

# **Ozonierung schadstoffbelasteter Böden in Kombination mit mikrobiologischen Verfahren**

**Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover**

**zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. Nat.**

**genehmigte Dissertation**

**von**

**Dipl. Chem. Joachim Stehr**

**Geboren am 04.07. 1972 in Hannover, Niedersachsen**

**2001**

**Hauptreferent: Prof. Dr. T. Scheper**

**Korreferent: Prof. em. Dr. Dr. h.c. K. Schügerl**

**Tag der Promotion: 14. 05. 2001**

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und sowohl die benutzten Hilfsmittel als auch die zu Hilfsleistungen herangezogenen Personen und Institutionen vollständig angegeben habe. Ich versichere, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, Februar 2001

Joachim Stehr

## Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit vom April 1998 bis Dezember 2000 am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. T. Scheper durchgeführt. Ich möchte mich im Besonderen bei ihm für die Überlassung des vorliegenden interessanten Themas, die Gewährung des Freiraums bei der Bearbeitung und die Bereitstellung der gebotenen Arbeitsmöglichkeiten bedanken. Herrn Prof. em. Dr. Dr. h.c. K. Schügerl danke ich für die bereitwillige Übernahme des Korreferats.

Der Deutschen Bundesstiftung Umwelt DBU möchte ich für die finanzielle Förderung der Arbeiten danken. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank auch Herrn Torsten Müller, mit dem es im Rahmen eines weiteren DBU-Projektes am Institut für Technische Chemie zu weitgehenden Kooperationen gekommen ist.

Meinen Eltern möchte ich für jegliche Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion herzlichst danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Chulaporn Kamnerdpetch, die mich im Rahmen ihres von der Carl-Duisberg-Gesellschaft geförderten Aufenthalts am Institut für Technische Chemie unterstützt hat. Das vielgepriesene Motto „Viel hilft Viel“ sollte man aber bei Chilischoten doch noch mal überdenken.

Desgleichen möchte ich mich bei Katharina Svensson für ihren Einsatz im Rahmen einer Diplomarbeit und bei Oliver Schweder für die Durchführung seines Schwerpunktpraktikums bedanken.

Allen weiteren Mitarbeitern, besonders aus dem „Neubau“ und der TCI-Bibliothek, danke ich für die oft so angenehme Kurzweil während der Arbeit und die tatkräftige Unterstützung beim Korrekturlesen. Dabei gilt mein besonderer Dank Michael Höfer, Ralf Finke, Joachim Ryll und Marc Laroche.

## Kurzfassung

### Ozonierung schadstoffbelasteter Böden in Kombination mit mikrobiologischen Verfahren

Der mikrobiologische Schadstoffabbau eignet sich sehr gut zur Sanierung von mit leicht wasserlöslichen und bioverfügbaren Schadstoffen kontaminierten Böden. Bei sandigen Böden mit hohen Durchlässigkeiten für Sauerstoff und Wasser sind die Sanierungsaussichten daher als gut einzuschätzen. Feinkörnige Böden, eine schlechte Wasserlöslichkeit und Bioverfügbarkeit der Schadstoffe wie die der PAK führen sehr leicht zu Limitierungen des Schadstoffabbaus. Der Abbau erfolgt nur langsam und ein Totalabbau der Schadstoffe lässt sich in den meisten Fällen nicht erreichen.

Eine Strategie zur Verbesserung der Wasserlöslichkeit und der Bioverfügbarkeit der PAK ist die Voroxidation eines mit PAK kontaminierten Bodens durch Ozon, um die anoxidierten Schadstoffe auf diese Weise einem mikrobiologischen Abbau besser zugänglich zu machen.

Ein wichtiger Teil der Arbeiten wurde am Modellsystem Phenanthren als ein Vertreter der Substanzklasse der PAK durchgeführt. Durch fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen konnte eine Erhöhung der Wasserlöslichkeit und der Bioverfügbarkeit des Phenanthrens nach erfolgter Vorozonierung des kontaminierten Bodens nachgewiesen werden, wenn der Ozoneintrag niedrig gehalten wurde. Die Ursache dafür war möglicherweise die Oxidation der Huminstoffe zu kleineren Molekülen mit verbesserter Wasserlöslichkeit. Adsorbierte PAK konnten auf diese Weise mit in die wässrige Phase überführt werden. Es konnten 7 Oxidationsprodukte des Phenanthrens gaschromatisch nachgewiesen und 4 weitere postuliert werden. Ein im Vergleich zum Ausgangsschadstoff verbesserter mikrobiologischer Abbau dieser Oxidationsprodukte durch Rein- und Mischkulturen war nur möglich, wenn mindestens monoaromatische Substanzen aus der Ozonolyse hervorgegangen waren. Eine Erhöhung der Toxizität Phenanthren- und PAK-kontaminierter Böden durch Ozonierung konnte durch Untersuchungen mit *S. yanoikuyae*, *V. fischeri*, *B. subtilis*, Mischkulturen und Kresse nachgewiesen werden. Der mikrobiologische Schadstoffabbau in Bodensuspension mittels *S. yanoikuyae* und einer Mischkultur wurde durch eine Vorozonierung gar nicht oder nur wenig verbessert.

Schlagworte: Mikrobiologischer PAK-Abbau; Vorozonierung; Bioverfügbarkeit

---

## Abstract

### Ozonation of contaminated soils in combination with microbial degradation of PAH

The remediation of sites contaminated with PAH can be performed easily by microbial methods, which lead to a natural mineralization of the contaminants. Biological treatment has been demonstrated to be a feasible and common remediation technology which has been successfully applied to the clean-up of contaminated soils, if the permeability of water and oxygen in the soil is high enough. Soils containing shares of clay as well as bad solubility and low bioavailability of contaminants like PAH are causing limitations in biodegradability of these substances. For these reasons biological oxidation processes are often inherently slow and total mineralization to carbondioxide cannot be achieved.

Because bioavailability of the contaminants is of great importance for a successful bioremediation the idea is to test a chemical pre-oxidation step by ozone to enhance a following biodegradation step. Oxidation of PAH by ozone should result in reaction products that have a better solubility in water and a better bioavailability.

A main part of this work was done by examinations of the model substance phenanthrene as a typical compound of polycyclic aromatic hydrocarbons. Analysis by 2-D fluorescence spectroscopy showed an increasing phenanthrene concentration in soil suspensions if the ozone input in the soils was quite low. The ozonation of the humic acids lead to low mass molecules of humic acids that were better soluble into water. By this way PAH adsorbed to these humic acids has been transferred into the aqueous phase. Analysis by GC-MS showed 7 identified conversion-products of phenanthrene and 4 substances were supposed to be further reaction products. In comparison to phenanthrene these conversion-products were better biodegraded by *S. yanoikuyae* or mixed culture when the ozonation resulted in monoaromatic compounds. Investigations about the toxicity of contaminated and ozonated soils were carried out by tests of *S. yanoikuyae*, *V. fischeri*, *B. subtilis*, mixed cultures and gardencress. The ozonated soils showed toxic or inhibitory effects to different organisms than the PAH itself. The microbial degradation of PAH in slurry reactors by *S. yanoikuyae* or mixed culture wasnot enhanced significantly by pre-ozonation of the contaminated soil.

Keywords: bioremediation of PAH; pre-ozonation; bioavailability

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>THEORETISCHER TEIL</b> .....	<b>2</b>
2.1	MIKROBIELLER ABBAU VON PAK .....	2
2.1.1	<i>Mikrobiologisch abbaubare PAK und beteiligte Organismen</i> .....	2
2.1.2	<i>Mechanismen des mikrobiologischen PAK-Abbaus</i> .....	3
2.2	PAK-ABBAU AM BEISPIEL DES PHENANTHRENS DURCH <i>SPHINGOMONAS YANOIKUYAE</i> B1 .....	8
2.3	LIMITIERUNGEN DES MIKROBIOLOGISCHEN PAK-ABBAUS .....	9
2.3.1	<i>Biotische Limitierungen des Schadstoffabbaus</i> .....	9
2.3.2	<i>Bioverfügbarkeit als Hauptproblem des mikrobiologischen PAK-Abbaus</i> .....	11
2.4	STRATEGIEN ZUR VERBESSERUNG DER BIOVERFÜGBARKEIT UND DES MIKROBIOLOGISCHEN ABBAUS..... VON PAK .....	13
2.4.1	<i>Verbesserung der Bioverfügbarkeit von PAK durch physikalisch-mechanische Massnahmen</i> .....	13
2.4.2	<i>Erhöhung der Bioverfügbarkeit von PAK durch Tenside</i> .....	14
2.4.3	<i>Oxidation von PAK durch Wasserstoffperoxid oder Ozon</i> .....	15
2.4.4	<i>Enzymatische Oxidation zum Abbau von PAK</i> .....	17
2.4.5	<i>Der Einsatz thermophiler Mikroorganismen beim mikrobiologischen PAK-Abbau</i> .....	18
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>20</b>
3.1	VERWENDETE PAK .....	20
3.2	MIKROORGANISMEN .....	21
3.2.1	<i>Verwendete Mikroorganismen</i> .....	21
3.2.2	<i>Gewinnung eines auf Fluoren, Fluoranthren, Phenanthren, Pyren und Benzo[g,h,i]perylen und deren Ozonierungsprodukten angereicherten Mikroorganismenkonsortiums</i> .....	21
3.2.3	<i>Stammhaltung der verwendeten Mikroorganismen</i> .....	23
3.2.3.1	<i>Stammhaltung auf Agarplatten</i> .....	23
3.2.3.2	<i>Anlegen von Gefrierkulturen</i> .....	24
3.3	DIE VERWENDETEN BÖDEN .....	24
3.4	BESTIMMUNG DES MIKROBIELLEN WACHSTUMS .....	25
3.4.1	<i>Mikroskopische Bestimmung der Gesamtzellzahl</i> .....	25
3.4.2	<i>Bestimmung der Lebendzellzahl durch Ausplattierung</i> .....	26
3.4.3	<i>Messung des Proteingehaltes</i> .....	26
3.4.4	<i>Bestimmung der enzymatischen Hydrolyse von Fluoresceindiacetat</i> .....	27
3.4.5	<i>Messung der Dehydrogenaseaktivität</i> .....	27
3.4.6	<i>Bestimmung der optischen Dichte</i> .....	29
3.4.7	<i>Bestimmung der Vitalität von Zellsuspensionen mittels Durchflusszytometrie</i> .....	30
3.5	ONLINE-ANALYTIK.....	31
3.5.1	<i>Temperaturmessung</i> .....	31
3.5.2	<i>Messung des pH-Wertes</i> .....	31
3.5.3	<i>Erfassung des Gelöstsauerstoffgehaltes (pO<sub>2</sub>-Wert)</i> .....	31
3.5.4	<i>Kohlendioxidmessung (CO<sub>2</sub>) im Abgas</i> .....	31

3.5.5	<i>Sauerstoffmessung (O<sub>2</sub>) im Abgas</i> .....	32
3.5.6	<i>Datenaufnahme bei Kultivierungen im Bioreaktor</i> .....	32
3.6	OFF-LINE-ANALYTIK .....	33
3.6.1	<i>Durchführung der 2D-Fluoreszenzmessungen</i> .....	33
3.6.2	<i>Messung des pH-Wertes</i> .....	33
3.6.3	<i>Bestimmung des Phosphatgehaltes</i> .....	34
3.6.4	<i>Bestimmung des Nitratgehaltes</i> .....	34
3.6.5	<i>Bestimmung des Ammoniumgehaltes</i> .....	35
3.6.6	<i>Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffgehaltes DOC</i> .....	35
3.6.7	<i>Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs CSB</i> .....	36
3.6.8	<i>Bestimmung des PAK-Gehaltes</i> .....	36
3.6.8.1	<i>Feste Bodenproben oder Quarzsandproben</i> .....	36
3.6.8.2	<i>10% Boden- oder Quarzsandsuspensionsproben</i> .....	37
3.6.8.3	<i>Festphasenextraktion der PAK-Extrakte</i> .....	38
3.6.8.4	<i>Bestimmung der PAK-Konzentration mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie</i> .....	38
3.7	ANALYTIK VON OZONIERUNGSPRODUKTEN DER PHENANTHRENOXIDATION .....	40
3.7.1	<i>Herstellung von Methanolextrakten nach der Ozonierung von Phenanthren</i> .....	40
3.7.2	<i>Dünnschichtchromatographie von Ozonierungsprodukten</i> .....	40
3.7.3	<i>Säulenchromatographie von Ozonierungsprodukten</i> .....	40
3.7.4	<i>Derivatisierung mit MSTFA und Analyse mittels GC-MS</i> .....	41
3.7.5	<i>Analytik der Ozonierungsprodukte des Phenanthrens mittels Kapillarelektrophorese</i> .....	41
3.7.6	<i>Synthese der Referenzsubstanzen 2,2'-Biphenyldialdehyd und 2'-Formyl-2-Biphenylcarbonsäure</i> . .....	44
3.8	OZONERZEUGUNG UND DURCHFÜHRUNG DER OZONIERUNGEN.....	44
3.8.1	<i>Sander Labor-Ozonisator</i> .....	44
3.8.2	<i>Bestimmung der Ozonkonzentration mit dem Messgerät der Fa. Sander</i> .....	45
3.8.3	<i>Der verwendete Laborreaktor</i> .....	46
3.8.4	<i>Durchführung der Ozonierung mit dem Laborreaktor</i> .....	46
3.8.5	<i>Der verwendete Technikumsreaktor</i> .....	47
3.8.6	<i>Durchführung der Ozonierung mit dem Technikumsreaktor</i> .....	47
3.9	DURCHFÜHRUNG DER MIKROBIOLOGISCHEN ABBAUVERSUCHE .....	48
3.9.1	<i>Vorkulturen für mikrobiologische Abbauversuche</i> .....	48
3.9.2	<i>Phenanthrenabbau durch <i>S. yanoikuyae</i> in 10% Bodensuspension im Schüttelkolben</i> .....	48
3.9.3	<i>Phenanthren- und PAK-Abbau durch <i>S. yanoikuyae</i> und Mischkulturen in 10% Bodensuspension im Bioreaktor</i> .....	49
3.9.3.1	<i>Durchführung der Kultivierung</i> .....	49
3.9.3.2	<i>Probenahme während der Kultivierungen im Biostat B</i> .....	50
3.10	TOXIZITÄTSUNTERSUCHUNGEN .....	50
3.10.1	<i>Durchführung der Exponentiellen Wachstumstests in Schüttelkolben</i> .....	50
3.10.2	<i>Test auf mikrobiologische Abbaubarkeit von Ozonierungsprodukten des Phenanthrens</i> .....	51
3.10.3	<i>Test auf Hemmung der Lumineszenzaktivität von <i>Vibrio fischeri</i></i> .....	51
3.10.4	<i>Hemmung der Dehydrogenaseaktivität von <i>Bacillus subtilis</i> im Kontakttest</i> .....	54



---

3.10.5	Wurzellängenwachstumstest mit <i>Lepidium sativum</i> L. (Gartenkresse).....	55
3.10.6	Bestimmung der Bodenatmung .....	55
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>57</b>
4.1	EINLEITUNG .....	57
4.2	VORUNTERSUCHUNGEN .....	57
4.2.1	PAK-Analytik .....	57
4.2.2	Vergleich der Bestimmungsmethoden mikrobieller Aktivität .....	60
4.2.3	Analytik von Ozonierungsprodukten des Phenanthrens.....	62
4.2.3.1	Dünnschichtchromatographie und Säulenchromatographie .....	63
4.2.3.2	Derivatisierung und Analyse durch GC-MS .....	65
4.2.4	Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Phenanthren.....	72
4.3	ABBAUVERSUCHE VON PHENANTHRENKONTAMINATIONEN AUF BODEN UND QUARZSAND DURCH OZONIERUNG UND ANSCHLIEßENDEM ABBAU IM SCHÜTTELKOLBEN MIT <i>S. YANOIKUYAE</i> .....	75
4.4	PHENANTHRENABBAU IM BIOREAKTOR DURCH <i>S. YANOIKUYAE</i> DSM 6900 .....	81
4.4.1	Phenanthrenabbau in 10% Quarzsandsuspension im Bioreaktor nach Voroxidation mit Ozon ...	81
4.4.2	Phenanthrenabbau in 10% Bodensuspension im Bioreaktor nach Voroxidation mit Ozon .....	87
4.5	ABBAU VON PAK IM BIOREAKTOR DURCH EINE MISCHKULTUR .....	92
4.6	ABBAU VON OZONIERUNGSPRODUKTEN DES PHENANTHRENS DURCH <i>SPHINGOMONAS YANOIKUYAE</i> DSM 6900 UND EINE MISCHKULTUR.....	99
4.7	TOXIZITÄTSUNTERSUCHUNGEN VON WÄSSRIGEN BODENEXTRAKTEN .....	103
4.7.1	Exponentielle Wachstumshemmtests in Flüssigkultur .....	103
4.7.2	Hemmung der Lumineszenzaktivität von <i>Vibrio fischeri</i> .....	109
4.8	KONTAKTTTESTS MIT BODENMATERIAL ZUR BESTIMMUNG DER TOXIZITÄT.....	113
4.8.1	Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität während eines Kontakttests mit <i>Bacillus subtilis</i> .....	113
4.8.2	Wurzellängentest mit <i>Lepidium sativum</i> L. (Gartenkresse).....	115
4.8.3	Beurteilung der Toxizität auf Bodenmikroorganismen durch Bestimmung der Bodenatmung....	116
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>	<b>118</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURANGABEN.....</b>	<b>126</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>137</b>
7.1	FLÜSSIGMEDIEN .....	137
7.2	AGARPLATTEN .....	139
7.3	REAGENZIEN UND STANDARDLÖSUNGEN .....	139
7.4	MASSENSPEKTREN.....	142
7.5	NMR-DATEN HERGESTELLTER REFERENZSUBSTANZEN .....	150

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1</b>	Bakterielle Metabolisierung von Naphthalin.....	4
<b>Abb. 2</b>	Ringoxidations- und Ringspaltungsprodukte des Pyrens .....	6
<b>Abb. 3</b>	Bakterielle Metabolisierung von Phenanthren durch <i>Sphingomonas yanoikuyae</i> .....	8
<b>Abb. 4</b>	Reduktion des Resazurins zu Resorufin und Hydroresorufin.....	29
<b>Abb. 5</b>	Sander-Laborozonisorator 301.7 .....	45
<b>Abb. 6</b>	Extraktion von 5 PAK unterschiedlicher Größe durch 30-minütige Extraktion .....	58
<b>Abb. 7</b>	Wiederfindung von Phenanthren während eines Festlegungsexperimentes in 10% Bodensuspension ...	59
<b>Abb. 8</b>	Darstellung der Dehydrogenaseaktivität, der Fluoresceindiacylhydrolyse und der Proteinwerte .....	61
<b>Abb. 9</b>	DC-Folie der 2D-Dünnschichtchromatographie auf 20x20 cm Silicagel 60 F <sub>254</sub> -Folie .....	64
<b>Abb. 10</b>	Identifizierte und vermutete Oxidationsprodukte aus der Ozonolyse des Phenanthrens.....	67
<b>Abb. 11</b>	Vermutliches Massenspektrum von 2'-Hydroxy-2-Formylbiphenyl .....	68
<b>Abb. 12</b>	Vermutliches Massenspektrum von Biphenyl-2-Carbonsäure .....	68
<b>Abb. 13</b>	Vermutliches Massenspektrum von 9,10-Phenanthrendion .....	69
<b>Abb. 14</b>	Vermutliches Massenspektrum von Xanthon.....	69
<b>Abb. 15</b>	Konzentrationsverlauf der unterschiedlichen Reaktionsprodukte bei der Ozonierung von Phenanthren	71
<b>Abb. 16</b>	Phenanthrenfluoreszenz in Medienüberständen aus Schüttelkolbenkultivierungen mit <i>S. yanoikuyae</i> ...	73
<b>Abb. 17</b>	Phenanthrenabbau im Schüttelkolben in 10% Bodensuspension.....	76
<b>Abb. 18</b>	Phenanthrenabbauraten während des mikrobiologischen Phenanthrenabbaus in 10% Bodensuspension	77
<b>Abb. 19</b>	Verhältnis von CSB/DOC während des mikrobiologischen Phenanthrenabbaus in 10% Bodensuspension .....	77
<b>Abb. 20</b>	Dehydrogenaseaktivitäten während des mikrobiologischen Phenanthrenabbaus in 10% Bodensuspension .....	78
<b>Abb. 21</b>	Entwicklung der KBE während des mikrobiologischen Phenanthrenabbaus in Schüttelkolben in 10% Quarzsandsuspension.....	79
<b>Abb. 22</b>	Entwicklung der Dehydrogenaseaktivitäten während des mikrobiologischen Phenanthrenabbaus in Schüttelkolben in 10% Quarzsandsuspension .....	79
<b>Abb. 23</b>	Phenanthrenabbau im Schüttelkolben in 10% Quarzsandsuspension nach unterschiedlichem Vorzonierungsgrad .....	80
<b>Abb. 24</b>	Verlauf des Phenanthrenabbaus während der Kultivierung in 10% Quarzsandsuspension .....	82
<b>Abb. 25</b>	Verlauf der Dehydrogenaseaktivitäten während der Kultivierung in 10% Quarzsandsuspension .....	83
<b>Abb. 26</b>	Verlauf der Kolonie bildenden Einheiten KBE während der Kultivierung in 10% Quarzsand- suspension .....	84
<b>Abb. 27</b>	Verlauf des DOC während der Kultivierung in 10% Quarzsandsuspension .....	84
<b>Abb. 28</b>	Verlauf des CSB während der Kultivierung in 10% Quarzsandsuspension .....	85
<b>Abb. 29</b>	Darstellung der Mineralisierung zu Kohlendioxid während der Kultivierung in 10% Quarzsandsuspension.....	86
<b>Abb. 30</b>	Verlauf des Phenanthrenabbaus während der Kultivierung in 10% Bodensuspension .....	87
<b>Abb. 31</b>	Verlauf der Dehydrogenaseaktivitäten während der Kultivierung in 10% Bodensuspension .....	88
<b>Abb. 32</b>	Verlauf der Kolonie bildenden Einheiten KBE während der Kultivierung in 10% Bodensuspension....	89
<b>Abb. 33</b>	Verlauf des DOC während der Kultivierung in 10% Bodensuspension.....	90

---

<b>Abb. 34</b> Verlauf des CSB während der Kultivierung in 10% Bodensuspension .....	90
<b>Abb. 35</b> Darstellung der Mineralisierung zu Kohlendioxid bezogen auf die vorliegende Phenanthrenmenge während der Kultivierung in 10% Bodensuspension .....	91
<b>Abb. 36</b> Verlauf des PAK-Abbaus während der Kultivierung in 10% Bodensuspension .....	93
<b>Abb. 37</b> Dehydrogenaseaktivitäten während des PAK-Abbaus bei der Kultivierung in 10% Bodensuspension..	95
<b>Abb. 38</b> Kolonie bildende Einheiten KBE während des PAK-Abbaus bei der Kultivierung in 10% Bodensuspension. ....	96
<b>Abb. 39</b> Verlauf des DOC während des PAK-Abbaus bei der Kultivierung in 10% Bodensuspension.....	97
<b>Abb. 40</b> Verlauf des CSB während des PAK-Abbaus bei der Kultivierung in 10% Bodensuspension.....	97
<b>Abb. 41</b> Mikrobiologischer Abbau von Ozonierungsprodukten des Phenanthrens durch <i>Sphingomonas</i> <i>yanoikuyae</i> DSM 6900 in Schüttelkolben .....	100
<b>Abb. 42</b> Mikrobiologischer Abbau von Ozonierungsprodukten des Phenanthrens durch eine Mischkultur in Schüttelkolben .....	101
<b>Abb. 43</b> Verlauf der optischen Dichte von <i>S. yanoikuyae</i> in MM <sub>BRUN</sub> bei Wachstum auf Glucose unter Zusatz von verschiedenen Anteilen wässriger Quarzsandextrakte .....	104
<b>Abb. 44</b> Bestimmung der Vitalität von <i>S. yanoikuyae</i> mittels Durchflusscytometrie .....	105
<b>Abb. 45</b> Verlauf der optischen Dichte von <i>B. subtilis</i> in MM <sub>BRUN</sub> unter Zusatz von verschiedenen Anteilen wässriger Quarzsandextrakte.....	106
<b>Abb. 46</b> Bestimmung der Vitalität von <i>B. subtilis</i> mittels Durchflusscytometrie .....	107
<b>Abb. 47</b> Verlauf der optischen Dichte eines isolierten Mischkonsortiums in MM <sub>BRUN</sub> .....	108
<b>Abb. 48</b> Hemmung der Lumineszenzintensitäten von <i>Vibrio fischeri</i> durch Bodenextrakte des mit Phenanthren kontaminierten Bodens aus Banteln .....	110
<b>Abb. 49</b> Hemmung der Lumineszenzintensitäten von <i>Vibrio fischeri</i> durch Bodenextrakte des mit Phenanthren kontaminierten Bodens aus Braunschweig.....	111
<b>Abb. 50</b> Hemmung der Lumineszenzintensitäten von <i>Vibrio fischeri</i> durch Bodenextrakte des real kontaminierten Bodens aus Karlsruhe (Gaswerkgelände).....	112
<b>Abb. 51</b> Hemmung der Dehydrogenaseaktivitäten von <i>Bacillus subtilis</i> im Kontakttest mit ozonierten Bodenproben. ....	114
<b>Abb. 52</b> Hemmung des Wurzellängenwachstums von Gartenkresse in unterschiedlichen ozonierten Bodenproben. ....	115
<b>Abb. 53</b> Bodenatmung nach 4 Tagen bei 20°C in Boden aus Braunschweig und Karlsruhe.....	117

**Tabellenverzeichnis**

Tab. 1	Mikroorganismen mit der Befähigung zum PAK-Abbau.....	2
Tab. 2	Durch Mikroorganismen oxidierbare PAK .....	3
Tab. 3	Daten der verwendeten PAK.....	20
Tab. 4	Verwendete Reinkulturen .....	21
Tab. 5	Ausgangsmaterial für die Anreicherung eines Mikroorganismenkonsortiums auf einem Gemisch aus fünf PAK und deren Ozonierungsprodukten .....	22
Tab. 6	Anreicherung des Schadstoffabbauenden Konsortiums.....	23
Tab. 7	Geräteparameter des Epics XL.....	30
Tab. 8	Geräteparameter des Fluoreszenz-Spektrophotometers während der off-line-Küvettenmessungen ....	33
Tab. 9	Geräteeinstellungen des GC-MSD.....	39
Tab. 10	Geräteeinstellungen des GC-MS .....	41
Tab. 11	Durch Kapillarelektrophorese untersuchte Substanzen.....	43
Tab. 12	Geräteeinstellungen P/ACE™ System MDQ.....	43
Tab. 13	Geräteeinstellungen des Lumineszenzspektrometers.....	53
Tab. 14	R <sub>F</sub> -Werte und funktionelle Gruppen von Ozonierungsprodukten.....	63
Tab. 15	R <sub>F</sub> -Werte nach 2D-Dünnschichtchromatographie .....	64
Tab. 16	Liste der verwendeten und identifizierten Referenzsubstanzen.....	66
Tab. 17	Daten des Schadstoffabbaus aus Vorozonierung in Kombination mit mikrobiologischen Abbau.....	93

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
A/D	Analog/Digital
BSA	N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid
CEMA	Cetyledimethylammoniumbromid
c	Konzentration
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
d	Tag
DIN	Deutsche Industrie Norm
DMF-DMA	N,N-Dimethylformamid-Dimethylacetal
DOC	Dissolved organic carbon
E	Extinktion
EPA	Environmental Protection Agency
g	Gramm
GC-MSD	Gaschromatograph-Massenspektrometerdetektor
Gew%	Gewichtsprozent
KBE	Kolonie bildende Einheiten
kg	Kilogramm
m	Masse
M	Molmasse
MM <sub>BRUN</sub>	Mineralmedium nach Brunner
m/z*	Verhältnis von Masse/Ladung von Molekülonen
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid
nm	Nanometer
PAK	polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
rpm	round per minute
s	Sekunde
SIM	Single Ion Monitoring
SRU	Der Rat von Sachverständigen für Umweltfragen
Tab.	Tabelle
TM	Trockenmasse
TMAH	Tetramethylammoniumhydroxid

# 1 Einleitung und Zielsetzung

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) entstehen bei zahlreichen industriellen Verbrennungsprozessen und verursachen oft große Grundwasser- und Bodenbelastungen. Die Substanzen dieser Stoffklasse sind häufig schwer biologisch abbaubar und stellen aufgrund ihrer meist mutagenen und karzinogenen Eigenschaften eine Bedrohung für Mensch und Umwelt dar [SRU, 1995]. Dabei weisen die einzelnen Vertretern dieser Substanzklasse deutliche Unterschiede auf. Ist z.B. das Phenanthren nur wenig toxisch, so wirkt dagegen das Benz(a)anthracen in hohem Maße kanzerogen und mutagen [MCCANN et al., 1975]. Aufgrund ihrer hohen Zahl werden in einer von der „Environmental Protection Agency“ (EPA) veröffentlichten Prioritätenliste 16 PAK, die nach Vorkommen, umweltpolitischer Bedeutung und toxikologischem Potenzial als Leitsubstanzen für ihre Stoffklasse angesehen werden, zusammengefasst. PAK sind häufig auf Standorten ehemaliger Gaskraftwerke, Tankstellen, Öltanklager oder den Geländen ehemaliger Ölförderstellen nachzuweisen. Nachdem viele Fundstellen erschöpft sind, werden die ehemaligen Förderanlagen demontiert und es verbleiben mit PAK und Mineralölen kontaminierte Flächen in der Nähe des vormals genutzten Bohrlochs. Speziell für derartige, kleine kontaminierte Flächen wäre ein effektives und wenig zeitaufwendiges Sanierungsverfahren wünschenswert. Durch eine Kombinationsbehandlung kontaminierten Bodenmaterials mit chemisch-oxidativen Methoden und einer kostengünstigen mikrobiologischen Behandlung sollen die Vorteile beider Methoden miteinander kombiniert werden. Die Vorbehandlung eines mit PAK kontaminierten Bodens soll in einem durchmischten Feststoffreaktor durch eine Voroxidation der Schadstoffe durch Ozon erfolgen, wobei die Ozonierungszeit kurz und die eingesetzte Ozonmenge aus Kostengründen gering gehalten werden soll. Durch die Behandlung mit Ozon sollen die Schadstoffe anoxidiert und aufgrund einer verbesserten Wasserlöslichkeit einem mikrobiologischen Abbau besser verfügbar gemacht werden. Auf diese Weise sollen ein Abbau vormals inerter Schadstoffe und eine Beschleunigung des mikrobiellen Schadstoffabbaus angestrebt werden. Der mikrobiologische Abbau soll in Suspensionskultur studiert werden, um aus den auf diese Weise erhaltenen Ergebnissen schnell Aussagen über die Machbarkeit eines kombinierten Schadstoffabbaus ableiten zu können. In diesem Rahmen sind zudem die auftretenden Ozonierungsprodukte, als auch ihre ökotoxikologischen Eigenschaften Gegenstand der Untersuchungen.

## 2 Theoretischer Teil

### 2.1 Mikrobieller Abbau von PAK

#### 2.1.1 Mikrobiologisch abbaubare PAK und beteiligte Organismen

Die Fähigkeit zur Metabolisierung von PAK ist innerhalb der Gruppe der Mikroorganismen weit verbreitet. Es gibt keine ausgeprägten Spezialisten des PAK-Abbaus, sondern vielmehr handelt es sich meist um ausgesuchte Spezies aus einzelnen Mikroorganismengattungen, die zum Abbau der PAK befähigt sind und für die entsprechende Leistungen beobachtet und berichtet worden sind. Die folgende Tabelle zeigt eine Zusammenstellung von Mikroorganismengattungen, bei denen eine partielle oder vollständige Oxidation einzelner oder mehrerer PAK durch Metabolismus oder Kometabolismus beschrieben wurde [KÄSTNER et al, 1993; STIEBER, 1995].

Tab. 1 Mikroorganismen mit der Befähigung zum PAK-Abbau  
[KÄSTNER et al, 1993; CERNIGLIA et al, 1992; KANALY et al, 2000]

Bakterien	Cyanobakterien und Algen	Pilze*
<i>Aeromonas</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Agmenellum</i>	<i>Cunninghamella</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Selenastrum</i>	<i>Neurospora</i>
<i>Bacillus</i>		<i>Saccharomyces</i>
<i>Burkholderia</i>		( <i>Phanerochaete</i> )
<i>Corynebakterium</i>		( <i>Coriolus</i> )
<i>Flavobacterium</i>		( <i>Pleurotus</i> )
<i>Micrococcus</i>		( <i>Trametes</i> )
<i>Mycobacterium</i>		( <i>Funalia</i> )
<i>Nocardia</i>		( <i>Poria</i> )
<i>Pseudomonas</i>		( <i>Chrysosporium</i> )
<i>Sphingomonas</i>		( <i>Phlebia</i> )
<i>Rhodococcus</i>		
<i>Streptomyces</i>		
<i>Vibrio</i>		

(\* Weißfäulepilze in Klammern)

Die meisten Informationen über den mikrobiologischen PAK-Abbau wurden bei Untersuchungen mit Naphthalin, Phenanthren und Anthracen gewonnen. Einige weitere Vertreter der 16 PAK, die nach der Environmental Protection Agency EPA als Leitsubstanzen dieser Stoffklasse ausgewählt worden sind, konnten in Untersuchungen ebenfalls als biologisch abbaubar nachgewiesen werden [HEITCAMP et al, 1988; CERNIGLIA et al, 1992; KANALY et al, 2000]. Die folgende Tabelle bietet eine Übersicht.

Tab. 2 Durch Mikroorganismen oxidierbare PAK [CERNIGLIA et al, 1992]

Bakterien	Cyanobakterien und Algen	Pilze
Naphthalin	Naphthalin	Naphthalin
Acenaphthen		Acenaphthen
Anthracen		Anthracen
Phenanthren	Phenanthren	Phenanthren
Fluoranthen		Fluoranthen
Pyren		Pyren
Chrysen		
Benz[a]anthracen		Benz[a]anthracen
Benz[a]pyren	Benz[a]pyren	Benz[a]pyren

### 2.1.2 Mechanismen des mikrobiologischen PAK-Abbaus

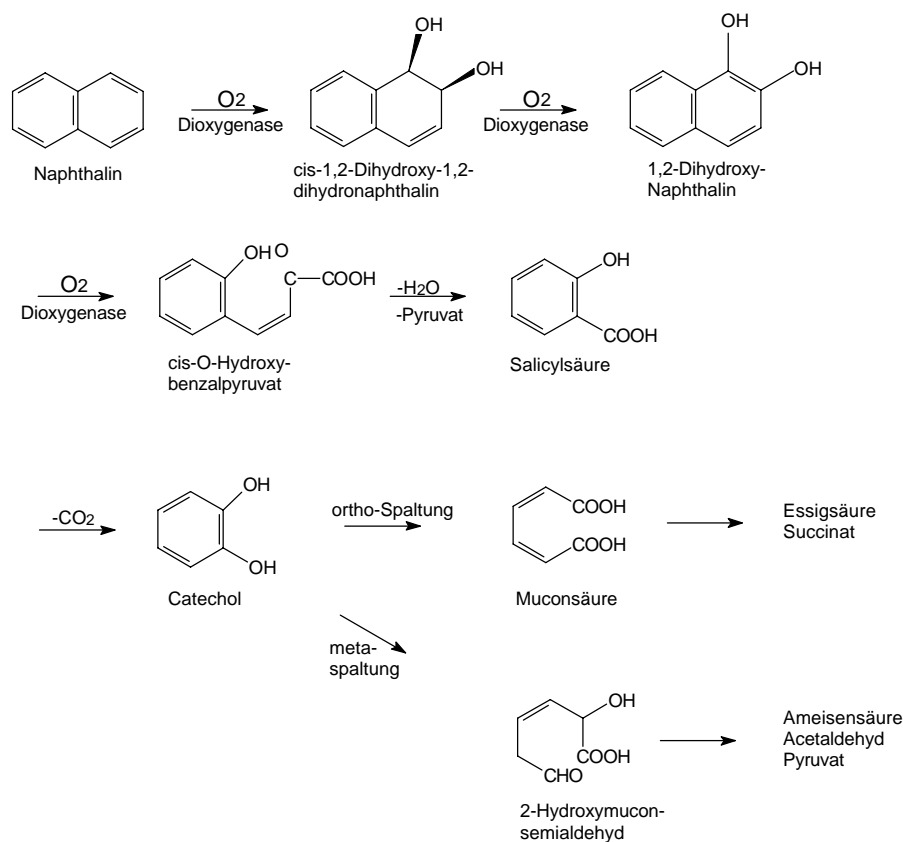
Die Mechanismen des mikrobiologischen PAK-Abbaus sind für die einzelnen Spezies, bzw. Gruppen sehr verschieden. Im Wesentlichen lassen sich dabei drei Haupttypen des PAK-Abbaus unterscheiden [KÄSTNER et al., 1993; OBST et al, 1997; FRITSCHKE, 1999].

- **Typ 1:** Vollständige Mineralisierung  
intrazellulär, vollständiger Abbau des Ringgerüsts, theoretisch keine Metabolitenbildung bzw. -akkumulation, CO<sub>2</sub> als Hauptprodukt
- **Typ 2:** kometabolische Transformation  
überwiegend intrazellulär, partielle Oxidation des Ringgerüsts, in der Regel Akkumulation teiloxidierter Metabolite, CO<sub>2</sub> als mögliches Produkt
- **Typ 3:** unspezifische radikalische Oxidation  
überwiegend extrazellulär, Initialoxidation durch Radikalbildung, ungerichtete Weiterreaktion des Oxidationsproduktes, CO<sub>2</sub> als mögliches Produkt



### PAK-Abbau durch vollständige Mineralisierung (Typ 1)

Bei der vollständigen Mineralisierung fungiert das PAK-Substrat sowohl als Kohlenstoff- als auch als Energiequelle. Demnach sind Bakterien, die zu einer vollständigen PAK-Mineralisierung imstande sind, in der Lage, auf einer derartigen Substanz als alleiniger Energie- und Kohlenstoffquelle zu wachsen. Diese Fähigkeit wird daher auch als Hauptkriterium für eine Klassifizierung dieses PAK-Abbautyps herangezogen. Die „vollständige Mineralisierung“ suggeriert einen vollständigen Abbau zu Kohlendioxid als einziges Stoffwechselprodukt bei einer aeroben PAK-Metabolisierung. Dies ist in der Realität weder für PAK noch für andere Substrate der Fall. Hinsichtlich der Zellökonomie und des Wachstums einer Zelle werden nicht nur Energie, sondern auch Zellbausteine benötigt. Ein Teil des Kohlenstoffgerüsts einer abzubauenen Verbindung wird deshalb auf unterschiedlichen Stufen des Abbauweges ausgeschleust und als Grundbaustein für die Synthese höhermolekularer Zellbestandteile verwendet [GIBSON et al., 1984; KÄSTNER et al., 1993; FRITSCH, 1997]. Am Beispiel des bekannten Abbauweges für Naphthalin sollen die Stoffwechselvorgänge bei einem vollständigen PAK-Abbau aufgezeigt werden.



**Abb. 1** Bakterielle Metabolisierung von Naphthalin [nach CERNIGLIA et al und GIBSON et al]

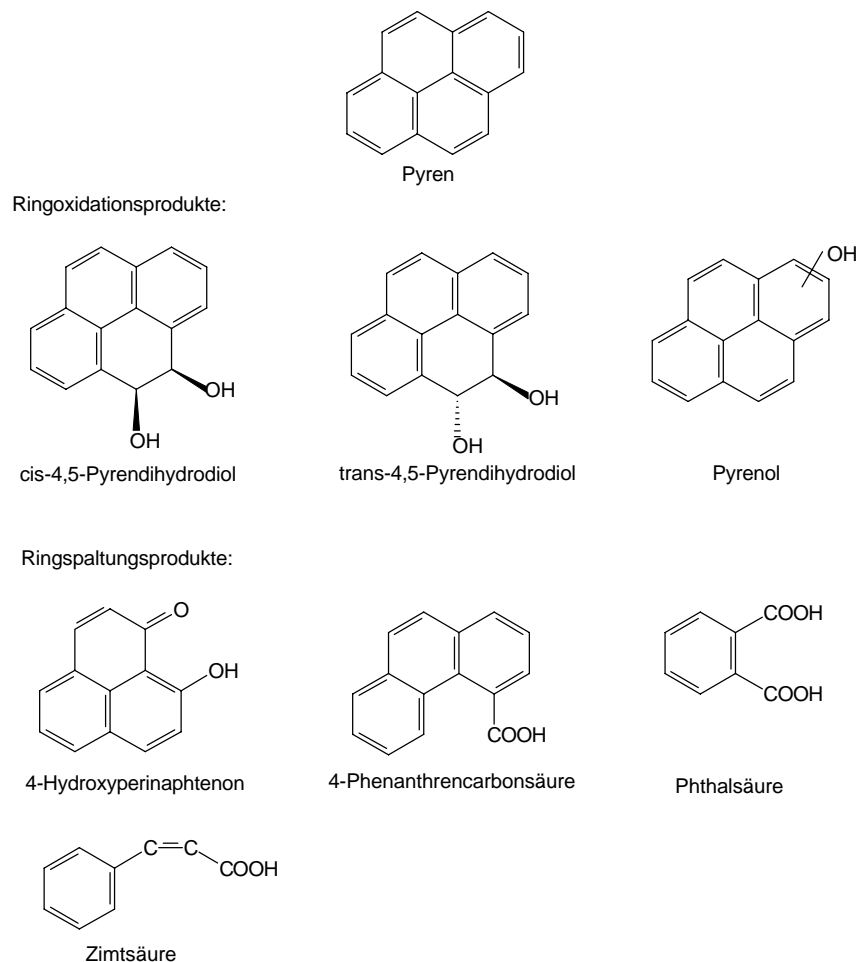
Bei den 2- und 3-Ringaromaten Naphthalin, Anthracen und Phenanthren liegt im wesentlichen das gleiche Abbaumuster vor, wie Untersuchungen für die Spezies *Pseudomonas* sp. zeigen konnten. Die einzelnen PAK-Ringe werden immer nacheinander abgebaut. Die Oxidation von Naphthalin wird durch die Einführung von Sauerstoff in den aromatischen Ring eingeleitet. Durch Katalyse mittels eines Multienzymkomplexes wird cis-1,2-Dihydroxy-1,2-Dihydronaphthalin gebildet, das mit Hilfe einer Dehydrogenase zu 1,2-Dihydronaphthalin dehydriert wird. Unter Beteiligung einer Dioxygenase wird der Ring extradiol gespalten und es entsteht cis-2-Hydroxybenzalpyruvat. Durch eine mit Aldolase katalysierte Reaktion werden Pyruvat und Salicylaldehyd gebildet, um schließlich zu Salicylsäure oxidiert zu werden. Mit Hilfe einer Monooxygenase entsteht aus Salicylsäure Catechol und der weitere Abbauweg entspricht dem Abbauweg der Monoaromaten. Je nachdem ob sich eine meta- oder ortho-Spaltung anschließt, entstehen Acetaldehyd und Pyruvat, bzw. Essigsäure und Succinat, die in den Citratzyklus der Zelle einfließen [CERNIGLIA et al und GIBSON et al].

### ***PAK-Abbau durch Kometabolismus (Typ 2)***

Der kometabolische Abbau von PAK ist sowohl für Pilze als auch für Bakterien beschrieben worden. Als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle können PAK als Substrate nicht genutzt werden. Bei Zugabe mindestens einer weiteren verstoffwechselbaren Kohlenstoffquelle können die PAK kometabolisch transformiert werden.

Bei Bakterien wird in Analogie zum mineralisierenden Abbau die initiale PAK-Oxidation in vielen Fällen durch eine Dioxygenase-katalysierte Einführung von Sauerstoff zu cis-Diol-Derivaten eingeleitet. Untersuchungen führten aber auch zu Erkenntnissen, wonach bei bestimmten Spezies, wie z.B. *Mycobacterium*-Spezies eine Monooxygenase-katalysierte PAK-Oxidation auftreten kann [HEITKAMP et al, 1988]. In diesem Fall trat beim kometabolischen Pyrenabbau ein trans-4,5-Pyrendihydrodiol als Metabolit auf, anstelle der sonst gängigen Bildung von cis-Dihydrodiolderivaten bei bakteriellen Umsetzungen. Das trans-4,5-Pyrendihydrodiol akkumuliert und wird nicht weiter umgesetzt. Interessanterweise verfügt dieses Bakterium neben der Monooxygenase auch über Dioxygenasen, so dass auch das cis-4,5-Pyrendihydrodiol gebildet werden kann, das dann noch weiteren metabolischen Umsetzungen unterliegt. Die Stereochemie der gebildeten Oxidationsprodukte übt einen nicht unerheblichen Einfluß auf den weiteren Metabolismus einer Verbindung aus. Der genaue Metabolismusweg beim kometabolischen Pyrenabbau konnte noch nicht in allen Details

aufgeklärt werden. Eine Übersicht über die entstandenen Ringoxidations- und Ringspaltungsprodukte gibt die folgende Abbildung.



**Abb. 2** Ringoxidations- und Ringspaltungsprodukte des Pyrens während des kometabolischen Abbaus durch *Mycobacterium* sp. [HEITCAMP et al., 1988]

Weitere Beispiele für die Fähigkeit zur initialen Monooxygenierung von PAK sind auch bei anderen Spezies wie *Beijerinckia* (*Sphingomonas* sp.) und *Streptomyzeten* beschrieben worden [SCHOCKEN et al, 1984; SUTHERLAND et al., 1990].

Im Gegensatz zum mineralisierenden PAK-Abbau bleibt der kometabolische PAK-Abbau meistens auf einer Stufe stehen. Häufig kommt es nur zu Ringoxidationen oder partiellen Ringspaltungen, so dass phenolisierte, carboxylierte oder chinoide Verbindungen als „Dead-End-Produkte“ akkumulieren.

Im Gegensatz zu einigen Bakterien verfügen Pilze nicht über die Fähigkeit, PAK vollständig zu mineralisieren. Pilze transformieren PAK immer unter kometabolischen Bedingungen zu trans-Diol-Intermediaten und benutzen im Unterschied zu den meisten Bakterien einen den Säugerzellen vergleichbaren Monooxygenase-katalysierten Mechanismus der PAK-

Oxidation. Im Gegensatz zu Säugerzellen, die aus den PAK meist R,R-Dihydrodiol mit erheblichen kancerogenen Potenzial bilden, werden durch Pilze Dihydrodiolisomere mit S,S-Konfiguration und geringeren kancerogenen Potenzial als das der Ausgangsstoffe gebildet. Die Stereochemie hat demnach einen deutlichen Einfluß darauf, ob Substanzen wie die PAK entgiftet oder in ihrer Kanzerogenität noch gesteigert werden [CERNIGLIA et al, 1985 und 1990].

### ***PAK-Abbau durch unspezifische radikalische Oxidation (Typ 3)***

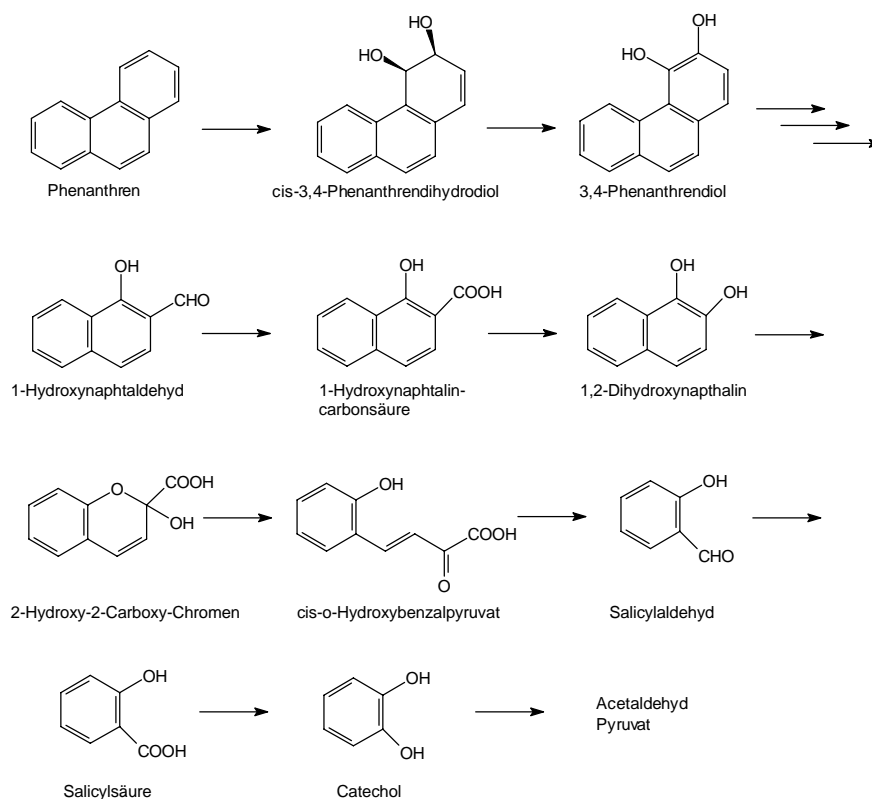
Untersuchungen zu diesem Typ des PAK-Abbaus zeigen, dass vor allem Weißfäulepilze, die taxonomisch zu den sog. Basidiomyceten zählen, zur Oxidation der PAK durch unspezifische radikalische Oxidation befähigt sind. Funktionell zählen diese Pilze zu den Holz-abbauenden, speziell zu den Lignin-abbauenden Pilzen. Lignin ist ein wasserunlösliches Heteropolymer, das nicht intrazellulär aufgenommen und metabolisiert werden kann. Der Abbau des Lignins erfolgt dagegen mit Hilfe extrazellulärer Enzymsysteme, den Ligninasen unter Beteiligung H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-bildender Zuckeroxidasen. Ligninasen wirken demnach als Peroxidasen und damit weitgehend unspezifisch. Durch Wasserstoffperoxid wird das aktive Zentrum des Enzyms in einen oxidativen Zustand und damit in die Lage versetzt, eine große Auswahl organischer Verbindungen zu oxidieren. Da die Ligninasen extrazellulär wirken, können auch wasserunlösliche oder schlecht wasserlösliche Stoffe wie PAK in der gleichen Weise wie Lignin oxidiert werden. Ligninase-katalysierte Umsetzungen können in kinetischer Sichtweise, bezogen auf das abzubauen Substrat, als Reaktion erster Ordnung beschrieben werden. Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt demnach hauptsächlich von der Konzentration des Substrates ab. Wichtiger ist jedoch der physiologische Zustand des Pilzes, da sich der Organismus in einem ligninolytischen Zustand befinden muss. Am Ende der Wachstumsphase bei Eintritt von Stickstoffmangel tritt dieser Zustand ein und erfordert eine leicht verwertbare Kohlenstoffquelle. In der Sanierungspraxis haben sich dabei Stroh oder andere Cellulosequellen bewährt.

Der Umsatz von PAK mit Weißfäulepilzen führt, vergleichbar dem schon geschilderten kometabolischen Abbau, zu einer großen Zahl von Metaboliten. Als Primärmetabolite entstehen dabei meist chinoide Verbindungen und die weiteren Abbauege dieser Stoffe sind nicht genau geklärt. Eine Oxidation bis zum Kohlendioxid und ein Einbau in die Biomasse findet nur in geringem Ausmaß statt. Ein Großteil der polaren Abbauprodukte findet sich stattdessen in der äußeren Matrix wieder. Ein Anteil der Abbauprodukte wird in den Huminstoffen festgelegt und ein anderer Teil liegt als extrahierbar im Boden vor. Dies konnte

durch Untersuchungen mit  $^{14}\text{C}$ -markierten Verbindungen nachgewiesen werden [KÄSTNER et al, 1993].

## 2.2 PAK-Abbau am Beispiel des Phenanthrens durch *Sphingomonas yanoikuyae* B1

Der in dieser Arbeit verwendete Mikroorganismus *Sphingomonas yanoikuyae* B1 (entspricht DSM 6900) ist in der Lage, eine Vielzahl organischer und aromatischer Substrate zu nutzen. Dazu zählen z.B. Toluol, m-Xylol, p-Xylol, Biphenyl, Naphthalin, Phenanthren und Anthracen [GIBSON et al, 1973]. Werden dem Organismus leicht verstoffwechselbare Kohlenstoffquellen angeboten, dann können auch Acenaphthen, Acenaphthylen, Benz[a]pyren, Benz[a]anthracen [GIBSON et al, 1975] aber auch Heterozyklen wie Dibenzofuran, Carbazol, Dibenzothiophen und diverse weitere Substanzen kometabolisch umgesetzt werden [GIBSON et al, 1999; KIM und ZYLSTRA, 1999].



**Abb. 3** Bakterielle Metabolisierung von Phenanthren durch *Sphingomonas yanoikuyae* [KIM et al, 1999]

Der Abbauweg des Phenanthrens ist noch nicht in allen Details aufgeklärt worden. Es gibt jedoch einige Ähnlichkeiten zu den Abbauwegen des Phenanthrens durch *Aeromonas* und *Pseudomonas* Spezies [GIBSON et al, 1984].

Der Metabolismus von Phenanthren lässt diesen Abbauweg als vollständige Mineralisierung (Typ 1) einordnen, da Phenanthren als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzbar ist. Die Abbauprozesse laufen intrazellulär ab und es bleiben keine Restmetaboliten übrig. Es entsteht Kohlendioxid, bzw. es findet ein teilweiser Einbau der Kohlenstoffketten in die Zellbestandteile statt. Durch eine Dioxygenase wird Phenanthren zu cis-Phenanthrendiol oxidiert. Interessanterweise spielt für die Funktionsweise der initialen Dioxygenase ein weiteres Enzym, das Ferredoxin, eine wichtige Rolle, indem das Ferredoxin als Elektronentransferprotein mit den unterschiedlichen Komponenten der Dioxygenase wechselwirken kann [KIM UND ZYLSTRA, 1999].

Eine cis-Dihydrodioldehydrogenase entzieht dem Molekül Wasserstoff und stellt die Aromatizität des angegriffenen Ringes durch Bildung von 3,4-Dihydroxyphenanthren wieder her. Die nächsten Schritte bis zum 1-Hydroxynaphtaldehyd sind noch nicht eindeutig geklärt worden. Die Umsetzungen zu 1-Hydroxynaphtalincarbonsäure und zu 1,2-Dihydroxynaphtalin erfolgen durch eine Aldehyddehydrogenase und eine Hydroxylase. Da 1,2-Dihydroxynaphtalin ein Metabolit des Naphthalinabbaus durch *Sphingomonas yanoikuyae* darstellt, ist beim weiteren Abbau mit einem dem Naphthalinabbau entsprechenden Metabolismus zu rechnen. Dabei wird 1,2-Dihydroxynaphtalin über mehrere Schritte unter Beteiligung von 2-Hydroxy-chromen-2-carboxylatisomerase und trans-o-Hydroxy-benzyliden-pyruvathydratase-aldolase zu Salicylaldehyd abgebaut. Durch Einwirkung von Salicylaldehyddehydrogenase und Salicylathydroxylase entsteht Catechol, das schließlich zu Pyruvat und Acetaldehyd abgebaut wird [KIM UND ZYLSTRA, 1999].

## **2.3 Limitierungen des mikrobiologischen PAK-Abbaus**

### **2.3.1 Biotische Limitierungen des Schadstoffabbaus**

Die mikrobiologische Sanierung PAK-kontaminierter Böden ist eine umwelt- und ressourcenschonende, kostengünstige Bodensanierungsmethode, die anderen technisch aufwendigeren und energieintensiveren Methoden wie z.B. der Bodenwäsche, thermischer Verbrennung oder der das Problem verlagernden Deponierung vorzuziehen ist. In jedem einzelnen Schadensfall muss eine vorhergehende Prüfung die Machbarkeit eines mikrobiologischen Abbaus nachweisen. Die mikrobiologische Sanierung von PAK-belasteten Böden ist dennoch aufgrund den Schadstoffabbau limitierender biotischer und abiotischer Faktoren begrenzt.

Es gibt zahlreiche biotische Faktoren, die einen Einfluss auf die mikrobiologische Umsetzung von PAK haben können. Für die Schadstoffmineralisierung ist eine adaptierte Mikroorganismenpopulation notwendig, die in den meisten Altlastböden schon vorliegt. Dabei unterscheidet man bei den anzuwendenden Sanierungsmethoden zwischen den sog. weichen und harten mikrobiologischen Sanierungsmethoden. Zu den weichen Methoden zählt man z.B. die „Natural Attenuation“, bei der die vorhandene Mikroorganismenpopulation angeregt und ausgenutzt werden soll. Hierbei wird weitgehend das natürliche Selbstreinigungspotenzial ausgenutzt. Bei der davon abgeleiteten „Biostimulation“ werden durch Zusatz von Kosubstraten und Elektronenakzeptoren optimalere Lebensbedingungen für die vorliegenden Mikroorganismenpopulationen geschaffen. Zu den harten Methoden gehört die sog. „Bioaugmentation“, bei der speziell gezüchtete und an die vorliegenden Schadstoffe angepasste Mikroorganismenpopulationen verwendet werden. Ein Einsatz dieser Methode gilt dann als sinnvoll, wenn damit zusätzliche metabolische Leistungen erbracht werden können. Die eingepflichten Spezialkulturen sollen dabei in die standort eigene Flora integriert werden und nicht zu deren totalen Verdrängung führen [FRITSCHKE et al., 1999; WARD LIEBEG et al., 1999; AL JUHASZ et al., 2000]. Der mögliche Einsatz gentechnisch optimierter Mikroorganismen zählt ebenfalls dazu und ist derzeit Gegenstand aktueller Untersuchungen und Diskussionen.

Neben den Schadstoffen als Kohlenstoff- und Energiequelle müssen zusätzlich die Makronährstoffe Phosphor und Stickstoff, sowie eine Vielzahl von Spurenelementen in ausreichender Menge vorliegen. Im Allgemeinen ist ein C:N:P-Verhältnis von 100:10:1 ausreichend [SCHIPPERS, 1999].

Bei den vorliegenden Substraten entscheiden die Anzahl der C-Atome, Molekülstruktur, Hydrierungsgrad, Kondensierung, Substitutionsgrad und Position von Substituenten über die Abbaubarkeit von Schadstoffen. Dabei ist mit zunehmendem xenobiotischen Charakter das Vorhandensein von kompletten Abbauwegen immer unwahrscheinlicher. Es kommt in zunehmendem Maße nur noch zu Teiltransformationen und zur Anreicherung von persistenten „Dead-End-Produkten“ [ALEF et al., 1994]. In Gegenwart mehrerer Schadstoffe besteht die Möglichkeit eines mehrphasigen Wachstums (Diauxie), wenn alle vorliegenden Stoffe leicht verstoffwechselbar sind, oder des Kometabolismus, der beim Metabolismus von Pilzen eine wichtige Rolle einnimmt. Die vorliegende Schadstoffkonzentration ist ebenfalls von Bedeutung, wenn eine Mindestkonzentration zur Induktion der am Metabolismus beteiligten Enzymsysteme notwendig ist. Andererseits können zu hohe Konzentrationen von prinzipiell

gut abbaubaren Stoffen auch zu einer akuten Schädigung und Toxizität führen (z.B. bei kurzkettigen Alkanen) [LFU Baden-Württemberg, 1991].

