

Forschungsverbund:  
**Biologische Verfahren zur Bodensanierung**

Teilverbund 5  
**Langzeit- und Remobilisierungsverhalten**

Projektträger:  
**Umweltbundesamt, (PT Abfallwirtschaft und Altlasten), Berlin**

**Teilprojekt 5.1**

**Langzeit- und Remobilisierungsverhalten  
von PAK bei der biologischen  
Bodensanierung**

**Heiko Mescher, Annette Eschenbach,  
Reinhard Wienberg und Bernd Mahro**



Institut für Technischen Umweltschutz

in Zusammenarbeit mit dem  
Umwelttechnischen Labor und Büro Dr. R. Wienberg, Hamburg

**Abschlussbericht**

Forschungsverbund: Biologische Verfahren zur Bodensanierung

Teilprojekt 5.1: Langzeit und Remobilisierungsverhalten von PAK bei der biologischen Bodensanierung

Fördernde Institution: Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF)

Fördernummer: 14810925

Projektleiter: Prof. Dr. rer.nat.habil. Bernd Mahro  
Hochschule Bremen

Verfasser: Dipl.-Ing. Heiko Mescher  
Dr. Annette Eschenbach  
Dr. Reinhard Wienberg  
Prof. Dr. Bernd Mahro

Beteiligte Institutionen: Hochschule Bremen, Institut für Technischen  
Umweltschutz, Neustadtswall 30,  
28199 Bremen

Umwelttechnisches Büro und Labor Dr. R. Wienberg,  
Gotenstraße 4, 20097 Hamburg

Projektbearbeiter: Hochschule Bremen:  
Dr. rer.nat. Annette Eschenbach  
Dipl.-Ing. Heiko Mescher  
Karen Johannsen  
Büro und Labor Dr. R. Wienberg:  
Dr. rer.nat. Reinhard Wienberg  
Dipl.-Ing. Momme Petersen  
Dipl.-Ing. Marco Silla

Laufzeit: 01.09.1997 - 30.09.2000

Die Autoren sind für den Inhalt des Berichtes verantwortlich.

## Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	S. 1
1.1	Gesamtzielsetzung des Forschungsprojektes	S. 1
1.2	Stand der Forschung zu Beginn der Arbeiten	S. 3
2.	MATERIAL UND METHODEN	S. 15
2.1	Material	S. 15
2.1.1	Bodenmaterialien	S. 15
2.1.2	Chemikalien	S. 17
2.1.3	Organische Supplemente und Organismen	S. 17
2.2	Methoden	S. 18
2.2.1	Versuchssystem	S. 18
2.2.2	Applikation der <sup>14</sup> C-markierten PAK	S. 19
2.2.3	Sequentielles dreistufiges Extraktionsverfahren zur Bestimmung von PAK in Bodenproben	S. 20
2.2.4	Huminstoffextraktion und –fraktionierung	S. 21
2.2.5	Bestimmung der <sup>14</sup> C-Aktivität von Bodenproben	S. 21
2.2.6	Flüssig-Szintillationsmessung	S. 22
2.2.7	Biologische Remobilisierungsmethoden	S. 23
2.2.7.1	Zusatz Huminstoff-abbauender Mikroorganismen	S. 23
2.2.7.2	Zugabe unspezifisch wirksamer Supplemente (Kompost, Rindenmulch, Waldbodenstreu)	S. 24
2.2.7.3	Zugabe von Organismen der Bodenfauna (Regenwürmer)	S. 24
2.2.8	Physikalische Remobilisierungsmethoden	S. 26
2.2.8.1	Behandlung von Bodenproben mittels Ultraschall-Sonde	S. 26
2.2.8.2	Zerstörung der Bodenstruktur durch Mörsern	S. 27
2.2.9	Chemische Remobilisierungsmethoden	S. 27
2.2.9.1	Zugabe Kationen-komplexierender Substanzen (EDTA)	S. 27
2.2.9.2	pH-Änderung (Simulation saurer Regen)	S. 28
2.2.10	Kombinationen von mechanischen und biologischen Behandlungsmaßnahmen	S. 28

3.	ERGEBNISSE	S. 30
3.1	Erstellung von Kohlenstoffbilanzen in einem humosen Altlastbodenmaterial	S. 30
3.1.1	Mineralisation von $^{14}\text{C}$ -PAK im Altlastbodenmaterial Bremen während der Vorinkubation	S. 30
3.1.2	Mineralisation von $^{14}\text{C}$ -PAK im Altlastbodenmaterial Bremen nach Zugabe von Kompost	S. 31
3.1.3	Verbleib von $^{14}\text{C}$ -PAK im Altlastbodenmaterial Bremen nach Zugabe von Kompost	S. 31
3.2	Vergleich zum Verbleib von $^{14}\text{C}$ -PAK in verschiedenen humosen Bodenmaterialien	S. 34
3.3	Remobilisierung von nicht-extrahierbaren Rückständen	S. 37
3.3.1	Chemische Remobilisierungsmaßnahmen	S. 42
3.3.1.1	Auflösung metall-organischer Komplexe durch Zugabe Kationen-komplexierender Substanzen (EDTA)	S. 42
3.3.1.2	pH-Änderung (Simulation des Einflusses von saurem Regen)	S. 42
3.3.2	Physikalische Remobilisierungsmaßnahmen	S. 44
3.3.2.1	Aggregatzerstörung im Altlastbodenmaterial Bremen	S. 45
3.3.3	Biologische Remobilisierungsmaßnahmen	S. 45
3.3.3.1	Einsatz von Organismen der Bodenfauna (Regenwürmer)	S. 47
3.3.4	Kombination von mechanischen und biologischen Remobilisierungsmaßnahmen	S. 47
4.	ZUSAMMENFASSUNG	S. 63
4.1	Bildung von nicht-extrahierbaren $^{14}\text{C}$ -PAK-Rückständen	S. 70
4.2	Langzeitstabilität und Remobilisierungsversuche von nicht-extrahierbaren $^{14}\text{C}$ -PAK-Rückständen	S. 70
5.	LITERATURVERZEICHNIS	S. 71
		S. 76

## 1. Einleitung

### 1.3 Gesamtzielsetzung des Forschungsprojektes

Ein Teil der als Altlast im Boden vorliegenden organischen Schadstoffe, wie z.B. PAK oder TNT, wird im Verlauf biologischer Sanierungsverfahren in Form von nicht-extrahierbaren Rückständen in der Bodenmatrix festgelegt. Während der vollständige Abbau von Schadstoffen (Mineralisation) eine unmittelbare Detoxifikation der Schadstoffe darstellt, muss für die festgelegten bzw. humifizierte Schadstoffe der Nachweis der Unbedenklichkeit erst durch wissenschaftliche Untersuchungen erbracht werden. Um die ökologische Nachhaltigkeit von biologischen Bodensanierungen, die zumindest teilweise auch auf Humifizierungsprozessen beruhen, bewerten zu können, war es im Rahmen des Verbundes " Biologische Bodensanierung" Aufgabe des Teilverbundes 5, das Langzeit- und Remobilisierungsverhalten solcher schadstoffbütiger, nicht mehr aus dem Boden extrahierbarer Rückstände detailliert zu untersuchen. Dabei wurden verschiedene Untersuchungsstrategien verfolgt:

- Evaluation des Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von humifizierten Schadstoffen unter simulierten ökologischen worst-case-Bedingungen (Zeitrafferversuche im Labormaßstab)
- Strukturanalytische Aufklärung der Bindungsform zwischen Schadstoff(-derivat) und organischer Substanz des Bodens mittels <sup>15</sup>N-NMR-Spektroskopie
- Untersuchungen des Langzeit- und Remobilisierungsverhaltens von humifizierten Schadstoffen im Großmaßstab unter möglichst naturnahen Freilandbedingungen
- Ökotoxikologische Bewertung der sanierten Bodenmaterialien mit humifizierten Schadstoffrückständen

Die Untersuchungen des Teilverbundes sind ausschließlich mit den Schadstoffen PAK und TNT, jedoch bei Einsatz verschiedener Bodenmaterialien, in variierenden Versuchsmaßstäben und unter Berücksichtigung unterschiedlicher Umweltfaktoren durchgeführt worden. Zusätzlich hatten einige Gruppen im Teilverbund 5 auch die Aufgabe, die im Teilverbund 6 des Verbundes "Biologische Verfahren zur Bodensanierung" in Clausthal-Zellerfeld von verschiedenen Firmen durchgeführte maßstabsgerechte Erprobung eines biologischen Verfahrens zur Sanierung eines TNT-kontaminierten Bodens im Labormaßstab zu simulieren und so zu überprüfen. Tabelle 1 gibt zunächst einen Überblick über die verschiedenen an dem Teilverbund beteiligten Arbeitsgruppen und ihre jeweiligen Aufgaben.

**Tab. 1.1:** Teilverbund 5 „Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen bei der biologischen Bodensanierung“

Nummer		Durchführende Institution
5.0	<b>Koordinierung</b>	Hochschule Bremen
5.1	Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von PAK bei der biologischen Bodensanierung	Hochschule Bremen
5.2	Biologische Sanierung – Beurteilung des Langzeitverhaltens / der Remobilisierung festgelegter Schadstoffe (PAK, sowie TNT und Metabolite)	FhIUCT, Schmallingenberg
5.3.1	Dynamisches Beetverfahren: Analyse der Bindungsstruktur nicht extrahierbarer TNT-Transformationsprodukte	Universität Marburg
5.3.2	Alternierender Anaerob-/Aerob-Prozess: Analyse der Bindungsstrukturen von metabolisiertem und humifiziertem TNT im Boden	FhIGB, Stuttgart
5.3.3	Analyse der Bindungsstrukturen gebundener TNT-Rückstände im Boden nach biologischer Behandlung durch das Weißfäulepilzverfahren und Remobilisierungsversuche	Universität Jena
	Analyse der Bindungsstruktur von humifiziertem TNT mittels <sup>15</sup> N-NMR-Spektroskopie	TU München

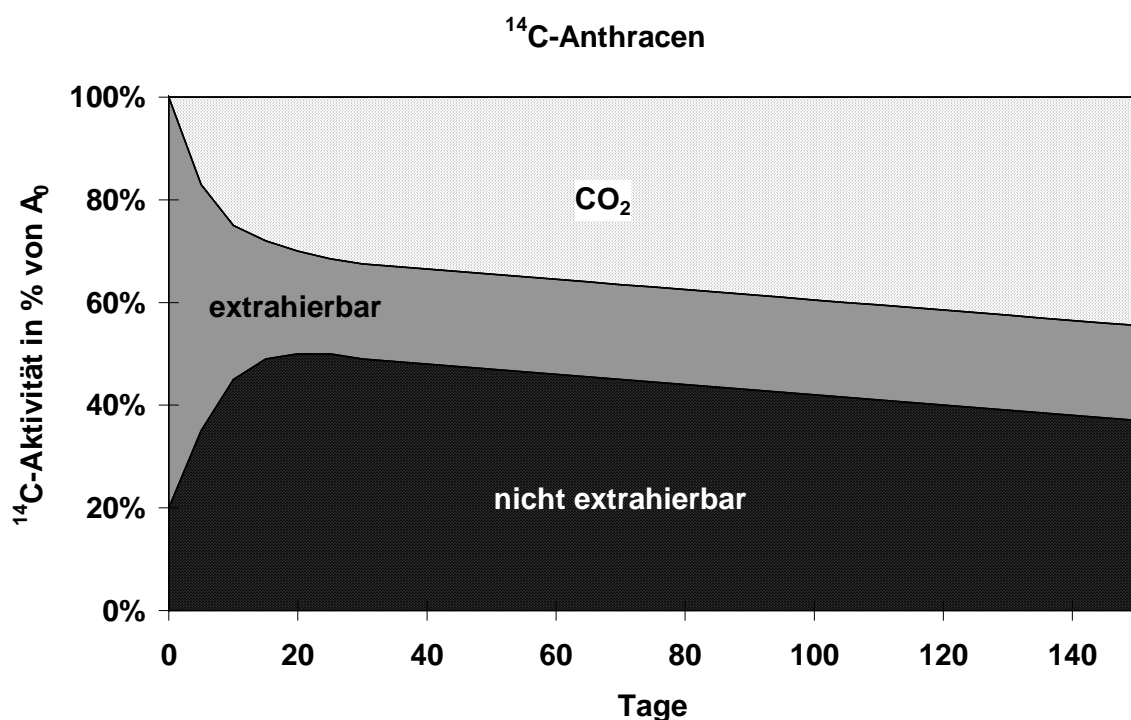
Die Arbeiten des Teilprojekts 5.1, über das hier ausschließlich berichtet wird, schlossen im experimentellen Teil an Untersuchungen an, wie sie bereits in dem vorangegangenen Teilprojekt 2.6 „Untersuchung und Bildung der Langzeitstabilität von humifizierten PAK in biologisch behandelten Recyclingböden“ (Förderkennzeichen 1480937) im Teilverbund „Kontrollierte Humifizierung von PAK“ erarbeitet worden waren. Aus diesem, damals noch ersten und einzigen Teilprojekt zur Frage der Langzeitstabilität von nicht-extrahierbaren schadstoffbürtigen Rückständen, hatten sich noch eine Reihe neuer Fragen zur Stabilität der PAK-Humifizierung ergeben (z.B. Rolle der organischen Bindematrix im Boden, Einfluss von Organismen der Bodenfauna, Simulation des Einflusses von saurem Regen), die nun hier weiter untersucht werden sollten. Auf Grund der in dem Vorprojekt gesammelten Erfahrungen zum Thema "Langzeitstabilität" hat das Teilprojekt in dem neuen Teilverbund auch die Aufgaben der Teilverbundkoordinierung übernommen.

Zusammengefasst ergaben sich somit für das TP 5.1 folgende spezielle Aufgaben:

- a) Ausweitung der experimentellen Untersuchungen zur Langzeitstabilität von <sup>14</sup>C-PAK-Rückständen im Boden
- b) die verschiedenen experimentellen Untersuchungen im Teilverbund zu koordinieren
- c) die Ergebnisse des Teilverbundes im Rahmen des zu erstellenden "Leitfadens zur biologischen Bodensanierung" zusammenfassend darzustellen

#### 1.4 Stand der Forschung zu Beginn der Arbeiten

Der Erfolg der biologischen Bodensanierungsverfahren beruht nicht allein auf dem Abbau der Schadstoffverbindungen, sondern auch auf einer Festlegung von Schadstoff(-derivaten) in der Bodenmatrix (vor allem in die organische Substanz des Bodens und bei einigen Schadstoffen zum Teil auch an Tonminerale). Die Festlegung kann maßgeblich zum Verschwinden der Schadstoffe beitragen. Durch herkömmliche analytische Methoden sind diese festgelegten Schadstoffe nicht mehr zu erfassen. Erst durch die Verwendung von  $^{14}\text{C}$ -markierten Schadstoffen konnte nachgewiesen werden, dass ein erheblicher Teil der Schadstoffe auch nach einer biologischen Sanierung nicht-extrahierbar in der Bodenmatrix verbleibt (s. Abb. 1.1). Das Auftreten von nicht-extrahierbaren Rückstände infolge einer biologischen Inkubation wurde für PAK unter Verwendung  $^{14}\text{C}$ -markierter Substanzen u.a. von Schnöder et al. (1994), Kästner et al. (1995, 1999), Eschenbach et al. (1995), Goodin & Webber (1995), und Qiu & McFarland (1991) beschrieben.



**Abb. 1.1:** Verbleib von  $^{14}\text{C}$ -Anthracen im Boden in % der anfänglichen Gesamtaktivität während einer 145tägigen aeroben Inkubation (Eschenbach, 1995).

Die Entstehung gebundener Rückstände, der sogenannten Bound Residues, ist ein aus agrarwissenschaftlichen Untersuchungen seit vielen Jahren bekanntes Phänomen (Bollag & Loll 1983, Calderbank 1989, Führ 1987, Führ et al. 1991, Kahn 1982), wobei der Anteil der als nicht-extrahierbarer Rückstand im Boden gebundenen Verbindung zwischen 20-70%

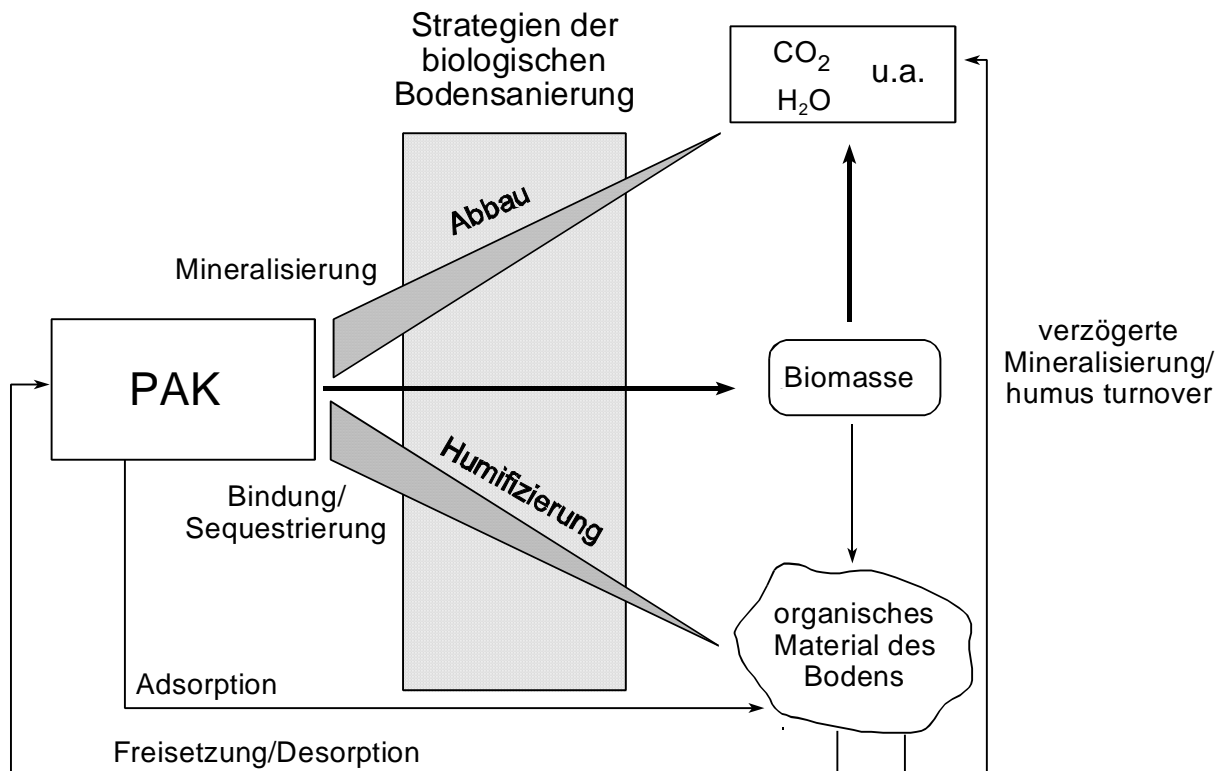
(maximal bis 90%) der applizierten Wirkstoffmenge variiert und je nach Wirkstoff unterschiedlich ist (Calderbank 1989).

Basierend auf einer Definition nicht-extrahierbarer Pflanzenschutzmittelrückstände der IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) haben Führ et al. (1998) kürzlich folgende Definition vorgeschlagen: „Gebundene Rückstände sind Verbindungen in Böden, Pflanzen oder Tieren, die als Ausgangssubstanz oder deren Metabolite nach Extraktion in der Matrix verbleiben. Die Extraktionsmethoden dürfen weder die Verbindung noch die Struktur der Matrix wesentlich verändern. Die Art der Bindung kann teilweise durch matrixverändernde Extraktionsmethoden und anschließende leistungsfähige analytische Methoden geklärt werden. Auf diese Weise wurden bis jetzt zum Beispiel kovalente, ionische und sorptive Bindungen, wie auch Bindungen in Form von Einschlüssen identifiziert. Generell verringert die Bildung von gebundenen Rückständen signifikant die biologische Zugänglichkeit und die biologische Verfügbarkeit der Verbindung.“

Nicht-extrahierbare Rückstände können aufgrund der oben genannten Definition von originären Schadstoffen oder deren Umwandlungsprodukten (Metaboliten) unterschieden werden. Extrahierbare Verbindungen sind im Gegensatz zu den nicht-extrahierbaren Rückständen mit organischen Lösungsmitteln extrahierbar und damit auch analytisch nachweisbar. Der Begriff „nicht-extrahierbare Rückstände“ ist jedoch als eine operationale Definition zu verstehen, da er sich immer auf das jeweilig verwendete Extraktionsverfahren bezieht, wobei möglichst effektive und erschöpfende Extraktionen Anwendung finden müssen. Weniger effektive Extraktionsverfahren (z.B. wässrig-methanolische Extraktion) sind hingegen geeignet, den Anteil der weniger fest sorbierten Schadstoffe, also beispielsweise noch bioverfügbare Anteile zu erfassen (Kelsey et al. 1997).

Da die Festlegung oder Humifizierung von in den Boden eingetragenen Stoffen ein unvermeidbarer Prozess ist und auch Natur-eigene Stoffe (z.B. Glucose) bei deren Abbau im Boden nicht-extrahierbare Rückstände bilden (Baldock et al. 1989), versucht man sich die natürlich im Boden ablaufenden Humifizierungsprozesse zunutze zumachen und als Sanierungsstrategie anzuwenden, um Schadstoff(-derivate) (z.B. PAK, TNT) langfristig im Boden zu immobilisieren (s. Abb. 1.2) (Bollag 1992, Bollag & Myers 1992, Mahro 1994, Mahro et al. 1994, Eschenbach et al. 1997a, Berry & Boyd 1985). Dabei wird angenommen, dass die einmal fixierten Schadstoff(-derivate) vom natürlichen Humus des Bodens nicht unterscheidbar sind und keinerlei Freisetzung unterliegen. Insbesondere für PAK und TNT ist die Immobilisierung der Schadstoffe durch Einbindung in die Humusmatrix nachgewiesen worden (Achnich et al. 1999, Eschenbach et al. 1997b) Das Verfahren der Humifizierung

beruht darauf, die Schadstoffe durch Einstellung der Prozessparameter zu transformieren und dadurch die Einbindung der Schadstoffderivate in die Bodenmatrix gezielt zu fördern, beispielsweise durch Zugabe ausgewählter organischer Supplemente (z.B. Kompost) (Baumgärtner et al. 1999, Achtnich et al. 1997) oder z.B. durch einen Wechsel von Anaerob- und Aerob-Phasen während der Sanierung (Bruns-Nagel et al. 1998).

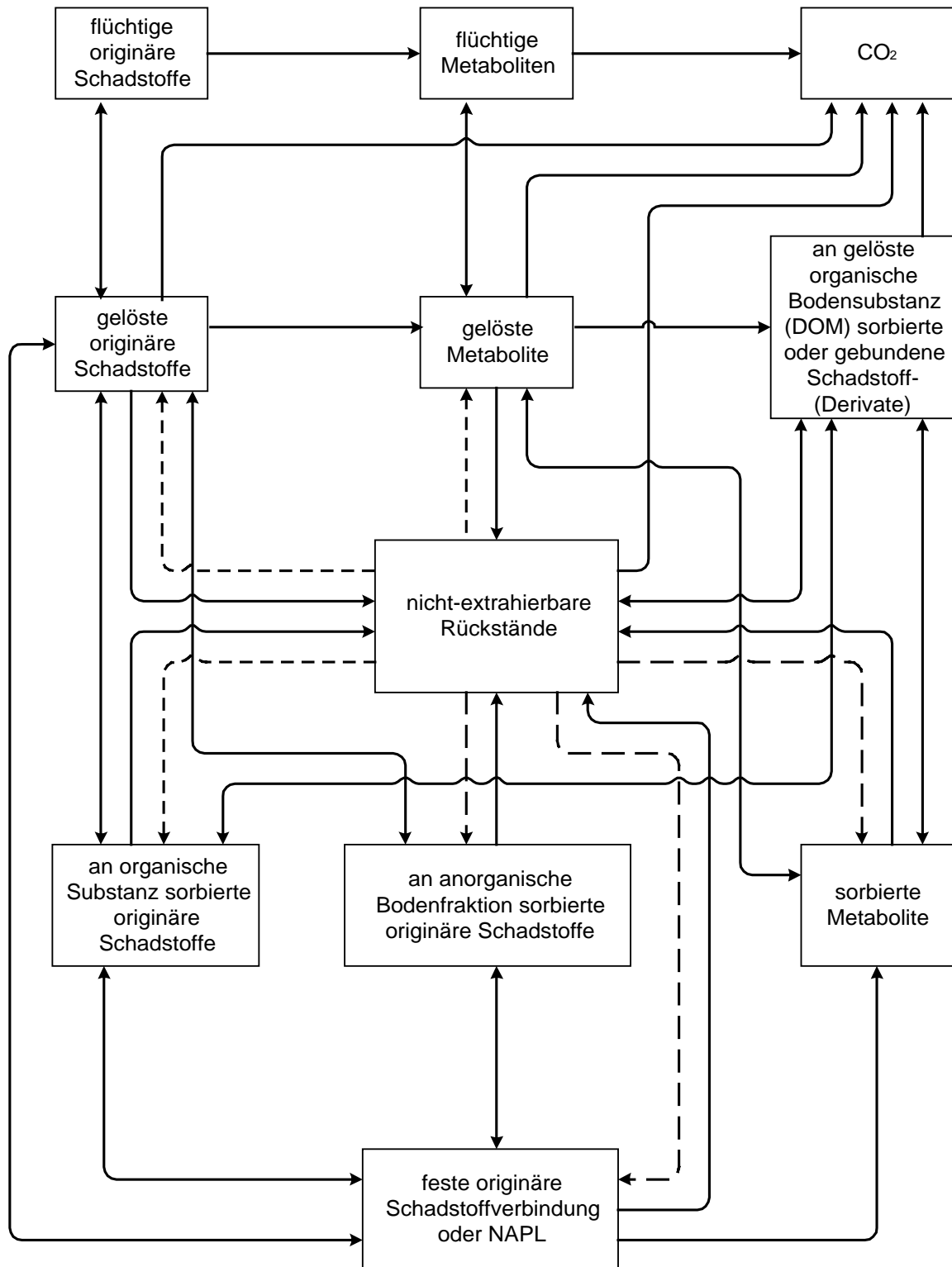


**Abb. 1.2:** Übersicht über die möglichen biologischen Eliminierungspfade bei dem Abbau von organischen Schadstoffen im Boden hier am Beispiel von PAK (Kästner et al. 1993, Mahro & Kästner 1993)

Während der vollständige Abbau von Schadstoffen (Mineralisation) eine unmittelbare Detoxifikation der Schadstoffe darstellt, muss der Nachweis der Unbedenklichkeit der festgelegten oder immobilisierten Schadstoffe erst durch wissenschaftliche Untersuchungen erbracht werden. Voraussetzung für die Nutzung der Humifizierung bei der biologischen Bodensanierung ist, dass die eingebundenen Schadstoff(-derivate) aber tatsächlich entweder vom natürlichen Humus nicht mehr unterscheidbar sind oder dass diese im Zuge eines sich über mehrere Jahre erstreckenden Humus-Turnovers ökologisch nachhaltig zu CO<sub>2</sub> und Wasser endoxidiert werden, dass die festgelegten Schadstoffe auch immobilisiert bleiben und nicht nach längeren Zeiträumen im Grundwasser, in Pflanzen oder Tieren wieder zum Vorschein kommen (Mahro 1999).

In Abb. 1.3 ist der mögliche Verbleib von in den Boden eingetragenen organischen Schadstoffen in den verschiedenen Kompartimenten des Bodens in den Phasen fest, flüssig

und gasförmig aufgezeigt. Es wird deutlich, dass es sich um ein hochkomplexes System handelt. Durch im Bodenmaterial vorhandene Mikroorganismen kann ein Teil der in unterschiedlichster Form vorliegenden Schadstoffverbindungen zu CO<sub>2</sub> mineralisiert werden. Dabei entscheidet vor allem die Bioverfügbarkeit der Schadstoffe über deren Abbaubarkeit (Mahro 2000).



**Abb. 1.3:** Multi-Kompartiment-Schema zum Verbleib von in den Boden eingetragenen Schadstoffen (NAPLs= non aqueous phase liquids: nicht-wässrige flüssige Schadstoffphase)

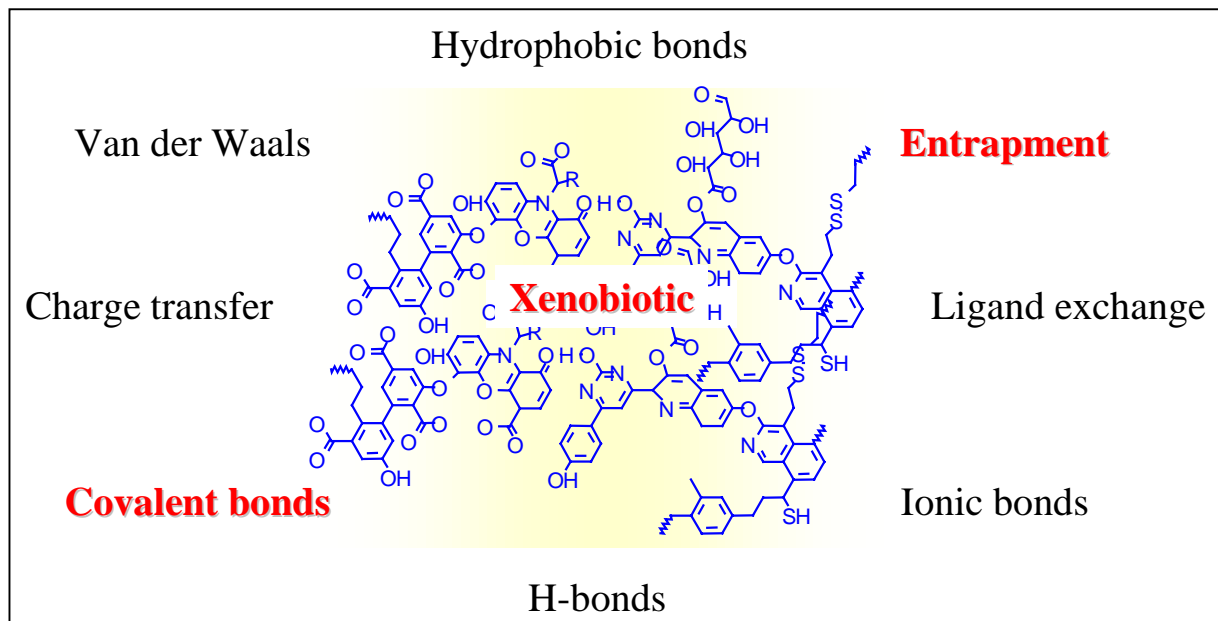
Die für Abbau und Umbau sowie Festlegungswege wichtigen Prozesse sind in Abb. 1.3 als durchgezogene Linien dargestellt. Die gestrichelten Linien zeigen denkbare Wege auf, die bei der Frage nach einer möglichen Freisetzung nicht-extrahierbarer Rückstände zu klären sind.

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

In welchem Ausmaß Mineralisation, Bildung von nicht extrahierbaren Rückständen und der Verbleib in einer extrahierbaren Form ausgeprägt sind, wird im wesentlichen durch die untersuchten Schadstoffe (PAK, TNT) bedingt. So werden PAK beispielsweise sowohl mineralisiert als auch in Form von nicht-extrahierbaren Rückständen festgelegt (Eschenbach et al. 1998), während TNT fast ausschließlich nicht-extrahierbar im Boden festgelegt wird und die Mineralisation keine oder nur eine sehr untergeordnete Rolle spielt (Drzyzga et al. 1998). Bei realen Altlastschadensfällen verbleibt auch nach langen Einwirkzeiten - insbesondere bei PAK - ein gewisser Anteil der Schadstoffe extrahierbar im Boden, was durch eine noch extrahierbare, aber nicht mehr abbaubare Restkontaminationen repräsentiert wird (Mahro et al. 1999, Weissenfels et al. 1992).

(Organische) Schadstoffe können an die organische Bodensubstanz adsorbiert oder gebunden werden, wobei die Bindungsformen zwischen einer reversiblen Sorption und einer resistenten Festlegung variieren (vgl. Abb. 1.3). Einen Überblick über verschiedene Mechanismen und die Bindungsformen von organischen Schadstoffe an die Bodenmatrix geben z.B. Chiou (1989), Hassett & Banwart (1989), Wienberg (1990), Senesi (1992, 1993), Wais (1997) und Haider & Schäffer (2000). Demnach können Schadstoffe durch Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoffbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen oder Charge-Transfer-Komplexe adsorptiv an die organische Substanz gebunden werden (vgl. Abb. 1.4). Dabei hängt die Stärke dieser Adsorption von den Eigenschaften der Schadstoffe und der Huminstoffe ab. Es wird davon ausgegangen, dass die Adsorption ein weitgehend reversibler Prozess ist, ein Teil der Komponenten also verfügbar oder mobilisierbar bleibt

und auch lösemittel-extrahierbar ist (Bollag et al. 1992b, Michaelis 1994, Richnow et al. 1993).

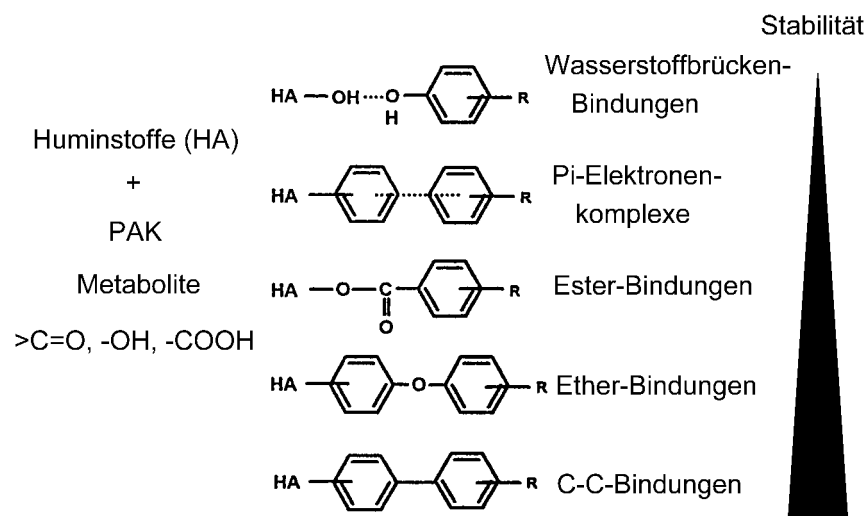


**Abb. 1.4:** Mögliche Bindungsformen/Wechselwirkungen von Xenobiotika an/mit der Bodenmatrix (organische Substanz und Tonminerale) (Haider & Schäffer 2000)

Als stabile Bindungsformen gelten die kovalente Bindungen. Allerdings sollte eine Differenzierung vorgenommen werden, da einige der kovalenten Bindungen, z.B. Ester- oder Peptid-Bindungen, leicht hydrolysierbar sind. Ether-, C-C- oder andere C-N-Bindungen, die schwer oder nicht hydrolysierbar sind, können als stabil angesehen werden. Organische Schadstoffe mit funktionellen Gruppen können kovalente Bindungen mit der organischen Bodensubstanz eingehen. PAK-Verbindungen können erst nach einer Metabolisierung, die mit der Ausbildung funktioneller Gruppen (z.B. Carboxyl- oder Carbonyl-Gruppen) einhergeht, kovalente Bindungen mit der organischen Bodenmatrix eingehen (Richnow et al. 1994). Es sind Ester-, Ether- und C-C-Bindungen zwischen PAK-Metaboliten und Huminstoffen möglich (Abb. 1.5). Dabei nimmt die chemische Stabilität der Bindung ausgehend von Wasserstoffbrückenbindungen, über  $\pi$ -Elektronenkomplexen, Ester- und Ether-Bindungen bis zu C-C-Bindungen zu (Richnow et al. 1993).

