

***Mikrobieller Abbau typischer Teeröl-PAK und Hetero-PAK
(N,S,O) in einem Modellbodenhorizont***

*Wechselwirkungen, Metabolitenbildung und Ansätze zur
ökotoxikologischen Metabolitenbewertung*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

aus dem
Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie
- Abteilung Lebensmittelchemie -
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Susanne Meyer

aus Bielefeld

Hamburg 1999

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von November 1995 bis Oktober 1998 unter der Leitung von Professor Dr. Dr. H. Steinhart am Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie, Abteilung Lebensmittelchemie, an der Universität Hamburg angefertigt.

1. Gutachter: Professor Dr. Dr. H. Steinhart
2. Gutachter: Professor Dr. J. Voß

Tag der mündlichen Prüfung: 01. September 1999

Danksagung

Für die vielseitige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit möchte ich mich bedanken, insbesondere bei:

Herrn Prof. Dr. Dr. Steinhart für die Überlassung der interessanten Themenstellung sowie für die Betreuung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Voß für die Übernahme des Koreferates.

Herrn Dr. Ahlf und insbesondere Ruth Lehmann aus dem Arbeitsbereich Umweltschutztechnik der Technischen Universität Hamburg-Harburg für die vielfältige Unterstützung und sympathische Zusammenarbeit bei der Durchführung der Microtox -Tests in ihrem Arbeitsbereich.

Thomas Käcker, Dr. Hartmut Wischmann und Dr. Thomas Simat für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Simone Cartellieri, Johanna Macke und Claudia Collingro für ihre großartige Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Meinen Eltern und meinem Freund für die Korrekturarbeiten und anderweitige vielfältige Unterstützung.

Allen Kolleginnen und Kollegen des Sonderforschungsbereiches 188 „Reinigung kontaminierter Böden“ sowie der Abteilung Lebensmittelchemie danke ich für die nette Zusammenarbeit.

Diese Arbeit wurde mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 188 „Reinigung kontaminierter Böden“ gefördert.

Folgende Publikationen und Poster gingen bisher aus dieser Arbeit hervor:

Publikationen

Meyer, S., Steinhart, H. (1998): Analysis of PAHs, hetero-PAHs (N,S,O) and N-substituted PAHs in tar oil contaminated soils including their degradation products, In *Contaminated Soil '98* (Hrsg.: Arendt, F., Harder, W., Hart, I.) Vol. 2, Thomas Telford Ltd. London, 871-872.

Meyer, S., Steinhart, H. (1999): Effects of heterocyclic PAHs (N,S,O) on the biodegradation of typical tar oil PAHs in a soil/compost-mixture, *Chemosphere*, im Druck.

Meyer, S., Cartellieri, S., Steinhart, H. (1999): Simultaneous determination of PAHs, hetero-PAHs (N,S,O) and their degradation products in creosote contaminated soils. Method development, validation and application to hazardous waste sites, *Anal. Chem.*, im Druck.

Meyer, S., Steinhart, H. (1999): Fate of PAHs and hetero-PAHs during biodegradation in a model soil/compost-system - formation of extractable metabolites, *Water Air Soil Pollut.*, eingereicht.

Poster

Meyer, S., Steinhart, H. (1998): Analysis of PAHs, hetero-PAHs (N,S,O) and N-substituted PAHs in tar oil contaminated soils including their degradation products, Poster im Rahmen des internationalen FZK/TNO-Kongresses „ConSoil '98“ in Edinburgh, 1998.

Meyer, S., Collingro, C., Steinhart, H. (1998): Heterozyklische PAK (N,S,O) als Einflußfaktoren auf den mikrobiellen PAK-Abbau in kontaminierten Böden, Poster im Rahmen der GDCh-Tagung „Umwelt und Chemie - Innovationen und Produktdesign“ in Karlsruhe, 1998.

Meyer, S., Steinhart, H. (1999): Analytik von Metaboliten im Rahmen des mikrobiellen PAK-Abbaus in kontaminierten Böden, Poster im Rahmen des Deutschen Lebensmittelchemikertages in Hamburg, 1999.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Acenaphthen
AED	Atom-Emissions-Detektor
Ah	A: oberer Bodenhorizont, h: humusreich
ANT	Anthracen
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid
BTX	Benzol, Toluol, Xylol
CAR	Carbazol
CN-	Cyano-
CV	Variationskoeffizient
DAD	Diodenarray-Detektor
DBF	Dibenzofuran
DBT	Dibenzothiophen
DCM	Dichlormethan
DIN	Deutsches Institut für Normung
EI	Elektronenstoßionisation
EPA	Environmental Protection Agency (US-Umweltbehörde)
FID	Flammenionisations-Detektor
FLU	Fluoren
FPD	Flammenphotometer-Detektor
GC	Gaschromatographie
h	Stunden
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC	High Performance Thin Layer Chromatography
ID	Innendurchmesser
IS	Interner Standard
ITVA	Ingenieurtechnischer Verband Altlasten e.V.
KBE	koloniebildende Einheiten
log K_{ow}	Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
min	Minuten
m:m	Gewichtsverhältnisse
MS	Massenspektrometer
MSD	Massenselektiver Detektor
MW	Mittelwert
m/z	Masse/Ladung
NAP	Naphthalin

n.b.	nicht bestimmt
NG	Nachweisgrenze
n.n.	nicht nachweisbar
N-PAK	stickstoffhaltige polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
NPD	Stickstoff-Phosphor-Detektor
OH-	Hydroxy-substituiert
O-PAK	sauerstoffhaltige polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PAH	polycyclic aromatic hydrocarbon
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PHE	Phenanthren
PTFE	Polytetrafluorethylen (Teflon)
r	Korrelationskoeffizient
RP	Reversed Phase (Umkehrphase)
RT	Retentionszeit
SC	Säulenchromatographie
SIM	Single Ion Monitoring
SN	Signifikanzniveau
S-PAK	schwefelhaltige polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
SPE	Solid Phase Extraction (Festphasenextraktion)
Tab.	Tabelle
TLC	Thin Layer Chromatography (Dünnschichtchromatographie)
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMS	Trimethylsilyl-
TS	Trockensubstanz
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenverhältnisse
WF	Wiederfindung
WHK _{max.}	maximale Wasserhaltekapazität

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG.....	13
2 PROBLEMSTELLUNG UND ARBEITSPLAN	21
3 UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND REFERENZSUBSTANZEN	23
3.1 Modellboden.....	23
3.2 Reale Altlasten.....	23
3.3 Modellverbindungen	23
4 ANALYTISCHE METHODEN.....	25
4.1 Methodenentwicklung.....	25
4.1.1 Extraktionsverfahren	25
4.1.2 Fraktionierung - Clean-up.....	27
4.1.3 Trimethylsilylierung von Metaboliten mit Hydroxy- und Carboxylgruppen	29
4.1.4 Chromatographische Trennmethoden	30
4.1.5 Validierung	32
4.1.6 Anwendung der Methode auf teerölkontaminierte Altlasten.....	35
4.2 Microtox[®]-Test	37
4.3 Statistik.....	37
5 MIKROBIELLER ABBAU EINES KOMPLEXEN PAK- BZW. HETERO-PAK- GEMISCHES - ABBAUSTUDIE 1.....	38
5.1 Durchführung	38
5.2 Ergebnisse der PAK- und Hetero-PAK-Analytik.....	39
5.2.1 Einfluß der Hetero-PAK auf den PAK-Abbau	39
5.2.2 Abbau der Hetero-PAK.....	42
5.2.3 Summarischer PAK- und Hetero-PAK-Abbau.....	47
5.3 Ergebnisse der Metaboliten-Analytik.....	49
5.3.1 Identifizierte PAK- und Hetero-PAK-Metaboliten.....	49
5.3.2 Konzentrationsverläufe von PAK bzw. Hetero-PAK und ihren Metaboliten in den verschiedenen Bodensystemen.....	53
5.4 Korrelation von chemischer Analytik und Microtox[®]-Test	58

5.4.1 Ergebnisse des Microtox [®] -Tests	58
5.4.2 Korrelation von Ausgangsverbindungen und Toxizität im Microtox [®] -Test	59
5.4.3 Korrelation von Metaboliten und Toxizität im Microtox [®] -Test.....	61
6 MIKROBIELLER ABBAU STRUKTURANALOGER PAK UND HETERO-PAK - ABBAUSTUDIE 2	63
6.1 Durchführung	63
6.2 Ergebnisse der PAK- und Hetero-PAK-Analytik.....	63
6.2.1 Abbau der PAK und Hetero-PAK und gegenseitige Wechselwirkungen.....	63
6.2.2 Abbaureihenfolge der strukturanalogen PAK und Hetero-PAK.....	65
6.3 Ergebnisse der Metaboliten-Analytik.....	66
7 DISKUSSION	69
7.1 PAK- und Hetero-PAK-Abbau in den Modellbodensystemen.....	69
7.1.1 Abbau der PAK.....	69
7.1.2 Abbau der Hetero-PAK.....	69
7.1.3 Wechselwirkungen von PAK und Hetero-PAK.....	72
7.2 Bildung von PAK- und Hetero-PAK-Metaboliten	75
7.2.1 Identifizierung von PAK-Metaboliten	75
7.2.2 Identifizierung von Hetero-PAK-Metaboliten	78
7.2.3 Konzentrationsverläufe der Metaboliten und Wechselwirkungen von PAK und Hetero-PAK auf die Metabolitenbildung.....	79
7.3 Korrelation von chemischer Analytik und Microtox -Test	81
8 ZUSAMMENFASSUNG - SUMMARY	85
8.1 Zusammenfassung.....	85
8.2 Summary.....	87
9 ANHANG	89
9.1 Chemikalien	89
9.2 Geräte und Meßbedingungen	92
9.2.1 Gaschromatographie-FID.....	92
9.2.2 Gaschromatographie-MSD	92
9.2.3 Hochleistungsflüssigchromatographie-DAD.....	94

