
Anzahl der Samenschoten			•		
Schotenfrisch- und –trockengewicht			•		

3.8 Chemische Analytik

Begleitend zu einem (Pyren) sowie zwei (TNT) Versuchen wurde die Konzentration beider Stoffe im Boden bei Versuchsbeginn und –ende bestimmt. Dabei wurde der zeitliche Verlauf der TNT-Abnahme und die Bildung der Metabolite 2-Amino-4,6-Dinitrotoluol und 4-Amin-2,6-Dinitrotoluol gemessen. TNT und seine Metabolite wurden auch im Wasser der Reservoirs bestimmt, da ihre Auswaschung über die Dochte möglich ist. Mit der chemischen Analytik wurde die CAU GmbH, Dreieich beauftragt. Pyren wurde in zwei Schritten (Aceton/Wasser, danach Cyclohexan) aus dem Boden extrahiert und mittels GC-MS bestimmt. TNT und die Metaboliten wurden aus dem Boden mittels Ultraschall-Extraktion mit Methanol und aus den Wasserproben mittels Festphasenextraktion gewonnen und mit HPLC-UV bestimmt.

4 Ergebnisse und Bewertung

4.1 Dosis-Wirkungstests mit Einzelstoffen

Im Vorhaben wurden Versuche mit dem mäßig wasserlöslichen Sprengstoff TNT (2,4,6-Trinitrotoluol) und dem schwer wasserlöslichen PAK Pyren durchgeführt. Diese beiden Substanzen wurden gewählt, da sie auch in einem Teil der im BMBF-Verbundprojekt ausgewählten Testböden vorkamen (neben einigen PAK-belasteten Böden insbesondere TNT-Altlasten aus Claustal-Zellerfeld). Zwar ist die Auswahl einer Referenzsubstanz als Positivkontrolle für diesen Test dringend zu empfehlen, doch sind TNT wie Pyren aus unterschiedlichen Gründen dafür nicht geeignet.

4.1.1 Versuche mit Pyren

In einem Dosis-Wirkungsversuch mit der schnellwachsenden Variante CrGC der Stoppelrübe wurde Pyren bis zu einer Konzentration von 10 g/kg in LUFA Boden und OECD-Kunsterde getestet, ohne dass eine Hemmwirkung festgestellt werden konnte. Unterschiede im Wachstum gab es in diesem Versuch nur im Vergleich der beiden verwendeten Substrate: Pflanzen in LUFA Boden waren mehr als doppelt so schwer wie in OECD-Kunsterde (Abb. 2). Aufgrund des Fehlens einer Wirkung durch Pyren wurden keine weiteren Versuche mit dieser Substanz durchgeführt.

Der Abbau des Pyrens kann als Ursache für die geringe Toxizität ausgeschlossen werden, da nach 35 Tagen noch 91 % der Anfangsmenge gefunden wurden. Entweder wirkt Pyren nicht toxisch auf Pflanzenzellen oder es ist als schwer wasserlösliche Substanz für die Pflanzen kaum verfügbar. Es wurde gezeigt, dass polyzyklische Aromaten toxisch gegenüber Pflanzen wirken, sobald sie über den Wasserpfad verfügbar sind [22]. In Lysimeterversuchen war der Transfer von PAKs vom Boden in die Pflanze über die Wurzel vernachlässigbar [13]. Unter natürlichen Bedingungen kann es zu einer Aufnahme über die Luft oder über auf den Pflanzen deponierten kontaminierten Bodenpartikeln kommen, doch im entlüfteten Labor ist dieser Transferpfad vernachlässigbar.

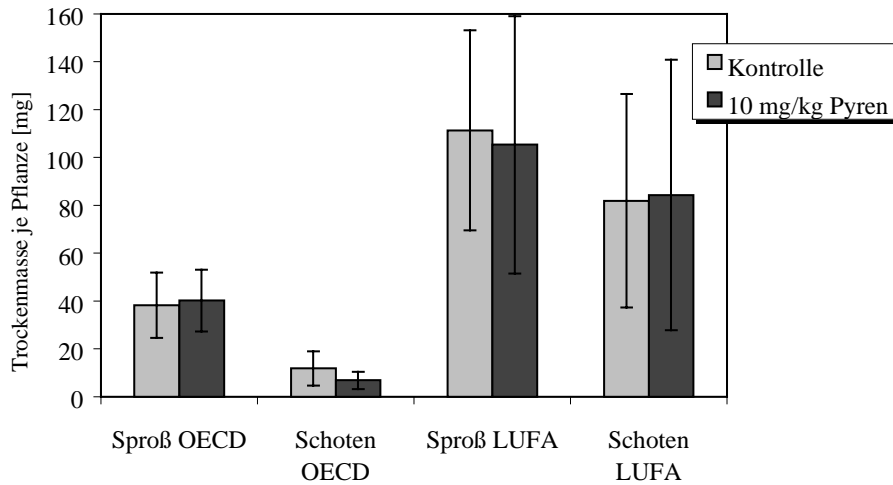


Abb. 2: Die schnellwachsende Stoppelrübe *Brassica rapa* CrGC wurde im 35-tägigen Versuch von Pyren bis zu einer Konzentration von 10 g/kg nicht gehemmt.

Der Einsatz von anderen polyzyklischen Kohlenwasserstoffen anstelle von Pyren im Rahmen des Vorhabens wurde in Absprache mit der Verbundkoordination verworfen, da PAKs mit niedrigerem Molekulargewicht als Pyren aufgrund ihrer höheren Flüchtigkeit und schnelleren Abbau im Boden ebenfalls keine starke Wirkungen erwarten lassen. Die Verfügbarkeit hydrophober Substanzen im Boden hängt stark vom Gehalt an gelöster organischer Substanz ab. Außerdem wurde bei PAKs die Mobilisierung durch Detergentien gefunden [27] und auch als Maßnahme zur Beschleunigung biologischer Bodenreinigung häufig beschrieben [31; 46; 48]. Optimale Solubilisierung erfolgt im Bereich der kritischen Micellenkonzentration (CMC), die jedoch im Boden schwer abzuschätzen ist. Die Mobilisierung von polychlorierten Biphenylen unterhalb der CMC wurde jedoch auch beobachtet [14].

Um eine eventuelle Mobilisierung von Pyren durch ein Detergens zu überprüfen, wurde *B. rapa* CrGC in OECD-Kunsterde kultiviert, der entweder Pyren in 5 Konzentrationen von 26 - 1000 mg/kg, Triton X-100 (400 mg/kg Boden) oder beides zugesetzt wurden. Dieses nichtionische Tensid wurde nach Vorversuchen ausgewählt, weil es bei der eingesetzten Konzentration keine signifikanten Einflüsse auf das Wachstum der Stoppelrübe hatte. Auch in Gegenwart von Triton X-100 gingen keine Effekte von Pyren im getesteten Konzentrationsbereich aus.

4.1.2 Versuche mit TNT

4.1.2.1 Stoppelrübe (*Brassica rapa* CrGC)

Die Wirkung von TNT bei *B. rapa* CrGC in LUFA Sp2.2 Boden und OECD-Kunsterde wurde sowohl bei Docht- als auch bei Handbewässerung ermittelt. Begleitend wurde der TNT Gehalt der Böden am Versuchsbeginn und -ende bestimmt (Abb. 3), an letzterem auch zusätzlich in den Wasserreservoirs. In den Ansätzen mit niedrigen TNT Konzentrationen (6,2; 18,5 und 55 mg/kg nominal) verschwand TNT im Beobachtungszeitraum völlig, während bei höheren Konzentrationen Spuren (167 mg/kg nominal) bzw. erhebliche Mengen (500 mg/kg nominal) im Boden gefunden wurden. Ursachen für die unterschiedlichen Wiederfunde zwischen

beiden Bewässerungsmethoden in den zwei Böden können keine angegeben werden. Dieses Ergebnis kann nicht durch Auswaschung von TNT erklärt werden, da a) in handbewässerten Ansätzen keine Auswaschung möglich war und b) in den Proben aus den Wasserreservoirs der dochtbewässerten Ansätze kein TNT gefunden wurde. Allerdings wurden in diesem Versuch keine TNT-Metaboliten gesucht. Eine Hemmung des Wachstums der Stoppelrübe durch TNT wurde unabhängig von der Bewässerungsart und des Bodentyps stets gefunden (Abb. 4).

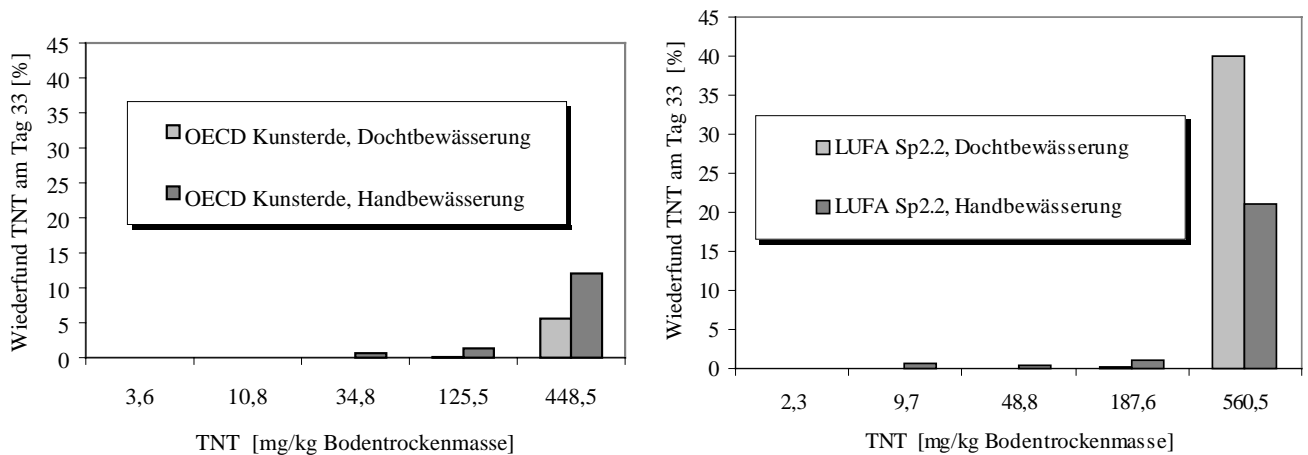


Abb. 3: Wiederfunde von TNT nach 33 Tagen bezogen auf die gemessene Konzentration bei Versuchsbeginn im Versuch mit *B. rapa* CrGC in zwei Standardböden und in Abhängigkeit von der Bewässerungsmethode

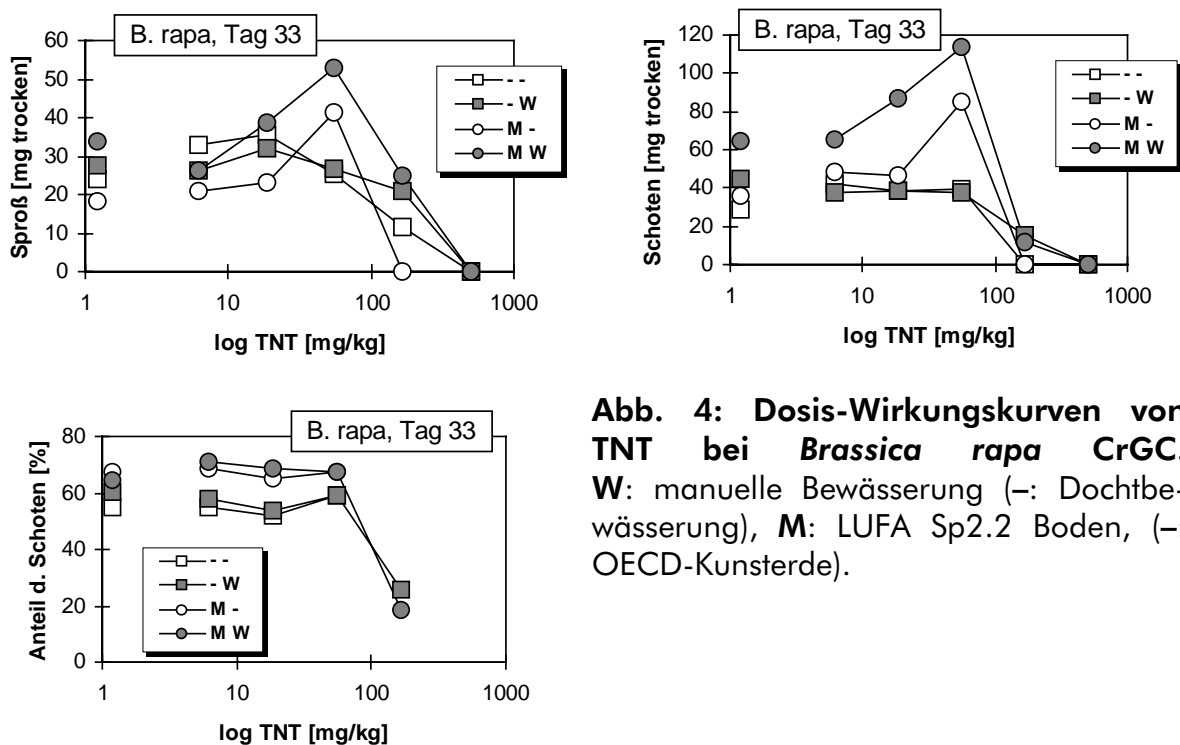


Abb. 4: Dosis-Wirkungskurven von TNT bei *Brassica rapa* CrGC. W: manuelle Bewässerung (-: Dochtbewässerung), M: LUFA Sp2.2 Boden, (-: OECD-Kunsterde).

B. rapa CrGC überlebte bei der höchsten Konzentration von TNT nicht bis zum Tag 33 (Abb. 4). Bei der zweithöchsten Konzentration waren die Sprosserträge verringert. Beim Schoten-

ertrag war die Hemmung noch deutlicher ausgeprägt (Abb. 4: rechts und unten). Der Einfluss der Bewässerungsmethode auf die Dosis-Wirkungs-Kurven war gering. In LUFA Sp2.2 Boden kam es jedoch zu einer starken Steigerung des Ertrags (Hormesis) bei den mittleren Konzentrationen von 18,5 und 55 mg/kg.

Für fast alle Endpunkte wurde eine NOEC von 55,5 mg/kg und eine LOEC von 167 mg/kg ermittelt, was dem Ergebnis eines Akuttests mit *B. rapa* entspricht (NOEC = 40 mg/kg; [20]). Die EC₅₀-Werte lagen je nach Endpunkt im Bereich von 96 bis 207 mg/kg. Teilweise, z.B. beim Sprossgewicht, wurden signifikant höhere EC₅₀-Werte in Ansätzen mit LUFA Boden und Dochtbewässerung festgestellt.

4.1.2.2 Hafer (*Avena sativa*)

Parallel zur Untersuchung von TNT in LUFA bei Hafer wurden die Dochtweite und die Düngung variiert, die beide die Dosis-Wirkungskurven beeinflussten (Abb. 5). Bei den ungedüngten Ansätzen kam es bei niedrigen TNT Konzentrationen zu einer sehr geringen Wachstumsförderung, während sie bei den gedüngten Ansätzen wesentlich stärker ausgeprägt war. Bei steigender TNT Konzentration kam es stets zu einer Wachstumshemmung. Bei sehr hoher Konzentration konnte der Dünger die toxische Wirkung des TNTs nicht mehr ausgleichen und die Erträge in den ungedüngten und gedüngten Ansätzen glichen sich an. Ohne Dünger waren die NOEC-Werte zum Teil niedriger als mit Düngung, wo bei niedrigen TNT-Konzentrationen mehrfach eine Förderung des Ertrags gefunden wurde.

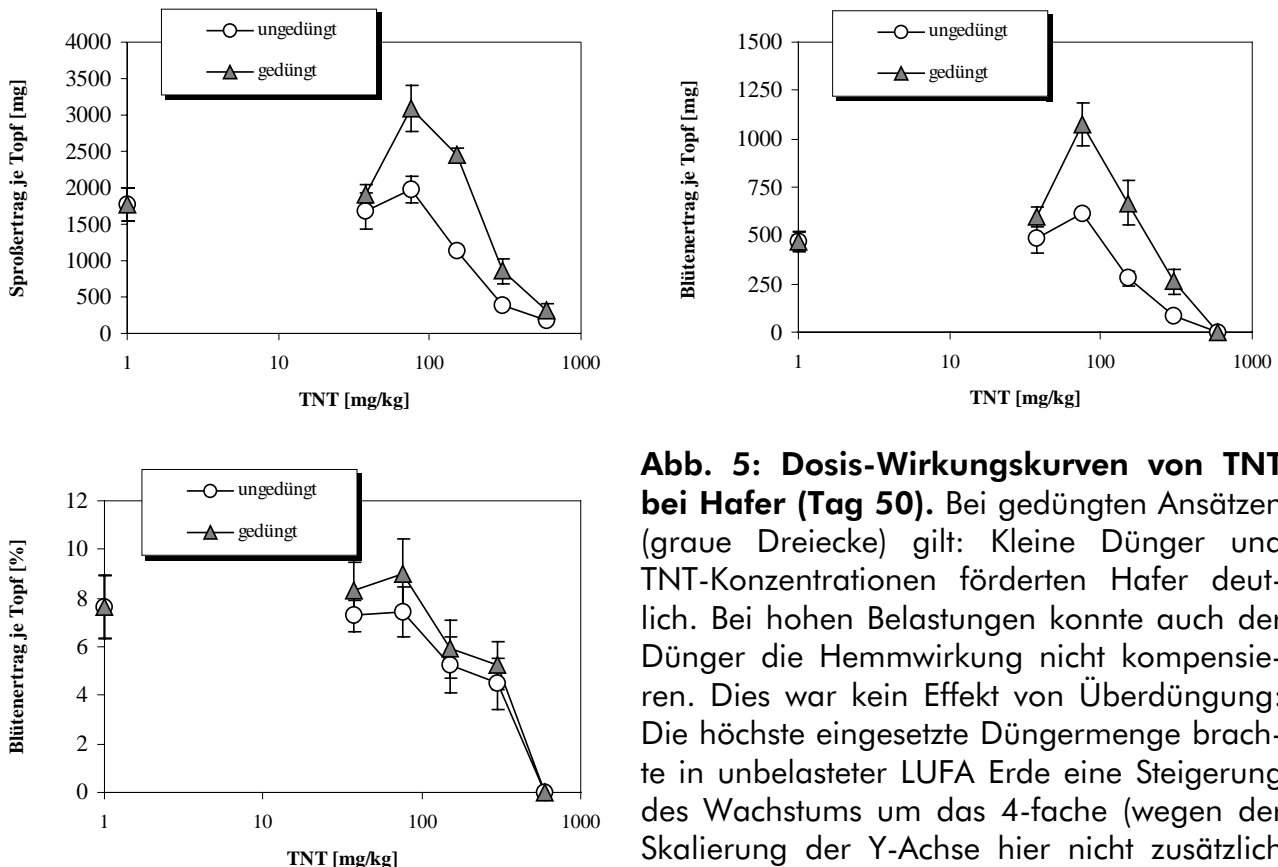


Abb. 5: Dosis-Wirkungskurven von TNT bei Hafer (Tag 50). Bei gedüngten Ansätzen (graue Dreiecke) gilt: Kleine Dünger und TNT-Konzentrationen förderten Hafer deutlich. Bei hohen Belastungen konnte auch der Dünger die Hemmwirkung nicht kompensieren. Dies war kein Effekt von Überdüngung: Die höchste eingesetzte Düngermenge brachte in unbelasteter LUFA Erde eine Steigerung des Wachstums um das 4-fache (wegen der Skalierung der Y-Achse hier nicht zusätzlich zu den ungedüngten Kontrollen aufgetragen).

Generell schwankten die NOEC/LOEC-Werte je nach Endpunkt stark. So lag die niedrigste LOEC für die Sprosslänge am Tag 50 bei 37,5 mg/kg während eine signifikante Hemmung der Blütenzahl erst bei der höchsten Konzentration von 600 mg/kg stattfand. Für die Mehrzahl der Endpunkte lagen NOEC bzw. LOEC in ungedüngten Ansätzen bei 75 bzw. 150 mg/kg und in gedüngten bei 150 bzw. 300 mg/kg. Damit lagen diese Werte im Bereich der für *B. rapa* ermittelten Ergebnisse. Bei Hafer lagen die EC₅₀-Werte für die verschiedenen Endpunkte in gedüngten Ansätzen mit 317 – 505 mg/kg im Mittel um den Faktor 1,3 über denen in ungedüngten Ansätzen (180 – 360 mg/kg) und damit über denen bei *B. rapa*. Zum Vergleich: Es wurde für Hafer nach 14-tägiger Inkubation in LUFA Boden eine NOEC von 175 mg/kg und eine LOEC von 350 mg/kg berichtet [20].

4.2 Versuche mit kontaminierten oder sanierten Testböden

In diesem Kapitel werden Testergebnisse mit kontaminierten bzw. sanierten Testböden vorgestellt, wobei aufgrund der großen Zahl dieser Tests nur eine beschränkte Auswahl mit Schwerpunkt auf TNT bzw. PAK präsentiert werden kann. Aus demselben Grund werden auch nicht alle Ergebnisse für beide Testspezies getrennt aufgeführt. Speziell wurde auf eine detaillierte Darstellung der Versuche mit MKW-belasteten Böden verzichtet, bei denen sich in den meisten Fällen nur relativ geringe Wirkungen zeigten (vgl. Kap. 5).

4.2.1 Versuche mit TNT belasteten Böden

Der mit 1600 mg/kg TNT belastete Testboden CTNT1a, eine Altlast aus Clausthal-Zellerfeld, wurde in vier Mischungen mit OECD- Kunsterde oder LUFA Sp2.2 Boden vermischt. Der Referenzboden CTNT0 wurde nicht als Mischsubstrat für den Testboden verwendet, sondern ebenfalls wie dieser mit OECD und LUFA Böden vermischt. Mit steigendem Mischungsanteil von CTNT0 in LUFA-Boden wurde eine schwache Hemmung des Wachstums von *B. rapa* CrGC beobachtet (Abb. 6), nicht aber bei OECD-Kunsterde. Wegen der nur sehr schwachen Wirkung im Vergleich zu den Kontrollen wurden keine Effektkonzentrationen für den Boden CTNT0 berechnet.

CTNT1a hemmte *B. rapa* unabhängig vom Mischsubstrat und vom betrachteten Endpunkt stark. Dabei zeigte sich, dass die am Tag 14 ermittelten Effektkonzentrationen etwas niedriger lagen, als die am Tag 35. Ein mit steigendem Anteil an CTNT1a etwas verzögertes Auflaufen als Folge langsamerer Befeuchtung oder der Abbau der Hauptkontaminante TNT im Versuchsverlauf können diese Beobachtung erklären. Die EC₅₀-Werte variierten zwischen 6,6 und 23,5 %. Bezogen auf die Hauptkontaminante TNT entspricht dies einer Konzentration von 106 – 376 mg TNT/kg und liegt damit im Bereich, der auch im Einzelstofftest (EC₅₀-Wert: 93 – 170 mg/kg; vgl. Kap. 4.1.2) ermittelt wurde. Der Boden CTNT1a kann aufgrund seiner starken Hemmwirkung auf *B. rapa* als toxisch eingestuft werden.

In einem weiteren Versuch wurde ein deutlich höher mit TNT (3100 mg/kg) belasteter Testboden, CTNT4a (ebenfalls aus Clausthal-Zellerfeld) mit *B. rapa* getestet, wobei der als unbelastete Referenz zur Verfügung gestellte, recht saure (pH 4,1) CTNT04a als Mischsubstrat verwendet wurde. Als zusätzliche Kontrollen wurden OECD-Kunsterde und LUFA Sp2.2 einbezogen. Zudem wurden alle Testansätze einmal ungedüngt und einmal gedüngt untersucht (DECHEMA-Nährlösung). Der unbelastete CTNT04a-Boden ermöglichte nur sehr geringe

Pflanzenerträge (deutlich unter denen in LUFA-Standardboden und OECD-Kunsterde). Dieser Effekt lässt sich nicht auf Nährstoffmangel zurückführen: während Düngung bei den beiden Standardböden zu einer Steigerung des Wachstums um etwa das Zweieinhalbfache führte, brachte sie in CTNT04a Boden keinen Erfolg.

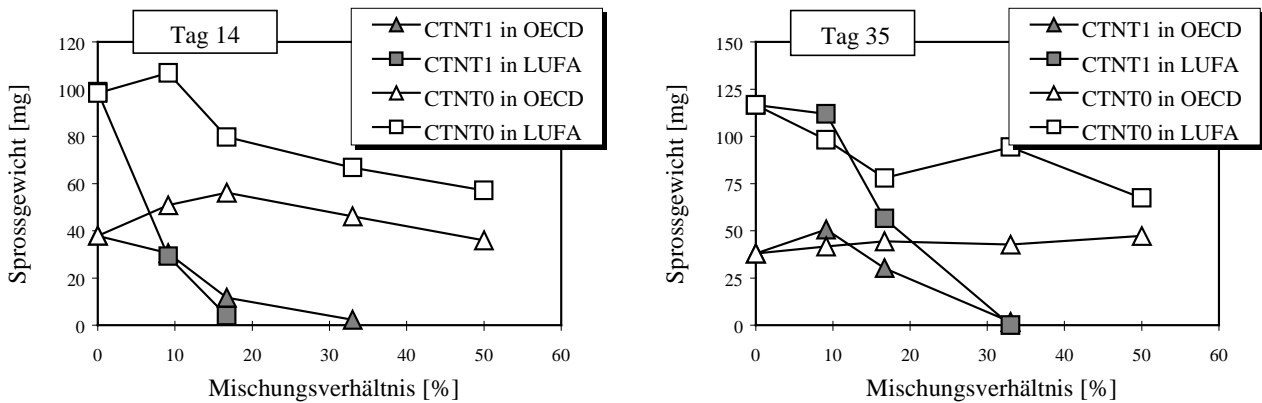


Abb. 6: Einfluss von Bodenmischungen aus CTNT0 und CTNT1a in OECD-Kunsterde und LUFA Standardboden auf den Sprossertrags von *Brassica rapa*

Mit steigendem Mischungsanteil von CTNT4a in CTNT04a ging der Ertrag der Pflanzen noch weiter zurück. In unverdünntem CTNT4a wuchsen keine Pflanzen mehr (auch nicht nach Düngung). Ein Unterschied zwischen den EC_x -Werten am Tag 14 und 35 war kaum erkennbar. Sie entsprachen je nach Endpunkt und Messzeitpunkt TNT-Konzentrationen von 763 – 1500 mg/kg, also Werten, die weit über dem liegen, was im Einzelstofftest in Standardböden gefunden wurde. Ein Grund sind sicherlich die extrem flachen Mischungs-Wirkungskurven. Vermutlich wären entsprechende Kurven bei Mischung in Standardböden steiler verlaufen und hätten Effekte bereits bei niedrigeren Konzentrationen sichtbar gemacht. Sowohl der Referenzboden CTNT04a als auch der Testboden CTNT4a können anhand des chronischen Pflanzentests als toxisch eingestuft werden. Allerdings ließ sich die Hemmwirkung des recht sauren Referenzbodens CTNT04a (pH-Wert 4,1) durch Zugabe von Kalk stark mildern. Möglicherweise ist die Hemmwirkung in CTNT04a teilweise durch das in diesem Boden vorhandene Blei und Zink zu erklären.

Analog zu dem vorangehend beschriebenen Versuch, allerdings ohne Düngung, wurde CTNT4a bei *A. sativa* getestet. Auch bei Hafer blieb der Ertrag im Referenzboden CTNT04a unter dem in OECD-Kunsterde oder LUFA Sp2.2 Boden (Abb. 7). Am Tag 14 waren die Erträge von Hafer in allen Mischungen von CTNT4a und CTNT04a ähnlich hoch und blieben unter denen in OECD-Kunsterde und LUFA Standardboden. Ein Hemmeffekt von unverdünntem CTNT4a Boden gegenüber den Kontrollen wurde erst nach 56 Tagen deutlich: die Pflanzen waren kleiner als in den Kontrollen und trugen keine Blüten. Am Tag 56 wurde für alle Endpunkte eine NOEC von 32,7 % bei einer LOEC von 51,7 % gegenüber der Referenz ermittelt. Eine EC_{50} von 45 % CTNT4a entspricht einer TNT-Belastung von 1400 mg/kg, was deutlich höher als die im Einzelstofftest ermittelte 50 %ige Hemmung von Hafer in LUFA Boden mit 180 – 500 mg/kg TNT ist. Der CTNT4a Boden kann aufgrund der Ergebnisse mit Hafer als toxisch angesehen werden. Eine Eignung als Pflanzenstandort ist nicht gegeben, wenn die Pflanzen sehr klein bleiben und nicht blühen. Im Gegensatz zum Test *B. rapa* kann der Refe-

renzboden CTNT04a aufgrund der Ergebnisse mit Hafer nicht als bedenklich eingestuft werden. Zwar bleiben die Haferpflanzen klein, aber sie vermögen zu blühen.

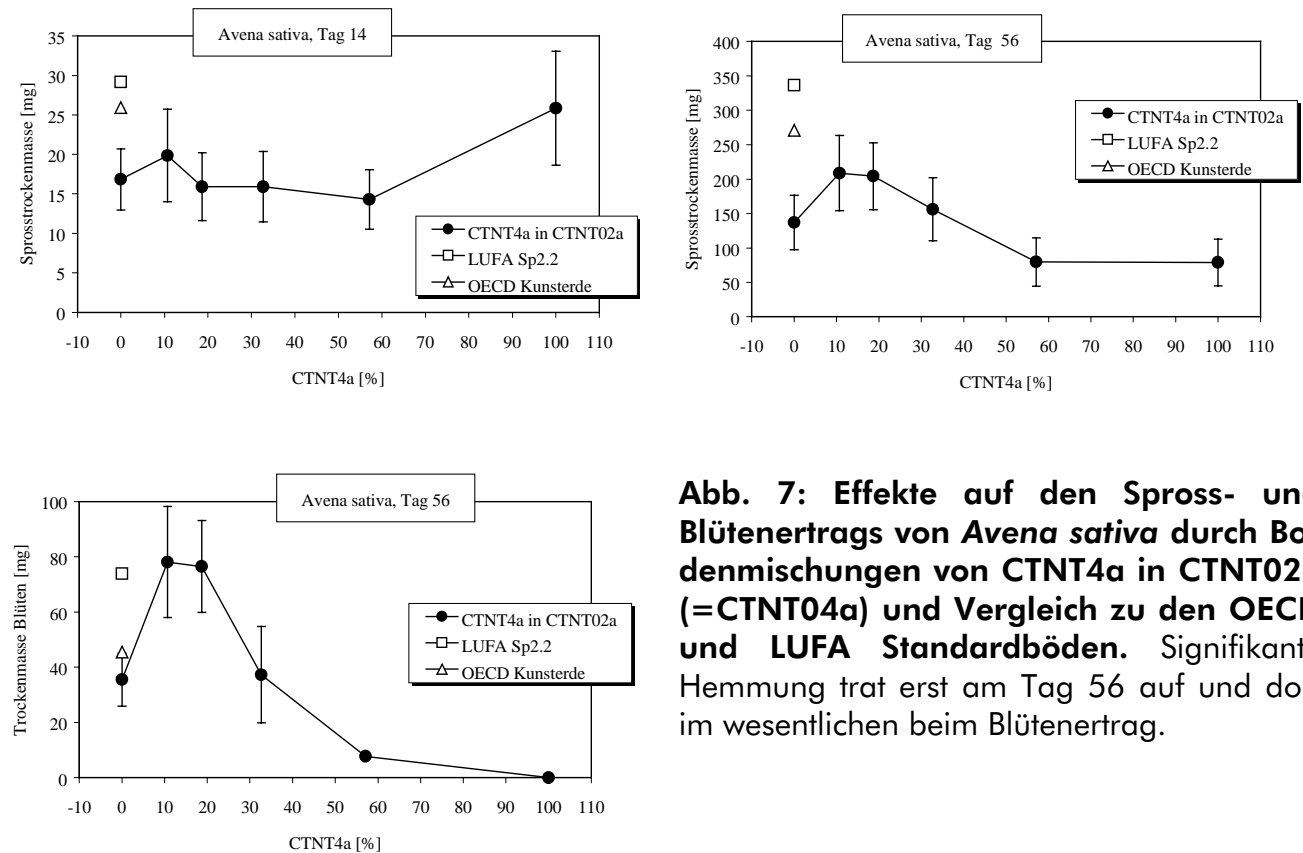


Abb. 7: Effekte auf den Spross- und Blütenertrags von *Avena sativa* durch Bodenmischungen von CTNT4a in CTNT02a (=CTNT04a) und Vergleich zu den OECD und LUFA Standardböden. Signifikante Hemmung trat erst am Tag 56 auf und dort im wesentlichen beim Blütenertrag.

Der Boden CTNT4b wurde aus CTNT4a durch biologische Sanierung erhalten, wobei eine hohe Menge organischen Materials zugeschlagen und eine anaerob-aerobe Behandlung durchgeführt wurde, bis die TNT-Konzentration unter die Nachweisgrenze abgesunken war. Parallel dazu wurde eine Teilmenge des Referenzbodens CTNT0 mit der gleichen Methode behandelt, die dann, CTNT04b genannt, als Kontrolle des Einflusses der Sanierungsmethode auf die Bodenqualität diente. Beide Böden hatten einen hohen pH-Wert (7,6 – 8,0) und waren in der Handhabung problematisch, da "Verkleben" der Bodenpartikel auftrat. Mischungen beider Böden in LUFA resultierten in einer Verbesserung des Wachstums gegenüber dem Standardboden, doch wuchs *B. rapa* in unverdünnter CTNT4b Erde kaum. Wegen der flachen Mischung-Wirkungskurven und der starken Hormesis bei niedrigen Mischungsverhältnissen wurden keine EC_x-Werte berechnet.

In einem weiteren Versuch mit CTNT4b und CTNT04b Boden wurde der Einfluss des pH-Werts untersucht. Die Korrektur des pH-Wertes auf ca. 6,5 verbesserte die Erträge signifikant (p = 0,05, alle Endpunkte). Gegenüber den sehr niedrigen Erträgen in unbehandeltem CTNT4b Boden erhöhte sich das Wachstum um mehr als das Dreifache, doch blieben die Erträge noch hinter denen in CTNT04b zurück. Eine Beurteilung der Bodenqualität auf der Grundlage des ersten Versuchs würde zu einer negativen Bewertung des sanierten CTNT4b, nicht aber des mit dem gleichen Sanierungsverfahren behandelten, vorher unbelasteten CTNT04b führen. Aufgrund der Ergebnisse des zweiten Versuchs sollte aber schon eine Korrektur des pH-Wertes ausreichen, um den sanierten CTNT4b als Substrat für Pflanzen nutzen zu können.

Analog dazu wurden die Böden CTNT4b und CTNT04b bei *A. sativa* mit LUFA Sp2.2 als Kontroll- und Mischsubstrat getestet. In diesem Fall fehlte die deutliche Hemmwirkung des unverdünnten CTNT4b Bodens. Auffallend waren die Unterschiede zwischen Tag 14 und Tag 56: Während am Tag 14 beide Böden eine mäßige Hemmwirkung aufwiesen, traf dies am Tag 56 nur noch bei CTNT4b zu. Bei CTNT04b kam es zu einer deutlichen Förderung des Wachstums. Die Ergebnisse aus diesem Test mit Hafer allein erlauben nur bedingt eine Einstufung der Qualität von CTNT4b als "für Pflanzen toxisch". Allerdings muss der Boden als "auffällig" eingestuft werden und ein Test mit korrigiertem pH-Wert wäre zu empfehlen.

4.2.2 Versuche mit durch PAK belasteten Böden

Mit dem Boden SPAK1a stand ein Boden zur Verfügung, der als Hauptkontaminante polyzyklische Kohlenwasserstoffe enthielt, daneben aber auch eine hohe Menge an Chrom und etwas Mineralölkohlenwasserstoffe. In einem Test mit *B. rapa* liefen innerhalb der ersten Woche in allen Mischungen, nicht jedoch im unverdünnten SPAK1a Boden, fast alle Keimlinge auf. Mit steigendem Anteil an SPAK1a Boden waren Schäden, vor allem fehlende oder mangelhaft ausgebreitete Keimblätter und chlorotische Verfärbungen erkennbar (Abb. 8).

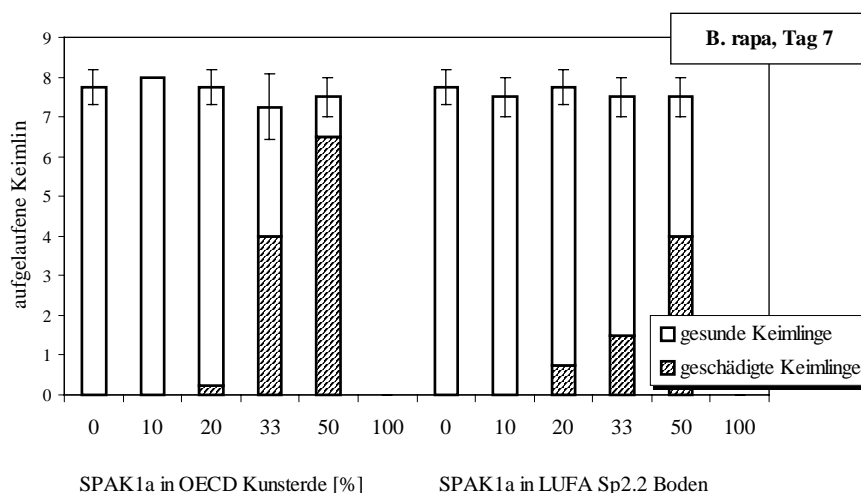


Abb. 8: Bis zum Tag 7 waren in allen Ansätzen bis auf die mit unverdünntem SPAK1a Boden fast alle Keimlinge aufgelaufen. Mit steigendem Anteil am Testboden traten vermehrt Schäden an den Pflänzchen auf.

Am Tag 14 war eine starke Hemmung des Wachstums von *B. rapa* erkennbar, während am Versuchsende (Tag 34) das Bild differenzierter war (Abb. 9). Bei beiden Mischsubstraten waren starke Effekte ab einer 33%-Mischung erkennbar, doch wuchsen die Pflanzen in Lufa-Böden bis dahin besser als in OECD-Kunsterde. Die starken Hemmeffekte führen zu einer Einstufung des SPAK1a Bodens als toxisch. Ob dies auf die Hauptkontaminante PAK oder auf die Mischung verschiedener, teilweise unerkannter Schadstoffe zurückzuführen ist, ist unklar; gilt doch, dass hydrophobe Substanzen in Böden wenig bioverfügbar sind [42]. So hatten bereits die Versuche mit Pyren gezeigt, dass dieses keine Hemmung des Wachstums der Testpflanzen verursachte (vgl. Kap. 4.1.1).

Nach 8-monatiger Lagerung wurde SPAK1a in Mischungen mit dem Standardboden LUFA Sp2.2 und der OECD-Kunsterde nochmals bei *B. rapa* und zusätzlich bei *A. sativa* getestet. Bei der Stoppelrübe war die Hemmwirkung ähnlich der, die im ersten Versuch mit frischem Boden beobachtet wurde. Hafer reagierte deutlich weniger empfindlich auf den gelagerten SPAK1a Boden. Insgesamt kann auch der gelagerte SPAK1a Boden als toxisch eingestuft werden.

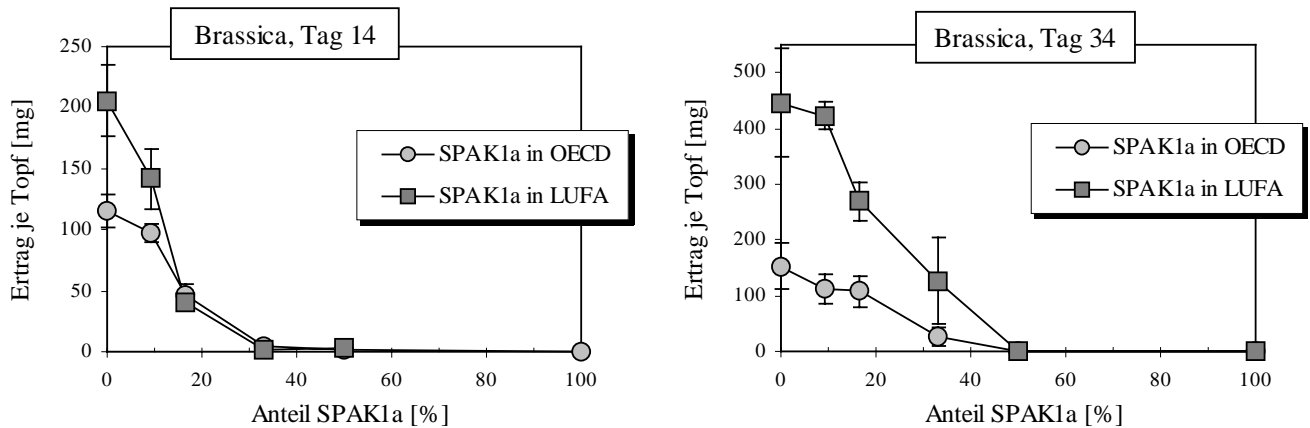


Abb. 9: Hemmung des Ertrags von *Brassica rapa* durch SPAK1a Boden in zwei Mischsubstraten am Tag 14 und 34.

Der aus der Sanierung von SPAK1a hervorgegangene SPAK1b wurde in Mischungen mit dem Standardboden LUFA Sp2.2 bei *B. rapa* und *A. sativa* getestet. Bei der Stoppelrübe zeigte sich eine Wachstumsförderung durch geringe bis mäßige Beimischungen von SPAK1b in LUFA, wobei am Tag 14 in 33 %iger Mischung und am Tag 35 in unverdünntem Testboden eine Abnahme der Erträge beobachtet wurde (bei 50 %iger Mischung war das Wachstum aber noch gesteigert). Dies konnte aufgrund des hohen Nährstoffgehaltes von SPAK1b auch erwartet werden, nicht aber der Ausfall der Pflanzen in unverdünntem Testboden.

Bei Hafer wurde nicht der unverdünnte SPAK1b, sondern eine 75 %ige Mischung in LUFA als höchste Stufe getestet. Am Tag 14 verliefen die Kurven sehr flach und zeigten nur eine schwache Hemmung bei der 75 %igen Mischung an, doch am Versuchsende ähnelten die Hemmkurven denen von *B. rapa*: Nach einer anfänglichen Förderung wuchsen die Pflanzen in der höchsten Mischung nicht mehr. Aufgrund dieser drastischen Wirkung könnte der gut mit Nährstoffen versorgte SPAK1b Boden als toxisch eingestuft werden. Da die PAKs als Hauptkontaminanten im Zuge der Sanierung beseitigt wurden, kann dies als Hinweis auf andere Kontaminanten (insbesondere lag der Chrom-Gehalt mit 750 mg/kg weit über den Vorsorgewerten der BBodSchV) oder als Auswirkung physikalischer Veränderungen erklärt werden, denn der SPAK1b Boden nahm Wasser über Dochte schlecht auf. In zusätzlich untersuchten handbewässerten Gefäßen wuchs Hafer auch in 75 %iger Mischung, so dass die beobachteten Hemmwirkungen in den dochtbewässerten Ansätzen primär auf Wassermangel zurückzuführen sind.

5 Übertragbarkeit / Anwendung

In Tab. 5 werden die wichtigsten Ergebnisse der Bodentests (vgl. Kap. 4.2) bewertet. Zusammen mit der Methodenentwicklung (vgl. Kap. 2) und den Daten zur Einzelstofftestung (vgl. Kap. 4.1) dienen diese Ergebnisse als Grundlage der Diskussion zur Übertragbarkeit der Testresultate und zur Anwendbarkeit des chronischen Pflanzentests.

Demnach ist folgendes festzuhalten:

- bei allen belasteten Böden traten deutliche Wirkungen im Pflanzentest auf.
- wenn bei sanierten Böden bzw. Referenzböden Wirkungen auftraten, waren mehrfach Bodenfaktoren (z.B. der pH-Wert) als Ursache identifizierbar.
- im allgemeinen war die Stoppelrübe empfindlicher als der Hafer.
- meist waren die chronischen Endpunkte empfindlicher als akute Parameter.
- aufgrund unterschiedlicher Wirkmodi ist die Erfassung unterschiedlicher Endpunkte (Biomasse wie Reproduktionsparameter) zu empfehlen.
- OECD-Kunsterde und LUFA Sp2.2 Standardboden waren als Kontroll- und Mischsubstrat verwendbar, aber Referenzböden waren teils problematisch.
- eine gute Übereinstimmung zwischen Einzelstofftestung und mit der gleichen Substanz kontaminierten Böden konnte im Fall von TNT festgestellt werden.

Diese Projektergebnisse belegen, dass der chronische Pflanzentest eine sinnvolle Ergänzung der gegenwärtig zur Verfügung stehenden Batterie ökotoxikologischer Tests zur Bodenqualitätsbeurteilung und Einzelstoffprüfung darstellt. Besonders hervorzuheben sind dabei die folgenden Punkte:

- es steht eine standardisierte Testmethode zur Verfügung, die hinsichtlich Kriterien wie Praktikabilität und Reproduzierbarkeit internationalen Ansprüchen genügt (einziges Defizit ist das Fehlen einer Referenzsubstanz).
- das ökotoxikologische Gefährdungspotential von Chemikalien wird gut erfasst.
- die Durchführung des Tests mit vielen verschiedenen Böden belegt die Anwendbarkeit unter realen Bedingungen, wobei das Anwendungsspektrum durch die leicht mögliche Testung mehrerer Arten verbreitert wird.
- die Differenzierung von belasteten und sanierten Böden durch ein ökologisch relevantes Testsystem ermöglicht eine belastbare Aussage zur Qualität eines Bodens hinsichtlich seiner Funktion als Lebensraum für Bodenorganismen.
- die Weiterentwicklung zu einer international akzeptierten Richtlinie, u.a. mittels eines Ringtests, ist daher zu empfehlen.

Tab. 5: Zusammenfassung der Ergebnisse der Tests mit TNT, PAK und MKW belasteten Böden (einschließlich der Standard-, Kontroll- und Referenzböden), differenziert nach Testspezies.

Boden	Gemischt mit	Bodenstatus	<i>B. rapa</i> ¹	Bemerkung	<i>A. sativa</i> ¹	Bemerkung
CTNT1a	LUFA 2.2	Altlast	+	Gute Übereinstimmung mit TNT-Einzelstofftests	Kein Test	
CTNT1a	OECD	Altlast	+		Kein Test	
CTNT0	LUFA 2.2	Referenz	-		Kein Test	
CTNT0	OECD	Referenz	-		Kein Test	
CTNT4a	Ref. 02a	Altlast	+	Effekt des niedrigen pH-Wertes?	+	
CTNT04a	-	Referenz	?		-	Pflanzen bleiben klein
CTNT4b	LUFA 2.2	Sanierte Altlast	+	Effekt des hohen pH-Wertes nach Sanierung ?	?	Effekt des hohen pH-Wertes ?
CTNT40b	LUFA 2.2	Sanierte Altlast	-		-	
SPAK1a	LUFA 2.2	Altlast	+	Ursache unklar: PAKs, Chrom, unbekannte Substanzen, oder Mischung ?	Kein Test	
SPAK1a	OECD	Altlast	+		Kein Test	
SPAK1a	LUFA 2.2	Gelagerte Altlast	+		+	Effekt kleiner als bei <i>Brassica rapa</i>
SPAK1a	OECD	Gelagerte Altlast	+		+	
SPAK1b	LUFA 2.2	Sanierte Altlast	+	Wassermangel ?	+	Wassermangel
BMKW1a	LUFA 2.2	Altlast	+		+	Effekt kleiner als <i>B. rapa</i> .
OMKW1a	Ref. 0a	Altlast	?	Mischung toxischer als Referenz- oder Testboden !	Kein Test	
OMKW0a	-	Referenz	-		Kein Test	
OMKW1b	LUFA 2.2	Sanierte Altlast	-		Kein Test	
OMKW1b	OECD	Sanierte Altlast	-		Kein Test	

¹ Die Bewertung bezieht sich jeweils auf den eingemischten Boden am Versuchsende (ca. Tag 35 bzw. 56). Eine Wirkung wird mit "+", ihr Fehlen mit "-" und unklare Fälle mit einem "?" gekennzeichnet.

6 Abkürzungen und Namen

ASTM	American Society for Testing and Materials, Philadelphia
BBA	Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig und Berlin
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung, Berlin
CMC	kritische Micellenkonzentration bei Tensiden
DECHEMA	Gesellschaft für Chemische Technik u. Biotechnologie, Frankfurt
EC	Effect concentration
EPA	US-Environmental Protection Agency, Washington DC
ISO	International Standardization Organization, Genf
MKW	Mineralölkohlenwasserstoffe
NOEC/LOEC	No/Lowest observed effect concentration
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
TNT	2,4,6-Trinitrotoluol
UBA	Umweltbundesamt, Berlin
WHK	Wasserhaltekapazität

7 Eigene Veröffentlichungen

Kalsch W. und J. Römbke. 1999. Zur chronischen Wirkung von TNT auf die Stoppel-rübe *Brassica rapa* im Labortest. In: Oehlmann J. & Markert B. (Hrsg.) Ökotoxikologie - Ökosystemare Ansätze und Methoden, Ecomed, Landsberg. S. 100 – 105.

Kalsch, W. und J. Römbke. 2000. Entwicklung eines chronischen Pflanzentests. Endbericht für das BMBF-F+E- Vorhaben 1491077 (incl. Richtlinienvorschlag)

Römbke, J. und Kalsch, W. (1998): Biological Assessment of Soils by Using a Chronic Plant Test. Presentation, SETAC 19th Annual Meeting, Charlotte (USA).

8 Literatur

1. **Aquaterra** 1998. Development of plant toxicity tests for assessment of contaminated soils. Bericht an Environment Canada, Environmental Technology Centre, Method Development and Application Section, November 1998. 75 Seiten zzgl. Anhänge.

2. **ASTM** 1984: Standard practise for conducting early seedling growth tests. ASTM E 1598-94. American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA.
3. **ASTM** 1997. Standard guide for conducting terrestrial plant bioassays. ASTM E-47, Draft New Standard, American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, PA.
4. **BBA** 1979. Entwicklungsstadien bei Getreide. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (Herausgeber), Merkblatt Nr. 27/1.
5. **BBA** 1984. Verfahrensvorschlag: "Phytotoxizitätstest an einer monokotylen Pflanzenart (*Avena sativa* L.) und einer dikotylen Pflanzenart (*Brassica rapa* ssp. *rapa* DC. Metzg.)" Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin (Herausgeber). 15 Seiten.
6. **BBodSchG** 1998. Gesetz zum Schutz des Bodens vom 17. März 1998. Bundesgesetzblatt 1998, Teil I, Nr. 16, 502-510.
7. **BBodSchV** 1999. Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung (BBodSchV) vom 16.6.1999. Bundesgesetzblatt 1999, Teil I, Nr. 36, 1554.
8. **Biernacki, M., J. Lovett-Doust und L. Lovett-Doust** 1997. Laboratory assay of sediment phytotoxicity using the macrophyte *Vallisneria americana*. Environ. Toxicol. Chem. **16**: 472-478.
9. **Boutin, C., K. E. Freemark und C. J. Keddy** 1995. Overview and rationale for developing regulatory guidelines for nontarget plant testing with chemical pesticides. Environ. Toxicol. Chem. **14**: 1465-1475.
10. **Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe, Hannover (Herausgeber)**. Bodenkundliche Kartieranleitung. 4. Auflage 1996.
11. **Burhenne, M. und G. Deml**. 1996. Biotests mit Bodenalgeln zur Ökotoxikologie von Schwermetallen und zur Bewertung von Pflanzenschutzmitteln. Mittl. Biol. Bundesanstalt f. Land- u. Forstwirtschaft **321**: 130.
12. **Dechema** 1995. Bioassays for soils / Ad hoc-Committee "Methods for Toxicological/Ecotoxicological Assessment of Soils" ; DECHEMA, Frankfurt am Main [Herausgeber: G. Kreysa und J. Wiesner], Frankfurt am Main.
13. **Delschen, T., A. Hembrock-Heger., J. Leisner-Saaber und D. Sopczak**. 1999. Verhalten von PAK im System Boden/Pflanze. UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. **11**: 79-87.
14. **Eckelhoff, A. und A.V. Hirner**. 1997. Mobilisierung von organischen Schadstoffen in Bodensäulen einer Parabraunerde durch Natriumlaurylsulfat. Vom Wasser **89**: 297-304.
15. **Fletcher, J.S.** 1990. Use of algae versus vascular plants to test for chemical toxicity. In: Plants for Toxicity Assessment, ASTM STP 1091, W. Wang, J.W. Gorsuch & W.R. Lower (Hrsg.), American Society for Testing and Materials, Philadelphia. Seiten 33-39.
16. **Fletcher, J.S., F. L. Johnson und J. C. McFarlane**. 1990. Influence of greenhouse versus field testing and taxonomic differences on plant sensitivity to chemical treatment. Environ. Toxicol. Chem. **9**: 769-776.

17. **Füll, C., S. Jung und C. Schulte.** 1999. Prüfanforderungen des Umweltbundesamtes zur Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf terrestrische Pflanzen. UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox. **11**: 145-149.
18. **Gemtos, T.A. und Th. Lellis.** 1997. Effects of soil compaction, water and organic matter contents on emergence and initial plant growth of cotton and sugar beet. J. Agric. Engng. Res. **66**: 121-134.
19. **Geuns, J.M.C., A. J. F. Cuypers, T. Michiels, J. V. Colpaert, A. van Laere, A. O. van den Broeck und C. H. A. Vandecasteele.** 1997. Mung bean seedlings as bio-indicators for soil and water contamination by cadmium. Sci Total Envir. **203**: 183-197.
20. **Gong, P., B.-M. Wilke und S. Fleischmann.** 1999. Soil-based phytotoxicity of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) to terrestrial plants. Arch. Environ. Contam. Toxicol. **36**: 152-157.
21. **Holst R. W. und T. C. Ellwanger.** 1982. Pesticide Assessment Guidelines: Hazard Evaluation: Nontarget Plants. US-EPA 54019-82-020, Washington, DC.
22. **Hulzebos, E.M., D. M. M. Adema, E. M. Dirven-van Breemen, L. Henzen, W. A. van Dis, H. A. Herbold, J. A. Hoekstra, R. Baerselman und C. A. M. van Gestel.** 1993. Phytotoxicity studies with *Lactuca sativa* in soil and nutrient solution. Environ. Toxicol. Chem. **12**: 1079-1094.
23. **ISO 1992:** Soil quality – determination of the effects of pollutants on soil flora – part 1: method for the measurement of inhibition of root growth. Internationale Norm 11269, International Standardization Organization, ISO, Genf (Hrsg.)
24. **ISO 1994:** Soil quality – determination of the effects of pollutants on soil flora – part 2: effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants. ISO-Norm 11269, International Standardization Organization, ISO, Genf (Hrsg.)
25. **Kalsch, W. und J. Römbke.** 2000. Entwicklung eines chronischen Pflanzentests. Endbericht für das BMBF-F+E- Vorhaben 1491077.
26. **Keddy, C., J. C. Greene und M. A. Bonnell.** 1994. A review of whole organism bioassays for assessing the quality of soil, freshwater sediment, and freshwater in Canada. Environment Canada (Hrsg.), 185 Seiten.
27. **Marschner B.** 1997: Chemische und biologische Einflußfaktoren der PAK- und PCB-Mobilisierung im Boden. Habilitationsschrift, TU-Berlin.
28. **Morgan E.** 1991: Chemometrics: Experimental Design. John Wiley & Sons, Chichester, New York, 275 Seiten.
29. **OECD 1984a:** Earthworms: Acute Toxicity Tests. Guidelines for Testing of Chemicals, no. 207. Organization of Economic Cooperation and Development, Paris (Hrsg.).
30. **OECD 1984b:** Terrestrial Plants, Growth Test. Guidelines for Testing of Chemicals, no. 208. Organization of Economic Cooperation and Development, Paris (Hrsg.).

31. **Payá-Pérez, A. B., M. S. Rahman, H. Skejo-Andresen und B. R. Larsen.** 1996. Surfactant Solubilization of hydrophobic compounds in soil and water. *ESPR – Environ. Sci. & Pollut. Res.* **3**: 183-188.
32. **Pestemer, W. und B. Auspurg B.** 1986. Eignung eines Testpflanzensortiments zur Risikoabschätzung von Stoffwirkungen auf höhere Pflanzen im Rahmen des Chemikaliengesetzes. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **38**: 120-125.
33. **Pestemer, W. und P. P. Günther.** 1997. Standardisierte Biotestmethode zur Ermittlung der ED₁₀- (NOEL) und ED₅₀-Werte für Herbizide und verschiedene Pflanzenarten im Boden. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) (Hrsg.), Berichte Heft 29, Braunschweig, 26 Seiten.
34. **Pestemer, W. und P. Zwerger.** 1999. Application of a standardized bioassay to estimate the phytotoxic effects of frequently used herbicides on non-target plants. In: A.A.M. Del Re, C. Brown, E. Capri, G. Errera, S.P. Evans & M. Trevisan (Hrsg.): *Human and Environmental Exposure to xenobiotics. Proceedings of the XI Symposium Pesticide Chemistry*, Sept. 11-15, 1999, Cremona, Italien, Seiten 763-770.
35. **Ratsch, H. C., D. J. Johndro und J. C. McFarlane.** 1986. Growth inhibition and morphological effects of several chemicals for *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Environ. Toxicol. Chem.* **5**: 50-60.
36. **Ratsch, H.C. und D. Johndro D.** 1987. The influence of two culturing techniques on toxicity of four chemicals in *Arabidopsis*. *Environ. Monit. Assess.* **9**: 155-168.
37. **Römbke, J., C. Bauer und A. Marschner.** 1996. Entwicklung einer Teststrategie zur Bewertung des Umweltgefährlichkeitspotentials. *UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox.* **8**: 158-166.
38. **Sawatsky, N. und X. Li.** 1997. Importance of soil water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils. *Plant Soil* **192**: 227-236.
39. **Sheppard, S. C., W. G. Evenden, S. A. Abboud und M. Stephenson.** 1993. A plant Life-Cycle Bioassay for contaminated soil, with comparison to other bioassays: mercury and zinc. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **25**: 27-35.
40. **Shimabuku, R. A., H. C. Ratsch, C. M. Wise, J. U. Nwosu und L. A. Kapustka.** 1991. A new plant life cycle bioassay for assessment of the effects of toxic chemicals using rapid cycling Brassica. In: *Plants for Toxicity Assessment, 2nd Volume*, ASTM STP 1115, Gorsuch J.W., Lower W.R., Wang W. & Lewis M.A. (Hrsg.), American Society for Testing and Materials, Philadelphia. Seiten 365-375.
41. **Simini, M., R. S. Wentsel, R. T. Checkai, T. Phillips, N. A. Chester, M. A. Major und J. C. Amos.** 1995. Evaluation of soil toxicity at Joliet Army Ammunition Plant. *Environ. Toxicol. Chem.* **14**: 623-630.
42. **Sprenger, C., P. Harborth und H. Hanert.** 1994: Untersuchungen zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit von adsorbierten PAK in Böden von ehemaligen Gaswerksgeländen. *BioEngineering* **10**: 16-22.
43. **Tottman, D. R. und H. Broad.** 1987. The decimal code for the growth stages of cereals, with illustrations. *Ann. Appl. Biol.* **110**: 441-454.

44. **U.S. EPA** Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.4150. Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Vegetative Vigor), April 1996
45. **White, J. C., A. Quiñones-Rivera A. und M. Alexander.** 1998. Effect of wetting and drying on the bioavailability of organic compounds sequestered in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**: 2378-2382.
46. **White, J. C., M. Alexander und J. J. Pignatello.** 1999. Enhancing the bioavailability of organic compounds sequestered in soil and aquifer solids. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**: 182-187.
47. **Williams, P. H. und C. B. Hill.** 1986. Rapid-cycling populations of Brassica. *Science* **232**: 1385-1389.
48. **Wilson, S. C. und K. C. Jones K.C.** 1993. Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Environ Pollut.* **81**: 229-249.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.3 Verbundvorhaben 4: Ökotoxikologische Testbatterien

9.3.8 Ermittlung optimaler Lagerungsbedingungen für Bodenrückstellproben für toxikologische Untersuchungen in Abhängigkeit von der Schadstoffbelastung (TV 4.7)

Prof. Dr. W. Dott
Dr.-Ing. A. Eisenträger

Drs. J.-P. Rila
N. Mende

Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen
Medizinische Fakultät
Institut für Hygiene und Umweltmedizin
Pauwelsstraße 30
52057 Aachen

Förderkennzeichen: 1491080

Laufzeit: 01.11.1996 – 31.12.1999

1 Zusammenfassung und Zielsetzung

Zur Zeit besteht ein hohes Maß an Unsicherheit darüber, ob Bodenproben, die toxikologisch charakterisiert werden sollen, so aufbewahrt werden können, daß sich ihre toxikologischen Eigenschaften nicht signifikant verändern. In den vorhandenen DIN-ISO-Normen zur Bodenuntersuchung finden sich keine Hinweise darüber, ob und wie Bodenproben nach Entnahme vor der Untersuchung aufbewahrt werden können. Weiterhin ist unklar, wie Ergebnisse erhalten werden können, die anhand von Rückstellproben justiziabel nachprüfbar sind.

Im Rahmen des Vorhabens sollen daher die Stabilität und Veränderung biologischer Wirkungen von verschiedenen Bodeninhaltsstoffen in Abhängigkeit unterschiedlicher Lagerungsbedingungen und Lagerzeiten sowie in Abhängigkeit von den physikalisch-chemischen und biologischen Eigenschaften der Böden untersucht werden. Die Grenzen der Lagerungsfähigkeit von Böden sollen aufgezeigt werden. Aus den Untersuchungsergebnissen werden Empfehlungen zur Lagerung von Boden-Rückstellproben abgeleitet.

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

2.1 DIN-Normen zu Lagerung von wäßrigen Proben und Bodenproben

Im folgenden werden aus vier DIN-Normen zu Untersuchungen mit wäßrigen Lösungen und mit Böden einige Hinweise zu Lagerung und Probenkonservierung zusammengefaßt und diskutiert.

1. *DIN 38412, Teil 1, Juni 1982 [20]: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung: Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L). Allgemeine Hinweise zur Planung, Durchführung und Auswertung biologischer Testverfahren (L1):*

In dieser DIN-Norm ist festgelegt, daß Wasser-, Abwasser- und Schlammproben "möglichst bald nach der Entnahme getestet werden sollen". "Eine Konservierung darf nur durch Kühlen (2 bis 4°C, für weniger als 2 Tage) oder Tiefgefrieren (-18°C, für weniger als 2 Wochen) der Proben erfolgen und sollte nur in Ausnahmefällen, z.B. zur Herstellung von Sammel- und Mischproben angewandt werden. In manchen Fällen kann Kühlen oder Tiefgefrieren zu Veränderungen des Testgutes führen. Chemische Konservierungsmittel dürfen nicht verwendet werden."

2. *DIN 38409, Teil 51, Mai 1987 [14]: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung: Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs nach n Tagen nach dem Verdünnungsprinzip (Verdünnungs-BSBn) (H51):*

Proben, aus denen der BSBn bestimmt werden soll, sind vor dem Transport möglichst direkt nach Entnahme aufzubereiten (Homogenisation, Sedimentation, Filtration). Anschließend werden sie "in luftblasenfrei gefüllten, luftdicht verschlossenen Glasbehältern bei einer Temperatur von 2 bis 5°C" transportiert und gelagert. Die Wasserprobe muß "so bald wie möglich nach der Probenahme" verarbeitet werden. Es wird darauf hingewiesen, daß jede Art der Konservierung die Probe verändert. "Wasserproben, die aus zwingenden Gründen nicht sofort weiterverarbeitet werden können, sind durch Tiefgefrieren in geeigneten Behältern, z.B.

Aluminiumflaschen, auf etwa -15 bis -20°C zu konservieren. Dabei kann sich der BSB₅ der Proben um bis zu 10% verringern. Gefrierkonservierte Proben müssen vor der Weiterverarbeitung homogenisiert werden. Bei gekühlter Lagerung bleiben die Proben in günstigen Fällen bis zu 3 Tagen verwendungsfähig."

3. *DIN-Entwurf ISO 10381-6 (1993) [23]: Bodenbeschaffenheit, Probenahme: "Anleitung zur Probenahme, Behandlung und Lagerung von Böden für die Bestimmung aerober mikrobieller Prozesse unter Laborbedingungen":*

Ziel dieser Norm ist es in erster Linie, die Mikroflora des Bodens möglichst unverändert zu erhalten. Der Boden wird nach Entnahme und Entfernung der Vegetation, größerer Bodentiere und Steine mit einem 2-mm-Sieb gesiebt. Falls nötig, wird er zuvor so weit getrocknet, wie es für das Sieben erforderlich ist. Anschließend kann er "im Dunkeln bei 4°C ± 2°C mit freiem Luftzutritt gelagert werden, wofür zum Beispiel ein locker verschlossener Kunststoffbeutel o. ä. geeignet ist. Der Boden sollte vor der Einlagerung wie oben beschrieben vorbereitet werden, damit stabile aerobe Bedingungen gewährleistet sind. Es ist wichtig, daß der Boden nicht gefrieren oder austrocknen oder sich während der Lagerung voll Wasser saugen darf. Die Proben sollten nicht übereinander gelagert werden."

Bezüglich der Lagerungsdauer wird angemerkt, daß "die Bodenproben vorzugsweise sobald wie möglich nach der Probenahme verwendet werden. Falls eine Lagerung unvermeidlich ist, sollte sie nicht länger als 3 Monate dauern...".

Ziel dieser Norm ist es, die aerobe Mikroflora des Bodens für einen Lagerungszeitraum von bis zu 3 Monaten möglichst unverändert hinsichtlich der Zusammensetzung und des Aktivitätszustands zu erhalten. Die Lagerung des gesiebten Bodens bei 4°C in Kunststoffbeuteln gewährleistet, daß bei ausreichendem Luftzutritt dennoch keine starke Austrocknung des Bodens stattfindet. Der unter diesen Bedingungen aufbewahrte Boden kann zum Beispiel bei der Untersuchung der biologischen Abbaubarkeit von organischen Chemikalien im Boden unter aeroben Bedingungen eingesetzt werden [24].

Bei humusreichen Böden könnte die Aufbewahrung der Böden in gasdicht geschlossenen Behältern zu einer Zehrung des Sauerstoffs führen. Unter den dann herrschenden anaeroben Bedingungen verändert sich das Bodenmilieu stark. Es kann eine Gärung mit entsprechenden physikochemisch-biologischen Veränderungen (Versauerung, Bildung von Fettsäuren) stattfinden.

4. *DIN ISO 11464 (1994) [25]: Bodenbeschaffenheit: Probenvorbereitung für physikalisch-chemische Untersuchungen:*

Hier wird lediglich darauf hingewiesen, daß "die Lagerung von Bodenproben für längere Zeit einen Einfluß auf einige Bodenkennwerte haben kann, speziell auf die Löslichkeiten sowohl anorganischer als auch organischer Bestandteile". Bodenproben werden nach dieser Anleitung getrocknet, zerkleinert, gesiebt, evtl. gemahlen und dann aufgeteilt. Ausgegangen wird dabei von "feldfrischen Bodenproben". Es ist nicht angemerkt, nach welchem Aufbereitungsschritt und unter welchen Bedingungen die Probenlagerung erfolgt.

Auf diese Norm wird in vielen anderen DIN/ISO-Normen zur chemischen Analytik Bezug genommen (z.B. [32 - 34], [36]). In diesen Normen zur Bodenanalytik finden sich keine Hinweise zu Lagerungsbedingungen und Lagerungsdauer.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Ansprüche an die Lagerung sehr stark davon abhängen, aus welchem Medium welche Stoffe quantifiziert werden sollen. Der Anwendungsbereich der Normen zur Bodenlagerung und zur Bodenaufbereitung ist jedoch nicht streng eingegrenzt. Zur Lagerung von Böden, aus denen organische Parameter, insbesondere flüchtige organische Verbindungen, quantifiziert werden sollen, sind keine Normen zu finden, und in der vorhandenen Norm DIN ISO 11464 [25] sind keine Hinweise zur Bodenvorbehandlung zu finden. Auf toxikologische Untersuchungen von Böden bzw. Bodenextrakten wird nicht eingegangen.

2.2 Lagerung von Bodenproben

Die zu diesem Themenbereich vorhandene Literatur befaßt sich mit Lagerungseffekten, die die mikrobielle Biomasse und die extrahierbaren anorganischen Nährstoffe beeinflussen. Neuere Arbeiten befassen sich mit der Bestimmung flüchtiger organischer Substanzen.

Anderson [3] untersuchte die Veränderung der mikrobiellen Biomasse in 11 Böden während einer 70-tägigen Lagerung bei verschiedenen Bedingungen. Seine Ergebnisse wurden auch bei der Erstellung des oben erwähnten DIN-Entwurfs ISO 10381-6 [23] berücksichtigt. Die Lagerungstemperatur, der Wassergehalt und die Lagerungsdauer wurden variiert. Es wird empfohlen den Boden möglichst frisch zu verwenden, ihn nicht stark zu trocknen und höchstens 3 Monate bei 2 bis 4°C im gesiebten Zustand zu lagern.

In dem "Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie" empfiehlt Alef [1], Böden nicht an der Luft zu trocknen, da dies eine "von Bodenart zu Bodenart unterschiedliche Aktivitätsminderung zur Folge hat". Die Proben sollten am Tag der Probenahme verarbeitet werden. Sie können entweder bei +4°C bis zu 4 Wochen, oder bei -20°C eingefroren werden. Weiterhin wird angemerkt, daß "im Hinblick auf die Lagerung von Bodenproben für mikrobiologische Analysen völlig kontroverse Meinungen existieren".

Haldeman et al. [30] untersuchten Vulkangestein, das nach dem Mahlen für eine Woche bei 4°C in luftdichten Behältern gelagert wurde. Sie stellten fest, daß die Anzahl der denitrifizierenden und der auf R2A-Agar wachsenden heterotrophen Bakterien zunahm, während das Artenspektrum der heterotrophen Bakterien schmaler wurde. Der Phospholipid-Fettsäuregehalt von Bodenbakterien ändert sich bei einer siebenwöchigen Lagerung des Bodens bei 4,5°C nicht signifikant, während er sich bei 25°C bereits nach 3 Wochen deutlich verändert [41].

Bodenproben, aus denen der Gehalt an VOC (Volatile Organic Carbons) bestimmt werden soll, werden in den meisten Fällen im Dunkeln in Glasgefäßen gelagert, die mit Teflonbeschichteten Kappen verschlossen sind. Die Lagerungstemperatur liegt in der Regel bei 4°C [37]. Die Autoren stellen fest, daß die Proben bei dieser Temperatur noch biologisch aktiv sein könnten. Sie schlagen vor, die Proben mit Quecksilberchlorid zu dotieren (2,5mg/5g Boden), um den biologischen Abbau der VOCs zu verhindern und VOCs durch Zugabe von Feststoffabsorbentien wie einem Molekularsieb 5A[®] oder Florasil[®] (0,2mg/5g Boden) zu absorbieren.

Die Probengefäße unterscheiden sich stark hinsichtlich ihrer Luftdichtigkeit. Wenn in den Gefäßen ein Gasraum vorhanden ist, kommt es zu VOC-Verlusten beim Öffnen, da die VOCs von den Bodenpartikeln desorbieren [31] (zitiert nach [37]). Siegrist und Jenßen [46] lagerten Böden in Methanolimmersion. Im Vergleich zu diesen Böden entwichen aus Böden, die lediglich in mit Teflonkappen verschlossenen Glasgefäßen gelagert wurden, 81% der VOCs.

Für die Bestimmung extrahierbarer anorganischer Nährstoffe (austauschbares Ammonium und Nitrat, fixiertes Ammonium) wird empfohlen, Bodenproben in gasdichten Gefäßen bei -5°C zu lagern [40]. Die Kühlung der Böden bewirkte bei vier untersuchten Böden eine Erhöhung der Menge an extrahierbarem Ammonium und Phosphat [2]. Beim extrahierbaren Phosphat, Kalium und Calcium wurde dagegen keine einheitliche Tendenz beobachtet. Die Autoren raten davon ab, Böden für die Bestimmung extrahierbarer Nährstoffe einzufrieren. Dieser Empfehlung schließt sich auch Bates [4] an.

Bei der Bestimmung extrahierbarer anorganischer Bestandteile wie Aluminium, Phosphat, Mangan und Zink aus Waldböden hat das Trocknen von Böden bei 55°C einen starken Effekt. Während feuchte Böden bis zu 10 Wochen bei "niedrigen Temperaturen" gelagert werden können [44].

2.3 Lagerung wäßriger Extrakte

Die Veränderungen der gelösten Phosphorfraktion in wäßrigen Bodenextrakten wurden von Ron Vaz et al. [43] untersucht. Glas- und Polyethylengefäße wurden mit Extrakten bei -12°C , 4°C und 22°C gelagert. Bei der Lagerung in PE-Gefäßen bei 4°C bleibt der Gesamtphosphatgehalt mindestens 2 Monate konstant. Bei 22°C verflüchtigten sich aus den PE-Gefäßen nach 15 Tagen aus den beiden untersuchten Böden 56 bzw. 31% des Gesamtphosphors. Der Gehalt an gelöstem organischen Phosphat oder der Gehalt an gelöstem kondensierten Phosphat, sollte an einer frischen Probe bestimmt werden.

Naudin et al. [39] untersuchten den Einfluß der Lagerung auf die Toxizität eines Industrieabwassers. Sie stellten fest, daß Kühlung und Gefrieren einen ähnlichen Konservierungseffekt erzielen, empfehlen aber, bei einer Lagerungsdauer von mehr als zwei Tagen die Proben einzufrieren. Durch Gefrietrocknung konnte keine gute Konservierung erreicht werden. Die Methode wird jedoch empfohlen, wenn Proben zur Untersuchung der Genotoxizität aufkonzentriert werden sollen.

2.4 Zusammenfassende Bewertung

Der Aspekt der toxikologischen Beurteilung birgt einen besonders hohen Anspruch an die Bodenkonservierung, da über einen unterschiedlich langen Zeitraum sowohl die Konzentration als auch die Bioverfügbarkeit und das Bindungsverhalten der Schadstoffe in der Probe stabilisiert werden müssen. Zur Frage nach geeigneten Lagerungsmöglichkeiten für toxikologisch zu bewertende Bodenproben sind keine DIN-Normen oder Literaturhinweise vorhanden. Es gibt keine einheitlichen Methoden bzw. Richtlinien zur Lagerung von Boden-Rückstellproben.

Bislang ist nicht untersucht worden, in welchen Gefäßen und bei welcher Temperatur kontaminierte Böden aufbewahrt werden können. Im allgemeinen werden Bodenproben eingefroren, was bei großen Probenmengen problematisch werden kann.

Eine direkte Übertragung des DIN-Entwurfs ISO 10381-6 [23] auf die Lagerung von Böden für die Untersuchung aerober mikrobieller Prozesse ist genauso wenig angebracht wie die Anwendung der DIN ISO 11464 [25] zur Bodenvorbehandlung. Des weiteren ist bei der Lagerung von Böden die Art der Kontamination zu berücksichtigen (flüchtig, nicht-flüchtig).

3 Angewandte Methoden

3.1 Material

Es wurden 11 Bodenproben gelagert. 4 Proben waren mit Nitroaromaten (HTNT1, HTNT2, CTNT1a und CTNT4a), weitere 4 Proben mit Mineralöl-Kohlenwasserstoffen (LMKW1, LMKW2, SPMKW1 und BMKW1a), 2 Proben mit Schwermetallen (INTUS1 und R1) und eine Probe mit PAKs und Chrom (SPAK1a) kontaminiert.

Die Proben LMKW1, LMKW2, HTNT1 und HTNT2 wurden vom Institut für Hygiene und Umweltmedizin, RWTH Aachen, entnommen und verarbeitet. Die restlichen Proben wurden von der Projektkoordination, TU Berlin, gestellt.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die gelagerten Bodenproben und den Zeitraum der Lagerung.

Tabelle 1: Übersicht über die untersuchten Bodenproben und die Lagerungsdauer

	Hauptkontamination	Beginn der Lagerung	Ende der Lagerung
LMKW1	Mineralöl-KW	04 / 1997	10 / 1998
LMKW2		04 / 1997	10 / 1998
SPMKW1		07 / 1997	04 / 1999
BMKW1 α		04 / 1998	11 / 1999
HTNT1	Nitroaromaten	05 / 1997	11 / 1998
HTNT2		05 / 1997	11 / 1998
CTNT1 α		06 / 1997	01 / 1999
CTNT4 α		06 / 1998	02 / 2000
INTUS1	Schwermetalle	07 / 1997	03 / 1999
R1		04 / 1998	11 / 1999
SPAK1 α	PAKs	06 / 1997	01 / 1999

In Abb. 1 ist der Untersuchungsgang für eine Probe schematisch dargestellt. Nach Ankunft wurde die Probe gesiebt und homogenisiert. Anschließend erfolgte eine umfassende Charakterisierung der Probe, wobei die physikalisch-chemischen Parameter, die Bodenatmung, die Langzeitrespiration, das ökotoxikologische und genotoxikologische Potential bestimmt wurden und chemische Analysen durchgeführt wurden. Für die Lagerung zusätzlicher Probenmengen wurden die Art der Gefäße und die Lagerungstemperatur variiert. Nach 1, 3, 6 und 12 Monaten Lagerung wurden von diesen Proben die physikalisch-chemischen Parameter bestimmt und Ökotoxizitäts- und Genotoxizitätstests durchgeführt. Nach 18 Monaten wurden die gelagerten Proben, wie zu Beginn der Lagerung, umfassend analysiert.

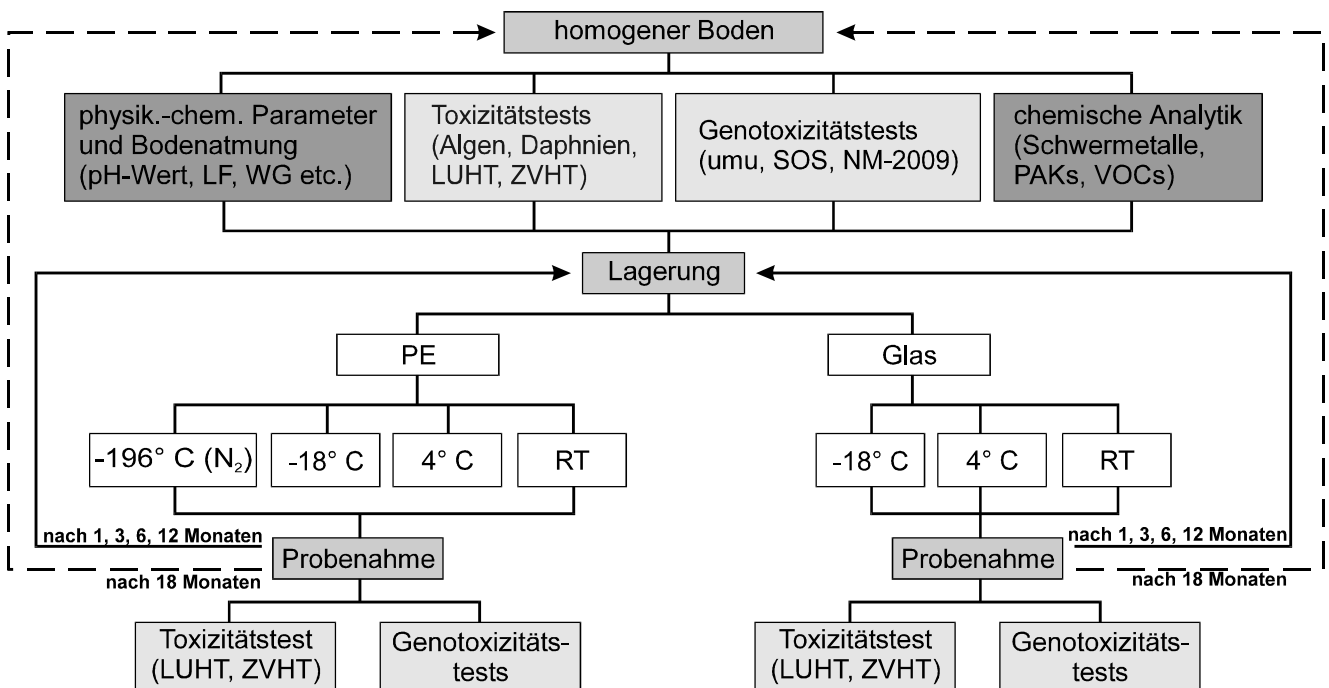


Abb. 1: Schematische Darstellung des Untersuchungsprogramms.

3.2 Methoden

Für eine detaillierte Beschreibung der Methoden wird auf Maxam (Diplomarbeit, RWTH Aachen, 1997) und Ehrlichmann [26] verwiesen. In den folgenden Tabellen werden die angewandten Methoden aufgelistet. Tab. 2 listet die Methoden zur physikalisch-chemischen Untersuchung, Tab. 3 die Mikrobiologischen Methoden und Tab 4. die Methoden zu den biologischen Testverfahren.

Tab. 2: Methoden zur physikalisch-chemischen Untersuchung

Parameter	Methode	Anmerkung
Aktueller pH-Wert	Messung mit Elektrode im Überstand	Mischung 10 g Boden und 25 ml Aqua bidest.
Potentieller pH-Wert	Messung mit Elektrode im Überstand	Mischung 10 g Boden und 25 ml 0,01 M CaCl ₂ -Lösung
Wassergehalt	[35]	
Maximale Wasserhaltekapazität	Methode nach [1]	
Organischer Kohlenstoffgehalt	Glühverlust-Methode	

Tab. 2: (Fortsetzung)

Parameter	Methode	Anmerkung
Korngrößenverteilung	[42]	
Anionen	Flüssigkeits-chromatographie	DX-100 (DIONEX) Ionenchromatograph
Ammonium	Messung mit Elektrode	Elektrode (Orion 9512, Fa. Orion Research)
DOC	Infrarotspektroskopie	
Schwermetalle	Sequentielle Extraktion nach [47] Restgehalt wird aufgeschlossen nach [21]	Atomabsorptions- spektrometrie (AAS) Graphitrohrtechnik (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb) Flammentechnik (Zn) Hydrid-Methode (As) Amalgam- Methode (Hg) i. A. an [7 - 13]
Flüchtige organische Verbindungen (VOCs) und BTEX	Multiple Headspace Extraktion	GC-MS
PAK	Soxhlett-Extraktion	HPLC mit Diodenarray- und Fluoreszenzdetektor i. A. an [29]
Nitroaromaten	Ultraschall-Extraktion	HPLC i. A. an [28]

i. A.: in Anlehnung

Tabelle 3: Mikrobiologische Methoden

Parameter	Methode	Anmerkung
Koloniebildende Einheiten (KBE) auf R2A- und Würze-Agar	[42]	
Denitrifikanten	Titerverfahren	
Nitrifikanten	Titerverfahren	
Langzeitrespiration	Partialdruck	GC-WLD
Bodenatmung	Sauerstoff- und Kohlendioxidumsetzung	Mirco-Oxymax [®] -Respirometer

Tabelle 4: Methoden zu den biologischen Testverfahren

Parameter	Methode	Anmerkung
Eluatherstellung	[6]	Mischung Boden mit Aqua bidest. 1+2
Nitrifikationshemmtest	[6]	
Wachstumshemmtest mit <i>Scenedesmus subspicatus</i> CHODAT	[17] i. A. an [27]	In 250-ml-Erlenmeyerkolbenmaßstab
24-Stunden-Daphnientest	[6] i. A. an [16]	
Lumineszenzhemmtest mit <i>Vibrio fischeri</i>	[18]	
Zellvermehrungshemmtest mit <i>Vibrio fischeri</i>	[19]	Mikrotiterplatten
Zellvermehrungshemmtest mit <i>Pseudomonas putida</i>	[15]	Mikrotiterplatten
Umu-Test	i. A. an [22]	Mikrotiterplatten
SOS-Test	[38]	Mikrotiterplatten
NM2009-Test	i. A. an [22]	Mikrotiterplatten

i. A.: in Anlehnung

3.2.1 Methoden zur toxikologischen Bewertung

Die Rückhaltefunktion der Böden aus ökotoxikologischer Sicht wurde mit der Methode nach DECHEMA [6] beurteilt. Das über den Wasserpfad austragbare genotoxische Potential wurde nach einem Vorschlag von Ehrlichmann [26] bewertet. In Abb. 2 wird diese Vorgehensweise dargestellt.

Im ersten Schritt zur Bewertung der Böden wurden die Eluate im umu-, NM2009- und SOS-Test mit und ohne metabolische Aktivierung untersucht. Wird ein G-Wert von mindestens 3 im SOS-Test und in einem der beiden anderen Tests erreicht, so liegt eine akute genotoxische Gefährdung für den Wasserpfad vor. In allen anderen Fällen kann eine genotoxische Wirkung nicht ausgeschlossen werden und eine Absicherung der Ergebnisse durch Konzentration des Bodeneluates ist erforderlich.

Bodeneluat-Extrakte gelten als genotoxisch, wenn ein G-Wert von mindestens 6 im SOS-Test und in einem der beiden anderen Tests erreicht wird. Ist der G-Wert im SOS-Test höchstens 3 und einer der beiden anderen Tests mindestens 6, so muß zur Bewertung das chemische Belastungsprofil der Probe herangezogen werden [26].

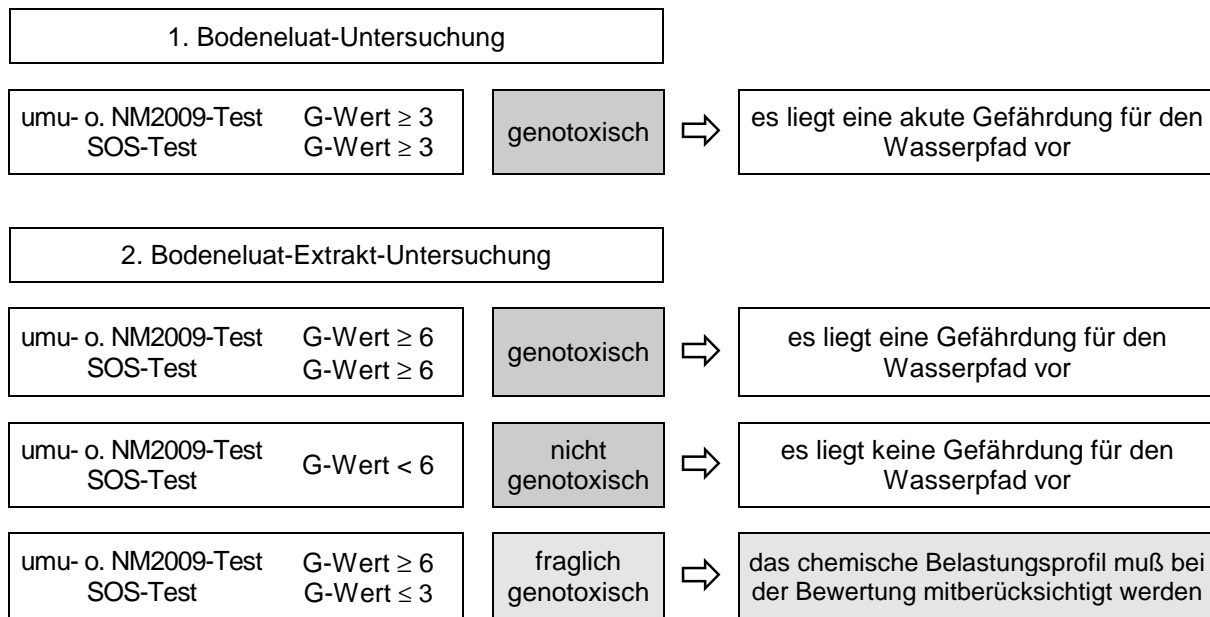


Abb. 2: Bewertungsstrategie für das über den Wasserpfad austragbare genotoxische Potential mit einer Testbatterie aus drei miniaturisierten Genotoxizitätstests (umu-, NM2009- und SOS-Test) (nach [26])

4 Ergebnisse und Bewertung

4.1 Ökotoxizitäts- und Genotoxizitätstests

Im nachfolgenden wird kurz auf die Ergebnisse der Ökotoxizitäts- und Genotoxizitätstests der Bodenproben zu Beginn der Lagerung eingegangen. Danach werden anhand ausgewählter Daten Veränderungen, die im Laufe der Lagerung auftraten, aufgezeigt. Die Ergebnisse zeigen die Tendenz für die Veränderungen der Böden während der Lagerung auf.

4.1.1 Ergebnisse zu Beginn der Lagerung

Tab. 6 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der Tests zur Erfassung des über den Wasserpfad austragbaren ökotoxischen Potentials. Anhand der Meßdaten wird eine Bewertung der Rückhaltefunktion der Böden aus ökotoxikologischer Sicht vorgenommen. Die Ergebnisse, die zu Beginn der Lagerung ermittelt wurden, sind aus den verschiedenen detaillierten Zwischenberichten zu entnehmen [5].

Tab. 5: Beurteilung der Rückhaltefunktion der Böden aus ökotoxikologischer Sicht

	24 h Daphnien- test [6]	Wachstums- hemmtest <i>Scenedesmus</i> s. [17]	LUHT V. <i>fischeri</i> [18]	ZVHT V. <i>fischeri</i> [19]	ZVHT <i>P.</i> <i>putida</i> ¹ [15]	Ökotoxisches Gefährdungs- potential vorhanden ²
LMKW1	–	–	+	–	+	Gering
LMKW2	–	–	+	–	+	Gering
SPMKW1	–	–	–	–	–	Gering
BMKW1 _a	–	–	–	–	+	Gering
HTNT1	+	+	+	+	+	Gegeben
HTNT2	+	+	+	+	–	Gegeben
CTNT1 _a	+	+	+	+	–	Gegeben
CTNT4 _a	+	+	+	+	–	Gegeben
INTUS1	–	–	–	–	–	Gering
R1	–	+	–	–	+	Gegeben
SPAK1 _a	+	+	+	+	+	Gegeben

LUHT: Lumineszenzhemmtest; ZVHT: Zellvermehrungshemmtest

¹ Dieser Test wird in der Bewertung nach [6] nicht mitgeführt

² Nach [6]

Zur Erfassung des über den Wasserpfad austragbaren genotoxischen Potentials der Bodenproben wurden 3 Genotoxizitätstests durchgeführt (Tab. 7).

Tabelle 6: Beurteilung der Rückhaltefunktion aus genotoxikologischer Sicht

	Umu-Test		SOS-Test		NM2009-Test		Genotoxisches Gefährdungs- potential vorhanden ¹
	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	
LMKW1	-	-	-	-	-	-	Nein
LMKW2	-	-	-	-	-	-	Nein
SPMKW1	-	-	-	-	-	-	Nein
BMKW1 _a	-	-	-	-	-	-	Nein
HTNT1	+	+	+	+	+	+	Ja
HTNT2	+	+	+	+	+	+	Ja
CTNT1 _a	+	+	+	+	+	+	Ja
CTNT4 _a	+	+	+	+	-	-	Ja
INTUS1	-	-	-	-	-	-	Nein
R1	-	-	-	-	-	-	Nein
SPAK1 _a	+	-	-	-	-	-	Ja

+/-: eine Probe wird als genotoxisch eingestuft, wenn der G-Wert > 1,5 ist

¹: siehe Bewertungsschema nach [26].

4.1.2 Ergebnisse nach der Lagerung

Veränderungen des toxikologischen Potentials, die während der Lagerung auftreten, werden als signifikant definiert, wenn sich der G-Wert um mehr als zwei Verdünnungstufen ändert.

Bei keinem Boden wurde ein signifikanter Anstieg der Ökotoxizität in den Tests gefunden. Die Proben, die hauptsächlich mit Nitroaromaten kontaminiert sind und die Probe SPAK1a behielten ihre Toxizität im Zeitraum von 1 bis 18 Monaten Lagerung. Eine signifikante Abnahme der Ökotoxizität im Lumineszenzhemmtest mit *Vibrio fischeri* wurde bei den Proben LMKW1 (Abbildung 3) und LMKW2 schon nach 1 Monat Lagerung gefunden. Die Abnahmen sind nicht abhängig von der gewählten Lagerungsart (Temperatur und Lagerungsgefäß), sondern könnten auf Verluste von VOCs und PAKs bei Einlagerung, während des Abfüllens der Proben, zurückzuführen sein.

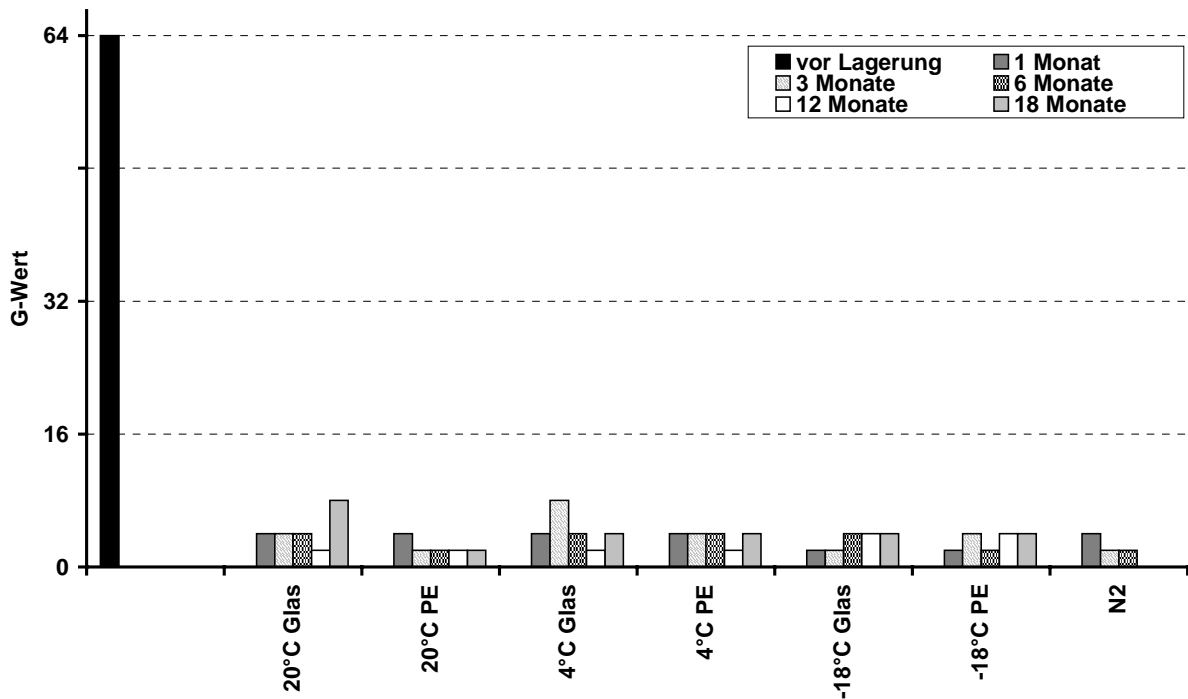


Abb. 3: Lagerungseffekte, nachgewiesen mit dem Lumineszenzhemmtest mit *Vibrio fischeri* für den Boden LMKW1

⇒ Zusammenfassend ist aus den Versuchen zu schließen, daß die Ökotoxizität der Proben nicht anstieg. Eine Abnahme des G_L -Wertes im Verlauf der Lagerung wurde bei Proben, die mit MKWs und PAKs belastet sind, beobachtet. Die Rückhaltefunktion der Böden aus ökotoxikologischer Sicht ändert sich während der Lagerung nicht.

Auch bei der Überprüfung der Genotoxizität wurde bei keiner der Bodenproben ein signifikanter Anstieg der G-Werte in den Tests beobachtet. Eine allgemeine Tendenz des Verlaufs der Genotoxizität über die Zeit konnte nicht aufgezeigt werden. Bei den Proben HTNT1 und HTNT2 wurden Schwankungen der genotoxischen Wirkung nachgewiesen, wobei der G-Wert über die Zeit sowohl zu als auch abnahm. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lagerungsarten gefunden. Bei den anderen mit Nitroaromaten kontaminierten Proben, CTNT1a und CTNT4a, blieb die Genotoxizität über die Zeit konstant. Die Genotoxizität der mit PAK kontaminierten Probe, SPAK1a, nahm bereits nach 1 Monat Lagerung ab (Abb. 4).

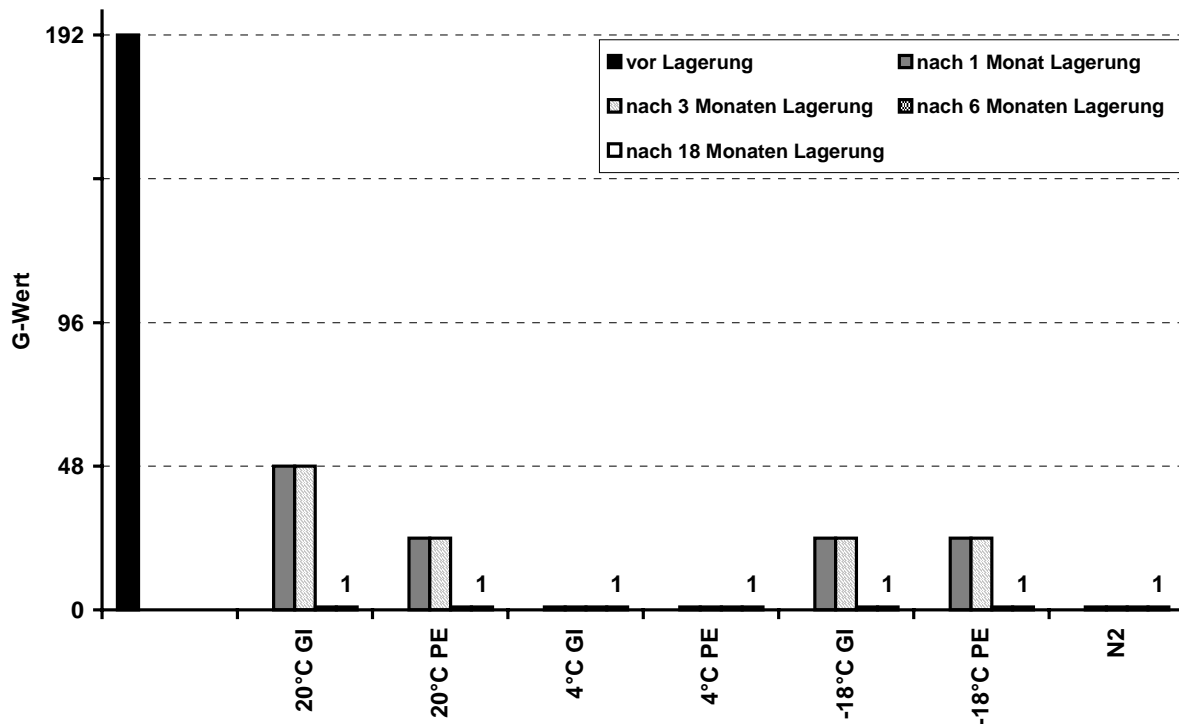


Abb. 4: Lagerungseffekte, nachgewiesen mit dem umu-Test mit metabolischer Aktivierung für den Boden SPAK1a

Die Rückhaltefunktion von Probe SPAK1a aus genotoxikologischer Sicht würde in Abhängigkeit von der Lagerung unterschiedlich beurteilt. Bei Lagerung bei 4°C und in Flüssigstickstoff würde die Probe bereits nach 1 Monat, bei Lagerung bei 20°C und bei -18°C erst nach 6 Monaten Lagerung nicht mehr als genotoxisch eingestuft. Eine Erklärung für das hohe genotoxische Potential der Probe, vor Lagerung, konnte bisher nicht gegeben werden.

4.2 Bodenatmung und Langzeitrespiration

Die Bodenatmung wurde mit einem Mirco-Oxymax[®]-Respirometer und die Langzeitrespiration mit GC-WLD erfaßt. Mit dem Respirometer wurde der kumulierte Sauerstoffverbrauch nach 120 Meßstunden vor Lagerung und nach 18 Monaten Lagerung bestimmt. Dabei konnten keine signifikanten lagerungsbedingten Veränderungen festgestellt werden.

Zusätzlich zu der Erfassung der Bodenatmung mit dem Respirometer wurden Gasmessungen (N₂, O₂ und CO₂) vor Lagerung und nach 1, 3, 6, 12 und 18 Monaten Lagerung durchgeführt. Hierzu wurden 50 g gesiebter, naturfeuchter Boden in mit Septen luftdicht abgeschlossenen 100 ml-Infusionsflaschen eingewogen. Die Gasanalytik wurde mit einem Gaschromatographen der Firma Perkin Elmer, Modell Auto-system mit WLD, durchgeführt. Die Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die Sauerstoffpartialdrücke der Proben, die bei 20°C in Infusionsflaschen, bzw. bei 4°C in Infusionsflaschen gelagert wurden.

Tab. 7: Langzeitrespiration (Partialdruck in mbar O₂), zu Beginn der Lagerung und nach 1, 3, 6, 12 und 18 Monaten Lagerung in Infusionsflaschen bei 20°C und 4°C

		Lagerung in Monaten					
		0	1	3	6	12	18
LMKW1	20°C	192	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	4°C	218	131	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
LMKW2	20°C	229	195	101	33	23	n.n.
	4°C	225	225	197	172	155	137
SPMKW1	20°C	220	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	4°C	220	168	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
BMKW1 _a	20°C	222	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	4°C	221	67	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
HTNT1	20°C	213	205	189	169	145	125
	4°C	220	219	208	200	203	194
HTNT2	20°C	220	72	n.n.	n.n.	34	n.n.
	4°C	189	172	114	93	48	39
CTNT1 _a	20°C	220	186	126	70	n.n.	n.n.
	4°C	220	208	184	143	69	78
CTNT4 _a	20°C	248	37	45	n.n.	n.n.	n.n.
	4°C	250	147	75	20	n.n.	n.n.
INTUS1	20°C	220	227	222	221	207	184
	4°C	220	224	215	228	223	220
R1	20°C	226	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	4°C	228	134	63	49	n.n.	n.n.
SPAK1 _a	20°C	220	n.n.	23	n.n.	n.n.	n.n.
	4°C	220	47	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

Die Daten zeigen deutlich, daß die Partialdrücke von der Lagerungstemperatur (20°C oder 4°C), von dem organischen Kohlenstoffgehalt, dem Nährstoffgehalt und dem Gesamtgehalt der toxischen Verbindungen abhängig sind.

4.3 Chemische Analytik

Von allen Proben wurden sowohl vor als auch nach Lagerung die 16 PAKs nach EPA, die VOCs und BTEX und der Gesamt-Schwermetallgehalt bestimmt. Außerdem wurde von 4 Proben (HTNT1, HTNT2, CTNT1a und CTNT4a) der Nitroaromaten-Gehalt vor und nach Lagerung erfaßt.

Die Schwermetallgehalte verändern sich nicht im Laufe der Lagerung. Nur für die Proben LMKW1 und SPAK1a konnten vor und nach Lagerung VOC-Gehalte bestimmt werden, die zu einer Auswertung benutzt werden können. Bei den mit Nitroaromaten kontaminierten Proben ist auf Grund der hohen Nitroaromatengehalte neben einer quantitativen Auswertung der BTEX-Konzentration nur eine qualitative Auswertung der VOCs möglich. Abb. 5 zeigt die Tendenz, die sowohl bei der Probe LMKW1 als auch bei der Probe SPAK1a gefunden wurde.

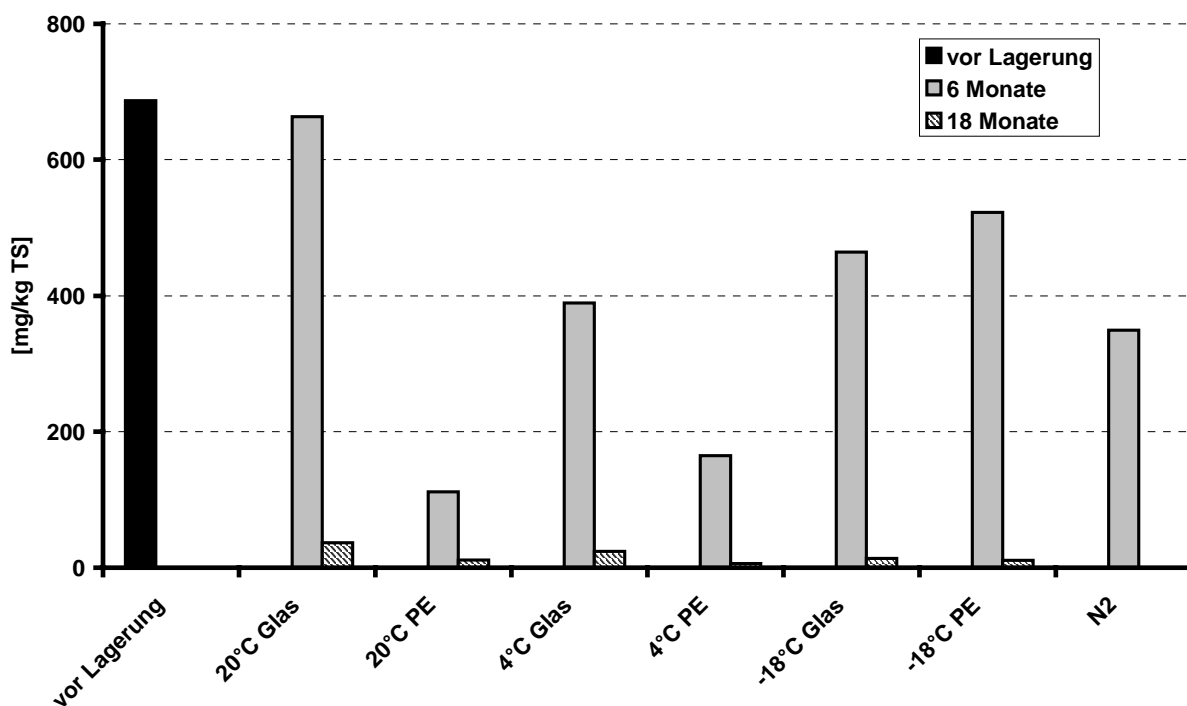


Abb. 5: VOC-Gehalt der Probe LMKW1 zu Beginn der Lagerung und nach 6 und 18 Monaten Lagerung

Bei Lagerung nach 18 Monaten bei 20°C und 4°C in PE-Flaschen wurden für beide Proben Verluste bis zu 100% nachgewiesen. Die Verluste durch die Lagerung bei -18°C der Probe SPAK1a waren nicht größer als 50%.

Nach Lagerung der Proben LMKW1, LMKW2 und HTNT1 wurden Verluste von bis zu 100% des zweiringigen PAKs Naphthalin bestimmt.

Der Nitroaromaten-Gehalt blieb bei allen Proben einigermaßen konstant.

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

- ⇒ Die Ökotoxizität stieg bei keiner der untersuchten Proben. Bei den Proben, die hauptsächlich mit Nitroaromaten kontaminiert sind, traten keine signifikanten Veränderungen auf. Bei den Proben, die hauptsächlich mit MKWs und PAKs kontaminiert sind, kam es in einigen Fällen zu signifikanten Abnahmen des G_L -Wertes im Lumineszenztest mit *Vibrio fischeri*. Diese Abnahmen traten zu Beginn der Lagerung auf und waren unabhängig von der ausgewählten Lagerungsart (Temperatur und Gefäßart).
- ⇒ Für die Genotoxizität der Böden konnte keine klare Tendenz des Verlaufs der G-Werte während der Lagerung aufgezeigt werden. In machen Fällen kam es zunächst zu einer signifikanten Abnahme des G-Wertes, abhängig von der Bodenprobe und des Testsystems. Später stieg der G-Wert wieder an. Auch hier machten sich keine Unterschiede zwischen den einzelnen Lagerungsbedingungen bemerkbar. Die G-Werte der Proben stiegen in keinem Fall durch die Lagerung an.
- ⇒ Die Langzeitrespiration, gemessen mit GC-WLD, der einzelnen Bodenproben ist abhängig von dem organischen Kohlenstoffgehalt, dem Nährstoffgehalt und dem Gesamtgehalt der toxischen Verbindungen, sowie von der Lagerungstemperatur (20°C oder 4°C). Bei den Messungen mit dem Respirometer wurden keine signifikanten Unterschiede in den kumulierten Sauerstoffverbrauchs-Werten vor und nach Lagerung gefunden.
- ⇒ Die größten Verluste der VOCs traten zu Beginn der Lagerung auf. Die Verluste sind bei Lagerung in PE-Flaschen höher als bei Lagerung in Glasflaschen, sowie bei Lagerung bei 20°C und 4°C höher als bei -18°C und bei Lagerung in Flüssigstickstoff. Bei einigen Bodenproben kam es zu Verlusten von bis zu 100% des zweiringigen PAKs Naphthalin. Der Nitroaromatengehalt blieb bei allen Proben einigermaßen konstant.

5 Empfehlungen / Anwendung

Auf Basis der vorliegenden Daten können folgende Empfehlungen für eine optimale Lagerung gemacht werden: Erstens sollte genau der Weg der Probe nach der Probenahme beschrieben werden. Es sollte dokumentiert werden, wie die Probenahme erfolgte, in welchen Behältern die Probe transportiert wurde, wie lange die Probe zwischengelagert wurde (in welchen Gefäßen, bei welcher Temperatur). Auch sollte der Umgang mit der Probe im Detail dokumentiert werden. Zweitens sollte die Probe weniger als eine Woche zwischengelagert werden.

Grundsätzlich sollte von jeder Probe vor der Lagerung bekannt sein, ob die Probe flüchtige Inhaltsstoffe enthält und wie hoch die mikrobielle Aktivität der Probe ist.

Aus den Daten kann abgeleitet werden, daß bereits nach einem Monat Lagerung eine signifikante Veränderung der Bodeninhaltsstoffe auftreten kann. Es wird daher empfohlen, die Bodenproben möglichst nicht länger als einen Monat, aber auf keinen Fall länger als drei Monate zu lagern.

Für die Lagerung wird idealerweise eine Lagerungstemperatur von -18°C in Glas-Flaschen empfohlen. Eine Lagerung in flüssigem Stickstoff ist eine Alternative, aber auf Grund der Kosten wahrscheinlich weniger effektiv als die Lagerung bei -18°C in Glas-Flaschen.

6 Abkürzungen

i. A.	in Anlehnung
LUHT:	Lumineszenzhemmtest
n.b.:	nicht bestimmt
n.n.:	nicht nachweisbar
n.a.:	nicht auswertbar
VOC:	Volatile Organic Carbons (Leichtflüchtiger organischer Kohlenstoff)
ZVHT:	Zellvermehrungshemmtest

7 Eigene Veröffentlichungen & Diplomarbeiten

Original-Publikationen

Ehrlichmann, H., A. Eisenträger, M. Möller, W. Dott. 1997. Effect of storage conditions of soil on ecotoxicological assessment. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **39 (1)**: 55-59

Ehrlichmann H., W. Dott, A. Eisenträger. (in press). Assessment of the water extractable genotoxic potential of contaminated soil samples. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

Eisenträger A., G. Maxam, J.-P. Rila, W. Dott. (in press). A stepwise procedure for the assessment of the microbial respiratory activity of soil samples contaminated with organic compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

Eisenträger A., K. Hund. 2000. Ecotoxicological Assessment. In: H.-J. Rehm, G. Reed (eds): *Biotechnology Vol. 11b Environmental Processes II – Soil Decontamination* (Vol. 11b edited by J. Klein), Wiley-VCH, Weinheim, New York... 127-141.

Eisenräger, A., G. Maxam, J.-P. Rila, W. Dott. 1998. Respiratorische Aktivitäten der Bodenmikroflora als ein Kriterium für Bodenqualität - Stufenkonzept zur Bewertung von hoch mit organischen Verbindungen belasteten Böden. Renger, M., F. Alaily, G., Wessolek (Hrsg.): Bodenökologie und Bodengenese: Tagungsband Mobilität und Wirkung von Schadstoffen in urbanen Böden, **26**: 130-141.

Eisenräger, A., G. Maxam, H. Ehrlichmann, R.P.H. Schmitz, J.-P. Rila, K. Hund, C. Lutermann, W. Dott. 1997. Ecotoxicological and genotoxicological characterization of soils contaminated with high concentrations of nitroaromatics. *Proceedings of Eco-Informa '97*, Munich, October 6 - 9, 1997, **12**: 245-252

Maxam G., J.-P. Rila, W. Dott, A. Eisenräger. (in press). Use of bioassays for the assessment of the water extractable ecotoxic potential of soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

Pollumaa, L., A. Kahru, A. Eisenräger, R. Reiman, A. Maloveryan, A. Ratsep. (in press). Toxicological Investigation of Soils with Solid-Phase Flash-Assay: Comparison with Other Ecotoxicological Tests. *Alternatives to Laboratory Animals*.

Schmitz, R.P.H., A. Eisenräger, W. Dott. 1998. Miniaturized kinetic growth inhibition assays with *Vibrio fischeri* and *Pseudomonas putida* (application, validation and comparison). *Journal of Microbiological Methods*. **31 (1)**: 159-166

Schmitz, R.P.H., A. Eisenräger, W. Dott. 1998. Agonistic and antagonistic toxic effects observed with miniaturized growth and luminescence inhibition assays. *Chemosphere* (in press), akzeptiert am 12.05.1998

Schmitz, R.P.H., M. Klose, A. Eisenräger, W. Dott. 1997. Ecotoxicological testing with a new automatized kinetic *Vibrio fischeri* luminescence inhibition assay in microtitration scale. *Proceedings of Eco-Informa '97*, Munich, October 6 - 9, 1997, **12**: 265-271 (Short Paper)

Schmitz, R.P.H., C. Kretkowski, A. Eisenräger, W. Dott. 1998. Ecotoxicological testing with new kinetic *Photobacterium luminescens* growth and luminescence inhibition assays in microtitration scale. *Chemosphere* (in press), akzeptiert am 12.05.1998

Vorträge

Eisenräger, A., W. Dott. 1996. Miniaturisierung und Automatisierung ökotoxikologischer Testverfahren. Biotestsysteme - Neue Wege zur Umweltbewertung. 4. Fachseminar Umweltbiotechnologie. Ausrichter: Transferstelle Umweltbiotechnologie Bochum im Netzwerk Umweltbiotechnologie und RWTH Aachen, Institut für Hygiene und Umweltmedizin, 20.9.96, RWTH Aachen.

Eisenräger, A. 1996. Aufbau und Arbeitsgebiete des Instituts für Hygiene und Umweltmedizin Kolloquiumsvortrag am Helmholtz-Institut für Biomedizinische Technik, RWTH Aachen, 24.10.96, RWTH Aachen.

Eisenräger, A. 1997. Research fields of the Institute of Hygiene and Environmental Medicine of the RWTH Aachen. Working Group Biotechnology in the Euregio, 21.4.97, RWTH Aachen.

Eisenräger, A., G. Maxam, H. Ehrlichmann, R.P.H. Schmitz, J.-P. Rila, K. Hund, C. Lutermann, W. Dott. 1997. Ecotoxicological and genotoxicological characterization of soils

contaminated with high concentrations of nitroaromatics. Eco-Inforna '97, 7.10.97 GSF-Research Center for Environment and Health, Neuherberg/ München.

Eisenräger, A. 1997. Toxicological characterization of environmental samples using automatized test systems in microtitration scale. Working Group Biotechnology in the Euregio, 23.10.97, RWTH Aachen.

Eisenräger, A. 1997. Miniaturisierung und Automatisierung ökotoxikologischer Testverfahren. Seminar: Bodenbewertung mit miniaturisierten automatisierten biologischen Testverfahren, 5.12.97, RWTH Aachen.

Eisenräger, A., G. Maxam, J.-P. Rila, W. Dott. 1998. Respiratorische Aktivitäten der Bodenmikroflora als ein Kriterium für Bodenqualität - Stufenkonzept zur Bewertung von hoch mit organischen Verbindungen belasteten Böden. Tagung: Mobilität und Wirkung von Schadstoffen in urbanen Böden, 16.-17.2.98, Technische Universität Berlin.

Eisenräger, A., J.-P. Rila. 1998. Stand des BMBF-Forschungsprojekts "Ermittlung optimaler Lagerungsbedingungen...". Statusseminar des BMBF-Forschungsverbunds "Ökotoxikologische Testbatterien", 2.3.98, Technische Universität Berlin.