Zu Veränderungen im Stoffwechsel kommt es häufig dann, wenn es zu einer Limitierung des Elektronenakzeptors z.B. von Sauerstoff oder auch von Nitrat kommt. Die Auswirkungen auf den Stoffwechsel sind jedoch reversibel, wenn eine Behebung des Akzeptormangels herbeigeführt wird [SCHLEGEL, 1992].

Weitere abiotische Faktoren, die den mikrobiologischen Schadstoffabbau ebenfalls beeinflussen, werden auch unter dem Begriff der sog. Bioverfügbarkeit zusammengefasst.

### **2.3.2 Bioverfügbarkeit als Hauptproblem des mikrobiologischen PAK-Abbaus**

Ein den Schadstoffabbau beeinflussendes Kriterium ist die sogenannte Bioverfügbarkeit der Schadstoffe. Neben den stoffspezifischen Eigenschaften eines Schadstoffes in Bezug auf seine generelle Verwertbarkeit durch Mikroorganismen ist es ebenfalls von großer Bedeutung, wie die Mikroorganismen Zugang zum verwertbaren Substrat haben. Eine Verwertung durch Mikroorganismen erfolgt nur, wenn die potenziellen Substrate in der wässrigen Phase in physiologisch günstiger Konzentration gelöst vorliegen. Die Lösungsvorgänge und den anschließenden mikrobiologischen Abbau beeinflussende Faktoren liegen in der Oberfläche der Schadstoffe, Adsorption, Desorption, Porendiffusion und dem Löslichkeitsprodukt der betrachteten Substanz begründet [CUNO, 1995].

Die Größe der Schadstoffoberfläche bestimmt die Geschwindigkeit der Einstellung des Löslichkeitsgleichgewichts der PAK mit der wässrigen Phase. Die PAK können an Oberflächen adsorbiert, als Kristalle oder in Partikeln, verklebt mit Teer und Boden vorliegen. Besonders in gealterten Altlastböden liegen die PAK in Kohle- und Teerpartikeln vor, deren flüssige und leichter flüchtigen Bestandteile im Laufe der Zeit an die Bodenluft abgegeben worden sind. Die Oberflächen solcher Partikel sind im Zuge der Alterung so verhärtet, dass die eingeschlossenen PAK nicht ohne zusätzliche Massnahmen remobilisierbar sind. Durch Adsorptionsprozesse oder zunehmende Kristallgrößen der PAK-Partikel wird die freie Oberfläche eingeschränkt und der Abbau limitiert [THOMAS et al, 1986; BRINKMANN, 1996].

PAK sind vorzugsweise in der Feinkornfraktion von Böden vorhanden, da es an den dort vorliegenden Tonmineralen mit großen Oberflächen zu Adsorptionsprozessen kommt. Zusätzlich kommt es zu starken Wechselwirkungen mit den Huminstoffen, die ebenfalls ein starkes Adsorbens für PAK darstellen [MANILAL et al, 1991]. Die Wechselwirkungen mit den Huminstoffen führen zur Bildung gebundener Rückstände, den sog. „Bound residues“.



Darunter versteht man nicht extrahierbare und chemisch nicht in ihrer Struktur definierbare Rückstände, die in verschiedenen Bindungsformen in der Fulvo- oder Huminsäure und in der Huminfraction vorliegen. Denkbare Bindungsformen sind Wasserstoffbrückenbindungen, Charge-Transfer-Komplexe oder chemische Bindungen partiell umgesetzter PAK durch Ether-, Ester- oder C-C-Kohlenstoffbindungen. Sowohl bakterielle Umsetzungen als auch der Kometabolismus von Pilzen kann zur Bildung gebundener Rückstände führen. Die bakterielle Umsetzung von Phenanthren und Pyren führte zu einer Einbindung in die gelöste Huminsäure- oder feste, partikuläre Huminfraction im Boden von bis zu 20 % der Ausgangsmengen. Auf diese Weise wurde ein Teil der eingesetzten PAK dem Abbau entzogen und war damit nicht mehr bioverfügbar [RESSLER et al, 1999]. Das Ausmaß der Bildung gebundener Rückstände wurde durch den Einsatz  $^{14}\text{C}$ -markierter PAK stichhaltig nachgewiesen. Zu einem mit Pyren oder Anthracen kontaminierten Boden wurde ein Pilz-Strohgemisch hinzugefügt und der PAK-Abbau über 160 Tage verfolgt. Im Falle des Pyrens gingen 20 % des dotierten PAK in die gebundenen Rückstände ein, beim Anthracen waren es unter vergleichbaren Bedingungen 45 % der Ausgangsaktivität. Durch Exoenzyme der zugesetzten Weißfäulepilze wurden die dotierten PAK partiell oxidiert und ohne weiter verwertet zu werden, in die Huminstoffmatrix eingebaut. Die aus PAK gebildeten nicht extrahierbaren Rückstände sind sehr stabil und eine Remobilisierung war nach einem Jahr nicht nachweisbar. Über die Langzeitstabilität solcher Verbindungen ist jedoch nicht viel bekannt und erst weitere Untersuchungen können die Frage klären, ob die Humifizierung als sicherer Remediationsprozess angesehen werden kann [ESCHENBACH et al., 1997].

Für die Mobilisierung und Bioverfügbarkeit von PAK sind auch Desorptionsprozesse und das Löslichkeitsgleichgewicht der PAK mit Wasser von Bedeutung. Die Solvatisierung ist von dem Adsorptions/Desorptionsverteilungskoeffizienten der PAK zwischen den Oberflächen der Bodenbestandteile und der wässrigen Phase abhängig. Der Verteilungskoeffizient ( $k_p$ ) ist außer vom Anteil der organischen Substanz ( $k_{oc}$ ) nur durch substanzspezifische Eigenschaften bedingt und verhält sich proportional zum Verteilungskoeffizienten zwischen Octanol und Wasser ( $k_{ow}$ ). Der Zusammenhang zwischen  $k_p$ ,  $k_{oc}$  und  $k_{ow}$  für PAK konnte empirisch ermittelt werden [VOWLES et al, 1987]. Der Octanol-/Wasserverteilungskoeffizient von PAK kann in Gegenwart von Bodenbestandteilen zur Beschreibung des Löslichkeitsgleichgewichtes verwendet werden.

Eine ausreichende Löslichkeit und ein genügender Octanol-/Wasserverteilungskoeffizient vorausgesetzt, kann eine mikrobiologische Sanierung dennoch nur Aussicht auf Erfolg haben, wenn die wässrige Phase, das Boden- und Porenwasser beweglich und austauschbar ist. Bei

In-situ-Verfahren werden häufig Spülkreisläufe installiert, die eine Mobilisierung der PAK durch Solvatisierung bewirken sollen. Mit abnehmender Korngröße des vorliegenden Bodens wird diese Mobilisierung erschwert, da in der gleichen Weise der Durchlässigkeitsbeiwert des Bodens für Wasser ( $K_F$ -Wert) immer geringer wird. Mikrobiologische Sanierungsverfahren erfahren daher nur auf sandig-kiesigen Böden mit hohem  $K_F$ -Wert einen sinnvollen Einsatz, während bei feinkörnigen, tonigen Böden, die nur über geringe Durchlässigkeiten für Sauerstoff und Wasser verfügen schnell eine Stagnation des mikrobiologischen Abbaus eintritt [KÄSTNER et al, 1993; OBST U. et al, 1997].

Es gibt unterschiedliche Strategien, die Bioverfügbarkeit von PAK zu erhöhen. Dazu zählen u.a. physikalisch-mechanische Verfahren (Erhöhung des Energieeintrages), chemische Oxidation mit Ozon oder Wasserstoffperoxid, enzymatische Verfahren, der Einsatz von Tensiden als auch der Einsatz von thermophilen Mikroorganismen. Die unterschiedlichen Strategien werden im Folgenden an Beispielen einzeln diskutiert.

## **2.4 Strategien zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit und des mikrobiologischen Abbaus von PAK**

### **2.4.1 Verbesserung der Bioverfügbarkeit von PAK durch physikalisch-mechanische Massnahmen**

Anhand der schon genannten Gründe ist der Einsatz des statischen Verfahrens in mikrobiologischer Mietentechnik in Bezug auf Schadstoffart, Bioverfügbarkeit und Bodeneigenschaften begrenzt. Lösungen für Problemböden bietet der Einsatz von dynamischen Verfahren in Feststoffreaktoren, bei denen die Bioverfügbarkeit von PAK durch physikalisch-mechanische Massnahmen erhöht wird. Ein wichtiger Aspekt ist dabei die Mischtechnik zum Zwecke der Zerkleinerung von Schadstoffaggregaten und der Ablösung der Schadstoffe von der Feststoffoberfläche. Zudem werden für die Sauerstoffversorgung der Mikroorganismen bessere Voraussetzungen geschaffen [PARTHEN et al, 1993].

Zu unterscheiden sind Verfahren, die erdfeuchten Boden im sog. „solid-state-Verfahren“ oder den Boden in Bodensuspension im „Slurry-Verfahren“ behandeln. Es wurde vom Einsatz eines Drehtrommelreaktors mit Mahlkugeln berichtet, um eine Verbesserung des Schadstoffabbaus durch Desagglomeration zu erzielen. Bei ausreichend hohem Wassergehalten des Bodens (50% WHK) bewirken die Mahlkugeln eine hohe mechanische Belastung des anhaftenden, plastisch verformbaren Bodens. Die Bildung großer

Bodenagglomerate wurde verhindert, die biologische Aktivität gesteigert und der Schadstoffabbau von Kohlenwasserstoffen und Aromaten beschleunigt [SCHOLZ et al., 1996]. Für bindige Böden mit hohem Feinkornanteil bieten sich im Besonderen Bioreaktorverfahren in Bodensuspension an. So wurde in einem Suspensionsreaktor ein Wirbelschichtverfahren realisiert, indem eine mit Feinkorn belastete Bodensuspension von der wässrigen Phase vertikal von unten angeströmt und zusätzlich mit Luft begast wurde. Gute Abbauergebnisse wurden für 2-3-Ring PAK erzielt, 4-6-Ring PAK ließen sich im Bioreaktorverfahren allein nur wenig reduzieren. Hierzu waren zusätzliche Massnahmen wie die Kombination des Verfahrens mit einer vorgeschalteten Bodenwäsche nötig [MANN et al., 1996].

Untersuchungen mit einem Drehrohrreaktor konnten ebenfalls bestätigen, dass eine Behandlung von PAK-belasteten Bodenfeinkorn in Bodensuspension möglich ist. Die 2-4-Ring PAK waren in Bodensuspension gut mineralisierbar, während eine Abnahme von 5-6-Ring PAK nur langsam oder gar nicht erfolgte [PARTHEN, 1992; BRINKMANN 1996].

#### **2.4.2 Erhöhung der Bioverfügbarkeit von PAK durch Tenside**

Eine weitere Strategie zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit von PAK beinhaltet den Einsatz von technischen oder Biotensiden. Eine wichtige Voraussetzung für die Eignung eines Tensids ist vor allem seine mikrobiologische Abbaubarkeit. Neben Huminstoffen als natürlichen kohlenstoffreichen Verbindungen treten in belasteten Böden vorwiegend Kohlepartikel als Schadstoffsенke auf, oder die PAK selbst liegen in Form von Teeragglomeraten vor. PAK, die an diesen sorptiven Materialien gebunden sind gelten als nicht oder nur schwer biologisch abbaubar, da die möglichen Austauschflächen klein und die Diffusionsprozesse erschwert sind. Tenside sollen den Phasentransfer Adsorptiv-Wasser durch die Verringerung der Grenzflächenspannung verbessern [FREUDENBERG et al., 1997].

Durch den Einsatz eines Tensidsystems, bestehend aus einem nichtionischen Emulgator und einem anionischen Netzmittel, konnte in Labor- und halbtechnischen Versuchen eine deutliche Mobilisierung und der anschließende mikrobiologische Abbau der PAK demonstriert werden. Ein vollständiger Abbau der PAK gelang jedoch nicht [SPRENGER et al., 1994].

Durch Elutionsversuche an Bodensäulen wurden mit Hilfe synthetischer Tenside größere PAK-frachten (81,6% der Ausgangskonzentration) im Spülkreislauf mobilisiert, als durch das Biotensid Sophoroselipid (67,9% der Ausgangskonzentration) [FREUDENBERG et al., 1997].

Durch Untersuchungen des Phenanthrenabbaus im Bioreaktor mit Hilfe von Tensiden, konnten abbausteigernde Effekte sowohl bei Einsatz von Texapon<sup>®</sup> N25, einem synthetischen

Tensid, als auch durch Sophoroselipide festgestellt werden [SCHIPPERS, 1999]. Ob eher durch synthetische oder sog. Biotenside eine bessere Schadstoffmobilisierung und eine größere Abbausteigerung erzielt werden kann, ist noch nicht abschließend beurteilt worden. Weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet sind zur Klärung dieser Frage notwendig.

Es können anstelle von Tensiden auch andere Stoffe mit lösungsvermittelnden Eigenschaften eingesetzt werden. Dazu zählen langkettige Alkohole, ausgewählte Aliphaten, anorganische Pyrophosphate und Cyclodextrine. Cyclodextrine können mit den hydrophoben PAK hydrophile Komplexe bilden und in dieser Weise als Lösungsvermittler wirken [MÜLLER-MARCKGRAF, 1994].

### **2.4.3 Oxidation von PAK durch Wasserstoffperoxid oder Ozon**

Zu weiteren alternativen Bodenbehandlungsmethoden zählen chemische Oxidationsverfahren mit Wasserstoffperoxid oder Ozon [WILLE, 1993 und Kolloquium TU Berlin, 1996]. Das Ziel derartiger Verfahren ist entweder die Totaloxidation der Schadstoffe oder die Anoxidation und Überführung in besser wasserlösliche und damit besser bioverfügbare Stoffe. Diese Sanierungsverfahren sind mit einem höheren Bedarf an Energie und Chemikalien verbunden, was zu höheren Sanierungskosten führt.

Es wurde von der Behandlung PAK-belasteter Böden mit Fenton's Reagenz berichtet, bei dem es sich um Wasserstoffperoxid und Eisen(II)sulfat handelt [MARTENS et al., 1995]. Eine Anwendung dieses Verfahrens erscheint auch bei anderen Schadstoffen vielversprechend. Autoren berichten von der Oxidation von Pentachlorphenolen [TYRE et al, 1991; WATTS et al, 1991; RAVIKUMAR et al, 1992] und Trichlorethylen [HURST et al, 1993]. Durch die chemische Voroxidation mittels Fenton's Reagenz, bestehend aus Wasserstoffperoxid und Eisen(II)sulfat, von PAK in einem Anthracenöl konnte eine Steigerung des Gesamtabbaus nach erfolgter mikrobiologischer Behandlung gezeigt werden. Vor allem bei 4-kernigen PAK war eine deutliche Steigerung der Abbauleistung zu beobachten [SPECHT et al., 1996].

Durch die Oxidation von Anthracen mit Fenton's Reagenz und zusätzlicher Ethanolzugabe konnte eine quantitative Anthracenoxidation realisiert werden, die zum Hauptprodukt Anthrachinon führte. Das entstandene Anthrachinon konnte mikrobiologisch besser abgebaut werden als der Ausgangsschadstoff Anthracen [BYUNG-DAE LEE et al., 1998].

Grundlegende Untersuchungen zum Einsatz von Ozon wurden ebenfalls an verschiedenen Schadstoffsystemen durchgeführt. Abgeschlossene Dissertationen beschäftigten sich mit der Sanierung PAK-belasteter Gaswerksböden [ETRICH, 1996 und SEIDEL, 1995]. Andere Autoren führten Untersuchungen zur Oxidation von Polyethoxynonylphenolen [CALVOSA et

al, 1991] und anderer aromatischer Substanzen durch [BOWERS et al, 1993]. Mittels selektiver Adsorption von PAK an oxidativ regenerierbaren Adsorbentien konnten schwer abbaubare PAK an modifiziertem Silicagel abgetrennt werden. Eine Oxidation des Adsorbermaterials z.B. durch Ozon regenerierte zum einen den Adsorber und führt zusätzlich zu Oxidationsprodukten mit verbesserter Abbaubarkeit. Eine Anwendung eines derartigen Verfahrens bietet Anwendungsmöglichkeiten in der Behandlung von Abwässern oder in Bodenwaschanlagen [GÖTZ et al., 1996].

Untersuchungen über Kombinationsbehandlungen von chemischer Oxidation und mikrobiologischer Bodenbehandlung sind nicht sehr zahlreich, wogegen deren Anwendung bei der Aufarbeitung von kontaminierten Grundwasser, Abwasser oder Deponiesickerwässern als Stand der Technik angesehen werden kann. Studien beschäftigten sich mit der Frage, welche Abbauprodukte aus der Ozonierung von Pyren und Benz[a]pyren auf Quarz, Boden und in Lösung hervorgehen und ob diese eine ökotoxikologische Relevanz aufweisen [EBERIUS et al, 1997 und YAO et al, 1998]. In diesem Zusammenhang wurden auch Arbeiten über die Ozonierung von PAK-haltigen Dodekan/Wasseremulsionen durchgeführt [KORNMÜLLER et al, 1997 und SCHULZ, 1998]. Die Arbeiten beschäftigten sich mit den auftretenden Reaktionsprodukten, Reaktionskinetiken und den toxikologischen Eigenschaften der wässrigen Extrakte als auch einzelner Ozonierungsprodukte. Das Abbauverhalten dieser Stoffe durch Mikroorganismen wurde untersucht. Aus der Ozonierung der PAK entstandene Stoffe führten in Leuchtbakterientests zu einer Hemmung und erwiesen sich in Mineralisierungsexperimenten als weitgehend persistent.

Es wurden einige Übersichtsartikel über die Anwendung von Kombinationsbehandlungen mit unterschiedlichen chemischen Oxidationsmitteln auf unterschiedliche Schadstoffsysteme veröffentlicht [VAN KEMENADE et al, 1995 und 1996; CHEN, 1993]. Eine Auswahl aromatischer Verbindungen wurde mit chemischer Oxidation durch Wasserstoffperoxid, Ozon oder Kaliumpermanganat mit anschließendem mikrobiologischen Abbau stärker abgebaut als durch mikrobiologischen Abbau allein [BOWERS et al, 1993].

Interessanterweise konnte bei einem Vergleich der Oxidationsmethoden mittels  $H_2O_2$ ,  $O_3$ , bzw. der Kombinationen  $H_2O_2/UV$  und  $O_3/UV$  gezeigt werden, dass die direkte Ozonolyse von PAK durch Ozon der wichtigste Weg zur Oxidation von PAK ist [HAUTANIEMI et al., 1999].

Autoren berichten von einer Kombinationsbehandlung, bei der nach erfolgter mikrobiologischer in-situ-Sanierung die Restgehalte an PAK durch Ozonierung deutlich verringert wurden [LEAHY et al, 1997]. In anderen Untersuchungen konnte in Experimenten

mit Bodensäulen gezeigt werden, dass eine Verringerung der PAK-Gehalte des verwendeten Bodens durch eine absatzweise Begasung im Wechsel mit Ozon und Luft um 70% erreicht wurde. In den Perioden der Begasung mit Luft nahm die mikrobiologische Aktivität im Boden wieder deutlich zu, dass man auch hier von einem Abbau sowohl durch Ozon als auch durch Mikroorganismen ausgeht [LUTE et al, 1998]. In Prozesswässern aus der Extraktion von PAK-kontaminierten Böden mittels überkritischen Wasser konnte bei der Verdüsung und Ozonierung in einem Sprühreaktor eine deutliche Verringerung des Gesamtkohlenstoffgehaltes des Prozesswassers festgestellt werden. Eine mikrobiologische Nachbehandlung in einem Sapromaten zeigte einen deutlich erhöhten Sauerstoffbedarf, bezogen auf den verfügbaren Gesamtkohlenstoffgehalt, was auf eine höhere Stoffwechselleistung und damit auf eine verbesserte Bioverfügbarkeit hinweist. Bei in der gleichen Weise behandelten Bodenfeinkornsuspensionen zeigte sich jedoch ein gegenteiliger Effekt, wenn man den Sauerstoffbedarf auf die Trockenmasse des Bodenfeinkorns bezog. Mit erfolgter Vorozonierung im Sprühreaktor verschlechterte sich die Stoffwechselaktivität, der Sauerstoffbedarf fiel gegenüber der nicht ozonierten Probe ab [BEHRENDT et al., 1996].

Durch Bodenwäsche abgetrennte, schwer sanierbare mit PAK belastete Feinkornfraktionen wurden in einem Suspensionsreaktor einer kombinierten Behandlung unterworfen. Dabei wurde nach einer mikrobiologischen Behandlung eine oxidative Behandlung mit Ozon durchgeführt, um in einem zweiten mikrobiologischen Schritt eine Steigerung des Gesamtabbaus zu bewirken. Dadurch konnte gegenüber dem alleinigen mikrobiologischen Abbau eine Steigerung des Gesamtabbaus um bis zu 15% der Ausgangskontamination erzielt werden [KONING et al., 1999].

#### **2.4.4 Enzymatische Oxidation zum Abbau von PAK**

Ein weiterer interessanter Ansatz zum oxidativen Abbau von PAK wird durch den Einsatz von Enzymen verfolgt. Durch Laccase des Weißfäulepilzes *Trametes versicolor* konnte bei 14 untersuchten PAK eine Oxidation zwischen 10 und 40% erzielt werden. Durch Zugabe von Lösungsvermittlern und Mediatoren wie 1-Hydroxybenzotriazol konnte bei einigen Verbindungen eine Steigerung der Oxidation auf bis zu 50% erreicht werden [MAJCHERCZYK et al., 1998]. Ein weiteres nutzbares Enzymsystem stellt die Manganperoxidase einiger Weißfäulepilze wie *Nematoloma frowardii*, *Stropharia rugosoannulata* oder *Trametes versicolor* dar. In zellfreien Systemen gelang eine partielle Oxidation einzelner PAK in einem Umfang von 5-80% der Ausgangskonzentrationen [HOFRICHTER et al., 1999].

Anderen Autoren gelang es, eine Oxidation diverser PAK durch die Verwendung von Wasserstoffperoxid und Peroxidase aus Sojabohnen als Katalysator zu erzielen. Anthracen, Pyren und Acenaphthylen konnten nahezu quantitativ in ihre Chinone überführt werden, wenn in einem wässrigen System mit 10% Lösungsmittelanteil Tetrahydrofuran, Acetonitril oder Dimethylformamid gearbeitet wurde [KRAUS et al., 1999]. Bisherige Untersuchungen fanden jedoch nur im Labormaßstab statt und über die technische Anwendung in der Boden- oder Grundwasser- bzw. Abwassersanierung ist derzeit noch keine Aussage möglich.

#### **2.4.5 Der Einsatz thermophiler Mikroorganismen beim mikrobiologischen PAK-Abbau**

Ein relativ junges Forschungsgebiet stellt das der thermophilen Mikroorganismen dar. Eine Vielzahl thermophiler Mikroorganismen konnte bereits aus natürlichen oder industriellen heißen Standorten isoliert werden. Diese Organismen zeichnen sich durch ein großes Substratspektrum aus, wobei über die Nutzung von PAK als Kohlenstoff- und Energiequelle noch wenig bekannt ist. Man unterscheidet zwischen thermophilen (Wachstumsoptimum bei 50-65°C), extrem thermophilen (Wachstumsoptimum bei 65-85°C) und hyperthermophilen Mikroorganismen (Wachstumsoptimum bei 85-110°C). Die Anwendung derartiger Mikroorganismen erfordert bestimmte Lebensbedingungen, die für das optimale Wachstum der Organismen geschaffen werden müssen. Dabei spielt die Einstellung des richtigen, hohen Temperaturbereichs eine herausragende Rolle. Für die Anwendung in der Bodensanierung bedeutet dies, dass nur die Durchführung von Reaktorverfahren möglich sein wird. Ein Einsatz thermophiler Mikroorganismen wäre demnach denkbar für mit PAK belastetes Bodenfeinkorn in Bodensuspension in einem Slurry-Reaktor oder die Aufreinigung belasteter Wässer aus der Bodenwäsche. Der Vorteil solcher Verfahren liegt in einer erhöhten Wasserlöslichkeit der PAK bei höheren Temperaturen und damit einer erhöhten Bioverfügbarkeit begründet [FEITKENHAUER et al., 1996].

Durch vergleichende Untersuchungen konnte sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen ein PAK-Abbau in Bodensuspension durch thermophile Mikroorganismen über einen Zeitraum von 60 Tagen bei 65°C demonstriert werden. Der aerobe Abbau erwies sich mit 58% Abbauleistung als effektiver gegenüber dem anaeroben PAK-Abbau mit nur 15% Abbauleistung [CASTALDI et al., 1995].

In Laboruntersuchungen in wässriger Phase und in Slurry-Reaktoren konnte ein Einzelstoffabbau durch thermophile Mikroorganismen nachgewiesen werden. Abgebaut wurden u.a. Benzoesäure, Naphthalin, Benzol und aliphatische Kohlenwasserstoffe durch

Mikroorganismen der Gattungen *Bacillus* sp., *Bacillus thermoleovorans* HH1 und HH2 sowie durch Mischkulturen [FEITKENHAUER et al., 1996]. Genauere Untersuchungen zum Naphthalinabbau durch *Bacillus thermoleovorans* HH2 bestätigten die Fähigkeit dieses Mikroorganismus, bei 60°C auf Naphthalin zu wachsen. Eine Untersuchung des Metabolismus zeigte zudem einige grundlegende Unterschiede des Abbauweges gegenüber mesophilen schadstoffabbauenden Bakterien auf [ANNWEILER et al., 2000].

Die Untersuchungen sind vielversprechend, jedoch müssen noch weitere Anstrengungen unternommen werden, um die Anwendbarkeit von thermophilen Mikroorganismen in der Bodensanierung aufzuklären. Die Abbaufähigkeit von höhermolekularen PAK mit 5 oder 6 Ringen konnte auch unter thermophilen Bedingungen noch nicht belegt werden.

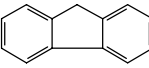
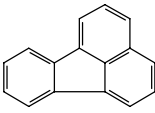
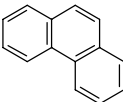
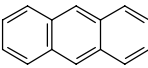
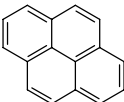
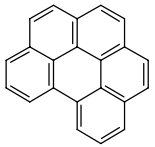


### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Verwendete PAK

Die in der Arbeit eingesetzten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe PAK sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die Mehrzahl der Versuche wurde mit Phenanthren durchgeführt, das eine geringe Toxizität und einen für diese Stoffgruppe geeigneten Modellcharakter aufweist. Darüber hinaus wurde ein Mikroorganismenkonsortium auf einem Gemisch aus 5 verschiedenen PAK sowie Ihrer Ozonierungsprodukte angezogen. Es sollte nicht nur eine Adaption an die Ausgangsschadstoffe, sondern auch an die entstehenden Ozonierungsprodukte erfolgen. Zu diesem Zweck wurden Fluoren, Fluoranthren, Phenanthren, Pyren und Benzo-[g,h,i]-perylen verwendet, die eine Auswahl von 2-Ring- bis 5-Ring-PAK darstellen. Anthracen wurde nicht für Abbauprobversuche verwendet, kam aber, aufgrund seiner Strukturverwandschaft zum Phenanthren, als interner Standard bei der GC-Analytik zum Einsatz. Bei der Analytik auf alle 16 PAK gemäß EPA wurde an dessen Stelle eine deuterierte Verbindung wie z.B. deuteriertes Naphthalin als interner Standard verwendet.

Tab. 3 Daten der verwendeten PAK

Bezeichnung	Fluoren	Fluoranthren	Phenanthren	Anthracen	Pyren	Benzo-[g,h,i]-perylen
Strukturformel						
Summenformel	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub>	C <sub>22</sub> H <sub>12</sub>
Molmasse	166,2	202,26	178,23 g/mol	178,23 g/mol	202,26 g/mol	276,34 g/mol
Schmelzpunkt <sup>(1)</sup>	115°C	108,8°C	100,5°C	216,4°C	150,4°C	278,3°C
Siedepunkt <sup>(1)</sup>	294°C	383°C	338°C	340°C	393°C	542°C

<sup>1</sup>BRINKMANN [1996] und SCHIPPERS [1999]

## 3.2 Mikroorganismen

### 3.2.1 Verwendete Mikroorganismen

Unterschiedliche mikrobielle Reinkulturen wurden für Abbau- und Toxizitätsuntersuchungen eingesetzt. Zudem wurde eine Mischkultur auf einem Medium angezogen, das fünf PAK-Komponenten, sowie Ihre Ozonierungsprodukte enthielt (s. Kap. 3.2.2).

Für die Abbauversuche mit einer Reinkultur an einem einfachen Modellsystem wurde der Bakterienstamm *Sphingomonas yanoikuyae* DSM 6900 verwendet, der über eine gute Phenanthrenabbaukapazität verfügt. Derselbe Stamm wurde neben den Gattungen *Vibrio fischeri* DSM 7151 und *Bacillus subtilis* DSM 10 auch für Toxizitätsuntersuchungen verwendet. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die im Fortgang der Arbeiten verwendeten Reinkulturen.

Tab. 4 Verwendete Reinkulturen

Mikroorganismus	Herkunft	GRAM-Verhalten	Schadstoffabbauer
<i>Sphingomonas yanoikuyae</i> B1	DSMZ, Nr. 6900	negativ	Ja
<i>Vibrio fischeri</i>	DSMZ, Nr. 7151	negativ	Nein
<i>Bacillus subtilis</i>	DSMZ, Nr. 10	Positiv	Nein

### 3.2.2 Gewinnung eines auf Fluoren, Fluoranthren, Phenanthren, Pyren und Benzo-[g,h,i]perylen und deren Ozonierungsprodukten angereicherten Mikroorganismenkonsortiums

Zur Anreicherung von Mikroorganismen wird Boden, in dem die gewünschten Keime als auch die Schadstoffe vorliegen, an welche die Adaption erfolgen soll, verwendet und unter selektiven Bedingungen inkubiert. Die gewünschten Mikroorganismen sollten sowohl die Ausgangsschadstoffe als auch deren Ozonierungsprodukte verwerten können. Aus diesem Grund wurden verschiedene Altlastböden in naturfeuchter Form verwendet, da diese sowohl die Schadstoffe als auch lebensfähige Keime enthalten. Des Weiteren wurden die gleichen Böden bei 105°C getrocknet und ozoniert, um auch die Ozonierungsprodukte der Ausgangsschadstoffe der Inkubation zuzuführen. Zusätzlich wird eine, die genannten fünf PAK enthaltende Stammlösung in Dichlormethan und ein wässriger Extrakt mit Ozonierungsprodukten als Substrat zugegeben. So ist das Vorhandensein eines komplexen

Schadstoffspektrums gewährleistet. Die gewünschten Abbauer wurden aus schadstoffbelasteten Proben in Mineralsalzmedium MM<sub>B</sub> unter Zusatz der Ausgangsverbindungen und den aus der Ozonierung hervorgegangenen Stoffen angezogen und durch mehrfaches Überimpfen in frisches Medium angereichert.

Tabelle 3 gibt eine Liste des Probematerials wieder, das für die vorgenommene Anreicherung eingesetzt wurde.

Tab. 5 Ausgangsmaterial für die Anreicherung eines Mikroorganismenkonsortiums auf einem Gemisch aus fünf PAK und deren Ozonierungsprodukten

Nr.	Probe	Quelle	Vorbereitung des Probenmaterials	Eingesetzte Menge
1	Altlastboden	Gaswerkgelände, Solingen-Ohligs <sup>1</sup>	Lagerung bei +4°C	1 g
			Trocknung und Ozonierung <sup>5</sup>	1 g
2	Altlastboden	Gaswerkgelände, Karlsruhe <sup>1</sup>	Lagerung bei +4°C	1 g
			Trocknung und Ozonierung <sup>5</sup>	1 g
3	Altlastboden	Mineralölkontamination, Lüneburger Heide <sup>2</sup>	Lagerung bei +4°C	1 g
			Trocknung und Ozonierung <sup>5</sup>	1 g
4	Boden	Autobahnnähe, Braunschweig <sup>3</sup>	Lagerung bei +4°C	1 g
5	5 PAK	Dichlormethanstamm- lösung	Lagerung bei + 4°C	30 mg/L <sup>7</sup>
				5 mg/L <sup>8</sup>
6	Wasserextrakt	Quarzsand, kontaminiert mit 5 PAK (s. Nr. 5)	Ozonierung des Quarz <sup>6</sup> , Extraktion mit Wasser	10 ml
7	Belebtschlamm	Klärwerk Herrenhausen <sup>4</sup>	Sofort eingesetzt	10 ml

<sup>1</sup>Brinkmann, 1996; <sup>2</sup>Fa. Ferdinand Koller und Sohn GmbH, 1999; <sup>3</sup>Czeska, 1995; <sup>4</sup>zur Verfügung gestellt durch das Klärwerk Herrenhausen  
<sup>5</sup>Ozonierungsbedingungen: Einsatz von 200 g TM Boden, Ozonierung im Laborreaktor bei 60 rpm, 15 min, 25 g Ozon/m<sup>3</sup>, Volumenstrom 30l/h

<sup>6</sup>Ozonierungsbedingungen wie bei <sup>5</sup>, Einsatz von 100 g Quarz, kontaminiert mit Fluoren, Fluoranthren, Phenanthren, Pyren mit 1200 mg/kg TM und Benzo[g,h,i]perylen 200 mg/kg TM. Extrahiert werden 50 g des ozonierten Materials mit 100 ml Wasser auf einem Reziproschüttler (HT, Infors AG, Bottmingen, CH) über 24 h bei 150 rpm

<sup>7</sup>Konzentration im Medium von Fluoren, Fluoranthren, Phenanthren, Pyren

<sup>8</sup>Konzentration im Medium von Benzo[g,h,i]perylen

Die Proben wurden in 1000 mL 4-Schikane-Erlenmeyerkolben überführt, die mit 400 mL Mineralmedium MM<sub>Brun</sub> befüllt waren. Die Kolben für die ersten drei Überimpfungen wurden unsteril angesetzt worden, erst in der vierten und letzten Stufe wurde steril gearbeitet.

Die Schüttelkolben wurden bei Raumtemperatur und 120 rpm (Certomat R/H, Braun, Melsungen) inkubiert. Tabelle 4 gibt die Abfolge der durchgeführten Arbeitsschritte wieder.

Tab. 6 Anreicherung des Schadstoffabbauenden Konsortiums

Anreicherungs-schritt	Inkuba-tionszeit	Inokulum für den nächsten Schritt	Inkubationsbedingungen
1	14 d	10 mL	unsteril, 120 rpm, RT, 1000 mL 4-Schikane-Erlenmeyerkolben,
2	14 d	10 mL	unsteril, 120 rpm, RT, 1000 mL 4-Schikane-Erlenmeyerkolben,
3	14 d	10 mL	unsteril, 120 rpm, RT, 1000 mL 4-Schikane-Erlenmeyerkolben
4	7 d	Anlegen von Gefrier-kulturen	steril, 120 rpm, RT, 1000 mL 4-Schikane-Erlenmeyerkolben

### 3.2.3 Stammhaltung der verwendeten Mikroorganismen

#### 3.2.3.1 Stammhaltung auf Agarplatten

Die eingesetzten Reinkulturen *Sphingomonas yanoikuyae* und *Bacillus subtilis* wurde alle 4-6 Wochen auf Standard-I-Agarplatten, der Stamm *Vibrio fischeri* auf Seawater Agar mittels Vereinzelausstrich übertragen. Dadurch war die Stammhaltung gewährleistet und es konnten auf einfache Weise frische Zellen für Kultivierungen entnommen werden. Nach der Inkubation von etwa 2-3 d bei 28°C für *Sphingomonas yanoikuyae* und *Bacillus subtilis*, sowie bei 25°C für *Vibrio fischeri* im Brutschrank (BE 200, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach) wurden die bewachsenen Platten mit Parafilm verschlossen und bei +4°C im Kühlschrank gelagert. Zusätzlich wurden von allen verwendeten Mikroorganismen Gefrierkulturen angelegt.

Das auf den fünf PAK und deren Ozonierungsprodukten angereicherte Mikroorganismenkonsortium wurde zur Stammhaltung nicht auf Agarplatten ausgebracht, da sich das Konsortium in seiner Zusammensetzung verändert hätte und ein reproduzierbares Übertragen auf neue Platten nicht möglich gewesen wäre. Zur Stammhaltung wurden von diesem Konsortium Gefrierkulturen angelegt. Bei Bedarf kann eine Gefrierkultur zur Verwendung für eine Kultivierung schonend aufgetaut werden.

### 3.2.3.2 Anlegen von Gefrierkulturen

Um von einer Reinkultur eine Gefrierkultur anzulegen, wurde von einer bewachsenen Agarplatte Biomasse entnommen und in Glucose oder Schadstoff enthaltendes MM<sub>Brun</sub>, bzw. Seawatermedium oder Corynebacteriummedium in einen 4-Schikane-Erlenmeyerkolben überführt und bei 28°C, bzw. 25°C und 120 rpm inkubiert (Certomat R/H, Braun, Melsungen). Nach 24 h wurde das Kulturmedium in sterile Zentrifugenbecher überführt, 10 min bei 8.000 rpm zentrifugiert (Kühlzentrifuge Sigma 3K20, Braun, Melsungen), der Überstand anschließend verworfen und die erhaltenen Pellets nach Resuspendierung in frischem Medium vereinigt. Genauso wurde mit der Mikroorganismenkultur nach der Anzucht eines Mischkonsortiums verfahren. Mit den Suspensionen wurden dann in keimfreien Kryoröhrchen mit sterilem Glycerin 15% (v/v) Glycerinlösungen hergestellt. Einfrier- und Auftauvorgänge wurden langsam und schonend vorgenommen, indem schrittweise die Temperatur von Raumtemperatur auf +4°C über -20°C bis zu -80°C erniedrigt bzw. erhöht wurde. Die Suspensionen wurden für ca. 1-2 h bei den jeweiligen Temperaturen gelagert. Einige Tage nach dem Einfrieren wurde jeweils ein Kryoröhrchen eines Ansatzes wieder auf Raumtemperatur erwärmt, auf geeignete Agarplatten oder in geeignete Schüttelkolben ausgebracht und nach Inkubation die Lebensfähigkeit, bzw. die Reinheit der Kultur begutachtet.

## 3.3 Die verwendeten Böden

Im Rahmen der Arbeiten wurde ein Boden eingesetzt, der vom Institut für Biochemie der Technischen Universität Braunschweig zur Verfügung gestellt wurde. CZESCHKA [1995] führte die Gewinnung, Siebung und Charakterisierung des verwendeten Bodens durch.

Der Boden wurde in der Nähe zur Autobahn A 391 in der Nähe der Gebäude der Gesellschaft für biotechnologische Forschung (GBF) in Braunschweig / Stöckheim entnommen. Der Boden wurde auf den Durchmesser von 2 mm gesiebt und bei 4°C in geschlossenen Behältern gelagert. Der Boden wurde bei 105°C bis zur völligen Gewichtskonstanz getrocknet und bis zu seiner Verwendung bei RT gelagert. Der vorhandene Boden kann aufgrund seiner Korngrößenverteilung als sandiger Schluff charakterisiert werden [CZESCHKA, 1995]. Eine Zusammenstellung der Daten zur Charakterisierung des Bodens findet sich bei SCHIPPERS [1999].

Der zweite verwendete Modellboden wurde in der Nähe von Banteln aus einer ehemaligen Kiesgrube aus dem Bt-Horizont entnommen [MÜLLER, 2000]. Bei diesem Boden handelt es

sich um einen sehr kohlenstoffarmen Lößboden. Der Boden wurde bei 105°C bis zur völligen Gewichtskonstanz getrocknet, auf den Durchmesser von 2 mm gesiebt und bis zu seiner Verwendung bei RT gelagert. Eine Charakterisierung des Bodens ist in der Dissertation von MÜLLER [2000] dargestellt.

Der in dieser Arbeit verwendete real kontaminierte Boden stammt von einem Gaswerkstandort in Karlsruhe. Den Boden charakterisierende Daten finden sich bei MÜLLER [2000] und ETRICH [1996]. Der Boden ist mit 400 bis 500 mg PAK/kg TM belastet, wobei überwiegend 4- und 5-Ringaromaten der 16 EPA-PAK vorliegen. Da es sich um eine gealterte Altlast handelt, sind die mikrobiologisch leichter verstoffwechselbaren 2- und 3-Ring PAK nur noch in geringen Anteilen nachweisbar. Die Kontamination liegt zum Teil in festen Agglomeraten aus Sand und Bodenfeinkorn verkittet mit Teer vor. Aufgrund seiner Korngrößenverteilung ist der Boden als grober Sand zu bezeichnen.

### 3.4 Bestimmung des mikrobiellen Wachstums

#### 3.4.1 Mikroskopische Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl wurde durch Auszählung unter einem Mikroskop mittels einer Zählkammer ermittelt. Dazu wurde ein Durchlichtmikroskop (Olympus BH-2, Fa. Olympus Optical Co., Ltd., Japan) mit 400facher Vergrößerung und eine Helber-Zählkammer verwendet. Um einen Durchschnittswert zu erhalten, wurden je vier diagonal auf dem Zählkreuz liegende Großquadrate ausgezählt. Die Proben wurden so mit 0,9% Kochsalzlösung verdünnt, dass sich ein Wert von 30-80 Zellen pro Großquadrat ergab. Die Zellzahl pro mL wurde nach Gleichung 1 berechnet.

$$\frac{ZZ}{mL} = \frac{\sum GQ}{x} * KF * VF \quad (1)$$

wobei

ZZ/mL = Zellzahl pro mL

GQ = Zählergebnis eines Großquadrats

x = Anzahl gezählter Großquadrate

KF = Kammerfaktor  $1,25 * 10^6$

VF = Verdünnungsfaktor

### 3.4.2 Bestimmung der Lebendzellzahl durch Ausplattierung

Mit den Proben aus den Kultivierungen in 10% Bodensuspensionen wurden Verdünnungsreihen in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit steriler 0,9% Kochsalzlösung angelegt. Von den Verdünnungsstufen  $10^{-1}$  bis  $10^{-6}$  wurden jeweils in Doppelbestimmung 100  $\mu$ L mit einem Drigalsky-Spatel auf St-I-Agar verteilt. Die Agarplatten wurden 48 h bei 28°C im Brutschrank (BE 200, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach) inkubiert und die vereinzelt gewachsenen Kolonien ausgezählt.

### 3.4.3 Messung des Proteingehaltes

Der verwendete Bio-Rad Protein Assay<sup>®</sup> basiert auf dem Lowry-Test und beruht auf zwei Reaktionen: Im ersten Schritt reagieren Proteinbestandteile, vorwiegend Tyrosin und Tryptophan, daneben aber auch Cystein, Cystin und Histidin, mit dem Kupfer(II) in einem alkalischen Medium zu Kupfer(I). In der Folge wird das Folinreagenz durch das Kupfer(I) reduziert, wodurch Verbindungen mit charakteristischer blauer Farbe gebildet werden [BIO-RAD LAB. 1994].

Der Test wurde als erstes darauf untersucht, ob er zur Proteinbestimmung in Bodensuspensionen geeignet ist. Aus 10 % Bodensuspension die mit definierten Inokula auf Zellzahlen von  $10^6$  bis  $10^9$  Zellen/mL angeimpft worden sind, wurden deshalb je 1 mL Suspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Es wurde eine Kalibrationsreihe in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit 10% Bodensuspension und Proteinkonzentrationen zwischen 0,1 bis 1,4 mg/mL angesetzt. Als Blindwert diente ein Ansatz mit Bodensuspension ohne Protein- und ohne Mikroorganismen. Alle Proben wurden durch Zentrifugation bei 13.200 rpm ankonzentriert (Zentrifuge 5415C, Gerätebau Eppendorf GmbH, Engelsdorf) und der Überstand verworfen. Es wurde mit 20  $\mu$ L 3 M HCL versetzt und durch Zugabe von 125  $\mu$ L Reagenz A und 1000  $\mu$ L Reagenz B wurde die Nachweisreaktion gestartet. Während der Reaktionszeit von 15 min wurden die Ansätze wiederholt mit einem Vortex (Reax 2000, Fa. Heidolph) intensiv gemischt. Anschließend wurden die Ansätze 10 min bei 13.200 rpm zentrifugiert und der Überstand in Halbmikroküvetten aus Kunststoff bei 750 nm im Spektralphotometer (UVIKON 922, Fa. Kontron Instruments, Neufahrn) vermessen. Die Messungen der Proben mit Zellzahlen von  $10^6$  bis  $10^9$  Zellen/mL ließ keinen linearen Zusammenhang zwischen Zellzahl und Proteingehalt erkennen, so dass dieser Test bei den weiteren Untersuchungen nicht mehr verwendet wurde.

### 3.4.4 Bestimmung der enzymatischen Hydrolyse von Fluoresceindiacetat

Das Testprinzip beruht darauf, dass das farblose Fluoresceindiacetat durch eine enzymatische Reaktion hydrolysiert wird, was zu einer Freisetzung des intensiv gelb gefärbten Fluoresceins führt. Auch in sehr kleinen Konzentrationen ist eine Gelbfärbung photometrisch einfach zu messen [ALEF, 1991].

Der Test wurde als erstes darauf untersucht, ob er zur Bestimmung der mikrobiologischen Aktivität in Bodensuspensionen geeignet ist. Aus 10% Bodensuspension, die mit definierten Inokula auf Zellzahlen von  $10^6$  bis  $10^9$  Zellen/mL angeimpft wurde, sind deshalb je 2 mL Suspension in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt worden.

Diese Proben wurden 10 min bei 13200 rpm zentrifugiert (Zentrifuge 5415C, Gerätebau Eppendorf GmbH, Engelsdorf). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in ein Reagenzglas mit 5 ml Phosphatpuffer (9,84 g/L Natriumphosphat, pH 7,6) überführt. Es wurden 25  $\mu$ L einer Stammlösung von Fluoresceindiacetat in Aceton (2 g/L) zugefügt. Die Ansätze wurden 3h bei 24°C und 150 rpm inkubiert (Certomat R/H, Braun, Melsungen). Nach Ablauf der 3 h wurden 5 mL Aceton hinzugefügt und mit einem Vortex (Reax 2000, Fa. Heidolph) gründlich durchmischt. Es wurden 2 mL der Lösung abgenommen und 10 min bei 13200 rpm zentrifugiert (Zentrifuge 5415C, Gerätebau Eppendorf GmbH, Engelsdorf). Die Messung erfolgt am Spektralphotometer (UVIKON 922, Fa. Kontron Instruments, Neufahrn) bei 490 nm gegen eine 50% Lösung von Aceton in Wasser. Mit Hilfe einer Stammlösung von Fluorescein in Methanol (5 g/L) wurden Kalibrationslösungen in einer 50% Mischung von Aceton in Wasser angesetzt. Bei den gemessenen Extinktionen ergab sich keine Linearität bei den Proben mit Zellzahlen von  $10^6$  bis  $10^9$  Zellen/mL, so dass dieser Test bei den weiteren Untersuchungen nicht mehr verwendet wurde. Eine messbare Gelbfärbung der Lösung trat nur bei der höchsten Zellzahl auf.

### 3.4.5 Messung der Dehydrogenaseaktivität

Dehydrogenasen sind an vielen Stoffwechselfvorgängen im Metabolismus beteiligt. Viele Dehydrogenasen übertragen abgespaltenen Wasserstoff auf die Coenzyme Nicotinamid-adenin-dinucleotid (NAD) und Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP). Im Stoffwechsel aerober Bakterien steht Pyruvat im Zentrum des Intermediärstoffwechsels. Beispielhaft sei die Oxidation von Pyruvat zu Acetyl-CoenzymA und die Oxidation von Acetat zu Kohlendioxid im Tricarbonsäurecyclus erwähnt, bei denen mehrere Dehydrogenasen an der Wasserstoffabspaltung beteiligt sind. Am Abbau der PAK sind mehrere Enzymsysteme beteiligt. So führen Dioxygenasen und Monooxygenasen durch



Oxidation der aromatischen Ringe Sauerstoff in die Verbindungen ein, während Dehydrogenasen zu erneuter Wasserstoffabspaltung und zu aromatischen, funktionelle Gruppen tragenden Verbindungen zurückführen. In weiteren Schritten führt die Ringspaltung zu niedermolekularen Verbindungen wie z.B. cis,cis-Muconat, das zu 3-Oxadipat abgebaut und weiter zu Succinyl-CoA und Acetyl-CoA gespalten wird. Diese Verbindungen fließen weiter in den Intermediärstoffwechsel ein, an dem weitere Dehydrogenasen beteiligt sind [SCHLEGEL, 1992].

Die Kultivierungsproben (je 2 mL) wurden 10 min bei 5000 g (Kühlzentrifuge Sigma 3K20, Fa. Braun, Melsungen) zentrifugiert und der Rückstand in 1 mL Sepawet CE 5432-Lösung (3 mg/L in Pyrophosphatpuffer 2,8 g/L, pH 7) aufgenommen und gründlich gemischt (1 min, Reax 2000, Heidolph, höchste Stufe). Die Mikroorganismen hydrophobisieren in Gegenwart von Kohlenwasserstoffen ihre Zellwände, deshalb musste dieser Waschvorgang zur Erleichterung des Transportes des hydrophilen Farbstoffs Resazurin in die Zellen durchgeführt werden [OBERBREMER 1990].

Resazurin dient als Wasserstoff- und Elektronenakzeptor bei Oxidationsreaktionen des mikrobiellen Stoffwechsels. Die an diesen Prozessen beteiligten Dehydrogenasen übertragen Wasserstoff, bzw. Elektronen auf die farbige Verbindung Resazurin. Die Reduktion des Resazurins führt zu einer Entfärbung und damit zu einem indirektem photometrischen Nachweis der Dehydrogenaseaktivität.

Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 5000 g wurde der Überstand verworfen und der Rückstand in 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_{dest.}$  aufgenommen. Die gewaschenen Bodenproben wurden in Reagenzgläser überführt und 1 mL Resazurininlösung (75 mg/L), 0,5 mL Pufferlösung A (Imidazol 6,8 g/L, pH 6,3) und 5 mL  $\text{H}_2\text{O}_{dest.}$  zugegeben. Die Proben wurden anschließend bei 37°C und 150 rpm im Brutschrank (Certomat R/H, Fa. Braun, Melsungen) inkubiert. Eine Blindprobe, die statt der Bodensuspension 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_{dest.}$  und zusätzlich bereits 1 mL Pufferlösung B (Natriumtetraborat 3,8 g/L, pH 11) enthielt, um jegliche Aktivität zu unterbinden, wurde in der gleichen Weise angesetzt und inkubiert. Je Probe wurde zudem parallel ein zusätzliches Reagenzglas mit einer identischen Kultivierungsprobe angesetzt, bei dem durch Zugabe von drei Tropfen *m*-Kresol die biologische Reduktion des Resazurins unterbunden wurde. So konnte die chemische Aktivität nach LIU und STRACHAN [1977] festgestellt werden.

Nach 24-48h ist die Verfärbung der Reaktionslösungen von Blau nach Rosa erfolgt und die Reaktion wurde durch Zugabe von je 1 mL Pufferlösung B gestoppt. Die Proben wurden dann 10 min bei 13200 rpm zentrifugiert (Zentrifuge 5415C, Gerätebau Eppendorf GmbH,

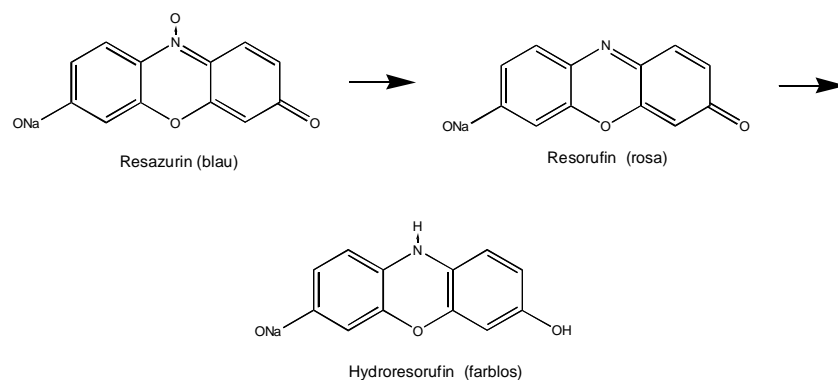
Engelsdorf) und der Überstand aller Ansätze in Halbmikroküvetten aus Kunststoff bei 615 nm im Spektralphotometer (Uvikon 922, Fa. Kontron Instruments, Neufahrn) vermessen.

Die Dehydrogenaseaktivität in [mg reduziertes Resazurin/L Bodensuspension \* h] wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Dehydrogenaseaktivität} = \left( \left( \frac{E_{\text{Blind}} - E_{\text{ges.}}}{\text{Vol.} * t} * R \right) - \left( \frac{E_{\text{Blind}} - E_{\text{chem.}}}{\text{Vol.} * t} * R \right) \right) * 1000 \quad (2)$$

$E_{\text{Blind}}$	=	Extinktion der Blindprobe bei 615 nm
$E_{\text{ges.}}$	=	Extinktion der Probe ohne <i>m</i> -Kresol bei 615 nm
$E_{\text{chem.}}$	=	Extinktion derselben Probe mit <i>m</i> -Kresol bei 615 nm
Vol.	=	Volumen in mL der Bodensuspensionsprobe
t	=	Inkubationszeit in h
R	=	mg Resazurin in der Probe (= 0,075)

Die Reduktion des Resazurins verläuft nach dem folgenden Schema:



**Abb. 4** Reduktion des Resazurins zu Resorufin und Hydroresorufin

### 3.4.6 Bestimmung der optischen Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Kultivierungslösungen zur Bestimmung der Biomasseentwicklung war nur bei den Vorkulturen und den Toxizitätstests möglich, bei denen keine festen Bodenpartikel zugegen waren, die aufgrund von Trübung und starker Lichtstreuung eine Messung der Extinktion unmöglich machten. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 546 nm gemessen. Dazu wurde 1 mL Probe in eine Halbmikroküvette überführt und die Extinktion gegen einen Blindwert mit  $MM_{\text{Brun.}}$  in einem Zweistrahl-Spektralphotometer (Uvikon 922, Fa. Kontron Instruments, Neufahrn) bestimmt. Bei Werten der optischen Dichte, die über 1 liegen wurde die Probe verdünnt. Bei den

Toxizitätsuntersuchungen wurde auch gegen Mischungen von MM<sub>BRUN</sub> und den eingesetzten Bodenextrakten als Referenz gemessen, um die Eigenfarbe der Extrakte zu berücksichtigen.

### 3.4.7 Bestimmung der Vitalität von Zellsuspensionen mittels Durchflusscytometrie

Die Vitalität der Zellsuspensionen wurde nach Anfärben der Zellen mit dem Farbstoff Propidiumiodid mittels eines Durchflusscytometers (Epics XL, Fa. Coulter) bestimmt. Die Zellsuspension wurde dazu auf Konzentrationen von  $10^6$  Zellen/ml oder weniger verdünnt. Propidiumiodid ist ein sogenannter Ausschlussfarbstoff, der tote Zellen anfärbt. Die Zellmembranen toter Zellen sind durchlässig für die Farbstoffmoleküle und es kommt zu einer Anfärbung der DNA und RNA in diesen Zellen. Nach Anregung emittiert dieser Farbstoff Fluoreszenzlicht im rotenWellenlängenbereich, was zu einer Unterscheidung von lebenden Zellen ausgenutzt werden kann. Vor der Anregung der Zellen und der Detektion des Fluoreszenzlichts müssen im Cytometer die Zellen eines definierten Probevolumens vereinzelt werden. Diese Zellvereinzelung findet in einem laminaren Flüssigkeitsstrom mit Hilfe hydrodynamischer Fokussierung statt. Die Zellen fließen durch eine Kapillare zur Messkammer, in welcher die Zellsuspension nach Verlassen der Kapillare durch die in der Küvette strömende Trägerflüssigkeit erfasst wird. Dabei verengt sich der Probestrom auf das Küvettenzentrum und erfährt eine Beschleunigung von wenigen cm/sec auf ca. 7 m/sec. So können vereinzelt Zellen punktgenau an den Messpunkt geführt werden, in welchem sie von einem Laser zur Fluoreszenz angeregt werden [ARNDT, 1998]. Eine Lebendzell/Totzellverteilung, bzw. die Vitalität der Zellsuspension kann somit durch die Verschiebung des Fluoreszenzlichts festgestellt werden.

Tab. 7 Geräteparameter des Epics XL (Fa. Coulter)

Laser	Ar-Ionen-Laser
Fluoreszenzfarbstoff	Propidiumiodid
Anregungswellenlänge	488 nm
Gemessene Wellenlänge	590 nm
Farbstoffkonzentration	50 µg/mL

## **3.5 On-line-Analytik**

### **3.5.1 Temperaturmessung**

Die Messung der Temperatur des Kultivierungsmediums erfolgte mit einem pT100-Temperaturfühler über die Steuereinheit des Biostat B Reaktors.

### **3.5.2 Messung des pH-Wertes**

Zur on-line-Analytik wurde eine pH-Gelelektrode (Fa. Mettler-Toledo, Steinbach) eingesetzt, die direkt mit der Steuereinheit des Biostat B Fermenters verbunden ist. Die sterilisierbare pH-Elektrode wurde vor dem Autoklavieren kalibriert, indem durch eine Zwei-Punkt-Kalibration mit einem Puffer (pH-Wert 4,01) der Elektrodennullpunkt und mit einem weiteren Puffer (pH-Wert 7,00) die Elektrodensteilheit eingestellt wurde.

### **3.5.3 Erfassung des Gelöstsauerstoffgehaltes (pO<sub>2</sub>-Wert)**

Der Gehalt an gelöstem Sauerstoff im Kultivierungsmedium wurde mit einer autoklavierbaren pO<sub>2</sub>-Elektrode (Fa. Mettler-Toledo, Steinbach) polarographisch erfasst. Die Kalibration der Sauerstoffelektrode erfolgte nach der Sterilisation und nach anschließender Polarisierung der Elektrode. Zur Polarisierung musste die Elektrode mindestens 6 h an die Fermentereinheit angeschlossen sein. Die Kalibration erfolgte in Form einer Zwei-Punkt-Kalibration mit reinem Stickstoff für den Nullpunkt (0% Sauerstoffsättigung) und Druckluft für die Elektrodensteilheit (100% Sauerstoffsättigung). Bei der Kalibration mussten die Kultivierungsbedingungen bezüglich Temperatur, Rührerdrehzahl und Begasungsrate genau eingehalten werden.

### **3.5.4 Kohlendioxidmessung (CO<sub>2</sub>) im Abgas**

Bei den Ozonierungen von Boden und Quarzsand wurden die Kohlendioxidwerte mit einem CO<sub>2</sub>-Analysator mit einem Messbereich 0-4% Kohlendioxid (Polytron IR-CO<sub>2</sub>, Drägerwerk) aufgenommen. Das Messgerät wurde mit Stickstoff (0% CO<sub>2</sub>) und einem Prüfgas (1,98% CO<sub>2</sub>, 19,0% O<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) bei einem Volumenstrom von 30l/h kalibriert.