9.2.4 Lumineszenzmessung.....	96
9.3 Arbeitsvorschriften	97
9.3.1 Soxhlet-Extraktion von PAK, Hetero-PAK und Metaboliten	97
9.3.2 Ultraschall-Extraktion der strukturanalogen PAK und Hetero-PAK.....	97
9.3.3 Alkalische Hydrolyse der Bodenmatrix.....	97
9.3.4 Festphasenextraktion.....	98
9.3.5 Kationenaustausch-Chromatographie.....	99
9.3.6 Trimethylsilylierung der polaren Oxidationsprodukte	100
9.3.7 Microtox [®] -Test.....	100
9.4 Bodenmaterialien	101
9.4.1 Modellboden.....	101
9.4.2 Teerölkontaminierte Altlasten.....	101
9.5 Verfahrenskenndaten der validierten Methode.....	102
9.6 PAK-, Hetero-PAK- und Metaboliten-Gehalte in den Altlasten.....	105
9.7 Abbau eines komplexen PAK- bzw. Hetero-PAK-Gemisches	108
9.7.1 Standardlösungen	108
9.7.2 Verschieden kontaminierte Ah-Horizont/Kompost-Modellsysteme	109
9.7.3 Probenahme und Untersuchung	109
9.7.4 Quantifizierung von Dibenzothiophensulfoxid	110
9.7.5 Ergebnisse der PAK- und Hetero-PAK-Analytik.....	111
9.7.6 Ergebnisse der Metaboliten-Analytik.....	116
9.7.7 Ergebnisse des Microtox -Tests.....	118
9.7.8 PAK- und Hetero-PAK-Gehalte in den Methanol-Extrakten.....	119
9.7.9 Metabolitengehalte in den Methanol-Extrakten	121
9.8 Abbau strukturanaloger PAK und Hetero-PAK	123
9.8.1 Standardlösungen	123
9.8.2 Verschieden kontaminierte Ah-Horizont/Kompost-Modellsysteme	123
9.8.3 Probenahme und Untersuchung	123
9.8.4 Ergebnisse der PAK-, Hetero-PAK- und Metaboliten-Analytik	125
9.9 UV- und MSD-Spektren identifizierter Metaboliten	127
10 LITERATURVERZEICHNIS	133

1 Einleitung

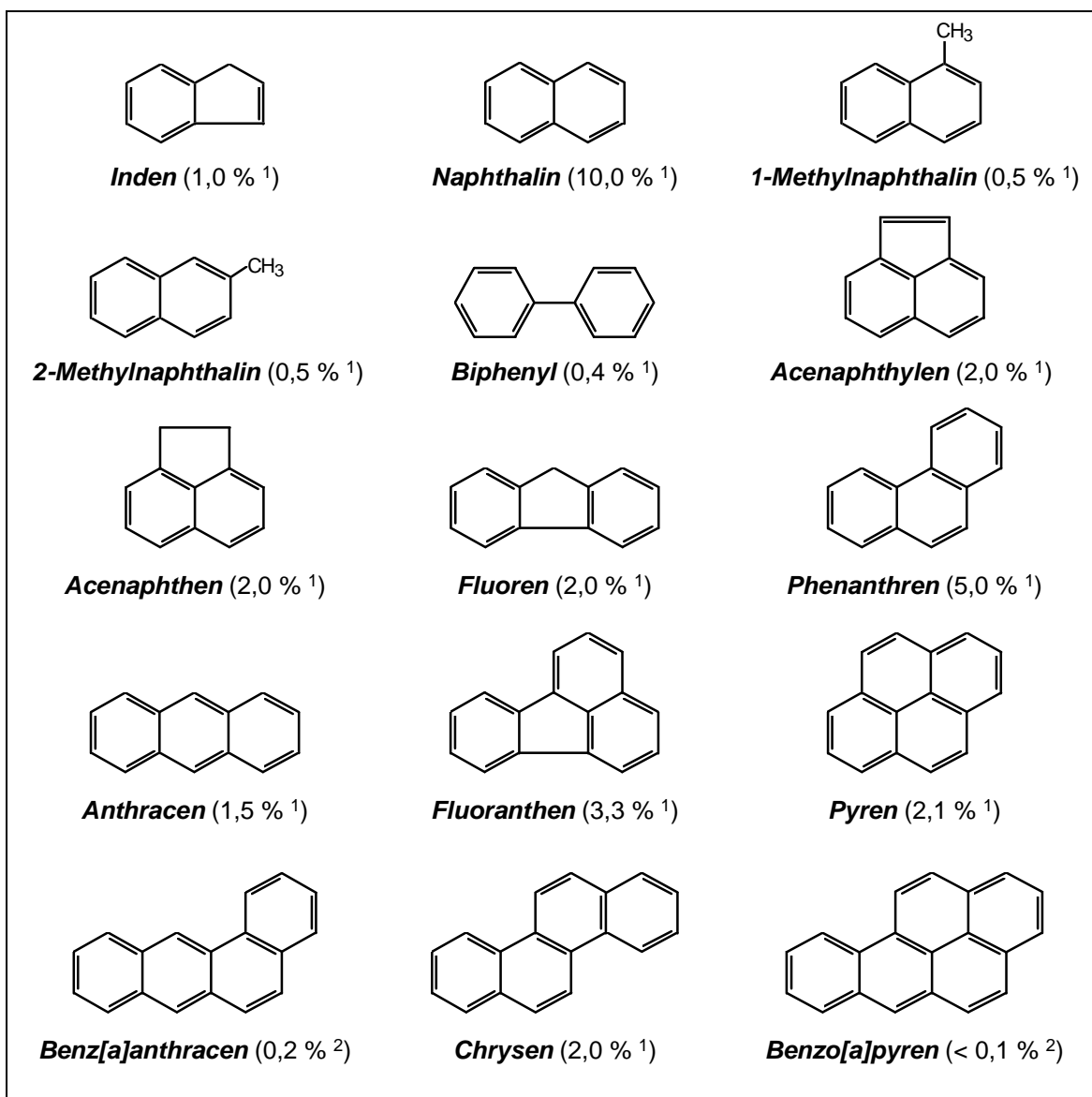
Die Anzahl der in der Bundesrepublik Deutschland registrierten Altlastenverdachtsflächen hat sich im Laufe der letzten Jahre stetig erhöht. Waren noch 1989 in den alten Bundesländern ca. 48.000 Altlastenverdachtsflächen erfaßt, wurde 1993 die Anzahl, bedingt durch Wiedervereinigung und steigenden Erfassungsgrad, auf 139.000 Flächen beziffert. 1998 waren 190.000 Altlastenverdachtsflächen registriert, ca. 50 % dieser Flächen befinden sich in den neuen Bundesländern (FRANZIUS, 1994; SANDEN und FREIER, 1998). Bis zum Jahr 2010 wird mit 240.000 registrierten Altlastenverdachtsflächen gerechnet. Nach vorsichtigen Schätzungen besteht bei 10 - 15 % dieser Verdachtsflächen ein Handlungsbedarf zur Gefahrenabwehr, so daß Sanierungsmaßnahmen ergriffen werden müssen (UMWELTBUNDESAMT, 1997).

Bodenkontaminationen auf Steinkohlenteerbasis gehören zu den häufigsten Altlasten. Steinkohlenteere bzw. Teeröle, die seit dem Ende des 18. Jahrhunderts zunächst als Nebenprodukte der Kohleentgasung anfielen, haben im letzten Jahrhundert immer mehr an industrieller Bedeutung gewonnen. Anwendung fand der Teer zur Erzeugung von Teerfarben und zur Holzimprägnierung (Eisenbahnschwellen, Telegrafmasten, Schiffe). Seit dem Ende des 19. Jahrhunderts wurde Teer zur Gewinnung von Rohstoffen für die Chemieindustrie (Phenole, Anilinfarben) aufbereitet. Entsprechend treten Spitzenbelastungen des Bodens mit Steinkohlenteer bzw. Teeröl insbesondere auf ehemaligen Geländen von Kokereien, Gaswerken und von teer- und holzschutzmittelverarbeitenden Betrieben auf (FRANCK und KNOP, 1979; STARKE et al., 1995). Mitte dieses Jahrhunderts wurden in Deutschland die letzten Gaswerke stillgelegt. Seit 1991 ist das Inverkehrbringen von Teerölen und deren Erzeugnissen durch die TEERÖL-VERORDNUNG verboten, die 1993 in der CHEMIKALIEN-VERBOTSVERORDNUNG aufgegangen ist.

Steinkohlenteere bzw. Teeröle sind komplexe Vielstoffgemische aus ca. 10.000 Verbindungen, von denen bisher nur einige hundert charakterisiert wurden. Diese lassen sich in folgende vier Klassen einteilen (COLLIN und ZANDER, 1985; WRIGHT et al., 1985; PETERS und LUTHY, 1993):

1. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) (ca. 85 %)
2. stickstoff-, schwefel- bzw. sauerstoffhaltige PAK (Hetero-PAK) (ca. 5 - 13 %)
3. Phenole (1 - 10 %)
4. monoaromatische Kohlenwasserstoffe des BTX-Typs (BTX) (< 1 %)

Aus der Gruppe der PAK und der Hetero-PAK sind eine Auswahl der mengenmäßig bzw. toxikologisch relevantesten Verbindungen und ihre prozentualen Gehalte in *Abb. 1* und *Abb. 2* dargestellt. Neben den typischen PAK-Grundkörpern kommt eine



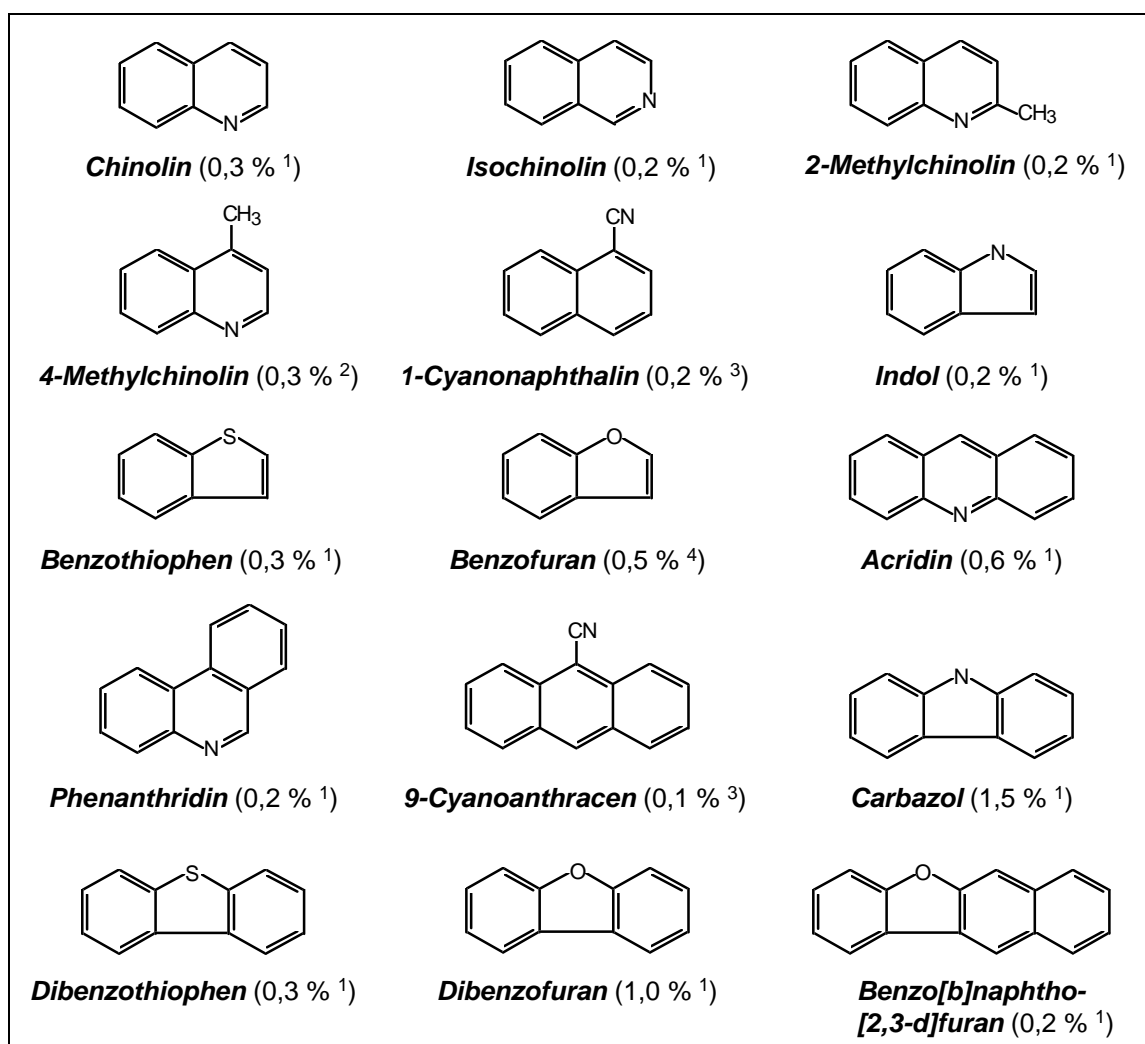
¹ COLLIN und ZANDER (1985): PAK-Gehalte in Steinkohlenteer