Eisenräger, A., H. Ehrlichmann, J.-P. Rila, G. Maxam, W. Dott. 1998. Strategy for genotoxicological characterization of soil samples. 8th Annual Meeting of SETAC-Europe: Interfaces in Environmental Chemistry and Toxicology: from the global to the molecular level, 14.-18.4.98, Bor-deaux, Frankreich.

Eisenräger, A., H. Ehrlichmann, R.P.H. Schmitz, W. Dott. 1998. Development and application of new miniaturized and automated ecotoxicological and genotoxicological biotests with kinetic data acquisition. International Symposium on New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring, 1.-3.6.98, Masaryk University, Brno, Tschechien.

Eisenräger, A. 1998. Optimale Lagerungsbedingungen für Bodenrückstellproben für toxikologische Untersuchungen in Abhängigkeit von der Schadstoffbelastung. 2. Statusseminar des Teil-verbunds 4 "Ökotoxikologische Testbatterien" des Forschungsverbunds "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", 25.8.98, Frankfurt.

Eisenräger, A., J.-P. Rila, H. Ehrlichmann, R.P.H. Schmitz, W. Dott. 1998. Ecotoxicological and genotoxicological characterization of contaminated soil samples from military sites using optimized microplate test systems with kinetic photometric and luminometric data acquisition. Joint Conference of Scandinavian Society of Cell Toxicology and Estonian Society of Toxicology (SSCT & ETS 98), 23.10–26.10.98, Tallinn, Estland.

Eisenräger, A., J.-P. Rila, H. Ehrlichmann, R.P.H. Schmitz, W. Dott. 1998. Ecotoxicological and genotoxicological characterization of contaminated soil samples from military sites using optimized microplate test systems with kinetic photometric and luminometric data acquisition. 15. Um-brella Symposium "Biotechnology", 2.11.–4.11.98, TECHNICON Haifa, Israel.

Eisenräger, A., J.-P. Rila, W. Kördel, F. Pfeifer, W. Dott. 1999. Influence of storage and transport of homogenized soil samples on legal certainty of ecotoxicological and chemical analyses. 9th Annual Meeting of SETAC-Europe: Quality of Life and Environment in Cultured Landscapes, 25.-29.5.99, Leipzig, Deutschland.

Eisenträger, A., J.-P. Rila, W. Dott. 1999. Stabilität ökotoxikologischer und genotoxikologischer Bodenparameter bei Lagerung unter definierten Bedingungen. 3. Statusseminar des Teilverbunds 4 "Ökotoxikologische Testbatterien" des Forschungsverbunds "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", 1.6.99, Frankfurt.

Eisenträger, A., H. Ehrlichmann, J.-P. Rila, W. Dott. 1999. Entwicklung und Erprobung eines Konzepts zur Bewertung des wässrig extrahierbaren genotoxischen Potentials kontaminierter Böden. Jahrestagung 1999 der Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie der Gesellschaft Deutscher Chemiker "Chemisch-biologische Teststrategien und Bewertungskonzepte – Beiträge zur Risikoanalyse komplexer Umweltkontaminationen." 24. bis 26.99, Jena.

Poster-Veröffentlichungen (zitierfähige Abstracts)

Ehrlichmann, H., A. Eisenträger, M. Möller, W. Dott. 1997. Lagerungsbedingte Veränderungen ökotoxikologischer und chemischer Eigenschaften von Bodenproben. Gründungstagung des deutschsprachigen Zweigs der SETAC-Europe, 24.2. bis 25.2.97, Aachen.

Ehrlichmann, H., A. Eisenträger, D. Küppers, W. Dott. 1997. Genotoxikologische Bewertung von Böden mit bakteriellen Testsystemen: Vergleich von Bodenextrakten, wässrigen Eluaten und aufkonzentrierten wässrigen Eluaten. Kongreß der Gesellschaft für Hygiene und Umweltmedizin (GHU): Umwelt und Gesundheit, 6. bis 8.3.97, Aachen.

Ehrlichmann, H., B. Mahn, A. Eisenträger, W. Dott. 1998. Development and validation of a miniaturized *Salmonella typhimurium* reversion test with kinetic data acquisition. International Symposium on new microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring, 1.-3.6.98, Brünn, Tschechien.

Ehrlichmann, H., A. Eisenträger, M. Möller, W. Dott. 1998. Festphasenextraktion zum sensitiveren Nachweis des wässrig extrahierbaren genotoxischen Potentials von Böden. 3. Tagung der SETAC-Europe (German Language Branch): Ökosystemare Ansätze in der Ökotoxikologie, 18. bis 19.5.1998, Zittau.

Eisenträger, A., J.-P. Rila, H. Ehrlichmann, R.P.H. Schmitz, W. Dott. 1998. Ecotoxicological and genotoxicological characterization of sites with mixed contaminations set free during production of explosives. International Symposium on New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring, 1.-3.6.98, Brünn, Tschechien

Eisenträger A., J.-P. Rila, W. Kördel, F. Pfeifer, W. Dott. 1999. Influence of storage and transport of homogenized soil samples on legal certainty of ecotoxicological and chemical analyses. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (ed.): Quality of Life and Environment in Cultured Landscapes, Proceedings of the 9th annual meeting of SETAC-Europe, 25.-29.5.96, Leipzig, Deutschland, 34

Guettes, R., A. Eisentraeger, W. Dott. 1999. Evaluation of soil respiration measurements of contaminated sites taking nutrient limitations into account. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (ed.): Quality of Life and Environment in Cultured Landscapes, Proceedings of the 9th annual meeting of SETAC-Europe, 25.-29.5.96, Leipzig, Deutschland, 138.

Hempel, U., R.P.H. Schmitz, A. Eisenträger, W. Dott. 1998. Presentation of a new algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* in microtitration scale. Eighth Annual Meeting of SETAC-Europe, 14-18 April, Bordeaux, France

Rila J.P., A. Eisenträger, W. Dott W. 1999. Bioassays as early-warning system to determine the water extractable genotoxic and ecotoxic potential from sites mainly contaminated with explosives and PAHs. Nationaal Symposium Bodemonderzoek "Bodem Breed", Proceedings of the 11th annual meeting, 29.-30.11.99, Lunteren, The Netherlands, 193.

Schmitz, R.P.H., A. Eisenträger, W. Dott. 1997. Möglichkeiten und Problemfelder miniaturisierter und automatisierter Zellvermehrungshemmtests mit Prokaryonten. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin*. **199 (5)**: 448-449

Schmitz, R.P.H., A. Eisenträger, W. Dott. 1997. Wachstumskinetiken unter Schwermetalleinfluß - stoffspezifische und coergistische Effekte in miniaturisierten aquatischen Biotestsystemen mit Prokaryonten. *Biospektrum*, Sonderausgabe zur Frühjahrstagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie e.V. (VAAM) in Hamburg, 16. - 19. März (ISSN 0947-0867), S. 74

Schmitz, R.P.H., T. Lindvogt, A. Eisenträger, N. Jacobi, M. Möller, W. Dott. 1997. Aspekte toxikologischer Bewertung "umweltverträglicher" Schmierfluide. *Biospektrum*, Sonderausgabe zur Frühjahrstagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie e.V. (VAAM) in Hamburg, 16. - 19. März (ISSN 0947-0867), S. 73

Schmitz, R.P.H., T. Lindvogt, A. Eisenträger, N. Jacobi, M. Möller, W. Dott. 1997. Nutzungsbedingte Veränderung des toxischen Potentials von Schmierfluiden auf der Basis von synthetischen Estern. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin*. **199 (5)**: 448

Sonstige Veröffentlichungen/Tagungsberichte

Schmitz, R.P.H. 1998. Miniaturisierte und automatisierte Testverfahren zur human- und ökotoxikologischen Bewertung von Schadstoffen. Bericht zum Statusseminar "Bodenbewertung mit miniaturisierten und automatisierten biologischen Testverfahren", 5. Dezember 1997, Aachen. *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft*. **58 (4)**: 173-174

Eisenträger, A., R.P.H. Schmitz, H. Ehrlichmann, W. Dott. 1997. Miniaturisierung und Automatisierung ökotoxikologischer Testverfahren. In: S. Heiden, W. Dott (Hrsg.): "Miniaturisierte automatisierte Testverfahren zur Human- und Ökotoxikologischen Bewertung von Schadstoffen in Umweltproben". Tagungsband Initiativen zum Umweltschutz 7, Zeller-Verlag, **7**: 3-17

Dissertationen

Ehrlichmann, H. 1999. Ph.D. thesis. Entwicklung eines Konzepts zur Bewertung des wässrig extrahierbaren genotoxischen Potentials kontaminierter Böden mit optimierten und miniaturisierten prokaryontischen Testverfahren. RWTH Aachen. Akademische Edition Umweltforschung. Band 7/99. Shaker Verlag. Aachen.

Diplomarbeiten

Maxam, G. 1997. Toxikologische Bewertung von Böden mit miniaturisierten Testverfahren und mit Bodenatmungsmessungen. Institut für Hygiene und Umweltmedizin der RWTH Aachen.

8 Literaturverzeichnis

1. **Alef, K.** 1991. Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie: Aktivitäten, Biomasse, Differenzierung. ecomed, Landsberg/Lech.
2. **Allen, S.E., H.M. Grimshaw.** 1962. Effect of low-temperature storage on the extractable nutrient ions in soils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **13**: 525-529.
3. **Anderson, J.P.E.** 1987. Handling and storage of soils for pesticide experiments. In: Somerville L, und Greaves MP (eds.): *Pesticide effects and soil microflora*. Taylor and Francis.
4. **Bates, T.E.** 1993. Soil Handling and Preparation. In: Carter MR (ed.): *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Lewis Publishers, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 19-24.
5. **BMBF-Forschungsverbund "Biologische Verfahren zur Bodensanierung".** 1997, 1998, 1999. Zwischenberichte zum Teilvorhaben 4.7: "Ermittlung optimaler Lagerungsbedingungen für Bodenrückstellproben für toxikologische Untersuchungen in Abhängigkeit von der Schadstoffbelastung". RWTH Aachen.
6. **Dott, W., M. van Afferden, W. Ahlf, G. Crößmann, B. Daei, M. Dorgerloh, Th. Eikmann, W. Fabig, U. Gauglitz, C.A.M. van Gestel, A. Hartmann, K. Hund, M. Kästner, G. Kalnowski, R. Kanne, U. Müller-Wegener, W. Müller-Markgraf, F. Pfeifer, G. Rippen, W. Schäfer-Treffenfeld, V. Schulz-Berendt, M. Sellner, B. Sprenger, W.D. Weißenfels, D. Werner, M. Wiegand-Rosinus, J. Wiesner, B.M. Wilke.** 1995. DECHEMA-Ad-hoc-Arbeitsgruppe: "Methoden zur toxikologischen/ökotoxikologischen Bewertung von Böden": Biologische Testmethoden für Böden. 4. Bericht des interdisziplinären Arbeitskreises "Umwelttechnologie - Böden". DECHEMA Deutsche Gesellschaft für Chemisches Apparatewesen, Chemische Technik und Biotechnologie e. V., Frankfurt am Main.
7. **DIN 38 406 T6.** 1981. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Bestimmung von Blei (E6). VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
8. **DIN 38 406 T7.** 1991. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Bestimmung von Kupfer mittels AAS (E7). VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
9. **DIN 38 406 T8.** 1980. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Bestimmung von Zink . VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
10. **DIN 38 406 T10.** 1985. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Bestimmung von Chrom. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
11. **DIN 38 406 T11.** 1991. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Bestimmung von Nickel mittels AAS (E11). VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

12. **DIN 38 406 T12-3.** 1981. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Bestimmung von Quecksilber mittels AAS. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
13. **DIN 38 406 T19.** 1993. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Bestimmung von Cadmium mittels AAS. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
14. **DIN 38 409 T51.** 1987. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser- Abwasser- und Schlammuntersuchung. Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs in *n* Tagen nach dem Verdünnungsprinzip (Verdünnungs-BSB_n) (H51). Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN, Berlin.
15. **DIN 38 412 L8.** 1991. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserinhaltsstoffen auf Bakterien (Pseudomonas-Zellvermehrungs-Hemmtest) (L8). 25. Lieferung, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
16. **DIN 38 412 L30.** 1989. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Daphnien über Verdünnungsstufen (L30). 22. Lieferung, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
17. **DIN 38 412 L33.** 1991. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsstufen (L33). 25. Lieferung, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
18. **DIN 38 412 L34/341.** 1991/93. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von Photobacterium phosphoreum - Leuchtbakterien. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
19. **DIN 38 412 L37.** 1997. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Licht-emission von Vibrio fischeri - Leuchtbakterien. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
20. **DIN 38 412 T1.** 1982. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser- Abwasser- und Schlammuntersuchung. Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L). Allgemeine Hinweise zur Planung, Durchführung und Auswertung biologischer Testverfahren (L1). Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN, Berlin.
21. **DIN 38414-7.** 1983. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Aufschluß mit Königswasser zur nachfolgenden Bestimmung des säurelöslichen Anteils von Metallen (S7).
22. **DIN 38 415 T3.** 1995. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Bestimmung des erbgutverändernden Potentials von Wasser- und Abwasserinhaltsstoffen mit dem umu-Test (T3). Entwurf. Beuth Verlag GmbH, Berlin.
23. **DIN-Entwurf ISO 10381-6.** 1993. Bodenbeschaffenheit, Probenahme: Anleitung zur Probenahme, Behandlung und Lagerung von Böden für die Bestimmung aerober mikrobieller Prozesse unter Laborbedingungen.

24. **DIN-Entwurf ISO 11266.** 1993. Bodenbeschaffenheit: Anleitung zur Laboruntersuchung zur biologischen Abbaubarkeit von organischen Chemikalien im Boden (aerobe Bedingungen).
25. **DIN-Entwurf ISO 11464.** 1994. Bodenbeschaffenheit: Probenvorbehandlung für physikalisch-chemische Untersuchungen.
26. **Ehrlichmann, H.** 1999. Ph.D. thesis. Entwicklung eines Konzepts zur Bewertung des wässrig extrahierbaren genotoxischen Potentials kontaminierter Böden mit optimierten und miniaturisierten prokaryontischen Testverfahren. RWTH Aachen. Akademische Edition Umweltforschung. Band 7/99. Shaker Verlag. Aachen.
27. **EN 28 692 L9.** 1993. Wasserbeschaffenheit. Wachstumshemmtest mit den Süßwasseralgen *Scenedesmus subspicatus* und *Selenastrum capricornutum*. 29. Lieferung, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
28. **EPA.** 1995a. Method 8330, Nitroaromatics und Nitramines by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Test Method for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods, Office of Solid Waste and Emergency Response, U.S. Environmental Protection Agency, Washington D.C., SW-846, Revision 0, September 1994.
29. **EPA.** 1984. US-Environmental Protection Agency. Part VIII, 49, 209, method 610.
30. **Haldeman, D.L., S.A. Penny, D.C. White, D.B. Ringelberg.** 1994. Changes in bacteria recoverable from subsurface volcanic rock samples during storage at 4°C. *Applied and Environmental Microbiology*. **60**, **8**: 2697-2703.
31. **Hanisch, R.C., M.A. McDevitt.** 1984. Protocols for sampling and analysis of surface impoundments and land treatment/disposal sites for VOCs. Technical Note, EPA-NMB 68-02-3850, Work Assignment 11.
32. **ISO 10693.** 1995. Soil Quality - Determination of carbonate content - volumetric method.
33. **ISO 10694.** 1995. Soil Quality - Determination of organic and total carbon after dry combustion - elementary analysis.
34. **ISO 11261.** 1995. Soil Quality - Determination of total nitrogen - modified Kjeldahl method.
35. **ISO 11465.** 1993. Soil Quality – Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method
36. **ISO 11466.** 1995. Soil Quality - Extraction of trace elements soluble in aqua regia.
37. **Lewis, T.E., A.B. Crockett, R.L. Siegrist.** 1994. Soil sampling and analysis for volatile organic compounds. *Environmental Monitoring and Assessment*. **30**: 213-246.
38. **McDaniels, A.E., A.L. Reyes, L.J. Wymer, C.C. Rankin, G.N. Stelma.** 1993. Genotoxic activity detected in soils from a hazardous waste site by the Ames test and SOS colorimetric test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **22**: 115-122.
39. **Naudin, S., J. Garric, E. Vindimian, M. Bray, B. Migeon, B. Vollat, G. Lenon.** 1995. Influence of the sample preservation mode to assess the chronic toxicity of an industrial effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **30**: 54-62.

40. **Nelson, D.W., J.M. Bremner.** 1972. Preservation of soil samples for inorganic nitrogen analyses. *Agronomy Journal*. **64**: 192-199.
41. **Petersen, S.O., M.J. Klug.** 1994. Effects of sieving, storage and incubation temperature on the phospholipid fatty acid profile of a soil microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*. **60, 7**: 2421-2430.
42. **Reasoner, D. J., E.E. Geldreich.** 1985: A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Applied and Environmental Microbiology*. **49, 1**: 1 - 7.
43. **Ron Vaz, M.D., C.A. Shand, A.C. Edwards.** 1994. Effect of storage on soluble phosphorus fractions in water extracts of soils. *Communications in Soil Science & Plant Analysis*. **25 (19 &20)**: 3147-3159.
44. **Ross, D.S., T.R. Wilmot, J. Larsen.** 1994. Testing sugarbrush soils: effects of sample storage and drying. *Communications in Soil Science & Plant Analysis*. **25 (17 &18)**: 2899-2908.
45. **Schinner, F., R. Öhlinger, E. Kandeler.** 1993. *Bodenbiologische Arbeitsmethoden*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.
46. **Siegrist, R.L., P.D. Jennsen.** 1990. Evaluation of sampling method effects on volatile organic compound measurements in contaminated soils. *Environmental Science & Technology*. **24**: 1387-1392.
47. **Zeien, H. and G.W. Brümmer.** 1991. Chemische Extraktion zur Bestimmung der Bindungsformen von Schwermetallen in Böden. *Berichte aus der ökologischen Forschung, Band 6, Auswirkungen von Siedlungsabfällen auf Böden, Bodenorganismen und Pflanzen, KFA Jülich* 1991, S. 62

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.4 Verbundvorhaben 5: Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen bei der biologischen Bodensanierung

Prof. Dr. B. Mahro¹

Dr. A. Eschenbach^{1,2}

H. Mescher^{1,2}

¹)Institut für Technischen Umweltschutz, Hochschule Bremen
Neustadtwall 30
28199 Bremen

²)Umwelttechnischen Büro und Labor Dr. R. Wienberg
Gotenstraße 4
20097 Hamburg

Förderkennzeichen: 14810925

Laufzeit: 01.09.1997 – 30.06.2000

1 Aufgabenstellung im Verbundvorhaben

Ein Teil der als Altlast im Boden vorliegenden organischen Schadstoffe, wie z.B. PAK oder TNT, wird im Verlauf biologischer Sanierungsverfahren in Form von nicht-extrahierbaren Rückständen im Boden festgelegt. Während der vollständige Abbau von Schadstoffen (Mineralisation) eine echte Detoxifikation der Schadstoffe darstellt, muß der Nachweis der Unbedenklichkeit der festgelegten oder immobilisierten Schadstoffe erst durch wissenschaftliche Untersuchungen erbracht werden. Um die ökologische Nachhaltigkeit der biologischen Bodensanierungen zu bewerten, ist das Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von humifizierten Schadstoffen in dem Verbundvorhaben 5 detailliert untersucht worden. Dabei wurden verschiedene Untersuchungsstrategien verfolgt:

1. Laborversuche zur Evaluation des Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von humifizierten Schadstoffen unter simulierten ökologischen worst-case-Bedingungen (Zeitrafferversuche im Labormaßstab)
2. Untersuchungen des Langzeit- und Remobilisierungsverhaltens von humifizierten Schadstoffen im Großmaßstab unter möglichst naturnahen Freilandbedingungen
Strukturanalytische Aufklärung der Bindungsform zwischen Schadstoff (-derivat) und organischer Substanz des Bodens

Zur Bearbeitung dieser Fragestellungen waren in dem Verbundvorhaben verschiedene Arbeitsgruppen beauftragt (Tab. 1).

Tab. 1: Verbundvorhaben 5 "Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen bei der biologischen Bodensanierung"

Teilvorhaben (Kapitel*)	Titel	Durchführende Institution
5.0 (9.4)	Koordinierung	Hochschule Bremen
5.1 (9.4.1)	Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von PAK bei der biologischen Bodensanierung	Hochschule Bremen
5.2 (9.4.2)	Biologische Sanierung – Beurteilung des Langzeitverhaltens / der Remobilisierung festgelegter Schadstoffe (PAK, TNT und Metabolite)	FhIUCT, Schmallingenberg
5.3.1 (9.4.3)	Dynamisches Beetverfahren: Analyse der Bindungsstruktur nicht extrahierbarer TNT-Transformationsprodukte	Universität Marburg
5.3.2 (9.4.4)	Alternierender Anaerob-/Aerob-Prozeß: Analyse der Bindungsstrukturen von metabolisiertem und humifiziertem TNT im Boden	FhIGB, Stuttgart
5.3.3 (9.4.5)	Analyse der Bindungsstrukturen gebundener TNT-Rückstände im Boden nach biologischer Behandlung durch das Weißfäulepilzverfahren und Remobilisierungsversuche	Universität Jena

*Kapitelnummer in diesem Leitfaden

Die Untersuchungen erfolgten ausschließlich am Beispiel der Schadstoffe PAK und TNT, jedoch bei Einsatz unterschiedlicher Bodenmaterialien, in unterschiedlichen Versuchsmaßstäben und unter Berücksichtigung unterschiedlicher Umweltfaktoren. Eine spezielle Aufgabe des Koordinierungsprojektes war es dabei, die methodische Vorgehensweise der verschiedenen Arbeitsgruppen zusammenzuführen. Darüberhinaus sollten die im Verbund erarbeiteten Forschungsergebnisse in einer Bewertung und Handlungsempfehlung zum Umgang mit der gezielt geförderten oder als Begleiterscheinung auftretenden Schadstoff-Humifizierung zusammengefaßt werden.

Die Ergebnisse der in den einzelnen Forschungsvorhaben durchgeführten Untersuchungen werden im Folgenden für jedes Projekt getrennt dargestellt. Allgemeinere Schlußfolgerungen und Bewertungen zum Thema "Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen bei der biologischen Bodensanierung" sind an verschiedenen Stellen im Teil 1 dieses Leitfadens ausführlich dargestellt worden (Kap. 2.2 und 4.3).

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.4 Verbundvorhaben 5: Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen bei der biologischen Bodensanierung

9.4.1 Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von PAK bei der biologischen Bodensanierung (TV 5.1)

Prof. Dr. B. Mahro¹

Dr. A. Eschenbach^{1,2}

H. Mescher^{1,2}

Karen Johannsen¹

¹)Institut für Technischen Umweltschutz, Hochschule Bremen
Neustadtwall 30
28199 Bremen

²)Umwelttechnischen Büro und Labor Dr. R. Wienberg
Gotenstraße 4
20097 Hamburg

Förderkennzeichen: 14810925

Laufzeit: 01.09.1997 – 30.06.2000

1 Aufgabenstellung im Teilvorhaben

Die hier dargestellten Ergebnisse wurden in den Forschungsvorhaben "Untersuchung der Bildung und Langzeitstabilität von humifizierten PAK in biologisch behandelten Recyclingböden" (Förderkennzeichen: 140937) und "Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen bei der biologischen Bodensanierung" (Förderkennzeichen: 14810925) erarbeitet.

Im Rahmen der Entwicklung biologischer Sanierungsverfahren ist auch die Festlegung von Schadstoffen in der organischen Bodenmatrix nach Zugabe von Supplementen als Sanierungsoption zunehmend in das Blickfeld des Interesses gerückt [1; 10; 20]. Im Forschungsvorhaben "Untersuchung der Bildung und Langzeitstabilität von humifizierten PAK in biologisch behandelten Recyclingböden" sollte vor diesem Hintergrund deshalb die im Verbundvorhaben 2 untersuchten technischen Verfahren zur gezielten Einbindung von PAK in die Humusmatrix nach Zugabe verschiedener organischer Supplemente mit Hilfe radioaktiver Substanzen simuliert und hinsichtlich des Erfolgs der Einbindung in verschiedenen Bodenmaterialien untersucht werden. Der Einsatz ^{14}C -markierter Substanzen war notwendig, da nur so die exakte Erfassung aller Kompartimente (^{14}C - CO_2 , ^{14}C -Ausgasung (VOC), extrahierbare originäre ^{14}C -Verbindung oder deren Metabolite, nicht-extrahierbare ^{14}C -Rückstände) und die Erstellung einer vollständigen Kohlenstoff-Bilanz möglich war. In einem zweiten Untersuchungsabschnitt sollte dann der Verbleib und die Langzeitstabilität der im Verlauf der Behandlung gebildeten nicht-extrahierbaren ^{14}C -markierten PAK-Rückstände im Boden untersucht werden. Besonderes Ziel dieser Messungen war, durch Anwendung von extremen Behandlungsmaßnahmen das Freisetzungspotential gebundener Schadstoff-Rückstände unter worst-case-Bedingungen im Zeitraffer zu simulieren.

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

Aus agrarwissenschaftlichen Untersuchungen war zu Beginn unserer Arbeiten seit einigen Jahren bekannt, daß ein Teil der applizierten Wirkstoffe (Pestizide) im Boden in Form von sogenannten gebundenen Rückständen (bound residues) überdauern kann [2; 3; 11; 22]. Die Menge, die beim Einsatz von Pestiziden als nicht-extrahierbarer Rückstand im Boden gemessen worden war, lag zwischen 20-70% (maximal bis 90%) der applizierten Wirkstoff-Menge und war je nach Wirkstoff unterschiedlich [3]. Die Tatsache, daß es auch bei der biologischen Sanierung von Altlastböden zu einer solchen Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen kommen kann, war erst später thematisiert worden [17]. Durch die Verwendung von radioaktiv-markierten Modellschadstoffen konnte aber auch für im Boden vorkommende Altlaststoffe wie PAK nachgewiesen werden, daß das Verschwinden von Schadstoffen nach biotechnischen Bodensanierungsverfahren nicht allein auf der vollständigen Umsetzung zu CO_2 und Wasser basiert, sondern daß die Schadstoffe mit einem größeren Prozentanteil auch einer Festlegung in der organischen Substanz des Bodens unterliegen [9; 14]. Dabei kann es sowohl zur reversiblen Adsorption an Bodenpartikel [16; 24] als auch zu einer irreversiblen Festlegung der Schadstoffe in der Bodenmatrix kommen [14; 19; 21]. Die Festlegung kann biologisch induziert und gefördert werden [9], aber auch durch nicht-biologische Prozesse, wie Diffusion in Mikroporen des Bodens erfolgen [13].

Die festgelegten Verbindungen sind auch durch rigorose Extraktionsbedingungen (mehrfache Lösemittel-Extraktion, alkalische Hydrolyse) nicht mehr extrahierbar [8] und werden somit nach biotechnischer Behandlung – vergleichbar den Pestiziden – zu gebundenen Rückständen. Da die Festlegung von Schadstoffen im Unterschied zur vollständigen Mineralisation der Substanzen nicht zugleich das vollständige Verschwinden des Schadstoffs impliziert, mußte in Folgeuntersuchungen geklärt werden, wie sich die so humifizierten Schadstoffe über längere Zeiträume verhalten. Im Sinne der ökologischen Nachhaltigkeit der Sanierung muß dabei insbesondere sichergestellt werden, daß die eingebundenen Schadstoffe nicht nach einiger Zeit wieder als originäre Verbindung oder als Metabolit freigesetzt werden können.

Die zur Frage der Remobilisierung gebundener Rückstände vorliegenden Erfahrungen mit Pestiziden boten zunächst noch kein einheitliches Bild [5; 12; 15]. Darüber hinaus waren die Ergebnisse aus der Pestizidforschung auch nicht direkt mit der hier diskutierten Problematik bei Altlastböden vergleichbar, da Pestizide i.d.R. nur in sehr kleinen Mengen in den Boden eingetragen werden (< 1mg/kg). Altlast-Schadstoffe liegen hingegen häufig im Bereich von einigen mg/kg oder gar g/kg im Boden vor und unterscheiden sich auch hinsichtlich der Zustandsform, in der sie im Boden vorliegen. Während Pestizide möglichst fein verteilt durch Spritzen oder Sprühen appliziert werden, gelangen Altlast-Schadstoffe meist in größeren Mengen (z.B. in Form von Schlämmen, Teer- oder TNT-Klumpen) oder als fließfähige Schadstoffphase (z.B. als Ölphase) in den Boden, woraus sich auch Unterschiede hinsichtlich der Einbindungsmöglichkeiten im Humus und der Stabilität der Humifizierung ergeben können [20].

Eine detaillierte Analyse der Faktoren, die das Langzeitverhalten von organischen Schadstoffen in Altlastböden beeinflussen, existierte zum Zeitpunkt des Vorhabensbeginns noch nicht. Da die Humifizierung von Schadstoffen aber zum einen im Boden genau so wenig zu vermeiden ist wie die Humifizierung von natürlichen organischen Verbindungen und zum anderen im Rahmen des Sanierungsverfahrens auch gezielt genutzt werden sollte [1; 18] war die Bewertung der Langzeitstabilität und des Remobilisierungsverhaltens von humifizierten Schadstoffen in biologisch sanierten Bodenmaterialien deshalb dringend erforderlich.

3 Eingesetzte Bodenmaterialien und Methoden

In den Versuchen zur Langzeitstabilität und zum Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen wurde ein Modellbodenmaterial (Muttergarten) ohne vorherige Kontamination, sowie verschiedene Altlastbodenmaterialien (Wülknitz, Bremen, Veringstraße) verwendet. Die Bodeneigenschaften, sowie die Kontaminationsart sind in Tabelle 2 und 3 dargestellt.

Tab. 2. Bodeneigenschaften der verwendeten Bodenmaterialien

Bezeichnung	Muttergarten (Modellboden- material)	Wülknitz (Altlastboden- material)	Bremen (Altlastboden- material)
Bodenart	schluffiger Ton (ÜT)	lehmiger Sand (l'S)	Sand (S)
Ton [Gew.-%]	30,3	7,2	n.b.
Schluff [Gew.-%]	66,6	12,3	n.b.
Sand [Gew.-%]	3,1	80,5	n.b.
Kontaminationsart	nicht kontaminiert	Teeröl	Mineralöl
PAK-Gehalt [mg EPA-PAK/kg Boden]	nicht nachweisbar	6.400	3.500
C_{org} [Gew.-%]	0,9	6,7	13,8
Maximale Wasserhalte- kapazität [Gew.-%]	53,0	20,4	20,0
pH (CaCl₂)	6,9	7,2	5,3

Tab. 3: Bodeneigenschaften der Altlastbodenmaterialien Veringstraße (Hamburg)

Bezeichnung	Boden A	Boden B	Boden C
Bodenart	lehmiger Sand (l'S)	toniger Lehm (tL)	lehmiger Sand (l'S)
Ton [Gew.-%]	16,6	25,5	9,7
Schluff [Gew.-%]	17,9	35,9	14,0
Sand [Gew.-%]	59,2	36,3	66,7
Kontaminationsart	niedrig kontaminiert	mittel kontaminiert	hoch kontaminiert
PAK-Gehalt [mg EPA-PAK/kg Boden]	100	600 - 650	1.600 – 1.800
C_{org} [Gew.-%]	4,65	3,39	7,91
Maximale Wasserhalte- kapazität [Gew.-%]	41,9	43,8	38,8
pH (CaCl₂)	7,5	7,2	7,6

Die Bodenmaterialien wurden nach Applikation der ^{14}C -markierten PAK (^{14}C -Anthracen, ^{14}C -Pyren, ^{14}C -Benzo(a)pyren) zunächst ohne Zugabe organischer Supplemente vorinkubiert (Modellboden Muttergarten: 69 Tage, Altlastboden Wülknitz: 82 Tage, Altlastboden Bremen: 35 Tage), um einen "Alterungsprozeß" der Schadstoffe im Boden entsprechend einer realen Altlasten-Situation zu simulieren. Um Humifizierungsprozesse gezielt zu fördern, wurden in weiterführenden Inkubationsversuchen (Muttergarten: 291 Tage, Wülknitz: 288 Tage, Bremen: 175 Tage) organische Supplemente wie Kompost oder Rindmulch zugegeben. Die ^{14}C -Aktivität wurde während der Vorinkubation und den nachfolgenden Inkubationsversuchen bilanzierend untersucht. Die Untersuchungen wurden in Bioreaktorgefäßen mit Gaserfassung durchgeführt. Die Analytik von ^{14}C -PAK sowie die Extraktionen erfolgten nach Eschenbach [9].

Eingehendere Erläuterungen zu den angewandten Methoden sind im Anhang Methodensammlung aufgeführt.

4 Ergebnisse der Untersuchungen

Die ersten Untersuchungen des Forschungsvorhabens wurden zunächst zur Bewertung der im Verbundvorhaben 2 durchgeführten technischen Humifizierungsversuche durchgeführt. In einem Screening verschiedener potentieller Humifizierungssupplemente hatte sich ein Supplement hinsichtlich seiner abbaufördernden Wirkung als besonders wirksam herausgestellt. Dieses Supplement wurde dann auch im technischen Maßstab mit verschiedenen Böden eingesetzt. Im Rahmen dieses Forschungsvorhabens wurde die großtechnisch eingesetzte Technik im Labormaßstab und unter Einsatz radioaktiv- markierter PAK simuliert und anschließend die Einbindungsquote (=Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände) gemessen.

In den nachfolgenden Abbildungen 1-3 ist der Verbleib der ^{14}C -Aktivitäten in den Bodenmaterialien Muttergarten, Wülknitz und Bremen zu Versuchsbeginn (0 Tage) und nach der Inkubation der Bodenmaterialien mit den jeweiligen Supplementen in Prozent der anfänglichen Gesamtaktivität (A_0) für ^{14}C -Anthracen, ^{14}C -Pyren und ^{14}C -Benzo(a)pyren dargestellt. Gegenübergestellt sind die mineralisierten, extrahierbaren und nicht-extrahierbaren ^{14}C -Aktivitätsanteile zu Beginn der Versuche im un-supplementierten Bodenmaterial und nach der Inkubation in den drei Versuchsvarianten (un-supplementierter Boden, Boden mit Kompost bzw. mit Rindenmulch).

Aus Abbildung 1 ist ersichtlich, daß die Zugabe der Supplemente Kompost und Rindenmulch in den Versuchen mit dem Bodenmaterial Muttergarten mit ^{14}C -Anthracen und ^{14}C -Pyren die Mineralisation der Schadstoffe beschleunigt, aber dadurch einer Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände entgegenwirkt. Es zeigte sich, daß das Ausmaß der Mineralisation die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen beeinflußt und diese beiden Prozesse konkurrierend nebeneinander ablaufen. Wurden die ^{14}C -PAK sehr weitgehend zu $^{14}\text{CO}_2$ mineralisiert, war die Bildung der nicht-extrahierbaren Rückstände gering.

In den Versuchen mit dem höher kondensierten ^{14}C -Benzo(a)pyren kann durch die Zugabe von Rindenmulch eine Steigerung der Eliminierung der extrahierbaren PAK durch die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen festgestellt werden. Die gesamte Eliminierung der

extrahierbaren PAK war in den Versuchen mit ^{14}C -Anthracen und ^{14}C -Pyren durch die Mineralisation der Schadstoffe jedoch deutlich höher.

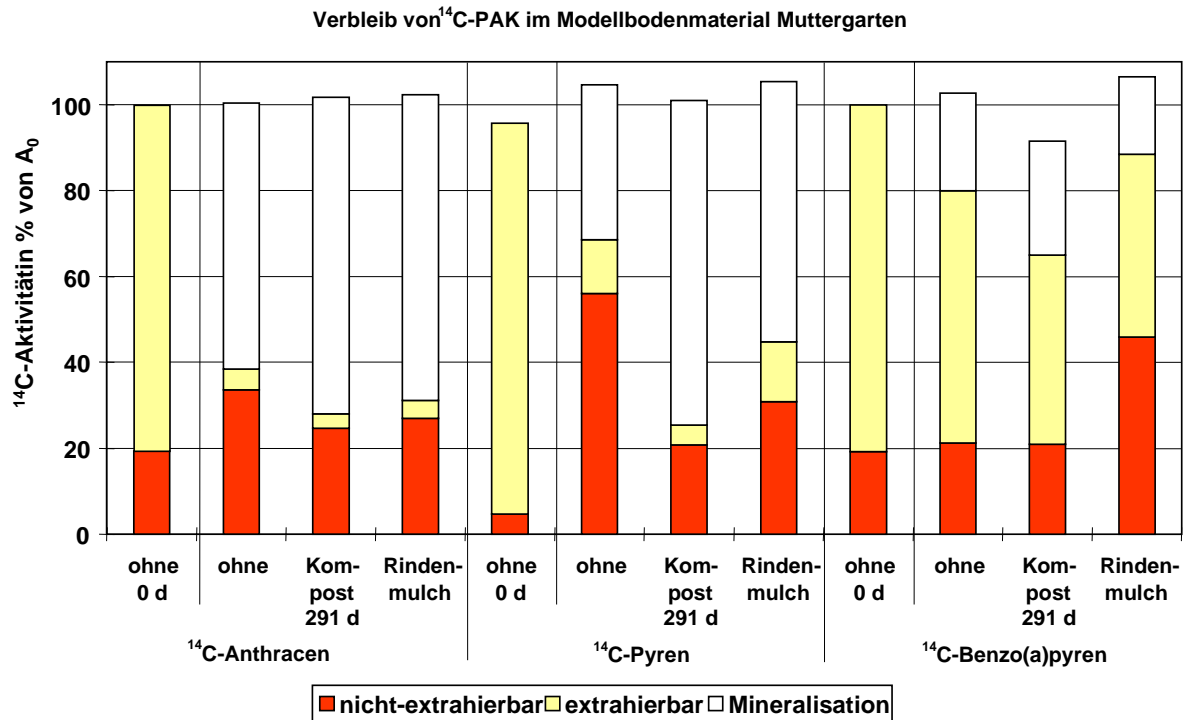


Abb. 1: Verbleib der ^{14}C -Aktivität im Modellbodenmaterial Muttergarten zu Versuchsbeginn (0 Tage) und nach 291tägiger Inkubation mit verschiedenen Supplementen

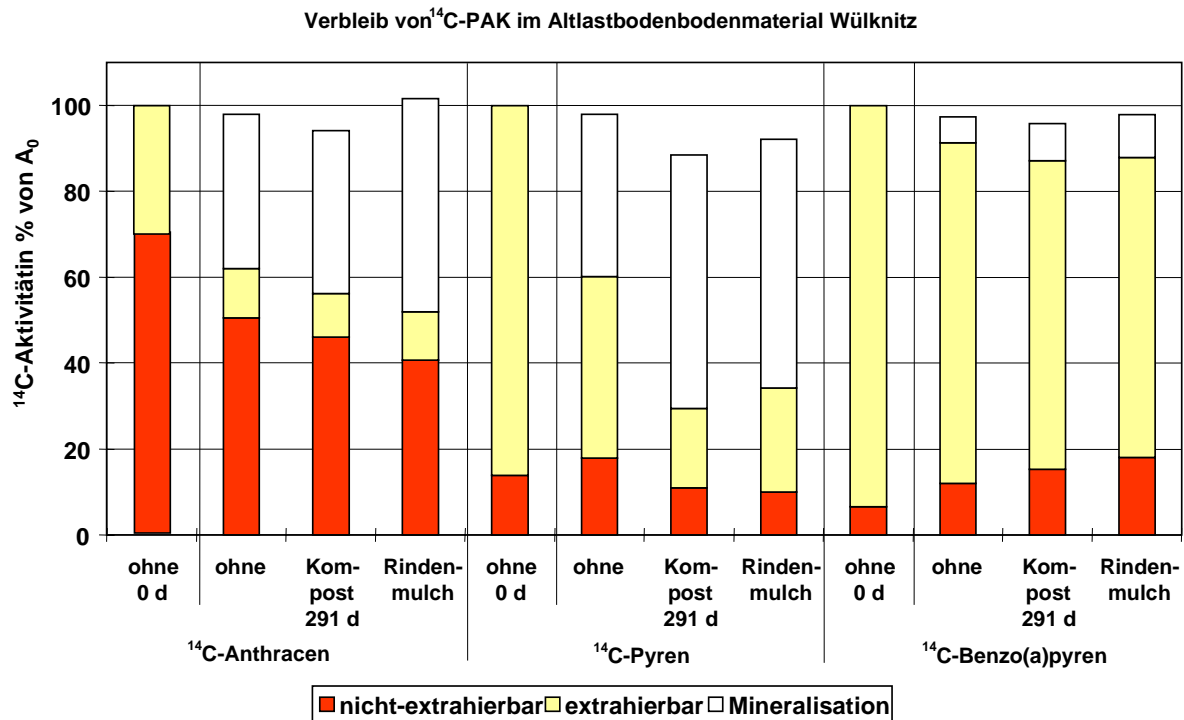


Abb. 2: Verbleib der ^{14}C -Aktivität im Altlastbodenmaterial Wülknitz zu Versuchsbeginn (0 Tage) und nach 291tägiger Inkubation mit verschiedenen Supplementen

Nur in den Versuchen mit dem Altlastbodenmaterial Wülknitz mit ^{14}C -Pyren zeigte sich, daß die Supplement-Zugabe durch die Mineralisation der Schadstoffe einen positiven Effekt auf die Abnahme der extrahierbaren ^{14}C -Aktivität hat (Abb. 2). In den anderen Versuchen mit dem Bodenmaterial Wülknitz mit ^{14}C -Anthracen und ^{14}C -Benzo(a)pyren stellt sich heraus, daß die Zugabe der Supplemente weder durch eine gesteigerte Mineralisation noch durch die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen einen Effekt auf die Eliminierung der extrahierbaren PAK hatte.

Es läßt sich festhalten, daß die Zugabe der Supplemente z.T. den Abbau der ^{14}C -PAK im Bodenmaterial erheblich steigerte, was i.d.R. zu Lasten der nicht-extrahierbaren Rückstände erfolgte. Eine humifizierende Wirkung, d.h. eine gesteigerte Bildung von nicht-extrahierbarer Rückstände im Boden durch Supplement-Zugabe wurde aber nicht festgestellt.

Durch sterilisierte Versuchsansätze wurde nachgewiesen, daß biologische Prozesse die Ursache der Humifizierung im Boden sind, da in den sterilisierten Bodenmaterialien die humifizierende Wirkung annähernd ausblieb.

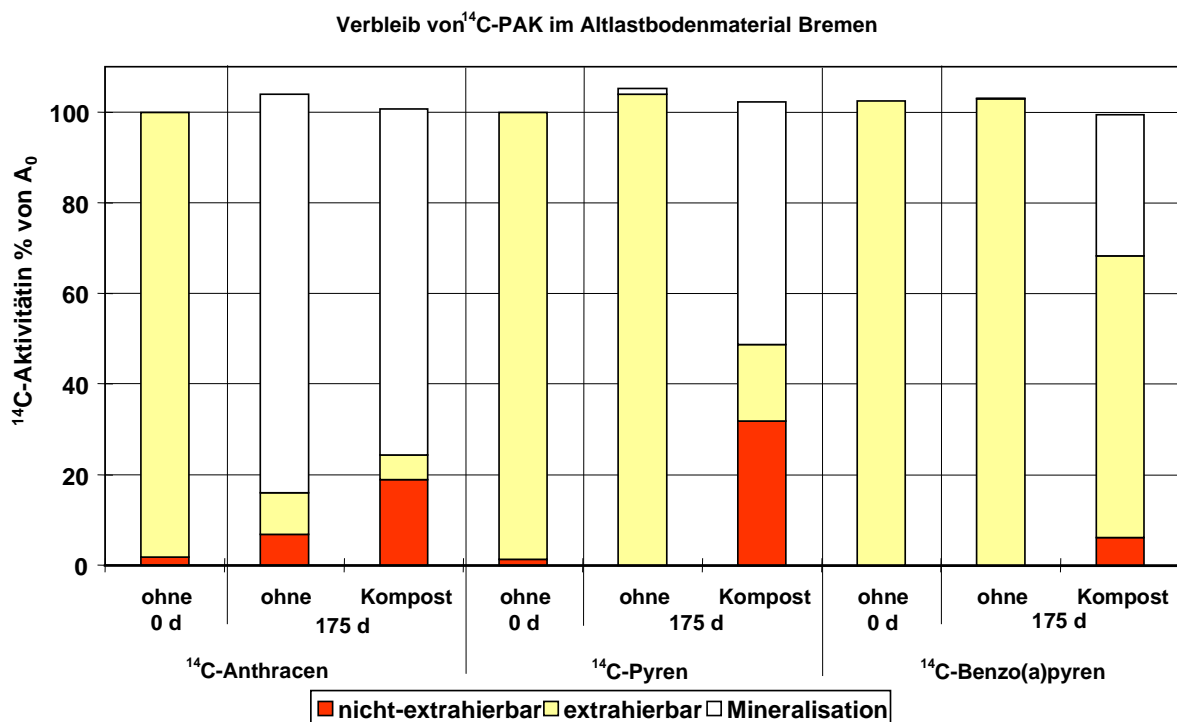


Abb. 3: Verbleib der ^{14}C -Aktivität im Altlastbodenmaterial Bremen zu Versuchsbeginn (0 Tage) und nach 175 tägiger Inkubation mit verschiedenen Supplementen

In Abbildung 3 wird deutlich, daß in den Versuchen mit dem Altlastbodenmaterial Bremen der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückständen nach der Inkubation in den Kompost-supplementierten Varianten höher war, als in den unsupplementierten Varianten. In den unsupplementierten Versuchen mit ^{14}C -Pyren und ^{14}C -Benzo(a)pyren lag die gesamte ^{14}C -Aktivität nach der Inkubation extrahierbar vor. Durch die Kompost-Zugabe konnte in den Versuchen mit ^{14}C -Pyren und ^{14}C -Benzo(a)pyren die Mineralisation sowie die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen gesteigert werden.

In einer im Verbundvorhaben 2 durchgeführten Untersuchung wurden darüberhinaus auch Versuche durchgeführt, in denen das Einbindungspotential verschiedener ^{14}C -markierter PAK-Metabolite gemessen wurde. Dabei sollte zum einen der Verbleib von partiell oxidierten PAK-Metaboliten im Bodenmaterial untersucht werden und zugleich herausgefunden werden, inwieweit sich die Einbindungsquote bei verschiedenen funktionellen Gruppen unterscheidet. Die Experimente wurden mit den radioaktiv markierten PAK-Metaboliten ^{14}C -cis-1,2-Dihydro-1,2-dihydroxyanthracen und ^{14}C -4,5-Dicarboxyphenanthren durchgeführt. Es zeigte sich, daß der PAK-Metabolit ^{14}C -cis-1,2-Dihydro-1,2-dihydroxyanthracen kaum mineralisiert wurde, in den untersuchten Bodenmaterialien aber einer starken Festlegung in Form nicht-extrahierbarer Rückstände unterlag. Dagegen wurde ^{14}C -4,5-Dicarboxyphenanthren in dem gleichen Altlastboden, der eine PAK-abbauende, autochthone Mikroflora aufwies, in erheblichem Ausmaß mineralisiert, während die Festlegungsquote in diesem Fall geringer war.

Die in diesen Versuchen erbrüteten Bodenmaterialien mit nicht-extrahierbaren Rückständen wurden in den nachfolgenden Remobilisierungsversuchen eingesetzt. Des Weiteren wurden Bodenmaterialien aus dem "Wissenschaftlichen Begleituntersuchungsprogramm Veringstraße (WUP)" in Hamburg für die Remobilisierungsversuche verwendet. Die Anteile der nicht-extrahierbaren ^{14}C -PAK-Rückstände, sowie die Mineralisation während der Inkubation ($^{14}\text{CO}_2$) einiger Bodenmaterialien sind in Tabelle 4 in Prozent der zu Beginn der Remobilisierungsversuche ermittelten Anfangsaktivität A_0 dargestellt.

Tab. 4: Anteil der nicht-extrahierbaren ^{14}C -PAK-Rückstände (neR) der Bodenmaterialien in Prozent der zu Beginn der Remobilisierungsversuche ermittelten Anfangsaktivität A_0

^{14}C -PAK	Bodenmaterial	Supplemente	Inkubationsdauer	$^{14}\text{CO}_2$	neR
Anthracen	Modellbodenmaterial Muttergarten, schluffiger Ton, anfänglich nicht kontaminiert	unsupplementiert	291 d	62%	33%
		Kompost		74%	25%
		Rindenmulch		71%	27%
Pyren		unsupplementiert		36%	56%
		Kompost		76%	21%
		Rindenmulch		61%	31%
Benzo(a)pyren		unsupplementiert		23%	21%
		Kompost		26%	21%
		Rindenmulch		18%	46%

Tab. 4: Fortsetzung

¹⁴ C-PAK	Bodenmaterial	Supplemente	Inkubationsdauer	¹⁴ CO ₂	neR
Anthracen	Altlastbodenmaterial Wülknitz, lehmiger Sand, hoch kontaminiert mit Teeröl	unsupplementiert	288 d	36%	51%
		Kompost		38%	46%
		Rindenmulch		50%	41%
Pyren		unsupplementiert		38%	18%
		Kompost		59%	11%
		Rindenmulch		58%	10%
Benzo(a)pyren		unsupplementiert		6%	12%
		Kompost		9%	15%
		Rindenmulch		10%	18%
Anthracen	Altlastboden Bremen, Sand, mäßig kontaminiert, mit hohem C _{Org} -Gehalt 13,8 %	unsupplementiert	175 d	88%	7%
		Kompost		76%	19%
Pyren		unsupplementiert		0%	1%
		Kompost		54%	32%
Benzo(a)pyren		unsupplementiert		0%	0%
		Kompost		31%	6%

Im folgenden sind die Ergebnisse sämtlicher in den obengenannten Forschungsvorhaben durchgeführten biologischen, physikalischen und chemischen Remobilisierungsversuche dargestellt.

4.1 Biologische Remobilisierungsmethoden:

4.1.1 Zusatz Huminstoff-abbauender Mikroorganismen (*Trametes versicolor*, *Rhodococcus erythropolis*)

Bei der biologischen Sanierung kontaminierter Böden werden z.T. Mikroorganismen zugegeben, um die Mineralisation der Schadstoffe gezielt zu beeinflussen. Einige Mikroorganismen sind aber auch in der Lage Huminstoffe bzw. Lignin-ähnliche Strukturen abzubauen. Es ist vorstellbar, daß dadurch ein Teil der Huminstoff-Strukturen abgebaut und in Folge Schadstoffrückstände freigesetzt werden können.

Für die worst-case-Remobilisierungsversuche mit einer solchen Zielsetzung wurden der Weißfäulepilz *Trametes versicolor* (DSM 3086) und das Bodenbakterium *Rhodococcus erythropolis* (DSM 1069) ausgewählt. Für die Auswahl war ausschlaggebend, daß die Mikroorganismen einerseits in der Lage sind, Huminstoffe bzw. Lignin abzubauen und andererseits gute Überlebenschancen im Bodenmaterial haben bzw. unter natürlichen Bedingungen im Boden vorkommen. Die Fähigkeit Lignin abzubauen ist für beide Mikroorganismen nachgewiesen [4; 7; 23].

Nach der Inokulation der Mikroorganismen wurde das Bodenmaterial 210 Tage inkubiert. Als Kontrolle wurde unsupplementiertes Bodenmaterial unter den selben Bedingungen inkubiert. Die Mineralisation wurde während der Inkubation kontinuierlich als $^{14}\text{CO}_2$ ermittelt. Eine Bodenprobeentnahme erfolgte zu Beginn der Versuche (0 Tage) und bei Abschluß der Inkubation (210 Tage). Die Mineralisation war in den Versuchsansätzen mit *Rhodococcus erythropolis* (19% von A_0) bzw. *Trametes versicolor* (16% von A_0) etwas höher als in den Kontrollansätzen (14% von A_0). Entscheidend für das Remobilisierungsverhalten der festgelegten Schadstoffe ist die Fragestellung, ob sich nach Zugabe der Mikroorganismen die Verteilung der ^{14}C -Aktivität im Boden verändert hat. In Abbildung 4.1-4.3 ist der Verbleib der ^{14}C -Aktivität im Bodenmaterial mit Zugabe von *Trametes versicolor* bzw. *Rhodococcus erythropolis*, sowie als unsupplementierte Kontrolle im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen dargestellt. Die Ergebnisse der Versuche mit *Trametes versicolor* und *Rhodococcus erythropolis* zeigen, daß durch die 210tägige Inkubation mit den Mikroorganismen keine Freisetzung der nicht-extrahierbaren Rückstände in eine (leichter-)verfügbare bzw. extrahierbare Fraktion stattfand. Die Abnahmen der nicht-extrahierbaren Rückstände sind durch die Mineralisation bewirkt worden.

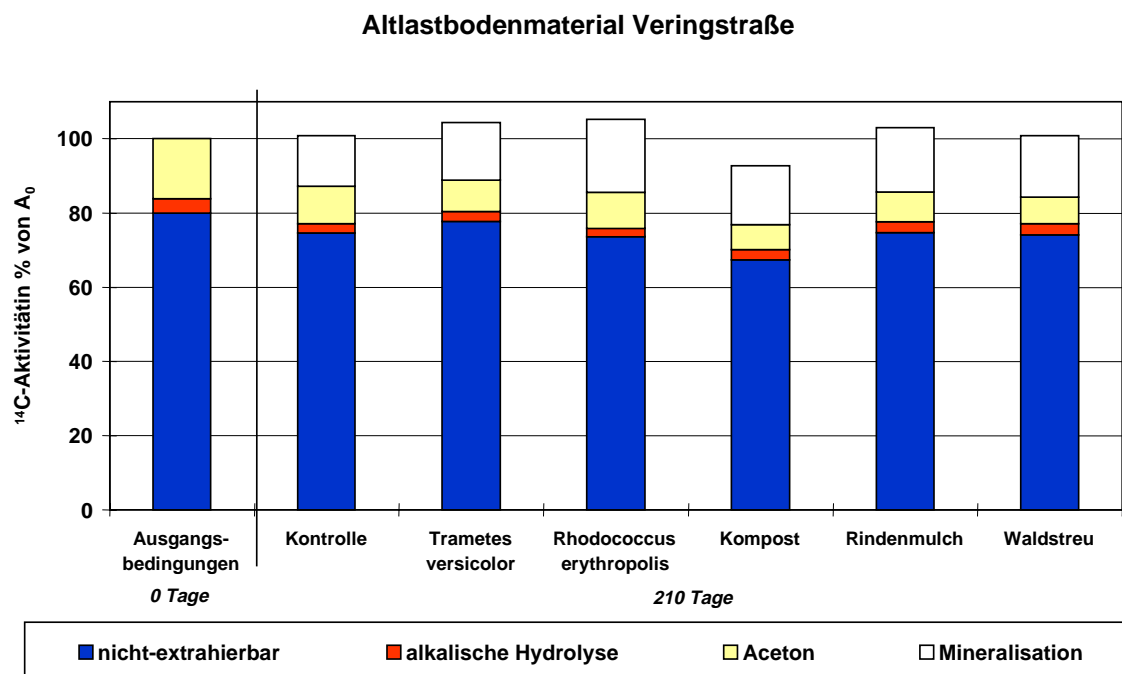


Abb. 4.1: Verbleib der ^{14}C -Aktivität im Bodenmaterial Veringstraße mit nicht-extrahierbaren ^{14}C -PAK-Rückständen mit Zugabe von organischen Supplementen oder Mikroorganismen nach der Inkubation im Vergleich zur unsupplementierten Kontrolle und zu den Ausgangsbedingungen

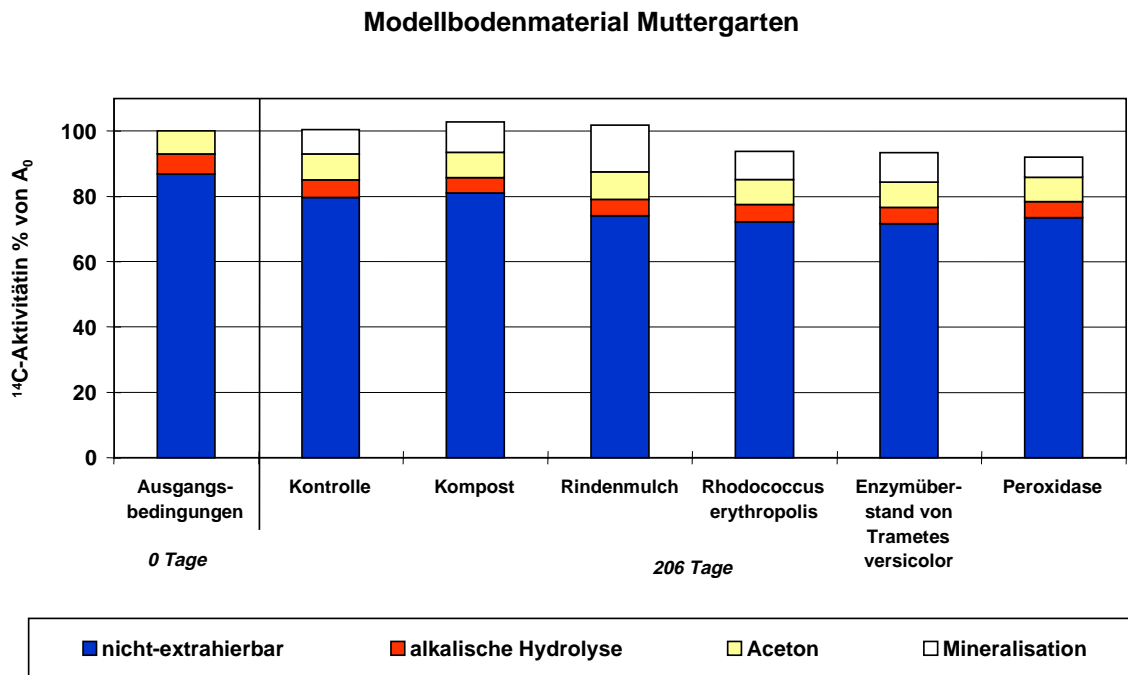


Abb. 4.2: Verbleib der ¹⁴C-Aktivität im Bodenmaterial Muttergarten mit nicht-extrahierbaren ¹⁴C-PAK-Rückständen mit Zugabe von organischen Supplementen oder Mikroorganismen oder Enzymen nach der Inkubation im Vergleich zur unsupplementierten Kontrolle und zu den Ausgangsbedingungen

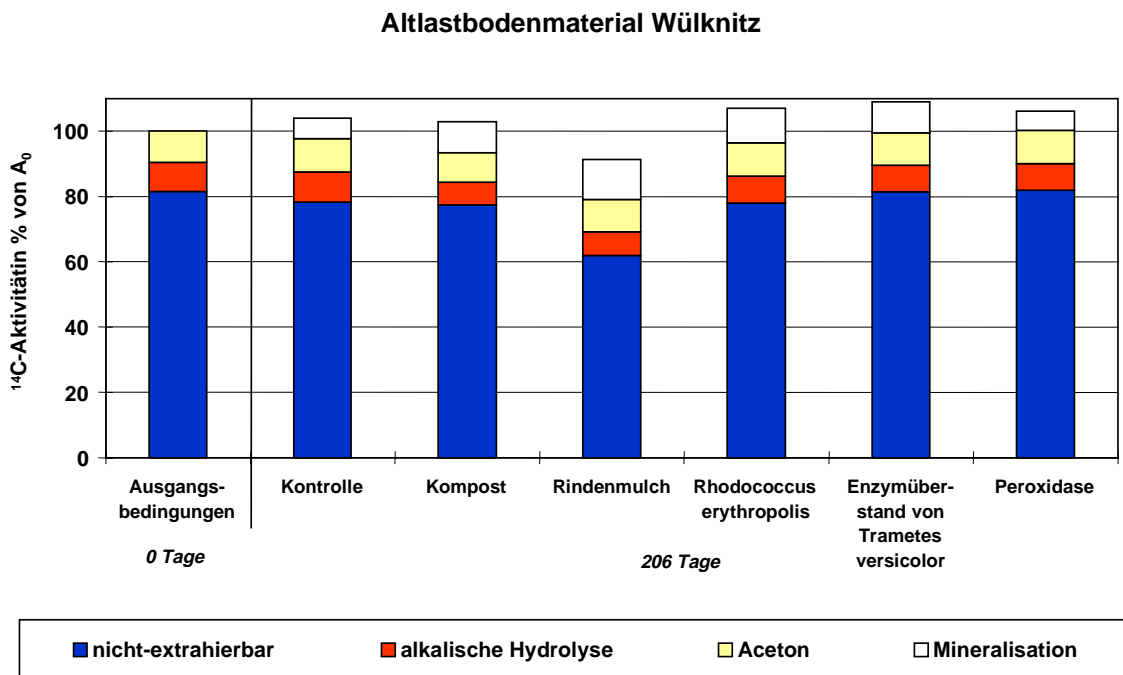


Abb. 4.3: Verbleib der ¹⁴C-Aktivität im Bodenmaterial Wülknitz mit nicht-extrahierbaren ¹⁴C-PAK-Rückständen mit Zugabe von organischen Supplementen oder Mikroorganismen oder Enzymen nach der Inkubation im Vergleich zur unsupplementierten Kontrolle und zu den Ausgangsbedingungen

4.1.2 Zugabe unspezifisch wirksamer Supplemente (Kompost, Rindenmulch, Waldbodenstreu)

Neben der gezielten Zugabe von Mikroorganismen wurde die Zugabe verschiedener unspezifisch wirksamer organischer Supplemente (Kompost, Rindenmulch, Waldbodenstreu) als weitere biologische Remobilisierungsmaßnahmen untersucht. Diese Supplemente wurden ausgewählt, weil sie i.d.R. Mikroorganismen-Populationen enthalten, die effektiv am Abbau von organischen Substanzen beteiligt sind. Durch die Zugabe von organischen Supplemente (Kompost, Rindenmulch, etc.) zu kontaminiertem Bodenmaterial, ist nicht nur eine Mineralisation der betreffenden Schadstoffverbindung möglich, sondern durch den Abbau des Huminstoffgerüsts durch die Mikroorganismen auch eine Freisetzung zuvor gebundener Schadstoffrückstände denkbar. Der Verbleib der ^{14}C -Aktivität im Bodenmaterial mit der Zugabe von Kompost, Rindenmulch und Waldbodenstreu im Vergleich zur un-supplementierten Kontrolle nach 210 tägiger Inkubation und zu den Ausgangsbedingungen ist in Abbildung 4.1-4.3 dargestellt. Auch in diesen biologischen Remobilisierungsversuchen kam es nach der Zugabe von Kompost, Rindenmulch oder Waldbodenstreu zum Bodenmaterial zu keiner Freisetzung von nicht-extrahierbaren Rückständen in eine (leichter) verfügbare bzw. extrahierbare Fraktion. Geringe Anteile der nicht-extrahierbaren Rückstände unterlagen einer Mineralisation.

4.1.3 Zugabe von radikalbildenden Enzyme (Meerrettichperoxidase [HRP], Enzymüberstand von *Trametes versicolor*)

Bei biologischen Sanierungsverfahren werden z.T. Weißfäulepilze als Supplement dem zu sanierenden Bodenmaterial zugegeben, um die Mineralisation der Schadstoffe zu beschleunigen. Durch die Pilze können radikalbildenden Enzyme freigesetzt werden, die einerseits durch Initialoxidation einen Abbau der Xenobiotika induzieren, andererseits aber auch eine remobilisierende Wirkung auf nicht-extrahierbare Rückstände im Boden ausüben können.

Um den Einfluß von radikalbildenden Enzymen auf den Verbleib von nicht-extrahierbaren ^{14}C -PAK-Rückständen im Boden zu untersuchen, wurde das Modellbodenmaterial Muttergarten und das Altlastbodenmaterial Wülknitz mit Meerrettichperoxidase oder dem Enzymüberstand von *Trametes versicolor* 206 Tage inkubiert. In Abbildung 4.2 und 4.3 ist der Verbleib der ^{14}C -Aktivität in den Bodenmaterialien Muttergarten und Wülknitz mit Zugabe von Peroxidase sowie dem Enzymüberstand von *Trametes versicolor* im Vergleich zur un-supplementierten Kontrolle nach 206tägiger Inkubationszeit und zu den Ausgangsbedingungen dargestellt. In den Versuchen mit dem Modellbodenmaterial Muttergarten wurde nach der Behandlung mit Meerrettichperoxidase oder mit dem Enzymüberstand von *Trametes versicolor* ein leichter Rückgang der nicht-extrahierbaren Rückstände festgestellt, der auf die Mineralisation zurückgeführt wurde. In den Versuchen mit dem Altlastbodenmaterial Wülknitz war der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände durch die 206tägige Inkubation mit Meerrettichperoxidase bzw. mit dem Enzymüberstand von *Trametes versicolor* im Vergleich zur Ausgangsprobe nahezu konstant. Ein Anstieg der ^{14}C -Aktivität in einer extrahierbaren Fraktion wurde in keiner der Varianten nachgewiesen.

4.1.4 Einsatz von Organismen der Bodenfauna (Regenwürmer)

Regenwürmer haben bei der Umsetzung organischer Substanz im Boden eine wichtige Aufgabe als streuzersetzende Organismen. Aufgrund der Tatsache, daß *Eisenia fetida* als Vertreter der epigäischen Arten in der Lage ist große Mengen organischer Substanz umzusetzen und *Aporrectodea caliginosa* als endogäischer Vertreter im Gegensatz dazu größere Mengen mineralischer Substanz ingestiert [6], wurden diese beide Arten in den Remobilisierungsversuchen miteinander verglichen und deren Einfluß auf nicht-extrahierbare Rückstände aus ^{14}C -markierten PAK in Altlastböden untersucht. Dabei wurde der Fragestellung nachgegangen, ob Regenwürmer durch das Ingestieren des Bodenmaterials mit den PAK-Rückständen oder durch das Ausscheiden von abbaufördernden Substanzen die nicht-extrahierbaren humifizierten PAK-Rückstände remobilisieren. Es wurde weiterhin untersucht, ob die Anwesenheit der Regenwürmer die Mineralisation der PAK-Rückstände beschleunigt oder den Verbleib der nicht-extrahierbaren Rückständen beeinflusst.

Die Versuche wurden mit dem Modellbodenmaterial Muttergarten und dem Altlastbodenmaterial Wülknitz durchgeführt, die z.T. erhebliche Anteile an nicht-extrahierbaren Rückständen aus ^{14}C -Anthracen, ^{14}C -Pyren oder ^{14}C -Benzo(a)pyren enthielten. Diese Bodenmaterialien wurden 42 Tage mit *A. caliginosa* oder *E. fetida* inkubiert. Als Kontrolle diente eine unsupplementierte Varianten ohne Lumbriciden, die aber ebenfalls inkubiert wurde. Es wurden jeweils die Anfangsproben (0 Tage) und die Endprobe (42 Tage) untersucht und die ^{14}C -Aktivität im Boden bilanziert. Die Mineralisation ($^{14}\text{CO}_2$) wurde kontinuierlich über den gesamten Inkubationszeitraum gemessen. Die Anwesenheit der Regenwurmarten *A. caliginosa* und *E. fetida* führte im Vergleich zu den unsupplementierten Kontrollversuchen nicht zu einer wesentlichen Steigerung der Mineralisation. Entsprechend der Wasserlöslichkeit der originären PAK-Verbindungen, wurde eine abgestufte Mineralisation beobachtet (^{14}C -Pyren > ^{14}C -Anthracen > ^{14}C -Benzo(a)pyren). Eine Remobilisierung der nicht-extrahierbaren humifizierten PAK-Rückstände durch den Einfluß von Regenwürmern konnte mit Hilfe des dreistufigen Extraktionsverfahren ausgeschlossen werden. Ein wesentlicher Unterschied der ^{14}C -Aktivität wurde in den verschiedenen extrahierbaren Fraktionen (Methanol/Wasser, Aceton, alkalische Hydrolyse) im Vergleich zur Eingangsprobe und zur unsupplementierten Kontrolle nicht festgestellt. Auch konnte in den Regenwurm-supplementierten Versuchsansätzen keine neue humifizierende Wirkung auf extrahierbare PAK beobachtet werden. In Abbildung 5 ist exemplarisch die ^{14}C -Aktivitätsverteilung für die unterschiedlichen extrahierbaren Fraktionen und die nicht-extrahierbaren Rückstände für ein Bodenmaterial mit nicht-extrahierbaren Rückständen aus ^{14}C -Pyren dargestellt. Es wurden die Werte vor der Inkubation und nach der Inkubation mit *A. caliginosa* bzw. *E. fetida*, sowie ohne Zugabe von Lumbriciden (Kontrolle), dargestellt.

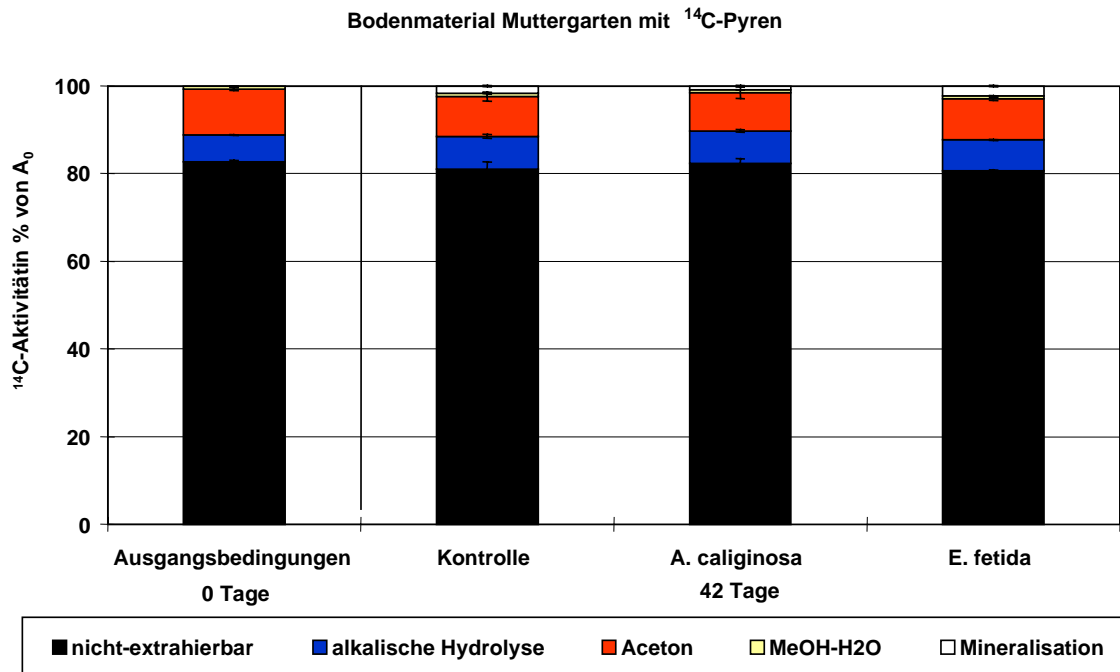


Abb. 5: ^{14}C -Aktivitätsverteilung in der extrahierbaren und nicht-extrahierbaren Fraktion der Versuchsansätze mit dem Bodenmaterial Muttergarten mit ^{14}C -Pyren, vor und nach 42tägiger Inkubation mit *A. caliginosa* bzw. mit *E. fetida* im Vergleich zur unsupplementierten Kontrolle und den Ausgangsbedingungen

Mit ausgewählten Bodenproben wurde eine Huminstoffextraktion durchgeführt. Auch in den unterschiedlichen Fraktionen der Huminstoffextraktion (Fulvosäuren, Huminsäuren, Humine) konnten keine wesentlichen Verschiebungen der ^{14}C -Aktivität durch die Inkubation mit den Lumbriciden festgestellt werden. Es kann somit davon ausgegangen werden, daß Regenwürmer durch die Ingestion von Bodenmaterial mit nicht-extrahierbaren PAK-Rückständen oder durch das Ausscheiden von abbaufördernden Substanzen nicht in der Lage sind, humifizierte nicht-extrahierbare PAK-Rückstände in biologisch sanierten Altlastböden zu remobilisieren. Durch die Bestimmung der Bioakkumulationsfaktoren ließ sich nach 42tägiger Exposition keine gesteigerte Akkumulation von ^{14}C -PAK-Rückständen im Gewebe der Regenwürmer erkennen.

4.1.5 Fazit:

Die ausgewählten biologischen Behandlungen bewirkten keine Remobilisierung von nicht-extrahierbaren Rückständen, die unter der Zugabe von Kompost erbrütet worden waren. In keinem der untersuchten Fälle kam es zu einer Freisetzung von zuvor nicht-extrahierbaren Rückständen in eine besser verfügbare bzw. extrahierbare Fraktion. In keiner Versuchsvariante wurde eine Zunahme der extrahierbaren ^{14}C -Aktivität festgestellt.

4.2 Physikalische Remobilisierungsmethoden

Die Aggregatstruktur des Bodens kann durch unterschiedliche natürliche physikalische Einflüsse beeinträchtigt werden. Schnelle Temperaturwechsel (Frost/Tau-Zyklen) bewirken durch Frostsprengung ein Aufbrechen der Aggregate und eine Vergrößerung der inneren Oberflächen, wodurch z.B. sequestrierte Schadstoffverbindungen freigesetzt werden können. Ebenso ist eine Freisetzung infolge schneller Feucht/Trocken-Wechsel durch Quell-/Trocknungsprozesse denkbar. Durch Ultraschallbehandlung und Mörsern wird die Aggregatstruktur eines Bodenmaterials künstlich sehr effektiv zerstört. Dementsprechend wurden als physikalische Remobilisierungsmaßnahmen schnelle Temperaturwechsel (Frost/Tau-Zyklen), Änderung des Bodenwassergehaltes und die mechanische Zerstörung der Bodenaggregate durch Mörsern und Ultraschall-Behandlung durchgeführt. Als Kontrolle diente jeweils unbehandeltes Bodenmaterial.

4.2.1 Klimasimulation durch Frost/Tau-Zyklen

Die Remobilisierungsversuche zum Einfluß von schnellen Temperaturwechseln (Frost/Tau-Zyklen) auf den Verbleib von nicht-extrahierbaren Rückständen wurden mit dem Altlastbodenmaterial Veringstraße mit 66% nicht-extrahierbaren Rückständen aus ^{14}C -Pyren durchgeführt. In der ersten Phase (1. Monat) wurde das Bodenmaterial im 24h-Zyklus schnellen Temperaturwechseln ausgesetzt (-20°C - $+40^{\circ}\text{C}$). Im Anschluß erfolgte eine 1-monatige Inkubationsphase mit für Mikroorganismen günstigen Temperaturbedingungen (konstante Temperatur von $+20^{\circ}\text{C}$). Danach erfolgte erneut eine Phase mit Frost/Tau-Zyklen im 24h-Zyklus und anschließend wieder eine Inkubationsphase bei $+20^{\circ}\text{C}$ (jeweils 1 Monat). Die Versuchsphasen mit konstanten Temperaturen wurden eingefügt, um den Mikroorganismen unter diesen günstigen Milieubedingungen eine Mineralisation eventuell remobilisierter Rückstände zu ermöglichen. Trotz der extremen Temperaturwechsel wurde die Mineralisation im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollansätzen nicht beeinflusst. Der Verbleib der ^{14}C -Aktivität im Boden ist in Abbildung 6 nach Beendigung der Inkubation in den verschiedenen Versuchsansätzen im Vergleich zum Ausgangsbodenmaterial dargestellt. Es wird deutlich, daß der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände durch diese Behandlungsmaßnahme nicht beeinflusst wurde. Die nicht-extrahierbaren Rückstände blieben sowohl in der unbehandelten Kontrolle als auch in den Ansätzen, die den Temperaturwechsel unterlagen, gegenüber dem Ausgangsbodenmaterial nahezu unverändert. Der Anteil der Lösemittel-extrahierbaren ^{14}C -Aktivität (2-fache Methanol-Wasser-Extraktion und Aceton-Extraktion) nahm in allen Versuchsansätzen aufgrund der Mineralisation um ca. 5%-Punkte ab.

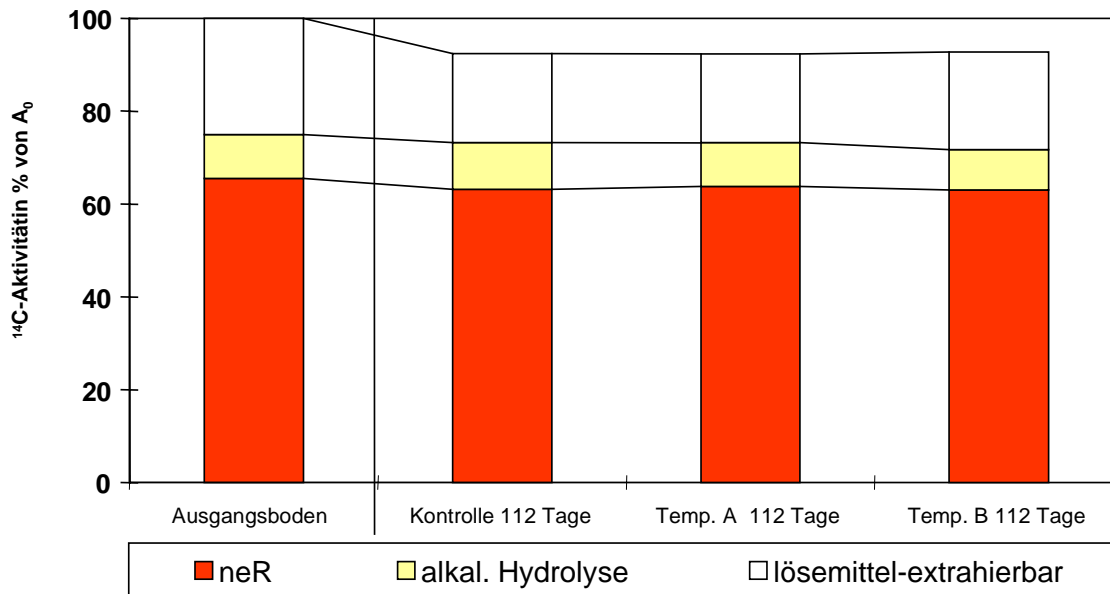


Abb. 6: Verbleib der ^{14}C -Aktivität im Altlastbodenmaterial Veringstraße mit nicht-extrahierbaren Rückständen aus ^{14}C -Pyren nach 112tägiger Inkubation (Frost/Tau-Zyklen) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und zum Ausgangsboden

4.2.2 Änderung des Wassergehaltes durch Feucht/Trocken-Zyklen

Die Versuche zum Einfluß von Feucht/Trocken-Zyklen auf den Verbleib von nicht-extrahierbaren Rückständen wurden analog zu den Versuchen mit den Temperaturwechseln durchgeführt. Eingesetzt wurde für diese Versuche das Altlastbodenmaterial Veringstraße mit 60% nicht-extrahierbaren Rückständen aus ^{14}C -Pyren. In der ersten Phase (1. Monat) wurde das Bodenmaterial in einem 24stündigen Wechsel von Feucht/Trocken-Zyklen ($< 10\%$ und $> 120\%$ WK_{max}) inkubiert. Die Wassergehalte wurden durch Trocknung bei 55°C und anschließender Wiederbefeuchtung durch Wasser-Nachdosierung eingestellt. Anschließend wurde eine 1-monatige Inkubationsphase mit für Mikroorganismen günstigen Feuchtebedingungen (konstanter Wassergehalt von ca. 50% WK_{max}) eingefügt. Danach folgte erneut eine Phase mit schnellem Wechsel der Wassergehalte sowie im Anschluß eine Phase mit konstantem Wassergehalt (jeweils 1 Monat). Die Kontrolle wurde während der gesamten Versuchsdauer mit einem Wassergehalt von 50% WK_{max} inkubiert. Während der 4-monatigen Inkubation war die Mineralisation zu $^{14}\text{CO}_2$ in beiden Versuchsansätzen gering. In der Kontrolle verblieb die ^{14}C -Aktivität in den verschiedenen Fraktionen während der 4-monatigen Inkubation fast unverändert. In dem Bodenmaterial, das den Feucht/Trocken-Zyklen ausgesetzt war, nahm der lösemittel-extrahierbare Anteil um 10%-Punkte der anfänglichen Gesamtaktivität ab. Gleichzeitig nahmen die nicht-extrahierbaren Rückstände während der Inkubation zu. Die Anwendung von extremen Wassergehalt-Wechseln führte offensichtlich zu einer leicht erhöhten Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen im Bodenmaterial. Um diese Hinweise abzusichern, wurde der Versuch mit dem Altlastbodenmaterial Veringstraße, das 54% nicht-extrahierbare Rückstände enthielt, wiederholt (s. Abb. 7). Das Ergebnis des zweiten Versuches bestätigte, den oben beschriebenen Sachverhalt.

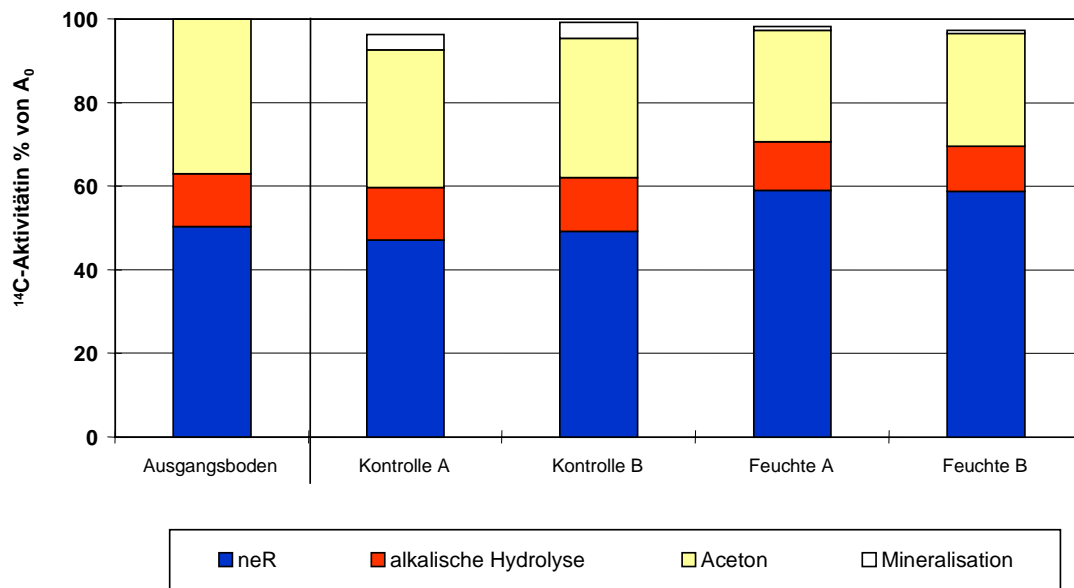


Abb. 7: Verbleib der ¹⁴C-Aktivität im Altlastbodenmaterial Veringstraße nach der Inkubation in den Versuchen zum Einfluß von Feucht/Trocken-Zyklen auf die Remobilisierung nicht-extrahierbarer Rückstände mit den Parallelen A und B

4.2.3 Mechanische Zerstörung der Aggregatstruktur durch Ultraschall-Behandlung oder intensives Mörsern

Um zu untersuchen, ob die direkte mechanische Zerstörung der Aggregatstruktur einen Einfluß auf die Remobilisierung von nicht-extrahierbaren Rückständen im Boden hat, wurde das Altlastbodenmaterial Veringstraße mit 70% nicht-extrahierbaren Rückständen aus ¹⁴C-Anthracen intensiv gemörsert bzw. mit einem Ultraschall-Desintegrator behandelt. Anschließend wurden die Bodenproben, ebenso wie eine unbehandelte Kontrolle verschiedenen Extraktionsverfahren ausgesetzt (wässrige Extraktion, Aceton-Extraktion, 6-fach-Elution mit Wasser, 6-fach-Elution mit Pflanzenöl). Der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände wurde weder durch das Mörsern noch durch die Ultraschall-Behandlung beeinflusst. Bei den Mehrfach-Elutionen mit Wasser konnte zwar mit steigendem Energieeintrag der Probenbehandlung ein Anstieg der wässrig-eluierbaren Radioaktivität aufgezeigt werden (unbehandelte Kontrolle < gemörserte Bodenprobe < ultraschall-behandelte Bodenprobe), doch blieb die so eluierte Aktivität weit hinter der Lösemittel-extrahierbaren ¹⁴C-Aktivität zurück und hatte somit keine Auswirkungen auf den nicht-extrahierbaren ¹⁴C-Aktivitätsanteil (s. Abb. 8).

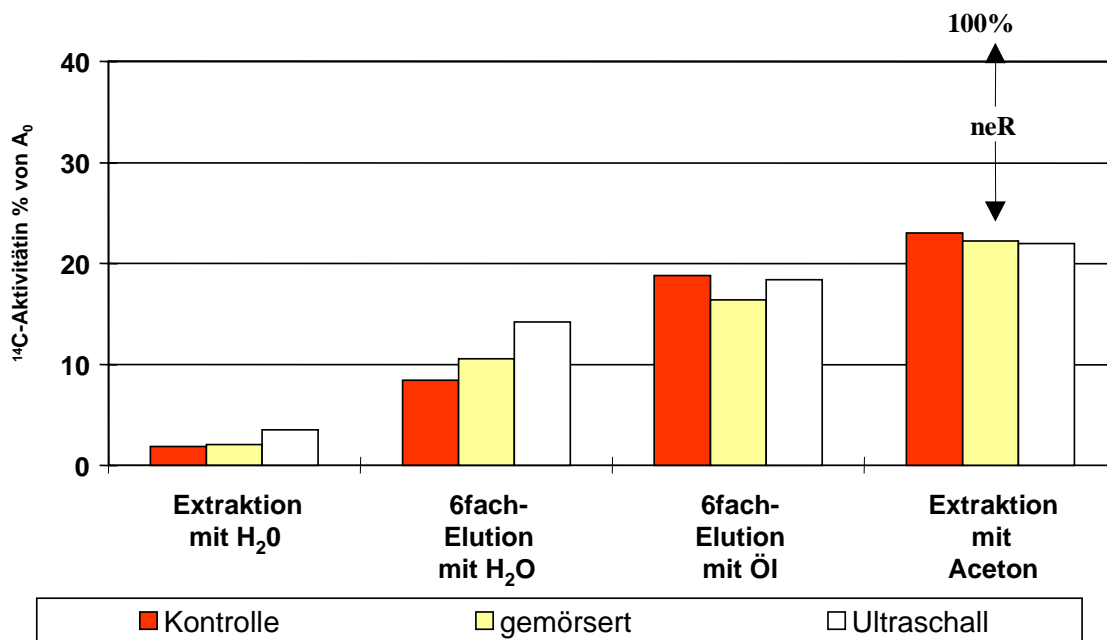


Abb. 8: Verbleib der ¹⁴C-Aktivität im Boden nach mechanischer Zerstörung der Aggregatstruktur des Bodens und Anwendung verschiedener Extraktionsverfahren

4.3 Chemische Remobilisierungsmethoden

4.3.1 Zusatz von Komplexbildnern (EDTA)

Bei dieser Remobilisierungsmaßnahme wurde das Altlastbodenmaterial Veringstraße mit 65% nicht-extrahierbaren Rückstände aus ¹⁴C-Pyren mit einer EDTA-Lösung behandelt (EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure). Die Extraktion mit komplexierenden Agentien sollte metall-organische Komplexe auflösen. Es wurde untersucht, ob durch die Auflösung der (räumlichen) Struktur der organischen Substanz nicht-extrahierbare Rückstände freigesetzt werden können, wie z.B. in die Humusmatrix sequestrierte PAK. Die Untersuchungen wurden mit einer Na₂-EDTA-Lösung in den Konzentrationen 0,01 M, 0,025 M und 0,05 M durchgeführt. Im Anschluß an diese wässrigen Elutionen wurde das Bodenmaterial mit Lösemittel extrahiert.

Steigende EDTA-Konzentrationen führten zu einem steigenden Anteil eluierbarer Radioaktivität (s. Abb. 9). Der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände nahm gleichzeitig mit steigenden EDTA-Konzentrationen ab. In der Variante mit 0,05 M EDTA-Lösung nahmen die nicht-extrahierbaren Rückstände um 15%-Punkte ab. Die Auflösung der metall-organischen Komplexe durch den Einsatz von EDTA bewirkte eine Verminderung der nicht-extrahierbaren Rückstände im Boden. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurden Versuche mit zwei weiteren Bodenmaterialien durchgeführt (Altlastbodenmaterialien Veringstraße und Altlastbodenmaterial Bremen). In diesen Versuchen kam es ebenfalls – in der gleichen Größenordnung – zu einer deutlichen Freisetzung von nicht-extrahierbaren Rückständen.

Von besonderem Interesse für eine Gefahrenbewertung ist die Frage, in welcher Form die nicht-extrahierbaren Rückstände durch die EDTA-Behandlung freigesetzt wurden. Theoretisch

möglich ist einerseits, daß durch die Auflösung metall-organischer Komplexe sequestrierte PAK (originäre physikalisch eingeschlossene PAK) oder deren Metaboliten freigesetzt werden. Andererseits kann durch die EDTA-Behandlung auch lösliche organische Substanz (DOM) entstanden sein, an dessen Moleküle die ^{14}C -Aktivität gebunden vorliegt.

Um die ^{14}C -Aktivität in den EDTA-Lösungen zu charakterisieren wurden diese mit konzentrierter HCl angesäuert ($\text{pH} < 1$), oder mit gesättigter Aluminiumsulfat-Lösung versetzt, wodurch die lösliche organische Substanz ausgefällt wird. Mit beiden Methoden wurden ca. 50% der ^{14}C -Aktivität des EDTA-Extraktes gefällt. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß die ^{14}C -Aktivität z.T. an Molekül-Bruchstücken der löslichen organischen Bodensubstanz vorliegt.

Als weitere Methode zur Charakterisierung der ^{14}C -Aktivität in den EDTA-Extrakten wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Hexan durchgeführt. Diese Untersuchung bestätigt den Hinweis, daß es sich bei der durch die EDTA-Behandlung freigesetzten ^{14}C -Aktivität nicht um hydrophobe originäre PAK handelt, da in der Hexan-Phase keine ^{14}C -Aktivität ermittelt wurde ($< 0,5\%$ der ^{14}C -Aktivität im EDTA-Extrakt). Die ^{14}C -Aktivität verblieb vollständig in der EDTA-Phase. Durch zusätzliche Untersuchungen mit in EDTA gelöstem ^{14}C -Pyren wurde nachgewiesen, daß durch die Flüssig-Flüssig-Extraktion originäre PAK vollständig in die Hexan-Phase überführt werden. Dieser Befund zeigt eindeutig, daß es sich bei der freigesetzten ^{14}C -Aktivität nicht um originäre PAK oder hydrophobe Derivate handelt.

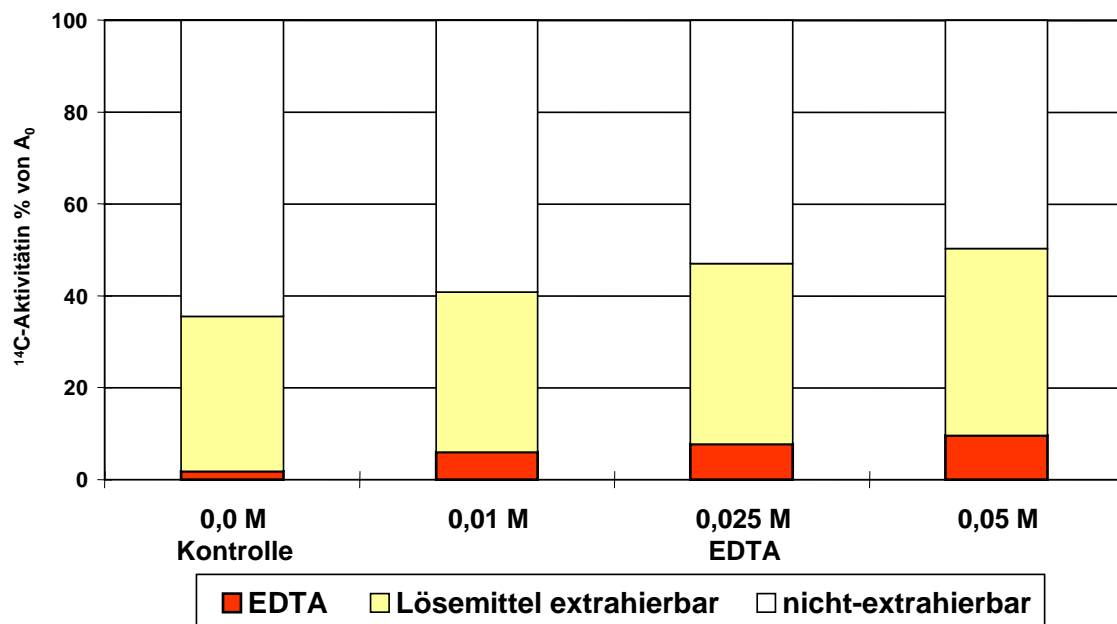


Abb. 9: Verbleib der ^{14}C -Aktivität im Bodenmaterial nach Behandlung mit EDTA-Lösung in unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle

4.3.2 Behandlung mit radikal-erzeugenden Agenzien (Fenton Reagenz)

Um den möglichen Einfluß freier Radikale auf die Freisetzung von nicht-extrahierbaren Rückständen zu ermitteln, wurde das Altlastbodenmaterial Veringstraße, das nicht-extrahierbare Rückstände aus ^{14}C -Benzo(a)pyren enthielt, mit Fentons Reagenz behandelt.

Die Fenton Reagenz wurde aus einem Komplex aus Eisen-Gallussäure und Wasserstoffperoxid (60%ig) hergestellt. Durch die von der Fenton Reagenz ausgelöste Radikalreaktion kann es einerseits zum Abbau der organischen Substanz und damit theoretisch zur Freisetzung von nicht-extrahierbaren Rückständen im Boden kommen, andererseits können Radikalreaktionen aber auch zu einer Polymerisierung von Substanzen führen, wie dies bei der Huminstoffgenese diskutiert wird. Das Bodenmaterial wurde vor der Behandlung einer 2-fachen Aceton-Extraktion unterzogen, um die extrahierbare ^{14}C -Aktivität zu entfernen. Die Fenton-Behandlung wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt (1 mM Eisen-Gallussäure und 1 M H_2O_2 ; 10 mM Eisen-Gallussäure und 10 M H_2O_2). Als Kontrolle diente einerseits Bodenmaterial, das nur mit Wasser und andererseits Bodenmaterial, das nur mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) behandelt wurde. Nach der Fenton-Behandlung wurde das Bodenmaterial einer Methanol-Wasser-Extraktion und einer 2-fachen Aceton-Extraktion unterzogen.

In den Versuchen zeigte sich, daß die Behandlung mit Fentons Reagenz in der niedrigen Konzentration nahezu keinen Einfluß auf den Verbleib der ^{14}C -Aktivität im Boden im Vergleich zur wässrigen Behandlung hatte (s. Abb. 10). In der Versuchsvariante mit höher konzentrierter Fenton Reagenz wurde $^{14}\text{CO}_2$ in einer Größenordnung von über 50% der anfänglichen Gesamtaktivität gebildet. Gegenüber der alleinigen H_2O_2 -Behandlung war die Oxidation mit der höher konzentrierten Fenton Reagenz um bis zu 15%-Punkte höher.

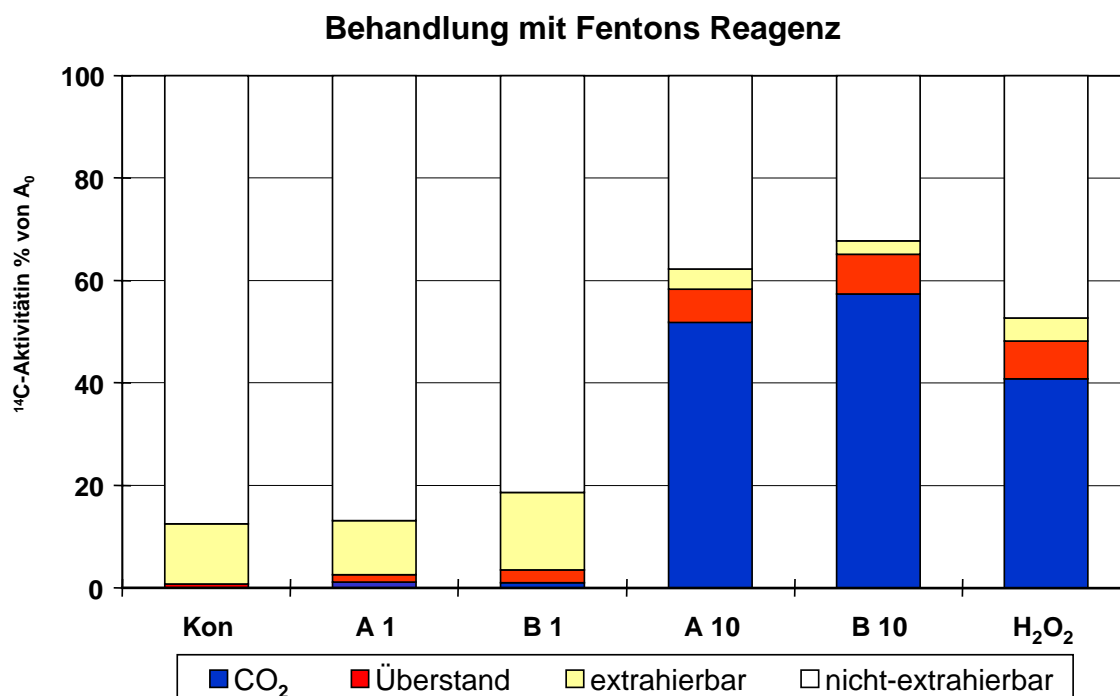


Abb. 10: Verbleib der ^{14}C -Aktivität in den verschiedenen Versuchsvarianten nach 5-stündiger Behandlung des Bodenmaterials mit Fentons Reagenz. (Kon: Kontrolle nur mit Wasser; A und B: parallele Versuchsdurchführung; 1: Behandlung mit 1 mM Eisen-Gallussäure und 1 M H_2O_2 ; 10: Behandlung mit 10 mM Eisen-Gallussäure und 10 M H_2O_2)

Als Fazit dieser Untersuchung läßt sich feststellen, daß bei Einsatz höher konzentrierter Fenton Reagenz ein erheblicher Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände chemisch zu $^{14}\text{CO}_2$

oxidiert wird, wobei die Oxidation wie die Mineralisation als vollständige Detoxifizierung zu bewerten ist. Einen Anstieg der ^{14}C -Aktivität in eine (leichter) verfügbare bzw. extrahierbare Fraktion konnte nicht festgestellt werden. Eine Remobilisierung der nicht-extrahierbaren Rückstände im eigentlichen Sinne konnte nicht nachgewiesen werden.

4.3.3 Zusatz von Tensiden

Um den Einfluß eines ausgewählten nicht-ionischen Tensides (Sapogenat: Alkylphenolpolyethylenglycolether) auf den Verbleib nicht-extrahierbarer Rückstände zu untersuchen, wurde das Altlastbodenmaterial Veringstraße mit 44% nicht-extrahierbaren Rückständen aus einer ^{14}C -PAK-Mischkontamination mit verschiedenen Tensid-Konzentrationen ausgeschüttelt. Um den extrahierbaren Anteil der ^{14}C -Bodengesamtaktivität zu entfernen, wurde das Bodenmaterial vorher 2-fach mit Aceton extrahiert. Danach wurde das extrahierte Bodenmaterial mit einer 0 mM (Kontrolle), 2,5 mM, 5 mM und einer 10 mM Tensid-Lösung ausgeschüttelt, wobei die Extraktionsdauer 4, 6 sowie 12 Stunden betrug.

Durch die Tensid-Lösungen wurden in allen Konzentrationsbereichen nur maximal weitere 3% der anfänglichen Gesamtaktivität (A_0) extrahiert. Steigende Sapogenat-Konzentrationen führten gegenüber der Kontrolle lediglich zu einer um 2%-Punkte erhöhten Freisetzung. Längere Einwirkzeiten der Tensid-Lösung führten zu keiner weiteren Freisetzung von ^{14}C -Aktivität.

4.3.4 Mehrfach-Extraktionen mit einem Lösungsmittel

Um zu untersuchen, ob nicht-extrahierbare Rückstände durch mehrfach Extraktionen mit einem Lösungsmittel – zumindest teilweise – remobilisiert werden können, wurden zwei Bodenmaterialien mit nicht-extrahierbaren Rückständen aus einer ^{14}C -PAK-Mischkontamination insgesamt fünfmal mit Aceton extrahiert. Die ersten drei Extraktionen erfolgen unmittelbar nacheinander, die vierte Extraktion erfolgte nachdem die Proben 15 Tage auf dem Schüttler extrahiert wurden, und die fünfte Extraktion nach einer Extraktionsdauer von drei Monaten.

In den ersten beiden Extraktionsschritten erfolgte schon eine Erfassung von 90% des insgesamt extrahierbaren Anteils. Bei den späteren Extraktionsschritten wurde nur noch eine minimale weitere Freisetzung der ^{14}C -Aktivität ermittelt, die sich asymptotisch einem Endwert annäherte. Eine erhöhte Nachlösung oder Desorption bei längeren Einwirkzeiten des Extraktionsmittels wurde nicht festgestellt.

4.3.5 Kombinationen von mechanischen und biologischen Behandlungsmaßnahmen

In den vorherigen Untersuchungen wurden die Remobilisierungsmaßnahmen jeweils als Einzelfaktoren untersucht. Die effektivsten Maßnahmen wurden nun in Kombination untersucht, um mögliche synergistische Effekte zu ermitteln. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob eine Kombination aus mechanischer Beanspruchung und nachfolgender mikrobiologischer Behandlung zu einer Freisetzung von zuvor nicht-extrahierbaren Rückständen führt. Zugleich wurde in den folgenden Versuchen die Wirkung einer

Kombination von verschiedenen biologischen Behandlungsmaßnahmen untersucht. Zum einen wurde das Bodenmaterial unsupplementiert inkubiert, zum anderen mit Zugabe von Kompost und als dritte biologische Variante mit der Zugabe von Kompost und Mikroorganismen. Bei den Mikroorganismen handelte es sich um einem Cocktail von Abbauspezialisten bestehend aus den Mikroorganismen *Mycobacterium* sp. VF1, *Mycobacterium* sp. KA, *Sphingomonas paucimobilis* sp. BA2 und *Gordona* sp. BP9, die alle nachweislich zum Abbau von PAK befähigt sind. Diese wurden nach einer Vorkultivierung jeweils in einer Zellzahl von $0,25 \times 10^6$ /g TG Boden zugesetzt. Als mechanische Behandlungsmaßnahmen wurde das Bodenmaterial gemörsert bzw. mit einer Ultraschall-Sonde behandelt. Die Versuche wurden mit dem Modellbodenmaterial Muttergarten und dem Altlastbodenmaterial Wülknitz mit nicht-extrahierbaren Rückständen aus ^{14}C -Anthracen durchgeführt.

Kombination von mechanischen und biologischen Maßnahmen

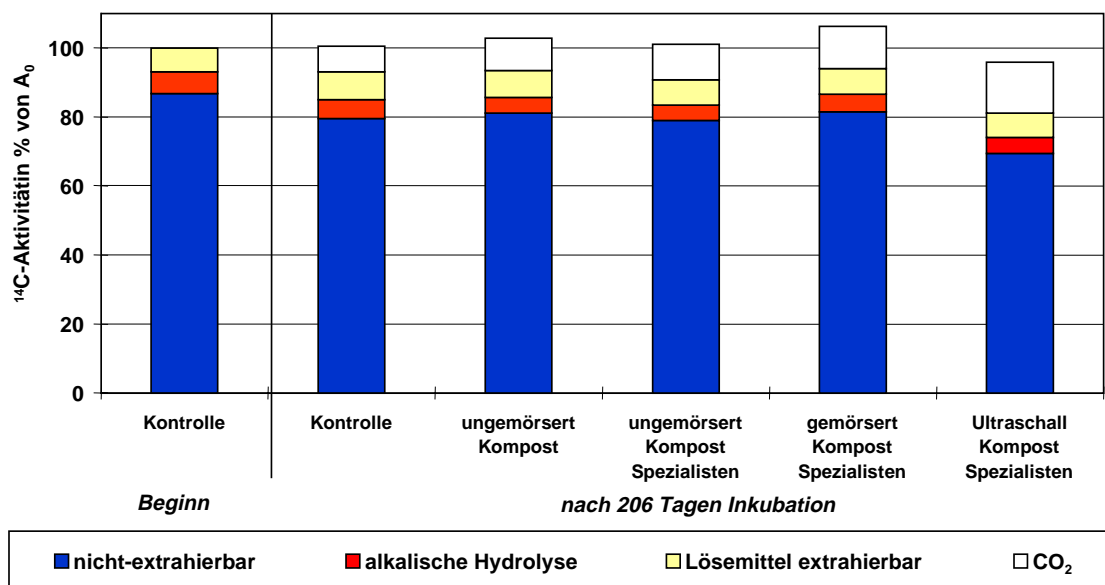


Abb. 11: Verbleib der ^{14}C -Aktivität im Bodenmaterial Muttergarten mit nicht-extrahierbaren ^{14}C -Anthracen-Rückständen nach 206-tägiger Inkubation bei Kombination unterschiedlicher Remobilisierungsmaßnahmen im Vergleich zum Ausgangsmaterial zu Versuchsbeginn

Die Kombination dieser drastischen Behandlungsmaßnahmen bewirkte insgesamt keine deutliche Freisetzung von zuvor nicht-extrahierbaren Rückständen (s. Abb. 11). Die Mineralisation nahm in dem Bodenmaterial Muttergarten mit steigender Behandlungsintensität etwas zu, wobei die höchste Mineralisation in dem ultraschall-behandelten Bodenmaterial, dem Kompost und Mikroorganismen zugesetzt waren, ermittelt wurde. Die Fraktion der nicht-extrahierbaren Rückstände nahm zwar während der Inkubation in allen Versuchsvarianten leicht ab, doch wurde die Abnahme nicht durch die kombinierten Behandlung bedingt, denn auch in der unbehandelten Kontrolle wurden Abnahmen festgestellt.

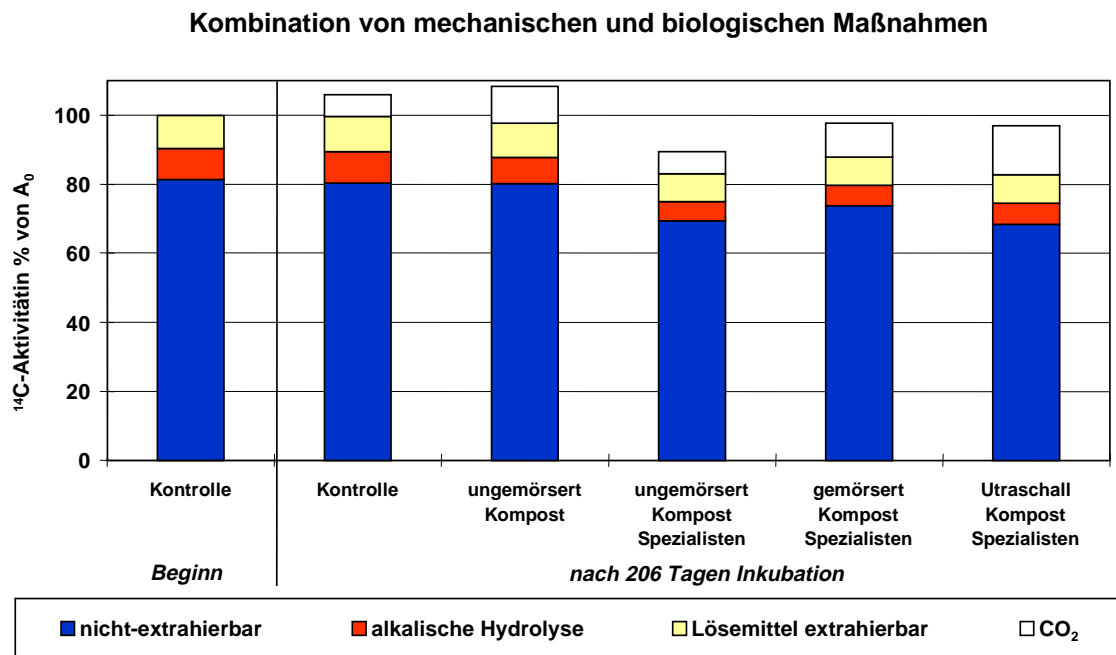


Abb. 12: Verbleib der ¹⁴C-Aktivität im Bodenmaterial Wülknitz mit nicht-extrahierbaren ¹⁴C-Anthracen-Rückstände nach 206-tägiger Inkubation bei Kombination unterschiedlicher Remobilisierungsmaßnahmen im Vergleich zum Ausgangsmaterial zu Versuchsbeginn

In den Versuchen mit dem Altlastbodenmaterial Wülknitz war die Mineralisation in allen Versuchsvarianten in etwa vergleichbar (6-10%). Nur in der Ultraschall behandelten Variante mit Supplement-Zugabe war die Mineralisation etwas höher (s. Abb. 12). Die Fraktion der nicht-extrahierbaren Rückstände nahm z.T. durch die Inkubation leicht ab, was auf die Mineralisation sowie eine niedrigere Wiederfindung der ¹⁴C-Aktivität zurückgeführt wurde.

Als Fazit läßt sich festhalten, daß durch die Anwendung dieser Kombination aus mechanischen und biologischen Behandlungsmaßnahmen in keinem Fall eine Freisetzung von zuvor nicht-extrahierbaren Rückständen in eine (leichter) verfügbare bzw. extrahierbare Fraktion erfolgte.

Die Versuche zur Kombination verschiedener biologischer und mechanischer Remobilisierungsmaßnahmen wurden mit dem humosen Altlastbodenmaterial Bremen mit nicht-extrahierbaren Rückstände aus ¹⁴C-Anthracen fortgesetzt. Als biologische Remobilisierungsmaßnahmen wurde die Zugabe verschiedener organischer Supplemente wie Kompost, Rindenmulch, Waldbodenstreu, sowie die Zugabe des Actinomyceten *Rhodococcus erythropolis* untersucht. Als mechanische Behandlung wurden das Bodenmaterial ebenfalls vorher einer Ultraschall Behandlung unterzogen. In Abbildung 13 und 14 ist der Verbleib der ¹⁴C-Aktivität im Bodenmaterial Bremen mit nicht-extrahierbaren Rückständen aus ¹⁴C-Anthracen nach 136tägiger Inkubation bei Kombination unterschiedlicher Maßnahmen im Vergleich zum Ausgangsmaterial zu Versuchsbeginn dargestellt.

Kombination von mechanischen und biologischen Maßnahmen

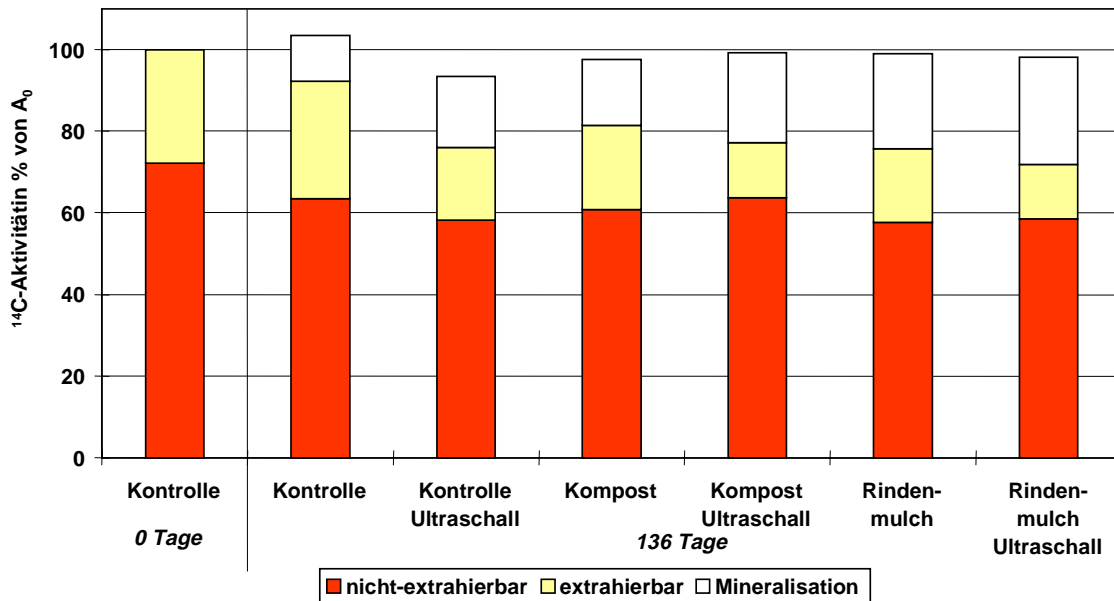


Abb. 13: Verbleib der ^{14}C -Aktivität im Altlastbodenmaterial Bremen mit nicht-extrahierbaren ^{14}C -Anthracen-Rückständen nach 136-tägiger Inkubation bei Kombination unterschiedlicher Maßnahmen im Vergleich zum Ausgangsmaterial zu Versuchsbeginn

Kombination von mechanischen und biologischen Maßnahmen

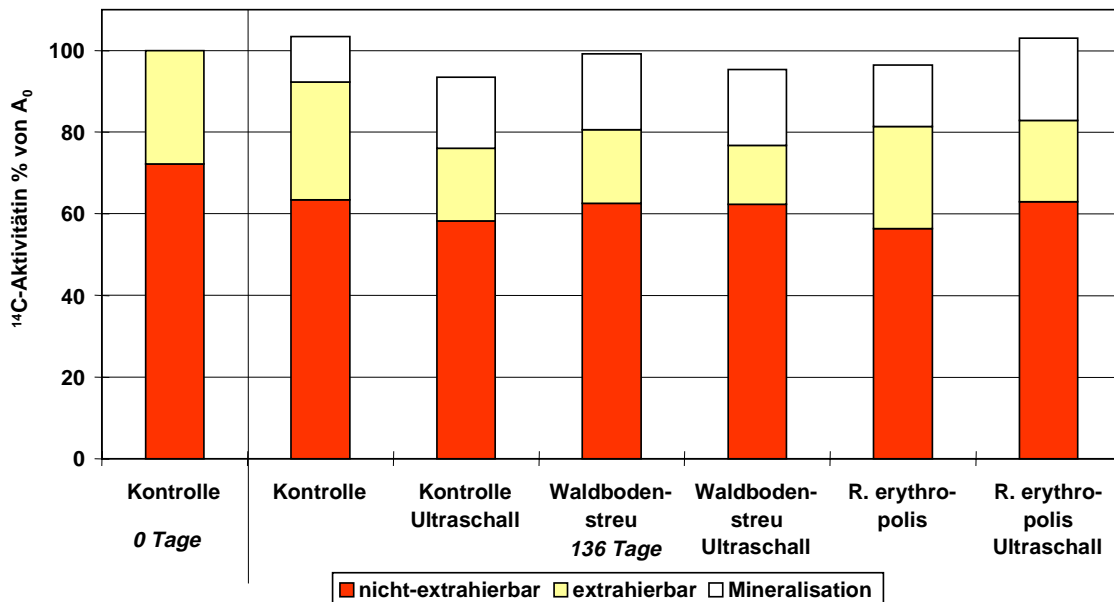


Abb. 14: Verbleib der ^{14}C -Aktivität im Altlastbodenmaterial Bremen mit nicht-extrahierbaren ^{14}C -Anthracen-Rückständen nach 136-tägiger Inkubation bei Kombination unterschiedlicher Maßnahmen im Vergleich zum Ausgangsmaterial zu Versuchsbeginn

Aus den Abbildungen 13 und 14 ist ersichtlich, daß durch die 136tägige Inkubation des Bodenmaterials die Anteile der nicht-extrahierbaren Rückstände infolge einer Mineralisation abnehmen. Ebenfalls zeigte die extrahierbare Fraktion geringe ¹⁴C-Aktivitätsabnahmen. Es läßt sich festhalten, daß die Kombinationen der optimierten mechanischen und biologischen Remobilisierungsmaßnahmen zu keiner Freisetzung der zuvor nicht-extrahierbaren ¹⁴C-Aktivität führte.