Bei den Kultivierungen im Bioreaktor diente ein CO<sub>2</sub>-Analysator mit einem Messbereich 0-1% Kohlendioxid (FINOR, Fa. Maihak, Hamburg) für die Aufnahme des Kohlendioxidgehaltes im Abgas. Ein vorgeschalteter Rückflusskühler verhinderte das Eindringen von Kondensat in das Messgerät. Die Kalibration des Messgerätes wurde mit

Stickstoff (0% CO<sub>2</sub>) und einem Prüfgas (0,152% CO<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) durchgeführt. Der Volumenstrom durch das Messgerät betrug 40 l/h, bedingt durch die interne Messgasförderpumpe des nachgeschalteten Sauerstoffmessgerätes Oxigor (s. Kap.3.5.5).

### 3.5.5 Sauerstoffmessung (O<sub>2</sub>) im Abgas

Die Sauerstoffmessung im Abgasstrom wurde mit einem O<sub>2</sub>-Analysator (Oxygor, Fa. Maihak AG, Hamburg) im Messbereich von 10-21% Sauerstoff durchgeführt. Das Messgas wurde über eine Pumpe, die sich im Oxygor und damit in der letzten der in Reihe geschalteten Abgasmessgeräte befindet, mit einem Volumenstrom von 40l/h gefördert. Die 2-Punkt-Kalibration erfolgte für den Nullpunkt durch ein Prüfgas (1,98% CO<sub>2</sub>, 19,0% O<sub>2</sub>, Rest N<sub>2</sub>) und für den Messbereich durch Luft (20,93% CO<sub>2</sub>).

### 3.5.6 Datenaufnahme bei Kultivierungen im Bioreaktor

Der Biostat B verfügt über einen eigenen Frontend-Prozessor als Steuereinheit. Während der Kultivierungen wurden damit Temperatur und Rührerdrehzahl geregelt. Die pH- und pO<sub>2</sub>-Messwerte wurden jeweils über eine serielle Schnittstelle ausgegeben. Durch ein Mass-Flow-Meter (Mass-Flow-Controller, 0-150 L/h, Fa. Bronkhorst) mit Controller wurde die Begasungsrate auf einem konstanten Volumenstrom von 120l/h gehalten.

Zur Datenerfassung der Kultivierungen im Bioreaktor wurde ein Hauptrechner (MIMAS) benutzt, auf dem das Prozessleitsystem RISP installiert ist. Über eine am Reaktor aufgestellte Workstation (Vax-Station 3000, Digital), die über das institutseigene local area network (LAN) mit dem Rechner verbunden ist, wurden sowohl der Datenerfassungsprozess gestartet und kontrolliert als auch die anfallenden Daten visualisiert.

Die durch die Steuereinheit des Bioreaktors direkt aufgenommenen Prozessdaten, wie Temperatur, Rührerdrehzahl, Gelöstsauerstoffkonzentration und pH-Wert, konnten über den Hostanschluss digital ausgegeben und somit direkt an die MIMAS weitergeleitet werden. Demgegenüber verfügen der Mass-Flow-Controller und die Abgasanalysengeräte (CO<sub>2</sub>-FINOR, Oxigor) nur über Analogausgänge. Diese Daten wurden per Computer (PC 486, 50 MHz), der mit einer 12-Bit Mehrkanal-A/D-Karte (PCL 818, Advantech) ausgestattet ist und dem Programm Labtech Notebook (Version<sup>®</sup> 1993) aufgenommen und von dort an den Zentralrechner MIMAS weitergegeben. Alle 2 s wurden die Prozessdaten

erfasst und der jeweils nach 1 Minute gebildete Mittelwert auf dem Hauptrechner MIMAS gespeichert.

### 3.6 Off-line-Analytik

#### 3.6.1 Durchführung der 2D-Fluoreszenzmessungen

Für die Untersuchungen wurde das Fluoreszenz-Spektrofluorometer F-4500 (Fa. Hitachi, Ltd., Tokyo) eingesetzt. Bei der Messung wird Licht einer Exzitationswellenlänge auf die Probe gestrahlt und das korrespondierende Emissionsspektrum aufgenommen. Dann wurde die Exzitationswellenlänge um 10 nm erhöht und erneut die Emission registriert usw. Die gewonnenen Daten lassen sich graphisch als 3D-Diagramm darstellen, bei dem die beiden Wellenlängen  $\lambda_{\text{Ex.}}$  und  $\lambda_{\text{Em.}}$  auf der X- bzw. Y-Achse liegen, während die Fluoreszenzintensität in der Z-Achse aufgetragen wird. Zur besseren Übersichtlichkeit beschränkt man sich in der Praxis auf eine 2-dimensionale Darstellung, bei der die Intensitäten in der Ebene durch unterschiedliche Farben dargestellt werden.

Die off-line-Messungen wurden mit einer Fluoreszenzküvette (Hellma) durchgeführt. Durch einen Computer konnten die aufgenommenen Daten gespeichert, in eine ASCII-Datei umgewandelt und mittels Microsoft Excel weiterverarbeitet werden. Damit lassen sich farbige 2D-Fluoreszenzspektren graphisch darstellen. Tabelle 8 gibt die verwendeten Geräteeinstellungen bei den off-line-Messungen wieder.

Tab. 8 Geräteparameter des Fluoreszenz-Spektrophotometers während der off-line-Küvettenmessungen

Parameter	Wert	
Photomultiplierspannung	700 V	
Scangeschwindigkeit	30000 nm/min	
	Exzitation	Emission
Erfasste Wellenlängen	270-530 nm	330-600 nm
Schrittweite	10 nm	10 nm
Slit	10 nm	20 nm

#### 3.6.2 Messung des pH-Wertes

Die off-line-Proben der Schüttelkolbenkultivierungen wurden mit einer Gelelektrode (Fa. Mettler-Toledo, Steinbach) durchgeführt, die an die Steuereinheit des BIOSTAT B

Bioreaktors (Fa. Braun, Melsungen) angeschlossen war. Die Kalibration wurde mit entsprechenden Pufferlösungen im pH-Bereich von pH 4,01 bis pH 7,0 vorgenommen.

Zur Bestimmung des pH-Wertes von Bodensuspensionsproben während des Schüttelkolbenversuchs wurde eine Probe von mindestens 1 mL des Mediumüberstandes genommen und gemessen. Die Aufbewahrung der pH-Elektrode erfolgte in 3 M Kaliumchloridlösung.

### 3.6.3 Bestimmung des Phosphatgehaltes

Zur Messung der Phosphatkonzentration wurde der Merck (PMB) Phosphortest eingesetzt. Das Testprinzip beruht auf der Bildung von Molybdato-phosphorsäure in schwefelsaurer Lösung aus Phosphat- und Molybdato-Ionen, die anschließend mit Ascorbinsäure zu Phosphormolybdänblau (PMB) reduziert wird. Es wurden 1 mL der Bodensuspensionsprobe 10 min bei 13200 rpm zentrifugiert (Zentrifuge 5415C, Gerätebau Eppendorf GmbH, Engelsdorf) und der Überstand im Verhältnis 1:400 mit  $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$  verdünnt und je 1 mL der resultierenden Lösung in einer Einwegküvette mit 1 Tropfen Reagenzlösung P-1A vermischt. Im Anschluß daran wurde in alle Proben eine Spatelspitze Reagenz P-2A (entspricht 50 mg) zugesetzt. Als Blindwert wurde statt der Probe 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$  vorgelegt. Alle Ansätze wurden gründlich gemischt und nach einer 15 minütigen Inkubation bei 712 nm im Spektralphotometer (Uvikon 922, Fa. Kontron Instruments, Neufahrn) vermessen.

Zum Ansatz des Phosphat-Standards wurde 0,2197 g bei 105°C getrocknetes  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  mit  $\text{H}_2\text{O}_{bidest.}$  unter Zusatz von 2,5 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf 1000 mL aufgefüllt (entspricht 153,3 mg  $\text{PO}_4^{3-}$ ) und daraus durch geeignete Verdünnung Kalibrationslösungen angesetzt.

### 3.6.4 Bestimmung des Nitratgehaltes

Der Nitratgehalt von Bodensuspensionsproben wurde nach der DIN 38 405, Teil 9 bestimmt: In schwefel- und phosphorsaurer Lösung reagieren die Nitrat-Ionen mit zugesetztem 2,6-Dimethylphenol zu 4-Nitro-2,6-dimethylphenol, das bei einer Wellenlänge von 324 nm gemessen werden kann.

Die Probenahme und -aufbereitung erfolgte wie bei der Phosphatanalytik beschrieben. 150  $\mu\text{L}$  Probe wurden in Einwegküvetten pipettiert und durch Zugabe von 1200  $\mu\text{L}$  Säuremischung (50% Mischung von Phosphor- in Schwefelsäure) und 150  $\mu\text{L}$  2,6-Dimethylphenol-Lösung (1,2 g/L Essigsäure) der Test gestartet. Die Reaktionslösung wurde gut vermischt und nach 15 min. die Extinktion der Lösungen bei 324 nm gemessen. Als Blindwert diente ein Ansatz

mit Wasser. Eine Kalibrationsreihe wurde durch geeignete Verdünnungen einer  $\text{KNO}_3$ -Stammlösung (0,3609 g/L Kaliumnitrat, 105°C getrocknet) aufgestellt.

### 3.6.5 Bestimmung des Ammoniumgehaltes

Die Bestimmung von  $\text{NH}_4^+$ -Ionen wurde gemäß der DIN 38 406, Teil 5 durchgeführt. Bei einem pH-Wert von 12,6 reagieren die vorliegenden Ammoniumionen mit Hypochlorit- und Salicylationen zu einem blauen Farbstoff, der bei 655 nm photometrisch gemessen werden kann. Dinatriumpentacyanonitrosylferrat dient dabei als Katalysator. Die Hypochloritionen entstehen im alkalischen Milieu durch die Hydrolyse der Dichloroisocyanursäure.

Die Probenahme und -aufbereitung erfolgte wie bei der Phosphatanalytik beschrieben. Die Kultivierungsproben wurden vor dem Testansatz 1:200fach verdünnt und je 1 mL der Verdünnung in eine Einwegküvette pipettiert. Nach Zusatz von 100  $\mu\text{L}$  Reagenz A (13 g Natriumsalicylat, 13 g Trinatriumcitrat, 0,097 g Dinatriumpentacyanonitrosylferrat in 100 mL  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ ) und 100  $\mu\text{L}$  Reagenz B (3,2 g Natriumhydroxid, 0,2 g Natriumdichloroisocyanurat in 100 mL  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ ) wurden die Ansätze gemischt und nach 1 bis max. 3 h photometrisch vermessen. Als Blindprobe wurde 1000  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  angesetzt. Als Standard diente eine Ammoniumsulfatstammlösung (0,4717 g/L, entspricht 140 mg/L  $\text{NH}_4$ ). Zur Kalibration wurden entsprechende Verdünnungen der Stammlösung unter gleichen Bedingungen vermessen.

### 3.6.6 Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffgehaltes DOC

Die Messung des DOC der unverdünnten Medienüberstände der Kultivierungsproben wurde an einem Kohlenstoffanalysator TOCOR 3 (Fa. Maihak, Hamburg) durchgeführt. Mit Glucosestandardlösungen im Bereich von 20 – 200 mg C/L wurde eine Kalibrationsgerade erstellt. Das Messprinzip beruht auf einer Totaloxidation des gelösten organischen Kohlenstoffs zu Kohlenstoffdioxid. Die Oxidation erfolgt durch Ozon, das während der Begasung der Probe in schwefelsaurem Medium bei 40°C und pH 2 mit Sauerstoff in-situ bei Bestrahlung mit UV-Licht entsteht. Das Ozon bildet unter diesen Bedingungen Hydroxylradikale, die allen vorliegenden Kohlenstoff zu Kohlenstoffdioxid oxidiert. Das entstandene Kohlenstoffdioxid wurde mit einem Messgerät (UNOR, Fa. Maihak, Hamburg) gemessen und die Daten über eine A/D-Wandlerkarte (12-Bit Mehrkanal-A/D-Wandlerkarte PCL 818, Fa. Advantech) an einen Computer (PC 686, 120 MHz) übermittelt und ausgewertet.



### 3.6.7 Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs CSB

Die Bestimmung des CSB erfolgte durch die Küvettentestkits LCK 114, LCK 314, LCK 414 und LCK 614 (Fa. Dr. Lange, Düsseldorf). Es wurden jeweils 2 mL der unverdünnten Medienüberstände der Kultivierungsproben in die Testküvetten pipettiert und auf dem Vortex (Reax 2000, Fa. Heidolph) gemischt. Anschließend wurden die Testküvetten in einem Thermoblock (Fa. Dr. Lange, Düsseldorf) 2 h bei 148°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden die Küvetten in einem Spektralphotometer CADAS 100 (Fa. Dr. Lange, Düsseldorf) gemessen. Das Testergebnis wurde in [mg O<sub>2</sub>/L] angegeben.

### 3.6.8 Bestimmung des PAK-Gehaltes

#### 3.6.8.1 Feste Bodenproben oder Quarzsandproben

Jeweils 0,5-1,5 g Bodenprobe oder Quarzsand wurden in ein Reagenzglas eingewogen, mit 1 ml einer Dimedonlösung (500 mg/100mL Aceton) und für die Phenanthrenbestimmung mit 1 mL Anthracenstandard (1 mg/mL Dichlormethan) und für die Bestimmung der 16 PAK nach EPA mit 1 mL Naphthalinstandard (0,5 mg deuteriertes Naphthalin/mL Dichlormethan) als internem Standard versetzt. Die Reagenzgläser wurden dann mit Kunststoffstopfen und Parafilm verschlossen und bis zur Aufarbeitung bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Proben wurden einmal mit jeweils 5 ml Cyclohexan versetzt und auf einem Rüttler (Reax 2000, Fa. Heidolph) fünf Minuten bei Stufe 9 gerüttelt. Der Extrakt einer Probe wurde über einen mit Cyclohexan angefeuchteten Faltenfilter filtriert und in einem 100 ml Spitzkolben aufgefangen. Das Lösungsmittel wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers (OB 2001, Fa. Heidolph) bei einer Wasserbadtemperatur von 40°C und 400 mbar entfernt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wurde der Druck auf 100 mbar erniedrigt, um letzte Reste von Cyclohexan zu entfernen.

Der Rückstand wurde in 1 ml Dichlormethan aufgenommen und mittels Festphasenextraktion gereinigt. Diese dient der Abtrennung polarer Substanzen, die den PAK-Nachweis stören und die Kapillarsäule des GC-MSD bzw. das MS selbst schädigen könnten.

### 3.6.8.2 10% Boden- oder Quarzsandsuspensionsproben

Die bei den Schüttelkolbenkultivierungen verwendeten 100 mL-Vier-Schikane-Erlenmeyerkolben wurden jeweils komplett zur Phenanthrenbestimmung aufgearbeitet. Bei der Probenahme wurde durch Zugabe von 400  $\mu$ L 3 M HCl die mikrobiologische Aktivität abgestoppt und 1 mL Anthracen-Stammlösung (1 mg/mL in Dichlormethan) zugesetzt. Bis zur Aufarbeitung wurden die Kolben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und gelagert.

Die bei den Bioreaktorkultivierungen entnommenen Boden- oder Quarzsandsuspensionsproben mit einem Volumen von 30 mL wurden ebenfalls mit 400  $\mu$ L 3 M HCl versetzt, um die mikrobiologische Aktivität abzustoppen. Bei den Proben zur Phenanthrenbestimmung wurde 1 mL Anthracen-Stammlösung (1 mg/mL in Dichlormethan) und bei den Proben zur Bestimmung der 16 PAK nach EPA 1 mL Naphthalin-Stammlösung (0,5 mg deuteriertes Naphthalin/mL Dichlormethan) als internem Standard zugesetzt. Bis zur Aufarbeitung wurden die Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und gelagert.

Zur Extraktion wurden die Quarzsand- und Bodensuspensionsproben quantitativ in 100 mL Schütteltrichter überführt. Diese wurden dann auf einem Reziproschüttler (Lab-Shaker, Fa. Adolph Kühn AG) befestigt und dreimal für 30 min mit 50 mL Dichlormethan bei 170 rpm extrahiert. Anschließend wurde jeweils die untere organische Phase über den im Auslauf mit Watte versehenen Hahn des Schütteltrichters in einen Spitzkolben abgelassen. So konnte eventuell aus dem Schütteltrichter abgelassener Boden aufgefangen werden. Die Extraktion wurde noch zweimal mit je 50 mL Dichlormethan wiederholt. Das im Spitzkolben vereinigte Lösungsmittel wurde mit Hilfe eines Rotationsverdampfers (OB 2001, Fa. Heidolph) bei einer Wasserbadtemperatur von  $40^{\circ}\text{C}$  und 550 mbar abdestilliert. Nach Abrotieren des Lösungsmittels wurde der Druck auf 100 mbar erniedrigt, um letzte Reste von Dichlormethan zu entfernen. Der Rückstand wurde in 1 mL Dichlormethan aufgenommen und einer Festphasenextraktion unterzogen.

### 3.6.8.3 Festphasenextraktion der PAK-Extrakte

Für die Festphasenextraktion wurden Silicagelsäulen (Silica 200 mg/3 ml column reservoir, Fa. ICT) verwendet. Bei dem Verfahren werden polare Substanzen auf der Säule gebunden, während unpolare Substanzen wie Phenanthren und Anthracen, bzw. andere PAK nach EPA eluiert werden. Zur Konditionierung der Säule wurden erst 1 ml Methanol und anschließend 4 ml Dichlormethan eluiert. Dann wurde die Probe aufgegeben und bis zur Oberkante der Festphase abgelassen, um schließlich mit 6 ml Dichlormethan in einen 10 ml Messkolben zu eluieren.

Nach Aufnahme des Eluates und auffüllen auf 10 mL mit Dichlormethan wurden von jeder Probe je 1,5 ml auf 2 Autosamplervials verteilt und diese mit einer Bördelzange verschlossen. Je ein Vial diente zur Messung am GC-MSD, das andere zur Aufbewahrung als Referenz. Bis zur Messung am GC-MSD werden die Proben bei +4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.6.8.4 Bestimmung der PAK-Konzentration mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Die PAK-Analytik wurde mit einer Gerätekombination von GC-MSD durchgeführt.

Gaschromatograph:	Modell 5890 Series II+ (Fa. Hewlett-Packard, Waldbronn)
Massenspektrometer:	Modell 5972 A (Fa. Hewlett-Packard, Waldbronn)
Autosampler:	Modell 5960 (Fa. Hewlett-Packard, Waldbronn)

Die von HP gelieferte Software (HP G1034C MS ChemStation C.02.03), die einerseits zur Gerätesteuerung und andererseits zur Datenerfassung bzw. -verarbeitung dient, wurde auf einem 486 PC von Hewlett Packard installiert.

In Tabelle 9 sind die Geräteeinstellungen für die Bestimmung der Proben mit Phenanthren und für die PAK-Bestimmung der 16 PAK nach EPA aufgelistet.

Tab. 9      Geräteeinstellungen des GC-MSD

	<b>Phenanthren</b>	<b>16 PAK nach EPA</b>
Injektionsvolumen	1 µL	1 µL
Liner	Single Taper Liner	Single Taper Liner
Injektortemperatur	300°C	300°C
Split	Splitless	Splitless
Chromatographiesäule	HP-5MS, 30 m * 0,25 mm	HP-5MS, 30 m * 0,25 mm
Carriergas	Helium 4.6	Helium 4.6
Trägergasdruck/-flußrate	104 kPA/ 1,68 mL/min	104 kPA/ 1,68 mL/min
Temperaturprogramm	60 °C: 1 min 20 °C/min bis 150 °C 5 °C/min bis 210 °C 20 °C/min bis 310 °C 310 °C: 10 min	50 °C: 1 min 12°C/min bis 150 °C 7°C/min bis 210 °C 5 °C/min bis 310 °C 310 °C: 10 min
Solvens Delay	5 min	6,5 min
Elektronen-Multiplier-Spannung	Gemäß Standard Sensitive Autotune	Gemäß Maximum Sensitivity Autotune
Modus	SIM	SIM
Gruppe 1 Dwell: 65 ms	ab 5 min: 136/128/64	Ab 6,8 min: 136/128/64/61
Gruppe 2 Dwell: 45 ms	ab 7,5 min: 154/153/152/76	Ab 10 min: 154/153/152/76
Gruppe 3 Dwell: 65 ms	ab 9 min: 166/165/83	Ab 11,5 min: 167/166/139/82
Gruppe 4 Dwell: 33 ms	ab 10,5 min: 178/176/152/89/76	Ab 14 min: 188/184/178/176/160/158/156/ 152/89/76
Gruppe 5 Dwell: 65 ms	ab 13,5 min: 202/200/101	Ab 18 min: 212/211/210/208/206/202/200/ 101/88
Gruppe 6 Dwell: 45 ms	ab 18,5 min: 228/226/114/101	Ab 23,5 min: 228/226/224/114/101
Gruppe 7 Dwell: 65 ms		Ab 28 min: 252/248/250/224/126/113
Gruppe 8 Dwell: 26 ms		Ab 33 min: 278/276/274/139/138/137/124

## **3.7 Analytik von Ozonierungsprodukten der Phenanthrenoxidation**

### **3.7.1 Herstellung von Methanolextrakten nach der Ozonierung von Phenanthren**

Mit Phenanthren kontaminierte und ozonierte Quarzsandproben (s. Kap 3.8.4) wurden jeweils in Mengen von 100 g dreimal mit 200 mL Methanol extrahiert. Dazu wurde in einem 250 mL Scheidetrichter 3 mal 2 Minuten ausgeschüttelt. Die vereinigten Methanolextrakte wurden über einen Faltenfilter extrahiert und anschließend am Rotationsverdampfer (OB 2001, Fa. Heidolph) bei einer Wasserbadtemperatur von 50°C und 200 mbar entfernt. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels wurde der Druck auf 100 mbar erniedrigt, um letzte Reste von Methanol zu entfernen. Der Rückstand wurde in 100 mL Methanol aufgenommen und bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

### **3.7.2 Dünnschichtchromatographie von Ozonierungsprodukten**

Die aus dem Reaktionsrückstand der Ozonierung hergestellten Methanolextrakte wurden nach einem Aufkonzentrierungsschritt für die Dünnschichtchromatographie verwendet. Durch Versuche mit Dünnschichtchromatographie sollten Hinweise auf die Anzahl der aus der Ozonierung von Phenanthren entstandenen Verbindungen sowie ihrer funktionellen Gruppen ermittelt werden. Für die Analyse auf funktionelle Gruppen wurden kleine Dünnschichtfolien 7,5 x 5 cm mit Silicagel- oder RP<sub>18</sub>-Phasen verwendet, da hier mit einem höheren Durchsatz an DC-Folien gearbeitet wurde. Die kleinen DC-Folien sind billig und lassen sich einfach und schnell entwickeln. Parallel dazu wurden auch Versuche mit 2D-Dünnschichtchromatographie auf 20 x 20 cm Silicagelfolien durchgeführt, da durch die längere Laufstrecke und die Verwendung von 2 verschiedenen Laufmitteln eine bessere Auftrennung der Stoffgemische möglich war. Nach einem ersten Lauf wurden die Platten um 90° gedreht und durch einen Lauf mit einem zweiten Laufmittel erneut entwickelt. Die Gesamtzeit für die Entwicklung der DC-Folien betrug hier bis zu 4 h. Die Detektion von Substanzen erfolgte sowohl visuell unter UV-Licht als auch durch Anfärben mit bestimmten Reagenzien. Die Zusammensetzungen der verwendeten Reagenzien befinden sich im Anhang.

### **3.7.3 Säulenchromatographie von Ozonierungsprodukten**

Die nach der Ozonierung von Phenanthren hergestellten Methanolextrakte wurden eingeeengt und über Säulenchromatographie aufgereinigt. Dazu wurden 150 g Silicagel in eine Säule gefüllt und die Säulenchromatographie mit den gleichen Laufmitteln durchgeführt wie bei

der Dünnschichtchromatographie. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatographie, GC-MS und NMR-Spektroskopie untersucht.

### 3.7.4 Derivatisierung mit MSTFA und Analyse mittels GC-MS

Der hergestellte Methanolextrakt wurde direkt der Analyse mittels GC-MS zugeführt, oder es wurde 1 mL abgenommen, das Methanol am Rotationsverdampfer (OB 2001, Fa. Heidolph) bei einer Wasserbadtemperatur von 50°C und 200 mbar abrotiert und eine Derivatisierung mit N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) durchgeführt. Dazu wurde 250 µL MSTFA zugefügt und 15 min bei 60°C erhitzt. Vor der Messung am GC-MS wurde mit 250 µL Dichlormethan verdünnt.

Tab. 10 Geräteeinstellungen des GC-MS

	<b>Ozonierungsprodukte</b>
Injektionsvolumen	1 µL
Liner	Single Taper Liner
Injektortemperatur	250°C
Split	Splitless
Chromatographiesäule	HP-5MS, 30 m * 0,25 mm
Carriergas	Helium 4.6
Trägergasdruck/-flußrate	0,8 mL/min, const. Flow
Temperaturprogramm	60 °C: 1 min 10 °C/min bis 150 °C 15 °C/min bis 300 °C 300 °C: 10 min
Solvens Delay	4 min
Elektronen-Multiplier-Spannung	Standard Sensitive Autotune
Modus	SCAN

### 3.7.5 Analytik der Ozonierungsprodukte des Phenanthrens mittels Kapillarelektrophorese




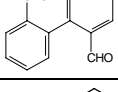
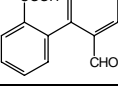
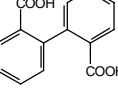
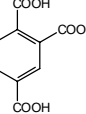
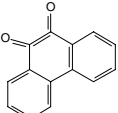
Bei der Kapillarelektrophorese wird eine Quarzglas Kapillare gleichmäßig mit einer Elektrolytlösung gefüllt. Nach der Beaufschlagung der Kapillare mit einer Probe kommt es bei Anlegen einer Hochspannung durch die Kombination der elektrophoretischen Wanderung geladener Teilchen und des elektroosmotischen Flusses der Elektrolytlösung zu einer Trennung. Negativ geladene Teilchen wandern aufgrund ihrer elektrophoretischen

Beweglichkeit zur Anode. Der elektroosmotische Fluß kommt durch die Elektrolytlösung zustande, die durch die geladene Kapillarenwand und die angelegte Spannung verursacht wird. Bei Elektrolytlösungen, deren pH-Wert oberhalb von 1,5 liegt werden die Silanolgruppen der Kapillarenwand negativ geladen, wobei in der Elektrolytlösung ein kleiner Überschuß an positiven Ladungen verbleibt, die zur Kathode wandern. Aufgrund dessen bewegt sich der elektroosmotische Fluß in Richtung auf die Kathode zu. Der elektroosmotische Fluß ist stärker als die elektrophoretische Beweglichkeit der Teilchen in die entgegen gesetzte Richtung. Daher wandern alle Analyte zur Kathode, wobei die positiv geladenen Moleküle diese eher erreichen als die negativ geladenen. Ist ein UV- oder PDA-Detektor vor der Kathode installiert, so können die Analyten, die das Detektorfenster auf ihrem Weg zur Kathode passieren, in der Reihenfolge ihrer Auftrennung gemäß der unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeiten detektiert werden. Neutrale Moleküle können bei dieser Technik durch Zusatz von mizellaren Additiven wie z.B. Natriumdodecylsulfat oder Cholsäure getrennt werden. Die neutralen Analyten werden in die Mizellen aufgenommen, die ihrerseits aufgrund einer negativen Ladung über eine elektrophoretische Beweglichkeit verfügen. Diese Technik wird als mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie bezeichnet und kam bei den Messungen zum Einsatz.

Ozonierungsprodukte des Phenanthrens, die durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie mit Hilfe von Vergleichssubstanzen identifiziert werden konnten, sind bei Versuchen mit *Sphingomonas yanoikuyae* DSM 6900 und mit Mischkulturen auf ihre biologische Abbaubarkeit untersucht worden. Die während der Schüttelkolbenkultivierung genommenen Proben wurden mit Hilfe der Kapillarelektrophorese untersucht. Dazu wurde 1 mL Medium aus dem Schüttelkolben entnommen und die Bakterienzellen bei 13200 rpm (Zentrifuge 5415C, Gerätebau Eppendorf GmbH, Engelsdorf) abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 10 µL einer Lösung von Cetyldiethylmethylammoniumbromid (25 mg/mL) und mit 10 µL Diphenylessigsäurelösung (100 mg/mL) als internem Standard versetzt. Bis zur Messung mittels Kapillarelektrophorese wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt. Für die Messung wurde ein Puffer verwendet, der Borsäure (50 mM/L) und Cholsäure (100 mM/L) als Mizellenbildner enthielt und auf einen pH-Wert von 8,3 eingestellt worden ist. Die Messung der Proben wurde mit einer Kapillarelektrophorese der Fa. Beckmann Coulter, Typ P/ACE<sup>TM</sup> System MDQ durchgeführt.

Tabelle 11 gibt die unterschiedlichen eingesetzten Substanzen und ihre Migrationszeiten wieder, sofern diese Substanzen mittels CE aufgetrennt und detektiert werden konnten.

Tab. 11 Durch Kapillarelektrophorese untersuchte Substanzen

Substanzname	Strukturformel	Migrationszeit [min]
Salicylsäure		16,71
Phthalaldehydsäure		15,09
Phthalsäure		35,92
2,2'-Biphenyldialdehyd		12,81
2'-Formyl-2-Biphenylcarbonsäure		11,65
Diphensäure		25,30
Trimellithsäure		Nicht detektierbar
9,10-Phenanthrendion		Nicht detektierbar

Bei der verwendeten Methode handelte es sich aufgrund des verwendeten Puffers um die Technik der mizellaren elektrokinetischen Kapillarchromatographie. Die Tabelle 12 gibt die wichtigsten Geräteparameter und Einstellungen wieder.

Tab. 12 Geräteeinstellungen P/ACE™ System MDQ

Geräteparameter	Wert
Kapillartemperatur	25°C
Probentemperatur	25°C
Kanal A	PDA Detektor
Kanal B	214 nm, bandwidth 10 nm
Probeninjektion	10 s
Messzeit	40 min
Spannung	25 kV
Kapillarlänge insgesamt	57 cm
Kapillarlänge bis Detektorfenster	50 cm
Puffersystem	Borsäure 50mM/L Cholsäure 100 mM/L pH-Wert 8,3



### 3.7.6 Synthese der Referenzsubstanzen 2,2'-Biphenyldialdehyd und 2'-Formyl-2-Biphenylcarbonsäure

In einem 3-Halskolben versehen mit Gaseinleitungsfrötte, Thermometer und Röhrfisch wurden 15 g Phenanthren in 300 mL Methanol suspendiert. Der Kolben wurde mit Aceton (abgeköhlt durch Einröhren von flüssigem Stickstoff) auf  $-30^{\circ}\text{C}$  geköhlt. Unter Röhren wurde Ozon eingeleitet (30 l/h,  $40\text{ g/m}^3$ , 4,5 h). Mit steigendem Umsatz färbte sich die Lösung gelb und die Suspension wurde klar, wobei das Phenanthren vollständig in Lösung ging und abreagierte. Mit steigender Ozonkonzentration im Abgas wurde die Ozonolyse beendet. Der Ansatz wurde in zwei gleich große Ansätze I und II zu jeweils 150 mL aufgeteilt.

Zu Ansatz I wurden unter Röhren 22 g NaI und 22,5 mL konz. Essigsäure zugegeben. Die Lösung stand 30-60 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Lösung durch Zugabe einer 10%igen Lösung von Natriumthiosulfat in Wasser entfärbt. Das Methanol wurde am Rotationsverdampfer eingengt und die Lösung mit zusätzlichem Wasser verdünnt bis 2,2'-Biphenyldialdehyd ausfiel.

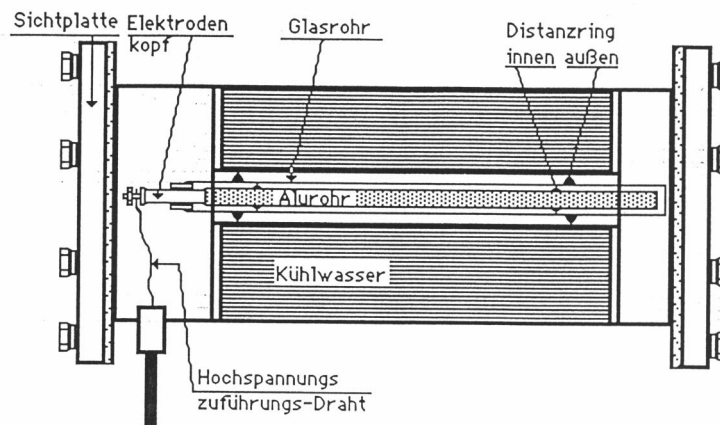
Ansatz II wurde mit einigen Tropfen konz. Salzsäure angesäuert und über Nacht bei  $+4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Es fielen weiße Kristalle von 3,8-Dimethoxy-4,5,6,7-dibenzo-1,2-dioxacyclooktan aus. Der Niederschlag wurde auf einer Nutsche abfiltriert und im Exsikkator getrocknet. 10 g dieser Substanz wurden in 50 mL NaOH (10%) und 200 mL Ethanol 15 min unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktionslösung wurde eisgeköhlt und langsam mit Wasser verdünnt, bis sich die Lösung trübte und sich ein Niederschlag von 2'-Formyl-2-Biphenylcarbonsäure bildete. Es wurde langsam Wasser zugegeben, bis die Kristallisation komplett war. Der erhaltene Niederschlag wurde mit einer Nutsche abfiltriert und im Exsikkator getrocknet. Eine Umkristallisation erfolgte in Methanol:Wasser (50:50). Die erhaltenen Produkte wurden mittels GC-MS und NMR-Spektroskopie untersucht.

## 3.8 Ozonerzeugung und Durchführung der Ozonierungen

### 3.8.1 Sander Labor-Ozonisator

Bei dem Labor-Ozonisator 301.7 (Fa. Erwin Sander Elektroapparatebau, Elze) (Abk. Sander-Ozonisator) handelt es sich um einen Röhrenozonisator. Die Ozon erzeugende Einheit besteht aus einer 30 cm langen Doppelzylinderelektrode. Auf ein Aluminiumrohr ist ein Glasrohr als Dielektrikum aufgezogen, während als äußere Gegenelektrode ein Edelstahlrohr dient. Das

Edelstahlrohr wurde geerdet und das Aluminiumrohr ist an Hochspannung von max. 7 kV angeschlossen. Im Ozonisator sind sieben solcher Doppelröhren zu einem Bündel zusammengeschlossen. Eine exakte Abstandshaltung der Elektroden zueinander bzw. zum Dielektrikum wird durch nichtleitende Abstandsringe bewirkt, die das Aluminiumrohr und das Glasrohr umgeben. Bei der Ozonerzeugung mit dem Sander-Ozonisator entsteht eine Verlustwärme von ca. 20 W/g Ozon. Diese Wärme wird durch Kühlwasser, das die äußeren Edelstahlröhren umströmt, abgeführt. Der Kühlwasserbedarf liegt bei 50 l/h. Die Hochspannung wird von einem in das Gerät integrierten Transformator erzeugt und kann zwischen 0 und 7 kV angelegt werden. Die folgende Abbildung 5 zeigt den Aufbau des Sander-Ozonisators.



**Abb. 5** Sander-Laborozonisator 301.7 entnommen aus Gebrauchsanleitung Laborozonisator 301.7 (Fa. Erwin Sander Elektroapparatebau)

### 3.8.2 Bestimmung der Ozonkonzentration mit dem Messgerät der Fa. Sander

Am Reaktorausgang diente ein Messgerät zur Ozonmessung in der Gasphase (Fa. Erwin Sander Elektroapparatebau, Elze) zur Bestimmung der Ozonkonzentration. Um das Gerät in einen betriebswarmen Zustand zu bringen, wurde es eine halbe bis eine Stunde vor Versuchsbeginn eingeschaltet. In das Gerät integriert ist eine Durchflussküvette, in der mit Hilfe einer UV-Lampe die Extinktion des Gasstroms gemessen werden kann. Die Umrechnung der Extinktion in eine Konzentrationsangabe erfolgt durch das Gerät. Über einen Analogausgang des Gerätes werden die Daten über eine A/D-Wandlerkarte (12-Bit Mehrkanal-A/D-Wandlerkarte PCL 818, Fa. Advantech) an einen Computer (PC 686, 120 MHz) übermittelt. Jede Sekunde wird ein Wert aufgenommen und nach jeweils zehn Sekunden wird ein Mittelwert gebildet. Alle 100 sec, wechselt die Messgaszuführung vom

Reaktorein- zum Reaktorausgang und wieder zurück. Aus der Bilanzierung der aufgenommenen Messwerte können der Ozoneintrag und der Ozonverbrauch errechnet werden.

### **3.8.3 Der verwendete Laborreaktor**

Als Reaktor zur Vorbehandlung des kontaminierten Quarzsand- oder Bodenmaterials diente ein 500 mL Laborreaktor aus Edelstahl, der in Kooperation mit Herrn T. Müller im Rahmen seiner Dissertation entstand [MÜLLER, 2000]. Mit diesem Reaktor konnten 400 g Feststoff behandelt werden. Für eine Durchmischung des Materials während der Begasung mit Ozon verfügt der Reaktor über einen einfachen Paddelmischer, bestehend aus drei im 120° Winkel angeordneten Paddelschaufeln. Als Antrieb wird ein Motor eines Biostat B Fermentersystems (Fa. Braun, Melsungen) verwendet, der mittels der zugehörigen Biostat B Steuereinheit (Fa. Braun, Melsungen) eine stufenlose Regelung des Mixers ermöglicht. Bezüglich weiterer Einzelheiten siehe MÜLLER [DISSERTATION, 2000].

### **3.8.4 Durchführung der Ozonierung mit dem Laborreaktor**

Alle benötigten Geräte wurden vor Versuchsbeginn in einen betriebswarmen Zustand gebracht. Das Ozonmessgerät wurde eingeschaltet, der Luftstrom durch den Reaktor auf 30 l/h eingestellt und das Kühlwasser für die Kühlung des Ozonisators aufgedreht.

Zur Bestimmung der Ausgangskonzentration des Schadstoffes wurden 200 g des Quarzsandes oder Bodens in den Reaktor eingefüllt und das Material 15 min bei 60 rpm durchmischt. Vor Beginn des Versuches wurden 3 Proben des mit Phenanthren kontaminierten Quarzsandes oder Bodens entnommen und wie in Kapitel 3.6.8.1 beschrieben behandelt. Nach Feststellung der Versuchsbedingungen wie der Gastemperatur, dem Luftdruck, dem Überdruck in der Apparatur, der Mischergeschwindigkeit von 60 rpm und dem Volumenstrom von 30 l/h (Pressluft) wurde der Versuch gestartet.

Dazu wurde der Ozonisator bei einer eingestellten Leistung von 65 % eingeschaltet. Der ozonhaltige Gasstrom wurde solange über den Bypass geleitet, bis die Ozonkonzentration von 25 g/m<sup>3</sup> konstant war. Nach ca. fünfzehn Minuten wurde der Gasstrom durch den Reaktor geleitet und die Datenaufnahme gestartet. Nach Ablauf einer vorher festgelegten Zeit wurde die Ozonierung unter- oder abgebrochen, indem der ozonhaltige Gasstrom über einen Bypass geleitet wurde. Bei jeder Unterbrechung und bei Beendigung der Ozonierung wurden bis zu drei Proben entnommen und gemäß Kap. 3.6.8.1 behandelt. Bei Beendigung des Versuchs

blieb der Pressluftstrom bei ausgeschaltetem Ozonisator noch für 30 min eingeschaltet, um letzte Ozonreste aus der Apparatur zu spülen.

### **3.8.5 Der verwendete Technikumsreaktor**

Der Verwendete Technikumsreaktor hat ein Volumen von 25 l, wobei in einer Charge bis zu 5 kg Boden behandelt werden konnten. Der Reaktor besteht aus Edelstahl, verfügt über zwei Probenahmeöffnungen und ist mit einem Pflugscharmischer ausgerüstet. Der Antrieb erfolgt über einen Keilriemen, der mit einem Elektromotor (VEB Elektromotorenwerke, Thurm, DDR, 1986) verbunden ist. Bezüglich weiterer Einzelheiten siehe MÜLLER [DISSERTATION, 2000].

### **3.8.6 Durchführung der Ozonierung mit dem Technikumsreaktor**

Alle benötigten Geräte wurden vor Versuchsbeginn wie unter Kap. 3.8.4 beschrieben in einen betriebswarmen Zustand gebracht. Zur Bestimmung der Ausgangskonzentration des Schadstoffes wurden 5 kg des Bodens in den Reaktor eingefüllt und das Material 15 min bei 200 rpm durchmischt. Vor Beginn des Versuches wurde 1 Probe (200-250 g) des mit Phenanthren oder PAK kontaminierten Bodens entnommen. Aus dieser Menge wurden alle physikalischen und chemischen Parameter bestimmt, sowie Extrakte für deren Bestimmung hergestellt. Proben für die Phenanthren- und PAK-Analytik wurden wie in Kapitel 3.6.8.1 behandelt. Nach Feststellung der Versuchsbedingungen (Temperatur, Luftdruck und Überdruck, Volumenstrom 120 l/h, 20 g Ozon/m<sup>3</sup>, Ozonisatorleistung 78%) wurde der Versuch gestartet.

Der ozonhaltige Gasstrom wird solange über den Bypass geleitet, bis die Ozonkonzentration von 20 g/m<sup>3</sup> konstant ist. Nach ca. fünfzehn Minuten wird der Gasstrom durch den Reaktor geleitet und die Datenaufnahme gestartet. Nach Ablauf einer vorher festgelegten Zeit wird die Ozonierung für die Probenahme unterbrochen, wobei jedesmal ca. 200-250 g Boden aus dem Reaktor entnommen wurde. Alle Proben wurden entsprechend den zu bestimmenden Parametern weiterbehandelt. Bei Beendigung des Versuchs bleibt der Pressluftstrom bei ausgeschaltetem Ozonisator noch für 30 min eingeschaltet, um letzte Ozonreste aus der Apparatur zu spülen.

### 3.9 Durchführung der mikrobiologischen Abbauprobungen

#### 3.9.1 Vorkulturen für mikrobiologische Abbauprobungen

Vorkulturen von *S. yanoikuyae* wurden in 500 mL Vier-Schikane-Erlenmeyerkolben, die mit 200 mL MM<sub>Brun.</sub> und 1 g/L Glucose und 150 mg/L Phenanthren befüllt waren, angesetzt. Nach der Inokulation durch Zugabe einzelner Kolonien, die von einer Agarplatte entnommen wurden, wurde der Kolben für 24 h im Rotationsschüttler (Certomat R/H, Fa. Braun, Melsungen) bei 120 rpm und 28°C inkubiert.

Vorkulturen der PAK abbauenden Mischkultur wurden in 500 mL Vier-Schikane-Erlenmeyerkolben, die mit 200 mL MM<sub>Brun.</sub> und 1 g/L Glucose und jeweils 100 mg/L PAK (Fluoranthren, Fluoren, Phenanthren und Pyren) befüllt waren, angesetzt. Die Inokulation erfolgte immer aus einer frisch aufgetauten Gefrierkultur. Die Mischkulturen benötigten aufgrund einer längeren Adaptionsphase 48 h bis ein ausreichendes Wachstum erreicht war.

Danach wurde mit beiden Vorkulturen in der gleichen Weise verfahren. Der Inhalt des Erlenmeyerkolbens wurde auf sterile 30 mL Zentrifugenröhrchen verteilt und für 10 min bei 8.000 rpm zentrifugiert (Kühlzentrifuge Sigma 3K20, Braun, Melsungen). Der Überstand wurde verworfen und die Pellets jeweils mit 2 mL sterilem Medium MM<sub>BRUN</sub> resuspendiert und zu einer Bakteriensuspension vereinigt. Durch zählen der Zellzahl am Mikroskop erfolgte gemäß Kapitel 3.4.1 die Bestimmung der Gesamtzellzahl und im Anschluß daran wurde mit der berechneten Menge ankonzentrierter Bakteriensuspension die Kultivierung mit einem Animpftiter von  $1 \cdot 10^8$  Zellen/mL gestartet.

#### 3.9.2 Phenanthrenabbau durch *S. yanoikuyae* in 10% Bodensuspension im Schüttelkolben

Diese Versuche wurden in 100 mL Vier-Schikane-Erlenmeyerkolben durchgeführt, in die je 18 mL steriles Medium mit 2 g Quarz oder Boden aus den Ozonierungen im Edelstahlreaktor vorgelegt wurden. So wurden Bodensuspensionen erzeugt, deren Phenanthrengehalte durch die Vorozonierung in unterschiedlichen Maßen reduziert waren. Durch Zugabe einer definierten Menge der aufbereiteten Vorkultur wurde in den Kolben eine Zellzahl von je  $1 \cdot 10^8$  Zellen/mL eingestellt. Alle Kolben wurden bei 120 rpm und 28°C im Rotationsschüttler (Certomat R/H, Braun, Melsungen) inkubiert.

Da die Probenahme aus den Kolben nicht reproduzierbar durchgeführt werden konnte, wurden nur die Anfangs- ( $t = 0$  h, 20 min nach Animpfung) und Endbedingungen ( $t = 22$  h)

analytisch erfasst. Dabei wurde je ein Kolben zur Phenanthrenanalytik (s. Kap.3.6.8.2) und der zweite zur Bestimmung der verbleibenden Messgrößen (s. Kap. 3.6) eingesetzt.

### **3.9.3 Phenanthren- und PAK-Abbau durch *S. yanoikuyae* und Mischkulturen in 10% Bodensuspension im Bioreaktor**

#### **3.9.3.1 Durchführung der Kultivierung**

Das eingesetzte BIOSTAT B Reaktorsystem (Fa. Braun, Melsungen) besteht aus einer Steuereinheit und einem Glasreaktor mit 2 L Arbeitsvolumen. Das Bioreaktorgefäß ist mit einem Rührwerk aus zwei übereinanderliegenden 6-blättrigen Scheibenrührern versehen. Die im Reaktor installierten Einbauten sind der Begasungsring, die pH-Elektrode, die pO<sub>2</sub>-Elektrode, ein Probenahmerohr und ein pT100-Temperaturfühler.

Der Zuluftstrom wurde über ein Mass-Flow-Meter (Fa. Bronkhorst) auf 120 l/h geregelt und nach Sterilfiltration in den Reaktor geleitet. Der Abluftstrom wurde über den im Reaktordeckel integrierten Rückflusskühler geleitet und gelangte von dort in die Abgasmessung. Nach Durchleitung durch einen weiteren Rückflusskühler wurde ein Teilstrom durch den CO<sub>2</sub>-Analysator FINOR und das O<sub>2</sub>-Messgerät Oxigor geleitet. Während der Vorbereitung einer Kultivierung wurde der Bioreaktor mit 200 mL zehnfach konzentriertem Medium MM<sub>Brun.</sub> und 20 mL Spurenelementelösung SL-4 befüllt. Unter Berücksichtigung des Volumens, des nach dem Autoklavieren noch zuzusetzenden Bodens wurde mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> soweit aufgefüllt, das sich letztendlich ein Volumen von 2 L ergab.

Der gesamte Reaktor inklusive Zuluftsystem wurde 30 min bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlung wurde das System mit der Steuereinheit verbunden, auf 28°C temperiert, der Rührer auf eine Drehzahl von 500 rpm eingestellt und eine Quarzsand- oder Bodenmenge von 200 g zugesetzt. Das Medium wurde während der Kultivierung mit 1 vvm begast, was einem Volumenstrom von 120 l/h entspricht. Vor dem Start der Kultivierung durch Zusatz einer entsprechend ankonzentrierten Vorkulturlösung von *S. yanoikuyae*-Bakterien im Falle der abzubauenen Phenanthrenkonzentrationen oder von Bakterien einer Mischkultur bei Versuchen mit dem real kontaminierten Boden, wurde eine Wartezeit von 1h eingehalten, um die Gleichgewichtseinstellung des Phenanthrens oder der PAK zu gewährleisten. Ein Anwachsen autochthoner Mikroorganismen innerhalb dieser Zeit konnte nicht beobachtet werden, da der Boden vorher immer getrocknet, gesiebt, gegebenenfalls mit Phenanthren versetzt, mechanisch gemischt und mit Ozon behandelt worden war.

### 3.9.3.2 Probenahme während der Kultivierungen im Biostat B

Bei den Kultivierungen mit Bodensuspension war die Durchführung einer reproduzierbaren Probenahme schwierig, da größere Bodenpartikel im nicht optimal gerührten Medium sofort absinken und bei der Entnahme nicht mehr mit erfasst werden und sich somit auch im Reaktor anreichern.

Während der Kultivierungen wurden die Proben zu festgelegten Zeitpunkten (s. Ergebnisteil) über das Probenahmerohr entnommen. Dazu wurde der Vorlauf des Mediums verworfen und anschließend zwei Proben genommen. Eine Probe mit ca. 20 mL wurde in einer Braunglasflasche (30 mL) aufgefangen, mit 400  $\mu$ L 3m HCL versetzt und gewogen. Anschließend wurde die Probe mit 1 mL einer internen Standardlösung (1 mg Anthracen/mL, bzw. 0,5 mg deuteriertes Naphthalin/ mL in Dichlormethan) versetzt. Die Proben dienen zur Bestimmung des Phenanthren- oder PAK-Gehaltes.

Eine weitere Probe wurde genommen, indem ein Volumen von ca. 30 mL in einem 30 mL Zentrifugenröhrchen aufgefangen wurde. Daraus wurden 2x 2 mL für den Dehydrogenasetest und 100  $\mu$ L für die Bestimmung der KBE durch Ausplattierung entnommen. Anschließend wurden 400  $\mu$ L 3m HCL zugesetzt und der Boden 10 min bei 12000 rpm und 0°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde für weitere Bestimmungen bei +4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

## 3.10 Toxizitätsuntersuchungen

### 3.10.1 Durchführung der exponentiellen Wachstumstests in Schüttelkolben

Dieser Test basiert auf der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Schadstoffen. Dabei wurde der zu untersuchende Mikroorganismus, auf einer nichttoxischen Kohlenstoffquelle (Glucose) wachsend, erst in der exponentiellen Wachstumsphase mit der zu testenden Substanz konfrontiert, wobei das Wachstum mit der Messung der optischen Dichte verfolgt wurde. Es sollte ein möglicher toxischer Einfluss von Ozonierungsprodukten des Phenanthrens auf das Wachstum verschiedener Bakterien untersucht werden.

Getestet wurden sowohl Quarzsand- bzw. Bodenextrakte, um das gesamte aus der Ozonierung hervorgegangene Schadstoffspektrum zu erfassen. Um die aus der Ozonierung hervorgegangenen Reaktionsprodukte zu erhalten, wurde mit Phenanthren kontaminierter Quarzsand gemäß Kap. 3.8.4 ozoniert. Anschließend wurden wässrige Extrakte durch Schütteln von 50 g Feststoff mit 100 mL Wasser über 24 h bei 150 rpm auf einem Reziproschüttler (Lab-Shaker, Fa. Adolph Kühn AG) hergestellt. Diese Extrakte wurden

über Faltenfilter filtriert und bei +4°C in Braunglasflaschen aufbewahrt. Die für den Versuch verwendeten sterilen 100 mL-Vier-Schikane-Erlenmeyerkolben wurden mit sterilem zehnfach konzentriertem Medium, steriler Glucoselösung (10 g/L) und sterilem Wasser beaufschlagt. Nach Zugabe unterschiedlicher Volumina der hergestellten Quarzsandextrakte konnten unterschiedliche Extraktkonzentrationen eingestellt werden. Beim Erreichen einer OD der Vorkultur zwischen 0,2-0,3 wurden je 10 mL Kultivierungsmedium zügig in die 100 mL Vier-Schikane-Erlenmeyerkolben überführt. Die Kolben wurden bei 28°C und 120 rpm im Schüttler (Certomat R/H, Braun, Melsungen) inkubiert. Es wurde über einen Zeitraum von 8 h stündlich und nach 24 h eine weitere Probe genommen. Gemessen wurden die optische Dichte am Spektralphotometer (Uvikon 922, Fa. Kontron Instruments, Neufahrn) und die Vitalität der Zellen an einem Durchfluscytometer (Epics XL, Fa. Coulter) (s. Kap. 3.4.7).

### **3.10.2 Test auf mikrobiologische Abbaubarkeit von Ozonierungsprodukten des Phenanthrens**

Die Abbaubarkeit von Ozonierungsprodukten des Phenanthrens wurde durch Schüttelkolbenversuche mit *Sphingomonas yanoikuyae* und einer Mischkultur untersucht, die auf den Abbau von PAK und deren Ozonierungsprodukten adaptiert wurde. Bei den Schüttelkolbenversuchen mit insgesamt 8 Einzelsubstanzen wurde in der gleichen Weise verfahren wie unter 3.10.1 beschrieben, wobei Konzentrationen von 100 mg/L dem glucosehaltigen Medium zugegeben wurden, um mögliche Wachstumshemmungen festzustellen. Parallel wurden die Einzelsubstanzen in Abwesenheit von Glucose als einzige Kohlenstoffquelle eingesetzt, um neben dem bakteriellen Wachstum auch die Abbaubarkeit der Substanzen zu untersuchen. Die Probenahmen und die Messung der optischen Dichte erfolgte wie in 3.10.1 beschrieben. Um die Abbaubarkeit zu dokumentieren, wurden zu Beginn des Abbaueversuchs, nach 0 h, 24 h, 48 h, 72 und 168 h je 1 mL Probe genommen und die dem Medium zugesetzten Einzelsubstanzen mittels Kapillarelektrophorese gemäß Kapitel 3.7.5 analysiert.

### **3.10.3 Test auf Hemmung der Lumineszenzaktivität von *Vibrio fischeri***

Der Mikroorganismus *Vibrio fischeri* ist ein Gram-negatives, fakultativ anaerobes, durch Geißeln bewegliches und halophiles Bakterium. Unter aeroben Bedingungen ist das Bakterium zur Biolumineszenz befähigt. Der Leuchtvorgang ist als aerober Oxidationsprozess anzusehen, als ein Nebenweg der Atmung, welcher nicht zur ATP-Regenerierung, sondern



zur Anregung einer Intermediärverbindung führt, die Licht aussendet. Bei Bakterien sind mehrere Komponenten am Leuchtvorgang beteiligt. Dazu zählen reduziertes Flavin-adeninmononukleotid FMNH<sub>2</sub>, Sauerstoff, ein langkettiger Aldehyd (Tetradecanal) und das Enzym Luciferase. Bei der Luciferase handelt es sich um eine Monooxygenase. Die Reaktion lässt sich folgendermaßen formulieren:



Der lichtemittierende Prozess wird durch einen Autoinduktor induziert. Bei starkem Zellwachstum und hoher Zelldichte nimmt die Konzentration des Autoinduktors zu und das entsprechende Lumineszenzgen wird aktiviert, was zur Expression von Luciferase führt. Durch toxische, inhibierende Substanzen kann die Aktivität der Luciferase stark beeinträchtigt werden, was eine Anwendung dieses Organismus in der Toxikologie ermöglicht [SCHLEGEL, 1992]. Der Einsatz von Lumineszenzbakterien in der Untersuchung von Wasser und Abwasser kann als Stand der Technik angesehen werden. Eine Übertragung auf wässrige Bodenextrakte erscheint daher als sinnvoll, da auf diese Weise die Substanzen erfasst werden, die durch Regen- oder Grundwasser ausgewaschen werden könnten. Die Lumineszenztests sind in Anlehnung an DIN 38412-34 durchgeführt worden.

Die Herstellung der wässrigen Bodenextrakte erfolgte durch eine 20-minütige Extraktion der während der Ozonierung in verschiedenen Zeitabständen genommenen Bodenproben mit Wasser im Verhältnis 1:2 im Ultraschallbad (Sonorex Super RK 510H, Fa. Bandelin, Berlin). Die Bodenpartikel wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 13200 rpm abgetrennt (Zentrifuge 5415C, Gerätebau Eppendorf GmbH, Engelsdorf) und die Überstände auf 20 g/L mit Natriumchlorid aufgesalzt, sowie auf einen pH-Wert von 7,0 gebracht.

Aus einer Gefrierkultur, die schonend über 2h bei -20°C und 2 h bei +4°C aufgetaut wurde, ist eine erste Vorkultur in Seewassermedium 24 h bei 20°C und 120 rpm in einem Inkubationsschüttler (Certomat HK und Certomat SII, Fa. Braun, Melsungen) inkubiert worden. Nach Überimpfen auf eine zweite Vorkultur und einem 20-24 h Wachstum konnte diese Vorkultur für die Experimente eingesetzt werden. Die Kultur wurde im Verhältnis 1:5 verdünnt, damit die relative Lumineszenzintensität der Vorkulturlösung in einem Bereich von 200 bis 300 relativen Einheiten des verwendeten Lumineszenzspektrometers (Typ LS-5B, Perkin-Elmer, Buckinghamshire, England) gemessen werden konnte.

Tab. 13 Geräteinstellungen des Lumineszenzspektrometers

Anregung	0
Emission	500 nm
Verstärkerspannung	960 V
Verzögerung (Delay time, $t_D$ )	0.2 ms
Messfenster (Gate time, $t_G$ )	13.20 ms
Integrationszeit	4 s

Für den Test wurden Küvetten mit 0,5 mL der Vorkulturlösung (1:5 Verdünnung) gefüllt und für 15 Minuten bei 15°C inkubiert (Certomat HK und Certomat SII, Fa. Braun, Melsungen). Die Lumineszenz  $I_0$  der Testküvetten wurde anschließend gemessen. Die Referenzküvetten wurden mit 0,5 mL Natriumchloridlösung (20 g/L, pH 7,0) aufgefüllt, während die Probeküvetten zu unterschiedlichen Anteilen (50, 25 und 5%) mit Bodenextrakt aufgefüllt worden sind. Daran hat sich eine weitere 30-minütige Inkubation der Referenz- und der Probeküvetten bei 15°C (Certomat HK und Certomat SII, Fa. Braun, Melsungen) angeschlossen, bevor die Lumineszenzintensität nach Ablauf der Inkubationszeit  $I_{T30}$  gemessen wurde. Zur Berechnung der Hemmung der Lumineszenzintensität musste ein Faktor  $f_{K30}$  aus dem Verhältnis der Lumineszenz der Referenz nach 30 Minuten  $I_{K30}$  und der Lumineszenz der Proben  $I_0$  bevor das Testgut hinzugegeben wurde berechnet werden.

$$f_{K30} = I_{K30}/I_0 \quad (3)$$

$f_{K30}$  : Korrekturfaktor für die 30-minütige Kontaktzeit

$I_{K30}$  : Lumineszenz der Referenz nach 30 Minuten

$I_0$  : Lumineszenz der Probeküvetten bevor das Testgut zugegeben wurde

Aus den einzelnen Faktoren wurde ein Mittelwert  $f_{K30m}$  berechnet. Dieser Korrekturfaktor berücksichtigte die mögliche Abnahme der Lumineszenzintensität während der 30-minütigen Testdauer, die ohne die Einwirkung des Testgutes auftreten könnte. Auf diese Weise war die theoretische Lumineszenzintensität in der Probe zu berechnen, wenn nach 30 Minuten Einwirkzeit keine Hemmung aufgetreten wäre.

$$I_{C30} = I_0 \cdot f_{K30m}. \quad (4)$$

$I_{C30}$  : theoretische Lumineszenz in der Probe wenn nach 30 Minuten keine Hemmung aufgetreten wäre

Die Hemmung der Lumineszenzintensität kann mit Hilfe der folgenden Gleichung berechnet werden.

$$H_{30} = (I_{C30} - I_{T30})/I_{C30} \cdot 100 \quad (5)$$

$H_{30}$  : Hemmung der Lumineszenz durch den Bodenextrakt nach 30 Minuten Kontaktzeit (%)

$I_{T30}$  : Lumineszenz der Probeküvette nach 30 Minuten Kontaktzeit

Der  $f_K$ -Wert sollte in einem Bereich von 0,6 und 1,3 liegen, um eine zu große Abnahme der Lumineszenz ohne Einwirkung des Testgutes auszuschließen.