Untersuchungen zur Bindungsstruktur von  $^{13}\text{C}$ -markierten PAK-Derivaten und Huminstoffen zeigten, dass bei der Hydrolyse PAK-Fragmente wie  $^{13}\text{C}$ -Hydroxynaphthensäuren und  $^{13}\text{C}$ -Phthalsäure aus den Huminstoffen freigesetzt wurden (Richnow et al. 1998). Weiterhin wurde die Bildung von Ester-Bindungen zwischen PAK-Metaboliten und Molekülen der organischen Substanz nachgewiesen. Dabei konnte an einem biologisch vorbehandelten PAK-Boden durch Hydrolyse in Gegenwart von  $^{18}\text{O}$ -markierter NaOH und spektroskopischen

Untersuchungen gezeigt werden, dass ein Teil der freigesetzten Kohlenstoffstrukturen ursprünglich von festgelegten PAK stammen musste (Richnow & Michaelis 1996).

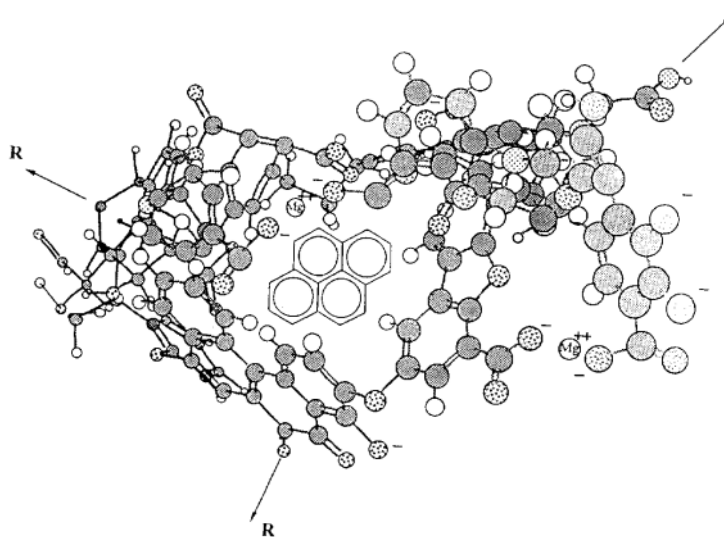


**Abb. 1.5:** Mögliche Bindungsformen von PAK und deren Metaboliten an die organische Substanz des Bodens (verändert nach Richnow et al. 1993)

In Untersuchungen zur zeitlichen Einbindung wurde nachgewiesen, dass i.d.R. unmittelbar nach der Applikation von markierten Substanzen, bereits ein Teil der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität nicht-extrahierbar im Boden vorlag (Eschenbach 1995). Für diese spontane, initiale Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände sind sorptive Prozesse maßgeblich. Die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände, die direkt nach der Applikation von  $^{14}\text{C}$ -markierten PAK auftritt, ist von biogenen Transformationen unabhängig. Als adsorptive Prozesse spielen auch bei PAK Van-der-Waals-Kräfte, Wasserstoff-Brückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen oder Charge-Transfer-Komplexe eine Rolle. Obwohl diese adsorptiven Prozesse zunächst weitgehend reversibel und durch relativ schwache Wechselwirkungen gekennzeichnet sind, können sie dennoch zur Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen beitragen. Darüber hinaus können über längere Zeiträume adsorptiv gebundene Schadstoffe in festere Bindungsformen übergehen und damit resistenter gegenüber Extraktion und Abbau werden (Calderbank 1989, Pignatello 1989, Scow 1994). Hatzinger & Alexander (1995) beschreiben einen Prozess der „Alterung“ (Aging) von PAK im Boden, der zur Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen führt, ohne dass dies mit einer Veränderung der Molekülstruktur der PAK einher gehen soll. Sie führen dieses Phänomen auf eine Diffusion in Mikroporen, eine Verteilung gemäß der Konzentrationsgradienten und starke Adsorption an Oberflächen zurück. Bei kontaminierten Böden kommt auch eine Sorption an die

Kontaminationsphase z.B. Kohle und Kokspartikel als Mechanismus der Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände in Betracht (Kästner 1998, Weissenfels et al. 1992).

Der über die reine Adsorption hinausgehende physikalische Einschluss von organischen Schadstoffen (als Sequestrierung oder Entrapment bezeichnet) in Poren oder Hohlräume der makromolekularen Huminstoffe findet in letzter Zeit als ein wichtiger unspezifischer Mechanismus der Bindung zunehmend Beachtung (Achnich et al. 1999, Bollag & Loll 1983, Chiou 1989, Dec et al. 1997, Haider et al. 1992, Senesi 1993, Guthrie et al. 1999). Als Sequestrierung wird auch die langsame Diffusion der Schadstoffe in nichtzugängliche Mikroporen der Bodenmatrix beschrieben, in denen die Schadstoffe zurückgehalten werden (Alexander 1997). Dies beruht darauf, dass die organische Bodensubstanz Hohlräume in Nanometer-Größe mit adsorptiv wirksamen inneren Oberflächen aufweisen soll, in die Schadstoffe hinein diffundieren können (Pignatello & Xing 1996). Der Verlauf einer möglichen Sequestrierung von Schadstoffen in hydrophobe Regionen von Huminstoffen wurde für PAK von Engbretson & Wandruszka (1994) beschrieben. Ein Modell von sequestrierten PAK ist in Abb. 1.6 wiedergegeben. Engbretson und Wandruszka (1994) konnten zeigen, dass gelöste Huminsäuren in der Lage sind, Pyren in hydrophobe Mikrokompartimente einzuschließen. Die Stärke dieser Bindung ist dabei von der Hydrophobizität des Bindungsplatzes abhängig. Die Heterogenität und Komplexität organischer Makromoleküle ermöglicht eine große Diversität von unterschiedlich starken hydrophoben Adsorptionsplätzen (Murphy & Zachara 1995).



**Abb. 1.6:** Modell eines in die Humussubstanz sequestrierten PAK-Moleküls (verändert nach Engbretson & Wandruszka 1994).

Durch die Silylierung des extrahierten Bodenmaterials kann der Nachweis einer Sequestrierung von Schadstoffen oder auch von deren Derivaten erfolgen. Bei der Silylierung wird eine Derivatisierung der organischen Bodensubstanz mit Trimethylchlorsilan durchgeführt, die zur Desintegration der Humusaggregate führt. Dadurch werden zuvor sequestrierte Schadstoffe in gelöster Form freigesetzt, die dann auch wieder mit herkömmlichen Verfahren weiter charakterisiert werden können (z.B. mit TLC) (Dec et al. 1997, Haider et al. 1993).

Das „Verschwinden“ der Kontaminanten wird durch die Zugabe von organischen Zuschlagstoffen wie Kompost zum Teil deutlich stimuliert (Hupe et al. 1996, Hupe et al. 1998, Lotter et al. 1993, Mahro & Kästner 1993b), weshalb in einigen Studien der Einfluss verschiedener organischer Supplemente auf die Entstehung nicht-extrahierbarer Rückstände untersucht wurde. Dabei stand zunächst die Annahme im Vordergrund, dass die Zugabe von organischer Substanz als zusätzliche Bindematrix die Humifizierung von Schadstoffen gezielt fördern kann. In ihren Untersuchungen konnten Eschenbach et al. (1998) allerdings zeigen, dass die Zugabe der Supplemente (Kompost, Rindenmulch) z.T. den Abbau der <sup>14</sup>C-PAK im Bodenmaterial erheblich steigerte, was i.d.R. zu Lasten der nicht-extrahierbaren Rückstände erfolgte. Zum Teil war der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände sogar in dem mit Kompost oder Rindenmulch versetzten Bodenmaterial geringer als in einem ungesupplementierten Kontroll-Boden (Eschenbach et al. 1997b). Eine humifizierende Wirkung, d.h. eine gesteigerte Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen im Boden durch Supplement-Zugabe wurde aber nicht festgestellt.

In realen Altlast-Schadensfällen ist häufig ein wiederholter Schadstoffeintrag durch über einen längeren Zeitraum andauernde Versickerung von Schadstoffe anzutreffen. Um zu untersuchen, wie sich eine wiederholte Zugabe von PAK auf die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen bzw. auf die Mineralisation der Schadstoffe auswirkt, wurden Langzeitversuche mit und ohne Zugabe von organischen Supplementen durchgeführt. Auch nach wiederholter Zugabe von PAK konnte die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen nicht gesteigert werden. Die zusätzlich applizierten Schadstoffe wurden in beiden Versuchsvarianten (mit und ohne Kompost) mineralisiert, jedoch war das Ausmaß der Mineralisation in dem Versuchsansatz mit Kompost-Zugabe wesentlich höher, als im Versuchsansatz ohne Kompost-Zugabe (Richnow et al. 1999).

Die Hypothese, dass Kompost mit hohem Gehalt an organischem Kohlenstoff als zusätzliche Bindungsmatrix für nicht-extrahierbare Rückstände fungiert konnte somit nicht bestätigt werden. Es wird deshalb angenommen, dass das metabolisierende Potential der

Bodenmikroflora der Hauptfaktor für die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen ist, was auch das Ausbleiben der Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen in Steril-Ansätzen belegt (Eschenbach et al. 1998).

Auch nach Zugabe von ligninolytischen Weißfäulepilzen (*Pleurotus ostreatus*), bei denen angenommen wurde, dass sie über unspezifische Radikalreaktionen und oxidative Kopplungen durch Exoenzyme zur Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände beitragen können, war kein spezifischer Anstieg des im Boden humifizierten Schadstoffanteils festzustellen (Eschenbach et al. 2000).

In keinem der untersuchten Fällen konnte durch die Zugabe organischer Supplemente (Kompost, Rindenmulch) oder auch von Weißfäulepilzen eine gezielte Einbindung oder Humifizierung gefördert werden. Dem entsprechend ist noch kein Supplement gefunden worden, dass ausschließlich die Humifizierung von PAK begünstigt ohne die Mineralisation ebenfalls zu fördern.

Eine biologische Aktivität ist allerdings die Voraussetzung für die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen im Boden. In Untersuchungen mit sterilisiertem Bodenmaterial mit  $^{14}\text{C}$ -PAK war zwar die oben beschriebene initiale spontane Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände (direkt 1-2 Stunden nach der Applikation) festzustellen, aber während der Inkubation fand keine weitere Zunahme dieser Fraktion statt (Eschenbach et al. 1998). In biologisch aktiven Bodenmaterialien wurden hingegen z.T. ganz erhebliche Zunahmeraten ermittelt (Eschenbach 1995, 2000)

Beobachtet wurde auch ein enger Zusammenhang zwischen einem PAK-Abbau im Boden und der Bildung gebundener Rückstände. Wenn eine Mineralisation eingesetzt hat, war auch eine deutliche Zunahme nicht-extrahierbarer Rückstände zu beobachten. Werden die PAK nicht mineralisiert - wie dies teilweise bei Benzo(a)pyren der Fall ist - findet auch keine oder nur eine sehr geringfügige über die spontane Einbindung hinausgehende weitere Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände statt (Eschenbach et al. 1997a). Gleichzeitig ist die Mineralisation aber auch ein konkurrierender Prozess. Werden die PAK schnell und in hohem Ausmaß mineralisiert, wie es beispielsweise auf Grund der relativ hohen Wasserlöslichkeit bei Naphthalin oder Pyren ermittelt wurde, ist das Ausmaß der Humifizierung gering. Die Substanzen werden mineralisiert, bevor sie festgelegt werden können.

Auch bei Inkubation von  $^{14}\text{C}$ -markierten bakteriellen PAK-Metaboliten ( $^{14}\text{C}$ -cis-1,2-Dihydro-1,2-dihydroxyanthracen und  $^{14}\text{C}$ -4,5-Dicarboxyphenanthren) im Boden zeigte sich eine sehr

hohe und z.T. sehr schnelle Einbindung dieser PAK-Derivate (Eschenbach et al. 1998). Zum Teil wurden diese Metabolite aber auch sehr schnell und weitgehend mineralisiert.

Nach Abschluss des ersten Forschungsprojektes zum Thema „Untersuchung und Bildung der Langzeitstabilität von humifizierten PAK in biologisch behandelten Recyclingböden“ (FKZ 1480937) sind vor diesem Hintergrund noch folgende Fragen offen geblieben, die nun weiter untersucht werden sollten:

Erstens sollten die bisher durchgeführten Untersuchungen zur Bildung von nicht-extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -PAK-Rückständen auch auf unterschiedlich humose Bodenmaterialien ausgedehnt werden. Darüber hinaus sollte in diesem Forschungsprojekt die Stabilität der nicht-extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -PAK-Rückstände, insbesondere unter dem Einfluss von Organismen der streuzersetzenden Bodenfauna (Regenwürmer) untersucht werden. Weiter sollte untersucht werden, ob verschiedene mechanisch, biologisch oder chemisch wirksame Stressoren im Boden zu Remobilisierungsprozessen führen. Dazu wurde eine Kombination aus den bisher effektivsten physikalischen und biologischen Remobilisierungsmaßnahmen auf nicht-extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -PAK-Rückstände im Boden angewendet. Die Ergebnisse dieser experimentellen Untersuchungen werden im Folgenden dargestellt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1 Bodenmaterialien

In den Untersuchungen zur Bildung und Langzeitstabilität von nicht-extrahierbaren PAK-Rückständen wurden mit drei unterschiedlichen Bodenmaterialien gearbeitet:

- hoch-kontaminiertes humoses Altlastbodenmaterial (Altlastboden Bremen),
- künstlich kontaminiertes Modellbodenmaterial (Modellboden Muttergarten),
- hoch kontaminiertes Altlastbodenmaterial (Altlastboden Wülknitz).

Das Altlastbodenmaterial Bremen entstammte einem Rüstungslager aus der Umgebung von Bremen (Achim) und wurde aufgrund seines hohen  $C_{\text{Org}}$ -Gehaltes (13,8) für die Untersuchungen ausgewählt, da angenommen wurde, dass hohe Gehalte an natürlicher organischer Substanz die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen begünstigen. Das Modellbodenmaterial Muttergarten und das Altlastbodenmaterial Wülknitz wurden im vorangegangenen Projekt „Untersuchung und Bildung der Langzeitstabilität von humifizierten PAK in biologisch behandelten Recyclingböden“ (FKZ 1480937) mit  $^{14}\text{C}$ -PAK dotiert und inkubiert. Durch die biologische Behandlung der Bodenmaterialien wurden beträchtliche Anteil der  $^{14}\text{C}$ -PAK als nicht-extrahierbare Rückstände festgelegt (vgl. Tab. 2.3). Bei dem Bodenmaterial Muttergarten handelte es sich um ein Modellbodenmaterial mit einem sehr niedrigen  $C_{\text{Org}}$ -Gehalt (0,9), das zuvor nicht kontaminiert war und dem erst für die Versuche künstlich nicht-markierte PAK sowie  $^{14}\text{C}$ -markierte PAK zugegeben wurden. Das Altlastbodenmaterial Wülknitz entstammte einem Holz-Imprägnierwerk und war stark mit Teeröl verunreinigt, es wurde von der Firma Standort (Ludwigsburg) zur Verfügung gestellt. Die Bodeneigenschaften der eingesetzten Bodenmaterialien sind in Tab. 2.1 dargestellt.

**Tab. 2.1:** Bodeneigenschaften der verwendeten Bodenmaterialien

Bezeichnung	Muttergarten (Modellboden- material)	Wülknitz (Altlastboden- material)	Bremen (Altlastboden- material)
Bodenart	schluffiger Ton	lehmiger Sand	Sand
Kontaminationsart	nicht kontaminiert	Teeröl	Mineralöl
PAK-Gehalt [mg EPA-PAK/kg Boden]	nicht nachweisbar, zuvor unkontaminiert	6.400	3.500
$C_{\text{Org}}$ [Gew.-%]	0,9	6,7	13,8
Maximale Wasserhalte- kapazität [Gew.-%]	53,0	20,4	20,0
pH ( $\text{CaCl}_2$ )	6,9	7,2	5,3

Aufgrund ihrer Kontaminationsgeschichte wiesen die verwendeten Bodenmaterialien unterschiedliche PAK-Gehalte auf, die in Tab. 2.2 detailliert dargestellt sind.

**Tab. 2.2:** PAK-Gehalte [mg/kg Boden] der Bodenmaterialien Muttergarten und Wülknitz

PAK [mg/kg Boden]	künstlich kontaminierter Modellboden Muttergarten	Altlastboden Wülknitz	Altlastboden Bremen
Naphthalin	61	169	260
Acenaphten	79	625	320
Fluoren	87	697	280
Phenanthren	396	1557	1100
Anthracen	46	985	180
Fluoranthen	137	1269	490
Pyren	187	778	350
Benz(a)anthracen	6	114	40
Chrysen	7	135	40
Dibenz(a,h)anthracen	n.n.	<1	50
Benzo(b)fluoranthen	n.n.	38	40
Benzo(k)fluoranthen	n.n.	17	30
Benzo(a)pyren	n.n.	24	70
Benzo(g,h,i)perylen	n.n.	6	n.n.
Indeno(1,2,3-cd)pyren	n.n.	16	40
<b>Summe EPA-PAK</b>	<b>1006</b>	<b>6430</b>	<b>3520</b>

n.n.: nicht nachweisbar

Die Bodenmaterialien Muttergarten und Wülknitz wurden im vorangegangenen Forschungsvorhaben „Untersuchung und Bildung der Langzeitstabilität von humifizierten PAK in biologisch behandelten Recyclingböden“ (FKZ 1480937) mit  $^{14}\text{C}$ -PAK und das Modellbodenmaterial Muttergarten auch mit nicht-markierten PAK (vgl. Tab 2.2) dotiert. Durch die biologische Behandlung wurden beträchtliche Anteile der PAK als nicht-extrahierbare Rückstände in der Bodenmatrix festgelegt. Diese Bodenmaterialien wurden in den nachfolgenden Remobilisierungsexperimenten eingesetzt.

**Tab. 2.3:** Anteil der nicht-extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -PAK-Rückstände der eingesetzten Bodenmaterialien in Prozent der im Boden vorhandenen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität

Bodenmaterial	Muttergarten (Modellbodenmaterial)			Wülknitz (Altlastbodenmaterial)		
	Benzo(a)-pyren	Pyren	Anthracen	Benzo(a)-pyren	Pyren	Anthracen
Anteil nicht-extrahierbarer $^{14}\text{C}$ -markierter PAK-Rückstände	39,8 %	82,7 %	86,3 %	21,2 %	43,3 %	77 %

## 2.1.2 Chemikalien

$^{14}\text{C}$ -markierte PAK:

- $^{14}\text{C}$ -u-Seitenring-Anthracen, Molekulargewicht: 178,2 g/mol, spezifische Aktivität:  $45,14 \times 10^7$  Bq/mmol, radiochemische Reinheit >98 %, SIGMA Chemical Company, Deisenhofen, BRD
- $^{14}\text{C}$ -4,5,9,10-Pyren, Molekulargewicht: 202,26 g/mol, spezifische Aktivität:  $11,95 \times 10^8$  Bq/mmol, radiochemische Reinheit >98 % angegeben, SIGMA Chemical Company, Deisenhofen, BRD
- $^{14}\text{C}$ -7,10-Benzo(a)pyren, Molekulargewicht: 254 g/mol, spezifische Aktivität:  $22,6 \times 10^8$  Bq/mmol, radiochemische Reinheit 97,1 %, Amersham-Buchler, Braunschweig, BRD.

Für die Bestimmung der  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten mit der Flüssig-Szintillationsmessung wurde als Szintillationscocktail Pico-Fluor TM 40 (Canberra-Packard GmbH, Frankfurt, BRD), ein Lösemittelgemisch auf Pseudocumol-Basis, eingesetzt.

Zur Absorption von  $\text{CO}_2$  während der Verbrennung von Bodenproben diente Carbo-Sorb (2-Methoxyethylamin, Canberra-Packard GmbH, Frankfurt, BRD).

Die verwendeten Lösungsmittel Ethylacetat, Methanol, Hexan und Chloroform wurden in der Qualität p.a. bzw. LiChrosolv (Methanol) von Merck, Darmstadt, BRD, bezogen, ebenso wie alle anderen verwendeten Chemikalien (NaOH, HCl,  $\text{Na}_2$ -EDTA usw.).

### 2.1.3 Organische Supplemente und Organismen

Als Supplemente wurden Kompost, Rindenmulch und Waldbodenstreu verwendet, die in dem vorangegangenen Projekt „Untersuchung der Bildung und Langzeitstabilität von humifizierten PAK in biologisch behandelten Recyclingböden“ (FKZ 1480937) eingesetzt worden waren.

Beim Kompost handelte es sich um einen Grünschnitt-Fertigkompost, Rottegrad IV, der auf dem Kompostplatz Zuffenhausen (Stadtgärtnerei Stuttgart) produziert wurde. Das Material wurde vom Produzenten gehäckselt und auf kleiner 20 mm gesiebt. Vor Einsatz in die Inkuabtions- bzw. Remobilisierungsversuchen wurde das Kompostmaterial auf unter 8 mm gesiebt.

Bei dem Rindenmulch handelte es sich um Baumrindenmulch der Recyclinganlage H.G. Schmid, Steinkirch. Das Material wurde ca. drei Wochen auf einer Miete gelagert, vom

Produzenten gehäckselt und auf kleiner 20 mm gesiebt. Auch dieses Supplement wurde für die Versuche auf kleiner 8 mm abgesiebt.

Die Waldbodenstreu stammte aus einem Buchenwald südlich von Hamburg (Hamburg-Heimfeld). Es wurde Material des Oe und Oa Horizontes entnommen, das zersetztes und teilweise zersetztes organisches Material (Blätter usw.) enthielt. Nach Entfernung von Wurzeln und kleinen Ästen wurde auch dieses Supplement auf kleiner 8 mm abgesiebt.

Die Supplemente wurden in den Versuchen zur Remobilisierung von nicht-extrahierbaren Rückstände mit einem Trockengewichtsanteil von 20 % zugegeben.

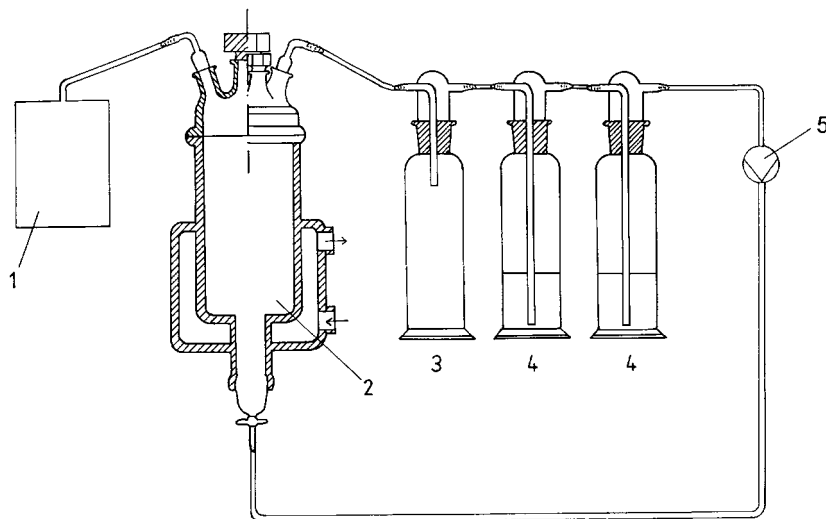
Der Actinomycet *Rhodococcus erythropolis* (DSM 1069) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig bezogen.

Bei den Versuchen zur Remobilisierung nicht-extrahierbarer Rückstände durch streuzersetzende Organismen der Bodenfauna kamen zwei Regenwurmart zum Einsatz: *Aporrectodea caliginosa*, als endogäischer Vertreter (Mineralbodenform) wurde von U. Gräfe, in Hamburg bezogen. *Eisenia fetida*, als epigäischer Vertreter (Streuform) wurde vom Verein Bakterien, Pilze, Regenwürmer e.V. in Borken-Burlo geliefert.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchssystem

Die Versuche zur Bildung von nicht-extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -PAK-Rückständen bzw. zur Remobilisierung von nicht-extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -PAK-Rückständen wurden in geschlossenen Bioreaktorsystemen durchgeführt (vgl. Abb. 2.1). Der Reaktor wurde mit dem jeweiligen Bodenmaterial mit  $^{14}\text{C}$ -PAK bzw.  $^{14}\text{C}$ -PAK-Rückständen beschickt und mittels Schlauchpumpe kontinuierlich belüftet. Je nach Versuchsanordnung wurden dem Bodenmaterial Supplemente zugesetzt, z.B. Kompost, Rindenmulch, Waldbodenstreu oder Mikroorganismen. Das entstandene  $^{14}\text{CO}_2$  wurde in den Gaswaschflaschen in 50-100 ml 1 M NaOH eingebunden. Vor, während und nach der Inkubation wurde das Bodenmaterial einem sequentiellen dreistufigen Extraktionsverfahren unterzogen, um den jeweilig extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil zu bestimmen. Der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände wurde durch Verbrennungsanalyse bestimmt (vgl. Kap. 2.2.5).



**Abb. 2.1:** Versuchsaufbau einer Reaktorlinie zur Bildung bzw. Remobilisierung von nicht-extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -markierten PAK-Rückständen. (1: Gassack mit Sauerstoff, 2: Reaktor mit Bodenmaterial, 3: Sicherheitswaschflasche, 4: Waschflaschen mit NaOH, 5: Schlauchpumpe)

### 2.2.2 Applikation von $^{14}\text{C}$ -markierten PAK

Voraussetzung für die Durchführung von Abbauuntersuchungen bzw. Humifizierungs- und Remobilisierungsversuchen mit zudotierten  $^{14}\text{C}$ -PAK bzw.  $^{14}\text{C}$ -PAK-Rückständen, ist eine homogene Verteilung der applizierten Substanzen im jeweiligen Bodenmaterial. Die  $^{14}\text{C}$ -PAK-Stammlösungen wurden in 20 ml Ethylacetat gelöst und langsam in kleinen Tropfen ( $\leq 10 \mu\text{l}$ ) mittels einer 10 ml-Hamilton-Spritze auf das zu kontaminierende Bodenmaterial gegeben. Das Bodenmaterial wurde während dieses Vorgangs in einer elektrischen Edelstahl-Rührmaschine (KM 220, Kenwood electronic plc., Hamshire, U.K., ) durchmischt. Auch nach Zugabe der Dotierungslösung wurde der Boden eine weitere Stunde gerührt, um ein Verdunsten des Lösungsmittels und eine möglichst homogene Verteilung der Schadstoffe zu erreichen. Das während dieser Zeit verdunstete Wasser wurde dem Boden anschließend wieder zugefügt.

### **2.2.3 Sequentielles dreistufiges Extraktionsverfahren zur Bestimmung von PAK in Bodenproben**

Der Anteil der extrahierbaren organischen Schadstoffen (z.B. MKW, PAK) kann durch die Anwendung eines sequentiellen dreistufigen Extraktionsverfahrens in drei unterschiedliche Fraktionen differenziert werden.

#### **1. Stufe (MeOH-H<sub>2</sub>O-Extraktion)**

Um den Anteil der weniger fest sorbierten und damit besser bioverfügbaren Schadstoffe zu ermitteln wurde das zu untersuchende Bodenmaterial durch ein mildes Extraktionsverfahren mit einer Wasser-Methanol-Lösung extrahiert. Jeweils 3 g Boden wurden in Hungate-Röhrchen (Reagenzglas mit Schraubdeckel und Septum) eingewogen (3 Parallelen). Die Bodenprobe wurde mit 3 ml Wasser-Methanol-Lösung (50 Vol.-%:50 Vol.-%) versetzt und mit einem Vortex-Mischer durchmischt. Anschließend wurde die Bodenprobe 30 Minuten im Ultraschallbad (Sonorex Super RK 106, Bandelin; Berlin, BRD) extrahiert und bei 2.700 U/min für 20 Minuten zentrifugiert (Omnifuge 2.0 RS, Heraeus Sepatech, Osterode, BRD). Der Überstand wurde mittels 5 ml-Hamilton-Spritze durch das Septum – unter Volumenbestimmung - abgezogen und analysiert.

#### **2. Stufe (Aceton-Extraktion)**

Bei der zweiten Stufe der Extraktion wurden zu der im Hungate-Röhrchen verbleibenden Bodenprobe 3 ml Aceton zugegeben und diese resuspendiert. Anschließend wurde die Bodenprobe ebenfalls 30 Minuten im Ultraschallbad extrahiert und danach bei 2.700 U/min für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde ebenfalls mit einer Hamilton-Spritze abgezogen, das Volumen bestimmt und analysiert.

#### **3. Stufe (alkalische Hydrolyse)**

Stärker an die Bodenmatrix gebundene Schadstoffe wurden durch eine Verseifung (alkalische Hydrolyse) extrahiert. Dadurch wird zumindest teilweise eine Spaltung von Ester-Bindungen in den Huminstoffen bewirkt (Eschenbach et al. 1994). Bei dieser dritten Extraktionstufe wurden zu der verbleibenden Bodenprobe 2,8 ml Methanol und 0,2 ml einer 2 M NaOH zupipettiert und die Probe resuspendiert. Anschließend wurde die Bodenprobe in einem Wasserbad (SWB 20, Haake Messtechnik, Karlsruhe, BRD) bei 95°C, unter leichtem Schütteln, 1 Stunde lang extrahiert und nach dem Abkühlen bei 2.700 U/min 20 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgezogen, das Volumen bestimmt und analysiert.

Durch die Bestimmung des verbleibenden Restvolumens des vorangegangenen Extraktionsmittels wurde die Verschleppung bei dem jeweiligen Extraktionsschritt berechnet. Diese dreistufigen Extraktionsverfahren sind beschrieben in Eschenbach et al. (1994) und Eschenbach (1995). Mit einigen ausgewählten Extraktionsrückstände wurde eine Huminstoffextraktion durchgeführt.

#### **2.2.4 Huminstoffextraktion und -fraktionierung**

Nach dem dreistufigen Extraktionsverfahren wurde mit den Extraktionsrückständen z.T. eine Huminstofffraktionierung durchgeführt, um die nicht-extrahierbaren Rückstände in Fulvosäuren, Huminsäuren und Huminen zu differenzieren. Fulvosäuren sind über den gesamten pH-Bereich löslich. Huminsäuren sind nur bei hohen pH-Werten löslich, bei sauren pH-Werten sind sie nicht löslich. Humine sind weder bei sauren, noch bei basischen pH-Werten löslich.

Zu den verbliebenen Extraktionsrückständen des dreistufigen Extraktionsverfahrens wurden 12 ml 0,5 M NaOH zugegeben und diese resuspendiert. Anschließend wurden die Proben in einem Überkopfschüttler 15 Stunden extrahiert und danach bei 4.000 U/Min. 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand (extrahierbare Humin- und Fulvosäuren) wurde abdekantiert und analysiert. Die nicht-extrahierbaren Bodenreste (Humine) wurden getrocknet, gemörsert in der Verbrennungsanlage verbrannt, um die verbliebene  $^{14}\text{C}$ -Aktivität zu bestimmen. 5 ml des Überstandes wurden mit 400-800  $\mu\text{l}$  rauchender Salzsäure (32%ig) angesäuert, und auf einen pH von  $\leq 1$  eingestellt, worauf die Huminsäuren als dunkler Niederschlag ausgefällt wurde. Der Extrakt mit den gelösten Fulvosäuren wurde für 15 Minuten zentrifugiert (3.000 U/Min.) und der Überstand analysiert. Die ausgefallenen Huminsäuren wurden mit 5 ml 0,5 M NaOH resuspendiert (pH 14) und nach erneutem Zentrifugieren (3.000 U/Min./ 15 Minuten) analysiert.

#### **2.2.5 Bestimmung der $^{14}\text{C}$ -Aktivität von Bodenproben**

Die  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten der Bodenproben wurden durch Verbrennung ermittelt. Dieses Verfahren wurde sowohl zur Bestimmung der Gesamtaktivitäten der Bodenproben als auch zur  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsbestimmung der nicht-extrahierbaren Rückstände angewandt.

Zu diesem Zweck wurde ca. 1 g Bodenprobe in ein Porzellanschiffchen eingewogen und verbrannt. Das dabei entstehende  $^{14}\text{CO}_2$  wurde in einem flüssigen  $\text{CO}_2$ -Absorber (Carbo-Sorb; 2-Methoxyethylamin) aufgefangen und anschließend im  $\beta$ -Szintillationszähler quantitativ bestimmt. Die Verbrennung wurde im Sauerstoffstrom mit einer Apparatur der Firma Ströh-

lein Instruments, Kaarst, BRD (I-05/RP und D-02 GTE) durchgeführt (vgl. Abb. 2.2). Nach einer Vorheizphase (4 min, 150 °C) wurde das Probenmaterial für 10 min bei 900-1000°C verbrannt. Die  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsbestimmung durch Verbrennung wurde jeweils mit zwei Parallelproben durchgeführt.

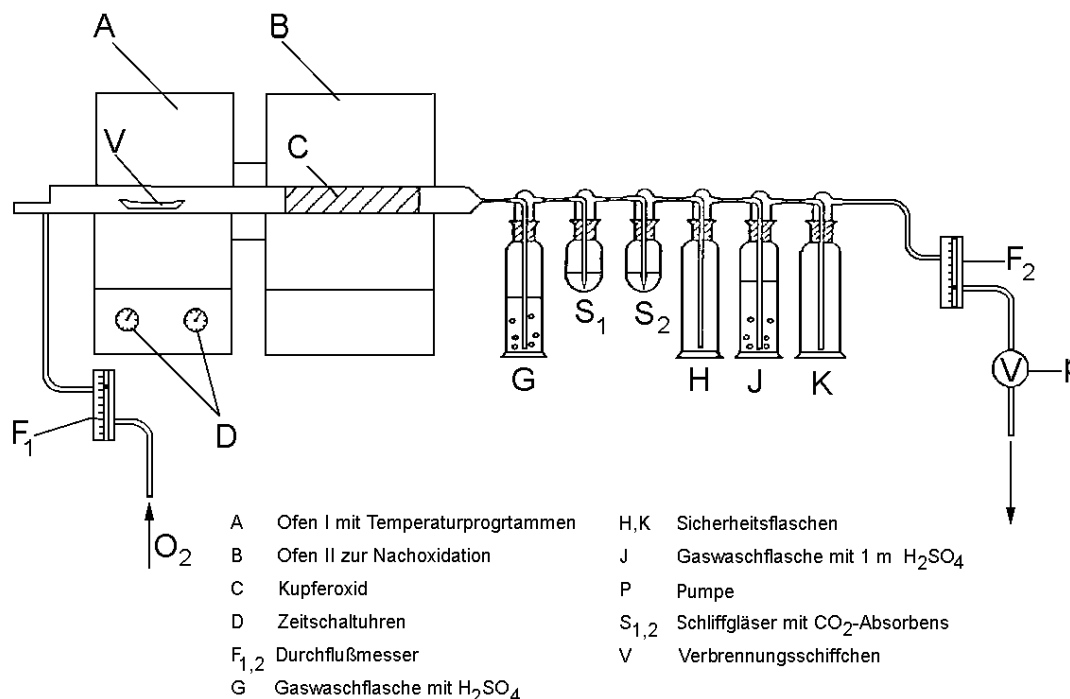


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Verbrennungsapparatur

### 2.2.6 Flüssig-Szintillationsmessung

Die  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsbestimmung in den Lösungen erfolgte mit Hilfe der Flüssig-Szintillationsmessung (Messgerät: TRI-CARB 1600 TR, Liquid Analyzer, Packard Instrument Company, Frankfurt, BRD). Die radioaktiven Lösungen wurden vor den Messungen mit einem Szintillationscocktail (Pico Fluor<sup>TM</sup> 40, Packard Instrument Company, Frankfurt, BRD) vermischt.