² WRIGHT et al. (1985): PAK-Gehalte in Teeröl

Abb. 1: PAK in Steinkohlenteer bzw. Teeröl und prozentuale Gehalte

Vielzahl einfach und mehrfach methylierter Verbindungen vor. Je nach Herkunft der Steinkohle und den Verarbeitungsbedingungen können die Gehalte einzelner Verbindungen stark schwanken.

Die toxikologische Relevanz von Teerprodukten ist bereits seit 1775 durch das signifikant erhöhte Vorkommen von bestimmten Krebsformen bei Schornsteinfegern und Teerarbeitern bekannt. Ca. 150 Jahre später wurden einige PAK, wie das Benzo[a]pyren, als kanzerogene Teerinhaltsstoffe identifiziert (SIMS und OVERCASH, 1983). Da kanzerogene und/oder mutagene Eigenschaften unter den Hauptinhaltsstoffen des Steinkohlenteers, den PAK, aber auch den Hetero-PAK, weit verbreitet



¹ COLLIN und ZANDER (1985): Hetero-PAK-Gehalte in Steinkohlenteer

² MUELLER et al. (1989): Hetero-PAK-Gehalte in Teeröl

³ KRONE et al. (1986): Hetero-PAK-Gehalte in Teeröl

⁴ eigene Untersuchungen verschiedener Teeröle (unveröffentlichte Daten)

Abb. 2: Hetero-PAK in Steinkohlenteer bzw. Teeröl und prozentuale Gehalte

sind (LATER et al., 1982; BOS et al., 1983; GRIMMER et al., 1991), geht von Bodenkontaminationen auf Steinkohlenteerbasis eine ernstzunehmende Gefahr für Mensch und Umwelt aus.

Die Bundesregierung hat den Bodenschutz und die Altlastensanierung zu einer dringenden Aufgabe erklärt und dies mit dem Erlaß des BUNDES-BODENSCHUTZGESETZES (1998) dokumentiert. Für die Sanierung von Bodenkontaminationen wurde in der Vergangenheit eine Vielzahl verschiedener physikalisch-chemischer und biologischer Verfahren entwickelt. Die Wahl des Verfahrens für einen speziellen Sanierungsfall hängt von diversen Faktoren wie Art und Konzentration der Kontamination, Bodenart, Grundwassergefährdung, der weiteren Nutzung und nicht zuletzt von den Kosten ab. Die hohen Erwartungen, die aufgrund ihrer Umweltverträglichkeit und der Kostengünstigkeit an die biologischen Verfahren gestellt wurden, konnten diese in der Vergangenheit nur bedingt erfüllen. Ursachen dafür sind eine nicht ausreichend gewährleistete Reproduzierbarkeit und Berechenbarkeit des biologischen Abbaus, da dieser sehr weitgehend von den Randbedingungen der speziellen Schadenssituation abhängt. Das sich ergebende hohe Risiko einer biologischen Sanierung für den Anwender hat dazu geführt, daß sich die biologischen Verfahren zur Sanierung von Bodenkontaminationen bisher nicht durchgesetzt haben. Um die immensen ökologischen und ökonomischen Vorteile biologischer Bodenreinigungsverfahren in Zukunft dennoch nutzen zu können, wurde von Seiten des Umweltbundesamtes sowie des Ingenieurtechnischen Verbandes Altlasten e.V. (ITVA) in jüngerer Zeit dringender Bedarf an Forschung und Entwicklung u.a. in folgenden Bereichen der biologischen Bodensanierung definiert (JACOBI, 1995; BRYNIOK et al., 1996):

- Untersuchung von Wechselwirkungen verschiedener Schadstoffe und Schadstoffklassen in Mischkontaminationen hinsichtlich Bioverfügbarkeit und Abbauverhalten im Boden,
- Abbaubarkeit bisher wenig oder gar nicht untersuchter Schadstoffe im Boden,
- Identifizierung von Metaboliten aus der biologischen Bodenbehandlung, Untersuchung ihres weiteren Abbaus und ihres (öko-)toxikologischen Potentials.

Im Rahmen der Entwicklung der biologischen Bodenreinigungsverfahren wurden diverse Untersuchungen zum Abbau von einzelnen PAK und PAK-Gemischen durchgeführt (WEISSENFELS et al., 1992; WILSON und JONES, 1993; KÄSTNER und MAHRO, 1996; WISCHMANN et al., 1996; WISCHMANN und STEINHART, 1997). Das aus Kulturmedien bekannte Abbaupotential von einzelnen Mikroorganismen und Mischkulturen gegenüber PAK (CERNIGLIA, 1984 und 1992) konnte dabei auch im Boden bestätigt werden. Zusätzlich wurde bereits eine Vielzahl von Einflußfaktoren auf den PAK-Abbau im Boden wie Konzentration der Schadstoffe, Temperatur, pH-Wert, Wassergehalt, Redoxpotential des Bodens und Anwesenheit von Nährstoffen untersucht (MANILAL und ALEXANDER, 1991; DAVIS und MADSEN, 1996). Auch die Bioverfügbarkeit der Schadstoffe im Boden, die durch verstärkte Sorptionsprozesse bei steigendem Gehalt des Bodens an organischem Kohlenstoff limitiert wird, ist ein vielfältig untersuchtes Phänomen (KARICKHOFF et al., 1979; MEANS et al., 1980; MANILAL und ALEXANDER, 1991). WEISSENFELS et al. (1993) zeigten in einer Studie mit einem mit Anthracenöl kontaminierten Bodenmaterial, daß die adsorptive Festlegung der Substanzen zu einer Einschränkung der mikrobiellen Abbaubarkeit der im Anthracenöl enthaltenen PAK führte. Die Verwendung von Kompost als Zuschlagstoff beim mikrobiellen PAK-Abbau in Böden führt zu einem schnellen Verschwinden der Kontaminanten, was in Experimenten mit ^{14}C -markierten PAK sowohl auf eine erhöhte Mineralisierungsrate als auch auf die vermehrte Bildung gebundener Rückstände (*bound residues*) zurückgeführt werden konnte (KÄSTNER et al., 1995). KÄSTNER und MAHRO (1996) konnten in verschiedenen Abbaueversuchen den positiven Effekt des Kompostes auf seine makroskopische Struktur zurückführen; entgegen bisheriger Erwartungen zeigten weder die dem Kompost eigenen Nährstoffe, seine spezifische Mikroflora noch die durch den Kompostzusatz bedingte Änderung des pH-Werts des Bodens einen Einfluß auf den Abbau. Die Verwendung von Zuschlagstoffen zur gezielten Festlegung organischer Schadstoffe wird zur Zeit alternativ zur vollständigen Mineralisierung als vielversprechende Methode der biologischen Sanierung diskutiert, insbesondere, da die hochmolekularen PAK aufgrund ihrer geringen Wasserlöslichkeit ohnehin durch Bakterien nur unzureichend abgebaut werden können (JACOBI, 1995; KÄSTNER et al., 1995). Voraussetzung für derartige Verfahren ist, daß eine möglichst hohe Bindungsstabilität erreicht wird und auch eine verzögerte Remobilisierung der PAK unter ungünstigsten Umweltbedin-

gungen ausgeschlossen ist. ESCHENBACH et al. (1997) konnten eine hohe Stabilität von gebundenen ^{14}C -PAK gegenüber verschiedenen Bakterien und Pilzen als auch physikalischen Behandlungsmaßnahmen wie extremen Temperaturschwankungen und mechanischer Aggregatzerstörung nachweisen.

Ein in deutlich geringerem Maße untersuchter Einflußfaktor auf den mikrobiellen Schadstoffabbau sind die gerade beim Vielstoffgemisch Teeröl relevanten Wechselwirkungen verschiedener PAK und weiterer Schadstoffklassen wie Hetero-PAK. Durch gegenseitige Hemmung oder Induktion der verschiedenen schadstoffabbauenden Enzyme kann es je nach Art der Schadstoffe, ihrer Konzentration und den abbauenden Mikroorganismen zu erhöhten oder verringerten Umsatzraten oder auch zur Akkumulation von Metaboliten kommen (ROJO et al., 1987; PIEPER et al., 1996). Untersuchungen zu den Wechselwirkungen verschiedener Teerölinhaltsstoffe sind bisher nur vereinzelt in Kulturmedien bekannt. TIEHM und FRITZSCHE (1995) untersuchten die Wechselwirkungen beim Abbau solubilisierter PAK durch *Mycobacterium* sp. in einem Kulturmedium und beobachteten u.a. eine hemmende Wirkung von Fluoren und eine fördernde Wirkung von Phenanthren auf den Pyren-Abbau. Ebenfalls hemmende und fördernde Effekte wiesen BOUCHEZ et al. (1995) beim Abbau von Naphthalin, Fluoren, Phenanthren, Anthracen, Fluoranthren und Pyren in sechs verschiedenen Flüssigkulturen nach. Die Konzentrationsabhängigkeit von Wechselwirkungen zeigte sich beim mikrobiellen Abbau von Xylol in Gegenwart von Toluol in einem Kulturmedium: Niedrige Toluol-Konzentrationen erhöhten die Abbaurate von Xylol, höhere Toluol-Konzentrationen verminderten sie (ARCANGELI und ARVIN, 1995).