### 3.10.4 Hemmung der Dehydrogenaseaktivität von *Bacillus subtilis* im Kontakttest

*Bacillus subtilis* zählt zu den aeroben Sporenbildnern und kann u.a. aus Heuaufgüssen isoliert werden, was zu seinem Namen geführt hat. Gebildete Sporen sind oval bis zylindrisch und nicht breiter als die Mutterzelle [SCHLEGEL, 1992]. Der für den Kontakttest zu verwendende Mikroorganismus sollte zum Einen empfindlich gegenüber exogenen Einflüssen sein, um die durch die Ozonierung hervorgerufenen Effekte aufzeigen zu können. Zum Anderen ist vor allem der Einfluss auf Bodenmikroorganismen von Interesse. Aus diesem Grund fiel die Wahl des Testorganismus auf den *Bacillus subtilis*, zumal dieser auch im Boden beheimatet ist. Ein Kontakttest sollte deshalb durchgeführt werden, um gegenüber den Testmethoden mit Bodeneluat auch die Einflüsse schwer wasserlöslicher Substanzen oder gebundener Rückstände zu beurteilen. Zur Funktion der Dehydrogenasen im Stoffwechsel s. auch Kap. 3.4.5. Eine Beeinträchtigung der Dehydrogenaseaktivität lässt Rückschlüsse auf die Störungen der Stoffwechselaktivität zu.

Bei der Durchführung des Tests wurden 1 g Bodenprobe zusammen mit 2,75 mL Wasser, 0,25 mL Imidazolösung (6,8 g/L, pH 6,3), 1 mL Resazurinlösung (200 mg/L) und 1 mL Zellsuspension aus einer Vorkultur von *Bacillus subtilis* in einem Reagenzglas suspendiert. Die Vorkultur wurde in Nährmedium bei 120 rpm und 30°C inkubiert und sollte zu Beginn des Tests eine Optische Dichte von 0,4 nicht übersteigen. Die parallel mitgeführten Blindansätze enthielten anstelle der Bakteriensuspension 1 mL Wasser und zusätzlich 1 mL einer Natriumtetraboratlösung (3,8 g/L, pH 11), um jegliche Aktivität zu unterbinden. Zusätzlich wurde für jede Probe eine mit m-Cresol vergiftete Kontrolle angesetzt, um die biologische Reduktion des Resazurins zu verhindern. Sämtliche Reagenzgläser wurden für 2 h bei 30°C und 5 rpm in einem Überkopfschüttler (Eigenbau des Institutes) inkubiert. Nach 2 h war die Verfärbung der Reaktionslösungen von Blau nach Rosa erfolgt und der Test wurde

beendet, indem jeweils 1 mL einer Natriumtetraboratlösung (3,8 g/L, pH 11) zugegeben wurde. Nach der Entnahme von 1 mL der Testsuspensionen und der Zentrifugation über 10 min bei 13200 rpm (Zentrifuge 5415C, Gerätebau Eppendorf GmbH, Engelsdorf), wurde der Überstand aller Ansätze in Halbmikroküvetten aus Kunststoff bei 615 nm im Spektralphotometer (Uvikon 922, Fa. Kontron Instruments, Neufahrn) vermessen.

Die Dehydrogenaseaktivität in [mg reduziertes Resazurin/L Bodensuspension \* h] wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Dehydrogenaseaktivität} = \left( \left( \frac{E_{\text{Blind}} - E_{\text{ges.}}}{\text{Vol.} * t} * R \right) - \left( \frac{E_{\text{Blind}} - E_{\text{chem.}}}{\text{Vol.} * t} * R \right) \right) * 1000 \quad (6)$$

$E_{\text{Blind}}$	=	Extinktion der Blindprobe bei 615 nm
$E_{\text{ges.}}$	=	Extinktion der Probe ohne <i>m</i> -Kresol bei 615 nm
$E_{\text{chem.}}$	=	Extinktion derselben Probe mit <i>m</i> -Kresol bei 615 nm
Vol.	=	Volumen in mL der zugefügten Bakterienvorkultur (=1)
t	=	Inkubationszeit in h (=2)
R	=	mg Resazurin in der Probe (= 0,2)

### 3.10.5 Wurzellängenwachstumstest mit *Lepidium sativum* L. (Gartenkresse)

Gartenkresse ist eine schnell wachsende, empfindliche Pflanze, die den Einfluss toxischer Substanzen im festen Bodenmaterial auf mögliche Kulturpflanzen deutlich machen soll. Im Hinblick auf die nach einer Sanierungsmaßnahme vorgesehene Nutzung des Bodens ist eine Beurteilung der Toxizität gegenüber Kulturpflanzen von herausragender Bedeutung.

Für den Test wurde eine Glaspetrischale mit ca. 15 g trockenem Boden bedeckt, der zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Bodenozonierung entnommen wurde. Nach dem gleichmäßigen Verteilen von 10 Kressesamen und dem Befeuchten mit 4 mL Wasser, wurden die Glaspetrischalen mit Deckeln versehen und an einem hellen Platz für 2 Tage aufbewahrt. Nach zwei Tagen wurden die Wurzellängen der einzelnen gewachsenen Pflanzen ausgemessen und miteinander verglichen. Aus den 10 gekeimten Pflanzen jeder einzelnen Petrischale wurden Mittelwerte berechnet.

### 3.10.6 Bestimmung der Bodenatmung

Für die Durchführung der Bestimmung der Bodenatmung ist der Wassergehalt des Bodens ein sehr wichtiger Parameter, da der Wassergehalt auf ca. 60 % der Wasserhaltekapazität des

verwendeten Bodens eingestellt sein muss. Um die Wasserhaltekapazität zu bestimmen, wurde ein an beiden Enden geöffneter Glaszylinder zu zwei Drittel mit getrocknetem Boden gefüllt und am unteren Ende mit einem Wattestopfen verschlossen. Der Zylinder wurde für 2 h in ein Wasserbad gestellt, dessen Höhe gerade die Bodenoberfläche erreicht, um eine Sättigung des Bodens mit Wasser zu erreichen. Anschließend wurde der Glaszylinder auf ein mit Filterpapier bedecktes, wassergesättigtes Sandbad gestellt. Wenn sich nach mehreren Stunden ein Gleichgewicht eingestellt hat und kein Wasser mehr aus dem Zylinder austrat, konnte die Wasserhaltekapazität durch Wägung und Bestimmung der Sättigung des Bodens mit Wasser ermittelt werden [KASSEM, 1994]. Die Wasserhaltekapazität wurde berechnet auf 100 g Trockenmasse des Bodens:

$$\mathbf{WHK = (A+B)/C \cdot 100} \quad (7)$$

A: Wasseraufnahme pro 100 g Trockenmasse naturfeuchter Boden

B: Wassergehalt in 100 g eingesetzten naturfeuchten Boden

C: Trockenmasse

Der Wassergehalt in Gewichtsprozent errechnet sich:

$$\mathbf{Gew \%(\text{H}_2\text{O}) = m_{\text{H}_2\text{O}} / (m_{\text{Trockenmasse}} + m_{\text{H}_2\text{O}})} \quad (8)$$

$m_{\text{H}_2\text{O}}$ : Masse des Wassers

$m_{\text{Trockenmasse}}$ : Trockenmasse des Bodens

Zur Bestimmung der Bodenatmung wurde ca. 100 g getrockneter Boden mit einer berechneten Menge Wasser angefeuchtet, die 60 % der Wasserhaltekapazität entsprach. Zuvor wurde diese Wassermenge mit 1 mL Mineralmedium (10x) aufgesalzt und einem Inokulum einer bakteriellen Mischkultur versetzt. Die Bakterienmischkultur wurde zuvor 48 h bei 26°C, 120 rpm inkubiert und am Mikroskop ausgezählt. Mit dem berechneten Inokulum wurde eine Dichte von  $2 \cdot 10^7$  Zellen/g TM Boden eingestellt, was ungefähr der Bakterienzahl der aeroben Bakterien in naturbelassenem Boden entspricht [SCHEFFER/SCHACHTSCHNABEL, 1979]. Die Proben wurden zur Messung der Basalatmung (ohne Zusatz von leicht verstoffwechselbaren Nährsubstraten) an das Institut für Siedlungswasserwirtschaft der Universität Hannover übergeben. Die Inkubation der Bodenproben erfolgte über 4 Tage bei 20°C in einem Sapromaten, bzw. in einem geschlossenen System der Fa. Aqualytik, Langen.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Einleitung**

Bevor mit den mikrobiologischen Abbauversuchen im Hauptteil begonnen werden konnte, mussten die Parameter im Rahmen der Voruntersuchungen durch geeignete Methoden bestimmt werden, die begleitend zu den mikrobiologischen Abbauversuchen Anwendung finden sollten. Dazu zählen im Rahmen der PAK-Analytik mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie sowohl die Etablierung einer Extraktionsmethode als auch die Ermittlung von Wiederfindungsraten bei der Extraktion von 10% Bodensuspension.

Für die Beurteilung des mikrobiellen Wachstums, bzw. die Bestimmung mikrobieller Aktivität in 10% Bodensuspension sollte die optimale Methode ermittelt werden. Dazu wurden die Zahl der Kolonie bildenden Einheiten KBE, die Proteinwerte mittels Biorad DC Protein Assay, die Fluoreszeindiacetathydrolyseaktivitäten und die Dehydrogenaseaktivitäten verglichen.

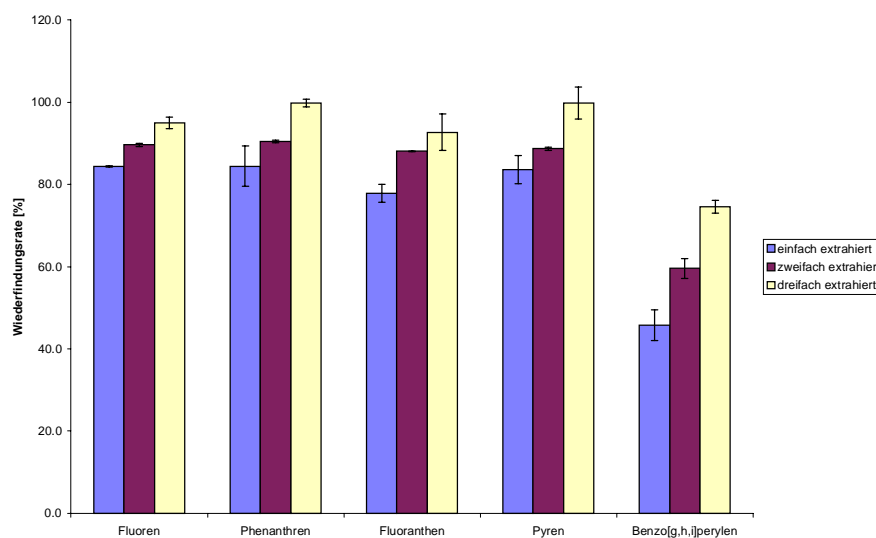
Im Hauptteil finden sich die Ergebnisse zur Bioverfügbarkeit am Modellsystem Phenanthren und zu den mikrobiologischen Abbauversuchen mit künstlichen und mit realen Kontaminationen. Desweiteren bildet die Analyse und Identifizierung von Ozonierungsprodukten des Modellschadstoffs Phenanthren einen weiteren Schwerpunkt der Arbeit. Es musste eine Derivatisierungsmethode erarbeitet werden, die es erlaubte, diese Substanzen bei gaschromatographischen Untersuchungen zu analysieren. Mittels Massenspektrometrie sollte so eine Identifizierung der Ozonierungsprodukte ermöglicht werden. Allgemeine Toxizitätsuntersuchungen und Ergebnisse über die mikrobiologische Abbaubarkeit dieser Substanzen schließen diese Arbeiten ab.

### **4.2 Voruntersuchungen**

#### **4.2.1 PAK-Analytik**

Für die Durchführung mikrobiologischer Abbauversuche musste eine Extraktionsmethode zur Bestimmung der PAK aus 10% Bodensuspension bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde die extrahierbare Menge an PAK ermittelt, indem anhand von 5 Modellschadstoffen die Wiederfindung aus 10% Bodensuspension bestimmt wurde. Dazu wurden jeweils 20 mL Bodensuspension angesetzt, indem deren Feststoffanteil zuvor mit einer

Dichlormethanstammlösung der 5 Modellschadstoffe kontaminiert und das Dichlormethan verdampft wurde. Anschließend wurde sofort mit 40 mL Dichlormethan extrahiert. Anhand von Abb. 6 lässt sich erkennen, dass eine dreimalige halbstündliche Extraktion die größte Ausbeute ergab. Eine Verlängerung der Extraktionsdauer und -häufigkeit führte zu keiner signifikanten Steigerung der Extraktionsausbeute. Bei Benzo[g,h,i]perylen, einem Vertreter 5-kerniger PAK fällt besonders stark auf, dass die zugegebene Menge an Substanz nicht mehr quantitativ extrahierbar war. Dieses Phänomen lässt sich mit einer möglichen Festlegung der PAK zu sog. „bound residues“ an Huminstoffen des Bodens oder Adsorptionseffekten an Bodenfeinkorn erklären. Interessant ist das sofortige Eintreten dieses Effekts, da zwischen Kontamination und Beginn der Extraktion nur wenig Zeit verstrichen war.

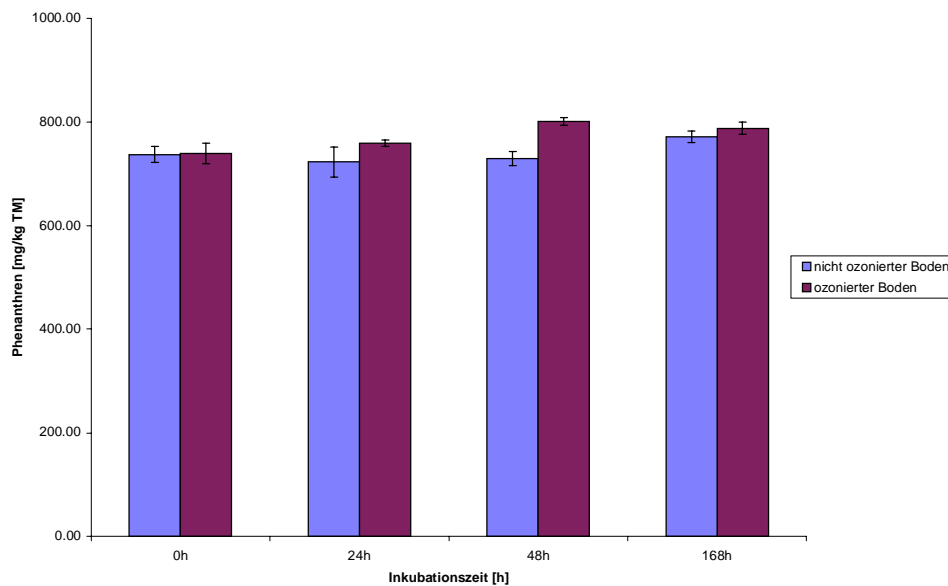


**Abb. 6** Extraktion von 5 PAK unterschiedlicher Größe durch 30-minütige Extraktion auf einem Vertikalschüttler bei 150 rpm mit Dichlormethan aus 20 mL 10% Bodensuspension (Lößboden Braunschweig) mit 40 mL Dichlormethan. Es wurde einfach, zweifach und dreifach extrahiert, wobei die Werte durch Doppelbestimmung ermittelt worden sind.

Bei allen weiteren Extraktionen wurde daher 3 mal mit einer Zeitdauer von 30 min und mit einem Lösungsmittelvolumen extrahiert, das dem doppelten Volumen der Bodensuspension entsprach. Bei künstlichen Kontaminationen ist demnach bei den 2-4-Ring PAK mit einer Wiederfindung von 92-99% zu rechnen, während bei Benzo[g,h,i]perylen, einem Vertreter der 5-Ring PAK nur noch 75% der Ausgangsmenge wiedergefunden wurden.

Darüber hinaus wurde die Festlegung von PAK an die Bodenmatrix untersucht, indem mit Phenanthren kontaminierter Boden unter den gleichen Bedingungen inkubiert wurde, wie unter den späteren Abbauversuchen. Dazu wurden 20 mL 10% Bodensuspension in 100 mL 4-Schikane-Erlenmeyerkolben bei 28°C und 120 rpm im Schüttelinkubator über einen Zeitraum von einer Woche inkubiert. Phenanthren wurde ausgewählt, da mit diesem

Modellschadstoff auch die meisten Abbauversuche durchgeführt worden sind. Abb. 7 gibt die Ergebnisse wieder.



**Abb. 7** Wiederfindung von Phenanthren während eines Festlegungsexperimentes in 10% Bodensuspension (Lößboden Braunschweig). Eingesetzt wurde sowohl getrockneter als auch zusätzlich ozonierter Boden. Die Ausgangskonzentration des Phenanthrens betrug 1000 mg/kg TM, Inkubationsbedingungen 28°C, 120 rpm. Alle Ansätze wurden mit m-Cresol vergiftet, um das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern. Alle Werte wurden durch Doppelbestimmung ermittelt.

Der getrocknete Lößboden wurde mit einer Phenanthrenstammlösung in Dichlormethan kontaminiert. Nach einer Wartezeit von 24 h zur Verdampfung des Lösungsmittels wurde der Boden wie bei den Abbauversuchen im Laborreaktor gründlich durchmischt und anschließend für das Ansetzen der Bodensuspension verwendet. In einem Parallelansatz wurde zusätzlich Lößboden verwendet, der vor der Kontamination mit Phenanthren mit Ozon behandelt worden ist, um Huminstoffe zu oxidieren. Dazu wurden 200 g getrockneter Boden 4 h mit Ozonkonzentrationen von  $25\text{g/m}^3$  (bei  $30\text{l/h}$ ) behandelt, bis keine signifikante Kohlendioxidentwicklung mehr zu beobachten war.

Zu Beginn wurden bis zu 26% der eingesetzten Phenanthrenmenge zu sog. „bound residues“ festgelegt und waren nicht mehr extrahierbar. Diese Menge änderte sich auch nur noch wenig im Laufe der 168 h und nahm zum Ende sogar wieder auf 22% ab, d.h. die extrahierbare Phenanthrenmenge nahm wieder etwas zu. Die Fähigkeit, Phenanthren an die Bodenmatrix festzulegen, fällt zudem bei dem ozonierten Boden bei allen Proben etwas geringer aus, als bei dem nicht ozonierten Boden. Ob die extrahierbare Menge an Phenanthren auch mit der bioverfügbaren Menge an Phenanthren gleichzusetzen ist, kann an dieser Stelle jedoch nicht beantwortet werden. Für die mikrobiologischen Abbauversuche bedeutet dieses Ergebnis,



dass bei künstlichen PAK-Kontaminationen mit Phenanthren 80-85% der ursprünglich eingesetzten Mengen durch die Extraktion von Bodensuspension mit Dichlormethan extrahierbar sind.

Die Extraktionsmethode sollte auch auf Bodensuspensionen mit real kontaminierten Böden übertragen werden. Dabei zeigte sich im Vergleich zu Untersuchungen über verschiedene Extraktionsmethoden, dass die Soxhletextraktion festen Bodenmaterials mit Toluol die beste Methode war, PAK zu extrahieren [MÜLLER, 2000]. Verglichen mit der Soxhletextraktion, zeigte die Extraktion flüssiger Bodensuspensionsproben mit Dichlormethan bezogen auf den Feststoffanteil eine gleich gute oder sogar bessere Extraktionsleistung bei den 2- und 3-Ring PAK, jedoch eine um bis zu 50% schlechtere Extraktionsleistung bei den PAK mit 4 oder mehr aromatischen Ringen. Aus Gründen der Vergleichbarkeit zu den Phenanthrenextraktionen aus künstlich kontaminierter Bodensuspension wurde diese Extraktionsmethode auch für Bodensuspensionen real kontaminierter Böden verwendet.

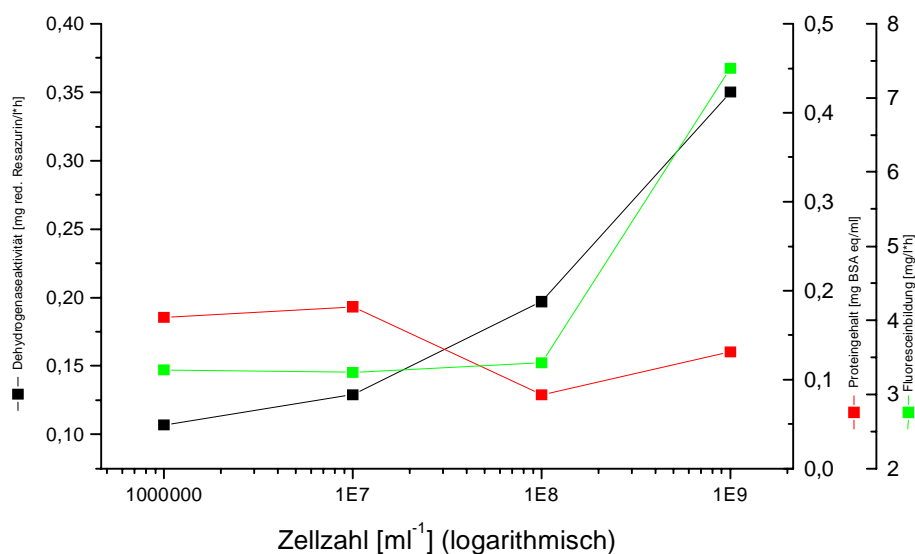
#### **4.2.2 Vergleich der Bestimmungsmethoden mikrobieller Aktivität**

Eine Methode zur Bestimmung der mikrobiologischen Aktivität und des Wachstums der Mikroorganismen während des mikrobiologischen Schadstoffabbaus musste etabliert werden. So liefert die Bestimmung der Kolonie bildenden Einheiten zwar ein genaues Ergebnis über die Anzahl der lebensfähigen Keime, wobei diese Methode jedoch sehr vorbereitungs-, arbeits- und materialintensiv ist. Zudem ist unter Umständen bei einer Beeinflussung der Stoffwechselaktivität von Bakterien durch inhibierende Substanzen nicht unbedingt mit einer Abnahme der Lebendkeimzahl zu rechnen. Es ist daher eine Methode nötig, die nicht nur Aufschluss über die Vitalität sondern auch über die Stoffwechseltätigkeit gibt. Zusätzlich ist bei den Toxizitätstests die Durchführung eines Kontakttests in Bodensuspension geplant, der bei Verwendung einer Methode zur Bestimmung mikrobiologischer Stoffwechselaktivität innerhalb weniger Stunden schnelle Ergebnisse liefern kann. Die Ermittlung der Gesamtzellzahl lebensfähiger Keime, die mindestens 2 Tage in Anspruch nimmt, ist dazu nicht sehr gut geeignet. Es sollten drei verschiedene Methoden auf ihre Eignung zur Anwendung bei Bodensuspensionen miteinander verglichen werden. Dazu gehörten ein Proteintest, die enzymatische Hydrolyse von Fluoresceindiacetat und ein Dehydrogenasetest. Der verwendete Bio-Rad Protein Assay<sup>®</sup> basiert auf zwei Reaktionen: Im ersten Schritt reagieren Proteinbestandteile, vorwiegend Tyrosin und Tryptophan, daneben aber auch Cystein, Cystin und Histidin, mit dem Kupfer(II) in einem alkalischen Medium zu Kupfer(I).

In der Folge wird das Folinreagenz durch das Kupfer(I) reduziert, wodurch Verbindungen mit charakteristischer blauer Farbe gebildet werden [BIO-RAD LAB. 1994] (s. 3.4.3).

Die enzymatische Hydrolyse des farblosen Fluoresceindiacetats durch Bodenmikroorganismen führt zu einer Freisetzung des intensiv gelb gefärbten Fluoresceins. Auch in sehr kleinen Konzentrationen ist eine Gelbfärbung leicht photometrisch zu messen [ALEF, 1991]. Dieses Prinzip kann ebenfalls als Test auf eine mikrobiologische Aktivität genutzt werden, wobei die Zunahme der Gelbfärbung Aufschluss über die mikrobiologische Aktivität gibt (s. 3.4.4).

Bei der Dehydrogenaseaktivität macht man sich die enzymatische Entfärbung des intensiv blauen Resazurins durch das Enzym Dehydrogenase zunutze. Es entstehen das rosa gefärbte Resorufin und das farblose Hydroresorufin. Die Aktivität wird durch den Grad der Entfärbung photometrisch gemessen (s. Kap. 3.4.5). Der Vergleich der drei Methoden ist in Abb. 7 dargestellt.



**Abb. 8** Darstellung der Dehydrogenaseaktivität, der Fluoresceindiacetathydrolyse und der Proteinwerte von 10% Bodensuspension, die mit Inokula von *S. yanoikuyae* mit Zellzahlen von 10<sup>6</sup> bis 10<sup>9</sup> pro mL angeimpft wurden. Inkubationsbedingungen nach dem Animpfen der Bodensuspension bis zur Probenahme: 28°C, 120 rpm, 20 min. Der Blindwert von Bodensuspension ohne Inokulum ist bei allen drei Methoden nicht mit dargestellt. Alle Werte wurden in Dreifachbestimmung bestimmt.

Der untersuchte Zellzahlbereich von 10<sup>6</sup> bis 10<sup>9</sup> pro mL<sup>-1</sup> wurde gewählt, weil dies auch der bei den Abbaubersuchen zu erwartende Zellzahlbereich sein wird. Für alle Testmethoden war ein weiteres Verringern der Zellzahl nicht sinnvoll, da die Empfindlichkeit der Testmethoden nicht hoch genug ist und die Störungen durch die Huminstoffe zu groß werden. In der Regel

entsprechen die Werte bei einer Zellzahl von  $10^6 \text{ mL}^{-1}$  den Blindwerten von Bodensuspensionen ohne Inokulum.

Der Proteintest ist für die Bestimmung des Proteingehaltes in Bodensuspensionen nicht geeignet. Es kam zu deutlichen Störungen durch Bodeninhaltsstoffe mit einer großen Schwankungsbreite, so dass die durch die Mikroorganismen verursachten Änderungen des Proteinwertes nicht mehr zu unterscheiden waren.

Die Hydrolyse von Fluoresceindiaceat ist offensichtlich nicht empfindlich genug. Bis zu einer Zellzahl von  $10^8 \text{ mL}^{-1}$  entsprach die festgestellte Aktivität dem Blindwert von Bodensuspension ohne Inokulum. Eine Steigerung des Wertes war erst bei einer Zunahme der Zellzahl von  $10^8$  auf  $10^9 \text{ mL}^{-1}$  zu beobachten.

Die Dehydrogenaseaktivität war am besten geeignet, die mikrobiologische Aktivität zu bestimmen. Unterhalb von Zellzahlen von  $10^6 \text{ mL}^{-1}$  war auch die Dehydrogenaseaktivität so gering, dass eine sinnvolle Messung nicht möglich gewesen ist, da die Werte dem Blindwert der Bodensuspension ohne Inokulum entsprachen. Im Bereich der Zellzahlen von  $10^6$  bis  $10^9$  pro  $\text{mL}^{-1}$  war ein kontinuierlicher Anstieg der Werte zu beobachten. Das ist auch der für die Abbauprobversuche und Toxizitätsuntersuchungen interessante Bereich. Die Dehydrogenaseaktivität verhält sich proportional zur Zellzahl. In den folgenden Arbeiten wird die Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität bei den Abbauprobversuchen mit *S. yanoikuyae* und der Mischkultur und bei dem Kontakttest mit *B. subtilis* zur Bestimmung der Toxizität zur Anwendung kommen.

#### 4.2.3 Analytik von Ozonierungsprodukten des Phenanthrens

Die Analyse der Ozonierungsprodukte der PAK beschränkte sich auf den Modellschadstoff Phenanthren, da mit diesem Modellschadstoff der Großteil der Arbeiten durchgeführt wurde. Die Analyse weiterer Oxidationsprodukte, entstanden aus der Ozonierung anderer PAK in realen Kontaminationen, hätte aufgrund der Komplexität des entstandenen Schadstoffgemisches wenig Aussicht auf Erfolg. Die analytischen Untersuchungen der Ozonierungsprodukte von Phenanthren gestalteten sich als sehr schwierig. Wie anhand von Modellschadstoffen bei Extraktionsversuchen aus Boden festgestellt wurde, sind die Wiederfindungsraten von Keto-, oder Carboxyverbindungen aus huminstoffreicher Matrix sehr schlecht. Vermutlich können die durch Ozonolyse funktionalisierten aromatischen Verbindungen starke Wechselwirkungen oder chemische Bindungen mit den Huminstoffen eingehen. Daher wurden bei allen weiteren Untersuchungen mit Phenanthren kontaminierte und ozonierte Quarzsandproben verwendet, um vorerst sämtliche Wechselwirkungen mit der

Huminstoffmatrix auszuschließen. Dazu wurden aus den ozonierten Quarzsandproben Methanolextrakte hergestellt und für die weiteren analytischen Arbeiten verwendet.

#### 4.2.3.1 Dünnschichtchromatographie und Säulenchromatographie

Da bei der Ozonierung von Phenanthren, bzw. auch anderen PAK mit einer Vielzahl von Verbindungen gerechnet werden musste, sollten durch Versuche mit Dünnschichtchromatographie Hinweise auf die Anzahl der entstandenen Verbindungen sowie ihrer funktionellen Gruppen ermittelt werden. Für die Analyse auf funktionelle Gruppen wurden kleine Dünnschichtfolien 7,5 x 5 cm mit Silicagel- oder RP<sub>18</sub>-Phasen verwendet, da hier mit einem höheren Verbrauch an DC-Folien gerechnet werden musste. Die kleinen DC-Folien sind kostengünstig und lassen sich einfach und schnell entwickeln. Parallel dazu wurden auch Versuche mit 2D-Dünnschichtchromatographie auf 20 x 20 cm Silicagelfolien durchgeführt, da durch die längere Laufstrecke und die Verwendung von 2 verschiedenen Laufmitteln eine bessere Auftrennung der Stoffgemische möglich war. Nach einem ersten Lauf wurden die Platten um 90° gedreht und mit einem zweiten Laufmittel erneut entwickelt. Die Gesamtzeit für die Entwicklung der DC-Folien betrug hier bis zu 4 h. Um die Anzahl möglicher entstandener Substanzen zu begrenzen, wurden 100 g Quarzsand nur mit 500 mg des Modellschadstoffs Phenanthren kontaminiert und ozoniert (25 g O<sub>3</sub>/m<sup>3</sup>, 30 l/h, 8 h). Aus dem Reaktionsrückstand wurden Methanolextrakte hergestellt und für die Dünnschichtchromatographie verwendet. Durch Dünnschichtchromatographie auf 7,5 x 5 cm Silicagelfolien konnten insgesamt 11 verschiedene Spots auf der entwickelten DC-Folie unter UV-Licht erkannt werden. Durch Vergleich mit Referenzsubstanzen konnten jedoch keine dieser Spots identifiziert werden. Jedoch wurden folgende funktionelle Gruppen ermittelt:

Tab. 14 R<sub>F</sub>-Werte und funktionelle Gruppen von Ozonierungsprodukten

R <sub>F</sub> -Werte	Funktionelle Gruppe	Reagenz	Laufmittel
0,02	Säure	BKB	EMK:A:H (5:8:87)
0,05	Chinon	NaOH	EMK:A:H (5:8:87)
0,09	Aldehyd, Keton	DNPH	EMK:A:H (5:8:87)
0,14	Säure	BKB	EMK:A:H (5:8:87)
0,3	Chinon	NaOH	EMK:A:H (5:8:87)

EMK: Ethylmethylketon; A: Aceton; H: Hexan

BKB: Bromkresolblau; DNPH: Dinitrophenylhydrazin; NaOH: Natronlauge

DC-Folien: Silicagel 60 F<sub>254</sub>

Da sich auf der Laufstrecke trotz der relativ guten Auftrennung noch Substanzen überlagern konnten, wurde eine 2D-Dünnschichtchromatographie mit 20 x 20 cm Silicagel 60 F<sub>254</sub> Folien durchgeführt. Die Zahl der insgesamt unter UV-Licht erkannten Substanzspots erhöhte sich auf 16 und es kann davon ausgegangen werden, dass gerade die hochpolaren Substanzen auf Silicagelphasen nicht sehr mobil sind. Diese Substanzen verblieben auf der Grundlinie und wurden hier noch nicht erfasst.

Tab. 15 R<sub>F</sub>-Werte nach 2D-Dünnschichtchromatographie

Spotnr.	1	2	3	4	5	6	7	8
R <sub>F</sub> -Wert (1)	0,01	0,06	0,02	0,03	0,05	0,13	0,08	0,18
R <sub>F</sub> -Wert (2)	0,10	0,09	0,16	0,19	0,33	0,62	0,69	0,78
Spotnr.	9	10	11	12	13	14	15	16
R <sub>F</sub> -Wert (1)	0,25	0,34	0,41	0,49	0,72	0,81	0,89	0,93
R <sub>F</sub> -Wert (2)	0,83	0,80	0,83	0,85	0,86	0,89	0,93	0,93

(1): Laufmittelsystem 1 EMK:A:H (5:8:87)

(2): Laufmittelsystem 2 EMK:A:T (10:10:80)

EMK: Ethylmethylketon; A: Aceton; H: Hexan; T: Toluol

Die folgende Abbildung verdeutlicht die erzielten Auftrennungsergebnisse:

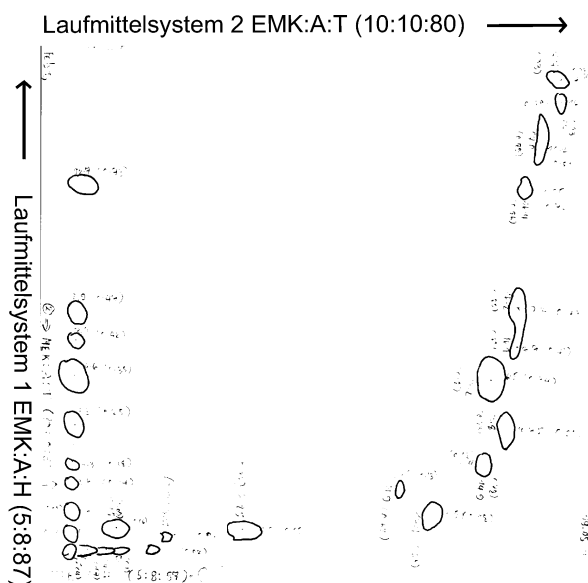


Abb. 9 DC-Folie der 2D-Dünnschichtchromatographie auf 20x20 cm Silicagel 60 F<sub>254</sub>-Folie

Die auf den DC-Folien mögliche Auftrennung sollte auch zur Auftrennung des Substanzgemisches durch Säulenchromatographie genutzt werden, wobei die gleichen Laufmittelsysteme verwendet worden sind wie bei der 2D-Dünnschichtchromatographie. Eine Kolonne wurde zu diesem Zweck mit 150 g Silicagel beladen. Es wurden je 1,5 l von Laufmittel 1 und Laufmittel 2 als mobile Phase verwendet. Obwohl mit Teilfraktionen der

ersten Säulenchromatographie eine weitere Säulenchromatographie durchgeführt wurde, erwies sich die Zusammensetzung von Teilfraktionen immer noch als zu komplex. Eine Isolierung von Reinsubstanzen für NMR-Spektroskopische Untersuchungen gelang aufgrund der Überlagerung mehrerer Substanzen nicht. Die Identifikation einzelner Substanzen gelang nur mit Hilfe gaschromatischer Untersuchungen und der Detektion durch Massenspektrometrie.

#### 4.2.3.2 Derivatisierung und Analyse durch GC-MS

Die aus den ozonierten Quarzsandproben hergestellten Methanolextrakte wurden entweder direkt am GC-MS vermessen oder vorher einer Derivatisierung zugeführt. Desweiteren waren Teilfraktionen aus der Säulenchromatographie Gegenstand der Untersuchungen.

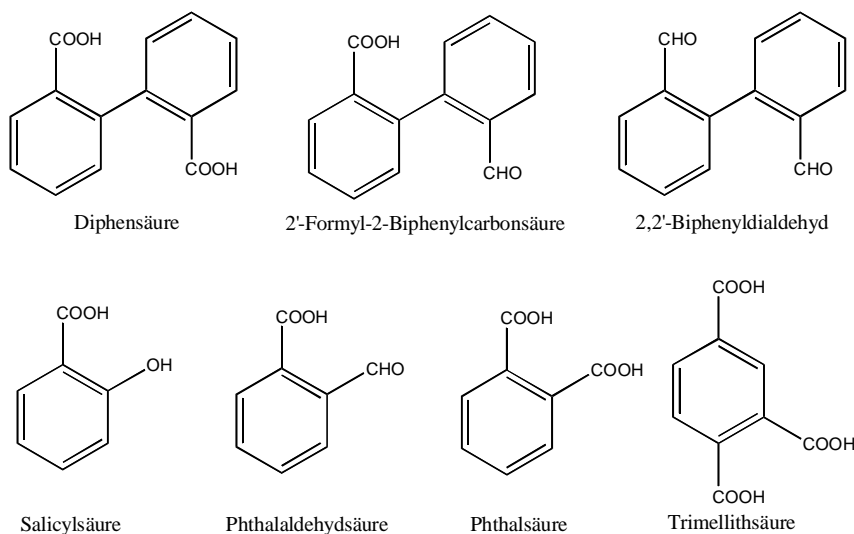
Um Hydroxyl- oder Carboxylgruppen tragende Verbindungen besser GC-gängig zu machen, sollten diese Gruppen als Methylester oder Trimethylsilylether geschützt werden. Als Methylierungsreagenzien wurden Dimethylformamid-Dimethylacetal (DMF-DMA) und Methyljodid (MeI) + Tetramethylammoniumhydroxid (TMAH) getestet. Mit Diazomethan wurde mangels entsprechender Ausrüstung und Sicherheitsvorkehrungen und der nicht unerheblichen Kanzerogenität nicht gearbeitet. Das Reagenz DMF-DMA führte bei Vorversuchen mit polyfunktionellen Verbindungen zu Mehrfachpeaks im GC-Chromatogramm, da nicht nur Carboxyl- und Hydroxylgruppen methyliert wurden, sondern auch noch die Methylierung von Carbonylfunktionen zu Halbacetalen beobachtet wurde. Das Auftreten von Mehrfachpeaks erschwerte allerdings die Zuordnung und Identifizierung einer Substanz. Methyljodid und TMAH stellen ein sehr gutes Methylierungsreagenz dar, jedoch war in der Probe über einen langen Zeitraum ein Ausfall von Niederschlag zu beobachten. Die Triebkraft der Methylierung ist die Bildung von Tetramethylammoniumiodidniederschlägen. Für die Messung am GC war diese Methode daher auch ungeeignet. Desweiteren wurden N,O-Bis(trimethylsilyl)-acetamid (BSA) und N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoracetamid (MSTFA) für die Silylierung von Hydroxyl- und Carboxylgruppen getestet. BSA erwies sich als ein zu schwaches Silylierungsreagenz. Mit MSTFA konnten dagegen alle Alkohole oder Carbonsäuren erfolgreich silyliert werden. MSTFA wurde daher für die weiteren Versuche verwendet. In der folgenden Tabelle sind alle im Rahmen der analytischen Untersuchungen getesteten Substanzen aufgelistet. Dazu zählen sowohl die Substanzen, die anhand der Säulenchromatographie isoliert und identifiziert werden konnten, als auch Substanzen, die direkt aus ozoniertem Quarzsand extrahiert und nachgewiesen worden sind.

Tab. 16 Liste der verwendeten und identifizierten Referenzsubstanzen

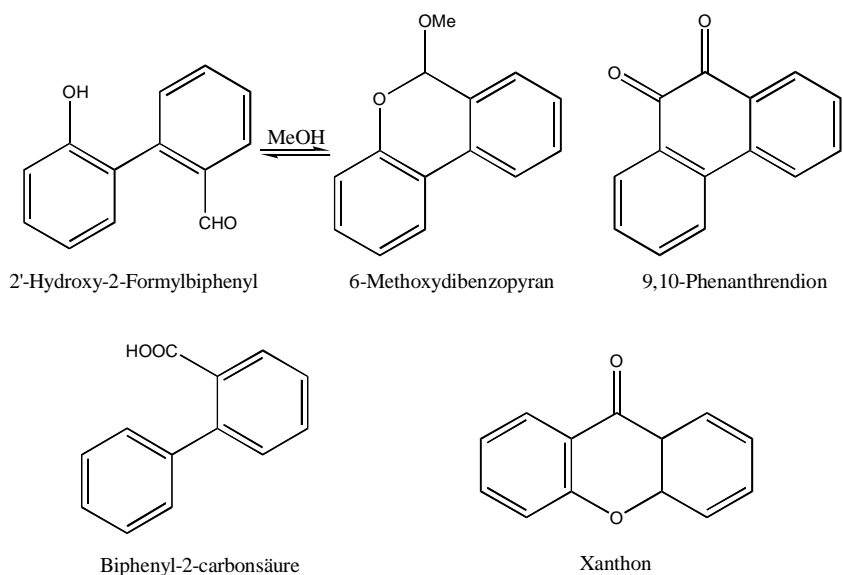
Substanzname	Nachweis über Retentionszeit	Nachweis über Massenspektrum
Ameisensäure		
Oxalsäure		
Phenylelessigsäure		
Diphenylelessigsäure		
o-Phthalaldehydsäure	X	X
m-Phthalaldehydsäure		
p-Phthalaldehydsäure		
Salicylsäure	X	X
Phthalsäure	X	X
Terephthalsäure		
Diphensäure	X	X
Trimellitssäure	X	X
Pyromellitssäure		
1,3,5-Benzoltricarbonsäure		
Xanthen		
Xanthon	(X)	(X)
9,10-Phenanthrendion	(X)	(X)
Biphenyl-2-Carbonsäure		(X)
4,4'-Dihydroxybiphenyl		
2,2'-Biphenyldialdehyd	X	X
2'-Formyl-2-Biphenylcarbonsäure	X	X
2'-Hydroxy-2-Formylbiphenyl		(X)
1,4-Naphthochinon		

Durch Vergleich mit den Massenspektren und den Retentionszeiten der Referenzsubstanzen konnten bisher 7 Substanzen sicher nachgewiesen werden. Desweiteren wurden anhand der erhaltenen Massenspektren 4 weitere Substanzen vermutet. Dabei handelte es sich um Xanthon, 9,10-Phenanthrendion, 2'-Hydroxy-2-Formylbiphenyl und Biphenyl-2-Carbonsäure. Im Anhang sind die Massenspektren der hier aufgelisteten Substanzen aufgeführt. Die Abb. 10 gibt eine Übersicht über die Strukturformeln der identifizierten und vermuteten Reaktionsprodukte.

Identifizierte Oxidationsprodukte des Phenanthrens:



Weitere vermutete Oxidationsprodukte des Phenanthrens:



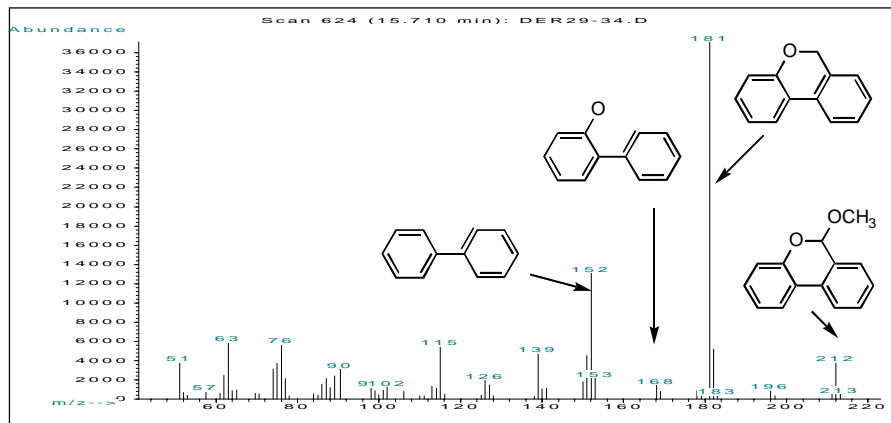
**Abb. 10** Identifizierte und vermutete Oxidationsprodukte aus der Ozonolyse des Phenanthrens

Die Substanzen Biphenyldialdehyd, 2'-Formyl-2-Biphenylcarbonsäure, Diphenylsäure, Salicylsäure, Phthalaldehydsäure, Phthalsäure und Trimellithsäure werden nicht genauer diskutiert, da eine sichere Identifizierung durch Referenzsubstanzen möglich war.

Die Massenspektren der Referenzsubstanzen und der 7 sicher identifizierten Substanzen befinden sich im Anhang.

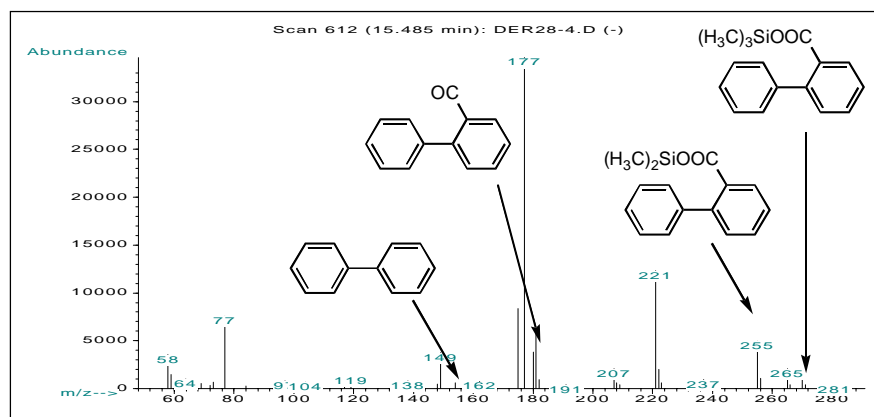
Die 4 nur vermuteten Ozonierungsprodukte des Phenanthrens bedürfen im Folgenden jedoch weiterer Erläuterung und Diskussion.





**Abb. 11** Vermutliches Massenspektrum von 2'-Hydroxy-2-Formylbiphenyl als cyclisches Acetal 6-Methoxydibenzopyran als mögliches Oxidationsprodukt des Phenanthrens

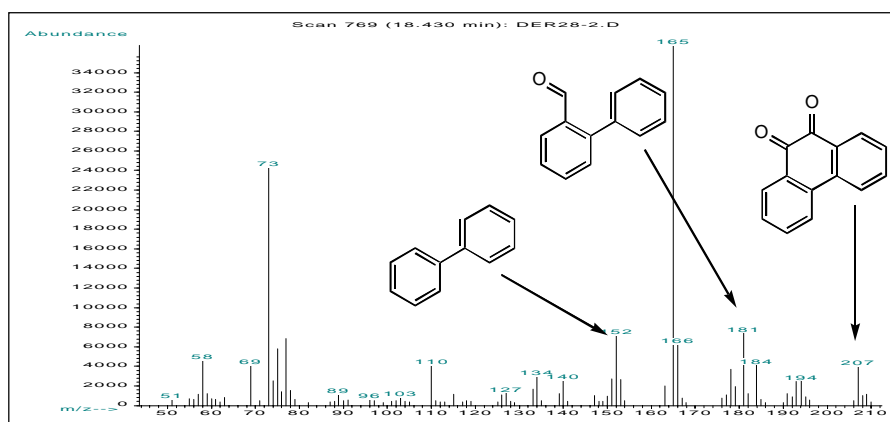
Das Massenspektrum wurde aus einer mit Methanol extrahierten und ohne Derivatisierung gemessenen Probe aufgenommen. Das Massenspektrum von 2'-Hydroxy-2-Formylbiphenyl weist darauf hin, dass die Substanz in Methanol in Form eines cyclischen Acetals (6-Methoxy-dibenzopyran) vorzuliegen scheint. Einige charakteristische Molekülonen zeigen den Molekülzerfall im Massenspektrometer. Die offene Form des Moleküls, die eine Hydroxylgruppe trägt müsste mit MSTFA derivatisierbar sein, indem diese funktionelle Gruppe mit einer Trimethylsilylgruppe geschützt wird. Die Massenspektren derivatisierter Proben ergaben darauf keine eindeutigen Hinweise, weshalb die Substanz als tatsächliches Oxidationsprodukt des Phenanthrens in Frage zu stellen ist.



**Abb. 12** Vermutliches Massenspektrum von Biphenyl-2-Carbonsäure (MSTFA-Derivat) als mögliches Oxidationsprodukt des Phenanthrens

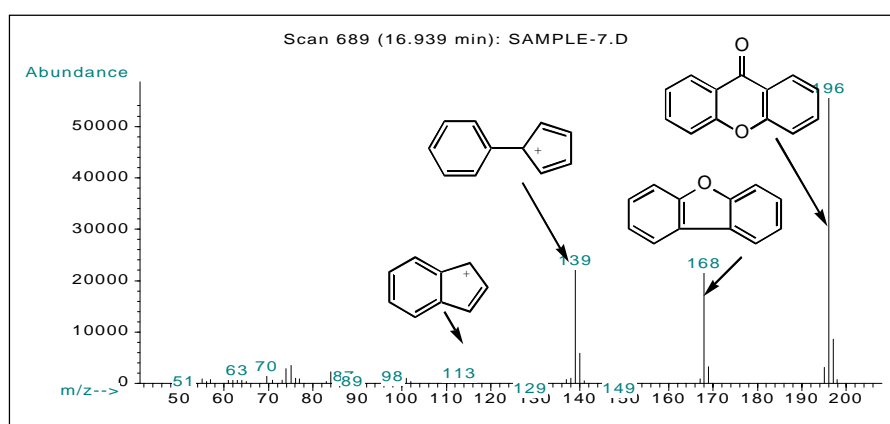
Biphenyl-2-Carbonsäure konnte trotz Übereinstimmung der Retentionszeiten zwischen Referenz und Probe nicht sicher nachgewiesen werden, da es zu einer Überlagerung mit dem Phenanthrenpeak im Chromatogramm gekommen ist. Phenanthren verursacht einen

Massenpeak bei  $m/z$  177 mit großer Intensität. Es treten jedoch auch die Moleküllionen der Biphenyl-2-Carbonsäure mit geringer Intensität auf.



**Abb. 13** Vermutliches Massenspektrum von 9,10-Phenanthrendion als mögliches Oxidationsprodukt des Phenanthrens

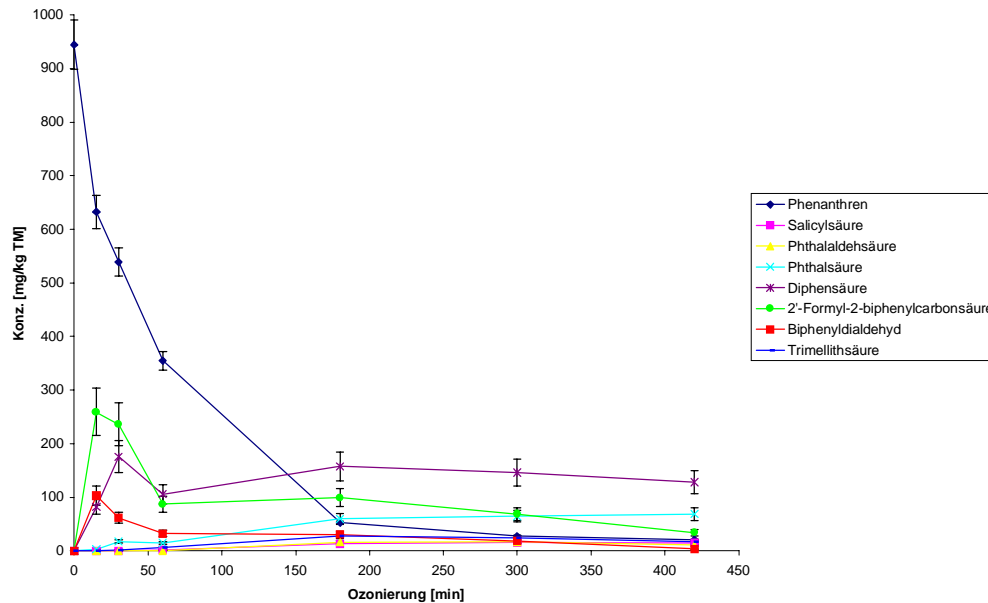
Vergleicht man das Massenspektrum der Probe mit dem Referenzspektrum von 9,10-Phenanthrendion (s. Anhang), dann fallen hier die zusätzlichen Massenpeaks bei  $m/z$  194 und 166 auf, die nicht der Substanz zugeordnet werden können. Problematisch sind zudem die Zuordnung der Massen  $m/z$  207, 181 und 152, da sich aus dem Phenanthrenmolekül durch Oxidation sehr viele mögliche aromatische Strukturen ergeben können, die in diese Moleküllionen zerfallen können. Aus diesem Grund ist das Massenspektrum allein nicht aussagekräftig genug. Jedoch stimmen die Retentionszeiten von Substanz und Referenz überein, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich tatsächlich um 9,10-Phenanthrendion handelt.



**Abb. 14** Vermutliches Massenspektrum von Xanthon als mögliches Oxidationsprodukt des Phenanthrens

Die Identifizierung des Oxidationsproduktes als Xanthon ist mit sehr großer Unsicherheit behaftet. Die Zerfallsmuster von Referenz und Probe stimmen im Vergleich sehr gut überein, allerdings gibt es einen Unterschied zwischen den Retentionszeiten (s. Anhang). Betrachtet man die Retention der reinen Einzelsubstanz im Standard und das Verhalten in der komplexen Substanzmischung der Probe, so wäre eine mögliche Erklärung ein unterschiedliches Retentionsverhalten der Substanz auf der Säule des Gaschromatographen in Reinform, bzw. in Substanzmischungen. Diese Erklärung erscheint jedoch nicht als sehr plausibel. Es sind auch noch andere Strukturisomere der gleichen Masse und Zusammensetzung denkbar, die möglicherweise ein gleiches oder ähnliches Zerfallsmuster aufweisen, so dass Xanthon als mögliches Reaktionsprodukt der Ozonolyse des Phenanthrens in Frage zu stellen ist. Desweiteren ist auch der Reaktionsweg unklar, durch den es in der Folge der Ozonolyse zu einem Kohlenstoffverlust und zu einem anschließenden Ringschluß zu dem Heterozyklus des Xanthons kommen könnte.

Im folgenden ist das Auftreten der 7 identifizierten Reaktionsprodukte des Phenanthrens im Verlauf einer Ozonierung auf Quarzsand dargestellt. In einem Laborreaktor wurden 200 g mit Phenanthren (1 g/kg TM) kontaminierter Quarzsand über einen Zeitraum von 7 h mit Ozon behandelt (25 g O<sub>3</sub>/m<sup>3</sup>, 30 l/h). Durch MÜLLER [Dissertation, 2000] wurden ähnliche Verläufe bei der Ozonierung auf verschiedenen Böden und der Analytik von 4 Hauptkomponenten des Phenanthrenabbaus durch HPLC erhalten. Je nach Bodeneigenschaften verschieben sich die Anteile der unterschiedlichen Reaktionsprodukte etwas. Es lassen sich jedoch immer die gleichen Ozonierungsprodukte nachweisen und die Ergebnisse sind gut mit der Ozonierung auf Quarzsand vergleichbar.



**Abb. 15** Konzentrationsverlauf der unterschiedlichen Reaktionsprodukte bei der Ozonierung von Phenanthren auf Quarzsand. Alle Werte wurden in Doppelbestimmung ermittelt.

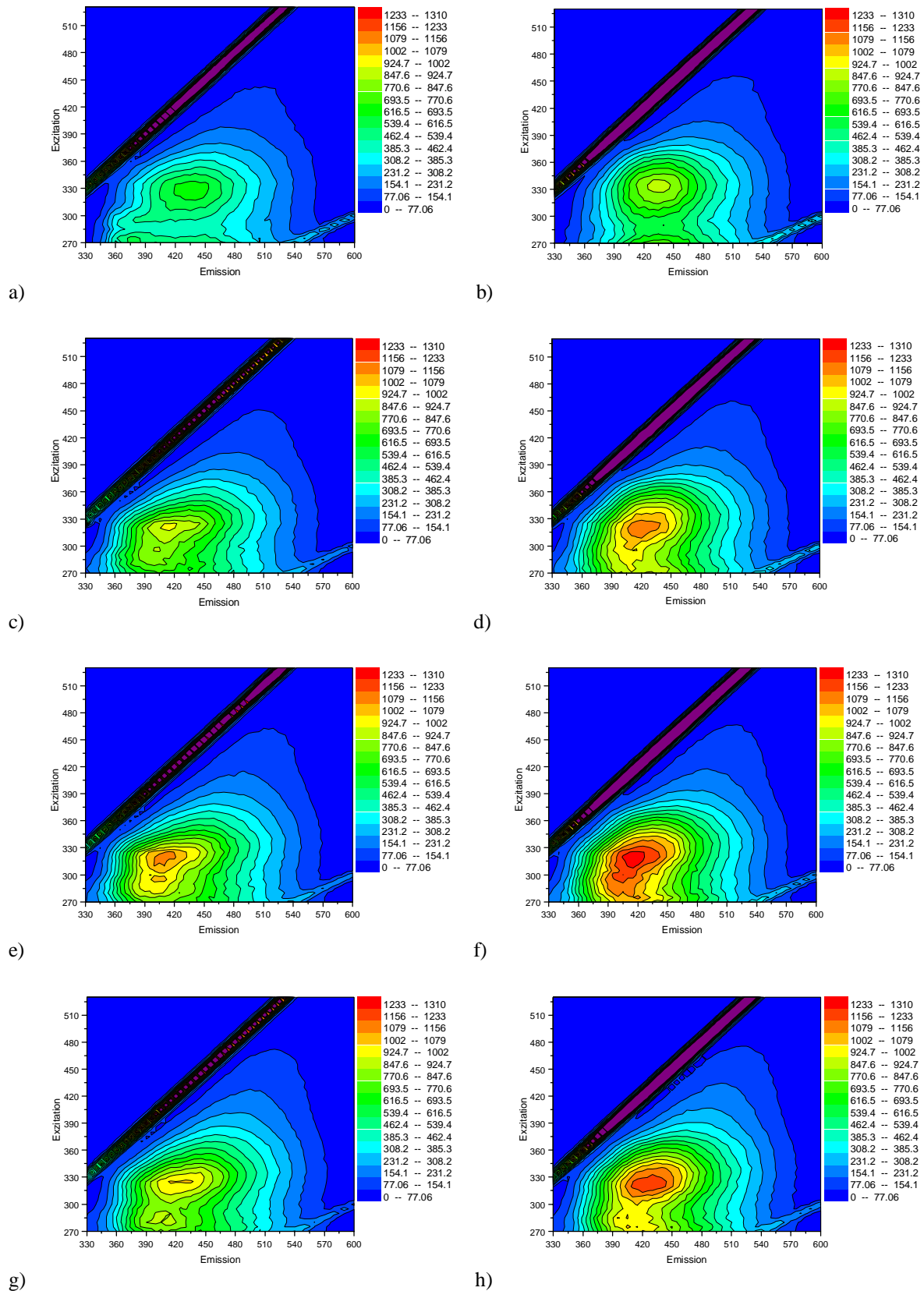
Die Abb. 15 lässt den Reaktionsverlauf des Phenanthrens mit Ozon deutlich erkennen. Der erste Reaktionsschritt führte zu einer Ringöffnung des Phenanthrenrings. Bereits innerhalb von 15-30 Minuten wurden mit der Bildung von 2,2'-Biphenyldialdehyd (103 mg/kg TM), 2'-Formyl-2-Biphenylcarbonsäure (259 mg/kg TM) und 2,2'-Biphenyldicarbonsäure (Diphensäure, 176 mg/kg TM) deren höchste Konzentrationen erreicht. Diese Substanzen zeichnen sich durch das Biphenylringsystem mit Erhalt der Aromatizität der vormaligen äußeren Ringe des Phenanthrens aus. Durch die Carbonyl- und Carboxylgruppen ist der weitere Angriff auf das aromatische System durch das Ozon gehemmt. Aufgrund dessen wurden die nach 15-30 Minuten erreichten, hohen Konzentrationen der primären Reaktionsprodukte nur langsam zugunsten der Bildung der sekundären Reaktionsprodukte abgebaut. Deren maximal während der Ozonierung aufgetretenen Konzentrationen lagen bei 15 mg/kg TM (Salicylsäure), 16 mg/kg TM (Phthalaldehydsäure), 69 mg/kg TM (Phthalsäure) und 27 mg/kg TM (Trimellithsäure).