Gefärbte Lösungen, wie Bodenextrakte oder chemische Inhaltsstoffe können zu einer Verminderung der Zählausbeute führen, so dass die Zahl der vom Szintillationszähler registrierten Impulse (cpm) geringer ist als die reale Radioaktivität der Probe. Diese Verminderung beruht entweder auf der Absorption des vom Szintillator emittierten Lichtes durch den Farbstoff (Farbquenchen) oder auf dem Vorhandensein von Substanzen in der Probe, die die Phosphoreszenz des organischen Lösungsmittels bzw. die Fluoreszenz des Szintillators durch chemische Wechselwirkungen mit den Inhaltsstoffen des Szintillationscocktails (chemischer Quenchen) verhindern.

Der Quenchgrad jeder Probe wird durch geräte-interne Vergleichsmessungen mit einem externen Standard ermittelt (tSIE-Werte = transformed Spectral Index of the External Standard, Intensitätsverringern der externen Strahlungsquelle). Durch Verwendung von quenched Stammlösungen können Korrekturkurven aufgenommen werden, bei denen die Zählrate bzw. der Wirkungsgrad als Funktion des tSIE-Wertes dargestellt wird. Bei den Messungen erfolgte die Berechnung der realen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität auf der Basis von Quenchkorrekturkurven. Als Quench-induzierende Substanzen wurden hier zum einen Huminstoffe, organische Extrakte der Bodenmaterialien (Altlastbodenmaterial Wülknitz und Modellbodenmaterial Muttergarten) und Chloroform eingesetzt. Die Quenchkurven für Farb- und chemischen Quench sind zwischen tSIE-Werten von 100 und 1000 (ungequenched Probe) weitgehend identisch, so dass mit einer einzigen Korrekturkurve gearbeitet wurde.

## **2.2.7 Biologische Remobilisierungsmethoden**

### **2.2.7.1 Zusatz Huminstoff-abbauender Mikroorganismen**

Bei der biologischen Sanierung kontaminierter Böden werden z.T. Mikroorganismen zugegeben, um die Mineralisation der Schadstoffe gezielt zu beeinflussen. Einige Mikroorganismen sind in der Lage Huminstoffe bzw. Lignin-ähnliche Strukturen ab- bzw. umzubauen. Es ist vorstellbar, dass durch den Abbau der Huminstoff-Strukturen gebundene Schadstoffrückstände freigesetzt werden können.

Für diese Remobilisierungsversuche wurde einerseits der Actinomycet *Rhodococcus erythropolis* (DSM 1069) ausgewählt und andererseits ein Cocktail von Abbauspezialisten bestehend aus *Mycobacterium sp.* VF1, *Mycobacterium sp.* KA1, *Sphingomonas paucimobilis* BA2, und *Gordona sp.* BP9 zugegeben. Die PAK-Abbaufähigkeit in Flüssigkulturen ist für die Abbauspezialisten nachgewiesen worden (Kästner et al. 1991). Für *Rhodococcus erythropolis* ist die Fähigkeit Huminstoff-ähnliche Strukturen wie z.B. Lignin abzubauen, nachgewiesen (Collins et al. 1996, Eggeling & Sahm 1980, Trojanowski et al. 1977). Andererseits war für die Auswahl ausschlaggebend, dass die Organismen gute Überlebenschancen im Bodenmaterial haben bzw. unter natürlichen Bedingungen im Boden vorkommen.

*Rhodococcus erythropolis* wurde in einem Kulturmedium mit Veratrylalkohol als alleinige C-Quelle vorkultiviert (Trojanowski et al. 1977). Diese Kultur wurde in der exponentiellen Wachstumsphase (mid-log Phase) geerntet und mit einer Zellzahl von  $2 \times 10^7$  Zellen/g Boden [TG] inokuliert (Eschenbach et al. 1998a). Die Abbauspezialisten wurden in einer Zellzahl von  $0,25 \times 10^6$  Zellen/g Boden [TG] zugegeben.

Das Bodenmaterial wurde nach Zugabe von Mikroorganismen 206 Tage bzw. in der Variante mit *Rhodococcus erythropolis* 136 Tage inkubiert. Als Kontrolle diente eine nicht mit Mikroorganismen versetzte Bodenprobe, die ebenfalls inkubiert wurde. Vor, während und nach der Inkubation wurden Bodenproben entnommen, und diese einer Extraktion unterzogen. Die Extrakte wurden auf eventuell remobilisierte Schadstoffrückstände ( $^{14}\text{C}$ -Aktivität) analysiert.

### **2.2.7.2 Zugabe unspezifisch wirksamer Supplemente (Kompost, Rindenmulch, Waldbodenstreu)**

Neben der gezielten Zugabe von Mikroorganismen wurde die Zugabe verschiedener unspezifisch wirksamer organischer Supplemente (Kompost, Rindenmulch, Waldbodenstreu) als weitere biologische Remobilisierungsmaßnahmen untersucht. Diese Supplemente wurden ausgewählt, weil sie i.d.R. Mikroorganismen-Populationen enthalten, die effektiv am Ab- bzw. Umbau von organischen Substanzen im Boden beteiligt sind. Durch die Zugabe von organischen Supplementen (Kompost, Rindenmulch, Waldbodenstreu, etc.) zu kontaminiertem Bodenmaterial ist nicht nur eine Steigerung der Mineralisation der betreffenden Schadstoffverbindung möglich, sondern durch den Um- und Abbau des Huminstoffgerüsts durch die Mikroorganismen auch eine Freisetzung gebundener Schadstoffrückstände bzw. sequestrierter originärer Schadstoffe vorstellbar.

Das zu untersuchende Bodenmaterial wurde mit 20 Vol.-% organischem Supplement versetzt (Kompost, Rindenmulch, Waldbodenstreu) und in Kleinreaktoren 206 Tage bzw. in der Variante mit dem Altlastbodenmaterial Bremen 136 Tage inkubiert. Durch sequentielle Extraktionen (s.o.) wurde vor und nach der Inkubation die extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivität und durch Verbrennungsanalyse der nicht-extrahierbare Anteil ermittelt (Eschenbach et al. 1998a, 1998b).

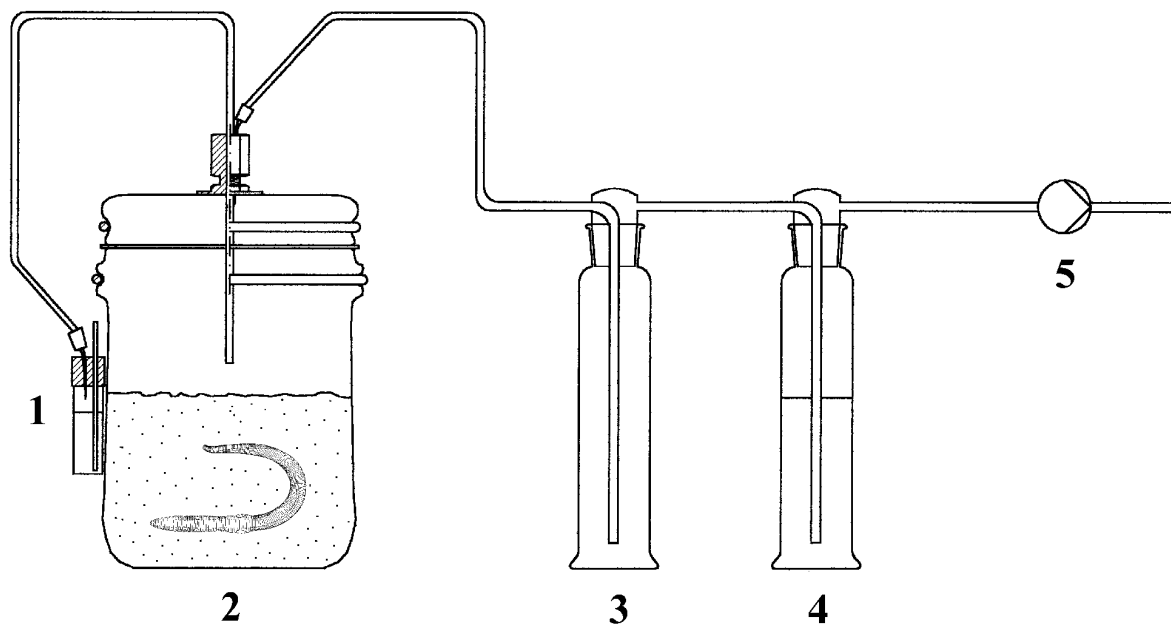
### **2.2.7.3 Zugabe von Organismen der Bodenfauna (Regenwürmer)**

Um den Einfluss von Regenwürmern auf immobilisierte nicht-extrahierbare Schadstoffe zu untersuchen, wurde das zu untersuchende Bodenmaterial mit nicht-extrahierbaren Rückständen 42 Tage lang in geschlossenen Kleinreaktorsystemen unter Zugabe von Regenwürmern inkubiert. Da speziell Regenwürmern bei der Umsetzung organischer Substanz im Boden eine wichtige Aufgabe als streuzersetzende Organismen zukommt, ist davon auszugehen, dass Regenwürmer humifizierte Schadstoffrückstände zusammen mit dem Bodenmaterial ingestieren und eine Remobilisierung der gebundenen Rückstände bewirken können. Um den Einfluss von verschiedenen Regenwurmartens zu untersuchen,

wurden *Eisenia fetida* als epigäische Art (Streuform) und *Aporrectodea caliginosa* als endogäischer Vertreter (Mineralbodenform) eingesetzt. Die Inkubation wurde bei den für die jeweiligen Organismen günstigsten Temperaturen durchgeführt (*A. caliginosa* bei 10°C, *E. fetida* bei 20°C) (Edwards & Bohlen 1996). Um zu gewährleisten, dass sich die Tiere durch das Bodenmaterial durchfressen und nicht an einer Stelle ausharren, wurde die Inkubation in einem Hell/Dunkel-Zyklus durchgeführt. Als Kontrolle diente unsupplementiertes Bodenmaterial, das ebenfalls inkubiert wurde. Das Verhältnis Bodenmaterial/Lumbricid wurde 60 g Boden pro Individuum gewählt, da die Tiere eine definierte Bodenmenge zu Leben benötigen. Die Versuche mit dem Modellbodenmaterial Muttergarten wurden mit *A. caliginosa* und *E. fetida* durchgeführt, aufgrund der begrenzten Mengen an Altlastbodenmaterial mit nicht-extrahierbaren <sup>14</sup>C-PAK-Rückständen wurden die Versuche mit dem Altlastbodenmaterial Wülknitz nur mit *E. fetida* durchgeführt. Die Bodenmaterialien enthielten nicht-extrahierbare <sup>14</sup>C-PAK-Rückständen aus Anthracen, Pyren und Benzo(a)pyren, wobei jeweils drei Parallelen inkubiert wurden. Als Kontrollen wurden für jedes Bodenmaterial drei Ansätze ohne Lumbriciden inkubiert. Die Gesamtheit der Versuchsansätze ist in Tab. 2.4 dargestellt. Der Versuchsaufbau einer einzelnen Parallele ist in Abb. 2.3 schematisch dargestellt, insgesamt wurden 45 Versuchsansätze inkubiert.

**Tab. 2.4:** Versuchsansätze mit den eingesetzten Bodenmaterialien

Bodenmaterial	<sup>14</sup> C-markierte PAK-Verbindung	Supplement	Lumbricid	Anzahl der Parallelen
Muttergarten	Benzo(a)pyren	Kompost	<i>A. caliginosa</i>	3
			<i>E. fetida</i>	3
			Kontrolle	3
Wülknitz	Benzo(a)pyren	Kompost	<i>E. fetida</i>	3
			Kontrolle	3
Muttergarten	Pyren	Kompost	<i>A. caliginosa</i>	3
			<i>E. fetida</i>	3
			Kontrolle	3
Wülknitz	Pyren	Kompost	<i>E. fetida</i>	3
			Kontrolle	3
Muttergarten	Anthracen	Kompost	<i>A. caliginosa</i>	3
			<i>E. fetida</i>	3
			Kontrolle	3
Wülknitz	Anthracen	Kompost	<i>E. fetida</i>	3
			Kontrolle	3
				Σ 45



**Abb. 2.3:** Versuchsaufbau eines Glas-Bioreaktorsystems zur Untersuchung des Einflusses von Lumbriciden auf nicht-extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -PAK-Rückstände im Boden (Darstellung von einem Parallel-Ansatz) 1: Gassperre, 2: Klein-Bioreaktor mit Bodenmaterial mit nicht-extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -PAK-Rückständen und Regenwürmern, 3: Sicherheitswaschflasche, 4: Gaswaschflasche mit 1 M NaOH, 5: Schlauchpumpe

Die Versuchsansätze wurden diskontinuierlich mit Hilfe von Schlauchpumpen belüftet. Die Bodenproben wurden vor Versuchsbeginn und nach Versuchsende untersucht. Um die extrahierbaren und nicht-extrahierbaren Anteile im Bodenmaterial zu bestimmen, wurde eine dreistufige Extraktion des Bodenmaterials durchgeführt (Mescher et al. 1999).

## 2.2.8 Physikalische Remobilisierungsmethoden

### 2.2.8.1 Behandlung von Bodenproben mittels Ultraschall-Sonde

Um zu untersuchen, ob die direkte mechanische Zerstörung der Aggregatstruktur einen Einfluss auf die immobilisierten Schadstoffrückstände hat, wurde Bodenmaterial mit nicht-extrahierbaren Rückständen mit Wasser aufgeschlämmt (pro g Boden 10 ml Wasser) und mit einem Ultraschall-Desintegrator (Braun Labosonic; Typ 853972/3; Hz 50/60 mit Standardsonde 2000 U) insgesamt 10 Minuten (20 Intervalle) behandelt. Bei größeren Bodenmengen (500 g) verlängerte sich die Ultraschallbehandlung (30 min), wobei zuvor auf die vollständige Durchmischung der Boden-Wassersuspension zu achten war. Anschließend wurde das Bodenmaterial bis zum Wassergehalt der ursprünglichen Probe getrocknet. Um den Einfluss der Aggregatzerstörung auf das Auswaschverhalten zu untersuchen, wurden Mehrfach-Elutionen (6-fach) mit Wasser in Anlehnung an den S4-Test nach DIN 38414

durchgeführt. Das Verhältnis Bodenmaterial zu Elutionsflüssigkeit betrug 2 g (TG) zu 20 ml. Die Elution erfolgt in einem Zeitraum von 28 Tagen, wobei die Elutionsflüssigkeiten nach 24h, 48h sowie nach 4, 8, 14 und nach 28 Tagen gewechselt wurden. Als Kontrolle diente eine unbehandelte Bodenprobe, die ebenfalls den verschiedenen Elutionen unterzogen wurde (Eschenbach et al. 1998a).

### **2.2.8.2 Zerstörung der Bodenstruktur durch Mörsern**

Um die mögliche Freisetzung nicht-extrahierbarer Rückstände durch die direkte Aggregatzerstörung zu überprüfen, wurde das zu untersuchende Bodenmaterial intensiv gemörsert. Anschließend wurden analog den Versuchen mit der Ultraschall-Sonde Mehrfach-Elutionen (6-fach) mit Wasser durchgeführt um die Auswaschbarkeit immobilisierter Schadstoffrückstände zu überprüfen (Eschenbach et al. 1998a).

## **2.2.9 Chemische Remobilisierungsmethoden**

### **2.2.9.1 Zugabe Kationen-komplexierender Substanzen (EDTA)**

Bei dieser Remobilisierungsmaßnahme wurde das zu untersuchende Bodenmaterial mit nicht-extrahierbaren Rückständen mit einer EDTA-Lösung (EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure) behandelt. Diese Extraktion mit einem komplexierenden Agens soll die Humus-stabilisierenden Metallionen aus den metall-organischen Komplexen lösen. Durch die Veränderung der (räumlichen) Struktur der organischen Substanz können möglicher Weise nicht-extrahierbare sequestrierte Rückstände freigesetzt werden.

Die Untersuchungen wurden mit Na<sub>2</sub>-EDTA-Lösungen in den Konzentrationen 0,01 M, 0,025 M und 0,05 M durchgeführt, die auf pH 4,6 eingestellt wurden. Als Kontrolle wurde das Bodenmaterial nur mit Wasser extrahiert. Die EDTA-Extraktion wurde zweimal aufeinanderfolgend mit drei Parallelen durchgeführt. Das Bodenmaterial (entsprechend 2 g TG) wurde in Hungate-Röhrchen eingewogen und mit den oben genannten wässrigen EDTA-Lösungen (12 ml) 90 min im Überkopfschüttler behandelt. Anschließend wurden die Lösungen und das Bodenmaterial durch Zentrifugieren getrennt (3000 g für 20 min und 16.000 g für 5 min). Der Überstand wurde  $\beta$ -szintillometrisch vermessen und möglicherweise remobilisierte Schadstoffrückstände bestimmt. Im Anschluss an die 2-stufige EDTA-Extraktion wurde das Bodenmaterial einem 3-stufigen Extraktionsverfahren (MeOH/H<sub>2</sub>O, Aceton, alkalische Hydrolyse) unterzogen.

### 2.2.9.2 pH-Änderung (Simulation saurer Regen)

Um den Einfluss von saurem Regen auf nicht-extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -PAK-Rückstände zu untersuchen, wurde ein mehrere Jahrzehnte andauernder saurer Regen durch einen entsprechenden Versuch simuliert.

Dazu wurden 5 g (3 Parallelen) des zu untersuchenden Bodenmaterials in 400 ml-Gefäßen eingewogen. Anschließend wurden jeweils 100 ml Wasser, welches mit einer Mischung aus Salpetersäure und Schwefelsäure im Verhältnis 2:3 auf einen pH-Wert von 5 angesäuert wurde, zugegeben und das gesamte Gefäß erneut ausgewogen und auf einem Horizontalschüttler 18 Stunden bei 30°C inkubiert. Nach 30-minütiger Zentrifugation (5000 U/min) wurden die Überstände der drei Versuchsansätze vorsichtig abdekantiert. Um Radioaktivitätsbilanzen aufgestellt zu können, war es notwendig die Gesamtüberstände sowie die Rückstände auszuwiegen. Anschließend wurde jeweils ein Aliquot über einen Filter (Porenweite 0,45µm, ca. 10-20 ml) filtriert und die  $^{14}\text{C}$ -Aktivität bestimmt. Unter weiterer Gewichtskontrolle wurde diese Bodenextraktion insgesamt 10 mal durchgeführt. Parallel zur Bestimmung der Radioaktivität in den wässrigen Überständen, wurde die gebundene Radioaktivität im Ausgangsboden und in den Bodenproben nach 10 Extraktionsschritten durch Verbrennungsanalyse bestimmt (Griest et al. 1994).

### 2.2.10 Kombinationen von mechanischen und biologischen Behandlungsmaßnahmen

Um mögliche synergistische Effekte der einzelnen Remobilisierungsmaßnahmen zu ermitteln, wurden die effektivsten Maßnahmen in Kombination durchgeführt. Dabei wurde der Frage nachgegangen, ob eine Kombination z.B. aus mechanischer Beanspruchung und nachfolgender mikrobiologischer Behandlung zu einer Freisetzung von zuvor nicht-extrahierbaren Rückständen führt.

Als mechanische Behandlung wurde das Bodenmaterial mit einer Ultraschall-Sonde behandelt. Danach schlossen sich verschiedene biologische Varianten an, zum einen wurde das Bodenmaterial unsupplementiert inkubiert (Kontrolle), zum anderen mit Zugabe biologisch wirksamer Supplemente (z.B. Kompost, Rindenmulch, Waldbodenstreu) und als dritte biologische Variante mit der Zugabe von Kompost und Mikroorganismen. Dabei handelte es sich um definierte Mischkulturen von Abbauspezialisten bestehend aus den Mikroorganismen *Mycobacterium* sp. VF1, *Mycobacterium* sp. KA, *Sphingomonas paucimobilis* sp. BA2 und *Gordona* sp. BP9, die alle nachweislich zum Abbau von PAK befähigt sind (Kästner et al. 1991). Die Bakterien wurden dem Boden nach einer

Vorkultivierung jeweils in einer Zellzahl von  $0,25 \cdot 10^6$ /g TG Boden zugesetzt. Das Bodenmaterial wurde 206 Tage unter Einfluss der verschiedenen kombinierten Remobilisierungsmaßnahmen inkubiert. Vor und nach der Inkubation wurden Bodenproben entnommen, die auf remobilisierte  $^{14}\text{C}$ -Aktivität - entsprechend dem dreistufigen Extraktionsverfahren – untersucht wurden.

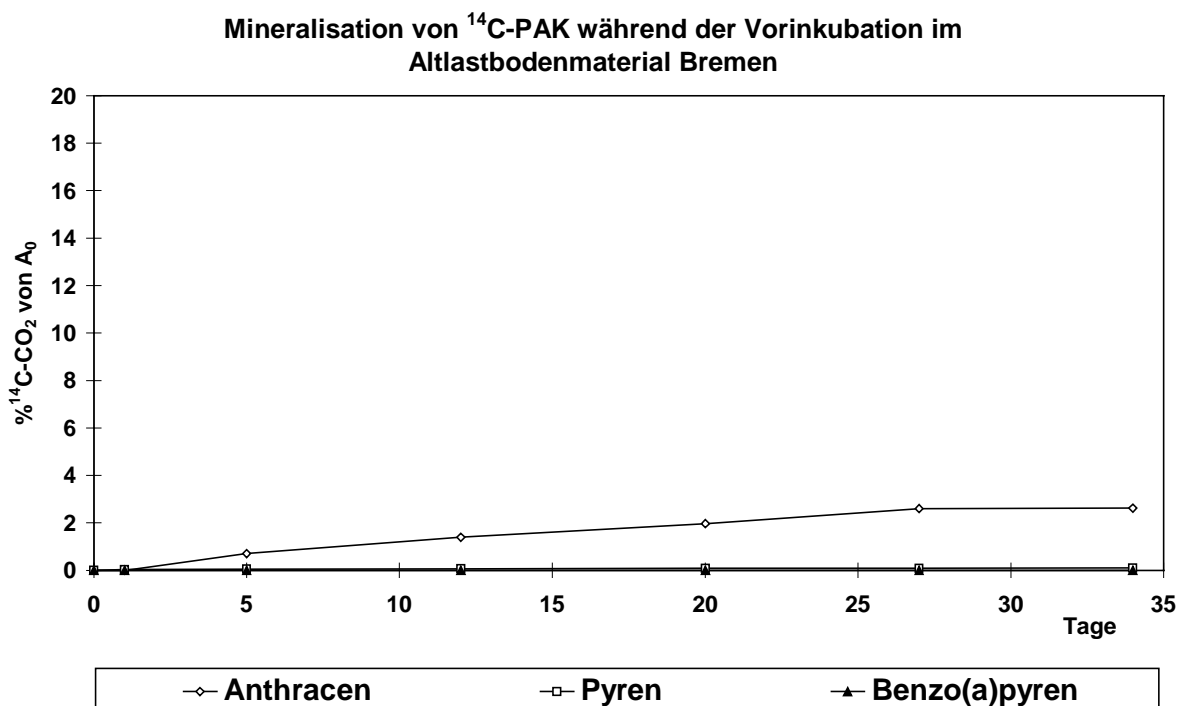
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Erstellung einer Kohlenstoffbilanz in einem humosen Altlastbodenmaterial

##### 3.1.1 Mineralisation von $^{14}\text{C}$ -PAK im Altlastbodenmaterial Bremen während der Vorinkubation

Nach Applikation der  $^{14}\text{C}$ -markierten PAK (Anthracen, Pyren, Benzo(a)pyren) wurde das Altlastbodenmaterial Bremen zunächst für 34 Tage vorinkubiert, um die Einstellung physikalischer Gleichgewichte und Sorptionsvorgänge zu ermöglichen sowie Alterungsprozesse der Schadstoffe im Boden zu simulieren.

Im Altlastbodenmaterial Bremen zeigte sich während der 34-tägigen Vorinkubation keine oder nur eine sehr geringen Mineralisation. Im Versuchsansatz der mit  $^{14}\text{C}$ -Anthracen dotiert worden war, betrug die Mineralisation 2,6%, im Versuchsansatz mit Pyren nur 0,1% und im Ansatz mit Benzo(a)pyren konnte keine Mineralisation während der 34-tägigen Vorinkubation festgestellt werden (vgl. Abb. 3.1).



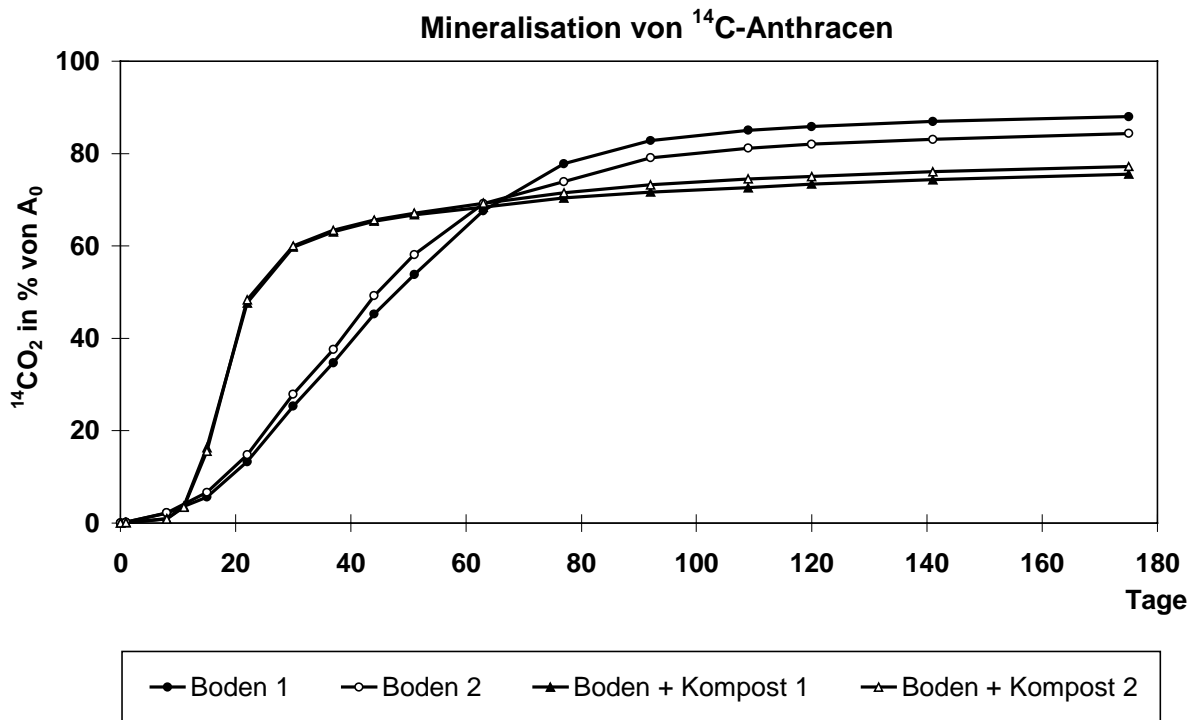
**Abb. 3.1:** Mineralisation von  $^{14}\text{C}$ -PAK im Altlastbodenmaterial Bremen während 34-tägigen Vorinkubation.

Der Verbleib der  $^{14}\text{C}$ -PAK in der extrahierbaren bzw. in der nicht-extrahierbaren Fraktion wurde während der 34-tägigen Vorinkubation nicht bilanzierend untersucht.

### 3.1.2 Mineralisation von $^{14}\text{C}$ -PAK im Altlastbodenmaterial Bremen nach Zugabe von Kompost

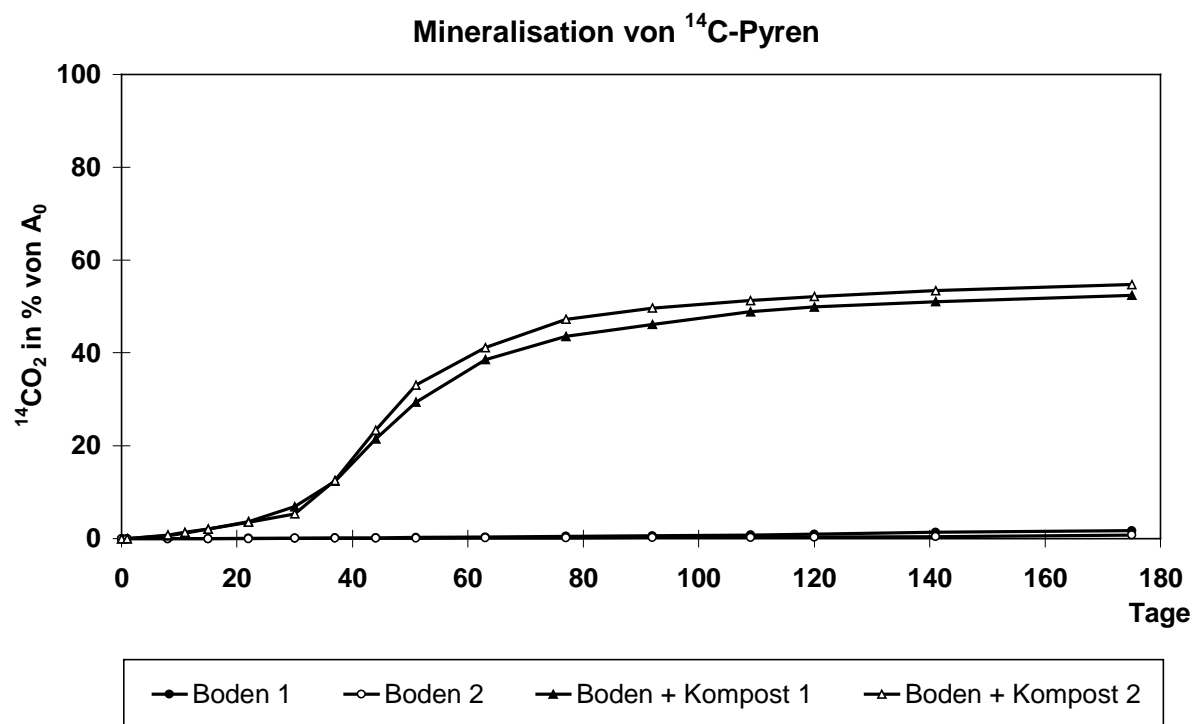
Nach der 34-tägigen Vorinkubation wurde das Altlastbodenmaterial mit Kompost supplementiert und 175 Tagen in geschlossenen Bioreaktoren inkubiert, um nicht-extrahierbare Rückstände zu erbrüten. Es wurden Kohlenstoffbilanzen für die unterschiedlichen  $^{14}\text{C}$ -markierten PAK (Anthracen, Pyren, Benzo(a)pyren) nach Supplement-Zugabe, sowie für die Kontrolle ohne Supplementierung erstellt. Die Versuche wurden nach dem Erreichen eines stabilen Mineralisationsplateau nach 175 Tagen beendet. Der Verlauf der Mineralisation der  $^{14}\text{C}$ -PAK zu  $^{14}\text{CO}_2$  ist in den Abb. 3.2 bis 3.4 dargestellt.

$^{14}\text{C}$ -Anthracen wurde sowohl in der unsupplementierten Kontrolle, als auch in dem Bodenmaterial mit Kompost in hohem Maße mineralisiert (Abb. 3.2). Bei den Kontrollen (Boden 1, Boden 2) erfolgte nach einer schwach ausgeprägten lag-Phase der größte Teil der Mineralisation in den ersten 100 Tagen. Danach ergab sich nur noch ein langsamer Anstieg der  $^{14}\text{CO}_2$ -Produktion, bis zu einer Mineralisation von 85% nach 175 Tagen. Demgegenüber wurde  $^{14}\text{C}$ -Anthracen in dem Bodenmaterial mit Kompost, nach einer lag-Phase von 10 Tagen, sehr schnell zu  $^{14}\text{CO}_2$  umgesetzt. Bereits nach 40 Tagen waren 65% mineralisiert. Jedoch blieb der Endwert der Mineralisation in den mit Kompost supplementierten Ansätzen leicht hinter den unsupplementiert Ansätzen zurück. Nach 175 Tagen wurde in den Ansätzen mit Kompost ein Wert von 76% erreicht.



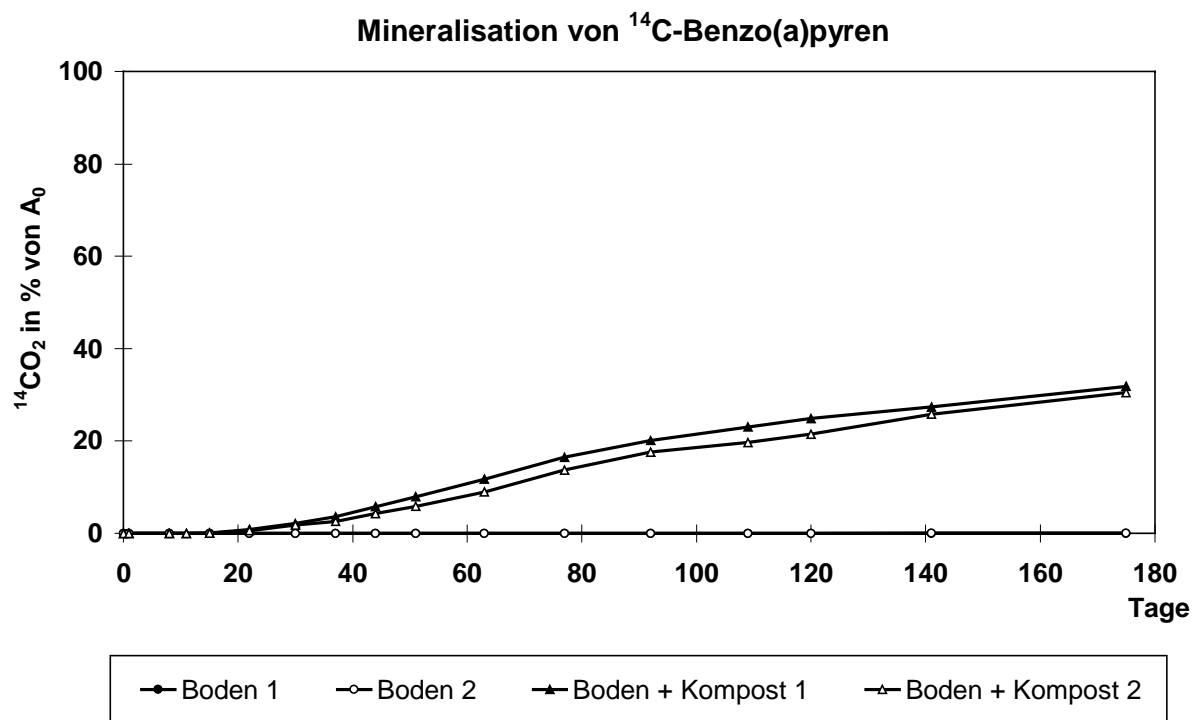
**Abb. 3.2:** Mineralisation von  $^{14}\text{C}$ -Anthracen im Altlastbodenmaterial Bremen während 175-tägiger Inkubation im un-supplementierten Bodenmaterial und im Kompost supplementierten Bodenmaterial in % der anfänglichen Gesamtaktivität  $A_0$ .