In einer Studie zum Einfluß von Hetero-PAK auf den Abbau von Naphthalin durch eine teeröladaptierte Mischkultur wurde ein hemmender Effekt bereits geringer Konzentrationen an Hetero-PAK (0,1 mg/L) auf den Abbau von Naphthalin nachgewiesen (ARCANGELI und ARVIN, 1995). In Abbauversuchen mit Mono- und Diaromaten sowie S- und O-Heteroaromaten durch eine teeröladaptierte Mischkultur konnten DYREBORG et al. (1996c) komplexe Wechselwirkungen dieser Verbindungen nachweisen: Unter anderem wurden Thiophen und Benzothiophen nur in Gegenwart bestimmter Cosubstrate abgebaut, der Benzofuran-Abbau wurde durch bestimmte Cosubstrate positiv beeinflusst. Gleichzeitig zeigten die Heteroaromaten hemmende

Wirkungen auf den Abbau einiger Mono- und Diaromaten. LANTZ et al. (1997) wiesen die Hemmung verschiedener Teerölbestandteile (Hetero-PAK, Phenole) auf die Aktivität des Fluoranthen-abbauenden Mikroorganismus *Sphingomonas paucimobilis* EPA 505 nach.

Von den eingangs erwähnten vier Klassen von Teerölinhaltsstoffen werden im Rahmen von Bodensanierungsmaßnahmen üblicherweise 6 PAK nach der deutschen TRINKWASSERVERORDNUNG (1990) bzw. 16 PAK nach der Priority Pollutant List der US-amerikanischen Environmental Protection Agency (EPA) untersucht. Weitere in der Praxis häufig angewendete Verfahren sind eine summarische Bestimmung der Phenole in Anlehnung an DIN 38 409 - H16 (1984) sowie die Bestimmung der BTX-Kohlenwasserstoffe in Anlehnung an DIN 38 407 - F9 (1991). Heterozyklische PAK werden in der Praxis üblicherweise nicht untersucht, obwohl diese Verbindungen wie die PAK toxikologisch relevant sind. LATER et al. (1982) wiesen nach, daß die Fraktion basischer Stickstoffaromaten der überwiegende Träger mutagener Eigenschaften von Teerölen ist. Die durch das Heteroatom bedingte, im Vergleich zu den PAK höhere Polarität der Hetero-PAK bewirkt daneben, daß von diesen Verbindungen eine erhöhte Grundwassergefährdung ausgeht. Über die Abbaubarkeit einzelner Hetero-PAK in Kulturmedien oder in Grundwasser - beispielsweise Chinolin, Indol, Carbazol, Dibenzothiophen und Dibenzofuran - liegen Kenntnisse vor (ENSLEY, 1984; PEREIRA et al., 1987; GRIFOLL et al., 1995; KAISER et al., 1996; JOHANSEN et al., 1997). Aus Studien in marinen Ökosystemen ist bekannt, daß insbesondere schwefelhaltige PAK eine hohe Persistenz aufweisen (KUHN und SUFLITA, 1989; FEDORAK, 1990) und in diesem Zusammenhang bereits als Marker für Rohölverunreinigungen vorgeschlagen wurden (FRIOCOURT et al., 1982). Der mikrobielle Abbau von Hetero-PAK im Boden wurde bisher nur vereinzelt untersucht (GROSSER et al., 1991; MUELLER et al., 1991; GROSSER et al., 1995).

Nicht nur das Abbaupotential bestimmter Mikroorganismen gegenüber PAK, sondern auch die genauen Abbauwege sind unter Kulturbedingungen für viele zwei- bis vierkernige PAK bekannt (CERNIGLIA, 1984; GIBSON und SUBRAMANIAN, 1984; CERNIGLIA, 1992). Auch die Abbauwege einiger zwei- und dreikerniger Hetero-PAK sind in

Flüssigkulturen aufgeklärt worden (ENSLEY, 1984; PEREIRA et al., 1987; KAISER et al., 1996). Allgemein können beim Abbau polyaromatischer Verbindungen drei verschiedene Stoffwechselwege unterschieden werden (MAHRO und KÄSTNER, 1993) (*Abb. 3*): Bei der bakteriellen *vollständigen Mineralisierung* zu Kohlendioxid, Wasser und Biomasse wird der aromatische Ring durch eine Dioxygenase zum *cis*-Dihydrodiol umgesetzt, das durch eine Dehydrogenase zum Dihydroxy-Derivat rearomatisiert wird. Durch eine weitere Dioxygenierung kommt es zur Ringspaltung; weitere Zwischenprodukte beim Abbau zum Catechol sind aromatische Hydroxycarbonsäuren. Bei der *cometabolischen Transformation* durch Pilze wird der aromatische Ring durch eine Monooxygenase- und Epoxidhydratase-katalysierte Reaktion zum *trans*-Dihydrodiol umgesetzt. Die weitere Oxidation kommt häufig schnell zum Erliegen, so daß Dihydrodirole, Dihydroxy-PAK und Chinone akkumulieren können. Bei der *unspezifischen radikalischen Oxidation* durch Weißfäulepilze werden die PAK durch substratunspezifische extrazelluläre Ligninasen (Peroxidasen) umgesetzt. In diesem Zusammenhang können chinoide Abbauprodukte auftreten oder es kann zu einer Polymerisation kommen.

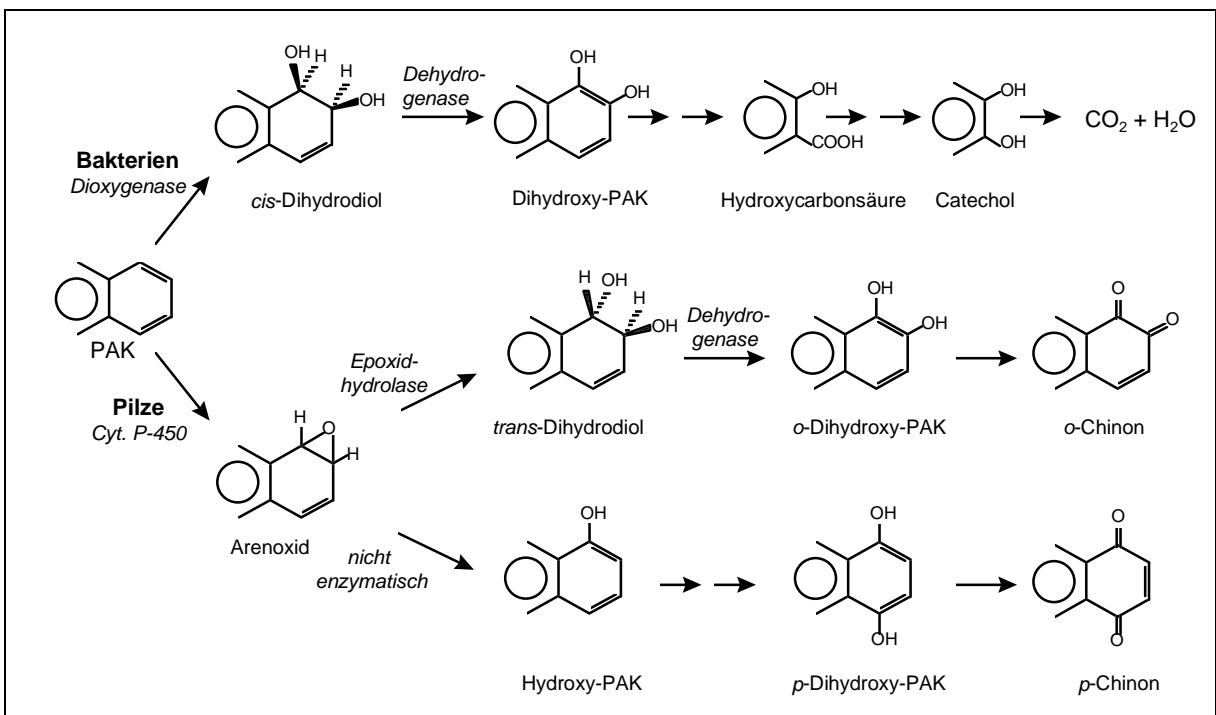


Abb. 3: PAK-Abbaupfade durch Bakterien und Pilze (zusammengefaßt nach MAHRO und KÄSTNER, 1993)

Durch Untersuchung der Abbauewege von einzelnen PAK und PAK-Gemischen in verschiedenen Modellböden zeigten WISCHMANN et al. (1996) sowie WISCHMANN und STEINHART (1997), daß die autochthone Bodenmikroflora dieselben bzw. vergleichbare Abbauewege wie die in Kulturmedien beschriebenen nutzt. Als extrahierbare Metaboliten wurden überwiegend mittelpolare Verbindungen mit Keton- oder Chinonstruktur sowie Monohydroxyverbindungen identifiziert. Sowohl Konzentration als auch Persistenz der extrahierbaren Metaboliten sind von der Bodenart abhängig (WISCHMANN und STEINHART, 1997): In einem mit Kompost supplementierten Oberboden (Ah-Horizont) wurden höhere maximale Konzentrationen an extrahierbaren Metaboliten nachgewiesen als in den nichtsupplementierten Ansätzen, hierbei handelte es sich jedoch um kurzzeitige Maxima, die gut mit der maximalen PAK-Abbaurrate korrelierten. Dagegen waren die Metaboliten in dem reinen Ah-Horizont deutlich persistenter. Untersuchungen zur Bildung von Hetero-PAK-Metaboliten in Böden liegen nicht vor.