Innerhalb kurzer Zeit nach Beginn der trockenen Ozonierung von Phenanthren auf einer festen Matrix wie Boden oder Quarzsand traten eine Vielzahl verschiedener aromatischer Oxidationsprodukte auf. Durch Dünnschichtchromatographie wurden 16 Substanzen aufgetrennt. Mit Hilfe der Gaschromatographie-Massenspektrometrie konnten 7 Substanzen eindeutig identifiziert und 4 weitere Substanzen postuliert werden. Der weitere Abbau zu kürzeren Kohlenstoffverbindungen war erschwert und eine Totaloxidation zu

Kohlenstoffdioxid nicht zu erzielen. Eine Ozonolyse in Gegenwart von Wasser wäre möglicherweise effektiver aufgrund der extrem reaktiven Hydroxylradikale, die aus dem Ozon gebildet werden. Eine derartige Reaktionsführung ist mit einem Feststoffreaktor aufgrund der leichten Agglomeratbildung feuchten Bodens [MÜLLER, 2000] nicht realisierbar. Eine Totaloxidation von PAK zu Kohlenstoffdioxid wäre demnach anhand der Untersuchungen am Modellschadstoff Phenanthren unter diesen Bedingungen nicht effektiv zu realisieren. Bei einer Teiloxidation, die bisher verwirklicht werden konnte müssen weitere Untersuchungen Erkenntnisse über die mikrobiologische Abbaubarkeit der entstandenen Substanzen erbringen.

#### **4.2.4 Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Phenanthren**

Die Voroxidation von PAK mit Ozon sollte zu anoxidierten, polaren und damit besser wasserlöslicheren Substanzen führen. Auf diese Weise sollte die Bioverfügbarkeit von PAK erhöht werden. Zum einen stellte sich die Frage nach den entstehenden Substanzen und zum anderen nach dem Einfluss der Ozonierung auf die verbleibenden PAK selbst. Diese Fragen sollten anhand von Untersuchungen am Modellschadstoff Phenanthren untersucht werden. Für fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen konnten nur die Überstände von Kultivierungsproben für off-line-Messungen verwendet werden, da die Trübung der Bodensuspensionen zu hoch war. Eine direkte on-line-Messung war daher nicht möglich. In der Abbildung 16 sind die Fluoreszenzspektren dargestellt, die aus den Proben eines Schüttelkolbenversuches mit unterschiedlichem Voroxidationsgrad des eingesetzten Bodenmaterials stammen.



**Abb. 16** Phenanthrenfluoreszenz in Medienüberständen aus Schüttelkolbenkultivierungen mit *S. yanoikuyae* in 10% Bodensuspension. Ausgangskontamination 1000 mg Phenanthren/kg TM. (Vorzonierung bei: Ozonkonzentration 25 g/m<sup>3</sup>, 30 l/h). Probenahme jeweils zu Beginn und Ende der Kultivierung.  
 Probe a) 0 h und b) 22 h: Referenz ohne Vorzonierung  
 Probe c) 0 h und d) 22 h: 3minütige Vorzonierung des Bodens, Voroxidationsgrad 11 %  
 Probe e) 0 h und f) 22 h: 6minütige Vorzonierung des Bodens, Voroxidationsgrad 59 %  
 Probe g) 0 h und h) 22 h: 12minütige Vorzonierung des Bodens, Voroxidationsgrad 68 %

Der Fluoreszenzpeak des Phenanthrens liegt bei dem Wellenlängenpaar Ex 320nm/Em 400nm. Vergleicht man die Spektren, die bei 0 h zu Beginn des Schüttelkolbenversuches aufgenommen wurden (a-c-e-g), so lassen sich bei den vorozonierten Proben höhere Fluoreszenzintensitäten erkennen. Der gleiche Trend ist auch aus den Spektren bei 22 h am Ende des Abbaues (b-d-f-h) zu erkennen. Dies legt den Schluß nahe, dass die Verfügbarkeit des Phenanthrens durch die Vorbehandlung mit Ozon erhöht wurde. Im dargestellten Experiment war der beobachtete mikrobiologische Phenanthrenabbau in den vorozonierten Ansätzen bei einem Voroxidationsgrad von 11% so hoch wie in der Referenz, während bei Voroxidationsgraden von 59 % und 68 % sogar eine Steigerung der Gesamtabbauleistung zu beobachten war. Eine verbesserte Verfügbarkeit könnte sich durch ein Aufbrechen der Huminstoffmatrix durch die Ozonbehandlung ergeben haben, was zu geringeren Anteilen an gebundenen Rückständen geführt haben kann. Die Ozonierung bewirkte eine unselektive Oxidation der Huminstoffe zu kleineren Huminstoffbruchstücken. Diese Huminstoffmoleküle verfügten über eine verbesserte Löslichkeit in Wasser, was auch anhand der Zunahme des DOC und einer bräunlichen Verfärbung der verwendeten Medien zu beobachten war. Phenanthrenmoleküle, die an die Huminstoffe gebunden oder adsorbiert waren gingen in der Folge ebenfalls in Lösung und konnten fluorenszenzspektroskopisch detektiert werden, was zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität geführt hat.

Oxidationsprodukte des Phenanthrens aus der Reaktion mit Ozon konnten bisher nicht fluorenszenzspektroskopisch nachgewiesen werden. In der Abb. 16 scheint sich unterhalb der Phenanthrenfluoreszenz bei den vorozonierten Ansätzen ein weiterer Fluoreszenzpeak bei dem Wellenlängenpaar Ex 300nm/Em 400nm abzubilden. Allerdings war dieses Ergebnis bisher nicht reproduzierbar. Zudem kann es sich hierbei auch um eine Verschiebung der Fluoreszenz durch kristalline Phenanthrenpartikel handeln.

Anhand der Fluoreszenzuntersuchungen von Überständen des Kultivierungsmediums konnte demonstriert werden, dass die Voroxidation des eingesetzten Bodenmaterials durchaus zu einer Erhöhung der Phenanthrenmenge in Bodensuspension geführt hat. Geringe Ozonmengen führten zu einer Erhöhung des löslichen Huminstoffanteils, was aufgrund der adsorbierten Phenanthrenmoleküle zu deren erhöhten Bioverfügbarkeit beigetragen hat.

### **4.3 Abbauprobungen von Phenanthrenkontaminationen auf Boden und Quarzsand durch Ozonierung und anschließendem Abbau im Schüttelkolben mit *Sphingomonas yanoikuyae***

Durch Vorversuche sollte der Einfluss der Vorozonierung von Phenanthren auf den mikrobiologischen Phenanthrenabbau durch *Sphingomonas yanoikuyae* untersucht werden. Dabei wurde eine Verbesserung des mikrobiologischen Abbaus erwartet, da der gewählte Mikroorganismus über eine Abbaupazität eines umfangreichen Substratspektrums verfügt. Um das Modellsystem einfach zu halten, wurde eine Reinkultur und nur ein Modellschadstoff gewählt. Um Huminstoffeinflüsse auszuschalten, wurden die Versuche neben Boden auch auf Quarzsand durchgeführt. Durch Schüttelkolbenversuche sollten vorab die günstigsten Versuchsbedingungen untersucht werden, um nach erfolgter Vorozonierung während des mikrobiologischen Abbaus eine Verfälschung der Ergebnisse durch im Boden befindliches Restozon zu vermeiden.

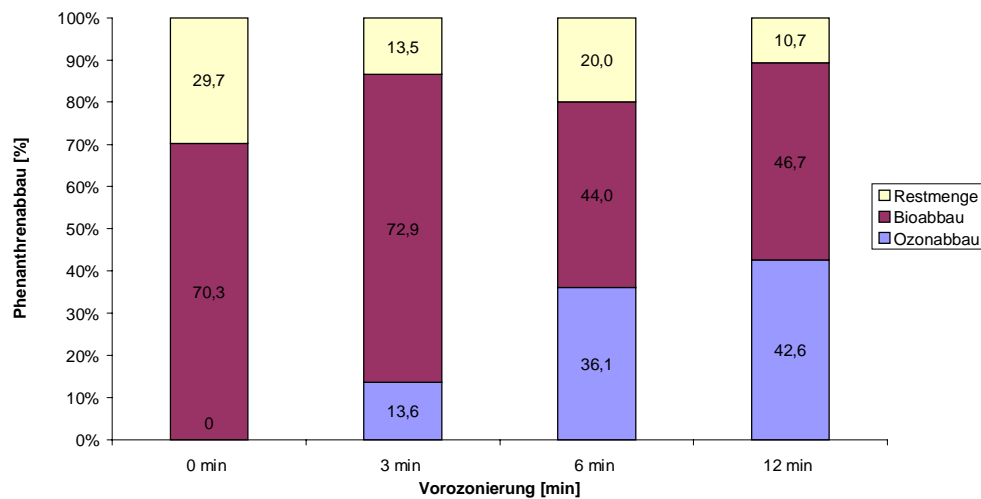
Dazu wurde 200 g Boden oder Quarzsand mit Phenanthren kontaminiert (1000 mg/kg TM) und diese Charge in einem 500 mL Edelstahlreaktor mit Paddelmischer ozoniert. Die Versuchsbedingungen waren immer ein Volumenstrom von 30 l/h durch den Reaktor, eine Ozonkonzentration von 25 g/m<sup>3</sup> und Einwirkzeiten des Ozons auf das Feststoffmaterial von 0 bis 12 min. Die kurze Einwirkzeit wurde gewählt, da der Schadstoff erst anoxidiert werden sollte und nicht eine Totaloxidation angestrebt wurde. Der Ozoneintrag innerhalb dieser Zeit liegt in einem Bereich von 0 bis 750 mg Ozon/kg TM, was einem spezifischen Ozoneintrag von 0 bis 0,75 mg Ozon/mg Phenanthren entspricht.

Die nach erfolgter Voroxidation genommenen Bodenproben wurden bis zum Start des Abbauprobens im Schüttelkolben 1, 4, bzw. 26 Tage bei +4°C aufbewahrt. Dabei sollte der eventuelle Einfluss von im Boden verbliebenen Restozon durch eine gewisse Wartezeit eliminiert werden. Dabei zeigte sich nach dem Animpfen eines Bodensuspensionsansatzes direkt oder 24 h nach erfolgter Vorozonierung, dass ein starkes Absinken der Kolonie bildenden Einheiten KBE und eine Verringerung der Dehydrogenaseaktivität zu beobachten war. Durch eine Wartezeit von 4 Tagen nach erfolgter Vorozonierung war dieser toxische Effekt nicht mehr so deutlich ausgeprägt, so dass aufgrund dessen in weiteren Versuchen immer so verfahren wurde. Eine längere Wartezeit von 26 Tagen ergab in diesem Sinne keine weitere Reduzierung der Hemmwirkung.

Es werden daher im Folgenden die Ergebnisse geschildert, bei denen mit Phenanthren kontaminierter Boden oder Quarzsand (1000 mg/kg TM) unter oben genannten Bedingungen ozoniert wurde und der mikrobiologische Abbau erst nach 4 Tagen gestartet worden ist. Die

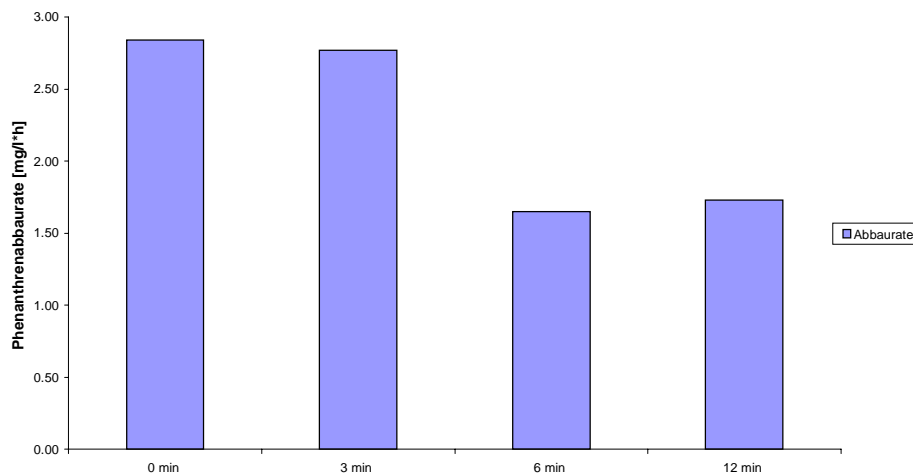


Versorgung der Mikroorganismen mit anorganischem Stickstoff und Phosphor in Form von Ammonium und Phosphat war bei allen Versuchen gewährleistet. Über den Versuchszeitraum war immer genügend Phosphat und Ammonium im Mineralsalzmedium vorhanden, so dass keine Mangelsituation auftreten konnte (hier nicht dargestellt).



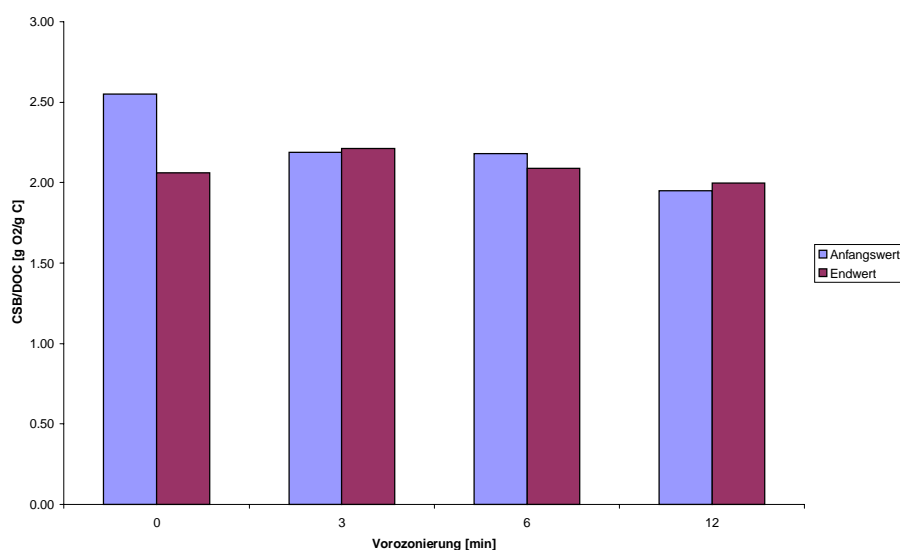
**Abb. 17** Phenanthrenabbau im Schüttelkolben in 10% Bodensuspension nach unterschiedlichem Vorozonierungsgrad

Gegenüber der Referenz, die nicht mit Ozon vorbehandelt worden ist, lässt sich eine Steigerung des Gesamtabbaus auf 80–85% der Ausgangsmenge erzielen. Auf diesem Niveau erfolgte jedoch eine Stagnation des Abbaus. Dabei muss berücksichtigt werden, dass es unter den gegebenen Bedingungen (Inkubation bei 28°C, 21 h, 130 rpm) auch bei der Referenz zu schwankenden Abbauleistungen von 70 – 90% kommen konnte. Wenn hier eine Steigerung der Gesamtabbauleistung vorzuliegen scheint, so ist diese also noch vorsichtig zu bewerten.



**Abb. 18** Phenanthrenabbauraten während des mikrobiologischen Phenanthrenabbaus in 10% Bodensuspension

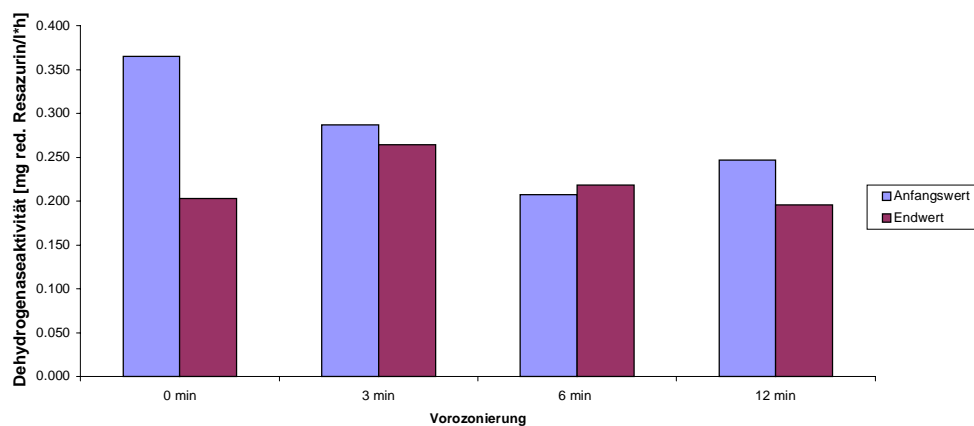
Die Abb. 18 zeigt die mikrobiologischen Phenanthrenabbauraten nach unterschiedlicher Vorzonierung des eingesetzten Bodens. Nur bei dem geringsten Vorzonierungsgrad innerhalb einer 3-minütigen Vorzonierung ließ sich noch eine der Referenz vergleichbare mikrobiologische Abbauraten erzielen. Bei höherem Ozoneintrag konnten die mikrobiologischen Abbauraten nach erfolgter Vorzonierung nicht mehr erreicht werden, obwohl noch immer genügend restliches Phenanthren dem Abbau zur Verfügung stand. Noch schlechtere mikrobiologische Abbauraten ergaben sich, wenn die Bodensuspensionen 24 h nach der Ozonierung des Bodens angesetzt und angeimpft wurden. Der Trend zu fallenden Abbauraten war dann noch deutlicher ausgeprägt (hier nicht dargestellt).



**Abb. 19** Verhältnis von CSB/DOC während des mikrobiologischen Phenanthrenabbaus in 10% Bodensuspension

Anhand der ermittelten Werte von CSB, DOC und ihrem Verhältnis zueinander ist festzustellen, dass während des mikrobiologischen Abbaus nur bei der Referenz, die nicht mit Ozon vorbehandelt wurde, ein Absinken der absoluten Werte von CSB und DOC zu beobachten war. Zudem nahm der CSB mehr ab, was zu einem kleineren Verhältnis CSB/DOC geführt hat. Daraus lässt sich schließen, dass bei fallenden DOC ein höherer Oxidationsgrad der vorliegenden Substanzen auftrat. Die vorliegende Substanz benötigte somit weniger Sauerstoff zur Oxidation und ist durch mikrobiologische Stoffwechselaktivität weiter oxidiert worden. Bei den vorozonierten Ansätzen war im Gegenteil dazu eine Steigerung oder Stagnation der Werte zu beobachten, was den Schluß nahelegt, dass die aus der Vorozonierung hervorgegangenen Substanzen durch das Bakterium nicht weiter umgesetzt wurden. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass es hier auch durch inhomogene Huminstoffverteilungen auf die Proben in den einzelnen Schüttelkolben zu Beeinflussungen und Verfälschungen der Ergebnisse kommen konnte.

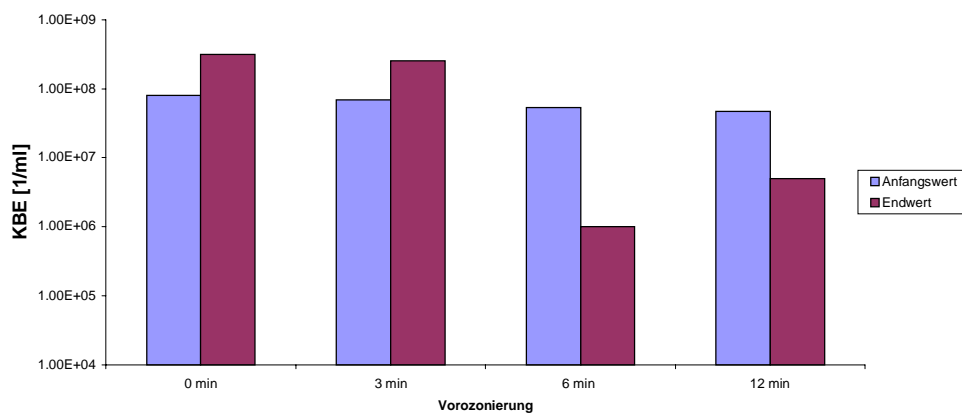
Aus den ermittelten Werten für die Kolonie bildenden Einheiten KBE ließen sich keine Rückschlüsse auf eine Beeinträchtigung der mikrobiologischen Aktivität ziehen. Anfangs- und Endwerte lagen bei allen Ansätzen im gleichen Bereich (hier nicht dargestellt). Einflüsse ließen sich jedoch aus den Dehydrogenaseaktivitäten deuten.



**Abb. 20** Dehydrogenaseaktivitäten während des mikrobiologischen Phenanthrenabbaus in 10% Bodensuspension

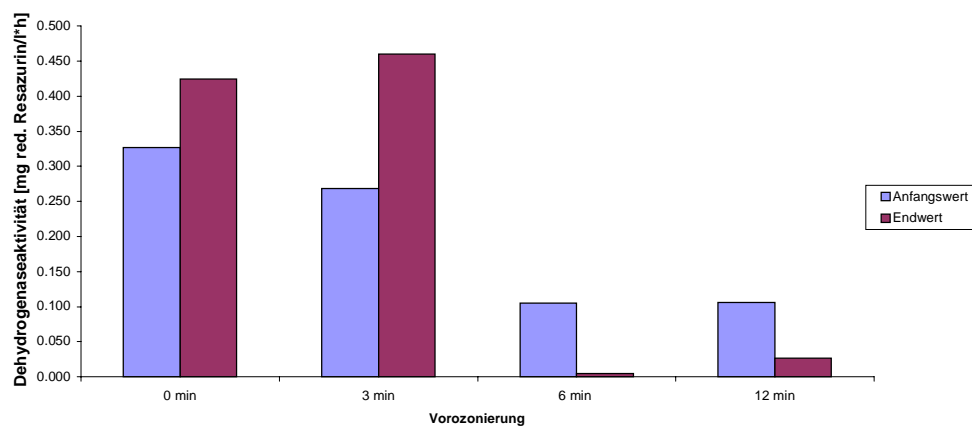
Bei den Dehydrogenaseaktivitäten war mit steigender Vorozonierung ein Trend zu abnehmenden Aktivitäten zu erkennen. Offensichtlich müssen die aus der Ozonierung hervorgegangenen Substanzen zu einer die Dehydrogenaseaktivität beeinflussenden Wirkung geführt haben.

Um die aufgezeigten Einflüsse genauer zu untersuchen, sind diese Versuche in der gleichen Weise mit Quarzsand anstelle von Boden durchgeführt worden, um Huminstoffeinflüsse auszuschließen. Dabei zeigten sich die Unterschiede während des mikrobiologischen Abbaus zwischen Referenz und vorozonierten Proben noch deutlicher als bei den Versuchen mit Boden.



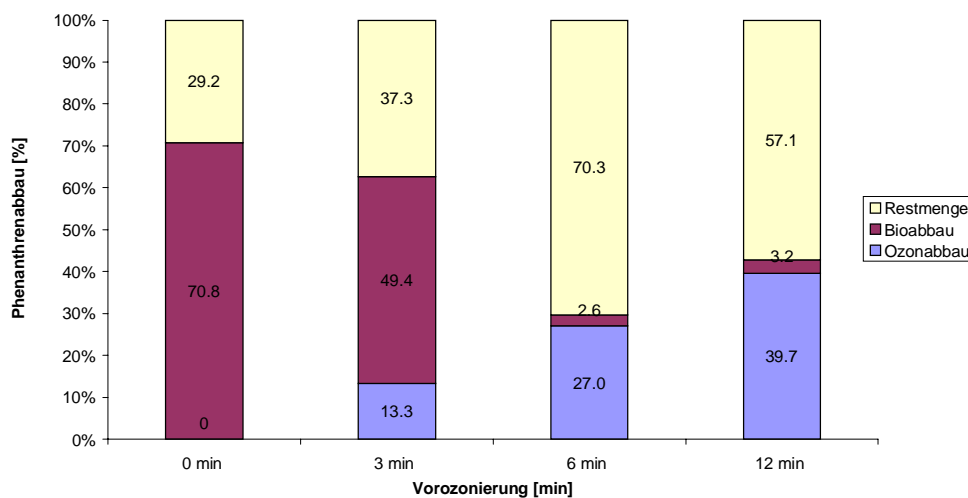
**Abb. 21** Entwicklung der KBE während des mikrobiologischen Phenanthrenabbaus in Schüttelkolben in 10% Quarzsandsuspension

Während die Animpfinokula bei allen Ansätzen gleich waren, konnte bei den Ansätzen mit Vorozonierung von 6 und 12 Minuten deutliche Abnahmen bei der KBE beobachtet werden.



**Abb. 22** Entwicklung der Dehydrogenaseaktivitäten während des mikrobiologischen Phenanthrenabbaus in Schüttelkolben in 10% Quarzsandsuspension

Dieser Trend spiegelte sich bei den Werten der Dehydrogenaseaktivität noch stärker wieder. Mit steigendem Vorozonierungsgrad nahmen die Anfangswerte der Dehydrogenaseaktivitäten deutlich ab. Nur bei 3-minütiger Vorozonierung war nochmals eine Steigerung der Aktivität während des Abbaus zu beobachten. Die anderen Ansätze zeigten gegenüber der Referenz kaum noch Aktivität an. Die mikrobiologischen Aktivitäten korrelierten mit den erzielten Abbaumengen und Abbauraten.



**Abb. 23** Phenanthrenabbau im Schüttelkolben in 10% Quarzsandsuspension nach unterschiedlichem Vorozonierungsgrad

Bei den Vorozonierungsgraden von 27 bzw. 40 % nach 6 bzw. 12-minütiger Vorozonierung fand nahezu kein Abbau mehr statt. Die Phenanthrenabbauraten lagen dementsprechend nahezu bei 0 (nicht dargestellt), während die Referenz eine Abbauraten von 3 mg/l\*h aufwies. Auch die Ergebnisse für den CSB und DOC spiegelten diese Ergebnisse wieder, da bei DOC und CSB keine signifikanten Änderungen mehr auftraten.

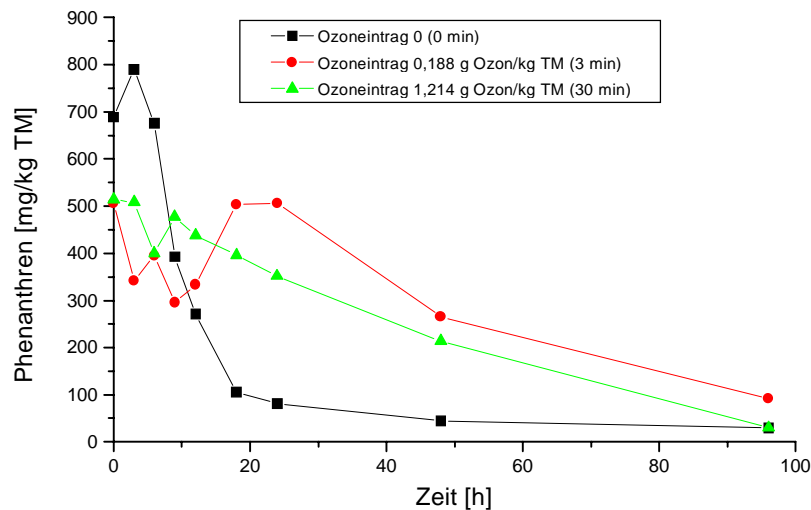
Anhand der Schüttelkolbenexperimente wurde aufgezeigt, dass der mikrobiologische Phenanthrenabbau in Quarzsandsuspension bei steigender Vorozonierung schlechter verläuft als der alleinige mikrobiologische Abbau. Mit steigendem Vorozonierungsgrad trat eine zunehmende Hemmung des Wachstums, der mikrobiologischen Aktivität und der Abbauleistung auf. An Quarzsand war dieser Effekt besonders stark ausgeprägt, da nach der Ozonierung entstandene Stoffe frei im Medium vorliegen konnten und nicht durch Huminstoffe gebunden wurden. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass diese Stoffe nicht biologisch abbaubar sind und sogar eine toxische oder inhibierende Wirkung entfalten können. An Boden schienen die die Inhibierung verursachenden Stoffe durch die

Huminstoffmatrix gebunden zu werden, so dass sich diese hemmenden Effekte nicht so stark auswirken konnten.

#### **4.4 Phenanthrenabbau im Bioreaktor durch *S. yanoikuyae* DSM 6900**

##### **4.4.1 Phenanthrenabbau in 10% Quarzsandsuspension im Bioreaktor nach Voroxidation mit Ozon**

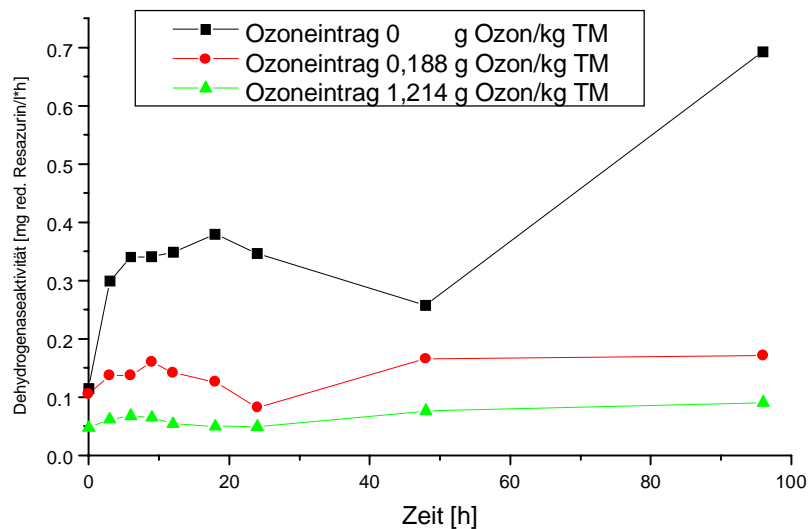
Gegenstand der Untersuchungen war der Verlauf des mikrobiologischen Phenanthrenabbaus nach einer Voroxidation mit Ozon. Dabei ist es von Bedeutung, ob der mikrobiologische Abbau hinsichtlich Geschwindigkeit und Effektivität durch die vorhergehende Ozoneinwirkung auf den Schadstoff positiv oder negativ beeinflusst wurde. Um Störungen durch Huminstoffe auszuschließen, wurden die ersten Versuche mit Quarzsand durchgeführt. Im Gegensatz zu den Schüttelkolbenversuchen sind bei den Kultivierungen im 2-L-Bioreaktor umfassendere Untersuchungen möglich, die den Verlauf des Phenanthrenabbaus über einen längeren Versuchszeitraum dokumentieren. Zur Vorozonierung des Ausgangsmaterials wurde der 500 mL Edelstahlreaktor mit Paddelmischer verwendet. Dazu wurden 200 g Quarzsand mit Phenanthren kontaminiert (1000 mg/kg TM) und diese Charge eine festgelegte Zeit mit Ozon behandelt. Die Versuchsbedingungen wurden immer eingestellt auf einen Volumenstrom von 30 l/h durch den Reaktor, eine Ozonkonzentration von 25 g/m<sup>3</sup> und Einwirkzeiten des Ozons auf das Feststoffmaterial von 0, 3 und 30 min. Diese Reaktionszeiten wurden gewählt, da gegenüber den Schüttelkolbenversuchen eine etwas größere Einwirkzeit des Ozons eingeräumt werden sollte. Auch hier sollte der Schadstoff erst anoxidiert und nicht eine Totaloxidation angestrebt werden. Möglicherweise kann durch die Verlängerung der Ozonierung die bei den Schüttelkolbenversuchen beobachteten Hemmungen wieder gesenkt werden. Der Ozoneintrag innerhalb dieser Zeit lag in einem Bereich von 0 bis 1875 mg Ozon/kg TM, was einem spezifischen Ozoneintrag von 0 bis 1,875 mg Ozon/mg Phenanthren entspricht. Das Bodenmaterial wurde nach der Ozonbehandlung 4 Tage bei +4°C gelagert, bevor es für die Kultivierung eingesetzt wurde. Die Kultivierung wurde über einen Zeitraum von 4 Tagen durchgeführt. In der Abbildung 24 sind die Verläufe der Phenanthrenkonzentrationen dargestellt.



**Abb. 24** Verlauf des Phenanthrenabbaus während der Kultivierung in 10% Quarzsandsuspension mit *S. yanoikuyae* bei unterschiedlichem Vorozonierungsgrad. (Kultivierungsbedingungen: 28°C, 500 rpm, Begasung 1 vvm)

Anhand der Referenzkultivierung ohne Vorozonierung ist zu erkennen, dass der Abbau innerhalb von 24 h bis auf das Restniveau von 80 mg Phenanthren/kg TM erfolgte. Eine weitere Reduzierung von 80 auf 30 mg Phenanthren/kg TM innerhalb der folgenden 72 h fiel nur noch gering aus. Sehr deutlich zeichnet sich die Auswirkung der Vorozonierung im Verlauf der Abbaukurven ab. Eine Vorozonierung von 3 min. innerhalb derer schon 35% der Ausgangsmenge des Phenanthrens oxidiert wurden hat genauso wie die Vorozonierung von 30 min. innerhalb derer 58% der Ausgangsmenge des Phenanthrens oxidiert wurden, eine deutliche Verlangsamung des Phenanthrenabbaus zur Folge. Erst nach 96 Stunden wurde das gleiche Niveau von 30 mg Phenanthren/kg TM erreicht, wobei die Kultivierung mit der kürzeren Vorozonierung von 3 min. sogar nur 120 mg Phenanthren/kg TM erreichte. Beide Kurvenverläufe sind einander sehr ähnlich, wobei sich mit steigender Voroxidation die gesamte Abbaukurve auf der y-Achse weiter nach unten verschieben sollte. Warum sich die Anfangswerte der Kultivierungen bei 3- und 30-minütiger Voroxidation mit ca. 500 mg Phenanthren/kg TM kaum unterscheiden ist nicht eindeutig zu erklären. Möglicherweise war auch die Gleichgewichtseinstellung im Reaktor noch nicht vollständig erreicht. Die Extraktion des Phenanthrens aus der Bodensuspension war jedoch mit Schwankungen behaftet und konnte mangels Probenvolumen und aufgrund des Aufwandes nur einfach bestimmt werden. Die Anfangswerte des Ausgangsmaterials, aus denen die Phenanthrenwerte durch Feststoffextraktion bestimmt wurden, lagen bei 683 (3 min. Vorozonierung) bzw. 476 mg Phenanthren/kg TM (30 min. Vorozonierung). Auffallend ist die schnelle Reduktion des

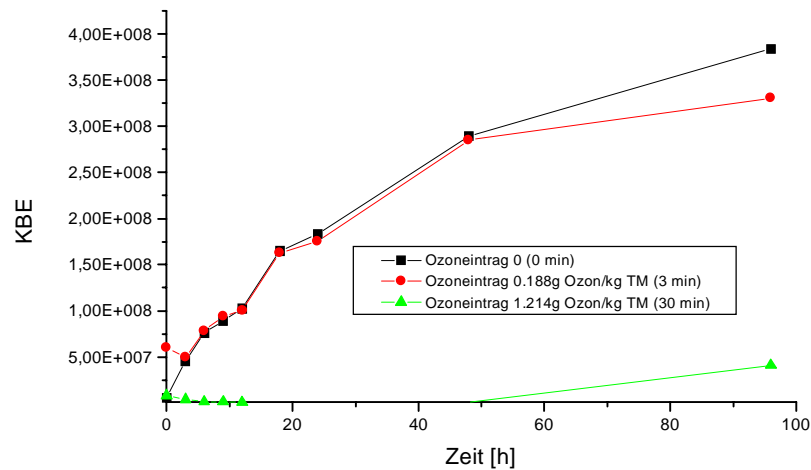
Phenanthrengehaltes bei 3-minütiger Vorozonierung innerhalb der ersten 12 Kultivierungsstunden und der dann folgende Wiederanstieg. Vermutlich war die zugegebene Vorkultur in der Lage gewesen das gelöste Phenanthren sofort abzubauen, bis sich eine Hemmung bemerkbar machen konnte.



**Abb. 25** Verlauf der Dehydrogenaseaktivitäten während der Kultivierung in 10% Quarzsandsuspension mit *S. yanoikuyae* bei unterschiedlichem Vorozonierungsgrad.

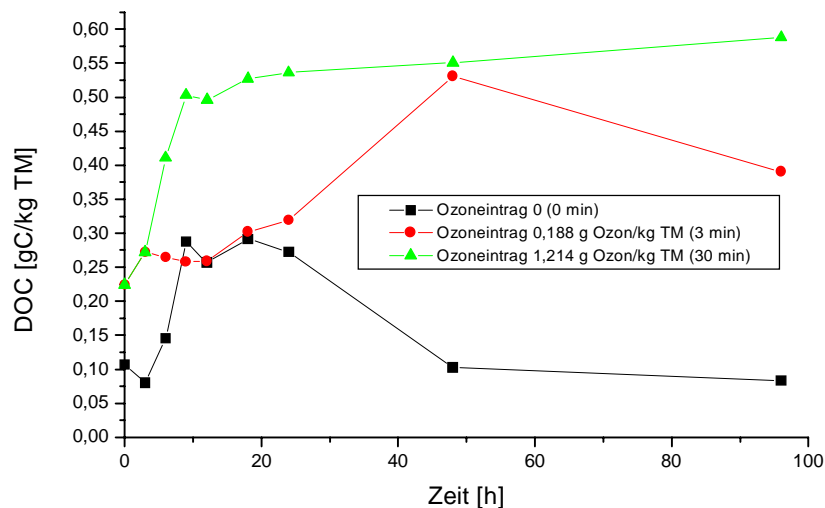
Die Dehydrogenaseaktivitäten lassen sehr deutlich erkennen, dass die Vorozonierung eine Wirkung auf die Stoffwechselaktivität der Bakterien hat. Ohne Vorozonierung sind durchgehend höhere Dehydrogenaseaktivitäten zu erkennen. Der Verlauf bei 3-minütiger Vorozonierung korreliert mit dem Verlauf der entsprechenden Phenanthrenwerte. Zwar waren die Anfangsaktivitäten geringer im Vergleich zur Referenz ohne Vorozonierung, aber in den ersten 12 h ist eine steigende Tendenz zu erkennen. Nach den ersten 12 Kultivierungsstunden ist es wieder zu einem Abfall der Werte gekommen. Die Aktivitäten bei 30-minütiger Vorozonierung verliefen auf noch niedrigerem Niveau mit nur schwach ansteigender Tendenz. Die Vorozonierung führte demnach zu Produkten, die nicht weiter metabolisiert werden konnten, was mangels Substratangebot zu einer verringerten Expression der beteiligten Dehydrogenasen geführt haben könnte. Möglicherweise übten die entstandenen Ozonierungsprodukte aber auch eine akute Hemmung auf die Dehydrogenasen aus.



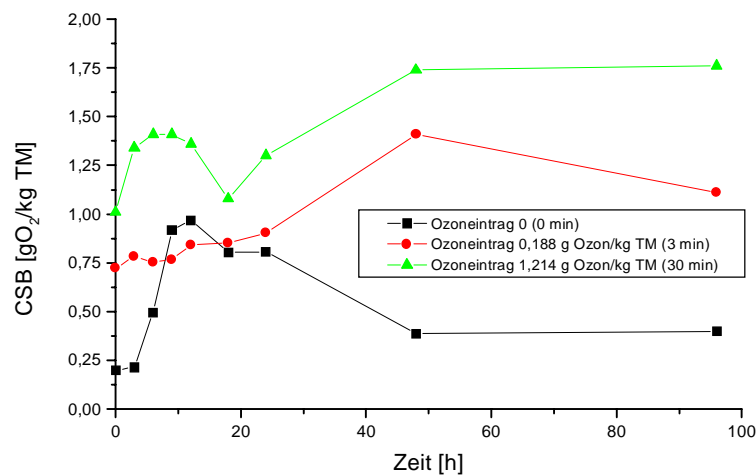


**Abb. 26** Verlauf der Kolonie bildenden Einheiten KBE während der Kultivierung in 10% Quarzsandsuspension mit *S. yanoikuyae* bei unterschiedlichem Vorozonierungsgrad.

Die Entwicklung der KBE spiegelt die Unterschiede der Kultivierungen ebenfalls deutlich wieder. Interessant ist der nahezu identische Verlauf der KBE bei 3-minütiger Vorozonierung und der Referenz, obwohl die Dehydrogenaseaktivitäten schon auf gravierende Unterschiede hingewiesen haben. Offensichtlich war die Auswirkung auf die Lebendzellzahl relativ gering. Dagegen war bei dem Kultivierungsverlauf mit 30-minütiger Vorozonierung die KBE um eine Zehnerpotenz niedriger als bei der Referenz. Die inhibierende Wirkung entstandener Ozonierungsprodukte trat sehr deutlich hervor.

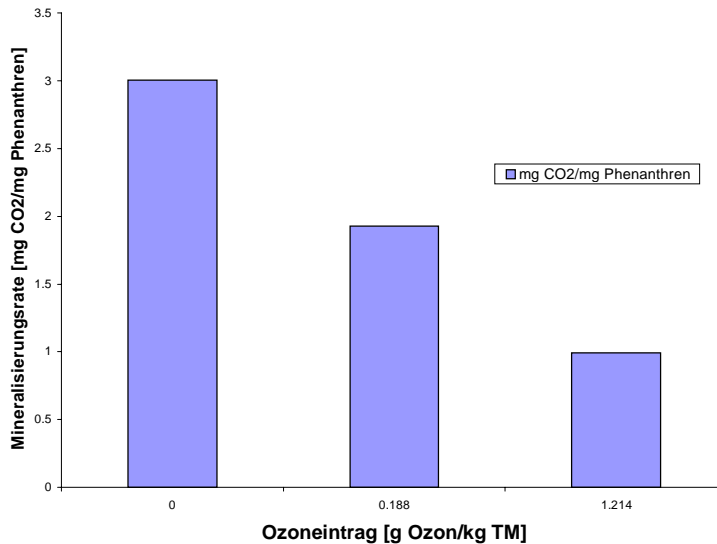


**Abb. 27** Verlauf des DOC während der Kultivierung in 10% Quarzsandsuspension mit *S. yanoikuyae* bei unterschiedlichem Vorozonierungsgrad.



**Abb. 28** Verlauf des CSB während der Kultivierung in 10% Quarzsandsuspension mit *S. yanoikuyae* bei unterschiedlichem Vorozonierungsgrad.

Die Verläufe der DOC- und CSB-Werte zeigten bei der Referenzkultivierung ohne Vorozonierung einen ansteigenden Verlauf innerhalb der ersten 12 Kultivierungsstunden. Nach Durchlaufen eines Maximums kam es dann zu einem Abfall auf ein niedriges Restniveau. Durch den Metabolismus der Bakterien wurde das Phenanthren verstoffwechselt, was zu einem durch die Zunahme oxidiertes und im Medium gelöster Substanzen verursachten Anstieg von DOC und CSB geführt hat. Aufgrund weiterer Mineralisierung zu Kohlendioxid sanken die Werte zum Ende der Kultivierung ab. Bei den Kultivierungen mit Vorozonierung war ein höheres Ausgangsniveau von DOC und CSB zu beobachten, da durch die Vorozonierung des Phenanthrens wasserlöslichere Substanzen entstanden waren. Durch weitere Verstoffwechslung des restlichen Phenanthrens erhöhten sich die Werte noch. Es kam zu keiner weiteren Verminderung, weil die aus der Ozonierung hervorgegangenen Substanzen vermutlich nicht weiter umgesetzt wurden. Das kann durch die folgende Abbildung ebenfalls verdeutlicht werden, in der die entstandenen Kohlendioxidmengen auf die abgebaute Phenanthrenmenge bezogen wurden, die zu Beginn der Kultivierung im Reaktor vorlag.



**Abb. 29** Darstellung der Mineralisierung zu Kohlendioxid während der Kultivierung in 10% Quarzsandsuspension mit *S. yanoikuyae* bei unterschiedlichen Ozoneintrag (Vorozoneierungsgrad).

Die absoluten Kohlendioxidmengen, die während der Kultivierungen entstanden sind, wurden hier nicht dargestellt. Ohne Vorozoneierung entstanden 456,7 mg Kohlendioxid, bei einem Ozoneintrag von 0,188 g entstanden 159,8 mg Kohlendioxid und 99,3 mg Kohlendioxid bei einem Ozoneintrag von 1,214 g Ozon/kg TM. Mit steigendem Vorozoneierungsgrad nimmt die durch den mikrobiologischen Abbau entstandene Kohlendioxidmenge ab. Berechnet man die Menge Kohlendioxid, die theoretisch bei vollständiger Mineralisierung von Phenanthren entstehen kann, ergibt sich ein Wert von 3,46 mg CO<sub>2</sub>/mg Phenanthren. Die Kultivierung ohne Vorozoneierung kam dem mit einem Wert von 3,01 mg CO<sub>2</sub>/mg Phenanthren schon sehr nahe, während die Werte bei den Kultivierungen nach einer Vorozoneierung auf 1,93 und 0,99 mg CO<sub>2</sub>/mg Phenanthren abfielen. Möglicherweise wurde das vorhandene restliche Phenanthren nur noch unvollständig umgesetzt, während die aus der Vorozoneierung hervorgegangenen Substanzen nicht mehr weiter mineralisiert worden sind.

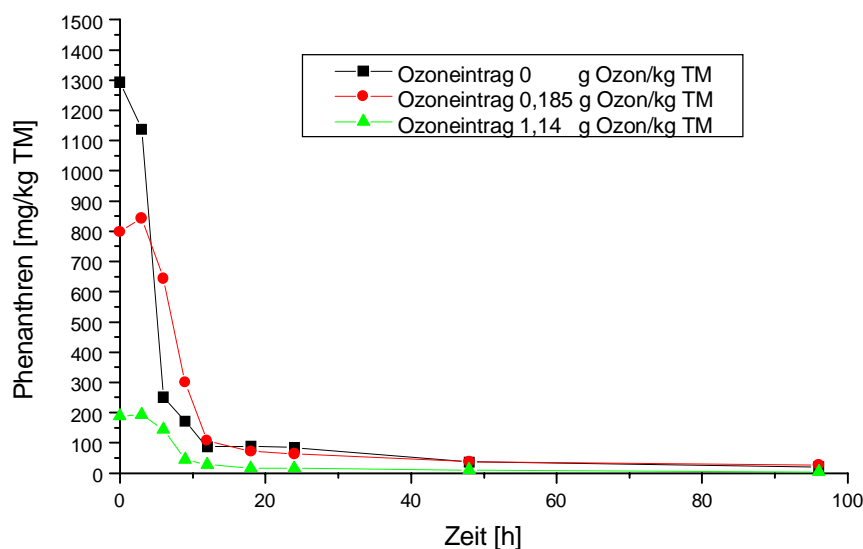
Eine Vorozoneierung im Modellsystem Quarzsand führte zu keiner Verbesserung und Beschleunigung des Abbaus, sondern eher zu deren Verlangsamung.

Die Restwerte an nicht umgesetztem Phenanthren blieben nach einer Voroxydation mit Ozon während des mikrobiologischen Abbaus mindestens genauso groß oder sogar größer im Vergleich zur Kultivierung ohne Vorozoneierung. Die Restwerte wurden zudem auch erst zu einem späteren Zeitpunkt erreicht. Bezüglich der Dehydrogenaseaktivität und der KBE war eine Hemmung der mikrobiologischen Aktivität mit steigender Vorozoneierung festzustellen. Wie die Werte von DOC, CSB und die Mineralisierungsrate zu Kohlendioxid zeigen, war eine weitere Verstoffwechslung der aus der Ozonierung von Phenanthren hervorgegangenen

Substanzen nicht weiter oder nur unvollständig möglich. Anhand der identifizierten Ozonierungsprodukte des Phenanthrens soll diese Aussage zu einem späteren Zeitpunkt experimentell überprüft werden.

#### 4.4.2 Phenanthrenabbau in 10% Bodensuspension im Bioreaktor nach Voroxidation mit Ozon

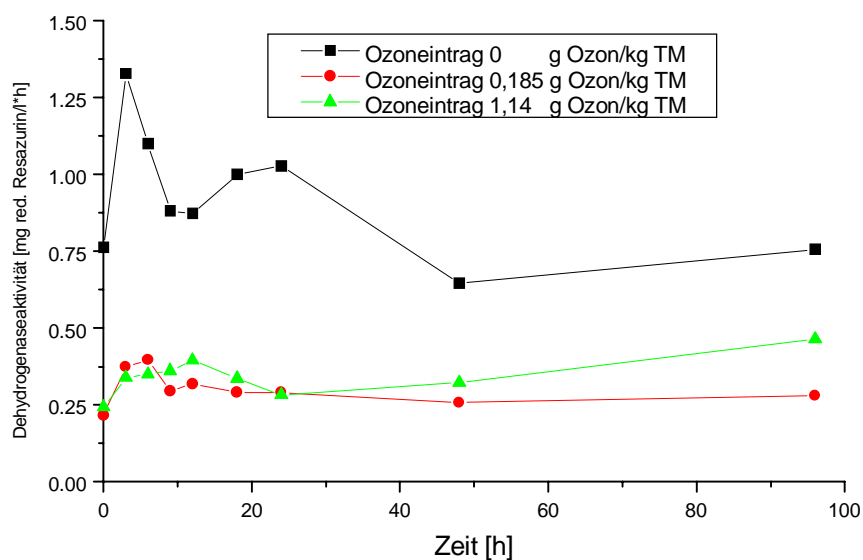
Der Verlauf des mikrobiologischen Phenanthrenabbaus nach einer Voroxidation mit Ozon an einem huminstoffhaltigen Boden wurde untersucht. Es war das Ziel der Untersuchungen, festzustellen, ob nach erfolgter Ozonierung des Schadstoffes in einer huminstoffhaltigen Matrix ebenso wie bei den Quarzsandkultivierungen eine Verlangsamung des mikrobiologischen Schadstoffabbaus zu beobachten ist. Zur Vorozonierung des Ausgangsmaterials wurde in der gleichen Weise verfahren wie in Kapitel 4.4.1 bei den Kultivierungen in Quarzsandsuspension. Der Ozoneintrag während der Vorozonierung des Bodens lag in einem Bereich von 0 bis 1875 mg Ozon/kg TM, was einem spezifischen Ozoneintrag von 0 bis 1,875 mg Ozon/mg Phenanthren entsprach. In der Abbildung 30 sind die Verläufe der Phenanthrenkonzentrationen während des mikrobiologischen Abbaus dargestellt.



**Abb. 30** Verlauf des Phenanthrenabbaus während der Kultivierung in 10% Bodensuspension mit *S. yanoikuyae* bei unterschiedlichem Vorozonierungsgrad. (Kultivierungsbedingungen: 28°C, 500 rpm, Begasung 1 vvm)

Innerhalb der ersten 24 Kultivierungsstunden ist allen Kultivierungen der nahezu komplette Phenanthrenabbau gemeinsam. Bei der Referenzkultivierung ohne Vorozonierung wurde der Phenanthrengehalt von 1300 auf 85mg/kg TM reduziert, während bei den Kultivierungen mit Vorozonierung eine Senkung des Phenanthrengehalts von 800 auf 65, bzw. 200 auf 16 mg/kg TM eintrat. Im weiteren Verlauf nähern sich die Abbaukurven nahezu dem gleichen Grenzwert an. Im Vergleich zu den Kultivierungen in Quarzsandsuspension war weder eine deutliche Verlangsamung des mikrobiologischen Phenanthrenabbaus noch eine deutliche Beschleunigung zu beobachten. Nach durchgeführter Vorozonierung verlief der Abbau bei einem Ozoneintrag von 0,185g Ozon/kg TM genauso schnell wie bei der Referenz. Bei einem Ozoneintrag von 1,14 g Ozon/kg TM verlief der Restabbau etwas schneller als bei der Referenz und es wurden auch geringere Restwerte nach 96 Kultivierungsstunden erreicht. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant.

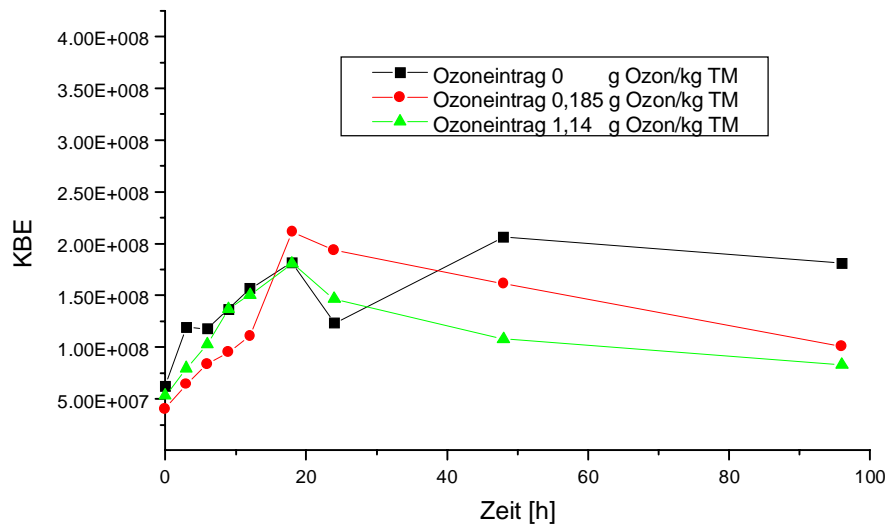
Der Abbau des nach der Vorozonierung noch vorhandenen Phenanthrens bereitete den Mikroorganismen wenig Schwierigkeiten. Über die Folgen der Ozoneinwirkung auf Boden und Schadstoff lässt die Phenanthrenabbaukurve keine Rückschlüsse zu. Die folgenden beiden Abbildungen machen den Einfluss der Ozoneinwirkung jedoch sehr deutlich.



**Abb. 31** Verlauf der Dehydrogenaseaktivitäten während der Kultivierung in 10% Bodensuspension mit *S. yanoikuyae* bei unterschiedlichem Vorozonierungsgrad.

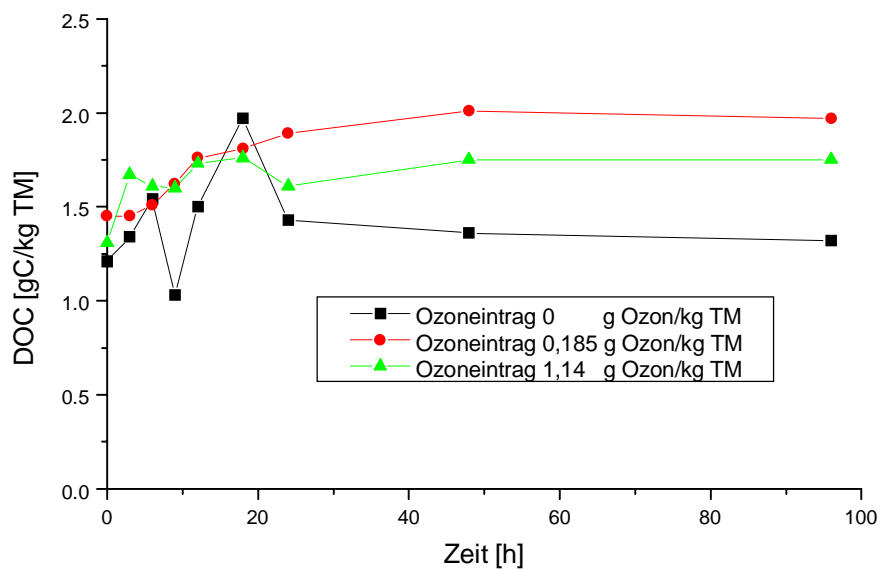
Trotz gleicher Animpfinokula von  $1 \cdot 10^8$  Zellen/mL fielen die Dehydrogenaseaktivitäten bei den Kultivierungen mit Vorozonierung deutlich niedriger aus. Der Höchstwert, der bei allen Kultivierungen nach 3 Kultivierungsstunden erreicht wurde, entsprach bei der Referenz mit

1,35 mg red. Resazurin/ l\*h dem 4-5 fachen Wert der Kultivierungen mit Vorozonierung. Letztere liegen in der gleichen Größenordnung zwischen 0,25 und 0,5 mg red. Resazurin/l\*h. Vergleichbar mit den Quarzsandkultivierungen ist auch hier eine Hemmung der Dehydrogenaseaktivität zu beobachten. Durch die Ozoneinwirkung auf Schadstoff und Huminstoffe wurde die Stoffwechselaktivität der Bakterien deutlich beeinflusst.

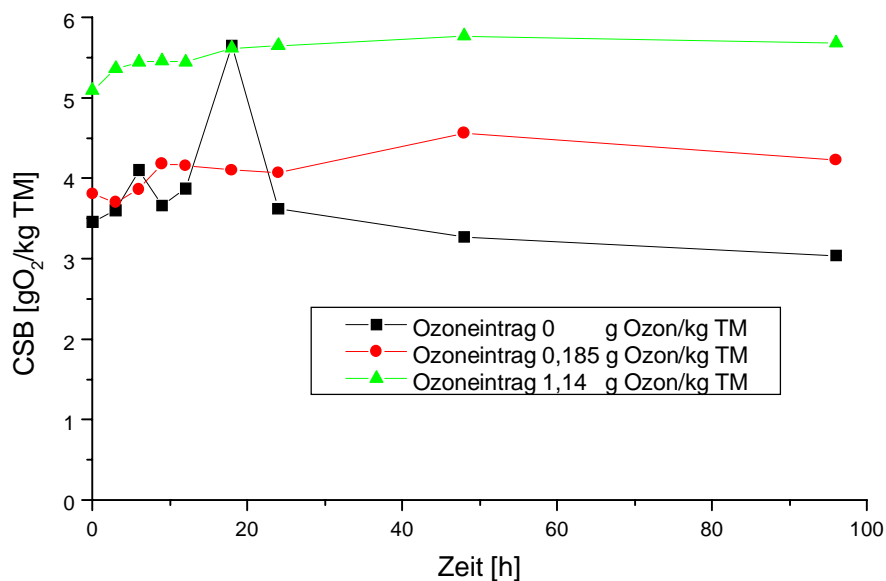


**Abb. 32** Verlauf der Kolonie bildenden Einheiten KBE während der Kultivierung in 10% Bodensuspension mit *S. yanoikuyae* bei unterschiedlichem Vorozonierungsgrad.