In den Versuchen mit  $^{14}\text{C}$ -Pyren zeigten sich große Unterschiede in der Mineralisation zwischen den Versuchsansätzen mit und ohne Supplementzugabe (Abb. 3.3). Bei den un-supplementierten Kontrollen (Boden 1, Boden 2) wurde  $^{14}\text{C}$ -Pyren kaum mineralisiert; nach 175 Tagen waren nur etwa 1-2% der  $^{14}\text{C}$ -PAK zu  $^{14}\text{CO}_2$  umgesetzt worden. In Versuchsansätzen mit Kompost wurden demgegenüber im selben Zeitraum 53% des  $^{14}\text{C}$ -Pyren zu  $^{14}\text{CO}_2$  umgesetzt, wobei das Mineralisationsplateau bereits nach 90 Tagen annähernd erreicht war. Es wird deutlich, dass durch die Kompost-Zugabe die Mineralisation erheblich gesteigert werden konnte.



**Abb. 3.3:** Mineralisation von  $^{14}\text{C}$ -Pyren im Altlastbodenmaterial Bremen während 175-tägiger Inkubation im unsupplementierten Bodenmaterial und im Kompost supplementierten Bodenmaterial in % der anfänglichen Gesamtaktivität  $A_0$ .

In den Versuchen mit  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren zeigte sich in den unsupplementierten Kontrollen (Boden 1, Boden 2) keine nennenswerte Mineralisation (Abb. 3.4). Wurde dem Bodenmaterial Kompost zugegeben, setzte nach etwa 20 Tagen ein kontinuierlicher Abbau des  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyrens ein. Nach 175 Tagen waren 31% mineralisiert, ohne dass ein stabiles Mineralisationsplateau erreicht wurde. Auch den Versuchen mit  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren konnte die Kompost-Zugabe die Mineralisation erheblich steigern.



**Abb. 3.4:** Mineralisation von  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren im Altlastbodenmaterial Bremen während 175-tägiger Inkubation im unsupplementierten Bodenmaterial und im Kompost supplementierten Bodenmaterial in % der anfänglichen Gesamtaktivität  $A_0$ .

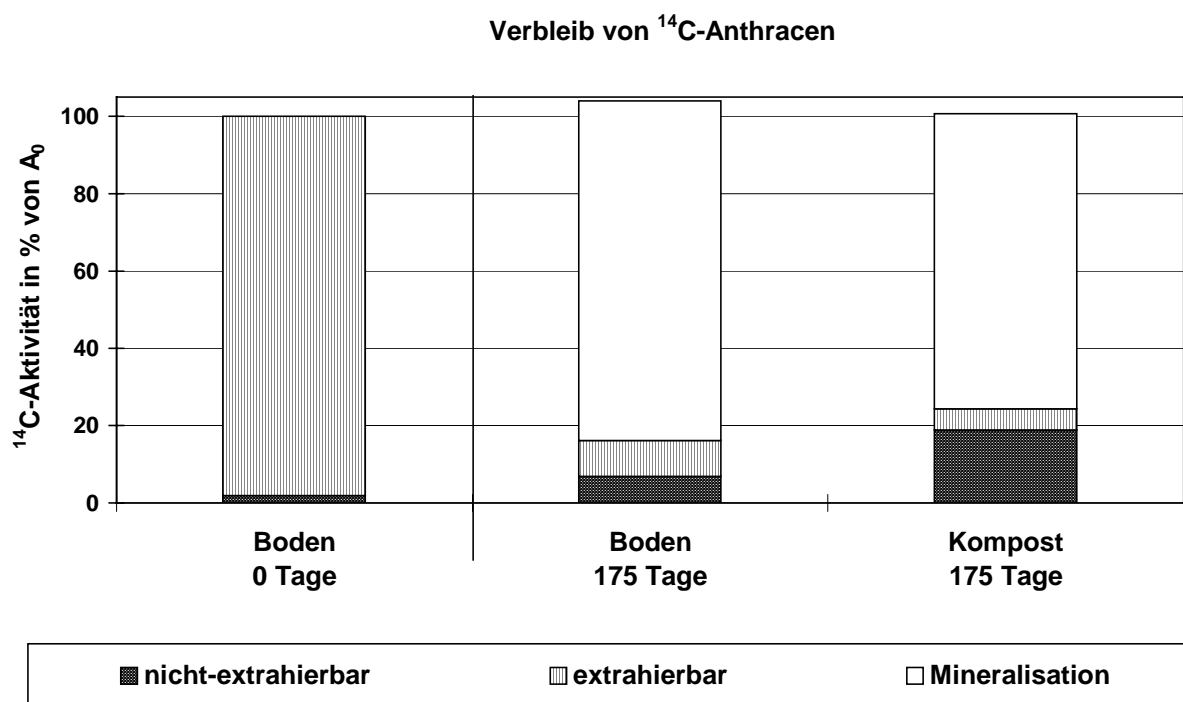
Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Kompost-Zugabe im Altlastbodenmaterial Bremen – mit Einschränkungen in den Versuchsansätzen mit  $^{14}\text{C}$ -Anthracen - sich positiv auf den Abbau der  $^{14}\text{C}$ -PAK (Mineralisation) auswirkte.

### 3.1.3 Verbleib von $^{14}\text{C}$ -PAK im Altlastbodenmaterial Bremen nach Zugabe von Kompost

Vor und nach der 175-tägigen Inkubation wurden den Versuchsansätzen jeweils Bodenproben entnommen und der Verbleib der  $^{14}\text{C}$ -PAK bilanzierend durch sequentielle Extraktionen untersucht. In den Abb. 3.5 – 3.7 ist der Verbleib der  $^{14}\text{C}$ -PAK (Anthracen, Pyren, Benzo(a)pyren) in den Fraktionen Mineralisation, extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivität und nicht-extrahierbare Rückstände dargestellt.

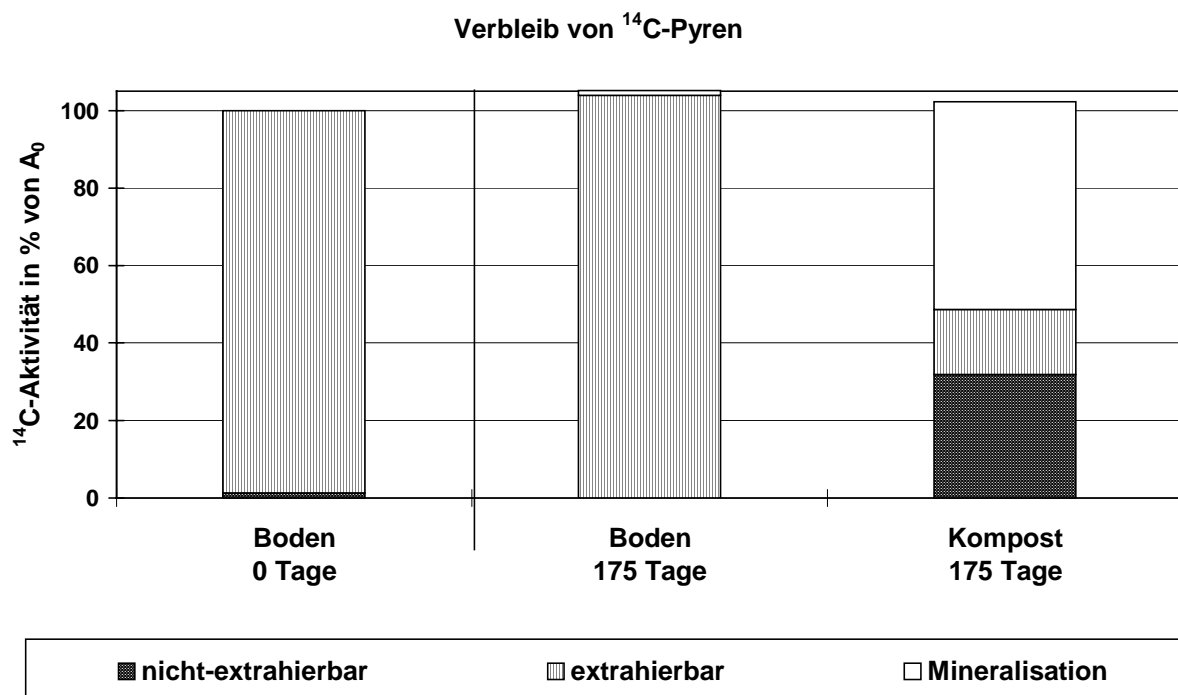
In den Versuchen mit  $^{14}\text{C}$ -Anthracen war nach der 175-tägigen Inkubation der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände in den Versuchsansätzen, die mit Kompost supplementiert wurden, höher als in den unsupplementierten Versuchsvarianten. In den Versuchsansätzen mit Kompost-Zugabe betrug der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände nach 175-

tägiger Inkubation 19% gegenüber 7% im unsupplementierten Bodenmaterial (Abb. 3.5). Im Gegensatz dazu war der extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil in den Kompost-supplementierten Versuchsansätzen etwas niedriger (5%) als in den unsupplementierten Varianten (7%). Nach der Inkubation waren in dem Versuchsansatz mit  $^{14}\text{C}$ -Anthracen und Kompost-Zugabe 78% der noch im Boden vorhandenen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität in der Fraktion der nicht-extrahierbaren Rückstände festgelegt. Die Mineralisation war in den unsupplementierten Versuchsansätzen höher als in den Versuchen mit Kompost-Zugabe, 88% gegenüber 76%.



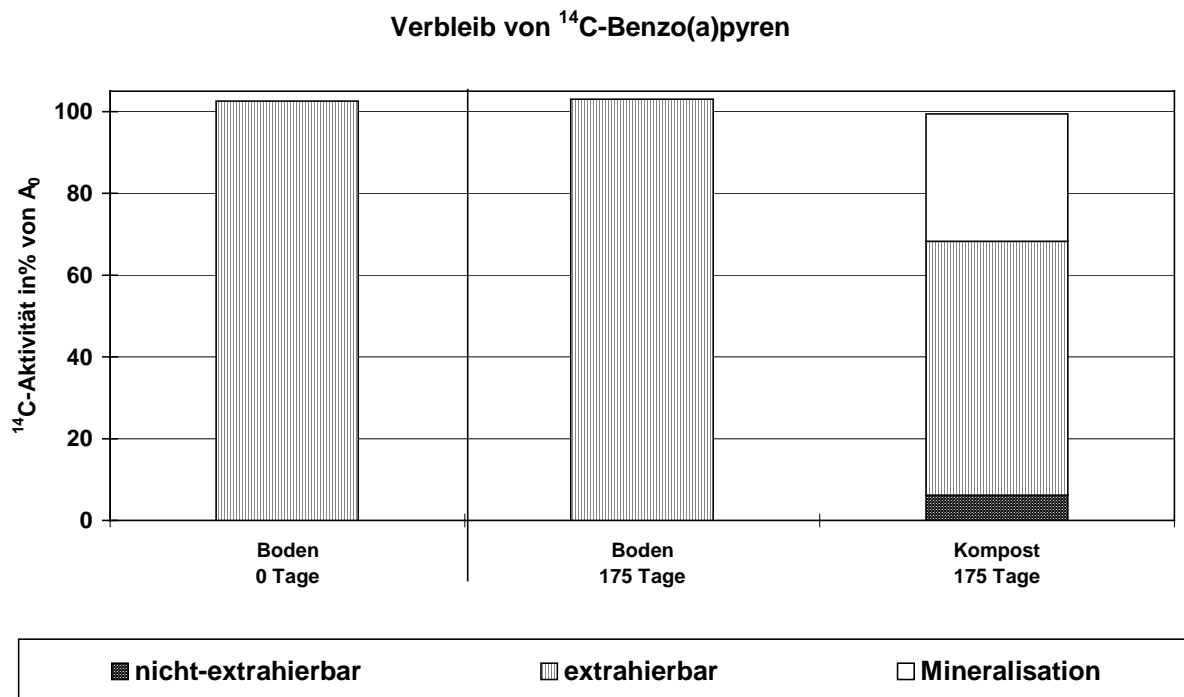
**Abb. 3.5:** Verbleib von  $^{14}\text{C}$ -Anthracen im Altlastbodenmaterial Bremen mit bzw. ohne Kompost-Zugabe. Gegenüberstellung der nicht-extrahierbaren Rückstände, der extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -Aktivität und der Mineralisation zu Versuchsbeginn (0 Tage) und nach 175-tägiger Inkubation.

In den Versuchen mit  $^{14}\text{C}$ -Pyren lag nach 175-tägiger Inkubation in den unsupplementierten Kontrollen noch die gesamte  $^{14}\text{C}$ -Aktivität extrahierbar im Boden vor. In den Varianten mit Kompost-Zugabe waren 17% der anfänglichen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität noch extrahierbar. 32% wurden als nicht-extrahierbare Rückstände im Boden festgelegt und 54% wurden mineralisiert. Somit waren nach der Inkubation in den Kompost-supplementierten Versuchsansätzen 64% der im Boden vorhandenen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität als nicht-extrahierbare Rückstände im Boden festgelegt (vgl. Abb. 3.6).



**Abb. 3.6:** Verbleib von  $^{14}\text{C}$ -Pyren im Altlastbodenmaterial Bremen mit bzw. ohne Kompost-Zugabe. Gegenüberstellung der nicht-extrahierbaren Rückstände, der extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -Aktivität und der Mineralisation zu Versuchsbeginn (0 Tage) und nach 175-tägiger Inkubation.

Gleichwohl wie in den Versuchen mit  $^{14}\text{C}$ -Pyren, lag in den unsupplementierten Versuchsansätzen mit  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren nach der Inkubation die gesamte  $^{14}\text{C}$ -Aktivität extrahierbar vor (vgl. Abb. 3.7). Die Mineralisation war in den unsupplementierten Versuchsansätzen verschwindend gering (< 1% der anfänglichen Gesamtaktivität). Im Versuchsansatz mit  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren und Kompost-Zugabe wurden 6% der anfänglichen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität als nicht-extrahierbare Rückstände festgelegt. 31% der eingesetzten  $^{14}\text{C}$ -Aktivität wurden während der 175-tägigen Inkubation mineralisiert und 62% waren bei Versuchsende immer noch extrahierbar. Die Zugabe von Kompost als Supplement förderte in erster Linie die Mineralisation von  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren, aber auch in geringem Ausmaß die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen.



**Abb. 3.7:** Verbleib von  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren im Altlastbodenmaterial Bremen mit bzw. ohne Kompost-Zugabe. Gegenüberstellung der nicht-extrahierbaren Rückstände, der extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -Aktivität und der Mineralisation zu Versuchsbeginn (0 Tage) und nach einer 175-tägigen Inkubation.

### 3.2 Vergleich zum Verbleib von $^{14}\text{C}$ -PAK in verschiedenen humosen Bodenmaterialien

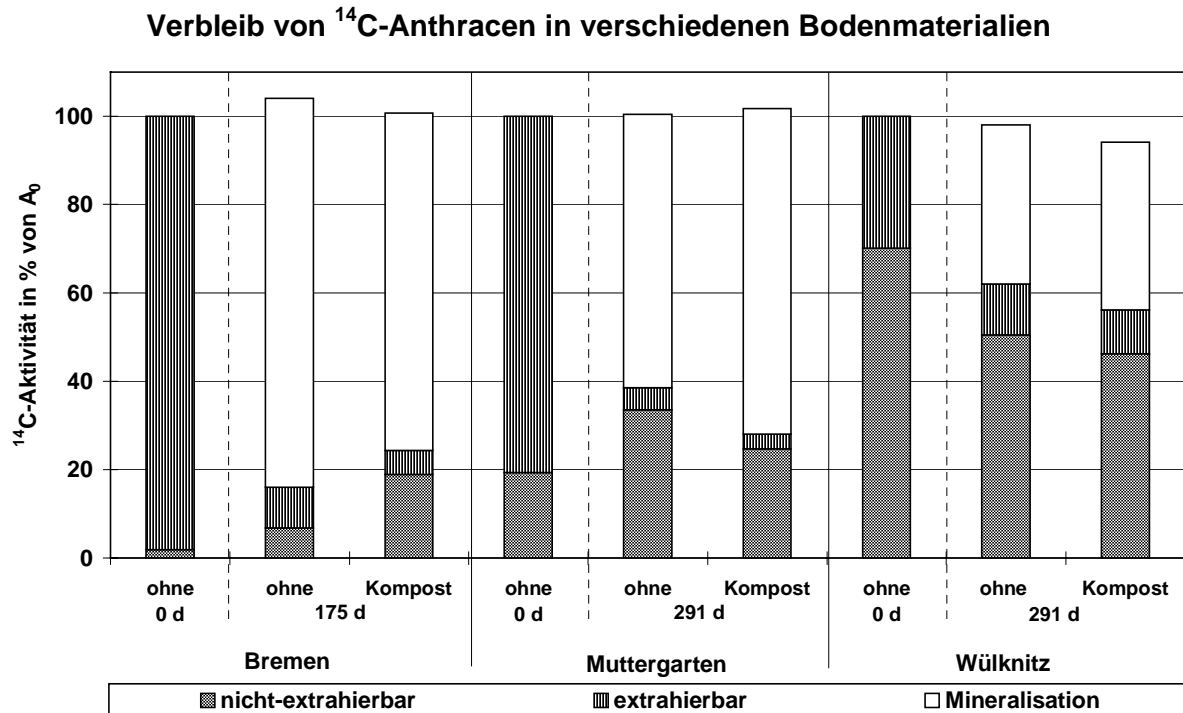
Im folgenden wird der Verbleib von  $^{14}\text{C}$ -PAK (Anthracen, Pyren, Benzo(a)pyren) in verschiedenen humosen Bodenmaterialien dargestellt. In den oben dargestellten Untersuchungen wurde das Altlastbodenmaterial Bremen verwendet, das einen Gehalt an organischem Kohlenstoff ( $\text{C}_{\text{Org}}$ ) von 13,8 aufwies. Die Ergebnisse für die anderen beiden Bodenmaterialien (Muttergarten, Wülknitz) entstammen dem vorangegangenen Forschungsprojekt „Bildung und Langzeitstabilität von humifizierten PAK in biologisch behandelten Recyclingböden“ (FKZ 1480937). Das Altlastbodenmaterial Wülknitz hatte einen  $\text{C}_{\text{Org}}$ -Gehalt von 6,7 und das Modellbodenmaterial Muttergarten einen  $\text{C}_{\text{Org}}$ -Gehalt von 0,9. In der Abb. 3.8 ist der Verbleib von  $^{14}\text{C}$ -Anthracen in den drei oben genannten Bodenmaterialien dargestellt.

Im **Altlastbodenmaterial Bremen** wurde  $^{14}\text{C}$ -Anthracen während der 175-tägigen Inkubationszeit - unabhängig von der Kompost-Zugabe - sehr stark mineralisiert (76-88% von  $A_0$ ). Die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen war in den mit Kompost

supplementierten Versuchsansätzen etwas höher (19% von  $A_0$ ) als in der un-supplementierten Variante (7% von  $A_0$ ). Umgekehrt war der extrahierbare Anteil nach der Inkubation in der Kompost-supplementierten Variante niedriger als in den Versuchsansätzen ohne Kompost.

Wie auch im Altlastbodenmaterial Bremen war die Mineralisation im **Modellbodenmaterial Muttergarten** nach 291-tägiger Inkubation ebenfalls hoch, wobei die Kompost-Zugabe die Mineralisation von  $^{14}\text{C}$ -Anthracen in diesem Bodenmaterial begünstigte, 74% gegenüber 62% im un-supplementierten Versuchsansatz. Im Gegensatz zum Altlastbodenmaterial Bremen war die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen im Bodenmaterial Muttergarten in den Kompost-supplementierten Versuchsansätzen geringer (25% von  $A_0$ ) als in der un-supplementierten Variante (34% von  $A_0$ ). Vergleicht man das Altlastbodenmaterial Bremen ( $C_{\text{Org}}$  13,8) und das Modellbodenmaterial Muttergarten ( $C_{\text{Org}}$  0,9) miteinander, wird deutlich, dass ein hoher Gehalt an organischem Kohlenstoff die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen nicht förderte.

Im **Altlastbodenmaterial Wülknitz** lagen zu Beginn der Inkubation schon 70% des  $^{14}\text{C}$ -Anthracens nicht-extrahierbar vor. Im Verlauf der 291-tägigen Inkubation wurde ein Teil der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität – unabhängig von der Kompost-Zugabe – mineralisiert (36-38%). Der extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil schrumpfte während der Inkubation von 30% auf 10-11% der anfänglichen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität. Die nicht-extrahierbaren Rückstände wurden von 70% durch die Inkubation auf 51-46% von  $A_0$  reduziert. Es wurde deutlich, dass auch nicht-extrahierbare Rückstände während der Inkubation mineralisiert werden können.



**Abb. 3.8:** Verbleib von  $^{14}\text{C}$ -Anthracen in verschiedenen humosen Bodenmaterialien mit bzw. ohne Kompost-Zugabe. Gegenüberstellung der nicht-extrahierbaren Rückstände, der extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -Aktivität und der Mineralisation zu Versuchsbeginn (0 Tage) und nach der Inkubation.  $C_{\text{Org}}$  (Bremen): 13,8;  $C_{\text{Org}}$  (Muttergarten): 0,9;  $C_{\text{Org}}$  (Wülknitz): 6,7.

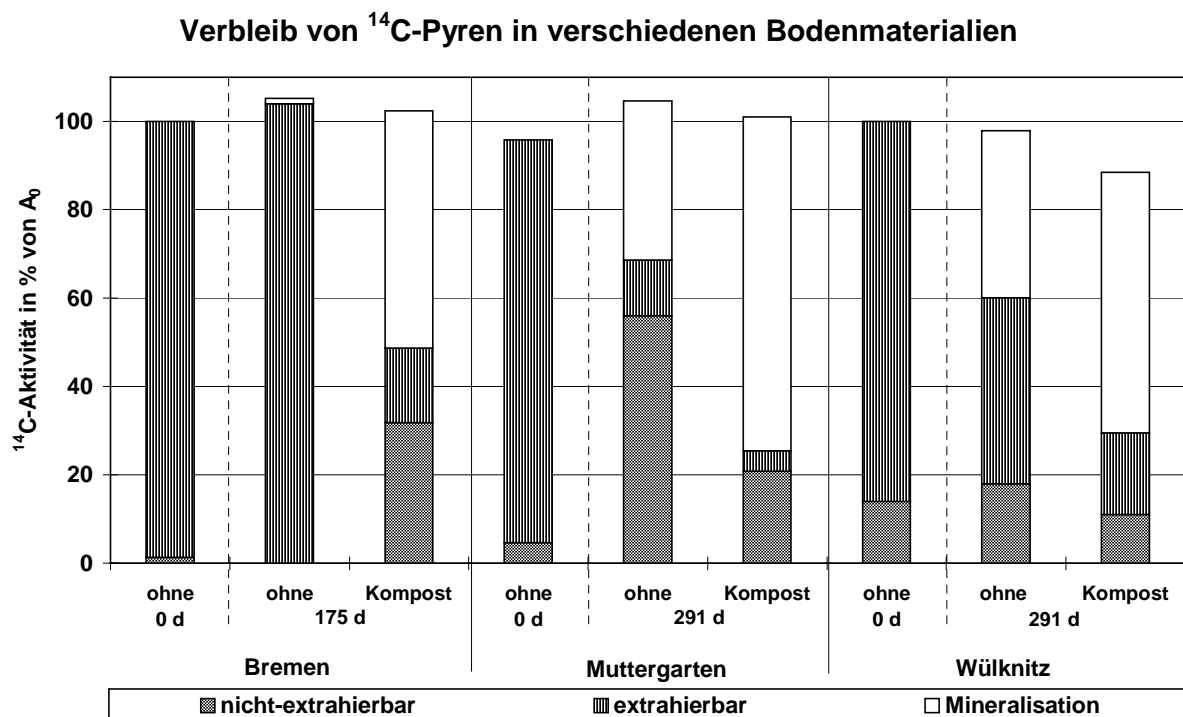
In den Versuchen mit dem **Altlastbodenmaterial Bremen** und  $^{14}\text{C}$ -Pyren wurde deutlich, dass die Kompost-Zugabe insbesondere die Mineralisation (32% von  $A_0$ ) aber auch die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen (17% von  $A_0$ ) förderte, denn in den Versuchen ohne Kompost-Zugabe lag die gesamte  $^{14}\text{C}$ -Aktivität auch nach 175-tägiger Inkubation extrahierbar vor (vgl. Abb. 3.9).

Auch in den Versuchen mit dem **Modellbodenmaterial Muttergarten** beschleunigte die Zugabe von Kompost die Mineralisation, 76% gegenüber 36% von  $A_0$  in den unsupplementierten Versuchsansätzen. Im Gegensatz dazu war die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen in den unsupplementierten Versuchen höher (56% von  $A_0$ ), als in den Ansätzen mit Kompost-Zugabe (21% von  $A_0$ ). Der extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil betrug nach der Inkubation in den Versuchen ohne Supplement-Zugabe 13% und in den Versuchen mit Kompost 5% der anfänglichen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität.

Wie auch in den Bodenmaterialien Bremen und Muttergarten förderte die Zugabe von Kompost im **Altlastbodenmaterial Wülknitz** die Mineralisation von  $^{14}\text{C}$ -Pyren (59% von  $A_0$  mit Kompost-Zugabe, 38% ohne Supplement). Der extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil war in den Kompost-supplementierten Versuchen dementsprechend niedriger (18% von  $A_0$  mit Kompost-Zugabe, 42% ohne Supplement-Zugabe). In den unsupplementierten Versuchen

konnte allerdings ein leicht erhöhter Anteil an nicht-extrahierbaren Rückständen nach der Inkubation detektiert werden (vgl. Abb. 3.9).

Der Vergleich zwischen den drei Bodenmaterialien mit  $^{14}\text{C}$ -Pyren zeigte, dass im Modellbodenmaterial Muttergarten - mit dem niedrigsten Gehalt an organischem Kohlenstoff ( $C_{\text{Org}}$  0,9) - die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen in den unsupplementierten Versuchen am höchsten ausfiel (56% von  $A_0$ ). Das Ergebnis ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass nicht der Gehalt an organischem Kohlenstoff entscheidend für die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen ist.

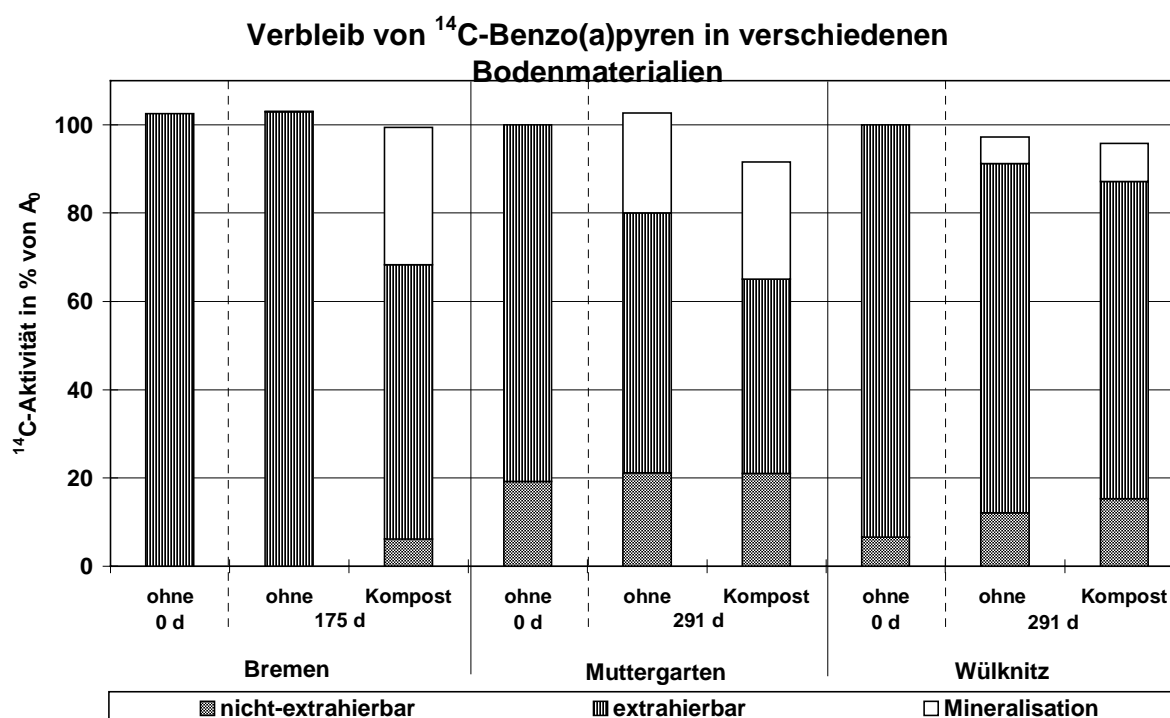


**Abb. 3.9:** Verbleib von  $^{14}\text{C}$ -Pyren in verschiedenen humosen Bodenmaterialien mit bzw. ohne Kompost-Zugabe. Gegenüberstellung der nicht-extrahierbaren Rückstände, der extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -Aktivität und der Mineralisation zu Versuchsbeginn (0 Tage) und nach der Inkubation.  $C_{\text{Org}}$  (Bremen): 13,8;  $C_{\text{Org}}$  (Muttergarten): 0,9;  $C_{\text{Org}}$  (Wülknitz): 6,7.

Wie auch in den Versuchen mit  $^{14}\text{C}$ -Pyren ergaben die Versuche mit  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren, dass die Zugabe von Kompost die Mineralisation steigerte (vgl. Abb. 3.10). Im **Altlastbodenmaterial Bremen** erhöhte die Kompost-Zugabe die Mineralisation auf 31% der anfänglichen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität, wohingegen in der unsupplementierten Variante die gesamte  $^{14}\text{C}$ -Aktivität nach der Inkubation extrahierbar vorlag. Die Fraktion der nicht-extrahierbaren Rückständen stieg allerdings durch die Kompost-Supplementierung nur unwesentlich auf 6% von  $A_0$  an. Der weitaus größte Teil der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität blieb auch nach der Inkubation noch extrahierbar (62% von  $A_0$ ).

Im **Modellbodenmaterial Muttergarten** konnte die Kompost-Zugabe nur eine geringfügig höher Mineralisation im Vergleich zur unsupplementierten Variante bewirken (26% anstatt 18% von  $A_0$ ). Der nicht-extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil wurde durch die Inkubation, sowie die Supplement-Zugabe nicht verändert (19-21% von  $A_0$ ).

Im **Altlastbodenmaterial Wülknitz** mit  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren war die Mineralisation in den Versuchsansätzen mit bzw. ohne Kompost-Zugabe gering (6-7% von  $A_0$ ). Der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände konnte durch die Kompost-Zugabe nur geringfügig gesteigert werden (vgl. Abb. 3.10). Der größte  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil verblieb auch nach der Inkubation - unabhängig von der Supplement-Zugabe - extrahierbar im Bodenmaterial.



**Abb. 3.10:** Verbleib von  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren in verschiedenen humosen Bodenmaterialien mit bzw. ohne Kompost-Zugabe. Gegenüberstellung der nicht-extrahierbaren Rückstände, der extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -Aktivität und der Mineralisation zu Versuchsbeginn (0 Tage) und nach der Inkubation.  $C_{\text{Org}}$  (Bremen): 13,8;  $C_{\text{Org}}$  (Muttergarten): 0,9;  $C_{\text{Org}}$  (Wülknitz): 6,7.

### 3.3 Remobilisierung von nicht-extrahierbaren Rückständen

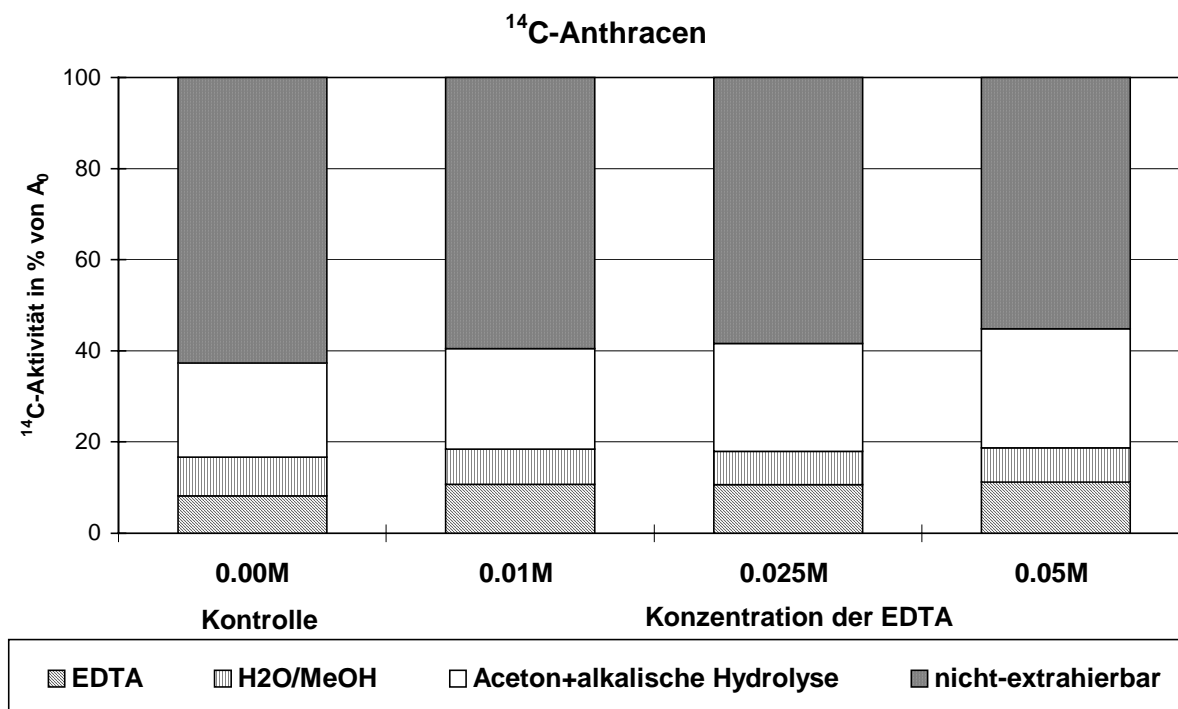
#### 3.3.1 Chemische Remobilisierungsmaßnahmen:

### 3.3.1.1 Auflösung metall-organischer Komplexe durch Zugabe Kationenkomplexierender Substanzen (EDTA)

Bei dieser Remobilisierungsmaßnahme wurden die zu untersuchenden Bodenmaterialien mit nicht-extrahierbaren Rückständen mit einer EDTA-Lösung (EDTA: Ethyldiamintetraessigsäure) behandelt. Diese Extraktion mit einem komplexierenden Agens soll die Humusstabilisierenden Metallionen aus den metall-organischen Komplexen lösen. Durch die Veränderung der (räumlichen) Struktur der organischen Substanz können möglicher Weise nicht-extrahierbare sequestrierte Rückstände freigesetzt werden.