5 Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

1. Durch die Verwendung von ¹⁴C-markierten PAK war es möglich den Verbleib dieser Verbindungen bzw. deren Metaboliten in sämtlichen Kompartimenten nachzuvollziehen und vollständig zu bilanzieren (¹⁴CO₂, ¹⁴C-Ausgasung (VOC), extrahierbare originäre ¹⁴C-Verbindung oder deren Metabolite, nicht-extrahierbare ¹⁴C-Rückstände).
2. Die Zugabe der Supplemente (Kompost, Rindenmulch, Waldbodenstreu) konnten z.T. das Verschwinden von ¹⁴C-PAK im Bodenmaterial steigern, doch erfolgte dies meist aufgrund einer verstärkten Mineralisation. Eine spezifische Förderung der Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände im Boden konnte durch die Supplement-Zugabe nicht festgestellt werden. Auch bei Verwendung von stark humosem Bodenmaterial konnte keine gesteigerte Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen im Boden nachgewiesen werden.
3. Die Untersuchungen zur Langzeitstabilität nicht-extrahierbarer PAK-Rückstände im Boden unter ökologischen Streßbedingungen haben gezeigt, daß diese weitgehend stabil im Boden vorlagen. Von den verschiedenen eingesetzten Remobilisierungstests bewirkt nur die durch Zugabe von EDTA hervorgerufene Auflösung metall-organischer Komplexe im Boden eine verstärkte Freisetzung von schadstoffbürtiger ¹⁴C-Aktivität. Genauere Untersuchungen dieser freigesetzten Rückstände zeigten, daß es hierbei aller Wahrscheinlichkeit nach um die Freisetzung von ¹⁴C-Aktivität handelt, die an gelöste organische Bodensubstanz (DOM) gebunden ist. Die Freisetzung originärer PAK konnten in keinem Remobilisierungsversuch nachgewiesen werden. Auch in den kombinierten Behandlungsmaßnahmen (mechanisch/biologisch) sowie in den Versuchen mit Organismen der Bodenfauna (Regenwürmer) konnte keine Freisetzung der nicht-extrahierbaren Rückstände beobachtet werden.
4. Anhand der durchgeführten Remobilisierungsversuche ist deutlich geworden, daß die nicht-extrahierbaren Rückstände sehr stabil im Boden vorliegen und nicht wieder als ursprüngliche Verbindung in Erscheinung treten. Die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen infolge von biogenen Humifizierungsprozessen trägt somit wirksam zur biologischen Sanierung von kontaminierten Böden bei. Eventuell kritischer zu beurteilen ist hingegen der auch nach Anwendung biologischer Sanierungsverfahren noch in kleinem Umfang im Boden verbleibende extrahierbare Schadstoffanteil, der hier aber nicht Gegenstand weiterer Untersuchungen war.

Zur weiteren Absicherung der Einschätzung des ökologischen Risikos von humifizierten PAK sind sowohl die Aufklärung und Quantifizierung der verschiedenen Bindungsformen im Humus als auch ökotoxikologische Tests notwendig. Die wichtigsten Ergebnisse dieser Untersuchungen werden an anderer Stelle ausführlicher dargestellt (Kap. 9.3 des Leitfadens).

Aufgrund der hier durchgeführten und beschriebenen Tests kann die Humifizierung von PAK zur Reduktion des Gefährdungspotentials beitragen. Da sich Altlastschäden jedoch von Fall zu Fall unterscheiden, wird empfohlen, die Nachhaltigkeit der jeweils geplanten Sanierungsmethode ebenfalls für jeden Fall neu zu prüfen. In Abschnitt 4.3 sind einige der auf dieser Basis empfohlenen Testverfahren genauer beschrieben.

6 Abkürzungen

A_0 :	^{14}C -Gesamtaktivität einer Bodenprobe zu Versuchsbeginn
C_{Org} -Gehalt:	Gehalt an organischem Kohlenstoff
DOM:	dissolved organic matter - gelöste organische Substanz des Bodens
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure (Komplexbildner)
PAK:	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
VOC:	volatile organic compounds - flüchtige organische Verbindungen
WK_{max} :	maximale Wasserhaltekapazität des Bodens

7 Eigene Veröffentlichungen

Eschenbach, A., R. Wienberg, und B. Mahro. 1997. Bildung und Langzeitstabilität von nicht-extrahierbaren PAK-Rückständen im Boden. Altlastenspektrum, **6**:292-297

Eschenbach, A., R. Wienberg, und B. Mahro. 1997. Einsatz von Kompost und Rindenmulch bei der biologischen Altlastensanierung PAK-kontaminierter Bodenmaterialien. Mittlgn. Dt. Bodenkundl. Gesellsch., **83**:279-282

Eschenbach, A., R. Wienberg, und B. Mahro. 1998. Fate and stability of non-extractable residues of ^{14}C -PAH in contaminated soils under environmental stress conditions. Environ. Sci. Technol. **32**:2585-2590

Richnow, H. H., A. Eschenbach, B. Mahro, R. Seifert, P. Wehrung, P. Albrecht, and W. Michaelis. 1998. The use of ^{13}C -labelled polycyclic aromatic hydrocarbons for the analysis of their transformation in soil. Chemosphere, **36**:2211-2224

Mahro, B., and G. Schaefer. 1998. Bioverfügbarkeit als limitierender Faktor des mikrobiellen Abbaus von PAK im Boden - Ursachen des Problems und Lösungsstrategien. Altlastenspektrum **7**:127-134

Eschenbach, A., R. Wienberg, und B. Mahro. 1998. Immobilization of PAH in soil organic matter: Long-term stability and fate of non-extractable ^{14}C -PAH-residues. Mittlgn. Dt. Bodenkundl. Gesellsch., **87**:269-270

Eschenbach, A., R. Wienberg, und B. Mahro. 1998. Langzeitstabilität und Remobilisierung von nicht-extrahierbaren ^{14}C -PAK-Rückständen unter ökologischen Stressbedingungen in kontaminierten Böden. DECHEMA-Jahrestagungen '98, Kurzfassungen, Bd. 1, Frankfurt, 246-247

Eschenbach, A., R. Wienberg, and B. Mahro. 1998. Risk Assessment of PAH in soil: Behaviour and fate of non-extractable ^{14}C -PAH-residues under environmental stress conditions. *In* ConSoil '98. Sixth international FZK/TNO conference on contaminated soil. Thomas Telford Publishing, London, 821-822

Eschenbach, A., and B. Mahro. 1998. Long-time stability of non-extractable ^{14}C -PAH-residues in contaminated soils. International Workshop "Innovative Potential of Advanced Biological Systems for Remediation" Extended Abstracts Volume. 151

Kästner, M., M. Breuer-Jammali, and B. Mahro. 1998. Impact of inoculation protocols, salinity and soil pH on the PAH-degradation and survival of degrading bacteria introduced into soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:359-362

Mahro, B., A. Eschenbach, and R. Wienberg. 1999. Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von "Schadstoffrückständen" in biologisch sanierten Böden. *In* Umweltbundesamt Projektträger des BMBF (ed.) Forschungsverbund "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", CD-ROM, DECHEMA, Frankfurt/M. 42-55

Eschenbach, A., H. Mescher, R. Wienberg, und B. Mahro. 1999. Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von PAK in kontaminierten Böden. *In* Tagungsband zum BMBF-Statusseminar "Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen", 22. und 23.9.98 in Bremen; Umweltbundesamt (ed.), Projektträger Abfallwirtschaft und Altlastensanierung des BMBF, ISBN 3-88135-323-2, B1-17

Mahro, B. 1999. Aufgaben und Fragestellungen des Statusseminares "Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen im Boden". *In* Tagungsband zum BMBF-Statusseminar "Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen", 22. und 23.9.98 in Bremen; Umweltbundesamt (ed.) Projektträger Abfallwirtschaft und Altlastensanierung des BMBF, ISBN 3-88135-323-2, A1-17

Mahro, B., L. Schmidt, and A. Eschenbach. 1999. Möglichkeiten und Grenzen mikrobiologischer Verfahren bei der Sanierung kontaminierter Böden. *In* Heiden, S., R. Erb, J. Warrrelmann, R. Dierstein (ed.) Biotechnologie im Umweltschutz. Bioremediation: Entwicklungsstand - Anwendungen - Perspektiven, E. Schmidt-Verlag Berlin, 99 -107

Mescher, H., A. Eschenbach, R. Wienberg, und B. Mahro. 1999. Einfluß von Regenwürmern (Lumbricidae) auf die Remobilisierung von humifizierten ^{14}C -PAK-Rückständen in Altlastböden. *In* DECHEMA-Jahrestagungen '99, Kurzfassungen, Bd. I, Frankfurt, 419-420

Eschenbach, A., R. Wienberg, and B. Mahro. 1999. Humifizierung von PAK: Verbleib von ^{14}C -markierten PAK-Metaboliten im Boden. *In* DECHEMA-Jahrestagungen '99, Kurzfassungen, Bd. I, Frankfurt, 421

Mescher, H. 1999. Einfluß von Regenwürmern (*Aporrectodea caliginosa*, *Eisenia fetida*) auf den Verbleib von ^{14}C -markierten PAK-Rückständen in verschiedenen biologisch sanierten Bodenmaterialien. Diplomarbeit Hochschule Bremen.

Eschenbach, A., R. Wienberg, and B. Mahro. 1999. Die Rolle von nicht-extrahierbaren im Boden festgelegten PAK-Rückständen für die Bewertung biologischer Bodensanierungen., Mittlgn. Dt. Bodenkundl. Gesellsch. Bd. 91, 601-604

Mescher, H., A. Eschenbach, R. Wienberg, and B. Mahro. 1999. Untersuchung zur Remobilisierung von humifizierten ¹⁴C-PAK-Rückständen durch Regenwürmer (Lumbricidae) in Altlastböden. Mittlgn. Dt. Bodenkundl. Gesellsch. Bd. 91, 682-683

Mahro, B., L. M. Schmidt, and G. Schaefer. 1999. Möglichkeiten und Grenzen des Einsatzes von Spezialkulturen bei der Sanierung PAK-kontaminierter Böden. Mittlgn. Dt. Bodenkundl. Gesellsch. Bd. 91, 1285-1288

Richnow, H. H., A. Eschenbach, B. Mahro, M. Kästner, E. Annweiler, R. Seifert, and W. Michaelis. 1999. Formation of nonextractable residues: a stable isotope approach. Environ. Sci. Technol., **33**:3761-3767

Dahn, A., A. Eschenbach, S. Fleischmann, and J. Michels. (1999): BMBF-Forschungsverbund "Biologische Verfahren zur Bodensanierung". In Heiden, S., R. Erb, J. Warrelmann, und R. Dierstein: Biotechnologie im Umweltschutz. Bioremediation: Entwicklungsstand – Anwendungen – Perspektiven. Initiativen zum Umweltschutz, Bd. 12, Erich Schmidt Verlag, Berlin, 43-51

Eschenbach, A., R. Wienberg, and B. Mahro. 2000. Formation, long-term stability and fate of non-extractable ¹⁴C-PAH-residues in contaminated soils. In Wise, D. L., D. J. Trantolo, E. J. Cichon (ed.): Remediation of hazardous waste contaminated soils.- 2nd Edition, Marcel Dekker, Inc., New York, in press

Mahro, B. 2000. Bioavailability of contaminants. In Biotechnology Vol.11 b: Environmental Processes - Soil decontamination, Waste gas treatment, Potable water preparation. In Rehm, H. J., G. Reed, A. Pühler, P. Stadler (ed.); Wiley-VCH, Weinheim, 62-88

Mahro, B. 2000. Natürliche Selbstreinigung von PAK-Altlasten – ein Warten auf Godot. In DECHEMA (ed.) Natural Attenuation – Möglichkeiten und Grenzen naturnaher Sanierungsstrategien. in press

8 Literaturverzeichnis

1. **Bollag J. M.** 1992. Decontaminating soil with enzymes. Environ. Sci. Technol. **26**:1876-1881
2. **Bollag J. M., and M. J. Loll.** 1983. Incorporation of xenobiotics into soil humus. Experientia **39**:1221-1231
3. **Calderbank A.** 1989. The occurrence and significance of bound pesticide residues in soil. Rev. Environ. Contam. Toxicol. **108**:71-103
4. **Collins, P. J., M. J. J. Kotterman, J. A. Field, and A. D. Dobson.** 1996. Oxidation of anthracene and benzo(a)pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. Appl. Environ. Microbiol. **62**:4563-4567
5. **Dec, J., and J. M. Bollag.** 1987. Microbial release and degradation of catechol and chlorophenols bound to synthetic humic acid. Soil Sci. Am. J. **52**:1366-1371

6. **Edwards, C. A., P. J. Bohlen.** 1996. Biology and ecology of earthworms. Capman & Hall, New York
7. **Eggeling, L., and H. Sahn.** 1980. Degradation of coniferyl alcohol and other lignin-related aromatic compounds by *Nocardia* sp. DSM 1069. Arch. Microbiol. 126:141-148
8. **Eschenbach, A., M. Kästner, R. Bierl, G. Schaefer, and B. Mahro.** 1994. Evaluation of a new and more effective method to extract polycyclic hydrocarbons from soil samples. Chemosphere **28**:683-692
9. **Eschenbach, A.** 1995. Einfluß von *Pleurotus ostreatus*, Kompost, *Sphingomonas paucimobilis* und der Kontaminationsdauer auf den Verbleib und Abbau ¹⁴C-markierter polyzyklischer Kohlenwasserstoffe (PAK) in Altlastböden. Diss. Techn. Univ. Hamburg-Harburg
10. **Eschenbach, A., R. Wienberg, and B. Mahro.** 1997. Bildung und Langzeitstabilität von nicht-extrahierbaren PAK-Rückständen im Boden. Altlastenspektrum **6**:292-297
11. **Führ F., W. Steffens, W. Mittelstaedt, and B. Brumhard.** 1991. Lysimeter experiments with ¹⁴C-labelled pesticides - an agroecosystem approach. In Frehse H. (ed.) Pesticide chemistry: Advances in international research, development and legislation. Verlag Chemie, Weinheim. 37-48
12. **Haider, K. M., and J. P. Martin.** 1988. Mineralization of C-labeled humic acids and of humic-acid bound C-xenobiotics by *Phanaerochaete chrysosporium*. Soil Biol. Biochem. **20**:425-429
13. **Hatzinger, P. B., and M. Alexander.** 1995. Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. Environ. Sci. Technol. **29**:537-545
14. **Hosler K. R., T. L. Bulman, und P. J. A. Fowlie.** 1988. Der Verbleib von Naphthalin, Anthracen und Benz(a)pyren im Boden bei einem für die Behandlung von Raffinerieabfällen genutztem Gelände. In Wolf, K., W. J. van den Brink und F. J. Colon, (ed.) Altlastensanierung '88. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht/Boston/ London. 111-113
15. **Hsu, T. S., and R. Bartha.** 1974. Biodegradation of chloraniline-humus complexes in soil and culture solution. Soil Sci. **118**:213-220
16. **Means, J. C., S. G. Wood, J. J. Hassett, and W. L. Banwart.** 1980. Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediments and soils. Environ. Sci. Technol. **14**:1524-1528
17. **Mahro, B., and M. Kästner.** 1993. Mechanisms of microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in soil-compost mixtures. In Arendt, F., G. J. Annokkee, R. Bosman, W. J. van den Brink (ed.) Contaminated soils '93. Kluwer Acad. Publishers. 1249-1256
18. **Mahro, B., A. Eschenbach, M. Kästner, and G. Schaefer.** 1994. Untersuchungen von Möglichkeiten zur gezielten Stimulation der biogenen Mineralisation und Humifizierung von PAK im Boden. In Schriftenreihe biologische Abwasserreinigung. TU-Berlin. Biologischer Abbau von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen. **4**:55-68
19. **Mahro, B., G. Schaefer, and M. Kästner.** 1994. Pathways of microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. In Hinchee, R. E., A. Leeson, L. Semprini, S. K. Ong (ed.) Bioremediation of chlorinated and polycyclic hydrocarbon compounds. Lewis Publishers. Boca Raton. 203-217.

20. **Mahro, B.** 1994. Vergleichende Untersuchung zur Wirkung der Zugabe biologisch aktiver Supplemente auf den mikrobiellen Abbau polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) im Boden. Habilitationsschrift TU Hamburg-Harburg
21. **Park, K. S., R. C. Sims, W. J. Doucette, J. E. Matthews.** 1988. Biological transformation and detoxification of 7,12-dimethyl benz(a)anthracene in soil systems. *J. Water Poll. Control Fed.* **60**:1822-1825
22. **Piccolo A., and L. Campanella.** 1992. Behaviour of pesticides in the soil environment. The science of the total environment, 123,124, Elsevier, Amsterdam.
23. **Trojanowski J., K. Haider, and V. Sundman.** 1977. Decomposition of ¹⁴C-labelled lignin and phenols by a *Nocordia sp.* *Arch. Microbiol.* **114**:149-153
24. **Weissenfels, W. D., H. J. Klewer, and J. Langhoff.** 1992. Adsorption of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**:689-696

9 Anhang

Methodensammlung zur Beurteilung biologischer Bodensanierung

Die hier dargestellten Methoden sind z.T. in den in Kapitel 9.4 des Leitfadens genannten Forschungsvorhaben (VV5) entwickelt worden oder der Literatur entnommen.

9.1 Sequentielles dreistufiges Extraktionsverfahren zur Bestimmung von PAK in Bodenproben

Der Anteil der extrahierbaren organischen Schadstoffen (z.B. MKW, PAK) kann durch die Anwendung eines sequentiellen dreistufigen Extraktionsverfahrens in drei unterschiedliche Fraktionen differenziert werden.

1. Stufe (MeOH-H₂O-Extraktion)

Um den Anteil der weniger fest sorbierten und damit besser bioverfügbaren Schadstoffe zu ermitteln wird das zu untersuchende Bodenmaterial durch ein mildes Extraktionsverfahren mit einer Wasser-Methanol-Lösung extrahiert. Jeweils 3 g Boden werden in Hungate-Röhrchen (Reagenzglas mit Schraubdeckel und Septum) eingewogen, wobei 3 Parallelen extrahiert werden. Die Bodenprobe wird mit 3 ml Wasser-Methanol-Lösung (50 Vol.-%:50 Vol.-%) versetzt und mit einem Vortex-Mischer durchmischt. Anschließend wird die Bodenprobe 30 Minuten im Ultraschallbad (Sonorex Super RK 106, Bandelin; Berlin, BRD) extrahiert und bei 2.700 U/min für 20 Minuten zentrifugiert (Omnifuge 2.0 RS, Heraeus Sepatech, Osterode, BRD). Der Überstand wird mittels 5 ml-Hamilton-Spritze durch das Septum abgezogen - wodurch eine Volumenbestimmung erreicht wird - und analysiert.

2. Stufe (Aceton-Extraktion)

Bei der zweiten Stufe der Extraktion werden zu der im Hungate-Röhrchen verbleibenden Bodenprobe 3 ml Aceton zugegeben und resuspendiert. Anschließend werden die Bodenproben ebenfalls 30 Minuten im Ultraschallbad extrahiert und danach bei 2.700 U/min für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird ebenfalls mit einer Hamilton-Spritze abgezogen, das Volumen bestimmt und analysiert.

3. Stufe (alkalische Hydrolyse)

Stärker an die Bodenmatrix gebundene Schadstoffe werden durch eine Verseifung (alkalische Hydrolyse) extrahiert. Dadurch wird zumindest teilweise eine Spaltung von Ester-Bindungen in den Huminstoffen bewirkt. [4]. Bei dieser dritten Extraktionstufe werden zu der verbleibenden Bodenprobe 2,8 ml Methanol und 0,2 ml einer 2 M NaOH zupipettiert und durchmischt. Anschließend werden die Bodenproben in einem Wasserbad (SWB 20, Haake Meßtechnik, Karlsruhe, BRD) bei 95°C, unter leichtem Schütteln, 1 Stunde lang extrahiert und nach dem Abkühlen bei 2.700 U/min 20 Minuten zentrifugiert. Danach wird der Überstand abgezogen, das Volumen bestimmt und analysiert.

Durch die Bestimmung des verbleibenden Restvolumens des vorangegangenen Extraktionsmittels läßt sich die Verschleppung bei dem jeweiligen Extraktionsschritt berechnen. Diese dreistufigen Extraktionsverfahren sind beschrieben in Eschenbach et al. [4; 5]. Eine Huminstoffextraktion kann analog zu der später beschriebenen mit diesen Extraktionsrückständen durchgeführt werden.

9.2 Wäßrige Extraktion und 3-fachen Methanol-Extraktion zur Extraktion von TNT aus Bodenproben mit nachfolgender Huminstoffextraktion

Der extrahierbare Anteil organischer Schadstoffe kann ebenfalls durch eine wäßrige Extraktion mit nachfolgender 3-facher Methanolextraktion bestimmt werden. Dazu werden 4 g Boden (FG) in die Probenröhrchen eingewogen, im Verhältnis 1:3 mit Aqua dest. versetzt und 15 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Anschließend werden die Proben bei 3000 U/min zentrifugiert. Der Extraktionsüberstand wird abdekantiert und analysiert. Das Röhrchen mit dem verbleibenden Bodenrest wird nach der Extraktion ausgewogen, um die Verschleppung zu bestimmen.

Nach der wäßrigen Extraktion wird die verbleibende Bodenprobe im Verhältnis 1:3 mit Methanol versetzt, resuspendiert und erneut 15 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Nach der Zentrifugation bei 3000 U/min wird der Extraktionsüberstand abdekantiert und analysiert. Das Probenröhrchen mit der verbleibenden Bodenprobe wird erneut ausgewogen. Die Methanol-Extraktion wird anschließend noch 2 mal wiederholt.

Nach der wäßrigen und organischen Lösemittel-Extraktion schließt sich die Huminstoffextraktion an. Vor der Huminstoffextraktion sind die Lösemittelrückstände im verbleibenden Extraktionsrückstand durch Überblasen mit Stickstoff zu entfernen. Um Veränderungen der Bodenprobe durch Radikalbildung und Autooxidation im basischen Milieu zu verhindern, wird die 0,5 N NaOH-Lösung vor der Verwendung 30 Minuten mit Stickstoff durchperlt, um so den Sauerstoff zu entfernen.

Der Extraktionsrückstand wird dann mit 20 ml 0,5 N NaOH versetzt und 1 Stunde auf einem Vertikalschütteler oder 30 Minuten im Ultraschallbad extrahiert oder maximal 30 Sekunden mit einem Ultraschallfinger dispergiert. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 3000 U/min wird der Überstand abdekantiert. Die NaOH-Extraktion wird anschließend noch zweimal wiederholt bis die Lösung hellgelb ist. Die vereinigten NaOH-Extraktionsüberstände bilden die gelösten Fulvo- und Huminsäuren. Das verbleibende Bodenpellet bildet die unlöslichen Humine, es wird homogenisiert und getrocknet. Bei Verwendung von ^{14}C -markierten Schadstoffen kann die ^{14}C -Aktivität durch Verbrennungsanalyse bestimmt werden.

Dem Extraktionsüberstand werden ca. 900 μl konzentrierte HCl hinzugefügt, bis pH 1 erreicht ist. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 3000 U/min werden die Fulvosäuren abdekantiert. Die ausgefällten Huminsäuren (Rückstand) werden in 6 ml 0,5 N NaOH resuspendiert. Je 1,0 g der Lösung werden in ein Porzellanschiffchen pipettiert, getrocknet und die ^{14}C -Aktivität wird durch Verbrennungsanalyse bestimmt.

Sollen die Huminfraktionen durch NMR-Spektroskopie untersucht werden, erfolgt die Extraktion anstatt mit Methanol mit Acetonitril. Statt 4 g Bodenprobe werden 160 g benötigt. Entsprechend erhöhen sich auch die Mengen der verwendeten Extraktionsmittel (Verhältnis Bodenprobe : Extraktionsmittel 1:3).

Für die weitergehenden Untersuchungen mittels NMR-Spektroskopie sind die flüssigen Phasen der Huminstoffextraktion 30 Minuten mit Stickstoff zu durchperlen und anschließend nach Möglichkeit durch Gefriertrocknung, ansonsten bei maximal 40°C auf ca. 5-10 ml, aber besser bis zur Trockne einzuengen. Der getrocknete Rückstand wird in Aqua dest. aufgenommen und durch Dialyse neutralisiert. Die Dialyse erfolgt gegen Aqua dest. (5-8 l) bei Raumtemperatur

im Dunkeln für maximal 48 Stunden (Dialyseschlauch: SPECTRAPOR, Trenngröße < 1000 Da, regenerierte Cellulose). Nach der Dialyse werden die Proben für Gewichtsbestimmung und Transport gefriergetrocknet. Durch NMR-Spektroskopie können Aussagen über die Bindungsform der nicht-extrahierbaren Schadstoff-Rückstände mit der Bodenmatrix gemacht werden.

9.3 Biologische Remobilisierungsmethoden

9.3.1 Pflanzenverfügbarkeit/ Rhizosphäreneffekt von humifizierten TNT-Rückständen

Ziel des Versuches ist es, zu untersuchen, ob humifizierte TNT-Rückstände durch Pflanzen remobilisiert und aufgenommen werden können. Durch chemische und biochemische Prozesse im Wurzelraum (Rhizosphäre) haben Pflanzen die Fähigkeit kaum oder nicht wasserlösliche Substanzen aus dem Boden zu mobilisieren und aufzunehmen und diese in ihrem Gewebe zu akkumulieren. Neben den pflanzeigenen Enzymen spielen Bakterien und Pilze eine entscheidende Rolle, die sich in der Rhizosphäre (Wurzelraum) anreichern oder mit den Pflanzen in Symbiose leben. Als Versuchspflanzen können Buschbohne, Radieschen und Weidelgras ausgewählt werden, da der TNT-Metabolismus dieser Spezies bereits teilweise bekannt ist, und auch Untersuchungen über den Einfluß der TNT-Konzentration und der TNT-Metaboliten im Boden vorliegen [8; 15]. Als Substrat wird einerseits mit ^{15}N -TNT dotierter Kompost verwendet. Andererseits wird anaerob-/aerob-behandeltes saniertes Bodenmaterial mit humifizierten ^{15}N -TNT-Rückstände eingesetzt. Auf jedem Bodenmaterial werden für Buschbohne und Radieschen je 6 Pflanzen/Spezies einzeln in Aufzuchtgefäßen mit 50 ml Fassungsvermögen kultiviert. Für Weidelgras werden jeweils 6 Aufzuchtgefäße/Bodenmaterial mit je einer Oberfläche von ca. 25 cm², und 50 ml Fassungsvermögen eingesäht. Die Pflanzen keimen direkt in den sanierten Bodenmaterial. Vor dem Befüllen der Aufzuchtgefäße werden die Bodenmaterialien durch Mörsern gut homogenisiert. Die Pflanzen werden mit einer Na-Dampflampe 12h am Tag beleuchtet und täglich gewässert. Nach frühestens einem Monat werden die Pflanzen geerntet, von anhaftendem Substrat durch Waschen befreit und anschließend in die Pflanzenorgane (Wurzeln, Stengel und Blätter) zerlegt. In den getrockneten Pflanzenorganen wird dann mittels Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) das Isotopenverhältnis $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ bestimmt, ferner mittels Elementaranalyse (CHN-Analyse) der Gehalt an Stickstoff. Durch die Kombination der gewählten Analyseverfahren ist eine Quantifizierung der remobilisierten ^{15}N -TNT Rückstände möglich (vgl. Kap. 9.3.1 des Leitfadens).

9.3.2 Zusatz Huminstoff-abbauender Mikroorganismen

Bei der biologischen Sanierung kontaminierter Böden werden z.T. Mikroorganismen zugegeben, um die Mineralisation der Schadstoffe gezielt zu beeinflussen. Einige Mikroorganismen sind in der Lage Huminstoffe bzw. Lignin-ähnliche Strukturen ab- bzw. umzubauen. Es ist vorstellbar, daß dadurch Huminstoff-Strukturen abgebaut und gebundene Schadstoffrückstände freigesetzt werden können.

Für diese Remobilisierungsversuche sind z.B. der Weißfäulepilz *Trametes versicolor* (DSM 3086) und das Bodenbakterium *Rhodococcus erythropolis* (DSM 1069) geeignet. Für die Auswahl ist ausschlaggebend, daß die Mikroorganismen einerseits in der Lage sind Huminstoffe bzw. Lignin abzubauen und andererseits gute Überlebenschancen im Bodenmaterial haben bzw. unter natürlichen Bedingungen im Boden vorkommen. Die Fähigkeit Lignin abzubauen ist für beide Mikroorganismen nachgewiesen [1; 3; 16].

Des weiteren können für die Remobilisierungsversuche mit Bodenmaterial, das gebundene TNT-Rückstände enthält *Clitocybula dusenii* B11 und I63, *Stropharia rugosoannulata* und *Pleurotus ostreatus* Z15 eingesetzt werden.

Trametes versicolor wird auf festem Succinatmedium [14] 5-7 Tage bei 28°C im Brutschrank bis zur Ausbildung von Fruchtkörpern kultiviert. Für die Bodeninokulation wird eine Peroxidase-produzierende Kultur von *Trametes versicolor* mit sterilem Succinatmedium abgeschwemmt, in ein flüssiges Succinatmedium überimpft und für 7 Tage bei 28°C auf dem Schüttler bei 120 U/min (Certomat R, Braun, Melsungen, BRD) inkubiert. Das durch Absieben gewonnene Mycel wird zusammen mit 3-5 g sterilen Haferflocken, in 15 ml sterilem Leitungswasser, eingerührt und für 5 Tage bei 28°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird das Haferflocken-Pilzgemisch mit einem Gewichtsanteil von 10% in den Altlastboden eingebracht.

Rhodococcus erythropolis wird in einem Kulturmedium mit Veratrylalkohol als alleinige C-Quelle vorkultiviert [16]. Diese Kultur wird in der exponentiellen Wachstumsphase (mid-log Phase) geerntet und mit einer Zellzahl von 2×10^7 Zellen/g Boden inokuliert (6).

Clitocybula dusenii B11, I63, *Stropharia rugosoannulata* und *Pleurotus ostreatus* Z15 werden in jeweils 25 ml Kirk-Medium [12] vorkultiviert, anschließend das Pilzmycel drei Tage vorinkubiert und dem mittels Kugelmühle zerkleinertem Bodenmaterial (7,5 g) zugegeben (vgl. Kap. 9.4.5 des Leitfadens).

Das Bodenmaterial wird nach Zugabe von Mikroorganismen 4-6 Wochen inkubiert. Als Kontrolle dient eine nicht mit Mikroorganismen versetzte Bodenprobe, die ebenfalls inkubiert wird. Vor, während und nach der Inkubation werden Bodenproben entnommen, und diese einer Extraktion unterzogen. Die Extrakte werden auf eventuell remobilisierte Schadstoffrückstände analysiert. Werden ^{14}C -markierte Schadstoffe eingesetzt, werden die Extrakte auf eventuell mobilisierte ^{14}C -Aktivität untersucht.

9.3.3 Zusatz radikalbildender Enzyme

Durch Weißfäulepilze werden radikalbildende Enzyme freigesetzt, die einerseits durch Initialoxidation einen Abbau der Xenobiotika induzieren, andererseits aber möglicherweise auch eine remobilisierende Wirkung auf nicht-extrahierbare Rückstände im Boden ausüben können.

Um den Einfluß von radikalbildenden Enzymen auf den Verbleib von nicht-extrahierbaren Rückständen im Boden zu untersuchen, wird Bodenmaterial mit den entsprechenden Enzymen versetzt und 4-6 Wochen inkubiert. Die Kontrolle ist ein unsupplementiertes

Bodenmaterial, das aber ebenfalls inkubiert wird. Als Enzymen können Meerrettichperoxidase (HRP) (P 8000, mit ca. 51 Units/mg solid, Sigma, Deisenhofen) sowie eine Enzymmischung aus dem Kulturüberstand von *Trametes versicolor* oder Glucoseoxidase (GOD) (aus *Aspergillus niger*, E.C.1.1.3.4., Merck (108443), Activity 90 Units/mg). verwendet werden. Des weiteren können Lignin-Peroxidase und Mangan-Peroxidase von *Nematoloma frowardii*, sowie der Pflanzenwurzelextrakt von *Phaseolus vulgaris* und die Kulturüberstände von den Braunfäule Pilz *Gloeophyllum striatum* (DSM 9592) bzw. *Streptomyces spec.* SK 97/12 eingesetzt werden (JenaBios GmbH) [10; 11].

Den Enzymüberstand von *Trametes versicolor* erhält man, in dem der Pilz in einem flüssigen Succinat-Medium 5 Tage bei 28°C kultiviert wird. Der durch Absieben gewonnene Überstand wird ultrafiltriert (Amicon Diaflo 2017, Amicon) und aufkonzentriert [14].

Vor, während und nach der Inkubation werden Bodenproben entnommen, und diese einer Extraktion unterzogen und auf evtl. remobilisierte Schadstoffrückstände untersucht.

9.3.4 Zugabe unspezifisch wirksamer Supplemente (Kompost, Rindenmulch, Waldbodenstreu)

Neben der gezielten Zugabe von Mikroorganismen kann die Zugabe verschiedener unspezifisch wirksamer organischer Supplemente (Kompost, Rindenmulch, Waldbodenstreu) als weitere biologische Remobilisierungsmaßnahmen untersucht werden. Diese Supplemente wurden ausgewählt, weil sie i.d.R. Mikroorganismen-Populationen enthalten, die effektiv am Ab- bzw. Umbau von organischen Substanzen im Boden beteiligt sind. Durch die Zugabe von organischen Supplementen (Kompost, Rindenmulch, Waldbodenstreu, etc.) zu kontaminiertem Bodenmaterial ist nicht nur z.T. eine Steigerung der Mineralisation der betreffenden Schadstoffverbindung möglich, sondern durch den Um- und Abbau des Huminstoffgerüsts durch die Mikroorganismen auch eine Freisetzung gebundener Schadstoffrückstände vorstellbar.

Das zu untersuchende Bodenmaterial wird mit 50 Vol.-% organischem Supplement versetzt (Kompost, Rindenmulch, Waldbodenstreu) und in Kleinreaktoren 4-6 Wochen inkubiert. Durch eine Extraktion (s.o.) wird im Anschluß der extrahierbare Schadstoffanteil ermittelt [6; 7].

9.3.5 Zugabe von Organismen der Bodenfauna (Regenwürmer)

Um den Einfluß von Regenwürmern auf immobilisierte nicht-extrahierbare Schadstoffe zu untersuchen, wird entsprechendes Bodenmaterial mit nicht-extrahierbaren Rückständen 4-6 Wochen lang in geschlossenen Kleinreaktorsystemen (Abb. 15) unter Zugabe von Regenwürmern inkubiert. Da speziell Regenwürmern bei der Umsetzung organischer Substanz im Boden eine wichtige Aufgabe als streuzersetzende Organismen zukommt, ist davon auszugehen, daß Regenwürmer humifizierte Schadstoffrückstände zusammen mit dem Bodenmaterial ingestieren und eine Remobilisierung dieser bewirken können. Um den Einfluß von verschiedenen Regenwurmarten zu testen, kommen als einzusetzende Organismen z.B. *Eisenia fetida* als epigäischer Regenwurm (Streuform) und *Aporrectodea caliginosa* als endogäischer Wurm (Mineralbodenform) in Frage. Die Inkubation wird bei den für die jeweiligen Organismen günstigsten ökologischen Bedingungen durchgeführt (Temperatur,

Feuchte, pH-Wert) [2]. Um zu gewährleisten, daß sich die Tiere durch das Bodenmaterial durchfressen und nicht an einer Stelle ausharren, wird die Inkubation in einem Hell/Dunkel-Zyklus durchgeführt. Als Kontrolle dient unsupplementiertes Bodenmaterial, das ebenfalls inkubiert wird. Das Verhältnis Bodenmaterial/Lumbricid wird mit 60 g Boden pro Individuum gewählt, da die Tiere eine definierte Bodenmenge zu Leben benötigen.

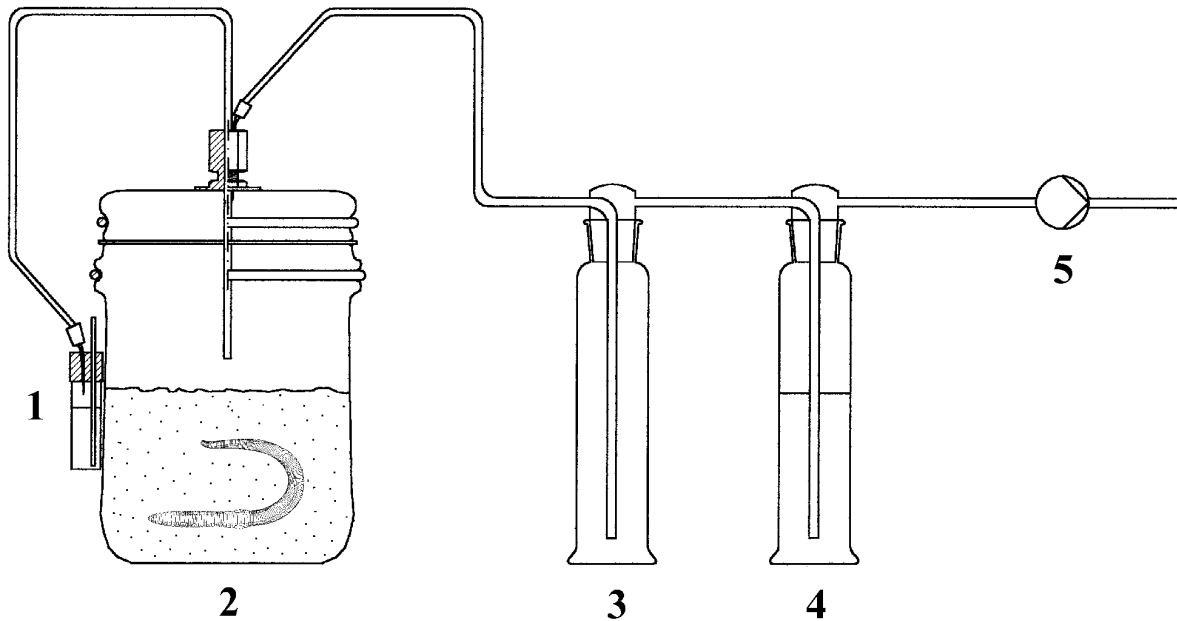


Abb. 15: Versuchsaufbau eines Glas-Bioreaktorsystems zur Untersuchung des Einflusses von Lumbriciden auf nicht-extrahierbare ^{14}C -PAK-Rückstände im Boden (Darstellung von einem Parallel-Ansatz) 1: Gassperre, 2: Klein-Bioreaktor mit Bodenmaterial mit nicht-extrahierbaren ^{14}C -PAK-Rückständen und Regenwürmern, 3: Sicherheitswaschflasche, 4: Gaswaschflasche mit 1 M NaOH, 5: Schlauchpumpe

Die Bodenproben werden vor Versuchsbeginn und nach Versuchsende untersucht. Um die extrahierbaren und nicht-extrahierbaren Anteile im Bodenmaterial zu bestimmen, wird eine Extraktion des Bodenmaterials durchgeführt. Zusätzlich kann die Akkumulation der Schadstoffrückstände in den Tieren untersucht werden, außerdem können durch derartige Inkubationsexperimente auch Aussagen über die Ökotoxizität des verwendeten Bodenmaterials erhalten werden (Mortalität) [13].

9.4 Physikalische Remobilisierungsmethoden

9.4.1 Klimasimulation durch Frost/Tau-Zyklen

Die Aggregatstruktur des Bodens kann z.B. durch schnelle Temperaturwechsel beeinflusst werden. Es ist vorstellbar, daß dadurch nicht-extrahierbare Schadstoffrückstände freigesetzt werden.

Das zu untersuchende Bodenmaterial mit nicht-extrahierbaren Rückständen wird wiederholten Frost/Tau-Zyklen (Temperaturwechsel zwischen -20°C und +40°C) ausgesetzt und somit wird eine Frostsprengung oder Frostgare des Bodenmaterials erreicht. Einer 1-monatigen Phase mit schnellen Temperaturwechseln (jeweils im 24 Stunden-Zyklus) folgt eine 1-monatige Inkubationsphase mit für Mikroorganismen günstigen Temperaturbedingungen (konstante Temperatur von +20°C). Danach erfolgt erneut eine 1-monatige Phase mit Frost/Tau-Zyklen und anschließend wieder eine Inkubationsphase bei +20°C (vgl. Ablaufschema, Abb. 16). Die Versuchsphasen mit konstanten Temperaturen werden eingefügt, um den Mikroorganismen unter diesen günstigen Milieubedingungen eine Mineralisation der eventuell remobilisierten Schadstoffrückstände zu ermöglichen. Als Kontrolle dient unbehandeltes Bodenmaterial, das über die gesamte Versuchsdauer bei +20°C inkubiert wird, aber ansonsten analog untersucht bzw. extrahiert wird. Nach der Behandlung wird der Verbleib der Schadstoffe (bzw. die ¹⁴C-Aktivität) in den unterschiedlichen Bodenfraktionen ermittelt (z.B. extrahierbar durch Methanol/Wasser, extrahierbar durch Lösemittel (Aceton), alkalisch hydrolysisierbar, nicht-extrahierbarer Rückstand).

Es wird jeweils eine 100 g TG entsprechende Bodenmenge, die einen Wassergehalt von 40-60% der maximalen Wasserhaltekapazität aufweist, in der oben beschriebenen Weise inkubiert. Über Gewichtskontrolle wird der Wassergehalt während der Inkubation ermittelt und ggf. durch Zugabe von Wasser korrigiert. Die Temperaturbehandlung erfolgt jeweils im 23 Stundenintervall, d.h. die Proben werden bei -20°C 23 Stunden tief gefroren, aus dem Gefrierschrank entnommen und auf Raumtemperatur aufgetaut und dann bei 40°C inkubiert. Werden ¹⁴C-markierte Schadstoffe verwendet, kann entstandenes ¹⁴CO₂ sorbiert werden. Dazu werden die Inkubationsgefäße während der Inkubationsphasen bei Raumtemperatur und auch für die eine Stunde zwischen den Temperaturwechsel an ein Sorptionssystem für ¹⁴CO₂ angeschlossen, um auch eine Mineralisation bilanzieren zu können [6; 7].

Dem Ablaufschema folgend werden nach jeder Inkubationsphase Bodenproben entnommen und analysiert.

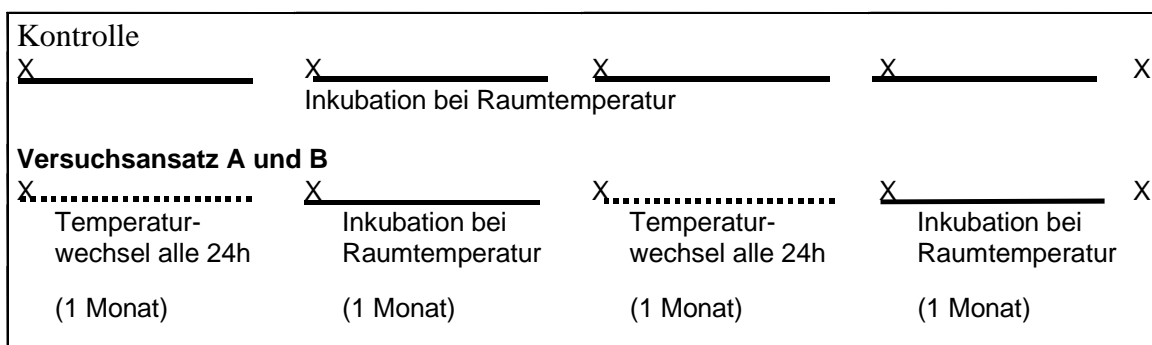


Abb. 16: Ablaufschema des Versuchs zur Remobilisierung nicht-extrahierbarer Rückstände durch Änderung der Temperatur (Versuchsansatz A und B) im Vergleich zur Kontrolle. Die mit X gekennzeichneten Termine stehen jeweils für eine Entnahme von Bodenmaterial.

9.4.2 Änderung des Bodenwassergehaltes durch Feucht/Trocken-Zyklen

Die Versuche zum Einfluß von Feucht/Trocken-Zyklen auf den Verbleib von nicht-extrahierbaren Rückständen werden analog zu den Versuchen mit den Temperaturwechseln durchgeführt. In der ersten Phase (1. Monat) wird das Bodenmaterial in einem 24-stündigen Wechsel von Feucht/Trocken-Zyklen ($< 10\%$ und $> 120\%$ WK_{max}) inkubiert. Die Wassergehalte werden durch Trocknung bei $55^{\circ}C$ und anschließender Wiederbefeuchtung durch Wasser-Nachdosierung eingestellt. Anschließend erfolgt eine 1-monatige Inkubationsphase mit für Mikroorganismen günstigen Feuchtebedingungen (konstanter Wassergehalt von ca. 50% WK_{max}). Danach folgt erneut eine 1-monatige Phase mit schnellem Wechsel der Wassergehalte sowie im Anschluß eine 1-monatige Phase mit konstantem Wassergehalt. Die Kontrolle wird während der gesamten Versuchsdauer mit einem Wassergehalt von 50% WK_{max} inkubiert. In Versuchen mit ^{14}C -markierten Schadstoffen kann während der Inkubationsintervalle entstehendes $^{14}CO_2$ analog zu den Versuchen mit den schnellen Temperaturwechseln ermittelt werden. Vor, während und nach der Inkubation wird Bodenmaterial entnommen, um den Verbleib der Schadstoffrückstände zu analysieren [6; 7].

9.4.3 Behandlung von Bodenproben mittels Ultraschall-Sonde

Um zu untersuchen, ob die direkte mechanische Zerstörung der Aggregatstruktur einen Einfluß auf die immobilisierten Schadstoffrückstände hat, wird Bodenmaterial mit nicht-extrahierbaren Rückständen mit Wasser aufgeschlämmt (pro g Boden 10 ml Wasser) und mit einem Ultraschall-Desintegrator (Braun Labosonic; Typ 853972/3; Hz 50/60 mit Standardsonde 2000 U) insgesamt 10 Minuten (20 Intervalle) behandelt. Bei größeren Bodenmengen (500 g) verlängert sich die Ultraschallbehandlung (30 min), wobei zuvor auf die vollständige Durchmischung der Boden-Wassersuspension zu achten ist. Anschließend wird das Bodenmaterial bis zum Wassergehalt der ursprünglichen Probe getrocknet. Um den Einfluß der Aggregatzerstörung auf das Auswaschverhalten zu untersuchen, werden Mehrfach-Elutionen (6-fach) mit Wasser in Anlehnung an den S4-Test nach DIN 38414 oder mit Pflanzenöl, um eine Desorption in eine hydrophobe Phase zu simulieren, durchgeführt. Das Verhältnis Bodenmaterial zu Elutionsflüssigkeit beträgt 2 g (TG) zu 20 ml. Die Elution erfolgt in einem Zeitraum von 63 Tagen, wobei die Elutionsflüssigkeiten nach 24 und 48 Stunden sowie nach 5, 14, 28 und nach 63 Tagen gewechselt werden. Als Kontrolle dient eine unbehandelte Bodenprobe, die ebenfalls den verschiedenen Elutionen unterzogen wird [7]. Für die Bewertung der Ergebnisse sollte die Möglichkeit einer Mitelution von Kolloiden und gelöster organischer Substanz beachtet werden (ggf. weitere Untersuchungen der Eluate z.B. Mit HPLC)

9.4.4 Zerstörung der Bodenstruktur durch Mörsern

Um die mögliche Freisetzung nicht-extrahierbarer Rückstände durch die direkte Aggregatzerstörung zu überprüfen, wird das zu untersuchende Bodenmaterial intensiv gemörsert. Anschließend werden analog den Versuchen mit der Ultraschall-Sonde Mehrfach-Elutionen (6-fach) mit Wasser und Pflanzenöl durchgeführt um die Auswaschbarkeit immobilisierter Schadstoffrückstände zu überprüfen [7].

9.4.5 Zerstörung der Bodenstruktur durch Zermahlen mittels Kugelmühle

Eine weitere Methode um den Einfluß der Aggregatzerstörung auf die Freisetzung nicht-extrahierbarer Rückstände zu untersuchen, ist der mechanische Aufschluß des Bodengefüges mittels Kugelmühle. Dafür werden 60 g Boden in einer Kugelmühle (drei Kugeln, Ø 2,5 cm) bei 76 U/min 20 Minuten lang gemahlen. Als Kontrolle dient eine unbehandelte Bodenprobe (60 g). Nach der mechanischen Behandlung schließt sich eine Extraktion der Bodenprobe an (vgl. Kap. 9.4.5 des Leitfadens).

9.4.6 Wasserdampfextraktion

Um gebundene Rückstände mit Wasserdampf zu extrahieren wird 1 g feuchter Boden mit 1 g Seesand vermischt, auf einen Filter (Glasfaser) in einem Probenbehälter gegeben und mit Wasserdampf (1 bar, max. 50 ml) extrahiert. Der Extrakt wird direkt in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 9000 U/min 10 min zentrifugiert. Der abdekantierte Überstand wird auf evtl. remobilisierte Schadstoffe analysiert. Die Verschleppung kann gravimetrisch bestimmt werden. Werden ^{14}C -markierte Schadstoffe verwendet, kann zur ^{14}C -Bilanzierung die verbleibende ^{14}C -Aktivität im Bodenpellet durch Verbrennungsanalyse bestimmt werden (vgl. Kap. 9.4.5 des Leitfadens).

9.5 Chemische Remobilisierungsmethoden

9.5.1 Zugabe Kationen-komplexierender Substanzen (EDTA)

Bei dieser Remobilisierungsmaßnahme wird das zu untersuchende Bodenmaterial mit nicht-extrahierbaren Rückständen mit einer EDTA-Lösung (EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure) behandelt. Diese Extraktion mit einem komplexierenden Agens soll die Humus-stabilisierenden Metallionen aus den metall-organischen Komplexen lösen. Durch die Veränderung der (räumlichen) Struktur der organischen Substanz können möglicher Weise nicht-extrahierbare sequestrierte Rückstände freigesetzt werden.

Die Untersuchungen werden mit $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Lösungen in den Konzentrationen 0,01 M, 0,025 M und 0,05 M durchgeführt, die auf pH 4,6 eingestellt werden. Als Kontrolle wird das Bodenmaterial nur mit Wasser extrahiert. Die EDTA-Extraktion wird zweimal aufeinanderfolgend mit drei Parallelen durchgeführt. Das Bodenmaterial (entsprechend 2 g TG) wird in Hungate-Röhrchen eingewogen und mit den oben genannten wäßrigen EDTA-Lösungen (12 ml) 90 min im Überkopfschüttler behandelt. Anschließend werden die Lösungen und das Bodenmaterial durch Zentrifugieren getrennt ($3000 \times g$ für 20 min und $16.000 \times g$ für 5 min). Der Überstand wird auf möglicherweise remobilisierte Schadstoffrückstände untersucht. Bei Verwendung von ^{14}C -markierten Schadstoffen wird die ^{14}C -Aktivität des Überstandes β -szintillometrisch bestimmt. Im Anschluß an die 2-stufige EDTA-Extraktion wird das Bodenmaterial den jeweilig zu untersuchenden Schadstoffen entsprechen extrahiert. Die Verschleppung kann gravimetrisch oder volumimetrisch erfolgen. Bei Verwendung von ^{14}C -markierten Schadstoffen kann zur vollständigen Bilanzierung die ^{14}C -Aktivität

des verbleibenden Bodenpellets nach Trocknung durch Verbrennungsanalyse bestimmt werden. Um Aussagen über die Art der mit EDTA extrahierten ^{14}C -Aktivität (z.B. an organische Substanz gebunden) zu erhalten, sind weitere Aussagen (z.B. Flüssig-Flüssig-Extraktion, chromatographische Verfahren, Molekülgrößenbestimmung, etc.) erforderlich [6; 7].

9.5.2 pH-Änderung (Simulation saurer Regen)

Um das potentielle Auswaschverhalten von immobilisierten Schadstoffen zu untersuchen, wird ein mehrere Jahrzehnte andauernder saurer Regen durch einen entsprechenden Versuch simuliert.

Dazu werden 3 x 5 g des zu untersuchenden Bodenmaterials in 400 ml-Gefäßen eingewogen. Anschließend werden jeweils 100 ml Wasser, welches mit einer Mischung aus Salpetersäure und Schwefelsäure im Verhältnis 2:3 auf einen pH-Wert von 5 angesäuert wurde, zugegeben und das gesamte Gefäß erneut ausgewogen. Die Gefäße werden verschlossen und auf einem Horizontalschüttler 18 Stunden bei 30°C inkubiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation (mindestens 5000 U/min) werden die Überstände der drei Versuchsansätze vorsichtig abdekantiert. Bei Verwendung von radioaktiv-markierten Schadstoffen können Radioaktivitätsbilanzen aufgestellt werden. Dazu ist es notwendig die Gesamtüberstände sowie die Rückstände auszuwiegen. Anschließend wird jeweils ein Aliquot über einen Filter (Porenweite 0,45µm, ca. 10-20 ml) filtriert. Die ^{14}C -Aktivität bzw. bei nicht-radioaktiven Versuchen wird die Schadstoffkonzentration der Filtrate bestimmt. Unter weiterer Gewichtskontrolle wird diese Bodenextraktion insgesamt 10 mal durchgeführt. In Versuchen mit ^{14}C -markierten Schadstoffen wird parallel zu der Bestimmung der Radioaktivität in den wäßrigen Überständen, die gebundene Radioaktivität im Ausgangsboden und in den Bodenproben nach 10 Extraktionsschritten durch Verbrennungsanalyse bestimmt [9].

Ein Problem bei diesem Extraktionsverfahren kann sich bei der Verwendung von ^{14}C -markierten Schadstoffen durch die Miterfassung von gelösten organischen Bestandteilen ergeben, aus der eine erhöhte extrahierbare ^{14}C -Aktivität resultiert. Zur genaueren Charakterisierung der ^{14}C -Aktivität sind deshalb weitere Analysen der Extrakte (z.B. chromatographische Verfahren) anzuraten.

9.5.3 Behandlung mit radikal-erzeugenden Agenzien (Fenton Reagenz)

Um den Einfluß freier Radikale auf die Freisetzung von nicht-extrahierbaren Rückständen zu ermitteln wird Bodenmaterial mit nicht-extrahierbaren Rückständen mit Fentons Reagenz behandelt. Die Fenton Reagenz wird aus einem Komplex aus Eisen-Gallussäure und Wasserstoffperoxid (60%ig) hergestellt. Durch die von der Fenton Reagenz ausgelöste Radikalreaktion kann es einerseits zum Abbau der organischen Substanz und damit theoretisch zur Freisetzung von nicht-extrahierbaren Rückständen im Boden kommen, andererseits können Radikalreaktionen aber auch zu einer Polymerisierung von Substanzen führen, wie dies bei der Huminstoffgenese diskutiert wird. Das Bodenmaterial wird vor der Behandlung einer 2-fachen Aceton-Extraktion unterzogen, um die extrahierbare ^{14}C -Aktivität zu entfernen. Die Fenton-Behandlung kann in zwei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt (1 mM Eisen-Gallussäure und 1 M H_2O_2 ; 10 mM Eisen-Gallussäure und 10 M

H₂O₂). Als Kontrolle dient einerseits Bodenmaterial, das nur mit Wasser und andererseits Bodenmaterial, das nur mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) behandelt wird. Nach der Fenton-Behandlung wird das Bodenmaterial einer Methanol-Wasser-Extraktion und einer 2-fachen Aceton-Extraktion unterzogen [7].

9.5.4 Behandlung des Bodenmaterials mit einem Tensid

Um den Einfluß ausgewählter Tenside auf die Freisetzung nicht-extrahierbarer Rückstände zu untersuchen, kann Bodenmaterial mit Tensiden in unterschiedlichen Konzentrationen ausgeschüttelt werden (z.B. mit dem nicht-ionischen Tensid Sapogenat: Alkylphenolpolyethylenglycolether). Um den extrahierbaren Schadstoffanteil zu entfernen, wird das Bodenmaterial vorher 2 mal mit Aceton extrahiert (5 g Bodenmaterial : 5 ml Aceton). Danach wird das extrahierte Bodenmaterial mit einer 0 mM (Kontrolle), 2,5 mM, 5 mM und einer 10 mM Tensid-Lösung (7 ml) ausgeschüttelt. Die Extraktionsdauer beträgt 4, 6 sowie 12 Stunden. Die erhaltenen Extrakte werden auf möglicherweise freigesetzte Schadstoffe hin untersucht [7].

9.5.5 Mehrfach-Extraktionen mit einem Lösemittel

Um zu untersuchen, ob nicht-extrahierbare Rückstände durch Mehrfach-Extraktionen über lange Zeiträume mit einem Lösemittel – nach Einstellung neuer Gleichgewichte – remobilisiert werden können, wird Bodenmaterial mit nicht-extrahierbaren Rückständen insgesamt fünfmal mit Aceton extrahiert (3 g Bodenmaterial:3 ml Aceton). Die ersten drei Extraktionen erfolgen unmittelbar nacheinander, die vierte Extraktion erfolgt nachdem die Proben 15 Tage auf dem Schüttler extrahiert wurden. Die fünfte Extraktion erfolgt nach einer Extraktionsdauer von drei Monaten [7].

9.6 Kombinationen von mechanischen und biologischen Behandlungsmaßnahmen

Um mögliche synergistische Effekte der einzelnen Remobilisierungsmaßnahmen zu ermitteln, werden die effektivsten Maßnahmen in Kombination durchgeführt. Dabei wird der Frage nachgegangen, ob eine Kombination z.B. aus mechanischer Beanspruchung und nachfolgender mikrobiologischer Behandlung zu einer Freisetzung von zuvor nicht-extrahierbaren Rückständen führt.

Als mechanische Behandlung wird das Bodenmaterial intensiv gemörsert oder, falls vorhanden, mit einer Ultraschall-Sonde behandelt. Danach schließen sich verschiedene biologische Varianten an, zum einen wird das Bodenmaterial unsupplementiert inkubiert (Kontrolle), zum anderen mit Zugabe biologisch wirksamer Supplemente (z.B. Kompost, Rindenmulch, Waldbodenstreu) und als dritte biologische Variante mit der Zugabe von Kompost und Mikroorganismen. Dabei handelt es sich um definierte Mischkulturen von Abbauspezialisten bestehend aus den Mikroorganismen *Mycobacterium* sp. VF1, *Mycobacterium* sp. KA, *Sphingomonas paucimobilis* sp. BA2 und *Gordona* sp. BP9, die alle nachweislich zum Abbau von PAK befähigt sind. Die Bakterien werden dem Boden nach einer

Vorkultivierung jeweils in einer Zellzahl von $0,25 \times 10^6$ /g TG Boden zugesetzt. Das Bodenmaterial wird 4-6 Wochen unter Einfluß der verschiedenen kombinierten Remobilisierungsmaßnahmen inkubiert. Vor, während und nach der Inkubation werden Bodenproben entnommen, die auf remobilisierte Schadstoffrückstände untersucht werden.

9.7 Literaturverzeichnis

1. **Collins, P. J., M. J. J. Kotterman, J. A. Field, and A. D. Dobson.** 1996. Oxidation of anthracene and benzo(a)pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. Appl. Environ. Microbiol. **62**:4563-4567
2. **Edwards, C. A., and P. J. Bohlen.** 1996. Biology and ecology of earthworms. Capman & Hall, New York
3. **Eggeling, L., and H. Sahn.** 1980. Degradation of coniferyl alcohol and other lignin-related aromatic compounds by *Nocordia sp.* DSM 1069. Arch. Microbiol. **126**:141-148
4. **Eschenbach, A., M. Kästner, R. Wienberg, and B. Mahro.** 1994. Evaluation of a new, effective method to extract polycyclic aromatic hydrocarbons from soil samples. Chemosphere **28**:683-692
5. **Eschenbach, A.** 1995. Einfluß von *Pleurotus ostreatus*, Kompost, *Sphingomonas paucimobilis* und der Kontaminationsdauer auf den Verbleib und Abbau ^{14}C -markierter polyzyklischer Kohlenwasserstoffe (PAK) in Altlastböden. Diss. Techn. Univ. Hamburg-Harburg
6. **Eschenbach, A., R. Wienberg, and B. Mahro.** 1998. Fate and stability of nonextractable residues of [^{14}C]PAH in contaminated soils under environmental stress conditions. Environ. Sci. Technol. **32**:2585-2590
7. **Eschenbach, A., R. Wienberg und B. Mahro.** 1998. Untersuchung der Bildung und Langzeitstabilität von humifizierten PAK in biologisch behandelten Recyclingböden. Abschlußbericht BMBF-Forschungsvorhaben "Biologische Verfahren zur Bodensanierung". Teilprojekt 7. Förder-Nr. 1480937
8. **Görge, E.** 1993. Aufnahme von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) in Pflanzen unter besonderer Berücksichtigung von Freilandversuchen auf dem Gelände einer ehemaligen Sprengstofffabrik in Stadtallendorf. Diss. Univers. Marburg
9. **Griest, W. H., A. J. Stewart, C.-H. Ho, R. L. Tyndall, A. A. Vass, J. E. Caton, and W. M. Caldwell.** 1994. Characterization of explosives processing waste decomposition due to composting. US Army Report ORNL/TM12812
10. **Herre, A., K. Scheibner und W. Fritsche.** 1997. Bioremediation von TNT-belasteten Böden mit Pilzen; Metabolisierung, Mineralisierung und Humifizierung. In Umweltbundesamt (ed.) Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten. Tagungsband zum 3. Statusseminar des BMBF-Verbundvorhabens "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten", 26. und 27.02.1997 in Berlin. K1-27

11. **Herre, A., K. Scheibner, M. Kästner, and W. Fritsche.** 1999. Aerobe Behandlung von UR-14TNT-dotiertem Boden mit ligninolytischen Pilzen – Bildung und Remobilisierbarkeit der gebundenen Rückstände. In Umweltbundesamt (ed.) Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen. Tagungsband zum Statusseminar des BMBF-Verbundvorhabens "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", 22. und 23.10.1998 in Bremen. G1-17
12. **Kirk, T. K., E. Schulz, W. J. Connors, J. Lorenz, and J. G. Zeikus.** 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *phanerochaete chrysosporium*. Arch. Microbiol. **117**:277-285
13. **Mescher, H., A. Eschenbach, R. Wienberg, and B. Mahro.** 1999. Untersuchung zur Remobilisierung von humifizierten ¹⁴C-PAK-Rückständen durch Regenwürmer (Lumbricidae) in Altlastböden. Mittlgn. Dt. Bodenkundl. Gesellsch. **91**:682-683
14. **Schmidt, L.-M.** 1998. Aktivität abbauaktiver Mikroorganismen und Enzyme im Altlastboden. Diss. TU-Hamburg-Harburg.
15. **Sens, Ch.** 1998. Metabolisierung und Lokalisierung von ¹⁴C-Trinitrotoluol (TNT) in *Phaseolus vulgaris* (Buschbohne) und *Triticum aestivum* (Weizen). Diss. Univers. Marburg
16. **Trojanowski J., K. Haider, and V. Sundman.** 1977. Decomposition of ¹⁴C-labelled lignin and phenols by a *Nocordia sp.* Arch. Microbiol. **114**:149-153

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.4 Verbundvorhaben 5: Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen bei der biologischen Bodensanierung

9.4.2 Biologische Bodensanierung – Beurteilung des Langzeitverhaltens / der Remobilisierung festgelegter Schadstoffe (PAK sowie TNT und Metabolite) (TV 5.2)

Dr. Kerstin Hund-Rinke

Dr. Werner Kördel

Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie
Postfach 1260
D-57377 Schmallenberg

Förderkennzeichen: 1471075

Laufzeit: 01.10.1998 – 30.09.2002

1 Zusammenfassung und Zielsetzung

Ziel des Vorhabens ist es, in enger Zusammenarbeit mit Sanierungsfirmen exemplarisch den Erfolg der biologischen Bodenreinigung im Hinblick darauf zu beurteilen, ob festgelegte Kontaminantenanteile längerfristig wieder freigesetzt und somit zu einer Grundwassergefährdung oder Einschränkung der ökologischen Bodenfunktion führen können. Folgende Sanierungsverfahren wurden gewählt:

- TNT-Sanierung: Verfahren der Firmen Plambeck ContraCon, Umweltschutz Nord, Wisstrans (s. Kap 9.5)
- PAK-Sanierung: Verfahren der Firma S+G

Für die vorliegende Fragestellung werden die jeweiligen Sanierungsverfahren mit kontaminiertem Boden der Standorte Clausthal-Zellerfeld (TNT) bzw. Wülknitz (PAK) unter Zusatz von ^{14}C -markierten Kontaminanten (^{14}C -TNT bzw. ^{14}C -Phenanthren, ^{14}C -Pyren und ^{14}C -Benzo(k)fluoranthen) sowie den firmenspezifischen Zuschlagsstoffen im Maßstab von 2 m³ simuliert. Dabei wird Wert darauf gelegt, dass alle Bedingungen und Prozesse, die einen signifikanten Einfluss auf die mikrobielle Aktivität und damit auf die Schadstoffumsetzungen ausüben, vom Prinzip her im Simulationsversuch weitestgehend identisch mit denen im technischen Maßstab sind. Nach erfolgter Sanierung wird das Langzeitverhalten der festgelegten Schadstoffe in Freilandlysimeterstudien und Reaktoruntersuchungen verfolgt. Alle Untersuchungen werden sowohl mit chemischer als auch mit ökotoxikologischer Analytik begleitet.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass es gelungen ist, in einem Maßstab von 2 m³ und einem heterogenen Bodenmaterial eine Dotierung mit radioaktivem Material vorzunehmen, die ein vergleichbares Abbauverhalten zur originären Kontamination aufweist. Des Weiteren war es im Simulationsversuch möglich, die Bedingungen der großtechnischen Sanierung nachzustellen.

Erste Ergebnisse aus den Langzeituntersuchungen deuten darauf hin, dass auch Sanierungstechniken, die auf einer Schadstoff-Festlegung beruhen, geeignete Verfahren zur Bodendekontamination darstellen können.

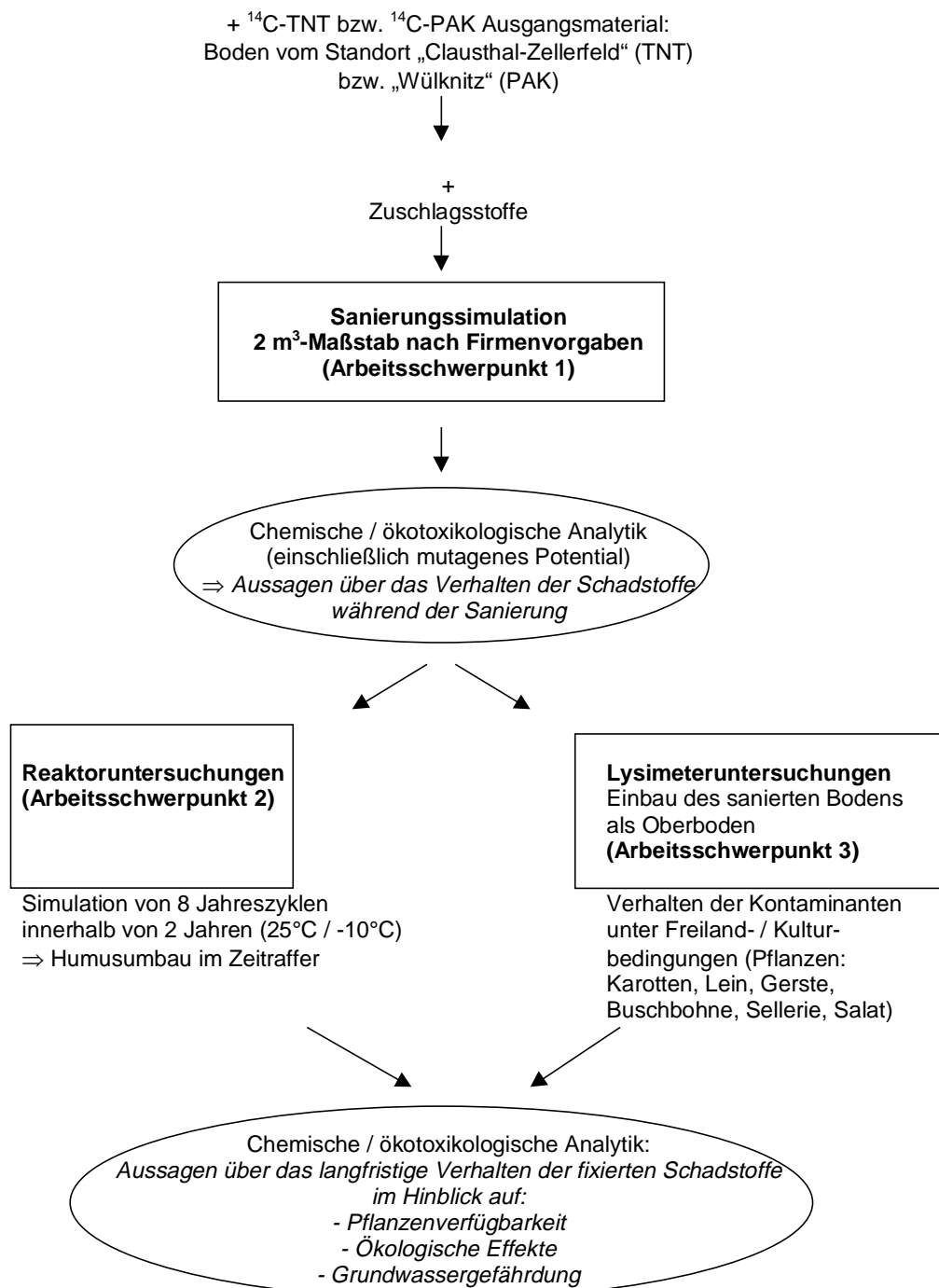
2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

Die Techniken zur TNT-Sanierung führen zu einer Reduktion von TNT mit anschließender Festlegung an die Humusmatrix. Auch im Rahmen der PAK-Sanierung werden gezielt Verfahren entwickelt, die zu einer Humifizierung der Schadstoffe führen. Zum Nachweis der Stabilität werden Remobilisierungsversuche im Kleinmaßstab unter einzelnen Extrembedingungen (z. B.: Zusatz von Komplexbildnern, Zermahlen des Bodens mit Kugelmühle, pH-Änderung) durchgeführt. (s. Teilverbände 3(Kap 9.2) und 6 (Kap. 9.5)).

3 Angewandte Methoden

3.1 Versuchsablauf

Die Festlegungs- und Remobilisierungsprozesse werden durch den Einsatz von ¹⁴C-markierten Schadstoffen verfolgt, die dem kontaminierten Boden in geringen Mengen zugesetzt werden. Der Zielsetzung entsprechend gliedert sich das Projekt in drei Arbeitsschwerpunkte, die im Folgenden dargestellt sind:



3.2 Sanierungssimulation

Da verlässliche Aussagen zur großtechnischen Sanierung gemacht werden sollen, muss bei den Modelluntersuchungen sichergestellt sein, dass alle Bedingungen und Prozesse, die einen signifikanten Einfluss auf die mikrobielle Aktivität und damit auf die Schadstoffumsetzungen ausüben, vom Prinzip her im Simulationsversuch weitestgehend identisch mit denen im technischen Maßstab sind. Hierzu zählen beispielsweise der Zusatz von Strukturmaterial (unter Berücksichtigung von dessen Größe), Bodenbearbeitung, Belüftung und Bewässerung. Tritt bei dem Sanierungsverfahren Selbsterhitzung auf, sollte auch diese im Simulationsmaßstab möglich sein. Diese Vorgaben bedingen eine Mindestgröße des Ansatzes. In der vorliegenden Untersuchung werden daher Spezialreaktoren (\varnothing 150 cm, max. Füllhöhe ca. 110 cm) eingesetzt.

Für die Applikation wurden die radioaktiv markierten Substanzen (120 mg TNT, PAK: 69 mg Pyren, 63 mg Phenanthren, 144 mg Benzo(k)fluoranthren) gelöst in Aceton auf 10 kg schluffigen Sand (Siebfraction 0,4 – 1 mm) aufgebracht und das organische Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Dieser belegte Boden wurde wiederum mit weiterem trockenem Boden im Verhältnis von ca. 1 : 10 gemischt. Die gesamte Bodenmenge wurde auf 20 % der maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt und für eine Woche (PAKs) bzw. 2 Wochen (TNT) bei 4 °C gelagert, um Alterungsprozesse (Sorption) zu ermöglichen. Anschließend wurde dieser Boden wiederum im Verhältnis von ca. 1 : 10 unter die reale Altlast gemischt.

TNT-Sanierung

Im Fall der Firmen Plambeck ContraCon und Umweltschutz Nord wird der Boden vom Standort Clausthal-Zellerfeld mit den firmenspezifischen Zuschlagsstoffen versetzt.

Für die Simulation des Sanierungsverfahrens der Firma Wisstrans wird der Originalboden nach Zusatz des ^{14}C -TNT-Bodens lagenweise in 5 Schichten eingebaut, zwischen denen jeweils eine Strohschicht eingebaut ist, die von Hyphen einer Subspezies der Pilzart *Bjerkandera adusta* durchzogen ist.

Nach Firmenvorgaben wird der Boden gewendet, befeuchtet, belüftet und temperiert.

Der Schadstoffabbau wird auf unterschiedlichen Wegen verfolgt. Zum einen wird der Verbleib des zugesetzten radioaktiv markierten TNTs untersucht. Zum anderen wird die Abnahme der originären Kontamination in dem Boden verfolgt, wobei neben chemischer Analytik auch ökotoxikologische Testsysteme zum Einsatz kommen. Die biologischen Untersuchungen umfassen hierbei die aquatischen Testsysteme mit Leuchtbakterien [3], Daphnien ([1], Abweichungen: Inkubationszeit 48 h; 20 Tiere pro Verdünnungsstufe) und Algen ([2]; Abweichungen: Messzeitpunkte: 0, 24, 48, 72 h), die mit wässrigen Bodenextrakten durchgeführt werden. Die Extrakterstellung entspricht dem in Teilvorhaben 4.4 (Bodenextraktionsverfahren zur Bewertung des ökotoxikologischen Potentials von Böden) entwickelten Verfahren.

Zur Erfassung der Lebensraumfunktion werden terrestrische Untersuchungen durchgeführt. Diese beinhalten die Erfassung der mikrobiellen Atmung und der Ammoniumoxidation gemäß TV 4.1 (Kapitel 9.3.1 des Leitfadens) und den Regenwurmakutttest [4]. Schadstoffuntersuchungen in Sickerwasser und Abluft runden das Messprogramm ab.

PAK-Sanierung

Zur Simulation der PAK-Sanierung wird der Boden vom Standort Wülknitz von der Firma S+G dem von ihnen entwickelten speziellen Vorbehandlungsverfahren unterworfen, das die Verfügbarkeit der PAK für Abbau- und Humifizierungsprozesse erhöht (Aufschluss).

Nach Zugabe von dem mit ¹⁴C-Schadstoffen versetzten Boden werden die firmenspezifischen Zuschlagsstoffe untergemischt und der Boden in einen Reaktor eingelagert. Die chemische Analytik umfasst die Originalkontamination (16 EPA-PAKs), sowie die zugesetzten ¹⁴C-markierten PAKs. Untersucht wurden der Boden, die Abluft sowie das Sickerwasser. Die ökotoxikologische Analytik umfasst wiederum die bei der TNT-Sanierung beschriebenen Verfahren.

3.3 Langzeitverhalten der festgelegten Schadstoffe

Nach erfolgter Sanierung wird das Langzeitverhalten der festgelegten Schadstoffe in Freilandlysimeterstudien und Reaktoruntersuchungen verfolgt, um Informationen zu erhalten, ob längerfristig bei verschiedenen Umweltbedingungen eine Schadstoff-Freisetzung zu erwarten ist.

Reaktoruntersuchungen: Schadstoffverhalten bei beschleunigtem Humusabbau und -umbau

In Reaktoren (Ø 1,50 m; Schichthöhe des Bodens: 25 cm) werden in einem realen Zeitraum von 2 Jahren 8 Jahreszyklen charakterisiert durch Sommer- und Winterperioden simuliert. Während in den „Sommerperioden“ eine optimale Temperatur für mikrobielle Aktivität eingestellt wird, ermöglichen die kurzen Winterperioden mit Temperaturen bis -20 °C durch Frostsprenzung die Schaffung neuer mikrobieller Angriffsstellen. Dabei sollen Informationen erhalten werden, ob durch die Aktivität von Mikroorganismen bei den natürlichen Ab- und Umbauprozessen im Humus Schadstoffe erneut freigesetzt werden können.

Freilandlysimeter: Schadstoffverhalten unter Freilandbedingungen und Bepflanzung

Mit Freilandlysimeterstudien (Freilandlysimeter: Ø 1,0 m; Tiefe 1,2 m, Füllhöhe des kontaminierten Bodens: 50 cm auf einen sandigen Unterboden), bei denen der sanierte Boden über drei Vegetationsperioden mit 6 verschiedenen Kulturen (Lein, Getreide, Salat, Karotten, Buschbohne, Sellerie) bepflanzt wird, werden Aussagen in Bezug auf eine Schadstoffaufnahme durch Pflanzen bzw. auf eine Schadstoff-Freisetzung und -auswaschung ins Grundwasser erhalten.

Alle Langzeituntersuchungen werden wiederum sowohl mit chemischer als auch mit ökotoxikologischer Analytik begleitet. Zusätzlich zu den ökotoxikologischen Testsystemen mit aquatischen Organismen werden noch Untersuchungen mit Bodenorganismen (Mikroorganismen, Nematoden, Regenwürmern) durchgeführt. Durch die Einbeziehung terrestrischer Organismen sollen Hinweise erhalten werden, in wie weit der sanierte Boden Lebensraum für Bodenorganismen bieten kann.

Der Boden wird routinemäßig über chemische und ökotoxikologische Analytik charakterisiert, wobei die Untersuchungen in den Reaktoren nach jeder Winterperiode, in den

Freilandlysometern sowohl im Frühjahr als auch nach der Vegetationsperiode durchgeführt werden. Nur exemplarisch werden ausgewählte ökotoxikologische Tests in den Reaktoren auch nach der 1. Sommerperiode angewandt. Im Sickerwasser der Lysimeter wird von Monatsmischproben der ^{14}C -Gehalt sowie der Gehalt an DOC und Stickstoff bestimmt. Ergeben sich Auffälligkeiten wird bei Bedarf auch eine ökotoxikologische Analytik durchgeführt.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Stand der Arbeiten

Zum Zeitpunkt des Redaktionsschlusses war die Sanierungssimulation der Verfahren der Firmen Umweltschutz Nord (TNT) und Plambeck ContraCon (TNT) bereits abgeschlossen. Die Untersuchungen zum Langzeitverhalten umfassten bei den Reaktoruntersuchungen im Fall von Umweltschutz Nord zwei abgeschlossene Jahreszyklen, bei Plambeck ContraCon einen abgeschlossenen Jahreszyklus. Die Simulation der Sanierungsverfahren der Firmen Wisstrans (TNT) und S + G (PAK) war noch nicht beendet.

4.2 Ergebnisse zum Verfahren der Firma Umweltschutz Nord

4.2.1 Sanierungssimulation

Schadstoffabbau

In Abbildung 1 ist der Abbau der im Boden vorhandenen Originalbelastung (TNT und Metabolite) bei der Sanierungssimulation dargestellt. Die Eliminierung geht sehr schnell vonstatten. Nach 2 Wochen sind nur noch Spuren der Kontamination analytisch nachweisbar. Die anfangs noch recht hohen Standardabweichungen können auf eine inhomogene Verteilung der Schadstoffe zurückgeführt werden. Durch die starke Bodenbearbeitung während der Sanierung werden die Schadstoffaggregate zerstört, so dass parallel zum Abbau der Kontaminanten auch die Messschwankungen infolge der Inhomogenität zurückgehen.

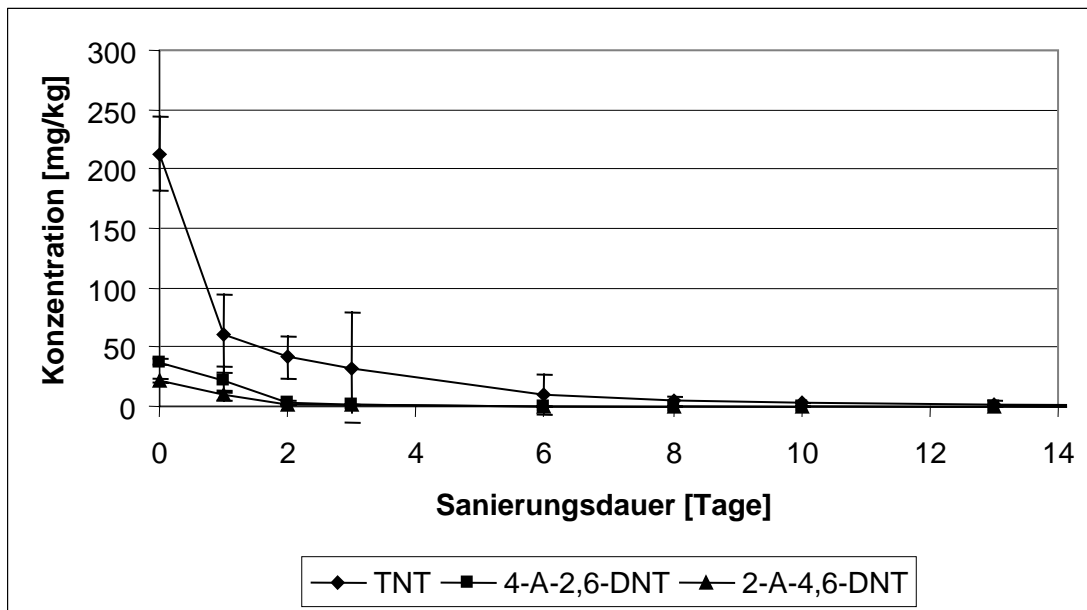


Abb. 1: Abbau der im Boden vorliegenden originären Kontamination während der Sanierungssimulation (bezogen auf die ≤ 10 mm gesiebte Bodenprobe)

Vergleich von Simulation und großtechnischer Sanierung

Zeigen sowohl Simulation als auch großtechnische Sanierung einen vergleichbaren Verlauf der Schadstoffabnahme, kann davon ausgegangen werden, dass ähnliche Bedingungen herrschen und vergleichbare mikrobielle Vorgänge stattfinden, so dass die Ergebnisse der Simulation auf die reale Sanierung übertragbar sind.

Abbildung 2 gibt eine Gegenüberstellung der Sanierungsmaßnahme am Standort Clausthal-Zellerfeld und der Simulation wieder. Zwar lag die Ausgangsbelastung bei der großtechnischen Sanierungsmaßnahme fast um den Faktor 3 über derjenigen bei der Sanierungssimulation, doch ergibt sich eine ähnliche Abbaukinetik.

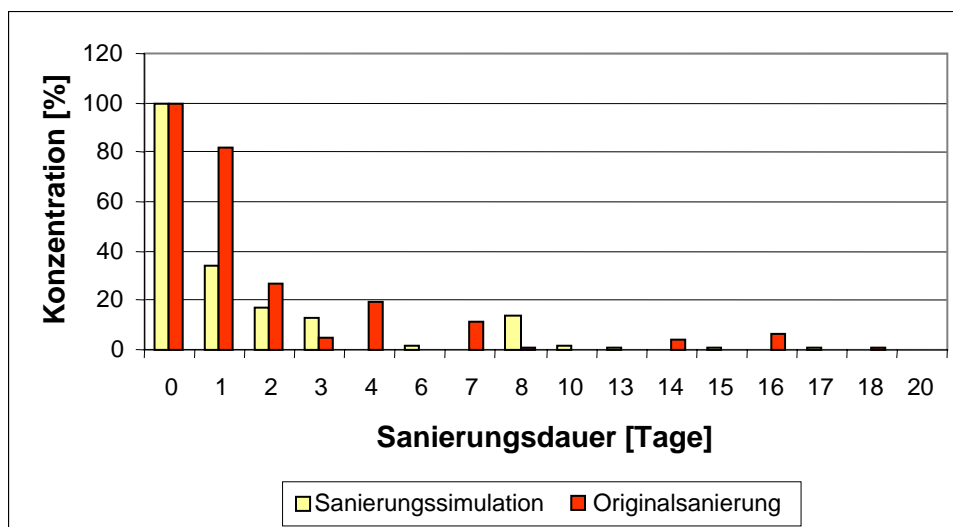


Abb. 2: Vergleich des Abbauverhaltens der originären Kontamination bei der Sanierungssimulation und dem großtechnischen Verfahren

Vergleich des Abbaus von originärer und zugesetzter Kontamination bei der Simulation

Abbildung 3 verdeutlicht, dass die an der Sanierung beteiligten Mikroorganismen nicht zwischen originärem TNT und zugesetztem ^{14}C -markiertem TNT unterscheiden. Beide Abbaukurven zeigen einen ähnlichen charakteristischen Verlauf. Die geringfügig höhere Abbaugeschwindigkeit zwischen Tag 1 und Tag 6 bei dem zugesetzten ^{14}C -markierten TNT kann auf die homogenere und feinere Verteilung im Vergleich zu der Originalkontamination zurückgeführt werden.

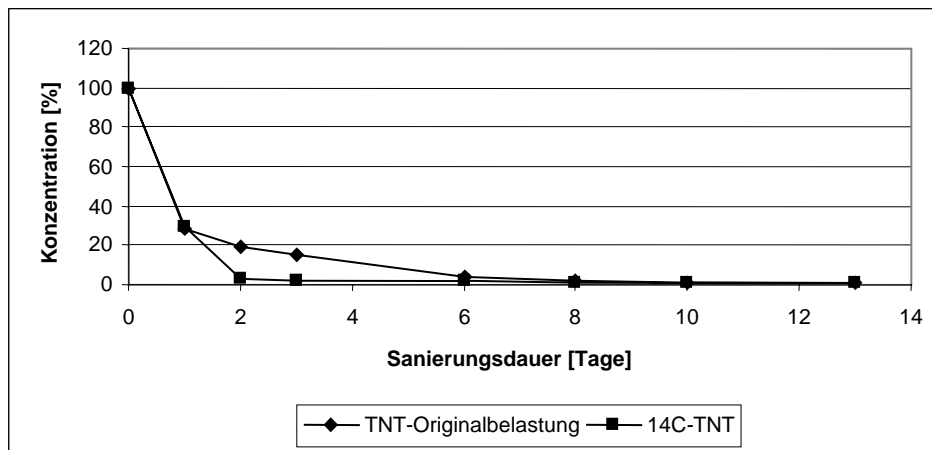


Abb. 3: Vergleich des Abbaus von originärer und zugesetzter (^{14}C) Kontamination (bezogen auf die ≤ 10 mm gesiebte Bodenprobe)

Ökotoxikologische Untersuchungen

Die über chemische Analytik detektierte Schadstoffabnahme (Abb. 1) spiegelt sich auch in einem Rückgang der Toxizität in den aquatischen Testsystemen wider (Tab. 1), wobei jedoch eine Resttoxizität erhalten bleibt.

Die Abnahme der mikrobiellen Aktivitäten kann auf den Abbau der zugesetzten organischen Substanz und die damit einhergehende Reduktion der zur Verfügung stehenden Kohlenstoff- und Stickstoffquellen und damit auf eine Reduktion der entsprechenden Populationen zurückgeführt werden.

Im Gegensatz zu den übrigen Testsystemen blieb die Mortalität im Test mit *Eisenia fetida* gleichbleibend hoch. Eine mögliche Ursache könnte in den hohen Stickstoffwerten liegen. So wird in der Vorschrift zum Test mit *Eisenia fetida* im Annex A zur Zucht der Tiere explizit darauf hingewiesen, dass hohe Ammonium- bzw. Harnstoffgehalte, die in diesem Fall durch den zugesetzten Dung eingetragen würden, zu vermeiden sind.

Tab. 1: Ökotoxikologische Tests als Begleitanalytik bei dem Verfahren zur TNT-Sanierung der Firma Umweltschutz Nord

	Sanierungsbeginn	Sanierungsende
Eluatuntersuchungen		
Leuchtbakterientest EC₅₀ [%]	16	62
G_L-Wert	> 16	8
Daphnientest EC₅₀ [%]	18	42
G_D-Wert	8	4
Algentest EC₅₀ [%]	48	28
G_A-Wert	> 32	16
Nährstoffgehalte im Eluat:		
P [mg/l]	48	3
NH₄⁺-N [mg/l]	351	72
NO₃⁻-N [mg/l]	-	50
Feststoffuntersuchung		
Ammoniumoxidation [ng NO₂⁻-N/(g×min)]	117 ± 8	89 ± 12
Basalatmung [μg/(g×h)]	155 ± 4	4 ± 0,1
SIR [μg/(g×h)]	370 ± 20	12 ± 1,0
Regenwurm-Mortalität [%]	100	100

4.2.2 Langzeituntersuchungen

4.2.2.1 Reaktoruntersuchungen

Chemische Analytik

Die begleitende chemische Analyse der Reaktoruntersuchungen zeigt während der ersten beiden Probenahmen keine signifikante Veränderung des sanierten Bodens. Über den Versuchszeitraum sind geringe Mengen an TNT sowie an ADNT nachweisbar. Dies gilt auch für die ¹⁴C-Bestimmung (Tab. 2). Betrachtet man die Eluatwerte (Tab. 3), so wird deutlich, dass keine messbaren Mengen an TNT oder identifizierbaren Metaboliten während des intensiven Humusabbaus und -umbaus in den Reaktoruntersuchungen freigesetzt werden. Die geringe Menge an Gesamtradioaktivität, die wässrig eluiert werden kann, wird bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung als an lösliche Huminstoffe gebundenes TNT identifiziert. Da das zugegebene ¹⁴C-TNT über die große TNT-Menge des kontaminierten Ausgangsbodens stark verdünnt wird und somit die spezifische Radioaktivität entsprechend vermindert wird, liegt die ¹⁴C-Nachweisgrenze über der der Rückstandsanalytik. Dies bedeutet, dass bisher während der Reaktoruntersuchungen keine Remobilisierung quantifiziert werden konnte.

Tab. 2: Chemische Analysen der auf 10 mm gesiebten Reaktorproben

Zeitpunkt	TNT		4-A-2,6-DNT	2-A-4,6-DNT	¹⁴ C	
	[mg/kg]	[%] des Anfangsgehaltes	[mg/kg]	[mg/kg]	[Bq/g]	[%] des Anfangsgehaltes
Einlagerung in Reaktor (26.05.99)	0,61	0,29	0,10	0,10	1,40	0,30
vor 1. Winterperiode (03.08.99)	1,08	0,51	0,18	0,24	1,24	0,27
nach 1. Winterperiode (23.08.99)	0,54	0,26	0,15	0,15	1,35	0,29
nach 2. Winterperiode (15.11.99)	1,23	0,58	0,15	0,15	1,42	0,31

Tab. 3: Wässrig eluierbare Anteile (Boden/Wasser-Verhältnis: 1/2)

Zeitpunkt	TNT und Metabolite [mg/kg Boden] (Rückstandsanalytik *)	¹⁴ C-Gesamtaktivität [mg TNT-Äquiv. /kg Boden]	TNT und Metabolite [mg/kg Boden] (¹⁴ C-Analytik **)
Einlagerung in Reaktor (26.05.99)	< 0,01	5,7	< 0,6
vor 1. Winterperiode (03.08.99)	< 0,01	2,3	< 0,6
nach 1. Winterperiode (23.08.99)	< 0,01	2,5	< 0,6
nach 2. Winterperiode (15.11.99)	< 0,01	2,0	< 0,6

*) Rückstandsanalytik über HPLC; **) ¹⁴C-Analytik über Dünnschichtchromatographie

Ökotoxikologische Untersuchungen

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse der ökotoxikologischen Untersuchungen dargestellt. Im Gegensatz zur chemischen Analytik, die keine signifikanten Veränderungen erkennen lässt, ist während der Reaktoruntersuchungen eine weitere deutliche Abnahme in den aquatischen

Ökotoxizitätstests zu verzeichnen. Eine gleichbleibend hohe Toxizität bleibt dagegen im Regenwurmtest erhalten. Die mikrobiellen Aktivitäten (Atmung und Ammoniumoxidation) zeigen ebenfalls eine weiterhin abnehmende Tendenz, was auf einen weiteren Abbau der leicht verfügbaren Kohlenstoff- bzw. Stickstoffquellen hindeutet. Um den Einfluss des Einfrierens und der sich anschließenden erneuten Temperaturerhöhung auf die Mikroflora zu erfassen, wurden die mikrobielle Atmung sowie die Ammoniumoxidationsaktivität sowohl nach der ersten Sommerperiode als auch nach der ersten Winterperiode bestimmt. Nur ein geringfügiger Rückgang war in der Ammoniumoxidationsaktivität zu verzeichnen. Kein Einfluss war dagegen auf die Atmungsrate festzustellen. Es ist somit davon auszugehen, dass die Temperaturveränderungen die mikrobiellen Umsatzleistungen nicht nachhaltig beeinträchtigen sollten.

Tab. 4: Sanierungsverfahren der Firma Umweltschutz Nord - Ökotoxikologische Analytik während der Reaktorversuche im Rahmen der Untersuchungen zum Langzeitverhalten

	Sanierungs- ende	Nach der ersten Sommerperiode	Nach der ersten Winterperiode	Nach der zweiten Winterperiode
Eluatuntersuchung				
Leuchtbakterien- test EC₅₀ [%]	62	--	--	
Daphnientest EC₅₀ [%]	42	--	--	--
G_D-Wert	4	2	2	1
Algentest EC₅₀ [%]	28	--	--	--
G_A-Wert	16	1	2	1
Nährstoffgehalte im Eluat:				
P [mg/l]	3	1,4	1,4	1
NH₄⁺-N [mg/l]	72	4	3	2
NO₃⁻-N [mg/l]	50	163	168	235
Feststoffuntersuchung				
Ammoniumoxi- dation [ng NO₂⁻ N/(g×min)]	89 ± 12	6,8 ± 0,9	4,2 ± 0,4	5,0
Basalatmung [μg/(g×h)]	4 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,1 ± 0,4	0,7 ± 0,05
SIR [μg/(g×h)]	12 ± 1,0	5,6 ± 0,7	5,8 ± 0,2	5,7 ± 0,3
Regenwurm- Mortalität [%]	100	n.b.	100	n.b.

n. b.: nicht bestimmt; --: nicht mehr berechenbar

4.2.2.2 Lysimeteruntersuchungen

Chemische Analytik des Bodens

Der Vergleich der Analysendaten bei der Einlagerung des sanierten Materials am 26.05.99 und der Herbstbeprobung am 18.10.99 zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Probenahmen. Dies gilt gleichermaßen für die Gesamtgehalte an TNT und seinen Metaboliten (Tab. 5) wie auch für die wässrigen Eluate (Tab. 6).

Tab. 5: Chemische Analysen des auf 10 mm gesiebten Lysimeterbodens

Zeitpunkt	TNT [mg/kg]	4-A-2,6- DNT [mg/kg]	2-A-4,6- DNT [mg/kg]	¹⁴ C	
				[Bq/g]	[%] des Anfangsgehalts
Einlagerung in Lysimeter (26.05.99)	0,61	0,10	0,10	1,40	0,30
Herbstprobenahme (18.10.99)	1,23	0,14	0,14	1,43	0,31

Tab. 6: Wässrig eluierbare Anteile (Boden/Wasser-Verhältnis: 1/2)

Zeitpunkt	TNT und Metabolite [mg/kg Boden] (Rückstands- analytik) *)	¹⁴ C-Gesamtaktivität [mg TNT-Äquiv. /kg Boden]	TNT und Metabolite [mg/kg Boden] (¹⁴ C-Analytik) **)
Einlagerung in Lysimeter (26.05.99)	< 0,01	5,7	< 0,6
Herbstprobe- nahme (18.10.99)	< 0,01	3,5	< 0,6

*) Rückstandsanalytik über HPLC; **) ¹⁴C-Analytik über Dünnschichtchromatographie

Chemische Analytik der Pflanzen

Die Analyse der Pflanzen, die auf dem Lysimeter angezogen wurden, zeigen eine geringe Aufnahme an Gesamtradioaktivität (Abb. 4). Die gemessene Radioaktivität ist so gering, dass eine analytische Auftrennung z.B. über Dünnschichtchromatographie oder HPLC nicht möglich ist. Mit Methanol lässt sich nur ein geringer Anteil der Radioaktivität (ca. 25 %) extrahieren,

der größte Anteil bleibt an den unlöslichen Pflanzenbestandteilen wie Zellulose gebunden. Da im Sickerwasser polare Abbauprodukte von TNT analysiert werden, legt dies den Schluss nahe, dass TNT, das bei der Sanierung reduziert und an Huminstoffe gebunden wurde, mit dem Humusabbau und -umbau metabolisiert wurde. Diese löslichen Metabolite können von den Pflanzen aufgenommen und für die Neusynthese pflanzlicher Biomasse genutzt werden. Die gemessene Radioaktivität steht dann in keiner strukturellen Beziehung mehr zu dem ursprünglichen TNT.

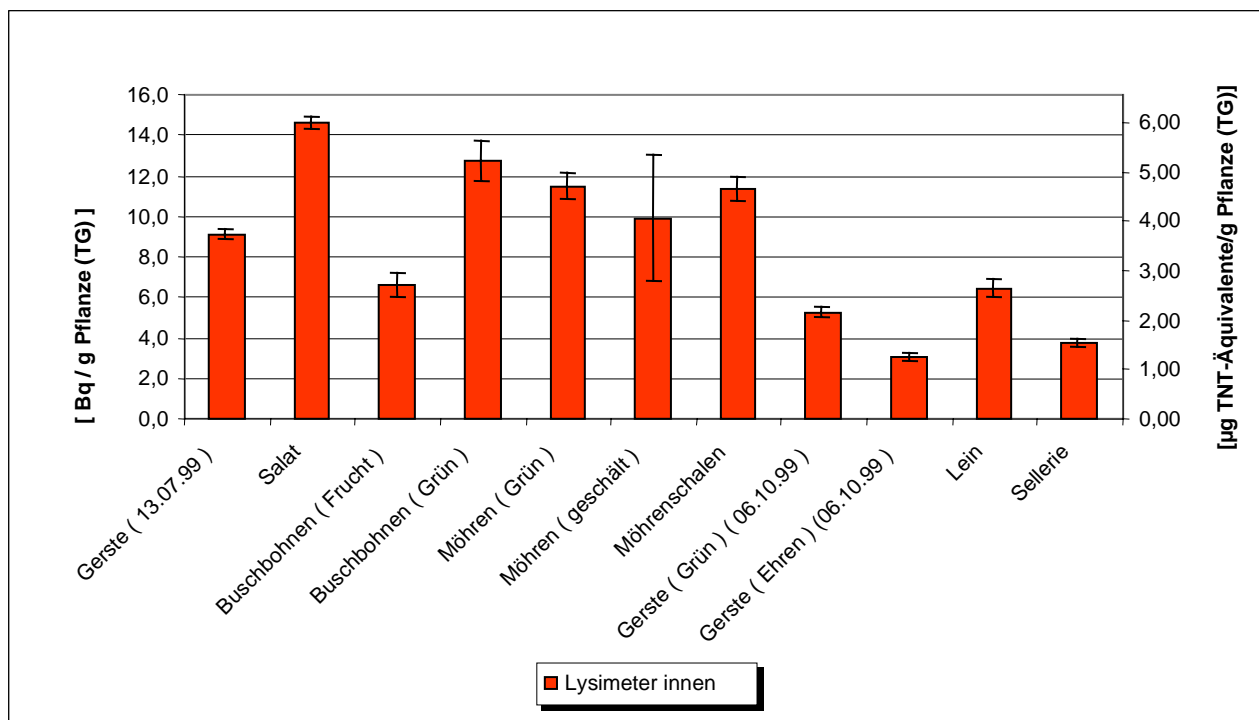


Abb. 4: Gesamtradioaktivität in den Pflanzen

Chemische Analytik des Sickerwassers

Die Analysenergebnisse (Tab. 7) zeigen, dass es einige Zeit benötigt, bis selbst mobile Stoffe wie z. B. Nitrat oder auch lösliches DOM (DOC) durch den sanierten Boden und den darunter liegenden sandigen Unterboden migriert sind. Deutlich wird, dass der hohe Nitratgehalt des sanierten Bodens sehr hohe Nitratwerte im Sickerwasser nach sich zieht. Des weiteren stellen sich hohe DOC-Werte im Sickerwasser ein. Bei der Aufarbeitung der Proben zeigt sich, dass der weitaus größte Teil der Radioaktivität sehr polar ist und z. B. von RP-18-Säulen nicht gebunden wird. Dies bedeutet, dass TNT und definierte Metabolite nicht in nachweisbaren Mengen im Sickerwasser vorhanden sind, da sie aus der wässrigen Phase extrahierbar wären.

Tab. 7: Analyse des Sickerwassers

Entnahme- datum	Sickerwasser- menge	Gesamtradioaktivität			NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	DOC
		[Bq/ml]	[mg TNT- Äquiv./ kg Boden]	% der im Lysimeter vorhandenen Gesamtaktivität	[mg/l]	[mg/l]	[mg/l]
16.07.99	40,5	< 0,1	< 0,5	–	–	131	21
02.09.99	39,5	0,1	< 0,5	1,98 × 10 ⁻³	4	500	38
15.10.99	39,0	0,3	0,1	5,66 × 10 ⁻³	59	1482	105
26.11.99	47,0	0,4	0,2	8,58 × 10 ⁻³	57	2831	146
10.12.99	44,0	1,3	0,5	2,43 × 10 ⁻²	29	4061	228
14.12.99	55,5	1,6	0,7	3,93 × 10 ⁻²	13,6	2644	268
23.12.99	18,5	1,8	0,7	1,51 × 10 ⁻²	7,3	2491	216
27.12.99	37,5	2,8	1,1	4,71 × 10 ⁻²	4,8	2393	358
04.01.00	53,0	3,5	1,4	8,29 × 10 ⁻²	n.b.	n.b.	n.b.

n. b.: nicht bestimmt

Ökotoxikologische Untersuchungen

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der ökotoxikologischen Untersuchungen aufgeführt. Am auffälligsten ist der vollständige Rückgang in der Toxizität (Mortalität) im Regenwurmtest, während sich die Ergebnisse in den weiteren ökotoxikologischen Untersuchungen nicht wesentlich von den Reaktoruntersuchungen unterscheiden. Des Weiteren ist ein signifikanter Rückgang in der löslichen Stickstofffraktion zu verzeichnen. Unterschiede zwischen den Freilandlysimeter- und den Reaktoruntersuchungen bestehen zum einen darin, dass in den Lysimetern infolge von Niederschlägen Auswaschung sowie durch den Anbau von Kulturen eine Aufnahme in die Pflanze stattfinden kann. Es liegt nahe, dass auf zumindest einem dieser Wege die für die Regenwurmtoxizität verantwortlichen Substanzen aus dem Boden eliminiert wurden. Zu dem jetzigen Zeitpunkt kann noch keine Aussage getroffen werden, ob die Stickstoffgehalte die Ursache für die Toxizität darstellen.

Tab. 8: Sanierungsverfahren der Firma Umweltschutz Nord - Ökotoxikologische Analytik während der Versuche in Freilandlysimetern im Rahmen der Untersuchungen zum Langzeitverhalten

	Sanierungsende (26.05.99)	Herbstprobenahme (nach 1. Vegetations- periode; 18.10.99)
Eluatuntersuchungen		
Leuchtbakterientest EC₅₀ [%]	62	--
G_L-Wert	8	6
Daphnientest EC₅₀ [%]	42	--
G_D-Wert	4	1
Algentest EC₅₀ [%]	28	--
G_A-Wert	16	2
Nährstoffgehalte im Eluat:		
P [mg/l]	3	4
NH₄⁺-N [mg/l]	72	4
NO₃⁻-N [mg/l]	50	35
Feststoffuntersuchung		
Ammoniumoxidation [ng NO₂⁻-N/(g×min)]	89 ± 12	12 ± 1
Basalatmung [µg/(g×h)]	4 ± 0,1	4 ± 0,3
SIR [µg/(g×h)]	12 ± 1,0	12 ± 2,3
Regenwurm-Mortalität [%]	100	0

--: nicht berechenbar

4.3 Ergebnisse zum Verfahren der Firma Plambeck ContraCon

Die Ergebnisse zum Verfahren der Firma Plambeck ContraCon weisen große Ähnlichkeiten zu den bereits dargestellten Resultaten auf, so dass auf eine gesonderte Darstellung verzichtet wird.

4.4 Ergebnisse zum Verfahren der Firma Wisstrans

Der Abbau der Kontamination durch Weißfäulepilze nach dem Verfahren der Firma Wisstrans erfolgt erfahrungsgemäß deutlich langsamer als bei den Verfahren der Firmen Umweltschutz Nord und Plambeck ContraCon. Nach einer Laufzeit von sieben Monaten stagnierte der Abbau trotz mehrmaligem weiteren Animpfen mit Pilzmycel. Nach einem Jahr waren ca. 90 %

sowohl der originären TNT-Kontamination, der Metabolite 4-A-2,6-DNT und 2-A-4,6-DNT als auch des zugesetzten ^{14}C -TNT abgebaut (bezogen auf die ≤ 5 mm gesiebte Bodenprobe).

4.5 Ergebnisse zum Verfahren der Firma S+G (PAKs)

In Abbildung 5 ist das Abbauverhalten der PAK innerhalb eines Zeitraums von 4 Monaten dargestellt. Deutlich wird, dass die 2-Ring PAK (im wesentlichen Naphthalin) und die 3-Ring PAK relativ schnell abgebaut werden. Hier zeigt sich der Einfluss der Vorbehandlung der Böden, durch die offensichtlich die Verfügbarkeit der PAKs durch Aufschmelzen der Teerklumpen signifikant vergrößert wurde. Auch der Abbau der 4-Ring PAKs hat innerhalb der Versuchszeit bereits deutlich eingesetzt. Die 5- und 6-Ring PAKs liegen nur in geringeren Mengen bei dem bearbeiteten Boden vor, so dass sich wegen der kurzen Versuchszeit noch keine Aussagen hinsichtlich einer Festlegung in die Humusmatrix treffen lassen. Wie bei den TNT-Versuchen zeigt sich auch bei dem PAK-Versuch, dass sich die zugesetzten ^{14}C -markierten PAKs analog den in der Kontamination vorliegenden verhalten. Entsprechend dem schnellen Abbau von ^{14}C -Phenanthren konnten entsprechende ^{14}C -CO₂-Werte in der Abluft gemessen werden.

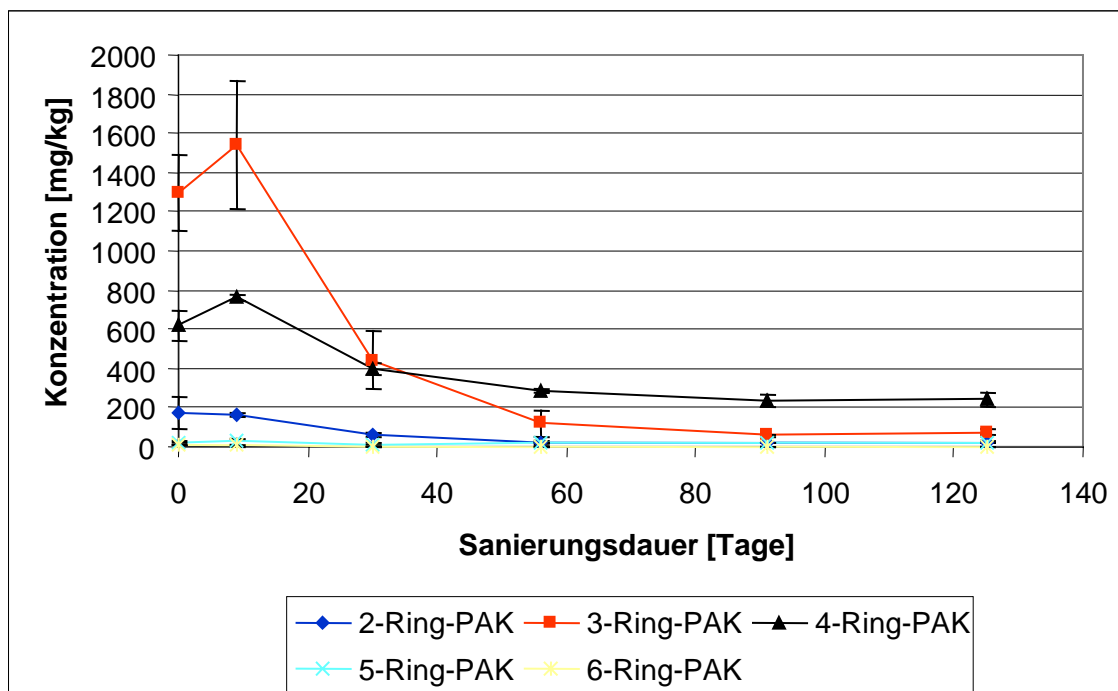


Abb. 5: Abbauverhalten der PAKs nach dem Verfahren der Firma S+G (bezogen auf die ≤ 5 mm gesiebte Bodenprobe).

Da ökotoxikologische Untersuchungen nur zu Beginn und am Ende der Sanierungssimulation durchgeführt werden, können über den Verlauf der Toxizität noch keine Aussagen getroffen werden. Zu Beginn war eine hohe Toxizität in den aquatischen Testsystemen mit Leuchtbakterien und Daphnien zu verzeichnen. Im Algentest trat dagegen eine Wachstumsstimulation auf. Bei den terrestrischen Untersuchungen wurde eine Mortalität von 100 % bei *Eisenia fetida* ermittelt.

5 Ausblick

Aus den Ergebnissen zur Sanierungssimulation wird deutlich, dass die gewählte Vorgehensweise zur Dotierung eines heterogenen Bodens mit radioaktivem Material geeignet ist, Informationen über den Verbleib von Altlasten unter realen Sanierungsbedingungen zu erhalten, da ein vergleichbares Abbauverhalten von zugesetzter und originärer Kontamination erzielt wird.

Ein Maßstab von 2 m³ stellt eine ausreichende Größe für einen Simulationsversuch dar.

Erste Ergebnisse aus den Langzeituntersuchungen deuten darauf hin, dass auch Sanierungstechniken, die auf einer Schadstoff-Festlegung beruhen, geeignete Verfahren zur Bodendekontamination darstellen können.

Eine umfassende Beurteilung von Sanierungsverfahren, die auf einer Schadstoff-Festlegung beruhen, ist jedoch erst nach Abschluss der Untersuchungen möglich.

6 Eigene Veröffentlichungen und Diplomarbeiten

Hund-Rinke, K. und W. Kördel (2000): Biologische Bodensanierung unter der Lupe. Umwelt, 30, 1/2, 51-53.

7 Literaturverzeichnis

1. **DIN 38412, Teil 30** (1989): Testverfahren mit Wasserorganismen. Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Daphnien über Verdünnungsstufen.
2. **DIN 38412, Teil 33** (1991): Testverfahren mit Wasserorganismen. Bestimmung der nicht giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Grünalgen (Scenedesmus-Chlorophyll-Fluoreszenztest) über Verdünnungsreihen.
3. **DIN EN ISO 11348-3** (1999): Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest); Teil 3: Verfahren mit gefriergetrockneten Bakterien.
4. **ISO 11268-1** (1993): Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.4 Verbundvorhaben 5: Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen bei der biologischen Bodensanierung

9.4.3 Dynamisches Beetverfahren: Analyse der Bindungsstrukturen nicht extrahierbarer TNT-Transformationsprodukte (TV 5.3.1)

Dr. Eberhard v. Löw

Dr. Andreas Banholczer

Dr. Dirk Bruns-Nagel

Dipl. Ing. Jürgen Fründt

Prof. Dr. Diethard Gemsa

Fachbereich Humanmedizin d. Philipps-Universität Marburg,
Zentrum für Hygiene und Med. Mikrobiologie, Bereich Umwelthygiene
Pilgrimstein 2
D-35037 Marburg

Förderkennzeichen: 1481166

Laufzeit: 01.01.1999 – 30.04.2000

1 Zusammenfassung

In dem hier vorgestellten Projekt wurde das dynamische Beetverfahren vergleichend mit zwei weiteren biologischen Methoden zur Sanierung TNT-kontaminierter Böden im Hinblick auf die Bindungsstruktur und die Remobilisierbarkeit der TNT-Umwandlungsprodukte untersucht. Beim dynamischen Beetverfahren wird in einer anaeroben Phase das TNT durch die autochone Mikroflora des Bodens hauptsächlich zu ADNT und DANT reduziert. Diese Metabolite werden in einer sich anschließenden aeroben Phase immobilisiert. Dabei wird eine kovalente Bindung an die Bodenmatrix oder Bindung durch Heterozyklenbildung angenommen (Humifizierung). Als Zuschlagsstoff finden organische Zuschlagsstoffe definierter Zusammensetzung Verwendung.

In diesem Projekt wurde Festkörper- ^{15}N -NMR zur Aufklärung des Bindungszustandes der Metabolite benutzt. Zur Bewertung der Remobilisierbarkeit wurden Versuche zum Einfluss physikalischer Parameter auf das Bodengefüge (Zermahlen, mehrmaliges Einfrieren und Auftauen, Wasserdampfextraktion), zum Einfluss chemischer Parameter (pH-Wert/saurer Regen, Anwesenheit von Komplexbildnern) und zu biogenen Einflüssen (radikalbildende Enzyme, Huminstoff abbauende Pilze, Pflanzenbewuchs) durchgeführt. Bei den Versuchen zur physikalischen bzw. chemischen Remobilisierung wurden dabei extremste Bedingungen gewählt, wie sie in der Natur praktisch nicht auftreten.

Im Labormaßstab (2 kg TG Boden) wurden Kompostierungen eines TNT-kontaminierten Bodens vom ehemaligen Sprengstoffwerk „Tanne“, Niedersachsen durchgeführt, wobei der Boden mit ^{15}N -markiertem TNT (für Festkörper- ^{15}N -NMR und Remobilisierung durch Pflanzenbewuchs) bzw. ^{14}C -markiertem TNT (für Massenbilanz und die übrigen Remobilisierungsversuche) dotiert wurde. Die TNT-Ausgangskonzentration betrug in beiden Böden ca. 7 g TNT/kg TG. Die ^{14}C -Bilanz ergab, dass innerhalb 93 d 90 % des TNT immobilisiert wurden. 11 % des ursprünglich dotierten TNT wurden in der Huminsäurefraktion, 12 % in der Fulvinsäurefraktion und 67 % in den unlöslichen Huminstoffen wiedergefunden. Beim Verfassen dieses Beitrags waren von den Versuchen zur Remobilisierung nur die Simulation eines 100-jährigen Regens und der Versuch zum Einfluss des Komplexbildners EDTA abgeschlossen. Dabei konnte bei der Simulation des sauren Regens keine messbare Aktivität aus der Bodenmatrix gelöst werden. Mit höheren EDTA-Konzentrationen ($> 0,01$ mol/L) ließen sich bis zu 30 % der insgesamt in der betreffenden Bodenprobe gefundenen Aktivität remobilisieren. Nach dem bisherigen Stand des Projektes stellt das dynamische Beetverfahren eine Methode dar, mit der sich selbst hoch kontaminierte Böden sanieren lassen, wobei eine dauerhafte Einbindung des TNT in die Bodenmatrix erzielt wird.

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

Die Kontamination des Bodens und des Grundwassers ehemaliger Rüstungsstandorte mit dem Sprengstoff 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) stellt aufgrund der Persistenz und der akut toxischen und mutagenen Wirkung des TNT und seiner Metabolite ein großes ökologisches und toxikologisches Problem dar. Verfahren zur Dekontamination dieser Böden kommt daher eine besondere Bedeutung zu. Zur Zeit erfolgt eine Dekontamination meist durch Verbrennen der

belasteten Böden. Da bei diesem Verfahren erhebliche Emissionen auftreten und die biologische Aktivität des Bodens zerstört wird, finden biologische Verfahren zur Bodensanierung, bei denen diese Probleme nicht auftreten, immer mehr Beachtung. Das dynamische Mietenverfahren, das gemeinsam von der Universität Marburg und der Plambeck ContraCon GmbH, Cuxhaven, entwickelt wurde, stellt ein solches dar. Seit Mai 98 wird dieses Verfahren maßstabsgerecht am Standort des ehemaligen Werks „Tanne“ bei Clausthal-Zellerfeld, Niedersachsen, erprobt (s. Kapitel 9.5.2 des Leitfadens). Bei diesem Sanierungsverfahren wird TNT während einer anaeroben Phase zunächst mikrobiell metabolisiert. In einer anschließenden aeroben Phase erfolgt dann eine irreversible Bindung der Metabolite an die Humusmatrix, die als Humifizierung bezeichnet wird [4].