Im Gegensatz zur Dehydrogenaseaktivität, die bei Vorozonierung des Bodens während der Kultivierung zu geringeren Werten führte, schien das bakterielle Wachstum in den ersten 20 Kultivierungsstunden keine Unterschiede aufzuweisen. Jedoch zeigte sich bei den Kultivierungen mit Vorozonierung das Ende der exponentiellen Wachstumsphase bereits nach 18 Kultivierungsstunden. Bei der Referenz ist das Ende dieser Wachstumsphase erst nach 48 Kultivierungsstunden erreicht worden. Eine akute toxische Wirkung auf die Bakterien konnte nicht festgestellt werden, auch wenn es anhand der Dehydrogenaseaktivität zu einer Beeinträchtigung der Stoffwechselaktivität kam. Die exponentiellen Wachstumsphasen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Das Wachstum war bei den Kultivierungen mit Vorozonierung nur wenig langsamer. Das bedeutet, dass nach 18 Kultivierungsstunden bei den Kultivierungen mit Vorozonierung schon eine Verknappung des Substratangebotes eingetreten sein musste, in deren Folge die Bakterien in die Absterbephase eingetreten waren. Die nächsten Abbildungen zeigen die Verläufe des gelösten organischen Kohlenstoffgehalts DOC und des chemischen Sauerstoffbedarfs CSB.



**Abb. 33** Verlauf des DOC während der Kultivierung in 10% Bodensuspension mit *S. yanoikuyae* bei unterschiedlichem Vorozonierungsgrad.

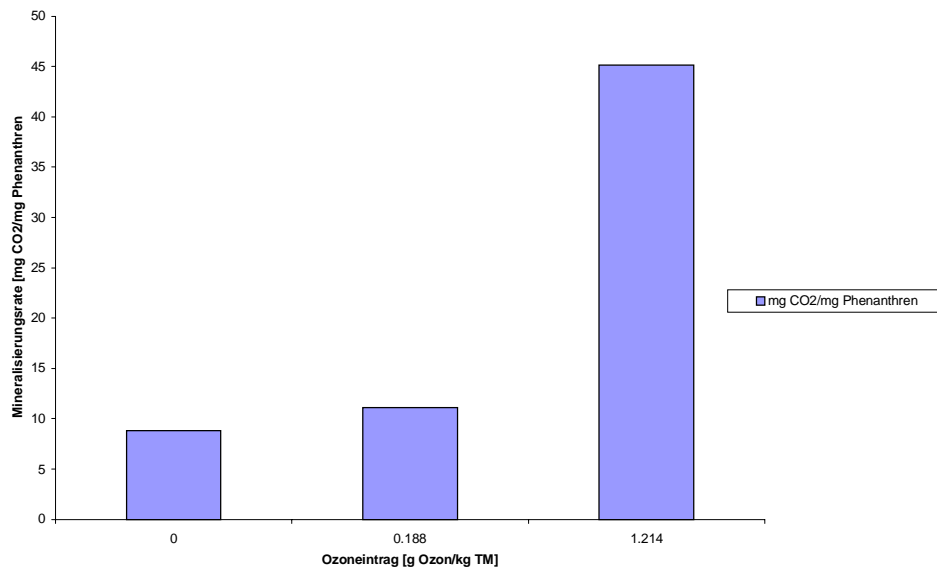


**Abb. 34** Verlauf des CSB während der Kultivierung in 10% Bodensuspension mit *S. yanoikuyae* bei unterschiedlichem Vorozonierungsgrad.

Beiden Abbildungen ist gemeinsam, dass bei der Kultivierung ohne Vorozonierung, ausgehend von einem bestimmten Anfangswert bei DOC und CSB, ein Maximum durchlaufen wurde. Zum Ende der Kultivierung fielen DOC und CSB wieder ab. Nach erfolgter Vorozonierung starteten die Kultivierungen mit etwas erhöhten Werten, allerdings stiegen DOC und CSB während des Kultivierungsverlaufs weiter an. DOC und CSB

verharrten dann auf einem Niveau, dass sich auch nicht mehr weiter reduziert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass durch die Vorozonierung mehr wasserlösliche organische Stoffe entstanden waren, die zu einer Erhöhung des DOC und CSB geführt haben. Jedoch wurden diese Substanzen nicht mehr weiter mineralisiert, da keine Verringerung des DOC und CSB zu beobachten war.

Eine schlechte Mineralisierung der aus der Ozonierung hervorgegangenen Substanzen kann auch anhand der Kohlendioxidmengen, die während des mikrobiologischen Abbaus entstanden sind, vermutet werden. Bei der Kultivierung ohne Vorozonierung entstanden 2243 mg Kohlendioxid, während mit steigender Vorozonierung nur noch 1813 mg, bzw. 1707 mg Kohlendioxid entstanden sind (nicht dargestellt). Ein analoger Trend war auch schon bei den Quarzsandkultivierungen mit Phenanthren als einziger Kohlenstoffquelle zu beobachten.



**Abb. 35** Darstellung der Mineralisierung zu Kohlendioxid bezogen auf die vorliegende Phenanthrenmenge während der Kultivierung in 10% Bodensuspension mit *S. yanoikuyae* bei unterschiedlichem Ozoneintrag (Vorozonierungsgrad).

Interessanterweise stiegen die relativen Kohlendioxidmengen in Relation zum vorhandenen Phenanthren mit steigender Vorozonierung an. Der größte Anteil am entstandenen Kohlendioxid musste daher durch die Mineralisierung von Huminstoffen des Bodens verursacht worden sein.

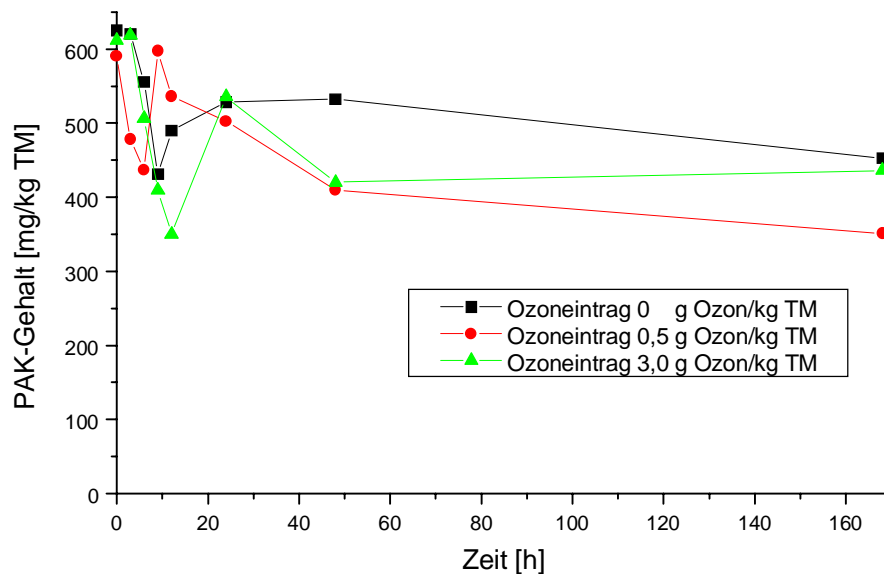
Eine Vorozonierung des Phenanthrens am Modellsystem Boden führte im Vergleich zu den Abbauprobungen auf Quarzsand nicht zu einer Verlangsamung des mikrobiologischen Abbaus. Die Unterschiede zum mikrobiologischen Abbau ohne Vorozonierung sind jedoch



nicht signifikant. Die Stoffwechselaktivität der Bakterien wurde dennoch durch die Vorozonierung beeinflusst. Die Dehydrogenaseaktivitäten lagen bei der Kultivierung ohne Vorozonierung um das drei- bis fünffache höher als es nach einer Vorozonierung der Fall war, während keine so deutliche Auswirkung auf die Lebendzellzahl zu beobachten war. Jedoch wurde bei den Kultivierungen mit Vorozonierung das Wachstumsmaximum schon nach 18 Kultivierungsstunden durchlaufen, während dies bei der Referenzkultivierung erst nach 48 Kultivierungsstunden der Fall war. Die beobachteten Effekte lassen sich auf einen möglichen Substratmangel zurückführen, wonach durch die Ozonolyse des Phenanthrenrings schon die Angriffspunkte des mikrobiologischen Stoffwechsels vorweggenommen wurden und Substanzen entstanden sind, die sich nicht in den Stoffwechsel einbinden lassen. Eine Hemmung des Enzymsystems der Dehydrogenasen durch ein bestimmtes Ozonierungsprodukt kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Der DOC und CSB liefern ebenfalls Hinweise darauf, dass trotz des durch die Ozonierung hervorgerufenen Kohlenstoffangebotes im Medium dieses nicht weiter umgesetzt wurde. So war mit der Vorozonierung ebenfalls eine Abnahme der absoluten Kohlendioxidproduktion zu beobachten.

#### **4.5 Abbau von PAK im Bioreaktor durch eine Mischkultur**

Für den mikrobiologischen Abbau einer realen Kontamination eines Gaswerkbodens mit PAK wurde eine Bakterienmischkultur eingesetzt, die sowohl auf 5 verschiedenen PAK als den Ausgangschadstoffen als auch auf deren Ozonierungsprodukten angereichert wurde. Vergleichend zu den Abbauversuchen am Modellsystem Phenanthren und dessen Abbau durch eine Reinkultur sollte der Einfluss der Ozonierung auf den mikrobiologischen Abbau durch eine Mischkultur untersucht werden. Zur Vorozonierung des Ausgangsmaterials wurde in der gleichen Weise verfahren wie in Kapitel 4.4.1 bei den Kultivierungen in Quarzsand- und Bodensuspension. Der Ozoneintrag während der Vorozonierung des Bodens lag in einem Bereich von 0 bis 3 g Ozon/kg TM, was bei einer Gesamtbelastung des Bodens von 600 mg PAK/kg TM einem spezifischen Ozoneintrag von 0 bis 6 mg Ozon/mg PAK entsprach. Der höhere Ozoneintrag wurde gewählt, da bei der gealterten Kontamination mit einer geringeren Oxidationsrate der PAK gerechnet werden musste. In der Abbildung 36 sind die Verläufe der PAK-Konzentrationen während des mikrobiologischen Abbaus dargestellt.



**Abb. 36** Verlauf des PAK-Abbaus während der Kultivierung in 10% Bodensuspension mit einer Mischkultur bei unterschiedlichem Vorozonierungsgrad. (Kultivierungsbedingungen: 28°C, 500 rpm, Begasung 1 vvm)

In der Abbildung 36 fallen zwei Effekte besonders deutlich auf. Allen Kultivierungen ist gemeinsam, dass es nach einem Anfangswert der Gesamtkonzentration der PAK zu einem schnellen Abfall und Wiederanstieg der Konzentrationen gekommen ist. Eine Erklärung dafür ist möglicherweise ein Abbau der leichter verstoffwechselbaren PAK in den ersten 6-12 Kultivierungsstunden, während die Gleichgewichtseinstellung und die Verteilung der PAK im Medium noch nicht abgeschlossen war. Während sich der PAK-Abbau wieder verlangsamte könnten von den Bakterien ausgeschiedene Tenside eine Erhöhung der Löslichkeit der PAK bewirkt haben, was den Wiederanstieg der Konzentrationen erklären würde.

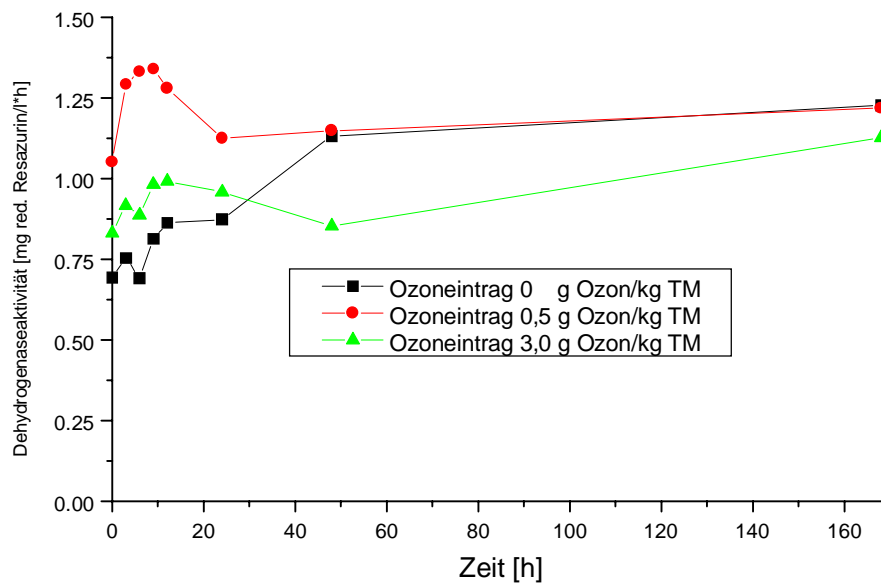
Die Abbauleistungen sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst und erlauben einen Überblick über den mikrobiologischen Schadstoffabbau.

Tab. 17 Daten des Schadstoffabbaus aus Vorozonierung in Kombination mit mikrobiologischen Abbau

Ozoneintrag [g Ozon/kg TM]	Mikrobiologischer PAK-Abbau [mg/kg TM]	Abbauraten des mikrobiologischen PAK-Abbaus [mg/kg TM·h]
0,0	170,7	1,02
0,5	239,4	1,43
3,0	185,8	1,11

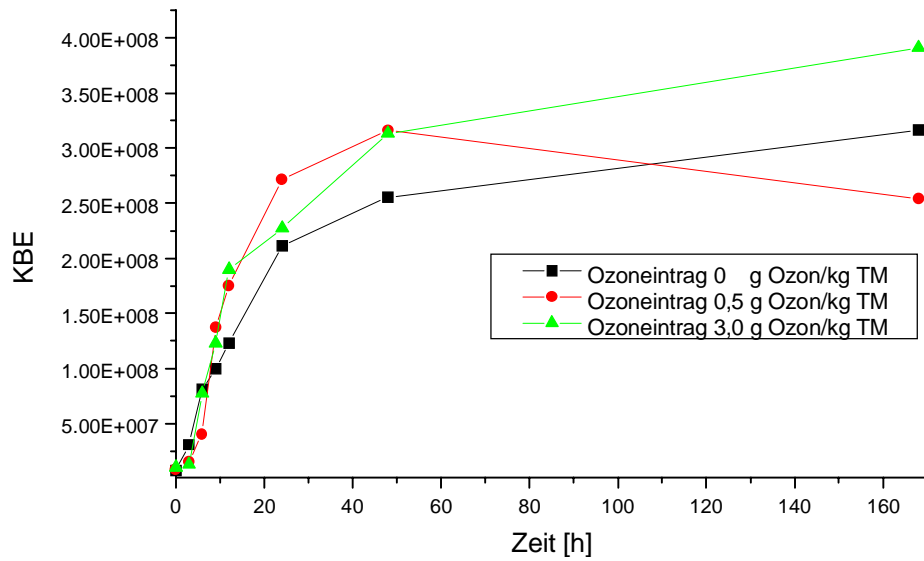
Betrachtet man den mikrobiologischen Abbau über den beobachteten Versuchszeitraum so konnte durch die Vorozonierung eine Steigerung der Abbauraten beobachtet werden. Ausgehend von nahezu gleichen Ausgangskonzentrationen wurden nach einer Vorozonierung etwas geringere Restkonzentrationen erreicht. Bei der kürzeren Vorozonierung mit einem Ozoneintrag von 0,5 g Ozon/kg TM war dieser Effekt deutlicher ausgeprägt, indem 239,4 mg PAK abgebaut wurden gegenüber 170,7 mg PAK/kg TM bei der Referenzkultivierung. Bei einem längeren vorhergehenden Ozoneintrag nahm die mikrobiologisch abgebaute PAK-Menge mit 185,8 mg PAK/kg TM wieder ab. Diese Ergebnisse sind jedoch mit Vorsicht zu interpretieren, da aufgrund des hohen Volumens während der Probenahmen alle Messwerte nur einfach bestimmt werden konnten. Inhomogenitäten während der Probenahme können daher nicht ausgeschlossen werden. Eine Verfälschung des Abbaus durch einen zu hohen Feststoffaustrag während der Kultivierung kann dagegen ausgeschlossen werden. Der Feststoff- und PAK-Austrag belief sich auf 1,5% der eingesetzten Bodenmasse.

Auffallend ist auch die geringe Auswirkung der Ozonierung auf den gesamten PAK-Gehalt des Bodens. Obwohl unter gleichen Bedingungen der Ozoneintrag in den Boden versechsfacht wurde, konnte sowohl zwischen den PAK-Gehalten der Böden mit einem Ozoneintrag von 0,5 und 3,0 g Ozon/kg TM als auch gegenüber dem unbehandelten Ausgangsmaterial kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Verlängerung der Ozonierung hat sich im Sinne einer weiteren Schadstoffabnahme nicht ausgewirkt. Ursachen für diese Beobachtung finden sich auch in der Dissertation von MÜLLER [MÜLLER, 2000]. Zum einen sind die PAK bei einer gealterten Altlast tief in die Bodenporen eingedrungen, was den Angriff durch das Ozon erschwert. Zum anderen liegen die PAK in Form kleiner Partikel, verklebt mit Teer und Sandkörnern vor. Eine Oxidation der PAK findet demnach nur an der Oberfläche dieser Partikel unter Bildung einer Produktschicht aus Oxidationsprodukten statt. Eine weitere Oxidation schreitet nur langsam oder gar nicht voran. Demnach ist ein weiterer Einsatz von Ozon nicht sehr effektiv, was sich in den oben aufgeführten Ergebnissen widerspiegelt.



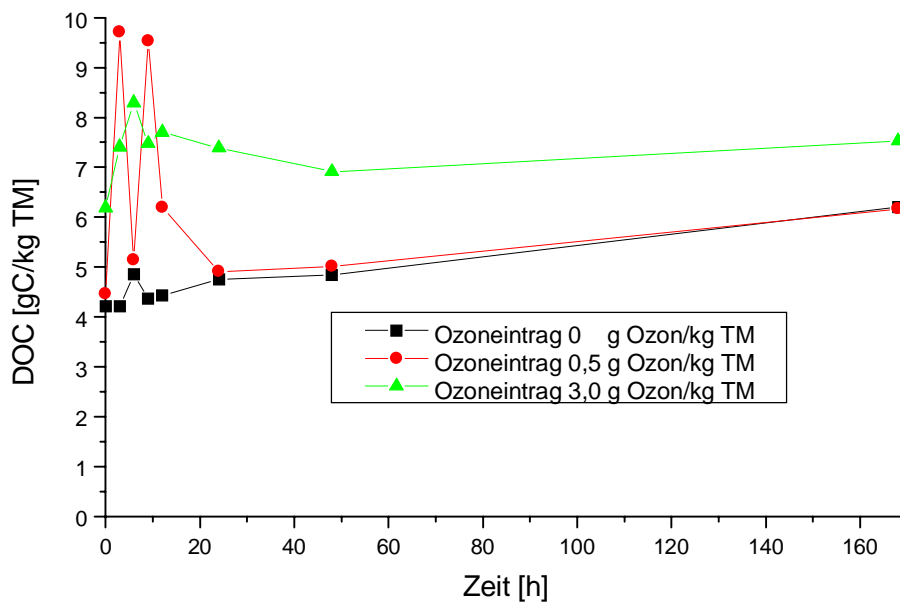
**Abb. 37** Dehydrogenaseaktivitäten während des PAK-Abbaus bei der Kultivierung in 10% Bodensuspension mit einer Mischkultur bei unterschiedlichem Vorozonierungsgrad.

Interessanterweise wiesen die Kultivierungen mit Vorozonierung des eingesetzten Bodens z. T. höhere Dehydrogenaseaktivitäten auf als die Kultivierungen ohne vorhergehenden Ozoneintrag. Die Ursache dafür ist möglicherweise ein größeres Substratangebot zu Beginn der Kultivierungen, das aus den Ozonierungsprodukten der PAK und der Huminstoffe des Bodens hervorgegangen ist. Offenbar kam die eingesetzte Bakterienmischkultur mit den vorliegenden Bedingungen nach einer Ozonierung des Bodens besser zurecht als die Reinkultur im Modellsystem. Allerdings ist anhand der PAK-Werte festzustellen, dass trotz gesteigerter Stoffwechselaktivität nur eine kleinere Steigerung des mikrobiologischen Abbaus erreicht worden ist.

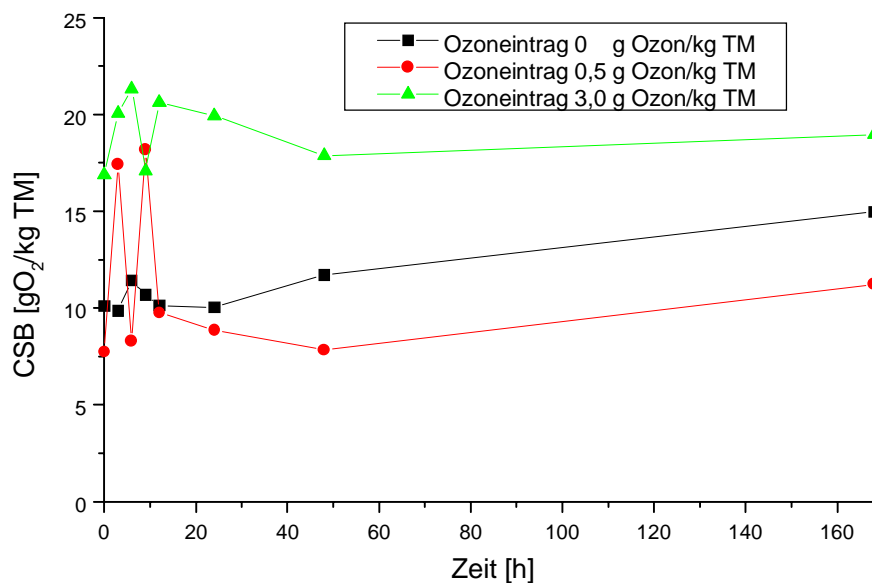


**Abb. 38** Kolonie bildende Einheiten KBE während des PAK-Abbaus bei der Kultivierung in 10% Bodensuspension mit einer Mischkultur bei unterschiedlichem Vorozonierungsgrad.

Die Entwicklung der Kolonie bildenden Einheiten wies keine großen Unterschiede auf. So war bei einem vorhergehenden Ozoneintrag eine geringfügig höhere KBE zu beobachten als bei der Referenzkultivierung. Wie anhand der KBE und der Dehydrogenaseaktivität gezeigt werden konnte, wirkte sich die Ozonierung in einem real kontaminierten Boden nicht auf die Lebendzellzahl und die mikrobielle Aktivität aus. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Beobachtungen der Reinkultur in einem huminstoffarmen Milieu wie z.B. Quarzsand, als auch einem kohlenstoffhaltigem Lößboden.



**Abb. 39** Verlauf des DOC während des PAK-Abbaus bei der Kultivierung in 10% Bodensuspension mit einer Mischkultur bei unterschiedlichem Vorozonierungsgrad.



**Abb. 40** Verlauf des CSB während des PAK-Abbaus bei der Kultivierung in 10% Bodensuspension mit einer Mischkultur bei unterschiedlichem Vorozonierungsgrad.

Die Voroxidation des Bodens mit Ozon führte zu einem Anstieg des gelösten organischen Kohlenstoff DOC und des chemischen Sauerstoffbedarf CSB zu Beginn der Kultivierungen. Die erhöhten Werte konnten im weiteren Kultivierungsverlauf wieder gesenkt werden, was im Fall des geringeren Ozoneintrags zu einem Absinken der Werte unterhalb des Niveaus der Referenzkultivierung geführt hat. Bei der Kultivierung mit einem vorhergehenden

Ozoneintrag von 3,0 g Ozon/kg TM waren die Gesamtwerte so hoch, dass dies nicht mehr gelang. Ein großer Teil des gelösten Kohlenstoffgehaltes blieb daher für die Mikroorganismen ungenutzt und wurde nur wenig weiter umgesetzt. Die bei der Mineralisierung entstandenen Kohlendioxidmengen lassen keine weiteren Rückschlüsse auf die Unterschiede bei der Umsetzung des organischen Materials zu und wurden hier nicht weiter berücksichtigt.

Die Ozonierung eines mit PAK belasteten Altlastbodens bewirkte keine signifikante Verringerung der Ausgangsbelastung des kontaminierten Bodens. Die Ursachen dafür liegen in der schlechten Zugänglichkeit der Schadstoffe durch Porendiffusionshemmung oder die Bildung einer hemmenden Produktschicht auf der Oberfläche der vorliegenden Teerpartikel. Eine geringe Verbesserung des anschließenden mikrobiologischen Abbaus der Ausgangsschadstoffe in Suspensionskultur konnte dennoch beobachtet werden. Im Gegensatz zu dem mikrobiologischen Abbau von Phenanthren auf Quarzsand oder Boden durch eine Reinkultur war nach vorhergehender Vorozonierung während der Kultivierung sowohl eine höhere KBE als auch eine höhere Dehydrogenaseaktivität der Mischkultur zu beobachten. Die Zunahme des DOC und CSB wies auf eine Erhöhung des Kohlenstoffangebotes durch die Ozonierung hin. Bei höherer Vorozonierung gelang jedoch nicht mehr dessen Reduktion unter die Anfangswerte. Ein Umsatz der aus der Ozonierung hervorgegangen Substanzen muss daher in Frage gestellt werden.

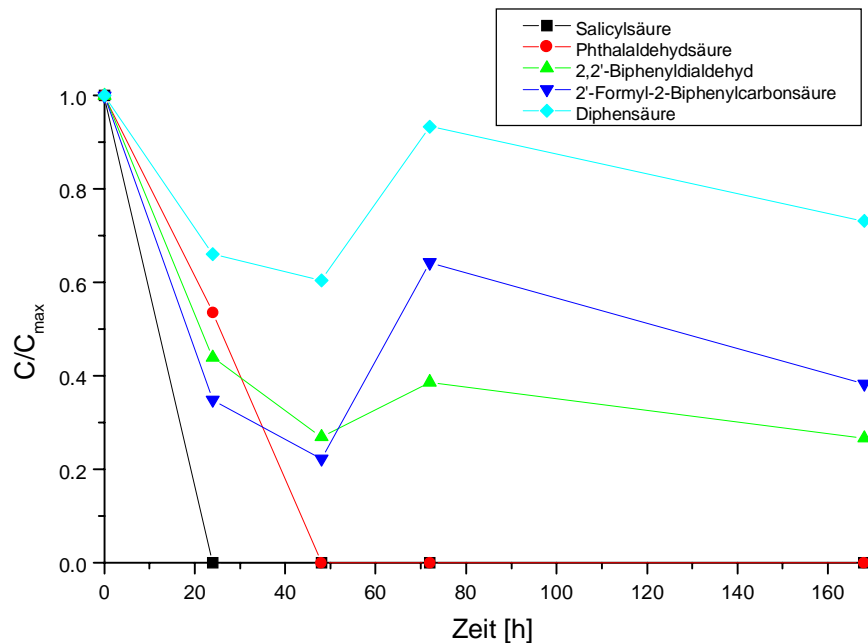
#### 4.6 Abbau von Ozonierungsprodukten des Phenanthrens durch *Sphingomonas yanoikuyae* DSM 6900 und eine Mischkultur

Die identifizierten Reaktionsprodukte des Modellschadstoffs Phenanthren wurden als Substrate bei Schüttelkulturen mit *Sphingomonas yanoikuyae* DSM 6900 und Mischkulturen eingesetzt, um deren mikrobiologische Abbaubarkeit zu untersuchen. Die Reinkultur *Sphingomonas yanoikuyae* DSM 6900 verfügt über die Abbaukapazität einer breiten Auswahl aromatischer Verbindungen (s.a. Theoretischer Teil), weshalb dieser Organismus für die Untersuchungen ausgewählt worden ist. Die Mischkultur sollte anhand der Selektionsbedingungen, unter welchen diese isoliert wurde, über eine breite Toleranz gegenüber den zu testenden Verbindungen verfügen. Es wurden insgesamt 8 Substanzen ausgewählt, die dem Medium in Konzentrationen von 100 mg/L zugegeben wurden. Der Konzentrationsverlauf während des Abbaus wurde mittels Kapillarelektrophorese bestimmt (s. Kap. 3.7.5). Der Vorteil der Bestimmung durch Kapillarelektrophorese liegt in dem direkten Nachweis der Substanzen aus dem verwendeten wässrigen Kultivierungsmedium. Eine aufwendige Extraktion und Derivatisierung entfällt auf diese Weise. Die Substanzen Phthalsäure, Trimellithsäure und 9,10-Phenanthrendion konnten dabei aufgrund ihrer großen Migrationszeiten und Bandenverbreiterungen bei der Detektion im UV-Licht nicht zufriedenstellend quantifiziert werden. Eine aussagekräftige Auswertung ließ sich nur bei den Substanzen Salicylsäure, Phthalaldehydsäure, 2,2'-Biphenyldialdehyd, 2'-Formyl-2-Biphenylcarbonsäure und Diphensäure durchführen. Es wurden sowohl Versuche mit der Zugabe von Einzelsubstanzen, als auch die Zugabe aller Substanzen gleichzeitig durchgeführt. Dabei zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Abbauleistungen. Bei der Zugabe aller Substanzen dauerte der Abbau nur geringfügig länger. Es wurde ebenfalls das Wachstum auf den Testsubstanzen als alleiniger Kohlenstoffquelle, als auch das Wachstum in Gegenwart von Glucose untersucht. Bei Wachstum auf Glucose ließen sich jedoch im Vergleich zum Abbau auf den Testsubstanzen als alleiniger Kohlenstoffquelle auch keine höheren Abbauraten durch einen möglichen kometabolischen Abbau beobachten. Hinweise auf Toxizität lieferte nur die Zugabe von 9,10-Phenanthrendion. Bei dessen Zugabe zu Glucose enthaltendem Medium wurde jegliches bakterielle Wachstum gehemmt, was anhand der optischen Dichte verfolgt werden konnte. Alle anderen Substanzen bewirkten keine Wachstumshemmungen. Die Ergebnisse der Messungen der optischen Dichte sind hier nicht dargestellt.

Dargestellt ist der Abbau 5 ausgesuchter Substanzen durch *Sphingomonas yanoikuyae* DSM 6900 und die gleiche Mischkultur, die auch bei den Abbauversuchen der PAK im Bioreaktor



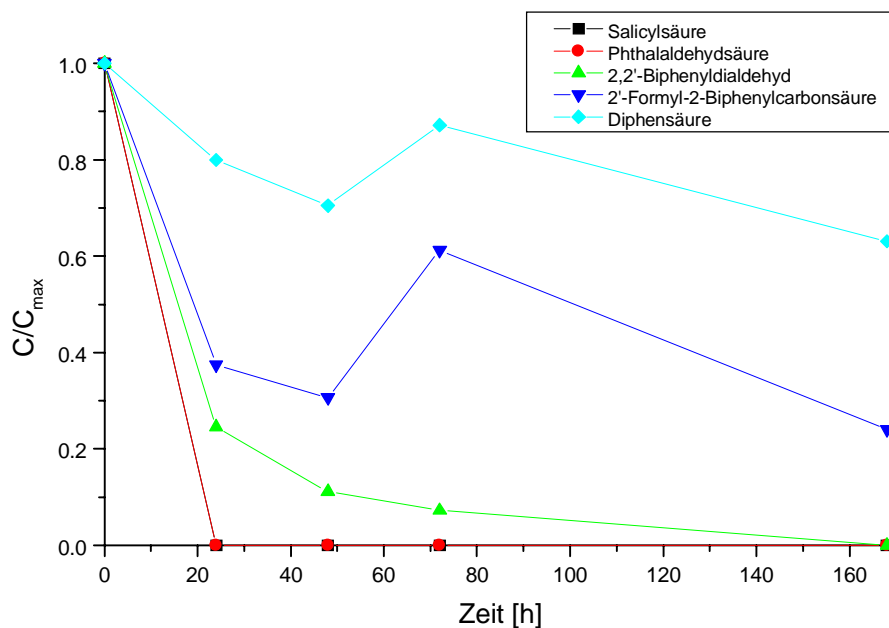
verwendet wurde. Da sich die reproduzierbare Einstellung der Ausgangskonzentrationen und deren Quantifizierung mittels Kapillarelektrophorese als schwierig erwies, wurden in der Darstellung relative Konzentrationsverhältnisse gewählt.



**Abb. 41** Mikrobiologischer Abbau von Ozonierungsprodukten des Phenanthrens durch *Spingomonas yanoikuyae* DSM 6900 in Schüttelkolben. Die Ausgangskonzentrationen betragen 100mg/L, die Inkubationsbedingungen 28°C, 120 rpm, 1 Woche.

Nur bei Salicylsäure und Phthalaldehydsäure ließ sich ein schneller quantitativer Umsatz innerhalb von 24-48 h feststellen. Bei 2,2'-Biphenyldialdehyd konnte ein sehr langsamer Abbau auf ca. 30% der Ausgangskonzentration ermittelt werden, während 2'-Formyl-2-Biphenylcarbonsäure auf ca. 40% der Ausgangsmenge abgebaut wurde. Bei der Diphensäure muss mit einem Restgehalt von ca. 80% ein Abbau deutlich in Frage gestellt werden. Der schnelle Abfall der Konzentrationen innerhalb der ersten 48 h könnte auch durch Adsorptionseffekte an die Kolbenwand oder der entstandenen Biomasse erklärt werden. Nach dem Eintreten der Bakterien in die Absterbephase könnte es dann zu einer erneuten Schadstoffmobilisierung ab der 72. h gekommen sein. Diese Fragestellung wurde jedoch nicht näher untersucht.

Der gleiche mikrobiologische Abbaueversuch wurde mit einer Mischkultur wiederholt. Dabei sollte gegenüber der Reinkultur ein umfangreicheres Abbauspektrum zu erwarten sein.



**Abb. 42** Mikrobiologischer Abbau von Ozonierungsprodukten des Phenanthrens durch eine Mischkultur in Schüttelkolben. Die Ausgangskonzentrationen betragen 100mg/L, die Inkubationsbedingungen 28°C, 120 rpm, 1 Woche.

Die Ergebnisse der Mischkultur unterscheiden sich nicht sehr von denen mit der Reinkultur. Salicylsäure und Phthalaldehydsäure ließen sich innerhalb von 24 h restlos abbauen. 2,2'-Biphenyldialdehyd wurde im Verlauf von einer Woche zwar nur langsam aber ebenfalls restlos abgebaut. Für 2'-Formyl-2-Biphenylcarbonsäure und Diphensäure gelten die gleichen Aussagen, die für die Diskussion der Reinkultur getroffen wurden. Ein Abbau verlief nur sehr langsam und muss für Diphensäure ganz in Frage gestellt werden. Das Absinken der Konzentrationen und der plötzliche Anstieg zur 72. h könnte auch hier durch Adsorptionseffekte und eine erneute Mobilisierung erklärt werden.

Die Fähigkeit zur Verwertung der angebotenen Ozonierungsprodukte des Phenanthrens als Substrate unterscheidet sich zwischen der Reinkultur und der Mischkultur nur wenig. Die einkernigen aromatischen Verbindungen Salicylsäure und Phthalaldehydsäure wurden sehr gut verstoffwechselt. Für Phthalsäure kann diese Aussage nur vermutet werden, da die Messung mittels Kapillarelektrophorese kein reproduzierbares Ergebnis ergab. Die funktionalisierten Biphenyle 2,2'-Biphenyldialdehyd, 2'-Formyl-2-Biphenylcarbonsäure und Diphensäure, die als primäre Reaktionsprodukte aus der Ozonolyse von Phenanthren hervortraten, ließen sich nur schwer von den verwendeten Bakterien abbauen. Einzig die Mischkultur war in der Lage das 2,2'-Biphenyldialdehyd vollständig abzubauen. Durch den

Angriff des Ozons wird die Molekülstruktur des Phenanthrens so verändert, dass die Bakterien möglicherweise über keine geeigneten Enzymsysteme verfügen, die entstandenen Primärprodukte schnell und effektiv abzubauen. Erst die weiteren Oxidationsprodukte wie z. B. Salicylsäure und Phthalaldehydsäure können in den Stoffwechsel eingebunden werden, da es sich dabei um Substanzen handelt, die ohnehin als Stoffwechselprodukte gebildet werden oder diesen Stoffen chemisch sehr ähnlich sind.

Phenanthrendion wirkte sowohl auf die Misch- als auch auf die Reinkultur toxisch. Über die Trimellithsäure konnte keine eindeutige Beobachtung gemacht werden.

Die Schlussfolgerung aus den beobachteten Ergebnissen ist die Notwendigkeit einer sehr weitgehenden Oxidation durch Vorozonierung, um gut verstoffwechselbare Produkte zu erzeugen. Eine geringe Vorozonierung wirkt sich dagegen kontraproduktiv auf den anschließenden mikrobiologischen Abbau aus.

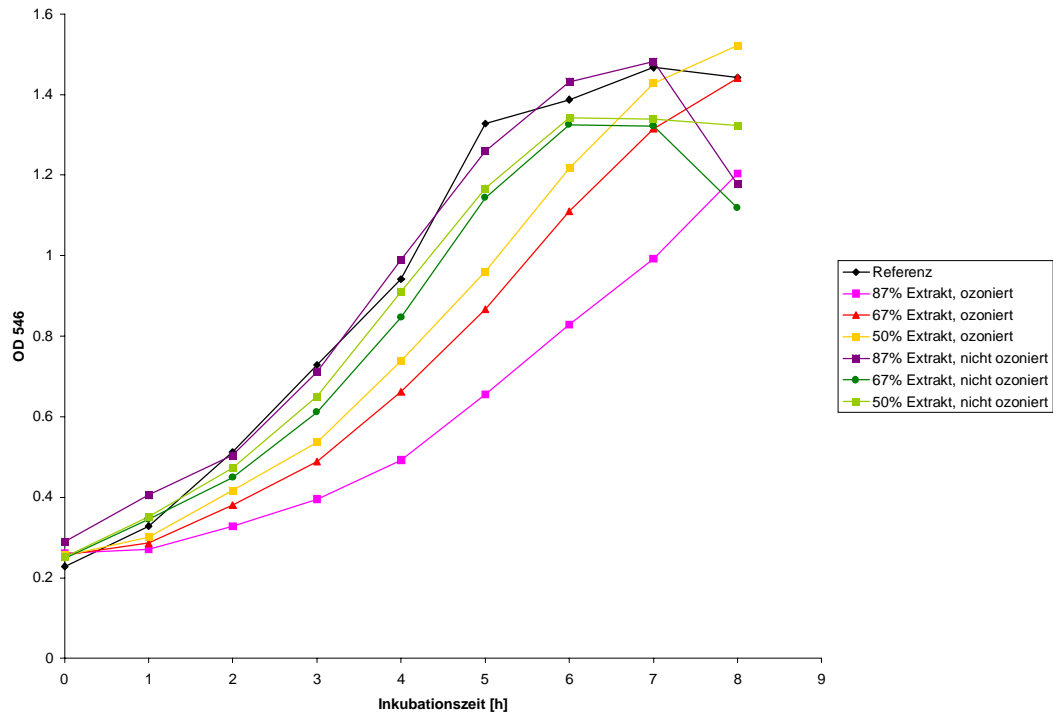
## 4.7 Toxizitätsuntersuchungen von wässrigen Bodenextrakten

### 4.7.1 Exponentielle Wachstumshemmtests in Flüssigkultur

Nachdem die Ergebnisse der Abbaubersuche schon auf inhibierende Effekte, ausgelöst durch die Ozonierung des Phenanthrens, hingewiesen haben, sollten auch allgemeine Toxizitätsuntersuchungen durchgeführt werden, um die Fragen der Ökotoxizität bezüglich einer Ozonbehandlung von PAK zu beantworten. Dabei stellte sich die Frage nach dem zu verwendenden Testorganismus, als auch nach der Beschaffenheit des Testgutes. Der zu testende Boden kann entweder direkt oder es kann ein wässriger Bodenextrakt für die Untersuchung verwendet werden. Da durch eine wässrige Extraktion immer nur ein Teil der im Boden vorliegenden Stoffe erfasst werden kann, ist der Einsatz des ganzen Bodens als Testgut vorzuziehen. Bei Untersuchungen, bei denen in Lösung mit Organismen oder Zellen gearbeitet wird, wie z. B. bei Wachstumshemmtests ist dies jedoch nicht möglich, da bei der Messung der Parameter wie Zellzahl, Optische Dichte oder Vitalität der Zellen immer in einem klarem Medium gearbeitet werden muss.

Daher wurden zu Beginn mit verschiedenen Mikroorganismen exponentielle Wachstumstests in Schüttelkolben durchgeführt, um einen geeigneten Mikroorganismus zu identifizieren, mit dem dann im weiteren Fortgang der Arbeiten Kontakttests an Boden, bzw. in Bodensuspension durchgeführt werden sollten. Für die Wachstumshemmtests wurden die Gattungen *Sphingomonas yanoikuyae*, *Bacillus subtilis* und das Mischkonsortium, das auch für die Abbaubersuche verwendet wurde ausgewählt.

Um den Einfluss der Huminstoffmatrix bei der Herstellung von wässrigen Extrakten zu unterbinden wurde bei den Vorversuchen, zwecks Auswahl eines Bakteriums für die weiteren Untersuchungen, mit ozoniertem Quarzsand gearbeitet. Für die Durchführung der Tests wurde Quarzsand mit Phenanthren kontaminiert, 15 min mit Ozon begast ( $25 \text{ g/m}^3$ , 30 l/h) und der Quarz anschließend mit Wasser im Verhältnis 1:2 (Quarz:H<sub>2</sub>O) 24 h extrahiert. Die Extrakte wurden sofort für die Tests verwendet. Bei der Durchführung des Tests wurden je 10 mL einer Vorkultur (OD 0,2 - 0,3) in sterile Schüttelkolben vorgelegt, Glucose, zehnfach konzentriertes Medium und die hergestellten wässrigen Extrakte in unterschiedlichen Anteilen zugegeben und bei 28°C und 120 rpm inkubiert. Die stündlich genommen Proben dienten zur Messung der optischen Dichte am Photometer und der Vitalität mittels Durchflussscytometrie.



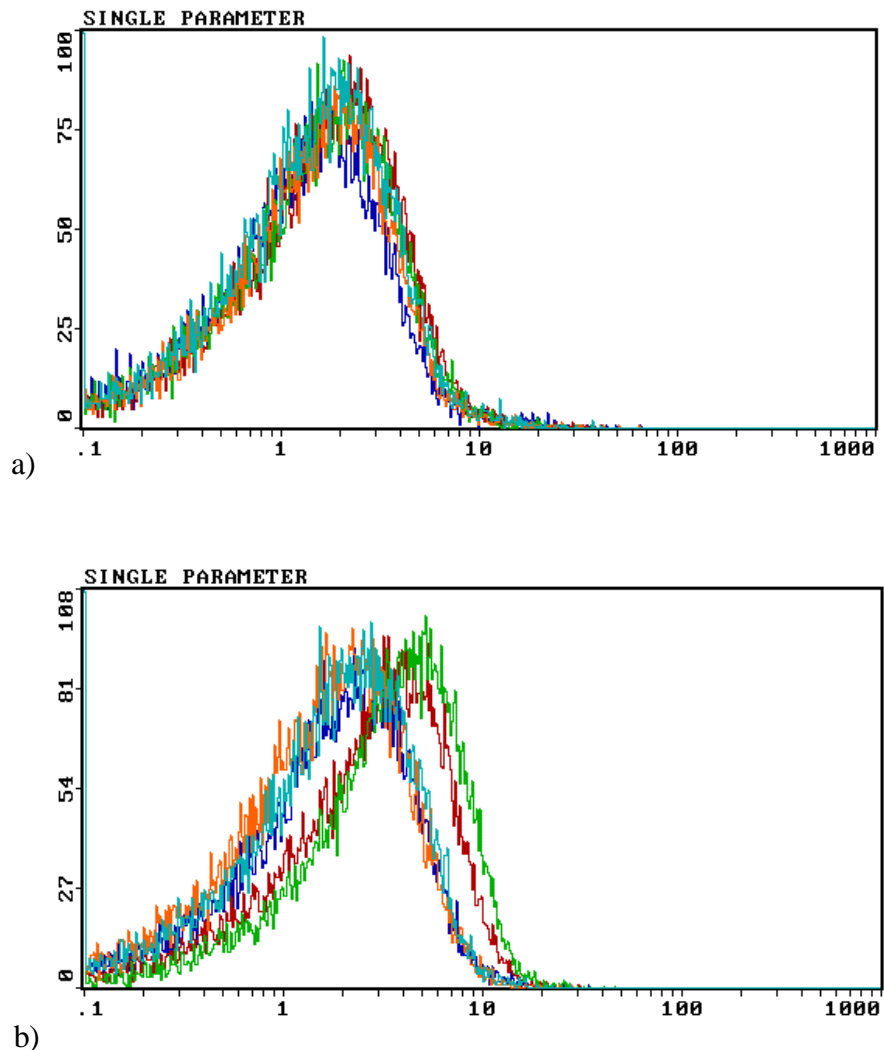
**Abb. 43** Verlauf der optischen Dichte von *S. yanoikuyae* in MM<sub>BRUN</sub> bei Wachstum auf Glucose unter Zusatz von verschiedenen Anteilen wässriger Quarzsandextrakte ozonierter und nicht ozonierter mit Phenanthren kontaminierter (1000 mg/kg TM) Quarzsandproben

Zur Kultur von *S. yanoikuyae* wurden wässrige Quarzsandextrakte in unterschiedlichen Anteilen zwischen 17 % und 87 % des Gesamtmediums (dargestellt in Abb. 43 nur 50% bis 87%) zugegeben. Die nicht ozonierten Extrakte führten zu keiner Beeinträchtigung des Wachstums. Das Wachstum verlief wie bei der ungestörten Referenz. Bei den ozonierten Extrakten war jedoch eine Inhibierung und Verlangsamung des Wachstums mit steigendem Extraktanteil ab einem Gehalt von 50% zu erkennen. Es zeigten sich verlängerte Lag-Phasen und ein späteres Erreichen der stationären Phase. Auf den Phenanthrenabbauer *S. yanoikuyae* wirkten sich die Ozonierungsprodukte in geringer Weise als wachstumshemmend aus. Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen der Abbauversuche.

Zusätzlich zu den bei den Abbauversuchen getesteten Ozonierungsprodukten müssen noch andere bisher nicht identifizierte Substanzen vorliegen, die für die Wachstumshemmungen verantwortlich sind. Viele dieser Substanzen konnten bisher nicht identifiziert werden, so liegen nach RYLL [RYLL, 1999] bis zu 6 Haupt- und 20 Nebenprodukte der Phenanthrenoxidation vor. Auch bei den eigenen Untersuchungen konnten bis zu 16 Substanzen entdeckt aber nur wenige identifiziert werden.

Es wurden zusätzlich Proben an einem Durchfluscytometer vermessen, um die Vitalität der Zellsuspensionen zu messen. Der besseren Übersichtlichkeit wegen wurden nur die höchsten beiden Konzentrationen an zugegebenen ozonierten, bzw. nicht ozonierten

Quarzsandextrakten dargestellt. Bei den noch geringeren Konzentrationen konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

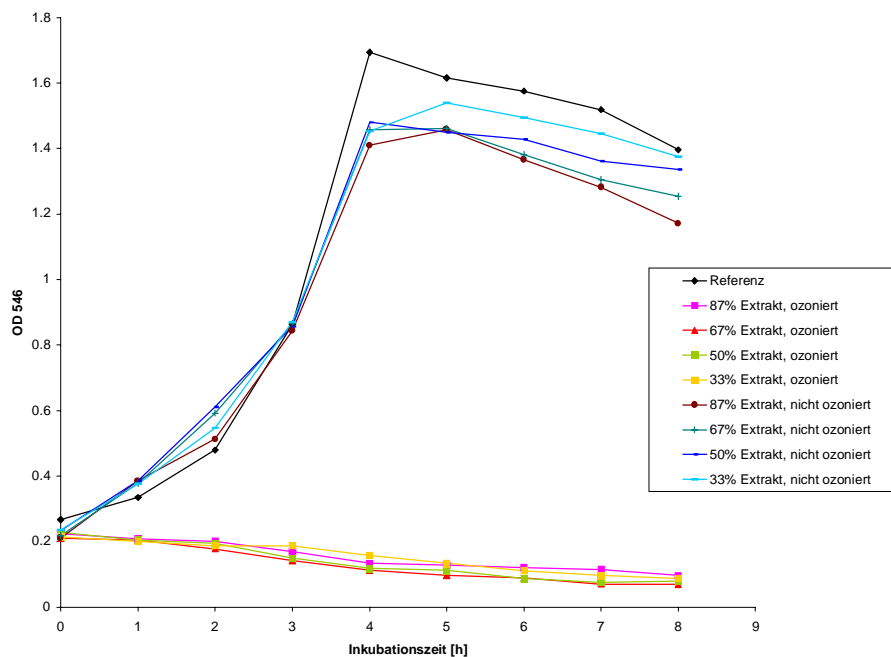


**Abb. 44** Bestimmung der Vitalität von *S. yanoikuyae* mittels Durchflussscytometrie. Auf der Ordinate liegen die relativen Fluoreszenzaktivitäten. Bei abnehmender Vitalität durch vermehrtes Auftreten von toten Zellen werden diese durch den Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid angefärbt und die Fluoreszenzintensität verschiebt sich nach rechts. Auf der Abzisse liegen die Häufigkeiten, bzw. relativen Zellzahlen. Die Darstellung stellt eine Gaußverteilung dar. Es wurde bei a) 0 h und b) 24 h gemessen.

Dunkelblau:	Referenz
Rot:	Anteil von 87% wässrigen Quarzsandextrakt am Medium, ozoniert
Grün:	Anteil von 67% wässrigen Quarzsandextrakt am Medium, ozoniert
Orange:	Anteil von 87% wässrigen Quarzsandextrakt am Medium, nicht ozoniert
Hellblau:	Anteil von 67% wässrigen Quarzsandextrakt am Medium, nicht ozoniert

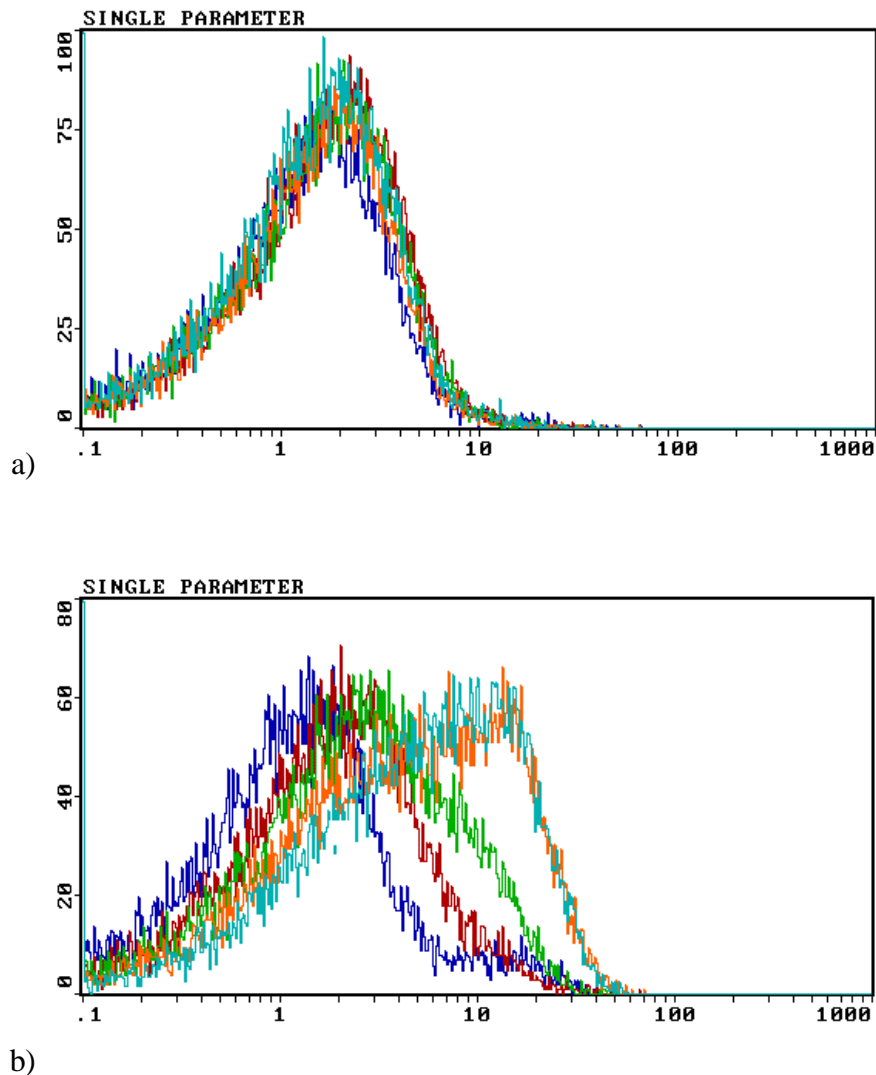
Die Vitalität von *S. yanoikuyae* nahm innerhalb von 24 h ab, was an der Verschiebung des Fluoreszenzmaximums nach rechts zu erkennen ist. Allerdings unterschieden sich die entsprechenden Werte der Vitalität zwischen Referenz, ozonierten und nicht ozonierten Ansätzen nur um wenige Prozent, was diese Methode nicht sehr geeignet erscheinen lässt den Einfluss der Ozonierung auf die Bakterienkultur zu untersuchen.

Der gleiche exponentielle Wachstumstest wurde mit einem weiteren Organismus, *B. subtilis* wiederholt.



**Abb. 45** Verlauf der optischen Dichte von *B. subtilis* in  $MM_{BRUN}$  unter Zusatz von verschiedenen Anteilen wässriger Quarzsandextrakte ozonierter und nicht ozonierter mit Phenanthren kontaminierter (1000 mg/kg TM) Quarzsandproben

Mit dem *B. subtilis* wurde ein Organismus eingesetzt, der zwar in Abwasser- und Bodenproben zu finden ist, jedoch keinen typischen PAK-Abbauer darstellt. Wie in Abb. 45 dargestellt, wirkte sich die Zugabe eines wässrigen Extraktes, der Ozonierungsprodukte des Phenanthrens enthält, auf das Wachstum in Form einer totalen Hemmung bei allen Konzentrationen aus. Dagegen wirkte sich ein wässriger Extrakt des Ausgangsschadstoffes Phenanthren nicht auf das Wachstum aus.



**Abb. 46** Bestimmung der Vitalität von *B. subtilis* mittels Durchflusszytometrie. Auf der Ordinate liegen die relativen Fluoreszenzaktivitäten. Bei abnehmender Vitalität durch vermehrtes Auftreten von toten Zellen werden diese durch den Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid angefärbt und die Fluoreszenzintensität verschiebt sich nach rechts. Auf der Abzisse liegen die Häufigkeiten, bzw. relativen Zellzahlen. Die Darstellung stellt eine Gaußverteilung dar. Es wurde bei a) 0 h und b) 24 h gemessen.

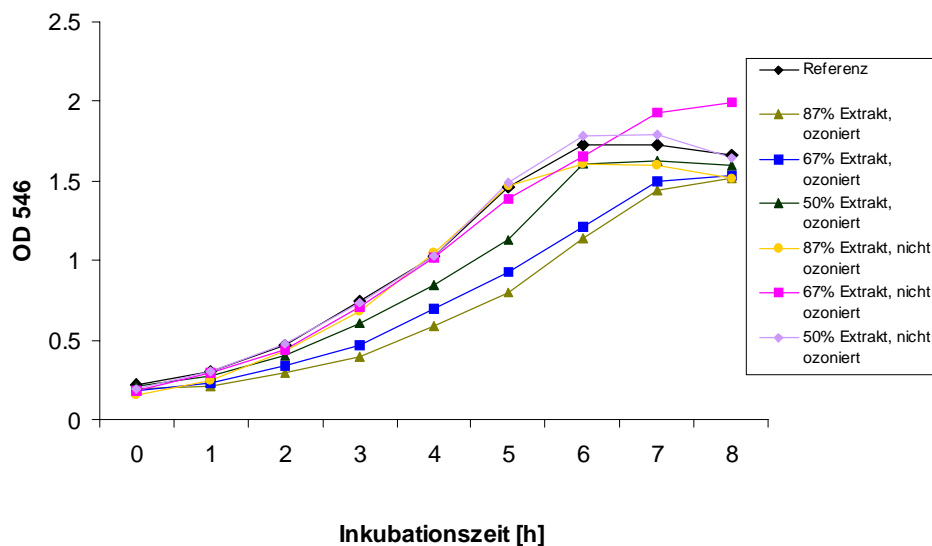
Dunkelblau:	Referenz
Rot:	Anteil von 87% wässrigen Quarzsandextrakt am Medium, ozoniert
Grün:	Anteil von 67% wässrigen Quarzsandextrakt am Medium, ozoniert
Orange:	Anteil von 87% wässrigen Quarzsandextrakt am Medium, nicht ozoniert
Hellblau:	Anteil von 67% wässrigen Quarzsandextrakt am Medium, nicht ozoniert

Bei den Messungen der Vitalität des *B. subtilis* mittels Durchflusszytometrie ergab sich, verglichen mit den Ergebnissen von *S. yanoikuyae*, ein umgekehrtes Ergebnis, nachdem die ozonierten Proben eine höhere Vitalität aufwiesen als die nicht ozonierten Ansätze. Bei allen Ansätzen nahm die Vitalität ab, jedoch war bei den nicht ozonierten Ansätzen eine deutlich höhere Vitalitätsabnahme festzustellen. Die in Abb. 46 dargestellten Wachstumskurven von *B. subtilis* ließen dieses Ergebnis jedoch als nicht plausibel erscheinen, da bei den ozonierten Ansätzen überhaupt kein Wachstum festzustellen war. Aufgrund dieser widersprüchlichen



Ergebnisse wurde auf weitere Messungen mit dem Cytometer verzichtet. Die Messung der Vitalität mittels Durchflusscytometrie bei Bakterien, deren Größenordnung zwischen 0,8 und 1,3  $\mu\text{m}$  und damit nur wenig über der Größenordnung des Wellenlängenbereichs des sichtbaren Lichts liegt, ist mit zu großen Ungenauigkeiten behaftet.

Das gleiche Experiment wurde auch mit einem Mischkonsortium durchgeführt, dass vormalig unter Bedingungen angezogen und isoliert worden ist, die denen des Wachstumshemmtests gleichen. Dabei war zu erwarten, dass das Wachstum eigentlich nicht durch die Ozonierungsprodukte des Phenanthrens beeinträchtigt werden sollte. Phenanthren und dessen Ozonierungsprodukte waren unter den Kultivierungsbedingungen der Anzucht dieses Konsortiums ständig zugegen.