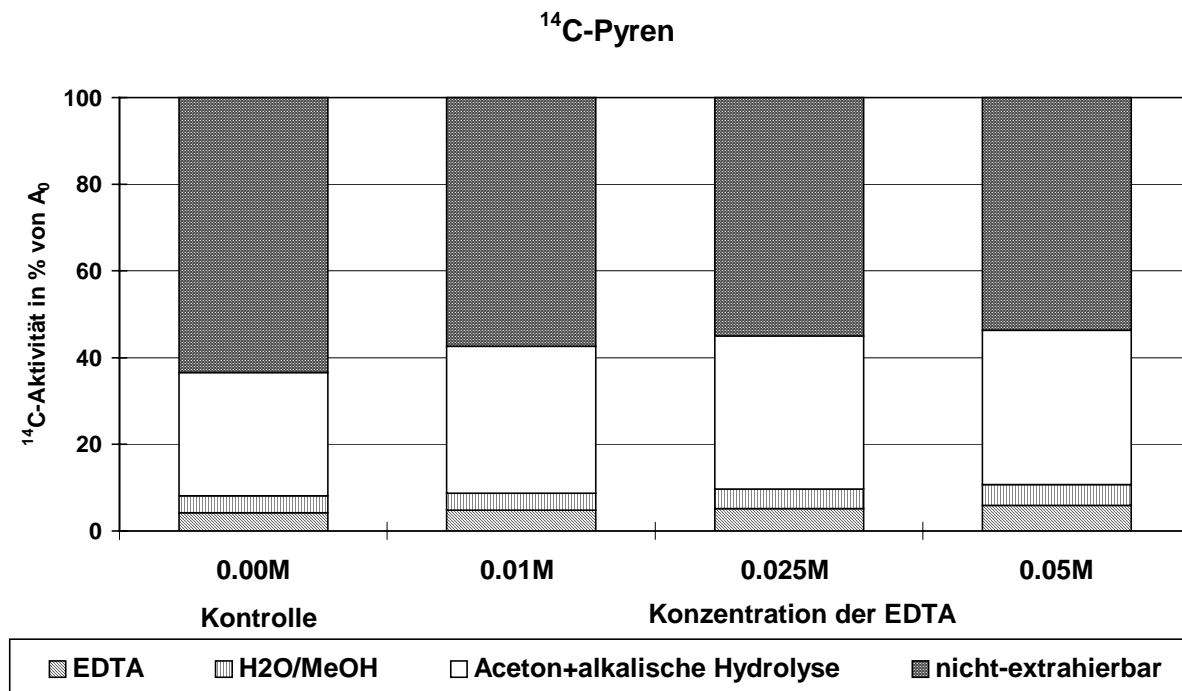
Die Untersuchungen wurden mit  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ -Lösungen in den Konzentrationen 0,01 M, 0,025 M und 0,05 M mit dem Altlastbodenmaterial Bremen mit nicht-extrahierbaren Rückständen aus  $^{14}\text{C}$ -Anthracen bzw. aus  $^{14}\text{C}$ -Pyren durchgeführt. Im Anschluss an die EDTA-Extraktion wurden die Bodenmaterialien einem dreistufigen sequentiellen Extraktionsverfahren (Methanol/Wasser, Aceton, alkalische Hydrolyse) unterzogen.

Die steigenden EDTA-Konzentrationen führten im Altlastbodenmaterial Bremen mit  $^{14}\text{C}$ -Anthracen zu einem erhöhten Anteil eluierbarer  $^{14}\text{C}$ -Aktivität (Abb. 3.11). In der Kontrolle, die nur mit Wasser extrahiert wurde (0,00 M), konnten 8% der anfänglichen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität eluiert werden. In den Versuchen mit den EDTA-Lösung (0,01 M, 0,025 M und 0,05 M) wurden jeweils 11% von  $A_0$  eluiert. Der wässrig-methanolisch extrahierbare Anteil wurde durch die vorangegangenen EDTA-Extraktion nur unwesentlich beeinflusst und betrug zwischen 7 und 8% von  $A_0$ . Die Summe des Aceton-extrahierbaren Anteils und des alkalisch hydrolysierbaren Anteil stiegen jedoch durch die EDTA-Behandlung merklich an, wurden in der Kontrolle noch 21% extrahiert, stieg dieser Anteil bei 0,01 M EDTA-Lösung auf 22%, bei 0,025 M EDTA-Lösung auf 24% und bei 0,05 M EDTA-Lösung auf 26% der anfänglichen Gesamtaktivität. Im Vergleich zur Kontrolle (0,00 M) stieg die gesamte extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivität in der Variante mit der höchsten EDTA-Lösung (0,05 M) um 7%-Punkte an (vgl. Abb. 3.11). Im gleichen Ausmaß sank der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände.



**Abb. 3.11:** Verbleib der <sup>14</sup>C-Aktivität im Altlastbodenmaterial Bremen mit nicht-extrahierbaren Rückständen aus <sup>14</sup>C-Anthracen nach der Behandlung mit EDTA-Lösungen in unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Das Bodenmaterial wurde anschließend mit Methanol/Wasser, Aceton und einer alkalischen Hydrolyse extrahiert.

Die Ergebnisse mit dem Altlastbodenmaterial Bremen mit <sup>14</sup>C-Pyren waren eindeutiger (vgl. Abb. 3.12). In der Kontrolle konnten durch wässrige Elution nur 4% der anfänglichen <sup>14</sup>C-Aktivität eluiert werden. Durch die Anwendung der EDTA-Extraktionen stieg dieser Anteil in der Variante mit der höchsten konzentrierten EDTA-Lösung (0,05 M) auf 6% von A<sub>0</sub>. Der wässrig-methanolisch extrahierbare Anteil wurde auch in diesen Versuchen nur gering beeinflusst und stieg von 4 auf 5% der anfänglichen Gesamtaktivität in der Variante mit der 0,05 M EDTA-Lösung an. Deutlich wurde der Unterschied beim Vergleich der Summe des Aceton-extrahierbaren Aktivitätsanteil und dem alkalisch hydrolysierbaren Anteil. In der Kontrolle waren auf diese Weise 28% extrahierbar, dieser Anteil stieg auf 36% in der Variante mit der höchsten EDTA-Konzentration (0,05 M) an. Insgesamt stieg der gesamte extrahierbare <sup>14</sup>C-Aktivitätsanteil in der Variante mit der 0,05 M EDTA-Lösung um 10%-Punkte der anfänglichen <sup>14</sup>C-Aktivität (A<sub>0</sub>) an. Der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände nahm mit steigender EDTA-Konzentration ab.

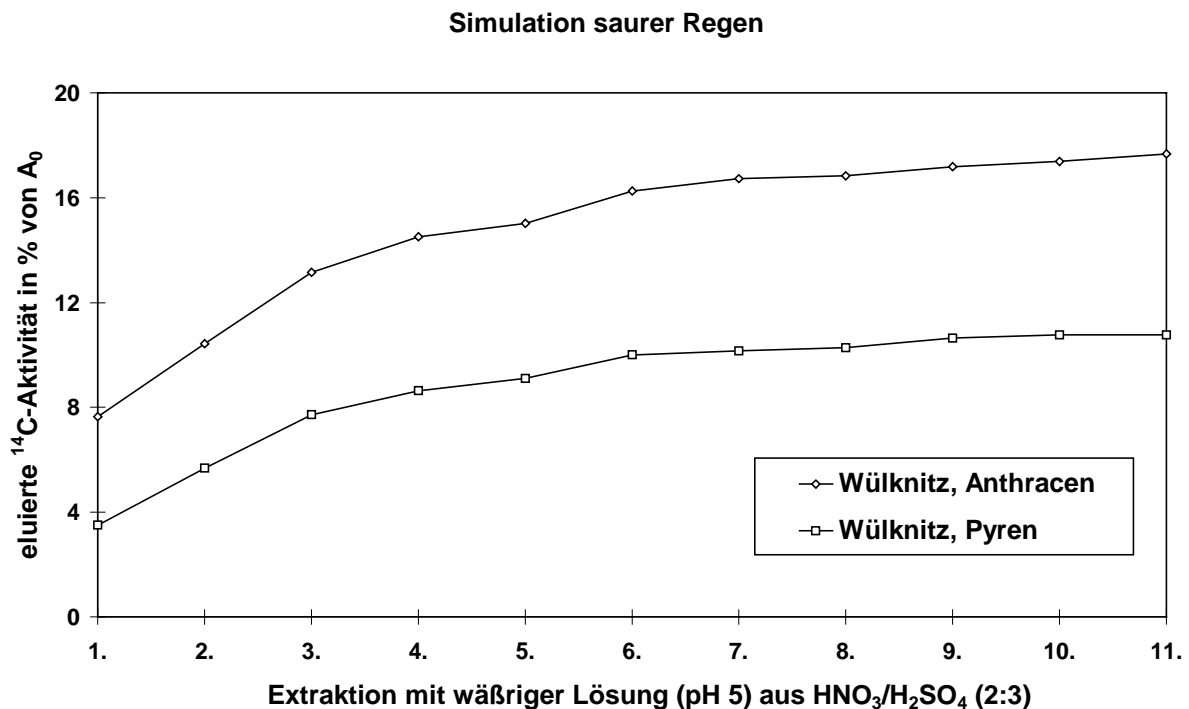


**Abb. 3.12:** Verbleib der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Altlastbodenmaterial Bremen mit nicht-extrahierbaren Rückständen aus  $^{14}\text{C}$ -Pyren nach der Behandlung mit EDTA-Lösungen in unterschiedlichen Konzentrationen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Das Bodenmaterial wurde anschließend mit Methanol/Wasser, Aceton und einer alkalischen Hydrolyse extrahiert.

### 3.3.1.2 pH-Änderung (Simulation des Einflusses von saurem Regen)

Um das Elutionsverhalten von nicht-extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -PAK-Rückstände zu untersuchen, wurde der Einfluss von saurem Regen durch einen entsprechenden Versuch simuliert. Dazu wurde eine wässrige Lösung mit Salpetersäure und Schwefelsäure im Verhältnis 2:3 auf einen pH-Wert von 5 angesäuert und dem Bodenmaterial im Verhältnis 1:10 zugegeben und auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Die angesäuerten Lösungen wurden täglich gewechselt und auf eluierte  $^{14}\text{C}$ -Aktivität hin untersucht. Insgesamt wurden 11 Extraktionen durchgeführt. Die Versuchen wurden mit dem Altlastbodenmaterial Wülknitz mit nicht-extrahierbaren Rückstände aus  $^{14}\text{C}$ -Anthracen bzw. aus  $^{14}\text{C}$ -Pyren durchgeführt. Das Altlastbodenmaterial mit den  $^{14}\text{C}$ -Anthracen-Rückständen hatte einen nicht-extrahierbaren Anteil von 77% der Gesamtaktivität und das Bodenmaterial mit den  $^{14}\text{C}$ -Pyren-Rückständen wies einen nicht-extrahierbaren Anteil von 43% von  $A_0$  auf. Durch die 11 Elutionen mit den leicht angesäuerten wässrigen Lösung konnten im Bodenmaterial Wülknitz mit  $^{14}\text{C}$ -Anthracen-Rückständen 18% der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität remobilisiert werden. Im Bodenmaterial Wülknitz mit  $^{14}\text{C}$ -Pyren-Rückständen konnten dagegen nur 11% von  $A_0$  eluiert werden (vgl.

Abb. 3.13). In beiden Versuchen blieb die Fraktion der nicht-extrahierbaren Rückstände durch die sauren Elutionen unberührt.



**Abb. 3.13:** Simulation des Einflusses von saurem Regen auf das Altlastbodenmaterial Wülknitz mit nicht-extrahierbaren <sup>14</sup>C-PAK-Rückständen aus <sup>14</sup>C-Anthracen (77% der Gesamtaktivität) bzw. <sup>14</sup>C-Pyren (43% der Gesamtaktivität).

Bei der Verwendung von <sup>14</sup>C-markierten Schadstoffen und hohen Anteilen organischer Zuschlagstoffe (z.B. Kompost, Tierdung) können im sauren Extraktionsverfahren (Simulation des Einflusses von saurem Regen) gelöste organische Bestandteile (DOM) mit erfasst werden, die zu einer erhöhten extrahierbaren <sup>14</sup>C-Aktivität führen können. Durch anschließende analytische Verfahren (z.B. chromatographische Verfahren) konnten originäre Schadstoffe oder deren Metaboliten nicht nachgewiesen werden.

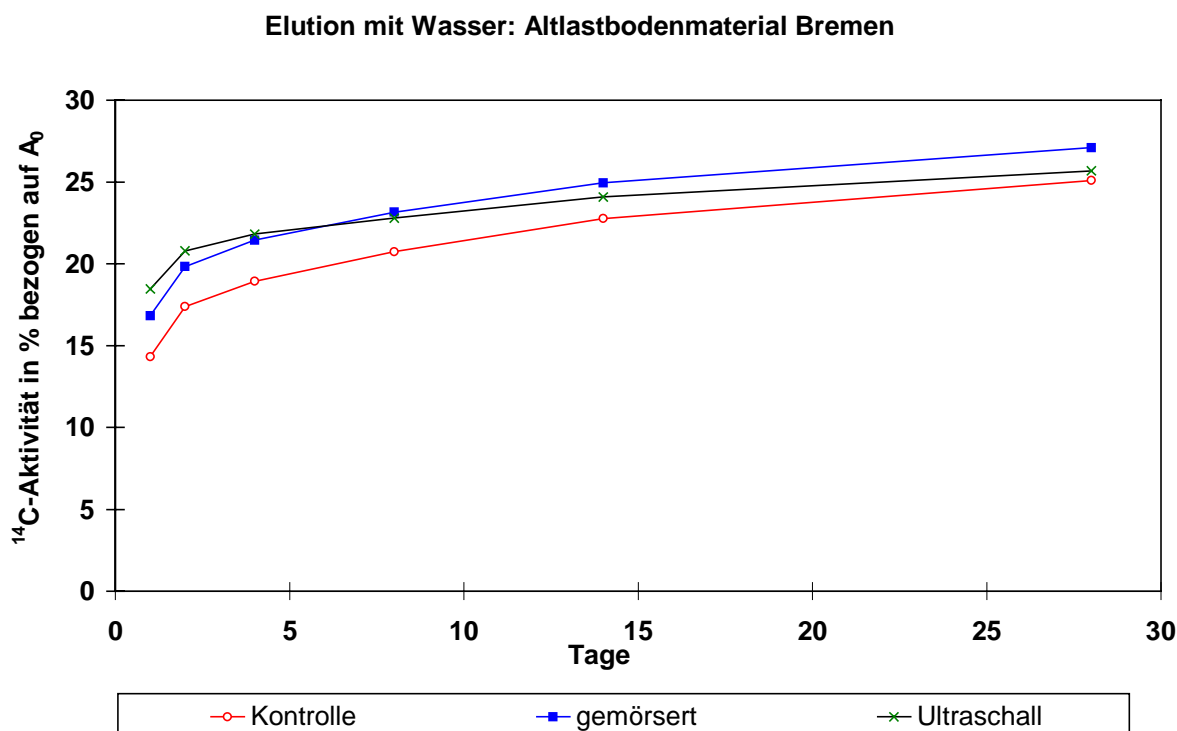
### 3.3.2 Physikalische Remobilisierungsmaßnahmen:

#### 3.3.2.1 Aggregatzerstörung im Altlastbodenmaterial Bremen

Um den Einfluss mechanischer Aggregatzerstörung auf die Eluierbarkeit von extrahierbaren bzw. nicht-extrahierbaren <sup>14</sup>C-PAK-Rückstände zu untersuchen, wurden Elutionsversuche mit dem humosen Altlastbodenmaterial Bremen durchgeführt. Die Versuche wurden jeweils mit drei Parallelen durchgeführt, wobei die Elutionslösung nach 24h 48h, 4d, 8d, 14d und nach 28d gewechselt und im  $\beta$ -Szintillator auf <sup>14</sup>C-Aktivität vermessen wurde. Das Verhältnis

Bodenmaterial zu Elutionslösung betrug 1:10. Untersucht wurden verschiedene mechanische Aggregatzerstörungen wie Mörsern und die Behandlung des Bodenmaterials mit einer Ultraschall-Sonde. Das Ultraschall-behandelte Bodenmaterial enthielt 74% nicht-extrahierbare Rückstände, das gemörserte und das unbehandelte Bodenmaterial enthielten 72% nicht-extrahierbare Rückstände.

Die Ergebnisse zeigten, dass die gesteigerte mechanische Beanspruchung (Ultraschall-Behandlung, Mörsern) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu Beginn der Versuche mehr  $^{14}\text{C}$ -Aktivität eluierte. Im Verlauf der weiteren Beprobung relativierte sich dieser Einfluss allerdings (vgl. Abb. 3.14). Nach 28 Tagen konnten in der Ultraschall-behandelten Variante 26% der anfänglichen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität eluiert werden, was dem gesamten extrahierbaren Anteil entsprach. In der gemörserten Variante konnten 27% eluiert werden (28% extrahierbarer Anteil), und in der unbehandelten Kontrolle 25% (28% extrahierbarer Anteil). Es wurde deutlich, dass durch die 28-tägige Elution – unabhängig von den mechanischen Behandlungen – annähernd der gesamte extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil eluiert werden konnte. Die nicht-extrahierbaren Rückstände blieben von der Elution allerdings unberührt. Die relativ hohen eluierten Werte lassen auf eine mögliche Mitelution gelöster organischer Substanz (DOM) schließen.



**Abb. 3.14:** Eluierbarkeit der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Altlastbodenmaterial Bremen durch verschiedene mechanische Behandlungen mit 72% (Kontrolle, gemörsert) bzw. 74% (Ultraschall) nicht-extrahierbaren Rückständen.

### 3.3.3 Biologische Remobilisierungsmaßnahmen:

#### 3.3.3.1 Einsatz von Organismen der Bodenfauna (Regenwürmer)

Regenwürmer haben bei der Umsetzung von organischer Substanz im Boden eine wichtige Rolle als streuzersetzende Organismen. Aufgrund der hohen Ingestionsraten von organischem sowie mineralischem Material ist es vorstellbar, dass Regenwürmer Bodenmaterial mit nicht-extrahierbaren Rückständen aufnehmen. Gegenstand der Untersuchung war die Frage, ob humifizierte  $^{14}\text{C}$ -markierten PAK-Rückstände aus der Bodenmatrix eines biologisch sanierten Bodenmaterials während der Darmpassage in den Regenwürmern unter Einwirkung von Enzymen oder durch im Darm befindliche Mikroorganismen wieder freigesetzt werden, nach der Ausscheidung in die Umwelt gelangen können und so eine potentielle Gefahr für die Biosphäre darstellen. Des Weiteren war von Interesse ob die Regenwürmer die Mineralisation bzw. die Humifizierung von diesen Schadstoffrückständen beeinflussen.

Um das Remobilisierungspotential unterschiedlicher Regenwurmartens zu vergleichen, wurden die Arten *Aporrectodea caliginosa* und *Eisenia fetida* verwendet, die zu

verschiedenen ökologischen Gruppen gezählt werden (endogäische bzw. epigäische Arten). *Eisenia fetida* gehört zu den **epigäische Arten** (Streuform), die an der Erdoberfläche z.B. in der Humusaufgabe der Böden leben und in der Lage sind große Menge organischen Materials abzubauen (Edwards & Bohlen 1996). Durch ihre Tätigkeit tragen sie aber nicht zu einer signifikanten Vermischung von mineralischem Bodenmaterial und organischem Material bei. Sie fressen hauptsächlich unverrottete Pflanzen- und Wurzelreste. *E. fetida* ist erwiesenermaßen äußerst leistungsstark im Umsatz organischer Substanz und wird häufig in Modellansätzen verwendet, da diese Organismen im Gegensatz zu anderen Regenwurmarten unter Laborbedingungen leicht zu halten und weniger parasitenanfällig sind (Ziegler 1990).

*Aporrectodea caliginosa* wird zu den **endogäische Arten** (Mineralbodenform) gezählt, d.h. er bewohnt die obere mineralische Bodenschicht. Endogäische Arten fressen im Vergleich zu epigäischen Arten hauptsächlich nicht mehr identifizierbares organisches Material zusammen mit Wurzeln und Blättern, die sich im fortgeschrittenen Zustand der Zersetzung befinden, aber auch mineralisches Material, das durch organische Substanz angereichert ist. Sie leben in einem flachen Gangsystem bis 50 cm Tiefe. *A. caliginosa* konsumiert im Gegensatz zu *E. fetida* größere Mengen Boden. Im Kot ist aber weitaus weniger organische Substanz als bei *E. fetida* vorhanden, wo sich noch oftmals fragmentierte Reste organischen Materials, z.B. Blätter, wiederfinden lassen (Edwards & Bohlen 1996).

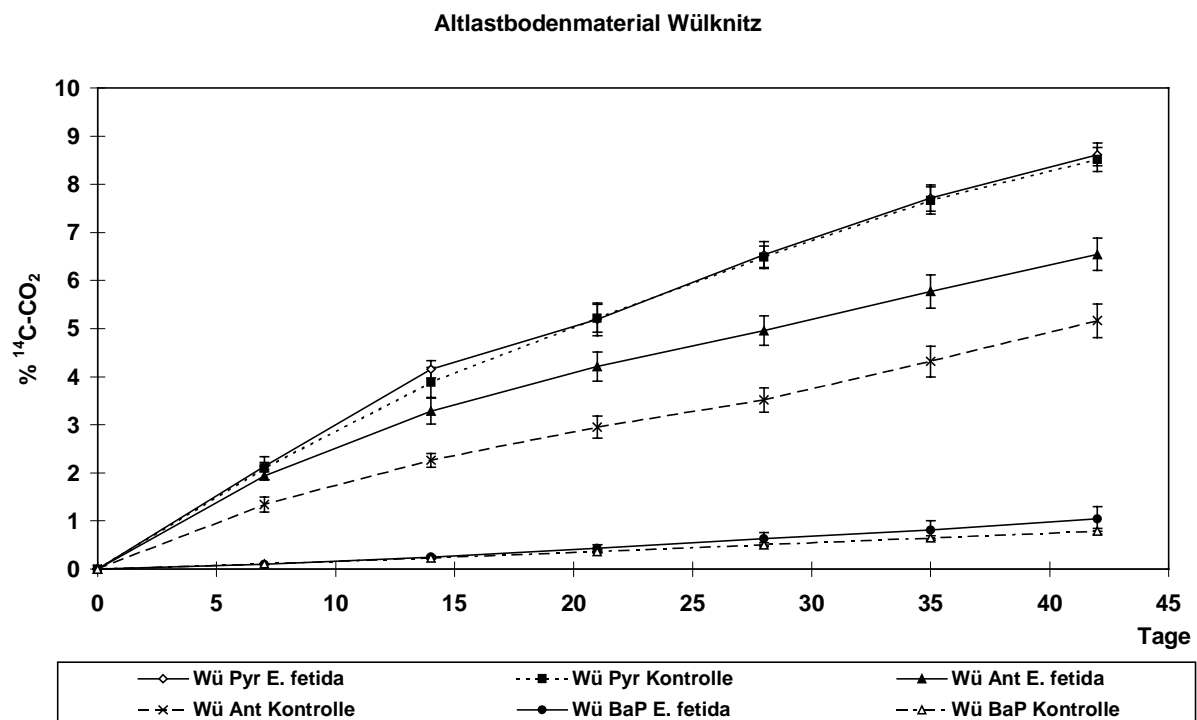
Aufgrund dieser unterschiedlichen Umsetzung von organischer Substanz und Boden wurde das Remobilisationsverhalten beider Regenwurmarten in den nachfolgenden Versuchen miteinander verglichen.

Um Aussagen über die Stabilität von nicht-extrahierbaren Rückständen aus verschiedenen originären  $^{14}\text{C}$ -markierten PAK zu treffen, wurden in der folgenden Remobilisierungsuntersuchung Bodenmaterialien mit nicht-extrahierbaren PAK-Rückständen aus  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren,  $^{14}\text{C}$ -Pyren und  $^{14}\text{C}$ -Anthracen, unter Zugabe von den Regenwürmern inkubiert. Ferner kamen in der Untersuchung zwei verschiedenen Bodenmaterialien - Modellboden Muttergarten und Altlastboden Wülknitz - zur Anwendung. Das Modellbodenmaterial Muttergarten wurde mit beiden Lumbricidarten inkubiert (*A. caliginosa* und *E. fetida*), das Altlastbodenmaterial hingegen wurde aufgrund der begrenzten Menge  $^{14}\text{C}$ -markierten Bodenmaterials nur mit *E. fetida* inkubiert.

### Mineralisation von $^{14}\text{C}$ -PAK-Rückständen während der Inkubation mit den Lumbriciden

Die Ergebnisse zeigten, dass die Zugabe von Regenwürmern im Vergleich zu den un-supplementierten Kontrollen keine wesentliche Steigerung der Mineralisation von  $^{14}\text{C}$ -PAK-Rückständen bewirkte. In Abb. 3.15 ist die Mineralisation der verschiedenen  $^{14}\text{C}$ -markierten PAK-Rückstände in den unterschiedlichen Versuchsansätzen mit dem **Altlastbodenmaterial Wülknitz** mit bzw. ohne Zugabe von Regenwürmern dargestellt. Die höchste Mineralisation wurden - unabhängig von der Regenwurm-Zugabe - in den Versuchen mit dem Altlastbodenmaterial Wülknitz mit  $^{14}\text{C}$ -Pyren-Rückständen erzielt (8,3-8,8%). In den Versuchen mit  $^{14}\text{C}$ -Anthracen-Rückständen (Altlastbodenmaterial Wülknitz) war die Mineralisation in den Regenwurm-supplementierten Ansätzen geringfügig höher (6,2-6,8%) als in den un-supplementierten Kontrollen (4,9-5,6%). Die  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren-Rückstände wurden durch die Regenwurm-Zugabe nicht nennenswert beeinflusst und während der Inkubation kaum mineralisiert (<1,5% von  $A_0$ ).

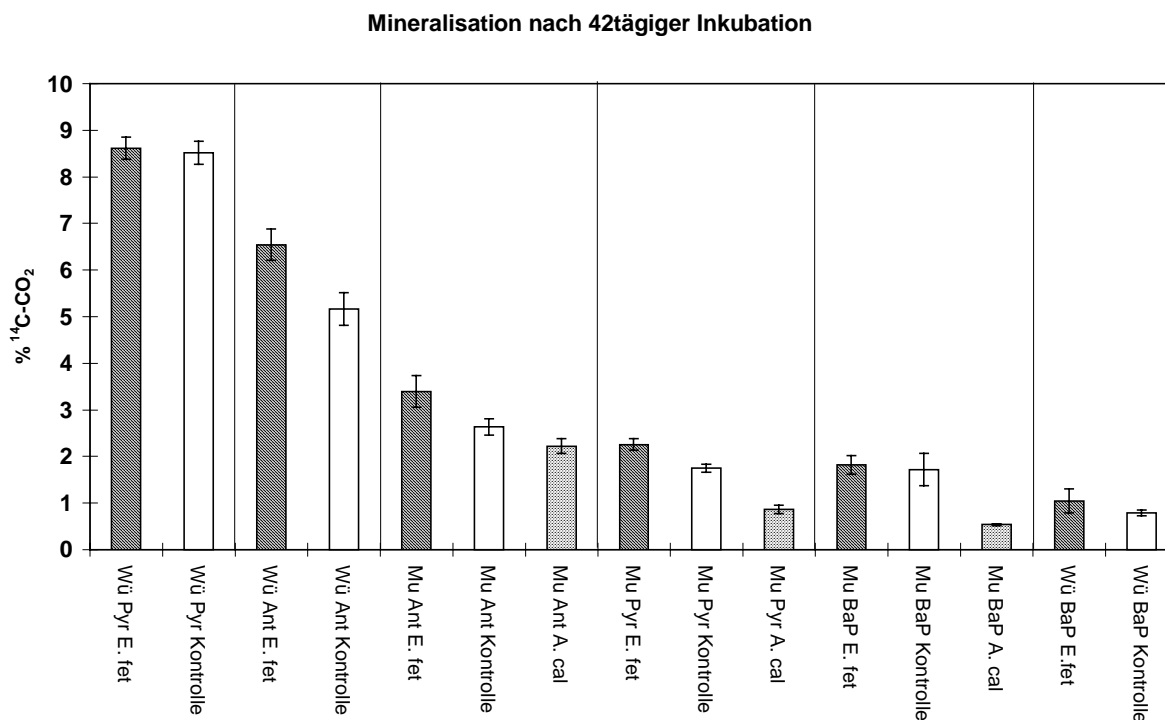
Es ist festzuhalten, dass die Mineralisation der  $^{14}\text{C}$ -markierten Rückstände von Pyren über Anthracen nach Benzo(a)pyren entsprechend der Wasserlöslichkeit der originären Verbindung abnahm, obwohl beträchtliche Anteile der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität gebunden als nicht-extrahierbare Rückstände vorlagen.



**Abb. 3.15:** Vergleich der Mineralisation der verschiedenen  $^{14}\text{C}$ -markierten PAK-Rückstände im Altlastbodenmaterial Wülknitz (Wü). [Pyr: Pyren, Ant: Anthracen, BaP: Benzo(a)pyren].

Die Mineralisation in den Versuchen mit dem Modellbodenmaterial Muttergarten war im Vergleich zu den Ansätzen mit dem Altlastbodenmaterial Wülknitz deutlich geringer und bewegten sich nach 42-tägiger Inkubation unterhalb von 3,5% der anfänglichen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität. Die Unterschiede zwischen den Mineralisationswerten der verschiedenen Versuchsvarianten waren im Modellbodenmaterial geringer, als im Altlastbodenmaterial, so dass eine differenzierte Abstufung der Mineralisation - wie im Altlastbodenmaterial - nicht beobachtet werden konnte.

Die mittleren kumulierten Mineralisationswerte aller Versuchsvarianten sind nach 42-tägiger Inkubation in Abb. 3.16 dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung zwischen drei Parallel-Ansätzen an. Im Altlastbodenmaterial Wülknitz mit  $^{14}\text{C}$ -Pyren-Rückständen wurde die höchste Mineralisation beobachtet. In den Versuchsansätzen mit dem Bodenmaterial Wülknitz mit  $^{14}\text{C}$ -Antracen-Rückständen und mit dem Bodenmaterial Muttergarten mit  $^{14}\text{C}$ -Antracen-Rückständen sowie mit  $^{14}\text{C}$ -Pyren-Rückständen, lässt sich die Tendenz feststellen, dass in den *E. fetida*-inkubierten Ansätzen, mehr  $^{14}\text{C}$ -markierte PAK-Rückstände mineralisiert wurden als in den Kontroll-Ansätzen, obgleich der prozentuale Anteil an der Anfangsaktivität gering war. In allen Versuchen wurde in den *A. caliginosa*-inkubierten Ansätzen im Durchschnitt weniger  $^{14}\text{C}$ -markierte PAK-Rückstände mineralisiert als in den Kontroll-Ansätzen und somit auch weniger als in den Ansätzen mit *E. fetida* (vgl. Abb. 3.16). Die Mineralisation in den Versuchsansätzen mit dem Altlastbodenmaterial war - ausgenommen von den Ansätzen mit  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren-Rückständen - höher als in den Versuchen mit dem Modellbodenmaterial, was auf die Anwesenheit einer autochthonen Mikroflora im Altlastbodenmaterial zurückgeführt wurde.



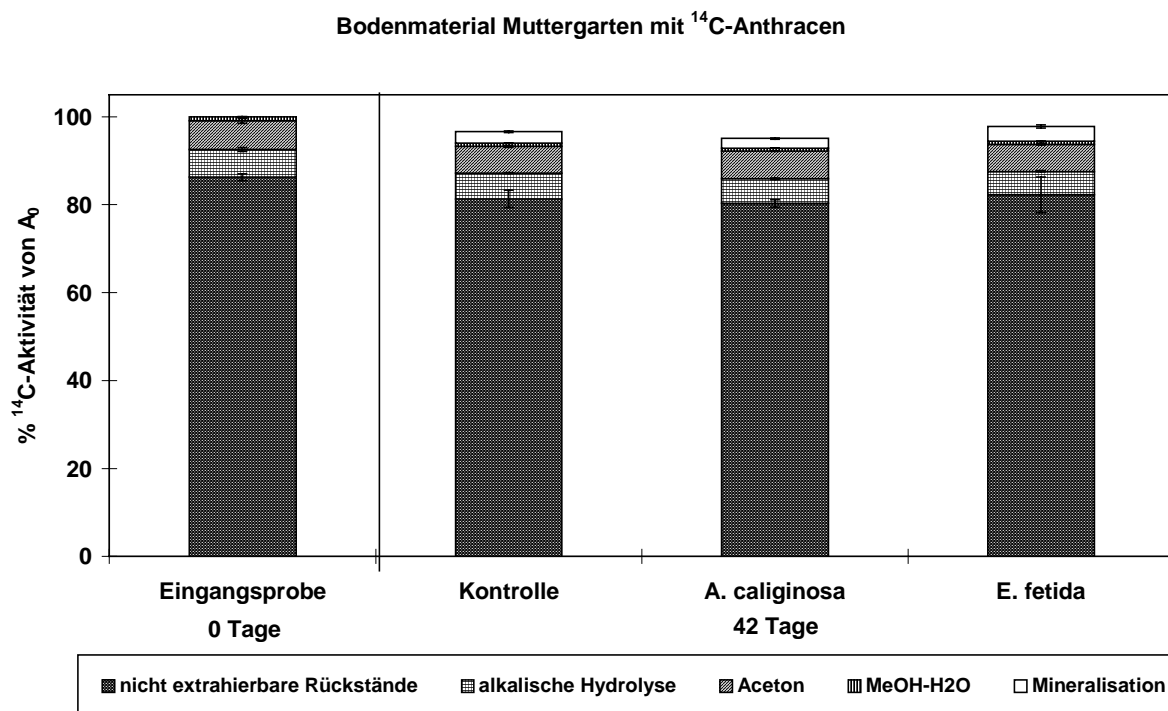
**Abb. 3.16:** Mineralisation der  $^{14}\text{C}$ -PAK-Rückstände aller durchgeführten Versuchsvarianten nach 42-tägiger Inkubation in Prozent der zu Versuchsbeginn im Boden vorhandenen Gesamtaktivität  $A_0$ . [Wü: Altlastbodenmaterial Wülknitz, Mu: Modellbodenmaterial Muttergarten, E. fet: *Eisenia fetida*, A. cal: *Aporrectodea caliginosa*].