Aus Studien an höheren Lebewesen ist bekannt, daß nicht die PAK selbst kanzerogen sind, sondern das eigentliche kanzerogene Potential erst durch metabolische Aktivierung entsteht. Diese führt wie bei der cometabolischen Transformation der Pilze über ein Epoxid zum *trans*-Dihydrodiol, das wiederum epoxidiert wird und in dieser Form das kanzerogene Agens darstellt (HARVEY, 1991). Seit längerer Zeit wird daher befürchtet, daß die Anreicherung von PAK-Metaboliten eine zunehmende Toxizität des Bodens bewirken kann. Die biologische Wirksamkeit von Stoffen in einem bestimmten Ökosystem läßt sich mit Hilfe ökotoxikologischer Testmethoden erfassen. Hier stellen Organismen, wie z.B. Bakterien, Daphnien, Fische, Regenwürmer oder auch höhere Pflanzen, die Indikatoren für stoffliche Belastungen dar (REITER und SCHWEDT, 1995). Solche Biotests haben den Vorteil, daß sie sowohl toxikologische Summenwirkungen von einzeln mit chemischer Analytik nicht mehr nachweisbaren Kontaminanten als auch Kombinationswirkungen erfassen können. Daneben können Gefährdungen, die von nicht erwarteten Kontaminanten ausgehen, erkannt werden. Biotests ermöglichen so eine summarische Beurteilung der Kontamination über Wirkdaten (AHLF, 1995). Bakterien sind aufgrund ihrer kurzen Generationszeit, der hohen Stoffwechselaktivität und der dadurch bedingten kurzen Ansprechzeit auf toxische Stoffe ideale Testorganismen (PUDILL, 1992). Ein standar-

disierter Bakterientest für die Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung ist der Leuchtbakterientest mit *Photobacterium phosphoreum* (DIN 38 412-L 34, 1989), der kommerziell als Test-Kit erhältlich ist (Microtox[®], Microbics). Dieses marine, halophile Bakterium besitzt die Fähigkeit, einen Teil seiner Stoffwechselenergie in Biolumineszenz, eine enzymkatalysierte Chemolumineszenz, umzuwandeln. Wird der Bakterienstoffwechsel durch toxische Stoffe beeinträchtigt, kommt es zur Verringerung der Biolumineszenz, die die Meßgröße des Tests darstellt und ein Maß für die Toxizität ist (LÜMMEN, 1988; SCHEIBEL et al., 1991). Wäßrige Eluate und Lösungsmittel-extrakte von Bodenproben konnten bereits erfolgreich im Leucht-bakterienhemmtest eingesetzt werden (BISA, 1991; SCHEIBEL et al., 1991; REITER und SCHWEDT, 1995). Neben der Bewertung komplexer Umweltmatrizes hat der Leucht-bakterientest auch bei der Untersuchung von Einzelsubstanzen Anwendung gefun-den.

In *Tab. 1* sind exemplarisch bekannte Effektkonzentrationen, bei denen eine 50%ige Lumineszenzhemmung (EC 50-Werte) eintritt, für einige PAK, Hetero-PAK und Metaboliten dargestellt. Deutlich wird die geringe Vergleichbarkeit solcher Daten anhand der um bis zu eine Zehner-Potenz differierenden EC 50-Werte verschiede-ner Datenquellen für ein und dieselbe Substanz. Ursachen können Testbedingungen wie Inkubationszeit sowie Art und Konzentration der verwendeten Lösungsvermittler sein. Bei einem Vergleich von EC 50-Werten der Ausgangsverbindungen und Meta-boliten derselben Datenquelle ist ersichtlich, daß die Umsetzung von PAK oder Hetero-PAK zu ihren Metaboliten je nach Substanz, aber auch in Abhängigkeit des

Tab. 1: Effektkonzentrationen (EC 50) [mg/L] von PAK, Hetero-PAK und Metaboliten

Substanz	EC 50 [mg/L]	Substanz	EC 50 [mg/L]
Fluoren	0,50 ¹ ; 3,2 ² ; 10,1 ³	1-Hydroxy-2-naphthoesäure	8,8 ³
Phenanthren	0,48 ¹ ; 0,53 ^{2,4} ; 0,049 ⁵ ; 2,1 ³	Anthracen	0,64 ¹ ; 33,4 ² ; 31,0 ⁶
9,10-Phenanthrenchinon	0,067 ⁵ ; 0,10 ⁴ ; 2,1 ³	Dibenzothiophen	0,11 ⁵ ; 9,0 ³ ; 0,16 ⁷
		Dibenzofuran	0,86 ⁵ ; 9,7 ³

¹ JOHNSON und LONG (1998); 5 Minuten Inkubation, < 5 % Dimethylsulfoxid

² JACOBS et al. (1993); 15 Minuten Inkubation, 5 % Dimethylsulfoxid

³ AHLF (1998); 30 Minuten Inkubation, ≤ 3 % Methanol

⁴ MCCONKEY et al. (1997); 15 Minuten Inkubation, ≤ 0,1 % Dimethylsulfoxid

⁵ KAISER und PALABRICA (1991); 15 Minuten Inkubation

⁶ ZINK (1995); keine Angaben zur Durchführung

⁷ SEYMOUR et al. (1997); 15 Minuten Inkubation

Metabolisierungspfad, sowohl mit einer Minderung als auch einer Steigerung der Toxizität einhergehen kann. So nimmt z.B. die Toxizität bei der Metabolisierung von Phenanthren zu 9,10-Phenanthrenchinon zu (McCONKEY et al., 1997), bei der Umsetzung zu 1-Hydroxy-2-naphthoesäure ab (AHLF, 1998). Auch von anderen biologischen Testsystemen wie der Wasserlinse (*Lemna gibba*) oder Grünalgen (*Selenastrum capricornutum*) ist bekannt, daß die Oxidation von PAK zu einer erhöhten Toxizität führen kann (GALA und GIESY, 1992; REN et al., 1994). BELKIN et al. (1994) untersuchten die Entwicklung von Toxizität und Genotoxizität beim PAK-Abbau in einem Lysimeter. Während im Laufe des PAK-Abbaus ein Anstieg der bakteriellen Genotoxizität festgestellt wurde, zeigte der Microtox[®]-Test zum Teil eine Toxizitätsabnahme. Studien zum Abbauverhalten von Teeröl-PAK und Hetero-PAK, in denen die chemische Analytik von PAK, Hetero-PAK und Metaboliten mit Ergebnissen des Microtox -Tests korreliert werden, liegen nicht vor.

2 Problemstellung und Arbeitsplan

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zur Beantwortung der folgenden, in Kapitel 1 beschriebenen nicht oder nur teilweise geklärten Fragen auf dem Gebiet der biologischen Bodensanierung zu erarbeiten:

1. Wechselwirkungen von PAK und Hetero-PAK beim mikrobiellen Abbau im Boden hinsichtlich Ausgangsverbindungen und Metabolitenbildung
2. Abbaubarkeit von Hetero-PAK (N,S,O) im Boden einschließlich Metabolitenbildung, Einfluß des Hetero-Atoms auf die biologische Abbaubarkeit
3. Korrelation von chemischer Analytik (Ausgangsverbindungen und Metaboliten) und ökotoxikologischen Testmethoden (Microtox[®]-Test)

Zur Umsetzung dieser Ziele sollten zunächst bestehende Analysenmethoden zur Bestimmung von PAK und ihren Metaboliten (LANGBEHN und STEINHART, 1994; WISCHMANN et al., 1996) weiterentwickelt werden, um eine simultane Bestimmung von PAK, Hetero-PAK und ihren Metaboliten zu gewährleisten. Dabei war zu beachten, daß die Hetero-PAK nach ihren unterschiedlichen chemischen Eigenschaften in verschiedene Gruppen einzuteilen sind:

- weniger polare schwefel- und sauerstoffhaltige Hetero-PAK (S-PAK, O-PAK)
- polarere stickstoffhaltige und stickstoffsubstituierte Hetero-PAK (N-PAK):
 - a) neutrale Verbindungen: 5-Ring N-PAK vom Carbazol-Typ und Cyano-PAK
 - b) basische Verbindungen: 6-Ring N-PAK vom Chinolin-Typ und Amino-PAK

Zur Trennung dieser Substanzklassen sollten verschiedene flüssigchromatographische und gaschromatographische Verfahren entwickelt werden. Eine bestehende Festphasenextraktion zur Fraktionierung von PAK- und PAK-Metaboliten-haltigen Bodenextrakten sollte weiterentwickelt und das Elutionsprofil an die gleichzeitige Fraktionierung von Hetero-PAK und Hetero-PAK-Metaboliten adaptiert werden. Um die komplexe Fraktion neutraler und basischer N-PAK sowie neutraler Metaboliten weiter auftrennen zu können, sollte eine Ionenaustauschchromatographie im Kartuschenmaßstab entwickelt werden. Weiterhin sollten zwei Bodenextraktions-

verfahren optimiert werden. Die gesamte Methodik sollte für das später eingesetzte Modellbodensystem validiert und ihre Anwendbarkeit an verschiedenen Teerölen und realen Teerölastlasten geprüft werden. Die Methodik sollte weiterhin Anwendung auf die nachfolgend beschriebenen Abbaustudien finden:

Um die Wechselwirkungen von PAK und Hetero-PAK zu untersuchen, sollte ein PAK-kontaminiertes, ein Hetero-PAK-kontaminiertes und ein PAK- und Hetero-PAK-kontaminiertes Modellboden/Kompost-System eingesetzt werden. Für die Dotierung sollten neun typische Teeröl-PAK und/oder zehn typische Teeröl-Hetero-PAK dem Boden entsprechend einer 1 %igen Teerölkontamination zugesetzt werden. Der biologische Abbau durch die autochthone Mikroflora sollte über einen Zeitraum von 29 Wochen untersucht werden. Dabei sollten der PAK- und Hetero-PAK-Abbau sowie die Metabolitenbildung verfolgt und mit Ergebnissen des Leuchtbakterienhemmtests korreliert werden. Wechselwirkungen von PAK und Hetero-PAK sollten durch Vergleich der Abbauraten in den verschiedenen kontaminierten Bodensystemen bestimmt und statistisch abgesichert werden.

Der Einfluß des Hetero-Atoms auf die biologische Abbaubarkeit von Aromaten sollte anhand eines Modellboden/Kompost-Systems, das mit vier strukturanalogen PAK und Hetero-PAK einzeln und in Mischung kontaminiert wurde, untersucht werden. Die strukturanalogen Verbindungen sollten sich lediglich durch den Ersatz eines Kohlenstoffatoms durch ein Hetero-Atom im aromatischen Ringsystem unterscheiden. Der biologische Abbau durch die autochthone Mikroflora sowie die Bildung von Metaboliten sollte über einen Zeitraum von 12 Wochen untersucht werden. Die Abbaureihenfolge der strukturanalogen Verbindungen sollte festgelegt werden, Wechselwirkungen durch den Vergleich der Abbauraten sollten bestimmt und ebenfalls statistisch abgesichert werden.

3 Untersuchungsmaterial und Referenzsubstanzen

3.1 Modellboden

Als Modellboden wurde im Rahmen der Methodenentwicklung und der Abbaustudien ein schwach lehmiger Sand (Ah-Horizont; A: Oberbodenschicht, h: humusreich) gemischt mit Hausmüllkompost (Rottegrad 5) im Verhältnis 9:1 (m:m) eingesetzt. Das Gemisch hatte einen Gesamtkohlenstoffgehalt von 2,6 % und eine maximale Wasserhaltekapazität $WHK_{max.}$ von 45,9 % (weitere Bodenparameter s. 9.4.1). Dieses Material wurde luftgetrocknet, gesiebt (Boden: ≤ 2 mm, Kompost: ≤ 4 mm) und mit einem Wassergehalt von 55 % $WHK_{max.}$ für die Versuche eingesetzt.