**Abb. 47** Verlauf der optischen Dichte eines isolierten Mischkonsortiums in  $\text{MM}_{\text{BRUN}}$  unter Zusatz von verschiedenen Anteilen wässriger Quarzsandextrakte ozonierter und nicht ozonierter mit Phenanthren kontaminierter (1000 mg/kg TM) Quarzsandproben

Auch bei dem isolierten Mischkonsortium, das sowohl auf den Ausgangs- als auch den ozonierten Schadstoffen angezogen wurde, zeigte sich im exponentiellen Wachstumstest eine Wachstumshemmung (s. Abb. 47). So war die Hemmung in einer vergleichbaren Größenordnung wie bei *S. yanoikuyae* ab einem Extraktgehalt von 50% deutlich festzustellen. Die Lag-Phase verlängerte sich und die exponentielle Wachstumsphase verlief flacher als in der Referenz. Die bisherigen Ergebnisse lassen sich zu folgenden Aussagen zusammenfassen:

Die Ozonierungsprodukte des Phenanthrens, die unter den gewählten Versuchsbedingungen entstanden waren, üben auf die verwendeten Bakterien eine inhibierende Wirkung aus. Eine toxische Wirkung konnte auf *B. subtilis* und eine inhibierende Wirkung auf *S. yanoikuyae* und das Mischkonsortium gezeigt werden. Dabei wurde eine geringe Ozonierungszeit von 15

Minuten gewählt, was unter den schon genannten Bedingungen zu einem Ozoneintrag von 1,875g Ozon/kg TM oder anders ausgedrückt 1,875g Ozon/g Phenanthren geführt hat.

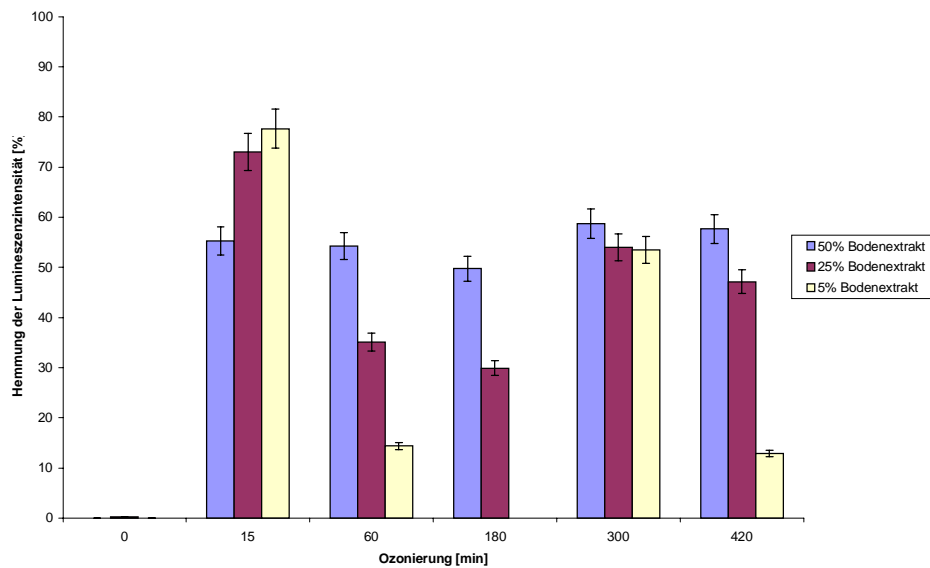
In Beziehung zu dem zeitlichen Verlauf der Entstehung unterschiedlicher Ozonierungsprodukte, wonach in den ersten 15 Minuten der Ozonierung in besonders hohen Konzentrationen die schlechter verstoffwechselbaren funktionalisierten Biphenyle entstanden sind, erscheinen diese Ergebnisse durchaus plausibel.

Eine Aussage über den zeitlichen Gang der Toxizität, die möglicherweise zu Beginn der Ozonierung ihren Höhepunkt findet und im weiteren Verlauf der Ozonierung mit zunehmender Degradation der primären Abbauprodukte zu einkernigen Aromaten wieder abnimmt, konnte mit diesen Experimenten nicht näher untersucht werden. Weitere Erkenntnisse darüber sollen durch Lumineszenztests von wässrigen Bodenextrakten mit *V. fischeri* und durch Kontakttests mit *B. subtilis* gewonnen werden.

#### **4.7.2 Hemmung der Lumineszenzaktivität von *Vibrio fischeri***

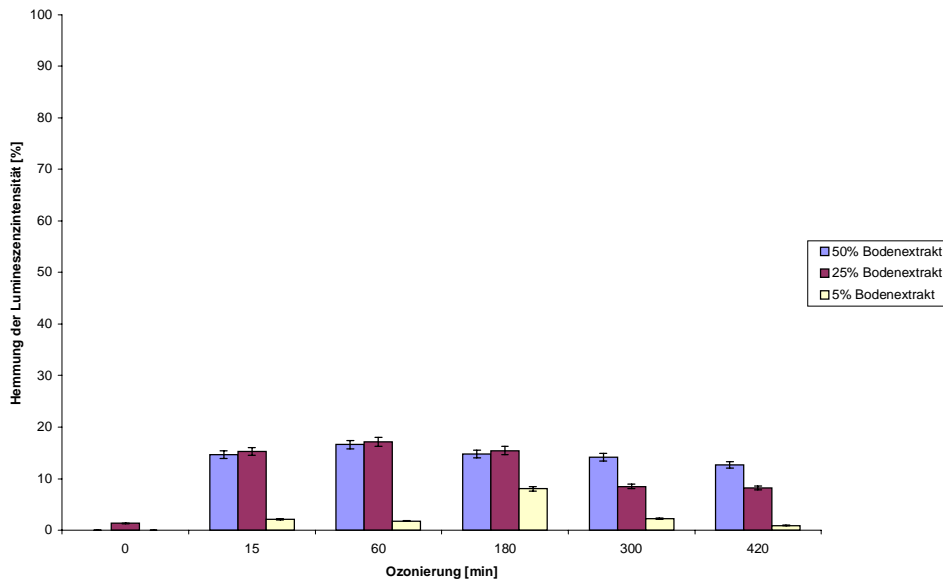
Gegenstand der Untersuchungen war der zeitliche Verlauf einer Hemmwirkung auf den aquatischen Mikroorganismus *Vibrio fischeri* durch wässrige Bodenextrakte, die aus ozonierten Bodenproben hergestellt wurden. *Vibrio fischeri* ist ein fakultativ anaerobes, Gram-negatives Stäbchen mit polarer Begeißelung. Als marines Bakterium ist es halophil und sein Einsatz in der Prüfung von Abwasser kann als Stand der Technik angesehen werden. Eine Übertragbarkeit auf Bodenextrakte sollte daher möglich sein, denn im Rahmen einer Bodensanierungsmaßnahme ist es von herausragendem Interesse, ob aus dem behandelten Boden schädliche Stoffe durch Regenwasser oder Grundwasser eluiert werden können. Messkriterium ist die bakterielle Leuchtintensität, die mit einem Lumineszenzphotometer gemessen wurde. Am Lumineszenzprozess ist ein Enzym beteiligt, die sogenannte Luciferase. Die den Lumineszenzprozess inhibierenden Substanzen inhibieren möglicherweise die Luciferase direkt oder es kommt zu einer Inhibierung der Luciferaseexpression, ohne dass das Zellwachstum beeinflusst sein muss [EBERHARD, 1971 und KEMPER UND HANSON, 1967]. Der zu prüfende Boden wurde über einen Zeitraum von 7 h in der gleichen Weise mit Ozon behandelt, wie in den Abbauxperimenten. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde eine Probe genommen und aus dieser ein wässriger Bodenextrakt hergestellt. Zu dem Mikroorganismen enthaltenden Testmedium wurden diese Extrakte in Anteilen von 50, 25 und 5% zugegeben. Getestet wurden drei verschiedene Böden. Zwei künstlich mit Phenanthren kontaminierte Böden, die sich hauptsächlich in ihrem Kohlenstoffgehalt unterschieden (Banteln und Braunschweig), sowie ein real kontaminierter Boden eines ehemaligen Gaswerkgeländes

(Karlsruhe). Die Ergebnisse sind in den drei folgenden Abbildungen dargestellt. Es wurde auch ein unkontaminierter Boden (Braunschweig) getestet, hierbei zeigten sich jedoch nur geringe Hemmungen der Leuchtintensitäten im Bereich von 5-6%, was nicht als signifikant angesehen werden kann. Die Ozonierung von Huminstoffen allein führte demnach zu keiner Steigerung der Toxizität der Bodenextrakte. Dieses Ergebnis wurde hier nicht grafisch dargestellt.



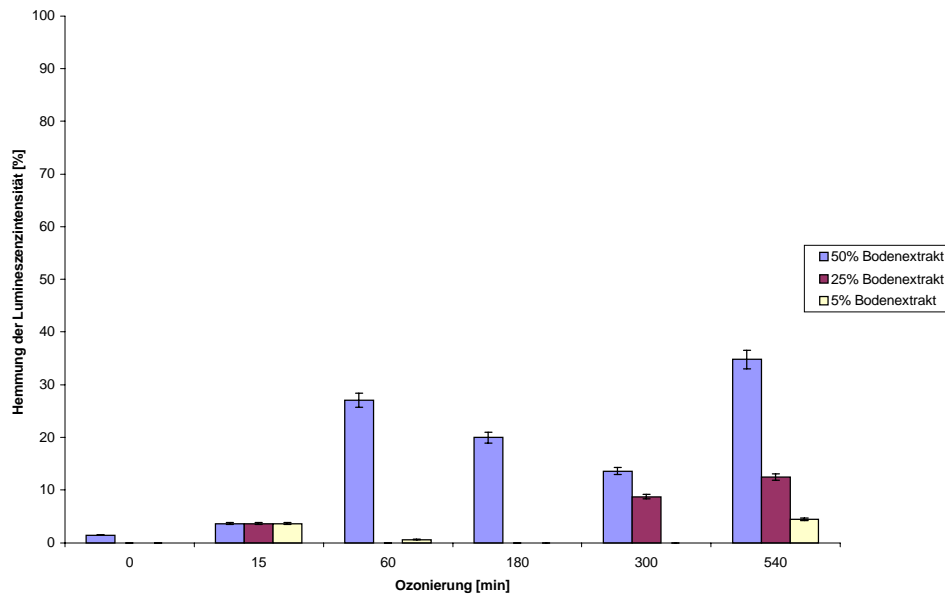
**Abb. 48** Hemmung der Lumineszenzintensitäten von *Vibrio fischeri* durch Bodenextrakte des mit Phenanthren kontaminierten Bodens aus Banteln. Die Bodenextrakte wurden in Anteilen von 50, 25 und 5% zum Testmedium zugegeben.

Der Boden aus Banteln zeichnet sich durch seinen geringen Huminstoffgehalt aus. Aus der Abb. 48 lässt sich anhand der geringeren Extraktkonzentrationen gut erkennen, dass nach 15 Minuten Ozonierung ein Maximum der Hemmwirkung erreicht wurde. Es folgte ein Abfall und ein erneuter Anstieg nach 300 Minuten Ozonierung. Möglicherweise waren bei 15 und 300 Minuten die Konzentrationen bestimmter hemmender Substanzen im Boden am höchsten.



**Abb. 49** Hemmung der Lumineszenzintensitäten von *Vibrio fischeri* durch Bodenextrakte des mit Phenanthren kontaminierten Bodens aus Braunschweig. Die Bodenextrakte wurden in Anteilen von 50, 25 und 5% zum Testmedium zugegeben.

Die Abb. 49 zeigt die Ergebnisse für den mit Phenanthren kontaminierten, huminstoffreicheren Boden aus Braunschweig. Im huminstoffreicheren Boden fiel die hemmende Wirkung der Bodenextrakte deutlich geringer aus, als beim Boden aus Banteln. Die Oxidation des Phenanthrens vollzog jedoch in beiden Böden in nahezu gleicher Weise und es entstanden auch die gleichen Ozonierungsprodukte in ähnlich großen Konzentrationen [MÜLLER, 2000 und SVENSSON, 2000]. Die Ozonierungsprodukte reagieren möglicherweise mit Huminstoffen und sind daher nicht mehr so gut mit Wasser extrahierbar wie im Boden aus Banteln. Das Maximum der Hemmwirkung wurde erst nach 60 Minuten, bzw. 180 Minuten erreicht, wenn man die 5% ige Extraktkonzentration betrachtet.



**Abb. 50** Hemmung der Lumineszenzintensitäten von *Vibrio fischeri* durch Bodenextrakte des real kontaminierten Bodens aus Karlsruhe (Gaswerkgelände). Die Bodenextrakte wurden in Anteilen von 50, 25 und 5% zum Testmedium zugegeben.

Die Bodenextrakte des real kontaminierten Bodens wiesen eine geringere Hemmwirkung auf als erwartet. Nur beim Anteil von 50% Bodenextrakt waren deutliche Hemmungen zu beobachten. Ein Maximum der Hemmung trat nach 60 Minuten auf. Nach einem Abfall der Hemmwirkung trat ein erneutes Maximum nach 540 Minuten Ozonierung auf, was auf das Entstehen neu auftretender Ozonierungsprodukte nach dieser Zeit schließen lässt. Die geringer konzentrierten Extrakte wiesen nur eine geringe Wirkung nach. Begleitend zu den Experimenten wurde auch eine PAK-Analytik durchgeführt. Aufgrund der nicht zu vernachlässigenden Agglomeratbildung während der Durchmischung des Teerpartikel enthaltenden und luftgetrockneten Bodens war auch die Oxidation der PAK durch Ozon in dieser Zeit nicht sehr weit fortgeschritten [MÜLLER, 2000 und SVENSSON, 2000]. Aus diesem Grund stieg auch die Extrahierbarkeit von oxidierten Substanzen mit Wasser nur langsam an.

Die Oxidation Phenanthren enthaltender Böden mit Ozon führte zu einer Erhöhung der Konzentration von Substanzen im Boden, die nach einer Extraktion mit Wasser zu einer Hemmung der Lumineszenzaktivität von *Vibrio fischeri* geführt haben. Im Lauf der ersten 15 bis 60 Minuten der Ozonierung wurde ein Maximum der Hemmwirkung durchlaufen. Je geringer der Huminstoffgehalt des Bodens ist, um so stärker wirkten sich die Ozonierungsprodukte aus, wie anhand der verwendeten Modellböden gezeigt werden konnte. Nach einem Abfall der Hemmung trat ein weiteres Maximum nach 300, bzw. 540 Minuten Ozonierung auf. Die Ozonierung von Huminstoffen bewirkte keine signifikante Steigerung

der Hemmung. Bei huminstoffreicheren Böden war dagegen am Modellschadstoff Phenanthren eine Abpufferung der Hemmwirkung gegenüber huminstoffarmen Böden zu beobachten.

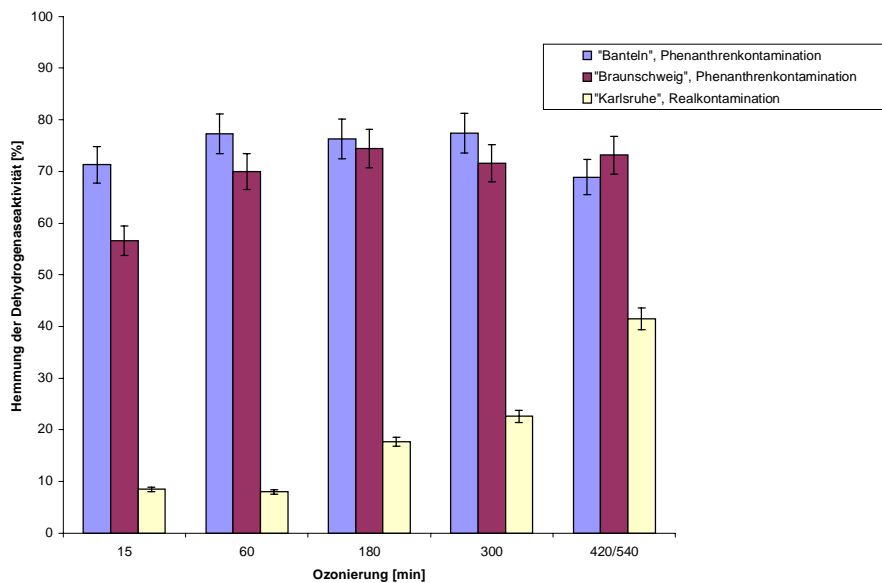
Die Ozonierung realer PAK-Kontaminationen führte entgegen der Erwartungen zu geringeren Hemmwirkungen als im künstlich kontaminierten Modellsystem. Eine Ursache dafür war möglicherweise die langsame Reaktion der vorliegenden PAK mit Ozon in der gealterten Kontamination.

## **4.8 Kontakttests mit Bodenmaterial zur Bestimmung der Toxizität**

### **4.8.1 Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität während eines Kontakttests mit *Bacillus subtilis***

Die Bestimmung von toxischen oder inhibierenden Wirkungen anhand von wässrigen Bodenextrakten stößt im Besonderen im Bereich der PAK belasteten Böden schnell an seine Grenzen. Die PAK sind kaum wasserlöslich und daher schlecht extrahierbar. Ein Vergleich der Toxizität zwischen Ausgangsschadstoff und Ozonierungsprodukt, welches meist besser wasserlöslich ist, ist daher kaum möglich, da im letzteren Fall nahezu immer eine Steigerung der Toxizität die Folge ist. Eine bessere Beurteilung dieser Fragestellung erlauben dagegen die Kontakttests mit festem Bodenmaterial oder Bodensuspensionen. Bei dieser Testvariante addieren sich die Effekte, die sowohl von an Bodenpartikeln gebundenen Substanzen als auch von in der wässrigen Phase gelösten Substanzen stammen. Für einen Kontakttest mit festen Bodenproben wurde daher eine Testvariante mit *Bacillus subtilis* in Bodensuspension ausgewählt. Dieser Mikroorganismus kommt sowohl in Böden, als auch in Abwässern vor. Es handelt sich dabei um einen aeroben Sporenbildner. Die Bodenproben, die über einen zeitlichen Verlauf während der Ozonierung genommen wurden, sind in der gleichen Weise ozoniert worden, wie im Kap. 4.7.2 bei den Lumineszenztests von *V. fischeri* beschrieben. Die Bodenproben wurden zusammen mit einem geeigneten Nährmedium und einem Inokulum aus einer Vorkultur 2 Stunden inkubiert. Als Messkriterium diente die Entfärbung des zugesetzten Farbstoffs Resazurin. An dieser Reaktion ist eine Dehydrogenase des Mikroorganismus beteiligt. Hemmende oder toxische Substanzen führen zu einer Verringerung der Dehydrogenaseaktivität, was aufgrund einer geringeren Entfärbung der Lösung photometrisch gemessen werden kann. Getestet wurden mit Phenanthren kontaminierte Böden aus

Braunschweig und Banteln, sowie ein real kontaminierter Boden aus Karlsruhe (Gaswerkgelände). Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

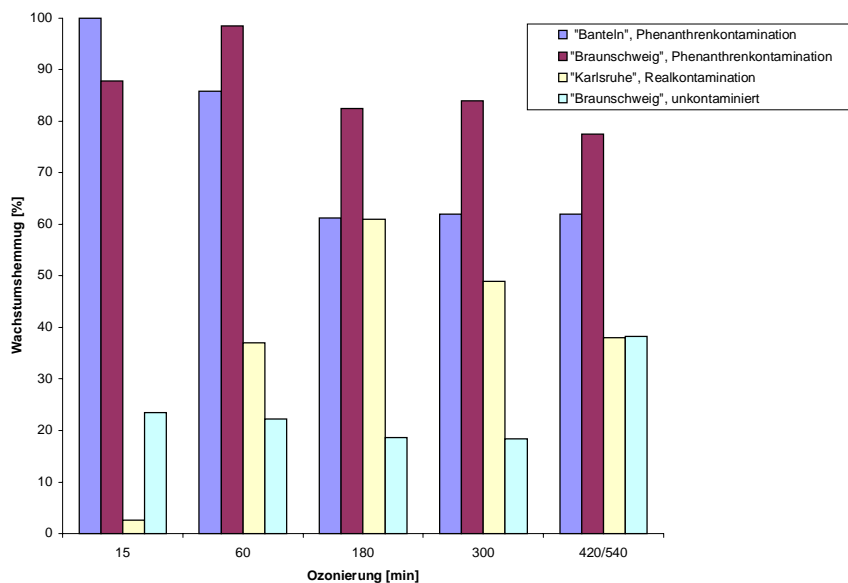


**Abb. 51** Hemmung der Dehydrogenaseaktivitäten von *Bacillus subtilis* im Kontakttest mit ozonierten Bodenproben. Alle Werte wurden in Doppelbestimmung ermittelt.

Nicht dargestellt sind die Ergebnisse mit ozonierten, unkontaminierten Boden, da hier keine signifikanten Hemmungen der Dehydrogenaseaktivität festgestellt werden konnten. Die Ozonierung von Huminstoffen führte demnach nicht zu den die Dehydrogenaseaktivität hemmenden Substanzen. Bei den mit Phenanthren kontaminierten Böden waren durchweg sehr hohe Hemmungen zu beobachten, die auch im Laufe der Ozonierung nur wenig geringer wurden. Im Vergleich zu den Untersuchungen wässriger Bodenextrakte durch *Vibrio fischeri* zeigten die Böden aus Banteln und Braunschweig auf *Bacillus subtilis* keine signifikanten Unterschiede im Kontakttest. Die Proben des real kontaminierten Bodens zeigten einen kontinuierlichen Anstieg der Hemmwirkung, was den Schluß zulässt, dass die Oxidation der PAK im Versuchszeitraum noch nicht beendet worden ist. Im Vergleich zu den Toxizitätstests mit wässrigen Bodenextrakten, die nur eine begrenzte Aussagekraft haben, war eine deutliche Steigerung der Hemmwirkung mit zunehmender Ozonierung zu beobachten. Die Ozonierung der PAK führte somit zu einer Steigerung der Toxizität. Im direkten Kontakt mit den Bodenpartikeln in der Suspension ist eine hemmende Wirkung demnach besser zu dokumentieren, als durch wässrige Bodenextrakte.

#### 4.8.2 Wurzellängentest mit *Lepidium sativum* L. (Gartenkresse)

Der Einfluss von Kontaminationen auf das Wachstum höherer Pflanzen kann durch die Bestimmung des Frischgewichts oder der Wurzellänge von *Lepidium sativum* L. erfolgen. Getestet werden in der Regel Abwässer oder wässrige Bodenextrakte. Bei den durchgeführten Untersuchungen sollte jedoch der Einfluss der Ozonierungsprodukte am festem Bodenmaterial direkt bestimmt werden. Als Parameter wurde das Wurzellängenwachstum gemessen. Die Bodenproben, die über einen zeitlichen Verlauf während der Ozonierung genommen wurden, sind in der gleichen Weise ozoniert worden, wie in den vorhergehenden Kap. 4.7.2 und 4.8.1 beschrieben. Es wurden immer zehn Kressesamen auf einer Petrischale ausgestreut, die mit ca. 15 g Boden bedeckt war und mit 4 mL Wasser angefeuchtet wurde. Getestet wurden mit Phenanthren kontaminierte Böden aus Braunschweig und Banteln, ein unkontaminierter Boden sowie ein real kontaminierter Boden aus Karlsruhe (Gaswerkgelände). Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung dargestellt [SVENSSON, 2000].



**Abb. 52** Hemmung des Wurzellängenwachstums von Gartenkresse in unterschiedlichen ozonierten Bodenproben. Auf Fehlerbalken wurde in der Darstellung verzichtet, da bei der Mittelwertbildung aus je zehn Samen Standardabweichungen von 20 bis 160 % auftreten konnten.

Interessanterweise führte auch die Ozonierung von unkontaminierten Boden aus Braunschweig zu einer Hemmung des Wurzelwachstums in Bereichen von 20 bis 40%. Bei den mit Phenanthren kontaminierten Böden waren die höchsten Hemmungen des Wurzelwachstums schon nach einer Ozonierung von 15, bzw. 60 Minuten zu beobachten. In der Folge sanken die Werte langsam ab, blieben jedoch immer höher als die des unkontaminierten Bodens. Das Wurzelwachstum der Kresse wurde demnach durch die



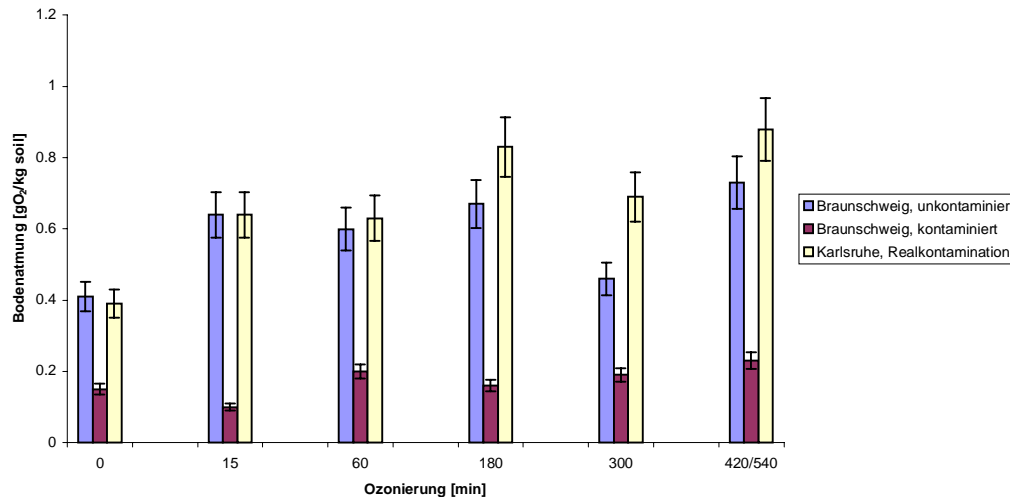
Ozonierungsprodukte des Phenanthrens deutlich gehemmt. Die Ozonierung des real kontaminierten Bodens führte zu einem Anstieg der Hemmung auf ein Maximum bei 180 Minuten. In der Folge nahmen die Werte jedoch wieder bis auf das Niveau des unkontaminierten Bodens ab. Die Reaktionsprodukte aus der Ozonierung der PAK üben demnach auch eine Hemmung auf das Wachstum von Pflanzen aus. Eine ausreichende Absenkung der Hemmwirkung war über den beobachteten Versuchszeitraum nicht möglich.

### **4.8.3 Beurteilung der Toxizität auf Bodenmikroorganismen durch Bestimmung der Bodenatmung**

Die „mikrobielle Aktivität“ im Boden umfasst alle biochemischen Stoffumsetzungen, die durch Mikroorganismen katalysiert werden. Bei aeroben Oxidationsprozessen sind diese Stoffumsetzungen immer mit einem Sauerstoffverbrauch und Kohlendioxidentwicklung verbunden. Im Boden ist eine Vielzahl von aeroben und anaeroben Mikroorganismen vorhanden. Zur Bestimmung der Aktivität der aeroben Bodenbakterien stehen Labormethoden zur Verfügung, die die Sauerstoffzehrung in einem geschlossenen System erfassen können. Als sogenannte Basalatmung bezeichnet man den gemessenen Sauerstoffverbrauch oder die Kohlendioxidbildung einer Bodenprobe ohne Zusatz von organischen Substanzen [ALEF, 1991 und 1994; SCHEFFER/SCHACHTSCHNABEL, 1979].

Für die Versuche wurde ein System der Fa. Aqualytik verwendet, dessen Prinzip auf der Messung der Druckdifferenz im geschlossenen System basiert. Sauerstoff wird verbraucht und das entstehende Kohlendioxid wird an einem Adsorber gefüllt mit Kaliumhydroxid gebunden. Daraus resultiert eine Druckdifferenz, die mit einem im Messkopf integrierten Manometer gemessen wird.

Ziel der Untersuchungen war die Frage, ob die Ozonierung der Böden einen Einfluss auf die Bodenatmung ausübt. Dazu wurde mit zwei Böden gearbeitet, von denen einer künstlich mit Phenanthren kontaminiert wurde und einem real kontaminierten Boden. Die Böden wurden in der gleichen Weise mit Ozon behandelt wie in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben. Da nach der Trocknung und Ozonierung der Böden kaum noch mit mikrobieller Aktivität gerechnet werden konnte, wurden die Bodenproben mit Mineralmedium (Brunner) auf einen Wassergehalt, der 60% der Wasserhaltekapazität entsprach, angefeuchtet und mit einer Mischkultur auf eine Zellzahl von  $2 \cdot 10^7$  Zellen/g TM angeimpft. Diese Zellzahl entspricht in ihrer Größe ungefähr der Menge an natürlich vorkommenden Aerobiern in ungesättigten Bodenzonen. Verglichen wurden die Aktivitäten des kontaminierten und des unkontaminierten Bodens durch Probenahmen über den Zeitraum der Ozonbehandlung.



**Abb. 53** Bodenatmung nach 4 Tagen bei 20°C in Boden aus Braunschweig (unkontaminiert und Phenanthren kontaminiert, beide 420 Minuten ozoniert) und Karlsruhe (Realkontamination, Gaswerkboden, 540 Minuten ozoniert).

Bei allen drei Böden war ein ähnlicher Trend zu beobachten, mit steigender Ozonierungsdauer auch erhöhte Bodenatmungsaktivitäten zu zeigen. Es kann vermutet werden, dass die zugegebenen Mikroorganismen in den ozonierten Bodenproben ein größeres Substratangebot, bzw. eine bessere Verfügbarkeit des vorhandenen Substratangebotes vorgefunden haben. In der Folge waren höhere Atmungsaktivitäten zu beobachten. Im Gegensatz zu den Abbauversuchen in Suspensionskultur scheinen die Mikroorganismen am festem Boden durch die Ozonierung nicht nachhaltig negativ beeinflusst worden zu sein.

Nicht erklärbar ist der große Unterschied der Atmungsaktivitäten zwischen dem mit Phenanthren kontaminierten und dem unkontaminierten Boden aus Braunschweig. Es erscheint nicht plausibel wodurch die Atmungsaktivität auf die Hälfte reduziert werden konnte, wenn Phenanthren im Boden vorlag. Hier zeigte sich die schlechte Vergleichbarkeit der drei einzelnen Versuche, da für jeden Versuch ein neuer Ansatz zur Bodenbefeuchtung und zum Animpfen des Bodens hergestellt werden musste. Aufgrund mangelnder Kapazitäten waren die Messungen auf 12 Proben beschränkt, was nur die Messung der Proben eines Versuches in Doppelbestimmung pro Messreihe erlaubte. Auf diese Weise wurden alle Versuche nacheinander durchgeführt, was durchaus zu unterschiedlichen Ausgangsbedingungen geführt haben konnte. Die Ergebnisse sind daher mit Vorsicht zu interpretieren.

## **5 Zusammenfassung und Ausblick**

Das Ziel einer modernen Sanierungsmethode, von Schadstoffen wie z.B. den PAK, ist die Verbesserung des mikrobiologischen Abbaus und der Bioverfügbarkeit der Schadstoffe. Die verfolgte Strategie beinhaltete eine Voroxidation der PAK in Böden durch Ozon und einen anschließenden mikrobiologischen Abbau. Gegenstand der Untersuchungen waren die Analytik der entstandenen Ozonierungsprodukte des Modellschadstoffs Phenanthren, der Verlauf des mikrobiologischen Abbaus der PAK, bzw. des Phenanthrens sowie dessen Ozonierungsprodukte. Eine Auswahl von Toxizitätsuntersuchungen sollten die Auswirkungen der Ozonierung auf verschiedene Organismen aufklären.

Durch Untersuchungen der Ozonierung des Modellschadstoffs Phenanthren konnten mindestens 16 Substanzen als Reaktionsprodukte erkannt und 7 Produkte durch Derivatisierung und gaschromatographische Analyse sicher identifiziert werden. Im Reaktionsverlauf des Phenanthrens mit Ozon führte der erste Reaktionsschritt zu einer Ringöffnung des Phenanthrenrings. Zu Beginn der Ozonierung wurden 2,2'-Biphenyldialdehyd, 2'-Formyl-2-Biphenylcarbonsäure, 2,2'-Biphenylcarbonsäure (Diphen-säure) in hohen Konzentrationen und vermutlich auch Phenanthrendion in geringerer Konzentration gebildet. Diese Substanzen zeichnen sich durch das Biphenylringsystem mit Erhalt der Aromatizität der vormaligen äußeren Ringe des Phenanthrens aus. Durch die Carbonyl- und Carboxylgruppen ist der weitere Angriff des Ozons auf das aromatische System gehemmt. Aufgrund dessen wurden die zu Beginn der Ozonierung erreichten, hohen Konzentrationen der primären Reaktionsprodukte nur langsam zugunsten der Bildung der sekundären, monoaromatischen Reaktionsprodukte abgebaut. Zu diesen zählen Salicylsäure, Phthalaldehydsäure, Phthalsäure und Trimellithsäure.

Es konnten 4 weitere Ozonierungsprodukte vermutet werden, die durch die analytischen Untersuchungen nicht eindeutig bestätigt werden konnten. Dazu zählen Xanthon, 9,10-Phenanthrendion, 2'-Hydroxy-2-Formylbiphenyl und Biphenyl-2-Carbonsäure.

Durch die Anwendung der 2-D-Fluoreszenzspektroskopie wurden Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit durchgeführt. Anhand der Intensitätsverläufe der Phenanthrenfluoreszenz während der Kultivierungen in Bodensuspension ließ sich erkennen, dass eine geringere Voroxidation zu einer Erhöhung der Phenanthrenfluoreszenz und damit auch zu einer Erhöhung der Phenanthrenkonzentration im Medium geführt hat. Der Effekt der

Phenanthrenmobilisierung überwog die Verringerung des Phenanthrens durch Oxidation. Die stärkere Reduzierung des Phenanthrengehalts bei weitergehender Ozonierung auf nur noch einen geringen Teil der Ausgangsmenge war jedoch schon so gravierend, dass der Effekt einer Schadstoffmobilisierung durch den starken oxidativen Abbau neutralisiert wurde. In der Folge sank die Phenanthrenfluoreszenz in den Kultivierungsüberständen wieder deutlich ab. Die Ozonierung bewirkte eine unselektive Oxidation der Huminstoffe zu kleineren Huminstoffbruchstücken. Diese Huminstoffmoleküle verfügten über eine verbesserte Löslichkeit in Wasser, was auch anhand der Zunahme des DOC und einer bräunlichen Verfärbung des verwendeten Mineralmediums zu beobachten war. Phenanthrenmoleküle, die an die Huminstoffe gebunden oder adsorbiert waren, gingen möglicherweise ebenfalls mit in Lösung und konnten fluoreszenzspektroskopisch detektiert werden, was zu einer Erhöhung der Fluoreszenzintensität geführt hat. Eine kurze Einwirkung des Ozons, die nur zu geringen Voroxidationsraten führte, hat demnach eine Erhöhung der Bioverfügbarkeit bewirkt.

Der mikrobiologische Phenanthrenabbau durch die Reinkultur *Sphingomonas yanoikuyae* DSM 6900 in Quarzsandsuspension verlief nach vorhergehender Vorozonierung deutlich langsamer. Die Restwerte an nicht umgesetzten Phenanthren im Kultivierungsverlauf blieben mindestens genauso groß oder sogar größer im Vergleich zur Kultivierung ohne Vorozonierung. Die nicht weiter umsetzbaren Restwerte wurden zudem auch erst zu einem späteren Zeitpunkt erreicht. Bezüglich der Dehydrogenaseaktivität und der KBE war eine deutliche Hemmung der mikrobiologischen Aktivität mit steigender Vorozonierung festzustellen. Wie die Werte von DOC, CSB und die Mineralisierungsrate zu Kohlendioxid zeigen konnten, war eine weitere Verstoffwechselung der aus der Ozonierung von Phenanthren hervorgegangenen Substanzen nicht weiter oder nur unvollständig möglich.

Eine Vorozonierung des Phenanthrens am Modellsystem Boden führte im Vergleich zu den Abbauversuchen auf Quarzsand nicht zu einer Verlangsamung des mikrobiologischen Phenanthrenabbaus durch *Sphingomonas yanoikuyae* DSM 6900 in Suspensionskultur. Die Unterschiede zum mikrobiologischen Abbau ohne Vorozonierung waren jedoch nicht sehr signifikant. Die Stoffwechselaktivität der Bakterien wurde dennoch durch die Vorozonierung beeinflusst. Die Dehydrogenaseaktivitäten lagen bei der Kultivierung ohne Vorozonierung um das drei- bis fünffache höher als es nach einer Vorozonierung der Fall war. Bei den Kultivierungen mit Vorozonierung wurde das Wachstumsmaximum mit den höchsten Lebendzellzahlen (KBE) schon nach 18 Kultivierungsstunden durchlaufen, während dies bei

der Referenzkultivierung erst nach 48 Kultivierungsstunden der Fall war. Dies lässt sich auf einen möglichen Substratmangel zurückführen, wonach durch die Ozonolyse des Phenanthrenrings schon die Angriffspunkte des mikrobiologischen Stoffwechsels vorweggenommen wurden und Substanzen entstanden sind, die sich nicht in den Stoffwechsel einbinden lassen. Eine Hemmung des Enzymsystems der Dehydrogenasen durch ein bestimmtes Ozonierungsprodukt kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Der DOC und CSB ergaben ebenfalls Hinweise darauf, dass trotz des durch die Ozonierung hervorgerufenen zusätzlichen Kohlenstoffangebotes im Medium dieses nicht weiter umgesetzt wurde. So war mit der Vorozonierung ebenfalls eine Abnahme der absoluten Kohlendioxidproduktion zu beobachten.

Die Ozonierung eines mit PAK belasteten Altlastbodens bewirkte keine signifikante Verringerung der Ausgangsbelastung des kontaminierten Bodens. Um Probleme bei der Ozonierung des Bodens durch Aggregatbildung zu umgehen, wurde nur mit getrockneten und gesiebten Böden gearbeitet. Dennoch war die Reduzierung des PAK-Gehaltes durch die Ozonierung nicht sehr effektiv. Die Ursachen dafür lagen vermutlich in der schlechten Zugänglichkeit der Schadstoffe durch Porendiffusionshemmung oder die Bildung einer hemmenden Produktschicht auf der Oberfläche der vorliegenden Teerpartikel. Eine geringe Verbesserung des anschließenden mikrobiologischen Abbaus in Suspensionskultur mit erhöhten Abbauleistungen konnte dennoch beobachtet werden. Im Gegensatz zu dem mikrobiologischen Abbau von Phenanthren auf Quarzsand oder Boden war nach vorhergehender Vorozonierung während der Kultivierung sowohl eine etwas höhere KBE als auch eine leicht erhöhte Dehydrogenaseaktivität der Mischkultur zu beobachten. Die Zunahme des DOC und CSB wies auf eine Erhöhung des Kohlenstoffangebotes durch die Ozonierung hin. Während des mikrobiologischen Abbaus gelang jedoch keine Reduktion des hohen CSB und DOC unter deren Anfangswerte, wenn zuvor eine Vorozonierung des Bodens durchgeführt wurde. Ein Umsatz der aus der Ozonierung hervorgegangenen Substanzen blieb aufgrund der Komplexität des Schadstoffgemisches schwierig zu beurteilen, auch wenn die Mischkultur mit den vorliegenden Bedingungen besser zurechtkam als die Reinkultur im Modellsystem.

Die Fähigkeiten zur Verwertung der identifizierten und angebotenen Ozonierungsprodukte des Modellschadstoffs Phenanthren als Substrat für den mikrobiologischen Abbau in Flüssigkultur unterschieden sich zwischen der Reinkultur *Sphingomonas yanoikuyae* DSM

6900 und der Mischkultur nur wenig. Die einkernigen aromatischen Verbindungen Salicylsäure und Phthalaldehydsäure wurden sehr gut verstoffwechselt. Vermutlich traf dies auch auf Phthalsäure zu, dessen Messung mittels Kapillarelektrophorese jedoch Schwierigkeiten bereitete. Die funktionalisierten Biphenyle 2,2'-Biphenyldialdehyd, 2'-Formyl-2-Biphenylcarbonsäure und Diphensäure, die als primäre Reaktionsprodukte aus der Ozonolyse von Phenanthren hervortraten, ließen sich nur schwer von den verwendeten Bakterien abbauen. Einzig die Mischkultur war in der Lage das 2,2'-Biphenyldialdehyd über den Zeitraum von einer Woche vollständig abzubauen. Durch den Angriff des Ozons wurde die Molekülstruktur des Phenanthrens möglicherweise so verändert, dass die Bakterien über keine geeigneten Enzymsysteme verfügen, die entstandenen Primärprodukte schnell und effektiv abzubauen. Erst die weiteren Oxidationsprodukte wie z. B. Salicylsäure und Phthalaldehydsäure konnten in den Stoffwechsel eingebunden werden, da es sich dabei um Substanzen handelte, die ohnehin als Stoffwechselprodukte gebildet wurden oder diesen Stoffen chemisch sehr ähnlich waren. Die Schlussfolgerung aus den beobachteten Ergebnissen ist die Notwendigkeit einer sehr weitgehenden Oxidation durch Vorozonierung, um verstoffwechselbare Produkte zu erzeugen. Eine geringe Vorozonierung wirkte sich dagegen kontraproduktiv auf den mikrobiologischen Abbau aus. Obwohl durch eine geringe Voroxidation die Bioverfügbarkeit des Ausgangsschadstoffs erhöht wurde, konnten einige entstandene primäre Ozonierungsprodukte des Phenanthrens im Vergleich zum Ausgangsschadstoff nur sehr langsam oder gar nicht abgebaut werden. Ähnliche Beobachtungen machten auch andere Autoren bei dem mikrobiologischen Abbau stabiler Ozonide, die aus der Ozonolyse von Benzo[e]pyren und Benzo[k]fluoranthren hervorgegangen sind [SCHULZ, 1998].

Erste Aussagen zur Toxizität der Ozonierungsprodukte des Modellschadstoffs Phenanthren sollten mit Hilfe exponentieller Wachstumstests von Bodenbakterien gewonnen werden.

Die Ozonierungsprodukte des Phenanthrens, die unter den gewählten Versuchsbedingungen bei der Ozonierung innerhalb von 15 Minuten entstanden waren, schienen auf die Reinkultur *S. yanoikuyae* DSM 6900 und das Mischkonsortium eine geringe inhibierende Wirkung zu haben, wenn diese Stoffe in höherer Konzentration im Medium vorlagen. Eine toxische Wirkung konnte dagegen auch bei niedrigen Konzentrationen auf *B. subtilis* beobachtet werden.

In Beziehung zu dem zeitlichen Verlauf der Entstehung unterschiedlicher Ozonierungsprodukte, wonach in den ersten 15 Minuten der Ozonierung in besonders hohen

Konzentrationen die schlechter verstoffwechselbaren funktionalisierten Biphenyle entstanden, erscheinen diese Ergebnisse durchaus plausibel.

Eine Aussage über den zeitlichen Gang der Toxizität, die möglicherweise zu Beginn der Ozonierung ihren Höhepunkt findet und im weiteren Verlauf der Ozonierung mit zunehmender Degradation der primären Abbauprodukte zu einkernigen Aromaten wieder abnimmt, konnte mit diesen Experimenten nicht näher untersucht werden.

Aussagen über den zeitlichen Verlauf der Toxizität konnten mit Untersuchungen an *Vibrio fischeri*, *Bacillus subtilis* und *Lepidium sativum* gewonnen werden.

Die Oxidation Phenanthren enthaltender Böden mit Ozon führte zu einer Erhöhung der Konzentration von Substanzen im Boden, die nach einer Extraktion mit Wasser zu einer Hemmung der Lumineszenzaktivität von *Vibrio fischeri* geführt haben. Dabei wurde zu Beginn der Ozonierung ein Maximum in der Hemmung der Lumineszenzintensität durchlaufen. Je geringer der Huminstoffgehalt des Bodens war, um so stärker haben sich die Ozonierungsprodukte ausgewirkt, wie anhand der verwendeten Modellböden gezeigt werden konnte. Es konnte beobachtet werden, dass diese Hemmwirkung auf die Ozonierung von Phenanthren oder PAK zurückgeführt werden konnte. Die Ozonierung von Huminstoffen allein bewirkte keine signifikante Steigerung der Hemmung. Bei huminstoffreicheren Böden war dagegen am Modellschadstoff Phenanthren eine Abpufferung der Hemmwirkung gegenüber huminstoffarmen Böden zu beobachten. Entgegen den Erwartungen fielen die aufgezeigten Hemmungen der Lumineszenzintensitäten bei dem ozonierten real kontaminierten Boden geringer aus. Möglicherweise spiegelte sich darin der langsame und schon diskutierte Reaktionsfortschritt der gealterten PAK-Kontamination wieder. Eine weitere Ursache könnte aber auch eine schlechte Extrahierbarkeit von Ozonierungsprodukten aus der hydrophoben Teermatrix sein.

Im Dehydrogenase-Kontakttest von *Bacillus subtilis* führte die Ozonierung von Huminstoffen nicht zu einer Hemmung der Dehydrogenaseaktivität. Bei den mit Phenanthren kontaminierten Böden waren dagegen sehr hohe Hemmungen zu beobachten, die auch im Laufe der Ozonierung nur wenig verringert wurden. Im Vergleich zu den Untersuchungen wässriger Bodenextrakte durch *Vibrio fischeri* zeigten die verwendeten Böden aus Banteln und Braunschweig auf *Bacillus subtilis* keine signifikanten Unterschiede im Kontakttest. Die Proben des real kontaminierten Bodens bewirkten einen kontinuierlichen Anstieg der Hemmwirkung, was den Schluß zulässt, dass die Oxidation der PAK im Versuchszeitraum

noch nicht beendet worden ist. Im Vergleich zu den Toxizitätstests mit wässrigen Bodenextrakten, die nur eine begrenzte Aussagekraft haben, war eine deutliche Steigerung der Hemmwirkung mit zunehmender Ozonierung zu beobachten. Die Ozonierung der PAK führte somit zu einer Steigerung der Toxizität. Im direkten Kontakt mit den Bodenpartikeln in der Suspension ist eine hemmende Wirkung demnach besser zu dokumentieren, als durch wässrige Bodenextrakte, da die quantitative Erfassung aller vorliegenden Substanzen durch eine wässrige Extraktion möglicherweise nicht vollständig ist.

Die Auswirkung der Ozonierung von PAK in Böden auf höhere Pflanzen wurde mit Wurzellängentests von *Lepidum sativum* durchgeführt. Interessanterweise führte auch die Ozonierung von unkontaminierten huminstoffhaltigen Boden zu einer Hemmung des Wurzelwachstums in Bereichen von 20 bis 40%. Bei den mit Phenanthren kontaminierten Böden sind die höchsten Hemmungen des Wurzelwachstums von 80-100% schon nach einer Ozonierung von 15, bzw. 60 Minuten zu beobachten. In der Folge sanken die Werte langsam ab, blieben jedoch immer höher als die des unkontaminierten Bodens. Das Wurzelwachstum der Kresse wurde demnach durch die Ozonierungsprodukte des Phenanthrens deutlich gehemmt. Die Ozonierung des real kontaminierten Bodens führte zu einem langsameren Anstieg der Hemmung auf ein Maximum bei 180 Minuten. In der Folge nahmen die Werte jedoch wieder bis auf das Niveau des unkontaminierten Bodens ab. Die Reaktionsprodukte aus der Ozonierung der PAK übten demnach auch eine Hemmung auf das Wachstum von Pflanzen aus. Eine ausreichende Absenkung der Hemmwirkung durch fortschreitende Ozonolyse war über den beobachteten Versuchszeitraum nicht möglich gewesen.

Die Auswirkung der Ozonierung von PAK auf eine Bakterienpopulation in festem Bodenmaterial wurde anhand der Atmungsaktivität (Basalatmung) untersucht. Bei allen getesteten Böden war ein ähnlicher Trend zu beobachten, mit steigender Ozonierungsdauer auch eine erhöhte Bodenatmungsaktivität aufzuweisen. Es kann vermutet werden, dass die zugegebenen Mikroorganismen in den ozonierten Bodenproben ein größeres Substratangebot, bzw. eine bessere Verfügbarkeit des vorhandenen Substratangebotes vorgefunden haben. In der Folge waren höhere Atmungsaktivitäten zu beobachten. Im Gegensatz zu den Abbauversuchen in Suspensionskultur schienen die Mikroorganismen am festem Boden durch die Ozonierung nicht nachhaltig negativ beeinflusst worden zu sein. Allerdings zeigte sich die schlechte Vergleichbarkeit der einzelnen Versuche, da für jeden Versuch ein neuer Ansatz zur Bodenbefeuchtung und zum Animpfen des Bodens hergestellt werden musste. Aufgrund mangelnder Kapazitäten waren die Messungen auf 12 Proben beschränkt, was pro Messreihe



nur die gleichzeitige Messung der Proben eines Versuches in Doppelbestimmung erlaubte. Auf diese Weise wurden alle Versuche nacheinander durchgeführt, was durchaus zu unterschiedlichen Ausgangsbedingungen geführt haben konnte. Die Ergebnisse sind daher nicht sehr eindeutig und nur vorsichtig zu interpretieren.

Bisher konnte durch Untersuchungen an künstlich mit Phenanthren kontaminierten Böden als auch an real kontaminierten Boden keine eindeutige Verbesserung des Schadstoffabbaus in Suspensionskultur festgestellt werden. Bei den Phenanthrenkontaminationen waren gleich gute oder schlechtere Abbauleistungen zu beobachten wenn mit einer Reinkultur gearbeitet wurde. Am real kontaminierten Boden ist der mikrobiologische Abbau durch eine Mischkultur gleich gut oder besser wenn eine Vorozonierung durchgeführt wurde.

Die Ursachen für mögliche Verschlechterungen des Abbaus lagen möglicherweise in toxischen oder inhibierenden Eigenschaften der aus der Ozonierung hervorgegangenen Oxidationsprodukte, was anhand der bisherigen Toxizitätsuntersuchungen gezeigt werden konnte. Die Untersuchungen mit einer Reinkultur haben den schadhafte Einfluss sehr gut aufgezeigt, den die Ozonierung auf ein einzelnes Bakterium haben konnte. Die bessere Anpassungsfähigkeit einer Mischkultur konnte diese Einflüsse jedoch kompensieren, was die Vitalität und Stoffwechselaktivität angehen. Daraus ließ sich jedoch nicht automatisch ein verbesserter mikrobiologischer Abbau der Ozonierungsprodukte folgern, wie diese Untersuchungen zeigen konnten.

Die Abbauuntersuchungen an ausgewählten, identifizierten Ozonierungsprodukten des Phenanthrens konnten die Schwierigkeiten beim mikrobiologischen Abbau, sowohl durch eine Rein- als auch eine Mischkultur deutlich belegen. Demnach muss eine Voroxidation mit Ozon soweit fortgeführt werden, bis mindestens monoaromatische Verbindungen entstanden sind, die einem mikrobiologischen Abbau auch zugänglich sind. Es konnte gezeigt werden, dass die primären Oxidationsprodukte aus der Ozonolyse des Phenanthrens schlechter abbaubar waren als der Ausgangsschadstoff und z.T. nicht quantitativ mikrobiell umgesetzt werden konnten.

Die Voroxidation fördert den Gesamtabbau nicht signifikant und eine Totaloxidation mit Ozon wäre nur sinnvoll, wenn das Ozon wirtschaftlicher hergestellt werden und die Reaktion der PAK mit Ozon effektiver geführt werden könnte. Bezüglich weiterer Untersuchungen zur Oxidation von PAK in Böden durch Ozon sei auf die Dissertation von Müller verwiesen [MÜLLER, 2000], die ebenfalls im gleichen Zeitraum am Institut für Technische Chemie der Universität Hannover entstand.

Eine Ozonbehandlung des Bodens erscheint demnach als nicht sehr effektiv und wirtschaftlich nicht sinnvoll.

Ein Feststoffreaktorverfahren zur Behandlung von PAK in Böden durch Ozon beinhaltet verfahrenstechnische Probleme und hohe Kosten. Zudem stellt die Aggregatbildung fester Bodenpartikel besonders bei feuchtem Boden ein bisher ungelöstes Problem dar, welches die Austauschfläche Gas/Feststoff verkleinert. Eine weitere Schwierigkeit bereiten Altlastböden, bei denen die PAK in Form von mit Bodenkörnern fest verklebten Teerpartikeln vorliegen. Eine vollständige Oxidation der Schadstoffe ist in diesem Fall nicht möglich. Die Kombination eines mikrobiologischen Mietenverfahrens mit einer Feststoffbehandlung durch Ozon ist daher sowohl weder wirtschaftlich noch verfahrenstechnisch sehr effektiv. Dabei ist es auch nicht von Bedeutung, ob erst eine Voroxidation mit Ozon mit anschließender mikrobiologischer Mietentechnik oder der umgekehrte Verfahrensablauf angedacht ist. Die aufgezeigten Schwierigkeiten der Toxizität und der verschlechterten Abbaubarkeit der Ozonierungsprodukte bei unvollständigem Oxidationsgrad stellen eine Kombination mit mikrobiologischen Methoden ohnehin in Frage.

Ein alternativer physikalisch-chemischer Ansatz könnte vielleicht die Kombination von Bodenwaschverfahren mit einer Ozonierung des Waschwassers, bzw. der erhaltenen Bodenfeinkornsuspension darstellen. So könnte durch die Ozonolyse in wässriger Lösung bei ausreichend niedrigen pH-Werten durch die Bildung von Hydroxylradikalen eine schnellere und effektivere Oxidation der ausgewaschenen Schadstoffe erzielt werden.

Der Vergleich der Ozonierung festen Bodenmaterials und der Ozonierung einer Bodensuspension wäre ebenfalls ein interessanter Ansatzpunkt. Inwieweit hier eine Diffusionslimitierung der Reaktion durch gelöstes Ozon auftreten kann müsste näher untersucht werden. Durch die schnelle unselektive Reaktion der in wässriger Lösung ebenfalls gebildeten Hydroxylradikale ließe sich die Oxidation der PAK jedoch ebenfalls schwer steuern. Ob sich hier eine Kombination mit mikrobiologischen Methoden anbietet, müsste ebenfalls geprüft werden. Die Probleme der Bildung von schlecht verstoffwechselbaren Oxidationsprodukten sind jedoch auch hier zu erwarten.

## 6 Literaturangaben

ALEF, K.

Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie

Ecomed Verlagsgesellschaft Landsberg, 1991

ALEF, K.

Biologische Bodensanierung, Methodenbuch,

Die Deutsche Bibliothek-CIP-Einheitsaufnahme, Weinheim, 1994

AL JUHASZ, BRITZ M. L., STANLEY G. A.

Evaluation of a creosote-based medium for the growth and preparation of a PAH-degrading bacterial community for bioaugmentation

Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (2000), 24, 277-284

ANNWEILER A., RICHNOW H. H., ANTRANIKIAN G., HEBENBROCK S., GARMS C., FRANKE S.,  
FRANCKE W., MICHAELIS W.

Naphtalene Degradation an Incorporation of Naphthalen-Derived Carbon into Biomass by the Thermophile *Bacillus thermoleovorans*

Applied and Environmental Microbiology, 2000, Vol. 66, No. 2, p. 518-523

ARNDT S.,

Schnelle Wirkungsprüfung potenzieller Therapeutika auf Proliferation und Stoffwechsel mit Hilfe durchflußcytometrischer Messungen

Diplomarbeit, Universität Hannover, 1998

BEHRENDT J., HINTZE H., SEKOULOV I.

Behandlung von Prozesswässern der Altlastensanierung sowie von kontaminiertem Feinkorn mit Ozon im Sprühreaktor. Probleme und Lösungen

Neue Techniken der Bodenreinigung, Hamburger Berichte Band 10, S. 15, 1996

BOWERS A.R., CHO S.H., SINGH A.,

Chemical Oxidation of Aromatic Compounds: Comparison of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KMnO<sub>4</sub> and O<sub>3</sub> for Toxicity Reduction and Improvements in Biodegradability,

Chemical Oxidation: Technologies For The Nineties, Vol.3,pp.11-25, 1993

BRINKMANN D.,

Untersuchungen zum mikrobiologischen Abbau von Diesel-Hauptbestandteilen und polyaromatischen Kohlenwasserstoffen und deren On-line-Analyse in einem Drehrohrreaktor

Dissertation, Universität Hannover, 1996

Erschienen in: VDI Verlag GmbH Düsseldorf 1996, ISBN 3-18-3 16315-2

BYUNG-DAE LEE, MASAOKI HOSOMI, AKIHIKO MURAKAMI

Fenton Oxidation With Ethanol To Degrade Anthracen Into Biodegradable 9,10-Anthrachinon: A Pretreatment Method For Anthracen-Contaminated Soil

Wat. Sci. Tech. Vol., Vol. 38, No. 7, pp. 91-97, 1998

CASTALDI F. J., BOMBAUGH K. J., MCFARLAND B.

Thermophilic Slurry-Phase Treatment of Petroleum Hydrocarbon Waste Sludges  
Microbial Processes for Bioremediation, 1995, Vol. 8, P. 231-251

In: Third Int. In Situ and On-Site Bioreclamation Symp., San Diego, April 1995

CALVOSA L., MONTEVERDI A., RINDONE B., RIVA G.,

Ozone Oxidation of Compounds Resistant To Biological Degadation,

Wat. Res., Vol. 25, No. 8, pp.985-993, 1991

CERNIGLIA C. E.

Microbial Transformation of aromatic hydrocarbons

In: Atlas R. M., Petroleum Microbiology

Macmillan Publishing Company, New York, London 1984

CERNIGLIA C. E., WHITE G. L., HEFLICH R. H.

Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons

Arch. Microbiol. 143, pp. 105-110, (1985)

CERNIGLIA C.E., CAMPBELL W. L., FU P. P., FREEMAN J. P.,EVANS F. E.

Stereoselective fungal mechanism of methylated anthracens

Appl. Environm. Microbiol. 56, pp. 6661-668, (1990)

CERNIGLIA C. E.

Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons

Biodegradation 3: 351-368, 1992

CHEN C.T.,

Assessment of the Applicability of Chemical Oxidation Technologies for the Treatment of Contaminants at Leaking Underground Storage Tank Sites,

Chemical Oxidation: Technologies For The Nineties, Vol.3,pp.225-248, 1993

CUNO M.,

Kinetische Untersuchungen zum biologischen Abbau von Mineralölen und polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen

Dissertation, Universität Berlin, 1995

Erschienen: VDI Verlag Düsseldorf, 1996, ISBN 3-18-314815-3

CZESCHKA K.,

Einfluss von Starterkulturen und Tensiden auf den Abbau von Kohlenwasserstoffen in Bodenfestbettreaktoren

Dissertation, TU Braunschweig, 1995

EBERHARD, A., (1971)

Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis

Journal of Bacteriology, Vol. 109, No. 3, p. 1101-1105

EBERIUS M., BERNS A., SCHUPHAN I.,

Ozonation of pyrene and benzo[a]pyrene in silica and soil – <sup>14</sup>C-mass balances and chemical analysis of oxidation products as a first step to ecotoxicological evaluation,

Fresenius J. Anal. Chem., (1997) 359:274-279

ESCHENBACH A., WIENBERG R., MAHRO B.

Bildung und Langzeitstabilität von nicht extrahierbaren PAK-Rückständen im Boden

Altlastenspektrum 1997, 6, 292-297

ETRICH B.,

Chemisch-technische Untersuchungen zur Ozonbehandlung von Feststoffen am Beispiel

Teer-kontaminierter Böden,

Dissertation, Forschungszentrum Karlsruhe, 1996

FEITKENHAUER H., HEBENBROCK S., TERSTEGEN L., SCHNICKE S., SCHÖB T., MEYER M.,

MÜLLER B., ANTRANIKIAN G., MÄRKL H.

Bodenreinigung mit thermophilen Mikroorganismen

Neue Techniken der Bodenreinigung, Hamburger Berichte Band 10, S. 15, 1996

FREUDENBERG A., NIEBELSCHÜTZ H.

Untersuchungen zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit von PAK in Böden

Altlasten Spektrum 04/1997, S. 160

FRITSCH W.