Zu Beginn des Verfahrens wird der zu dekontaminierende Boden mit organischen Zuschlagsstoffen definierter Zusammensetzung durchmischt, anschließend verdichtet und nicht belüftet. Unter diesen anaeroben Bedingungen setzt bald die Verwertung des Substrates durch die autochtone Mikroflora des Bodens ein. Durch Cometabolismus werden die Nitrogruppen des TNT zu Aminogruppen reduziert. Dabei entstehen vor allem Amino-Dinitrotoluole (ADNT) und Diamino-Nitrotoluole (DANT). Die Bildung des vollständig reduzierten Produktes 2,4,6-Triaminotoluol (TAT) ist aufgrund des dafür erforderlichen hohen Redoxpotentials unwahrscheinlich. Als Zwischenprodukte des mikrobiellen TNT-Abbaus werden Nitroso- und Hydroxylamino- aromate gebildet, die spontan zu Azoxynitrotoluenen kondensieren können [10]. Ferner ist die Bildung von konjugierter Reduktionsprodukte des TNT bekannt [2].

Die anaerobe Phase ist nach ca. 40 – 50 Tagen abgeschlossen. In der sich nun anschließenden aeroben Phase wird durch intensives Durchmischen und Belüften des Bodens der Sauerstoffmangel aufgehoben. Die Belüftung des Bodens bewirkt eine nahezu vollständige Einbindung der Metabolite in die Bodenmatrix. Dabei steigt die Temperatur des Komposts auf 50 – 60°C an. Nach weiteren 40 – 50 Tagen ist die aerobe Phase abgeschlossen. Durch das dynamische Mietenverfahren ließ sich in einem kontaminierten Boden vom ehemaligen Werk „Tanne“ (TNT-Konzentration: 424 mg/kg TS Boden) eine Reduzierung des TNT um 99,5% erreichen [14]. Auch die Konzentrationen der Metabolite wurden dabei stark vermindert: Der Wiederfindungsgrad der Nitro- und Aminoaromaten, berechnet auf der Basis der ursprünglich vorhandenen Konzentration, betrug in diesem Fall 0,7%. Die damit einhergehende Detoxifizierung ließ sich im Leuchtbakterientest mit dem Bakterium *Vibrio fischeri* nachweisen [14].

In Laborversuchen, in denen Böden, die mit ¹⁴C-markiertem TNT dotiert und in einem dem hier beschriebenen ähnlichem anaerob/aeroben Verfahren kompostiert wurden, konnte gezeigt werden, daß über 80% der eingebrachten Radioaktivität und damit des TNT und seiner Metabolite immobilisiert wurden [5]. Eine Aussage über den Bindungszustand der Schadstoffe an die Bodenmatrix, und damit über eine mögliche Remobilisierbarkeit, lassen solche Untersuchungen allerdings nicht zu. Zur Bewertung der Eignung eines Dekontaminationsverfahrens sind diese Kenntnisse aber unerlässlich. Denn nur, wenn die gebundenen Schadstoffe oder ihre Umwandlungsprodukte selbst langfristig nicht wieder bioverfügbar und metabolisierbar werden, ist eine Gefährdung durch diese auch über lange Zeiträume ausgeschlossen.

Zur Charakterisierung des Bindungszustandes stickstoffhaltiger Xenobiotika an die Bodenmatrix eignet sich in besonderem Maße die Festkörper-¹⁵N-NMR-Spektroskopie [9]. Mit

Hilfe dieser Technik können aufgrund des großen chemischen Verschiebungsbereichs des ^{15}N -Isotops zahlreiche stickstoffhaltige funktionelle Gruppen, wie Aniline, Anilide, Indole, Pyrrole, Imine und Pyridine in Huminstoffen deutlich voneinander unterschieden werden [13]. Die geringe natürliche Häufigkeit des ^{15}N -Isotops und sein niedriges gyromagnetisches Verhältnis bedingen allerdings eine äußerst geringe Empfindlichkeit der Methode. Neben der systematischen Optimierung aller Aufnahmeparameter bietet insbesondere die Verwendung von ^{15}N -markierten Verbindungen eine Möglichkeit, diese Schwierigkeit zu umgehen [3; 9].

Festkörper- ^{15}N -NMR Untersuchungen im Boden gebundener TNT Rückstände nach einer anaerob/aeroben Kompostierung von ^{15}N -markiertem TNT wurden bereits durchgeführt [3; 9]. Dabei wurden in den NMR-Spektren Signale nachgewiesen, die sich kovalent gebundenen Umwandlungsprodukten der reduzierten Nitrogruppen des TNT zuordnen lassen, wie Phenoxazone, Hydrazine, Anilinohydrochinone und Aminodiphenylamine. Daneben wurden heterozyklische Strukturen, wie Pyrrole, Imidazole, Indole und Carbazole nachgewiesen. Diese Verbindungen bilden sich u.a. bei der Addition aromatischer Amine an Chinone in den Huminstoffen und anschließender Oxidation [11]. Die quantitative Auswertung der Peakflächen in den Festkörper-NMR-Spektren ergab, dass 23,3 % des dotierten ^{15}N in heterozyklischen Strukturen und 15 % in Form von sonstigen kovalent gebundenen Produkten, wie Anilinderivaten, Phenoxazonen und Hydrazinen vorlag. 15,2 % des ^{15}N lagen in Anilinen und Phenylaminen und 1,9 % in Nitrofunktionen vor. Eine Untersuchung der Verteilung des ^{15}N auf die einzelnen Huminfraktionen zeigte, dass in den Fulvosäuren überwiegend ^{15}N in Heterozyklen enthalten war, während die Huminsäuren und die unlöslichen Huminstoffe in etwa gleichen Teilen ^{15}N in Form von Heterozyklen und kovalent gebundenen Abbauprodukten enthielten.

Diese bisherigen Ergebnisse stützen die Annahme der Immobilisierung von Abbauprodukten des TNT durch kovalente Einbindung in die Bodenmatrix durch das dynamische Beetverfahren. Ein Ziel des hier vorgestellten Projekts war daher eine weitergehende Analyse der Bindungsstrukturen der TNT-Transformationsprodukte in den einzelnen Huminfraktionen mit Hilfe der Festkörper ^{15}N -NMR. Gleichzeitig wurden Versuche zur Remobilisierung der eingebundenen Rückstände durchgeführt, um die Langzeitstabilität der eingebundenen Transformationsprodukte bewerten zu können. Diese Arbeiten wurden vergleichend mit zwei weiteren biologischen Sanierungsverfahren, die von den Firmen Umweltschutz Nord (s. Kapitel 9.5.1 des Leitfadens) bzw. WISSTRANS (s. Kapitel 9.5.3 des Leitfadens) entwickelt, und vom Fraunhofer Inst. f. Grenzflächen- u. Bioverfahrenstechnik (FHIGB), Stuttgart (s. Kapitel 9.4.4 des Leitfadens), bzw. der Universität Jena (s. Kapitel 9.4.5 des Leitfadens) untersucht wurden, durchgeführt.

Dazu wurde eine Kompostierung im Labormaßstab (2 kg Trockengewicht (TG) kontaminierter Boden) eines mit ^{15}N -markiertem TNT dotierten Bodens durchgeführt. Für die Remobilisierungsversuche wurde simultan eine Kompostierung eines mit ^{14}C -markiertem TNT dotierten Bodens durchgeführt. Zur Bewertung der Remobilisierbarkeit sollte die Freisetzung der gebundenen Rückstände bei Zerstörung des Bodengefüges durch Zermahlen des Bodens bzw. durch wiederholtes Frieren und Auftauen (Frostsprengung) untersucht werden. Auch Komplexbildner wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), pH-Wert Verschiebungen im Boden und Feuchtigkeit können eine Freisetzung zuvor gebundener Schadstoffe bewirken, was in entsprechenden Versuchen (Extraktion mit EDTA, Simulation eines tausendjährigen sauren Regens [7], Extraktion mit Wasserdampf) untersucht wurde. Ferner ist die Bioverfügbarkeit der humifizierten Schadstoffe von besonderem Interesse für die Bewertung

des Sanierungserfolges. Deshalb wurden verschiedene Pflanzen (Buschbohne, Radieschen, Weidelgras) auf dem kompostierten Boden gezogen. Die genannten Pflanzen wurden ausgewählt, da ihr Verhalten bei der Aufzucht auf TNT-kontaminierten Flächen bereits gut untersucht ist [6; 12]. Als weitere mögliche biogene Remobilisierungswege wurden der Einfluss Huminstoff-abbauender Pilze und radikalbildender Enzyme untersucht.

3 Verwendete Methoden und Durchführung

3.1 Durchführung der Kompostierungen

Für die Kompostierungen wurde TNT-kontaminierter Boden (1,192 g TNT/kg TS Boden) vom ehemaligen Sprengstoffwerk „Tanne“ in Clausthal-Zellerfeld, Niedersachsen, verwendet. Mit diesem Boden wurde zunächst im Frühjahr 1999 ein Vorversuch durchgeführt, in dem die optimalen Bedingungen für die Kompostierung bestimmt wurden.

Für die Versuche mit dotierten Böden wurden je 2 kg TS des gesiebten Bodens mit 12 g ¹⁵N-markiertem TNT (¹⁵N-TNT) bzw. 8,195 µCi ¹⁴C-markiertem TNT (¹⁴C-TNT) versetzt. Damit in beiden Böden vergleichbare Ausgangskonzentrationen des TNT vorlagen, wurde dem mit ¹⁴C-TNT dotierten Boden noch 12 g nichtmarkiertes TNT zugesetzt. Dann wurden beide Böden 2 Wochen bei 4° C im Dunkeln gealtert.

Nach der Alterung wurden beide Böden auf 40 % Feuchte eingestellt und mit den Zuschlagstoffen vermischt. Die Zuschlagstoffe wurden zuvor auf 65 % Feuchte eingestellt. Der Massenanteil der Zuschlagsstoffe betrug 22,5 %, bezogen auf das Trockengewicht des Bodens. Anschließend wurden die so vorbereiteten Böden in je einen Bioreaktor aus Glas eingebracht und verdichtet. Während der anaeroben Phase der Kompostierung wurden Temperatur und pH-Wert des Kompostes, ferner der Sauerstoffgehalt der Abluft kontrolliert. Auch der Wassergehalt des Kompostes wurde kontrolliert und ggf. neu eingestellt. Bei dem Reaktor, der den mit ¹⁴C-TNT dotierten Boden enthielt, wurde zusätzlich die Radioaktivität im Sickerwasser und in der Abluft bestimmt. Die Abluft wurde dazu durch Natronlauge, c = 1 mol/L, geleitet, um durch Mineralisation des TNT gebildetes CO₂ zu binden. Ferner wurde der Kompost wöchentlich durchmischt, belüftet und erneut verdichtet. Dem ¹⁵N-TNT dotierten Boden wurde in regelmäßigen Abständen je drei Proben entsprechend 5 g TG entnommen und mittels HPLC analysiert, um den Abbau des TNT zu verfolgen. Um eine Auskühlung des Kompostes aufgrund des geringen Volumens zu vermeiden, wurde seine Temperatur durch eine Temperaturnachführung konstant gehalten. Dazu wurde durch eine um die Bioreaktoren gelegte Manschette Wasser geleitet, dessen Temperatur 0,1°C unter der gemessenen Temperatur des Kompostes lag. Ferner wurden die Bioreaktoren nach außen mit Ummantelungen aus Schaumstoff isoliert. Die anaerobe Phase wurde nach 26 d beendet.

In der sich anschließenden aeroben Phase wurden die Komposte gelockert und mit Hilfe einer Membranpumpe belüftet. Ansonsten wurden die Komposte wie in der anaeroben Phase behandelt und dieselben Parameter kontrolliert. Auch die Beprobung wurde wie in der anaeroben Phase durchgeführt. Die aerobe Phase wurde nach 96 d beendet. Im Anschluß wurde dem mit ¹⁵N-TNT dotierten Kompost eine Probe entsprechend 160 g TG für die Festkörper ¹⁵N-NMR-Analytik entnommen, und dem mit ¹⁴C-TNT dotierten Kompost 8 Proben

mit je entsprechend 5 g TG zur Erstellung einer Bilanz zum Verbleib der Radioaktivität. Die Aufarbeitung der Proben ist in Abschnitt 3.3.1. beschrieben.

3.2 Beschreibung der Versuche zur Remobilisierung der eingebundenen TNT-Rückstände

Im folgenden werden nur die Versuche zur Remobilisierung beschrieben, die selbst durchgeführt wurden. Die Untersuchungen zur Remobilisierbarkeit durch mechanische Zerstörung des Bodengefüges, durch Wasserdampfextraktion, durch Radikal-bildende Enzyme und durch Huminstoff-abbauende Pilze wurden an der Universität Jena durchgeführt. Sie sind im Beitrag der Universität Jena zu diesem Leitfaden näher beschrieben (s. Kapitel 9.4.5 des Leitfadens).

3.2.1 Remobilisierung durch Zerstören des Bodengefüges bei wiederholtem Frieren und Auftauen des Kompostes

Je 4 Proben des ^{14}C -TNT dotierten Kompostes einer Menge entsprechend 100g TG wurden auf eine Feuchte von 40% der maximalen Wasserhaltekapazität eingestellt und in Inkubationsgefäße gefüllt. Die Inkubationsgefäße wurden mit Gaswaschflaschenaufsätzen verschlossen, so dass die Proben mit Hilfe einer Membranpumpe mit Luft durchströmt werden konnten. Anschließend wurden zwei Proben bei -20°C eingefroren und die zwei verbleibenden Proben als Kontrollen bei Raumtemperatur (RT) aufbewahrt. Nach 23 h wurden die tiefgefrorenen Proben aufgetaut, und das entstandene CO_2 in 50 mL Natronlauge, $c = 0,2\text{ mol/L}$, absorbiert. Dazu wurde das jeweilige Inkubationsgefäß an eine Sicherheitswaschflasche, die die Natronlauge enthielt, angeschlossen und mit Hilfe einer Membranpumpe für 1 h mit Raumluft durchströmt. Die Menge des durch die Natronlauge gebundenen CO_2 wurde mittels β -Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt. Auch das in den Kontrollen gebildete CO_2 wurde so bestimmt. Nachdem durch Wiegen der Wassergehalt der Proben und der Kontrollen kontrolliert und ggf. neu eingestellt wurde, wurden die Proben bei $+40^\circ\text{C}$ für 23 h inkubiert. Anschließend wurde der beschriebene Zyklus wiederholt; insgesamt für die Dauer eines Monats.

Danach wurden die Proben für die Dauer eines Monats bei RT inkubiert, um der Mikroflora des Bodens günstige Bedingungen zur Mineralisation eventuell mobilisierter Rückstände zu schaffen. Das gebildete CO_2 wurde wie oben beschrieben bestimmt. Anschließend folgte wieder für die Dauer eines Monats ein weiterer Zyklus des Frierens/Auftauens. Am Ende jedes Zyklus (Frieren/Auftauen bzw. Inkubieren bei RT) wurden Bodenproben genommen und die wässrig bzw. organisch extrahierbare Aktivität β -szintillatorisch bestimmt. Die Fulvo-, Huminsäuren und unlöslichen Huminstoffe wurden als Summenparameter „nicht extrahierbare Rückstände“ durch Verbrennung des Rückstandes und Messung der Aktivität des entstandenen CO_2 bestimmt.

3.2.2 Remobilisierung durch Auflösung metallorganischer Komplexe mit EDTA

Je drei Proben entsprechend 2 g TG des ^{14}C -TNT dotierten Komposts wurden mit Lösungen von Dinatrium-EDTA der Konzentrationen 0,01 mol/L, 0,025 mol/L und 0,05 mol/L versetzt und 90 min geschüttelt. Anschließend wurde zentrifugiert, die überstehende Lösung abdekantiert und die Extraktion noch einmal wiederholt. Die Verschleppung wurde gravimetrisch durch Wiegen vor und nach der jeweiligen Extraktion bestimmt. Als Kontrolle wurden 3 Proben mit destilliertem Wasser zweimal aufeinanderfolgend extrahiert. Die Aktivität der Überstände wurde β -szintillatorisch gemessen. Anschließend wurden die wässrig und organisch extrahierbaren Bestandteile und der Summenparameter „nicht extrahierbare Rückstände“ bestimmt (siehe Abschn. 3.2.1.).

3.2.3 Remobilisierung durch Simulation eines 1000-jährigen sauren Regens

Durch die Simulation eines 1000-jährigen sauren Regens sollte der Einfluß einer pH-Wertverschiebung im Boden zu kleineren pH-Werten (zunehmend saures Milieu) untersucht werden. Dazu wurden 3 Proben des mit ^{14}C -TNT dotierten Kompostes entsprechend 5 TG mit 100 mL einer wässrigen Lösung aus Salpetersäure und Schwefelsäure im Verhältnis 2:3 mit $\text{pH} = 5$ versetzt und 18 h bei $+30^\circ\text{C}$ geschüttelt. Anschließend wurde zentrifugiert und abdekantiert. Ein Aliquot der abdekantierten Lösung wurde filtriert und die Radioaktivität des Filtrats mittels β -Szintillation gemessen. Die Verschleppung wurde gravimetrisch durch Wiegen vor und nach der jeweiligen Extraktion bestimmt. Die beschriebene Extraktion wurde insgesamt 10 mal durchgeführt. Zum Schluss wurden die verbleibenden Bodenpellets bei RT getrocknet, homogenisiert und der Summenparameter „nicht extrahierbare Rückstände“ bestimmt (siehe Abschn. 3.2.1.). Als Kontrolle diente eine Probe, die analog behandelt wurde, aber statt mit der Säurelösung lediglich mit destilliertem Wasser extrahiert wurde.

3.2.4 Remobilisierung durch Pflanzenbewuchs

Zum Zeitpunkt des Verfassens dieses Beitrags war mit den Versuchen zur Remobilisierung durch Pflanzenbewuchs noch nicht begonnen worden. Die geplante Durchführung dieser Versuche soll hier kurz dargestellt werden. Als Versuchspflanzen wurden Buschbohne, Radieschen und Weidelgras ausgewählt, da der TNT-Metabolismus dieser Spezies bereits teilweise bekannt ist, und auch Untersuchungen über ihren Einfluß auf Konzentration und Spektrum von TNT und seinen Metaboliten im Boden vorliegen [6; 12]. Als Substrat wird der mit ^{15}N -TNT dotierte Kompost verwendet. Gleichzeitig werden die Pflanzversuche mit den mit ^{15}N -TNT dotierten Komposten durchgeführt, die nach den Verfahren der Umweltschutz-Nord und der WISSTRANS hergestellt wurden. Diese werden von den jeweiligen Projektpartnern (FhIGB Stuttgart, bzw. Universität Jena) zur Verfügung gestellt.

Auf jedem Kompost werden für Buschbohne und Radieschen je 6 Pflanzen/Spezies einzeln in Aufzuchtgefäßen mit 50 mL Fassungsvermögen kultiviert. Für Weidelgras werden jeweils 6 Aufzuchtgefäße/Kompost mit je einer Oberfläche von ca. 25 cm^2 , und 50 mL

Fassungsvermögen eingesäht. Die Pflanzen keimen direkt in den sanierten Böden. Vor dem Befüllen der Aufzuchtgefäße werden die Komposte durch Mörsern gut homogenisiert. Die Pflanzen werden mit einer Na-Dampflampe 12 h am Tag beleuchtet und täglich gewässert. Nach frühestens einem Monat werden die Pflanzen geerntet, von anhaftendem Substrat durch Waschen befreit und anschließend in die Pflanzenorgane (Wurzeln, Stengel und Blätter) zerlegt. In den getrockneten Pflanzenorganen wird dann mittels Isotopenverhältnis-Massenspektrometrie (IRMS) das Isotopenverhältnis $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ bestimmt, ferner mittels Elementaranalyse (CHN-Analyse) der Gehalt an Stickstoff. Durch die Kombination der gewählten Analyseverfahren ist eine Quantifizierung der remobilisierten ^{15}N -TNT Rückstände möglich.

3.3 Beschreibung der verwendeten analytischen Methoden

3.3.1 Aufarbeitung der Bodenproben

3.3.1.1 Wässrige und organische Extraktion von Bodenproben

Die wässrige und organische Extraktion wurde für alle Proben, soweit nicht anders angegeben, wie folgt beschrieben durchgeführt.

Je ein Aliquot Kompost, entsprechend 5 g TG, wurde mit 15 mL destilliertem Wasser versetzt, 15 min mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert. Nach dem Abdekantieren wurde der Rückstand mit 15 mL Methanol (MeOH) versetzt, 15 min mit Ultraschall behandelt, zentrifugiert und abdekantiert. Diese organische Extraktion wurde noch zweimal wiederholt. Die Wiederfindungsrate des beschriebenen Extraktionsverfahrens beträgt in Bezug auf TNT für die HPLC-Analytik 64 %. Die Probe des ^{15}N -TNT dotierten Kompostes für die Festkörper ^{15}N -NMR Untersuchungen wurde anstelle mit MeOH mit Acetonitril (ACN) extrahiert. Die Proben, die dem ^{14}C -TNT dotierten Kompost zur Erstellung einer ^{14}C -Bilanz am Ende der Kompostierung entnommen wurden, wurden zur Bestimmung der Verschleppung vor und nach jedem Extraktionsschritt gewogen.

3.3.1.2 Huminstoffextraktion

Eine Extraktion und Trennung der Huminstoffe wurde mit der Probe für die Festkörper- ^{15}N -NMR Analytik und den Proben für die Erstellung der ^{14}C -Bilanz am Ende der Kompostierung durchgeführt. Dazu wurden die Proben nach der wässrigen und organischen Extraktion getrocknet, mit 20 mL NaOH, $c = 0,5 \text{ mol/L}$, versetzt und 30 min mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde zentrifugiert, abdekantiert, und die Extraktion noch zweimal wiederholt. Die Extraktionsüberstände wurden vereint, und mit konzentrierter HCl angesäuert. Anschließend wurde zentrifugiert, und die überstehende Lösung mit den gelösten Fulvinsäuren von den ausgefallenen Huminsäuren abdekantiert. Anschließend wurden die Huminsäuren mit NaOH, $c = 0,5 \text{ mol/L}$, wieder aufgelöst. Im Falle der Proben zur Erstellung der ^{14}C -Bilanz wurde die Verschleppung während der Huminstoffextraktion durch Wiegen des Rückstandes vor und nach jedem Extraktionsschritt bestimmt.

Die Lösungen der Fulvinsäuren und der Huminsäuren der Proben für die Festkörper- ^{15}N -NMR wurden bis auf ca. 10 mL eingeeengt und bei RT 48 h gegen 8 L destilliertes Wasser im Dunkeln dialysiert. Der verwendete Dialyseschlauch (Spectrapor) aus regenerierter Cellulose

hatte eine Trenngröße < 1000 Da. Nach der Dialyse wurde am Rotationsverdampfer bei 30°C bis zur Trockne eingengt.

3.3.2 HPLC-Analytik

Für die HPLC-Analytik wurde ein HPLC-System der Fa. Gynkotec, München, verwendet. Als Trennsäule wurde eine Nucleosil 120-3 C18 Säule (Länge 250 mm, Innendurchmesser 3 mm) verwendet (CS-Chromatographie Service, Langerwehe). Die Trennung der Analyte erfolgte durch Gradientenelution, ihre Identifizierung durch Vergleich ihrer Retentionszeiten und UV-Spektren mit denen eines Standards. Das verwendete HPLC-Verfahren ist in [1] genauer beschrieben.

3.3.3 Flüssigkeits- β -Szintillationsmessungen

3.3.3.1 β -Szintillationsmessungen flüssiger Proben

Die Messung der Radioaktivität aller flüssigen Proben wurde wie folgt beschrieben durchgeführt. Je 1 mL der Proben wurde mit 4 mL Szintillatorlösung (Rotiszint 22 eco, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe) versetzt und für ca. 1h stehen gelassen. Von den alkalischen Lösungen, die zum Auffangen des $^{14}\text{CO}_2$ verwendet wurden, wurden jeweils $400\ \mu\text{L}$ mit 4 mL der Szintillationslösung vermischt, um ein Ausfallen des Szintillators zu vermeiden. Danach wurden die Proben dreimal aufeinander folgend mit einem Flüssigkeits- β -Szintillationszähler (LSC) (Beckman LS 1801, Beckman Instruments, USA) ausgezählt. Die Zähldauer betrug 5 min, die Zähleffizienz lag stets über 90%. Anschließend wurde den Proben $10\ \mu\text{L}$ eines ^{14}C -TNT Standards entsprechend $3,035 \cdot 10^{-4}\ \mu\text{Ci}$ zugesetzt und erneut wie beschrieben ausgezählt. Bei jeder Messreihe wurde der Hintergrund einer Blindprobe, die wie die zu messenden Proben angesetzt war, aber keine Aktivität enthielt, mitgemessen. Aus den Mittelwerten der Messungen mit und ohne internen Standard wurde dann nach Abzug der Aktivität des Hintergrundes die ursprünglich in der Probe vorhandene β -Aktivität berechnet.

3.3.3.2 β -Szintillationsmessungen fester Proben

Die Bodenpellets, die nach der jeweiligen Extraktion zurückblieben, wurden im Oxidizer (Biological Oxydizer OX 500, R.J. Harvey Instruments Corp., USA) bei 904°C und einem Sauerstofffluss von $350\ \text{cm}^3/\text{min}$ verbrannt. Die Katalysatortemperatur betrug 700°C . Das freigesetzte $^{14}\text{CO}_2$ wurde in einem Flüssigkeitsszintillator (Oxysolve C-400, Zinnser Analytic, Frankfurt/Main) aufgefangen. Die Verbrennungsdauer betrug 4 min. Feuchte Proben wurden zweimal aufeinanderfolgend verbrannt. Die Aktivität der stark gelben bzw. braunen Lösungen der Fulvin- bzw. Huminsäuren wurden nach Eindampfen bei 60°C ebenfalls verbrannt. Die Aktivität der Proben wurde anschließend mit einem Beckman LS 6500 LSC dreimal aufeinanderfolgend ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die Zähldauer betrug 5 min, die Zähleffizienz lag stets über 80%. Eine Standardaddition wurde nicht durchgeführt.

3.3.4 Festkörper-¹⁵N-NMR-Analytik, IRMS- und CHN-Analytik

Zum Zeitpunkt des Verfassens dieses Beitrags lagen noch keine Ergebnisse der NMR-Analytik, der IRMS und der CHN-Analytik vor. Deshalb wird hier auf eine Beschreibung dieser Verfahren verzichtet. Das NMR-Verfahren, das in dieser Studie angewendet wird, ist in [3] ausführlich beschrieben.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Verlauf der Kompostierungen und der TNT-Humifizierung

Während der Kompostierungen wurden u.a. O₂-Gehalt der Abluft und die Temperatur des Kompostes kontrolliert. In Abbildung 1 ist der Verlauf beider Parameter für den mit ¹⁵N-TNT dotierten Kompost dargestellt. Während der anaeroben Phase war der Sauerstoffgehalt der Abluft meist kleiner 4 %. Ein genauere Wert lässt sich nicht angeben, da die verwendete Sauerstoffmeßzelle kleinere Werte nicht anzeigen kann. Die beiden erhöhten Werte sind auf Messungen unmittelbar nach der Bearbeitung (Belüftung) des Kompostes zurückzuführen. Zu Beginn der aeroben Phase schwankte der O₂-Gehalt zwischen 15 % und 20 %, um sich gegen deren Ende auf Werte um 20 % einzupendeln. Der geringere O₂-Gehalt zu Beginn der aeroben Phase korreliert mit dem Temperaturanstieg zu deren Beginn. Beides ist auf die gesteigerte Bioaktivität aerober Mikroorganismen in dieser Phase zurückzuführen. Diese Aktivität ist nach bereits 15 d weitgehend beendet, denn danach sinken Sauerstoffzehrung und Temperatur deutlich ab.

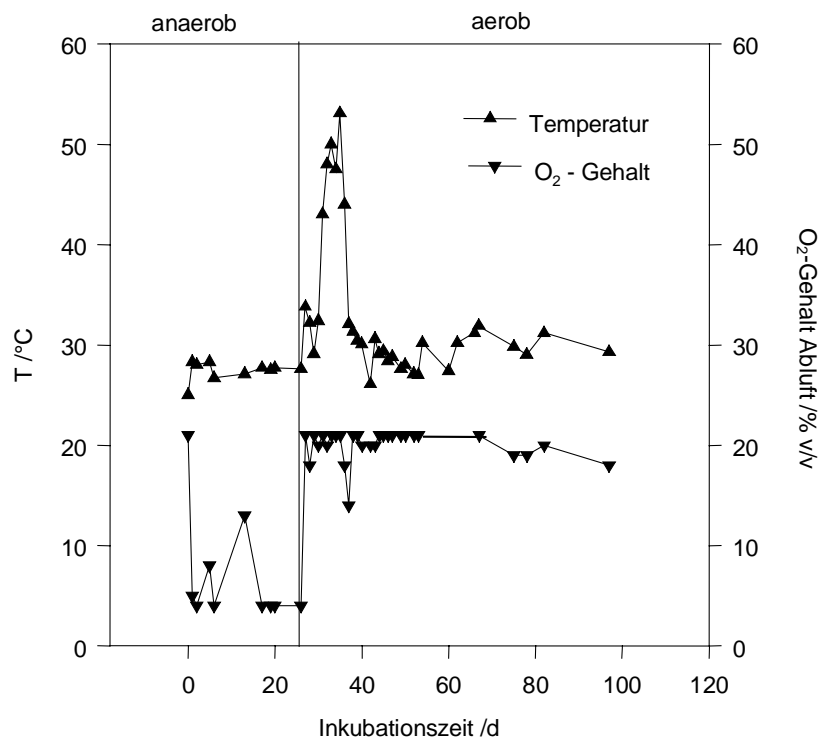


Abb. 1: Temperaturverlauf im Kompost und Verlauf des O₂-Gehalts in der Abluft für den mit ¹⁵N-TNT dotierten Kompost

Während der aeroben Phase sollte die Komposttemperatur auf 60 - 70° C steigen. Bei der hier beschriebenen Kompostierung wurden allerdings nur maximal 55° C erreicht. Dies ist auf den Labormaßstab des Ansatzes und sein ungünstiges Oberflächen/ Volumenverhältnis zurückzuführen. Der damit verbundene Wärmeverlust lässt sich auch nicht durch die verwendete Wärmenachführung gänzlich unterbinden. Dennoch reichen auch diese geringeren Temperaturen für eine nahezu vollständige Humifizierung des TNT aus. So waren nach Alterung des ¹⁵N-TNT dotierten Bodens durch wässrige und anschließende MeOH-Extraktion insgesamt 4112 mg/kg TNT, 45 mg/kg 4-Amino-2,6-Dinitrotoluol (4 ADNT) und 27 mg/kg 2-Amino-4,6-Dinitrotoluol (2 ADNT), jeweils bezogen auf TG, nach Beendigung der aeroben Phase aber keiner dieser Analyte mehr mittels HPLC nachweisbar. Allerdings sind die Wiederfindungsraten der Analyte für das gewählte Extraktions/HPLC-Verfahren vergleichsweise gering. So beträgt die Wiederfindungsrate für TNT 68 %. Die Ergebnisse der ¹⁴C-Bilanzierung am Ende der Kompostierung belegen aber, dass TNT fast vollständig immobilisiert wurde. So ließen sich weniger als 4 % der ursprünglich aufgebrauchten Aktivität mit einer sequentiellen wässrigen-methanolischen Extraktion remobilisieren.

In Abbildung 2 sind die im Verlauf der Kompostierung nachweisbaren Konzentrationen von TNT und seinen Metaboliten dargestellt. Neben den in Abbildung 2 aufgeführten Metaboliten wurden noch 2,4-Diamino-6-nitrotoluol (2,4 DANT), 4-N-Formylamino-2-amino-6-nitrotoluol (4N FAmANT) und 4-N-Acetylamino-2-amino-6-Nitrotoluol (4N AcANT) nachgewiesen, jedoch nur in im Vergleich mit den übrigen Metaboliten geringen Konzentrationen (2,4 DANT: 2,5 – 50,7 mg/kg TS, 4N FAmANT: nicht bestimmbar, 4N AcANT: 2,4 – 83,5 mg/kg TS). Alle drei wurden nur innerhalb der ersten 10 d der aeroben Phase nachgewiesen. Während die übrigen Metabolite bekannte Abbauprodukte des TNT sind, sind 4N FAmANT und 4N AcANT bisher fast ausschließlich als Produkte von anaerob/aeroben Kompostierungen bekannt [1; 2]. 4N FAmANT entsteht auch durch Pilzmetabolismus. 4N FAmANT und 4N AcANT entstehen bei Kompostierungen wahrscheinlich durch eine mikrobiell katalysierte Acetylierung bzw. Formylierung des 2,4 DANT. Im Falle der Acetylierung ist die Reversibilität der Reaktion nachgewiesen, was das zeitgleiche Auftreten von 2,4 DANT und 4N AcANT in dem hier beschriebenen Experiment erklären kann [2].

Abbildung 2 zeigt, dass bereits während der anaeroben Phase das TNT nahezu vollständig metabolisiert wurde. Gleichzeitig stiegen die Konzentrationen von 4 ADNT und 2 ADNT stark an, um bis zum Ende der anaeroben Phase wieder stark abzunehmen. Dabei wurde bevorzugt 4 ADNT gebildet. DANT wurden in dieser Phase nicht nachgewiesen. In der sich anschließenden aeroben Phase entstanden neben den ADNT die bereits weiter oben beschriebenen Metabolite. Das zum 2,4 DANT isomere 2,6 DANT wurde während keiner Phase der Kompostierung nachgewiesen. Etwa 20 d nach Beginn der aeroben Phase waren TNT und seine Metabolite in den Extrakten der Bodenproben nicht mehr nachweisbar. Die beschriebene Abbaucharakteristik entspricht der für das dynamische Beetverfahren üblichen [14], und ist vergleichbar mit solchen, die von ähnlichen anaerob/aeroben Kompostierungen TNT-kontaminierter Böden her bekannt sind [1; 2; 5]. Während der Kompostierung wurde eine Probe des ¹⁵N-TNT dotierten und gealterten Bodens bei +4° C im Dunkeln aufbewahrt und am Ende der Kompostierung demselben Extraktionsverfahren wie der kompostierte Boden unterworfen. Anstelle von MeOH wurde ACN als Extraktionsmittel verwendet. Dabei wurden 5076 mg/kg TG TNT gefunden, was einer Wiederfindungsrate von 85 % entspricht. Die höhere Wiederfindungsrate gegenüber der Extraktion mit MeOH (s.o.) ist auf die bessere Eignung des ACN für die Extraktion von TNT zurückzuführen (wegen der geringeren Toxizität

des MeOH wurde es in dieser Studie gegenüber ACN bevorzugt als Extraktionsmittel verwendet). Die Analyse des nicht behandelten Bodens belegt, dass die Metabolisierung und Humifizierung des TNT weitgehend auf die Kompostierung zurückzuführen ist, und unter natürlichen Bedingungen nicht, oder nur in vernachlässigbar geringen Raten stattfindet.

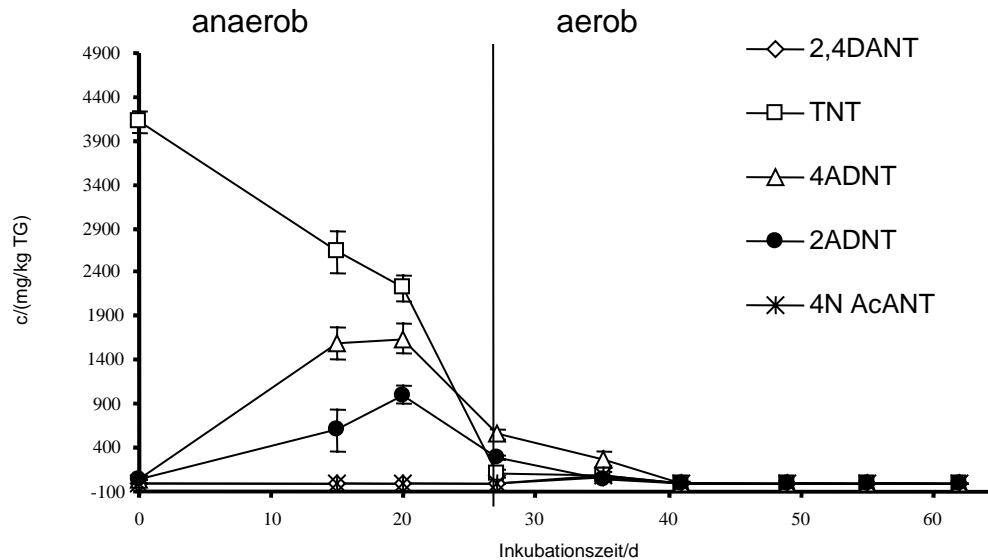


Abb. 2: Extrahierbare Konzentrationen TNT und Metabolite während der Kompostierung im mit ^{15}N -TNT dotierten Kompost. Mittelwerte aus drei Bestimmungen. Fehlerbalken: Standardabweichung

Wie Tabelle 1 zeigt, sind im Boden vor und nach der Kompostierung eine vergleichbare Anzahl Mikroorganismen zu finden. Die biologische Aktivität des Bodens bleibt also erhalten. Ein weiterer Vorteil des dynamischen Beetverfahrens ist, dass sich der Gehalt des Bodens an organischem Kohlenstoff praktisch nicht ändert. Die Daten in Tabelle 1 wurden aus dem Vorversuch zur Optimierung der Versuchsparameter vor der eigentlichen Kompostierung gewonnen (s. Kapitel 9.2.1 des Leitfadens).

Tab. 1: Mikrobiologische Bodenparameter für den Kompost aus dem Vorversuch im Frühsommer 1999. Anzahl der Organismen pro g TG

	vor der Kompostierung	nach der Kompostierung
heterotrophe Organismen	$4,6 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$
Clostridien	$1,4 \times 10^4$	$8,2 \times 10^4$
Pilze	$1,7 \times 10^5$	$3,4 \times 10^6$
TNT reduz. Organismen	$1,2 \times 10^6$	$3,0 \times 10^7$
Org. Kohlenstoff /%	15,3	18,3

4.2 ^{14}C -Bilanz am Ende der Kompostierung

Bereits während der Kompostierung wurde die Radioaktivität der Abluft und des Sickerwassers des mit ^{14}C -TNT dotierten Kompostes kontrolliert. Im Verlauf des Versuches wurde in der Abluft keine gegenüber einer Blindprobe signifikant erhöhte Aktivität gemessen. Die Aktivität des Sickerwassers war gegenüber einer Blindprobe geringfügig erhöht. Die höchsten Aktivitäten wurden dabei zu Beginn der Kompostierung gemessen, zu einem Zeitpunkt also, zu dem des TNT noch weitgehend in extrahierbarer Form vorlag. Die Aktivität des Sickerwassers wurde quantitativ ausgewertet, und ist in der ^{14}C -Bilanz des Kompostes in die Restaktivität mit einbezogen (Abb. 3).

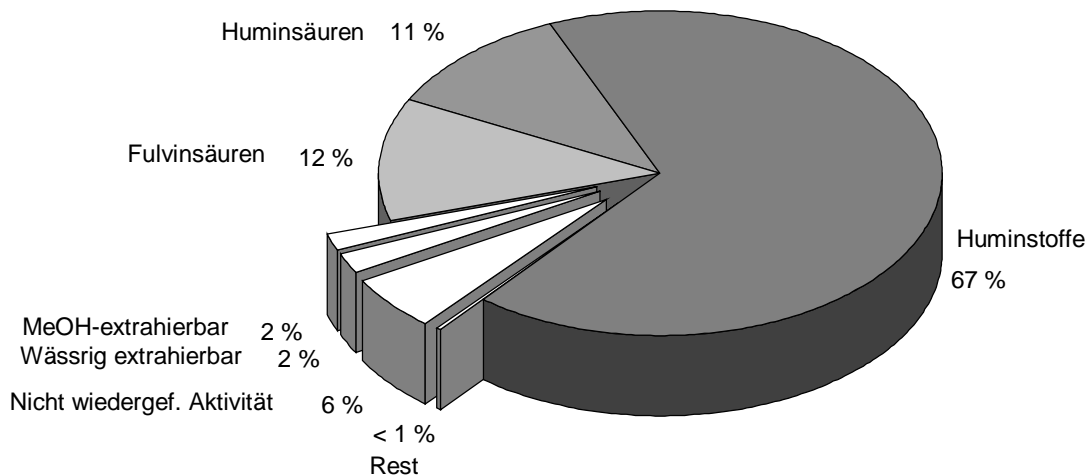


Abb. 3: Wiedergefundene Aktivität in Prozent der ursprünglich dotierten Aktivität in den einzelnen Fraktionen nach sequentieller wässriger/MeOH-Extraktion und anschließender Huminstofftrennung für den mit ^{14}C -TNT dotierten Kompost. Rest: Restaktivität in Waschlösungen, Abluft und Sickerwasser

Für die Aufstellung einer ^{14}C -Bilanz wurden folgende Fraktionen gebildet: Wässrig extrahierbare Fraktion, organisch extrahierbare Fraktion, Fulvinsäuren, Huminsäuren und unlösliche Huminstoffe. Die Aktivität der Sickerwässer, der Abluft und der Waschlösungen, die beim Abrüsten der Bioreaktoren anfielen, wurden unter der Restaktivität zusammen gefasst. In Abbildung 3 sind die in den Fraktionen gemessenen Aktivitäten in Prozent der ursprünglich dotierten Menge ^{14}C -TNT ($8,195 \mu\text{Ci}$) wiedergegeben. Danach wurden 90 % der eingebrachten Aktivität immobilisiert. Nur insgesamt 4 % des dotierten ^{14}C -TNT wurden in den Extrakten und der Restaktivität gefunden, was bei Berücksichtigung der durch die Dotierung extrem hohen Kontamination des Bodens äußerst gering ist. Die ^{14}C -Messungen untermauern damit die Ergebnisse der HPLC-Analytik (s.o.). Die Anteile der wässrig extrahierbaren Bestandteile und der methanolisch extrahierbaren Bestandteile sind in etwa gleich groß. Bei den nicht extrahierbaren Bestandteilen entfällt der größte Anteil auf die unlöslichen Huminstoffe (67 %), die nach der Behandlung des Kompostes mit NaOH im Bodenpellet verblieben. Die Anteile der mit NaOH extrahierbaren Fulvo- und Huminsäuren

betragen 12 % bzw. 11 %. Die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Fraktionen entspricht weitgehend der, die in [5] für eine anaerob/aerobe Kompostierung beschrieben wird, die eine Vorläufervariante der hier vorgestellten Methode darstellt. Dort betrug der Anteil der nicht extrahierbaren Aktivität lediglich 82 % bei einer um den Faktor 10 kleineren Ausgangskonzentration des TNT. Bei den hier beschriebenen Versuchen waren die Bedingungen für die Kompostierung optimiert. Insbesondere wurde die Temperatur kontrolliert und nachgeführt, wodurch der Kompost stets die für die jeweilige Phase optimale Wärme hatte. Dies erklärt den höheren Immobilisierungsgrad gegenüber den in [5] beschriebenen Kompostierungen. Es sei darauf hingewiesen, dass im technischen Maßstab wegen des günstigeren Oberflächen/Volumenverhältnisses des Komposts eine Temperierung, wie in den hier beschriebenen Versuchen verwendet, nicht notwendig ist.

Die Wiederfindungsrate der ursprünglich aufgebrauchten Aktivität ist mit ca. 95 % sehr hoch. Die geringe Menge nicht wiedergefundene Aktivität erklärt sich wahrscheinlich aus dem verwendeten analytischen Verfahren. So können bei einem Untergrundsignal von ca. 10 cpm, wie hier gemessen, Aktivitäten kleiner 30 cpm nicht mehr nachgewiesen werden (3σ -Kriterium) und entziehen sich der somit der Bilanz.

4.3 Festkörper ^{15}N -NMR-Untersuchungen

Ergebnisse aus den Untersuchungen der Fulvinsäuren, Huminsäuren und der unlöslichen Huminstoffe mit Festkörper ^{15}N -NMR lagen beim Verfassen diese Beitrags noch nicht vor. Es werden ähnliche Resultate, wie in [3] beschrieben, erwartet.

4.4 Remobilisierung humifizierter TNT-Rückstände

Beim Verfassen dieses Beitrages lagen nur für die Versuche zur Remobilisierung durch Komplexbildner und durch sauren Regen Ergebnisse vor, die im folgenden beschrieben werden. Die übrigen Versuche waren noch nicht abgeschlossen bzw. noch nicht begonnen, so dass aus diesen noch keine Ergebnisse vorlagen. Die Ergebnisse der durch die Universität Jena durchgeführten Remobilisierungsversuche werden, soweit bisher durchgeführt, in deren Beitrag zu diesem Leitfaden besprochen (s. Kapitel 9.4.5 des Leitfadens).

4.4.1 Remobilisierung durch Extraktion mit EDTA

Die Huminstoffe, in welche die Transformationsprodukte des TNT kovalent eingebunden werden, sind über Komplexbindungen an die Tonmineralien des Bodens gebunden [8]. Diese Bindung wird durch Metallkationen vermittelt. Durch Komplexbildner können die Metallkationen aus dem Huminstoff-Tonmineral Komplex entfernt werden, wodurch die Huminstoffe mobilisiert werden. Zur Simulation dieses Vorganges eignet sich die Extraktion mit EDTA bzw. mit dessen in Wasser besser löslichen Dinatriumsalz. Beide bilden mit den meisten Metallkationen außerordentlich stabile Komplexe, so dass dieser Versuch Extrembedingungen simuliert, wie sie in der Natur kaum auftreten dürften.

In Abbildung 4 ist die Aktivität pro g TG Kompost in den einzelnen Fraktionen (Summe der EDTA-Extrakte, wässriger Extrakt, Summe der MeOH-Extrakte, nicht extrahierbare Rückstände) für die Extraktionsreihen mit EDTA, $c = 0,01 \text{ mol/L}$, $0,025 \text{ mol/L}$ u. $0,05 \text{ mol/L}$

und für die Kontrolle (Extraktion mit dest. Wasser) dargestellt. Dabei wurde aus den Messwerten der 3 Parallelen jeder Extraktionsreihe der Mittelwert gebildet. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Trotz der teilweise recht großen Standardabweichungen (bis zu 50 % des Messwertes) lässt sich Abbildung 4 deutlich entnehmen, dass die Aktivität in der EDTA-Fraktion mit steigender EDTA-Konzentration zunimmt.

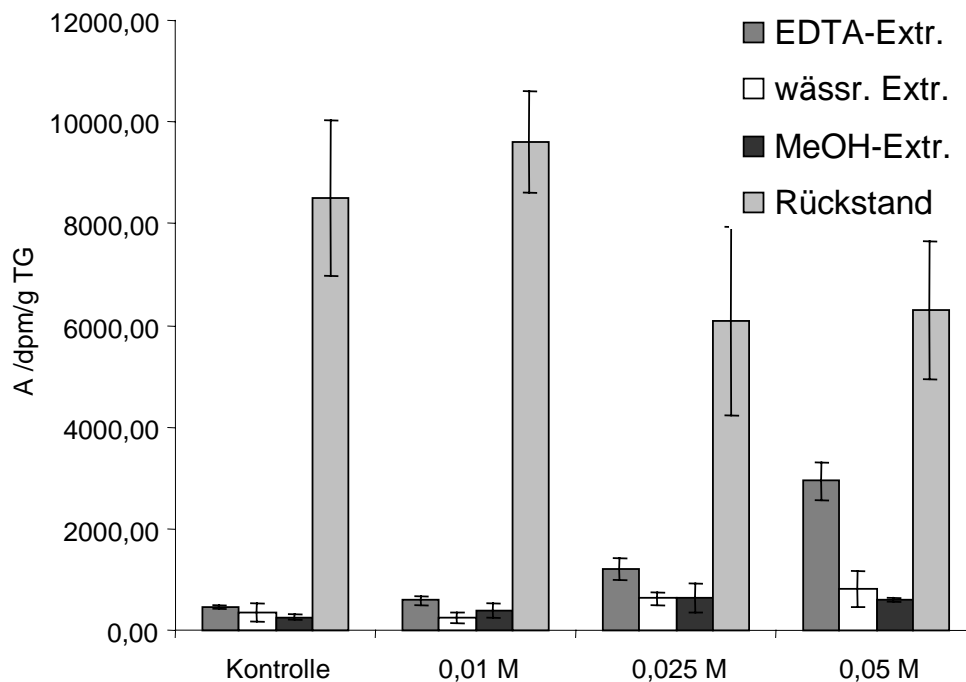


Abb. 4: Aktivität pro g TG Kompost in den einzelnen Fraktionen für die EDTA-Extraktionsreihen und die Kontrolle. Jeweils Mittelwerte aus drei Parallelen, Fehlerbalken: Standardabweichung, Rückstand: nicht extrahierbare Rückstände, EDTA-Extraktion und MeOH-Extraktion: jeweils Angabe der Summe der Aktivitäten in den einzelnen Fraktionen

Dieser Trend wird noch deutlicher, wenn die Aktivität der einzelnen Fraktionen einer Extraktionsreihe mit gegebener EDTA-Konzentration an der insgesamt in dieser Reihe gefundenen Aktivität gewichtet wird, wie in Abbildung 5 dargestellt. Dabei wurden wieder die Mittelwerte aus den drei Parallelen einer Reihe gebildet. Nach Abbildung 5 ist die Aktivität für die Kontrolle und $c(\text{EDTA}) = 0,01 \text{ mol/L}$ etwa gleich auf die einzelnen Fraktionen verteilt. Die Aktivität in der ersten Fraktion ($c(\text{EDTA}) = 0,01 \text{ mol/L}$: Summe der EDTA-Extrakte, Kontrolle: Summe der ersten beiden wässrigen Extraktionen) dieser beiden Extraktionsreihen beträgt 5 – 6 % der insgesamt gefundenen Aktivität. Demgegenüber steigt die Aktivität in den EDTA-Fractionen bei $c(\text{EDTA}) = 0,025 \text{ mol/L}$ auf 15 % und bei $c(\text{EDTA}) = 0,05 \text{ mol/L}$ auf 28 % der insgesamt gemessenen Aktivität. Für diese beiden Konzentrationen nimmt auch der Anteil der Aktivität in der wässrigen bzw. methanolischen Fraktion zu. Diese Anteile steigen von 3 – 4 % in beiden Fraktionen für die Kontrolle und $c(\text{EDTA}) = 0,01 \text{ mol/L}$ auf 6 – 8 % für $c(\text{EDTA}) = 0,025 \text{ mol/L}$ und $0,05 \text{ mol/L}$. Dies erklärt sich durch die Zerstörung der Huminstoff-Tonmineralkomplexe durch EDTA und ein noch anhaltendes „Ausbluten“ der gelösten Huminstoffe aus der Bodenmatrix bei nachfolgenden Extraktionen mit EDTA-freien Medien.

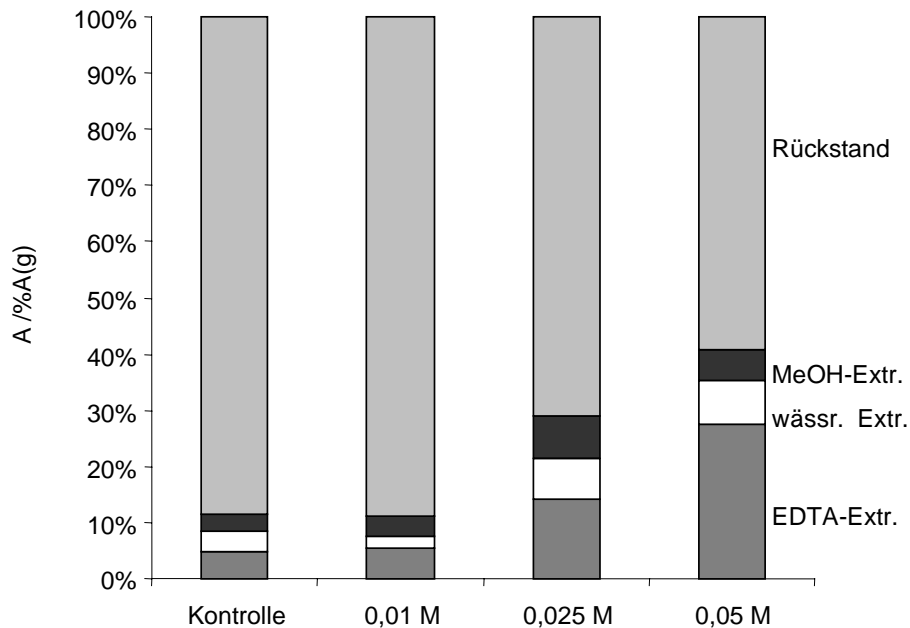


Abb. 5: Aktivität in den einzelnen Fraktionen der EDTA-Extraktionsreihen in Prozent der insgesamt in der entsprechenden Reihe wiedergefundenen Aktivität A(g). Rückstand: nicht extrahierbare Rückstände, EDTA-Extraktion und MeOH-Extraktion: jeweils Angabe der Summe der Aktivitäten in den einzelnen Fraktionen

Das Ergebnis zeigt, dass mit Komplexbildnern in Huminstoffe eingebundene TNT-Transformationsprodukte, wie sie beim dynamischen Beetverfahren entstehen, mobilisiert werden können. Aufgrund der Funktion der Komplexbildner beim Auflösen von Huminstoffen, ist zu vermuten, dass nicht die Transformationsprodukte selbst, sondern die Huminstoffe mit den nach wie vor in diese eingebundenen TNT-Metabolite freigesetzt werden. Freie TNT-Metabolite dürften hier also kaum vorliegen. Ein solches Verhalten ist von in vergleichbarer Weise immobilisierten polyaromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) bekannt. Ob bei der EDTA-Extraktion die Einbindungsprodukte der TNT-Metabolite tatsächlich nicht zerstört werden, soll im Rahmen dieses Projektes noch geklärt werden. Dazu sind EDTA-Extraktionen des ¹⁵N-TNT dotierten Kompostes und Analysen der Extrakte mit HPLC geplant.

Die Wiederfindung der dotierten Radioaktivität betrug für diese Versuche 93 % - 117 %. Wie die Werte der Standardabweichungen in Abbildung 4 belegen, ist die Schwankung in der Wiederfindung u.a. durch die Genauigkeit des Analyseverfahrens gegeben. Die Wiederfindungsraten über 100% können durch eine Erhöhung der Zählrate, z.B. durch statische Aufladung der Probenvials, erklärt werden.

4.4.2 Remobilisierung durch die Simulation eines 1000-jährigen sauren Regens

Der pH-Wert im Boden beeinflusst in vielfältiger Weise die chemische Beschaffenheit des Bodens. So ist z. B. der Dissoziationsgrad und damit die Löslichkeit der Humin- und Fulvinsäuren, in welche die Metabolite zu nicht unerheblichem Teil eingebunden werden, vom pH-Wert der umgebenden Matrix abhängig. Daher ist es denkbar, dass die langjährige Einwirkung von saurem Regen zu einer Freisetzung der TNT-Metabolite führen kann.

Für die Simulation eines sauren Regens wurden 3 Parallelen (Extraktion mit H₂SO₄/HNO₃ 3:2, pH = 5) und eine Kontrolle (Extraktion mit dest. Wasser) angesetzt. Das Ergebnis ist in Abbildung 6 dargestellt. Dabei wurden die Mittelwerte der Aktivität pro g TG der einzelnen Fraktionen (Extraktion 1 – 10, nicht extrahierbarer Rückstand) aus den 3 Parallelen gebildet und die Standardabweichung berechnet. Diese ist als Fehlerbalken in Abbildung 6 eingezeichnet. Da nur eine Kontrolle angesetzt wurde, kann für diese kein Mittelwert und keine Standardabweichung der gemessenen Aktivität angegeben werden.

Die meiste extrahierbare Aktivität wurde für die Parallelen und die Kontrolle in den Fraktionen 1 - 5 nachgewiesen. In diesen Fraktionen wurden im Mittel ca. 50 – 390 dpm/g TG gefunden. Ab der 5. Fraktion ist praktisch keine Aktivität im Extrakt mehr nachweisbar. Der weitaus größte Teil der Aktivität verblieb bei den Parallelen und der Kontrolle im nicht extrahierbaren Rückstand. Hier wurden für die Parallelen im Mittel 6660 dpm/g TG und für die Kontrolle 4853 dpm/g TG nachgewiesen. Auffällig ist die deutlich geringere Aktivität im Rückstand der Kontrolle. Legt man dieser Messung allerdings den Wert der Standardabweichung zugrunde, der für die Parallelen berechnet wurde, zeigt sich, dass die geringere Aktivität der Kontrolle mit der Genauigkeit des analytischen Verfahrens begründet werden kann. Die berechnete Standardabweichung bezieht sich dabei auf die Genauigkeit des Gesamtverfahren, also nicht nur auf die Messung der Aktivität selbst, sondern auch auf die Probenvorbereitung. Der Aktivitätsverlust im Rückstand der Kontrolle kann auch auf einen Massenverlust während der Extraktionen zurückzuführen sein. Die Extrakte mußten z.T. filtriert werden, und die an den Filtern verbleibende Aktivität wurde nicht ausgezählt. Dies erklärt auch die vergleichsweise geringe Wiederfindung der Aktivität von 65 % (Kontrolle) bis 80 % (Mittelwert der Parallelen).

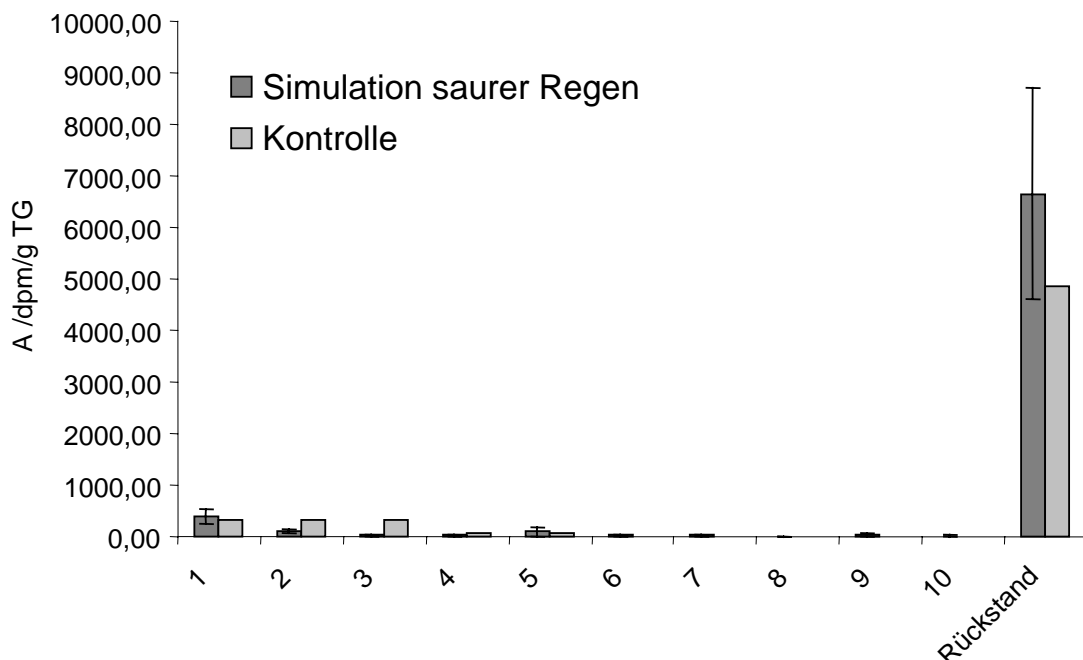


Abb. 6: Aktivität / g TG in den Fraktionen 1–10 für die Simulation eines 1000-jährigen sauren Regens (jeweils Mittelwert aus drei Parallelen, Fehlerbalken: Standardabweichung) und Kontrolle. 1–10: Fraktion-Nr., Rückstand: Nicht extrahierbarer Rückstand

In Abbildung 7 ist die in den einzelnen Fraktionen bestimmte Aktivität an der insgesamt bestimmten Aktivität gewichtet. Dabei wurden die Aktivitäten der Extraktionen 1 – 10 aufsummiert. Für die Parallelen wurde der Mittelwert gebildet. Für die Kontrolle verbleiben 89 % und für die Parallelen 94 % der gefundenen Aktivität im nicht extrahierbaren Rückstand. Unter Berücksichtigung der Genauigkeit des Verfahrens sind diese Werte als gleich groß anzusehen. Bei den hier gewählten Bedingungen zur Simulation eines 1000-jährigen sauren Regens findet also keine messbare Remobilisierung der gebundenen Aktivität statt.



Abb. 7: Vergleich der Summe der in den Fraktionen 1-10 gefundenen Aktivitäten und der im nicht extrahierbaren Rückstand gefundenen Aktivität für die Simulation eines 1000-jährigen sauren Regens mit der Kontrolle (Extraktion mit H₂O). Saurer Regen: Mittelwert aus drei Parallelen, Beide: Angabe Aktivität jeweils in Prozent der insgesamt in den Parallelen bzw. der Kontrolle wiedergefundenen Gesamtaktivität A(g)

5 Bewertung des dynamischen Beetverfahrens zur Sanierung TNT-kontaminierter Böden

Wie in Kapitel 2 erläutert, ist für die Bewertung eines Sanierungsverfahrens nicht nur der Grad der Immobilisierung wichtig, der bei der Anwendung des Verfahrens erreicht wird, sondern im besonderen die Langfristigkeit der Einbindung. Die Anwendung des dynamischen Beetverfahrens zur Sanierung TNT-kontaminierter Böden bewirkt eine nahezu vollständige Einbindung des TNT und seiner Metabolite. Selbst bei der extrem hohen TNT-Kontamination, die in dem hier beschriebenen Projekt dotiert wurde, wurde das TNT zu ca. 90 % eingebunden. Bei Kontaminationen, wie sie in der Praxis auftreten, ist der Einbindungsgrad noch höher. So wurden in dem Vorversuch, in dem die optimalen Bedingungen für den eigentlichen Versuchsansatz ermittelt wurden, 99,7 % des TNT eingebunden. Der zu dekontaminierende Boden hatte dabei eine Ausgangskonzentration des TNT von

1192 mg/kg TS. Diese Kontamination ist sehr hoch. Besonders erwähnenswert ist auch, dass beim dynamischen Beetverfahren der Gehalt an organischem Kohlenstoff nur unwesentlich erhöht wird. Als Ursache hierfür sind die vergleichsweise geringen Mengen an Zuschlagstoffen (20 %, wt/wt) zu nennen, die während der Kompostierung nahezu vollständig mineralisiert werden. Auch die biologische Aktivität des Bodens, gemessen an der Zahl der Mikroorganismen, bleibt während der Kompostierung erhalten. Aussagen zum Pflanzenwuchs auf dem dekontaminierten Boden sind derzeit noch nicht möglich, werden aber im Abschlussbericht dieses Projektes behandelt werden. Die Kompostierung selbst ist nach 100 d abgeschlossen.

Wie bisher durchgeführte Untersuchungen des Bindungszustandes der Metabolite zeigen, werden diese beim dynamischen Beetverfahren kovalent oder durch Heterozyklenbildung in die Humusmatrix eingebaut (humifiziert). Die bisher durchgeführten Versuche zur Remobilisierung (Einfluss von Komplexbildnern, saurer Regen) zeigen dementsprechend, dass selbst unter Extrembedingungen, wie sie hier zugrunde gelegt wurden, nur geringe Mengen der Einbindungsprodukte freigesetzt wurden. Diese Mengen entsprechen dabei meist denen, die auch in den die Versuche begleitenden Kontrollen freigesetzt wurden. Dabei ist es wichtig festzuhalten, dass die Messungen der Radioaktivität keine Aussage über den Bindungszustand erlauben. Deshalb bleibt die Identifizierung der bei den Remobilisierungsversuchen freigesetzten Verbindungen Gegenstand weiterer Untersuchungen. Die bisherigen Ergebnisse können aber so gedeutet werden, dass unter den in freier Natur auftretenden, weit weniger drastischen Bedingungen eine Remobilisierung der Schadstoffe kaum zu erwarten ist. Das dynamische Beetverfahren ist nach dem gegenwärtigen Stand der Wissenschaft zur Sanierung selbst stark TNT-kontaminierter Böden geeignet.

6 Verzeichnis oft gebräuchter Abkürzungen

^{14}C -TNT	^{14}C -markiertes TNT
^{15}N -NMR	^{15}N -Kernresonanzspektroskopie
^{15}N -TNT	^{15}N -markiertes TNT
2 ADNT	2-Amino-4,6-dinitrotoluol
2,4 DANT	2,4-Diamino-6-nitrotoluol
2,6 DANT	2,6 Diamino-4-nitrotoluol
4 ADNT	4-Amino-2,6-dinitrotoluol
4N AcANT	4-N-Acetylamino-2-amino-6-nitrotoluol
4N FAmANT	4-N-Formylamino-2-amino-6-nitrotoluol
A	Radioaktivität
ACN	Acetonitril
ADNT	Amino-dinitrotoluole
cpm	counts per minute (Zählrate pro Minute)

DANT	Diamino-nitrotoluole
dpm	decays per minute (Zerfälle pro Minute)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FG	Feuchtgewicht
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
IRMS	Isotopenverhältnis-Massenspektroskopie
LSC	Flüssigkeits-Szintillationszähler
MeOH	Methanol
NaOH	Natronlauge
TG	Trockengewicht
TNT	2,4,6 – Trinitrotoluol
wt/wt	Gewichtsverhältnis

7 Eigene Veröffentlichungen

Eigene Veröffentlichungen zum biogenen Abbau von TNT und zur anaerob/aeroben Kompostierung sind im Literaturverzeichnis aufgeführt (Literaturstellen [1] - [5], [9], [14]).

8 Literaturverzeichnis

1. **Bruns-Nagel, D.; Breitung, J.; von Löw, E.; Steinbach, K.; Gorontzy, T.; Kahl, M.; Blotevogel, K.-H.; Gemsa, D.**; 1996; Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene in aerobic soil columns, *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2651 – 2656
2. **Bruns-Nagel, D.; Drzyzga, O.; Steinbach, K.; Schmidt, T. C.; von Löw, E.; Gorontzy, T.; Blotevogel, K.-H.; Gemsa, D.**; 1998; Anaerobic/aerobic composting of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil in a reactor system, *Environ. Sci. Technol.* 32, 1676-1679
3. **Bruns-Nagel, D.; Knicker, H.; Drzyzga, O.; Bütehorn, U.; Steinbach, K.; Gemsa, D.; von Löw, E.**; Characterisation of ¹⁵N-TNT residues after an anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures by solid-state ¹⁵N NMR spectroscopy. 2. Systematic investigation of whole soil and different humic fractions, *Environ. Sci. Technol.*, im Druck
4. **Bruns-Nagel, D.; von Löw, E.**; 1997; Konzepte zur mikrobiellen Sanierung TNT-kontaminierter Böden unter Einbeziehung aerober und anaerob/aerober Prozesse, Schriftliche Fassung eines Vortrages des 3. Statusseminars des Verbundvorhabens „Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten“, Berlin, 26. – 27. 2. 1997, Hrsg.: Umweltbundesamt, Fachgebiet III 3.6

5. **Drzyzga, O.; Bruns-Nagel, D.; Gorontzy, T.; Blotevogel, K.-H.; Gemsa, D.; von Löw, E.;** 1998; Incorporation of ¹⁴C-labeled 2,4,6-trinitrotoluene metabolites into different soil fractions after anaerobic and anaerobic-aerobic treatment of soil/molasses mixtures, *Environ. Sci. Technol.*, 32, 3529 - 3535
6. **Görge, E.;** 1993; Aufnahme von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) in Pflanzen unter besonderer Berücksichtigung von Freilandversuchen auf dem Gelände einer ehemaligen Sprengstofffabrik in Stadtallendorf, Dissertation, Marburg
7. **Griest, W. H.; Stewart, A.J.; Ho, C.-H.; Tyndall, R. L.; Vass, A.A.; Caton, J.E.;** 1994; Characterisation of explosives processing waste decomposition due to composting, US Army Report ORNL/TM 12812
8. **Held, T.; Reis, K.-H.; Rippen, G.;** 1995; Mikrobielle Sanierung von TNT-kontaminierten Böden des Standortes Hessisch-Lichtenau im Rahmen des Verbundprojektes Rüstungsaltslasten; Teilvorhaben 2, BMBF-Förderkenn- zeichen 03110551 A, Endbericht
9. **Knicker, H.; Bruns-Nagel, D.; Drzyzga, O.; von Löw, E.; Steinbach, K.;** 1999; Characterisation of ¹⁵N-TNT residues after an anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures by solid-state ¹⁵N NMR spectroscopy. 1. Determination and optimization of relevant NMR spectroscopic parameters, *Environ. Sci. Technol.*, 33, 343 – 349
10. **McCormick, N. L.; Feeherry, F. E.; Levison, H. S.;** 1976; Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds, *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 949 – 958
11. **Parris, G. E.;** 1980; Covalent binding of aromatic amines to humates. 1. Reactions with carbonyls and quinones, *Environ. Sci. Technol.*, 14, 1099 – 1106
12. **Sens, C.;** 1998; Metabolisierung und Lokalisierung von ¹⁴C-Trinitrotoluol (TNT) in *Phaseolus vulgaris* (Buschbohne) und *Triticum aestivum* (Weizen), Dissertation, Marburg
13. **Thorn, K. A.; Pettigrew, P. J.; Goldberg, W. S.; Weber, E. J.;** 1996; Covalent Binding of aniline to humic substances. 2. ¹⁵N NMR studies of nucleophilic addition reactions, *Environ. Sci. Technol.*, 30, 2764 – 2775
14. **Winterberg, R.; von Löw, E.; Held, T.;** 1998; Dynamisches Mietenverfahren zur Sanierung von Rüstungsaltslasten, *TerraTech*, 3, 39 – 41

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.4 Verbundvorhaben 5: Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen bei der biologischen Bodensanierung

9.4.4 Alternierender Anaerob-/Aerob-Prozess: Analyse der Bindungsstruktur von metabolisiertem und humifiziertem TNT im Boden (TV 5.3.2)

Dr. Christof Achtnich

Dirk Peters

Dr. Hiltrud Lenke

Prof. Dr. Hans-Joachim Knackmuss

Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik (IGB)

Nobelstrasse 12,

70569 Stuttgart

Förderkennzeichen: 1481161

Laufzeit: 01.04.1999 – 31.03.2000

1 Zielsetzung und Zusammenfassung

Der Sprengstoff 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) wurde im II. Weltkrieg in beträchtlichen Mengen produziert (ca. 0,8 Mio. Tonnen). In Folge dieser Produktion gelangten an den Produktionsstandorten große Mengen TNT sowie seine Neben- und Folgeprodukte über Abwasser und Abfalldeponien in die Umwelt. Der Austrag der toxischen und möglicherweise kanzerogenen Kontaminanten in das Grundwasser gefährdet in zunehmendem Maße die Trinkwasserversorgung der anliegenden Gemeinden. Aufgrund dieses Gefährdungspotentials ist eine Sanierung der Altstandorte dringend erforderlich.

Als Alternative zur Verbrennung wurden verschiedene biologische Sanierungsmethoden für TNT-kontaminierte Böden entwickelt. Da eine biologische Behandlungsmethode, die auf einer vollständigen Mineralisation von TNT im Boden beruht, bisher nicht etabliert werden konnte, haben die meisten biologischen Sanierungsverfahren eine irreversible Bindung von Metaboliten des TNT an Bodenbestandteile zum Ziel.

Am Rüstungsaltsstandort Clausthal-Zellerfeld wurden drei verschiedene biologische Sanierungsverfahren vergleichend erprobt und die jeweils biologisch behandelten Böden einer Erfolgskontrolle unterzogen. Bei zwei dieser biologischen Sanierungsverfahren beruhte die Dekontamination des Bodens auf einer Festlegung der Schadstoffe durch Kompostierungen, bei dem dritten Verfahren wurde dies durch eine Behandlung mittels Pilzen erreicht.

Ziel der geplanten Untersuchungen war es, mit Hilfe des Einsatzes von isotonenmarkiertem TNT ($[^{14}\text{C}]\text{TNT}$ und $[^{15}\text{N}]\text{TNT}$) die Bindungsformen des im Boden reduzierten und festgelegten TNT zu analysieren. Es sollte nachgewiesen werden, dass die reduzierten Metabolite des TNT nach deren vollständigem Umsatz irreversibel an die Bodensubstanz gebunden sind. Nur wenn für das festgelegte TNT eine kovalente Bindung an Bodenbestandteilen nachgewiesen werden könnte, wäre dies als humifiziert zu bezeichnen und damit als unbedenklich einzustufen. Diese Untersuchungen wurden für alle am Standort Clausthal-Zellerfeld erprobten on-site Verfahren vergleichend im Labormaßstab durchgeführt (siehe Untersuchungen des Arbeitskreises der Universität Marburg sowie des Arbeitskreises der Universität Jena).

Das von der Fa. Umweltschutz Nord GmbH & Co., Ganderkesee, entwickelte biologische Kompostierungsverfahren zur Dekontamination von TNT-belastetem Boden wurde im Labormaßstab getestet. Dazu wurde real-kontaminierter Boden mit $[^{14}\text{C}]\text{TNT}$ oder $[^{15}\text{N}]\text{TNT}$ aufdotiert (5,3 – 5,7 g TNT/kg TS Boden) und mit organischen Zuschlagstoffen gemischt. Der Reaktor wurde kontinuierlich belüftet, zu festgelegten Zeitpunkten geleert und das Gemisch aus Boden und Zuschlagstoffen umgeschichtet und homogenisiert. Die Behandlung dauerte insgesamt 93 Tage. Zu Beginn der Kompostierung wurde im Reaktor eine Temperatur $>75^\circ\text{C}$ gemessen. Im weiteren Verlauf der Behandlung nahm die maximal gemessene Temperatur auf ca. 55°C ab. Die Konzentration des extrahierbaren TNT nahm nach Beginn der Inkubation sehr schnell ab: nach 3 Tagen betrug die Konzentration nur noch 31 mg TNT/kg TS Boden. ADNT und DANT wurden im Vergleich zur ursprünglichen TNT-Konzentration in sehr geringen Mengen gemessen (< 8 mg/kg TS Boden). Die Massenbilanz von $[^{14}\text{C}]\text{TNT}$ und seinen Metaboliten in den verschiedenen Fraktionen zeigte einen raschen Abfall der Radioaktivität in den methanolischen Extrakten. Die Radioaktivität, die am Behandlungsende durch Methanol extrahierbar war, betrug 1,1% der gesamten Radioaktivität im Boden. Durch die wässrige Extraktion wurde zu Beginn der Behandlung 21,9% der Gesamtradioaktivität desorbiert. Am

Ende der Behandlung lag dieser Wert bei 7,3%. Insgesamt waren nach der Kompostierung 8,4% der eingesetzten Gesamtradioaktivität durch Wasser oder Methanol mobilisierbar. Der hauptsächliche Anteil dieser extrahierbaren Radioaktivität war polaren Substanzen zuzuordnen. Die Bewertung dieser Ergebnisse findet im Kontext mit den anderen Projekten des Verbundes statt. Die ¹⁵N-NMR-Spektren des behandelten Bodens zeigten ein dominantes Signal im Bereich von -247 ppm. Dieser Verschiebungsbereich ist Kondensationsprodukten des TNT (Indole, Pyrrole, Anilide, Amide) zugeordnet. Ein schwächeres Signal wurde im Bereich von - 300 ppm beobachtet. Dies ist der Verschiebungsbereich von aromatischen Aminen. Das Signal war allerdings gegenüber Referenzmessungen etwas in den positiven Bereich verschoben, was auf die Existenz von elektronenziehenden Gruppen am Molekül hinweist. Dies zusammen mit der Beobachtung von kleinen Signalen um -11 ppm (Nitrogruppen) legt die Vermutung nahe, dass auch am Ende der Kompostierung noch intakte Nitrogruppen vorhanden waren, d.h. dass die Festlegung nicht in allen Fällen über multivalente und kovalente Bindungen von reduzierten Nitrogruppen erfolgte.

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

Aufgrund des starken elektronenziehenden Charakters der Nitrogruppen weisen aromatische Nitroverbindungen ein hohes Redoxpotential auf. Neben dem durch die Nitrosubstituenten verursachten Fremdstoffcharakter erschwert der negativ induktive Effekt der Nitrogruppe den elektrophilen Angriff durch Oxygenasen aerober Bakterien. Dieser Effekt wird mit steigender Zahl des Nitrosubstituenten noch verstärkt. Entsprechend dem hohen Redoxpotential wurden sowohl im aeroben wie auch im anaeroben Metabolismus von TNT bisher überwiegend reduktive Initialreaktionen nachgewiesen:

Es wurde gezeigt, dass unter aeroben Bedingungen TNT an den Nitrogruppen unter Bildung von Hydroxylaminonitrotoluolen, Aminonitrotoluolen sowie Kondensationsprodukten (z.B. Azoxynitrotoluole) [10; 18; 19; 27; 31] partiell reduziert wird. Für die entstehenden Reduktionsprodukte konnte bisher kein weiterer mikrobieller Abbau nachgewiesen werden. Außerdem konnte bei aeroben Organismen ein reduktiver Initialangriff am aromatischen System beobachtet werden [30]. Bei dem dabei gebildeten Hydrid-Meisenheimer Komplex handelt es sich ebenfalls um ein „dead-end“ Produkt [31]. Während reduktive Initialreaktionen mehrfach beschrieben wurden, liegt nur eine Arbeit vor, bei der ein oxidativer Angriff und zwar an der Methylgruppe erfolgt. Als Transformationsprodukt konnte unter anderem 4-Amino-2,6-dinitrobenzoesäure identifiziert werden [29]. Trotz des hohen Metabolisierungspotentials von TNT erscheint ein produktiver Abbau von TNT durch aerobe Bakterien nach derzeitigem Kenntnisstand eher unwahrscheinlich.

Während beim aeroben Metabolismus von TNT nur eine teilweise Reduktion der Nitrogruppen gezeigt werden konnte, ist unter anaeroben Bedingungen eine vollständige Reduktion der Nitrogruppen möglich [11; 13; 22; 24; 25]. So wurde z. B. ein sulfat-reduzierendes Bakterium beschrieben, welches TNT zu 2,4,6-Triaminotoluol (TAT) umwandelt [24]. Im anaeroben Metabolismus von TNT wurde durch *Clostridium bifermentans* neben einer phenolischen Verbindungen auch ein Addukt von 2,4,6-Triaminotoluol mit Methylglyoxal nachgewiesen [21]. Obwohl TNT leicht einem reduktiven Cometabolismus unterliegt, konnte bei Bakterien bisher keine wesentliche Mineralisation festgestellt werden. Der Nachweis einer

Mineralisation von TNT in bodenfreien Systemen gelang bisher nur durch den Einsatz von Pilzen [9; 23; 26; 28].

In den letzten Jahren wurden zunehmend biologische Verfahren zur Behandlung TNT-kontaminierter Böden beschrieben. Besonders intensiv wurde die Kompostierung untersucht [6; 15; 17; 19; 32]. Bei diesen Verfahren wird der kontaminierte Boden mit leicht abbaubaren Zuschlagstoffen (z.B. Reststoffe aus der landwirtschaftlichen Produktion) versetzt und einer Kompostierung unterzogen. Eine Weiterentwicklung dieser Bodenbehandlungsmethode stellt die sogenannte anaerobe/aerobe Kompostierung dar. Hier wird die Boden-Substrat-Mischung in einer ersten Phase durch Flutung mit Wasser anaerobisiert. In der nachgeschalteten aeroben Phase wird das System belüftet [5; 7; 8]. Alle bisherigen Arbeiten deuten darauf hin, dass die Dekontamination von Böden mittels Kompostierung auf einer Transformation des TNT und einer anschließenden Einbindung der entstehenden Produkte in den Boden beruht [12].

Neben Kompostierungsverfahren wurden unter anderem unterschiedliche Bodensuspensionsreaktoren zur Dekontamination TNT-haltiger Böden getestet [14]. Ein zweistufiges Anaerob-/Aerob-Verfahren, bei dem die anaerobe Phase in einem Bodensuspensionsreaktor durchgeführt wurde, konnte am Rüstungsaltsstandort Hessisch Lichtenau-Hirschhagen erfolgreich erprobt werden [20]. Während der anaeroben Verfahrensstufe wurden TNT und Begleitkontaminanten unter Zusatz von Glucose durch biologische Reduktion der Nitrogruppen im Boden vollständig festgelegt. Die aerobe Verfahrensstufe diente dem biologischen Abbau der aus der Glucose gebildeten Gärprodukte sowie der Förderung des Humifizierungsprozesses der im Boden festgelegten Verbindungen. Die Stabilität und Irreversibilität der Festlegung wurde durch Experimente mit [¹⁴C]TNT belegt [4]. NMR-spektroskopische Untersuchungen der chemische Struktur der Bindung ergaben, dass die reduzierten Transformationsprodukte des TNT über sekundäre und tertiäre Amin- bzw. Amidbindungen kovalent an die organische Bodensubstanz gebunden waren [2]. Voraussetzung dieser kovalenten und multivalenten Festlegung scheint eine genügend lange und intensive reduktive Behandlung zu sein [3].

Herre et al. führten Freiland- und Laborversuche mit dem Pilz *Stropharia rugoso-annulata* durch [16]. Hierbei konnte in Reinkultur eine nahezu vollständige Elimination von TNT nachgewiesen werden. Obwohl der Pilz im bodenfreien System TNT mineralisieren konnte, war in Gegenwart von Boden vor allem eine Immobilisierung von TNT-Metaboliten nachweisbar.

Somit zeigten also alle bisherigen Untersuchungen, dass bei der biologischen Behandlung von TNT-kontaminierten Böden die Immobilisierung der Metabolite des TNT der quantitativ bedeutendste Reaktionsweg ist. Dieses Potential kann für die Sanierung von TNT-kontaminierten Böden genutzt werden, wenn sichergestellt ist, dass die Festlegung irreversibler Natur ist.

3 Angewandte Methoden

3.1 Boden

Der für die Versuche verwendete Boden wurde von der Arbeitsgruppe in Marburg, entsprechend der Absprache im Teilverbund, für alle Projektpartner zur Verfügung gestellt.

Der Boden stammt vom Werksgelände des ehemaligen Sprengstoffwerkes „Tanne“ bei Clausthal-Zellerfeld. Es handelt sich um ein Aliquot (30 kg) des Bodens, der auch zur maßstabsgerechten Erprobung der biologischen Sanierungsverfahren am Standort verwendet wurde. Der Boden wurde vor Ort auf eine Korngröße von 2,5 cm gesiebt. Für die vorliegenden Versuche wurde der naturfeuchte Boden (etwa 10 kg) auf eine Korngröße von 2 mm gebracht. Der Boden wurde bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Die Belastung an Nitroaromaten betrug: TNT (1193 ± 423 mg/kg TS); 4-ADNT (81 ± 4 mg/kg TS); 2-ADNT (53 ± 3 mg/kg TS); 2-Amino-4,6-dinitrobenzoesäure (15-60 mg/kg TS). Diese von der Arbeitsgruppe der Universität Marburg gemessenen Werte standen in guter Übereinstimmung mit den Werten, die im vorliegenden Teilprojekt gemessen wurden: TNT (960 mg/kg TS); 4-ADNT (66 mg/kg TS); 2-ADNT (70 mg/kg TS). Die Bestimmung der physikalischen Bodenparameter und Untersuchungen der Bodenmikroflora (nach MPN-Methode) wurden ebenfalls von der Arbeitsgruppe der Universität Marburg durchgeführt: Boden-pH: 7,4; Kalkgehalt: 2,2%; Glühverlust: 13,7%; Sandanteil: 47,5%; Schluffanteil: 39,7%; Tonanteil: 12,9%, aerobe und fakultativ anaerobe heterotrophe Organismen: $4,6 \times 10^7$; Clostridien: $1,4 \times 10^4$; Pilze: $1,7 \times 10^5$; TNT-reduzierende Organismen: $1,2 \times 10^6$.

3.2 Versuchsaufbau im Labormaßstab

Die Kompostierungsversuche im Labormaßstab wurden in einem von der Firma Umweltschutz Nord GmbH & Co, Ganderkesee, entwickelten und zur Verfügung gestellten Festbettreaktor durchgeführt. Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung des Reaktors. Das Gesamtvolumen des Reaktors betrug etwa 400 l. Der Reaktor bestand aus einem Edelstahlzylinder, der von einem Lochblech nach unten begrenzt wurde. Unterhalb des Lochbleches war eine Auffangwanne befestigt, in die bei der Kompostierung möglicherweise frei werdendes Wasser tropfen konnte. Nach oben hin wurde der Reaktor mit einem Edelstahldeckel verschlossen, in den verschiedene Öffnungen eingelassen waren. Durch drei dieser Öffnungen wurde unterschiedliche Temperaturfühler in den Reaktor eingeführt, welche die Temperatur im oberen, mittleren und unteren Bereich des Kompostes maßen. Die Temperaturdaten wurden über den gesamten Versuchszeitraum alle drei Stunden aufgezeichnet. Ein weiterer Fühler, der direkt in der Reaktormitte die Temperatur ermittelte, diente der Steuerung der Temperaturnachführung. Die Temperatur des Reaktorkerns wurde mittels eines außen am Reaktor festigten Heizmantels auch an die Außenbereiche des Kompostes angelegt. Dadurch konnte eine homogene Temperaturverteilung im gesamten Reaktor erreicht werden. Dies war eine Grundvoraussetzung, um die Kompostierung der maßstabsgerechten Erprobung im Labor zu simulieren. Der Reaktor wurde belüftet, indem Pressluft (200 l/h) unterhalb des Lochbleches eingeblasen wurde. Die Entlüftung war am Deckel des Reaktors angebracht, von wo die Luft über eine Kühlfalle abgeführt wurde. Der [¹⁴C]TNT- sowie [¹⁵N]TNT-dotierte Boden wurde in einen separaten, doppelbödigen Metallzylinder gefüllt. Dieser Zylinder war ebenfalls aus einem Edelstahl-Lochblech gefertigt, das einen guten Gasaustausch ermöglichte. Das Behältnis wurde durch einen Zwischenboden geteilt. Dies erlaubte es, den [¹⁴C]TNT- sowie den [¹⁵N]TNT-dotierten Boden getrennt zu behandeln (Abb. 1). Durch den Einbau dieses Metallzylinders in den Festbettreaktor wurde sichergestellt, dass der dotierte Boden unter den selben Temperatur-, Feuchtigkeits- und Redoxbedingungen inkubiert wurde wie der Boden im gesamten Reaktor.

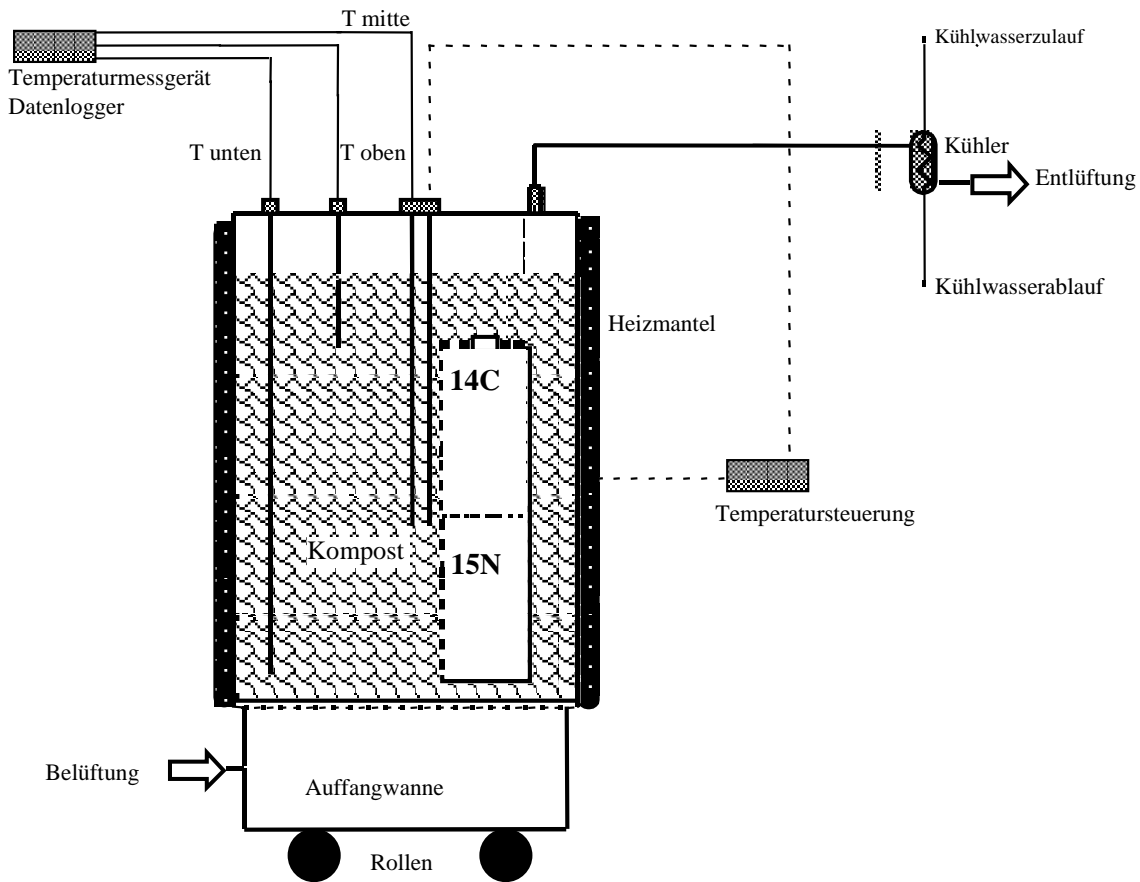


Abb. 1: Schematische Darstellung des von der Fa. Umweltschutz Nord GmbH & Co., Ganderkesee, entwickelten Festbettreaktors, in dem die beschriebenen Kompostierungsversuche mit $[^{14}\text{C}]\text{TNT}$ - und $[^{15}\text{N}]\text{TNT}$ -dotiertem Boden durchgeführt wurden.

3.3 Durchführung der Kompostierung

Bevor die Kompostierung durchgeführt werden konnte, musste der Boden mit $[^{14}\text{C}]\text{TNT}$ und $[^{15}\text{N}]\text{TNT}$ aufdotiert werden. Um eine einheitliche Handhabung in diesem Teilprojekt zu gewährleisten, wurde eine verbindliche Anleitung von der Arbeitsgruppe der Universität Marburg zur Verfügung gestellt. Es wurden 2,6 kg naturfeuchter Boden (= 2,0 kg Boden TS) für die Dotierung mit $[^{15}\text{N}]\text{TNT}$ und 2,5 kg naturfeuchter Boden (= 1,9 kg Boden TS) für die Experimente mit $[^{14}\text{C}]\text{TNT}$ eingewogen. Beide Bodenchargen wurde auf eine Korngröße von 2 mm gesiebt. Das $[^{15}\text{N}]\text{TNT}$ (12 g/ 2 kg Boden TS) wurde vorsichtig in einem Mörser gemahlen und in kleinen Portionen dem Boden beigemischt. Um den Boden, der mit $[^{14}\text{C}]\text{TNT}$ dotiert werden sollte, im gleichen Ausmaß zu kontaminieren wie den $[^{15}\text{N}]\text{TNT}$ -dotierten Boden, wurde zusätzlich zu dem $[^{14}\text{C}]\text{TNT}$ noch unmarkiertes TNT (12 g/ 2 kg Boden TS) zugegeben. Das TNT wurde wie oben beschrieben dem Boden beigemischt. Danach wurde das $[^{14}\text{C}]\text{TNT}$ ($6,2 \times 10^6$ Bq) in 2 ml Methanol gelöst, auf ein Aliquot des Bodens gegeben (etwa 10 g) und intensiv gemischt. Nach Abdampfen des Lösungsmittel wurde der dotierte Boden in den Restboden eingemischt. Beide Böden ($[^{15}\text{N}]\text{TNT}$ - und $[^{14}\text{C}]\text{TNT}/\text{TNT}$ -dotiert) wurden nach der Dotierung für zwei Wochen bei 4°C im Dunkeln gelagert, um eine künstliche Alterung zu erreichen.

Direkt vor dem Versuchsstart wurden die beiden Böden mit Zuschlagstoffen gemischt. Diese bestanden aus unterschiedlichen landwirtschaftlichen Reststoffen und sollten als leicht verfügbare Stickstoff- und Kohlenstoffquelle die Kompostierung ermöglichen. Die Zuschlagstoffmischung wurde von der Firma Umweltschutz Nord GmbH & Co., Ganderkesee, zur Verfügung gestellt. Das Trockengewicht der Mischung betrug 31%. Die Mischungsverhältnisse von Boden und Zuschlagstoffen sind für beide Versuchsansätze in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1: Mischungsverhältnis von Boden und Zuschlagstoffen für die Versuche mit [¹⁵N]TNT- und [¹⁴C]TNT/TNT-dotiertem Kompost.

Dotierung mit	Boden			Zuschlagstoffe			Dotierung Boden/ Zuschlagstoffgemisch		
	feucht (g)	TS (g)	Vol. (l)	feucht (g)	TS (g)	Vol. (l)	[¹⁵ N] TNT g/kg TS	[¹⁴ C] TNT Bq/kg TS	TNT g/kg TS
[¹⁵ N]TNT	1848	1410	ca. 2	1560	484	ca. 2	4,5	-	(0,8) ¹
[¹⁴ C]TNT/ TNT	1877	1432	ca. 2	1410	437	ca. 1,9	-	2,5 x 10 ⁶	4,9 (0,8) ¹

¹ Die Werte in Klammern bezeichnen die Konzentration des TNT, das durch die Kontamination im verwendeten Boden vorhanden war.

Beide Mischungen waren wie folgt dotiert: 4,5 g [¹⁵N]TNT/kg TS Boden-/Zuschlagstoffgemisch ([¹⁵N]TNT-dotierter Boden); 2,6 x 10⁶ Bq [¹⁴C]TNT und 4,9 g TNT/kg TS Boden-/Zuschlagstoffgemisch ([¹⁴C]TNT-dotierter Boden). Der [¹⁴C]TNT-dotierte Boden wurde in den oberen Teil des beschriebenen inneren Metallzylinder gefüllt, der [¹⁵N]TNT-dotierte Boden in den unteren (Abb. 1). Der gesamte Reaktor wurde mit einer im selben Verhältnis hergestellten Boden/Zuschlagstoffmischung befüllt. Dabei wurde darauf geachtet, dass der innere Metallzylinder möglichst in der Mitte des Reaktors plaziert wurde. Der Reaktor wurde bis zum oberen Rand gefüllt, da es im Laufe der Kompostierung zu einer teilweise erheblichen Volumenreduktion kam. Der Reaktordeckel wurde geschlossen, so dass der Reaktor ein geschlossenes System darstellte. Die Temperatur wurde über drei Messfühler alle drei Stunden gemessen und aufgezeichnet. Eine Temperaturregelung über einen außen angebrachten Heizmantel machte eine homogene Temperaturverteilung im Reaktor möglich. Zur Simulation der großtechnischen Kompostierung musste das Boden/ Zuschlagstoffgemisch am Anfang täglich, später in größeren Zeitintervallen gewendet werden. Dazu wurde zuerst der Reaktordeckel geöffnet und der Metallzylinder mit dem [¹⁴C]TNT- bzw. [¹⁵N]TNT-dotierten Boden entnommen. Dann wurde der gesamte Reaktorinhalt ausgeleert, intensiv gewendet, gemischt und, wenn nötig, zerkleinert. In der späten Phase der Kompostierung wurde die Boden- Zuschlagstoffmischung mehrfach befeuchtet. Die dotierte Kompostmischung in dem inneren Metallzylinder wurde jeweils parallel behandelt. Um die durch den Abbau von organischem Material bedingte Volumenreduktion im Reaktor auszugleichen, wurde Boden/Kompostmaterial, das in einem separaten Komposter parallel behandelt wurde, jeweils in den Reaktor nachgefüllt.

Zu festgelegten Zeitpunkten wurden aus dem [^{14}C]TNT- bzw. [^{15}N]TNT-dotierten Boden Proben für HPLC- und Radioaktivitäts-Bestimmung entnommen. Die Probenahme und die Extraktion erfolgte nach der im Teilverbund vorgeschriebenen Methode. Jeweils 2-4 g Boden wurden eingewogen und mit Aqua dest. 15 min im Ultraschallbad extrahiert. Nach Zentrifugation (6000 U/min) wurde der wässrige Überstand mit der HPLC gemessen. Bei dem [^{14}C]TNT-dotierten Boden erfolgte darüber hinaus eine Radioaktivitätsmessung. Der Bodenrest wurde dann 15 min im Ultraschallbad mit Methanol extrahiert. Die Extraktion wurde zweimal wiederholt. Die Konzentration von TNT und seinen Metaboliten wurde in den methanolischen Extrakten mittels HPLC bestimmt. Auch hier wurde bei Extrakten des ^{14}C -markierten Boden eine Radioaktivitätsbestimmung durchgeführt.

3.4 Festkörper- ^{15}N -NMR-Spektroskopie und Remobilisierung

Die Probenvorbereitung für die ^{15}N -NMR-Spektroskopie wurde entsprechend der einheitlichen Vorschrift des Teilprojektes durchgeführt. Es wurden eine Bodenprobe vor der Dotierung und Zugabe der Zuschlagstoffe sowie eine Endprobe nach der Kompostierung NMR-spektroskopisch untersucht. Von der Endprobe wurden fünf verschiedene Fraktionen getrennt gemessen. Zuerst wurde der Gesamtboden ohne jegliche Extraktion analysiert, dann wurde Boden untersucht, bei dem der desorbierbare Anteil der TNT-Metaboliten durch eine Acetonitril-Extraktion abgetrennt war. Eine weitere Teilprobe war die Huminfraction des Bodens, die durch aufeinanderfolgende Extraktionen mit Acetonitril und NaOH (0,5 M) erhalten wurde. Darüber hinaus wurde die Humin- und Fulvosäurefraktion des Bodens jeweils getrennt NMR-spektroskopisch untersucht.

Die Versuche zur Stabilität und Remobilisierung der festgelegten TNT-Metabolite wurden gemäß der verbindlichen Vorschriften des Teilprojekts durchgeführt. Für die Versuche wurde der Boden nach abgeschlossener Kompostierung verwendet. Die Untersuchungen zur Remobilisierbarkeit nach Zermahlen des Bodens mit der Kugelmühle, durch Wasserdampfextraktion, durch den Zusatz von humin-abbauenden Pilzen und radikalbildenden Enzymen sowie die Pflanzenverfügbarkeit und der Rhizosphäreneffekt wurden von den Projektpartnern in Marburg bzw. Jena durchgeführt. Im Rahmen des vorliegenden Teilprojektes wurde die Remobilisierbarkeit durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen, durch Zusatz von Komplexbildnern (EDTA) und durch pH-Änderung (Simulation von saurem Regen) untersucht.

Die Versuche zur Remobilisierung von TNT-Metaboliten durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen wurden durchgeführt, indem etwa 100 g feuchter, ^{14}C -dotierter Boden im 24-Stunden-Rhythmus bei -20°C eingefroren und bei 40°C aufgetaut und inkubiert wurde. Jeweils nach dem Auftauen wurde die Gasphase eine Stunde lang mit Luft gespült und entstandenes $^{14}\text{CO}_2$ über Waschflaschen, die mit 1 M NaOH gefüllt waren, sorbiert. Diese Behandlung erfolgte einen Monat lang. Danach wurde der Boden einen Monat bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte einen weiteren Monat der Temperaturwechsel von $-20^\circ\text{C}/40^\circ\text{C}$ und einen letzten Monat die Inkubation bei Raumtemperatur. Jeweils zu Beginn eines neuen Behandlungsabschnittes und am Ende des Versuchs wurde Boden zur Extraktion entnommen. Die Extraktion wurde wie oben beschrieben mit Methanol durchgeführt. Die Konzentration von TNT und seinen Reduktionsprodukten wurde mittels HPLC und Radioaktivitätsmessung bestimmt. Als Kontrolle diente eine Bodenprobe, die über den

gesamten Versuchszeitraum bei Raumtemperatur inkubiert war. Beide Ansätze wurde jeweils als Doppelbestimmung ausgeführt.

Die Remobilisierung durch Auflösung von metall-organischen Komplexen wurde mittels EDTA-Extraktion untersucht. Dabei erfolgte zuerst eine Einwaage von etwa 2 g Boden in ein Zentrifugenröhrchen. Die Extraktion (90 min) erfolgte mit einer 0,01, 0,025 und 0,05 M wässrigen EDTA-Lösung auf einem Rotationsschüttler. Nach Zentrifugation wurde der Bodenrest wie oben beschrieben methanolisch extrahiert. Sowohl die EDTA- als auch die Methanol-Extrakte wurden mittels HPLC und Flüssig-Radioaktivitätsbestimmung analysiert. Die Radioaktivität der extrahierten Bodenreste wurde zur vollständigen Bilanzierung mittels Verbrennungsanalyse bestimmt.

Die Stabilität der Festlegung wurde auch durch Simulation eines 1000-jährigen Regens überprüft. Dazu wurden 3 x 5 g des Bodens in 400-ml-Gefäße eingewogen. Die Extraktion erfolgte mit Aqua dest., das mit einer Mischung von Salpeter- und Schwefelsäure (2:3, v/v) auf einen pH von 5 angesäuert wurde. Jeweils 100 ml dieser Mischung wurden dem Boden zugegeben und 18 Stunden bei 30°C inkubiert. Nach der Extraktion wurde zentrifugiert und der Bodenrest in gleicher Weise einer weiteren Extraktion unterzogen. Insgesamt wurden zehn Extraktionen durchgeführt. Die Extrakte wurden jeweils nach einer Filtration mit einem 0,45 µm Membranfilter mittels HPLC und ¹⁴C-Radioaktivitätsmessung analysiert. Die Radioaktivität der extrahierten Bodenreste wurde zur vollständigen Bilanzierung ebenfalls mittels Verbrennungsanalyse bestimmt.

3.5 Analytische Methoden

Die Konzentration von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) und seinen Reduktionsprodukten Hydroxylaminodinitrotoluole (HADNT), 4-Amino-2,6-dinitrotoluol (4-ADNT), 2-Amino-4,6-dinitrotoluol (2-ADNT), 2,4-Diamino-6-nitrotoluol (2,4-DANT), 2,6-Diamino-4-nitrotoluol (2,6-DANT), 2,4,6-Triaminotoluol (TAT), 4,4',6,6'-Tetranitro-2,2'-azoxytoluol (2,2'-AZOXY) und 2,2',6,6'-Tetranitro-4,4'-azoxytoluol (4,4'-AZOXY) wurde mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt. Für die Trennung der Verbindungen wurde ein Eluent aus Wasser und Methanol verwendet, der entsprechend einem festgelegten Gradientenprogramm zusammengesetzt war (Tab. 2). Zur chromatographischen Trennung wurde eine 250 mm lange Trennsäule (LiChrospher 100 RP-18 in LiChroCart 250-4, Merck, Darmstadt) verwendet. Die Kalibrierung der Anlage wurde zu Beginn jeder Messreihe vorgenommen. Als Standard dienten Lösungen von TNT und seinen Metaboliten jeweils 0,1 mM in Methanol. Die Probenaufgabe wurde in der Regel mit einem Autosampler (Gina 50, Gynkotec, Germering) durchgeführt. Die Identifizierung der Substanzen erfolgte mittels spezifischer Retentionszeiten sowie durch einen Vergleich *in situ* mittels eines UV/VIS-Photodiodenarray-Detektors (UVD 340 S, Gynkotec, Germering) gemessener Spektren mit Referenzspektren.

Tab. 2: Zusammensetzung des Eluenten für die HPLC-Analyse von TNT und seinen Reduktionsprodukten.

Zeit (min)	Programm	Eluent-Zusammensetzung	
		Methanol (%)	Wasser (%)
0,0 - 10,0	isokratisch	30	70
10,0 - 10,1	graduell (linear)	30 - 40	70 - 60
10,1 - 34,0	isokratisch	40	60
34,0 - 36,0	graduell (linear)	40 - 75	60 - 25
36,0 - 50,0	isokratisch	75	25
50,0 - 46,1	graduell (linear)	75 - 30	25 - 70
46,1 - 50,0	isokratisch	30	70

Die ^{14}C -Radioaktivität wurde bestimmt indem ein Aliquot der zu messenden Probe (50-100 μl) mit 10 ml eines Szintillations-Cocktails (ecoplus rotiszint, Roth, Karlsruhe) gemischt wurde und mittels eines β -Szintillationszählers (1414 Winspectral, Wallac, Finnland) gemessen wurde.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Physikalische Größen und Verlauf der TNT-Reduktion

Die Temperatur wurde über die gesamte Kompostierung in drei unterschiedlichen Bereichen (unten/mitte/oben) gemessen. Die Temperaturverlaufskurve ist in Abbildung 2 dargestellt.

Generell lag die Temperatur im oberen Reaktorbereich am höchsten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Reaktor von unten nach oben belüftet wurde und so keine Kühlung durch die einströmende Luft im oberen Bereich stattfand. Insgesamt war die Temperatur im Reaktor sehr homogen verteilt. Die Temperaturdifferenz zwischen den einzelnen Messpunkten betrug maximal 5°C . Zu Beginn des Versuchs kam es zu einer starken Temperaturerhöhung mit Werten bis 76°C . Temperaturen um 70°C wurden in den ersten 11 Tagen gemessen. Das periodische, am Anfang tägliche Umsetzen des Boden/Kompostgemisches bewirkte ein zwischenzeitliches Absinken der Temperatur auf Werte um $40\text{-}50^\circ\text{C}$. Nach erneuter Inkubation erreichte die Temperatur nach etwa 12 Stunden wieder den Ausgangswert. Die maximale Temperatur verringerte sich im Laufe der Inkubation parallel mit dem Abbau der leichtverfügbaren Kohlenstoffquellen und der damit einhergehenden Volumenreduktion des Boden/Kompostgemisches im Reaktor. Nach 54 Tagen wurde noch eine maximale Temperatur von $40\text{-}45^\circ\text{C}$ gemessen. Das Abschalten der Temperaturnachführung bewirkte, dass die Temperatur nicht mehr über 25°C anstieg (Abb. 2).

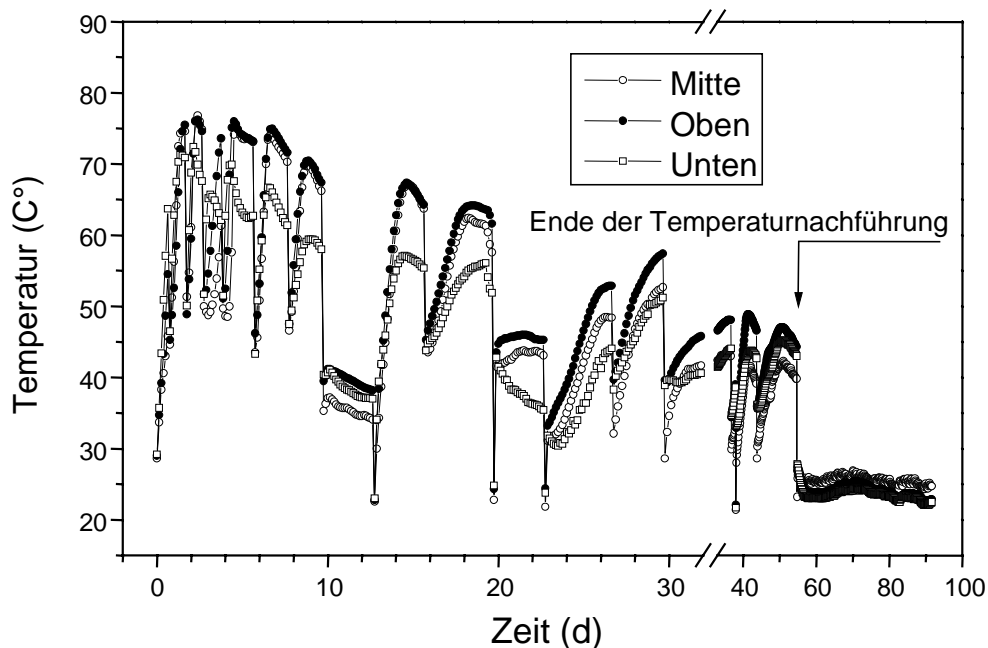


Abb. 2: Temperaturverlauf im Reaktor während der Kompostierung. Die Temperatur wurde mittels Messfühler in unterschiedlichen Höhen im Reaktor gemessen.

Über die gesamte Kompostierung war ein alkalischer pH von 8,0 – 8,5 in den wässrigen Extrakten des Kompostes messbar. Dies ist in der ersten Linie auf die Entstehung von Ammoniak aus Harnsäure zurückzuführen, was auch durch die Geruchsentwicklung bestätigt wurde.

Die Konzentration von desorbierbarem TNT und seinen Reduktionsprodukten (HADNT, 4-ADNT/ 2-ADNT, 2,4-DANT/2,6-DANT, 2,2'-AZOXY, 4,4'-AZOXY) wurde durch aufeinander folgende wässrige und methanolische Extraktionen bestimmt. Der zu Beginn der Behandlung gemessene Wert von 4,5 g TNT/kg TS Boden war bei dem ^{15}N -TNT-dotierten Boden etwas geringer als der berechnete Wert von 5,3 g TNT/kg TS Boden, der sich aus der TNT-Konzentration der Kontamination und der aufdotierten TNT-Menge bezogen auf die Boden/Substratmischung ergab (Abb. 3). Bei dem ^{14}C -TNT-dotierten Boden war die Diskrepanz zwischen berechnetem Wert (5,7 g TNT/kg TS Boden) und gemessenem Wert (4,0 g TNT/kg TS Boden) noch größer. Dies kann sowohl mit der am Anfang des Versuchs vorhandenen großen Inhomogenität der Boden/Substratmischung, die sich auch in beträchtlichen Standardabweichungen der drei Parallelproben (1,6 g TNT/kg TS ^{15}N -TNT-Boden und 1,7 g TNT/kg TS ^{14}C -TNT-Boden) äußerte, als auch durch eine sehr schnelle Reduktion zu ADNT erklärt werden. Eine im Verhältnis zur eingesetzten TNT-Menge sehr geringe Konzentration von isomeren Hydroxylaminodinitrotoluolen (HADNT) wurde zwei Tage nach Inkubationsbeginn gemessen: 0,33 mg/kg TS. In allen anderen Bodenproben war HADNT nicht nachweisbar. Die hohe Reaktivität von HADNT in Gegenwart von Huminstoffen und anorganischen Bodenbestandteilen [3] ermöglicht offensichtlich eine sehr schnelle Festlegung oder eine Reaktion mit anderen reduzierten TNT-Metaboliten, die dazu führt, dass HADNT nicht mehr aus dem Boden extrahierbar ist. Die aus HADNT und Nitrosodinitrotoluol entstehenden Azoxy-Verbindungen konnten aus dem Boden extrahiert werden. Die Konzentration von 4,4'-Azoxy erreichte bei beiden Böden 1-2 Tage nach Inkubationsbeginn einen maximalen Wert von 7-13 mg/kg TS. Die Konzentration nahm im Laufe der weiteren Behandlung ab und lag nach 9 Behandlungstagen unter der Nachweisgrenze. Andere isomere

Azoxy-Verbindungen waren nicht nachweisbar. Insgesamt war die Konzentration von 4,4'-Azoxy gering im Vergleich zu der in Boden vorhandenen TNT-Menge. Versuche mit ähnlich hoch TNT-belasteten Böden, die in einem Bodensuspensionsreaktor ausgeführt wurden, zeigten eine wesentliche höhere Konzentration von Azoxy-Verbindungen [2].

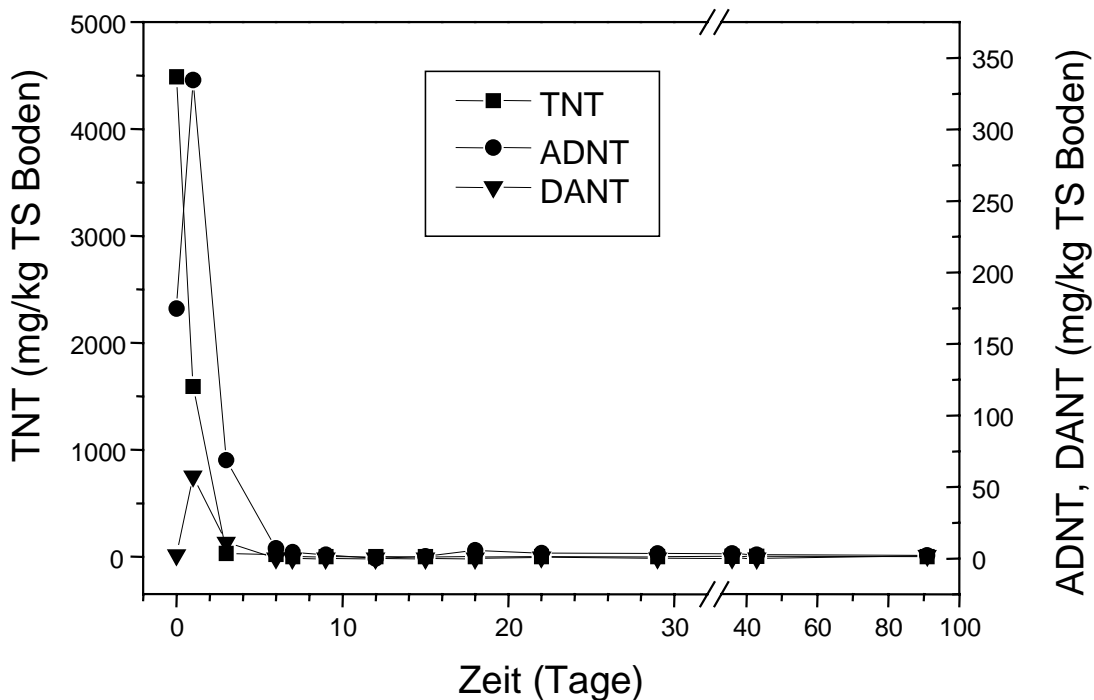


Abb. 3: Konzentrationsverlauf von desorbierbarem TNT, ADNT und DANT. Die Substanzen wurden durch aufeinanderfolgende wässrige und methanolische Extraktionen bestimmt.

Die maximale ADNT-Konzentration wurde ebenfalls 1-2 Tage nach Inkubationsbeginn gemessen. Im $[^{15}\text{N}]$ TNT-dotierten Boden lag sie bei 334 mg/kg TS Boden (Abb. 3), im $[^{14}\text{C}]$ TNT-dotierten Boden bei 227 mg/kg TS Boden. Die ADNT-Konzentration sank im weiteren Inkubationsverlauf innerhalb von 7-10 Tagen auf einen Wert unter 10 mg/kg TS Boden. Am Ende der Behandlung wurde eine ADNT-Konzentration von < 4 mg/kg TS Boden gemessen. DANT wurde, wenn auch in nur geringen Mengen, ebenfalls aus den Böden extrahiert. Die maximale Konzentration betrug bei dem $[^{15}\text{N}]$ TNT-dotierten Boden am Tag nach Behandlungsbeginn 57 mg/kg TS Boden, bei dem $[^{14}\text{C}]$ TNT-dotierten Boden wurde eine Konzentration von 50 mg/kg TS Boden gemessen (nach 4 Inkubationstagen). Auch die DANT-Konzentration nahm schnell ab und betrug am Ende der Behandlung < 1 mg/kg TS Boden. TNT konnte erwartungsgemäß über den gesamten Inkubationszeitraum nicht nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Experimenten, die im bodenfreien System oder im Bodensuspensionsreaktor durchgeführt wurden [4; 11], war bei den vorliegenden Versuchen keine eindeutige zeitliche Aufeinanderfolge der Reduktionsprodukte des TNT sichtbar. Die Reduktion von TNT, die Bildung und Reduktion von ADNT und DANT verlief simultan und im Vergleich mit den Experimenten im Bodensuspensionsreaktor sehr schnell. Nach 12 Tagen Kompostierung betrug die Restkonzentration von TNT, ADNT und DANT in beiden Böden < 10 mg/kg TS Boden. Bei einer Ursprungskontamination von mehr als 5000 mg/kg TS Boden entspricht dies einer Abreicherung von 99,8 %.