Für die Methodenentwicklung und Validierung wurde für jede zu untersuchende Parallelbestimmung separat eine 20 g Feuchtgewicht entsprechende Menge trockenen Bodenmaterials mit PAK, Hetero-PAK und Metaboliten in Dichlormethan dotiert. Das Lösungsmittel wurde vorsichtig mit Stickstoff abgeblasen und der Wassergehalt wurde eingestellt. Zur Einstellung des Sorptionsgleichgewichts wurden die Proben vor der Extraktion 16 h im Dunkeln gelagert.

3.2 Reale Altlasten

Mittels der an den Modellboden validierten Methodik wurden Proben von fünf verschiedenen teerölkontaminierten Standorten untersucht, die sich in Bodenart und Kontaminationsgrad deutlich unterschieden (Angaben zu den Standorten s. 9.4.2).

3.3 Modellverbindungen

Für die Methodenentwicklung und Validierung wurden PAK mit 2 bis 6 kondensierten Ringen und Hetero-PAK mit 2 bis 5 Ringen eingesetzt. Die Auswahl richtete sich nach dem Vorkommen der Verbindungen im Teeröl und einer möglichst repräsentativen Zusammensetzung der Modellverbindungen. Als Modellmetaboliten wurden oxidierte PAK und Hetero-PAK eingesetzt, die in Kulturmedien oder im Boden bereits als Abbauprodukte nachgewiesen werden konnten (CERNIGLIA, 1984; ENSLEY, 1984; GIBSON und SUBRAMANIAN, 1984; PEREIRA et al., 1987; KAISER et al., 1996;

WISCHMANN und STEINHART, 1997). Die Strukturformeln der eingesetzten Modellmetaboliten sind in *Abb. 4* dargestellt.

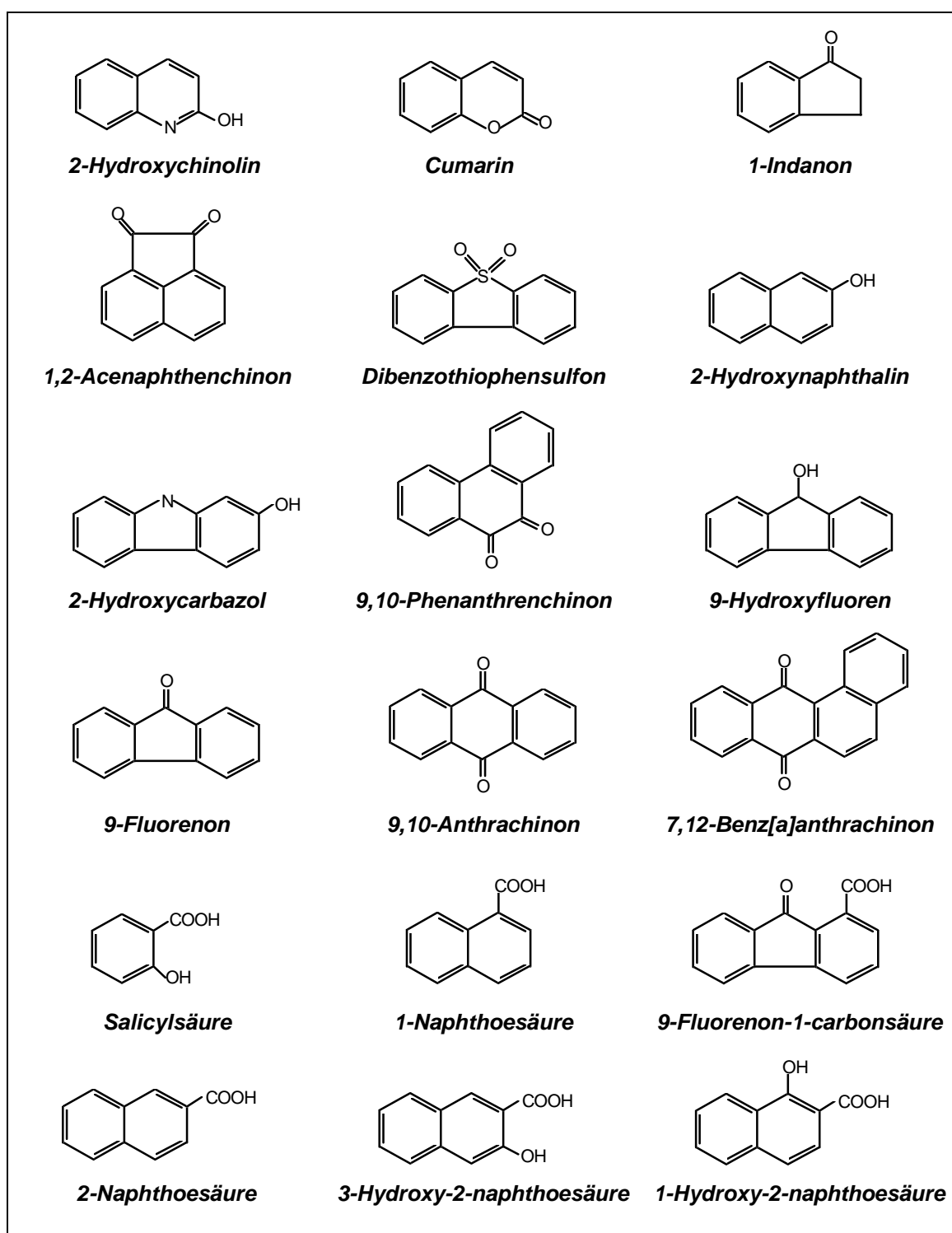


Abb. 4: Für Methodenentwicklung und Validierung eingesetzte Modellmetaboliten

4 Analytische Methoden

4.1 Methodenentwicklung

Im Rahmen der Methodenentwicklung wurden verschiedene Teilschritte (Extraktion, Fraktionierung/Clean-up und chromatographische Trennmethoden) entwickelt bzw. optimiert, die je nach Bedarf unterschiedlich zusammengesetzt werden konnten.

4.1.1 Extraktionsverfahren

Häufig angewendete Verfahren zur Extraktion von PAK aus Bodenproben sind die Soxhlet-Extraktion (KRENGEL-ROTHENSEE, 1993; PASCHKE, 1993) und die Ultraschall-Extraktion (BUNDT, 1991; ESCHENBACH et al., 1994; WISCHMANN et al., 1996).

Werden als Extraktionsmittel unpolare bis mittelpolare Lösungsmittel wie *n*-Hexan, Cyclohexan, Toluol, Dichlormethan, Aceton sowie Gemische dieser Lösungsmittel eingesetzt, wird der Extraktion des Bodens eine Trocknung mit Natriumsulfat vorangestellt. Die Einsatzmöglichkeit von Dichlormethan zur simultanen Extraktion von Substanzen eines breiten Polaritätsspektrums ist bereits aus verschiedenen Arbeiten bekannt: MUELLER et al. (1991) extrahierten PAK und Hetero-PAK aus Bodenproben mittels Soxhlet-Extraktion und Dichlormethan. Die Soxhlet-Extraktion von PAK, Hetero-PAK und oxidierten PAK aus Luftstaub mit Dichlormethan beschrieben BODZEK et al. (1993). Während für die PAK-Analytik eine einfache Ultraschall-Extraktion ausreicht, ist die Extraktion von PAK und PAK-Metaboliten unter Verwendung von Dichlormethan nur mittels mehrfacher Wiederholung des Extraktionsschrittes möglich (WISCHMANN et al., 1996). Als vorteilhaft für die Extraktion von Substanzen mit sauren funktionellen Gruppen hat sich das Ansäuern der Bodenproben vor der Trocknung erwiesen, wodurch die Eigendissoziation der Substanzen zurückgedrängt und die Affinität zum unpolaren Extraktionsmittel erhöht wird (LANGBEHN und STEINHART, 1994; WISCHMANN et al., 1996).

Bei Alterung einer Kontamination können PAK teilweise so stark an die Bodenmatrix sorbiert oder in das Huminstoffpolymer eingeschlossen werden, daß eine vollständige Extraktion mit organischen Lösungsmitteln nicht mehr möglich ist. Durch eine alkalische Hydrolyse der Bodenmatrix können die Charge-Transfer-Komplexe der

PAK gelöst sowie Esterbindungen des Huminstoffpolymers gespalten werden. ESCHENBACH et al. (1994) erreichten im Rahmen eines PAK-Abbauversuches durch alkalische Hydrolyse der Bodenmatrix 20 bis 40 % höhere PAK-Extraktionsausbeuten als durch Lösungsmittelextraktion. Im folgenden wurden Soxhlet- und Ultraschall-Extraktion an die Problematik der Arbeit adaptiert.

Gemeinsame Extraktion von PAK, Hetero-PAK und Metaboliten mittels Soxhlet-Extraktion

Für die gemeinsame Extraktion von PAK, Hetero-PAK und Metaboliten wurde aufgrund der einfachen Handhabbarkeit die Soxhlet-Extraktion mit Dichlormethan gewählt. Die für die Extraktion von sauren Metaboliten erwähnte vorteilhafte Ansäuerung der Bodenproben kann zu einer Protonierung und dadurch verschlechterten Extrahierbarkeit der basischen N-PAK führen. Daher wurde der Einfluß von Ansäuerung und Alkalisierung der Bodenmatrix vor der Extraktion auf die Extraktionsausbeute dieser Verbindungen überprüft.

Es zeigte sich, daß der pH-Wert vor der Extraktion nur einen geringen Einfluß auf die Extraktionsausbeute der basischen N-PAK hat. Bereits bei Vorbehandlung des Bodens mit 1 mL Salzsäure (1 mol/L) ergaben sich hohe Wiederfindungsraten von 78 bis 94 %, bei Alkalisierung mit 1 mL Kalilauge (1 mol/L) wurden zwischen 77 und 105 % wiedergefunden (Einzelwerte nicht im Anhang). Die gemeinsame Soxhlet-Extraktion von PAK, Hetero-PAK und Metaboliten konnte somit nach Ansäuerung des Bodens durchgeführt werden (Arbeitsvorschrift s. 9.3.1). Damit die Analyten im eingeeengten Extrakt in einem unpolaren Lösungsmittel vorlagen, von dem einige mL auf die Festphasenextraktionssäule (s. 4.1.2) gegeben werden konnten, wurden in den Extraktionskolben 10 mL *n*-Heptan vorgelegt.