Abbau von Mineralölkohlenwasserstoffen und polyzyklischen aromatischen

Kohlenwasserstoffen

In: Innovative Techniken der Bodensanierung

Spektrum Akademischer Verlag, 1999, S. 22-41

Gebrauchsanleitung Laborozonisator 301.7

Erwin Sander Elektroapparatebau

GIBSON D. T., ROBERTS S. L., WELLS M. C., KOBAL V. M.

Oxidation of biphenyl by a *Beijerinckia* sp.

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1973), 50: 211-219

GIBSON D. T., MAHADEVAN V., JERINA D. M., YOGI H., YEH H. J.

Oxidation of the carcinogens benzo[a]pyrene and benzo[a]anthracene to dihydrodiols by a bacterium, *Science* 1975, 189, pp. 289-297

GIBSON D. T.

Microbial Degradation of Organic Compounds

Marcel Dekker, Inc. New York 1984

GIBSON D. T.

*Beijerinckia* sp. Strain B1: a strain by another name...

Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (1999), 23, pp. 284-293

GÖTZ P., EICHENMÜLLER B., BUNKE G., BUCHHOLZ R.

Selektive Adsorption PAK an oxidativ regenerierbaren Adsorbentien

Neue Techniken der Bodenreinigung, Hamburger Berichte Band 10, S. 101, 1996

HAUTANIEMI M., KALLAS J., MUNTER R., TRAPIDO M., VERESSININA Y.

Modelling advanced oxidation treatment of polycyclic aromatic hydrocarbons

Proc. Estonian Acad. Sci. Chem., 1999, 48, 2, pp. 80-95

HEITCAMP M. A., FRANKLIN W., CERNIGLIA C. E.

Microbial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Isolation and Characterization of a Pyrene-Degrading Bacterium

Applied and Environmental Microbiology 1988, Vol. 54, No. 10, p. 2549-2555

HEITCAMP M. A., FREEMAN J.P., MILLER D.W., CERNIGLIA C. E.

Pyrene Degradation by a *Mycobacterium* sp.: Identification of Ring Oxidation and Ring Fission Products

Applied and Environmental Microbiology 1988, Vol. 54, No. 10, p. 2556-2565

HOFRICHTER M., SCHEIBNER K., HAAS R., NÜSKE J., FRITSCH W.

Die Mangan-Peroxidase ligninolytischer Pilze: Ein innovatives biokatalytisches System zur Eliminierung von Umweltschadstoffen

Veröffentlicht in: Biotechnologie im Umweltschutz; Erich Schmidt Verlag, 1999

HURST D.H., ROBINSON K.G., SIEGRIST R.L.,

Hydrogen Peroxide Treatment of TCE Contaminated Soils,

Chemical Oxidation: Technologies For The Nineties, Vol.3,pp.156-164, 1993

KANALY R. A., HARAYAMA S.

Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria  
Journal of Bacteriology , 2000, Vol. 182, No. 8, p. 2059-2067

KÄSTNER/MAHRO/WIENBERG,

Biologischer Schadstoffabbau in kontaminierten Böden,  
Hamburger Berichte 5, Abfallwirtschaft TU Hamburg Harburg, 1993

KEMPNER E. S.; HANSON F. E., (1967)

Aspects of light production by *Photobacterium fischeri*  
Journal of Bacteriology, Vol. 95, No. 3, p. 975-979

KIM E., ZYLSTRA G.J.

Functional analysis of genes involved in biphenyl, naphthalene, phenanthrene, and m-xylene degradation by *Sphingomonas yanoikuyae* B1  
Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology (1999), 23, pp. 294-302

KONING M., REIFENSTUHL J.-C., HINTZE H., FEITKENHAUER H., STEGMANN R.

Combined Chemical And Biological Treatment Of Mixed Contaminated Soils In Slurry Reactors  
Bioreactor and Ex Situ Biological Treatment Technologies (Battelle), volume 5, n5, p 25 (6), 1999

KORNMÜLLER A., CUNO M., WIESMANN U.,

Selective Ozonation Of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons In Soil/Water-Emulsions,  
Wat. Sci. Tech. Vol. 35, No. 4, pp. 57-64, 1997

KRAUS J. J., MUNIR I. Z., MCELDON J. P., CLARK D. S., DORDICK J. S.

Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Catalyzed by Soybean Peroxidase,  
Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 80, pp. 221, 1999

LFU Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg

Materialien zur Altlastenbearbeitung, Band 7

Handbuch Mikrobiologische Bodenreinigung, 1991



LEAHY M.C., NELSON C.H., FIORENTINE A.M., SCHMITZ R.J.

Ozonation as a polish technology for *In Situ* Bioremediation, in 4. Int. In Situ and On-Site Bioremediation Symposium, In Situ and On-Site Bioremediation Vol. 3, pp. 379-483, 1997

LUTE J.R.,

Evaluating The Effectiveness Of Ozonation And Combined Ozonation/Bioremediation Technologies, in First Int. Conf. On Designing and Applying Treatment Technologies: Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds, Montrey, California 1998

MAJCHERCZYK A., JOHANNES C., HÜTTERMANN A.

Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor* Enzyme and Microbial Technology 22, 335-341, 1998

MANILAL V. B., ALEXANDER M.

Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil  
Appl. Microbiol. Biotechnol. (1991), 35, 401-405

MANN V. G., SINDER C., PFEIFER F., KLEIN J.

Scale up und Optimierung eines Suspensionsbioreaktors zur mikrobiellen Behandlung PAK-kontaminierter, bindiger Böden (DMT-BIODYN-Verfahren)  
Neue Techniken der Bodenreinigung, Hamburger Berichte Band 10, S. 435, 1996

MARTENS D.A., FRANKENBERGER W.T.,

Enhanced Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil Treated with an Advanced Oxidative Process-Fenton's Reagent,  
Journal of Soil Contamination, 4 (2) : 175-190 (1995)

MCCANN J., CHOI E., YAMASAKI E., AMES B.N.,

Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsometest : Assay of 300 chemicals,  
Proc. Nat. Acad. Sci., Vol. 72, No. 12, pp. 5135-5139, 1975

MÜLLER T.,

Abbau von Schadstoffen in Böden mit Ozon

Dissertation, Universität Hannover, 2000

MÜLLER-MARCKGRAF W.

In: Biologische Bodensanierung, Methodenbuch,

Die Deutsche Bibliothek-CIP-Einheitsaufnahme, Weinheim, 1994

OBST U., SEIBEL F.

In: Chemie und Biologie der Altlasten

Herausgegeben von der Fachgruppe Wasserchemie der GDCh

VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1997

PARTHEN J.

Untersuchungen zur mikrobiologischen Sanierung von mit PAK verunreinigten feinkörnigen Böden im Drehtrommelreaktor

Dissertation, Universität Hannover, 1992

PARTHEN J.

Schadstoffabbau in Feststoffreaktoren

2. Int. Tagung und Ausstellung über Umweltinformation und Umweltkommunikation

ECOINFORMA 92, Bayreuth 14.-18. September 1992, S. 183

RAVIKUMAR J.X., GUROL M.D.,

Fentons Reagent as a Chemical Oxidant for Soil Contaminants,

Chemical Oxidation: Technologies For The Nineties, Vol.2, pp.206-215, 1992

RESSLER B. P., KNEIFEL H., WINTER J.

Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons and formation of humic acid-like residues during bacterial PAH degradation

Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999), 53, 85-91

SCHEFFER/SCHACHTSCHNABEL

Lehrbuch der Bodenkunde

10. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1979

SCHIPPERS C.,

Mikrobieller Phenanthrenabbau mit Tensidzusatz

Dissertation, Universität Hannover, 1999

SCHLEGEL H. G.,

Allgemeine Mikrobiologie

7. überarbeitete Auflage, Thieme Verlag 1992

SCHOCKEN M. J., GIBSON D. T.

Bacterial oxidation of of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphtylen

Appl. Environ. Microbiol. 48, 10-16, (1984)

SCHOLZ J., MÜLLER B. G., SCHWEDES J., DECKWER W.-D.

Verbesserung der mikrobiellen Bodenreinigung durch Desagglomeration

Neue Techniken der Bodenreinigung, Hamburger Berichte Band 10, S. 411, 1996

Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung,

Biologische und chemische Behandlung von PAK-haltigen Böden und Abwässern, Kolloquium an der TU Berlin, 18.11.-19.11. 1996

SCHULZ M.,

Identifizierung von Oxidationsprodukten bei der Ozonolyse von Benzo[e]pyren und

Benzo[k]fluoranthen in einer Dodekan-Wasser-Emulsion, Dissertation TU Berlin, 1998

SEIDEL J.P.,

Über die Anwendung von Ozon zum oxidativen Abbau polycyclischer aromatischer

Kohlenwasserstoffe in Böden, Dissertation, Forschungszentrum Karlsruhe, 1995

SPECHT A., BENTS S., KÖHNEMANN M., LICHTENBERG T., SIEFERT E.

Biologischer Abbau von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in Kombination mit chemischer Oxidation

Neue Techniken der Bodenreinigung, Hamburger Berichte Band 10, S. 331, 1996

SPRENGER C., HARBORTH P., HANERT H.P.

Untersuchungen zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit von adsorbierten PAK in Böden von ehemaligen Gaswerkgeländen

BioEngineering 04/1994 10. Jg.

SRU, Der Rat von Sachverständigen für Umweltfragen (1995), Altlasten II, Sondergutachten Februar 1995, Metzler Poeschel Institut Stuttgart

STIEBER M.

Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen

Dissertation, Techn. Universität Dresden, 1995

SUTHERLAND J. B., FREEMAN J. P., SELBY A. L., FU P. P., MILLER D. W., CERNIGLIA C. E.

Stereoselective formation of a K-region dihydrodiol from phenanthrene by *S. flavovirens*

Arch. Microbiol. 154, 260-266, (1990)

SVENSSON K.,

Degradation and toxic effects as a response to ozonation of PAH contaminated soils

Diplomarbeit, Universität Hannover, 2000

THOMAS J. M., YORDY J. R., AMADOR J. A., ALEXANDER M.

Rates of Dissolution and Biodegradation of Water-insoluble Organic Compounds

Applied and Environmental Microbiology (1986), Aug., S. 290-296

TYRE B.W., WATTS R.J., MILLER G.C.,

Waste Management-Treatment of Four Biorefractory Compounds in Soils Using Catalyzed Hydrogen Peroxide,

J. Environ. Qual. Vol 20, pp. 832, 1991

VAN KEMENADE I., ANDERSON W.A., SCHARER J. M., MOO-YOUNG M.,  
Bioremediation Enhancement of Phenanthrene Contaminated Soils by Chemical Pre-  
Oxidation,  
Hazardous Waste & Hazardous Materials 12 (4), 1995, pp. 345-355

VAN KEMENADE I., ANDERSON W.A., SCHARER J. M., MOO-YOUNG M.,  
Chemical Pre-oxidation For Enhancing Bioremediation of Contaminated Soils, Review Paper,  
TransIChemE, Vol 74, Part B, May 1996

VOWLES P. D., MANTOURA R. F. C.,  
Sediment-Water Partition Coefficients and HPLC Retention Factors of Aromatic  
Hydrocarbons  
Chemosphere (1987), Vol. 16, Nr. 1, S. 109-116

WARD LIEBEG E., CUTRIGHT T. J.  
The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro  
nutrients in a PAH contaminated soil  
International Biodeterioration & Biodegradation 44, (1999), 55-64

WATTS R.J., UDELL M.D., LEUNG S.W.,  
Treatment of Contaminated Soils Using Catalyzed Hydrogen Peroxide,  
Chemical Oxidation: Technologies For The Nineties, Vol. 1, pp. 37-50, 1991

WILLE F.,  
Bodensanierungsverfahren  
1. Auflage 1993, Vogel Verlag und Druck KG, Würzburg 1993

YAO J.J., HUANG Z., MASTEN S.J.,  
The Ozonation Of Pyrene Pathway And Product Identification,  
Water Res. 32 (10), 3001-3012, 1998

## 7 Anhang

### 7.1 Flüssigmedien

#### 10fach konzentriertes Mineralsalzmedium

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	24,4 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	15,2 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,0 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,5 g
$\text{H}_2\text{O}_{bidest}$	ad 1000 mL

#### Spurenelementlösung SL-6

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,03 g
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,3 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 g
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,03 g
$\text{H}_2\text{O}_{bidest}$	ad 1000 mL

#### Spurenelementlösung SL-4

EDTA	0,5 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
Spurenelementlösung SL-6	100 mL
$\text{H}_2\text{O}_{bidest}$	ad 1000 mL

#### Mineralmedium nach Brunner

10fach konzentriertes Mineralsalzmedium	100 mL
Spurenelementlösung SL-4	10 mL
$\text{H}_2\text{O}_{bidest}$	ad 1000 mL

**Corynebacterium Medium**

Casein Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Glucose	5 g
NaCl	5 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 mL, pH 7,3

**Artificial sea water**

NaCl	28,13g
KCl	0,77g
CaCl <sub>2</sub> *2 H <sub>2</sub> O	1,60g
MgCl <sub>2</sub> *6 H <sub>2</sub> O	4,80g
NaHCO <sub>3</sub>	0,11g
MgSO <sub>4</sub> *7 H <sub>2</sub> O	3,50g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	1000ml

**Seawatermedium für *Vibrio fischeri***

Fleischextrakt	10,0g
Pepton	10,0
Artificial sea water	750ml
Leitungswasser	250ml, pH 7,3

**Medium für *Bacillus subtilis***

Pepton	5,0g
Fleisch extrakt	3,0g
MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	10,0mg
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	1000ml, pH 7,0

## 7.2 Agarplatten

### Standard I-Agarplatten

Standard I-Nährbouillon	25 g
Agar-Agar	15 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 mL

### Seawater-Agarplatten

Agar-Agar	15 g
Seawatermedium	ad 1000 mL

## 7.3 Reagenzien und Standardlösungen

### Lösungen für die Kapillarelektrophorese

#### Stammlösungen

Substanz	100 mg
Methanol	ad 10 mL

Gültig für Salicylsäure, Phthalaldehydsäure, Phthalsäure, 2,2'-Biphenyldialdehyd, 2'-Formyl-Biphenylcarbonsäure, Diphensäure, Trimellithsäure, Phenanthrendion, Diphenylessigsäure

#### Ionenpaarbildner

CEMA (Cetyldimethylammoniumbromid)	250 mg
Methanol	ad 10 mL

#### Puffer

Cholsäure	50mM/L
Borsäure	100mM/L

pH-Wert 8,3

### PAH-mix 9, Fa. Dr. Ehrenstorf

16 PAK nach EPA in Cyclohexan je 10µg/mL



**Anthracenstandardlösung:**

Anthracen	50 mg
Dichlormethan	ad 100 ml

**Anthracen/Phenanthrenstandardlösung:**

Anthracen	50 mg
Phenanthren	50 mg
Dichlormethan	ad 100 ml

**Biorad DC Protein Assay**

Reagenz A

Reagenz B

**Reagenzien für den Test der Dehydrogenaseaktivität**

Resazurinlösung	75 mg/L Resazurin in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>
Puffer A	6,8 g/L Imidazol in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> , pH 6,3
Puffer B	3,8 g/L Natriumtetraborat in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> , pH 11

**Reagenzien für den Test der Fluoresceindiacetathydrolyse**

Phosphatpuffer	9,84 g/L Natriumphosphat in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> , pH 7,6
Fluoresceindiacetatlösung	2 g/L Fluoresceindiacetat in Aceton

**Reagenzien für den Ammoniumtest**

Reagenz A	13 g Natriumsalicylat, 13 g Trinatriumcitrat, 0,097 g Dinatriumpentacyanonitrosylferrat in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Reagenz B	3,2 g NaOH, 0,2 g Natriumdichloroisocyanurat in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

**Reagenzien für den Nitrattest**

Säuremischung	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> und H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> zu gleichen Volumenanteilen
Dimethylphenollösung	0,12 g 2,6-Dimethylphenol/100 mL Essigsäure

**Reagenzien für den Phosphattest**

Merck PMB Phosphortest, Reagenzien P-1A und P-2A

**Bromphenolblaureagenz für die Dünnschichtchromatographie**

Lösung I:

Bromkresolgrün	40 mg
Bromphenolblau	15 mg
Ethanol	ad 100 mL

Lösung II:

Kaliumpermanganat	250 mg
Natriumcarbonat	500 mg
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100 mL

Lösungen I und II unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 9 + 1 mischen

**Dinitrophenylhydrazinreagenz für die Dünnschichtchromatographie**

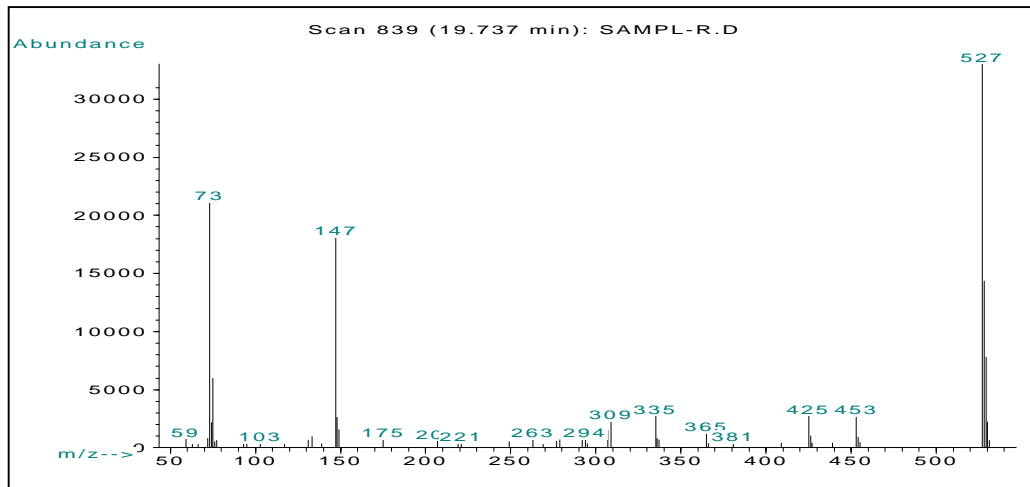
2,4-Dinitrophenylhydrazin	400 mg
2n-HCL	100 mL

**Natriumhydroxidreagenz für die Dünnschichtchromatographie**

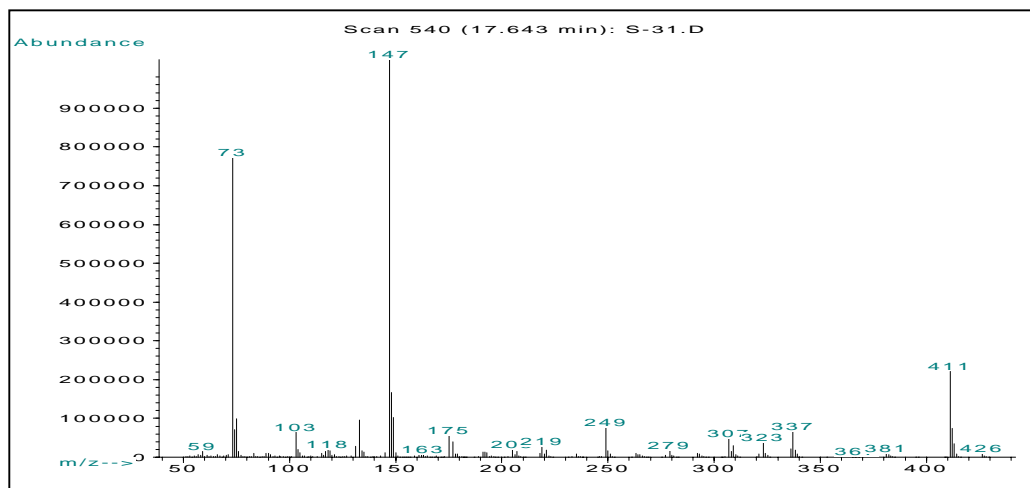
Natriumhydroxid	10 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	100 mL

## 7.4 Massenspektren

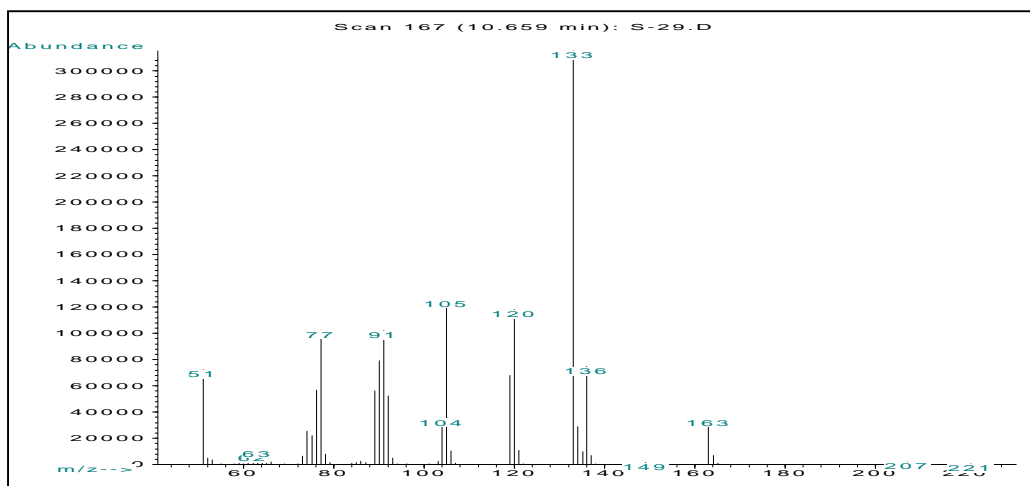
### Referenzsubstanzen



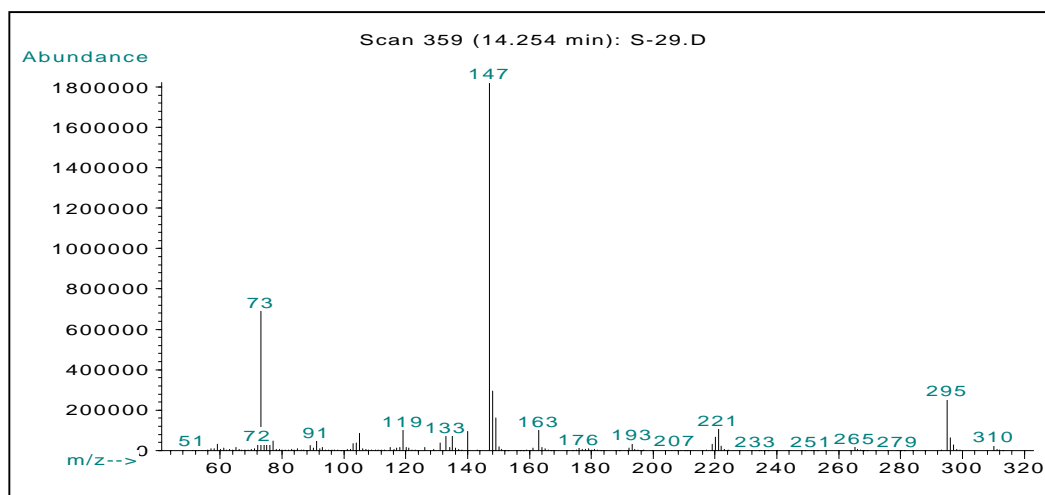
MSTFA-Derivat der Pyromellithsäure



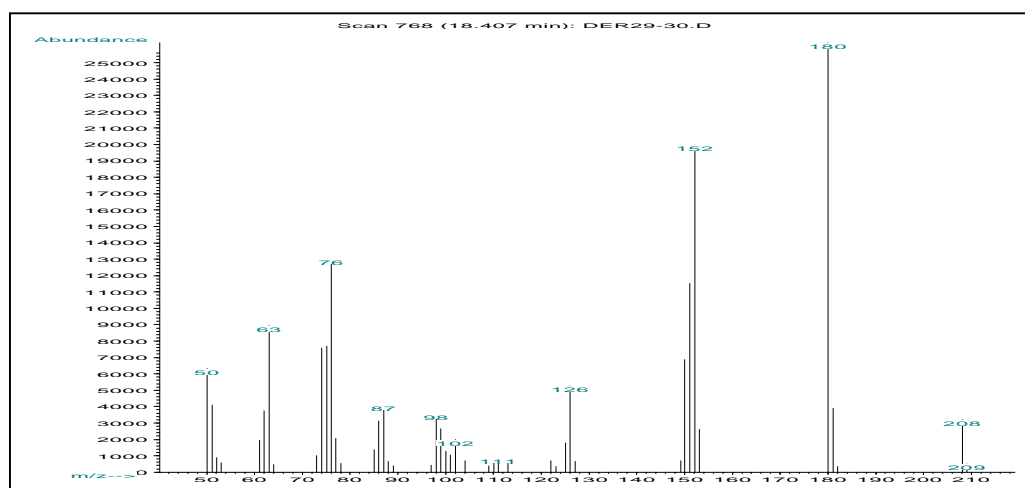
MSTFA-Derivat der Trimellithsäure



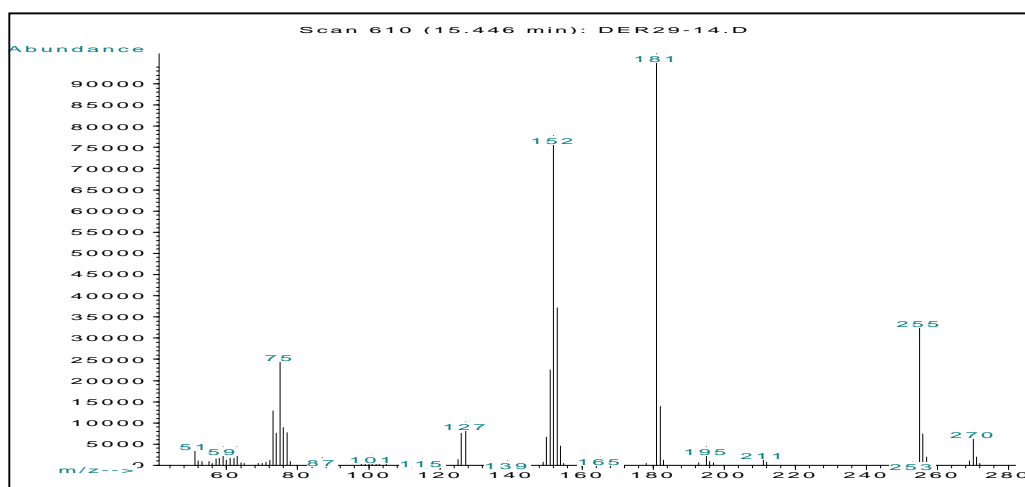
MSTFA-Derivat der Phthalaldehydsäure



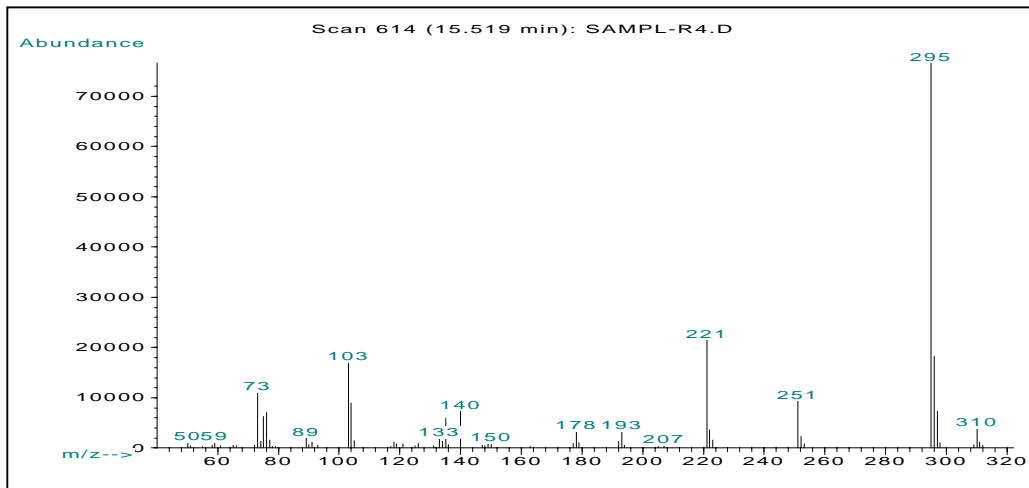
MSTFA-Derivat der Phthalsäure



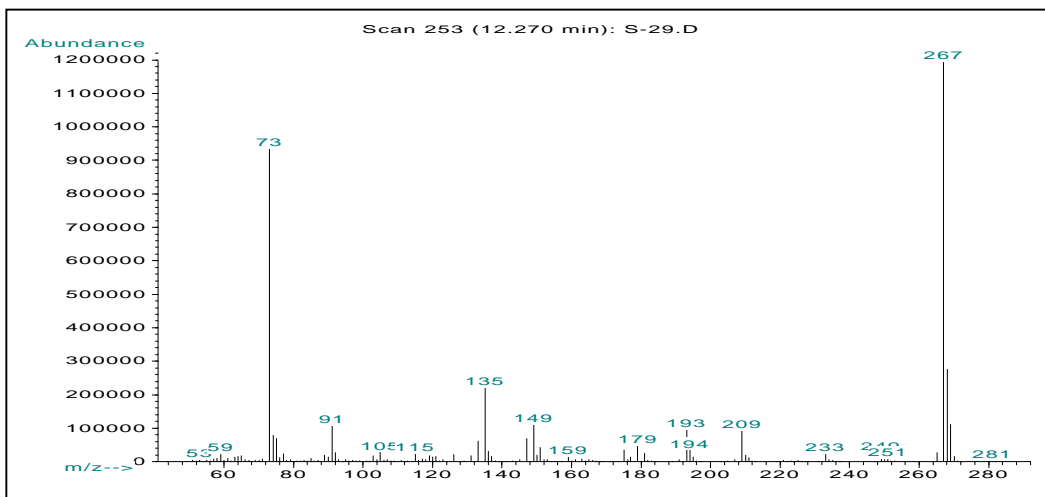
9,10-Phenanthrenion



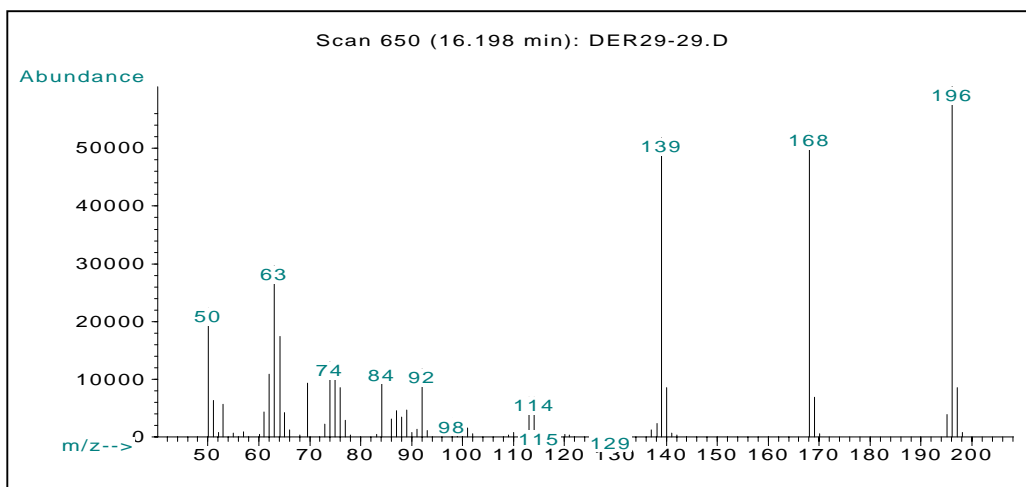
MSTFA-Derivat der 2-Biphenylcarbonsäure



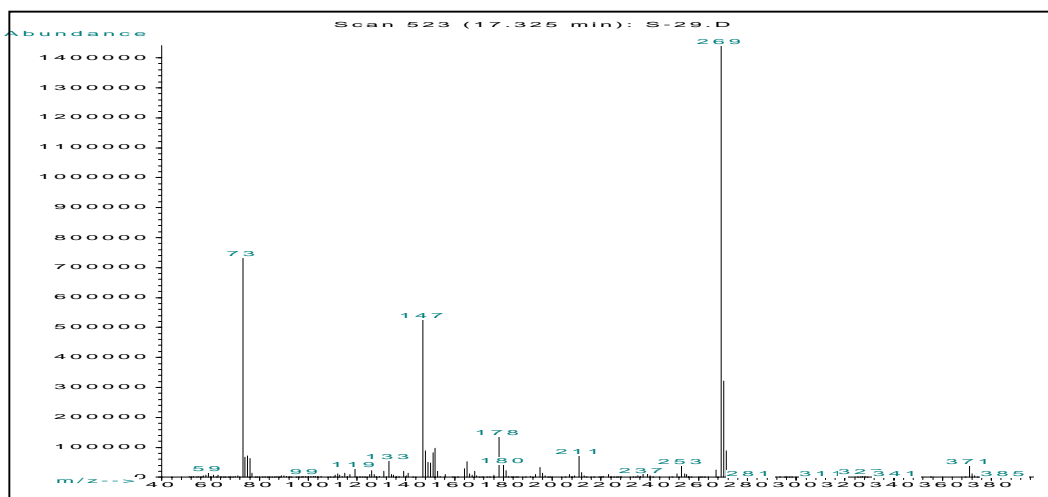
MSTFA-Derivat von Terephthalsäure



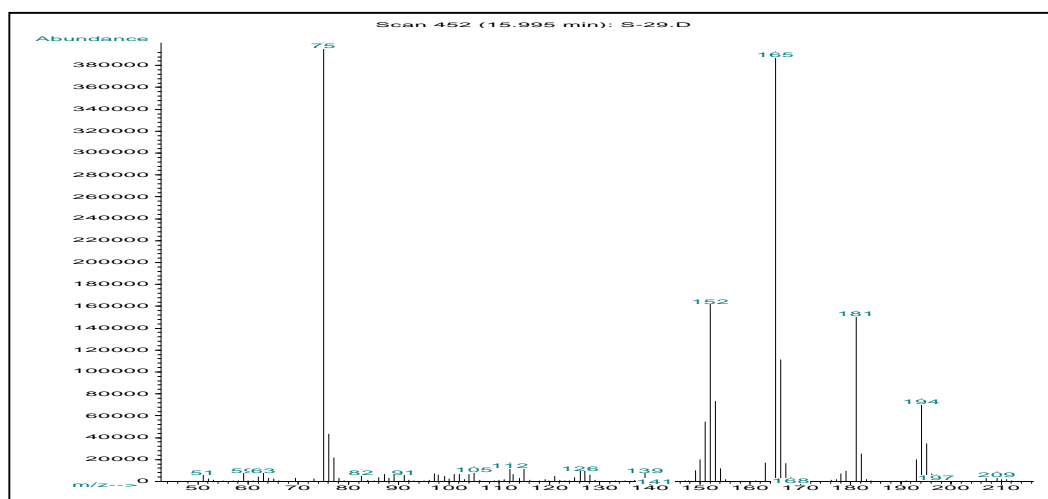
MSTFA-Derivat der Salicylsäure



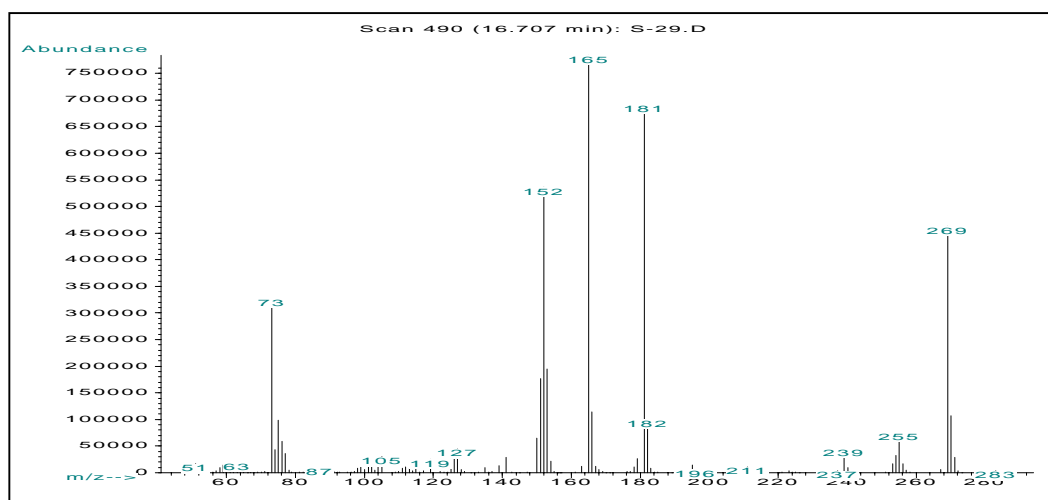
Xanthon



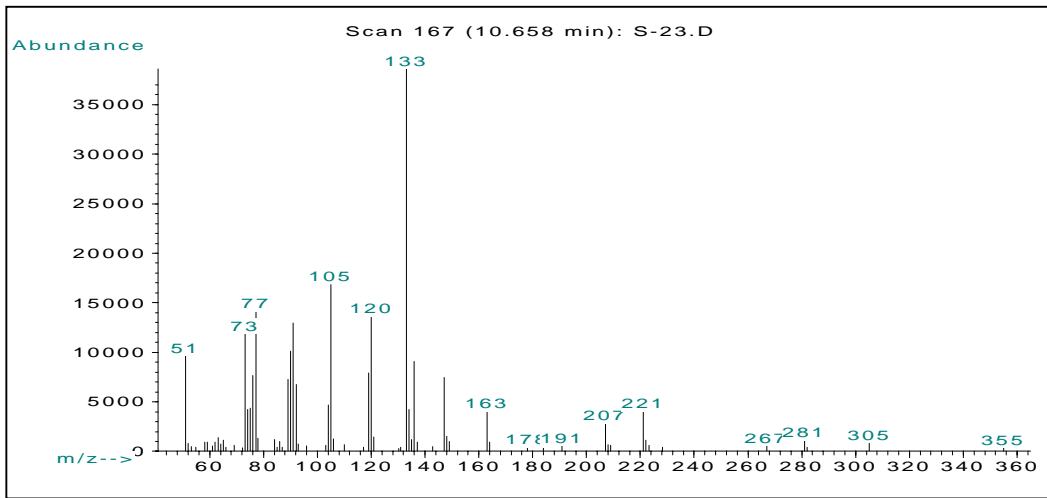
MSTFA-Derivat der Diphensäure



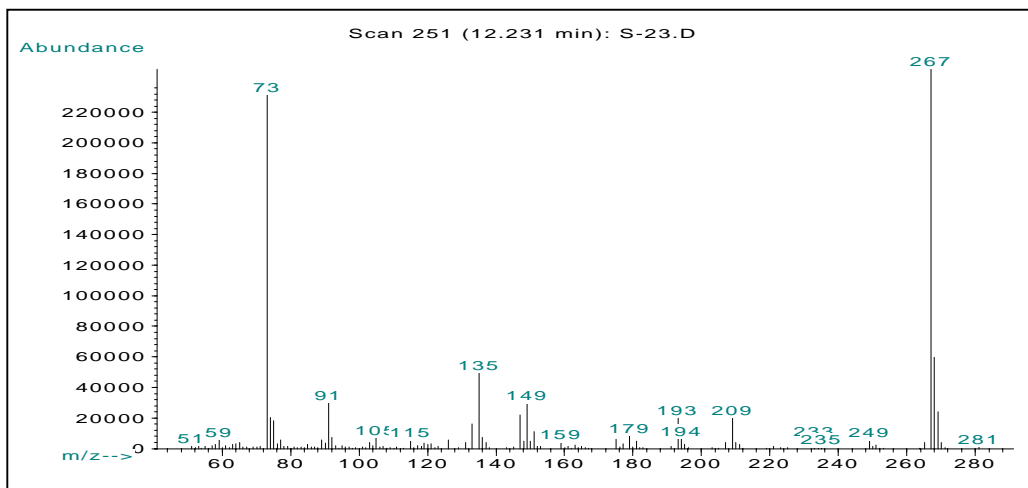
2,2'-Biphenylaldehyd



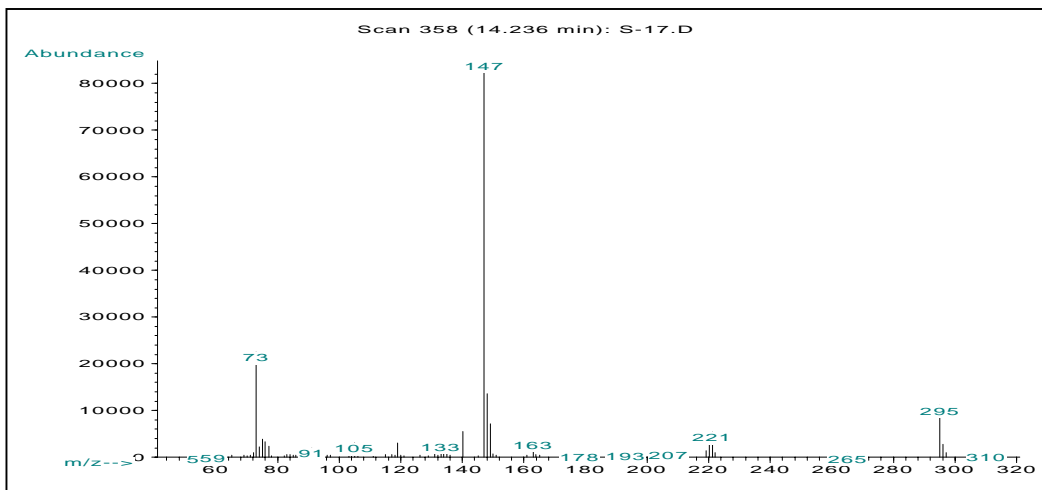
MSTFA-Derivat von 2'-Formyl-2-Biphenylcarbonsäure

**Massenspektren identifizierter oder vermuteter Substanzen (MSTFA-Derivate)**

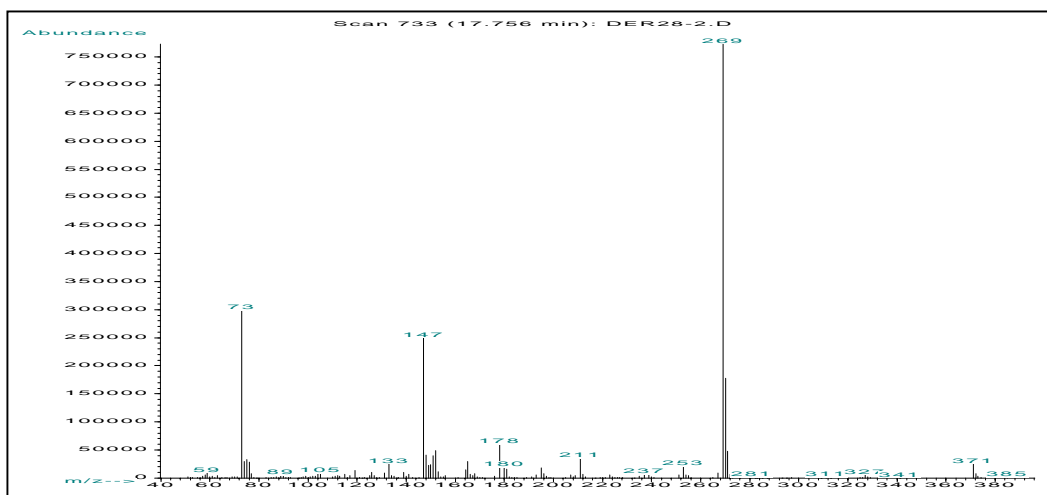
MSTFA-Derivat von Phthalaldehydsäure



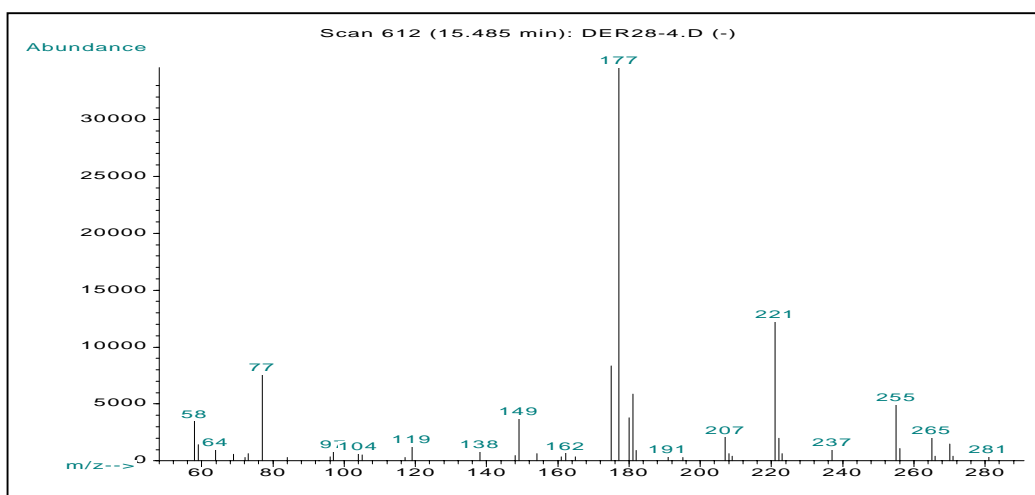
MSTFA-Derivat von Salicylsäure



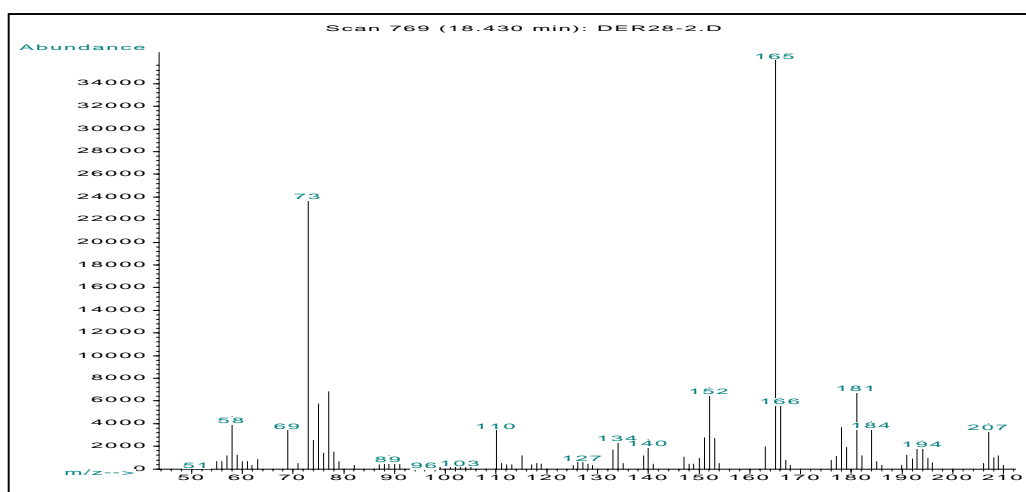
MSTFA-Derivat von Phthalsäure



MSTFA-Derivat von Diphensäure

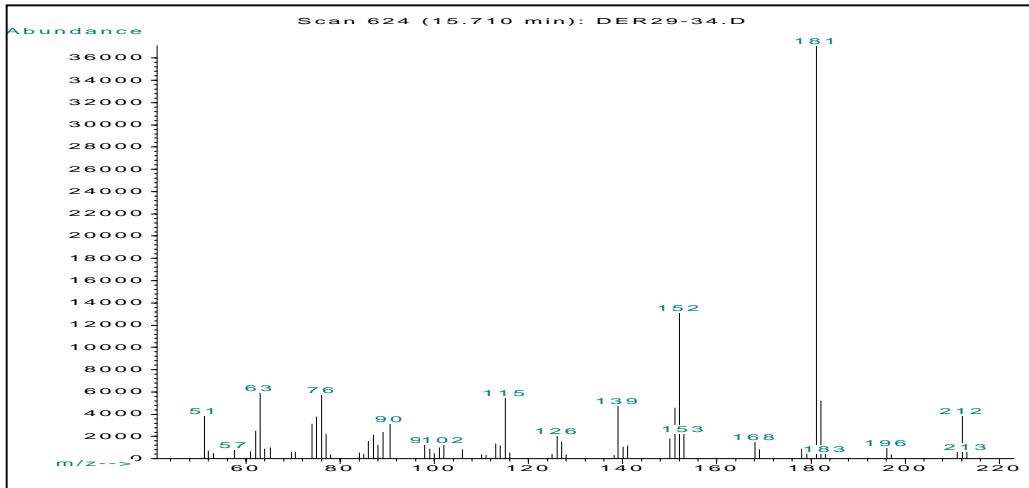


Vermutliches Massenspektrum von Biphenyl-2-Carbonsäure (MSTFA-Derivat)

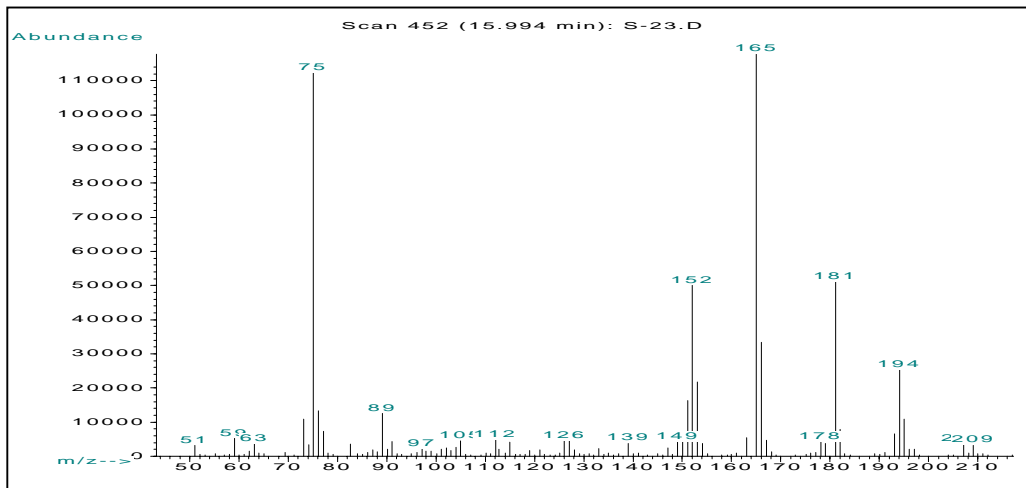


Vermutliches Massenspektrum von 9,10-Phenanthrendion

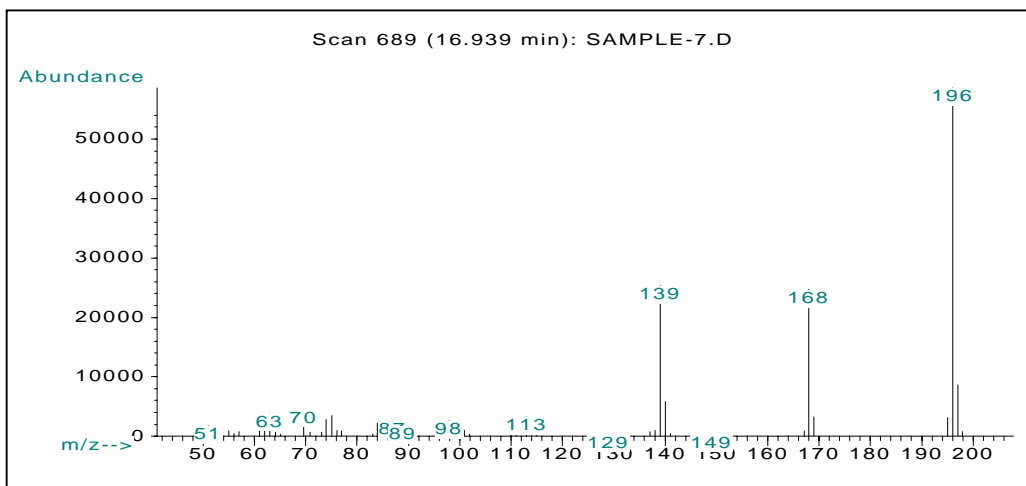




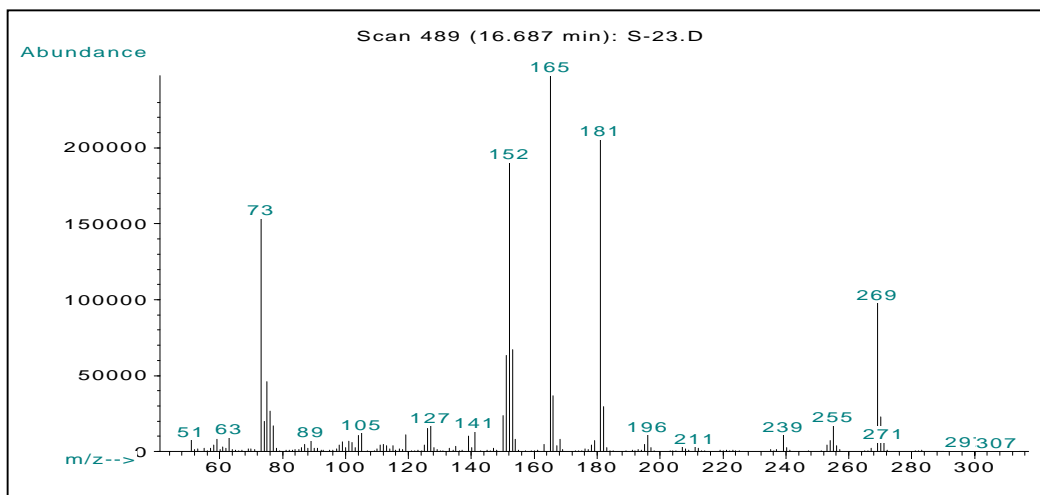
Vermutliches Massenspektrum von 2'-Hydroxy-2-Formyl-Biphenyl als cyclisches Acetal 6-Methoxydibenzopyran vorliegend



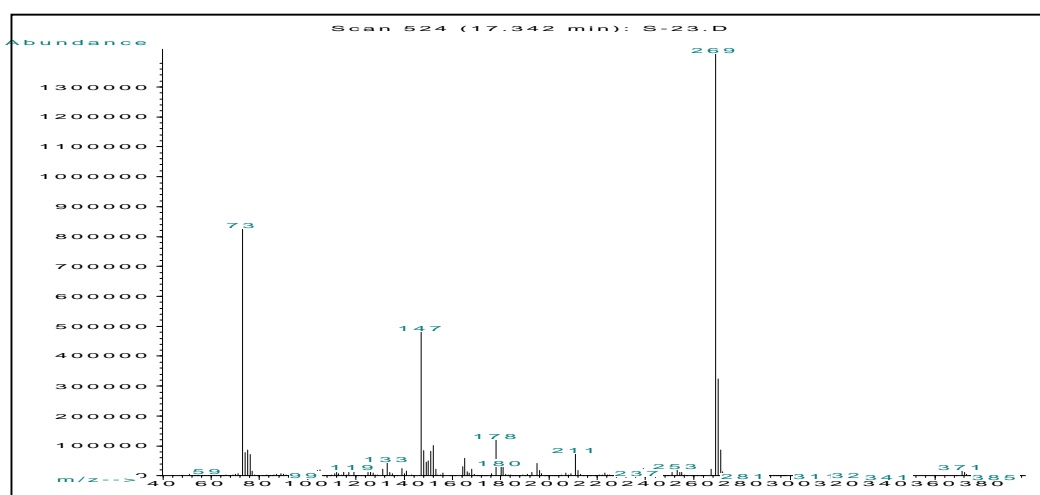
Massenspektrum von Biphenyl-2,2'-dialdehyd



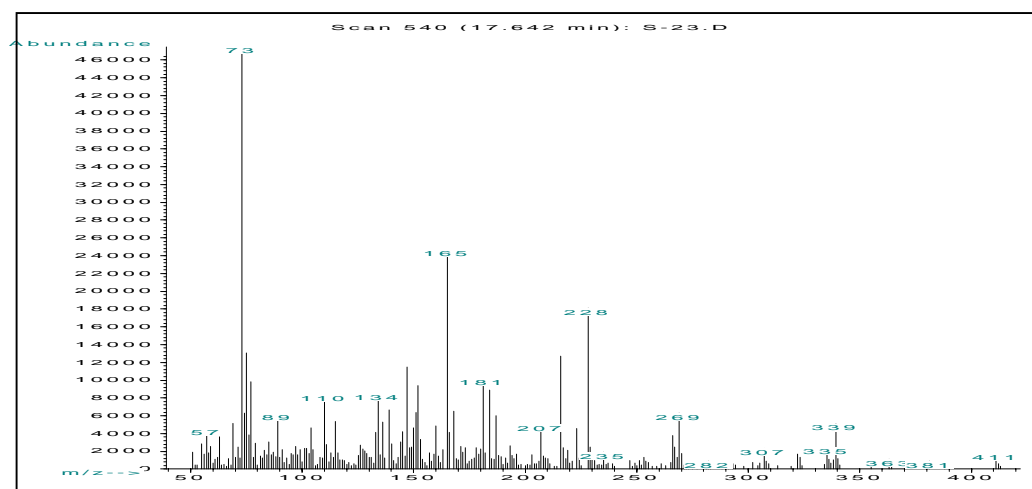
Vermutliches Massenspektrum von Xanthon



MSTFA-Derivat von 2'-Formyl-2-Biphenylcarbonsäure



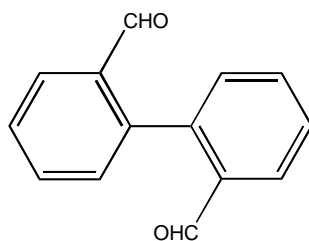
MSTFA-Derivat von Diphenensäure



MSTFA-Derivat von Trimellitensäure

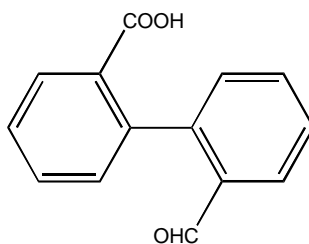
## 7.5 NMR-Daten hergestellter Referenzsubstanzen

### 2,2'-Biphenyldialdehyd



NMR  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 128,5 (CH); 128,8 (CH); 131,7 (CH); 133,41 (CH); 134,5 ( $\text{C}_{\text{quart.}}$ ); 141,2 ( $\text{C}_{\text{quart.}}$ ); 191,0 ( $\text{C}_{\text{Aldehyd}}$ )

### 2'-Formyl-2-Biphenylcarbonsäure



NMR  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  (ppm): 127,6 (CH); 127,9 (CH); 128,2 (CH); 129,1 (CH); 130,1 (CH); 131,2 (CH); 131,9 (CH); 132,5 (CH); 133,2 (CH); 133,7 (CH); 140,2 ( $\text{C}_{\text{quart.}}$ ); 144,8 ( $\text{C}_{\text{quart.}}$ ); 171,8 ( $\text{C}_{\text{Carboxyl}}$ ); 191,8 ( $\text{C}_{\text{Aldehyd}}$ )

## **Lebenslauf**

Name: Joachim Stehr  
Geburtsdatum: 04.07. 1972  
Geburtsort: Hannover

## **Schulbildung**

07/1978-07/1991 Abschluss Abitur am Gymnasium Lutherschule Hannover

## **Wehrdienst**

07/1991-07/1992 Grundwehrdienst bei 2./Panzerbataillon 334 in Celle

## **Studium**

10/1992 Beginn des Chemiestudiums an der Universität Hannover  
09/1994 Vordiplom im Fach Chemie an der Universität Hannover  
09/1995-03/1996 Auslandsaufenthalt an der Université de Paris-Sud XI  
09/1997 Diplom im Fach Chemie an der Universität Hannover

## **Promotion**

Seit 04/1998 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Universität Hannover