Um den Verbleib der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität in den Bodenmaterialien nach der Regenwurmbehandlung zu charakterisieren wurden ein sequentielles, dreistufiges Extraktionsverfahren angewendet, das die  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Boden in vier unterschiedliche Fraktionen aufteilte. Durch den ersten Extraktionsschritt (Methanol/Wasser) wurden weniger fest sorbierte, gelöste  $^{14}\text{C}$ -markierte PAK extrahiert. Der zweite Extraktionsschritt (Aceton) bezog sich auf die Lösemittel-mobilisierbare  $^{14}\text{C}$ -PAK-Fraktion, die den Anteil der an den Oberflächen der Bodenpartikel sorbierten PAK erfasst. Anschließend erfolgte eine alkalische Hydrolyse mit einem Methanol/NaOH-Gemisch, die eine Spaltung der Ester-Bindungen in den Huminstoffen bewirkt. Dadurch sollten PAK extrahiert werden, die in die Huminstoffmatrix eingelagert waren oder durch  $\pi$ -Elektronen-Austausch an die organische Substanz des Bodens gebunden waren. Die vierte Fraktion bildeten die nicht-extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -PAK-Rückstände, deren  $^{14}\text{C}$ -Aktivität aus der Differenz der durch Verbrennung bestimmten Bodengesamtaktivität und der Summe der  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten der extrahierbaren Fraktionen bestimmt wurde. Es wurden jeweils Triplets der verschiedenen Bodenproben dem dreistufigen Extraktionsverfahren unterzogen, wobei für jede Versuchsvariante mit drei Parallel-Ansätzen gearbeitet wurde. Die Fehlerbalken in den Abbildungen zeigen die

Standardabweichung zwischen den Parallel-Ansätzen an. Den Versuchsansätzen mit dem Modellbodenmaterial Muttergarten mit  $^{14}\text{C}$ -Anthracen-Rückständen wurden außerdem Bodenproben nach 7 Tagen und nach 28 Tagen entnommen und extrahiert, um eine mögliche Verschiebung der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität in den unterschiedlichen Fraktionen über den gesamten Inkubationszeitraum zu beschreiben.

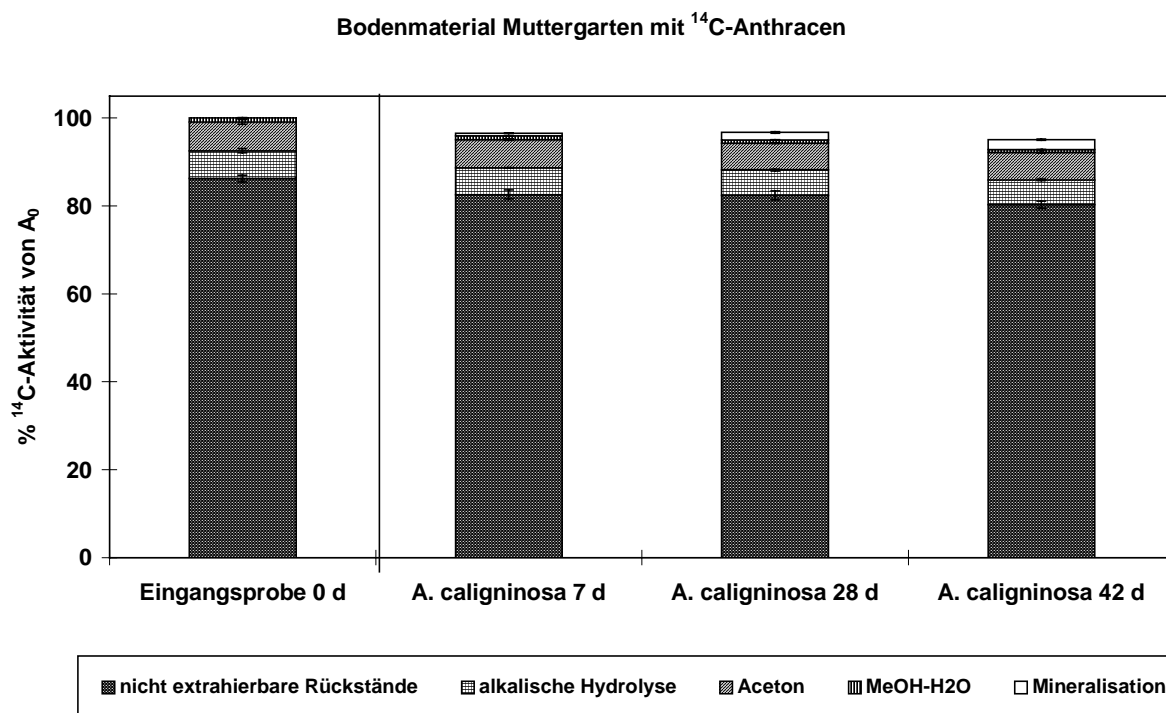
### **Modellbodenmaterial Muttergarten mit Rückständen aus $^{14}\text{C}$ -Anthracen**

In Abb. 3.17 ist die  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsverteilung der extrahierbaren Fraktionen und der nicht-extrahierbaren Rückstände in den Versuchsansätzen mit dem Bodenmaterial Muttergarten mit Rückständen aus  $^{14}\text{C}$ -Anthracen vor und nach 42-tägiger Inkubation dargestellt. In allen Versuchsvarianten war der wässrig-methanolisch extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil sehr gering und betrug weniger als 1% der zu Versuchsbeginn im Boden vorhandenen Gesamtaktivität. Nach 42-tägiger Inkubation mit *A. caliginosa* bzw. *E. fetida* konnte keine Steigerung gegenüber der Eingangsprobe (Tag 0) sowie den Kontroll-Ansätzen beobachtet werden. Der mittlere Aceton-extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil der Eingangsprobe betrug 6,5% von  $A_0$ . Nach der Inkubation mit den beiden Regenwurmarten bzw. des Kontroll-Ansatzes konnte keine wesentliche Änderung beobachtet werden. Ähnliche Größenordnungen zeigten die  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten der Extrakte der alkalischen Hydrolyse: in der Eingangsprobe wurde ein mittlerer alkalisch-hydrolysierbarer Anteil von 6,3% von  $A_0$  ermittelt, nach der Inkubation betrug dieser Anteil in allen Versuchsansätzen zwischen 5 und 6% der anfänglichen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität. Die nicht-extrahierbaren Rückstände bildeten den größten Anteil der im Boden vorhandenen Gesamtaktivität (vgl. Abb. 3.17). Zu Versuchsbeginn betrug dieser Anteil im Durchschnitt 86,3%, nach der Inkubation mit *A. caliginosa* bzw. *E. fetida* 80,3 bzw. 82,3% sowie in den Kontroll-Ansätzen 81,3% von  $A_0$ . Der Vollständigkeit halber wurde die Mineralisation in den Abbildungen mit dargestellt. Sie stieg in den *E. fetida*-supplementierten Ansätzen auf 3,4%, in den *A. caliginosa*-inkubierten Ansätzen betrug die mittlere Mineralisation 2,2% und in den Kontroll-Ansätzen 2,6% der Anfangsaktivität  $A_0$ .



**Abb. 3.17:**  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsverteilung der extrahierbaren und nicht-extrahierbaren Fraktionen der Versuchsansätze mit dem Bodenmaterial Muttergarten mit Rückständen aus  $^{14}\text{C}$ -Anthracen vor und nach 42-tägiger Inkubation.

Um zu überprüfen, ob es während der Inkubation zu einer Verschiebung der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität in den unterschiedlich extrahierbaren Fraktionen kam, wurden die Versuchsansätze mit dem Bodenmaterial Muttergarten mit Rückständen aus  $^{14}\text{C}$ -Anthracen auch nach 7 und nach 28 Tagen beprobt. Allerdings zeigten sich auch nach 7 und nach 28 Tagen nur geringe Abnahmen der nicht-extrahierbaren Fraktion zugunsten der Mineralisation. Eine Verschiebung der nicht-extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -Aktivität in eine extrahierbare Fraktion war in keiner der Parallelen zu beobachten. Exemplarisch ist die  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsverteilung während der Inkubation für die Variante mit *A. caliginosa* in Abb. 3.18 dargestellt. Es zeigte sich, dass die nicht-extrahierbaren Rückstände während der Inkubation in sehr geringem Maße zu  $\text{CO}_2$  umgesetzt wurden (2%-Punkte), während die verschiedenen extrahierbaren Fraktionen annähernd konstant blieben. Ein ähnliches Bild zeigten die Kontrollen und die Varianten, die mit *E. fetida* inkubiert worden waren. Nach 7 bzw. nach 28 Tagen zeigte sich ebenfalls eine abnehmende Tendenz der nicht-extrahierbaren Fraktion aufgrund einer geringen Mineralisation, die extrahierbaren Fraktionen blieben jedoch während der gesamten Inkubation konstant.

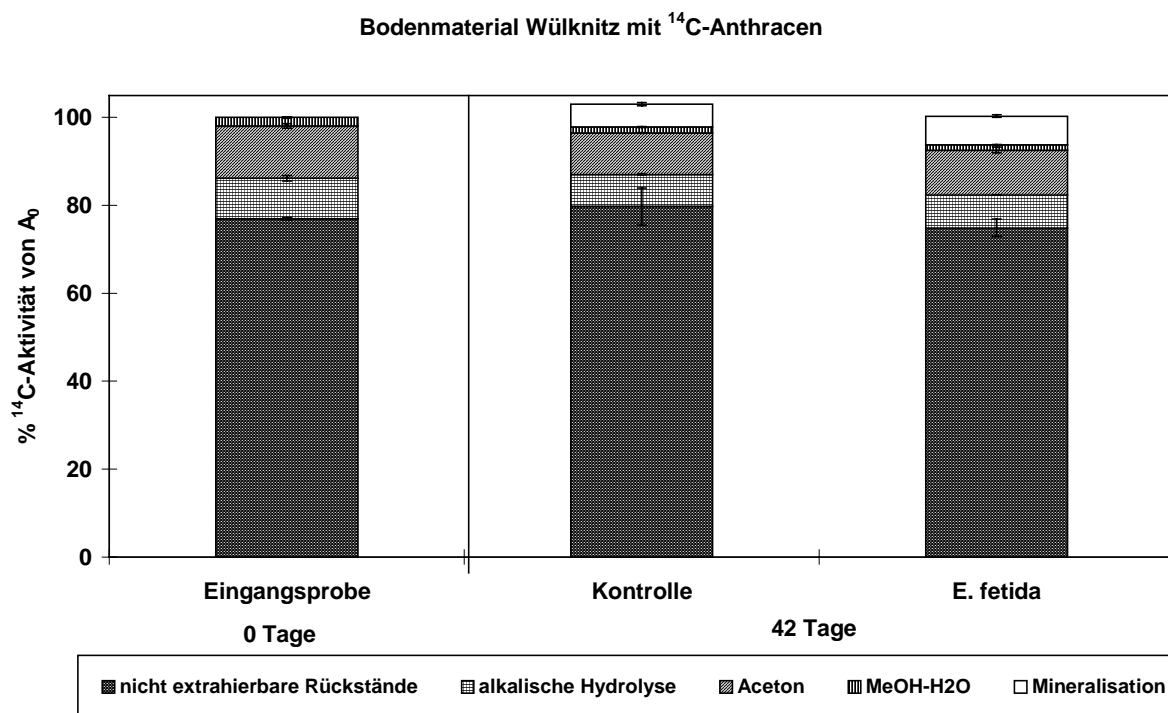


**Abb. 3.18:**  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsverteilung der extrahierbaren und nicht-extrahierbaren Fraktionen der Versuchsansätze mit dem Bodenmaterial Muttergarten mit Rückständen aus  $^{14}\text{C}$ -Anthracen, die mit *A. caliginosa* inkubiert wurden, während der 42-tägigen Inkubation.

#### Altlastbodenmaterial Wülknitz mit Rückständen aus $^{14}\text{C}$ -Anthracen

Wie auch in den Versuchen mit dem Bodenmaterial Muttergarten war der mittlere wässrig-methanolisch extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil zu Beginn der Versuchen mit dem Altlastbodenmaterial Wülknitz gering ( $< 2\%$  von  $A_0$ ) und konnte durch die Inkubation mit den Regenwürmern nicht gesteigert werden (vgl. Abb. 3.19). Ebenso zeigte der Aceton-extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil keine wesentlichen Veränderungen, zu Versuchsbeginn betrug dieser Anteil  $11,9\%$  von  $A_0$  und nach der Inkubation betrug der Aceton-extrahierbare Anteil in den *E. fetida*-inkubierten Ansätzen  $10,2\%$  und in den Kontroll-Ansätzen  $9,5\%$  von  $A_0$ . In den Extrakten der alkalischen Hydrolyse wurde zu Versuchsbeginn ein mittlerer  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil von  $9,2\%$  festgestellt und nach der Inkubation mit *E. fetida* bzw. in den unsupplementierten Kontroll-Ansätzen betrug dieser Anteil  $7\%$  der Gesamtaktivität. Wie auch in den Versuchen mit dem Modellbodenmaterial bildeten die nicht-extrahierbaren Rückstände in den Versuchen mit dem Altlastbodenmaterial mit  $^{14}\text{C}$ -Anthracen den größten Anteil der zu Versuchsbeginn ermittelten Gesamtaktivität. In der Eingangsprobe (Tag 0) betrug dieser Anteil  $77\%$ , nach der Inkubation mit *E. fetida* wurde ein mittlerer nicht-extrahierbarer Anteil von  $74,9\%$  und in den Kontroll-Ansätzen von  $79,8\%$  der

Anfangsaktivität ermittelt. Die Mineralisation war in den Versuchsansätzen, die mit *E. fetida* inkubiert wurden, mit 6,5% etwas höher als in den Kontroll-Ansätze mit 5,2% von  $A_0$ .

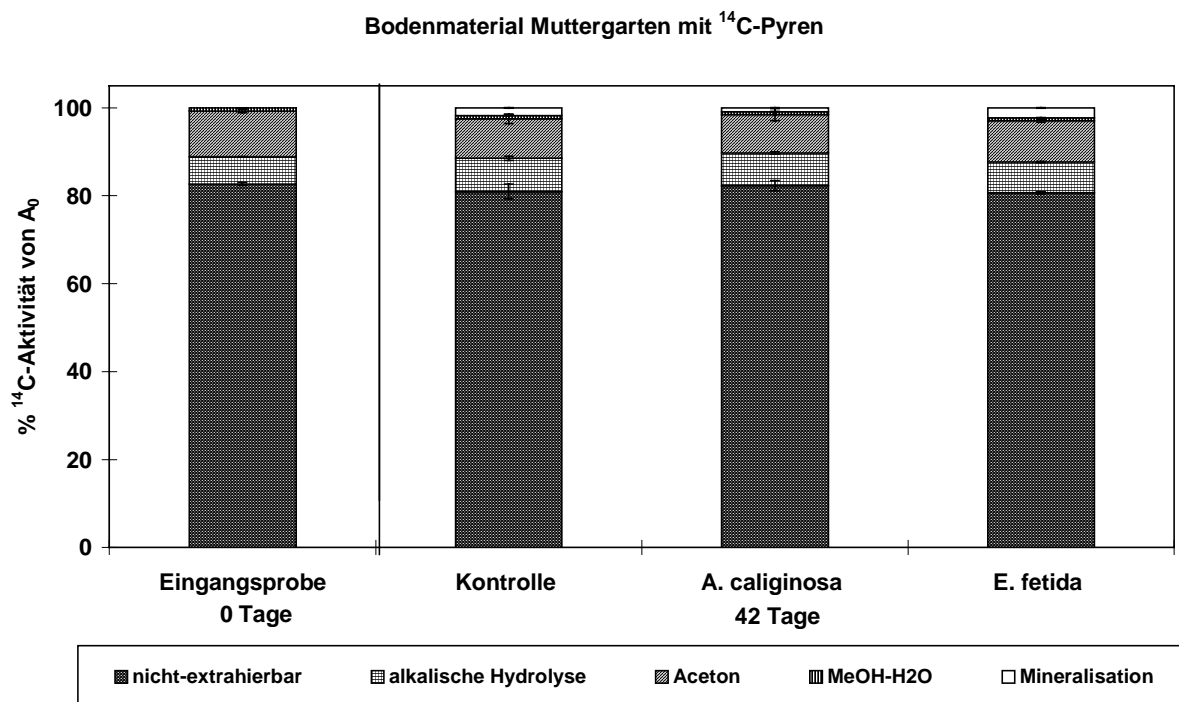


**Abb. 3.19:**  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsverteilung der extrahierbaren und nicht-extrahierbaren Fraktionen der Versuchsansätze mit dem Altlastbodenmaterial Wülknitz mit Rückständen aus  $^{14}\text{C}$ -Anthracen vor und nach 42-tägiger Inkubation.

### Modellbodenmaterial Muttergarten mit Rückständen aus $^{14}\text{C}$ -Pyren

Ebenso wie in den Untersuchungen mit  $^{14}\text{C}$ -Anthracen-Rückständen war der wässrig-methanolisch extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil in den Versuchen mit dem Bodenmaterial Muttergarten mit Rückständen aus  $^{14}\text{C}$ -Pyren sehr gering und betrug weniger als 1% der Anfangsaktivität ( $A_0$ ). Dementsprechend konnten keine wesentlichen Veränderungen durch die Inkubation mit *A. caliginosa* bzw. *E. fetida* im Vergleich zu den Kontroll-Ansätzen sowie zur Eingangsprobe (Tag 0) festgestellt werden. Auch in den Aceton-Extrakten konnte keine gesteigerte Remobilisierung von  $^{14}\text{C}$ -Aktivität nach der Inkubation aufgezeigt werden. Zu Versuchsbeginn betrug der mittlere Aceton-extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil 10,4%, nach der Inkubation betrug dieser Anteil in den Ansätzen, die mit *A. caliginosa* bzw. *E. fetida* inkubiert wurden 8,7 bzw. 9,4% und in den Kontroll-Ansätzen 9% der anfänglichen Gesamtaktivität. Ähnliche Größenordnungen wiesen die alkalisch-hydrolysierbaren Anteile auf, die zu Versuchsbeginn 6,2% betrug und nach der Inkubation in den Kontroll-Ansätzen 7,6% sowie in den Ansätzen, die mit *A. caliginosa* oder mit *E. fetida* inkubiert wurden, jeweils 7% der Anfangsaktivität betrug. In Abb. 3.20 wird deutlich, dass die nicht-extrahierbaren

Rückstände auch in diesen Versuchen den größten  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsbestandteil bildeten. Zu Versuchsbeginn betrug der mittlere nicht-extrahierbare Anteil 82,7% der anfänglichen Gesamtaktivität, der sich während der 42-tägige Inkubation mit *A. caliginosa* bzw. *E. fetida* nicht wesentlich änderte (82,3 bzw. 80,7% von  $A_0$ ), und auch in den Kontroll-Ansätzen nach der Inkubation keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zur Eingangsprobe (Tag 0) aufwies (81% von  $A_0$ ). Die mittlere Mineralisation betrug in den *A. caliginosa*-inkubierten Ansätzen <1%, in den Kontroll-Ansätzen 1,7% und in den Ansätzen, die mit *E. fetida* inkubiert wurden, 2,3% der zu Versuchsbeginn ermittelten  $^{14}\text{C}$ -Aktivität  $A_0$ .

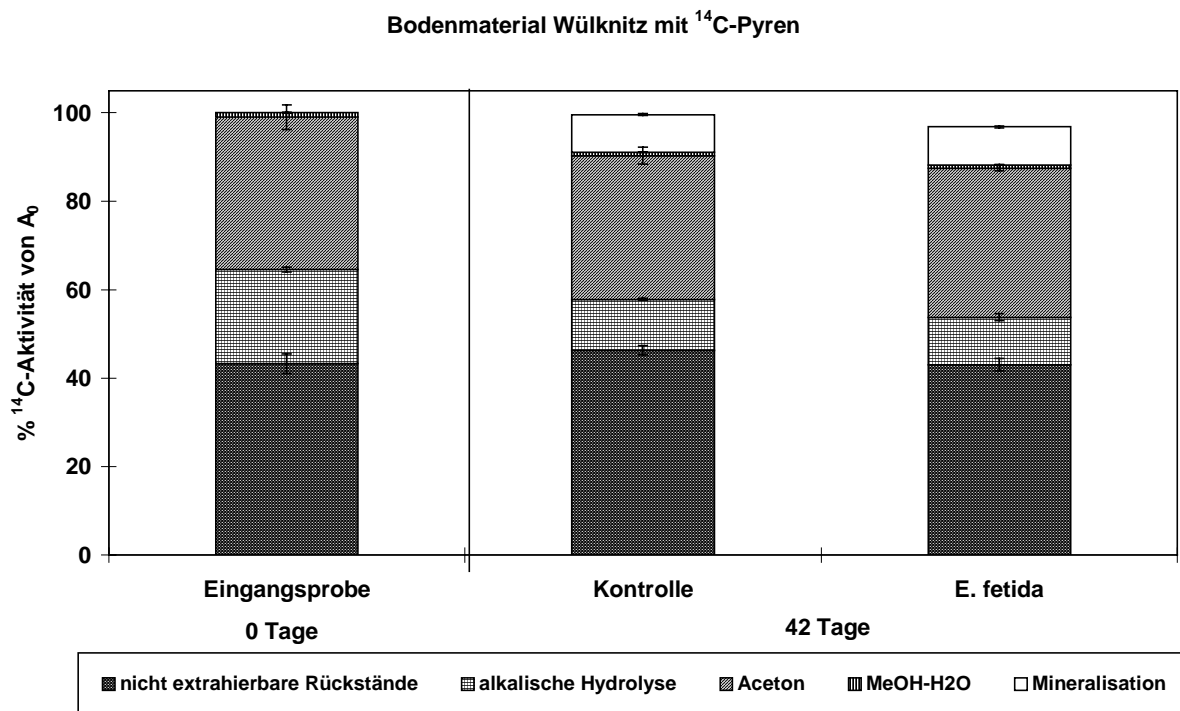


**Abb. 3.20:**  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsverteilung der extrahierbaren und nicht-extrahierbaren Fraktionen der Versuchsansätze mit dem Bodenmaterial Muttergarten mit Rückständen aus  $^{14}\text{C}$ -Pyren vor und nach 42-tägiger Inkubation.

### Altlastbodenmaterial Wülknitz mit Rückständen aus $^{14}\text{C}$ -Pyren

Auch in den Versuchen mit dem Altlastbodenmaterial mit  $^{14}\text{C}$ -Pyren-Rückständen war der mittlere wässrig-methanolisch extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil sehr gering (<1% von  $A_0$ ). Die 42-tägige Inkubation mit *E. fetida* bzw. der Kontroll-Ansätze erbrachten keine Steigerung dieses Anteils. Der Aceton-extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil wies ebenfalls keine wesentlichen Veränderungen durch die Inkubation auf (zu Versuchsbeginn: 31,7-37,3%; nach Versuchsende: 30,3-34,5% von  $A_0$ ). Deutlichere Veränderungen zeigten dagegen die Extrakte der alkalischen Hydrolyse. In der Eingangsprobe (Tag 0) betrug dieser  $^{14}\text{C}$ -

Aktivitätsanteil 21% von  $A_0$ . Nach der 42-tägige Inkubation zeigte sich eine Halbierung der alkalisch-hydrolysierbaren  $^{14}\text{C}$ -Aktivität (vgl. Abb. 3.21). In den Ansätzen, die mit *E. fetida* inkubiert wurden, betrug dieser Anteil nach Versuchsende 10,7% und in den Kontroll-Ansätzen 11,5% der anfänglichen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität. Die relativ hohen Abnahmen der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität in den Extrakten der alkalischen Hydrolyse beliefen sich auf ähnliche Größenordnungen wie die ermittelte Mineralisation, die in den *E. fetida*-inkubierten Ansätzen 8,6% und in den Kontroll-Ansätzen 8,5% von  $A_0$  betrug. Auch in den Versuchen mit dem Altlastbodenmaterial mit  $^{14}\text{C}$ -Pyren, bildeten die nicht-extrahierbaren Rückstände den größten Anteil der anfänglichen Gesamtaktivität. Zu Versuchsbeginn betrug der mittlere nicht-extrahierbare Anteil 43,3% der Anfangsaktivität. Die Inkubation mit *E. fetida* vermochte diesen Anteil nicht zu beeinflussen (43,1% von  $A_0$ ), aber auch in den Kontroll-Ansätzen konnten keine wesentlichen Veränderungen festgestellt werden (46,5% von  $A_0$ ).

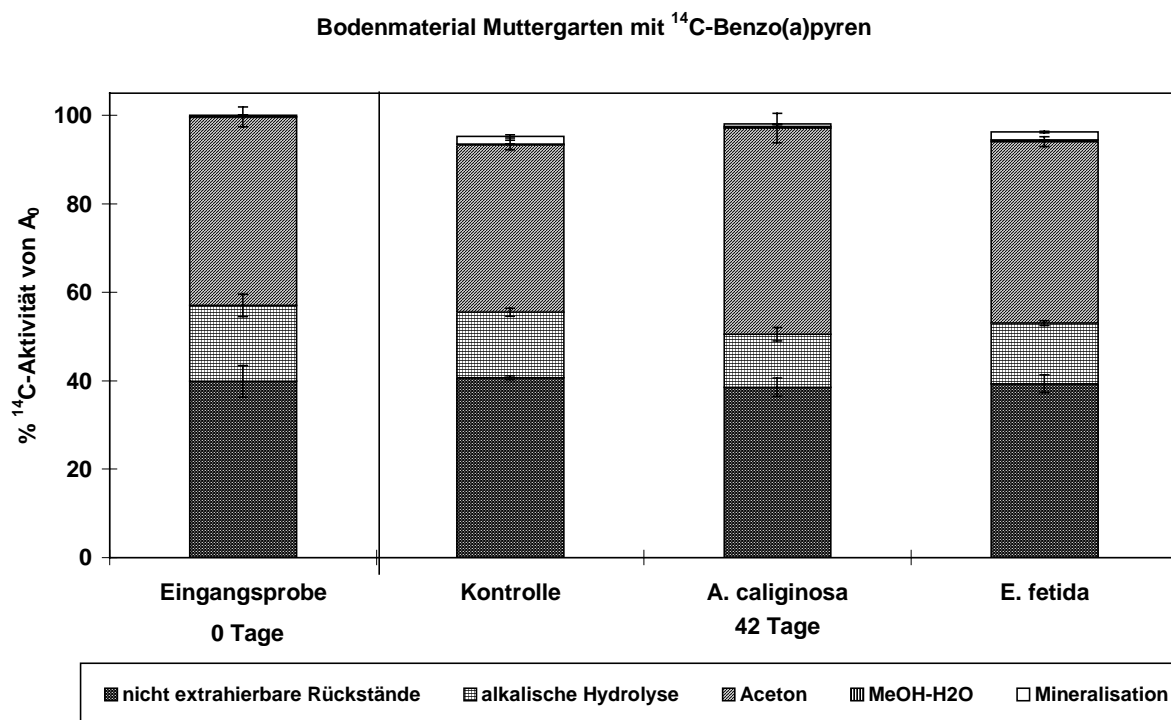


**Abb. 3.21:**  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsverteilung der extrahierbaren und nicht-extrahierbaren Fraktionen der Versuchsansätze mit dem Bodenmaterial Wülknitz mit Rückständen aus  $^{14}\text{C}$ -Pyren vor und nach 42-tägiger Inkubation.

**Modellbodenmaterial Muttergarten mit Rückständen aus  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren**

Der wässrig-methanolisch extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil war auch in allen Versuchsvarianten mit dem Bodenmaterial Muttergarten mit  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren-Rückständen äußerst gering und konnte durch die den Einsatz der Regenwürmer nicht gesteigert werden ( $<0,4\%$  von  $A_0$ ). Zu Versuchsbeginn betrug der Aceton-extrahierbare Anteil  $42,7\%$  der Gesamtaktivität. In der Kontrolle wurde nach 42 Tagen in dieser Fraktion  $37,8\%$  detektiert. In den Versuchsansätzen, die mit *A. caliginosa* inkubiert wurden, betrug der mittlere Aceton-extrahierbare Anteil  $46,6\%$  von  $A_0$ . (vgl. Abb. 3.22). Die Inkubation mit *E. fetida* hatte keinen Einfluss auf den Aceton-extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil ( $41\%$  von  $A_0$ ). Der alkalisch-hydrolysierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil veränderten sich während die 42-tägigen Inkubation nur unwesentlich und betrug zu Versuchsbeginn  $17\%$  von  $A_0$ . In den Kontroll-Ansätzen und den Ansätzen, die mit *E. fetida* inkubiert wurden, verhielten sich die  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten sehr ähnlich und nahmen Werte zwischen  $13,2$  und  $15,8\%$  von  $A_0$  an. Der mittlere alkalisch-hydrolysierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil der Versuchsansätze, die mit *A. caliginosa* inkubiert wurden, war etwas niedriger ( $12\%$  von  $A_0$ ), was auf den erhöhten Aceton-extrahierbaren Anteil in diesen Ansätzen zurück geführt wurde. In Abb. 3.22 wird deutlich, dass die Zunahme des Aceton-extrahierbaren Anteils in den Versuchsansätzen, die mit *A. caliginosa* inkubiert wurden, durch die Abnahme des Anteils der alkalischen Hydrolyse kompensiert wurde. In der Summe blieben diese beiden Anteile in allen Versuchsvarianten nach 42-tägigen Inkubationszeit annähernd unverändert.

Auch die Fraktion der nicht-extrahierbaren Rückstände veränderte sich während der 42-tägigen Inkubation mit *A. caliginosa* bzw. *E. fetida* gegenüber der Eingangsprobe (Tag 0) bzw. den Kontroll-Ansätzen nur unwesentlich. Zu Versuchsbeginn betrug die mittlere nicht-extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivität  $39,8\%$ , nach der Inkubation betrug sie in den Kontroll-Ansätzen  $40,7\%$ , in den Ansätzen, die mit *A. caliginosa* bzw. *E. fetida* inkubiert, wurden  $38,5$  bzw.  $39,3\%$  von  $A_0$ . Die Mineralisation betrug in allen Ansätzen weniger als  $2,1\%$  der zu Versuchsbeginn ermittelten Gesamtaktivität  $A_0$ .



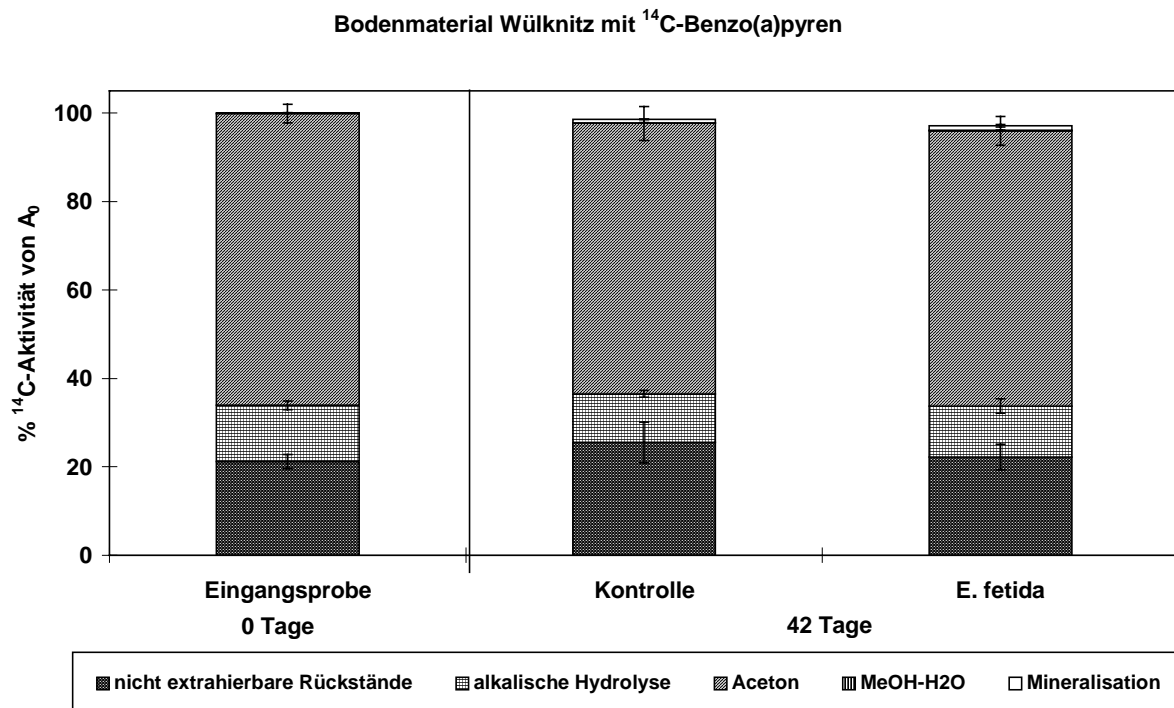
**Abb. 3.22:**  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsverteilung der extrahierbaren und nicht-extrahierbaren Fraktionen der Versuchsansätze mit dem Bodenmaterial Muttergarten mit Rückständen aus  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren vor und nach 42-tägiger Inkubation.

### Altlastbodenmaterial Wülknitz mit Rückständen aus $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren

In den Versuchen mit dem Altlastbodenmaterial Wülknitz mit  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren-Rückständen war der wässrig-methanolisch extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil im Vergleich zu den Versuchen mit dem Modellbodenmaterial mit  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren-Rückständen noch geringer und veränderte sich durch die 42-tägige Inkubation nur unwesentlich (<0,2% von  $A_0$ ). In Abb. 3.23 wird deutlich, dass der Aceton-extrahierbare Anteil den größten  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsbestandteil der Versuchsansätze mit dem Altlastbodenmaterial mit  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren-Rückständen bildete, der sich jedoch durch die Inkubation nur unwesentlich veränderte. Zu Versuchsbeginn betrug dieser Anteil im Mittel 66%, nach der Inkubation mit *E. fetida* 62,3% sowie in den Kontroll-Ansätzen 61,2% der anfänglichen Gesamtaktivität. Auch in den alkalisch-hydrolysierbaren Anteilen konnte keine gesteigerte Remobilisierung der  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten durch die Inkubation mit *E. fetida* im Vergleich zur Eingangsprobe (Tag 0) und den Kontrollproben beobachtet werden. Zu Versuchsbeginn betrug dieser mittlere  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil 12,7%, nach der Inkubation mit *E. fetida* bzw. in den Kontroll-Ansätze jeweils 11% von  $A_0$ .

Die  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten der nicht-extrahierbaren Rückstände betragen bei Versuchsbeginn im Mittel 21%, nach der Inkubation mit *E. fetida* 22% und in den Kontroll-Ansätze 25% der

anfänglichen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität, somit wurden auch hier keine wesentlichen Änderungen beobachtet. Die Mineralisation war in allen Versuchsvarianten  $<1,4\%$  der eingesetzten  $^{14}\text{C}$ -Aktivität.