Schnellextraktion ausgewählter PAK und Hetero-PAK mittels einfacher Ultraschall-Extraktion

Für die Extraktion der strukturanalogen PAK und Hetero-PAK (s. 6) wurde aufgrund ihrer Schnelligkeit und der dadurch bedingten Möglichkeit, eine größere Anzahl an Parallelbestimmungen durchzuführen, die einfache Ultraschall-Extraktion gewählt. Um möglichst optimale Extraktionsbedingungen für die ausgewählten Verbindungen

Fluoren, Carbazol, Dibenzothiophen und Dibenzofuran zu erzielen, wurden die Extraktionsausbeuten für die Verbindungen bei Einsatz dreier üblicher PAK-Extraktionsmittel - Toluol/Aceton (1/1; v/v), Cyclohexan/Aceton (1/1; v/v) und Dichlormethan - verglichen. Alle drei Extraktionsmittel lieferten für die ausgewählten Verbindungen Extraktionsausbeuten zwischen 91 und 102 %. Nach Extraktion mit Toluol/Aceton traten jedoch bei der direkt nach Extraktverdünnung durchgeführten HPLC-Bestimmung Interferenzen von Toluol und Carbazol auf, so daß Carbazol nicht ausgewertet werden konnte. Dichlormethan wurde als Extraktionsmittel gewählt, da es bei geringen Analyt-Gehalten leichter konzentrierbar ist als Cyclohexan/Aceton. Daneben war beim reinen Lösungsmittel Dichlormethan im Gegensatz zu den Lösungsmittelgemischen ein Recycling mittels Destillation möglich. Die Schnellextraktion von PAK und Hetero-PAK konnte somit mittels einfacher Ultraschall-Extraktion mit Dichlormethan durchgeführt werden (Arbeitsvorschrift s. 9.3.2).

Alkalische Hydrolyse der Bodenmatrix

Die alkalische Hydrolyse wurde während der Abbauversuche an ausgewählten Probenahmezeitpunkten in Anlehnung an Arbeiten von ESCHENBACH et al. (1994) und WISCHMANN und STEINHART (1997) durchgeführt (Arbeitsvorschrift s. 9.3.3).

4.1.2 Fraktionierung - Clean-up

Häufig angewendete Verfahren zur Isolierung und Fraktionierung von PAK, Hetero-PAK und Metaboliten aus Extrakten komplexer Umweltmatrizes sind die Säulenchromatographie (SC), die durch Miniaturisierung zur Festphasenextraktion (Solid Phase Extraction, SPE) weiterentwickelt wurde, sowie die Flüssig-Flüssig-Extraktion. Zur Isolierung von Polyaromaten aus unpolaren organischen Extrakten eignen sich als Sorbens insbesondere Aluminiumoxid und Kieselgel. LATER et al. (1981) führten eine säulenchromatographische Trennung von Teerölen in die Fraktionen der Aliphaten, PAK, N-PAK und Hydroxy-PAK an Aluminiumoxid durch. KRONE et al. (1986) isolierten N-PAK säulenchromatographisch aus Sediment-Extrakten an Kieselgel und Aluminiumoxid. HARTMANN (1996) nutzte ebenfalls eine Kombination dieser Sorbentien zur Isolierung von PAK aus Bodenextrakten mittels SPE. BUNDT et al. (1991) isolierten PAK aus Dieselöl im SPE-Maßstab an aktiviertem Kieselgel.

Durch eine Desaktivierung des Kieselgels mit Wasser gelingt eine Fraktionierung von PAK und polaren Derivaten: So trennten BODZEK et al. (1993) PAK, N-PAK und oxidierte PAK aus Luftstaub an mit 10 % Wasser desaktiviertem Kieselgel. WISCHMANN et al. (1996) gelang eine Fraktionierung von PAK und PAK-Metaboliten an mit 6 % Wasser desaktiviertem Kieselgel. LANGBEHN und STEINHART (1994) nutzten eine Kombination von Kieselgel (10 % Wasser) und basischem Aluminiumoxid zur zusätzlichen Abtrennung saurer Metaboliten. Eine Trennung der PAK und S-PAK, die eine ähnliche Polarität aufweisen, gelingt an den genannten Sorbentien nur indirekt durch oxidative Überführung der S-PAK in ihre Sulfone, die sich mittels SC oder SPE abtrennen lassen (DRUSHEL und SOMMERS, 1967; BUNDT et al., 1992). Diese Methodik ist jedoch nur unter Vorbehalt anwendbar, da es zu einer Reihe von Nebenprodukten kommen kann (ANDERSSON, 1992).

Die Isolierung von PAK mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion basiert auf der Überführung der unpolaren PAK aus der Phase eines unpolaren Lösungsmittels (*n*-Hexan, Cyclohexan) in eine polare Phase durch Bildung von Charge-Transfer-Komplexen zwischen PAK und nucleophilen aprotischen Lösungsmitteln wie Dimethylformamid (AAMOT et al., 1987) oder N-Methyl-2-pyrrolidon (PASCHKE et al., 1992). Durch Zugabe von Wasser werden diese Komplexe zerstört und die PAK in die unpolare Phase zurücküberführt. Eine gängige Methode zur Fraktionierung von PAK und Hetero-PAK stellt die Flüssig-Flüssig-Extraktion mit wechselndem pH-Wert der wässrigen Phase dar. LOPEZ-AVILA et al. (1988) bzw. MUELLER et al. (1991) fraktionierten teeröhlhaltige Bodenextrakte durch aufeinanderfolgende Extraktion mit Kalium- bzw. Natronlauge und Schwefelsäure in die drei Fraktionen der Säuren bzw. Phenole, der N-PAK und PAK, sowie der S-PAK und O-PAK. Eine Isolierung basischer N-PAK gelingt durch Extraktion mit wässrigen Säuren (ADAMS und GLAM, 1984; ONUSKA und TERRY, 1989; BRUMLEY et al., 1991). Die genannten Verfahren ermöglichen jedoch keine vollständige Trennung der basischen und neutralen N-PAK. Eine Möglichkeit zur selektiven Trennung basischer und neutraler N-PAK stellt die Kationenaustauschchromatographie dar. KLIMISCH und BEISS (1976) sowie GRIMMER (1983) setzten Kationenaustauscher auf Dextran-Basis (Sephadex[®] C-25) ein und trennten die genannten Verbindungen erfolgreich. Entsprechende Trennverfahren im miniaturisierten SPE-Maßstab existieren nicht.

SPE-Methode zur Fraktionierung von PAK, Hetero-PAK und Metaboliten

Ausgehend von einer SPE-Methode zur Isolierung von Stoffwechselprodukten des Mineralölabbaus an einer Kombination von desaktiviertem Kieselgel (10 % Wasser) und basischem Aluminiumoxid (LANGBEHN und STEINHART, 1994) wurde eine SPE-Methode entwickelt, die eine Fraktionierung der Teerölinhaltsstoffe und Metaboliten in die drei Fraktionen der PAK, S-PAK und O-PAK, der neutralen Metaboliten und N-PAK sowie der sauren Metaboliten ermöglicht (Abb. 5). Anstelle des Aluminiumoxids wurde zur Abtrennung der sauren Metaboliten ein stark basischer Anionenaustauscher auf Kieselgelbasis (Chromabond[®] SB, Macherey & Nagel, Düren) eingesetzt. Die Fraktionierung gelang nach Aufgabe des eingeeengten Soxhlet-Extrakts in *n*-Heptan durch Elution mit Lösungsmitteln steigender Polarität (*n*-Hexan, Dichlormethan, Methanol, Salzsäure in Methanol). Die Elution der Säuren konnte im Gegensatz zum Aluminiumoxid bereits mit niedrigen Säurekonzentrationen (0,05 N Salzsäure in Methanol) erreicht werden, so daß eine Methylierung der Substanzen auf der SPE-Kartusche vermieden werden konnte (Arbeitsvorschrift s. 9.3.4).

Kationenaustauschchromatographie zur Trennung von neutralen N-PAK und Metaboliten sowie basischen N-PAK

Für die Trennung der bei der SPE in Fraktion 2 gelangenden N-PAK und neutralen Metaboliten wurde eine Ionenaustauschchromatographie im Kartuschenmaßstab an einem stark sauren Kationenaustauscher auf Kieselgelbasis entwickelt (Abb. 5). Fraktion 2 der SPE wurde komplett auf diese Kartusche überführt. Während neutrale N-PAK und Metaboliten mit dem Totvolumen und Methanol von der Säule gewaschen wurden, gelang die Elution der basischen N-PAK erst bei Zugabe von Ammoniak (Arbeitsvorschrift s. 9.3.5).

4.1.3 Trimethylsilylierung von Metaboliten mit Hydroxy- und Carboxylgruppen

Um eine für die Gaschromatographie ausreichende Flüchtigkeit von Metaboliten mit Hydroxy- und Carboxylgruppen zu erreichen, war eine Derivatisierung dieser Verbindungen notwendig. Die von WISCHMANN et al. (1996) beschriebene Trimethylsilylierung mit N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid/Trimethylchlorsilan (BSTFA/TMCS)

(99/1; v/v) wurde hinsichtlich Reagenzmenge, Umsetzungszeit und Temperatur optimiert (Arbeitsvorschrift s. 9.3.6).