Die Geschwindigkeit und die Vollständigkeit der TNT-Abreicherung sind auf spezifische Eigenschaften der Kompostierung zurückzuführen. Insgesamt spielen sicherlich drei Faktoren eine entscheidende Rolle: Die hohe Temperatur, die bei der Kompostierung erreicht wird, der alkalische pH und der hohe Anteil von reaktivem organischem Material, das als Matrix und Reaktionspartner für reduzierte Metabolite des TNT zur Verfügung steht. Ein weiterer Faktor ist sicherlich auch der wechselnde Redoxzustand im Reaktor. Inwieweit aber bei dem generell aeroben Prozess durch die große Sauerstoffzehrung anaerobe Mikro-Nischen entstehen, lässt sich schwer quantifizieren. Es scheinen aber partiell anaerobe Bereiche vorhanden zu sein, was dadurch bestätigt wird, dass eine Reduktion bis zum DANT stattfindet. Die quantitativ wichtigste Reaktion ist aber die Bindung von teilreduzierten Metaboliten des TNT an Bodenbestandteile. So war schon zwischen reduziertem TNT und gebildeten ADNT eine beträchtliche Bilanzlücke sichtbar: nur 7% des im Boden vorhandenen TNT konnte als ADNT wiedergefunden werden. Die Bilanzlücke vergrößerte sich nochmals bei dem nächsten Reduktionsschritt: vom eingesetzten TNT konnte nur 1% als DANT aus dem Boden extrahiert werden. Diese Ergebnisse spiegelten sich auch in der Bilanzierung des dotierten [^{14}C]TNT wieder.

4.2 Massenbilanz

Um eine Massenbilanz des [^{14}C]TNT und seiner Metabolite zu erstellen, wurde die Radioaktivität in den wässrigen und methanolischen Extrakten bestimmt. Für eine vollständige Bilanzierung war es notwendig, am Anfang und am Ende der Behandlung sowie an ausgewählten Probenahmezeitpunkten während der Kompostierung auch die nach der Extraktion am Bodenrest gebundene Radioaktivität zu bestimmen. Die Ergebnisse dieser Verbrennungsanalyse waren allerdings zur Drucklegung des vorliegenden Berichts noch nicht verfügbar. In Abbildung 4 sind die Prozent der Radioaktivität dargestellt, die in den wässrigen- bzw. im methanolischen Extrakten gefunden wurden. Die am Boden gebundene Radioaktivität wurde aus der Differenz der Radioaktivität in wässrigen/methanolischen Extrakten und der eingesetzten Radioaktivität rechnerisch bestimmt. Zum ersten Probenahmezeitpunkt direkt am Beginn des Versuchs wurden etwa 50% der Gesamtradioaktivität in den methanolischen Extrakten und 22% der Gesamtradioaktivität im wässrigen Extrakt gefunden. Die Radioaktivität, die mittels Methanol extrahiert werden konnte, nahm sehr schnell ab: sie lag nach 6 Tagen Kompostierung bei 2,6% der Gesamtradioaktivität. Dieser Wert schwankte während der weiteren Behandlung nur noch leicht und sank am Ende der gesamten Kompostierung auf 1,1% ab. Auch die Radioaktivität im wässrigen Extrakt nahm zuerst schnell ab: nach 4 Tagen waren nur noch 5,0% der Gesamtradioaktivität in dieser Fraktion zu finden. Nach dem achten Inkubationstag stieg die Radioaktivität allerdings wieder auf einen Wert von 15,5% an. Zwischen dem 16. und 23. Behandlungstag fiel die im wässrigen Extrakt gemessene Radioaktivität auf Werte zwischen 4,0% und 5,5% der Gesamtradioaktivität. Danach stieg sie wiederum leicht an und betrug am Ende des Versuch 7,3% der Gesamtradioaktivität. Die Bindung des [^{14}C]TNT und seiner Metaboliten an den Boden erfolgte sehr schnell. Nach 4 Tagen waren bereits mehr als 90% der Gesamtradioaktivität an den Boden gebunden. Im weiteren Inkubationsverlauf schwankten die Werte, entsprechend den Schwankungen der Radioaktivität in den wässrigen Extrakten zwischen 82,0% und 92,1%. Am Ende der Behandlung waren 92,6% der Gesamtradioaktivität an Bodenbestandteilen gebunden. Vergleichbare Versuche in einem Bodensuspensionsreaktor erbrachten eine vollständigere Festlegung der TNT-Metabolite (>

98% der Gesamtradioaktivität) an den Boden [4]. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass bei Versuchen im Bodensuspensionsreaktor die Fraktion der wasserlöslichen Huminstoffe, an denen TNT-Metabolite gebunden waren, deutlich geringer war als bei der Kompostierung.

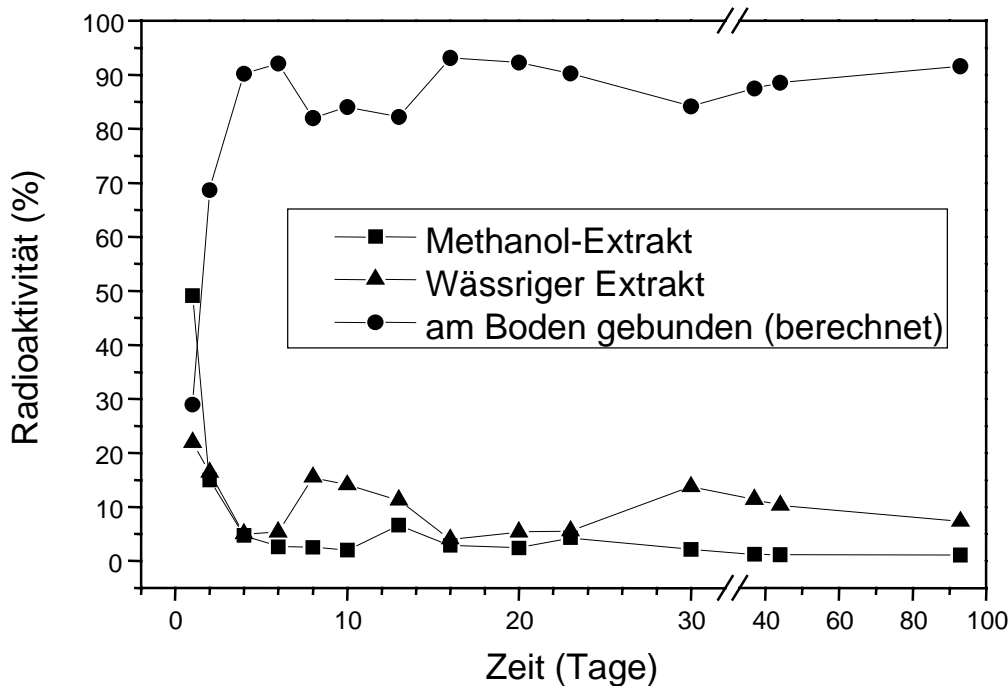


Abb. 4: Massenbilanz des $[^{14}\text{C}]$ TNT und seiner Metabolite in unterschiedlichen Fraktionen (wässriger- und methanolischer Extrakt, Restboden) während der Kompostierung.

Um die chemischen Eigenschaften derjenigen radioaktiv-markierten Substanzen, die mit Wasser oder Methanol extrahiert wurden, näher zu charakterisieren, erfolgte eine Auftrennung der Stoffe mittels HPLC und eine Fraktionierung des Eluenten. Diese Fraktionierung wurde zu drei unterschiedlichen Probenahmezeitpunkten durchgeführt: nach 4, 29 und 43 Tagen. Die Extrakte der Bodenprobe nach 43 Tagen wurde zudem einer sauren Hydrolyse unterzogen. Das Ergebnis der Fraktionierung des wässrigen und des methanolischen Extraktes der Bodenprobe nach 43 Tagen ist in Abbildung 5 dargestellt. Der überwiegende Anteil der Radioaktivität beider Extrakte ist in der ersten Fraktion des HPLC-Laufes zu finden (60,7% der Radioaktivität im wässrigen Extrakt und 36,5% im methanolischen Extrakt). Entsprechend der Chromatographie-Bedingungen (siehe Abschn. 3.5) sind in dieser Fraktion alle stark polaren Bestandteile, auch die huminstoffartigen Substanzen zu finden. Die Radioaktivität in den anderen Fraktionen war gering (0,9% - 7,4%). Eine Ausnahme bildete die Fraktion des Retentionsvolumen 26-29 ml des methanolischen Extraktes. In dieser Fraktion konnte mittels HPLC-Analyse 4-ADNT gemessen werden. Dies spiegelt sich auch in der Menge der gefundenen Radioaktivität wieder: 16,7% der Gesamtradioaktivität wurden in dieser Fraktion gefunden. Die Konzentrationen aller anderen TNT-Metabolite in beiden Extrakten lag unter der Nachweisgrenze. Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass die TNT-Metabolite an polare, vermutlich huminstoffartige Substanzen gebunden waren, die durch die Extraktionen mobilisiert werden konnten. Dies deckt sich wiederum mit vergleichbaren Versuchen im Bodensuspensionsreaktor, bei denen

ebenfalls der größte Teil der Radioaktivität in der Fraktion der polaren Substanzen gefunden wurde [4].

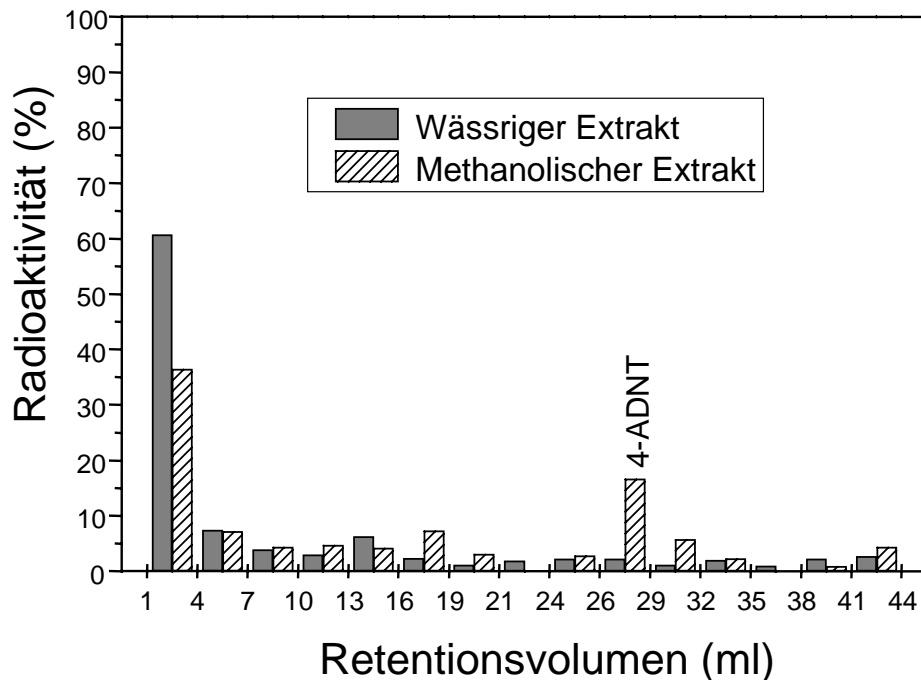


Abbildung 5: Fraktionierung des wässrigen- bzw. methanolischen Extraktes des ^{14}C TNT-dotierten Bodens nach 44 Tagen Kompostierung mittels HPLC. Unter den gegebenen Chromatographie-Bedingungen eluierten stark polare Substanzen mit einem Retentionsvolumen von 1-4 ml. 4-ADNT war die einzige Substanz, die mittels Spektenvergleich eindeutig identifiziert werden konnte.

Bei der Kompostierung allerdings war die absolute Menge der Radioaktivität, die in der Fraktion der polaren Substanzen gefunden wurde, größer als bei den Versuchen im Bodensuspensionsreaktor (4,7% der Radioaktivität im gesamten System gegenüber 0,9%) . Dies belegt nochmals die Vermutung, dass es bei der Kompostierung ein deutlicher Anteil der TNT-Metabolite an wasserlösliche und leicht mobilisierbare Substanzen gebunden oder in solche metabolisiert wurde (siehe oben).

Eine saure Hydrolyse des wässrigen Extraktes der Bodenprobe nach 43 Tagen erbrachte keine signifikante Änderung des Verteilungsmuster der Radioaktivität in den Fraktion oder der HPLC-Analyse. Dies deutet darauf hin, dass die Festlegung der TNT-Metabolite durch die saure Hydrolyse nicht aufgehoben werden konnte.

Die Fraktionierungen der Bodenproben nach 4 und 29 Inkubationstagen erbrachten im wesentlichen dieselben Ergebnisse. Der einzige Unterschied war, dass bei diesen Proben im methanolischen Extrakt noch TNT, 4-ADNT und 2,4-DANT mittels HPLC nachgewiesen wurde. Dies war aber bei den frühen Probenahmezeitpunkten zu erwarten gewesen.

4.3 NMR-Untersuchungen und Versuche zur Remobilisierbarkeit

Wie in Abschnitt 3.4 dieses Teilprojektes beschrieben, wurden unterschiedliche Fraktionen des Boden nach Abschluss der Kompostierung NMR-spektroskopisch untersucht: Der

Gesamtboden ohne jegliche Extraktion, der Boden nach Acetonitril-Extraktion, die Huminfraction des Bodens sowie die extrahierten Humin- und Fulvosäuren. Die Spektren wurden von Frau Dr. H. Knicker, Technische Universität München, Lehrstuhl für Bodenkunde, aufgenommen. Auf die speziellen Messbedingungen sowie spektroskopischen Detailfragen wird im vorliegenden Bericht nicht eingegangen. In Abbildung 6 und 7 sind die Festkörper ^{15}N -NMR-Spektren des Bodens nach Abschluss der Kompostierung ohne jegliche Extraktion (Abb.6 A) sowie nach Acetonitrilextraktion (Abb.6 B) sowie die Spektren der extrahierten Humin- und Fulvosäuren (Abb. 7 A, B) dargestellt. Das beste Signal-Rausch-Verhältnis ist im NMR-Spektrum der Huminsäuren zu verzeichnen. Parallel durchgeführte Radioaktivitätsmessungen zeigten, dass in dieser Fraktion 42,6% der TNT-stämmigen Transformationsprodukte gebunden waren. In der Fulvosäurenfraktion waren dagegen nur 1,2% Radioaktivität gebunden. Dies spiegelt sich auch im schlechten Signal-Rausch-Verhältnis des NMR-Spektrums wieder (Abb. 7 B). Durch die Acetonitrilextraktion wurde nur eine geringe Menge an Radioaktivität desorbiert (2,5 % der Gesamtradioaktivität). Generell weisen alle Spektren keine signifikanten Unterschiede auf.

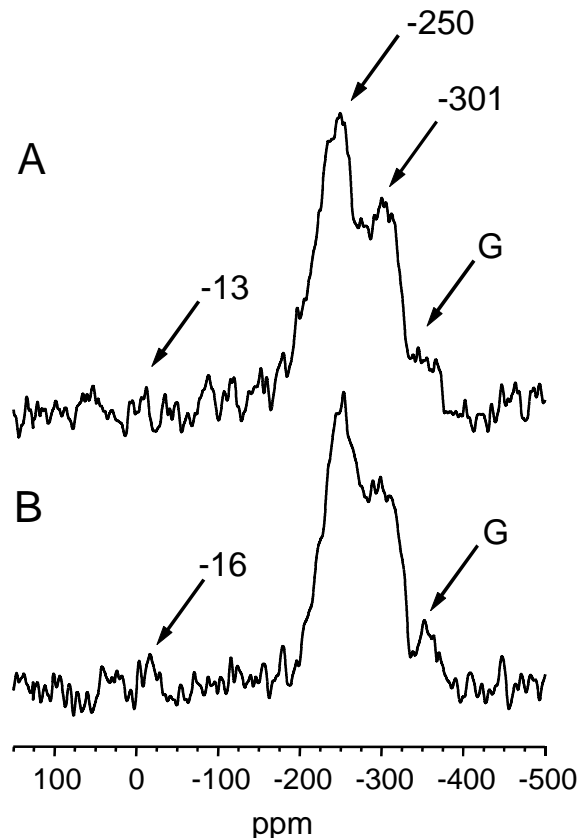


Abb. 6: Festkörper- ^{15}N -NMR-Spektren des Gesamtbodens nach der Kompostierung: Boden ohne Extraktion (A), Boden nach Acetonitrilextraktion (B). Das mit „G“ bezeichnete Signal ist auf spezifische Messbedingungen zurückzuführen und entspricht keiner realen chemischen Verschiebung.

Die ^{15}N -NMR-Spektren zeigten ein dominantes Signal im Bereich von -250 ppm. Dieser Verschiebungsbereich ist Kondensationsprodukten des TNT (Indole, Pyrrole, Anilide, Amide) zugeordnet. Ein schwächeres Signal wurde im Bereich von -300 ppm beobachtet. Dies ist der Verschiebungsbereich von aromatischen Aminen. Dieses Signal war allerdings gegenüber

entsprechenden Messungen, die an Bodenproben nach Behandlung im Bodensuspensionsreaktor durchgeführt wurden [1], etwas in den positiven Bereich verschoben. Diese Verschiebung ist auf die Existenz von elektronenziehenden Gruppen am Molekül zurückzuführen. Mögliche Substituenten sind Carbonyl- oder Nitrogruppen. Carbonylgruppen könnten durch eine Oxidation der Methylsubstituenten am aromatischen Ring entstanden sein. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass es sich um Nitrogruppen handelt. Dies wird durch die Beobachtung von kleinen Signalen um 0 ppm bestätigt, die Nitrogruppen zugeordnet werden konnten. Diese Signale sind sowohl in den Gesamtbodenproben (Abb. 6 A, B) als auch in der Huminsäurefraktion des Bodens (Abb. 7 A) deutlich zu sehen.

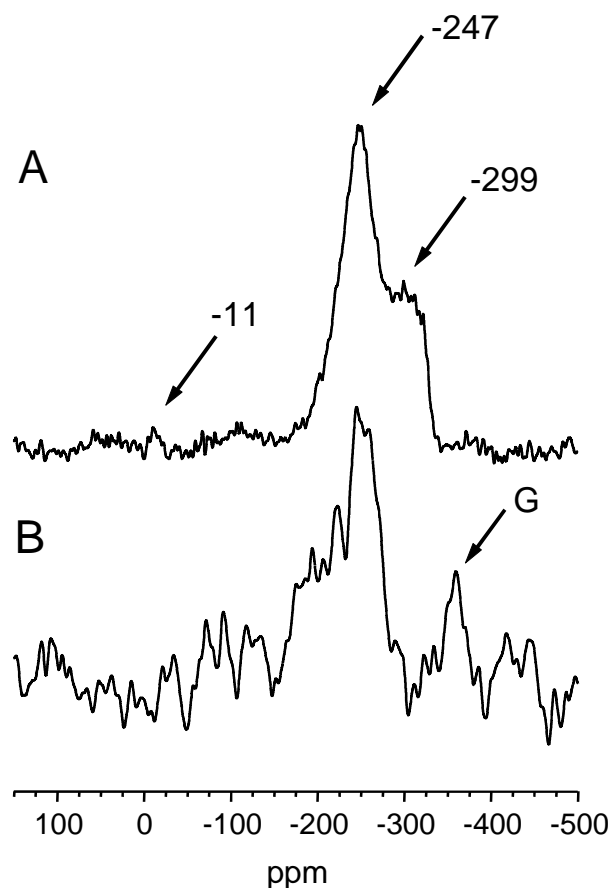


Abb. 7: Festkörper- ^{15}N -NMR-Spektren der aus dem Gesamtboden nach der Kompostierung extrahierten Huminsäuren (A) und Fulvosäuren (B). Das mit „G“ bezeichnete Signal ist auf spezifische Messbedingungen zurückzuführen und entspricht keiner realen chemischen Verschiebung.

Die Anzahl der noch intakt vorliegenden Nitrogruppen ist dabei größer einzuschätzen als es die Signalfächen vermuten lassen, da durch die speziellen Spektroskopiebedingungen der Gehalt an Nitrogruppen unterschätzt wird. Die Befunde legen die Vermutung nahe, dass auch am Ende der Kompostierung noch intakte Nitrogruppen vorhanden waren, d.h. dass die Festlegung nicht in allen Fällen über multivalente und covalente Bindungen der reduzierten Nitrogruppen erfolgte. Über die daraus folgenden Risiken muss hinsichtlich der Reversibilität der Festlegung kritisch diskutiert werden. Besonders wichtig dazu sind auch die Ergebnisse der Versuche zur Remobilisierbarkeit der TNT-Metabolite, die in den vorliegenden Bericht noch nicht aufgenommen werden konnten.

5 Ausblick

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten eine schnelle und vollständige Abnahme von TNT und seinen Metaboliten im Laufe der Kompostierung. Das getestete Verfahren scheint damit gut geeignet zu sein, hoch TNT-kontaminierten Boden zu sanieren. Die Versuche zur Stabilität und Irreversibilität der Festlegung konnten bis zur Drucklegung des vorliegenden Berichts noch nicht abschließend bewertet werden. Dies ist aber zusammen mit den Ergebnissen der anderen Teilprojekte, die an der Universität Marburg und Jena durchgeführt wurden, erforderlich, um den biologischen Verfahren zur Sanierung von Rüstungsaltslasten zum Durchbruch zu verhelfen. Dies ist im Interesse der von den Altslasten betroffenen Bürger und im Sinne einer umweltverträglichen und nachhaltigen Sanierung dringend erforderlich.

6 Formel und Abkürzungen

[¹⁴ C]TNT	Radioaktiv uniform-ringmarkiertes ¹⁴ C-TNT
[¹⁵ N]TNT	2,4,6-Trinitro- ¹⁵ N-Toluol
15N-NMR	Stickstoff-Kernmagnet-Resonanz
2,2'-AZOXY	4,4',6,6'-Tetranitro-2,2'-azoxytoluol
4,4'-AZOXY	2,2',6,6'-Tetranitro-4,4'-azoxytoluol
2,4'-AZOXY	2',4,6,6'-Tetranitro-2,4'-azoxytoluol
2',4-AZOXY	2,4',6,6'-Tetranitro-2',4-azoxytoluol
2,4-DANT	2,4-Diamino-6-nitrotoluol
2,6-DANT	2,6-Diamino-4-nitrotoluol
2-ADNT	2-Amino-4,6-dinitrotoluol
4-ADNT	4-Amino-2,6-dinitrotoluol
2-HADNT	2-Hydroxylamino-4,6-Dinitrotoluol
4-HADNT	4-Hydroxylamino-2,6-dinitrotoluol
Abb.	Abbildung
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
HADNT	Isomerengemisch aus 2-Hydroxylamino-4,6-Dinitrotoluol und 4-Hydroxylamino-2,6-dinitrotoluol
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
MPN	Most Probable Number (standardisiertes Zählverfahren für Mikroorganismen)
TAT	2,4,6-Triaminotoluol
TNT	2,4,6-Trinitrotoluol
TS	Trockensubstanz

UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht

7 Eigene Veröffentlichungen und Diplomarbeiten

Peters, D. 2000. Vergleich zwei alternativer Prozesse zur Sanierung von TNT-kontaminierten Böden: Kompostierung und Bodensuspensionsverfahren. Diplomarbeit, Universität Freiburg.

Achnich, C., H. Lenke, and H.-J. Knackmuss. 2000. Alternierender Anaerob-/Aerob-Prozess: Analyse der Bindungsstrukturen von metabolisiertem und humifiziertem TNT im Boden. 2. Statusseminar des BMBF-Verbundvorhabens: Langzeit und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen bei der biologischen Bodensanierung. 22.02.00 Bremen.

8 Literaturverzeichnis

1. **Achnich, C.** 1999. Sanierung von TNT-kontaminiertem Boden durch Immobilisierung des Schadstoffes: Stabilität und Charakterisierung der Festlegung. Dissertation Universität Stuttgart. Fraunhofer IRB Verlag, Stuttgart. ISBN 3-8167-5289-6.
2. **Achnich, C., E. Fernandes, J.-M. Bollag, H.-J. Knackmuss, and H. Lenke.** 1999. Covalent binding of reduced metabolites of [¹⁵N₃]TNT to soil organic matter during a bioremediation process analysed by ¹⁵N NMR spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 33:4448-4456.
3. **Achnich, C., P. Pfortner, M. G. Weller, R. Niesner, H. Lenke, and H.-J. Knackmuss.** 1999. Reductive transformation of bound trinitrophenyl residues and free TNT during a bioremediation process analysed by immunoassay. *Environ. Sci. Technol.* 33:3421-3426.
4. **Achnich, C., U. Sieglen, H.-J. Knackmuss, and H. Lenke.** 1999. Irreversible binding of biologically reduced 2,4,6-trinitrotoluene to soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 18:2416-2423.
5. **Breitung, J., D. Bruns-Nagel, K. Steinbach, L. Kaminski, D. Gemsa, and E. von Löw.** 1996. Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene contaminated soils by two different aerated compost systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:797-800.
6. **Bruns-Nagel, D., J. Breitung, E. von Löw, K. Steinbach, T. Gorontzy, M. Kahl, K.-H. Blotevogel, and D. Gemsa.** 1996. Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene in aerobic soil columns. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:2651-2656.
7. **Bruns-Nagel, D., J. Breitung, T. Gorontzy, K.-H. Blotevogel, D. Gemsa, E. v. Löw, K. Steinbach, Th. Gorontzy.** 1997. Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil by anaerobic/aerobic and aerobic methods, *in* In Situ and On-Site Bioremediation: Volume 4/2, S. 9-14, Battelle Press, Columbus, Richland.

8. **Bruns-Nagel, D., O. Drzyzga, K. Steinbach, T. C. Schmidt, E. von Löw, T. Gorontzy, K.H. Blotevogel, and D. Gemsa.** 1998. Anaerobic/aerobic composting of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil in a reactor system. *Environ. Sci. Technol.* 32:1676-1679.
9. **Bumpus, J. A., and M. Tatarko.** 1994. Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium*: identification of initial degradation products and the discovery of a TNT metabolite that inhibits lignin peroxidase. *Curr. Microbiol.* 28:185-190.
10. **Carpenter, D. F., N. G. McCormick, J. H. Cornell, and A. M. Kaplan.** 1978. Microbial transformation of ¹⁴C-labeled 2,4,6-trinitrotoluene in an activated-sludge system. *Appl. Environ. Microbiol.* 35:949-954.
11. **Daun, G., H. Lenke, M. Reuss, and H.-J. Knackmuss.** 1998. Biological treatment of TNT-contaminated soil 1. Anaerobic cometabolic reduction and interaction of TNT and metabolites with soil components. *Environ. Sci. Technol.* 32:1956-1963.
12. **Drzyzga, O., D. Bruns-Nagel, T. Gorontzy, K.-H. Blotevogel, D. Gemsa, and E. Löw.** 1998. Incorporation of ¹⁴C-labeled 2,4,6-trinitrotoluene metabolites into different soil fractions after anaerobic and anaerobic-aerobic treatment of soil/molasses mixtures. *Environ. Sci. Technol.* 32:3529-3535.
13. **Ederer, M. M., T. A. Lewis, Crawford RL.** 1997. 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) transformation by clostridia isolated from a munition-fed bioreactor: comparison with non-adapted bacteria. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 18:82-88.
14. **Funk, S. B., D. J. Roberts, D. L. Crawford, and R. L. Crawford.** 1993. Initial-phase optimization for bioremediation of munition contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2171-2177.
15. **Griest, W. H., A. J. Stewart, C.-H. Ho, R. L. Tyndall, A. A. Vass, J. E. Caton, W. M. Caldwell.** 1994. Characterization of explosives processing decomposition due to composting. US Army Report ORNL/TM12812.
16. **Herre, A.** 1997. Bioremediation von TNT-belasteten Böden mit Pilzen; Metabolisierung, Mineralisierung und Humifizierung. Verbundvorhaben Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten, 3. Statusseminar, 26. u. 27 Februar 1997 in Berlin, S. L 1-21, Hrsg. Umweltbundesamt, Fachgebiet III 3.6.
17. **Isbister, J. D., G. L. Anspach, J. F. Kitchens, and R. C. Doyle.** 1984. Composting for decontamination of soils containing explosives. *Microbiologica* 7:47-73.
18. **Kaplan, D. L, and A. M. Kaplan.** 1982. Thermophilic biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene under stimulated composting conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 757-760.
19. **Kaplan, D. L., and A. M. Kaplan.** 1982. 2,4,6-TNT-surfactant complexes: decomposting, mutagenicity and soil leaching studies. *Environ. Sci. Technol.* 16:566-571.
20. **Lenke, H., J. Warrelmann, G. Daun, K. Hund, U. Sieglen, U. Walter, and H.-J. Knackmuss.** 1998. Biological treatment of TNT-contaminated soil 2. Biologically induced immobilization of the contaminants and full-scale application. *Environ. Sci. Technol.* 32:1964-1971.

21. **Lewis, T. A., S. Goszczynski, R. L. Crawford, R. A. Korus, and W. Admassu.** 1996. Products of anaerobic 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) transformation by *Clostridium bifermentans*. Appl. Environ. Microbiol. 62:4669-4674.
22. **McCormick, N. G., F. E. Feeherry, and H. S. Levinson.** 1976. Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds. Appl. Environ. Microbiol. 31:949-958.
23. **Michels, J., and G. Gottschalk.** 1994. Inhibition of the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* by hydroxylamino-dinitrotoluene, an early intermediate in the degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. Appl. Environ. Microbiol. 60:187-194.
24. **Preuss, A., J. Fimpel, and G. Diekert.** 1993. Anaerobic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). Arch. Microbiol. 159: 345-353.
25. **Rieger, P.-G., H.-J. Knackmuss.** 1995. Basic knowledge and perspectives on biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene and related compounds in contaminated soil, p.1-18. In J. Spain (ed.), Biodegradation of nitroaromatic compounds; Spain, J., Ed., Plenum Press, New York, NY.1995; pp 1-18.
26. **Scheibner, K., M. Hofrichter, A. Herre, J. Michels, and W. Fritsche.** 1997. Screening for fungi intensively mineralizing 2,4,6-trinitrotoluene. Appl. Microbiol. Technol. 47:452-457.
27. **Spain, J. C.** 1995. Biodegradation of nitroaromatic compounds. Annu. Rev. Microbiol. 49:523-555.
28. **Stahl, J. D., and S. D. Aust.** 1993. Metabolism and detoxification of TNT by *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 192:477-482.
29. **Vanderberg, L. A., J. J. Perry, P. J. Unkefer.** 1995. Catabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Mycobacterium vaccae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43:937-945.
30. **Vorbeck, C., H. Lenke, P. Fischer, and H.-J. Knackmuss.** 1994. Identification of a hydride-Meisenheimer complex as a metabolite of 2,4,6-trinitrotoluene by a *Mycobacterium* strain. J. Bacteriol. 176:932-934.
31. **Vorbeck, C., H. Lenke, P. Fischer, J. C. Spain, and H.-J. Knackmuss.** 1998. Initial reductive reactions in aerobic microbial metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene. Appl. Environ. Microbiol. 64:246-252.
32. **Williams, R. T., P. S. Ziegenfuss, W. E. Sisk.** 1992. Composting of explosives and propellant contaminated soils under thermophilic and mesophilic conditions. J. Ind. Microbiol. 9:137-144.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.4 Verbundvorhaben 5: Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen bei der biologischen Bodensanierung

9.4.5 Analyse der Bindungsstrukturen gebundener TNT-Rückstände im Boden nach biologischer Behandlung durch das Weißfäulepilzverfahren und Remobilisierungsversuche (TV 5.3.3)

Prof. Dr. G. Diekert

Dr. R. Geyer

Dipl.-Ing. agr. M. Weiß

¹PD Dr. M. Kästner

Friedrich-Schiller-Universität Jena

Institut für Mikrobiologie, Angewandte und Ökologische Mikrobiologie

Philosophenweg 12

07743 Jena

¹UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH

Sektion Sanierungsforschung

Permoserstr. 15

04318 Leipzig

Förderkennzeichen: 1481162

Laufzeit: 01.02.1999 – 31.07.2000

1 Zusammenfassung und Zielsetzung

Die Entwicklung und Erprobung biologischer Verfahren zur Bodensanierung zeigt, daß aromatische Xenobiotika wie PAK, Chlorphenole, Nitroaromaten im Boden durch biologische Prozesse metabolisiert werden. Der vollständige mikrobielle Abbau solcher Schadstoffe zu den unbedenklichen anorganischen Mineralisationsprodukten wie CO₂, H₂O findet im Boden jedoch nur z. T. statt.

Beim mikrobiellen Abbau von ¹⁴C-markiertem 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) in Böden wurde festgestellt, daß trotz der Eliminierung ein erheblicher Teil des ¹⁴C als nicht extrahierbarer Rückstand zurückbleibt.

Im vorliegenden Projekt sollen daher die Bindungsformen von TNT-Rückständen nach aerober Behandlung kontaminierter Böden mit ligninolytischen Pilzen unter Einsatz von ¹⁵N- und ¹⁴C-markiertem TNT untersucht und die Remobilisierbarkeit sowie die Langzeitstabilität der gebundenen Rückstände unter verschiedenen Bedingungen ermittelt werden. Dabei handelt es sich um die Simulation eines von der AWIA GmbH Göttingen (hervorgegangen aus der WISSTRANS Umwelt GmbH) im Rahmen des Forschungsverbundes erprobten Pilzverfahrens (s. Kapitel 9.5.3 des Leitfadens). Die Bildung gebundener Rückstände und deren Bindungsformen sollen mit entsprechenden Ergebnissen der anderen beiden erprobten Anaerob/Aerob-Verfahren (Kompostierungsverfahren s. Kapitel 9.5.1 des Leitfadens) und Dynamisches Beetverfahren (s. Kapitel 9.5.2 des Leitfadens) der anderen Teilprojekte in diesem Verbundvorhaben in Marburg (s. Kapitel 9.4.3 des Leitfadens) und Stuttgart (s. Kapitel 9.4.4 des Leitfadens) verglichen werden. Ziel ist der Nachweis der Eignung biologischer Verfahren für eine Sanierung kontaminierter Altlaststandorte durch irreversible Festlegung von TNT-Metaboliten in der organischen Bodenmatrix ("Humifizierung"). Die im Labormaßstab durchgeführten Versuche stellen dabei ein *scale-down* der in Clausthal-Zellerfeld maßstabsgerecht erprobten Verfahren zur biologischen Bodensanierung dar.

Das Pilzverfahren beruht darauf, daß abbauaktive Pilze wie z.B. *Stropharia rugosoannulata* auf geeigneten Substraten in den Boden eingebracht werden und in diesen einwachsen. Unter aeroben Bedingungen führen dabei zellgebundene Reduktionen des TNT zunächst zur Bildung von Aminonitrotoluolen (2- und 4-Amino-Dinitrotoluol; 2,4-Diamino-Nitrotoluol). Durch die weitere aerobe Metabolisierung wurde eine Festlegung der Intermediate von mehr als 86 % erreicht [40]. In den dargestellten Experimenten konnte in Gegenwart des Pilz-/Strohsubstrates 2,1 g TNT/kg Boden TS metabolisiert und als nicht extrahierbare Verbindungen in der Bodenmatrix immobilisiert werden. Die autochthonen Mikroorganismen der Kontrollböden ohne Pilz konnten dagegen nur 0,9 g /kg TS festlegen. Vorausgegangene Untersuchungen belegen, daß aus derartigen Rückständen auch unter „worst case“-Bedingungen durch physiko-chemische oder biologische Prozesse kein originäres TNT oder toxische Metabolite freigesetzt werden. Unklar ist noch, in welchem Maße die verschiedenen Bindungsformen an der Bodenmatrix (C-N-, C-C-, C-O-Bindungen, H-Brücken u.a.) daran beteiligt sind.

Lassen sich nach Behandlung mit Pilzen kovalente Bindungen der festgelegten Metabolisierungsprodukte an Bodenbestandteilen bzw. Huminstoffen nachweisen, so kann von einer weitgehenden Festlegung der Rückstände ausgegangen werden. Weisen die Rückstände zudem noch eine entsprechende Langzeitstabilität unter verschiedenen Bodenbedingungen auf, dann kann von einer ökotoxikologisch unbedenklichen Festlegung im

Sinne einer Humifizierung von Naturstoffen ausgegangen und diese Eliminierung als Sanierungstechnologie eingesetzt werden.

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

Schwer abbaubare Naturstoffe, wie z. B. Holzbestandteile (Lignin), Gerbstoffe, Harze, Wachse, Melanine werden im natürlichen System Boden von Mikroorganismen nicht primär über einen mineralisierenden Abbau zu Kohlendioxid eliminiert, sondern über den Umweg der Bildung eines C-Depots (Huminstoffe). Dieses Depot macht einen beträchtlichen Teil des gesamten Kohlenstoffvorrates aus und ist seinerseits wieder einem langsamen unspezifischen Abbau durch Mikroorganismen unterworfen, so daß über diesen Umweg auch persistente und toxische Naturstoffe entgiftet und in den Kohlenstoffkreislauf einbezogen werden. Untersuchungen zum aeroben und anaeroben mikrobiellen Abbau von 2,4,6-TNT Böden ergaben, daß ein erheblicher Teil der Ausgangssubstanz oder der Transformationsprodukte als nicht extrahierbarer Rückstand im Boden verbleibt. Über Art und Bindungsform dieser Rückstände und über deren Stabilität liegen bisher noch keine gesicherten Erkenntnisse vor.

2.1 Mikrobielle Umsetzung von TNT unter aeroben und anaeroben Bedingungen durch Bakterien

TNT ist aufgrund seiner chemischen Eigenschaften weitgehend persistent gegenüber einem mikrobiellen Abbau. Die Nitrosubstituenten führen mit zunehmender Zahl zu negativen induktiven Effekten, welche den elektrophilen Angriff durch Oxygenasen aerober Bakterien auf den aromatischen Ring erschweren. Dementsprechend wurden auch unter aeroben Bedingungen bisher hauptsächlich reduktive Initialreaktionen am TNT-Molekül nachgewiesen. Dabei wurde TNT an den Nitrogruppen partiell reduziert. Für die gebildeten Aminonitrotoluole, Hydroxylaminonitrotoluole, sowie Azoxyverbindungen als Kondensationsprodukte [61] konnte bisher unter diesen Bedingungen kein weiterer mikrobieller Abbau nachgewiesen werden.

Ebenso wurde ein reduktiver Initialangriff am aromatischen Ring des TNT beobachtet [76]. Für den hierbei gebildeten Hydrid-Meisenheimer Komplex wurde eine weitere Hydrid-Addition mit der Bildung eines protonierten Dihydrid-Meisenheimer Komplexes als *dead-end* Produkt gezeigt [77]. Auch ein oxidativer Angriff auf die Methylgruppe des TNT wurde beschrieben [75]. Als Transformationsprodukte konnte unter anderem 4-Amino-2,6-dinitrobenzoesäure (4A26DNBS) nachgewiesen werden. Diese Verbindung wurde erst kürzlich in teilweise erheblichen Mengen in Bodenproben der ehemaligen Sprengstoffwerke in Stadtallendorf und Clausthal-Zellerfeld identifiziert [16]. Ein produktiver aerober Abbau von TNT wurde zwar mehrfach postuliert [32], eine signifikante Mineralisation durch aerobe Bakterien dagegen nicht beschrieben. Der Nachweis einer Mineralisation gelang bisher nur durch den Einsatz von Pilzen [22; 30; 58].

Unter anaeroben Bedingungen ist die unspezifische bakterielle Reduktion der Nitrogruppen in der Natur weit verbreitet und bedarf keiner speziellen Mikroorganismen. Nach neuen Erkenntnissen ist eine vollständige Reduktion von TNT und anderen (Poly)Nitroaromaten allerdings auch durch abiotische Prozesse z.B. in Gegenwart von Fe(II) (an der Oberfläche von Fe(III)(Hydr)oxiden vorhanden) möglich [45]. Mikrobiell erfolgt die vollständige Reduktion

von TNT zum 2,4,6-Triaminotoluol (TAT) über die Zwischenstufen 2-Hydroxylamino-4,6-Dinitrotoluol (2-HADNT), 4-Hydroxylamino-2,6-Dinitrotoluol (4-HADNT), 2-Amino-4,6-Dinitrotoluol (2-ADNT), 4-Amino-2,6-Dinitrotoluol (4-ADNT) und 2,4-Diamino-6-Nitrotoluol (2,4-DANT) [26]. Unter strikt anaeroben Bedingungen ist eine vollständige Reduktion von TNT zum TAT möglich [56; 59; 61], wenn leicht verwertbare Substrate als Elektronen-Donator zur Verfügung stehen. Daneben wurden Sulfat reduzierende Organismen gefunden, die TNT als N-Quelle nutzen und das Kohlenstoffgerüst zu Fettsäuren umbauen [12], [11]. Auch ein *Clostridium bifermentans* Stamm wurde beschrieben, der neben der Reduktion von TNT zum TAT zur Freisetzung phenolischer Abbauprodukte führt, und ein Adukt aus TAT und Methylglyoxal bildet [54]. Unter anaeroben Bedingungen konnte in einem Kompostreaktor die Bildung von acetylierten und formylierten Reduktionsprodukten nachgewiesen werden [20]. Die Bildung solcher Substanzen wurde jedoch (zum Teil) auch für aerobe Bedingungen beschrieben [3; 33; 57]. Außerdem wurde gezeigt, daß das unter aeroben wie auch anaeroben Bedingungen gebildete Reduktionsprodukt 2,4-Dihydroxylamino-6-Nitrotoluol [32] durch einen *Clostridium* Stamm enzymatisch zu 2-Amino-5-Hydroxy-4-Hydroxylamino-6-Nitrotoluol umgewandelt werden kann [50]. Ein Nachweis für eine signifikante Mineralisation von TNT durch Bakterien unter anaeroben Bedingungen wurde bisher nicht erbracht.

2.2 Mikrobielle Umsetzung von TNT unter aeroben Bedingungen durch ligninolytische Pilze

Holzabbauende und streuabbauende Basidiomyceten (ligninolytische Pilze) besitzen aufgrund ihres Vorkommens, ihrer ökologischen Merkmale und ihrer biochemischen Fähigkeiten ein hohes Potential zur Oxidation und Metabolisierung substituierter aromatischer Verbindungen, einschließlich TNT und seiner Metabolite. Die natürliche Funktion des ligninolytischen Enzymsystems ist der Abbau von makromolekularen Naturstoffen, wie Ligninen und Huminstoffen. Radikalbildende Enzyme ligninolytischer Pilze, wie Peroxidasen und Laccasen, sind in der Lage, über Ein-Elektron-Transfer-Reaktionen aus aromatischen Molekülen Radikale (Arylkationradikale, Phenoxyradikale u.a.) zu erzeugen. Dies bewirkt eine Destabilisierung des gesamten Moleküls und damit die Spaltung von chemischen Bindungen und führt zu Kopplungsreaktionen substituierter Aromaten an die organische Bodenmatrix [8; 67]. Sie können damit wesentlich zur Humifizierung beitragen. Bei Untersuchungen zum Abbau von Lignin durch Peroxidasen von holzabbauenden Pilzen mit Modellsubstanzen (Dehydro-Polymere) wurde lange Zeit vergeblich versucht, mit den gereinigten Enzymen den Abbau *in vitro* nachzuvollziehen. Dies gelang jedoch erst, als die Rolle von Mediatoren als Cofaktoren beim Abbau erkannt wurde. Modellvorstellungen gehen davon aus, daß diese Mediatoren die Elektronenübergänge zwischen dem Enzym und dem Substrat vermitteln [10]. Neuere Arbeiten zeigen, daß auch Laccasen in Gegenwart von Radikalmediatoren Lignin direkt abbauen können [13; 81].

Der Xenobiotikaabbau durch den am besten untersuchten Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* erfolgt bevorzugt unter Bedingungen bei denen dieser Basidiomycet vermehrt ligninolytische Enzyme ausscheidet [4]. Beispiele für die Vielzahl von Verbindungen [5; 23; 34], die unter diesen Bedingungen angegriffen werden, sind in einer Übersicht von Field et al. [31] zusammengestellt; darunter sind u.a. Verbindungen wie Pentachlorphenol und weitere chlorierte Phenole, Azofarbstoffe, Benz(a)pyren, Pyren, Phenanthren, polychlorierte

Biphenyle, TNT, Dinitrotoluole, Dioxine und Chloranilin. Neuere Untersuchungen zum Ligninabbau [37; 44] oder zur Depolymerisation von Braunkohle und Huminstoffen [41; 42; 43] lassen darauf schließen, daß die Mangan-Peroxidase dabei eines der wesentlichen Pilzenzyme ist.

Im Rahmen vorausgegangener Arbeiten zum Abbau von 2,4,6-TNT durch Pilze konnte die Arbeitsgruppe der Universität Jena nachweisen, daß eine Vielzahl von Stämmen der verschiedenen taxonomischen Gruppen (Deuteromyceten, Ascomyceten, Zygomyceten, Basidiomyceten) diese Verbindung innerhalb kurzer Zeit zu Aminodinitrotoluolen (ADNT) reduziert. Die Fähigkeit zur Mineralisierung ist jedoch auf die holz- und streuabbauenden Basidiomyceten beschränkt [65]. Innerhalb dieser Pilzgruppe erwiesen sich *Nematoloma frowardii* und *Stropharia rugosoannulata* als besonders aktive Arten und wurden für weitere Untersuchungen verwendet. Unter Verwendung isolierter Mangan-Peroxidase (MnP) von *N. frowardii* DSM11239 und *S. rugosoannulata* DSM11373 konnte später der Nachweis für eine direkte Mineralisierung (enzymatische "Verbrennung") von Aminodinitrotoluolen im zellfreien System erbracht werden [63; 64]. Als Reaktionsprodukte dieses enzymatischen Abbauprozesses entstanden Kohlendioxid und niedermolekulare, nichtaromatische Spaltprodukte.

Der Abbau von TNT durch ligninolytische Pilze in Böden wurde ebenfalls von der Arbeitsgruppe in Jena nachgewiesen [38; 39] und daraufhin zusammen mit der AWIA GmbH (hervorgegangen aus der WISSTRANS Umwelt GmbH, Göttingen) ein pilzliches Mietenverfahren zur mikrobiologischen Sanierung TNT-kontaminierter Böden erprobt. Dabei handelt es sich um ein einstufiges Verfahren, bei dem TNT-kontaminierter Boden schichtweise mit Pilz-Stroh-Substrat ligninolytischer Pilze versetzt und in einer Miete unter aeroben Bedingungen inkubiert wird. Die Steuerung des Prozesses erfolgt durch Regulation der Belüftung, der Temperatur und des Feuchtegehaltes der Miete sowie durch Zugabe von Nährstoffen. Verschiedene Pilzstämme, die in der Lage sind, TNT vollständig zu metabolisieren und z. T. zu mineralisieren wurden in diesem Verfahren eingesetzt. Der überwiegende Teil der Abbauprodukte des TNT wird bei diesem Prozeß jedoch in der Matrix des Bodens immobilisiert (Abb. 1).

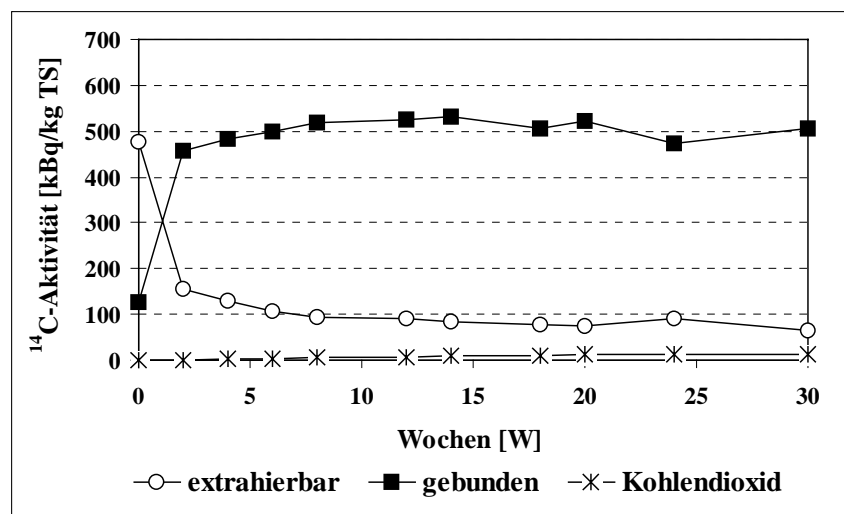


Abb. 1: ^{14}C -Verteilung im mit ^{14}C -TNT kontaminierten Bodenreaktor während der aeroben Inkubation mit dem Basidiomyceten *Stropharia rugosoannulata* - Bildung gebundener Rückstände; (Vorversuche mit 600 kBq U_R - ^{14}C -TNT und 200 mg TNT / kg TS) [40].

2.3 Mögliche Rückstandsstrukturen und Abschätzung der Mobilisierbarkeit

Untersuchungen zum aeroben wie auch anaeroben mikrobiellen Abbau von ^{14}C -markiertem TNT in Böden ergaben generell die Einbindung eines erheblichen Teils als nicht extrahierbarer Rückstand im Boden. Da bisher nicht geklärt werden konnte, ob dabei die Ausgangsverbindung oder Transformationsprodukte festgelegt werden, wurde das vorliegende Verbundprojekt initiiert. Bereits das originäre TNT kann in Wechselwirkungen mit der Bodenmatrix treten und festgelegt werden. So wurden Elektronen-Donator-Akzeptor-Komplexe von TNT mit Tonmineralen [79; 80] beobachtet. Eingehende Untersuchungen ionischer Wechselwirkungen mit Huminsäuren zeigten, daß mit steigendem pH und steigender Ionenstärke mehr TNT gebunden wurde. Im Gegensatz zum TNT zeigen Metabolite, deren Nitrogruppen durch mikrobielle Aktivität zu Aminogruppen reduziert wurden, wie z.B. 2,4-Diamino-6-Nitrotoluol (2,4-DANT), bezüglich des pH-Wertes genau entgegengesetztes Verhalten [55]. Diese Metabolite sind praktisch in allen TNT-kontaminierten Böden zu finden. Von den reduzierten TNT-Metaboliten, insbesondere vom Triaminotoluol (TAT), wird eine Festlegung an der organischen Bodenmatrix über C-N-Bindungen angenommen, da TAT in kontaminierten Böden nicht mehr nachgewiesen werden konnte [61].

Direkte Beweise für das beobachtete Auftreten von nicht extrahierbaren Rückständen, die an natürliche Huminstoffe gebunden sind [71; 82], konnten vor kurzem mit anderen Aminoaromaten (Anilin) mittels ^{15}N -NMR-Spektroskopie an verschiedenen Fulvo- und Huminsäuren erbracht werden [73]. Dabei wurde gezeigt, daß der Stickstoff der Aminogruppe fest in die neu gebildeten Heterozyklen eingebaut wurde. Anilinohydrochinon-, Anilinochinon-, Anilid- und Imin-Strukturen konnten in diesen Molekülen nachgewiesen werden. Der Anteil des heterozyklischen Stickstoffs betrug mehr als 50% des Stickstoffs in der gesamten Probe. Nach Meinung der Autoren führt der Einbau des Aminostickstoff des Anilins in Heterozyklen praktisch zu einer irreversiblen Festlegung, welche auch für reduzierte TNT-Metabolite wie 2,4-DANT erwartet werden kann. An Fulvosäuren aus aquatischen Standorten konnte über die Kopplung von Anilin (10^{-6} - 10^{-7} M) die Menge der potentiellen Bindungsplätze auf ca. $3,3 \times 10^{-3}$ pro mg C im aquatischen System bestimmt werden [78].

In Experimenten mit Laccasen ligninolytischer Pilze (z.B. *Trametes*, *Rhizoctonia*) in Gegenwart von Guajacol oder Ferulasäure als Bausteinen von Huminstoffen wurde die Bildung von Oligomeren durch oxidative Kopplung unter Einbindung verschiedener Xenobiotika (Phenole, Aniline, Pestizide, Nitrobenzen u.a.) nachgewiesen [9; 68; 69; 72]. Eine zweifelsfreie Strukturaufklärung fehlte bisher jedoch. Kopplungsexperimente mit Laccasen und Guajacol, denen 2,4-DANT zugesetzt wurde, ergaben die Bildung eines oligomeren Farbstoffmoleküls. Dieser Farbstoff wurde als trimere Verbindung aus zwei Guajacolumolekülen und einem Molekül DANT identifiziert und dessen Struktur eindeutig als 5-(2-Amino-3-Methyl-4-Nitroanilino)-3,3'-Dimethoxy-4,4'-Diphenochinon aufgeklärt [27]. Damit konnte erstmals die Struktur eines definierten, oligomeren Kopplungsproduktes an Huminstoffmodellsubstanzen ermittelt werden, welches durch Laccasen generiert wurde. Die Reaktion verläuft in zwei Schritten, bei denen es zunächst zu einer Dimerisierung des Guajacols kommt. An der oxidierten Form dieses Dimers erfolgt dann eine nucleophile Addition des DANT in *ortho*-Stellung zur Carbonylgruppe des Diphenochinons. Diese Reaktion beweist zudem, daß

Laccasen die Kopplung von Xenobiotika an chinoide Gruppen in Huminstoffen initiieren können.

Untersuchungen zum mikrobiologischen Abbau von TNT durch die autochthone Bodenmikroflora TNT-kontaminierter Böden unter aeroben Bedingungen in Kompostierungsexperimenten [14; 15; 17] und bei Versuchen in Bodenperkolationsanlagen [18], [19] ergaben ebenfalls die Bildung nicht extrahierbarer Rückstände. Dieser Mechanismus wurde als Prozeß der Humifizierung angenommen [17]. Daraufhin wurde der Humifizierungsgrad und die Struktur der Humifizierungsprodukte näher untersucht. Nach Projektbeginn zeigten neuere Experimente mit ^{14}C -TNT, daß ein anaerob/aerob-Verfahren zu einer Immobilisierung von über 83% des Sprengstoffes als nicht extrahierbarer Rückstand führte [29]. Die Verwendung von ^{15}N -TNT ermöglichte mittels ^{15}N -NMR-Spektroskopie eine teilweise Strukturaufklärung der gebundenen Rückstände [51]. So konnte gezeigt werden, daß ein wesentlicher Teil der Transformationsprodukte als Heterozyklen in den Huminsäuren der Komposte gebunden war. Neben diesen Untersuchungen zur qualitativen und quantitativen Einbindung von TNT-Transformationsprodukten wurden mittels HPLC/MS eine Reihe konjugierter TNT-Metabolite (Azoxyverbindungen) in den anaerob/aeroben Kompost-Systemen nachgewiesen [25]. Sorptions- und Bindungsstudien von TNT und seinen Reduktionsprodukten mit relevanten Bodenbestandteilen wie Tonmineralen und Huminsäuren ergaben, daß Hydroxylaminodinitrotoluole und 2,4,6-Triaminotoluol sowohl unter anaeroben als auch aeroben Bedingungen eine starke irreversible Bindung mit Bodenbestandteilen eingehen, während die Interaktion von TNT und den Aminonitrotoluolen deutlich geringer und teilweise reversibel waren [25]. Wurde die kometabolische Reduktion von TNT in Gegenwart von Tonmineralen oder Huminsäuren untersucht, so erfolgte eine vollständige Festlegung der Reduktionsprodukte im Laufe der anaeroben Behandlung. Im Falle der Tonminerale nahmen gleichzeitig auch die von der Festphase mittels organischem Lösungsmittel extrahierbaren Mengen an TNT und dessen Reduktionsprodukten ab.

Ältere Studien mit 3,4-Dichloranilin im Boden haben gezeigt, daß der durch Hydrolyse remobilisierbare Anteil der Rückstände aus Pflanzenschutzmitteln, der zunächst noch einige Prozent betrug, mit längerer Inkubationszeit immer fester gebunden wurde und nicht mehr mobilisiert werden konnte [46]. Vergleichbare Ergebnisse wurde auch mit Rückständen aus 2,4,6-Trinitrotoluol beobachtet [74].

Die molekularen Strukturen der Festlegungsprodukte aus TNT sind bisher noch weitgehend unbekannt. Erste neuere Daten ergaben eine Einbeziehung des Aminostickstoff aus TNT in heterozyklische Strukturen, die jedoch nicht quantifiziert wurden [21; 51].

Zur chemischen Charakterisierung gebundener Transformationsprodukte des TNT wurden im Rahmen des Verbundvorhabens 5 umfangreiche Untersuchungen mit Hilfe der Festkörper ^{15}N -NMR Spektroskopie an der TU-München durchgeführt. Diese Analysenmethode ist zur Zeit eine der wenigen Möglichkeiten, die Bindungstypen des festgelegten Stickstoffes aus TNT in der "black box" der organischen Bodenmatrix zu ermitteln.

Im vorliegenden Projekt sollen daher die Bindungsformen von TNT-Rückständen nach aerober Behandlung kontaminierter Böden mit ligninolytischen Pilzen (Simulation des Pilzverfahrens) unter Einsatz von ^{15}N - und ^{14}C -markiertem TNT untersucht und die Remobilisierbarkeit sowie die Langzeitstabilität der gebundenen Rückstände unter verschiedenen Bedingungen ermittelt werden. Hierzu wurde Standortboden ^{15}N - und ^{14}C -markiertes TNT zugesetzt und diese Bodenmaterialien der Behandlung durch Pilze

unterzogen. Als Kontrolle wurde ein vergleichbar dotierter Boden ohne Zusatz von Pilzen inkubiert, um den Einfluß der natürlichen biotischen und abiotischen Prozesse im Boden zu erfassen. Nach Abschluß der Behandlung werden die Bodenfraktionen untersucht und der Verbleib des TNT mittels ^{14}C -Markierung quantifiziert bzw. bilanziert und die Bindungstypen des Stickstoffes mittels ^{15}N -NMR-Spektroskopie analysiert. Am rückstandshaltigen Bodenmaterial soll nachfolgend die Remobilisierbarkeit mit physiko-chemischen und biologischen Methoden untersucht werden. Gleich behandelte Proben aus den Ansätzen mit ^{15}N -TNT werden dann der Untersuchung der Bindungstypen mittels ^{15}N -NMR-Spektroskopie zugeführt. Damit soll geklärt werden, ob der Stickstoff aus dem TNT durch die Behandlung mit ligninolytischen Pilzen in Form von Nitrogruppen erhalten bleibt, oder reduziert und in andere Bindungsformen wie Amid- oder heterozyklische Bindungen überführt wird. Darüber hinaus sollen die ^{15}N -NMR-Analysen in Verbindung mit der Quantifizierung aus den ^{14}C -markierten Ansätzen Aussagen über Art und Umfang der kovalenten Bindungen des metabolisierten TNT ermöglichen.

Die Frage jedoch, in wieweit Transformationsprodukte des TNT aus der organischen Bodenmatrix langfristig wieder freigesetzt werden können, ist bisher ungeklärt. Auch über das weitere Schicksal des Rückstands-Huminstoff-Systems liegen keine weiteren Daten vor. Arbeiten zur Remobilisierung von Rückständen, die beim Abbau von ^{14}C -PAK entstehen, zeigten jedoch, daß in der organischen Bodenmatrix gebundene Rückstände aus den PAK weitgehend inert und praktisch nicht remobilisierbar sind. Sie besitzen gegenüber den Ausgangsverbindungen um etwa den Faktor 10 höhere biologische Halbwertszeiten [48; 49]. Für die Remobilisierung von Schadstoffen im Boden ist der mikrobielle Umsatz der Humusmatrix von Bedeutung. Verschiedene biologische und physikalisch-chemische Mechanismen (oxidierende Radikal-bildende Enzyme, Gefügebau durch Temperaturänderungen und mechanische Einwirkung, pH-Änderungen u.a.) werden als Faktoren der Freisetzung von gebundenen Rückständen diskutiert [35]. Aus diesem Grund sollen weitere Versuche zur Remobilisierbarkeit der Rückstände aus der biologischen Behandlung von TNT im erzeugten Bodenmaterial durchgeführt werden. Hierzu wird in physiko-chemischen Experimenten die Mobilisierbarkeit der Rückstände ermittelt und bilanziert.

Einer der Hauptwege, die zur Mobilisierung von gebundenen Rückständen führen können, ist mit dem Humusabbau verbunden [9]. Organismen mit der Fähigkeit, polymere Huminsäuren zu depolymerisieren, finden sich vor allem unter den ligninolytischen Basidiomyceten und unter den coryneformen Bakterien [24; 47]. Aufgrund der makromolekularen Struktur der Humine muß für deren Ab- bzw. Umbau von extrazellulären enzymatischen Depolymerisationsmechanismen ausgegangen werden. Für alle bisher beschriebenen Huminsäure-abbauenden Organismen konnte extrazelluläre und/oder Zellhüllen-assoziierte Peroxidaseaktivität nachgewiesen werden [7; 36; 52; 60].

Zur Untersuchung der Remobilisierbarkeit soll im vorliegenden Projekt die Langzeitstabilität der Rückstände in verschiedenen Systemen unter „worst case“-Umweltbedingungen simuliert werden. Die Inkubation des rückstandshaltigen Bodenmaterials mit Huminsäure-depolymerisierenden (ligninolytischen) Pilzen und mit konzentrierten Enzymlösungen ist daher eine der aussichtsreichsten Möglichkeiten das Remobilisierungspotential zu ermitteln.

Enzyme ligninolytischer Pilze (z.B. Mn-Peroxidase) können makromolekulare Huminsäuren depolymerisieren [43]. Diese Enzyme sind im zellfreien System in der Lage durch oxidative

Reaktionen aus aromatischen Molekülen (z. B. Huminsäuren) Radikale zu erzeugen. Die bewirkte Destabilisierung des Moleküls führt zu einer Spaltung von chemischen Bindungen und damit zur Depolymerisation des Makromoleküls. Durch die enzymatische Depolymerisation der Humusmatrix kann das maximal mögliche Freisetzungspotential aus den gebundenen Rückständen abgeschätzt werden.

In vitro-Experimente mit zellfreien Extrakten der Weißfäulepilze *Trametes versicolor* [28] und *Nematoloma frowardii* [43] ergaben die enzymatische Mineralisierung zu CO₂ bzw. die Depolymerisation von künstlichen, ¹⁴C-markierten polymeren Huminsäuren. Die Aktivität des ligninolytischen Enzyms Mn-Peroxidase ist maßgebend für die Depolymerisation und Mineralisierung. Neben den unspezifischen Pilz-Peroxidasen (Lignin-Peroxidase, Mn-Peroxidase) können potentiell auch Laccasen, Peroxidasen/Oxidasen aus anderen Organismen wie coryneformen Bakterien oder Pflanzenwurzeln die Depolymerisation von Huminsäuren im Boden beeinflussen. Die extrazellulären Oxidoreduktasen der genannten Organismengruppen bilden die primären enzymatischen Faktoren für die Freisetzung von Humifizierungsprodukten aus Schadstoffen in Böden.

Darüber hinaus soll durch Bepflanzung des Bodenmaterials der Transfer in Pflanzen und die Remobilisierung im Wurzelraum untersucht werden. In den Ansätzen mit ¹⁴C-Markierung beobachtete, signifikante Mobilisierungen der Rückstände werden dann in den ¹⁵N-haltigen Böden mit ¹⁵NMR-spektroskopischen Methoden eingehender charakterisiert.

3 Angewandte Methoden

3.1 Bodenvorbereitung

Der für die modellhafte Sanierung durch die anaerob/aerob Verfahren (Teilprojekte in Marburg und Stuttgart) und das aerobe Pilzverfahren (Teilprojekt in Jena) verwendete Boden vom Werk "Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld wurde von der Arbeitsgruppe der Universität Marburg beschafft, gesiebt (< 2,5 cm) und mikrobiologisch, sowie chemisch und morphologisch charakterisiert (Tab. 1). Dieser Boden vom Altlaststandort enthielt noch erhebliche Mengen an Nitroaromaten (TNT: 1193 mg/kg, 4-ADNT: 81 mg/kg, 2-ADNT: 53 mg/kg, Werte bezogen auf TS). Der Boden wurde in Marburg mittels geeigneter Mischmaschinen homogenisiert und anschließend auf die Projektpartner (Arbeitsgruppen der Universität Stuttgart und Jena) aufgeteilt. Der an unser Projekt übergebene Boden (10 kg FG) wurde angetrocknet, auf eine Korngröße von 2 mm gesiebt, ein Wassergehalt von 20 % eingestellt (ergab 8,5 kg Boden FG) und nach Dotieren mit ¹⁴C-TNT bzw. ¹⁵N-TNT für zwei Wochen bei 4° C gelagert (Simulation der "Alterung"). Für die Versuche wurden jeweils 4 kg ¹⁵N-TNT und 4 kg ¹⁴C-TNT dotierter Boden (Wassergehalt 20 %) hergestellt. Unmittelbar nach Dotierung und nach Alterung wurden jeweils Rückstellproben genommen (ca. 50 g Boden) und bei -20° C eingefroren.

Tab. 1: Chemisch-physikalische und mikrobiologische Parameter des eingesetzten Bodens vom Werk "Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld (analysiert in Marburg, 1999)

Bodenzusammensetzung ¹			Bodenparameter		Bodenmikroflora ²	
gS	21,3 %	47,5 %	Boden pH:	7,43	aerobe und fakultativ anaerobe heterotrophe Organismen	4,6 x 10 ⁷
mS	14,8 %					
fS	11,4 %					
gU	12,6 %	39,7 %	Kalk- gehalt:	2,15 %	Clostridien	1,4 x 10 ⁴
mU	19,8 %				Pilze	1,7 x 10 ⁵
fU	7,3 %					
T	12,9 %	12,9 %	Glühverlust (550° C):	13,7 %	TNT reduz. Organismen	1,2 x 10 ⁶

¹g, grob; m, mittel; f, fein; S, Sand; U, Schluff; T, Ton

²Bestimmung der Lebendkeimzahl mittels MPN-Methode [2]

3.2 Bodendotierung

¹⁵N-TNT dotierter Boden

Für die Ermittlung der Bindungstypen sollten dem Boden mindestens 6 g kristallines ¹⁵N-TNT/kg TS zugesetzt werden, um das Signal-Rausch-Verhältnis für die ¹⁵N-NMR zu vergrößern. Das an der Universität Marburg synthetisierte ¹⁵N-TNT (24 g) wurde dazu in einem Mörser pulverisiert. Um eine homogene Verteilung des TNT zu erreichen wurden zunächst wenige g Boden im Mörser in das TNT eingearbeitet.

Dieses Gemisch wurde sukzessive im Mörser und dann in einem größeren Gefäß mit weiterem Boden intensiv vermischt. Nach "Alterung" (siehe oben) wurde der Wassergehalt des Bodens auf 30 % eingestellt und auf die zwei Reaktoren aufgeteilt. Die Gesamtkonzentration an TNT in den Reaktoren betrug beim Start der Inkubation 8,5 g/kg TS (R 1, mit Pilz) bzw. 8,9 g/kg TS (R 2, Kontrolle ohne Pilz).

¹⁴C-TNT dotierter Boden

Analog dem ¹⁵N-TNT-Boden wurde ein ¹⁴C-TNT dotierter Boden zur Quantifizierung der Stoffverteilung hergestellt. Dazu wurden zunächst 24 g unmarkiertes kristallines TNT im Mörser pulverisiert und anschließend 2 ml gelöstes ¹⁴C-TNT (6,014 MBq/ml MeOH) tropfenweise eingemischt. Die Einbringung des ¹⁴C-dotierten TNT in den feuchten Boden (20 % Wassergehalt) und dessen weitere Behandlung erfolgte entsprechend der Vorgehensweise mit ¹⁵N-TNT (siehe oben). Die TNT-Konzentrationen in den Reaktoren 3 (Kontrolle ohne Pilz) bzw. 4 (mit Pilzbrut) betragen somit 8,9 g/kg TS bzw. 8,5 g/kg TS Boden (dotiertes und aus der Altlast stammendes TNT).

3.3 Vorbereitung des Pilz-Stroh-Substrates

Für die biologische Bodenbehandlung wurde der streuschichtbewohnende Basidiomycet *Stropharia rugosoannulata* (Kulturträuschling) eingesetzt. Der Pilz wurde zunächst auf Malzagarplatten und auf sterilen Haferkörnern (100 g Körner und 80 ml Aqua dest.) vorkultiviert und dann für die Beimpfung von zwei mal sterilisiertem Weizenstroh (150 g und 375 ml Aqua dest.) verwendet. Nach einer Inkubationszeit von ca. 4 - 5 Wochen bei 18° C konnte das vollständig durchwachsene Pilz-Stroh-Substrat für Reaktorversuche eingesetzt werden.

3.4 Biologische Behandlung von ^{15}N - und ^{14}C -TNT-markiertem Boden in Bodenreaktoren

Die Bodenbehandlung erfolgte in vier Bodensäulenreaktoren (R 1-4), von denen R 1 und 2 mit ^{15}N -TNT dotiertem Boden und R 3 und 4 mit ^{14}C -TNT dotiertem Boden befüllt wurden. In jeweils einen der Reaktoren wurde nur der vorbereitete Boden eingebracht (R 2 und 3, Kontrollen), während in den Reaktoren R 1 und R 4 der ^{15}N - und ^{14}C -Boden schichtweise mit Pilz-Stroh-Substrat versetzt wurde. Details der Reaktoren und der Schichtung wurden in früheren Statusberichten bereits dargestellt [39; 40]. Abweichend von früherer Prozesstechnik stellten die Reaktoren für die dargestellten Versuche geschlossene Systeme dar, die durch um die Glaskörper gewickelte Wärmeaustauscherschläuche temperiert werden konnten (Abb. 2). Die Luft im System wurde ebenfalls temperiert durch eine Schlauchpumpe mit einem Volumenstrom von 32 ml/min von unten durch die Bodensäulen gepumpt. Die Abluft der Reaktoren wurde durch Waschflaschen mit 100 ml EGME und 2 mal 100 ml 4 N KOH geleitet um flüchtige organische Verbindungen und CO_2 zu sorbieren. Die regelmäßig ausgetauschten Lösungen wurden u.a. für die ^{14}C -Bilanz analysiert. Über einen angeschlossenen Luftvorrat (flexibler Gasbeutel, Fa. Tesseraux) wurde der verbrauchte Sauerstoff ergänzt.

Die Versuche in den Reaktoren stellen ein „scale-down“, des von der AWIA GmbH erprobten Pilzverfahrens dar. Als Leitparameter wurde die Temperatur des Bodens und der Sauerstoffverbrauch in regelmäßigen Abständen ermittelt. Nach 97 und weiteren 49 Tagen wurden die Reaktoren geöffnet, die Böden jeweils homogenisiert und nach Entnahme von Proben wieder in die Bodenreaktoren eingefüllt. Bei den Reaktoren 1 und 4 erfolgte ein Austausch des verbrauchten Pilz-Stroh-Substrates. Nach weiteren 30 Tagen wurde die Behandlung beendet, Proben genommen, der Umsatz bilanziert und das Ausmaß der Festlegung bestimmt. Die Böden wurden bis zur weiteren Bearbeitung für die Remobilisierungsversuche bei 4° C gelagert.

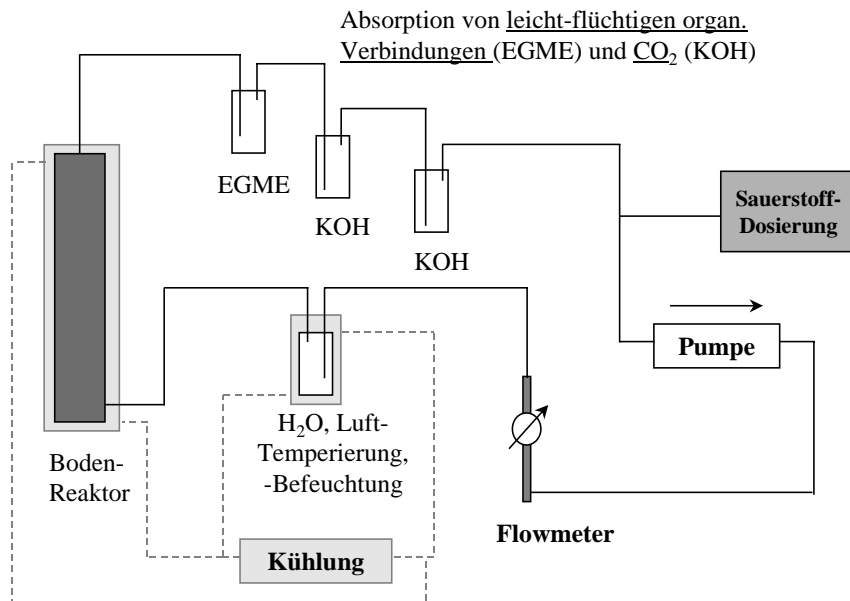


Abb. 2: Schema der Reaktoranlage (mit Kreislaufbelüftung) zur Festlegung von TNT/Metaboliten mit dem Pilzverfahren (Uni Jena).

3.5 Vorbereitung des Bodens für die Remobilisierungsexperimente mit biologischen Systemen

Für die Remobilisierungsexperimente mit biologischen Systemen mußten Reste nicht festgelegter Nitroaromaten weitgehend entfernt werden, um eine Hemmung durch toxisch wirkende Konzentrationen zu verhindern (siehe Abschnitt 4.7 und Abb. 8). Die für die Versuche benötigten Bodenmengen wurde mit der zweifachen Menge MeOH (w/w) 30 min im Ultraschallbad behandelt und anschließend 1 h ausgeschüttelt. Nach vollständigem Absetzen der Bodenpartikel wurde der Überstand abgezogen und anschließend das noch im Boden verbliebene MeOH unter einem Abzug abgedampft (24 h). Die Anfeuchtung des trockenen Bodens auf 20 % Wassergehalt erfolgte mit einer wässrigen Lösung, welche durch Ausschüttlung aus einem nicht kontaminierten Referenz-Boden (Boden aus Clausthal-Zellerfeld; TNT-frei) gewonnen wurde. Die mikrobielle Aktivität und krümelige Struktur des Bodens wurde dadurch weitgehend wiederhergestellt.

3.6 Ermittlung der Eigenschaften und Bindungstypen der Rückstände aus TNT nach der biologischen Bodenbehandlung

Durch unterschiedliche physiko-chemische und biologische Methoden wird die Stabilität nicht extrahierbarer Rückstände, nach der Behandlung der TNT-kontaminierten Böden mittels des aeroben Pilzverfahrens, untersucht. Die radioaktive ¹⁴C-Markierung erlaubt eine sehr genaue Aussage über die Verteilung der TNT-Produkte in verschiedenen Bodenfraktionen. Die ¹⁵N-NMR-Analytik ermöglicht dagegen eine qualitative Aussage zur Bindungsart gebundener und remobilisierter Rückstände. Um eine Aussage zur Häufigkeit bestimmter Bindungsmuster

machen zu können, ist daher die Bilanzierung mittels ^{14}C -TNT notwendig. Um die Anzahl der NMR-spektroskopischen Analysen zu minimieren, erfolgen die Versuche zunächst mit dem ^{14}C -TNT dotierten und behandelten Boden. Bei Ansätzen mit signifikanter Remobilisierung (quantifizierbar über freigesetzte Radioaktivität) werden die Versuche mit dem ^{15}N -TNT dotierten und behandelten Boden durchgeführt und dann ^{15}N -NMR-spektroskopisch analysiert.

Die behandelten Böden werden vor und nach den Experimenten einem bei allen Projektpartnern gleichen Extraktions- und Analysenverfahren unterzogen Abb. 3, welches im Anhang des Abschnittes 9.4.1 des Leitfadens im Detail erläutert ist und hier nur kurz zusammengefaßt werden soll:

^{14}C -Boden:

- Wasser- und Methanolextraktion;
- Messung der Radioaktivität in den Extrakten mittels Szintillationszählung;
- Huminstoffextraktion mit 0,5 N NaOH und anschließender Trennung von Fulvo- und Huminsäuren durch Säurefällung; Messung der Radioaktivität in der Fulvo- und Huminsäurefraktion sowie den unlöslichen Huminen nach Verbrennung eines Aliquots mit Oxidizer OX-500 (Zinsser Analytik GmbH, Frankfurt);

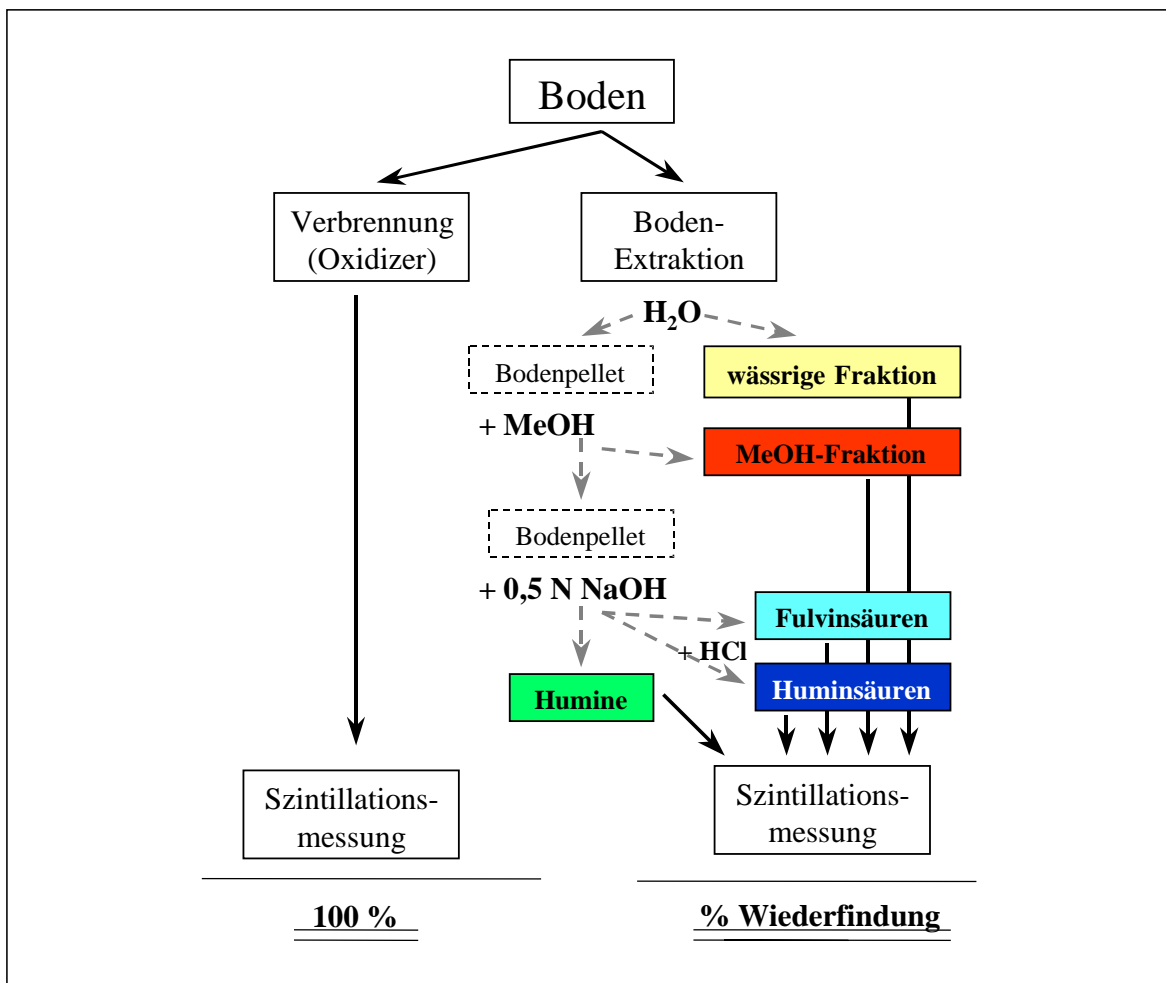


Abb. 3: Schema der Bodenextraktion und Bilanzierung der ^{14}C -Verteilung

¹⁵N-Boden:

- Wasser- und Methanolextraktion;
- Analyse der Nitroaromaten in den Extrakten mittels HPLC/DAD;
- ¹⁵N-Festkörper-NMR-Analyse des extrahierten Gesamtbodens;
- Huminstoffextraktion mit 0,5 N NaOH und anschließender Trennung von Fulvo- und Huminsäuren durch Säurefällung, Dialysieren und Gefriertrocknen der Fulvo- und Huminsäurefraktion; ¹⁵N-Festkörper-NMR-Analysen der Fulvo- und Huminsäurefraktion sowie der Humine.

3.6.1 Mobilisierung durch physiko-chemische Behandlung

Mit diesen Methoden soll die Mobilisierbarkeit der gebundenen Rückstände im Rückstandsboden durch physiko-chemische Prozesse getestet werden. Die physiko-chemischen Behandlungsmethoden simulieren dabei verschiedene Umweltbedingungen und werden mit allen hergestellten rückstandshaltigen Böden durchgeführt. Die Anwendung der Methoden 4.6.1.1 und 4.6.1.2 erfolgt nach einheitlichen Protokollen auch für die Bodenproben der Arbeitsgruppen aus Marburg und Stuttgart in Jena.

3.6.1.1 Mechanischer Aufschluß des Bodengefüges mit einer Kugelmühle

Der vollständige mechanische Gefügebaubruch der rückstandshaltigen, luftgetrockneten Böden erfolgt mit einer Kugelmühle des Typs S1 (Fa. Retsch, Haan). Je 120 g Boden (TS) werden in einem 500 ml Becher mit 3 Kugeln (Ø 2,5 cm) bei 75 Upm für 30 min gemahlen. Der Boden wird anschließend extrahiert und die ¹⁴C-Verteilung in den Fraktionen ermittelt.

3.6.1.2 Extraktion mittels Wasserdampf

Die Remobilisierung gebundener Rückstände mit dieser Methode soll die maximale Remobilisierung über den Wasserpfad abschätzen und erfolgt mit einem handelsüblichen Gerät zur Wasserdampfextraktion von Feststoffen Typ LaPavoni Professional (Italien). Etwa 1-5 g Boden werden in den Probenbehälter eingewogen und mit etwa der 50-fachen Menge überhitzten Wassers (121° C, 1 bar) extrahiert. Die Böden müssen teilweise (abhängig von ihren strukturellen Eigenschaften) vorher mit Seesand vermischt werden, um ein Stauen des Wassers zu verhindern. Der Wasserdurchfluß durch die Probe wird volumetrisch und der ausgespülte Feinkornanteil gravimetrisch in Zentrifugenröhrchen erfaßt. Der mit Wasser gesättigte Boden wird anschließend luftgetrocknet, mit H₂O, MeOH und NaOH extrahiert und die einzelnen Fraktionen analysiert. Die Standardisierung dieser Methode für die in der Struktur sehr unterschiedliche rückstandshaltigen Böden aus Marburg, Stuttgart und Jena ist zur Zeit noch in Arbeit.

3.6.1.3 Weitere Methoden zur Remobilisierung gebundener Rückstände

Die Simulation mehrjähriger Temperaturschwankungen erfolgt über einen Zeitraum von 4 Monaten entsprechend der für alle Teilprojekte gleichen Vorschrift durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen. Die Remobilisierung durch Auflösung metall-organischer Komplexe wird mit ansteigenden Konzentrationen von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) durchgeführt. Die Simulation eines 1000-jährigen sauren Regens erfolgt nach einer modifizierten EPA-Vorschrift. Dabei wird der Einfluß des pH auf die Remobilisierbarkeit der Rückstände untersucht.

3.6.2 Mobilisierung durch biologischen Behandlung

In diesen Versuchen wird die Mobilisierbarkeit der gebundenen Rückstände durch Zusatz von verschiedenen Mikroorganismen und Radikal-bildenden Enzymen von allen ¹⁴C-TNT-Böden aus den Teilprojekten in Stuttgart, Marburg und Jena quantifiziert. Mit dem analog behandelten ¹⁵N-TNT-Boden erfolgt dann die Untersuchung der Bindungstypen in den Mobilisierungsprodukten.

3.6.2.1 Untersuchungen zur Remobilisierung durch Zusatz von Huminstoff-abbauenden bzw. ligninolytischen Pilzen

Für die Remobilisierungsversuche erfolgte ein vollständiger Gefügeaufbruch des rückstandshaltigen Bodenmaterials durch Zermahlen in luftgetrocknetem Zustand in einer Kugelmühle des Typs S1 (Fa. Retsch, Haan). Von diesem Boden werden je 7,5 g TS zu emersen Flüssigkulturen von *Clitocybula duseinii*, *Pleurotus ostreatus*, *Stropharia rugosoannulata* und *Trametes versicolor* zugesetzt. Die Pilze werden zuvor von Malzagarplatten auf 25 ml geeignetes Nährmedium in 250 ml Kulturflaschen überimpft und 3-10 Tage (Oberfläche mit Myzel bewachsen) bei 24° C inkubiert. Nach sichtbarem Bewuchs und Induktion der extrazellulären Enzyme wird der Boden zugegeben und die Kulturflaschen gasdicht verschlossen. Zur Versorgung mit O₂ erfolgt über einen Zeitraum von 4-6 Wochen ein regelmäßiger Austausch des Gasvolumens über dem Medium, wobei gebildetes CO₂ in 4 N KOH und flüchtige aromatische Verbindungen in einem organischen Lösungsmittel (EGME) sorbiert werden. Mit den ¹⁴C-Ansätzen wird eine mögliche Mineralisation durch β -Szintillationsspektrometrie quantifiziert. Am Versuchsende wurden die Böden extrahiert, die ¹⁴C-Verteilung bilanziert und bei signifikanten Veränderungen die Bindungstypen mittels ¹⁵N-NMR bei den ¹⁵N-Böden untersucht.

3.6.2.2 Untersuchungen des Remobilisierungspotentials durch Zusatz von Radikal-bildenden Enzymen.

Diese Untersuchungen erfolgen nach einheitlichen Protokollen für die nach den verschiedenen Verfahren behandelten Böden mit ¹⁴C-TNT und ¹⁵N-TNT der Arbeitsgruppen aus Marburg, Stuttgart und Jena. Sie werden vergleichend an der FSU Jena in Zusammenarbeit mit der Firma JenaBios durchgeführt.

Die verwendeten enzymhaltigen Präparate stammten aus unterschiedlichen Quellen: Laccase (*Trametes versicolor*), Lignin-Peroxidase und Mangan-Peroxidase (*Nematoloma frowardii*), Meerrettich-Peroxidase (SIGMA), Pflanzenwurzelextrakt (*Phaseolus vulgaris*), Kulturüberstände von *Gloeophyllum striatum* (Braunfäulepilz) und von *Streptomyces spec.* (bodenbewohnender Actinomycet). Die Reaktionspuffer und -bedingungen wurden in einer ersten Phase für jedes der eingesetzten Enzyme in Bezug auf maximale Oxidationskraft optimiert.

In der zweiten Phase wird der Gesamtboden mit den Enzymen behandelt und eine Remobilisierung anhand der Änderung in der ^{14}C -Verteilung quantifiziert. In der dritten Phase wird mit dem am stärksten wirkenden Enzym eine Behandlung der Bodenfraktionen Humin, Humin- und Fulvosäuren durchgeführt. Bei signifikanter Remobilisierung werden die entsprechenden ^{15}N -Proben gewonnen und mit der ^{15}N -NMR-Spektroskopie untersucht.

3.6.3 Transfer und Mobilisierung durch Bepflanzung des Bodens

In diesen Versuchen soll der Transfer aus den Rückständen in die Pflanze untersucht und die stimulierende Wirkung der Pflanzen auf die Bodenmikroorganismen (Rhizosphäreneffekte) ermittelt werden. Die Bepflanzung des rückstandshaltigen Bodenmaterials erfolgt mit mono- und dicotylen Pflanzen (Weidelgras, Buschbohne, Radieschen). Der Transfer in die Pflanzen, wie auch die Veränderungen der Mobilisierbarkeit der Rückstände im Boden wird bilanziert. Diese Arbeiten werden vergleichend für alle ^{14}C -TNT-Böden an der Univ. Marburg durchgeführt und ermöglichen die Quantifizierung der Remobilisierung durch Pflanzenbewuchs. Mit den äquivalent im Arbeitskreis Marburg behandelten ^{15}N -TNT-Böden werden NMR-Analysen durchgeführt. Die Darstellung der Methodik der Pflanzversuche erfolgte im Statusbericht dieser Arbeitsgruppe (s. Kapitel 9.4.3 des Leitfadens).

3.7 Test auf Wachstumshemmung des Pilzmyzels durch TNT/Metaboliten

Für einen effektiven Abbau von TNT durch *Stropharia rugosoannulata* im Boden ist ein Einwachsen des Myzels in die Bodenmatrix notwendig. Um eine mögliche Hemmung des Myzelwachstums durch hohe bioverfügbare Konzentrationen von TNT/Metaboliten im Boden zu untersuchen, wurde ein Test auf Malzagarplatten (MA-Platten) durchgeführt. Der Überstand aus der 1. methanolischen Extraktion des ^{15}N -Bodens nach 97 Tagen Inkubation mit Pilz wurde dazu genutzt. Der Extrakt enthielt 3,2 mg/ml TNT bzw. -Metaboliten, wobei die Stoffmenge im verwendeten Boden-extrakt mit einem entsprechenden Extrakt aus ^{14}C -Boden über die noch enthaltende Radioaktivität bestimmt wurde. Es wurden mehrere Verdünnungsstufen des ^{15}N -Extraktes hergestellt und von diesen jeweils 500 μl auf Kulturplatten mit Standard-Malzagar-Medium ausplattiert (drei Parallelen). Als Kontrolle wurde reines MeOH verwendet. Nach vollständigem Abdampfen des Lösungsmittels wurde je ein Stanzstück (\varnothing 10 mm) aus einer gut mit *Stropharia rugosoannulata* bewachsenen MA-Platte im Zentrum der Testplatten plaziert. Das radiale Wachstum des Myzels wurde jeden Tag entlang von zwei orthogonal verlaufenden Linien erfaßt. Nach 14 Tagen hatte das Myzel bei den Kontrollen und bei der niedrigsten Verdünnungsstufe des TNT/Metaboliten enthaltenden Extraktes die MA-Platten vollständig bewachsen.

3.8 Analytik

Die Konzentrationen von TNT und seinen Metaboliten wurde für die H_2O - und MeOH -Extrakte aus den ^{15}N -Böden mit HPLC/DAD bestimmt. Die chromatographische Trennung erfolgte auf einer RP-18 HPLC-Säule (LiChrospher 100 in LiChroCart 250-4, Merck, Darmstadt) mit $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (60:40, 1ml/min) oder mit einem Gradienten von $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ als Elutionsmittel (s. Kapitel 9.4.4 des Leitfadens).

Für eine schnelle Bilanzierung von Mineralisation, Festlegung und möglicher Remobilisierung des TNT und seiner Metaboliten wurden die Extrakte der mit ^{14}C -TNT dotierten Böden mittels β -Szintillationsspektrometrie analysiert. Die wässrigen und MeOH -Extrakte sowie die Lösungen zur Absorption von CO_2 (4 N KOH) und aromatischen Verbindungen (EGME) wurden in geeigneten Szintillatoren direkt im Liquid-Szintillation-Counter (LS-6500, Beckman) vermessen. Die ^{14}C -Aktivitäten in den Fulvo- und Huminsäuren, den Huminen und im Gesamtboden wurden im Biological Oxidizer OX-500 (Zinsser Analytik, Frankfurt) verbrannt und das aufgefangene $^{14}\text{CO}_2$ anschließend durch β -Szintillationsmessung quantifiziert. Die Bilanzierung der ^{14}C -Verteilung in Böden erfolgte durch den Vergleich von eingesetzter ^{14}C -Aktivität mit den summarisch erfaßten Aktivitäten der einzelnen Fraktionen. Die Konzentrationen von ^{14}C -TNT und den ^{14}C -Aminonitrotoluolen sowie nicht chromatographierbaren Verbindungen wurden durch chromatographische Trennung auf DC-Platten und Detektion der Radioaktivität mit einem PhosphorImager-System (Storm 830, Pharmacia, Freiburg) ermittelt. Details der Dünnschichtchromatographie und weiterer Methoden (z.B. ^{15}N -NMR-Spektroskopie) wurden in den Projektbeschreibungen des VV 5 [1; 6] und im Zwischen- und Abschlußbericht des Verbundvorhabens „Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten“ TV 3.4 [39; 62] ausführlich dargestellt.

4 Ergebnisse und Diskussion

Da die ^{15}N -NMR lediglich qualitative Aussagen zu Bindungsstrukturen ermöglicht, war es notwendig, parallel zum Versuchsansatz mit ^{15}N -TNT dotiertem Boden einen Versuchsansatz mit ^{14}C -TNT dotiertem Boden durchzuführen, der eine Bilanzierung bzw. Quantifizierung der Veränderung bestimmter Bindungsmuster ermöglicht. Die Festlegung von TNT/-Metaboliten durch das aerobe Pilzverfahren wurde außerdem mit der Abbau-Aktivität der autochthonen Mikroorganismen des Standortbodens (Kontrolle) verglichen. Die Versuche wurden in einer gekoppelten Reaktoranlage gleichzeitig und somit unter analogen Bedingungen durchgeführt. Die Übereinstimmung der Parameter und Ergebnisse für die unterschiedlich dotierten Böden wurde nachgewiesen (siehe unten, Tab. 2). Die Darstellung der kontrollierten Parameter erfolgte deshalb jeweils nur für einen der mit Pilz-Stroh-Substrat inkubierten Böden und seiner entsprechenden Kontrolle (ohne Pilz).

Die Temperatur des Bodens in den vier Reaktoren wurde auf 15°C (Abb. 4) und in der 3. Immobilisierungsphase auf 18°C eingestellt, um natürliche Bedingungen zu simulieren. Eine sekundäre Besiedlung des Pilz-Stroh-Substrates oder des Bodens durch Streptomycceten und andere bodenbewohnende Mikroorganismen, wie sie bei Temperaturen $> 22^\circ\text{C}$ in Vorversuchen beobachtet wurde, konnte dadurch verhindert werden.

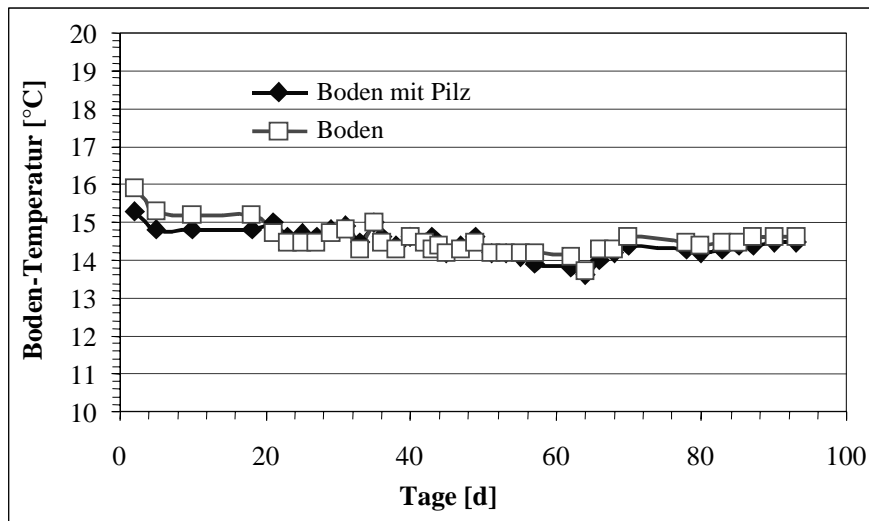


Abb. 4: Temperierung der Bodenreaktoren während der 1. Inkubationsphase

Der Sauerstoffverbrauch sowie die Bildung von $^{14}\text{CO}_2$ durch die mikrobiellen Aktivitäten wurde regelmäßig erfasst. In den Reaktoren mit Pilz wurde ein deutlich höherer O_2 -Verbrauch beobachtet (Abb. 5). Die Mineralisation (Bildung von $^{14}\text{CO}_2$) war im Gegensatz dazu nicht erhöht und betrug $< 1\%$ der eingesetzten ^{14}C -Aktivität (Abb. 6).

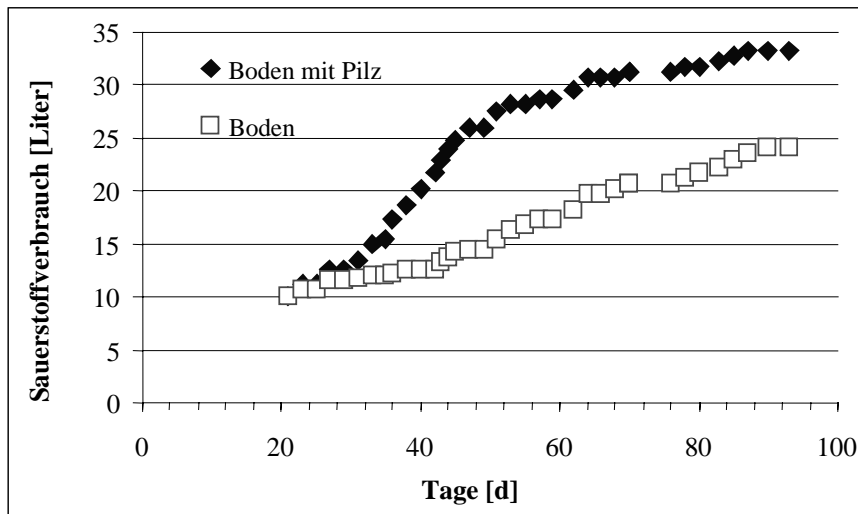


Abb. 5: Sauerstoffverbrauch während der 1. Inkubationsphase

Die Abnahme der extrahierbaren TNT-Konzentration und die zunehmende Festlegung der Metaboliten wurde mittels der ^{14}C -Verteilung im radioaktiv markierten Boden nach jeder Immobilisierungsphase quantifiziert (Abb. 7). Während des Versuchs wurden vom eingesetzten TNT in Gegenwart von *Stropharia rugosoannulata* insgesamt 2,1 g/kg TS im Boden festgelegt. Das ist mehr als das 10-fache der bisher mit dem Pilzverfahren umgesetzten TNT-Menge (200 mg/kg TS). Durch die autochthonen Bodenorganismen und Bodenprozesse wurden 0,9 g/kg TS immobilisiert (Kontrollen). Die in vorhergehenden Experimenten [40] festgestellte Immobilisierung von $> 86\%$ der eingesetzten Ausgangsmenge (siehe auch Abb. 1) wurde nicht erreicht.

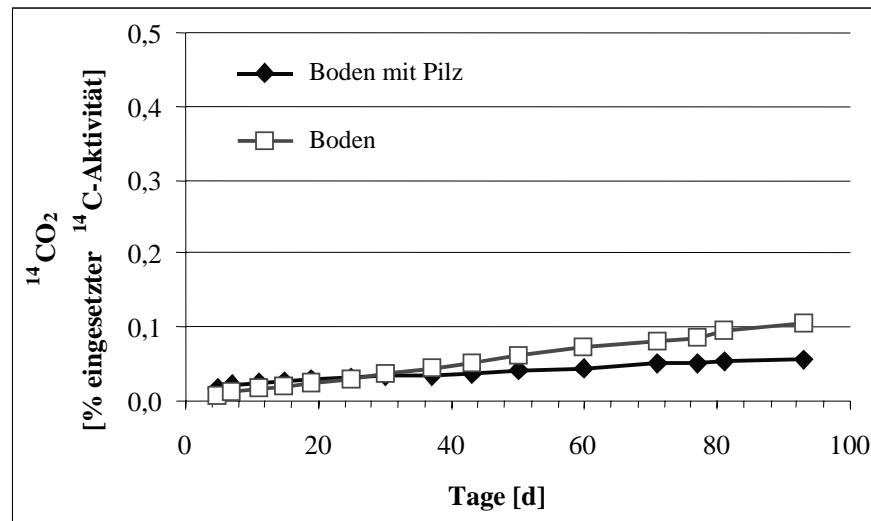


Abb. 6: Mineralisation von $^{14}\text{C-TNT}$ in den Bodenreaktoren ohne und mit Pilz-Stroh-Substrat unter aeroben Bedingungen.

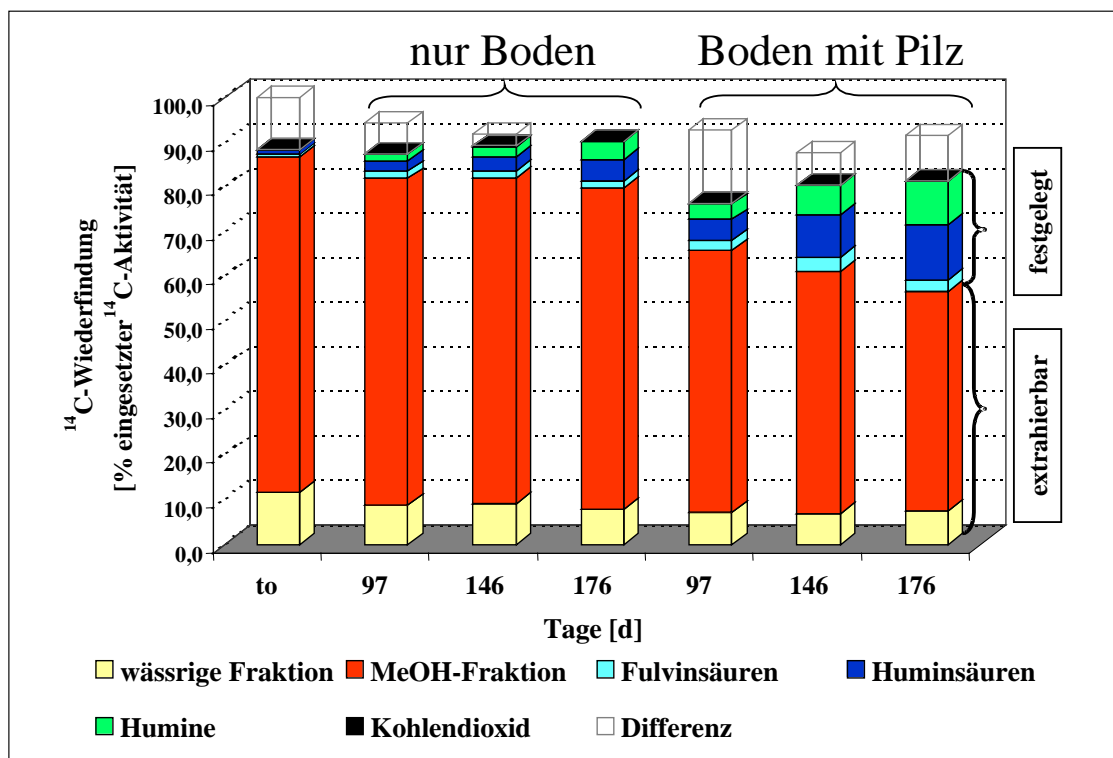


Abb. 7: Änderung der $^{14}\text{C-Verteilung}$ im $^{14}\text{C-TNT}$ -kontaminierten Boden (8,9 bzw. 8,5 g/kg TS, 3268 kBq/kg TS) nach 97, 146 und 176 Tagen aerober Inkubation ohne und mit Zusatz von Pilz-Stroh-Substrat.

Die am Versuchsende aus dem Boden extrahierbare ^{14}C -Aktivität bestand bei den Reaktoren mit Pilzzusatz zu etwa gleichen Teilen aus TNT und Aminonitrotoluolen. In den Kontrollen (nur Boden) wurde dagegen fast ausschließlich TNT nachgewiesen (Tab. 2). Es war naheliegend das durch die hier eingesetzten extrem hohen TNT-Konzentrationen (bis 8,9 g/kg TS; die starke Anreicherung des ^{15}N -Tracers erfolgte im Hinblick auf die NMR-Analyse bei allen Verfahren) und die dadurch erfolgte Bildung großer Mengen Aminonitrotoluole (Tab. 2)

toxische Effekte für eine Limitierung des Wachstums sorgten (siehe unten, Abb. 8). So erfolgte im Gegensatz zu Vorversuchen mit TNT-Konzentrationen von 200 mg bis 2 g TNT/kg TS in diesem Versuch kein sichtbares Einwachsen des Pilzmyzels in die Bodenmatrix [40; 70].

Die nach dem derzeitigen Kenntnisstand an das Pilzmyzel gebundene Reduktion des TNT konnte dadurch nur an den Grenzflächen von Pilz-Stroh-Substrat und Boden stattfinden und war somit geringer als bei einem vollständig vom Pilzmyzel durchwachsenen Boden. Trotz der Limitierung lagen in den Böden mit Pilz-Stroh-Substrat am Versuchsende nur noch 20 % der eingesetzten Menge als TNT vor, während aus den nativen Böden (Kontrollen) noch 70-74 % des applizierten TNT extrahiert werden konnten. Der Anteil von festgelegten TNT-Metaboliten in der Bodenmatrix war bezogen auf die eingesetzte TNT-Menge mit 24,7 % niedriger als auf Grund der Vorversuche erwartet, aber signifikant höher als in der Kontrolle (10,2 %). Die absolut im Boden immobilisierten Mengen an TNT-Metaboliten (2,1 g/kg TS, siehe oben) sollten für eine effektive Durchführung der Experimente zur Remobilisierung dennoch ausreichend sein.

Tab. 2: Bilanzierung der extrahierbaren Metaboliten im ^{15}N - und ^{14}C -Boden nach Ende der Immobilisierung (insgesamt 150 Tage Behandlungsdauer).

quantifiziert mit	% eingesetzter TNT-Konzentration			
	HPLC/DAD ¹⁾		DC/Phosphor-Imager ²⁾	
	^{15}N -Boden ohne Pilz	^{15}N -Boden mit Pilz	^{14}C -Boden ohne Pilz	^{14}C -Boden mit Pilz
1,3,5-Trinitrobenzol	0,0	0,0	n.d.	n.d.
1,3-Dinitrobenzol	0,0	0,0	n.d.	n.d.
2,4-Dinitrotoluol	0,1	0,1	n.d.	n.d.
2,6-Dinitrotoluol	0,0	0,0	n.d.	n.d.
2,4,6-Trinitrotoluol	74,3	20,3	70,2	19,8
2-Amino-4,6-dinitrotoluol	1,1	6,8	6,2	16,9
4-Amino-2,6-dinitrotoluol	1,0	14,5		
Summe	76,5	41,7	76,4	36,7

¹⁾ Quantifizierung erfolgte über die Peakfläche im Vergleich zu authentischen Standards

²⁾ Die prozentualen ^{14}C -Verteilung auf der DC-Platte (Kieselgel 60;

Petrolether:Isobutylmethylketon, 85:15, v/v, als mobile Phase) wurde in Bezug gesetzt zur im Boden extrahierbaren und eingesetzten ^{14}C -Aktivität; n.d. - nicht detektierbar (enthaltene ^{14}C -Aktivität zu niedrig);

Die Hemmung des Einwachsens des Pilzmyzels in die Bodenmatrix ist vermutlich auf die eingesetzten, hohen TNT-Konzentrationen im Boden zurückzuführen. Nicht nur das TNT sondern auch die durch die Wirkung des Pilzes an den Grenzschichten zwischen Boden und

Substrat gebildeten Metaboliten (z.B. Aminonitrotoluole) könnten daran beteiligt gewesen sein. Es wurde deshalb in einem einfachen Versuch die Toxizität der aus dem Boden extrahierbaren und somit als potentiell bioverfügbar eingeschätzten Verbindungen getestet, Wachstumstest [66]). Die Bestimmung des Myzelwachstums auf Malzagar bei Sc(Extraktion [53])hadstoffkonzentrationen von 0 - 1,6 mg/MA-Platte (entspricht 0 - 80 mg/kg Agar) zeigte eine deutliche Hemmung schon bei niedrigen Metaboliten-Konzentrationen (0,8 mg/MA-Platte). Eine Verminderung der toxisch wirkenden Konzentration von TNT/-Metaboliten im Boden erfolgte durch Adsorptionseffekte und den Abbauprozess. Eine gegenüber der Kontrolle deutlich höhere sukzessive Festlegung der Metaboliten in der Bodenmatrix in Gegenwart des Pilzes wurde nachgewiesen.

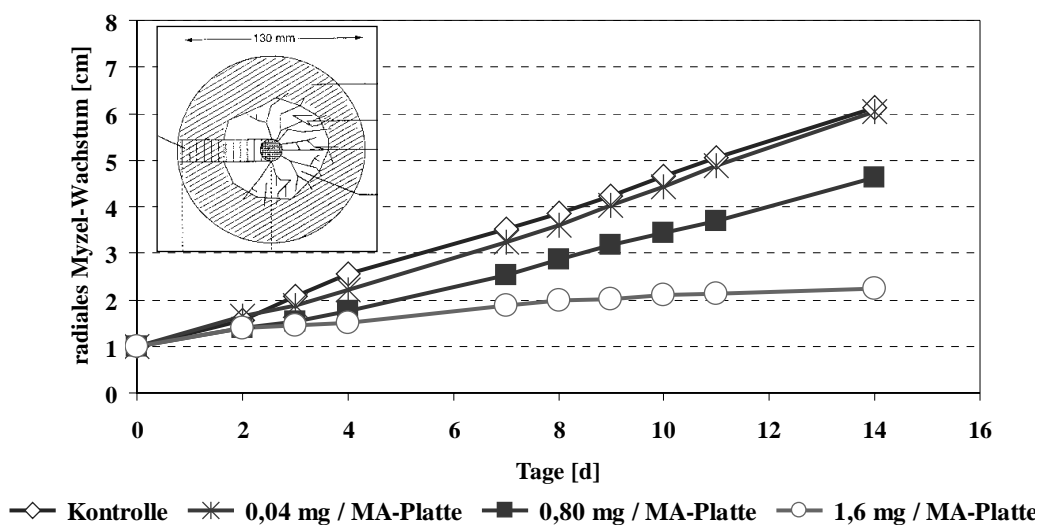


Abb. 8: Hemmung des Wachstums von *Stropharia rugosoannulata* auf Malzagarplatten durch die Wirkung extrahierbarer TNT/Metaboliten (mit MeOH aus dem ^{15}N -Boden extrahiert).

Die Verteilung der ^{14}C -Markierung bzw. der TNT-Metaboliten im hergestellten Rückstandsboden wurde sowohl für den eigenen ^{14}C -Boden, als auch für die ^{14}C -Böden aus den Teilprojekten in Marburg und Stuttgart untersucht. Die prozentuale Verteilung der ^{14}C -Aktivitäten bildet die Grundlage für den Nachweis einer möglichen Remobilisierung durch die folgende physiko-chemische oder biologische Behandlung. Eine Aussage über tatsächlich remobilisierte Mengen ist jedoch nur bei dem Boden aus den Pilzversuchen möglich. Die Versuchsanordnungen der anaerob/aerob-Verfahren dagegen lassen die Erstellung einer ^{14}C -Gesamtbilanz und eine Bilanzierung der Remobilisierung in Bezug auf die TNT-Ausgangskonzentrationen nicht zu. Die Ergebnisse der Extraktionen werden mit den Ergebnissen der Projektpartner verglichen und ggf. in einem Ringversuch überprüft. In dem mit dem Pilzverfahren in Jena behandelten Boden wurden von der im Boden immobilisierten ^{14}C -TNT-Aktivität (entsprechen 2,1 g TNT/kg TS, siehe oben) 10,3 % in den Fulvosäuren (FS), 50,6 % in den Huminsäuren (HS) und 39,1 % in den Huminen (HM) wiedergefunden. In der Kontrolle, bei der nur 0,9 g/kg TS festgelegt wurde, war die ^{14}C -Verteilung ähnlich (FS 14,6 %, HS 45,6 % und HM 39,8 %).

5 Ausblick

Auf Grundlage der erreichten Immobilisierung und der bereits gewonnenen Daten soll in den noch folgenden Experimenten zur Remobilisierung nicht nur die Freisetzung extrahierbarer Metaboliten, sondern auch Verschiebungen in der Verteilung der Metaboliten auf die Huminstofffraktionen untersucht werden. Der durch die aeroben autochthonen Mikroorganismen erfolgte deutlich geringere Abbau von TNT in der Kontrolle wird mit dem effektiven aeroben Abbau unter Beteiligung von Pilz verglichen. Die Struktur der an der Festlegung der Metaboliten in den Bodenfraktionen beteiligten Bindungen wird mittels ^{15}N -NMR charakterisiert und deren Stabilität durch die ^{14}C -Analysen quantifiziert. Die bis zur Stufe der Aminonitrotoluole nachgewiesene Übereinstimmung der Stoffpfade der unterschiedlichen Markierungen (^{14}C - am aromatischen Ring; ^{15}N - substituierte Gruppe) muß weiterhin kontrolliert werden. Die chromatographische Analyse und Bilanzierung der extrahierbaren ^{14}C -Aktivität läßt den Schluß zu, daß bereits vor Einbindung in die Huminstoffmatrix noch unbekannt, zum Teil höhermolekulare Verbindungen entstehen (MW ca. 0,9 kDa, Ergebnisse noch nicht dargestellt). Für einen Anteil von 15-30 % der extrahierbaren Intermediate war eine Zuordnung zu bereits bekannten Metaboliten nicht möglich. Diese Verbindungen sollen isoliert und mittels LC-MS-Kopplung analysiert werden.

Für die mit dem Pilzverfahren immobilisierten Transformationsprodukte des TNT wird nicht mit einer signifikanten Freisetzung von toxisch wirkenden Aromaten mit substituierten Nitro- oder Aminogruppen aus den Huminstoffen durch physiko-chemische oder biologische Prozesse gerechnet. Diese in früheren Versuchen gewonnenen Befunde sollen für das Bodenmaterial aus den hier beschriebenen Experimenten überprüft werden. Die Strukturen von Metaboliten oder Molekülfragmenten, welche im Zuge des natürlichen Huminstoff-Turnovers freigesetzt werden, sollen darüber hinaus charakterisiert werden.

Sofern die Stabilität der gebundenen Rückstände im Rahmen dieses Projektes nachgewiesen werden kann, ergibt sich für mögliche Sanierungen mit dem Pilzverfahren eine Obergrenze der effektiv behandelbaren TNT-Kontamination von etwa 2 g/kg Boden TS. Allerdings ergeben sich bei diesem Verfahren auch keine drastischen Erhöhungen der Temperatur in den Mieten und es werden keine speziellen Zuschlagstoffe untergemischt, welche die reale Kontamination in größerem Umfang verdünnt.

6 Formel und Abkürzungen

^{14}C -TNT	uniform- ^{14}C ringmarkiertes 2,4,6-Trinitrotoluol
^{15}N -NMR	^{15}N -Kernmagnetische Resonanzspektroskopie
^{15}N -TNT	2,4,6-Trinitro- $^{15}\text{N}_3$ -Toluol
2,4-DANT	2,4-Diamino-6-nitrotoluol
2,6-DANT	2,6-Diamino-4-nitrotoluol
2-ADNT	2-Amino-4,6-Dinitrotoluol
2-HADNT	2-Hydroxylamino-4,6-Dinitrotoluol

4-ADNT	4-Amino-2,6-Dinitrotoluol
4-HADNT	4-Hydroxylamino-2,6-Dinitrotoluol
Abb.	Abbildung
ADNT	Amino-Dinitrotoluole
DAD	Diodenarray-Detektor
DANT	Diamino-Nitrotoluole
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGME	Ethylenglykolmonomethylether (2-Methoxy-ethanol)
FG	Feuchtgewicht
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
KOH	Kaliumhydroxid (4 N für CO ₂ -Sorptions)
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektroskopie
LSC	Flüssigkeits-Szintillationszähler
MeOH	Methanol
MPN	Bestimmung der wahrscheinlichsten Zahl (Most Probable Number)
NaOH	Natronlauge (0,5 N für alkalische Bodenextraktion)
Tab.	Tabelle
TAT	2,4,6-Triaminotoluol
TNT	2,4,6-Trinitrotoluol
TS	Trockensubstanz
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/w	Masse pro Masse

7 Eigene Veröffentlichungen und Diplomarbeiten

Die aus vorhergehenden Untersuchungen zum aeroben Abbau von TNT durch Pilze und zur Festlegung von Schadstoffen im Boden entstandenen eigenen Veröffentlichungen sind im Literaturverzeichnis enthalten. (Referenzen: 38-40, 48-49, 62-66)

8 Literaturverzeichnis

1. **Achtnich, C., D. Peters, and H. Lenke.** 2000. Alternierender Anaerob-/Aerob-Prozeß: Analyse der Bindungsstrukturen von metabolisiertem und humifiziertem TNT im Boden. (TV 5.3.2); in diesem Leitfaden.
2. **Alef, K.** 1991. Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie: Aktivitäten, Biomasse, Differenzierung: 44-57. ecomed, Landsberg / Lech.
3. **Alvarez, M. A., C. L. Kitts, J. L. Botsford, and P. J. Unkefer.** 1995. *Pseudomonas aeruginosa* strain MA01 aerobically metabolizes the aminodinitrotoluenes produced by 2,4,6-trinitrotoluene nitro group reduction. *Can. J. Microbiol.* 41: 984-991.
4. **Aust, S. D.** 1995. Mechanisms of degradation by white rot fungi. *Environ Health Perspect.* 103 Suppl 5: 59-61.
5. **Aust, S. D., H. Tuisel, C.-W. Chang, and J. A. Bumpus (ed.).** 1990. Oxidation of environmental pollutants by lignin peroxidase from white rot fungi:453-464. Academic Press, New York.
6. **Banholzer, A., D. Bruns-Nagel, E. v. Löw, J. Fründt, and D. Gemsa.** 2000. Dynamisches Beetverfahren: Analyse der Bindungsstruktur nicht-extrahierbarer TNT-Transformations-Produkte. (TV 5.3.1); in diesem Leitfaden.
7. **Blondeau, R.** 1989. Biodegradation of natural and synthetic humic acids by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1282-1285.
8. **Bollag, J. M., C. J. Myers, and R. D. Minard.** 1992. Biological and chemical interactions of pesticides with soil organic matter. *The Science of the Total Environment.* 123/124: 205-217.
9. **Bollag, J.-M., and M. J. Loll.** 1983. Incorporation of xenobiotics into soil humus. *Experientia.* 39: 1221-1231.
10. **Boominathan, K., and A. Reddy (ed.).** 1992. Fungal degradation of lignin: biotechnological applications, 4.: Fungal biotechnology:763-822. Marcel Dekker, Inc., New York.
11. **Boopathy, R., C. F. Kulpa, and M. Wilson.** 1993. Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Desulfovibrio* sp. (B. strain). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 39: 270-275.
12. **Boopathy, R., and J. F. Manning.** 1996. Characterization of partial anaerobic metabolic pathway for 2,4,6-trinitrotoluene degradation by a sulfate-reducing bacterial consortium. *Can. J. Microbiol.* 42: 1203-1208.
13. **Bourbonnais, R., M. G. Paice, I. D. Reid, P. Lanthier, and M. Yaguchi.** 1995. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Appl Environ Microbiol.* 61(5): 1876-80.
14. **Breitung, J., D. Bruns-Nagel, K. Steinbach, L. Kaminski, D. Gemsa, and E. v. Löw.** 1996. Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soils by two different aerated compost systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 795-800.