**Abb. 3.23:**  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsverteilung der extrahierbaren und nicht-extrahierbaren Fraktionen der Versuchsansätze mit dem Bodenmaterial Wülknitz mit Rückständen aus  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren vor und nach 42-tägiger Inkubation

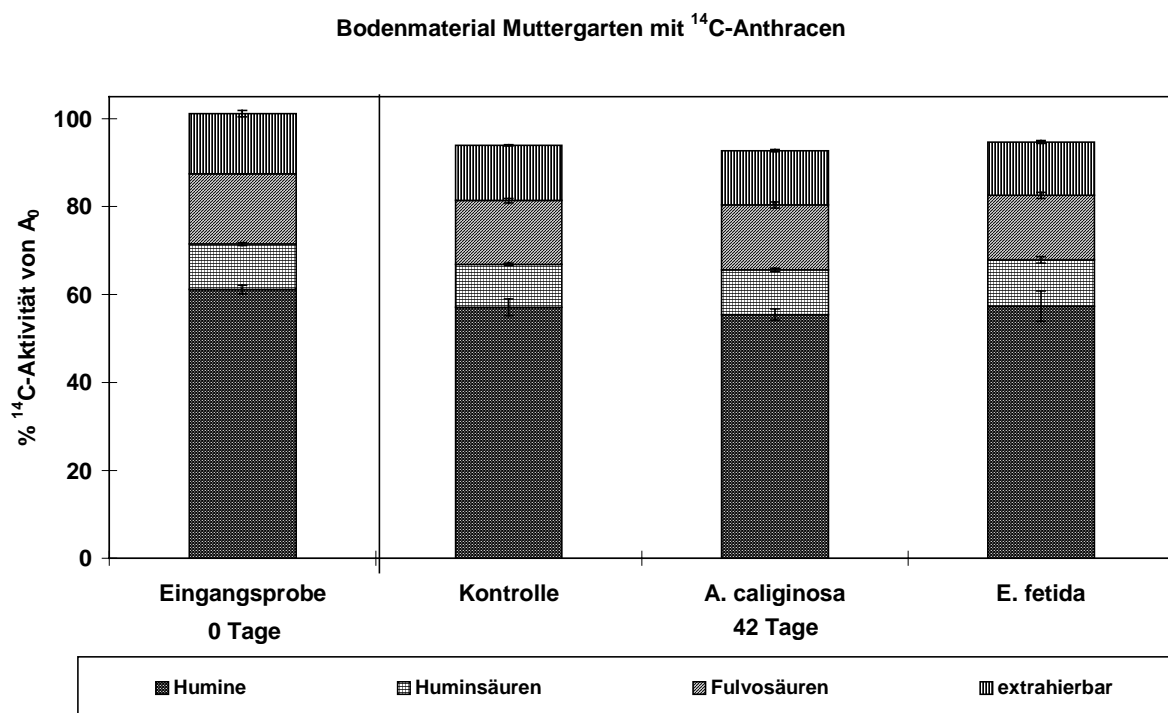
Als Fazit ist festzuhalten, dass eine Remobilisierung der nicht-extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -markierten PAK-Rückstände durch die Inkubation der Bodenmaterialien mit den Lumbriciden *A. caliginosa* und *E. fetida* im Vergleich zu den Kontroll-Ansätzen und zu den Eingangsprouben (Tag 0) nicht beobachtet werden konnte. In der Mehrzahl der untersuchten Fälle nahm die  $^{14}\text{C}$ -Aktivität der extrahierbaren Fraktion geringfügig ab. Diese Abnahme wurde auf die Mineralisation von extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -markierten PAK-Rückständen zurückgeführt. Ein  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanstieg ließ sich in den extrahierbaren Fraktionen nicht beobachten.

## Huminstoffextraktion und -fraktionierung:

### Modellbodenmaterial Muttergarten mit Rückständen aus $^{14}\text{C}$ -Anthracen

Um Verschiebungen der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität in den Huminstofffraktionen (Fulvosäuren, Huminsäuren und Humine) durch die Inkubation mit den Regenwürmern zu untersuchen, wurde mit ausgewählten Proben im Anschluss an das sequentielle dreistufige Extraktionsverfahren eine Huminstoffextraktion und -fraktionierung durchgeführt. Es wurden jeweils die Eingangsproben zu Versuchsbeginn und die Proben nach 42-tägiger Inkubation untersucht. Die  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten der verschiedenen extrahierbaren Fraktionen des dreistufigen Extraktionsverfahrens (Methanol/Wasser, Aceton, alkalische Hydrolyse) wurden in der folgenden Abb. 3.24 zusammengefasst und sind hier als extrahierbare Fraktion dargestellt.

In Abb. 3.24 sind die extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteile sowie die verschiedenen  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteile der Huminstofffraktionierung der unterschiedlichen Versuchsvarianten des Modellbodenmaterials Muttergarten mit  $^{14}\text{C}$ -Anthracen-Rückständen dargestellt. Der mittlere extrahierbare Anteil betrug zu Versuchsbeginn 13,7% der Anfangsaktivität und wurde durch die Inkubation nur unwesentlich verändert, in den Kontroll-Ansätzen nach der 42-tägigen Inkubation betrug dieser Anteil 12,6% und in den Ansätzen, die mit *A. caliginosa* bzw. *E. fetida* inkubiert wurden, jeweils 12% von  $A_0$ . Die Fraktion der Fulvosäuren beinhaltete in der Eingangsprobe (Tag 0) 16% der Gesamtaktivität. Auch in dieser Fraktion wurde durch die Inkubation keine wesentlichen Änderungen festgestellt. In den Kontroll-Ansätzen und in den Versuchsansätzen, die mit *A. caliginosa* bzw. *E. fetida* inkubiert wurden, betrug dieser  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil jeweils 15% von  $A_0$ . Auch die Fraktion der Huminsäuren zeigte durch die Inkubation keine erkennbaren Veränderungen, die mittleren  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten sämtlicher Versuchsvarianten betragen zwischen 9,8 und 10,5% der anfänglichen Gesamtaktivität. Aus Abb. 3.24 ist ersichtlich, dass die Humin-Fraktion den größten Bestandteil der zu Versuchsbeginn ermittelten Gesamtaktivität bildete. In der Eingangsprobe betrug dieser Anteil 61% von  $A_0$ . Durch die Inkubation nahm die  $^{14}\text{C}$ -Aktivität in der Humin-Fraktion in den Kontroll-Ansätze um 4%-Punkte ab. In den Versuchen mit *A. caliginosa* bzw. *E. fetida* konnte ebenfalls eine abnehmende Tendenz der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität in der Humin-Fraktion festgestellt werden (5,7 bzw. 3,8%-Punkte von  $A_0$ ). Aus Abb. 3.24 geht hervor, dass der extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil sowie die Anteile der Humin- und Fulvosäuren an der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität durch die verschiedenen Inkubationsvarianten nur unwesentlich beeinflusst wurden. Eine mittlere Abnahme um etwa 4,5%-Punkte konnte nur in der Fraktion der Humine verzeichnet werden.



**Abb. 3.24:**  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsverteilung im Modellbodenmaterial Muttergarten mit Rückständen aus  $^{14}\text{C}$ -Anthracen in der extrahierbaren Fraktion (Methanol/Wasser, Aceton, alkalische Hydrolyse) und in den Fraktionen der Huminstoffextraktion vor und nach der 42-tägigen Inkubation, bezogen auf  $A_0$ .

Durch die Huminstoffextraktion und -fraktionierung konnte gezeigt werden, dass keine wesentlichen Verschiebungen der  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten in den Fraktionen Fulvo- und Huminsäuren sowie in der Humin-Fraktion während der 42-tägigen Regenwurmbehandlung auftraten.

Die Huminstofffraktionierung wurde noch mit weiteren ausgewählten Bodenproben durchgeführt (Bodenmaterial Wülknitz mit  $^{14}\text{C}$ -Anthracen-Rückständen, Bodenmaterial Wülknitz mit  $^{14}\text{C}$ -Pyren-Rückständen, Bodenmaterial Wülknitz mit  $^{14}\text{C}$ -Benzo(a)pyren-Rückständen), es konnten aber auch in diesen Versuchen keine wesentlichen Verschiebungen der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität innerhalb der unterschiedlichen Huminstofffraktionen (Fulvo-, Huminsäure, Humine) festgestellt werden. Die Fraktion der Humine bildet auch in diesen Versuchen den größten Bestandteil der nicht-extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -Aktivität.

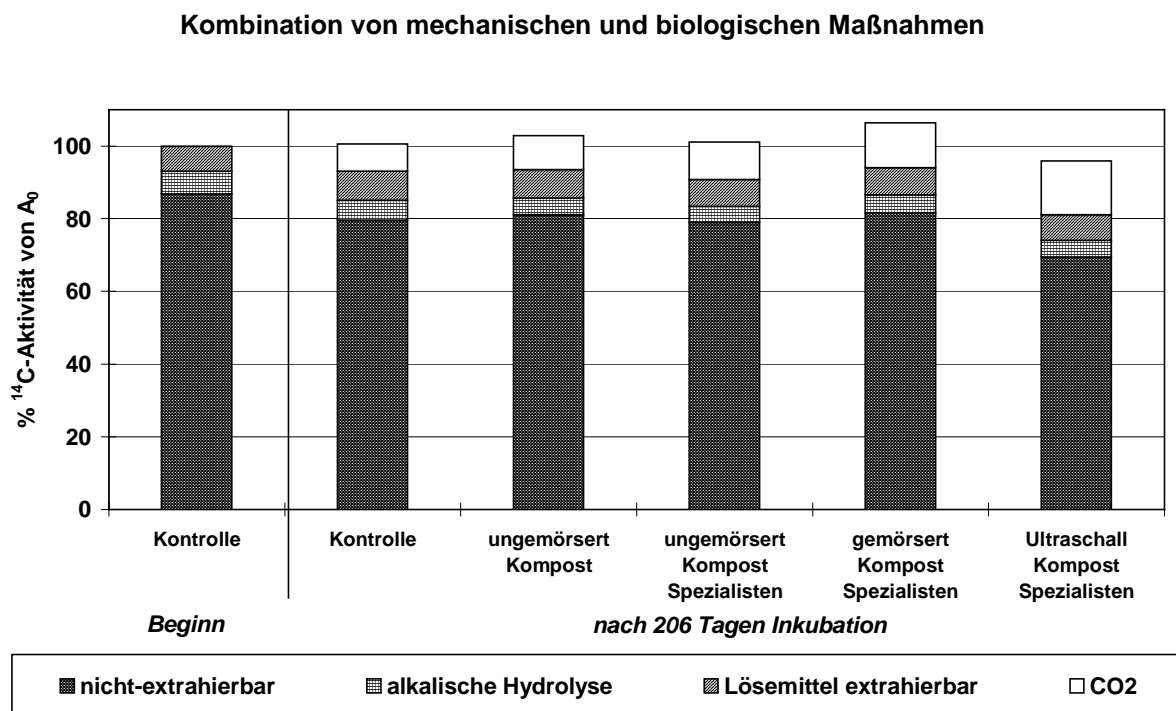
### 3.3.4 Kombination von mechanischen und biologischen Remobilisierungsmaßnahmen

In dem vorangegangenen Forschungsprojekt „Untersuchung und Bildung der Langzeitstabilität von humifizierten PAK in biologisch behandelten Recyclingböden“ (FKZ 1480937) wurden die Maßnahmen zur Remobilisierung von nicht-extrahierbaren Rückständen jeweils als Einzelfaktoren untersucht, um so die effektivsten Maßnahmen auszuwählen. Um mögliche synergistische Effekte mit einzubeziehen wurden diese Maßnahmen nun in Kombination verfolgt. In den vorherigen Untersuchungen hatte sich herausgestellt, dass die mechanische Aggregatzerstörung durch Mörsern oder durch Behandlung mit einer Ultraschall-Sonde zwar nicht zu einer Remobilisierung der nicht-extrahierbaren Rückstände führte, jedoch den wässrig extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil steigerte. Daraus leitete sich die Fragestellung ab, ob eine Kombination aus mechanischer Aggregatzerstörung und nachfolgender mikrobiologischer Behandlung zu einer Freisetzung von zuvor nicht-extrahierbaren Rückständen führt. Als mechanische Behandlung wurde das Bodenmaterial entweder gemörsert oder mit einer Ultraschall-Sonde behandelt. Neben der Aggregatzerstörung wurden in diesen Untersuchungen verschiedene Kombinationen von biologischen Behandlungsmaßnahmen untersucht. Zum einen wurde das Bodenmaterial un-supplementiert als Kontrolle inkubiert, zum anderen mit der Zugabe von Kompost, als weitere Variante wurde das Bodenmaterial mit der Zugabe von Kompost und einem Mikroorganismen-Cocktail inkubiert. Bei den Mikroorganismen handelte es sich um sogenannte Abbauspezialisten und zwar *Mycobacterium sp.* VF1, *Mycobacterium sp.* KA1, *Sphingomonas paucimobilis* BA2 und *Gordona sp.* BP9, die alle nachweislich zum Abbau von PAK befähigt sind (Kästner et al. 1991). Nach Vorkultivierung und Anzucht wurden diese Mikroorganismen in einer Zellzahl von  $0,25 \cdot 10^6/\text{g}$  TG Boden zugegeben.

Die erste Versuchsreihe wurden mit dem Modellbodenmaterial Muttergarten (87% nicht-extrahierbare Rückstände) und dem Altlastbdodenmaterial Wülknitz (82% nicht-extrahierbare Rückstände) durchgeführt (vgl. Abb. 3.25 und. Abb. 3.26).

Im Modellbodenmaterial Muttergarten bewirkte die Kombination dieser drastischen Behandlungsmaßnahmen insgesamt keine Freisetzung von zuvor nicht-extrahierbaren Rückständen. Mit steigender Behandlungsintensität nahm die Mineralisation in dem Bodenmaterial Muttergarten geringfügig zu. In der unbehandelten Kontrolle wurde während der 206-tägigen Inkubation 7% mineralisiert, in der Kompost supplementierten Versuchsvariante waren es 9%, in der Variante mit Zugabe von Kompost und Mikroorganismen betrug die Mineralisation 10%, in der gemörserten Variante mit Zugabe von

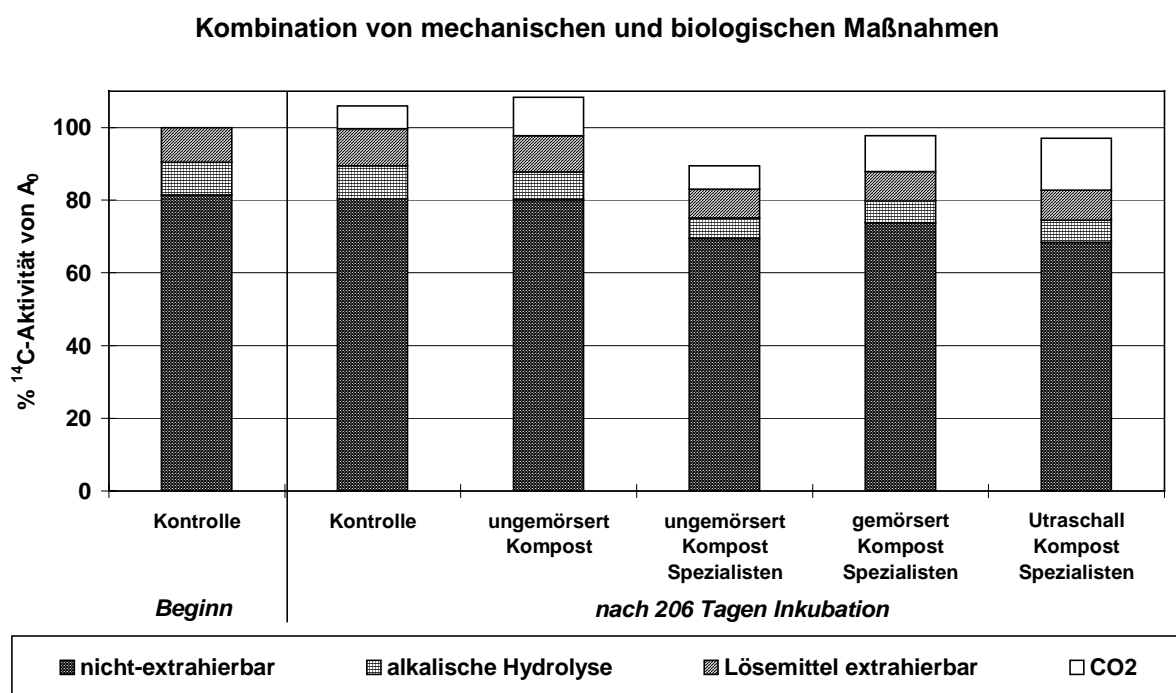
Kompost und Mikroorganismen wurden 12% detektiert und die höchste Mineralisation von 15% wurde in dem Ultraschall behandelten Bodenmaterial, dem Kompost und die Abbauspezialisten zugesetzt waren, ermittelt. Der Lösemittel-extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil sowie der alkalisch-hydrolysierbare Anteil veränderten sich durch die Anwendung der kombinierten Behandlungsmaßnahmen nur unwesentlich (7-8% bzw. 4-6%). Die Fraktion der nicht-extrahierbaren Rückstände nahm zwar während der Inkubation in allen Versuchsvarianten leicht ab, doch diese Abnahme wurde nicht durch die Behandlungsmaßnahmen bedingt. Sie war in den behandelten Bodenmaterialien vergleichbar wie in der unbehandelten Kontrolle und betrug ca. 7%-Punkte. Allein in der Ultraschall behandelten Variante mit Kompost und Mikroorganismen sank der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände nach der Inkubation um 17%-Punkte, jedoch erfolgte in keiner der untersuchten Varianten eine Freisetzung von zuvor nicht-extrahierbarer  $^{14}\text{C}$ -Aktivität in eine extrahierbare Fraktion (vgl. Abb. 3.25).



**Abb. 3.25:** Verbleib der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Modellbodenmaterial Muttergarten mit nicht-extrahierbaren Rückständen aus  $^{14}\text{C}$ -Anthracen nach 206-tägiger Inkubation bei Kombination unterschiedlicher Maßnahmen im Vergleich zum Ausgangsmaterial zu Versuchsbeginn.

In den Versuchen mit dem Altlastbodenmaterial Wülknitz war die Mineralisation in den Versuchsvarianten vergleichbar und betrug zwischen 6 und 10%. In der Ultraschall behandelten Variante mit Kompost und Mikroorganismen betrug die Mineralisation allerdings

14%. Wie in den Versuchen mit dem Bodenmaterial Muttergarten wurde der Lösemittel-extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil sowie der alkalisch hydrolysierbare Anteil durch die kombinierten Remobilisierungsmaßnahmen nur unwesentlich beeinflusst (8-10% bzw. 6-8% von  $A_0$ ). Die Fraktion der nicht-extrahierbaren Rückstände zeigte - wie auch in den Versuchen mit dem Bodenmaterial Muttergarten - Abnahmen, in der mit Kompost und Abbauspezialisten supplementierten Variante 12%-Punkte und in der Ultraschall behandelten Variante mit Kompost und Mikroorganismen 13%-Punkte. Eine Freisetzung von zuvor nicht-extrahierbarer  $^{14}\text{C}$ -Aktivität in eine extrahierbare bzw. (leichter)verfügbare Fraktion fand jedoch in keinem der untersuchten Fälle statt (vgl. Abb. 3.26).

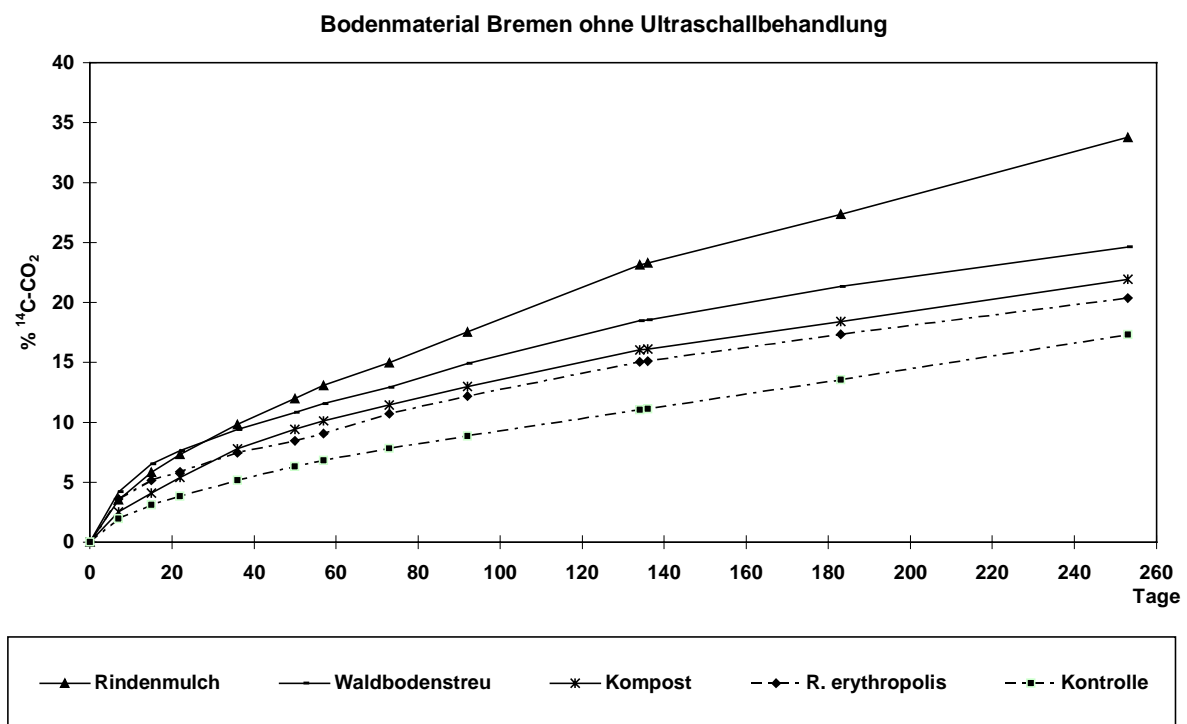


**Abb. 3.26:** Verbleib der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Altlastbodenmaterial Wülknitz mit nicht-extrahierbaren Rückständen aus  $^{14}\text{C}$ -Anthracen nach 206-tägiger Inkubation bei Kombination unterschiedlicher Maßnahmen im Vergleich zum Ausgangsmaterial zu Versuchsbeginn.

In weiteren Versuchen wurden die kombinierten mechanischen und biologischen Remobilisierungsmaßnahmen auf das humose Altlastbodenmaterial Bremen mit nicht-extrahierbaren Rückständen aus  $^{14}\text{C}$ -Anthracen ausgedehnt. Als effektivste mechanische Remobilisierungsmaßnahme erwies sich in den oben beschriebenen Versuchen die Behandlung des Bodenmaterials mit einer Ultraschall-Sonde. Diese mechanische Behandlungsmaßnahme wurde in Kombination mit verschiedenen biologischen Remobilisierungsmaßnahmen wie Zugabe von Kompost, Rindenmulch, Waldbodenstreu sowie Zugabe des Actinomyceten *Rhodococcus erythropolis* untersucht. Dabei stellte sich die Frage, ob die

Kombination dieser mechanischen und biologischen Remobilisierungsmaßnahmen zu einer Freisetzung der zuvor nicht-extrahierbaren Rückstände aus der humosen Bodenmatrix führt. Der Verlauf der Mineralisation der  $^{14}\text{C}$ -Anthracen-Rückstände während der 253-tägigen Inkubation mit bzw. ohne Ultraschall-Behandlung ist in den nachfolgenden Abb. 3.27 und 3.28 dargestellt.

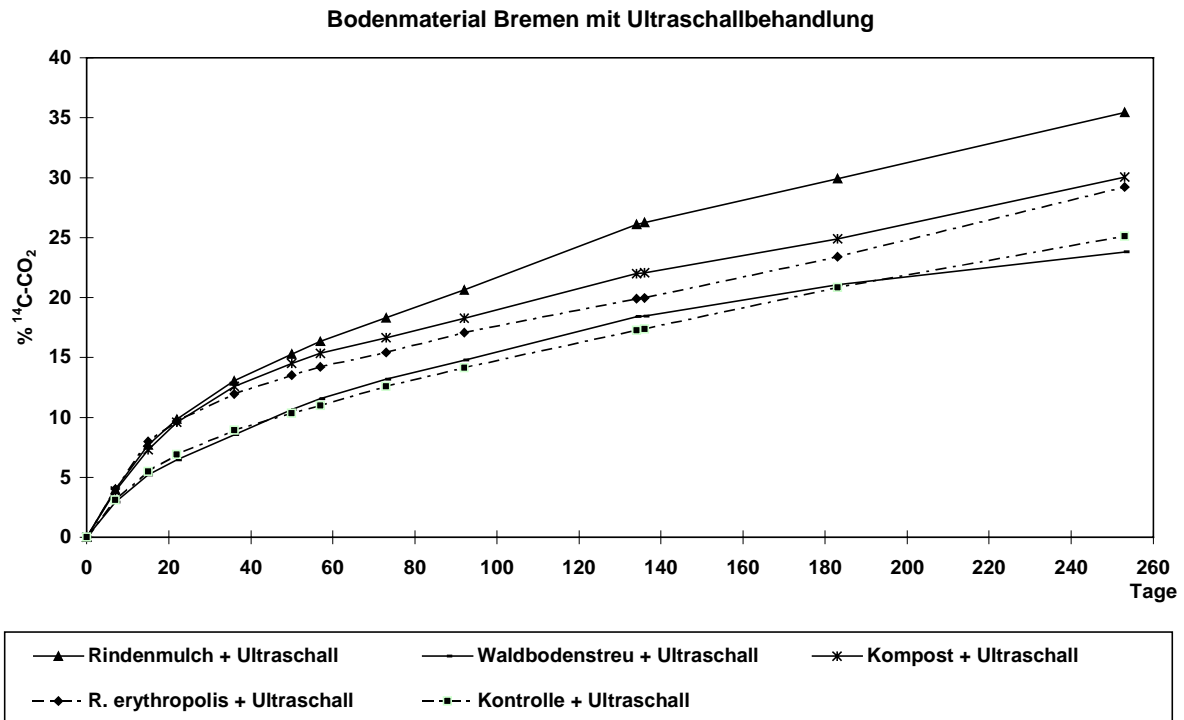
Aus Abb. 3.27 ist ersichtlich, dass die Zugabe der Supplemente die Mineralisation von  $^{14}\text{C}$ -Anthracen z.T. erheblich steigerte. In der unsupplementierten Kontrolle wurden nach 253-tägiger Inkubation nur 17% mineralisiert, die Zugabe des Actinomyceten *Rhodococcus erythropolis* ermöglichte eine Mineralisation von 20%, durch die Supplementierung mit Kompost wurden 22% mineralisiert und durch die Zugabe von Waldbodenstreu konnten 25% der anfänglichen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität mineralisiert werden. Die höchste Mineralisation zeigten die Versuchsansätze mit Zugabe von Rindenmulch mit 34% von  $A_0$ .



**Abb. 3.27:** Mineralisation von  $^{14}\text{C}$ -Anthracen im Altlastbodenmaterial Bremen bei Zugabe unterschiedlicher Supplemente als Remobilisierungsmaßnahmen während der 253-tägigen Inkubation.

Die Ultraschall-Behandlung des Altlastbodenmaterials Bremen konnte in der unsupplementierten Kontrolle, sowie in der Variante mit Kompost und in den Versuchsansätze mit der Zugabe von *Rhodococcus erythropolis* die Mineralisation um 8-9%-Punkte während der 253-tägigen Inkubation steigern (vgl. Abb. 3.27 und 3.28). In den

Versuchsvarianten mit den Supplemente Rindenmulch bzw. Waldbodenstreu änderte sich die Mineralisation durch die zusätzliche mechanische Behandlung mit der Ultraschall-Sonde während der Inkubation nur unwesentlich (1%-Punkt).



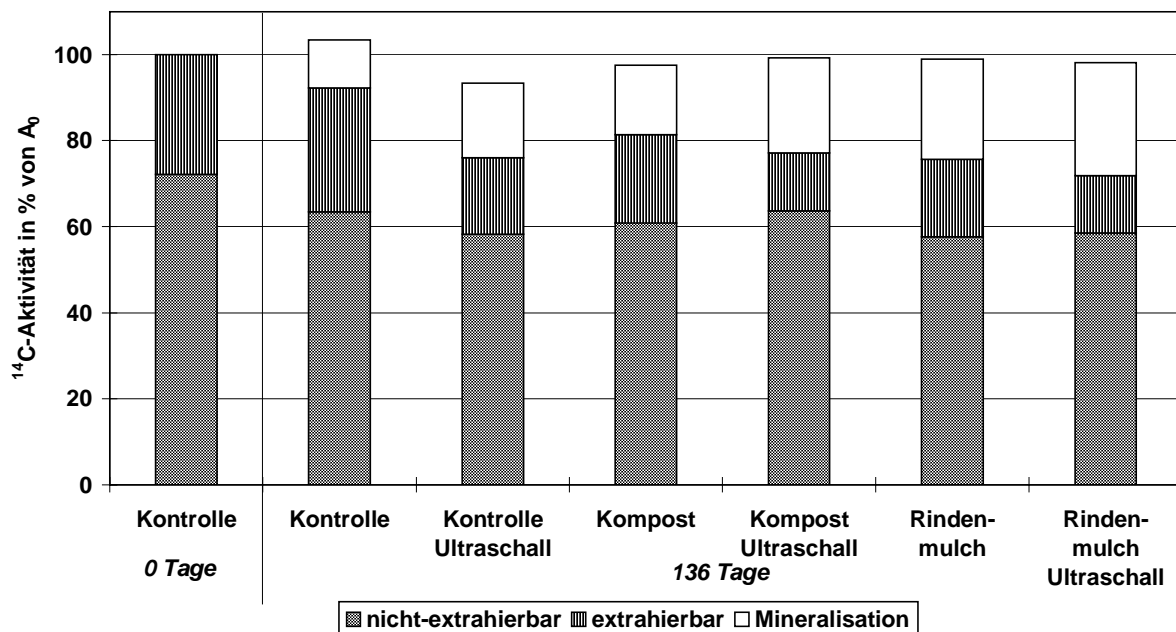
**Abb. 3.28:** Mineralisation von <sup>14</sup>C-Anthracen im Altlastboden Bremen bei Kombination mechanischer und biologischer Remobilisierungsmaßnahmen während der 253-tägigen Inkubation.

Um den Verbleib der <sup>14</sup>C-Aktivität im Altlastbodenmaterial Bremen bei Kombination mechanischer und verschiedener biologischer Remobilisierungsmaßnahmen während der Inkubation zu ermitteln, wurden nach 136-tägiger Inkubation Bodenproben entnommen und untersucht (vgl. Abb. 3.29 und 3.30). Während der kombinierten mechanischen und biologischen Behandlung nahmen die nicht-extrahierbaren Rückstände zwar in allen Versuchsansätzen, einschließlich der Kontrolle leicht ab, was aber nicht auf die kombinierten Remobilisierungsmaßnahmen sondern auf die Mineralisation von <sup>14</sup>C-Anthracen-Rückständen zurückgeführt wurde. Nach 136-tägiger Inkubation betrug der Anteil der nicht-extrahierbaren Rückstände im unbehandelten Kontrollansatz 63% der anfänglichen <sup>14</sup>C-Aktivität im Gegensatz zur Ultraschall-behandelten Kontrolle mit 58%. Im Kompost-supplementiert Versuchsansatz betrug die nicht-extrahierbare Fraktion 61% im Gegensatz zur Ultraschall-behandelten Kompost-Variante mit 64%. In der Versuchsvariante mit Rindenmulch wurden nach der 136-tägigen Inkubation 58% der eingesetzten <sup>14</sup>C-Aktivität als nicht-extrahierbare Fraktion detektiert. Die mechanische Behandlung mit der Ultraschall-

Sonde vermochten den nicht-extrahierbaren Anteil in der Rindenmulch-supplementierten Variante nicht zu ändern. Die biologische Behandlung mit Waldbodenstreu ergab im Vergleich zum unbehandelten Kontrollansatz keine Veränderung des nicht-extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanteil (63% von  $A_0$ ), auch in diesem Fall erbrachte die zusätzliche Ultraschall-Behandlung keine weitere  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsabnahme. Durch die Zugabe von *Rhodococcus erythropolis* sank der nicht-extrahierbare Anteil nach 136-tägiger Inkubation auf 56% der anfänglichen  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Gegensatz zu 63% in der ultraschall-behandelten *Rhodococcus erythropolis*-Variante.

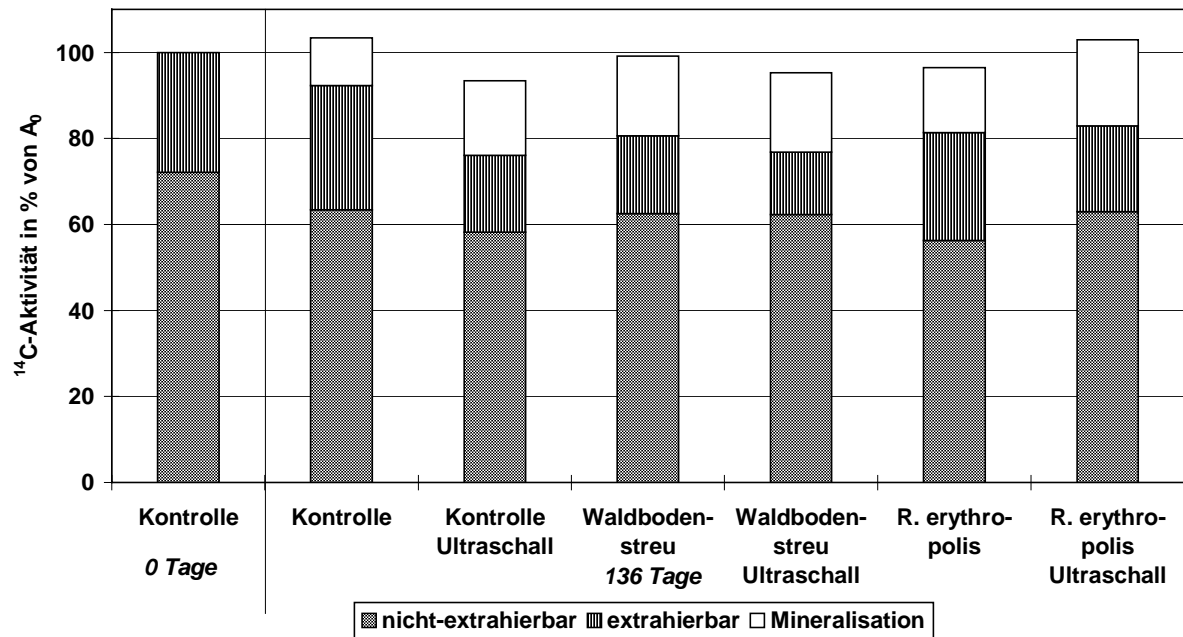
Ein  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsanstieg in der extrahierbaren Fraktion konnte durch die kombinierten mechanischen und biologischen Behandlungen nicht festgestellt werden, im Gegenteil es traten  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsabnahmen in der extrahierbaren Fraktion zwischen 3 und 15%-Punkten auf, die auf die Mineralisierung des extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -Anthracens zurückgeführt wurden. Es erfolgt jedoch in keinem Fall eine Freisetzung der zuvor nicht-extrahierbaren Rückstände in die extrahierbare Fraktion (vgl. Abb. 3.29 und 3.30).

#### Kombination von mechanischen und biologischen Maßnahmen



**Abb. 3.29:** Verbleib der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Bodenmaterial Bremen mit nicht-extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -Anthracen-Rückständen nach 136-tägiger Inkubation bei Kombination unterschiedlicher Maßnahmen im Vergleich zum Ausgangsmaterial zu Versuchsbeginn.

## Kombination von mechanischen und biologischen Maßnahmen



**Abb. 3.30:** Verbleib der  $^{14}\text{C}$ -Aktivität im Bodenmaterial Bremen mit nicht-extrahierbaren  $^{14}\text{C}$ -Anthracen-Rückständen nach 136-tägiger Inkubation bei Kombination unterschiedlicher Maßnahmen im Vergleich zum Ausgangsmaterial zu Versuchsbeginn.