15. **Breitung, J., D. Bruns-Nagel, E. v. Löw, K. Steinbach, L. Kaminski, R. Haas, and D. Gemsa.** 1995. Mikrobielle Sanierung von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) kontaminierten Böden. UWSF-Z. Umweltchem. Ökotox. 7(4): 195-200.
16. **Bruns-Nagel, D.** 1998. persönliche Mitteilung.
17. **Bruns-Nagel, D.** 1997. Dissertation. Carl-von-Ossietzky-Universität, Oldenburg.
18. **Bruns-Nagel, D., J. Breitung, K. Steinbach, D. Gemsa, K.-H. Blotevogel, and E. v. Löw.** 1995. Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau sprengstoffspezifischer Nitroaromaten in aeroben Bodenperkulationsanlagen. gwf-Wasser/ Abwasser. 137: 192-198.
19. **Bruns-Nagel, D., J. Breitung, E. v. Löw, K. Steinbach, T. Gorontzy, M. Kahl, K.-H. Blotevogel, and D. Gemsa.** 1996. Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in aerobic soil columns. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2651-2656.
20. **Bruns-Nagel, D., O. Drzyzga, K. Steinbach, T. Schmidt, E. v. Löw, T. Gorontzy, K.-H. Blotevogel, and D. Gemsa.** 1998. Anaerobic/aerobic composting of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soil in a reactor system. Environ. Sci. Technol. 32: 1676-1679.
21. **Bruns-Nagel, D., H. Knicker, O. Dryzga, B. Casper, K. Steinbach, and E. v. Löw.** 1998. Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen. Tagungsband zum Statusseminar des BMBF-Verbundvorhabens "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", 22. und 23.09.1998, Bremen: F1-14
22. **Bumpus, J. A., and M. Tatarko.** 1994. Biodegradation of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium* : Identification of initial degradation products and the discovery of a TNT-metabolite that inhibits lignin peroxidase. Current Microbiol. 28: 185-196.
23. **Bumpus, J. A., M. Tien, D. Wright, and S. D. Aust.** 1985. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. Science. 228(4706): 1434-6.
24. **Dari, K., M. Bechet, and R. Blondeau.** 1995. Isolation of Streptomyces strains capable of degrading humic acids and analysis of their peroxidase activity. FEMS Microbiol. Ecol. 16: 115-122.
25. **Daun, G., H. Lenke, F. Desiere, H. Stolpmann, J. Warrelmann, M. Reuss, and H.-J. Knackmuss.** 1995. Biological treatment of TNT-contaminated soil by a two stage anaerobic/aerobic process. In W. J. van den Brink, R. Bosman, and F. Ahrend (ed.), Contaminated soil '95.: Kluwer Academic Publishers, The Hague, Netherlands.
26. **Daun, G., H. Lenke, M. Reuss, and H.-J. Knackmuss.** 1998. Biological Treatment of TNT-Contaminated Soil. 1. Anaerobic Cometabolic Reduction and Interaction of TNT and Metabolites with Soil Components. Environ. Sci. Technol. 32(13): 1956-1963.
27. **Dawel, G., M. Kästner, J. Michels, W. Poppitz, W. Günther, and W. Fritsche.** 1997. Structure of a Laccase-Mediated Product of Coupling of 2,4-Diamino-6-Nitrotoluene to Guaiacol, a Model for Coupling of 2,4,6-Trinitrotoluene Metabolites to a Humic Organic Soil Matrix. Appl. Environ. Microbiol. 63(7): 2560-2565.

28. **Dehorter, B., and R. Blondeau.** 1992. Extracellular enzyme activities during humic acid degradation by the white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. FEMS Microbiol. Lett. 94: 209-216.
29. **Drzyzga, O., D. Bruns-Nagel, T. Gorontzy, K.-H. Blotevogel, D. Gemsa, and E. v. Löw.** 1998. Incorporation of ¹⁴C-labeled 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) metabolites into different soil fractions after anaerobic and anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures. Environ. Sci. Technol. 32(22): 3529-3535.
30. **Fernando, T., J. A. Bumpus, and S. D. Aust.** 1990. Biodegradation of TNT (2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1666-1671.
31. **Field, J. A., E. de Jong, G. F. Costa, and J. A. M. deBont.** 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. Trends in Biotechnology. 11: 44-49.
32. **Fiorella, P. D., and J. C. Spain.** 1997. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS52. Appl. Environ. Microbiol. 63: 2007-2015.
33. **Gilcrease, P. C., and V. G. Murphy.** 1995. Bioconversion of 2,4-diamion-6-nitrotoluene to a novel metabolite under anoxic and aerobic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 61: 409-4214.
34. **Haemmerli, S. D., M. S. Leisola, D. Sanglard, and A. Fiechter.** 1986. Oxidation of benzo(a)pyrene by extracellular ligninases of *Phanerochaete chrysosporium*. Veratryl alcohol and stability of ligninase. J Biol Chem. 261(15): 6900-3.
35. **Haider, K.** 1996. Biochemie des Bodens: 65-101. Enke-Verlag, Stuttgart,.
36. **Haider, K. M., and J. P. Martin.** 1988. Mineralization of ¹⁴C-labelled humic-acids and of humic-acid bound ¹⁴C-xenobiotics by *Phanerochaete chrysosporium*. Soil. Biol. Biochem. 4: 425-429.
37. **Hammel, K. E. (ed.).** 1995. Organopollutant degradation by ligninolytic fungi, Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology:331-346. Wiley-Liss Inc., New York.
38. **Herre, A., J. Michels, K. Scheibner, and W. Fritsche.** 1997. Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) contaminated soil by a litter decaying fungus. Preprints of the fourth international *in situ* and *on-site* bioremediation symposium., April 28-May 1, 1997; New Orleans: 493-498
39. **Herre, A., K. Scheibner, and W. Fritsche.** 1997. "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten" Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen, 26.-27.2.1997, Berlin: K1-27
40. **Herre, A., K. Scheibner, M. Kästner, and W. Fritsche.** 1998. "Biologische Verfahren zur Bodensanierung" Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen, 22. und 23.09.1998, Bremen: G1-17
41. **Hofrichter, M., and W. Fritsche.** 1997. Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems. III: In vitro depolymerization of coal humic acids by a crude preparation of manganese peroxidase of the white-rot fungus *Nematoloma frowardii* b19. Appl Microbiol Biotechnol. 47(5): 566-571.

42. **Hofrichter, M., K. Scheibner, I. Schneegaß, and W. Fritsche.** 1998. Enzymatic Combustion of Aromatic and Aliphatic Compounds by Manganese Peroxidase from *Nematoloma frowardii*. Appl. Environ. Microbiol. 64(2): 399-404.
43. **Hofrichter, M., K. Scheibner, I. Schneegaß, D. Ziegenhagen, and W. Fritsche.** 1998. Mineralization of synthetic humic substances by manganese peroxidase from the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*. Appl Microbiol Biotechnol. 49(5): 584-588.
44. **Hofrichter, M., T. Vares, M. Kalsi, S. Galkin, K. Scheibner, W. Fritsche, and A. Hatakka.** 1999. Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ¹⁴C-labelled lignin (¹⁴C-DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus *Nematoloma frowardii*. Appl Environ Microbiol. 65(5): 1864-70.
45. **Hofstetter, T. B., C. G. Heijman, S. B. Haderlein, C. Holliger, and R. P. Schwarzenbach.** 1999. Complete Reduction of TNT and Other (Poly)nitroaromatic Compounds under Iron-Reducing Subsurface Conditions. Environ. Sci. Technol. 33(9): 1479-1487.
46. **Hsu, T. S., and R. Bartha.** 1976. Hydrolysable and Nonhydrolysable 3,4-Dichloroaniline Humus Complexes and their Respective Rate of Biodegradation. J. Agric. Food Chem. 24: 118-122.
47. **Hurst, H. M., A. Burges, and P. Latter.** 1962. Some aspects of the biochemistry of humic acid decomposition by fungi. Phytochemistry. 1: 227-231.
48. **Kästner, M.** 1998. Habilitationsschrift. Friedrich-Schiller-Universität Jena, Jena.
49. **Kästner, M., S. Streibich, H. H. Richnow, W. Michaelis, and W. Fritsche.** 1997. Bildung und Schicksal von gebundenen Rückständen aus Umweltschadstoffen im Boden, B1-41, "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten" Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen, Berichte zum 3. Statusseminar des Verbundprojektes: B1-41, BMBF, PT AWAS im Umweltbundesamt, 26.-27.2.1997, Berlin.
50. **Khan, T. A., R. Bhadra, and J. Hughes.** 1997. Anaerobic transformation of 2,4,6-TNT and related nitro-aromatic compounds by *Clostridium acetobutylicum*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 18: 198-203.
51. **Knicker, H., D. Bruns-Nagel, O. Drzyzga, E. v. Löw, and K. Steinbach.** 1999. Characterization of ¹⁵N-TNT Residues After an Anaerobic/Aerobic Treatment of Soil/Molasses Mixtures by Solid-State ¹⁵N-NMR Spectroscopy. 1. Determination and Optimization of Relevant NMR Spectroscopic Parameters. Environ. Sci. Technol. 33(2): 343-349.
52. **Kontchou, C. Y., and R. Blondeau.** 1992. Biodegradation of soil humic acids by *Streptomyces viridosporus*. Can. J. Microbiol. 38: 203-208.
53. **Kördel, W., and K. Hund.** 1998. Statusseminar zum BMBF- Forschungsverbund , "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", Tagungsband, Clausthal-Zellerfeld: 129
54. **Lewis, T. A., S. Goszczynski, R. L. Crawford, R. A. Korus, and W. Admassu.** 1996. Products of anaerobic 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) transformation by *Clostridium bifermentans*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4669-4674.

55. **Li, A. Z., K. A. Marx, J. Walker, and D. L. Kaplan.** 1997. Trinitrotoluene and metabolites binding to humic acid. *Environ. Sci. Technol.* 31: 584-589.
56. **McCormick, N. G., F. E. Feeherry, and H. S. Levinson.** 1976. Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 949-958.
57. **Michels, J.** 1993. Dissertation. Cuvillier Verlag, Göttingen, Göttingen.
58. **Michels, J., and G. Gottschalk.** 1994. Inhibition of the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* by hydroxylaminodinitrotoluene, an early intermediate in the degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 187-194.
59. **Preuss, A., J. Fimpel, and G. Diekert.** 1993. Anaerobic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Arch. Microbiol.* 159: 345-353.
60. **Ralph, J. P., and D. E. A. Catecheside.** 1994. Decolourisation and depolymerisation of solubilised low-rank coal by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 536-542.
61. **Rieger, P. G., and H.-J. Knackmuss.** 1995. Basic knowledge and perspectives on biodegradation of 2,4,6-Trinitrotoluene and related nitroaromatic compounds in contaminated soil, 1-18. *In* J. C. e. Spain (ed.), *Biodegradation of nitroaromatic compounds: 1-18*, Plenum Press, New York., New York, London.
62. **Scheibner, K., A. Herre, and W. Fritsche.** 1999. Bioremediation von TNT-belasteten Böden: Metabolisierung, Mineralisierung und Humifizierung. Friedrich-Schiller-Universität, Institut für Mikrobiologie, LS Angew. und Ökolog. Mikrobiologie.
63. **Scheibner, K., and M. Hofrichter.** 1998. Conversion of aminonitrotoluenes by fungal manganese peroxidase. *J. Basic Microbiol.* 38: 63-71.
64. **Scheibner, K., M. Hofrichter, and W. Fritsche.** 1997. Mineralization of 2-amino-4,6-dinitrotoluene by manganese peroxidase of the white-rot fungus *Nematoloma frowardii*. *Biotechnol. Lett.* 19: 835-839.
65. **Scheibner, K., M. Hofrichter, A. Herre, J. Michels, and W. Fritsche.** 1997. Screening for fungi intensively mineralizing 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 452-457.
66. **Schlosser, D., R. Grey, C. Höfer, and K. Fahr.** 1998. Chapter 26: Degradation of chlorophenols by basidiomycetes, 393-408 *in press*. *In* D. L. Wise, D. J. Trantolo, H. I. Inyang, and E. J. Cichon (ed.), *Remediation of hazardous waste contaminated soils, 2nd Ed.:* 393-408 *in press*, Marcel Dekker, New York.
67. **Senesi, N. (ed.).** 1993. Organic pollutant migration in soils as affected by soil organic matter. Molecular and mechanistic aspects, NATO ASI Series:47-74. Springer Verlag, Berlin.
68. **Simmons, K. E., R. D. Minard, and J.-M. Bollag.** 1989. Oxidative Co-Oligomerisation of guajacol and 4-Chloroaniline. *Environ. Sci. Technol.* 23: 115-121.
69. **Simmons, K. E., R. D. Minard, and J.-M. Bollag.** 1988. Oxidative coupling and polymerization of guaiacol, a lignin derivate. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 52: 1356-1360.

70. **Spreinat, A.** 1998. Statusseminar zum BMBF- Forschungsverbund , "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", Tagungsband, Clausthal-Zellerfeld: 71-77
71. **Steelink, C.** 1994. Application of N-15 NMR spectroscopy to the study of organic nitrogen and humic substances in the soil. *In* N. Senesi and T. M. Miano (ed.), Humic substances in the global environment and implication on human health: Elsevier Science B. V.
72. **Tatsumi, K., A. Freyer, R. D. Minard, and J.-M. Bollag.** 1994. Enzyme-mediated coupling of 3,4-dichloroaniline and ferulic acid: a model for pollutant binding to humic materials. *Environ. Sci. Technol.* 28: 210-215.
73. **Thorn, K. A., P. J. Pettigrew, W. S. Goldenberg, and E. J. Weber.** 1996. Covalent binding of aniline to humic substances. 2. ¹⁵N-NMR studies on nucleophilic addition reactions. *Environ. Sci. Technol.* 30: 2764-2774.
74. **Thorne, P. G., and D. C. Leggett.** 1997. Hydrolytic release of bound residues from composted soil contaminated with 2,4,6-Trinitrotoluene. *Environ. Tox. Chem.* 16: 1132-1134.
75. **Vanderberg, L. A., J. J. Perry, and P. J. Unkefer.** 1995. Catabolism of 2,4,6, trinitrotoluene by *Mycobacterium vaccae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 937- 945.
76. **Vorbeck, C., H. Lenke, P. Fischer, and H.-J. Knackmuss.** 1994. Identification of a hydride-Meisenheimer complex as a metabolite of 2,4,6- trinitrotoluene by a *Mycobacterium* strain. *J. Bacteriol.* 176: 932-934.
77. **Vorbeck, C., H. Lenke, P. Fischer, J. C. Spain, and H.-J. Knackmuss.** 1998. Initial reductive reactions in aerobic microbial metabolism of 2,4,6-Trinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 246-252.
78. **Weber, E. J., D. L. Spiddle, and K. A. Thorn.** 1996. Covalent binding of aniline to humic substances. 1. Kinetic studies. *Environ. Sci. Technol.* 30: 2755-2763.
79. **Weissmahr, K. W., S. B. Haderlein, and R. P. Schwarzenbach.** 1997. *In Situ* Spectroscopic Investigations of Adsorption Mechanisms of Nitroaromatic Compounds at Clay minerals. *Environ. Sci. Technol.* 31(1): 240-247.
80. **Weissmahr, K. W., S. B. Haderlein, and R. P. Schwarzenbach.** 1997. *In situ* spectroscopic investigations of adsorption mechanisms of nitroaromatic compounds at clay minerals. *Environ. Sci. Technol.* 31: 240-247.
81. **Youn, H. D., K. J. Kim, J. S. Maeng, Y. H. Han, I. B. Jeong, G. Jeong, S. O. Kang, and Y. C. Hah.** 1995. Single electron transfer by an extracellular laccase from the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Microbiology.* 141(Pt 2): 393-8.
82. **Ziechmann, W.** 1994. *Humic Substances*· Bi-Wiss.-Verl., Mannheim; Leipzig; Wien; Zürich.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.5 Verbundvorhaben 6: Maßstabsgerechte Erprobung biologischer Verfahren mit Erfolgskontrolle auf dem Standort "Werk Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld in Niedersachsen

André Dahn

Jörg Uhde
Jelena Karutz
Jürgen Thieme

IABG mbH
Niederlassung Berlin
Straße der Pariser Kommune 38
10243 Berlin

Förderkennzeichen: 1451129/2

Laufzeit: 01.06.1997 – 30.09.2000

1 Zusammenfassung und Zielsetzung

1.1 Ziele des Forschungsvorhabens

Im Rahmen des BMBF-Förderprogramms "Biologische Verfahren zur Bodensanierung" wurden im Verbundvorhaben 6 am Beispiel TNT-belasteter Böden die Fähigkeiten und Möglichkeiten in der Entwicklung befindlicher biologischer Bodenreinigungsverfahren untersucht.

Das Gesamtziel dieses Vorhabens war,

biologische Sanierungsverfahren zu erproben und in Form einer Erfolgskontrolle zu dokumentieren,

die Akzeptanz biologischer Sanierungsverfahren bei Behörden und in der Bevölkerung zu erhöhen und

die generelle Bereitschaft zum Einsatz biologischer Verfahren für die schonende Behandlung belasteter Böden zu fördern.

Es wurden drei auf verschiedenen Ansätzen beruhende biologische "on site"-Verfahren unter einheitlicher wissenschaftlicher Begleitung auf dem Standort Clausthal-Zellerfeld erprobt, optimiert und nach einheitlichen Kriterien bewertet. Die Bewertung erfolgte im Rahmen einer externen Erfolgskontrolle unter Verwendung einer standardisierten Dokumentations- und Berichtsform.

1.2 Struktur des Forschungsvorhabens

Das FuE-Vorhaben wurde als Verbundvorhaben 6 in vier Teilvorhaben gegliedert, die von verschiedenen Vorhabenspartnern wahrgenommen wurden. Aus dem Verbundvorhaben leiteten sich insgesamt sechs Teilaufgaben mit den entsprechenden Teilzielen ab.

Die koordinatorischen, wissenschaftlichen und Service-Leistungen der IABG waren Bestandteil des Verbundvorhabens 6, die Forschungsnehmer Plambeck ContraCon, Umweltschutz Nord und Wisstrans waren für die Durchführung der jeweiligen Verfahrenserprobung an verschiedenen Bodenmieten verantwortlich. Diese wurden als TV 6.1 - 6.3 definiert (Tab.1).

Tab. 1: Verbundvorhaben 6 "Maßstabsgerechte Erprobung biologischer Verfahren mit Erfolgskontrolle auf dem Standort "Werk Tanne"

Teilvorhaben (Kapitel*)	Titel	Durchführende Institution
6.0 (9.5)	Gesamtkoordination, wissenschaftliche Begleitung und Erfolgskontrolle	IABG
6.1 (9.5.1)	Humifizierende Dekontamination sprengstoffbelasteter Böden in einem Anaerob/Aerob-Verfahren	Umweltschutz Nord
6.2 (9.5.2)	Irreversible Transformation und Immobilisierung von TNT zur Detoxifizierung kontaminierter Böden; Dynamisches Beetverfahren	Plambeck ContraCon
6.3 (9.5.3)	Einstufiges Mietenverfahren für den biologischen Abbau von Amino- und Nitroaromaten mit Hilfe von Pilzen	Wisstrans Umwelt

*Kapitelnummer in diesem Leitfaden

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

Siehe die Ausführungen zum Verbundvorhaben 3, Kapitel 9.2 des Leitfadens.

3 Leistungsdarstellung und Ergebnisse

3.1 Teilvorhaben 6: Standortkoordination, wissenschaftliche Begleitung, Erfolgskontrolle

Entsprechend der Zielsetzung des Verbundvorhaben 6 wurden drei biologische Sanierungsverfahren unter einheitlichen Bedingungen großtechnisch, praxisorientiert mit gleichzeitiger Prozeßoptimierung erprobt und im Rahmen einer externen Erfolgskontrolle bewertet.

Die übergreifenden Leistungen der IABG im Teilvorhaben 6 wurden in drei Teilaufgaben untergliedert. Die Leistungen umfaßten:

- das Management und Controlling,
- die wissenschaftliche Begleitung mit Erfolgskontrolle und
- die logistischen Service-Leistungen.

3.2 Management-Leistungen des Gesamtvorhabens

Die Management-Leistungen bezogen sich zum einen auf Tätigkeiten zur organisatorischen und konzeptionellen Vorbereitung und Durchführung des Vorhabens und zum anderen auf die wissenschaftlichen, verfahrensbegleitenden Kontrollaufgaben.

Das Informationsmanagement als zentrale Aufgabe während der gesamten Laufzeit des Vorhabens beinhaltete die sach- und fachgerechte Information aller Vorhabensbeteiligten und die Öffentlichkeitsarbeit.

Die Einhaltung der gesetzten Qualitätsstandards während der Verfahrenserprobung wurde durch eine einheitliche Handhabung der Dokumentation einzelner Abläufe geregelt.

Im einzelnen wurden folgende Arbeiten bzw. Maßnahmen im Rahmen der Teilaufgabe "Management-Leistungen" realisiert.

Genehmigungen:

- Koordination der vorhabensübergreifenden und standortspezifischen Aktivitäten zu den Genehmigungen der Versuchsanlagen / Behördenmanagement (z.B. Auflagen bzgl. Kampfmittelfreiheit, Immissionsschutz / vor Ort-Begehungen und Besprechungen mit dem Gesundheitsamt Goslar am 12.05. und 25.09.98);
- Klärung genehmigungsrechtlicher Sachverhalte für die vorbereitenden zentralen Baumaßnahmen im Versuchsbereich sowie für die Auskofferung des zu behandelnden Bodens;

- Abstimmung über die Auslagerungsbedingungen / Flächenfestlegung für die behandelten Mieten mit den zuständigen Behörden;

Arbeitsschutz:

- Koordination der Arbeitsschutzbelange für den Betrieb der Versuchsanlagen (Besprechungen/Abstimmungen mit den Verfahrenserprobern über die erforderlichen Arbeitsschutzmaßnahmen, Prüfung der Arbeits- und Sicherheitspläne sowie der zugehörigen Betriebsanweisungen, Besprechung und Abstimmung der A+S-Pläne und BA mit TBG München und TBG Hannover);
- Überwachung und Koordination des Arbeitsschutzes gem. ZH 1/183 – neu BGR 128 (u.a. Kontrollen der Einhaltung der festgelegten AS-Maßnahmen, Durchführung von Raumluftmessungen mit PID).

Vertragswesen:

- Erarbeitung und Abschluß eines Koordinations- und eines Zusammenarbeitsvertrages zwischen der IABG und den Verfahrenserprobern zur Regelung insbesondere der Zuständigkeiten bei der Projektkoordination, zu Veröffentlichungen/Geheimhaltungen und zu den zentralen Baumaßnahmen,
- Erarbeitung und Abschluß eines Vertrages zur Durchführung der wissenschaftlichen Begleitung (u.a. mit TU Berlin, IABG NL Leipzig, AUA, DMT, Ibacon, TBG),
- Erarbeitung und Abschluß eines Vertrages zur Durchführung der zentralen Baumaßnahmen auf dem Versuchsgelände und zur Auskofferung des zu behandelnden Bodens,
- Erarbeitung und Abschluß von Verträgen zur Stromversorgung des Versuchsgeländes und des Projektbüros mit den Stadtwerken Clausthal-Zellerfeld sowie zur Entsorgung des kontaminierten Abwassers aus der Reifenwaschanlage mit der IVG.
- Abstimmung der Mietverträge für den Versuchsbereich mit der Grundstückseigentümerin IVG und den Verfahrenserprobern sowie des Mietvertrages für das IABG-Projektbüro "Werk Tanne" mit der IVG;
- Prüfung der Rechnungen für Strom, Wasser, Abwasser, Miete für den Versuchsbereich und für die Bauleistungen zur Standplatzherrichtung, Weiterleitung an die Verfahrenserprober.

Qualitätssicherung / Berichtswesen:

- Verfeinerung der Vorgehensweise für die einheitliche Handhabung der Dokumentation der einzelnen Abläufe im VV 6;
- Vervollständigung und Anpassung der erarbeiteten Dokumentation und Übergabe der präzisierten Dokumentationsunterlagen an die Verfahrenserprober;
- Erstellung eines Zwischenberichtes für 1997 und 1998;
- Projektbegleitung Erprobungsphase
- Projektbegleitung vor Ort / Standortkoordination;
- Überwachung der Projektentwicklung sowie der Erfüllung festgelegter Leistungsparameter und Qualitätskriterien, Anpassung des Projektablaufes;

- Koordination von Immissionsmessungen als Auflage der Anlagenehmigungen im Mai/Juni '98;

Behördenmanagement / Informationsmanagement:

- ständige Information aller Vorhabensbeteiligten;
- Informationsaustausch mit anderen für VV 6 relevanten Verbundvorhaben (z.B. Arbeitsgespräche mit DECHEMA/VV 1, TU Berlin/VV 4, HS Bremen/VV 5);
- Vor- und Nachbereitungen von Beratungen des Projektbeirates (Projektbeiratssitzungen am 29.01.98, 23.04.98, 17.09.98, 25.02.99, 03.11.99).

Öffentlichkeitsarbeit:

- Vorbereitungen von Pressemitteilungen (z.B. Artikel in Goslarsche Zeitung vom 12.05.98, taz 08.08.98);
- Vorträge (z.B. beim Statusseminar im Mai '98 in Clausthal-Zellerfeld, im Rahmen der EXPO 2000 im Oktober '98 in Munster);
- Durchführung von Informationsveranstaltungen (z.B. für Gesundheitsamt Goslar sowie für Teilnehmer der "Robert-Koch-Tagung" in Clausthal-Zellerfeld am 25.09.98);
- Organisation des Tages der offenen Tür auf dem Versuchsgelände am 8. Mai '98;
- Vorbereitung und Koordination der Darstellung des VV 6 im Rahmen des Statusseminars im Mai '98 und in Mai '00;
- Vorbereitung und Koordination der Eröffnungsveranstaltung des VV 6 am 06. Mai '98;
- Teilnahme an den Statusseminaren der Verbundvorhaben 4 und 5 (September'99/Berlin und Februar '00/Bremen) und Vorträge über die Ergebnisse des Verbundvorhabens 6;
- Teilnahme (mit Vorträgen) an diversen wissenschaftlichen Fachtagungen;
- Standortbegehungen mit Interessierten (z.B. für ArGe focon-Probiotec und Vertretern des US-Army Corps am 11.08.98, für TU-Clausthal am 20.09.98).

3.3 Wissenschaftliche Begleitung, Erfolgskontrolle

Die wesentliche Voraussetzung für die Erfolgskontrolle bestand in der Schaffung gleicher bzw. vergleichbarer Rahmenbedingungen für die Verfahrenserprobung.

Folgende Kriterien wurden dazu festgelegt und am Standort "Werk Tanne" umgesetzt:

- vergleichbares Bodenmaterial,
- vergleichbare Belastungen,
- vergleichbare Analytik und einheitliche Dokumentation,
- vergleichbare Kontrollböden,
- vergleichbare Standortbedingungen.

Im Rahmen der Erfolgskontrolle wurden für die Absicherung einer allseitigen Bewertung der behandelten Bodenmaterialien und für die Kontrolle der Effektivität der eingesetzten

Verfahren chemisch-analytische, ökotoxikologische und humantoxikologische Untersuchungen durchgeführt.

Als eine weitere Voraussetzung für eine zuverlässige Erfolgskontrolle der Verfahrenserprobung galt:

- die exakte Charakterisierung des Ausgangsmaterials und des Endproduktes hinsichtlich des zur Verfahrenserprobung relevanten und mit dem NLÖ abgestimmten Schadstoffinventares sowie
- die Vergleichbarkeit der Analysenergebnisse zwischen den Vorhabenspartnern untereinander sowie mit den Ergebnissen des mit der externen Kontrolle beauftragten Labors sicherzustellen.

Die über chemische Analytik nachgewiesene Schadstoffreduzierung sowie die Ergebnisse aus toxikologischen Tests zwischen

- dem Ausgangsmaterial (Sektionen) und
- dem Bodenmaterial nach der biologischen Behandlung

bildeten die Grundlage für die Erfolgsbewertung der Verfahrenserprobung, die ausschließlich durch die externe Erfolgskontrolle durchgeführt wurde.

Im Kapitel 7.2 dieses Leitfadens ist eine Zusammenfassung der komplexen Untersuchungen dargestellt, die entsprechend dem Konzept für die wissenschaftliche Begleitung während der Verfahrenserprobung an dem Bodenmaterial erfolgten.

Die Erprobung der Verfahren sah für jede der beteiligten Firmen mehrere zeitlich nacheinander zu behandelnden Chargen (Mieten) vor, die zu Beginn, während und zum Ende der jeweiligen Behandlungsdauer beprobt und untersucht wurden.

Folgender Aufteilung des Bodenmaterials wurde mit den Verfahrenserprober vereinbart:

- Umweltschutz Nord erhielt 210 t Bodenmaterial, welches für die Errichtung von drei Mieten verwendet wurde.
- Plambeck ContraCon erhielt 140 t Bodenmaterial für zwei Mieten.
- WISSTRANS erhielt 210 t Bodenmaterial für drei Biobeete mit je 70 t.

Der Ablauf der Verfahrenserprobung in den jeweiligen Mieten setzte sich aus folgenden Arbeitsschritten zusammen:

- Startmiete, d.h. Vermengung des Bodenmaterials mit den jeweils technologisch bedingten Zusätzen, die in einer Halle bzw. in einem Zelt erfolgte,
- Behandlung der Miete, i.d.R. bis ca. 12 oder 24 Wochen, wenn die technologisch erreichbaren Mindestkonzentrationen an sprengstofftypischen Verbindungen nachgewiesen wurden,
- Auslagerung der Miete auf die Freifläche zum "Nachreifen" ca. 4-6 Wochen sowie
- Rückbau des Endproduktes auf dem Standort.

Eine technologisch bedingte Abweichung von diesem Ablauf betrifft die Mieten der Fa. WISSTRANS, bei den vor Auslagerung auf die Freifläche noch eine Nachreifung außerhalb der

Halle auf einer versiegelten Fläche mit Auffang und Reinigung des Sickerwassers erfolgt. Bei den Verfahren der Firmen U-Nord und Plambeck ContraCon fiel kein Sickerwasser an.

Die wesentlichsten Ergebnisse der Verfahrenserprobung erlauben folgende Aussagen:

- Im Rahmen der Erfolgskontrolle wurden bei der Verfahrenserprobung frühere positive Abbauergebnisse der eingesetzten Verfahren bestätigt, die Konzentrationen von sprengstofftypischen Verbindungen (TNT) in den behandelten Bodenmaterialien betragen vor Auslagerung je nach Verfahren zwischen 0 und ca. 60 mg/kg TS.
- Vollständige TNT-Umwandlung wurde in relativ kurzer Reaktionszeit erreicht.
- Das Parameterspektrum in der Nitroaromaten-Analytik konnte während der Erfolgskontrolle der Folgemieten eingegrenzt werden (kein MNT, DNT und Hexogen).
- TNBS und DNABS waren als einzige polare Verbindungen im Ausgangsmaterial gemessen und nach biologischer Behandlung in der Miete nicht mehr nachweisbar.
- Eine Vereinheitlichung der Eluataufbereitung für die aquatischen Tests ist von wesentlicher Bedeutung für die Ergebnisbewertung.

In Abstimmung mit der Bezirksregierung Braunschweig erfolgte die Auslagerung des behandelten Bodenmaterials der Mieten. Seitens der Bezirksregierung Braunschweig wurden folgende Anforderungen für die Zustimmung der Bodenmaterialauslagerung vorgegeben:

1. "Zustimmung zur Bodenmaterialauslagerung sofern keine Verschlechterung des Bodenausgangsmaterials nach der Behandlung hinsichtlich des Schadstoffgehaltes und des Eluatverhaltens festgestellt wird".
2. Parameteranforderungen nach Tabelle 1

Tab. 1: Parameteranforderungen für die Zustimmung der Bodenmaterialauslagerung

Chemisch	Ökotoxikologisch
▪ STV	▪ Leuchtbakterientest
▪ Pol. NA	▪ AMES-Test
▪ PAK (Feststoff/Eluat)	
▪ Schwermetalle (Feststoff/Eluat)	
▪ Nährstoffgehalte (Feststoff/Eluat).	

Die Erarbeitung und Formulierung von Kriterien und Anforderungen an das Endprodukt aus der Bodenbehandlung hinsichtlich Rückverfüllung bzw. Verwertung erfolgt derzeit unter Hinzuziehung gesetzlicher Regelwerke im Rahmen eines Arbeitskreises, dem die Behördenvertreter und die Verfahrenserprober angehören. Für die Zustimmung zur Bodenrückverfüllung im Hinblick auf WHG wurde vereinbart, daß für die ökotoxikologische Beurteilung die aquatischen Tests – Leuchtbakterienluminiszenz-Test und AMES-Test

ausreichen. Zur Auswertung der vorliegenden Ergebnisse aus der Erfolgskontrolle werden derzeit noch zusätzliche Fragen diskutiert, die eine Optimierung der Erfolgsbewertung ermöglichen sollen:

- Weitergehende chemische Untersuchungen zur Beurteilung des aeroben Abbaus von TNT-belastetem Bodenmaterials (Bodenmiete Wisstrans),
- ggf. weitere chemische Untersuchungen zur Überprüfung von Vereinfachungsmöglichkeiten in der Analytik,
- Einsatz weiterer terrestrischer Tests zur ökotoxikologischen Bewertung des Endproduktes,
- Ergänzung des akuten Regenwurmtests durch den Regenwurm-Reproduktions-Test,
- Einsatz von Algentests,
- Untersuchung von Bodenmaterialien mit unterschiedlichen boden-physikalischen Charakteristika erweitert die Aussagefähigkeit der Verfahrensbewertung,
- Ergänzung des Kriterienkatalogs zur Beurteilung der biologischen Behandlung.

1.4 Service-Leistungen

Zur Realisierung des Forschungsvorhabens waren vor Inbetriebnahme und nach Betriebs-einstellung der Forschungsanlagen bauliche Maßnahmen erforderlich. Die Schwerpunkte der Baumaßnahmen lagen in der Herrichtung der Standplätze und der Schaffung der Infrastruktur sowie in der Auskofferung, Bereitstellung und der Vorbereitung des zu behandelnden Bodens. Nach Außerbetriebnahme der Forschungsanlagen erfolgten Rückbaumaßnahmen.

Die Bauleistungen für die zentralen, d.h. von allen Verfahrenserprobern nutzbaren, Einrichtungen im Versuchsbereich sowie der Bodenaushub wurden zentral für alle am Standort beteiligten Verfahrenserprober von der IABG geplant und koordiniert. Für das Aufstellen der Versuchsanlagen waren die Verfahrenserprober selbst verantwortlich.

Folgende wesentliche Arbeiten im Hinblick auf die vorbereitenden Baumaßnahmen und den Rückbau wurden durch die IABG realisiert:

Standplatzherrichtung:

- Grundlagenermittlung (u.a. Standortauswahl des Versuchsbereiches) und Planung der erforderlichen Bauleistungen;
- Genehmigungsplanung und Abstimmung mit der Grundstückseigentümerin;
- Ausschreibung der Bauleistungen in 1997 und Erarbeiten von Vergabeempfehlungen, Vergabe in Abstimmung mit den Verfahrenserprobern und dem PT AWAS;
- folgende zentrale Baumaßnahmen wurden im wesentlichen an Unterauftragnehmer vergeben: Herrichtung der Anlagenstandplätze und des Containerlagers, Elektro- und Klempnerarbeiten zur Strom- und Wasserversorgung des Versuchsbereiches, Errichtung der zentralen Arbeitsschutz-Einrichtungen (S/W-Container, Reifenwaschanlage etc.);
- Konkretisierung und ggf. Modifizierung der ausgeschriebenen Bauleistungen (vor Ort-Begehungen mit den ausführenden Baufirmen);

- Bauüberwachung während der Durchführung der Baumaßnahmen im März/April '98 (Leistungs- und Terminkontrolle);
- Bauabnahme und Organisation der Mängelbeseitigung im Mai '98;
- Kostenkontrolle / Rechnungsprüfung der abgenommenen Bauleistungen.

Auskoffering:

- Grundlagenermittlung (u.a. Feststellung der Beschaffenheit und Schadstoffbelastung des zu behandelnden Bodens, Bodenvorbereitung);
- Auswahl der auszukoffernden Bereiche (Datenrecherche und Beprobung);
- Planung der erforderlichen Baumaßnahmen in 1997;
- Genehmigungsplanung und Abstimmung mit der Grundstückseigentümerin;
- Ausschreibung der Bauleistungen, Erarbeitung von Vergabeempfehlungen zur Durchführung der Auskoffering des zu behandelnden Bodens, Vergabe in Abstimmung mit PT AWAS;
- Erarbeitung eines Arbeits- und Sicherheitsplanes für den Bodenaushub in Abstimmung mit TBG München und Hannover, Übergabe an die ausführende Baufirma, Prüfung und Abstimmung der von der Baufirma erstellten Betriebsanweisung, Kontrolle der Einhaltung der erforderlichen AS-Maßnahmen während der Bauausführung;
- Konkretisierung der ausgeschriebenen Bauleistungen, Modifizierung der Vorgehensweise bei der Auskoffering, insbesondere hinsichtlich der Homogenisierung des Bodens (vor Ort-Begehungen mit der ausführenden Baufirma);
- Durchführung der Auskoffering im Mai '98 (Auskoffering in 5 Bereichen des Werksgeländes, Transport zu zwei zentralen Siebbereichen, Sieben und Homogenisieren des Bodens, Transport zum zentralen Versuchsbereich, lagenweises Aufschichten/Homogenisieren in der Versuchsanlage von U-Nord);
- chemisch-analytische Begleitung der Auskoffering (kontinuierliche Beprobung und Kontrolle des Bodens mit dem "Tüpfel"-Schnelltest, mit dem MERCK®-DTECH-TNT-Schnelltest sowie Überprüfung einzelner Proben mittels der im Projektbüro installierten HPLC-Anlage);
- kontinuierliche Bauüberwachung während der Durchführung der Auskoffering im Mai '98, (Leistungs- und Terminkontrolle), Bauabnahme und Organisation der Mängelbeseitigung;
- Kostenkontrolle / Rechnungsprüfung der abgenommenen Bauleistungen.

Rückbau:

- Festlegung der erforderlichen Rückbaumaßnahmen in Abstimmung mit der Grundstückseigentümerin,
- Planung und Ausschreibung der Rückbauleistungen in 1999,
- Bauüberwachung und Bauabnahme,
- Übergabe der Fläche des rückgebauten Versuchsbereiches an die Grundstückeigentümerin.

4 Ausblick

Die Erfolgskontrolle der maßstabsgerechten Erprobung biologischer Sanierungsverfahren wurde an den Böden des Standortes "Werk Tanne" durchgeführt. Einen Erkenntnisgewinn mit der Verifizierung der gewonnenen Ergebnisse würde die Durchführung der Erfolgskontrolle nach gleichen Parametern und Kriterien bei der Wiederholung des Versuchs mit anderen Böden für zumindest ein der erprobten Verfahren bedeuten. Die Verfahrenserprobung an standortfremden Böden ermöglicht eine kritische Überprüfung der erforderlichen Tests und Untersuchungen hinsichtlich ihrer Aussagefähigkeit zur Erfolgsbewertung und führt somit zur weiteren Optimierung der Begleitung. Mit dem Ziel einer Standardisierung des wissenschaftlichen Begleitprogramms für die biologische Sanierungsverfahren, wird auch die Möglichkeit der behördlichen Zertifizierung von biologischen Verfahren in Betracht gezogen. Die zertifizierten Verfahren können dann bei vergleichbaren Böden und ermitteltem Schadstoffspektrum ohne wissenschaftlicher Begleitung bzw. mit einer "gekürzten" Begleitung kostenwirksam eingesetzt werden.

5 Abkürzungen

AS-Maßnahmen	Arbeitssicherheitsmaßnahmen
A+S-Pläne	Arbeits- und Sicherheitspläne
BA	Betriebsanweisungen
BGR 128	Berufsgenossenschaftliche Richtlinie
HPLC-DAD	High Pressure Liquid Chromatographie mit Diodenarraydetektion im UV-Bereich
NLÖ	Niedersächsisches Landesamt für Ökologie
PID	Photoionisationsdetektor
PT AWAS	Projektträger Abfallwirtschaft und Altlastensanierung des BMBF im Umweltbundesamt
pol. NA	polare Nitroaromaten
STV	sprengstofftypische Verbindungen
S/W-Container	schwarz-weiß Bereich am Zugang zu den Sanierungsanlagen
TBG	Tiefbauberufsgenossenschaft
TNT, (MNT, DNT)	Trinitrotoluen, (Mono-, Di-)
TNBS / DNABS	Trinitrobenzoesäure / Dinitroaminobenzoesäure
TS	Trockensubstanz
TV	Teilvorhaben
VV	Verbundvorhaben
WHG	Wasserhaushaltsgesetz
ZH 1/183	Regeln für Sicherheit und Gesundheitsschutz bei der Arbeit in kontaminierten Bereichen (neu siehe BGR 128).

6 Eigene Veröffentlichungen und Diplomarbeiten

Veröffentlichungen und Vorträge

Sur, S., Dahn, A., Fischer, M. - "Entwicklung eines mikrobiologischen Sanierungsverfahrens am Beispiel des ehemaligen Sprengstoffwerkes Tanne bei Clausthal-Zellerfeld". Endbericht der IABG zum Teilvorhaben 3.1/ Teilphase 1 im Verbundvorhaben 3 des BMBF-Forschungsverbundes "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten". 2/1997.

Dahn, A. - "Entwicklung eines mikrobiologischen Sanierungsverfahrens..."-Projektdarstellung, Forschungsforum 1997, Messegelände Leipzig, 1997, Vortrag.

Dahn, A. - "Kommunikation in vernetzten Projekten - Optimierung des Informationsaustausches durch eine einheitliche Dokumentationsstruktur" 4. Statusseminar Verbundvorhaben 3, "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten" 6. und 7. 05.98 in Clausthal-Zellerfeld, Vortrag und Veröffentlichung, Herausgeber: Umweltbundesamt, Fachgebiet III 3.6 PT AWAS, 1998.

Dahn, A. - "Maßstabsgerechte Erprobung..." EXPO 2000 Fachtagung in Munster, Vortrag, 1998.

Dahn, A. - "Ergebnisse aus der maßstabsgerechten Erprobung biologischer Verfahren zur Behandlung TNT-belasteter Böden" Terra Tech in Leipzig, 1999, Vortrag.

Köppler, J., Thieme, J., Fengler, S., Nießen, R., Dr. Sohr, J. : "Systematische Untersuchung eines Rüstungsaltslastverdachtsstandort"; Ein Praxisleitfaden; Umweltbundesamt, UBA-Texte, 37/99.

Dahn, A. - "Mikrobiologische Sanierung von Rüstungsaltslasten -Verfahren und Wege in die Praxis", Fachtagung "Biotechnologie im Umweltschutz" in Munster im Rahmen der Expo 2000, Veröffentlichung, Deutsche Bundesstiftung Umwelt, Erich Schmidt Verlag, 1999.

Dahn, A., Karutz, J., Thieme, J. - "Wissenschaftliches Begleitkonzept für eine Erfolgskontrolle großtechnischer Verfahren...", 12th General Environmental Technology Data Exchange Meeting 1999, Bundeamt f. Wehrtechnik und Beschaffung in Koblenz, 1999.

Dahn, A., Karutz, J., Thieme, J. – "Maßstabsgerechte Erprobung biologischer Verfahren - Ergebnisse aus dem wissenschaftlichen Begleitkonzept", SFB-Seminar "Altlasten" TU Hamburg Harburg, 1999, / Statusseminar des Verbundvorhabens 5 "Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen in Böden", Bremen, 2000, Vorträge.

Lauer, U., Dahn, A., Le Dren, - "Mikrobiologische Sanierung von Rüstungsaltslasten; Verfahren und Wege in die Praxis", Biotechnologie in Umwelttechnik; Bioremediation – Entwicklungsstand-Anwendungen-Perspektiven; Erich Schmidt Verlag, Herausgeber: Deutsche Bundesstiftung Umwelt, 1999, S. 213-223.

Diplomarbeiten

Hein. J.-H. - "Erarbeitung von Empfehlungen zur Anwendbarkeit biologischer Sanierungsverfahren auf 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) belastete Standorte mit unterschiedlichen Bodeneigenschaften", Universität Potsdam, Institut für Geoökologie, Diplomarbeit, 2000.

Brandt. B. – "Wirkung von TNT auf das Wachstum von *Avena sativa* (Hafer) und *Lepidium sativum* (Kresse) im Pflanzenwachstumshemmtest", TU Berlin, Institut für Landschaftsentwicklung, Diplomarbeit, 2000.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.5 Verbundvorhaben 6: Maßstabsgerechte Erprobung biologischer Verfahren mit Erfolgskontrolle auf dem Standort „Werk Tanne“ bei Clausthal-Zellerfeld in Niedersachsen

9.5.1 Humifizierende Dekontamination sprengstoffbelasteter Böden in einem Anaerob/Aerob-Verfahren (TV 6.1)

Ulrich Walter
Dieter Fischer

UMWELTSCHUTZ NORD GMBH & CO.
Industriepark 6
27767 Ganderkesee

Förderkennzeichen: 1451129/5

Laufzeit: 01.01. 1998 - 30.09.2000

1 Zusammenfassung / Zielsetzung

Biologische Verfahren zur Sanierung von Böden, die mit Mineralölkohlenwasserstoffen kontaminiert sind, gelten seit Jahren als praxiserprobt und sind als "Stand der Technik" in den USA, Deutschland, Kanada und den Niederlanden etabliert. In der Regel bedienen sich die Verfahren der sogenannten Mietentechnologie. UMWELTSCHUTZ NORD hat mit seinem TERRAFERM[®] - Verfahren bereits über 6 Millionen Tonnen MKW-belastete Böden erfolgreich saniert.

Für Sprengstoffe mit nitroaromatischen Verbindungen wie z.B. TNT, wie sie an vielen ehemaligen Rüstungsstandorten zu finden sind, wurde der biologische Abbau von Mono- und Dinitroverbindungen bzw. die irreversible Festlegung von reaktiven Zwischenprodukten in verschiedenen wissenschaftlichen Studien nachgewiesen.

Im Rahmen des BMBF-Forschungsvorhabens „Maßstabgerechte Erprobung von biologischen Verfahren mit Erfolgskontrolle auf dem Standort 'Werk Tanne' bei Clausthal-Zellerfeld“ wurde *on-site* eine Sanierung sprengstoffkontaminierter Böden in einem Maßstab, der die Übertragung auf eine großtechnische Sanierung von Rüstungsaltslasten ohne ein weiteres „upscaling“ zuläßt, erprobt. Das Forschungsprojekt wurde zu 50 % vom BMBF gefördert.

Die Erprobung sollte erstens zeigen, für welche Bereiche die Verfahren anwendbar sind, zweitens die Wirtschaftlichkeit der biologischen Verfahren nachweisen und drittens - in Verbindung mit einer zentralen Erfolgskontrolle - die Qualität der Verfahren in Bezug auf Prozeßführung und Endprodukt (d. h. den gereinigten Boden) ermitteln. Die gewonnenen Ergebnisse sollen in künftige Sanierungsvorhaben von Rüstungsaltsstandorten mit ähnlichen oder vergleichbaren Kontaminationsspektren wie am Standort Werk 'Tanne' eingehen, insbesondere in die Sanierung ehemaliger Sprengstoff-Produktionsstätten und Munitionsanstalten.

Das getestete Umweltschutz Nord-Verfahren basiert auf einem alternierenden Anaerob-Aerob Prozeß. Durch die Applikation leicht verwertbarer Co-Substrate erfolgt unter anaeroben Milieubedingungen die Nitroaromatenreduktion. Die Schaffung aerober Verhältnisse ermöglicht, daß die reaktiven Reduktionsprodukte irreversibel an und in die Humusmatrix eingebaut werden (vgl. Abb. 1).

Seit Mai 1998 hat UMWELTSCHUTZ NORD insgesamt 250 t Sprengstoff kontaminierten Boden behandelt. In allen vier Testreihen wurde eine Abreinigung auf Gehalte < 5 mg/kg TS (Summe Nitroaromaten) erreicht.

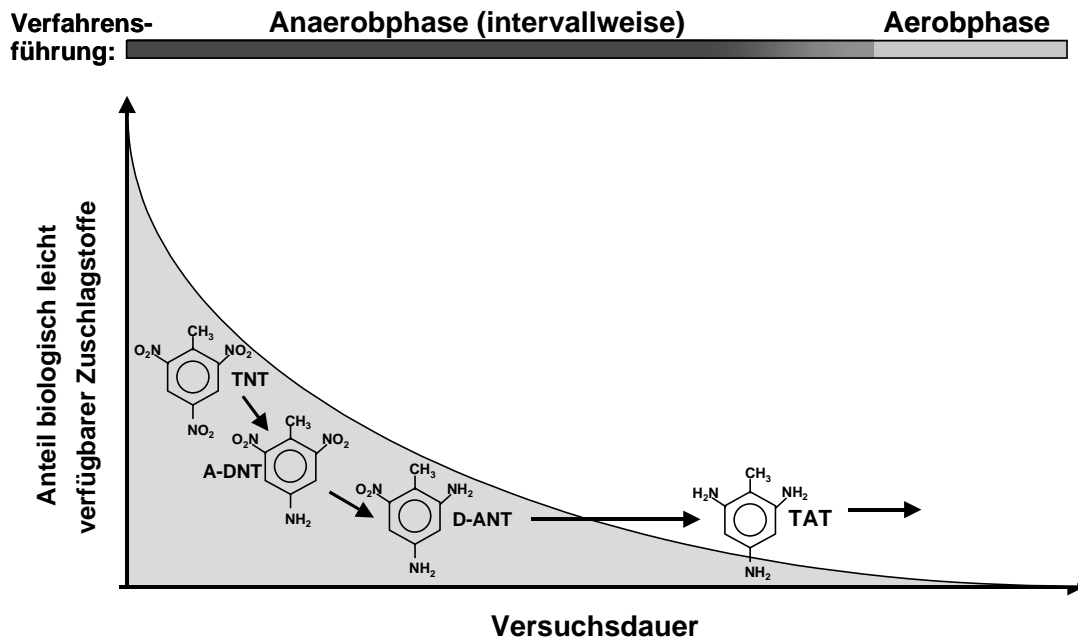


Abb. 1: Abbau von TNT – Darstellung des Humifizierungsprozesses

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

Basierend auf den Erkenntnissen aus der Literatur sind die grundlegenden Vorgänge des biologischen Dekontaminationsverfahrens eingehend untersucht worden [1; 5]. Die reduzierten Zwischenprodukte werden an Bodenbestandteile wie z. B. Tonminerale gebunden oder in Huminstoffen festgelegt. Dazu wurden eingehende Bindungs- und Strukturuntersuchungen durchgeführt. Der Kenntnisstand des Anaerob-Aerob-Verfahrens beruht u.a. auf Untersuchungen des Fraunhofer-Instituts für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik und der Fa. UMWELTSCHUTZ NORD sowie auf Untersuchungen der U.S. Army. Die eigenen Untersuchungen haben gezeigt, daß hohe Reinigungsleistungen erzielt werden können und im sanierten Boden keinerlei Resttoxizität nachzuweisen war [5].

Durch Simulationsexperimente mit radioaktiv-markiertem TNT konnte bestätigt werden, daß nach Ablauf des Verfahrens der überwiegende Teil der Radioaktivität irreversibel im Boden festgelegt und auch über einen längeren Zeitraum nicht ausgewaschen wird. Eine Fortsetzung der Elutionsexperimente über mehr als ein Jahr Versuchsdauer zeigt ebenfalls keine weitere Auswaschung der Radioaktivität (H. Lenke, pers. Mitteilung). Über den Labormaßstab hinaus wurde eine Variante des Verfahrens (Schlammverfahren) bereits erfolgreich im technischen Maßstab auf der Rüstungsaltpast Hessisch Lichtenau-Hirschhagen erprobt [10; 11].

Die am Standort 'Tanne' geplante Variante (Trockenverfahren) wurde in ähnlicher Form von BIOREMEDIATION SERVICE, INC., einem amerikanischen Partnerunternehmen von UMWELTSCHUTZ NORD, für grobkörnige Böden erfolgreich erprobt [2]. In einer Pilotsanierung mit Bodenmaterial vom Standort Leverkusen-Schlebusch konnten die Ergebnisse aus den USA von UMWELTSCHUTZ NORD bestätigt werden [12]. Am Standort Leverkusen handelte es sich -untypisch für viele Rüstungsaltpasten in Deutschland- um Böden mit geringem Feinkornanteil. Aus diesem Grund ist eins der wesentlichen Ziele im geplanten

Vorhaben, die Eignung des Verfahrens für weniger grobkörnige Böden, wie sie am Standort 'Tanne' und anderen Rüstungsaltlasten vorliegen, zu erproben. Somit kann dieses Verfahren einem weiten Anwendungsbereich zugänglich gemacht werden.

Die für das 'Werk Tanne' vorgeschlagene modifizierte Verfahrensvariante (Trockenverfahren) stellt hinsichtlich Handhabung und Wirtschaftlichkeit eine deutliche Verbesserung dar.

3 Verfahrensbeschreibung

Das grundlegende Verfahrensprinzip besteht darin, daß in einer ersten, anaeroben Stufe durch die Applikation leicht verwertbarer Substrate eine Reduktion sprengstofftypischer Verbindungen (STV) zu reaktiven Zwischenprodukten erfolgt, die sukzessive durch aerobe Verfahrensschritte in der Huminfraction des Bodens festgelegt werden. Die Nachbehandlung dient zum einen dem biologischen Abbau überschüssiger organischer Verbindungen, zum anderen der Förderung des Humifizierungsprozesses, so daß eine Konversion der Kontaminanten in naturverwandte, im Boden vorkommende Verbindungen (Huminstoffe) eintritt.

Ablauf der Bodenbearbeitung

Zur Einleitung der anaeroben Verfahrensstufe wird eine Bodencharge mit einer definierten Mischung leicht abbaubarer Substrate versetzt und zu einer Miete aufgeschichtet. Innerhalb von 1 - 2 Tagen erhöht sich durch biologische Aktivität die Mientemperatur auf über 40 °C. Ab diesem Zeitpunkt erfolgt eine intensive Bearbeitung und Homogenisierung des Boden/Substratgemisches mittels eines speziellen mobilen Mischgerätes. Hierzu wird der Boden mit einem Radlader aufgenommen und über einen Förderbunker einer schnell rotierenden Mischwalze zugeführt. Von dieser Walze wird der Boden hinter dem Gerät zu einer Miete aufgeschüttet (vgl. Abb. 2). Die gesamte Miete wird in einem 1 - bis 2-Tagerhythmus umgesetzt, um eine optimale Homogenisierung und einen vollständigen Aufschluß aller Bodenstrukturen zu erreichen [3; 6].

Nach ca. 3 Wochen nimmt mit dem Verbrauch der Substratanteile die Mientemperatur ab. Das Behandlungsintervall wird bis zum Behandlungsende nach insgesamt ca. 12 Wochen auf wöchentliches Wenden der Miete vergrößert.

Monitoring und Erfolgskontrolle

Um bereits während der Erprobungsphase eine Erfolgskontrolle zu haben und ggf. auf den Prozeß einwirken zu können, werden bei dem Verfahren Monitoringtests durchgeführt, die folgende Untersuchungen umfassen:

- physikalisch-chemische Prozeßparameter (Temperatur, pH, Dichte etc.)
- Nährstoffanalytik
- Analyse der Luft in der Behandlungsanlage (CO₂, CO, NO_x, NH₃ etc.)
- chemische Rückstandsanalytik der Sprengstoff typischen Verbindungen (STV) im Boden.

Neben dieser internen Erfolgskontrolle wird in Abstimmung mit dem Auftraggeber Probenmaterial zur Fremdüberwachung zur Verfügung gestellt.



Abb. 2: On site-Behandlung von TNT kontaminiertem Boden in einer mobilen Bodenreinigungsanlage

Arbeitssicherheit

Vor Betreten der Anlage wird zum Anlegen der persönlichen Schutzausrüstung der Schwarz/Weiß-Bereich durchlaufen.

Die Schutzausrüstung besteht aus folgenden Komponenten:

- atmungsaktiver Einmalschutzanzug
- Sicherheitsgummistiefel
- chemikalienundurchlässige Arbeitshandschuhe
- Atemschutzmaske bzw. Gebläse unterstützte Atemschutzhaube;
- ABEK-Filter am Mann

Die o.a. Ausrüstung stellt die *Schutzstufe 1* dar, die bei Kontrollgängen in der Anlage sowie bei Probenahmen an der Miete einzuhalten ist. Bei Bodenbewegungen in der Behandlungsanlage, die ein Freisetzen von Gefahrstoffen bewirken können (leichtflüchtige Schadstoffverbindungen) gilt die *Schutzstufe 2*. Sie beinhaltet zusätzlich das Tragen von Atemschutz (ABEK-Kombinationsfilter). Der Radlader hat in diesem Fall die Kabinenbelüftung über Aktivkohle einzuschalten.

Gasförmige Schadstoffemissionen: Zur Bewertung der Schadstoffemissionen werden während der Behandlung zu verschiedenen Zeitpunkten Messungen der Arbeitsplatzkonzentrationen der relevanten, chemischen Schadstoffe durchgeführt.

Der im Zelt betriebene Radlader besitzt zur Verminderung der Schadstoffemissionen einen Rußfilter. Alle typischen, vom Verbrennungsmotor erzeugten Schadstoffe (CO, NO_x, Ruß etc.) werden bei den Arbeitsplatzmessungen mit erfaßt.

Nitroaromatenanalytik

Zur Probenvorbereitung werden 25 g der homogenisierten und gegebenenfalls gesiebten Bodenprobe (sollte nur in Ausnahmefällen angewandt werden, da es dann zu erheblichen Minderbefunden bei den leichtflüchtigen Mono-Nitrotoluolen kommt) in ein 100 ml - Headspace-Vial eingewogen. Anschließend wird die Probe mit 50,0 ml Methanol versetzt und das Headspace-Vial mit einer passenden Septumkappe dicht verschlossen. Die Extraktion erfolgt mittels Ultraschall über 18 Stunden. Dabei ist das Ultraschallbad auf 20° C zu temperieren und lichtdicht zu verschließen um eine Beeinträchtigung der Probenkomponenten auszuschließen.

Nach dem Absetzen von Schwebstoffen werden 2 ml des klaren Probenüberstands durch ein 0,2 µm PTFE-Spritzenfilter in ein 2 ml - Vial filtriert und fest verschlossen. Die so aufbereitete Probe wird mittels HPLC analysiert:

Säule:	Macherey & Nagel ET 250/8/4 Nucleosil 120-5 C ₁₈
Theor. Bodenzahl:	min. 40000/m
Laufmittel:	Methanol/Wasser/Essigsäure 50,05 : 49,85 : 0,1
Flußrate:	1,0 ml/Minute
Injektionsmenge:	2 - 20 µl
Druck:	ca. 260 bar
Temperatur:	30° C
Detektor:	Diodenarray
Meßwellenlänge 1:	0 - 11,0 Minuten = 247 +/- 8 nm; Referenz 520 +/- 80 nm
Meßwellenlänge 2:	11,0 - 20,0 Minuten = 270 +/- 8 nm; Referenz 520 +/- 80 nm Die Umschaltzeit ist nicht fix und findet zwischen den Komponenten 2,4-Dinitrotoluol/2-Nitrotoluol statt.
Spektrum:	200 - 600 nm
Lampenspalt:	2 nm
Abtastrate:	1 Sekunde

4 Ergebnisse und Bewertung

Am 8.6.98 erfolgte planmäßig der Start der ersten von insgesamt vier Versuchschargen unter praxisnahen Bedingungen. Die Gesamtmenge des eingesetzten Nitroaromaten belasteten Bodens betrug 70 t. Der Boden wurde im Vorfeld der Versuche von dem Verbundkoordinator, der Fa. IABG, Industrieanlagen-Betriebsgesellschaft mbH, Niederlassung Berlin, auf dem Werksgelände ausgekoffert und bereits auf eine Korngröße von < 60 mm gesiebt (der Überkornanteil wurde direkt rückverfüllt), homogenisiert und in abgeplanten Transportwannen gelagert. Der Boden wurde im Behandlungszelt mit dem Substrat (bestehend aus mehreren, natürlichen, organischen Komponenten) intensiv vermischt. Insgesamt wurden im ersten Großversuch dem Boden 36 Gew.-% Substrat zugegeben.

Durch unser speziell auf die STV-Analytik eingerichtetes vor-Ort Labor wurden täglich die Schadstoffgehalte analysiert. Der Originalboden wies eine mittlere Nitroaromaten (NA)-Belastung von 1.126 mg/kg TS auf (vgl. Abb. 3). Die Startbelastung nach Zugabe des Substratgemischs lag bei 699 mg/kg TS. Die NA-Gehalte lagen innerhalb der ersten 14 Tage im Bereich der Nachweisgrenze (0,5 mg/kg TS). Am 14., 16. und 18. Versuchstag wiesen einzelne Mischproben erneute NA-Gehalte auf. In den Folgeuntersuchungen wurde bis zum Versuchsende (86. Tag) keine weiteren Kontaminationen mehr festgestellt [7; 8].

Ziel der weiteren Großversuche war es, durch die Reduktion des Substrateinsatzes eine unter ökonomischen Gesichtspunkten noch effizientere Verfahrensführung zu ermöglichen. So wurde der Substratanteil von 36 Gew.% auf 16 Gew.% - d.h. um mehr als 50 % - reduziert. Auch bei den Substrat reduzierten Tests konnten, mit vergleichbarer Schadstoffabbaukinetik, Endwerte von < 5 mg/kg TS Nitroaromaten erreicht werden [4; 9].

In der Regel wurden bei jeder Probenahme jeweils 4 Einzelproben analysiert. Es wurde innerhalb sehr kurzer Zeit eine optimale Homogenisierung und damit Nivellierung des Schadstoffgehaltes erreicht. Durch die eingesetzte Aufbereitungstechnologie wurden im Boden vorhandene Schadstoffaggregate, welche nur begrenzt über die Oberfläche einem biologischen Abbau zugänglich sind, mechanisch zerstört.

5 Übertragbarkeit / Anwendung

Durch die Wahl des Maßstabes sind für das Verfahren keine weiteren Entwicklungsschritte notwendig; vielmehr läßt sich die Technik direkt für die Sanierung von Rüstungsaltslasten einsetzen.

Das erprobte on site-Verfahren wurde so konzipiert, daß die Technologie direkt auf andere Rüstungsaltsstandorte übertragbar ist. Dies gilt insbesondere für ehemalige Sprengstoffproduktionsstätten in Deutschland, die hinsichtlich Kontaminationsgrad, -verteilung und -spektrum vergleichbar mit dem Standort 'Tanne' sind, d. h. es finden sich sowohl hochbelastete Bereiche (z. B. in der Umgebung ehemaliger Waschkäuser) als auch diffus belastete oberflächennahe Kontaminationen.

Die Praxiserfahrungen bei der maßstabsgerechten Erprobung und die begleitende Erfolgskontrolle machen den Ablauf und die Leistungsfähigkeit der Verfahren soweit transparent, daß behördliche Entscheidungen bei der künftigen Genehmigung derartiger

Sanierungsverfahren wesentlich erleichtert werden. Dies ist gerade deshalb von Bedeutung, weil es sich bei dem Forschungsvorhaben um neuartige Strategien in der biologischen Bodensanierung handelt, die eine hohe Akzeptanz erreichen sollen.

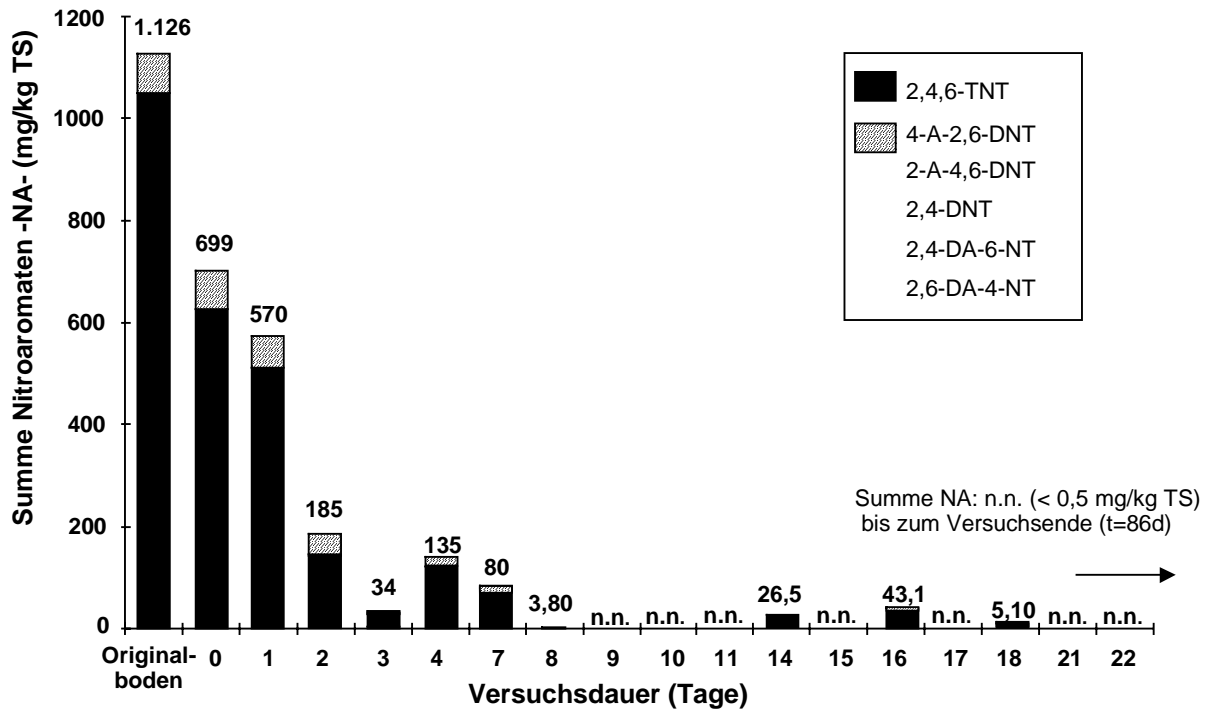


Abb. 3: Nitroaromatenabbau im großtechnischen Maßstab am Standort Clausthal-Zellerfeld

Großtechnische Behandlung Sprengstoff kontaminierter Böden

Allgemeine, anlagenbezogene Informationen

Umweltschutz Nord verfügt derzeit über mehr als 20 ortsfeste Bodenreinigungsanlagen in Deutschland. Durch das flächendeckende Netz an Bodenreinigungsanlagen besteht die Möglichkeit (Teil)-Mengen off site zu bearbeiten.

Alternativ kann auf dem zu sanierenden Gelände -on site- eine Bodenreinigungsanlage errichtet werden. Die Bearbeitung des Bodens erfolgt hierbei in Sanierungszelten, die nach Vorlage der erforderlichen Genehmigungen sehr kurzfristig aufgestellt werden können.

Behandelbare Materialien und Schadstoffe

Das Umweltschutz Nord Verfahren findet für eine breite Palette an organischen Schadstoffen Anwendung. Es ist geeignet für die Dekontamination von TNT, DNT, ADNT, DANT sowie Hexogen. Es wurde bislang nicht auf die Dekontamination von Hexyl, Nitropenta und Pikrinsäure getestet. Weiterhin eignet sich das Verfahren sowohl für Mineralöl belastete Böden als auch für Böden, die mit PAK, Phenolen, BTXE und sonstigen organischen Schadstoffen belastet sind. Bei Bedarf ist es erforderlich, die Konsistenz des Ausgangsmaterials zu verändern (z.B. Schlammkonditionierung, Klassifizierung, Sieben und Brechen von

Bauschutt). Eine Beeinträchtigung der Effektivität des Verfahrens durch solche Stoffe ist nicht gegeben. Fallspezifisch kann eine Entfernung derartiger Stoffe durch vorhandene Erdaufbereitungsanlagen erfolgen

Annahmegrenzen

Das Umweltschutz Nord Verfahren ist auch dadurch gekennzeichnet, daß ein sehr weites Spektrum an Böden verarbeitet werden kann. Anthropogene Verunreinigungen wie Bauschutt und andere bodenuntypische Störstoffe stellen kein Ausschlußkriterium dar. Für Überkorn > 80 mm sowie bei höheren Anteilen an Bauschutt ist einzelfallspezifisch ggf. eine Extrabehandlung vorgeschaltet.

Grundsätzlich besteht die Reglementierung, daß der sanierungsbedürftige Boden in seiner Gesamtheit nicht als explosionsfähig einzustufen ist. Boden mit TNT-Gehalten > 10 Gew.%, sowie größere Explosivstoffbrocken, die eine Explosionsgefahr darstellen, können in der Standardanlage nicht bearbeitet werden.

Die zentrale Betreuung der Sanierungstätigkeit durch das Zentrallabor von Umweltschutz Nord in Ganderkesee gewährleistet, daß die laufenden Sanierungstätigkeiten kontinuierlich überwacht und optimiert werden, um somit einen raschen und effektiven Schadstoffabbau zu erreichen. Jede neue Bodencharge wird vor der Übernahme in die Anlage auf seine Behandelbarkeit durch mikrobiellen Abbau untersucht.

Anlagendurchsatz

Ohne weitere, fallspezifische Vorgaben gehen wir von einem mittleren Durchsatz von 75 t/h aus, entsprechend eine jährlich zu bearbeitenden Bodenmenge von 140.000 t. (derzeitiger, bundesweiter Anlagendurchsatz: 1,50 Mio. t kontaminierte Böden).

Sollten projektbezogen die zu reinigenden Mengen den veranschlagten Anlagendurchsatz deutlich überschreiten, kann hierauf durch den Einsatz leistungsstärkerer Maschinen kurzfristig reagiert werden.

Anlagenkomponenten

Zur Aufbereitung kippt der Radlader den Boden in den Aufnahmebunker der Aufbereitungsmaschine (Typ Maulwurf). Hier findet eine gleichmäßige Homogenisierung mit dem zugeführten Substrat statt. Daran anschließend durchläuft der Boden eine Misch- und Siebtrommel. Die hier ausgesiebten Steine werden in einer Auffangwanne zur weiteren Verarbeitung bereitgestellt. Der aufbereitete Boden wird per Radlader in das Behandlungszelt gefahren und zu Mieten aufgesetzt. Das Mischen des Biosubstrates, bestehend aus natürlichen, organischen Einzelkomponenten und anorganischen Agrochemikalien, findet in einer separaten Mischanlage statt. In regelmäßigen Abständen bereitet ein Wendegerät die Mieten auf, um die optimalen Verhältnisse für den mikrobiellen Schadstoffabbau aufrechterhalten zu können (vgl. Abb. 4).

Abwasserbehandlung

Durch das Einbringen des Bodens in geschlossene Behandlungsanlagen ist ein Sickerwasseranfall durch Niederschlagswasser und somit die Auswaschung der Schadstoffe ausgeschlossen. Zwischen Bodenmiete und Untergrund wird eine resorbtive Sperrschicht eingebaut.

Sollte es aus Gründen des Grundwasserschutzes erforderlich sein, so ist es möglich, die Behandlungsanlage mit einer Foliendichtung auszustatten (dies gilt nicht für stationäre Behandlungsanlagen, da diese bereits standardmäßig über eine Untergrundabdichtung verfügen).

Anlagenbetrieb

Routinemäßig wird in den Anlagen im 1-Schichtbetrieb gearbeitet. Das Betriebspersonal setzt sich zusammen aus Projektleiter, Baustellenleiter, sowie Baugeräteführern und Baufacharbeitern. Der Gesamtenergieverbrauch liegt bei 10-15 kWh/t.

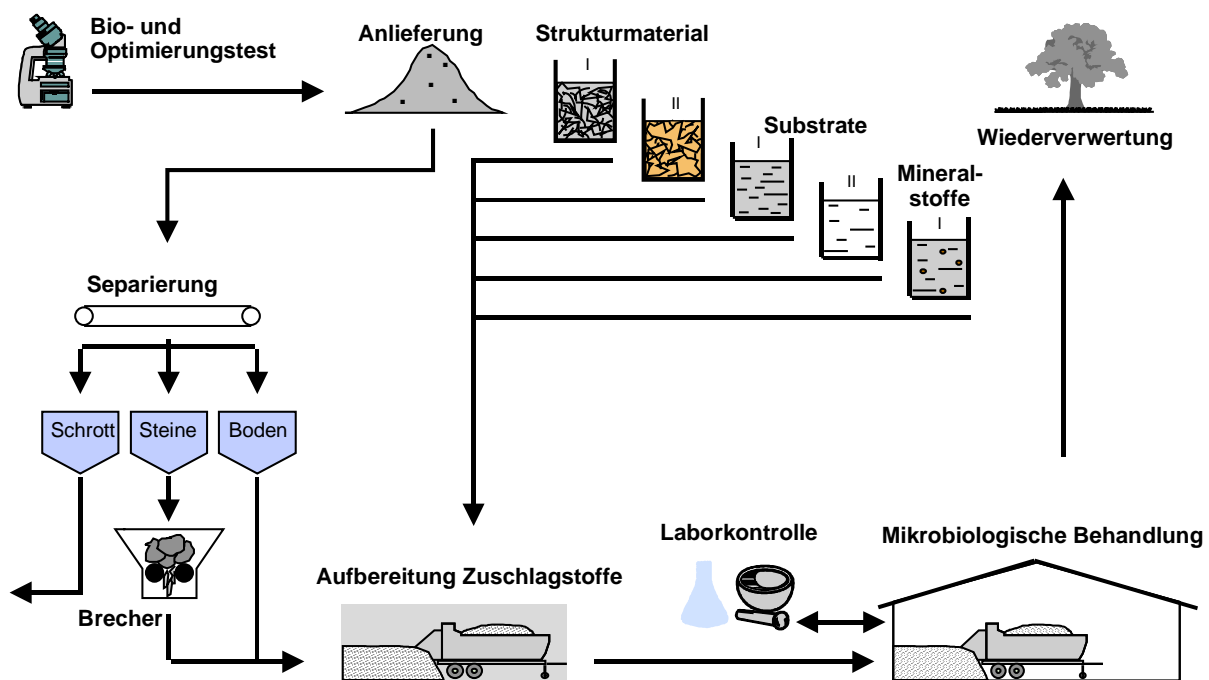


Abb. 4: Verfahrensschema zur biologischen Behandlung TNT-belasteter Böden.
TNT-Humifizierung – Das UMWELTSCHUTZ NORD-Verfahren

Arbeitsschutzeinrichtungen

Umweltschutz Nord ist jederzeit in der Lage, die erforderlichen Arbeitsschutzeinrichtungen gemäß den Richtlinien der Tiefbau-Berufsgenossenschaft für Arbeiten in kontaminierten Bereichen zur Verfügung zu stellen. Beim Umgang mit belastetem Erdreich steht eine Schwarz-/Weiß(S/W)-Anlage zur Verfügung. In der eigentlichen Bodenbehandlungsanlage führen Absauganlagen ausgasende Schadstoffe der Abluftreinigung zu.

Biofilter werden in Containerbauweise ausgeführt (Flächenbelastung entsprechend der VDI Richtlinie 3477).

Mobilität

Die Bodenreinigungsanlage ist aus einzelnen, mobilen Systemkomponenten zusammengestellt, die im Bedarfsfall kurzfristig verfügbar sind.

Genehmigung

Bei der Errichtung von Bodenreinigungsanlagen auf den zu sanierenden Standorten ist jeweils eine Genehmigung nach 4. BImSchV, Anhang, Ziffer 8.7 Spalte 1 (förmliches Verfahren) einzuholen. Die Erstellung einer UVU nach UVPG, einer Sicherheitsanalyse nach 12. BImSchV und einer Eingriffs- und Ausgleichsbilanzierung nach den einschlägigen länderspezifischen Vorgaben sind obligatorisch.

Die Genehmigung zur Errichtung und zum Betrieb der Bodenreinigungsanlagen auf dem jeweiligen Standort erfolgt auf Grundlage von §§ 4 Abs. 1,10 BImSchG i.V. m. §§1,2 der 4. BImSchV i.V. m. 8.7 Spalte 1 des Anhangs zur 4. BImSchV.

Gemäß § 13 BImSchG schließt diese Genehmigung die baurechtliche Erlaubnis ein.

Umweltverträglichkeit

In dem biologischen Prozeß werden keine Abwässer erzeugt. Eine Reststoff- und Abfallbeseitigung wird nur notwendig, wenn bodenfremde Stoffe (z.B. Holz, Kunststoffe etc.) im angelieferten Boden auftreten. Diese werden ausgesiebt und einer geordneten Entsorgung zugeführt. Bei der biologische Bodenbehandlung werden die Schadstoffe abgebaut und immobilisiert.

Lärmemissionen

Besondere Lärmschutzmaßnahmen müssen nicht getroffen werden, weil beim Einsatz der angegebenen Maschinen die Immissionsrichtwerte nach Abs. 2.3.2. der TA-Lärm nicht überschritten werden.

Verwertbarkeit des Reinbodens

Nach erfolgter Reinigung des kontaminierten Bodens kann das Endprodukt zur Rekultivierung auf der Liegenschaft, als Bodenverbesserer und Mulchmaterial eingesetzt werden. Sofern insbesondere im Hinblick auf die Nutzung des zu sanierenden Areals zur Trinkwassergewinnung Einschränkungen hinsichtlich der Nährstofffrachten bestehen, wird der gereinigte Boden vor der Ausbringung einer Nachreife unterzogen.

Kriterien und Analysemethoden zur (öko-)toxikologischen Bewertung biologisch gereinigter STV-Böden werden aktuell - exemplarisch für die Modellsanierungen am Standort „Werk Tanne“ bei Clausthal-Zellerfeld - von einer ad-hoc Arbeitsgruppe unter Leitung der DECHEMA erarbeitet.

Grundwassergefährdung

Das im Forschungsvorhaben getestete Sanierungsverfahren ist ein Trockenverfahren, in dem sich der Wassergehalt in dem Boden/Substrat-Gemisch in allen Betriebszuständen weit unterhalb der Wasserhaltekapazität bewegt.

Genehmigungsfähigkeit

Die Praxiserfahrungen bei der maßstabsgerechten Erprobung und die begleitende Erfolgskontrolle machen den Ablauf und die Leistungsfähigkeit der Verfahren soweit transparent, daß behördliche Entscheidungen bei der künftigen Genehmigung solcher Sanierungsverfahren wesentlich erleichtert werden. Dies ist gerade deshalb von Bedeutung, weil es sich bei dem beantragten Vorhaben um neuartige Strategien, in der biologischen Bodensanierung handelt, die eine hohe Akzeptanz erreichen sollen.

Erfolgsaussichten

Das getestete Verfahren läßt sich überall dort einsetzen, wo ein vergleichbares oder ähnliches Kontaminationsspektrum (z. B. TNT, DNT, MNT, DNB), wie am Standort 'Tanne', vorliegt. Laut aktueller Bestandsaufnahme des Umweltbundesamtes gibt es derzeit 3240 Verdachtsorte mit Rüstungsaltslasten, die zu einem erheblichen Teil Sprengstoff-typische Verbindungen aufweisen. Sprengstoff-Kontaminationen befinden sich vornehmlich auf ehemaligen Produktionsanlagen für Sprengstoffe und Treibmittel, auf Sprengplätzen, Delaborierungsplätzen, Explosivstofflagern und Füllstellen. Die Hauptkontamination wird durch TNT und dessen herstellungsbedingte Neben- und Zwischenprodukte verursacht.

Der Anteil zu reinigender Bodenmengen, die sich aus dieser Situation ergeben, läßt sich derzeit noch nicht beziffern, da auf vielen Standorten zwar Kontaminationen nachgewiesen, aber noch nicht eingegrenzt worden sind. Die großen ehemaligen Sprengstoffproduktionsstätten zeigen jedoch die Größenordnung, die zu erwarten ist. So fallen je nach Eingreifwert an Standorten wie z. B. Stadtallendorf, Hessisch Lichtenau oder Hallschlag jeweils 80.000 bis 150.000 t zu reinigende Bodenmenge an. Der überwiegende Teil dieser Bodenmengen weist Kontaminationsgrade auf, für die die biologischen Verfahren am Standort 'Tanne' erprobt wurden.

Gegenüber potentiellen Konkurrenztechnologien wie thermische Verfahren oder Bodenwaschverfahren weisen biologische Verfahren zur Sanierung von Rüstungsaltslasten einige Vorteile auf. Die zu erprobenden biologischen Verfahren erfordern einen vergleichsweise geringen technischen Aufwand und sind somit erheblich kostengünstiger. Die Verfahren sind ferner so konzipiert, daß keine Reststoffe anfallen. Das Endprodukt, d. h. der gereinigte Boden, muß zur Nutzbarmachung - im Gegensatz zu thermischen gereinigten Böden - nicht wiederbesiedelt werden. Die genannten Vorteile machen die Überlegenheit biologischer Verfahren in diesem Bereich und damit die wirtschaftlichen Erfolgsaussichten bei erfolgreicher Erprobung deutlich.

6 Eigene Veröffentlichungen & Diplomarbeiten

Daun, G., H. Lenke, F. Desiere, H. Stolpmann, J. Warrelmann, M. Reuss, H.-J. Knackmuss 1995. Biological treatment of TNT-Contaminated soil by a two-stage anaerobic/aerobic process. In: W. J. van den Brink, R. Bosmann, F. Arendt (Hrsg.): Contaminated soil '95, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 337-346

Fischer D und U. Walter. 1998. Werk Tanne-Erste Ergebnisse der Bodenbehandlung nach dem Anaerob Aerob Verfahren In: B. Mahro und A. Eschenbach (Hrsg.): BMBF Verbundvorhaben " Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen"

Fischer D., U. Walter, J. Warrelmann. 1999. On-site und in-situ erfolgreich. Umweltmagazin, Nov./Dez. 1999: 42.

Walter, U., D. Fischer, J. Warrelmann, W. Heyser, G.-A. Henke. 1998. Anaerob/Aerob verfahren zur biologischen Behandlung sprengstoffkontaminierter Böden. TerraTech 3/1998: 42-45

Walter U. und D. Fischer. 1998. Anaerob/Aerobe TNT-Humifizierung. In: Arge EXPO 2000 Munster (Hrsg.): Fachtagung „Sanierung kontaminierter Böden“, Munster.

Walter U. und D. Fischer. 1998. Biologische Behandlung sprengstoffkontaminierter Böden. TNT-Humifizierung nach dem Anaerob/Aerob Verfahren. In: J. Michels, U. Gehrke (Hrsg.): BMBF Verbundvorhaben „Biologische Verfahren zur Bodensanierung“

Walter U. und D. Fischer. 1999. TNT-Humification –The Umweltschutz Nord procedure. In: Bundesamt für Wehrtechnik (Hrsg.): 12TH General Environmental Technology Data Exchange Meeting 1999, Koblenz.

Warrelmann, J., U. Walter, B. Müller-Schmidt 1996. Biologische Dekontamination von Explosivstoffen durch einen 2-stufigen Anaerob-Aerob-Prozeß: Pilotsanierung im TERRANOX-Reaktor am Standort Hessisch Lichtenau - Hirschhagen. In: W. Fritsche und J. Michels: BMBF Verbundvorhaben „Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten“

Warrelmann, J., H. Lenke, G. Daun, U. Walter, K. Hund, H.-J. Knackmuss 1996. Mikrobiologische Sanierung Explosivstoff-belasteter Böden. TerraTech 2:44-47

Warrelmann, J. und U. Walter 1997. Erprobung und Anwendung mikrobiologischer Verfahren bei der Sanierung von Rüstungsaltslasten. In: V. Franzius, E. Brandt, K. Wolf (Hrsg.): Handbuch der Altslastensanierung, 5325.

7 Literaturverzeichnis

1. **Daun, G., H. Lenke, F. Desiere, H. Stolpmann, J. Warrelmann, M. Reuss, H.-J. Knackmuss** 1995. Biological treatment of TNT-Contaminated soil by a two-stage anaerobic/aerobic process. In: W. J. van den Brink, R. Bosmann, F. Arendt (Hrsg.): Contaminated soil '95, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 337-346
2. **Emerey D.D. and P.C. Faessler** 1996. First production-level Bioremediation of Explosives – contaminated Soil in the U.S. Annuals of the New-York Academy of sciences.

3. **Fischer D und U. Walter.** 1998. Werk Tanne-Erste Ergebnisse der Bodenbehandlung nach dem Anaerob Aerob Verfahren In: B. Mahro und A. Eschenbach (Hrsg.): BMBF Verbundvorhaben " Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen"
4. **Fischer D., U. Walter, J. Warrelmann.** 1999. On-site und in-situ erfolgreich. Umweltmagazin, Nov./Dez. 1999: 42.
5. **Lenke, H., G. Daun, U. Sieglen, B. Wagener, D. Jackisch, F. Desiere, H.-J. Knackmuss** 1996. Humifizierende Dekontamination von TNT und kongeneren Verbindungen im Boden, Abschlußbericht, Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Stuttgart.
6. **Walter, U., D. Fischer, J. Warrelmann, W. Heyser, G-A- Henke.** 1998. Anaerob/Aerob verfahren zur biologischen Behandlung sprengstoffkontaminierter Böden. TerraTech 3/1998: 42-45
7. **Walter U. und D. Fischer.** 1998. Anaerob/Aerobe TNT-Humifizierung. In: Arge EXPO 2000 Munster (Hrsg.): Fachtagung „Sanierung kontaminierter Böden“, Munster.
8. **Walter U. und D. Fischer.** 1998. Biologische Behandlung sprengstoffkontaminierter Böden. TNT-Humifizierung nach dem Anaerob/Aerob Verfahren. In: J. Michels, U. Gehrke (Hrsg.): BMBF Verbundvorhaben „Biologische Verfahren zur Bodensanierung“
9. **Walter U. und D. Fischer.** 1999. TNT-Humification –The Umweltschutz Nord procedure. In: Bundesamt für Wehrtechnik (Hrsg.): 12TH General Environmental Technology Data Exchange Meeting 1999, Koblenz.
10. **Warrelmann, J., U. Walter, B. Müller-Schmidt** 1996. Biologische Dekontamination von Explosivstoffen durch einen 2-stufigen Anaerob-Aerob-Prozeß: Pilotsanierung im TERRANOX-Reaktor am Standort Hessisch Lichtenau - Hirschhagen. In: W. Fritsche und J. Michels: BMBF-Verbundvorhaben „Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten“
11. **Warrelmann, J., H. Lenke, G. Daun, U. Walter, K. Hund, H.-J. Knackmuss** 1996. Mikrobiologische Sanierung Explosivstoff-belasteter Böden. TerraTech 2:44-47
12. **Warrelmann, J. und U. Walter** 1997. Erprobung und Anwendung mikrobiologischer Verfahren bei der Sanierung von Rüstungsaltslasten. In: V. Franzius, E. Brandt, K. Wolf (Hrsg.): Handbuch der Altlastensanierung, 5325.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.5 Verbundvorhaben 6: Maßstabsgerechte Erprobung biologischer Verfahren mit Erfolgskontrolle auf dem Standort "Werk Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld in Niedersachsen

9.5.2 Irreversible Transformation und Immobilisierung von TNT zur Detoxifizierung kontaminierter Böden; Dynamisches Beetverfahren (TV 6.2)

Andrea Dohnalek-Droste
Dr. Ralf Winterberg

Roland Knabe
Martin Schmidt

Plambeck ContraCon GmbH
Peter-Henlein-Str. 2-4
27472 Cuxhaven

Förderkennzeichen: 14511291

Laufzeit: 01.01.1998 – 31.03.2000

1 Zusammenfassung und Zielsetzung

Böden von Altstandorten der Militärproduktion und des Militärbetriebes werden zur Zeit in Deutschland durch Deponierung entsorgt oder durch thermische Behandlung saniert. Preisgünstige Alternativen zur nachhaltigen Sanierung bieten die biologischen Verfahren, an deren Entwicklung in den vergangenen Jahren intensiv gearbeitet wurde.

Ziel des Vorhabens ist es, das von der Plambeck ContraCon GmbH gemeinsam mit der Universität Marburg seit 1994 entwickelte anaerob/aerobe dynamische Mietenverfahren zur Immobilisierung von Nitroaromaten am Standort des ehemaligen Sprengstoffwerkes "Tanne" maßstabsgerecht zu erproben.

Das Prinzip der Bodenbehandlung beruht auf einer gezielten Umwandlung der Schadstoffe während einer vorgeschalteten anaeroben Phase und ihrem anschließenden irreversiblen Einbau in die Bodenmatrix unter aeroben Bedingungen. Voraussetzung für die mikrobiell induzierte Detoxifizierung ist die Zugabe eines durch die autochthonen Mikroorganismen leicht verwertbaren organischen Substrates. Dessen Konzentration war während der vorangegangenen Verfahrensentwicklung minimiert worden, um die bodenphysikalischen Eigenschaften möglichst wenig zu verändern und somit die Verwertungsmöglichkeiten des behandelten Bodens nicht einzuschränken.

Die maßstabsgerechte Erprobung des Verfahrens erfolgte durch die Behandlung von insgesamt vier Bodenchargen mit einer Masse von jeweils 32 t in einer mobilen Zelthallenanlage (Abb. 1). Jeweils zwei Chargen wurden während der Vegetationsperioden der Jahre 1998 und 1999 parallel behandelt.

Im Behandlungsjahr 1998 konnte die Konzentration des dominanten Schadstoffes Trinitrotoluol (TNT) im Boden von 1.160 mg/kg TS (917 mg/kg TS nach Substratzugabe) auf 1,3 mg/kg TS gesenkt werden. Dies entspricht einem TNT-Transformationsgrad von 99,9 %. Nachweisbare Nebenprodukte entstanden nicht: der Immobilisierungsgrad der Nitroaromaten betrug 99,9 %. Der behandelte Boden wurde nach Vorgabe der Genehmigungsbehörde ausgelagert. Das Verfahren wurde 1998 beim Deutschen Patentamt zum Patent angemeldet.



Abb. 1: Pilotanlage am Standort "Werk Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld (Foto: IABG)

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

Die Arbeiten der Universität Marburg (Arbeitsgruppe Dr. von Löw) zur Sanierung von Rüstungsaltslasten umfaßten zu Beginn der 90er Jahre sowohl reine Kompostierungskonzepte als auch eine anaerob/aerobe Variante, die als "anaerob/aerobe Kompostierung" bekannt geworden ist [2]. Diese Entwicklungslinie wurde durch die Plambeck ContraCon GmbH mit Beginn der Zusammenarbeit im Jahr 1994 aufgegriffen und systematisch zum anaerob/aeroben dynamischen Beet- oder Mietenverfahren weiterentwickelt. Die Entwicklungsarbeiten erfolgten im Rahmen des BMBF-Projektes "Entwicklung eines mikrobiologischen Sanierungsverfahrens am Beispiel des ehemaligen Sprengstoffwerkes "Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld" (Teilprojekte "Übertragung der Erkenntnisse der Grundlagenforschung des mikrobiologischen TNT-Abbaus auf Modelluntersuchungen unter Berücksichtigung der Erfordernisse eines technischen Sanierungsverfahrens (März 1993-Januar 1996) und: "Technikumsversuche zur Optimierung und zum scale up der Sanierungsverfahren" (TV 3.1.4, Juni 1996-März 1999)). Die Untersuchungen wurden mit Böden vom Standort "Werk Tanne" durchgeführt, die vorwiegend mit Trinitrotoluol (TNT) kontaminiert waren.

Ein wesentliches Ergebnis der Entwicklungsarbeiten war der Nachweis, daß die Detoxifizierung der Böden in weiten TNT-Konzentrationsbereichen gelingt: Im Falle eines hochkontaminierten Bodens konnte die Konzentration des Schadstoffes TNT von 4.400 mg/kg TS auf 7 mg/kg TS gesenkt werden. Der Immobilisierungsgrad der Nitroaromaten betrug nach der Behandlung 99,0 %. Durch eine ca. 3-monatige Behandlung ließ sich die TNT-Konzentration eines geringer kontaminierten Standortbodens von 424 mg/kg TS auf 1,7 mg/kg TS reduzieren. Dies entspricht einer Reduzierung von 99,6 %. Die mit der Bodenbehandlung verbundene Detoxifizierung des Bodens ließ sich durch den Leuchtbakterientest mit dem Bakterium *Vibrio fischeri* nachweisen (Tab. 2).

Tab. 2: Einfluß des Eluates (in Anlehnung an DIN 38414-S4) des unbehandelten und behandelten Bodens auf die Lumineszenz des Leuchtbakteriums *Vibrio fischeri*

Meßgröße	TNT-Konzentration (mg/kg TS)	G _L -Wert (<i>Vibrio fischeri</i>)
unbehandelter Boden	424	300
behandelter Boden	1,7	1

Eine Probe gilt als nicht toxisch, wenn der G_L-Wert ≤ 4 ist

Voraussetzungen für die großtechnische Anwendung eines Immobilisierungsverfahrens ist der Nachweis der Nachhaltigkeit der Detoxifizierung des Bodens. Nach dem Stand des Wissens können die Schadstoffumsetzungen mit Reaktionen der Humusbildung verglichen werden, so daß von einer Bodendetoxifizierung durch Humifizierung gesprochen wird [4]. Daß die mittels Einzelstoffanalytik nicht mehr nachweisbaren Umsetzungsprodukte der Immobilisierungsreaktion tatsächlich in die Bodenmatrix eingebunden werden, konnten Drzyzga et al. [3] (s. auch Kapitel 9.2.5 des Leitfadens (TV 3.1.4)) und mittlerweile auch

Hund-Rinke und Kördel [5] zeigen. Erste Hinweise auf das Fehlen der originären Schadstoffe im behandelten Bodenmaterial lieferten Untersuchungen von Banholczer et al. [1], so daß auch die oftmals diskutierte Sequestrierung der originären Schadstoffe durch die organische Bodensubstanz (also ihr Einschluß ohne chemische Modifikation) ausgeschlossen werden kann. Die Untersuchungen zur Aufklärung der Struktur des Produkts durch ¹⁵N-NMR-Spektroskopie werden zur Zeit im Rahmen des BMBF-Teilvorhabens 5.3.1 fortgesetzt (s. Kapitel 9.4.3 des Leitfadens). Sie werden ergänzt durch Untersuchungen zum Langzeitverhalten des behandelten Bodens (s. Kapitel 9.4 und 9.4.2 des Leitfadens).

3 Angewandte Methoden

3.1 Verfahrensprinzip

Das Prinzip der Bodenbehandlung beruht auf einer gezielten Umwandlung der Schadstoffe und ihrem anschließenden irreversiblen Einbau in die Bodenmatrix. Es entsteht ein detoxifiziertes Bodenmaterial.

Die Entwicklung des dynamischen Mietenverfahrens hat zu einer zweistufigen Bodenbehandlung geführt (vgl. Abb. 2):

1. Transformation des TNT zu reduzierten Umsetzungsprodukten (Monoamino-Dinitrotoluole (ADNT) und Diamino-Mononitrotoluole (DANT)). Dieser Schritt erfolgte unter weitgehend anaeroben Bedingungen.
2. Immobilisierung der Transformationsprodukte durch Einbindung in die Bodenmatrix unter aeroben Bedingungen.

Nach dem Stand des Wissens können die Schadstoffumsetzungen mit Reaktionen der Humusbildung verglichen werden, so daß von einer Bodendetoxifizierung durch Humifizierung gesprochen werden kann [4].

Für die mikrobiellen Umsetzungsreaktionen werden organische Substrate benötigt, die den beteiligten autochthonen Mikroorganismen das Wachstum ermöglichen. Diese Substrate werden dem Boden zugesetzt und im Verfahrensprozeß sehr weitgehend mineralisiert, d.h. zu den Endprodukten Kohlendioxid und Wasser abgebaut.

Nach Zugabe des mikrobiell verwertbaren organischen Substrates setzt dessen Verwertung durch die im Boden bereits vorhandenen Mikroorganismen sehr schnell ein. Der Zusatz speziell angezüchteter Mikroorganismen ist nicht notwendig. Die mikrobielle Umsetzung führt zum Verbrauch des im Porenraum des Bodens vorhandenen Sauerstoffs, so daß die weitere Umsetzung des Substrates unter Bedingungen der Substratgärung (vergleichbar der landwirtschaftlichen Silage) erfolgt. Diese Reaktionsbedingungen ermöglichen eine schnelle Transformation des Trinitrotoluols zu Monoamino-Dinitrotoluolen und Diamino-Mononitrotoluolen. Zwar wird der Boden auch während der anaeroben Phase regelmäßig bearbeitet, um eine weitergehende Homogenisierung und die mechanische Zerkleinerung von Schadstoffkristallen zu gewährleisten, doch führt die gewählte Bearbeitungsfrequenz nicht zur Aufhebung des Sauerstoffmangels im Boden. Dies geschieht erst nach nahezu vollständiger Transformation des TNT. Als Abschluß dieser Umsetzungsreaktionen wird die aerobe Behandlungsphase durch eine intensive Belüftung des Bodens eingeleitet. Die Belüftung des

Bodens bewirkt eine schnelle Mineralisierung der Gärungsprodukte sowie der noch nicht umgesetzten Substratbestandteile. Der Boden erhitzt sich während dieses Prozesses, wie das auch bei Kompostierungen der Fall ist, in Teilbereichen auf Temperaturen bis zu 70°C. Im Zuge der aeroben Umsetzung werden die Transformationsprodukte nahezu vollständig in die Bodenmatrix eingebunden.

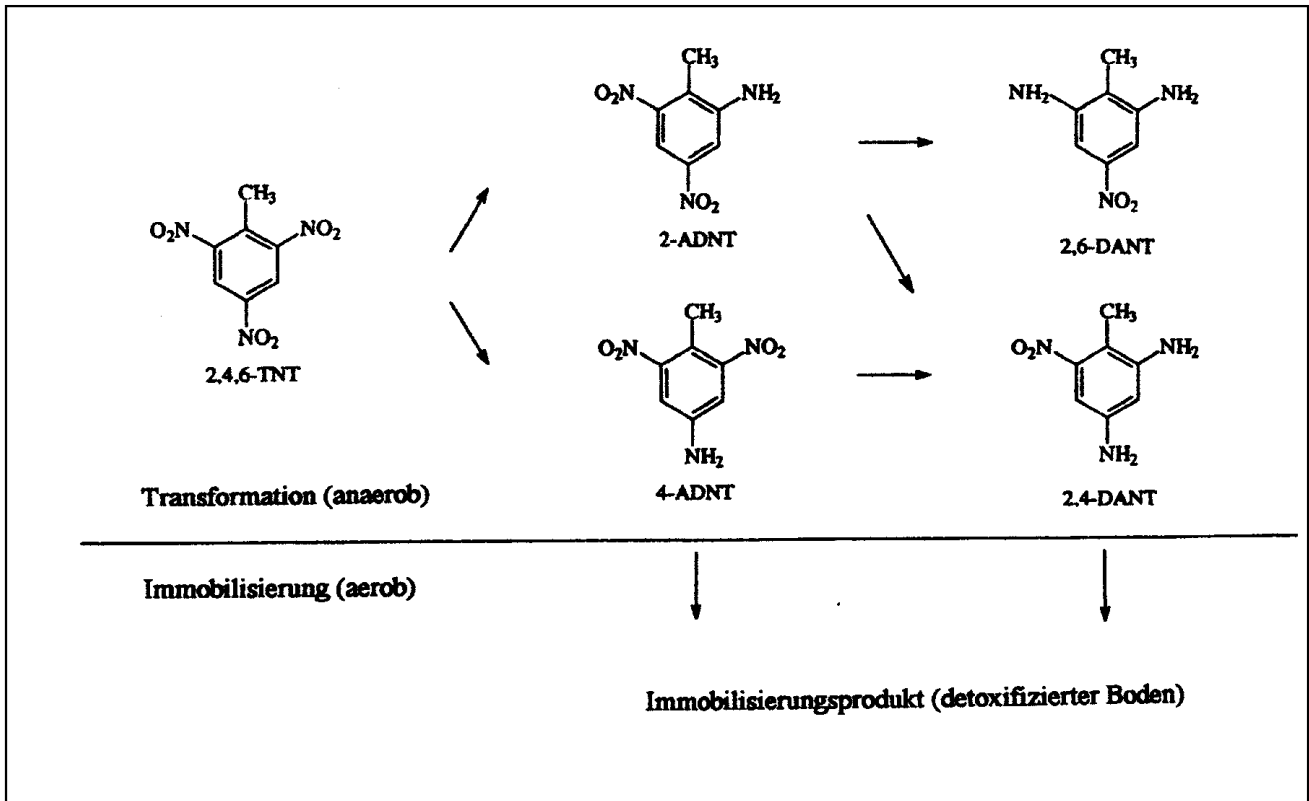


Abb. 2: Transformation und Immobilisierung von Nitroaromaten am Beispiel des 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT)

3.2 Sanierungstechnik

Nach der Auskoffnung wird das kontaminierte Bodenmaterial gesiebt. Für die maßstabsgerechte Erprobung des Verfahrens erfolgte die Siebung z. B mit einem Trennschnitt von 6 cm. Das Überkorn kann gebrochen und dem zu behandelnden Material wieder zugesetzt werden. Anschließend wird das Material mit dem für die Schadstoffumsetzung notwendigen organischen Substrat gemischt. Nach intensiver Homogenisierung des Materials erfolgt der Einbau in Form von Beeten, Tafel- oder Dreiecksmieten in eine eingehauste Anlage (Abb. 3).

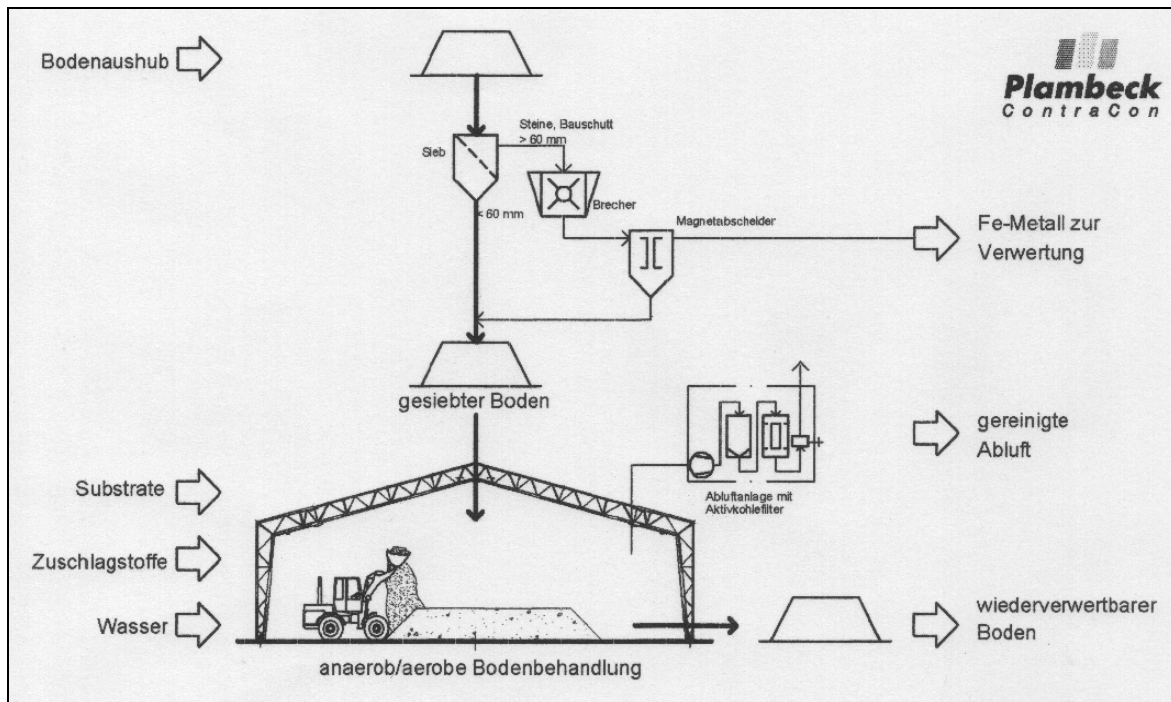


Abb. 3: Fließbild des dynamischen Mietenverfahrens

Die Bodenbearbeitung erfolgt im großtechnischen Maßstab mit konventionellen Bodenbearbeitungsgeräten, z.B. mit Mietenwendern. Im Rahmen der maßstabsgerechten Erprobung wurde der Boden auf vergleichbare Weise mit einer Siebmischerschaufel durchmischt. Dabei erfolgt die Behandlung in der ersten Vegetationsperiode (1998) in Containern (vgl. Abb. 4) und in der zweiten Vegetationsperiode (1999) in Form von Dreiecksmieten (Abb. 5).

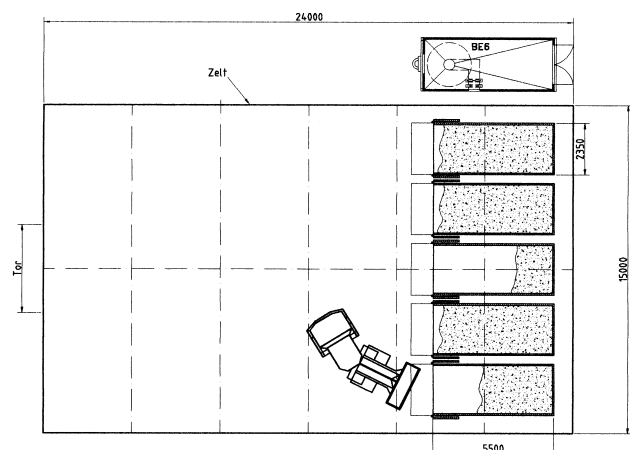


Abb. 4: Bodenbearbeitung in der Vegetationsperiode 1998 in Containern und Grundriß der Plambeck-ContraCon-Zeltanlage (1998)

Die Steuerung der Sauerstoffversorgung ist durch eine jeweils angepasste Bearbeitungsfrequenz möglich: regelmäßige, aber seltene Bearbeitung ermöglicht zu Beginn der Bodenbehandlung den erwünschten Sauerstoffmangel (anaerobe Phase). Die Erhöhung der Bearbeitungsfrequenz nach der Schadstofftransformation leitet zur aeroben Phase über, die durch eine Druckbelüftung (Lanzenbelüftung) unterstützt wird. Das behandelte Bodenmaterial kann anschließend ausgelagert und nach den Vorgaben der Genehmigungsbehörden wiederverwertet werden.



Abb. 5: Bodenbearbeitung in der Vegetationsperiode 1999 in Form von Dreiecksmieten in der Pilotanlage bei Clausthal-Zellerfeld

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Stand der Arbeiten

Zum Zeitpunkt des Redaktionsschlusses war die Behandlung aller Bodenchargen abgeschlossen, die im Jahr 1998 behandelten Böden wurden bereits ausgelagert. Die Auslagerungsgenehmigung der im Jahr 1999 sanierten Böden lag vor.

4.2 Sanierungsergebnisse

Die Sanierungsergebnisse werden weitgehend an der Bodenbehandlung des Jahres 1998 dargestellt. Im Jahr 1999 wurden sehr ähnliche Resultate erzielt.

Die Konzentration des organischen Substrates (eines handelsüblichen Nebenproduktes der Lebensmittelverarbeitung) betrug bei Sanierungsbeginn 20 Gew.-% (bezogen auf TS). Während der anaeroben Phase werden vor allem die leicht verwertbaren Bestandteile des Substrates vergoren. In der anschließenden aeroben Phase kommt es durch intensiven Lufteintrag zu einem Temperaturanstieg, der bei ca. 70°C durch Regelung der Sauerstoffzufuhr begrenzt wurde. Die mikrobiellen Aktivitäten führen zu einem sehr

weitgehenden Abbau des organischen Substrates sowie zur gewünschten Schadstoffumsetzung.

Im Rahmen dieser Umsetzungen konnte die TNT-Konzentration des Bodens von 1.160 mg/kg TS (917 mg/kg TS nach Substratzugabe) auf 1,3 mg/kg TS gesenkt werden. Dies entspricht einem TNT-Transformationsgrad von 99,9 %. Ein Immobilisierungsgrad von ebenfalls 99,9 % zeigt, daß nachweisbare Nebenprodukte in nennenswerten Konzentrationen nicht entstanden (Tab. 2).

Tab. 2: Ergebnisse der mikrobiologischen Behandlung (1998)

TNT-Konzentration (mg/kg TS)			TNT-Transformationsgrad (%)	Immobilisierungsgrad der Nitroaromaten (%)*
vor der Bodenbehandlung	Sanierungsbeginn	Sanierungsende		
1.160	917	1,3	99,9	99,9

* berechnet auf der Basis der HPLC-Analytik

Neben TNT wurden weitere im unbehandelten Boden nachgewiesene sprengstofftypische Verbindungen (z. B. 34,6 mg 2-Amino-4,6-Dinitotoluol/kg TS; 61,0 mg 4-Amino-2,6-Dinitrotoluol; 60,8 mg 4-Amino-2,6-Dinitrobenzoesäure/kg TS; 8,2 mg 1,3,5-Trinitrobenzol) vollständig (Dinitrobenzoesäure und Trinitrobenzol) oder nahezu vollständig umgewandelt.

Die in der Vegetationsperiode 1999 durchgeführte Bodenbehandlung zeigt ähnliche Resultate (Abb. 6)

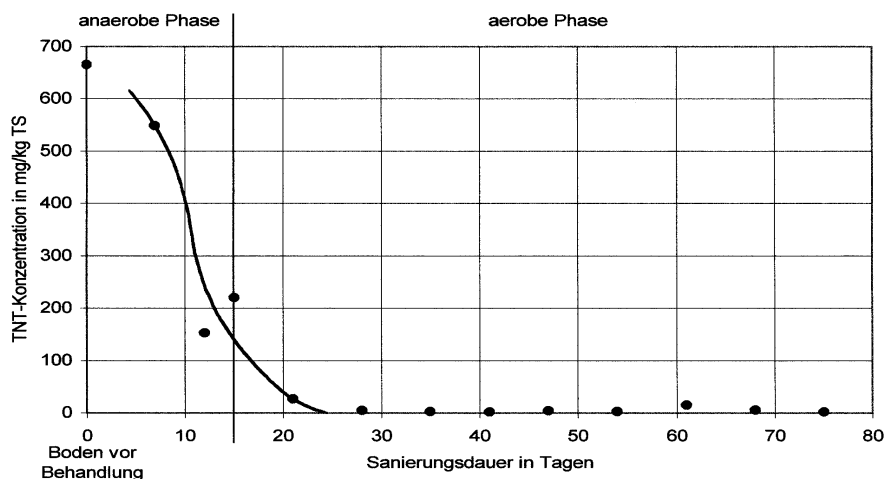


Abb. 6: TNT-Transformation während der anaerob/aeroben Bodenbehandlung (1999)

Die Untersuchungen zur Detoxifizierung des Bodenmaterials liegen noch nicht vollständig vor, doch kann in Analogie der Ergebnisse der Technikumsversuche [7] mit einer weitgehenden oder vollständigen Detoxifizierung des Bodens gerechnet werden.

Der Nachweis der vollständigen Einbindung mittels ^{14}C -markiertem Schadstoff ist maßstabsbedingt nicht möglich. Hier muß auf die Ergebnisse von Hundt-Rinke und Kördel [6] verwiesen werden, die eine nahezu vollständige Einbindung des TNT im 2 m^3 -Maßstab nachgewiesen haben. Untersuchungen zur Nachhaltigkeit der Schadstoffeinbindung sind, wie bereits in Kap. 2 erläutert, noch nicht abgeschlossen, deuten aber auf eine ausgeprägte Stabilität des Produktes hin.

5 Übertragbarkeit und Anwendung

Die maßstabsgerechte Erprobung des dynamischen Beetverfahrens verlief sehr erfolgreich. Auf Grund der gewählten Größenordnung der Pilotversuche besteht ein scale up-Risiko nicht mehr. Lediglich zum Nachweis der Langzeitstabilität des detoxifizierten Bodenmaterials stehen noch Untersuchungsergebnisse aus (s. Kapitel 9.4.2 (TV 5.2) und 9.4.3 (TV 5.3.1)), so daß das Verfahren unter der Voraussetzung der Nachhaltigkeit der Detoxifizierung auch in der Großtechnik unter realen Sanierungsbedingungen angewendet werden kann.

6 Abkürzungen

2,4,6-TNT	2,4,6-Trinitrotoluol
2,4-DANT	2,4-Diamino-6-nitrotoluol
2,6-DANT	2,6-Diamino-4-nitrotoluol
2-ADNT	2-Amino-4,6-dinitrotoluol
4-ADNT	4-Amino-2,6-dinitrotoluol
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
DANT	Diamino-Mononitrotoluole
ADNT	Monoamino-Dinitrotoluole
G_L	Giftigkeit/Hemmung im Leuchtbakterientest
Gew.-%	Gewichtsprozent
HPLC	High Performance Liquid Chromatography / Hochdruckflüssigkeitschromatographie
TNT	Trinitrotoluol
TS	Trockensubstanz

7 Eigene Veröffentlichungen und Diplomarbeiten

7.1 Veröffentlichungen

Winterberg, R.; von Löw, E.; Held, T.: Dynamisches Mietenverfahren zur Sanierung von Rüstungsaltslasten. TerraTech 3, 1998, 39-41

7.2 Diplomarbeiten

Jaitner, N.: Untersuchung eines biologischen Verfahrens zur Sanierung von TNT-kontaminierten Böden. Diplomarbeit, Hochschule Bremen, Bremen, 1999

Kirchwehm, K.: Maßstabgerechte Erprobung eines dynamischen Mietenverfahrens zur biologischen Behandlung TNT-kontaminierter Böden am Beispiel der ehemaligen Sprengstofffabrik "Tanne" in Clausthal-Zellerfeld. Diplomarbeit, Hochschule Bremen, Bremen, 2000

Sehlmeyer, R.: Verfahrensoptimierung zur mikrobiologischen Sanierung eines sprengstoffbelasteten Bodens. Diplomarbeit, Hochschule Bremerhaven, Bremerhaven, 1999

8 Literatur

1. **Banholz, A., von Löw, E.; Fründt, J.; Bruns-Nagel, D.:** Dynamisches Beetverfahren: Analyse der Bindungsstruktur nicht extrahierbarer TNT-Transformationsprodukte. Vortrag, 2. Statusseminar zum BMBF-Forschungsverbund "Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen bei der biologischen Bodensanierung, Bremen, 22.02.2000
2. **Bruns-Nagel, D.; Drzyzga, O.; Steinbach, K.; Schmidt, T. C.; von Löw, E.; Gorontzy, T.; Blotevogel, K.-H.; Gemsa, D.:** Anaerobic/aerobic composting of 2,4,6-Trinitrotoluene-contaminated soil in a reactor system. Environmental Science and Technology 32/11, 1998, 1676-1679
3. **Drzyzga, O.; Bruns-Nagel, D.; Gorontzy, T.; Blotevogel, K.-H.; Gemsa, D.; von Löw, E.:** Incorporation of ¹⁴C-Labeled 2,4,6-Trinitrotoluene Metabolites into Different Soil Fractions after Anaerobic and Anaerobic-Aerobic Treatment of Soil/Molasses Mixtures. Environmental Science and Technology 32/22, 1998, 3529-3535
4. **Fritsche, W.:** "Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten". Vortrag, Statusseminar zum BMBF-Forschungsverbund "Biologische Verfahren zur Bodensanierung", Clausthal-Zellerfeld, 06.-07.05.1998
5. **Hund-Rinke, K.; Kördel W.:** Biologische Bodensanierung – Beurteilung des Langzeitverhaltens und der Remobilisierung festgelegter Schadstoffe (PAK sowie TNT und Metabolite). Vortrag, 2. Statusseminar zum BMBF-Forschungsverbund "Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen bei der biologischen Bodensanierung, Bremen, 22.02.2000
6. **Hund-Rinke, K.; Kördel W.:** unveröffentlichte Ergebnisse, 2000
7. **Winterberg, R.; von Löw, E.; Held, T.:** Dynamisches Mietenverfahren zur Sanierung von Rüstungsaltslasten. TerraTech 3/1998, 39-41

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.5 Verbundvorhaben 6: Maßstabsgerechte Erprobung biologischer Verfahren mit Erfolgskontrolle auf dem Standort „Werk Tanne“ bei Clausthal-Zellerfeld in Niedersachsen

9.5.3 Einstufiges Mietenverfahren für den biologischen Abbau von Amino- und Nitroaromaten mit Hilfe von Pilzen (Weißfäulepilzverfahren) (TV 6.3)

Dr. A. Spreinat
Dr. H.-J. Abken
Dipl.-Ing. K. Tölle

WISSTRANS Umwelt GmbH
Am Leinekanal 4
37073 Göttingen

Förderkennzeichen: 1451129/3

Laufzeit: 01.01.1998 – 31.10.1999

1 Zusammenfassung und Zielsetzung

Mit diesem Vorhaben wurde bewiesen, daß das von der WISSTRANS Umwelt GmbH entwickelte Verfahren zur biologischen Sanierung von militärischen- und Rüstungsaltlasten mit Pilzen auch im Großmaßstab zu einer wirkungsvollen Dekontamination des Bodens führt.

Die technischen Arbeitsziele des Projektes wurden erreicht. Hierzu gehören die Anzucht der Pilze in großen Mengen, das Homogenisieren des Bodens, die Einarbeitung des Pilz/Stroh-Substrates in den Boden, sowie die Belüftung und Bewässerung großer Bodenmengen.

Ein wesentlicher Bestandteil des Projektes war die umfassende analytische Kontrolle des Sanierungsverlaufes mit chemischen und ökotoxikologischen Methoden. Es konnte gezeigt werden, daß es durch ein aerobes Pilzverfahren zu keiner Erhöhung der Gehalte der primären Abbauprodukte des Trinitrotoluols (TNT) im Boden kommt.

Durch die Einbindung des Vorhabens in den Forschungsverbund wurden auch die Fragestellungen des Langzeitverhaltens von mit Pilzen sanierten Böden sowie die Art der Einbindung der Metabolite in die Humusmatrix behandelt.

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

Viele Weißfäulepilze und streuzersetzende Pilze besitzen die Fähigkeit, Nitroaromaten mittels ihres ligninolytischen Enzymsystems abzubauen [10]. Während die Verfahren zur Kompostierung von Böden aus Rüstungsaltlasten durch Bakterien zunächst eine anaerobe Behandlung zur Reduktion der Nitroaromaten vorsehen, verfügen die Weißfäulepilze und streuzersetzenden Pilze über Nitroreduktasen, welche auch unter aeroben Verhältnissen z. B. TNT zu Amino-Dinitrotoluol reduzieren.

Für den Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* konnte gezeigt werden, daß der initiale Angriff des TNT über die Intermediate Nitroso-Dinitrotoluol und Hydroxylamino-Dinitrotoluol zu den beiden Isomeren des Amino-Dinitrotoluol verläuft [9] und daß durch die Reduktion der zweiten Nitrogruppe isomere Formen des Diamino-Nitrotoluols entstehen. Die Reduktion der zweiten Nitrogruppe erfolgt erst nach Einführung einer "Schutzgruppe", einem Formylrest an der Aminogruppe, so daß das Intermediat 2-Amino-4-Formamido-Nitrotoluol entsteht [8]. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, daß dieses Intermediat das Substrat für die Lignin-Peroxidase darstellt. Demgegenüber berichten BUMPUS und TARTARKO (1994) [3], daß 4-Hydroxyl-amino-2,6-Dinitrotoluol, ein Intermediat der initialen TNT-Reduktion, ein Substrat für die Lignin-Peroxidase H8 darstellt, eines der ringspaltenden Enzyme, über die Weißfäulepilze und streuzersetzende Pilze verfügen. Mittels dieser Enzyme sind die Pilze zur vollständigen Mineralisation der Nitroaromaten zu CO₂ fähig (36 %ige CO₂-Freisetzung) [4; 5]

Führt man diese Abbauprobe mit Boden durch, der mit radioaktiv markiertem TNT versetzt wurde, so konkurrieren die ringspaltenden Enzyme mit der Humusmatrix um die primären Abbauprodukte des TNT-Metabolismus. Dadurch wurden bei einer Versuchslaufzeit von einem Jahr nur ca. 6 % des TNT als radioaktiv markiertes CO₂ freigesetzt [1]. Nach dieser Behandlungszeit ließen sich nur noch 2 % des eingesetzten TNT aus dem Boden extrahieren. Die übrigen 92 % des TNT wurden von den Pilzen umgewandelt und anschließend fest an die

Bodenmatrix gebunden. Diese gebundenen Metabolite ließen sich weder durch Perkolation des Bodens noch durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen wieder vom Boden abtrennen. Die gute Qualität des behandelten Bodens wurde auch im Leuchtbakterien-Hemmtest bestätigt.

Die Sanierung der Böden wurde im Labormaßstab mit Bodenchargen von 1 kg bis 100 kg durchgeführt. Um weitere Erfahrungen zu sammeln, wurden anschließend 20 t Boden im Technikumsmaßstab in Chargen von jeweils 1 t behandelt. Hier zeigte sich die Bedeutung der gleichmäßigen Belüftung und Bewässerung der Böden. In diesem Maßstab stellte die Vorbereitung und Konditionierung der Böden sowie das Einarbeiten des Pilz/Stroh-Substrates kein Problem dar.

Im Technikumsversuch wurde bereits Boden aus dem ehemaligen Sprengstoffwerk „Tanne“ bei Clausthal-Zellerfeld eingesetzt. Die Analytik zeigte eine sehr inhomogene Verteilung der Nitroaromaten im Boden. Daraus folgt die Notwendigkeit, ein enges Beprobungsrastraster zu wählen, um durch Errechnung der durchschnittlichen Nitroaromaten-Konzentrationen zu Werten zu gelangen, die möglichst nahe an der tatsächlichen Gesamtbelastung des Bodens liegen.

3 Angewandte Methoden

Das von der WISSTRANS Umwelt GmbH entwickelte Verfahren kann als in-situ- oder on-site-Verfahren verwendet werden. Je nach Höhe der Schadstoffbelastung sind ein bis zwei Vegetationsperioden nötig, um eine ausreichende Dekontamination des Bodens zu erreichen.

Um weitere Erkenntnisse über die Versorgung der Pilze mit Luft, Wasser und Nährstoffen zu erlangen, wurde zur maßstabsgerechten Erprobung des Verfahrens die Behandlung von 210 t Boden aufgeteilt auf 3 Bodenchargen in einem Zeitraum von 18 Monaten geplant. Zur kontinuierlichen Erprobung des Verfahrens wurde auf dem Gelände des ehemaligen Sprengstoffwerkes „Tanne“ bei Clausthal-Zellerfeld eine Halle wärmeisoliert und mit einer Heizung versehen. Auf diese Weise konnte auch über die Wintermonate eine zum Wachstum der Pilze ausreichende Temperatur von ca. 15 °C in der Halle eingestellt werden.

Der Boden wurde in einer Miete behandelt, die mit einer saugenden Belüftung ausgestattet war. Ebenfalls wurde eine Untergrundabdichtung mit Sickerwasserfassung eingebaut. Die Temperatur- und Feuchtigkeitsverluste wurden durch eine Einhausung der Miete gering gehalten. Ein Austrocknen des Bodens wurde durch regelmäßiges Berieseln verhindert. Die Miete wurde in 4 Segmente unterteilt, um den Boden aus jeder Bodencharge (= 60 t bzw. 75 t) in maximal 3 Teile aufteilen zu können, die parallel unter verschiedenen Konditionen bezüglich Pilz- und Substratzugabe behandelt werden konnten. Ein Segment wurde freigelassen und diente zur Aufnahme des Bodens bei der Umlagerung bzw. beim Nachimpfen mit frischem Pilz/Stroh-Substrat.

Nach der Behandlung wurde die Bodencharge 1 und ein Segment der Bodencharge 2 auf einer Freifläche mit Untergrundabdichtung dem natürlichen Klima ausgesetzt, um Erkenntnisse über den sanierten Boden unter Freilandbedingungen zu erhalten.

Sowohl das Sickerwasser von Miete und Freifläche als auch die Abluft der Miete wurde über Aktivkohle gefiltert, um eine Belastung von Wasser und Luft zu vermeiden.

Die inhomogene Verteilung der Nitroaromaten im Boden wurde durch intensives Mischen in einem Mischaggregat ausgeglichen. Das Aggregat diente ebenfalls zur Vermischung von ligninhaltigen Feststoffen mit dem Boden, die den Pilzen als Substrate dienen und ein gleichmäßiges Durchwachsen des Bodens mit Pilzmycelien bewirken sollten.

Der Sanierungserfolg wurde durch eine umfassende verfahrensbegleitende Analytik dokumentiert. Hierzu zählte die Analytik auf Nitroaromaten von Boden, Wasser und Luft; die Untersuchung von Gesamtkeimzahlen und Schimmelpilz-Sporen in Boden und Luft, ökotoxikologische Untersuchungen wie Leuchtbakterien-Hemmtests und Regenwurm-Akutttests sowie allgemeine Bodenparameter (u. a. Körnungslinien, Nährstoff- und Schwermetallgehalte, Gehalte an Polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen [PAK]).

Im Forschungsverbund wurden zusätzliche Analysen auf polare Nitroverbindungen und AMES-Tests sowie HPLC-MS Analysen durchgeführt. Zur Überprüfung des Langzeitverhaltens des sanierten Bodens wurde vom Fraunhofer Institut Schmallenberg ca. 1 t Boden mit radioaktiv-markiertem TNT versetzt, mit Pilzen behandelt und anschließend für Versuche im Freiland-Lysimeter sowie zur Simulation des jahreszeitlichen Wechsels durch mehrmaliges Einfrieren und Auftauen des Bodens benutzt.

4 Ergebnisse und Bewertung

Die einzelnen Arbeitspakete zur Durchführung des Forschungsvorhabens sind in Abbildung 1 wiedergegeben.

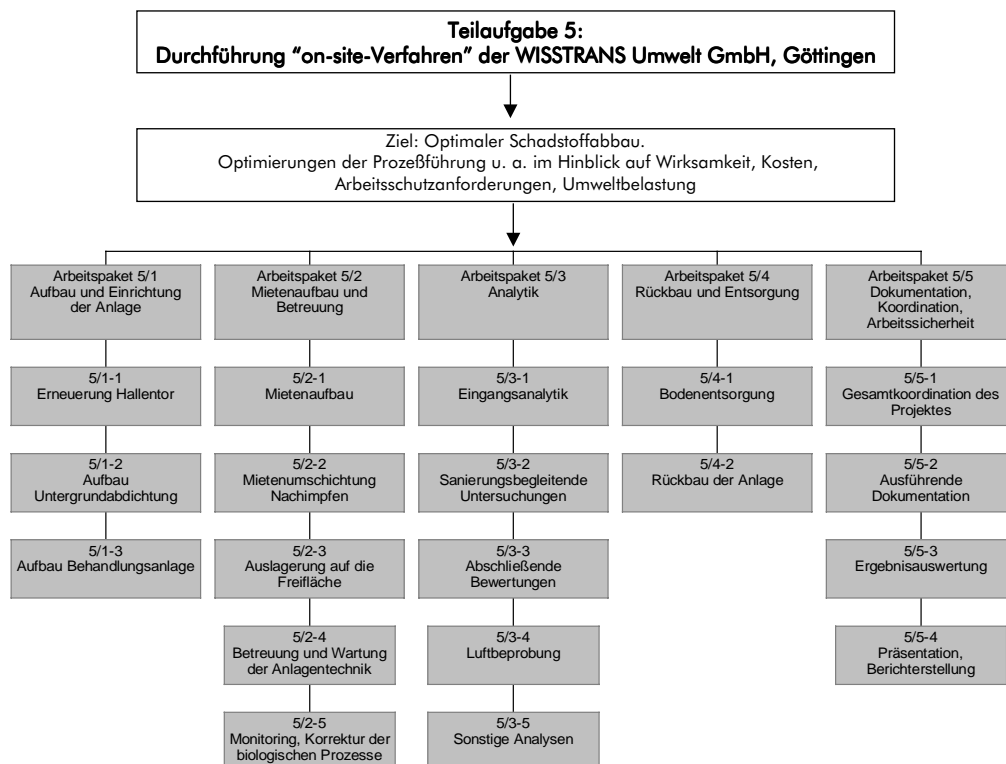


Abb. 1: Organigramm der maßstabsgerechten Erprobung der biologischen Sanierung von Rüstungsaltslasten durch Pilze

4.1 Arbeitspaket 5/1: Aufbau der Anlage

Die Behandlungshalle wurde fristgerecht zum Termin der Freigabe der Versuchsanlage am 06.05.1998 instandgesetzt. Zu diesem Zeitpunkt war auch die Installation der Anlagentechnik und der Aufbau der seitlichen Mietenbegrenzung und Untergrundsicherung der Miete sowie die Vorbereitung der Freifläche beendet.

4.2 Arbeitspaket 5/2: Mietenaufbau und Betreuung

Der Boden wurde von der IABG bereitgestellt, nachdem er durch Mischen verschieden stark kontaminierter Böden auf eine durchschnittliche Nitroaromaten-Konzentration von ca. 2000 mg/kg TS gebracht worden war. Nachdem eine homogene Verteilung der Schadstoffe weitestgehend erreicht war, wurde das von der IABG aufgeschichtete Haufwerk aufgeteilt und bis zur Behandlung in Containern gelagert. Die genaue Aufteilung des Bodens auf Bodenchargen und Segmente ist in Abb. 2 wiedergegeben.

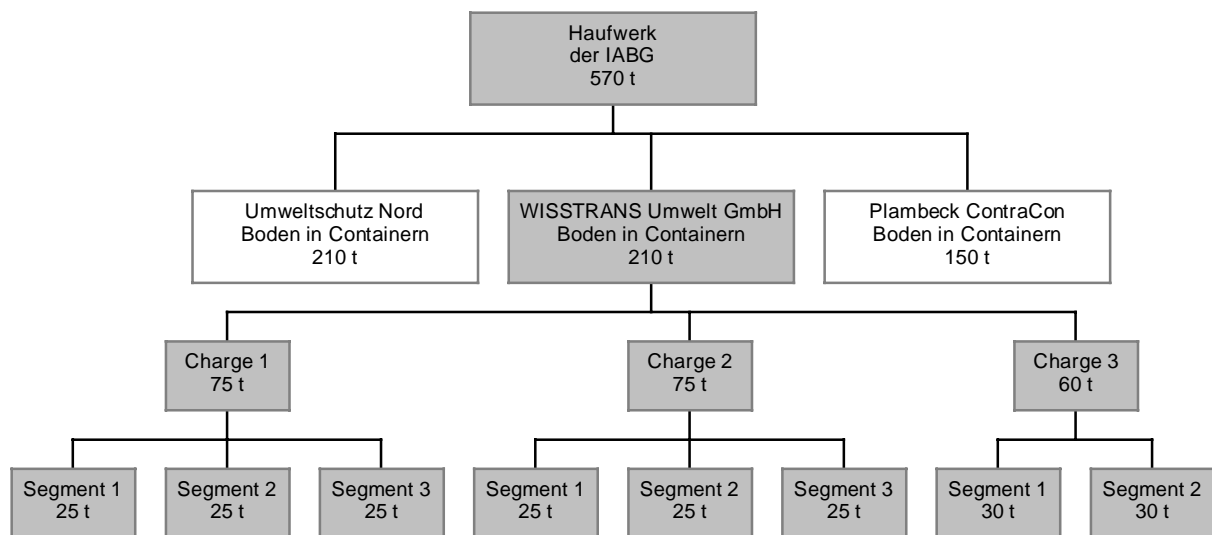


Abb. 2: Verteilung des Bodens aus dem von der IABG bereitgestellten Haufwerk auf die drei Verfahrenserprober und weitere Aufteilung der zur maßstabsgerechten Erprobung des Pilzverfahrens zur Verfügung gestellten Bodenmenge.

Die Abbildung 2 zeigt die Verteilung der 210 t Boden, die der Fa. WISSTRANS zur Verfügung gestellt wurden, auf zwei Bodenchargen à 75 und eine à 60 t, die der Kapazität der Behandlungsanlage entsprechen. Zur synchronen Erprobung verschiedener Pilzarten während einer Behandlung wurde eine Bodencharge jeweils in drei bzw. 2 Segmente unterteilt.

4.2.1 Dauer der Behandlungen

4.2.1.1 Erste Bodencharge

Die Behandlung der 1. Bodencharge wurde in der 26. KW 1998 gestartet. Hierzu wurden drei Mietensegmente durch schichtweises Einbringen von Weißfäulepilz/Stroh-Substratgemisch in

den mit Nitroaromaten belasteten Boden vom Standort „Werk Tanne“ errichtet. Dabei kamen die Weißfäulepilz-Arten *Bjerkandera adusta* und *Pleurotus ostreatus* zum Einsatz.

Nach 14 Wochen wurde die erste Bodencharge Segment für Segment entnommen, in einem Mischaggregat homogenisiert und anschließend schichtweise mit frischem Pilz/Stroh-Substrat nachgeimpft. Das Mischaggregat wurde außerplanmäßig benötigt, da sich trotz der Homogenisierung durch die IABG starke Schwankungen (Ausreißerwerte) in den TNT-Gehalten ergaben.

Die erste Bodencharge wurde nach 29 Wochen auf die gesicherte Freifläche ausgebracht, um die Auswirkungen des natürlichen Klimas auf den sanierten Boden zu untersuchen.

4.2.1.2 Zweite Bodencharge

Die Behandlung der 2. Bodencharge wurde in der 5. KW 1999 gestartet. Zunächst wurden nur 2 Segmente mit Weißfäulepilzen beimpft, da sich die Massenanzucht des streuzersetzenden Pilzes *Stropharia rugosoannulata* verzögert hatte.

Nach 16 Wochen wurden die beiden Segmente mit Weißfäulepilzen nachgeimpft. Zu diesem Termin stand auch der streuzersetzende Pilz zur Verfügung, mit dem die Hälfte des 3. Mietensegmentes beimpft wurde. Ein Sechstel wurde mit Fruchtkörpern von Weißfäulepilzen beimpft, die beiden verbleibenden Sechstel mit Pilz/Stroh-Substrat, welches von *Lentinula edodes* bzw. *Agrocybe aegerita* durchwachsen war, angeimpft. Die restliche Miete wurde mit Fest- und Flüssigsubstraten zur Stimulation des autochthonen Pilzwachstums versorgt.

Da sich im 3. Mietensegment weder durch Zugabe von Pilz/Stroh-Substrat des streuzersetzenden Pilzes noch durch Zugabe der anderen Substrate eine erhöhte Reduktion der Nitroaromaten-Konzentrationen im Boden erreichen ließ, wurde das 3 Segment nach 9 und 26 Wochen mit dem Weißfäulepilz *Pleurotus ostreatus* nachgeimpft, der bereits bei der Behandlung der 1. Bodencharge gute Abbauergebnisse erzielt hatte. Das Nachimpfen des Segmentes 1 erfolgte nach 15 und 23 Wochen. Segment 2 wurde nach 15 Wochen nachgeimpft.

Die Behandlung des Segmentes 2 wurde nach 23 Wochen abgeschlossen, der Boden wurde anschließend auf die gesicherte Freifläche ausgelagert. Die Segmente 1 und 3 der 2. Bodencharge wurden bis zum 31.01.2000 behandelt. Dies entspricht einer Behandlungsdauer von 51 Wochen für Segment 1 und 37 Wochen für Segment 2.

4.2.1.3 Dritte Bodencharge

Die Behandlung der 3. Bodencharge wurde in der 29 KW 1999 gestartet. Hierzu wurde der restliche Boden auf 2 Mietensegmente aufgeteilt. Während das 1. Segment mit Weißfäulepilzen beimpft wurde, erfolgte beim 2. Mietensegment zunächst eine Stimulation des autochthonen Pilzwachstums durch Zugabe von ligninhaltigem Festsubstrat und Flüssigsubstrat. Das Segment 2 wurde nach 5 Wochen mit Weißfäulepilzen angeimpft. Das Nachimpfen erfolgte in der 17. Behandlungswoche. Die Behandlung endete nach 28 Wochen am 31.01.2000. In der Tabelle 1 sind die Behandlungszeiten der 3 Bodenchargen zusammengefaßt:

Tab. 1: Behandlungszeiten der Bodenchargen bei der maßstabsgerechten Erprobung der Sanierung von Rüstungsalftlasten mit Pilzen

	Jahr	1998						1999												2000					
		6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2			
Charge 1	Segment 1	A	N						F																
Charge 1	Segment 2	A	N						F																
Charge 1	Segment 3	A	N						F																
Charge 2	Segment 1							A	N						N										
Charge 2	Segment 2							A	N			F													
Charge 2	Segment 3									A	N						N								
Charge 3	Segment 1												A	N											
Charge 3	Segment 2													A			N								

A = Animpftermin

N = Nachimpftermin

F = Auslagerung auf die gesicherte Freifläche

Während der gesamten Behandlung wurden die Parameter Temperatur, Feuchtigkeit und Sauerstoff- und CO₂-Gehalt im Boden erfaßt und bei Bedarf reguliert.

4.3 Arbeitspaket 5/3: Analytik

4.3.1 Probenahme

Zur Feststellung der Ausgangs- und Endkonzentrationen der Nährstoffe und Begleitkontaminationen sowie zur Bestimmung der Textur des Bodens (Körnungslinien) wurden vor und nach der Behandlung von jeder Charge 6 Bodenmischproben entnommen und auf ein von der Bezirksregierung Braunschweig gefordertes Parameterspektrum analysiert (s. Tab. 2). Direkt nach dem Behandlungsstart erfolgten Beprobungen zur Bestimmung der Nitroaromaten-Konzentrationen, der Gehalte an Keimen und Pilzsporen sowie zur Ermittlung der Ökotoxizität im Leuchtbakterien-Hemmtest und im Regenwurm-Akutttest. Diese Tests wurden auch nach Beendigung der Behandlungen durchgeführt.

Verfahrensbegleitend wurde der Rückgang der Nitroaromaten-Konzentration, die Abnahme der Toxizität im Leuchtbakterien-Hemmtest, die Gesamtkeimzahlen und Gehalte des Bodens an Schimmelpilz-Sporen untersucht. Die Luft wurde in regelmäßigen Abständen auf

Mononitroaromaten, auf Gesamtkeime und Schimmelpilz-Sporen untersucht. Ebenso erfolgte eine regelmäßige Beprobung des Sickerwassers der Freifläche auf die Parameter pH-Wert, PAK-Gehalt, CSB und Summe aromatischer Amine sowie auf Nitroaromaten. Während der Behandlung der 3 Bodenchargen ergaben sich keine nennenswerten Mengen an Sickerwasser aus der Bodenmiete. Die geringen Mengen, die durch übermäßiges Bewässern der Miete auftraten, wurden von der saugenden Belüftung abgezogen und sammelten sich im Kondensatabscheider des Belüftungssystems.

4.3.2 Analytik

4.3.2.1 Analytik auf Nitroaromaten

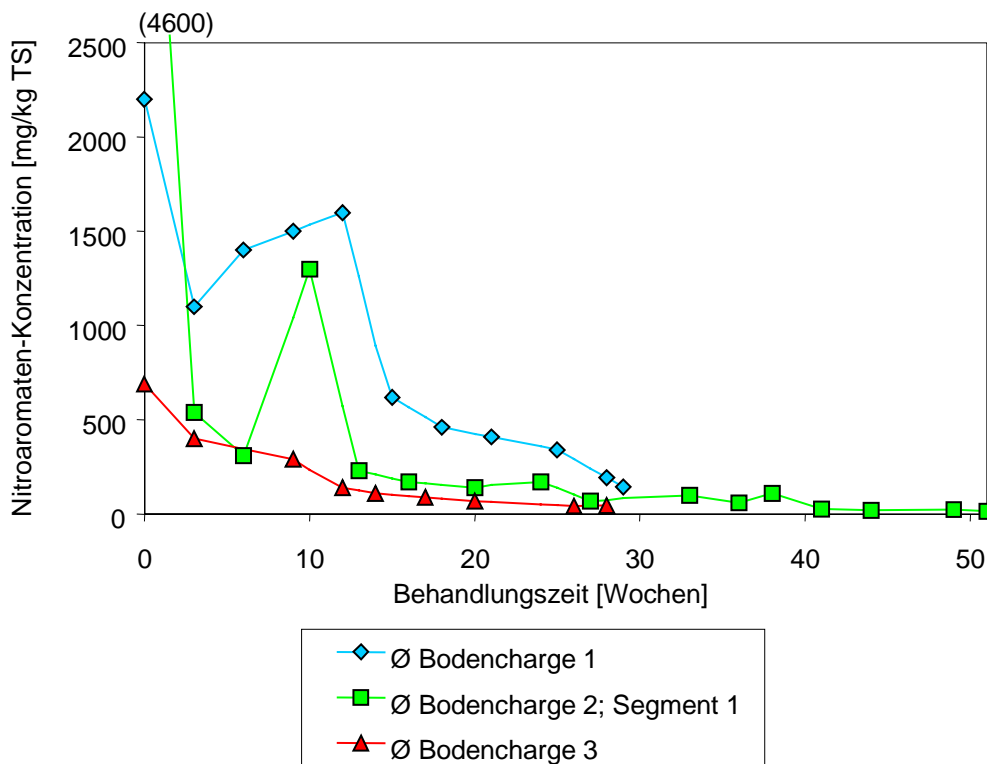


Abb. 3: Abnahme der Nitroaromatengehalte im Verlauf der Behandlung mit Weißfäulepilzen.

In der ersten Bodencharge wurde die Nitroaromaten-Konzentration in 29 Wochen von 2200 mg/kg TS auf 140 mg/kg TS um 93 % gesenkt. Im Verlauf der 51-wöchigen Behandlung des ersten Segmentes der 2. Bodencharge gingen die Nitroaromaten-Konzentrationen im Boden von 4600 mg/kg TS auf 15 mg/kg TS zurück, was einer Reduktion von 99,7 % entspricht. Die Gehalte an Nitroaromaten des 2. Segmentes reduzierten sich nach 23 Wochen Behandlung und 28 Wochen Lagerung auf der gesicherten Freifläche von 770 mg/kg TS auf 49 mg/kg TS (Reduktion um 93 %), die des Segmentes 3 gingen in 37 Wochen von 370 mg/kg TS auf 18 mg/kg TS zurück (Reduktion um 95 %). In der Abbildung sind nur die Daten des 1. Segmentes der 2. Bodencharge gezeigt. Die Konzentrationen an Nitroaromaten der 3. Bodencharge konnten in 28 Wochen von 690 mg/kg TS auf 45 mg/kg TS um 92 % gesenkt werden.

4.3.2.2 Analytik auf Nährstoffe

Ein wichtiges Kriterium für die Verwertung von Böden aus der biologischen Behandlung ist ihr Gehalt an Nährstoffen. Besondere Berücksichtigung finden hierbei die gut löslichen Nährsalze, wie Ammonium, Nitrit, Nitrat und Phosphat, die zur Eutrophisierung des Oberflächenwassers und über das Sickerwasser zur Belastung des Grundwassers mit Nährstoffen führen. Über den Glühverlust des Bodens wurden Rückschlüsse auf den verfügbaren Kohlenstoff erhalten.

Um die Veränderungen der Nährstoffgehalte im Boden während der Behandlung mit Weißfäulepilzen aufzuzeigen, wurden vor Beginn der Behandlung und nach ihrer Beendigung jeweils 6 Bodenmischproben gezogen, Eluate nach DIN 38414 S4 hergestellt und auf die o.g. Parameter analysiert. Außerdem wurde der Stickstoffgehalt im Boden nach der „Kjeldahl-Methode“ bestimmt sowie der Phosphorgehalt im Boden nach CAL-Auszug. Die Analyse eines CaCl_2 -Auszuges des Bodens erlaubte Rückschlüsse auf dessen Gehalt an Ammonium-N, Nitrit-N und Nitrat-N.

Tab. 2: Durchschnittliche Nährstoffgehalte des Bodens vor und nach der Behandlung mit Weißfäulepilzen

Bezeichnung der Bodenproben:	Ø Charge 1 Start 19.06.98	Ø Charge 1 End 26.10.99	Ø Charge 2 Start 29.01.99	Ø Charge 2 End 31.01.00	Ø Charge 3 Start 13.07.99	Ø Charge 3 End 31.01.00
an der Originalsubstanz bestimmt:						
Glühverlust [%]	10	13	9,8	21	9,7	15
Stickstoff [mg N/kg TS]	2900	2500	2700	3400	2700	2800
aus dem CAL-Auszug bestimmt:						
Phosphor [mg P/kg TS]	13	16	14	28	14	17
aus dem CaCl_2-Auszug bestimmt:						
NH_4^+ -N [mg N/kg TS]	1,9	1,5	1,9	1,1	1,0	1,0
Nitrit-N [mg N/kg TS]	0,65	0,078	0,65	< 0,05	1,5	< 0,05
Nitrat-N [mg N/kg TS]	8,1	0,13	3,5	0,62	6,8	3,2
aus dem S4-Eluat bestimmt:						
Ammonium [mg/l]	0,11	0,070	0,14	0,15	0,098	0,17
Nitrit [mg/l]	0,23	0,008	0,22	0,023	0,46	0,028
Nitrat [mg/l]	43	0,25	20	< 0,1	41	4,0
Phosphat [mg/l]	< 0,2	0,42	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2

Aus der Tabelle 2 ist ersichtlich, daß durch eine Sanierung von Rüstungsaltslasten mit Weißfäulepilzen im Hinblick auf Nährstoffe keine Belastung des Grundwassers zu erwarten ist. Die Eluatwerte für Ammonium, Nitrit und Nitrat liegen nach der Behandlung meist unter den Werten, die vor der Behandlung gemessen wurden. In Einzelfällen wurde eine geringfügige Erhöhung der Werte für Ammonium und Phosphat ermittelt.

Die durch CaCl_2 -Auszug des sanierten Bodens ermittelten Werte für Ammonium-N, Nitrit-N und Nitrat-N lagen alle unter den Werten des Ausgangsbodens. Der Phosphor-Gehalt im Boden erhöhte sich durch die Sanierung leicht. Der Stickstoffgehalt im Boden blieb während der Behandlung annähernd unverändert (s. Tabelle 2).

Nach der Behandlung wies der Boden erhöhte Glühverluste auf, verursacht durch das Einbringen von ligninhaltigen Festsubstraten als Nährstoff für den Pilz und zur Auflockerung des Bodens. Der unvollständige Abbau des Pilz/Stroh-Substrates führt ebenfalls zu einer Erhöhung des Glühverlustes. Die Restgehalte an Lignin-Substrat, die der Boden nach der Behandlung aufweist, haben positive Auswirkungen auf ligninolytische Organismen im Boden, die zum weiteren Abbau von Nitroaromaten fähig sind. Auf diese Weise wird auch nach dem Rückbau des Bodens eine weitere Verringerung der Gehalte an Nitroaromaten begünstigt.

4.3.2.3 Analytik auf Begleitkontaminationen

Rüstungsaltslasten weisen häufig neben Kontaminationen an Nitroaromaten weitere Schadstoffe auf. Hierzu gehören Verbindungen, die bei der Herstellung von chemischen Kampfstoffen verwendet wurden, wie z. B. Arsen. Um die zum Betrieb der Anlagen zur Herstellung der Sprengstoffe nötige Energie zu liefern, wurden auf dem Gelände der Rüstungsfabriken meist auch Heizkraftwerke betrieben, deren Emissionen zu einer Verschmutzung des Geländes mit Polyzyklischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) führte. Am Standort „Werk Tanne“ bei Clausthal-Zellerfeld kam die für den Harz typische Belastung mit Schwermetallen hinzu.

Die Gehalte an PAK und Schwermetallen wurden vor und nach der Behandlung mit Weißfäulepilzen im Boden und im Eluat bestimmt. Eine Aufstellung der Ergebnisse ist in der folgenden Tabelle 3 wiedergegeben.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß der Boden aus dem Werk „Tanne“ bei Clausthal-Zellerfeld hohe Gehalte an Schwermetallen und PAK aufweist. Der Arsen-Gehalt im Boden ist nicht auf die Produktion von chemischen Kampfstoffen zurückzuführen, er liegt, wie auch die anderen Schwermetall-Konzentrationen, im Bereich der durchschnittlichen Belastung eines Bodens aus dem Harz.

Vergleicht man die PAK-Konzentrationen im Boden und im Eluat vor und nach der Behandlung des Bodens mit Weißfäulepilzen, so ist ein starker Rückgang (ca. 40 %) der Kontamination zu verzeichnen. Dies zeigt, daß aufgrund der geringen Substratspezifität der ligninolytischen Enzyme der Weißfäulepilze außer den Nitroaromaten auch PAK cometabolisch abgebaut wurden [6; 7].

Tab. 3: Durchschnittliche PAK und Schwermetall-Konzentrationen im Boden vor und nach der Behandlung mit Weißfäulepilzen

Bezeichnung der Bodenproben:	∅ Charge 1 Start 19.06.98	∅ Charge 1 End 26.10.99	∅ Charge 2 Start 29.01.99	∅ Charge 2 End 31.01.00	∅ Charge 3 Start 13.07.99	∅ Charge 3 End 31.01.00
aus dem S4-Eluat bestimmt:						
Quecksilber [mg/l]	0,15	0,25	0,11	0,35	0,11	0,38
Arsen [mg/l]	< 4	5,0	< 4	6,4	< 4	9,3
Blei [mg/l]	57	99	48	140	48	130
Cadmium [mg/l]	0,54	0,60	0,38	0,72	0,38	< 0,2
Chrom ges. [mg/l]	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04
Kupfer [mg/l]	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04	< 0,04
Nickel [mg/l]	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08
Zink [mg/l]	0,034	0,062	0,040	0,084	0,040	0,058
PAK (EPA) [mg/l]	0,33	0,22	0,44	0,28	0,23	0,21
aus dem Königswasser-aufschluß bestimmt:						
Quecksilber [mg/kg TS]	0,71	0,66	0,64	0,61	0,74	0,68
Arsen [mg/kg TS]	7,0	21	9	15	12,0	15
Blei [mg/kg TS]	1500	900	870	970	950	780
Cadmium [mg/kg TS]	3,9	3,7	3,2	2,9	3,7	3,0
Chrom ges. [mg/kg TS]	8,5	18	14	20	8,3	23
Kupfer [mg/kg TS]	110	73	77	60	76	69
Nickel [mg/kg TS]	29	32	31	27	29	27
Zink [mg/kg TS]	940	900	870	770	980	740
an Originalsubstanz bestimmt:						
PAK (EPA) [mg/kg TS]	25	14	27	11	21	17

Die Schwermetall-Gehalte im Eluat stiegen durch den Gefügeaufbruch beim Homogenisieren des Bodens an, die einzelnen Konzentrationen bewegen sich aber weiterhin in einem Bereich,

der eine Gefährdung des Grundwassers ausschließt. Die Schwermetall-Gehalte im Boden gingen im Falle des Quecksilbers, des Bleis, des Cadmiums und des Kupfers zurück; beim Arsen und Chrom erhöhten sich die Werte und beim Nickel blieben die Gehalte im Boden annähernd unverändert. Es zeigte sich, daß die Startwerte der Bodenchargen, die alle aus einem Haufwerk gezogen wurden, eine große Varianz aufwiesen.

Daraus läßt sich auf eine inhomogene Verteilung der Schwermetalle im Boden schließen. Ebenfalls kann die Aufarbeitung zu geringer Probemengen der Bodenmischproben bei inhomogener Verteilung der Schadstoffe im Boden zu Varianzen führen. Tendenziell ist während der Behandlung von Rüstungsaltlasten mit Weißfäulepilzen eine leichte Abnahme des Schwermetall-Gehaltes im Boden zu beobachten, die durch Einbringen des Substrates (2-3 Zugaben von jeweils ca. 2,5 % der Trockensubstanz des Bodens) bedingt ist.

4.3.2.4 Ökotoxikologische Untersuchungen

Die Qualitätsverbesserung des kontaminierten Bodens durch die Behandlung mit Weißfäulepilzen wurde durch verschiedene ökotoxikologische Testmethoden bestätigt. Es wurden vor, während und nach der Sanierung Bodenmischproben entnommen, die im Leuchtbakterien-Hemmtest analysiert wurden. Zum Start und zum Ende der Behandlung wurde eine Beprobung zur Durchführung des Regenwurm-Akutttests vorgenommen.

Leuchtbakterien-Hemmtests

Die Abnahme der Ökotoxizität im Leuchtbakterien-Hemmtest, welche die Böden während der Behandlung mit Weißfäulepilzen aufwiesen, ist in der folgenden Abbildung 4 dargestellt.

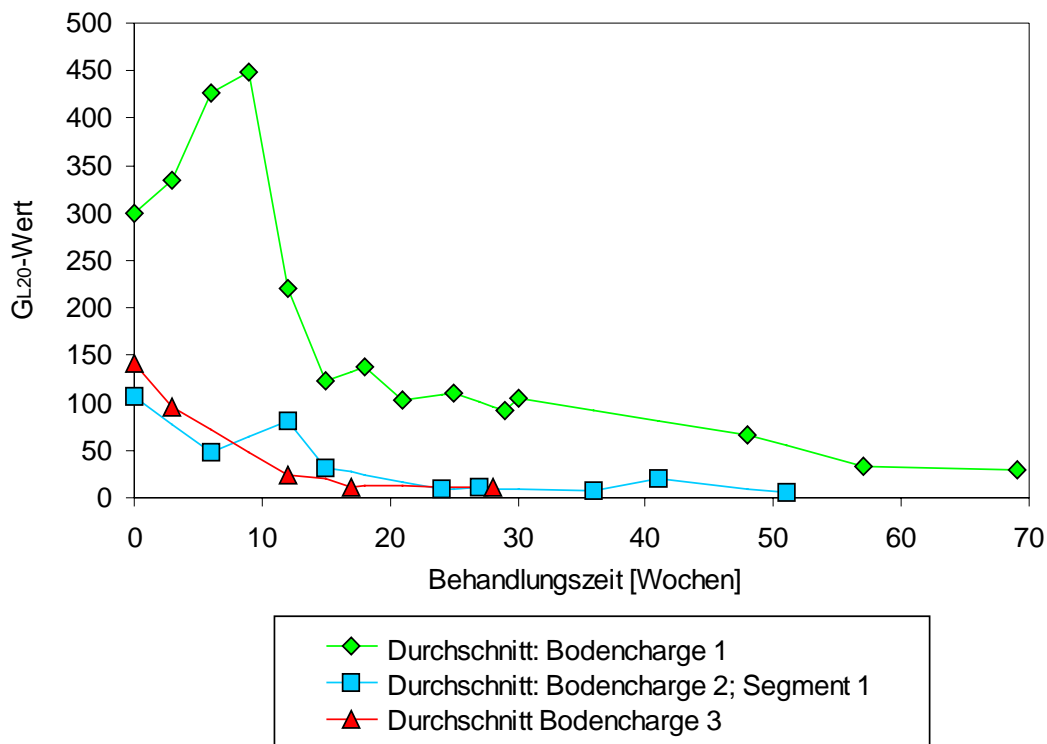


Abb. 4: Ökotoxizität des Bodens im Leuchtbakterien-Hemmtest

Zur Analyse im Leuchtbakterien-Hemmtest wurden jeweils 9 Bodenmischproben eingesetzt, aus denen Eluate nach der DECHEMA-Methode [2] hergestellt wurden. Die Abbildung zeigt die durchschnittlichen G_{L20} -Werte, die zu den einzelnen Probenahmezeitpunkten ermittelt wurden. Die erste Bodencharge wies zu Beginn der Behandlung einen durchschnittlichen G_{L20} -Wert von 299 auf. Die in der ersten Phase der Behandlung gemessenen, höheren G_{L20} -Werte lassen sich durch die inhomogene Verteilung der Nitroaromaten im Boden erklären (vgl. Abb. 3).

In der ersten Bodencharge wurden zu diesen Zeitpunkten auch wesentlich höhere Nitroaromaten-Konzentrationen gemessen. Direkte Rückschlüsse auf die Beeinflussung des Leuchtbakterien-Hemmtests durch die Nitroaromaten-Konzentrationen sind hier möglich, da die Eluatbildung für den Leuchtbakterien-Hemmtest und die Extraktion zur Ermittlung der Nitroaromaten-Konzentration aus denselben Bodenmischproben erfolgte. Während der Behandlung und der anschließenden Lagerung auf der Freifläche gingen die G_{L20} -Werte von 299 auf 30 zurück. Der relativ hohe Endwert der Ökotoxizität läßt sich durch die nach 69 Wochen verbleibende Konzentration an Nitroaromaten von 90 mg/kg TS erklären.

Das Segment 1 der zweiten Bodencharge zeigte zum Versuchsstart einen durchschnittlichen G_{L20} -Wert von 107, der während der 51-wöchigen Behandlung auf $G_{L20} = 5$ sank. Das zweite Segment der zweiten Bodencharge startete mit einem durchschnittlichen G_{L20} -Wert von 91, der sich während der Behandlung mit anschließender Lagerung auf der gesicherten Freifläche auf $G_{L20} = 10$ reduzierte. Der durchschnittliche G_{L20} -Wert der dritten Bodencharge lag zum Behandlungsstart bei 107 und nach 37 Wochen bei Behandlungsende bei 4. Da sich die Werte der drei Segmente der zweiten Bodencharge aufgrund unterschiedlicher Behandlungs- und Lagerungszeiten nicht kombinieren lassen, ist in der Abbildung aus Gründen der Übersichtlichkeit nur das erste Segment der zweiten Charge dargestellt.

Eluate der dritten Bodencharge, die mit Weißfäulepilzen behandelt wurde, zeigten vor der Behandlung durchschnittliche G_{L20} -Werte von 141. Nach der 28-wöchigen Behandlung ging die vom Boden ausgehende Ökotoxizität im Leuchtbakterien-Hemmtest auf einen G_{L20} -Wert von 11 zurück.

Vergleicht man Nitroaromaten-Konzentrationen und G_{L20} -Werte im Leuchtbakterien-Hemmtest, so verhalten sich Böden mit Nitroaromaten-Gehalten über 100 mg/kg TS immer stark toxisch (G_{L20} -Wert > 32). Eine geringe Ökotoxizität (G_{L20} -Wert < 4) ergibt sich erst, wenn die Nitroaromaten-Konzentration unter 20 mg/kg TS gefallen ist.

Regenwurm-Akutttests

Zur Beurteilung der Ökotoxizität im Regenwurm-Akutttest wurden vor und nach der Behandlung mit Weißfäulepilzen aus allen drei Bodenchargen Bodenmischproben entnommen. Die Abnahme der Ökotoxizität ist hier am Beispiel der ersten Bodencharge dargestellt.

Tab. 4: Ökotoxikologische Untersuchung der ersten Bodencharge bei der Behandlung von mit Nitroaromaten belasteten Böden mit Weißfäulepilzen: Mortalität im Regenwurm-Akutttest

	Kontrolle	Startanalytik	Endanalytik
Verdünnung 1+1	0 % Mortalität	100 % Mortalität	1 % Mortalität
Verdünnung 1+5	7 % Mortalität	34 % Mortalität	1 % Mortalität
Verdünnung 1+25	7 % Mortalität	4 % Mortalität	2 % Mortalität

Die Tabelle 4 zeigt die Abnahme der vom Boden ausgehenden Regenwurmtoxizität während der Behandlung mit Weißfäulepilzen. Hierzu wurden zum Zeitpunkt des Versuchsstarts (24.06.98) direkt nach dem Animpfen mit Weißfäulepilzen 9 Bodenmischproben gezogen und zum Regenwurm-Akutttest in Anlehnung an die vom Fraunhofer Institut entwickelte Methode (Frau Dr. Hund-Rinke, pers. Information) eingesetzt. Die Bodenproben wurden nach Homogenisierung in den Verhältnissen 1+1; 1+5 und 1+25 mit Standardboden (Lufa 2.2) gemischt, es wurden von jeder Verdünnungsstufe 3-fach-Ansätze hergestellt. Anschließend wurden jeweils 10 Regenwürmer pro Ansatz inkubiert und die Überlebensrate nach 7 und 14 Tagen ermittelt. Zur Kontrolle diente Standardboden und nicht kontaminierter Standortboden. Aus der Tabelle 4 ist ersichtlich, daß zum Versuchsstart vom Boden in der Verdünnungsstufe 1+1 eine 100 %ige Regenwurmtoxizität ausgeht. Auch bei einer Verdünnung von 1+5 reicht das vom Boden ausgehende toxische Potential aus, um über 30 % der Regenwürmer abzutöten. Erst in der Verdünnungsstufe 1+25 ist zum Versuchsstart eine nur geringe Ökotoxizität im Regenwurm-Akutttest zu beobachten. Zum Zeitpunkt der 9. versuchsbegleitenden Analytik (16.01.99) wurde ein erneuter Regenwurmtest durchgeführt, der in allen Verdünnungsstufen ein mit den unbelasteten Kontrollen vergleichbares Ergebnis von minimaler Regenwurmsterblichkeit aufwies.

Die Untersuchungen ergaben, daß der Regenwurm-Akutttest bei Gehalten an Nitroaromaten über 200 mg/kg TS hohe Regenwurm-Sterblichkeiten zeigte. Lagen die Konzentrationen unter 100 mg/kg TS, so war keine Regenwurm-Sterblichkeit zu verzeichnen, die über die Sterblichkeit in den Kontrollen hinausging.

4.3.2.5 Analyse der Gesamtkeimzahlen und Schimmelpilzsporen im Boden und in der Luft sowie Luftbeprobung auf Mononitroaromaten

Boden

Die Analyse des Bodens auf die Gesamtkeimzahlen und die Zahl der Schimmelpilzsporen diente der Untersuchung des Einflusses der Zugabe von Weißfäulepilzen und Stroh-Substraten auf die natürliche Mikroorganismen-Flora im Boden. Hierzu wurden vor, während und nach der Behandlung Bodenmischproben gezogen, die sofort auf die o. g. Parameter untersucht wurden.

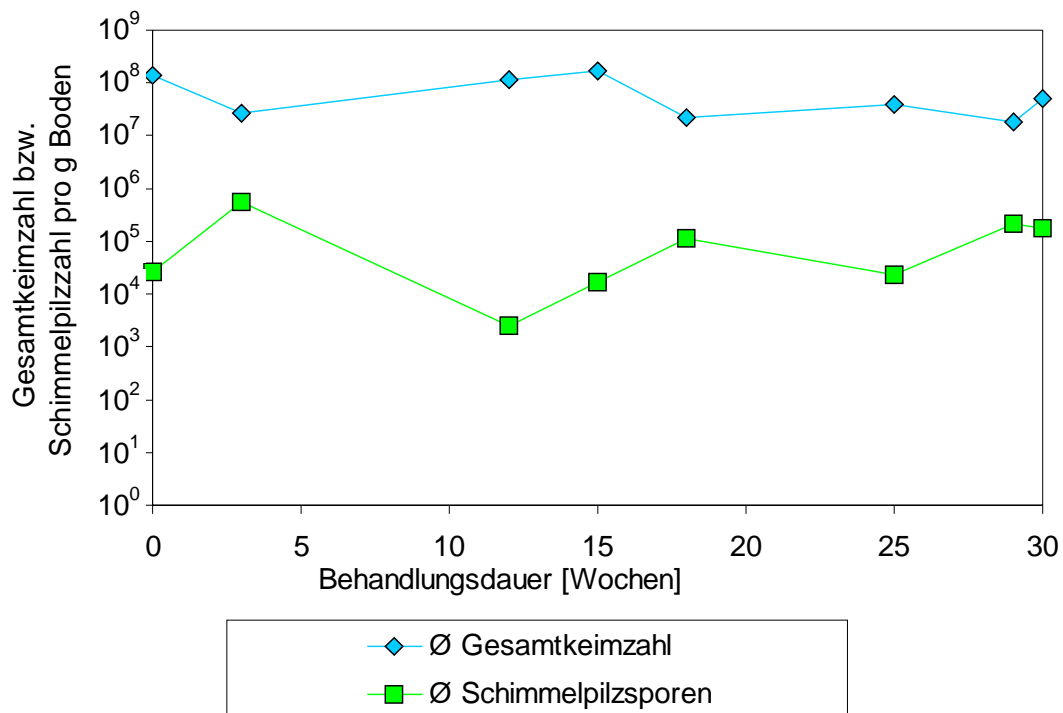


Abb. 5: Gesamtkeimzahlen und Zahl der Schimmelpilzsporen im Boden während der Behandlung von mit TNT kontaminierten Böden mit Weißfäulepilzen (1. Bodencharge in der Miete)

Die Abbildung 5 zeigt die durchschnittlichen Gesamtkeimzahlen (GKZ) und Schimmelpilzzahlen im Boden während der Behandlung der ersten Bodencharge. Hierzu wurden zum Termin des Mietenaufbaus und zu sieben weiteren Zeitpunkten jeweils 9 Bodenmischproben gezogen, die auf die entsprechenden Keime untersucht wurden. Aus den ermittelten Werten wurde für jeden Beprobungszeitpunkt der Mittelwert gebildet. Die Schwankungen der GKZ und Schimmelpilzzahlen innerhalb der pro Beprobungszeitpunkt gezogenen Proben waren nur gering. Aus der Abbildung ist erkennbar, daß auch im Verlauf der Behandlung die GKZ und Schimmelpilzzahlen nur in geringem Maße schwanken und daß Zahl und Verhältnis von GKZ und Schimmelpilzzahlen den im Boden in der Natur herrschenden Verhältnissen gleichen. Es zeigte sich also, daß die Bodenflora der mit Nitroaromaten belasteten Böden durch die Behandlung mit Weißfäulepilzen nicht wesentlich beeinflußt wurde.

Luft

Die Mieten-, Hallen- und Außenluft (Kontrolle) wurde auf Gesamtkeime und Schimmelpilze analysiert (s. Abb. 6). Luftproben, die ebenfalls regelmäßig über der Bodenmiete, in der Behandlungshalle und vor der Halle gezogen wurden, ergaben bei einer Analytik auf Mononitroaromaten bei einem Probenvolumen von jeweils 20 l nie meßbare Gehalte dieser Substanzen. Die Nachweisgrenze lag bei diesem Probenvolumen bei $10 \mu\text{g pro m}^3$. Diese Beprobungen dienten insbesondere während der Umlagerung des Bodens zur Abschätzung des über den Luftpfad vom Boden ausgehenden Gefährdungspotentials für die in der Behandlungshalle arbeitenden Personen.

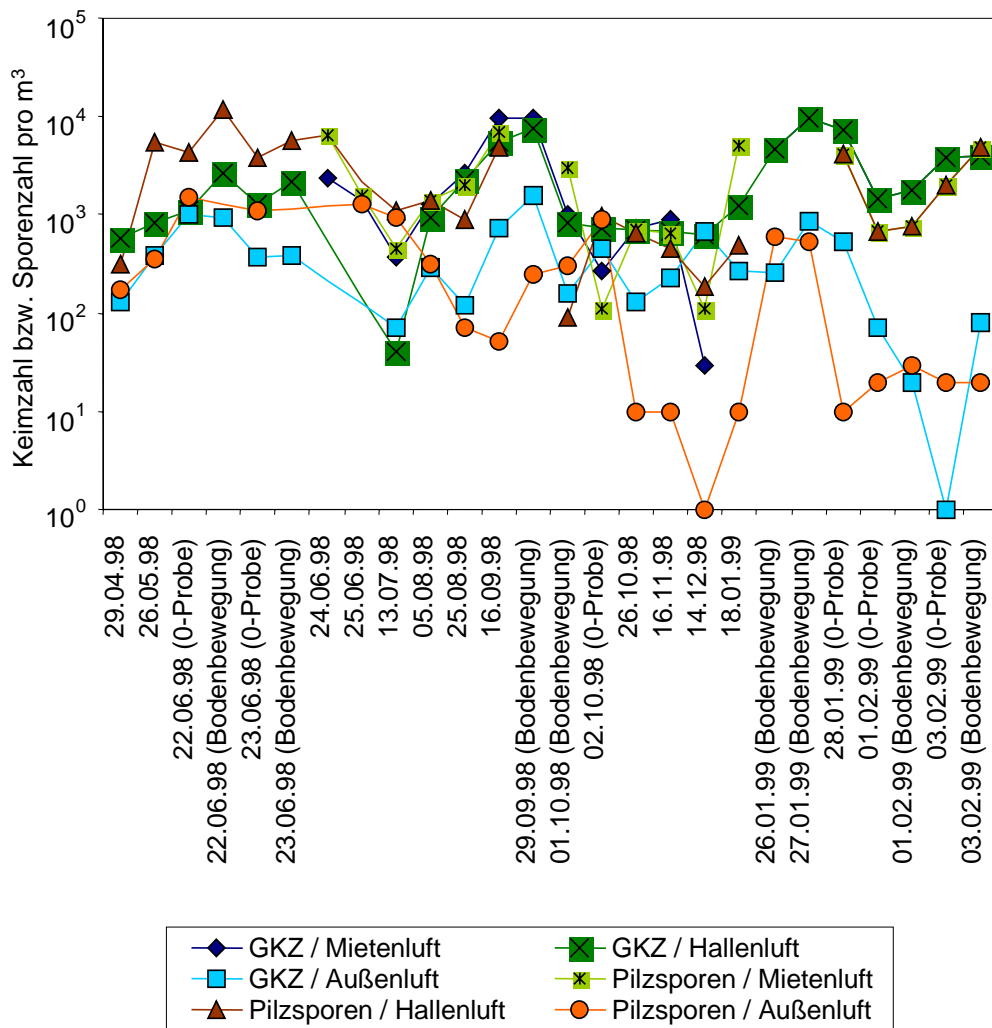


Abb. 6: Gesamtkeimzahlen und Pilzsporen während der 1. Bodenbehandlung durch Weißfäulepilze

Abbildung 6 zeigt die Gesamtkeimzahl und die Anzahl der Pilzsporen pro m^3 während des Aufbaus der Miete, der Vorbereitung des Biobeetes und der Behandlung des Bodens mit Pilzen. Am 29.04.98 wurde der Mietenaufbau fertiggestellt. Anschließend wurde eine dünne Lage Stroh in der Miete ausgebreitet (29.05.98). In der Zeit der Bodenbewegung am 22. und 23.06.98 wurde jeweils eine Messung vor Beginn der Arbeiten und eine während des schichtweisen Einbringens von Boden und Pilz-Stroh-Substrat in die Miete genommen.

Die Messungen am 24. und 25.06. markieren den Beginn der Behandlung, anschließend wurden in dreiwöchigen Abständen Messungen durchgeführt. Vom 28.9.-1.10.98 wurde der Boden homogenisiert und mit Pilz/Stroh-Substrat nachgeimpft. Die Auslagerung der ersten Bodencharge erfolgte vom 25.01.-27.01.99. Die Analysen der Luft in der Einhausung der Miete und in der Halle zeigten, daß sich die Keimzahlen nur bei Bodenbewegung erhöhten, allerdings in einem vertretbaren Rahmen. Während der Behandlung blieben die Zahlen der Gesamtkeime (GKZ) und Schimmelpilze auf niedrigem Niveau konstant. Die Außenluft (5 m vom Eingangstor entfernt in Brusthöhe gemessen) wurde durch die Ein-, Aus- und Umlagerungsaktionen nicht beeinflusst.

Temperaturmessung

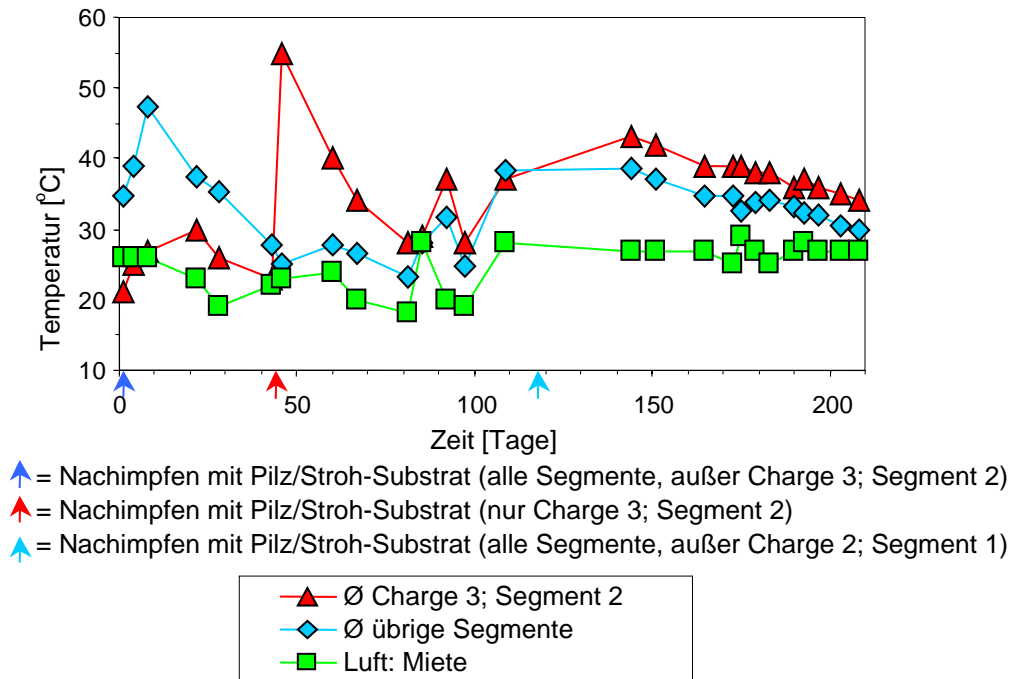


Abb. 7: Temperaturentwicklung in den Mietensegmenten während der Behandlung der 2. und 3. Bodencharge mit Pilzen

Während der gesamten Behandlung der drei Bodenchargen wurden in regelmäßigen Abständen die Temperaturen der Hallenluft, in der Einhausung und im Boden gemessen. Um die Effekte aufzuzeigen, die das An- bzw. Nachimpfen mit Pilz/Stroh-Substrat auf die Mietensegmente hat, wird hier exemplarisch die Entwicklung während der Behandlung der zweiten und dritten Bodencharge vorgestellt.

Das Zeitfenster der Abbildung 7 beginnt mit dem Nachimpftermin für die 2. Bodencharge und dem Animpftermin für die 3. Bodencharge. Das Segment 2 der 3. Bodencharge wurde nach 43 Tagen mit Pilz/Stroh-Substrat angeimpft. Die Miete wurde anfänglich nicht künstlich beheizt, es erfolgte lediglich eine Beheizung vom 81. bis zum 88. Tag (s. Temperaturerhöhung der Mietenluft). Die Kurvenverläufe zeigen, daß nur durch Beimpfen mit Pilz/Stroh-Substrat eine durch den Metabolismus der Pilze bedingte Temperaturerhöhung in der Miete stattfindet. Durch das Beheizen der Miete für eine Woche konnte keine ähnliche Temperaturerhöhung, wie beim Animpfen mit Pilz/Stroh-Substrat erzielt wurde, erreicht werden. Vom Tage 100 an erfolgte eine kontinuierliche Beheizung (Winterperiode), die zusammen mit den Nachimpfterminen vom 117. bis 119. Tage eine längerfristige, gleichmäßige Temperaturerhöhung bewirkte.

5 Übertragbarkeit / Anwendung

Die erfolgreiche biologische Behandlung von Rüstungsaltslasten mit Weißfäulepilzen im Pilotmaßstab hat gezeigt, daß das Weißfäulepilzverfahren eine Alternative zu den bisher üblichen Sanierungs- und Entsorgungsmethoden (thermische Behandlung, Bodenwäsche und

Deponierung) darstellt. Das Weißfäulepilzverfahren zeichnet sich dadurch aus, das Böden besonders schonend saniert werden, da nur geringe Substratmengen zugegeben werden und sich die Temperatur während der Behandlung nur kurzfristig erhöht, ohne ein keimtötendes Niveau zu erreichen.

Die Untersuchungen zur Gesamtkeimzahl und Schimmelpilzzahl zeigen, daß sich die Zahlen der Mikroorganismen im Boden während der Behandlung mit Weißfäulepilzen nur unwesentlich ändern. Der Boden behält also seine natürliche Lebensraum-Funktion bei und wird durch die Sanierung lediglich detoxifiziert, wie die ökotoxikologischen Begleituntersuchungen (Regenwurm-Akutttest, Leuchtbakterien-Hemmtest) zeigen.

Die Übertragbarkeit der Experimente auf die großtechnische Anwendung war Voraussetzung für dieses Pilotprojekt. Für die Umsetzung des Weißfäulepilz-verfahrens ist ein on-site-Verfahren denkbar. Eine für das Wachstum des Pilzes günstige Temperatur stellt sich während der Sommermonate durch Zugabe von aktivem Pilz/Stroh-Substrat ohne künstliche Beheizung ein. Aus diesem Grunde wurde bei der Simulation des Verfahrens nach Möglichkeit auf eine Beheizung der Behandlungshalle verzichtet. Lediglich für die Behandlung während der Wintermonate, die in der großtechnischen Anwendung nicht geplant ist, die aber für die Erprobung aus Zeitgründen notwendig war, erfolgte eine künstliche Temperaturerhöhung.

Mit dem Weißfäulepilzverfahren ist eine Reduktion der Nitroaromaten-Konzentrationen bis zu 99,7 % möglich. Bei Ausgangsgehalten von 370 mg/kg TS bis 4600 mg/kg TS wurden durch die Behandlung Endkonzentrationen von 15 mg/kg TS bis 90 mg/kg TS erreicht. Die sanierten Böden könnten entweder am Standort zur Rekultivierung eingesetzt werden oder auf Flächen mit unsensibler Nutzung für Maßnahmen der Landschaftsplanung verwendet werden. Hochkontaminierte Böden mit Nitroaromaten-Belastungen > 1000 mg/kg TS können durch die Behandlung mit Weißfäulepilzen auf ein Niveau saniert werden, die eine Verwendung im Deponiebau oder zur Haldenrekultivierung erlaubt. Durch die schonende Behandlung des Bodens ist eine unmittelbar nachfolgende Bepflanzung sanierter Böden möglich.

6 Formeln und Abkürzungen

°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAL-Auszug	Auszug durch Extraktion mit einer Mischlösung aus Calciumacetat und Calciumlactat
CO ₂	Kohlendioxid
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
EPA	Environmental Protection Agency (Amerikanische Umweltbehörde)
g	Gramm
GKZ	Gesamtkeimzahl

GL ₂₀ -Wert	Verdünnungsstufe, die eine 20 %ige Hemmung im Leuchtbakterien-Hemmtest bewirkt
HPLC	High Performance liquid chromatography
IABG	Industrieanlagen-Betriebsgesellschaft mbH, Berlin
kg	Kilogramm
KW	Kalenderwoche
l	Liter
LAWA	Länderarbeitsgemeinschaft Wasser
Lufa	Landwirtschaftliche Untersuchungs und Forschungsanstalt, Speyer
mg	Milligramm
MS	Massenspektrometrie
Ø	Durchschnitt
o.g.	oben genannt
PAK	Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe
S4-Eluat	Eluat nach DIN 38414 S4
t	Tonne
TNT	Trinitrotoluol
TS	Trockensubstanz

7 Eigene Veröffentlichungen und Diplomarbeiten

Abken, H.-J., Spreinat, A., Gottschalk, G. (1998): Abbau von Nitroaromaten durch Pilze. In: Verbundvorhaben „Langzeit und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen“; Tagungsband zum Statusseminar; Umweltbundesamt (Hrsg.) M 1-8

Abken, H.-J. (1998): Sanierung von Rüstungsaltslasten durch Weißfäulepilze-Schadstoffbilanzierung und Qualität des sanierten Bodens. In: Verbundvorhaben „Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten“; Tagungsband zum 4. Statusseminar; Umweltbundesamt (Hrsg.): G 1-22

Eilers, A. (1997): Abbau von TNT durch *Bjerkandera adusta* unter Beteiligung von Cytochrom P-450 und Entwicklung eines biologischen Verfahrens zur Sanierung TNT-belasteter Böden. Dissertation, Göttingen 1996, Cuvillier Verlag Göttingen.

Eilers, A. (1997): Entwicklung eines Kompostierungsverfahrens mit Pilzen. In: Verbundvorhaben „Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten“; Tagungsband zum 3. Statusseminar; Umweltbundesamt (Hrsg.): I 1-6

Eilers, A., Rüngeling, E., Stündl, U. M.; Gottschalk, G. (1999): Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* DSM 3375 depends on cytochrome P-450. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 75-80

Spreinat, A. (1998): Maßstabsgerechte Erprobung: „Weißfäulepilzverfahren“ In: Verbundvorhaben „Biologische Verfahren zur Bodensanierung“; Tagungsband zum Statusseminar; Umweltbundesamt (Hrsg.): 71-77

Abken, H.-J. (1999): Biologische Verfahren zur Sanierung von Rüstungsaltslasten: „Entwicklung eines Kompostierungsverfahrens mit Pilzen - Bilanzierung und Qualitätskontrolle. Abschlußbericht: TIB Hannover

Spreinat, A., Abken, H.-J., Tölle, K., Gottschalk, G. (1998): Sanierung von Rüstungsaltslasten durch Pilze. Terratech 3, 46-49

8 Literaturverzeichnis

1. **Abken, H.-J.** (1999): Biologische Verfahren zur Sanierung von Rüstungsaltslasten: „Entwicklung eines Kompostierungsverfahrens mit Pilzen - Bilanzierung und Qualitätskontrolle. Abschlußbericht: TIB Hannover
2. **Ad-hoc-Arbeitsgruppe** „Methoden zur toxikologischen / ökotoxikologischen Bewertung von Böden (1995) In: Biologische Testmethoden für Böden. DECHEMA, Frankfurt
3. **Bumpus, J. A. and Tartarko, M.** (1994): Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium*: Identification of initial degradation products and the discovery of a TNT metabolite that inhibits lignin peroxidase. Curr. Microbiol. 28: 185-190.
4. **Eilers, A.** (1993): Metabolisierung von 2,4,6-Trinitrotoluol durch *Bjerkandera adusta* und andere Weißfäulepilze. Diplom-Arbeit, Universität Göttingen
5. **Eilers, A.** (1997): Abbau von TNT durch *Bjerkandera adusta* unter Beteiligung von Cytochrom P-450 und Entwicklung eines biologischen Verfahrens zur Sanierung TNT-belasteter Böden. Dissertation, Göttingen 1996, Cuvillier Verlag Göttingen.
6. **Eschenbach, A., Kästner, M., Mahro, B.** (1995): Microbial PAH-degradation in soil material from a contaminated site. Mass balance experiments with *pleurotus ostreatus* and different ¹⁴C-PAH, p. 377-378. In: Van den Brink W. J., Bosmann R., Arendt F. (ed.): Contaminated soils. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
7. **Field, J. A., de Jong, E., Feijoo Costa, G., de Bont, J. A.** (1992): Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. Appl. Environ. Microbiol. 58 (7): 2219-2226
8. **Michels, J.** (1994): Abbau von 2,4,6-Trinitrotoluol durch den Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium*. Dissertation, Göttingen 1993, Cuvillier Verlag Göttingen.

9. **Michels, J. and Gottschalk, G.** (1994): Inhibition of the lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* by hydroxylamino-dinitrotoluene, an early intermediate in the degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. Appl. Environ. Microbiol. 60: 187-194.
10. **Scheibner, K., Hofrichter, M., Herre, A., Michels, J., Fritsche, W.** (1997): Screening for fungi intensively mineralizing 2,4,6-trinitrotoluene. Appl. Microbiol. Biotechnol. 47: 452-457.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.6 Verbundvorhaben 7: Biologische Sanierung von Kohlenwasserstoffaltlasten

9.6.1 Untersuchung zum mikrobiellen in-situ-Abbau von CKW (TV 7.1)

D. Bohlen¹
Dr. T. Held²

¹Hessische Industriemüll GmbH, Bereich Altlastensanierung,
Kreuzberger Ring 58, 65205 Wiesbaden

²ARCADIS Trischler & Partner GmbH,
Berliner Allee 6, 64295 Darmstadt

Förderkennzeichen: 1481079

Laufzeit: 01.10.1996 – 28.02.1999

1 Zusammenfassung

1,1,1-Trichlorethan (TCA) spielt neben Tetrachlorethen (PCE) und Trichlorethen (TCE) als Kontaminant eine bedeutende Rolle. Die analytische Überwachung hydraulischer Sicherungsmaßnahmen an einem mit Kohlenwasserstoffen, aromatischen Kohlenwasserstoffen und CKW kontaminierten Standort haben ergeben, daß PCE und TCE einem vergleichsweise raschen natürlichen Abbau mit Bildung der Metabolite *cis*-1,2-Dichlorethen (cDCE) und Vinylchlorid (VC) unterliegen, während TCA weitgehend persistent ist. Im F+E-Vorhaben wurde untersucht, inwieweit der mikrobielle in-situ-Abbau beschleunigt werden kann. Als bevorzugtes Verfahren wurde dabei ein kometabolischer sequentieller anaerob-aerob-Prozeß angestrebt, bei dem im anaeroben höher chlorierte CKW transformiert und im aeroben die Metabolite mineralisiert werden. Die unterschiedlichen Phasen sind dabei anstatt räumlich hier zeitlich getrennt.

Unter Einstellung geeigneter anaerober Milieubedingungen konnte ein effizienter Abbau von PCE, TCE und TCA in Versuchsansätzen zur Simulation von in-situ-Sanierungsverfahren (In-Situ-Box) erreicht werden. Die Adaptationsphase ist für PCE und TCE kurz, für TCA beträgt sie jedoch oft bis zu mehreren Wochen. TCA wurde anaerob vollständig abgebaut. Als Metabolit trat 1,1,-Dichlorethan (DCA) auf. Chlorethan akkumulierte nicht. Toxische Effekte der CKW auf die Mikroorganismen konnten in dem gewählten Konzentrationsbereich nicht festgestellt werden.

Den Übergängen der einzelnen Milieu-Phasen „Anaerob ↔ Aerob“ kommt bei dem angestrebten Verfahren eine besondere Bedeutung zu. Die Übergänge sind prinzipiell ohne eine signifikante Schädigung der anaeroben Mikroflora möglich. Während eine Anaerobisierung relativ rasch zu erreichen ist, erfordert die Aerobisierung deutlich mehr Zeit und einen hohen Einsatz an Elektronenakzeptoren. Der Milieuübergang ist vorteilhaft im Hinblick auf eine Veränderung der hydraulischen Durchlässigkeit. Während reine anaerobe Bedingungen und die Infiltration von Auxiliarsubstraten (C-Quelle zum cometabolischen CKW-Abbau) zu einer Abnahme der Durchlässigkeit und zu einer Abnahme der Versorgungseffizienz führte, verursachten Milieuübergänge stets eine Wiederzunahme der Durchlässigkeit in der aeroben Phase. Negative Effekte, wie z.B. die Mobilisierung von bodengebundenen Metallen in der anaeroben Phase wurden nicht beobachtet. Das unter anaeroben Bedingungen gebildete Methan war aber nicht ausreichend, um nach einem Übergang zu aeroben Bedingungen als Induktor des aeroben CKW-Abbaus dienen zu können. Höhere Konzentrationen an Auxiliarsubstraten mußten wegen der Gefahr der Bildung von Methan-Gasblasen vermieden werden.

Mit der verwendeten, vom CKW-kontaminierten Standort isolierten Mikroflora konnte bereits in der anaeroben Phase eine vollständige Mineralisierung der CKW erreicht werden. Bei in-situ-Verfahren spielen kinetische Parameter eine nicht so große Rolle wie bei Bioreaktorverfahren. In-situ-Verfahren werden in der Regel von Stoffübergängen und Transportgeschwindigkeiten limitiert. Daher lassen die Ergebnisse den Schluß zu, daß die CKW unter rein anaeroben Bedingungen mineralisiert werden können, wobei die Auxiliarsubstrate gepulst dosiert werden sollten. Durch ein intensives Monitoring und eine darauf abgestimmte Steuerung der Maßnahme können verfahrenstechnische Probleme (CH₄-Gasblasen, massive Biomassenbildung) vermieden werden. Eine aerobe Nachbehandlung („Schönung“) kann die Grundwasserqualität weiter verbessern.

2 Einleitung

Neben den am meisten als Umweltkontamination angetroffenen Mineralölkohlenwasserstoffen (MKW) stellen chlorierte Kohlenwasserstoffe (CKW) ebenfalls eine häufige Kontaminationsquelle dar. Allein in Deutschland wird die Zahl von kontaminierten Verdachtsflächen auf insgesamt ca. 190.000 geschätzt (Stand 1997). Marschner [17] gibt für die Bundesrepublik Deutschland eine Häufigkeit von 22 % CKW-Kontaminationen im Boden an. In der US-EPA-Liste der 129 wichtigsten Umweltschadstoffe stellen die halogenierten aliphatischen und aromatischen Verbindungen mit 54 % die Mehrheit der verzeichneten Stoffe dar. Die Verbindung 1,1,1-Trichlorethan (TCA) gehört zu den am häufigsten in mit Lösungsmittel kontaminierten Grundwässern nachgewiesenen Substanzen. Dies ist z.T. mit den hohen Produktionszahlen erklärbar: 680.000 t in 1988 [4; 21].

Der Anwendungsbereich von TCA umfaßte Metallreinigung (Kaltreiniger), Lösemittel zur Dampffentfettung, Verwendung als Lösungsmittel in verschiedenen Formulierungen wie Adhessive, Farben, Polituren, Klebstoffe, Tinten, Trockenreinigungsmittel u. ä.. Ferner wurde es vielen flammbaren Lösungsmitteln zugesetzt, um den Entflammungspunkt herabzusetzen. Es wurde auch als Kühlmittel oder Schmierstoff-Carrier sowie als Bestandteil von Metallschneideölen verwendet.

TCA wurde wegen seiner Stoffeigenschaften sehr schnell in die Umwelt eingetragen. In Böden ist TCA mobil und wird somit leicht in das Grundwasser ausgewaschen. Das nicht-karzinogene TCA weist eine akute Toxizität auf. Mit Beginn der 90er Jahre wurde TCA daher in Deutschland nach und nach in verschiedenen Verwendungen verboten und ist seit 1993 auf dem deutschen Markt nicht mehr vertreten.

Die Sanierung von CKW-Kontaminationen beschränken sich heute noch weitgehend auf chemisch-physikalische Verfahren (Bodenluftabsaugung, Airsparging, *pump-and-treat*). Ein *pump-and-treat*-Verfahren kann mehrere Jahrzehnte beanspruchen und ist daher nur zur Sicherung, nicht aber zur Sanierung geeignet [24; 6]. Die Biodegradation der aliphatischen halogenierten Kohlenwasserstoffe wird seit Anfang der 60er Jahre intensiv erforscht. Erst in jüngerer Zeit wurden Untersuchungen bekannt, die den vollständigen Abbau von CKW im Aquifer belegen [2; 3; 8; 18].

Wegen des elektronegativen Charakters der Chlor-Substituenten sind höher chlorierte Verbindungen wie PCE, TCE oder TCA weniger empfindlich gegen Oxidation; sie werden eher reduziert. Allgemein gilt: Je höher der Chlorierungsgrad, desto wahrscheinlicher und effizienter ist die Reduktion; je geringer der Chlorierungsgrad desto effizienter ist die Oxidation. Mit abnehmendem Chlorierungsgrad nimmt die Verflüchtigung zu und die Sorption an Bodenmaterial ab. Beim Abbau der chlorierten C₂-Alkene und -Alkane können drei Abbautypen (anaerob oder aerob) unterschieden werden:

- Produktiver Abbau (Verwertung als C- und Energiequelle)
- Cometabolischer Abbau
- Dehalorespiration (anaerobe Chloratmung)

Ein produktiver Abbau ist nur bei wenigen der betrachteten Verbindungen möglich (z.B. aerober Abbau von VC). Hauptabbauwege sind anaerobe cometabolische Dechlorierung mit sukzessiver Abspaltung jeweils eines Chloratoms sowie aerobe cometabolische Oxidierung. Diese verläuft nach bisheriger Kenntnis stets über die Bildung von Epoxiden, die spontan zu

einfach abbaubaren chlorierten und nichtchlorierten Verbindungen zerfallen. Daneben ist ein abiotischer Zerfall der meisten chlorierten Verbindungen möglich. In jüngster Zeit wurden sogar Bakterien entdeckt, die CKW als terminalen Elektronenakzeptor im Zuge der Gewinnung metabolischer Energie nutzen können [13; 14; 20; 16; 10; 9]. Details zum Abbau unter anaeroben und aeroben Bedingungen sowie zu dessen Regulierung finden sich u.a. bei Ahlert u. Enzminger [1]; Doong u. Wu [5]; Klecka et al. [15]; Vogel u. McCarty [23], bzw. zusammengefasst bei Held [11]. Die Abbausequenz von TCA ist in Abbildung 1 gezeigt.

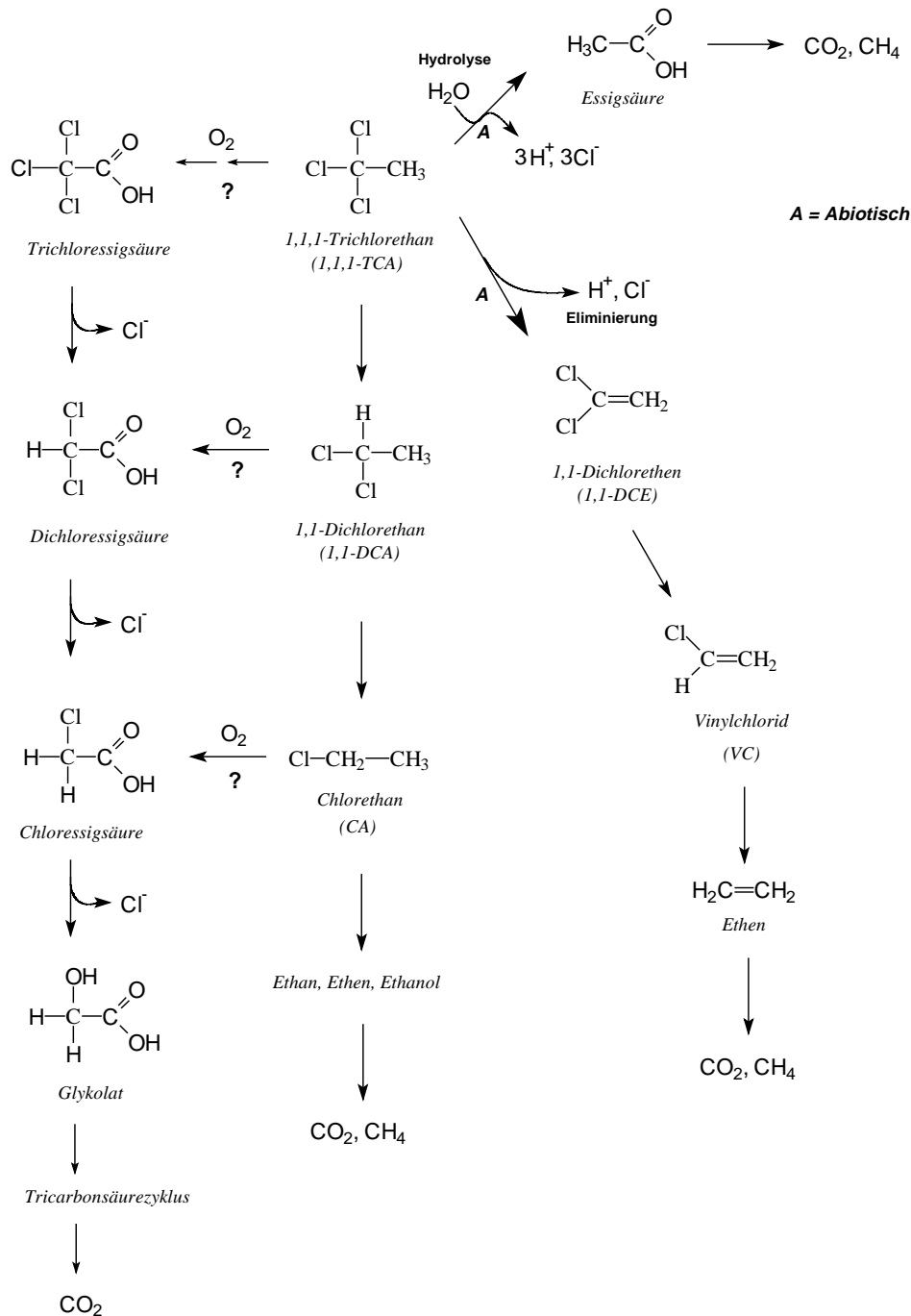


Abb. 1: Hypothetische anaerobe, aerobe und abiotische Abbausequenz von 1,1,1-Trichlorethan

Entwicklungen zur Mineralisierung von CKW beziehen sich insbesondere auf Reaktorverfahren. Da hierbei die Behandlungsdauer stark mit den Kosten korreliert, wurde ein zweistufiges Verfahren entwickelt, bei dem im anaeroben höherchlorierte CKW transformiert und im aeroben die entstandenen niederchlorierten CKW mineralisiert werden. Die Übertragung dieses Verfahrens auf in-situ-Maßnahmen ergab ein Verfahren, bei dem die CKW im Abstrom von dem Schadenszentrum behandelt werden. Durch verschiedene Infiltrationen werden Bereiche anaerober und aerober Milieus etabliert, die räumlich getrennt sind.

3 Zielsetzung

Wegen der am Untersuchungsstandort sowie an vielen anderen Standorten gegebenen Randbedingungen lassen sich in-situ räumliche anaerob-aerob-Sequenzen oft nicht realisieren. Die Besonderheit des designierten Verfahrens sollte daher in der Realisierung von zeitlichen anaerob-aerob-Sequenzen, die den in-situ-Abbau von CKW forcieren, liegen. Bei der zeitlichen Sequenz wird an ein und demselben Ort in zeitlicher Abfolge zunächst ein anaerobes Milieu und anschließend ein aerobes Milieu durch Infiltration unterschiedlicher Supplemente induziert. Zwischen den einzelnen Phasen ist jeweils eine Infiltrationspause erforderlich, in der Reste der zudosierten Nährstoffe der vorangegangenen Phase aufgebraucht werden, so daß es nicht zu einer Art "metabolischem Kurzschluß" kommt. Während der anaeroben Intervalle wurde eine Transformation der höher chlorierten CKW zu niederchlorierten Metaboliten und in den aeroben Phase eine Mineralisation der entstandenen Metabolite erwartet. Gleichzeitig sollte das für den cometabolischen Abbau zugesetzte Auxiliarsubstrat anaerob zu Methan degradiert werden, welches nach Übergang zu einem aeroben Milieu als Auxiliarsubstrat für die aerobe CKW-Oxidation genutzt werden kann (Abbildung 2). Durch dieses Verfahren sind nicht nur räumliche Einschränkungen überwindbar, sondern es ist auch eine kürzere Sanierungsdauer zu erwarten.

Nachteilig ist, daß über vergleichsweise schnelle Wechsel verschiedener Milieubedingungen im Aquifer nahezu nichts bekannt ist. Insbesondere spielt dabei eine Rolle, inwieweit sich methanogene Bedingungen nach einer aeroben-Phase entwickeln können. Von wesentlicher Bedeutung dürfte hierbei das Vorliegen von anaeroben Mikrokompartimenten unter sonst aeroben Bedingungen im Aquifer sein. Ausgehend von solchen Mikrokompartimenten kann sich zu Beginn einer anaeroben-Phase schnell eine anaerobe Mikroorganismen-Population entfalten. Anaerobe Mikrokompartimente sind möglicherweise unerlässlich für das Überleben obligat anaerober Keime bei dem zeitlich sequentiellen Verfahren. Fakultativ anaerobe Keime können problemlos durch jeweilige Anpassung des Stoffwechsels überleben. In welchem Umfang diese Keime zur anaeroben Dechlorierung beitragen, ist allerdings noch ungeklärt.

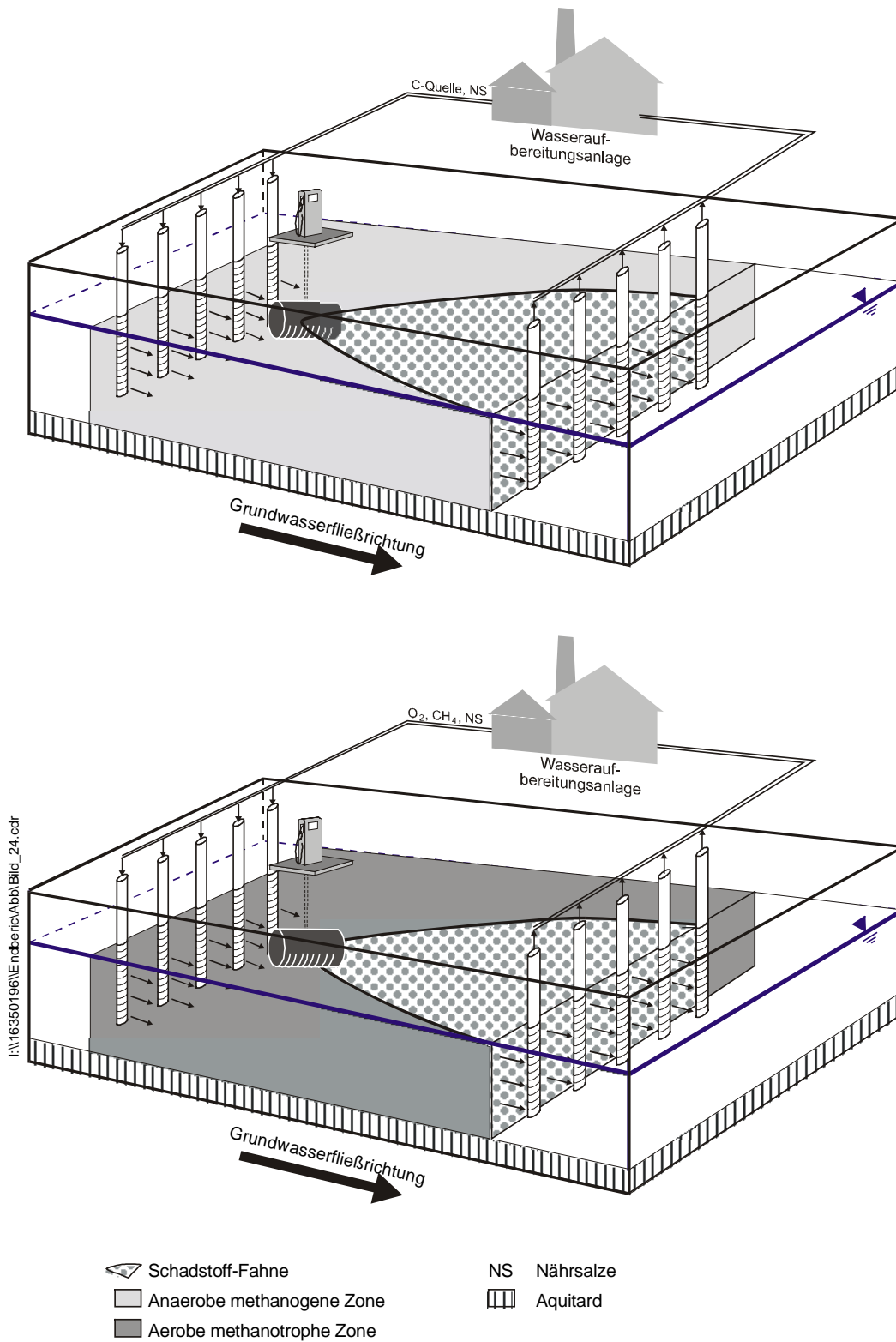


Abb. 2: Verfahrensschema des zeitlichen sequentiellen Prozesses zum mikrobiellen in-situ-Abbau von halogenierten C_2 -Alkenen und -Alkanen

Die Untersuchungen sollten in verschiedenen Untersuchungsmaßstäben durchgeführt werden und folgende Fragestellungen behandeln:

- Optimierung der Transformationskinetik von TCA
- Prüfung verschiedener C-Quellen, Milieubedingungen
- Nachweis und Effizienz anaerober Mikrokompartimente
- Einfluß der Milieuwechsel
- Isolierung von Anreicherungskulturen
- Quantifizierung CKW-transformierender Enzyme
- Verfahrensimulation im Labormaßstab

Als Gesamtziel stand die Entwicklung eines mikrobiologischen Verfahrens zum in-situ-Abbau von CKW (und insbesondere von TCA) im Vordergrund, das sowohl bei dem Untersuchungsstandort als auch bei anderen Standorten nach entsprechender Vorprüfung einsetzbar ist.

4 Untersuchungsmethoden

Die verwendeten Methoden umfaßten neben den üblichen mikrobiologischen Techniken insbesondere Abbauuntersuchungen in verschiedenen Maßstäben unter Verwendung von CKW-kontaminiertem Originalboden vom Standort. Wegen der seit mehr als 40 Jahren andauernden Kontamination war davon auszugehen, daß die autochthone Mikroflora ein hohes CKW-Abbaupotential besaß. Der Boden wurde konditioniert und in Glassäulen eingefüllt. Das Verfahrensschema des Säulenversuchs ist in Abbildung 3 gezeigt.

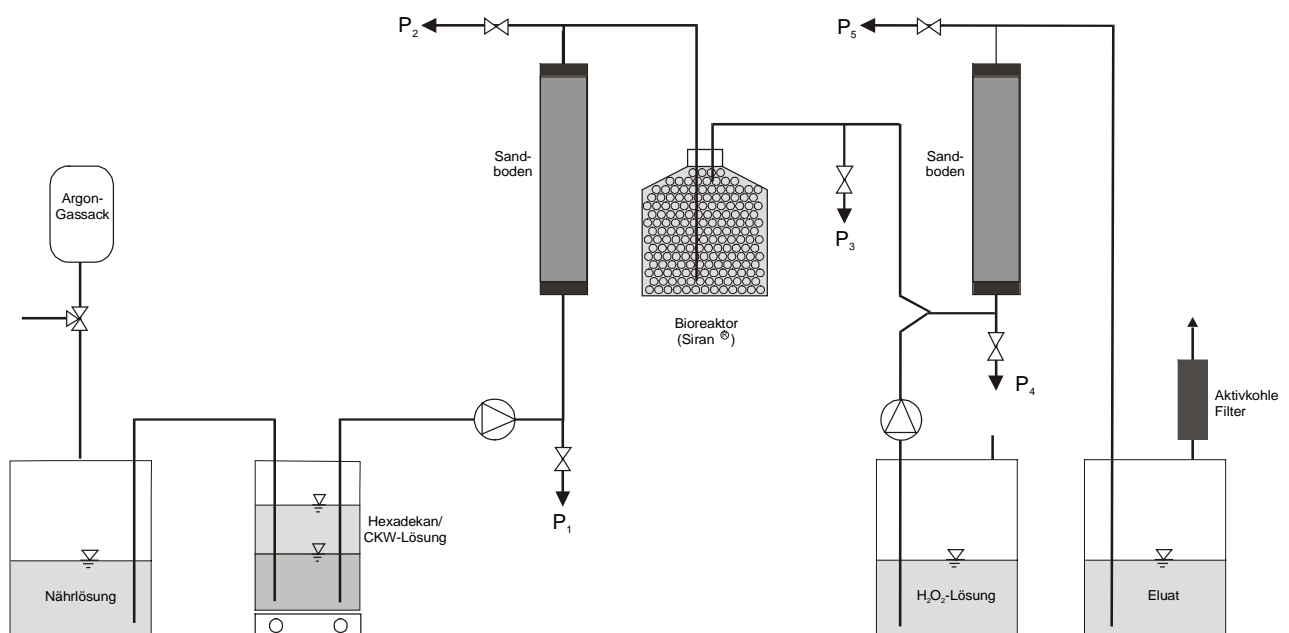


Abb. 3: Verfahrensschema der Säulenversuche mit Standortboden

Eine der Säulen wurde anaerob betrieben. Hierzu wurde eine geeignete Nährlösung, die mit CKW in der Dosiereinheit durch Lösung aus einer Hexadekanphase aufdotiert wurde [22], mit Hilfe einer Peristaltikpumpe infiltriert. Das Eluat der Säule passierte einen Bioreaktor mit Glaskugeln als Trägermaterial. Durch Zumischung hochkonzentrierter H_2O_2 -Lösung konnten in der zweiten Säule aerobe Bedingungen eingestellt werden. Das Versuchssystem entspricht in dieser Form einer räumlichen anaerob-aerob-Sequenz.

Die eigentliche Verfahrenssimulation wurde in der In-Situ-Box durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen oberflächenversiegelten Aluminiumbehälter. Die Box ist mit einem Einlauf- und Auslaufanschluß sowie 6 bis zur Tiefenmitte reichenden Stellen zur Entnahme von Prozeßwasserproben versehen. Der Auslauf führt in einen Zwischenbehälter. Dort wird das Eluat mit dem Prozeßwasser vermischt und dann als Infiltrationslösung wieder infiltriert. Das Verfahrensschema der In-situ-Box ist in Abbildung 4 gezeigt. Alle Schraubverbindungen, Anschlüsse und Leitungen bestehen aus Teflon. Die Box wurde mit Standortboden verfüllt. Am Auslauf der Box ist ein Niveaugefäß installiert. Der Luftraum des Niveaugefäßes war mit einem Argon-gefüllten Luftbeutel (Lindebeutel) verbunden und weist somit einen Druck vergleichbar dem Außenluftdruck auf. Ausgasungen, z.B. von in der In-situ-Box gebildetem Methan führen lediglich zu einer Ausdehnung des Lindebeutels und haben daher keinen Einfluß auf den Druck. Ein in der Infiltrationsleitung installierter Manometer dient zur Erfassung von Veränderungen der hydraulischen Durchlässigkeit.

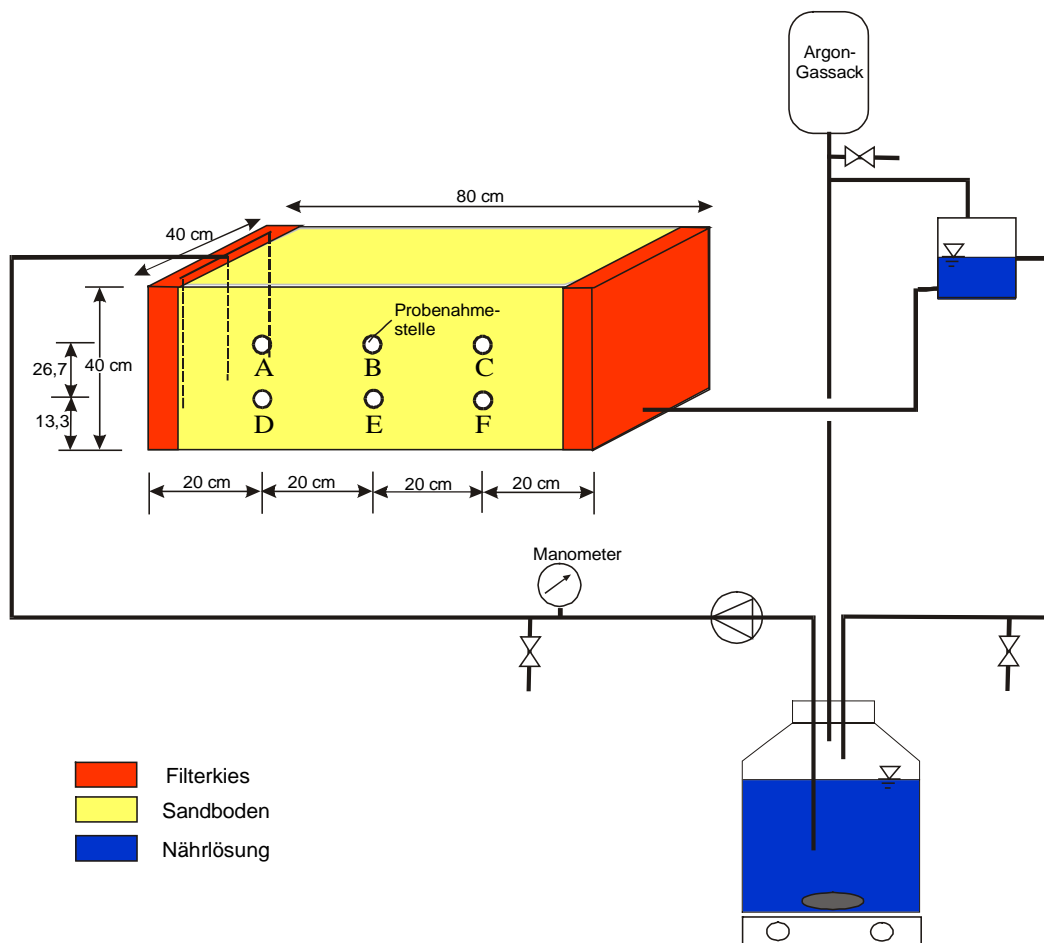


Abb. 4: Schema der Verfahrenssimulation in der In-Situ-Box

Neben der Verfahrenssimulation in der In-Situ-Box wurde eine Feldversuch durchgeführt, bei dem eine zeitliche anaerob-aerob-Sequenz realisiert wurde. Der Feldversuch gliederte sich in die bereits laufende technische in-situ-Sanierung am Standort ein und war dadurch den Erfordernissen der Sanierung unterworfen. Eine detaillierte Beschreibung der in-situ-Sanierung im technischen Maßstab findet sich bei Held et al. [12]

5 Ergebnisse und Diskussion

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß ein anaerober Abbau von TCA über die Sequenz TCA → DCA → CA → Ethan vergleichsweise einfach zu erreichen ist. Chlorethen (CA) als letzter chlorierter Metabolit der Abbaukette konnte bei keiner Analyse nachgewiesen werden. CA ist offensichtlich derart instabil, daß bereits abiotisch ein schneller Abbau abläuft. Der effizienteste Abbau wurde in Versuchen erhalten, bei denen eine standortspezifische Bodenmatrix als Trägermaterial für die dechlorierende Mikroflora diente. Allerdings zeigt der Verlauf der TCA-Dechlorierungsaktivität, daß diese über die Zeit nicht stabil ist. Es wurden Intervalle beobachtet, in denen TCA zwar fast vollständig zu DCA transformiert, dieses aber nicht weiter abgebaut wurde. Eine ähnliche zwischenzeitliche Akkumulation von cDCE wurde auch beim Abbau des PCE beobachtet. Möglicherweise waren diese Effekte verbunden mit einer Änderung der Zusammensetzung der bodengebundenen Mikroflora während des ca. 300 Tage dauernden Versuches. Die zwischenzeitliche Akkumulation der Metabolite trat im späteren Verlauf des Versuches auf. Erst zu diesem Zeitpunkt wurde als Auxiliarsubstrat ein *komplexes* Substrat infiltriert, was dazu führt, daß eine Vielzahl physiologischer Bakteriengruppen in ihrem Wachstum begünstigt werden [7]. Dies ist bei der Infiltration der definierten Substrate Acetat/Formiat nicht der Fall. Anscheinend kann eine vollständige Dechlorierung von PCE zu Ethen nur dann erreicht wurde, wenn komplexe Substrate verwendet werden [19].

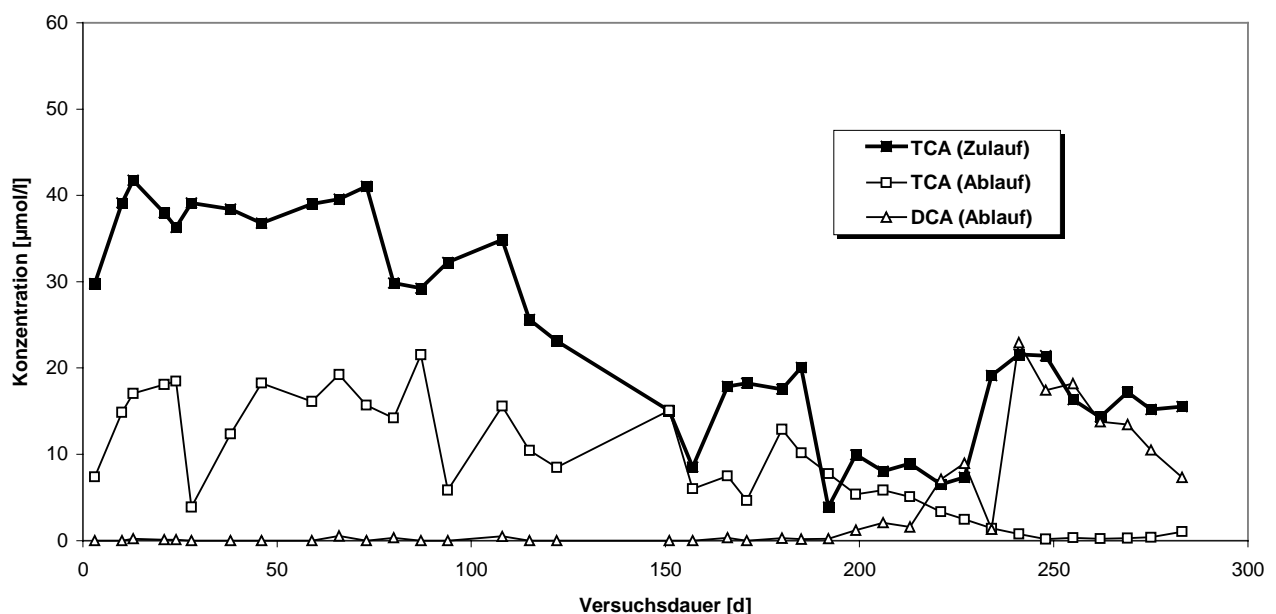


Abb. 5: Abbau von TCA und PCE in einer anaerob betriebenen Bodensäule

Zum Versuchsende hin konnte wieder ein vollständiger Abbau sowohl des TCA (Abbildung 5) als auch des PCE ohne signifikante Akkumulation von Metaboliten erreicht werden.

An das im technischen Maßstab verwendete Auxiliarsubstrat sind verschiedene Anforderungen zu stellen. Neben einem hohen Transformationsausbeutekoeffizienten und der Eignung für eine vollständige Dechlorierung sind für ein in-situ-Verfahren Eigenschaften wie Kosten, Verfügbarkeit, Wassergefährdung und insbesondere resultierende Biomassebildung (im Hinblick auf eine Verblockung des Aquifers) relevant. Melasse, allerdings in Intervallen infiltriert zur Verringerung des Biomassezuwachses, erfüllt ein Teil der Bedingungen. Bei zu hohen Infiltrationskonzentrationen kann es durch die Methanogenese zu solch hohen Mengen des Abbauproduktes (CH_4) kommen, daß dessen Löslichkeitsgrenze überschritten wird und sich Gasblasen bilden. Auch diese führen zu einer Verminderung der hydraulischen Durchlässigkeit des Aquifers. Da Melasse unter anaeroben Bedingungen nicht schnell mineralisiert wird, ist eine aerobe „Schönung“ zum Abbau des unter aeroben Bedingungen verbliebenen Rest-CSB erforderlich; dies kann signifikante Kosten verursachen.

Während der anaerobe Abbau in den Säulenversuchen sehr effizient verlief, ergab der aerobe methanotrophe Abbau der niederchlorierten Metabolite in der nachgeschalteten aeroben Bodensäule nur sehr geringe Abbauraten. Für den aeroben Abbau sind ebenfalls Auxiliarsubstrate (hier: Induktoren) erforderlich. Erst wenn diese vorhanden sind, werden die für den aeroben Abbau der CKW verantwortlichen Katalysatoren (Enzyme) gebildet. Aus genehmigungsrechtlichen Gründen sollten bei dem geprüften Verfahren keine Induktoren zugesetzt, sondern quasi „intrinsisch“ gebildet werden. Durch die anaerobe Mineralisierung des Auxiliarsubstrates entsteht als Endprodukt Methan, welches nach Übergang zu aeroben Milieubedingungen als Induktor wirken sollte. Die aus der anaeroben Säule eluierte Menge an CH_4 von $< 0,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ war anscheinend zu gering, um in der aeroben Säule eine ausreichende CKW-Oxidationsaktivität zu induzieren. Prinzipiell kann die Induktorkonzentration erhöht werden, indem in der anaeroben Phase höhere Mengen an Auxiliarsubstrat zur Verfügung gestellt werden. Allerdings führt dies nicht nur zu höheren CH_4 -Konzentrationen, sondern auch zu größeren verfahrenstechnischen Problemen (Verblockung des Aquifers durch CH_4 -Gasblasen sowie durch Biomasse).

Den Übergängen der einzelnen Milieu-Phasen „Anaerob \leftrightarrow Aerob“ kommt bei dem angestrebten sequentiellen Verfahren eine besondere Bedeutung zu. Es konnte gezeigt werden, daß trotz „großräumig aerober“ Bedingungen kleinräumige Mikrokompartimente vorliegen, in denen anaerobe Stoffwechselleistungen wie Denitrifikation und Sulfatreduktion (Zehrung der Elektronenakzeptoren Nitrat und Sulfat) möglich sind. Eine Bilanzierung der Elektronenakzeptoren ergab, daß die anaeroben Stoffwechselleistungen etwa 6 % des gesamten Stoffwechsels ausmachen. Die in den Mikrokompartimenten vorherrschenden Bedingungen sind hinreichend, daß auch obligat anaerobe Bakterien (z.B. methanogene Bakterien) unter „aeroben Bedingungen“ überleben können. Die Untersuchungen zur Kinetik der Milieuänderungen zeigten, daß nach Initiierung anaerober Bedingungen zwar eine kurze Adaptationszeit erforderlich ist, bevor Denitrifikation und Sulfatreduktion in ausreichendem Maß ablaufen, nach dieser Adaptationszeit aber effiziente anaerobe Stoffumsätze erfolgen. Während die Anaerobisierung relativ rasch zu erreichen war, erforderte die Aerobisierung deutlich mehr Zeit und einen hohen Einsatz an Elektronenakzeptoren. Dieser war wesentlich durch die aerobe Veratmung des unter anaeroben Bedingungen verbliebenen Rest-CSB sowie durch chemische und biologische Oxidation reduzierte anorganische Verbindungen in der Bodenmatrix (z.B. FeS) verursacht. Der Milieuübergang ist vorteilhaft im Hinblick auf eine

Veränderung der hydraulischen Durchlässigkeit. Während reine anaerobe Bedingungen und die Infiltration von Auxiliarsubstraten zu einer Abnahme der Durchlässigkeit und damit auch zu einer Abnahme der Versorgungseffizienz führte, verursachten Milieuübergänge stets eine Wiederrücknahme der Durchlässigkeit in der aeroben Phase. Negative Effekte, wie z.B. die Mobilisierung von bodengebundenen Metallen in der anaeroben Phase wurden nicht beobachtet.

Die Ergebnisse des Monitorings des CKW-Abbaus in den Säulenversuchen sowie in der In-Situ-Box ergaben, daß bereits anaerob eine vollständige Mineralisierung unter „in-situ-Bedingungen“ (d.h. mit geringen Transformationsraten) zu erreichen ist. Das ursprünglich anvisierte sequentielle anaerob-aerob-Verfahren beruhte auf der aus der Bioreaktortechnik bekannten Tatsache, daß die Mineralisierung der hochchlorierten Ausgangssubstanzen PCE und TCA schneller verläuft, wenn die unter anaeroben Bedingungen akkumulierten Metabolite unter aeroben Bedingungen oxidiert und damit schließlich mineralisiert werden. Eine hohe Gesamtmineralisierungsrate ist dort von hoher Bedeutung, da dort mit zunehmender Reaktionsgeschwindigkeit wesentlich die Behandlungskosten reduziert werden können. Bei in-situ-Verfahren stehen verfahrensbedingt wesentlich längere Behandlungszeiten zur Verfügung. Limitierend ist bei diesen Verfahren weniger die Mineralisierungsgeschwindigkeit sondern vielmehr die Geschwindigkeit von Stoffübergängen (z.B. sorbiert → gelöst) und des Stofftransportes (z.B. Diffusion von Schadstoffen aus Bodenmikroporen heraus in Bereiche, wo sie einem Abbau zugänglich sind; Versorgung mit Auxiliarsubstraten durch Infiltration). Daher kann es von Vorteil sein, in-situ Milieus zu induzieren, die eine Mineralisierung der CKW unter rein anaeroben Bedingungen erlauben. Hierzu müssen geeignete Auxiliarsubstrate infiltriert werden, so daß das in-situ-Redoxpotential soweit absinkt, daß eine signifikante Akkumulation von Metaboliten, hier insbesondere von dem karzinogenen Metaboliten Vinylchlorid, kaum oder nicht stattfindet. Auch wenn rein anaerobe Bedingungen zu einer Mineralisierung der CKW führen können, ist voraussichtlich eine nachgeschaltete aerobe Behandlung des sanierten Aquifers unerlässlich.

Eine realistischere Simulation des entworfenen sequentiellen in-situ-Verfahrens stellte die bei dem Feldversuch eingesetzte Verfahrensweise dar. Allerdings zeigten die Untersuchungen, daß das System dann bereits derart komplex ist, daß einzelne beobachtete Effekte nicht mehr sicher den getroffenen Maßnahmen (Versuchsparametern) zugeordnet werden konnten. Da der Feldversuch in die in-situ-Sanierung im technischen Maßstab integriert war, mußten sich zudem die Erfordernisse des Feldversuchs den Erfordernissen der Gesamtsanierung unterordnen. Daher wurden verschiedene Einzeleffekte in kleindimensionierteren Laborversuchen untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse können zu einem Verfahrensvorschlag zusammengefügt werden.

6 Ausblick

In dem F+E-Projekt konnte ein Abbau von TCA und PCE gezeigt werden. Aus den Ergebnissen der Untersuchungen kann ein technisches Verfahren abgeleitet werden. Dieses berücksichtigt hauptsächlich, daß die Prozesse in-situ sehr langsam ablaufen. Vereinfachend ergab sich, daß die CKW in-situ bereits unter rein anaeroben Bedingungen mineralisiert werden können. Die Supplemente werden mit einem Grundwasserkreislauf zugeführt. Dazu wird Grundwasser

entnommen, gereinigt, mit Supplementen angereichert und reinfiltriert. Das mögliche Auftreten von unerwünschten biochemischen und verfahrenstechnischen Effekten wie:

- Ausgasung des gebildeten Methans und Gasblasenbildung
- Verblockung durch Biomasse
- Akkumulation von Metaboliten (VC, DCA)

ist besonders zu überwachen, da die Bildung von Methanblasen im Aquifer zu einer drastischen Änderung des eingestellten Grundwasserströmungsregimes führt und damit zu einer Unterversorgung bestimmter Bereiche des Aquifers mit den im Zuge der Sanierung infiltrierten Supplementen. Als Leitparameter des Überwachungsmonitorings bieten sich neben der üblichen Analytik hier Niveaumessungen in Infiltrationspegeln sowie die „in-situ-Messung“ des Redoxpotentials an. Nach Entfernung der CKW kann die Qualität des Grundwassers durch Einstellung aerober Bedingungen verbessert werden. Es ist aber zu beachten, daß die Akkumulation von C-Substraten unter anaeroben Bedingungen nach einem Übergang zu aeroben Bedingungen zu den gleichen verfahrenstechnischen Problemen wie im anaeroben führen kann. Der dann einsetzende aerobe Abbau führt zur massiven Bildung von Biomasse, die den Aquifer verblocken kann. Um diese Effekte zu vermeiden, sind die Infiltrationen entsprechend anzupassen (z.B. Intervallinfiltration des Sauerstoffs) und das Verfahren detailliert zu überwachen.

7 Literaturverzeichnis

1. **Ahlert, R.C.; Enzinger, J.D.** (1992): Anaerobic process for the dechlorination of 1,1,1-trichloroethane. *J. Environ. Sci. Health A27*, 1675-1699.
2. **Boyer, J.D.; Ahlert, R.C.; Kosson, D.S.** (1988): Pilot plant demonstration of in-situ biodegradation of 1,1,1-trichloroethane. *Journal WPCF* 60, 1843-1849.
3. **Cox, E.E.; Edwards, E.; Lehmicke, L.; Major, D.** (1995): Intrinsic biodegradation of trichloroethene and trichloroethane in a sequential anaerobic-aerobic aquifer. In: Hinchee, R.E.; Wilson, J.T.; Downey, D.C. (eds.), *Intrinsic Bioremediation (Pap. Int. In: In Situ On-Site Bioreclamation Symposium, 3rd)*, Battelle Press, Columbus, Ohio, 223-231.
4. **Dobson, S.; Jensen, A.A.** (1992): Environmental Health Criteria 136: 1,1,1-Trichloroethane. World Health Organization, Geneva.
5. **Doong, R.-A.; Wu, Y.-W.** (1997): Enhanced biodegradation of 1,1,1-trichloroethane under low biomass conditions. *Chemosphere* 34, 1653-1662.
6. **Duba, A.G.; Jackson, K.J.; Jovanovich, M.C.; Knapp, R.B.; Taylor, R.T.** (1996): TCE remediation using in situ resting state bioaugmentation. *Environm. Sci. Technol.* 30, 1982-1989.
7. **Ensley, B.D.** (1991): Biochemical diversity of trichloroethylene metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* 45, 283-299.