## **4. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen**

Die im TP 5.1 durchgeführten Untersuchungen konnten im Ergebnis die bereits im vorangegangenen Teilprojekt 2.6 ermittelten Befunde zur Langzeitstabilität von humifizierten PAK zunächst bestätigen und diese darüberhinaus für weitere Parameter und Risikofaktoren auch weiter absichern. In den folgenden 3 Abschnitten werden die wichtigsten Ergebnisse der hier durchgeführten experimentellen Untersuchungen noch einmal zusammengefasst (4.1 und 4.2) und die sich daraus ergebenden Schlussfolgerungen vorgestellt.

### **4.1 Einflussfaktoren für die Bildung von nicht-extrahierbaren <sup>14</sup>C-PAK-Rückständen**

Die Untersuchungen zum Einfluss des Gehalts an organischer Bindematrix im Boden haben gezeigt, dass Bodenmaterial mit hohem organischen Kohlenstoffgehalt ( $C_{org}$ -Gehalt) im Vergleich zu Bodenmaterialien mit niedrigem  $C_{org}$ -Gehalt nicht notwendig zu einer Erhöhung des Anteils an nicht-extrahierbaren Rückständen führt. Die Bildung nicht-extrahierbarer PAK-Rückstände in Böden mit typisch durchschnittlichen Kohlenstoffgehalten ist demnach nicht durch einen mengenmäßig zu geringen Anteil organischer Substanz (organischer Bindematrix) limitiert. Die biologische Aktivität eines Bodenmaterials oder Supplements war allerdings die Voraussetzung für die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen im Boden. In Steril-Versuchen wurde keine nennenswerte Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen festgestellt, die über die spontane Einbindung (direkt 1-2 Stunden nach der Applikation) hinausging. Die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen konnte in der Mehrzahl der untersuchten Fälle auch durch die Kompost-Zugabe nicht gesteigert werden. Die Zugabe von Kompost konnte im Boden viel mehr primär die Mineralisation von <sup>14</sup>C-PAK, nicht jedoch die PAK-Humifizierung steigern. In geringem Umfang wurden durch die Kompostzugabe auch zuvor nicht-extrahierbare Rückstände nach einer solchen Supplement-Zugabe nun mineralisiert. Bislang ist noch kein Supplement gefunden worden, dass primär die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen (Humifizierung) fördert, ohne gleichzeitig die Mineralisation zu steigern. Der Einfluss der stark Organik-haltigen Supplemente (Kompost, Stroh..) ist somit vorwiegend auf ihre mikrobielle Aktivität und weniger auf die Bindekapazität der Supplemente zurückzuführen.

Die Mineralisation von PAK und die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen sind im Boden gleichermaßen vom Vorkommen einer mikrobiellen Aktivität abhängig. So konnte in der Regel immer dann, wenn die Mineralisation eingesetzt hatte, auch eine Zunahme der nicht-extrahierbaren Rückstände festgestellt werden. War die Mineralisation der PAK gehemmt (z.B. bei Benzo(a)pyren im Altlastbodenmaterial Bremen ohne Kompost-Zugabe), fand auch keine oder nur eine sehr geringfügige Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen statt. Dies erlaubt den Schluss, dass die Festlegung von PAK nicht allein eine Folge geringer Wasserlöslichkeit und hoher Sorptivität ist, sondern dass die metabolische Aktivierung der PAK durch einen partiellen Abbau für die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände entscheidend ist. Mineralisation und Humifizierung können dabei auch als konkurrierende Reaktionen auftreten. So ist für PAK, die schnell und in hohem Ausmaß mineralisiert werden (wie z.B. Naphthalin), der Anteil an gebildeten nicht-extrahierbaren Rückständen in der Regel gering.

#### **4.2 Remobilisierungsversuche zur Überprüfung der Langzeitstabilität von nicht-extrahierbaren <sup>14</sup>C-PAK-Rückständen**

Die bisher für einzelne Stressoren getrennt durchgeführten Untersuchungen zum potentiellen Freisetzungseffekt wurden nun um Untersuchungen hinsichtlich der Folgen einer gleichzeitigen Einwirkung verschiedener biologischer und mechanischer Remobilisierungsmaßnahmen (Mörsern, Ultraschall-Behandlung, Zugabe von Abbauspezialisten, Kompost, Rindenmulch, Waldbodenstreu, *Rhodococcus erythropolis*) ergänzt. Dabei zeigte sich, dass im Verlauf der Inkubation zwar in geringem Umfang eine Abnahme der nicht-extrahierbaren <sup>14</sup>C-Aktivität aufgrund einsetzender Mineralisation zu verzeichnen war, ein Anstieg der organisch extrahierbaren <sup>14</sup>C-Fraktion konnte jedoch in keiner der untersuchten Varianten beobachtet werden. Da auch die gleichzeitige Einwirkung potentieller ökologischer Stressfaktoren somit nicht zu einer Remobilisierung der ursprünglichen Schadstoffe oder ihrer Metabolite führt, bestätigt dies frühere Befunde, wonach die Schadstoffe kaum noch in ihrer ursprünglichen Form wieder aus dem Boden freigesetzt werden können.

Allerdings zeigte sich auch in den hier mit stark humosem Bodenmaterial durchgeführten Untersuchungen zur Wirkung von Kationen-komplexierenden Stoffen wie z.B. EDTA, dass die hierdurch induzierte Auflösung von Bodenaggregaten auch in einem stärker org C-haltigem Altlastbodenmaterial (Bremen-Boden) zu einer deutlichen Freisetzung von <sup>14</sup>C-Aktivität führen kann (hier um bis zu 10%-Punkte). Bei der freigesetzten <sup>14</sup>C-Aktivität handelt es sich aber nicht um originäre PAK, sondern nach bisherigen Erkenntnissen um

makromolekulare, lösliche organische Substanz (DOM), in der schadstoffbürtige  $^{14}\text{C}$ -Aktivität eingebunden vorliegt.

Ein ähnliches Ergebnis wurde auch in Experimenten erzielt, in denen entweder der Einfluss von saurem Regen simuliert wurde oder in denen die durch Ultraschall aufgebrochenen Bodenaggregate über längere Zeiträume wässrig eluiert wurden. Auch diese wässrigen Elutionen führte zu einer messbaren Mobilisierung von  $^{14}\text{C}$ -Aktivität, die aber ebenfalls primär an miteluierte gelöste organische Bodenbestandteile (DOM) gebunden war. Die Fraktion der nicht-extrahierbaren Rückstände blieb jedoch durch die sauren Elutionen unberührt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Einfluss von Organismen der Bodenfauna (Regenwürmer) belegen, dass der Einfluss der Makroinvertebraten auf nicht-extrahierbare PAK-Rückstände vernachlässigbar ist. Der nicht-extrahierbare Anteil nahm während der Inkubation mit den Regenwürmern generell nur in sehr geringem Maße und dies primär aufgrund von Mineralisation ab. Eine Freisetzung in eine (leichter-)extrahierbare Fraktion konnte in keiner der untersuchten Versuchs-Varianten festgestellt werden. Ferner konnte durch die Huminstoffextraktion und -fraktionierung gezeigt werden, dass während der Regenwurmbehandlung gegenüber der Kontrolle keine wesentlichen Verschiebungen der  $^{14}\text{C}$ -Aktivitätsverteilung zwischen den Fraktionen Fulvosäuren, Huminsäuren oder Huminstoffe auftraten.

### **4.3 Schlussfolgerungen:**

Aus den Ergebnissen der biologischen, physikalischen und chemischen Remobilisierungsmaßnahmen lässt sich zusammenfassend festhalten, dass nicht-extrahierbare  $^{14}\text{C}$ -PAK-Rückstände, die aufgrund einer biologischen Behandlung im Boden festgelegt worden sind, sehr stabil in der Matrix vorliegen und durch die angewendeten „worst-case“ Behandlungen nicht wieder als originäre Schadstoff-Verbindung mobilisierbar sind.

Aus der Vielzahl der im Teilverbund angewandten Remobilisierungsmaßnahmen lässt sich nach den bisher gemachten Erfahrungen ein Methodenpaket zusammenstellen, mit dem auch in Zukunft biologisch sanierte Bodenmaterialien mit immobilisierten Schadstoffen(-derivaten) zuverlässig untersucht und bewertet werden können. In dem folgenden Vorschlag wurden dabei die effizientesten und zugleich repräsentativsten biologischen, physikalischen und chemischen Remobilisierungstests (Stressorsimulationen) ausgewählt:

a) Test zur Simulation biologischer Freisetzungsprozesse:

- Inkubation mit Huminstoff-abbauenden Mikroorganismen

b) Tests zur Simulation physikalischer Freisetzungsprozesse:

- Zerstörung der Aggregatstruktur der Bodenproben durch Ultraschall-Behandlung, Mörsern oder Zermahlen mittels Kugelmühle
- Klimasimulation durch Frost/Tau-Zyklen

c) Tests zur Simulation chemischer Freisetzungsprozesse:

- Zugabe Kationen-komplexierender Substanzen (EDTA)
- pH-Änderung durch Simulation des Einflusses von saurem Regen

Details zur Durchführung dieser Tests sind in diesem Bericht oder auch in dem Leitfaden zur biologischen Bodensanierung beschrieben.

Die im Rahmen dieses Teilprojekts und im Teilverbund bisher erarbeiteten Befunde zum Thema Langzeitstabilität von humifizierten Schadstoffrückständen waren so vergleichbar und reproduzierbar, dass auf dieser Erfahrungsbasis auch ein Vorschlag zum Umgang mit Bodensanierungsmaterialien mit humifizierten, nicht-extrahierbaren Rückständen gemacht werden kann:

1. Der extrahierbare Schadstoffanteil (z.B. MKW, PAK, TNT) muss durch biologische Vorbehandlung auf Werte unterhalb des jeweiligen Grenzwertes der Kontaminanten abgereichert sein. Bei der Festlegung dieser "Extraktions-Grenzwerte" sollten aber auch neuere Befunde zur Bioverfügbarkeit Berücksichtigung finden.
2. Die Anwendung der oben empfohlenen Remobilisierungstests darf nicht zu einer Freisetzung der ursprünglichen Schadstoffe oder ihrer Metabolite führen (messbar als erhöhte Schadstoff/Metabolit-Konzentration im Extrakt oder Eluat)
3. Durch Einsatz einer validierten ökotoxikologischen Testbatterie muss gezeigt werden, dass das sanierte Bodenmaterial sich nicht maßgeblich von einem sauberen Referenzboden des Standorts unterscheidet

Wenn nach Anwendung der oben aufgeführten Kriterien keine Freisetzung von Schadstoffen oder deren Metaboliten im Eluat oder Extrakt festzustellen ist oder sich diese im Bereich natürlicher Hintergrundwerte bewegt, ist von einer nachhaltigen Detoxifikation des sanierten Bodenmaterials, entweder durch Mineralisation oder durch die Bildung von nicht-mobilisierbaren Rückständen auszugehen. Eine Freisetzung als originäre

Schadstoffverbindung ist nach derzeitigem Kenntnisstand dann auch nach langen Zeiträumen nicht mehr zu erwarten.

Das Bodenmaterial sollte dann vorzugsweise am Standort wieder eingebaut werden, wobei allerdings eine Ausbringung auf besonders sensiblen Flächen wie in Wasserschutzgebieten oder der Einbau auf Kinderspielplätzen, Sportplätzen, Schulhöfen, Klein- und Hausgärten sowie die Verbringung auf landwirtschaftlich genutzten Flächen aus Vorsichtsgründen dennoch vermieden werden sollte. Alternative Verwertungsmöglichkeiten für derartig sanierte Bodenmaterialien wären z.B. der Einsatz als Füllmaterial beim Straßenbau, bei Lärmschutzwällen, für den Tagebau oder als Abdeckmaterial von Deponien [BBoschV, LAGA].

Wird bei den Remobilisierungstests hingegen eine Freisetzung zuvor festgelegter Schadstoffe festgestellt (Zunahme der extrahierbaren Schadstoffe nach Anwendung der Remobilisierungsmaßnahmen), die den Sanierungszielwert übersteigt, ist die Festlegung als nicht stabil anzusehen und das Bodenmaterial bezüglich einer Gefahrenabschätzung als kritisch und bedenklich zu bewerten. Dies gilt besonders, wenn die Freisetzung der Schadstoff(-derivate) schneller abläuft als deren zu erwartender Abbau. Über die endgültige Verwendung dieses Materials wird dann im Einzelfall zu entscheiden sein.

Die Anwendbarkeit der oben vorgeschlagenen Remobilisierungstest ist für die Schadstoffe TNT und PAK bei der biologischen Bodensanierung im Teilverbund „Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen“ wissenschaftlich abgesichert worden. Sollen allerdings Aussagen zu Schadensfällen mit anderen Schadstoffen, bei denen möglicherweise mit anderen Bindungsmechanismen gerechnet werden muss, getroffen werden, ist zu empfehlen, gesondert ein ausführliches Untersuchungsprogramm (mit radioaktiv-markierten Schadstoffen zur vollständigen Bilanzierung und unter Einsatz von stabilen Isotopen sowie NMR-Spektroskopie zur Aufklärung der Bindungsart) durchzuführen. Außerdem darf auch nicht übersehen werden, dass es nach Anwendung biologischer Sanierungsverfahren oftmals nur zur Schadstoff-Abreicherung bis zu einem bestimmten Restplateau kommt und ein residualer Schadstoffanteil auch nach abgeschlossener Sanierung aufgrund mangelnder Bioverfügbarkeit immer noch extrahierbar im Boden vorliegen kann (Mahro 2000). Es wird zu untersuchen sein, inwieweit die o.a. Risikobewertungstests ggf. auch für solche Residualfraktionen einsetzbar sind.

Anhand der in diesem Forschungsvorhaben durchgeführten Remobilisierungsversuche ist deutlich geworden, dass es zur Zeit keine Hinweise darauf gibt, wonach befürchtet werden müsste, dass nicht-extrahierbare PAK-Rückstände möglicherweise nach längeren

Zeiträumen wieder in signifikanten Mengen als originärer Schadstoff aus der Bodenmatrix freigesetzt werden könnten. Es besteht jedoch noch weiterer Forschungsbedarf insbesondere hinsichtlich der Aufklärung der Bindung zwischen gebundenen PAK-Rückständen mit der organischen Bodensubstanz z.B. mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie. In Sediment-Untersuchungen mit  $^{13}\text{C}$ -Pyren konnten Guthrie et al. (1999) mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie zum Beispiel zeigen, dass PAK im Sediment offensichtlich primär über nicht kovalente Bindungen im Boden festgelegt werden. Für aerobe Böden steht dieser Nachweis jedoch noch aus. Möglichkeiten zur weiteren Untersuchung dieser Frage ergeben sich dabei möglicherweise durch modifizierte Silylierungstechniken. Durch Silylierung lassen sich sequestrierte Schadstoffe (originäre physikalisch eingeschlossene Schadstoffe), nicht jedoch kovalent gebundene PAK-Rückstände aus der Bodenmatrix freisetzen. Die Silylierungstechnik ist von verschiedenen Arbeitsgruppen für Pestizide (Haider et al. 1998) und auch für TNT (Achnich et al., in press) eingesetzt worden. Für PAK hingegen fehlt es bisher an vergleichbaren Untersuchungen.

## 5. Literaturverzeichnis

- Achtnich, C., G. Daun, D. Jackisch, U. Sieglen, B. Wagner, H. Lenke, und H.-J. Knackmuss.** 1997. Festlegung von TNT im Boden durch eine Anaerob-/Aerob-Behandlung: Stabilität der Metabolite. *In* Umweltbundesamt (ed.) Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten. Tagungsband zum 3. Statusseminar des BMBF-Verbundvorhabens „Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten“, 26. und 27.02.1997 in Berlin. P1-14
- Achtnich, C., E. Fernandes, J.-M. Bollag, H.-J. Knackmuss, and H. Lenke.** 1999. Covalent binding of reduced metabolites of [<sup>15</sup>N<sub>3</sub>]TNT to soil organic matter during a bioremediation process analyzed by <sup>15</sup>N NMR Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* **33**:4448-4456
- Achtnich, C., H. Lenke, U. Klaus, M. Spiteller, and H.-J. Knackmuss.** in press. Influence of extensive anaerobic treatment on the immobilization of reduced TNT in soil.
- Alexander, M.** 1997. How toxic are toxic chemicals in soil? *Environ. Sci. Technol.* **29**:2713-2717
- Baumgärtner, M., M. Bender und F. H. Streuber.** 1999. Kontrollierte Humifizierung von PAK – ein neues Verfahren in der biologischen Bodensanierung. *In* Umweltbundesamt (ed.) Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen. Tagungsband zum Statusseminar des BMBF-Verbundvorhabens „Biologische Verfahren zur Bodensanierung“, 22. und 23.10.1998 in Bremen. N 1-17
- Berry, D. F., and S. A. Boyd.** 1985. Decontamination of soil through enhanced formation of bound residues. *Environ. Sci. Technol.*, **19**:1132-1133
- Baldock, J. A., J. M. Oades, A. M. Vassallo, and M. A. Wilson.** 1989. Incorporation of uniformly labelled <sup>13</sup>C-glucose carbon into the organic fraction of a soil. Carbon balance and CP/MAS-<sup>13</sup>C-NMR-measurements. *Soil Biol. Biochem.* **27**:725-746
- Bollag, J.-M., and M. J. Loll.** 1983. Incorporation of xenobiotics into soil humus. *Experienta*, **39**:1221-1234
- Bollag, J.-M.** 1992. Decontaminating soil with enzymes. *Environ. Sci. Technol.* **26**:1876-1881
- Bollag, J.-M., and C. Myers.** 1992a. Detoxification of aquatic and terrestrial sites through binding of pollutants to humic substances. *Sci. Total Environ.* **117/118**:357-366
- Bollag, J.-M., C. J. Myers, and R. D. Minard.** 1992b. Biological and chemical interactions of pesticides with soil organic matter. *Sci. of Total Environ.* **123/124**:205-217
- Bruns-Nagel, D., O. Drzyzga, K. Steinbach, T. C. Schmidt, E. von Löw, T. Gorontzy, K.-H. Blotevogel, and D. Gemsa.** 1998. Anaerobic/aerobic composting of 2,4,6-Trinitrotoluene-contaminated soil in a reactor system. *Environ. Sci. Technol.* **32**:1676-1679
- Bundesbodenschutz- und Altlastenverordnung (BBodSchV).** 16.07.1999. Bundesgesetzblatt **36**:1554

- Calderbank, A.** 1989. The occurrence and significance of bound pesticide residues in soil. Rev. Environ. Contam. Toxicol. **108**:71-103
- Chiou, C.T.** 1989. Theoretical considerations of the partition uptake of nonionic organic compounds by soil organic matter. In B. L. Sawhney, and K. Brown (ed.) Reactions and movement of organic chemicals in soils. Bd. 22, Soil Sci. Soc. .Am. Inc., Madison. 1-29
- Collins, P. J., M. J. J. Kotterman, J. A. Field, and A. D. Dobson.** 1996. Oxidation of anthracene and benzo(a)pyrene by laccases from *Trametes versicolor*. Appl. Environ. Microbiol. **62**:4563-4567
- Dec, J., K. Haider, A. Schäffer, E. Fernandes, and J.-M. Bollag.** 1997. Use of silylation procedure and <sup>13</sup>C-NMR Spectroscopy to characterize bound and sequestered residues of cyprodinil in soil. Environ. Sci. Technol. **31**:2991-2997
- Drzyzga, O., D. Bruns-Nagel, T. Gorontzy, K.-H. Blotevogel, D. Gemsa, and E. von Löw.** 1998. Incorporation of <sup>14</sup>C-labeled 2,4,6-Trinitrotoluene metabolites into different soil fraction after anaerobic-aerobic treatment of soil/molasses mixture. Environ. Sci. Technol. **32**:3529-3535
- Edwards, C. A., and P. J. Bohlen.** 1996. Biology and ecology of earthworms. Capman & Hall, New York
- Eggeling, L., and H. Sahn.** 1980. Degradation of coniferyl alcohol and other lignin-related aromatic compounds by *Nocardia* sp. DSM 1069. Arch. Microbiol. **126**:141-148
- Engebretson, R. R., and R. Wandruszka.** 1994. Microorganization in dissolved humic acids. Environ. Sci. Technol. **28**:1934-1941
- Eschenbach, A., M. Kästner, R. Wienberg, and B. Mahro.** 1994. Evaluation of a new, effective method to extract polycyclic aromatic hydrocarbons from soil samples. Chemosphere, **28**:683-692
- Eschenbach, A.** 1995. Einfluß von *Pleurotus ostreatus*, Kompost, *Sphingomonas paucimobilis* und der Kontaminationsdauer auf den Verbleib und Abbau <sup>14</sup>C-markierter polyzyklischer Kohlenwasserstoffe (PAK) in Altlastböden. Diss. Techn. Univ. Hamburg-Harburg
- Eschenbach, A., M. Kästner, R. Wienberg, and B. Mahro.** 1995. Microbial PAH degradation in soil material from a contaminated site - Mass balance experiments with *Pleurotus ostreatus* and different <sup>14</sup>C-PAH. In W. J. van den Brink, R. Bosman, and F. Arendt. (ed.) Contaminated soil '95. Kluwer Academic Publ. Dordrecht 377-378
- Eschenbach, A., R. Wienberg, and B. Mahro.** 1997a. Bildung und Langzeitstabilität von nicht-extrahierbaren PAK-Rückständen im Boden. Altlastenspektrum **6**:292-297
- Eschenbach, A., R. Wienberg, and B. Mahro B.** 1997b. Einsatz von Kompost und Rindenmulch bei der biologischen Altlastensanierung PAK-kontaminierter Bodenmaterialien. Mittlgn. Dt. Bodenkundl. Gesellsch., **83**:279-282
- Eschenbach, A., R. Wienberg und B. Mahro.** 1998a. Untersuchung der Bildung und Langzeitsabiltät von humifizierten PAK in biologisch behandelten Recyclingböden. Abschlußbericht BMBF-Forschungsvorhaben „Biologische Verfahren zur Boden-sanierung“, Teilprojekt 7, Förder-Nr. 1480937

- Eschenbach, A., R. Wienberg, and B. Mahro.** 1998b. Fate and stability of nonextractable residues of [<sup>14</sup>C]PAH in contaminated soils under environmental stress conditions. *Environ. Sci. Technol.* **32**:2585-2590
- Eschenbach, A., R. Wienberg, and B. Mahro.** 2000. Formation, long-term stability and fate of non-extractable <sup>14</sup>C-PAH-residues in contaminated soils. *In* D. L. Wise, D. J. Trantolo, E. J. Cichon, I. I. Inyang, U. Stottmeister (ed.): Remediation of hazardous waste contaminated soils. 2<sup>nd</sup> Edition, Marcel Dekker, Inc., New York. 429-448
- Führ, F.** 1987. Non-extractable pesticide residues in soil. *In* R. Greenhalgh, T. R. Roberts (ed.) Pesticide science and biotechnologie. 6th IUPAC congress of pesticide chemistry. Blackwell Sci. Publ., Oxford. 381-389
- Führ, F., W. Steffens, W. Mittelstaedt, and B. Brumhard.** 1991. Lysimeter experiments with <sup>14</sup>C-labelled pesticides - an agroecosystem approach. *In* H. Frehse (ed.) Pesticide chemistry. Advances in international research, development and legislation. Verlag Chemie, Weinheim. 37-48
- Führ, F., H. Ophoff, P. Burauel, U. Wanner, and K. Haider.** 1998. Modification of the definition of bound residues. *In* Deutsche Forschungsgemeinschaft (ed.) Pesticide bound residues in soil. Wiley-VCH. Weinheim. 175-177
- Goodin, J. D., and M. D. Webber.** 1995. Persistence and fate of anthracene and benzo(a)pyrene in municipal sludge treated soil. *J. Environ. Qual.* **24**:271-278
- Griest, W. H., A. J. Stewart, C.-H. Ho, R. L. Tyndall, A. A. Vass, J. E. Caton, and W. M. Caldwell.** 1994. Characterization of explosives processing waste decomposition due to composting. US Army Report ORNL/TM12812
- Guthrie, E., J. M. Bortiatynski, J. D. H. van Heemst, J. E. Richman, K. S. Hardy, E. M. Kovach, and P. G. Hatcher.** 1999. Determination of <sup>13</sup>C-pyrene sequestration in sediment microcosmos using Flash Pyrolysis-GC-MS and <sup>13</sup>C-NMR. *Environ. Sci. Technol.* **33**:119-125
- Haider, K., M. Spiteller, K. Reichert, and M. Fild.** 1992. Derivatization of humic compounds: An analytical approach for bound organic residues. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **46**:201-211
- Haider, K., M. Spiteller, A. Wais, and M. Fild.** 1993. Evaluation of the binding mechanism of anilazine and its metabolites in soil organic matter. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **53**:125
- Haider, K., J. Dec, A. Schäffer, and J.-M. Bollag.** 1998. Characterization of bound residues from cyprodinil by <sup>13</sup>C-labelling and NMR spectrometry. *In* Deutsche Forschungsgemeinschaft (ed.) Pesticide bound residues in soil. Wiley-VCH. Weinheim. 41-47
- Haider, K., und A. Schäffer.** 2000. Umwandlung und Abbau von Pflanzenschutzmitteln in Böden - Auswirkungen auf die Umwelt. Thieme-Verlag. in press
- Hassett, J. J., and W. L. Banwart.** 1989. The sorption of nonpolar organics by soils and sediments. *In* B. L. Sawhney, and K. Brown. (ed.) Reactions and movement of organic chemicals in soils. Bd. 22, Soil Sci. Soc. Am. Inc., Madison. 31-44

- Hatzinger, P. B., and M. Alexander.** 1995. Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environ. Sci. Technol.* **29**:537-545
- Hupe, K., J.-C. Lüth, J. Heerenklage und R. Stegmann.** 1996. Kompost als Mittel zur Reinigung ölkontaminierter Böden. *Altlastenspektrum* **4**:182-189
- Hupe, K., M. Koning, J.-C. Lüth, J. Heerenklage, and R. Stegmann.** 1998. Einsatz von Testsystemen zur bilanzierenden Untersuchung der biologischen Schadstoffumsetzung im Boden. *Altlastenspektrum* **6**:360-366
- Kästner, M.** 1998. Verteilung des Kohlenstoff beim mikrobiellen Abbau von Fremdstoffen im Boden unter besonderer Berücksichtigung der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe – Metabolisierung, Mineralisierung, und Humifizierung. Habilitationsschrift.
- Kästner, M., M. Breuer, and B. Mahro.** 1991. Bakterien-Isolate aus unterschiedlichen Altlast-Standorten zeigen ein vergleichbares Abbau-Profil für PAK und Ölkomponenten. *GWF Wasser Abwasser* 132, **4**:253-255
- Kästner, M., B. Mahro, and R. Wienberg.** 1993. Biologischer Schadstoffabbau in kontaminierten Böden. *In* R. Stegmann (ed.) *Hamburger Berichte*. Economica Verlag, Bonn
- Kästner, M., S. Lotter, J. Heerenklage, M. Breuer-Jammali, R. Stegmann, and B. Mahro.** 1995. Fate of <sup>14</sup>C-labeled anthracene and hexadecane in compost-manured soil. *Appl. Microbiol. Bio-technol.* **43**:1128-1135
- Kästner, M., S. Streibich, M. Beyrer, H. H. Richnow, and W. Fritsche.** 1999. Formation of bound residues during microbial degradation of [<sup>14</sup>C]anthracene in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1834-1842
- Kelsey, J. W., B. D. Kottler, and M. Alexander.** 1997. Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* **31**:214-217
- Khan, S. U.** 1982. Bound pesticide residues in soil and plants. *Residue reviews.* **84**:1-24
- Länderarbeitsgemeinschaft Abfall, LAGA.** 1998. Anforderungen an die stoffliche Verwertung von mineralischen Reststoffen/Abfällen. Technische Regeln. Stand November 1998
- Lotter, S., A. Brumm, J. Bundt, J. Heerenklage, A. Paschke, H. Steinhart, and R. Stegmann.** 1993. Carbon balance of a PAH-contaminated soil during biodegradation as a result of the addition of compost. *In* F. Arendt, G. J. Annokkee, R. Bosman, W. J. van den Brink. (ed.) *Contaminated soils '93*. Kluwer Acad. Publishers. 1235-1245
- Mahro, B.** 1994. Vergleichende Untersuchung zur Wirkung der Zugabe biologisch aktiver Supplemente auf den mikrobiellen Abbau polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) im Boden. Habilitationsschrift TU Hamburg-Harburg, Hamburg
- Mahro, B. und M. Kästner.** 1993. Der mikrobielle Abbau polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) in Böden und Sedimenten: Mineralisierung, Metabolitenbildung und Entstehung gebundener Rückstände. *BioEngineering* **9**:50-58

- Mahro, B., and M. Kästner.** 1993b. Mechanisms of microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in soil-compost mixtures. *In* F. Arendt, G. J. Annokkee, R. Bosman, W. J. van den Brink. (ed.) Contaminated soils '93. Kluwer Acad. Publishers. 1249-1256
- Mahro, B., A. Eschenbach, M. Kästner, and G. Schaefer.** 1994. Untersuchung von Möglichkeiten zur gezielten Stimulation der biogenen Mineralisierung und Humifizierung von PAK in Böden. *In* TU Berlin, "Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung", Bd. 4, Biologischer Abbau von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen. 55-68
- Mahro, B.** 1999. Aufgaben und Fragestellung des Statusseminars „Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen im Boden.“ *In* Umweltbundesamt (ed.) Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen. Tagungsband zum Statusseminar des BMBF-Verbundvorhabens „Biologische Verfahren zur Bodensanierung“, 22. und 23.10.1998 in Bremen. A 1-17
- Mahro, B., L. M. Schmidt, and A. Eschenbach.** 1999. Möglichkeiten und Grenzen mikrobiologischer Verfahren bei der Sanierung kontaminierter Böden. *In* S. Heiden, R. Erb, J. Warrelmann, and R. Dierstein. Biotechnologie im Umweltschutz. Bioremediation: Entwicklungsstand – Anwendungen – Perspektiven. Initiativen zum Umweltschutz, Erich Schmidt Verlag, Berlin. 12:99-107
- Mahro, B.** 2000. Bioavailability of contaminants. *In* H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, (ed.) Biotechnology Vol.11 b. Environmental Processes - Soil decontamination, Waste gas treatment, Potable water preparation; Wiley-VCH, Weinheim. 62-88
- Mescher, H., A. Eschenbach, R. Wienberg, and B. Mahro.** 1999. Untersuchung zur Remobilisierung von humifizierten <sup>14</sup>C-PAK-Rückständen durch Regenwürmer (Lumbricidae) in Altlastböden. *Mittlgn. Dt. Bodenkundl. Gesellsch.* **91**:682-683
- Murphy, E. M., and J. M. Zachara.** 1995. The role of sorbed humic substances on the distribution of organic and inorganic contaminants in the groundwater. *Geoderma.* **67**:103-124
- Michaelis, W.** 1994. Chemische Wechselwirkungen von Erdölkontaminationen und deren Abbauprodukten mit der Humusfraktion von Böden. *In* Sonderforschungsbereich 188 der DFG. Reinigung kontaminierter Böden. Arbeits- und Ergebnisbericht. Techn. Univers. Hamburg-Harburg. 493-512
- Pignatello, J. J.** 1989. Sorption dynamics of organic compounds in soils and sediments. *In* B. L. Sawhney, and K. Brown. (ed.) Reactions and movement of organic chemicals in soils. Bd. 22, Soil Sci. Soc. Am. Inc., Madison. 45-80
- Pignatello, J. J., and B. Xing.** 1996. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ. Sci. Technol.* **30**:1-11
- Senesi, N.** 1992. Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. *Sci. Total Environ.* **123/124**:63-76

- Senesi, N.** 1993. Organic pollutant migration in soils as affected by soil organic matter. Molecular and mechanistic aspects. *In* D. Petruzelli, and F. G. Helfferich (ed.) Migration and Fate of pollutants in soils and subsoils. Springer, Berlin. 47-74
- Schnöder F., W. Mittelstaedt, and F. Führ.** 1994. Das Verhalten von Benzo(a)pyren und Fluoranthen in einer Parabraunerde - Lysimeter- und Laborstudien. *In* TU Berlin (ed.) Biologischer Abbau von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen. Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung **4**:217-230
- Scow, K. M.** 1994. Effect of sorption on biodegradation of organic chemicals in soil. *In* Inegi and Cna (ed.) 15th World Congress of soil science. **4a**:352-361
- Qiu, X., and M. J. McFarland.** 1991. Bound residues formation in PAH contaminated soil composting using *Phanerochaete Chrysosporium*. Hazardous Waste & Hazardous Materials **8**:115-126
- Richnow, H. H., R. Seifert, and W. Michaelis.** 1993. Der Einfluß der Huminstoffe auf die biologische Bodenreinigung - Assoziation organischer Schadstoffe aus Mineralölkontaminationen. *In* R. Stegmann (ed.) Bodenreinigung. Bd. 6, Economica Verlag, Bonn
- Richnow, H. H., R. Seifert, J. Hefter, M. Kästner, B. Mahro, and W. Michaelis.** 1994. Metabolites of xenobiotica and mineral oil constituents linked to macromolecular organic matter in polluted environments. Adv. Org. Geochem. **22**:671-681
- Richnow, H. H. und W. Michaelis.** 1996. Untersuchung zur Bildung von Bound Residues bei der biologischen Reinigung kontaminierter Böden. *In* R. Stegmann (ed.) Neue Techniken der Bodenreinigung. Bd. 10, Economica Verlag, Bonn
- Richnow, H. H., A. Eschenbach, B. Mahro, R. Seifert, P. Wehrung, P. Albrecht, and W. Michaelis.** 1998. The use of <sup>13</sup>C-labelled polycyclic aromatic hydrocarbons for the analysis of their transformation in soil. Chemosphere, **36**:2211-2224
- Richnow, H. H., A. Eschenbach, B. Mahro, M. Kästner, E. Annweiler, R. Seifert, and W. Michaelis.** 1999. The formation of nonextractable residues – a stable isotope approach. Environ. Sci. Technol. **33**:3761-3767
- Trojanowski J., K. Haider, and V. Sundman.** 1977. Decomposition of <sup>14</sup>C-labelled lignin and phenols by a *Nocordia* sp. Arch. Microbiol. **114**:149-153
- Wais, A.** 1998. Non-extractable residues of organic xenobiotics in soil – a review. *In* Deutsche Forschungsgemeinschaft (ed.) Pesticide bound residues in soil. Wiley-VCH. Weinheim. 5-31
- Weissenfels, W. D., H. J. Klewer, and J. Langhoff.** 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. Appl. Microbiol. Biotechnol. **36**:689-696
- Wienberg, R.** 1990. Zum Einfluß organischer Schadstoffe auf Deponietone.- Teil 2: Spezifische Interaktionen. Abfallwirtschaftsjournal **2/6**:393-403
- Ziegler, F.** 1990. Zum Einfluß von Regenwürmern (*Eisenia fetida*, Lumbricidae) und zur mineralischen Substanz auf die Zersetzung von Buchenstreu (*Fagus sylvatica*) und Gerstenstroh (*Hordeum vulgare*) im Modellversuch. Bayreuther Bodenkundliche

Berichte, Selbstverlag des Lehrstuhls für Bodenkunde und Bodengeographie der  
Universität Bayreuth.