8. **Fathepure, B.Z.; Youngers, G.A.; Richter, D.L.; Downs, C.E.** (1995): In situ bioremediation of chlorinated hydrocarbons under field aerobic-anaerobic environments. In: Hinchee, R.E. *et al.* (eds.), Bioremediation of Chlorinated Solvents, Battelle Press, Columbus, Ohio, 169-186.
9. **Fennell, D.E.; Gossett, J.M.; Zinder, S.H.** (1997): Comparison of butyric acid, ethanol, lactic acid, and propionic acid as hydrogen donors for the reductive dechlorination of tetrachloroethene. *Environ. Sci. Technol.* 31, 918-926.
10. **Fennell, D.E.; Stover, M.A.; Zinder, S.H.; Gossett, J.M.** (1995): Comparison of alternative electron donors to sustain PCE anaerobic reductive dechlorination. In: Hinchee, R.E. *et al.* (eds.), Bioremediation of Chlorinated Solvents, Battelle Press, Columbus, Ohio, 9-16.
11. **Held, T.** (1999): Untersuchung des mikrobiellen in-situ-Abbaus von CKW durch einen sequentiellen Anaerob-Aerob-Prozeß (Bericht, BMBF-Nr. 1481079).
12. **Held, T.; Stempel, R.; Bohlen, R.** (1997): Altölraffinerie Pintsch Hanau: Sanierung des Standortes mit einem kombinierten on-site-/in-situ-Verfahren. In: Franzius, V.; Wolf, K.; Brandt, E. (Hrsg.), Handbuch Altlastensanierung, C.F. Müller Verlag Heidelberg, Stand 7. Erg.-Lfg., 2. Aufl. Mai 1997, 9200.04.03, 1-28.
13. **Holliger, C.** (1992): Reductive dehalogenation by anaerobic bacteria. Promotionsschrift, Agricultural University of Wageningen, Department of Microbiology.
14. **Holliger, C.; Schumacher, W.** (1994): Reductive dehalogenation as a respiratory process. *Antonie van Leeuwenhoek* 66, 239-246.
15. **Klečka, G.M.; Gonsior, S.J.; Markham, D.A.** (1990): Biological transformation of 1,1,1-trichloroethane in subsurface soils and ground water. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 1437-1451.
16. **Krumholz, L.R.; Sharp, R.; Fishbain, S.S.** (1996): A freshwater anaerobe coupling acetate oxidation to tetrachloroethene dehalogenation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4108-4113.
17. **Marschner, A.** (1998): Möglichkeiten und Grenzen biologischer Bodensanierung. In: Fraunhofer IGB (Hrsg.), Workshop „Abbau chlorierter Kohlenwasserstoffe“, 28.-29. September 1998, Stuttgart.
18. **McCarty, P.L.; Goltz, M.N.; Hopkins, G.D.; Dolan, M.E.; Allan, J.; Kawakami, B.T.; Carrothers, T.J.** (1997): Full-Scale evaluation of in-situ cometabolic degradation of trichloroethylene in groundwater through toluene injection. *Environ. Sci. Technol.* 32, 88-100.
19. **Middeldorp, P.J.M.; van Aalst, M.A.; Rijnaarts, H.H.M.; Stams, F.J.M.; de Kreuk, H.F.; Schraa, G.; Bosma, T.N.P.** (1998): Stimulation of reductive dechlorination for *in situ* bioremediation of a soil contaminated with chlorinated ethenes. *Wat. Sci. Tech.* 37, 105-110.
20. **Neumann, A.; Scholz-Muramatsu, H.; Diekert, G.** (1994): Tetrachlorethen metabolism of *Dehalospirillum multivorans*. *Arch. Microbiol.* 162, 295-301.
21. **Rippen, G.** (1990): Handbuch Umweltchemikalien, Stoffdaten - Prüfverfahren - Vorschriften (Loseblattsammlung). ecomed Verlag Landsberg, Stand 3. Aufl., 43. Erg.lfg. 6/98.
22. **Scholz-Muramatsu, H.; Eisenbeis, M. Granzow, s.; Windfuhr, C.; Schaub, U.; Diekert, G.** (1999): Tetrachlorethen-Abbau mit Spezialkulturen in kontaminiertem Grundwasser gwf Wasser Abwasser (eingereicht).

23. **Vogel, T.M.; McCarty, P.L.** (1987b): Rate of abiotic formation of 1,1-dichlorethane from 1,1,1-trichloroethane in groundwater. *J. Contam. Hydrol.* 1, 299-308.
24. **Zhang, W.; Bower, E.J.; Cunningham, A.B.; Lewandowski, G.A.** (1995): Influence of sorption on organic contaminant biodegradation. In: Hinchey, R.E. et al. (eds.), *Microbial Processes for Biodegradation*, Battelle Press, Columbus, Ohio, 315-322.

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.6 Verbundvorhaben 7: Biologische Sanierung von Kohlenwasserstoffaltlasten

9.6.2 Untersuchungen zum mikrobiologischen Abbau von Restölfraktionen unter Einsatz von fettsäuremodifizierten Aminosäuren (TV 7.2.1)

Dr. Dietmar Miethe
Dr. Volker Riis

Dipl.-Biochem. Marion Brandt

Umweltforschungszentrum GmbH Leipzig/ Halle,
Sektion Umweltmikrobiologie
Permoserstr. 15, 04318 Leipzig

Förderkennzeichen: 1471086

Laufzeit: 01.09.1997 – 28.02.1999

1 Zusammenfassung und Zielsetzung

Ziel des Vorhabens ist die Minimierung des beim mikrobiellen Mineralölabbau verbleibenden Restes, insbesondere in Bodenwaschschlämmen, durch den Zusatz von Tensiden aus der Gruppe der fettsäureacylierten Aminosäuren. Diese neue Gruppe von Tensiden soll auf ihre Eignung zur Beschleunigung des Mineralöl- abbaus und zur Erhöhung des maximal erreichbaren Abbaugrades getestet werden. Bei dem Projekt handelt es sich um eine Machbarkeitsstufe, in deren Ergebnis über die Weiterführung der Arbeiten mit dem Ziel der technischen Nutzung entschieden werden muß.

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

Eine große Anzahl industrieller und militärischer Standorte ist mit Mineralölen kontaminiert, die eine Gefährdung für Mensch und Umwelt darstellen. Diese Tatsache erfordert Sanierungsmaßnahmen in deren Ergebnis ein gereinigter Boden vorliegen muß, der einer Nachnutzung übergeben werden kann. Als elegante und vielfach in der Praxis bewährte Methode gilt die mikrobiologische Sanierung von Mineralölschäden. Jedoch kommt es immer wieder zu Problemen; behördlich festgelegte Grenzwerte (1000mg RKW/ kg Boden) werden nicht erreicht. Dies resultiert daraus, daß es je nach Art und Alter des Mineralölschadens früher oder später zu einer Stagnation des Abbaus kommt. In der Regel verbleiben Reste zwischen 10 und 50% der Ausgangskonzentration. Die Aufklärung der Ursachen für das Verbleiben solcher Reste war Gegenstand des BMBF- Projektes "Mikrobiologische und physiologische Untersuchungen zur Frage der Restkonzentration in mineralölkontaminierten Böden"

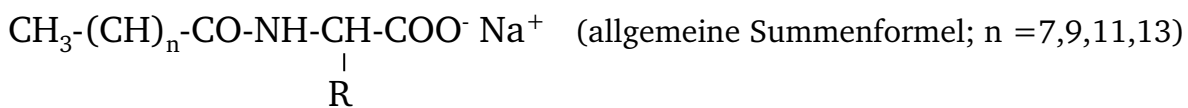
(Projekt nr.: 0310399A; Laufzeit 1.11. 1993- 31.10. 1995). Eine Ursache der Stagnation des Kohlenwasserstoffabbaus ist die mangelnde Bioverfügbarkeit der Schadstoffe. Ansatzpunkte zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit sind eine bessere Durchmischung und der Zusatz von oberflächenaktiven Substanzen. Es gibt eine Vielzahl von Arbeiten [3; 17; 25], die sich mit dem Zusatz von Tensiden bei der mikrobiologischen Mineralöldekontamination beschäftigen und interessante Ansatzpunkte liefern, ohne jedoch einen befriedigenden Lösungsansatz bieten zu können. Eine Übersicht über den Einfluß von oberflächenaktiven Substanzen auf den mikrobiellen Abbau von organischen Substanzen geben ROUSE und Mitarbeiter[21]. Es wird gezeigt, daß in Gegenwart der Tenside einerseits Steigerungen, andererseits Hemmungen des KW-Abbaus möglich sind. Die Ursache dieses Phänomens ist nicht geklärt. Es ist anzunehmen, daß die sterische Anordnung bzw. Konformation der Tenside mit den Zellmembranlipiden und -enzymen einen bedeutenden metabolischen Faktor darstellt., d.h. daß eine direkte Wechselwirkung der Tenside mit den Mikroorganismen stattfindet.

Soll ein mikrobiologischer Abbau von Kohlenwasserstoffen nicht in Flüssigkultur, sondern im Boden vonstatten gehen, wird die Bioverfügbarkeit zusätzlich im entscheidenden Maß von der Art der Bodenmatrix (stoffliche Zusammensetzung und Korngrößenverteilung) bestimmt. Adsorptionseffekte in Kapillaren und Poren subzellulärer Dimension führen zu einer schlechteren Verfügbarkeit [8; 9].

Zur Desorption der gebundenen Kohlenwasserstoffe werden in der Regel oberflächenaktive Substanzen eingesetzt. Auch hier werden sowohl positive [8; 23] als auch negative Effekte verzeichnet [11].

Als besonders problematisch erweist sich die biologische Reinigung von Bodenwaschschlamm. Während die Grobfraction von Böden nach einer Wäsche meist wiederverwendbar ist, stellt die Restbelastung an Schadstoffen im Schlamm ein wesentliches Hindernis für dessen Verwertbarkeit dar. Das Sanierungsziel, eine Restkonzentration von <1000mg/kg TS ist durch eine alleinige biologische Behandlung nicht erreichbar [19].

Gegenstand unserer Untersuchungen war der Einsatz von neuartigen Tensiden aus der Gruppe der Fettsäure-acylierten Aminosäuren.



Die Synthese und Charakterisierung dieser Tenside erfolgte bei unserem Verbundpartner an der Bergischen Universität Gesamthochschule Wuppertal im Fachbereich Organische Chemie unter Leitung von Prof. Schneider (Teilvorhaben 7.2.2: "Synthese der Säuren").

Diese neue Gruppe von Tensiden sollte auf ihre Eignung zur Beschleunigung des Mineralölabbaus und zur Erhöhung des Abbaugrades getestet werden.

In Vorversuchen konnte mit dem Tensid Laurinsäurevalinamid ein stimulierender Effekt auf den Kohlenwasserstoffabbau in Bodenwaschschlamm verzeichnet werden. Daraus ableitend sollte eine breite Palette von N-acylierten Aminosäuren unter besonderer Beachtung des Einflusses der Kettenlänge der eingesetzten Fettsäuren und der Art und Konfiguration der Aminosäuren untersucht werden.

Bei positiven Ergebnissen sollten dann anstelle der kostenintensiven Fettsäure-acylierten Aminosäuren acylierte Proteinhydrolysate aus pflanzlichen Rohstoffen (z.B. Raps) getestet werden, um bei entsprechender Eignung diese einzusetzen und so ökonomisch vertretbar zu machen.

3 Angewandte Methoden

3.1 Anzucht der Mikroorganismen

Für die Abbauprobe setzten wir ein Mikroorganismenkonsortium ein, welches aus verschiedenen Altlastenböden isoliert und vereinigt wurde [15]. Die Kultivierung der Mikroorganismen erfolgte in 500 ml Erlenmeyerkolben bei 150 U/min und 30°C unter Verwendung eines Standard-Mineralsalzmediums pH 7,0. Als Kohlenstoffquelle diente Dieselkraftstoff (0,1%).

Nach 72 Stunden wurden die Mikroorganismen abzentrifugiert, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen, in Nährlösung aufgenommen und mit einem „Potter“ homogenisiert. Von der

Mikroorganismensuspension (Inokulum) wurde der Trockensubstanzgehalt bestimmt (20 Stunden, 105°C). Der Blindwert der Nährsalze wurde abgezogen.

3.2 Abbau von Restkohlenwasserstoffen

3.2.1 Ansätze in Schüttelkolben

Die Abbauversuche erfolgten sowohl in Schüttelkolben als auch in der fedbatch-pro-Anlage der Fa. DASGIP GmbH.

Schüttelkolben:

Die Abbauversuche wurden in 100 ml Schüttelkolben unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Standard-Mineralsalzlösung, Inokulum: Mischkultur (5 mg TS), 30° C, 150 U/ min

Dauer: 336 Stunden, Arbeitsvolumen: 40 ml

Restkohlenwasserstoffe: 20 mg Extrakt aus einer Biomiete mit stagnierendem Mineralölabbau oder Bodenwaschschlamm, Trockensubstanzgehalt(TS)-Gehalt zwischen 2% und 10%

Tenside: wenn nicht anders angegeben: 0,03%; Nachdosierung nach jeweils 72 Std.

fedbatch-pro Anlage:

Mit dieser Anlage konnten 16 Versuchsansätze, PC-gesteuert, parallel ablaufen.

Die Abbauversuche wurden mit Bodenwaschschlämmen (TS: 2-10%) in Mineral-salzmedium durchgeführt (500 ml Erlenmeyerkolben, Arbeitsvolumen: 150-200 ml, 30° C, 250 U/ min, Dauer: 336 Std., pH-Wert 7,0, Tenside: wenn nicht anders angegeben: 0,03%; Nachdosierung nach jeweils 72 Std.).

3.2.2 Fermentation

Für die Abbauversuche von Restkohlenwasserstoffen im Bodenwaschschlamm wurde der Fermenter Biostat Q der Fa. Braun-Melsungen verwendet. Mit diesem Gerät war es möglich, 4 Parallelansätze in 500 ml-Fermentertöpfen zu fahren. Fermentationsbedingungen: Arbeitsvolumen 250 ml, pH-Wert 7,0, 30°C, 300-500 U/min, pO₂: 80-100%, Tenside: wenn nicht anders angegeben: 0,03%; Nach-dosierung nach 168 Std., Trockensubstanzgehalt der Bodenwaschschlämme: 2-10%

3.3 Biomasse- und KW-Bestimmung

Die Biomassebestimmung erfolgte sowohl gravimetrisch als Trockenrückstand der gewaschenen Bakteriensuspension (105°C, 20 Std.) als auch über den Proteingehalt [13] der KW-freien (extrahierten) Kulturflüssigkeit.

Die Kohlenwasserstoffbestimmung erfolgte mittels IR-Spektroskopie nach der DIN 38409-H18 Methode.

Um den Kohlenwasserstoffgehalt im Bodenwaschschlamm zu ermitteln, war es

notwendig, die Feststoffe abzutrennen und zu trocknen, da bei der Extraktion des nassen Schlammes mit Trichlortrifluorethan (TTE) die KW nur unvollständig erfaßt werden. Der getrocknete Schlamm wurde gemörsert, um Inhomogenitäten auszuschließen. Ca. 1g Trockensubstanz wurden mit 40 ml TTE extrahiert. Alle Bestimmungen wurden zwei- bis dreifach durchgeführt.

3.4 Tensidanalyse

Bei den Sapromatversuchen (Sapromat D12 der Fa. Voith GmbH, Heidenheim) zum Abbau der Tenside und ihrer Komponenten wurde die Abnahme der Tensid-konzentration indirekt anhand des Sauerstoffverbrauchs verfolgt. Jeder Sapromat-kolben enthielt 250 ml Medium. Die Mischkultursuspension wurde auf eine Extinktion von 0,15 bei 700 nm eingestellt. Die Tenside, Aminosäuren und Laurinsäure wurden in einer Konzentration von $10^{-3}M$ zugesetzt. Bei weiteren Versuchen erfolgte die Tensidbestimmung mit Hilfe der HPLC (Gerät: Perkin Elmer LC410, Säule: LiChrospher-100, Eluent: Methanol/ Wasser im v:v-Verhältnis 80:20, Fließgeschwindigkeit: 0,5 ml/min, Detektor: UV; 210nm).

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Ermittlung des Abbaugrades von Restölfractionen bei Zusatz verschiedener Fettsäure-acylierter Aminosäuren

Anhand des Zusatzes einer Palette Laurinsäure-acylierter Aminosäuren zu extrahierten Restkohlenwasserstoffen aus einer Biomiete, wo bereits eine Stagnation des Kohlenwasserstoffabbaus eingetreten war, sollte der mögliche Abbaugrad ermittelt werden. Zum Vergleich wurden Ansätze ohne Tensidzusatz herangezogen. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die durchgeführten Versuche:

Tab.1: Zusatz von verschiedenen Laurinsäure-acylierten Aminosäuren bei Abbauprobieren mit einer Restkohlenwasserstofffraktion

	eingesetzte Aminosäuren	erzielter Abbaugrad in %
ohne Tensidzusatz		15
aliphatische neutrale Aminosäuren	L-Glycin	28
	L-Alanin	44
	L-Valin	75
	L-Leucin	42
	L-Isoleucin	35

Tab.1: Fortsetzung

	eingesetzte Aminosäuren	erzielter Abbaugrad in %
aliphatische Hydroxy-Aminosäuren	L-Serin	25
saure Aminosäuren	L-Glutaminsäure	0
aromatische Aminosäuren	L-Phenylalanin	8
Iminosäuren	l-Prolin	0
basische Aminosäuren	L-Histidin	42
Proteinhydrolysate	Geliderm	15
	Rapsprotein	15

Versuchsbedingungen:

500mg RDK/l, Tensidzusatz. 0,03%

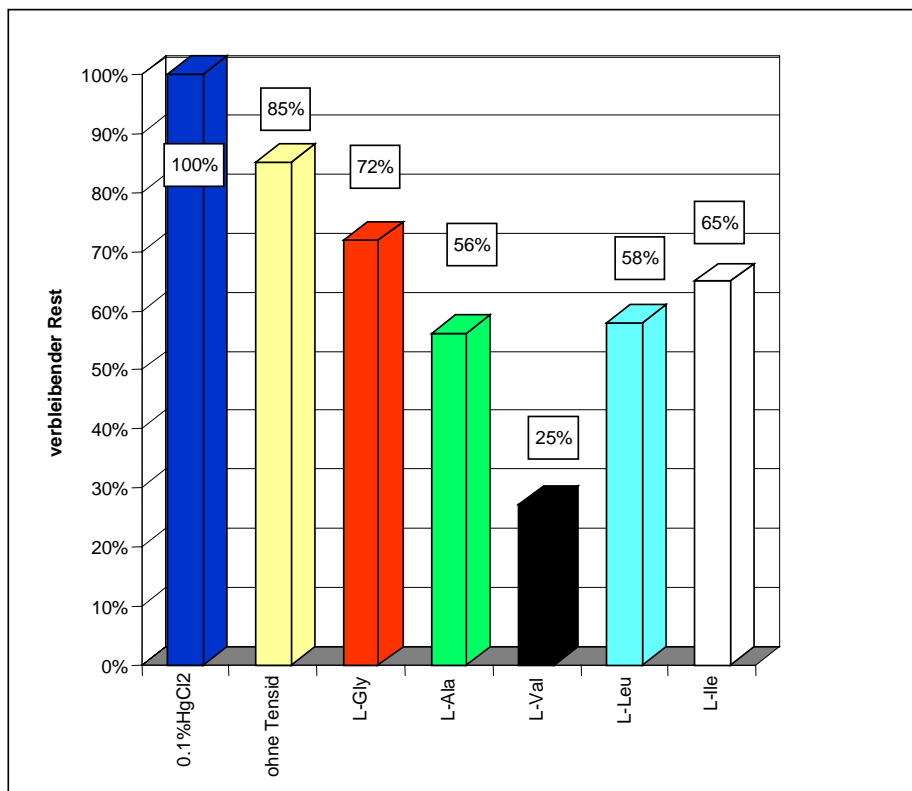


Abb.1: Abbaugrad eines Altlastenextraktes bei Zusatz von Laurinsäure-acylierten Aminosäuren aus der Reihe der aliphatischen neutralen Aminosäuren (0,3g/l)

Die Ergebnisse zeigen je nach Art der im Tensid enthaltenen Aminosäure große Unterschiede beim erzielten Abbaugrad. Deutliche Effekte konnten mit den aliphatischen Laurinsäure-

acylierten Aminosäuren und mit N-Lauroyl-L-Histidin erreicht werden. Die Verbesserung der Abbauleistung gegenüber dem tensidfreien Ansatz (Abb.1) betrug zwischen ca. 25% (Leucin) und 60% (Valin). Dagegen konnte beim Einsatz der Tenside, die Glutaminsäure bzw. Prolin als Aminosäure enthielten, kein weiterer Abbau erzielt werden, im Gegenteil die Anwesenheit dieser Tenside führte zu einer Hemmung des Abbaus. Der Zusatz des acylierten Proteinhydrolysates aus Raps bzw. des kommerziellen Geliderms zeigten keinen Effekt.

Analog dem Abbau von extrahierten Restölen aus einer Biomiete testeten wir den Zusatz einer Reihe von Laurinsäure-acylierten Aminosäuren zu einem Bodenwaschschlamm, dessen Kohlenwasserstoffbelastung ca. 5000mg/kg TS betrug. Die Zugabe eines Inokulums in Form der von uns isolierten Altlastenmischkultur erwies sich als überflüssig, da mit der autochthonen Mikroflora des Bodenwaschschlammes vergleichbare Abbauleistungen erzielt wurden. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die durchgeführten Versuche:

Tab.2: Zusatz von verschiedenen Laurinsäure-acylierten Aminosäuren zu Kulturmedien mit suspendierten Bodenwaschschlämmen

	eingesetzte Aminosäuren	erzielter Abbau [%]
ohne Tensidzusatz		55
aliphatische neutrale Aminosäuren	L-Glycin	55
	L-Alanin	58
	L-Valin	65
	L-Leucin	62
	L-Isoleucin	60
aliphatische Hydroxy-Aminosäuren	L-Serin	0
saure Aminosäuren	L-Glutaminsäure	0
aromatische Aminosäuren	L-Phenylalanin	0
Iminosäuren	l-Prolin	0
basische Aminosäuren	L-Histidin	60
Proteinhydrolysate	Geliderm	60
	Rapsprotein	55

Versuchsbedingungen:

Bodenwaschschlamm - TS 5%

Tensidzusatz: 0,03%

Zur Einschätzung der Wirksamkeit der Tenside wurden jeweils Vergleichsansätze ohne Tensid und ein mit HgCl_2 vergifteter Ansatz mitgeführt. Um aussagefähige Ergebnisse zu erhalten, wurden Doppel- bzw. Dreifachbestimmungen vorgenommen.

Wie Abbildung 2 zeigt, ist sowohl ohne als auch mit Tensidzusatz innerhalb der ersten 3 Tage eine starke KW-Abnahme zu verzeichnen, die mit zunehmender Zeit logarithmisch abnimmt. Nach 14 Tagen konnte bei den Ansätzen ohne Tensidzusatz der Mineralölgehalt von 5000mg/kg TS auf 2100 mg/kg reduziert werden, was einer Abbaurate von 55% entspricht. Das deckt sich mit den Ergebnissen der Arbeiten von G. REINERT [18]. Durch Zusatz von N-Lauroyl-L-Valin konnte als bestes Ergebnis innerhalb der Reihe der getesteten Laurinsäure-acylierten Aminosäuren (Tab. 2) eine Abbaurate von 65% erzielt werden.

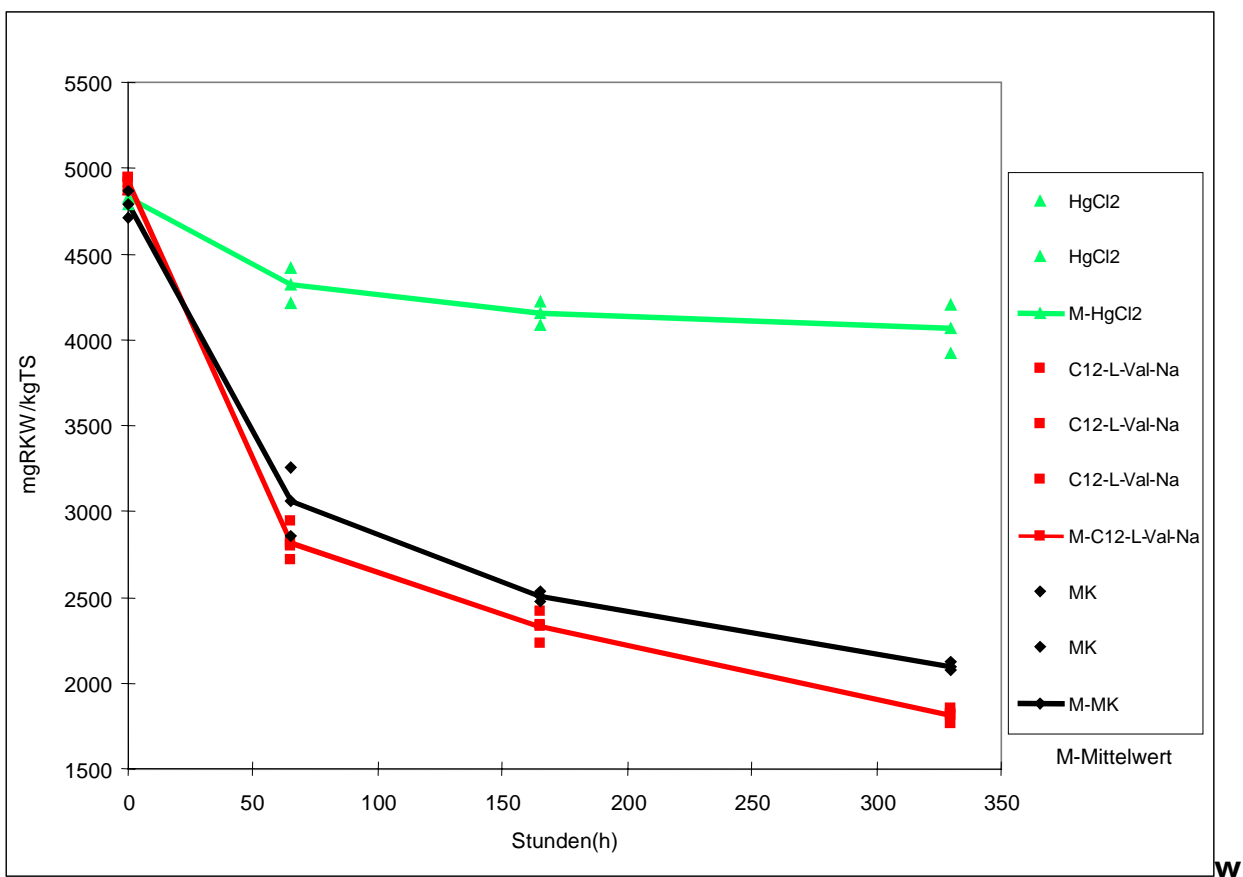


Abb.2: Abbau von Restkohlenwasserstoffen in Bodenwaschschlamm unter Zusatz von Laurinsäurevalinamid (0,3g/l)

Das ist im Vergleich zu den Ansätzen ohne Tensidzugabe eine Verbesserung von 10%, was aber nicht ausreicht, um die Zielkonzentration von 1000mg RKW/ kg TS zu erreichen (Abb. 3).

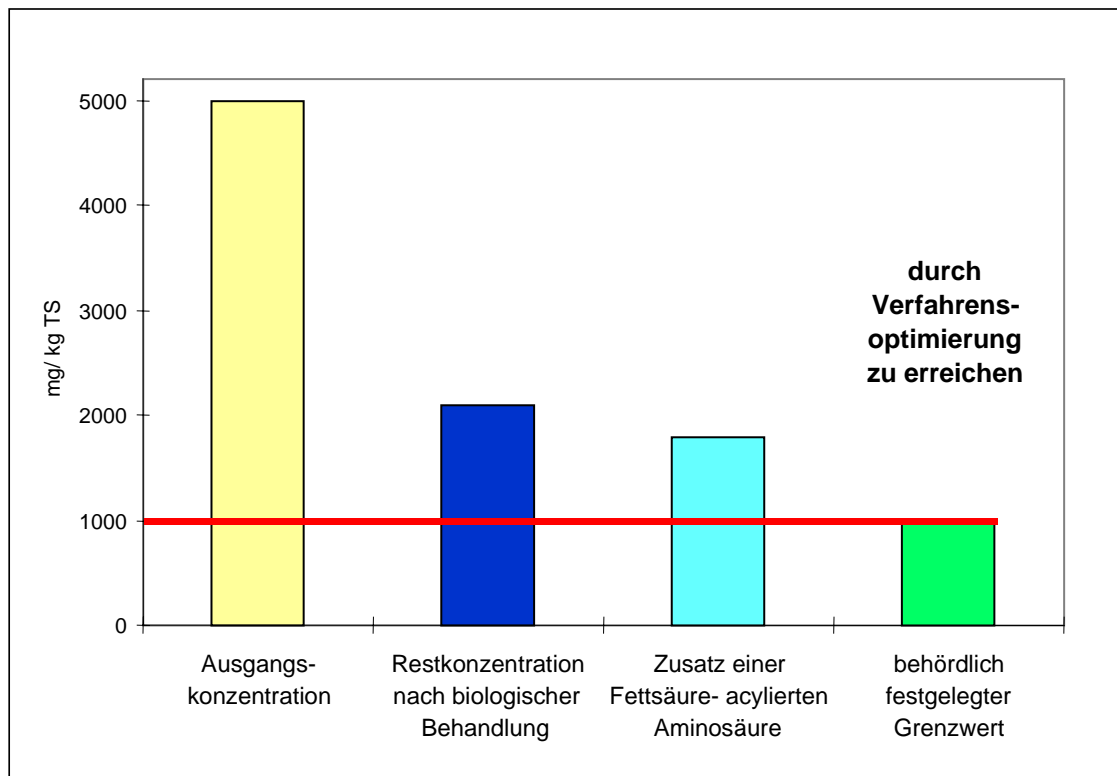


Abb.3: Restkohlenwasserstoffe im Bodenwaschschlamm vor und nach biologischer Behandlung (mit und ohne Tensidzusatz)

Um die Wirksamkeit der Fettsäure-acylierten Aminosäuren vergleichen zu können, setzten wir zusätzlich verschiedene kommerzielle Tenside, die in der Literatur häufig beschrieben werden, ein: Triton X100, Brij 35; Tween 20, Tween 80 und APG. Wir testeten die Wirksamkeit sowohl an KW-Extrakten als auch am Bodenwaschschlamm.

Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse zum Abbau von Restkohlenwasserstoffen. Der Zusatz der Tenside brachte gegenüber den tensidfreien Ansätzen einen verbesserten Kohlenwasserstoffabbau. Dieser betrug bei der Verwendung von Triton X100, Tween 80 und Brij 35 analog dem Ergebnis des Zusatzes von Laurinsäurevalinamid 70 - 75%. Bei den anderen Tensiden war der Effekt nicht so deutlich ausgeprägt.

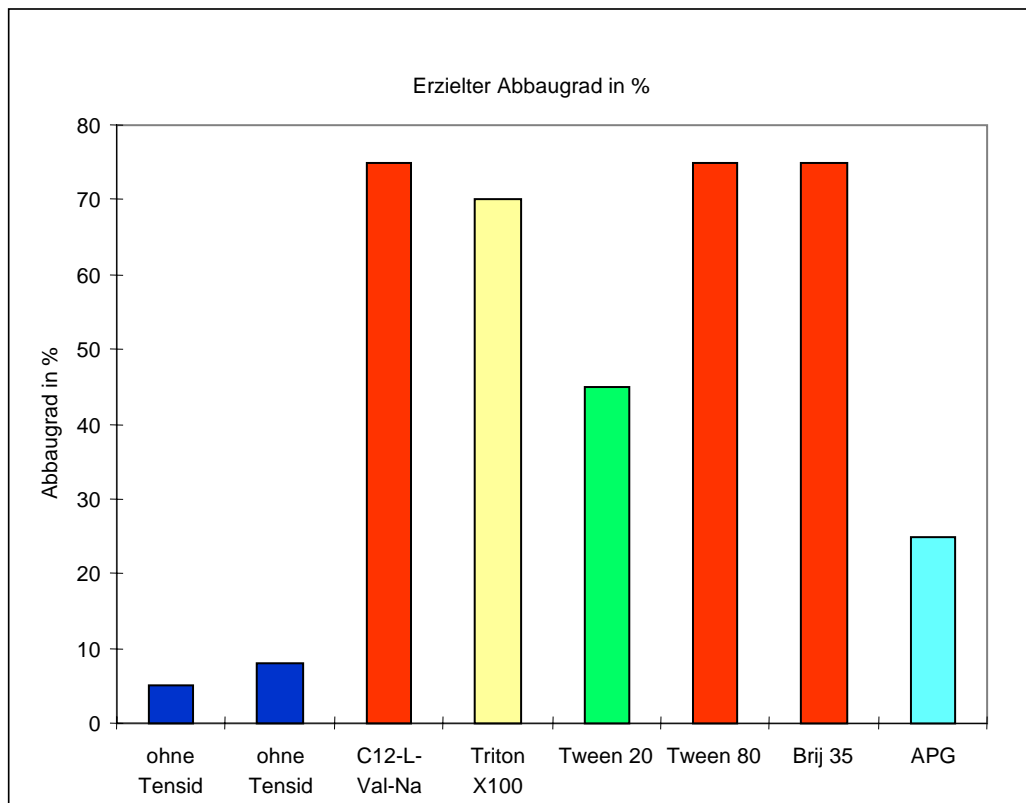


Abb.4: Zusatz von verschiedenen kommerziellen Tensiden zu Restkohlenwasserstoff enthaltenden Extrakten

Beim Zusatz der kommerziellen Tenside zur Bodenwaschschlamm-Suspension trat der entgegengesetzte Fall ein. Außer bei Brij 35 war gegenüber dem tensidfreien Ansatz eine deutliche Hemmung des Kohlenwasserstoffabbaus zu verzeichnen (Abb.5).

Während ohne Tensidzusatz nach 14 Tagen 55% der im Schlamm enthaltenen Kohlenwasserstoffe abgebaut wurden, waren es bei Zusatz von Triton X100 nur 35%. Auch bei Zusatz der häufig in der Literatur erwähnten Alkylpolyglycoside [2; 4] war eine deutliche Verschlechterung des Kohlenwasserstoffabbaus zu verzeichnen, die Abbauraten betrug nur etwa 40%. (Abb.5).

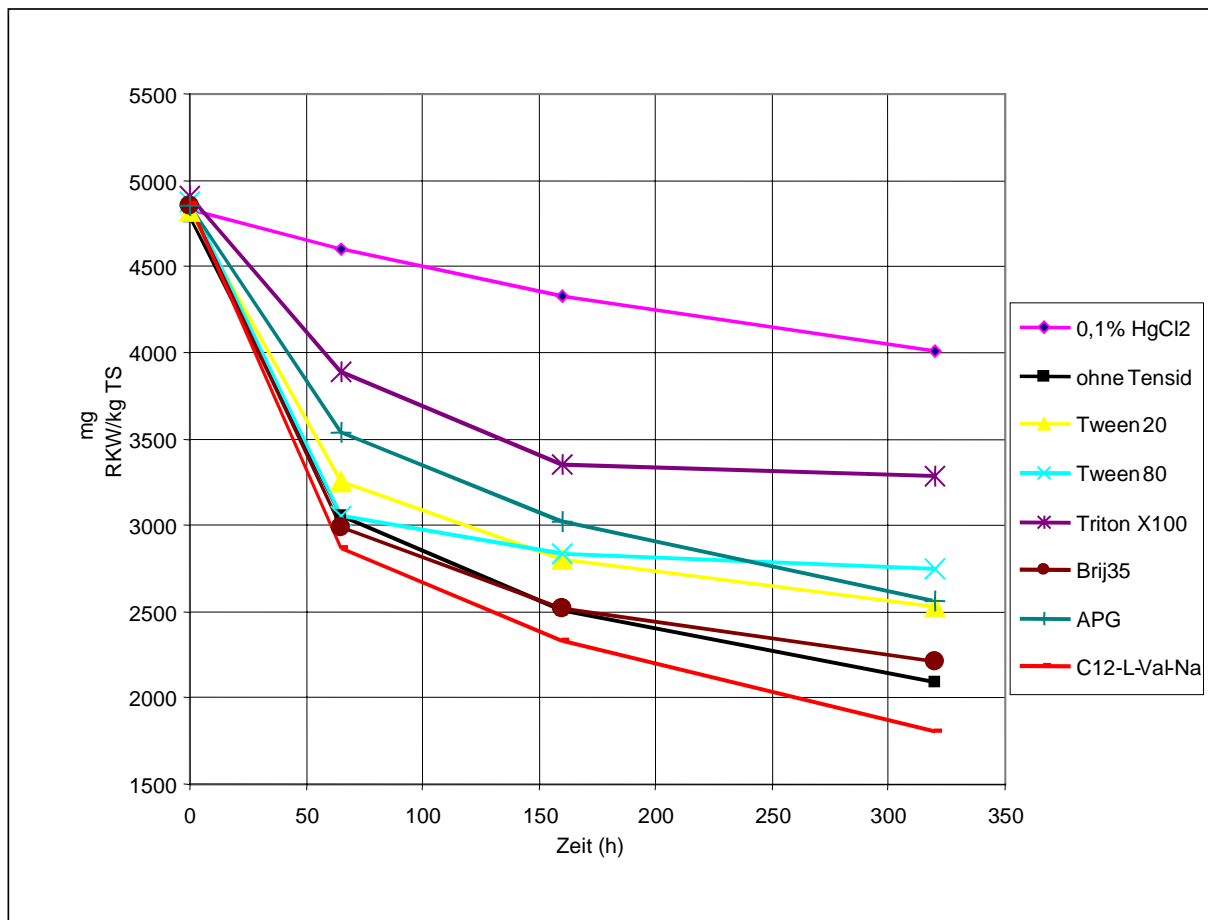


Abb. 5: Abbau von Restkohlenwasserstoffen in Bodenwaschschlammern unter Zusatz verschiedener kommerzieller Tenside

4.2 Einfluß der Konzentration der Tenside

Die Konzentration der eingesetzten Tenside spielt beim Abbau von Kohlenwasserstoffen eine wesentliche Rolle.

Die antibakterielle Wirkung von Tensiden ist seit langem bekannt. Ab einer bestimmten Konzentrationen und in Abhängigkeit vom pH-Wert können sie zur Lyse von Mikroorganismen führen, während bei Konzentrationen unterhalb des Inhibitorwertes eine Stimulation des Stoffwechsels möglich ist [1].

Häufig wird beobachtet, daß Tenside bei Konzentrationen über dem CMC-Wert inhibierend wirken [11; 20; 26]. Eine Ursache dafür ist gegeben, wenn die Kohlenwasserstoffkonzentration in der wäßrigen Phase geringer ist als die Wasserlöslichkeit und somit die wäßrige Lösung und die Mizellen um den Kohlenwasserstoff konkurrieren [6; 7].

Auch bei den Fettsäure-acylierten Aminosäuren wurde eine antibakterielle Wirkung festgestellt. So beträgt die Inhibitorkonzentration bei Fettsäure-acyliertem Leucin je nach Art der Fettsäure und dem getesteten Mikroorganismus zwischen 0,04g/l und 20 g/l [14].

Wir haben die Konzentrationsabhängigkeit mit dem Tensid N-Lauroyl-L-Valin getestet und zunächst eine Konzentration von 0,3g/l gewählt (sowohl für die extrahierten Kohlenwasserstoffe als auch für den Bodenwaschschlamm). Eine Reduzierung der Tensidkonzentration auf 0,2g/l bzw. eine Erhöhung bis zu 0,5g/l führten zu keiner Veränderung beim Kohlenwasserstoffabbau. Niedrigere Konzentrationen als 0,2 g/l erwiesen sich als ineffektiv. Bei Konzentrationen > 0,5g/l wurde der Kohlenwasserstoffabbau gehemmt.

Effektiver als eine hohe Starttensidkonzentration erwies sich die mehrmalige Zugabe des Tensides innerhalb der 14 tägigen Versuchsdauer.

Da die Fettsäure-acylierten Aminosäuren innerhalb eines kurzen Zeitraumes verbraucht werden (s. Abschn. 4.6), dosierten wir die Tenside 1 bis 3 mal innerhalb von 336 Stunden nach und konnten dadurch den Restmineralölgehalt deutlich senken (Tab.3; Abb.6).

Tab.3: Abbaugrad in Abhängigkeit von der Anzahl der Tensidzugaben

	Tensidzugabe	Abbaugrad in %
1*	nach 0 Stunden	35
2*	nach 0 und 72 Stunden	50
3*	nach 0, 72 und 168 Stunden	65
4*	nach 0, 72, 168 und 240 Stunden	75

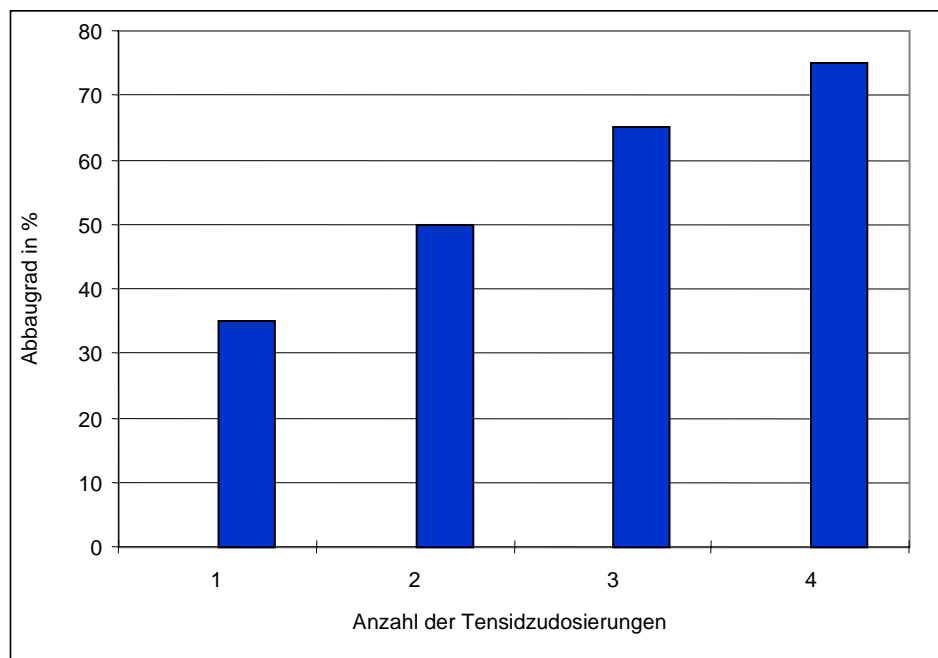


Abb.6: Abbaugrad in Abhängigkeit von der Anzahl der Tensidzugaben

4.3 Einfluß der Kettenlänge der Tenside

Nachdem wir eine Reihe Laurinsäure-acylierter Aminosäuren getestet hatten, wollten wir überprüfen, welchen Einfluß die Kettenlänge der verwendeten Tenside auf den Abbaugrad von Restölfractionen ausübt. Uns standen acylierte Aminosäuren mit den Kettenlängen

- C8- Caprylsäure
- C10- Capronsäure
- C12- Laurinsäure
- C14- Myristinsäure

zur Verfügung.

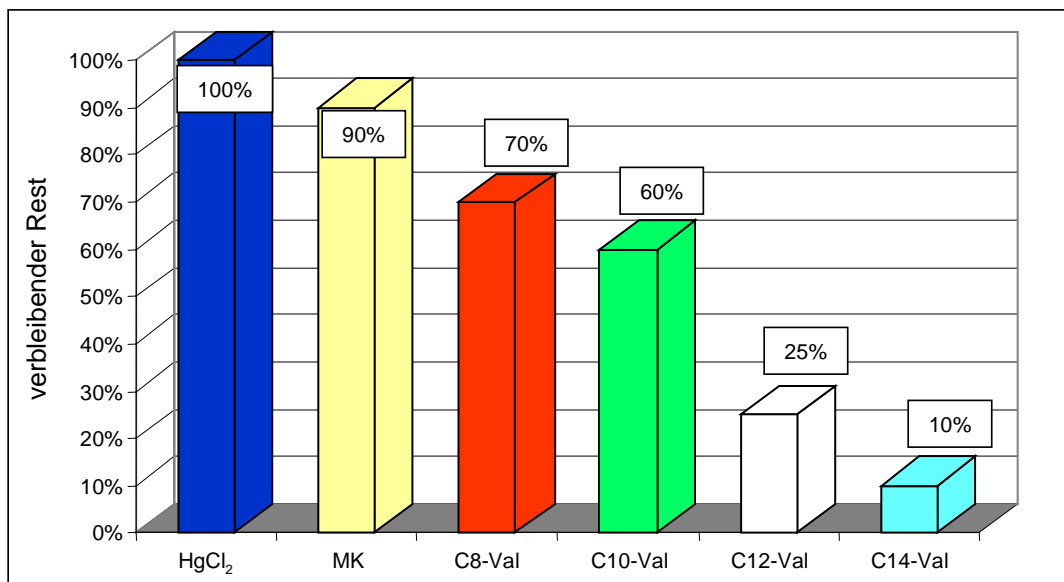


Abb.7: Abhängigkeit des verbleibenden Kohlenwasserstoffrestes von der Kettenlänge der Fettsäure des Tensides

Abbildung 7 zeigt, daß ein deutlicher Zusammenhang zwischen Abbaugrad der Restkohlenwasserstoffe und Kettenlänge der eingesetzten Tenside besteht. Mit zunehmender Kettenlänge der im Tensidmolekül enthaltenen Fettsäure, also mit zunehmender Hydrophobizität, konnte bei Restkohlenwasserstofffraktionen eine Verbesserung des Kohlenwasserstoffabbaus verzeichnet werden. Während bei Verwendung von N-Caproylsäure-L-Valin die Kohlenwasserstoffe nur um 30% reduziert werden konnten, erreichten wir mit N-Myristoyl-L-Valin eine Reduzierung um 90%.

Bei Versuchen mit Bodenwaschschlämmen erhielten wir keine vergleichbaren, einen deutlichen Trend zeigenden Ergebnisse.

4.4 Einfluß der Konfiguration der Tenside

Die bisher von uns verwendeten Tenside enthielten Aminosäuren der natürlichen L-Konfiguration. Es sollte nun untersucht werden, ob die Konfiguration der Aminosäuren den Prozeß der Minimierung der Restkohlenwasserstoffkonzentration beeinflusst. So testeten wir die Tenside Laurinsäurevalinamid und Laurinsäureleucinamid jeweils in der L- und D-Konfiguration.

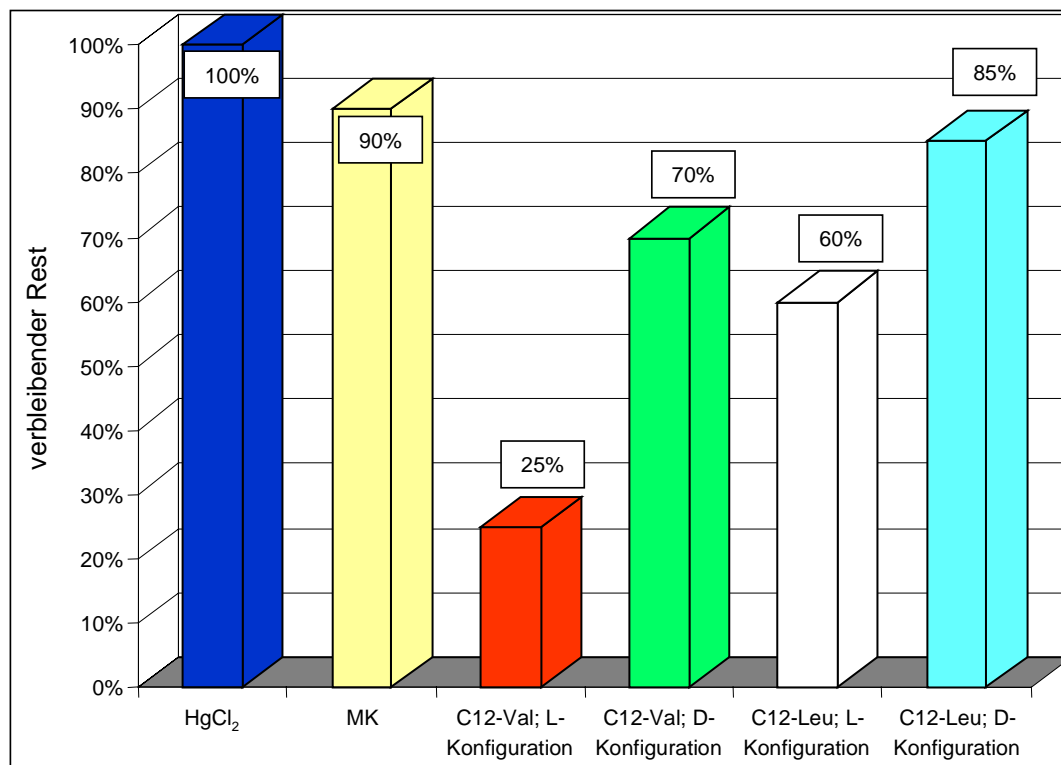


Abb.8: Einfluß des Zusatzes von Fettsäure-acylierten Aminosäuren in L- und D-Konfiguration beim Abbau von Restkohlenwasserstoffen

Wie Abbildung 8 zeigt, beeinflusst die Konfiguration der im Tensid enthaltenen Aminosäure den Abbaugrad der Restmineralöle entscheidend. Während bei Verwendung der Fettsäure-acylierten Aminosäuren in L-Konfiguration eine gute Abbauleistung zu verzeichnen ist, ist diese bei Einsatz der Tenside mit D-Konfiguration deutlich niedriger. Im Vergleich zum tensidfreien Ansatz kann man durch Zusatz der Fettsäure-acylierten Aminosäuren in D-Konfiguration auch einen verbesserten Kohlenwasserstoffabbau nachweisen, jedoch ist der Endwert im Vergleich zur L-Konfiguration beim Valin um 45% und beim Leucin um 25% reduziert.

4.5 Versuche zur Aufklärung der Wirkungsweise der Fettsäure-acylierten Aminosäuren

Mit den Fettsäure-acylierten Aminosäuren standen uns eine große Auswahl von strukturähnlichen Tensiden zur Verfügung, die sich in ihren physikochemischen Eigenschaften nicht wesentlich unterscheiden. Dennoch fanden wir bezüglich ihres Einflusses auf den Abbau von Restkohlenwasserstoffen sehr unterschiedliche Effekte (Abschn. 4.1).

Mit den Tensiden N-Lauroyl-L-Valin (positiver Effekt auf die Reduzierung von Restkohlenwasserstoffen) und N-Lauroyl-L-Glutamat (kein Effekt) führten wir Versuche zur Aufklärung der Wirkungsweise dieser Tenside durch. Auf Grund ihrer Bestandteile sollten sie günstige Substrate darstellen. Die Wirkung kann allein auf den Tensideffekt, ihrer Funktion als Hilfssubstrat oder in beiden liegen.

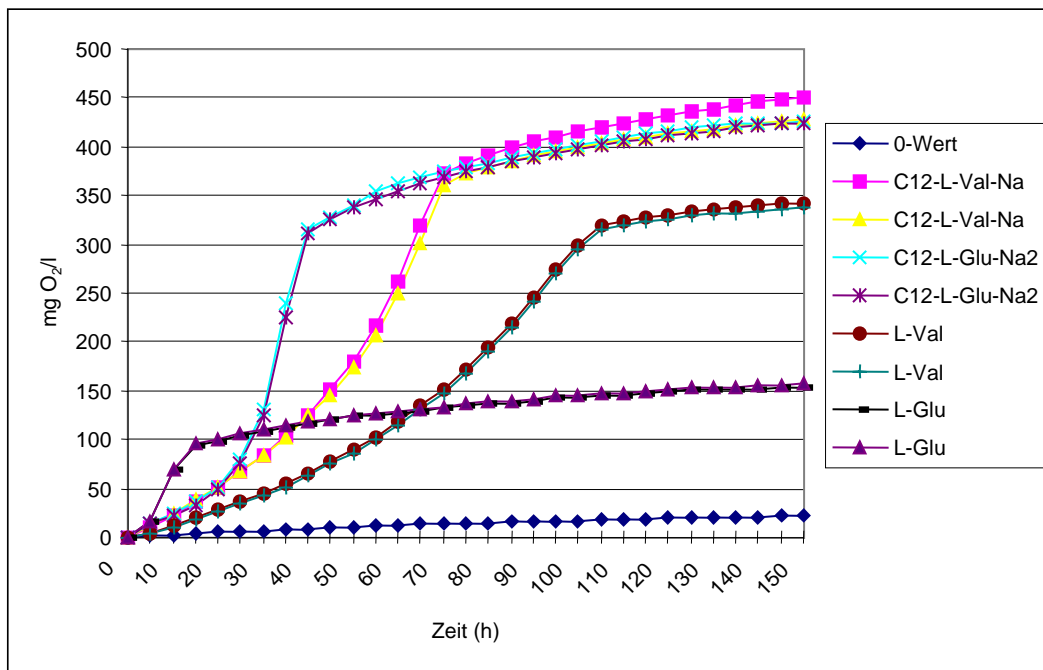


Abb.9: Sauerstoffverbrauch während der Kultivierung des Altlastenkonsortiums auf L-Glutaminsäure; L-Valin; N-Lauroylglutamat und N-Lauroylvalin (jeweils doppelter Ansatz)

Zuerst prüften wir im Sapromat mit einer Altlastenmischkultur, ob die Tenside bzw. die Bestandteile der Tenside als Substrate verwertet werden. Wie in Abb.9 und 10 zu sehen ist, kann man aus den Sauerstoffverbrauchskurven erkennen, daß sowohl die Fettsäure-acylierten Aminosäuren als auch deren Einzelbausteine umgesetzt werden.

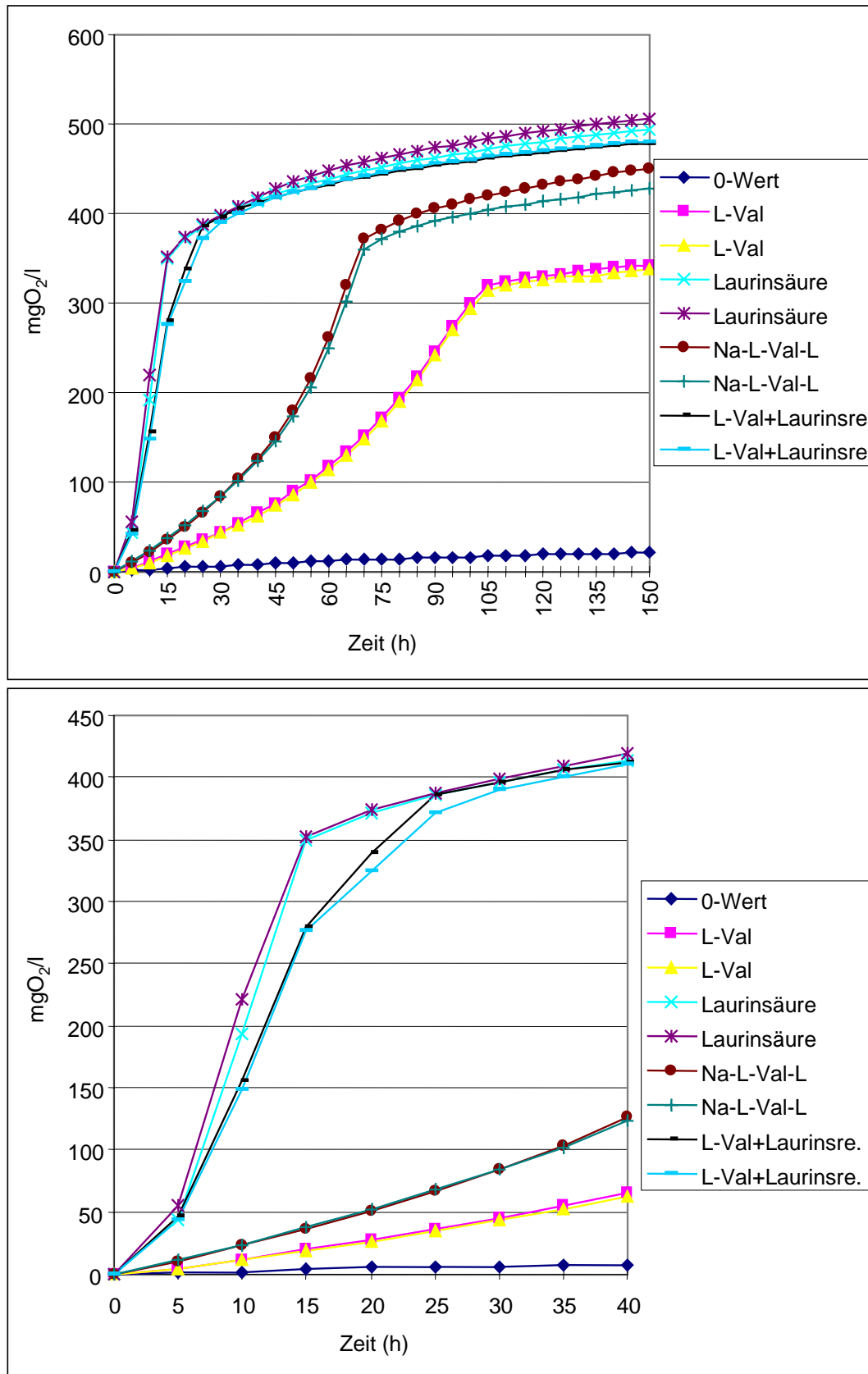


Abb.10a/10b: Sauerstoffverbrauch während der Kultivierung des Altlastenkonsortiums auf L-Valin; Laurinsäure; L-Valin und Laurinsäure und N-Lauroyl-L-Valin (jeweils doppelter Ansatz)

Obwohl Laurinsäure sehr schlecht wasserlöslich ist, steigt die Sauerstoffverbrauchskurve sofort steil an und knickt dann nach ca. 15 Stunden ab, was typisch für die Erschöpfung von Substraten ist. Laurinsäure erwies sich als ideales Substrat für auf Dieselkraftstoff vorkultivierte Mikroorganismen. Auch bei L-Glutaminsäure kann ein rascher Anstieg der Sauerstoffverbrauchskurven beobachtet werden, L-Valin dagegen wird etwas langsamer verwertet. Analoge Ergebnisse erhält man bei der Umsetzung der Tenside. Auch bei N-Lauroyl-L-Glutamat kommt es zu einem exponentiellen Anstieg des Sauerstoffverbrauchs. Das Tensid war nach ca. 35 Stunden verbraucht. Der Anstieg des Sauerstoffverbrauchs bei Einsatz von N-Lauroyl-L-Valin erfolgte langsamer und war nach ca. 72 Stunden beendet. Interessant ist, daß bei Zugabe eines Gemisches aus Laurinsäure und Aminosäure ein steilerer Anstieg des Sauerstoffverbrauchs als beim Tensid stattfand. Der Knickpunkt nach ca. 15 Stunden (Abb. 10b) weist auf eine diauxische Verwertung der Substrate hin. Da die Laurinsäure-acylierten Aminosäuren nicht so schnell verbraucht werden, wäre es denkbar, daß zunächst eine Peptidase induziert wird, die das Tensidmolekül extrazellulär spaltet und dann die Aufnahme der Einzelmoleküle ermöglicht.

Dagegen spricht jedoch die Tatsache, daß in den Sauerstoffverbrauchskurven bei Zusatz der Tenside kein Knickpunkt zu verzeichnen war.

Geht man davon aus, daß eine enzymatische Spaltung des Tensids außerhalb der Zelle stattfindet, so müßte bei Zugabe von Valin und Laurinsäure im Gemisch der gleiche Effekt auf die Reduzierung von Restmineralölen wie mit dem zunächst intaktem Tensid zu verzeichnen sein. Abb. 11 zeigt die Ergebnisse unserer diesbezüglichen Versuche. Es wird deutlich sichtbar, daß, obwohl L-Valin und Laurinsäure, sowohl einzeln als auch im Gemisch als Substrate verwertet werden (Abb.10), diese Komponenten aber keinen Einfluß auf die weitere Reduzierung von Restkohlenwasserstoffen ausüben. Nur in Form der Fettsäure-acylierten Aminosäure war eine deutliche Reduzierung des Restkohlenwasserstoffgehaltes zu verzeichnen.

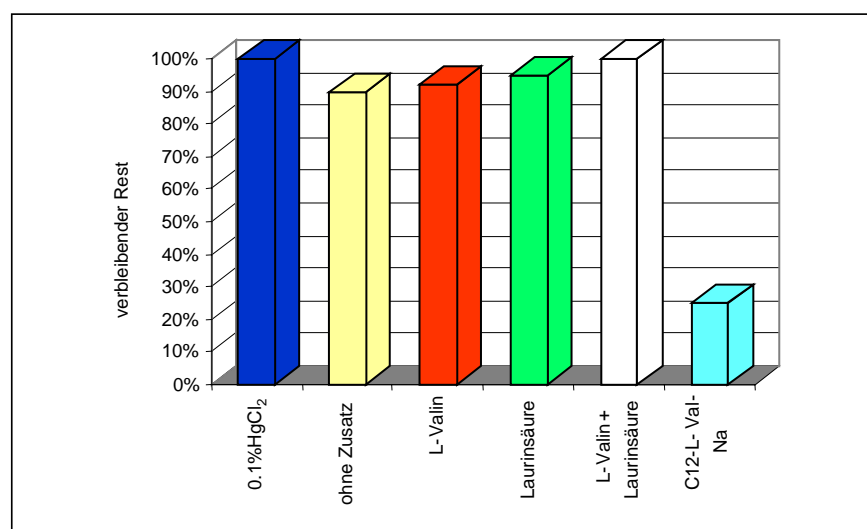


Abb.11: Zusatz von L- Valin; Laurinsäure, N-Lauroyl-L-Valin und L- Valin und Laurinsäure im Gemisch zu Restkohlenwasserstoff-enthaltenden Extrakten

Zusätzlich zu den Sapromatversuchen haben wir in Schüttelkolbenversuchen die Konzentrationsabnahme der Tenside mittels HPLC verfolgt. Während anhand der Sauerstoffverbrauchskurven zu sehen war, daß N-Lauroylvalin innerhalb von 72 Stunden umgesetzt wird, konnten wir mittels HPLC schon nach 24 Stunden kein Tensid mehr nachweisen. Als Ursache dafür sehen wir die hohe Absorptionsfähigkeit biologischer Membranen für oberflächenaktive Substanzen [22] an. Dieser Effekt führt dazu, daß die Tensidkonzentration in wäßriger Lösung erniedrigt wird [24].

Von weiterem Interesse war, in welchem Ausmaß die Fettsäure-acylierten Aminosäuren auch zur Bildung von Biomasse genutzt werden. Abbildung 12 zeigt, daß sowohl in Gegenwart von N-Lauroyl-L-Valin als auch von N-Lauroyl-L-Glutamat Wachstum (indirekte Bestimmung über Proteinmessung) stattfand. Jeweils unmittelbar nach einer Tensidzugabe konnte ein sprunghafter Anstieg der Biomasse gemessen werden. Analog dazu stellten wir in Gegenwart von N-Lauroyl-L-Valin eine Reduzierung der Restkohlenwasserstoffe fest, in Gegenwart von N-Lauroyl-L-Glutamat dagegen nicht.

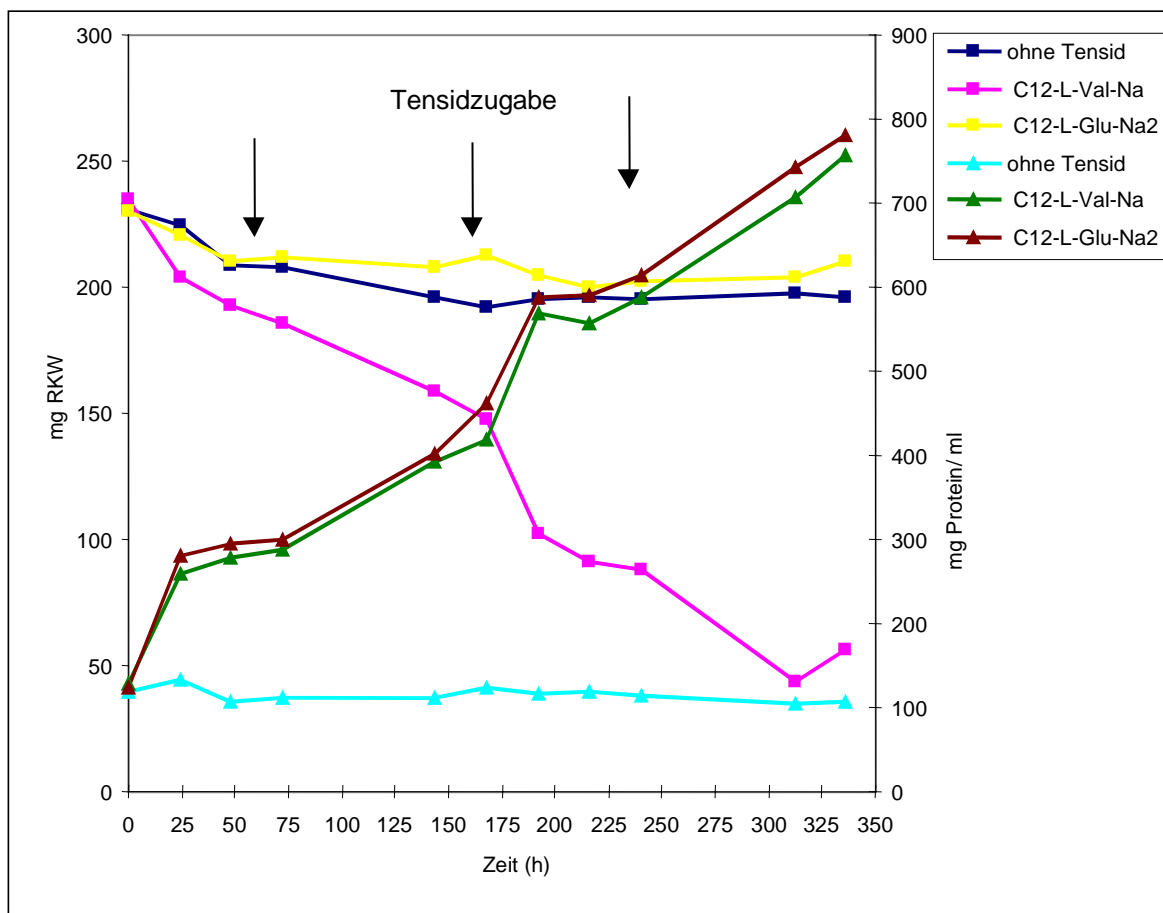


Abb.12: Abbau von Restkohlenwasserstoffen und Biomassebildung im Schüttelkolben mit und ohne Zusatz von Laurinsäure-acylierten Aminosäuren

Obwohl beide Tenside als Wachstumssubstrate verwertet werden, den gleichen CMC-Wert (2g/l) haben, ist ihre Wirkung auf den Kohlenwasserstoffabbau konträr. Was könnte die

Ursache sein? Biologische Membranen bestehen u.a. aus Phospholipiden, welche den Tensiden strukturverwandt sind. Diese Membranen sind in der Lage, Tenside zu absorbieren [22], wodurch die Permeabilität der Membran für Kohlenwasserstoffe verändert werden kann [16; 28]. Das kann zu einer erhöhten Aufnahme von hydrophoben Substanzen führen [12]. Valin ist eine hydrophobe Aminosäure, wodurch die Hydrophobizität der Fettsäure im Tensidmolekül wahrscheinlich noch verstärkt wird. Die Tatsache, daß N-Lauroyl-L-Valin nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar war, die Sauerstoffverbrauchskurve aber erst nach 72 Stunden abknickt, könnte ein Hinweis dafür sein, daß dieses Tensid zunächst von den Bakterienmembranen absorbiert und dadurch die Aufnahmefähigkeit für die Kohlenwasserstoffe erhöht wird. Innerhalb von 72 Stunden wird dann N-Lauroyl-L-Valin verbraucht und muß nachdosiert werden. N-Lauroyl-L-Glutamat enthält dagegen als Aminosäurebaustein die hydrophile Glutaminsäure. Bei diesem Tensid ist die Wechselwirkung mit der Membran offenbar schwächer. Es wird als ideales Substrat verwertet, ohne eine "Auflockerung" der Bakterienmembran zu bewirken.

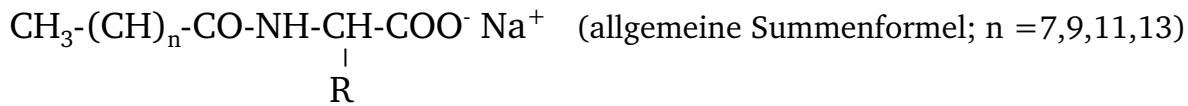
Doch nicht mit jeder hydrophoben Aminosäure als Tensidbestandteil (z.B. Pro, Phe) konnte eine Beschleunigung des Kohlenwasserstoffabbaus verzeichnet werden. Die Gründe dafür dürften konformationsbedingt sein. Ein Hinweis darauf ist, daß die Konfiguration der jeweiligen Aminosäure einen Einfluß auf den Kohlenwasserstoffabbau ausübt. Eine Aufklärung der Ursachen war im vorgegebenen Projektzeitraum nicht möglich.

5 Ausblick

Durch den Zusatz von Fettsäure-acylierten Aminosäuren zu Versuchsansätzen mit Restölfractionen kann eine Stimulation des Abbaus von Kohlenwasserstoffen erreicht werden. Der Effekt reicht jedoch für eine Praxisüberführung nicht aus. Die Reduzierung der Mineralölrestkonzentration insbesondere bei Bodenwaschschlamm ist minimal, vorgegebene Grenzwerte (<1000mg RKW/kg Boden) können nicht erreicht werden. Da, wie aus der Literatur bekannt, auch andere physikalisch oder chemische Methoden bei der Behandlung von Mineralölschlamm zu keinem befriedigenden Ergebnis führten, ist eine Kombination mehrerer Verfahren angezeigt. Dabei spielt auch der Einsatz von Tensiden eine wesentliche Rolle. Im Vorfeld sind Laborversuche mit oberflächenaktiven Substanzen durchzuführen, um die Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismus, Boden, Kohlenwasserstoff und Tensid in seiner gesamten Komplexität verstehen und beeinflussen zu können.

6 Formeln und Abkürzungen

Fettsäure-acylierte Aminosäuren



N-Lauroyl-L-Glycin (Na-Salz)	C ₁₂ -L-Gly-Na
N-Lauroyl-L-Alanin (Na-Salz)	C ₁₂ -L-Ala -Na
N-Lauroyl-L-Valin; N-Lauroyl-D-Valin (Na-Salz)	C ₁₂ -L(D)-Val -Na
N-Lauroyl-L-Leucin; N-Lauroyl-D-Leucin (Na-Salz)	C ₁₂ -L(D)-Leu-Na
N-Lauroyl-L-Isoleucin (Na-Salz)	C ₁₂ -L-Ile-Na
N-Lauroyl-L-Serin (Na-Salz)	C ₁₂ -L-Ser-Na
N-Lauroyl-L-Glutamat (Dinatriumsalz)	C ₁₂ -L-Glu-Na ₂
N-Lauroyl-L-Histidin	C ₁₂ -L-His-Na
N-Lauroyl-L-Prolin (Na-Salz)	C ₁₂ -L-Pro-Na
N-Lauroyl-L-Phenylalanin (Na-Salz)	C ₁₂ -L-Phe -Na
N-Capryl -L-Valin (Na-Salz)	C8-L-Val-Na
N-Caproyl-L-Valin (Na-Salz)	C10-L-Val-Na
N-Myristil-L-Valin (Na-Salz)	C14-L-Val-Na

KW - Kohlenwasserstoffe

RKW – Restkohlenwasserstoffe

7 Eigene Veröffentlichungen und Diplomarbeiten

7.1 Eigene Veröffentlichungen

Miethe, D., Riis,V., Stimming*, M., Babel, W. 1994. Mikrobiologische und physiologische Untersuchungen zur Frage der Restkonzentration bei der Sanierung mineralölkontaminierter Böden. ECOINFORMA '94. Bd.6: 211-224

Riis ,V.; Miethe,D.; Babel,W. 1995 The degradation of refinery products and oils from poluted sites by the autochthonous microorgnisms of contaminated and pristine soils Microbiol. Res. 150: 1-8

Riis, V.; Stimming*, M.; Miethe,D.; Babel,W. 1996. Investigations into the toxicity of persistent fractions of mineral oils. Chemosphere. 32: 1435-1443

Riis, V.; Miethe, D.; Möder, M.; Babel, W. 1996

Analytical characterization of persistent residues in the microbial degradation of mineral oils
Fresenius Journal of Analytical Chemistry. 356: 378-384

Babel, W., Brandt, M., Riis, V., Miethe, D. 1998. N-acylierte Proteinhydrolysate und N-acylierte Aminosäuren zum mikrobiellen Abbau der Restölfraction in ölkontaminierten Böden. Patent-Nr. 19521165 (erteilt am 21.08.1998)

Brandt, M.; Riis, V., Miethe, D., Babel, W. 1998. Untersuchungen zum mikrobiologischen Abbau von Restölfractionen unter Einsatz von fettsäureacylierten Aminosäuren. Poster zur 16. Jahrestagung der Biotechnologen in Wiesbaden

Brandt, M., Miethe, D., Riis, V., Babel, W. 1999. Verbesserung des Abbaugrades von Restölen aus Altlasten durch den Einsatz fettsäureacylierter Aminosäuren. Posteranmeldung zur 17. Jahrestagung der Biotechnologen in Wiesbaden

* Stimming = Brandt

7.2 Diplomarbeiten

Merting, H. 1997. Initiierung und Beschleunigung des Abbaus von persistenten Kohlenwasserstoffen

8 Literaturverzeichnis

1. **Baker, Z.E., Harrison, W., Miller, B.F.** 1940. Action of detergents on metabolism of bacteria. J. Exp. Med. 73: 249-269
2. **Bonkhoff, K., Wittmann, M., Haegel, F.-H., Subklew, G.** 1995 Basic Investigation for in-situ soil remediation with o/w microemulsions. 959-967 In: W.J. van den Brink; R. Bosman; F.Arendt (ed): Contaminated soil' 1995. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers
3. **Bury, S.J., Miller, C.A.** 1993. Effect of micellar solubilization on biodegradation rates of hydrocarbons. Environ. Sci. Technol. 27: 104-110
4. **Clemens, W.D., Haegel, F.-H., Schwuger, M.J., Stickdorn, K., Subklew, G., Webb, L.** 1993. Bodensanierung mit Mikroemulsionen- Konzept und erste Ergebnisse", 1345-1354 In: W.J. van den Brink; R. Bosman; F.Arendt (ed): Altlastensanierung'1993. Dordrecht, Boston, London, Kluwer Academic Publishers
5. **Edwards, D.A., Luthy, R.G., Liu, Z.** 1991. Solubilization of PAH in micellar nonionic surfactant solutions. Environ. Sci. Technol. 25: 127-133
6. **Guha, S., Jaffe, P.R.** 1996 a. Biodegradation kinetics of phenanthrene partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. Environ. Sci Technol. 30: 605-611

7. **Guha, S., Jaffe, P.R.** 1996b Bioavailability of hydrophobic compounds partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. *Environ. Sci Technol.* 30: 1382-1391
8. **Herbes, S.E., Schwall, L.R.** 1978. Microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in pristine and petroleum contaminated sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 306-316
9. **Herbes, S.E.** 1981. Rates of microbial transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediments in the vicinity of a coal-coking wastewater discharge. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 20-28
10. **Köhler, A., Schüttoff, M., Bryniok, D., Knackmuss, H.J.** 1994. Enhanced biodegradation of phenanthrene in a biphasic culture system. *Biodegradation* 5: 97-103
11. **Laha, S., Luthy, R.G.** 1991. Inhibition of phenanthrene mineralization by nonionic surfactants in soil-water systems. *Environ. Sci. Technol.* 25:1 1920-1930
12. **Lantz, S., Lin, J.E., Mueller, J.G., Pritchard, P.H.** 1995. Effects of surfactants on fluoranthene mineralization by *Spingomonas paucimobilis* Strain EPA 505, In: Hincee, R.E, Brockman, F.J., Vogel, C.M., *Microbial proceses for bioremediation*, 7-14. 1995. Battelle Press Columbus. USA
13. **Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.** 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
14. **Mhaskar, S.Y., Lakshminarayana, G., Saisree, L.** 1993. N-Acyl-L-Leucines of Biologically active uncommon fatty acids: synthesis and antibacterial activity. *JAOCS* 70: 23-27
15. **Miethe, D., Riis, V., Stimming, M.** 1995. Abschlußbericht: Mikrobiologische und physiologische Untersuchungen zur Frage der Restkonzentration bei der Sanierung mineralölkontaminierter Böden. (BMBF-Projekt-Förderkenneichen: 0310399A)
16. **Mihelcic, J.R., Lucking, D.R., Mitzell, R.J., Stapleton, J.M.** 1993. Bioavailability of sorbed- and separate- phase chemicals. *Biodegradation.* 4: 141-153
17. **Mueller, J.G., Chapman, P.J., Blattmann, B.O., Pritchard, P.H.** 1990. Isolation and characterization of a fluoranthene utilizing strain of *Pseudomonas paucimobilis*; *Appl. Environ. Microbiol*; 56: 1079-1086
18. **Peters** 1990
19. **Reinert, G., Schuster, E., Schneider, M., Bryniok, D.** 1996. Biologische Reinigung von Bodenwaschschlamm: Neue Perspektiven durch eine Verfahrensinnovation; *TerraTech.* 31: 55-57
20. **Roch, F., Alexander, M.** 1995. Biodegradation on hydrophobic compounds in the presence of surfactant.; *Environ. Toxicol. Chem.* 14: 1151-1158
21. **Rouse, J.D., Sabatini, D.A., Sufliata, J.M., Harwell, J.H.** 1994. Influence of surfactants on microbial degradation of organic compounds. *Crit. Rev. In Environ. Sci. Technol.* 24/4: 325-370
22. **Sikkema, J., De Bont, J.A.M., Poolman, B.** 1995. Mechanism of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59: 201-222

23. **Sobisch, T., Kühnemund, L., Hübner, H., Reinisch, G., Heeg, K.H.** 1994. Effektivere Bodenreinigung mit maßgeschneiderten Tensid-Kombinationen. Terra Tech. 6: 55-56
24. **Swisher, R.D.** 1987. Surfactant biodegradation. Surfactant science series 18, Marcel Dekker, Inc. New York, 1987
25. **Tiehm, A.** 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. Appl. Environ. Microbiol. 60: 258-263
26. **Tsomides, H.J., Hughes, J.B., Thomas, J.M., Ward, C.H.** 1995. Effect of surfactant addition on phenanthrene biodegradation in sediments. Environ. Toxicol. Chem. 14: 953-959
27. **Volkering, F., Breure, A.M., Rulkens, W.H.** 1998. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. Biodegradation. 8: 401-417
28. **Van der Werf, M.J., Hartmans, S., Van den Tweel, W.J.J.** 1995. Permeabilization and lysis of *Pseudomonas pseudoalcaligenes* cells by Triton X 100 for efficient production of d-malate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 590-594

9 Ausgewählte Projekte des Forschungsverbundes

9.6 Verbundvorhaben 7: Biologische Sanierung von Kohlenwasserstoffaltlasten

9.6.3 Synthese von fettsäuremodifizierten Aminosäuren und Proteinhydrolysaten als Tenside für den mikrobiologischen Abbau von Mineralölen (TV 7.2.2)

Prof. Dr. M. P. Schneider

Dr. B. Aha
B. Jakob

Bergische Universität-GH-Wuppertal, Fb 9, Organische Chemie,
Gauss-Str. 20, 42097 Wuppertal

Förderkennzeichen: 1471090

Laufzeit: 01.01.1998 – 30.06.1999

1 Zusammenfassung und Zielsetzung

Das Forschungsprojekt wird von der Bergischen Universität-GH-Wuppertal in enger Zusammenarbeit mit den Kollegen [7] vom Umweltforschungszentrum GmbH Leipzig durchgeführt. Hauptziel der Untersuchungen ist die Beschleunigung des mikrobiellen Abbaus der Restölfraction in mineralölverseuchten Böden und Schlämmen.

In früheren Versuchen konnten die Kollegen vom UFZ zeigen, daß nur beim Einsatz verschiedener fettsäuremodifizierter Aminosäuren ein weitgehender mikrobieller Abbau der Restölfraction stattfand.

Diese Beobachtung bildete die Grundlage für eingehendere Untersuchungen dieses Abbauprozesses. Hierzu wurde eine breite Palette von *N*-acylierten Aminosäuren und Proteinhydrolysaten mit variabler Acylgruppe (Kettenlänge und Sättigungsgrad) hergestellt.

Als Ausgangsmaterial dienten neben der gesamten Palette der natürlichen Aminosäuren, Proteinhydrolysate auf pflanzlicher Basis und typische Fettsäuren wie Capryl-, Laurin-, Stearin- und Ölsäure, die aus nativen Ölen gewonnen werden.

1.1 Synthese

Zur Herstellung reiner *N*-Acylaminosäuren eignen sich prinzipiell drei Verfahren:

- (1) Schotten-Baumann Reaktion
- (2) Einhorn Reaktion
- (3) Acylierung silylierter Aminosäuren

Die Acylierung von Proteinhydrolysaten ist nach Methode (1) oder (3) möglich.

Desweiteren soll im Rahmen des Projektes die enzymatische Acylierung von Aminosäuren und Proteinhydrolysaten untersucht werden, weiterhin sollte die Eignung neuartiger Gemini-Tenside zum Abbau der Restölfraction untersucht werden.

1.2 Tensideigenschaften

Von den erhaltenen Tensiden wurden einige Tensideigenschaften ermittelt. Dazu zählt die Bestimmung der Oberflächenspannung und der kritischen mizellaren Konzentration durch Aufnahme der Oberflächenspannungs-Konzentrations-Isothermen nach der Wilhelmy-Plattenmethode.

Alle Messungen der *N*-Acylaminosäuren erfolgten bei pH 7-8 in Form ihrer Triethanolammoniumsalze. Daneben wurden das Schäumvermögen, die Schaumstabilität und das Tauchnetzvermögen der Tenside bestimmt.

2 Kenntnisstand zu Beginn der Arbeiten

In zahlreichen wissenschaftlichen Untersuchungen wurde eindeutig gezeigt, daß Kohlenwasserstoffe mikrobiell bis zu CO_2 und H_2O abgebaut werden können. Dennoch treten bei der Sanierung von mineralölkontaminierten Arealen, wie z.B. Raffineriegeländen, Probleme auf. Diese Probleme sind auf die außerordentlich komplexe Zusammensetzung der Mineralöle (einige tausend Verbindungen) zurückzuführen, sowie auf deren schlechte Bioverfügbarkeit bedingt durch die Beschaffenheit der Bodenmatrix. Je nach Art und Alter der Altlast kommt es früher oder später zu einer einsetzenden Stagnation des Abbaus.

Ansatzpunkte zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit sind eine bessere Durchmischung und gleichzeitig der Zusatz von oberflächenaktiven Substanzen.

Bei Experimenten im Rahmen des laufenden Projektes wurde überraschend gefunden, daß durch den Zusatz geringer Mengen gewisser fettsäuremodifizierter Aminosäuren der mikrobiologische Abbau der Restkohlenwasserstoffe in beachtlichem Ausmaß zunimmt. Demgegenüber zeigten die bislang getesteten handelsüblichen Tenside keinerlei Effekt. Der Einsatz derartiger fettsäuremodifizierter Aminosäuren als Tenside zum Abbau von Restkohlenwasserstoffen ist bisher in der Literatur nicht beschrieben. Wir sehen daher hier einen besonders interessanten Ansatzpunkt zur weiteren Minimierung von Mineralöl-Restkonzentrationen.

3 Synthese der Tenside

Zur Herstellung der benötigten Produktpalette wurden unter Verwendung der entsprechenden Säurechloride die folgenden drei Verfahren eingesetzt:

- (1) Schotten-Baumann Reaktion
- (2) Einhorn Reaktion
- (3) Acylierung silylierter Aminosäuren

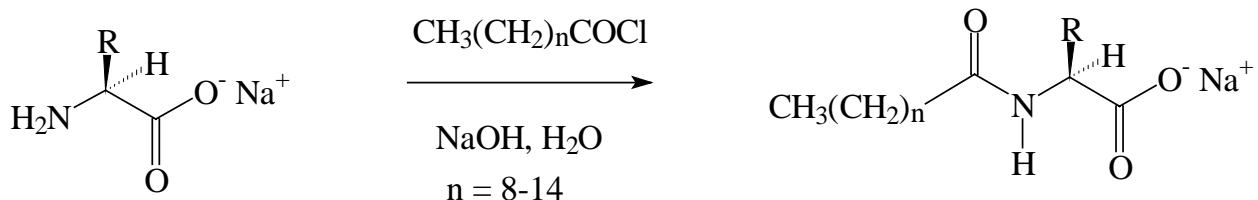


Abb. 1: Synthese von N-Acylaminosäuren – Schotten-Baumann Reaktion

Bei der Schotten-Baumann-Reaktion wird das Fettsäurechlorid direkt mit der in alkalisch wäßriger Lösung vorliegenden Aminosäure umgesetzt. Doch während beim Einsatz der Schotten-Baumann-Reaktion – sicherlich der einfachsten Methode – durch Fettsäuren verunreinigte Produkte anfallen, die oft mühsam gereinigt werden müssen, erhält man nach (2)

und (3) die gewünschten Produkte mit deutlich höherer Reinheit, da durch wasserfreie Arbeiten eine Hydrolyse der Fettsäurechloride ausgeschlossen ist.

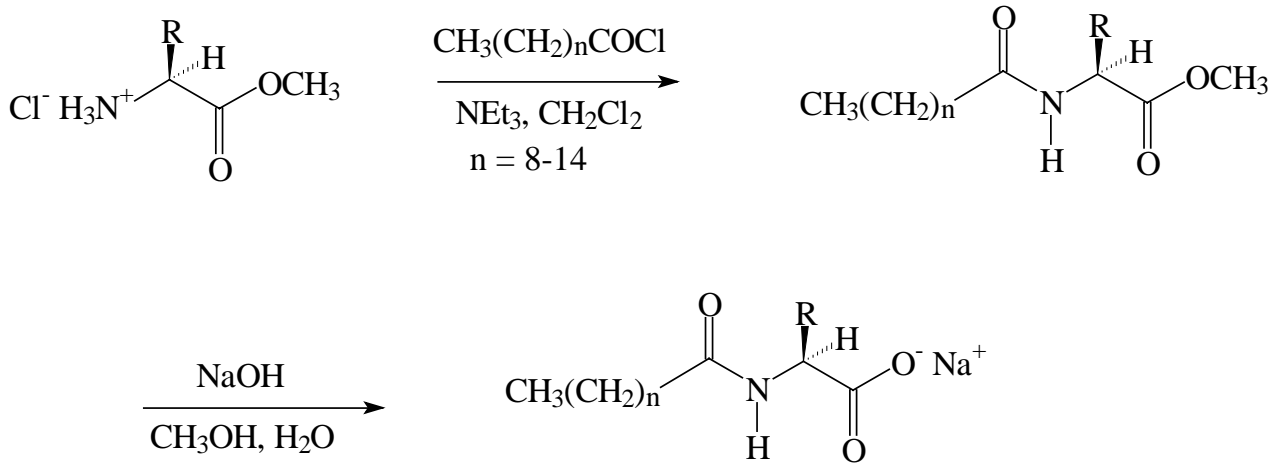


Abb. 2: Synthese von N-Acylaminosäuren – Einhorn Reaktion

Bei der Einhorn-Reaktion wird das Fettsäurechlorid mit dem entsprechenden Aminosäuremethylester umgesetzt. Dieser ist im Gegensatz zur freien Aminosäure in organischen Lösungsmitteln löslich. Im Anschluß an die Acylierung erfolgt die Freisetzung des gewünschten Produktes durch Hydrolyse des Methylesters. Nachteil dieser Methode sind die zum Schutz und zur Entschützung der Aminosäure erforderlichen, zusätzlichen Schritte.

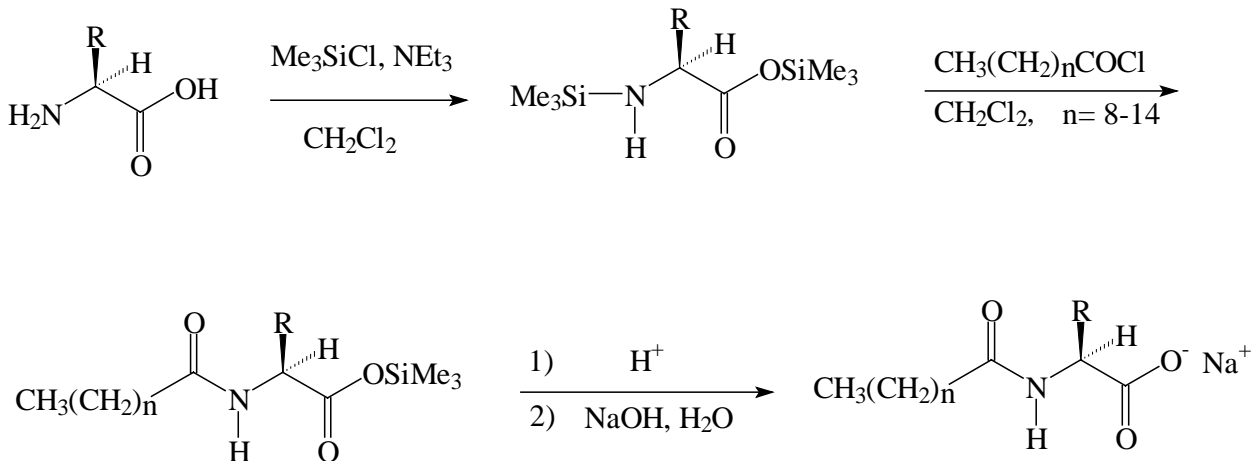


Abb. 3: Synthese von N-Acylaminosäuren – Silylierung

Bei der Acylierung werden die entsprechenden Aminosäuren zunächst silyliert und zwar sowohl an den Amino- als auch den Carboxylgruppen. Sie werden dadurch in organischen Lösungsmitteln gut löslich. Bei der anschließenden Umsetzung mit dem entsprechenden Fettsäurechlorid wird nur die Aminofunktion acyliert. Bei der wässrig extraktiven Aufarbeitung

der Reaktionsmischung erfolgt im Säuren die Hydrolyse der Silylester. Die *N*-Acylaminosäuren werden bei dieser Eintopfreaktion in hoher Reinheit und Ausbeute erhalten.

Ein wichtiger Vorteil dieser Methode ist, daß auf diese Weise auch andere protische Funktionen von Aminosäuren, z.B. Hydroxygruppen in Serin oder Tyrosin temporär geschützt werden können. Sie sind dadurch einer Acylierung nicht mehr zugänglich.

3.1 Tensideigenschaften

Zum Vergleich der Tensideigenschaften wurden von den Aminosäuren sowohl die Laurin- als auch die entsprechenden Ölsäurederivate nach Methode (2) oder (3) hergestellt.

Die so hergestellten Produktreihen von *N*-Lauroyl- und *N*-Oleoylaminosäuren wurden in Form ihrer Natrium- und Triethanolammoniumsalze auf ihre Tensideigenschaften untersucht. Letztere sind schon bei deutlich niedrigeren pH-Werten löslich als die entsprechenden Natriumsalze.

Die entsprechenden *N*-Acylderivate von Lysin, Arginin und Cystein wurden ebenfalls hergestellt und charakterisiert. Wegen der schlechten Löslichkeit der entsprechenden Salze bzw. der Oxidationsempfindlichkeit des Cysteinderivates mußte in diesen Fällen auf eine Bestimmung der Tensideigenschaften verzichtet werden.

Alle Tensideigenschaften wurden im Vergleich mit SDS (Natriumdodecylsulfat) und MARLON A (einem technischen, linearen Natriumalkylbenzolsulfonat) vermessen.

Bestimmt wurden:

- (1) Kritische mizellare Konzentration nach der Plattenmethode [3], [4], [15]
- (2) Schäumvermögen nach DIN 53902 sowie Schaumstabilität [2]
- (3) Netzvermögen nach DIN ISO 8022 [5]

3.1.1 Oberflächenspannung und kritische mizellare Konzentration (CMC)

Die Oberflächenspannung der Tensidlösungen beider Produktreihen wurden in Abhängigkeit von der Konzentration bis zum Erreichen der kritischen mizellaren Konzentration (CMC) mittels der Wilhelmy-Plattenmethode [15] bestimmt.

Für einige Laurinsäurederivate, so für die Aminosäuren Asparaginsäure, Glutamin und Serin liegen die kritischen mizellaren Konzentrationen oberhalb der Löslichkeit der Tenside (oberhalb der Krafft-Punkte) in Wasser. Hier konnten deshalb keine CMC-Werte bestimmt werden.

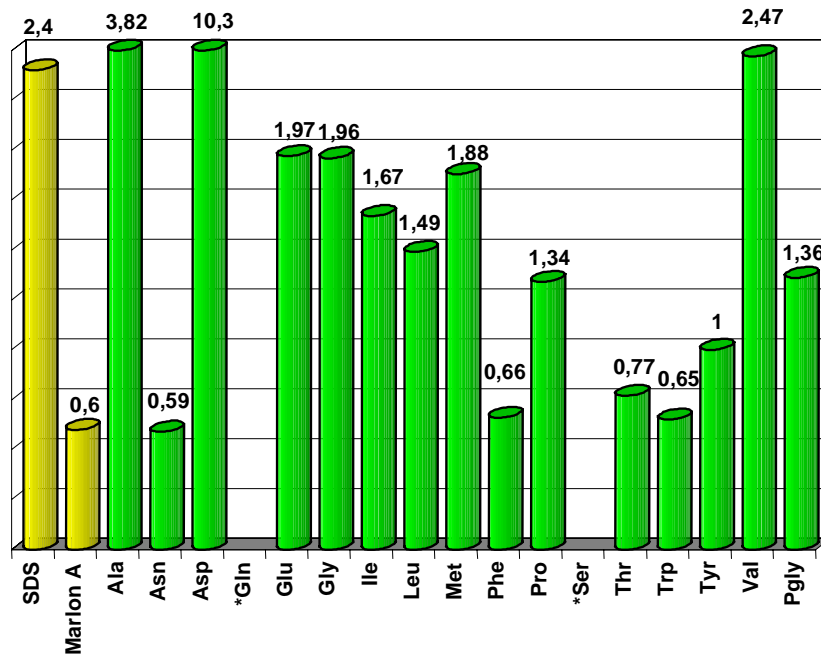


Abb. 4: Kritische mizellare Konzentrationen (CMC) N-Lauroylaminosäuren-Triethanolammoniumsalze, * CMC nicht erreicht

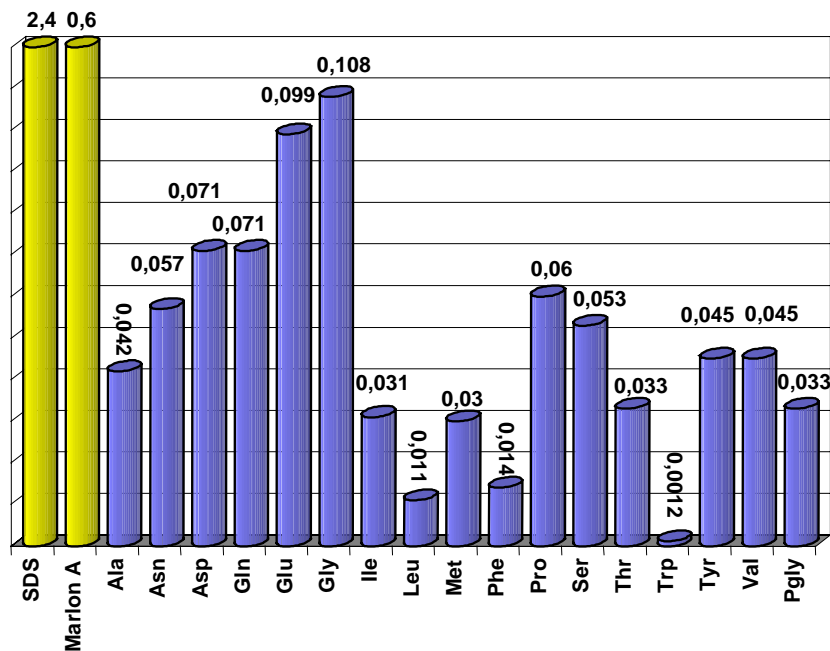


Abb. 5: Kritische mizellare Konzentrationen (CMC) N-Oleoylaminosäuren-Triethanolammoniumsalze

Ein Vergleich der CMC-Werte für beide Produktreihen liefert deutlich niedrigere Werte für die Ölsäurederivate (1,2 - 140 mg/l) im Vergleich zu den entsprechenden Derivaten der Laurinsäure (0,57 - 2,57 g/l). Es werden also von den Oleoylderivaten wesentlich geringere Mengen zum Erreichen der CMC benötigt. Diese Ergebnisse zeigen deutlich den erwarteten Einfluß der längeren, hydrophoben Alkylkette der Ölsäure.

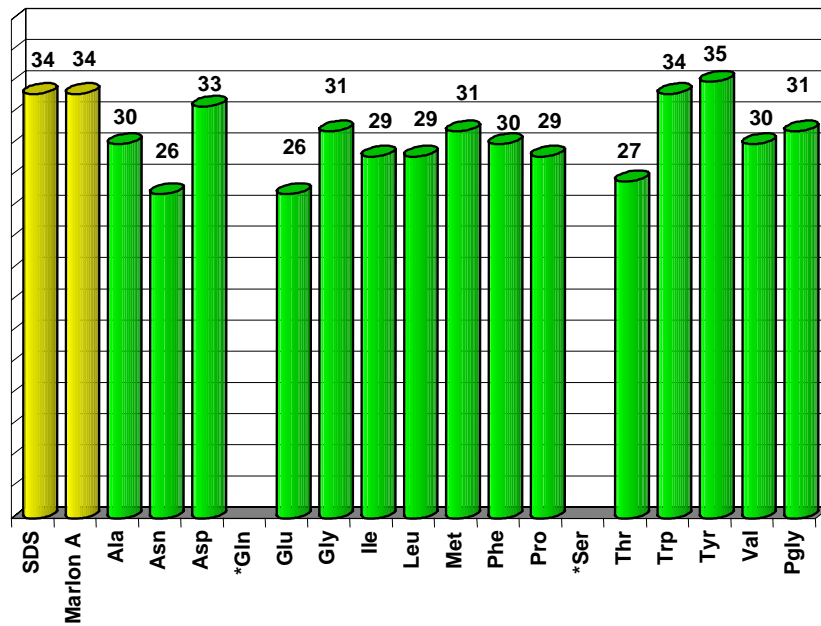


Abb. 6: Oberflächenspannung bei der kritischen mizellaren Konzentration (CMC) N-Lauroylamino säuren- Triethanolammoniumsalze; * CMC nicht erreicht

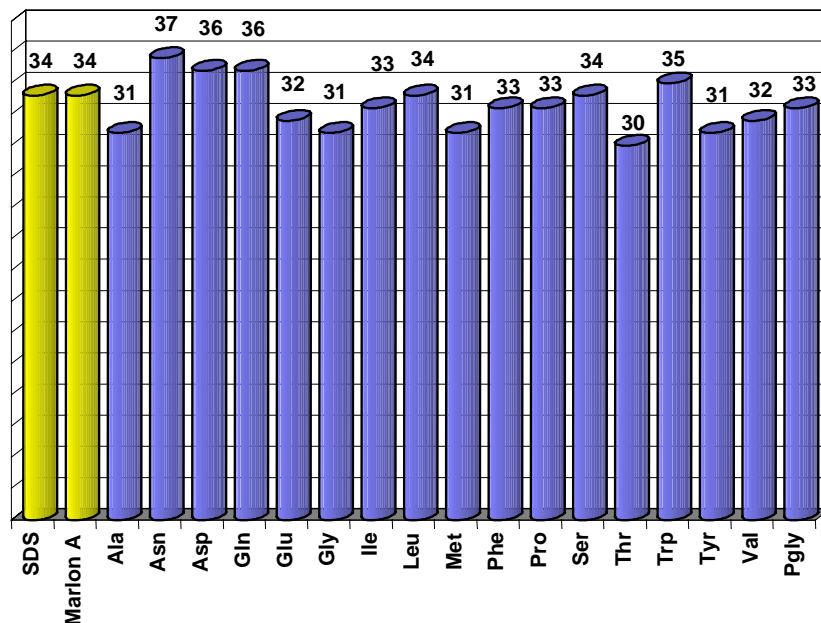


Abb. 7: Oberflächenspannung bei der kritischen mizellaren Konzentration (CMC) N-Oleoylamino säuren- Triethanolammoniumsalze

Die erzielbaren Oberflächenspannungen bei der CMC sind in Abb. 6 und Abb. 7 dargestellt. Sie entsprechen in der Größenordnung den für ionische Tenside zu erwartenden Werten. Für die Laurinsäurederivate werden mit 26-35 mN/m (Mittelwert ca. 30 mN/m) etwas niedrigere Werte als für die entsprechenden Ölsäurederivate mit 30-37 mN/m (Mittelwert ca. 33 mN/m) gefunden.

3.1.2 Schäumvermögen

Das Schäumvermögen beider Produktreihen wurde nach der Schlagschaummethode (DIN 53092 Teil 1 [2]) ermittelt. Dabei werden 200 ml einer Tensidlösung in einen Standzylinder gefüllt und mittels eines durchlöchernten Stempels 60 mal innerhalb von einer Minute geschlagen.

Die dabei erzielten Schaumhöhen über den Tensidlösung werden 30 s nach Beendigung des Schlagens abgelesen. Die Ölsäurederivate sind mit wenigen Ausnahmen den Laurinsäurederivaten hinsichtlich ihres Schäumvermögens überlegen sind. Lediglich *N*-Oleoyl-asparaginsäure zeigt ein extrem schwaches Schäumvermögen.

Die restlichen Ölsäurederivate liefern Werte, die durchaus mit denjenigen der Standards SDS und MARLON A vergleichbar sind. Die Variationsbreite innerhalb der Reihe der Ölsäurederivate ist geringer, als bei den entsprechenden Laurinsäurederivaten.

N-Lauroylaminosäuren mit aliphatischem und aromatischem Substituenten zeigen innerhalb dieser Reihe das größte Schäumvermögen. Derivate mit polaren Substituenten wie Serin, Glutaminsäure, Glutamin, Asparaginsäure und Asparagin zeigen dagegen nur schwaches Schäumvermögen.

3.1.3 Schaumstabilität

Die Schaumstabilität wird 5 min. nach Beendigung des Schlagens durch Bestimmung der Restschaumhöhe über der Tensidlösung ermittelt. Die Schaumstabilitäten sind bei den Ölsäurederivaten im allgemeinen besser als bei den entsprechenden *N*-Lauroylaminosäuren.

Sie liegen mit durchschnittlich 83 % deutlich höher als diejenigen der Laurinsäurederivate mit durchschnittlich 55 % und liegen damit nahe an den Standards die 86 % der ursprünglichen Schaumhöhe aufwiesen.

3.1.4 Tauchnetzvermögen

Das Tauchnetzvermögen der beiden Produktreihen wurde nach DIN ISO 8022 bestimmt. Dabei wird ein standardisiertes Gewebestück mittels einer speziell konstruierten Klammer unter standardisierten Bedingungen in eine Tensidlösung bekannter Konzentration (hier $c = 1 \text{ g/l}$) getaucht. Bei der Benetzung des Gewebes durch die Tensidlösung wird die darin eingeschlossene Luft verdrängt und das Gewebestück sinkt dadurch zu Boden.

Die Zeit zwischen dem Eintauchen des Gewebes bis zu dessen Absinken ist ein Maß für das Netzvermögen des untersuchten Tensids.

Die für beide Produktreihen ermittelten Werte bilden den Durchschnitt aus 12 Messungen bei zwei Streichergebnissen. Bei schwachem Netzverhalten wurden die Messungen nach spätestens 600 s abgebrochen.

Die Ergebnisse zeigen, daß man bei den *N*-Lauroylaminosäuren zwei Gruppen mit deutlich unterschiedlichem Netzverhalten unterscheiden kann. Während Derivate der Aminosäuren mit unpolaren Substituenten (Ala, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Val) gutes bis sehr gutes Netzvermögen und Netzzeiten zwischen 11 und 60 s zeigen - sie sind damit mit den Standard-Tensiden

vergleichbar - findet man bei den Derivaten mit polaren Aminosäuren (Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, Tyr, Thr) ein ausgeprägt schwaches Netzvermögen mit Werten über 600 s.

In der Reihe der Ölsäurederivate erweist sich der Einfluß der Aminosäure als weniger ausgeprägt. Wiederum findet man bei den polaren Vertretern (Asn, Asp, Glu) ein nur schwaches Netzvermögen. Generell läßt sich feststellen, daß alle anderen Ölsäurederivate mit Netzzeiten um 100 s ein nur mäßiges Netzvermögen zeigen.

4 Tensideigenschaften Zusammenfassung

Ein Vergleich der kritischen mizellaren Konzentrationen (CMC) für beide Produktreihen zeigt deutlich niedrigere Werte für die Ölsäurederivate (1,2 - 140 mg/l) verglichen mit den entsprechenden Derivaten der Laurinsäure (0,57 - 2,57 g/l).

Weitere Untersuchungen belegen für das Schäumverhalten und die Schaumstabilität die Überlegenheit der Ölsäurederivate. Dagegen erwiesen sich die Ölsäurederivate im Vergleich zu den Laurinsäurederivaten als schlechtere Netzer. Die unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Produktreihen sind in Tab. 1 in vergleichend zusammengefaßt.

Tab. 1: N-Lauroyl- und N-Oleoylaminosäure-salze – Tensideigenschaften im Vergleich

N-Lauroylaminosäure-salze	N-Oleoylaminosäure-salze
• hohe CMC	• niedrige CMC
• gutes Schäumvermögen	• gutes Schäumvermögen
• gutes Netzvermögen	• schwaches Netzvermögen

4.1 Acylierung von Proteinhydrolysaten – Eiweiß-Fettsäure Kondensate

Im Zusammenhang mit einem anderem Forschungsvorhaben [8] wurden außerdem Tenside (Eiweiß-Fettsäure Kondensate) durch Acylierung von Rapsproteinhydrolysaten hergestellt.

Die Herstellung der fettsäuremodifizierten Proteinhydrolysate gelang mit Hilfe der klassischen Schotten-Baumann-Reaktion, unter Verwendung von Säurechloriden (hier: Laurinsäurechlorid) im alkalischen Milieu.

Bei der Bestimmung der Tensideigenschaften in Schaumverhalten, Netzverhalten und Bildung der kritisch mizellaren Konzentration wurden die in aufgeführten Ergebnisse erhalten. Neben den acylierten Rapshydrolysaten (H21Ac01 und H22Ac01) dienten wiederum die Standardtenside Marlon A und SDS als Vergleich. Ein kommerziell erhältliches Weizenhydrolysat (W20Ac01), das unter den gleichen Bedingungen acyliert wurde, ist ebenfalls zum Vergleich herangezogen worden.

Tab. 2: Tenseideigenschaften der acylierten Proteinhydrolysate

Probenbezeichnung	Aussehen des Schaums	Schäumvermögen [ml]	Schaumstabilität [ml]	Netzvermögen [s^{-1}]	CMC [g/l]	σ (CMC) [mN/m]	c (σ^{40}) [g/l]
Marlon A	n.b.	670	560	9,7	0,6	34	0,44
SDS	n.b.	760	650	22	2,4	34	0,89
A1: W20Ac01	gröberer Schaum	90	60	> 600	0,38	32	0,22
A2: H21Ac01	etwas grober Schaum	240 ¹	185 ¹	> 600 ¹	n.a.	n.a.	n.a.
A3: H22Ac01	etwas grober Schaum	370 ¹	255 ¹	> 600 ¹	0,559 ²	41 ²	0,61 ²

¹: Salzhaltige Probe²: Entsalzte Probe - Ergebnisse vorläufig

Die untersuchten Eiweiß-Fettsäure-Kondensate zeigten ein mäßiges Schäumvermögen und Schaumstabilität. Ihre Netzigenschaften sind gering und könnten auf noch vorhandene polare Proteinseitenketten zurückzuführen sein. Beim farblichen Vergleich stehen die acylierten Rapshydrolysate den kommerziell erhältlichen nicht nach, denn sie besitzen beide eine hell-beige Farbe und sind sehr gut wasserlöslich. Die kritische Mizellkonzentration (CMC) für das Rapstensid liegt im Bereich des Standardtensids Marlon A.

Die hier beschriebenen Ergebnisse können bislang nur als vorläufig gewertet werden. Sie werden in nachfolgenden Arbeiten durch systematische, umfassende Untersuchungen vertieft und gesichert.

4.1.1 Solubilisierungswirkung

Die Solubilisierung [13] lipophiler Substanzen durch Tensidlösungen ist eng mit der Mizellbildung verknüpft, denn sie findet nur innerhalb der Mizelle statt und deshalb muß die Tensidkonzentration oberhalb der kritischen Mizellkonzentration CMC liegen. Von größter Bedeutung ist dies, wenn wasserunlösliche Verbindungen in die wäßrige Phase gebracht werden sollen.

Die Solubilisierung ermöglicht die Formulierung von Pharmaka, Kosmetika und Insektiziden. Durch solche Tensidformulierungen können organische Lösungsmittel und Cosolventien durch Wasser ersetzt werden. Dam et al. [1] fanden für Toluol und Hexan eine signifikant bessere Solubilisierung durch bestimmte Gemini-Tenside, als durch die entsprechenden Monomeren-Tenside. Gemini-Tenside [9], [10], [12], [13], [17], [18] sind *unkonventionelle* Tenside, denn sie bestehen aus zwei (oder mehr) Tensid-Untereinheiten, welche über einen „Spacer“, in der Nähe der hydrophilen Kopfgruppe miteinander verbunden sind. Diese bessere Solubilisierung könnte von entscheidender Relevanz bei der mikrobiellen Reinigung mineralölkontaminierter

Böden mit Hilfe von Tensiden [14] sein. Hierbei ist ein Haupteffekt die Solubilisierung der ansonsten immobil Kohlenwasserstoffe. Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von Kohlenwasserstoffen unter Zusatz von Gemini-Tensiden wurden am UFZ-Leipzig durchgeführt [7].

4.2 Enzymatische N-Acylierung von Aminosäuren

Im Hinblick auf innovative Neuentwicklungen soll nunmehr im vorliegenden Forschungsvorhaben versucht werden, Acylierungen von Aminosäuren und Proteinhydrolysaten möglichst direkt auf enzymatischem Wege zu erreichen. Ein hochgestecktes Ziel, welches bis zu einem endgültigen Erfolg sicher beträchtliches Durchhaltevermögen erfordern wird.

Zur enzymatischen Acylierung von Aminosäuren finden sich in der Literatur nur wenig Hinweise [11], [6], [16]. Beispiele dafür sind die Acylierung von L-Methionin im wässrigen Medium in Gegenwart der Acylase aus Hog Kidney.

5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der ersten Phase des Projektes war es das Hauptziel eine breite Palette N-acylierter Aminosäuren zu synthetisieren und eingehend auf ihre Tensideigenschaften hin zu untersuchen. Aus dieser Palette der acylierter Aminosäuren und Proteinhydrolysate konnte eine Auswahl vom Projektpartner im Hinblick auf seine Eignung zur Reduktion des Restölgehaltes hin untersucht werden.

Tab. 3: Auswahl der vom UFZ getesteten N-Acylaminosäuren

N-Lauroyl-L-Leucin Natriumsalz	N-Lauroyl-D-Leucin Natriumsalz
N-Lauroyl-L-Isoleucin Natriumsalz	N-Lauroyl-D-Valin Natriumsalz
N-Lauroyl-L-Alanin Natriumsalz	N-Lauroylglycin Natriumsalz
N, 'N-Dilauroyl-L-Lysin	N-Lauroyl-L-Prolin Natriumsalz
N-Lauroyl-L-Glutaminsäure Dinatriumsalz	N-Lauroyl-L- ^{tert.} Leucin Natriumsalz
N-Lauroyl-L-Serin Natriumsalz	N-Caprinoyl-L-Leucin Natriumsalz
N-Lauroyl-L-Methionin Natriumsalz	N-Capryloyl-L-Leucin Natriumsalz
N-Lauroyl-L-Valin Natriumsalz	N-Myristoyl-L-Leucin Natriumsalz
N-Lauroyl-L-Glutamin	N-Lauroyl-L-Histidin
N-Lauroyl-D-Hydroxyphenylglycin	N-Lauroyltryptophan
N-Lauroyl-L-Tyrosin	Laurinsäure acyliertes Rapsproteinhydrolysat
N,N'-Dilauroyl-dimethylen-N,N'-bisessigsäure Dinatriumsalz	N,N'-Dilauroyl-dimethylen-N,N'-bispropionsäure Dinatriumsalz

6 Ausblick

Durch die Acylierung von D-Aminosäuren und nicht proteinogener Aminosäuren werden enantiomere Tenside erhalten die bei gleichen grenzflächenaktiven Eigenschaften eine andere biologische Wirkung besitzen. Durch den Einsatz dieser Verbindungen sollten zusätzliche Informationen über die Wirkungsmechanismen bei den Ölabbaureaktionen gewonnen werden.

Um die Palette der Möglichkeiten zur Darstellung von Tensiden zu vergrößern, soll das bisher erfolgreich verfolgte Konzept zur Herstellung von Tensiden auf pflanzlicher Basis unter Verwendung enzymatischer Methoden weiter verfolgt und im Hinblick auf innovative Methoden erweitert und vertieft werden.

So sollen insbesondere Lösungen in Problembereichen wie der enzymatischen Acylierung von Aminosäuren und Oligopeptiden erarbeitet werden.

Weiteres Ziel ist die Bereitstellung größerer Mengen von acylierten Proteinhydrolysaten auf der Basis von Rapsprotein und deren eingehende Charakterisierung.

Alle hier hergestellten Verbindungen sollen hinsichtlich ihrer chemischen und oberflächenaktiven Eigenschaften charakterisiert werden.

7 Formeln und Abkürzungen

CMC	kritische mizellare Konzentration
σ CMC	Oberflächenspannung bei der CMC

8 Eigene Veröffentlichungen und Dissertationen

Waldinger C. 1996. Dissertation Universität-GH-Wuppertal.

Schneider M., B. Aha, B. Haase, J. Hermann, G. Machmüller, C. Waldinger. 1996. Combination of Lipids, Proteins and Carbohydrates: Surface Active Compounds From Plant Materials, 52. DGF-Tagung, Bremen.

Hermann J. 1997. Dissertation Universität-GH-Wuppertal.

Aha B., M. Berger, B. Haase, J. Hermann, O. Keil, G. Machmüller, S. Müller, C. Waldinger, M. Schneider. 1997. Tenside aus nachwachsenden Rohstoffen. in Tagungsband: 5. Symposium Nachwachsende Rohstoffe - Perspektiven für die Chemie, Schriftenreihe des Bundes-minis-teriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, Reihe A: Angewandte Wissenschaften, Berlin.

Aha B., B. Haase, J. Hermann, G. Machmüller, C. Waldinger, M. Schneider, 1998. „Biologisch Abbaubare Tenside aus heimischen Ölen,, in Nachwachsende Rohstoffe Band XII: Chemische Nutzung heimischer Pflanzenöle, Landwirtschaftsverlag Münster.

Aha B. 1999. Dissertation Universität-GH-Wuppertal.

9 Literaturverzeichnis

1. **Dam T., J. B. F. N. Engberts, Karthäuser, S. Karaborni, N. M. von Os.** 1996. Colloids and Surfaces A 118: 41-49.
2. **DIN 53902.Teil:** Prüfung von Tensiden und Tensidhilfsmitteln, Bestimmung des Schäumvermögens, Lochscheibenschlagverfahren, 1077.
3. **DIN 53914.** 1980. Bestimmung der Oberflächenspannung.
4. **DIN ISO 4311.** 1979. Bestimmung der CMC.
5. **Domingo X., L. Fiquet, H. Meijer.** 1992. Tenside Surf. Det. 29: 16.
6. **Ferjancic-Biagini A., T. Giardina, M. Reynier A. Puigserver.** 1997. Biocatalysis and Biotransformation, 15: 313-323.
7. **Forschungsverbundprojekt:** Biologische Verfahren zur Bodensanierung: siehe Projekt 7.21 und 7.22 unter <http://www.dechema.de/biotech/bodenr.htm>
8. **BML-Verbundvorhaben:** Chemische Nutzung heimischer Pflanzenöle II; TV 4: Biologisch abbaubare Tenside aus heimischen Ölen; Förderkennzeichen: FKZ 97 NR 175 F
9. **Menger F. M., C. A. Littau.** 1993. J. Am. Chem. Soc. 115: 10083-10090.
10. **Menger F.M., C. A. Littau.** 1991. J. Am. Chem. Soc. 113: 1451-1452.
11. **Montet D., F. Sevet, M. Pina, J. Graille, P. Galzy, A. Arnaud, H. Ledon, L. Marcon.** 1990. J. Am. Oil Chem. Soc. 67: 273-276.
12. **Rosen M. J.** 1993. Chemtech., 30-33.
13. **Rosen M. J.** 1989. Surfactants and Interfacial Phenomena, 2. Ed, John Wiley, New York.
14. **Volkering F., A. M. Breure, W. H. Rulkens.** 1998. Biodegradation 8: 401-417.
15. **Wilhelmy L.** 1863. Ann. Phys. Chem., 29: 177.
16. **Yokoigawa K., E. Sato, N. Esahi, K. Soda.** 1994. Appl. Microbiol. Biotechnol, 42: 287-289.
17. **Zana R.** 1997. Bolaform and dimeric (gemini) surfactants S. 81-103, in Spec. Surfactants, ed. D. I. Robb, Publ. Blackie, London.
18. **Zana R.** 1998. in „Novel Surfactants,, Surfactant Science Series Vol 74, Ed. C. Holmberg, M. Dekker, New York, Chapter 8, Dimeric (Gemini) Surfactants, 242-273.