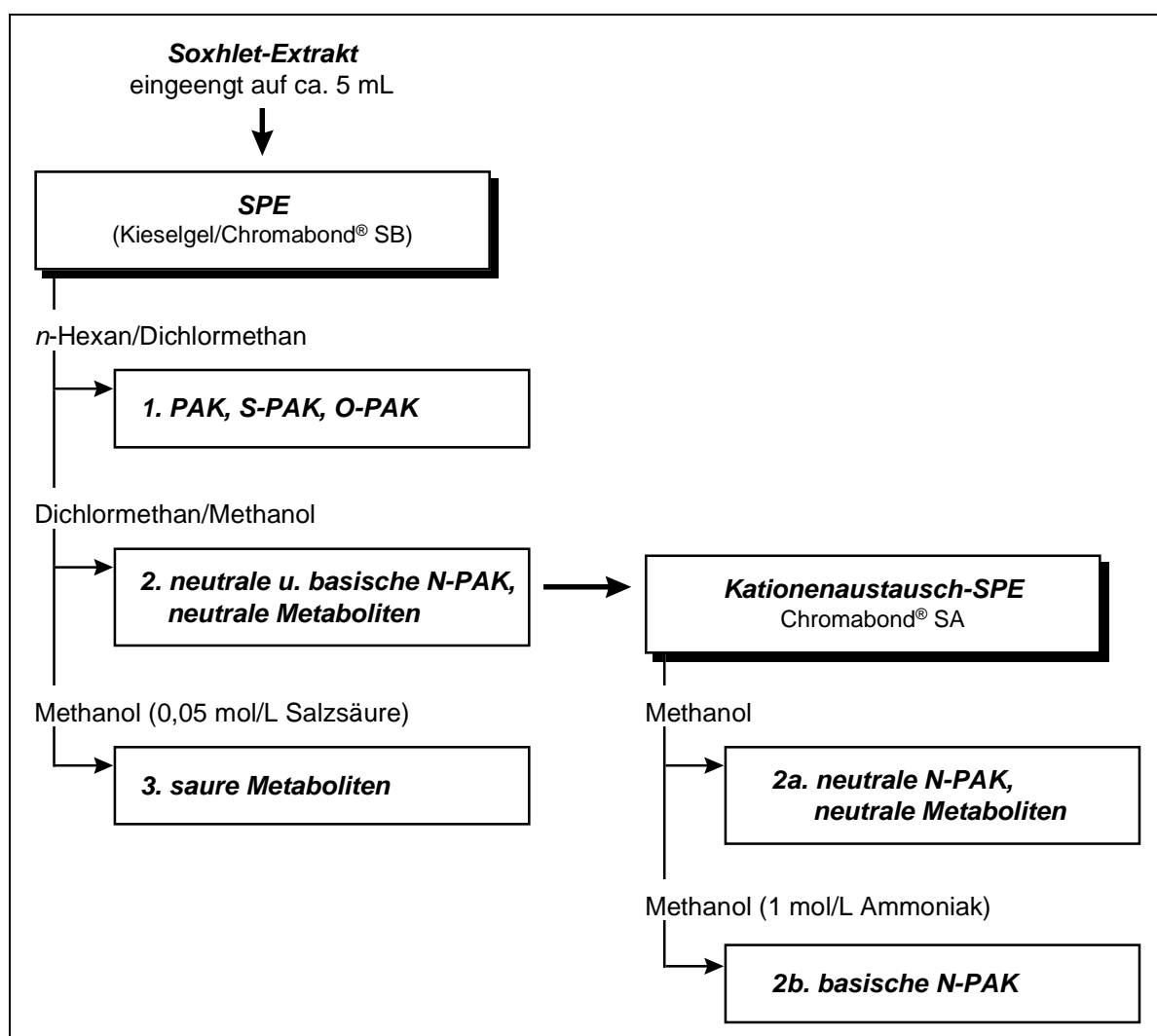


Abb. 5: Fraktionierung von PAK, Hetero-PAK und Metaboliten

4.1.4 Chromatographische Trennmethode

Für die Analytik von PAK können alle modernen Chromatographieverfahren angewendet werden. So kommen in standardisierten Methoden die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Fluoreszenzdetektion (DIN 38 407 - F8, 1995) und die Dünnschichtchromatographie (TLC) (DIN 38 409 - H13, 1981) zum Einsatz. Nach einem Vorschlag für eine DIN-Methode soll die Hochleistungs-Dünnschichtchromatographie (HPTLC) für die PAK-Analytik Anwendung finden (DIN 38 407 - F7, 1991). Für die Trennung der PAK komplexer Teeröl-Gemische reicht das Auflösungs-

vermögen der genannten chromatographischen Methoden jedoch nicht aus. Insbesondere für die simultane Bestimmung der ebenfalls unpolaren und daher von den PAK nicht abtrennbaren S-PAK und O-PAK aus Teeröl ist die hochauflösende Kapillar-Gaschromatographie (GC) an Methylphenylpolysiloxan-Phasen geeignet (GRIMMER et al., 1983). Gekoppelt mit der GC werden Flammenionisations-Detektoren (FID) und massenselektive Detektoren (MSD) eingesetzt; S-PAK lassen sich auch spezifisch mittels Flammenphotometer-Detektor (FPD) erfassen (LATER et al., 1981). Eine neuere Methode zur selektiven element-spezifischen Detektion stellt die Gaschromatographie mit Atom-Emissions-Detektion (AED) dar (ANDERSSON und SCHMID, 1995). Aufgrund der Vielzahl möglicher Isomere wird zur Bestimmung von N-PAK überwiegend die Gaschromatographie eingesetzt. Zur Detektion finden FID, MSD und der selektive Stickstoff-Phosphor-Detektor (NPD) Anwendung (LATER et al., 1981; KRONE et al., 1986, BRUMLEY et al., 1991). Die Trennung einiger neutraler N-PAK und neutraler PAK-Metaboliten ähnlicher Polarität mittels RP-HPLC und

Tab. 2: Angewendete chromatographische Methoden

Versuch / Substanzklasse	Chromatographische Methode
Methodenentwicklung / Validierung	
PAK, S-PAK, O-PAK	GC-FID
neutrale N-PAK, neutrale Metaboliten	HPLC-DAD
basische N-PAK	HPLC-DAD
saure Metaboliten	HPLC-DAD
Realkontaminationen	
alle Fraktionen	GC-MSD
Abbau eines komplexen PAK/Hetero-PAK-Gemisches	
PAK, S-PAK, O-PAK	GC-FID
neutrale und basische N-PAK	GC-FID
neutrale Metaboliten	HPLC-DAD und GC-MSD
saure Metaboliten	HPLC-DAD und GC-MSD
PAK, S-PAK, O-PAK und N-PAK (alkalische Hydrolysate)	HPLC-DAD
PAK, S-PAK, O-PAK und N-PAK (Methanol-Extrakte)	HPLC-DAD
PAK, S-PAK, O-PAK und N-PAK (wäßrige Eluate)	HPLC-DAD
neutrale und saure Metaboliten (Methanol-Extrakte)	HPLC-DAD
neutrale und saure Metaboliten (wäßrige Eluate)	HPLC-DAD
Abbau strukturanaloger PAK und Hetero-PAK	
PAK, N-PAK, S-PAK, O-PAK	HPLC-DAD
neutrale Metaboliten	HPLC-DAD und GC-MSD
saure Metaboliten	HPLC-DAD und GC-MSD

Diodenarray-Detektion (DAD) unter Verwendung eines ternären Gradienten aus Acetonitril, Methanol und Phosphorsäure wurde von WISCHMANN und STEINHART (1997) beschrieben.

In Anlehnung an bestehende GC- und HPLC-Programme wurden verschiedene Temperatur- und Gradientenprogramme entwickelt. *Tab. 2* gibt einen Überblick, welche chromatographische Methode bei den verschiedenen Versuchen für die jeweiligen Substanzklassen angewendet wurde.

4.1.5 Validierung

Durchführung

Die entwickelte Methode - Soxhlet-Extraktion, SPE, Kationenaustausch-SPE, GC- bzw. HPLC-Bestimmung - wurde für 21 PAK, 22 Hetero-PAK und 18 Metaboliten validiert. Dazu wurde für die eingesetzten Substanzen eine 5-Level-15-Punkt-Grundkalibrierung sowie eine 5-Level-15-Punkt-Matrixkalibrierung durchgeführt. Für die Matrixkalibrierung wurden dotierte Ah-Horizont/Kompost-Proben mittels der entwickelten Methode aufgearbeitet (Arbeitsvorschrift s. 9.3).

Ergebnisse

Die analytischen Kenndaten der validierten Methode sind zusammengefaßt in *Tab. 3* dargestellt. In der Grundkalibrierung wurde mit Korrelationskoeffizienten r zwischen 0,9955 und 1,0000 für alle Verbindungen eine gute bis sehr gute Linearität erreicht. In der Matrixkalibrierung wurden Korrelationskoeffizienten von $r \geq 0,9773$ erreicht mit Ausnahme von 1,2-Acenaphthenchinon, 9,10-Phenanthrenchinon, Salicylsäure und 3-Hydroxy-2-naphthoesäure.

Die Variationskoeffizienten waren mit 0,20 % bis 5,65 % in der Grundkalibrierung geringer als in der Matrixkalibrierung (1,64 % - 22,70 %). Während bei den PAK und Hetero-PAK die niedermolekularen und relativ leichtflüchtigen zweikernigen Verbindungen wie Inden, Naphthalin, Benzofuran, Benzothiophen und Indol besonders hohe Variationskoeffizienten aufwiesen, zeigten bei den Metaboliten Verbindungen mit zwei benachbarten funktionellen Gruppen, wie z.B. 1,2-Acenaphthenchinon oder 9,10-Phenanthrenchinon, die geringste Präzision. Für diese Verbindungen mit

Tab. 3: Zusammenfassung der analytischen Kenndaten der validierten Methode

Analytische Kenndaten	Grundkalibrierung	Matrixkalibrierung
PAK:		
Korrelationskoeffizient r	0,9955 - 0,9998	0,9801 - 0,9993
Variationskoeffizient CV [%]	0,99 - 4,83	1,93 - 10,24
mittlere Wiederfindungsrate WF [%]	-	30,7 - 103,5
Wiederfindungsfunktion: Steigung b	-	0,4710 - 1,0198
Nachweisgrenze NG [mg/kg]	-	n.b.
Hetero-PAK:		
Korrelationskoeffizient r	0,9968 - 1,0000	0,9773 - 0,9994
Variationskoeffizient CV [%]	0,20 - 5,65	1,70 - 22,70
mittlere Wiederfindungsrate WF [%]	-	29,8 - 102,0
Wiederfindungsfunktion: Steigung b	-	0,3926 - 0,9971
Nachweisgrenze NG [mg/kg]	-	0,02 - 1,74
neutrale Metaboliten:		
Korrelationskoeffizient r	0,9985 - 1,0000	0,9659 - 0,9995
Variationskoeffizient CV [%]	0,36 - 3,01	1,64 - 13,57
mittlere Wiederfindungsrate WF [%]	-	31,5 - 96,4
Wiederfindungsfunktion: Steigung b	-	0,2159 - 0,9338
Nachweisgrenze NG [mg/kg]	-	0,12 - 1,55
saure Metaboliten:		
Korrelationskoeffizient r	0,9997 - 1,0000	0,9378 - 0,9981
Variationskoeffizient CV [%]	0,44 - 1,23	3,10 - 18,74
mittlere Wiederfindungsrate WF [%]	-	77,5 - 102,9
Wiederfindungsfunktion: Steigung b	-	0,7549 - 0,9613
Nachweisgrenze NG [mg/kg]	-	0,01 - 0,27
n.b.: nicht bestimmt		

geringer Präzision wurden mit 29,8 bis 60,2 % auch die niedrigsten Wiederfindungsraten erreicht. Insgesamt lagen die mittleren Wiederfindungsraten aller Verbindungen zwischen 29,8 % und 103,5 %. Die Unterschiede in Präzision und Wiederfindung sind anhand der Wiederfindungsfunktionen ausgewählter Hetero-PAK und Metaboliten in *Abb. 6a* und *Abb. 6b* dargestellt. Entsprechend den unterschiedlichen Wiederfindungsraten wurden mit Werten zwischen 0,216 (9,10-Phenanthrenchinon, *Abb. 6b*) und 0,977 (Isochinolin, *Abb. 6a*) sehr unterschiedliche Steigungen der ermittelten Wiederfindungsfunktionen bestimmt.

Als Nachweisgrenze wurde aus der niedrigsten Konzentration der Matrixkalibrierung diejenige Konzentration berechnet, die den dreifachen Wert des Basislinienrauschens ergibt. Beeinflusst durch die unterschiedlichen molaren Extinktionskoeffi-

zienten und Wiederfindungsraten ergaben sich Nachweisgrenzen zwischen 0,01 und 1,74 mg/kg (Einzelergbnisse s. 9.5).

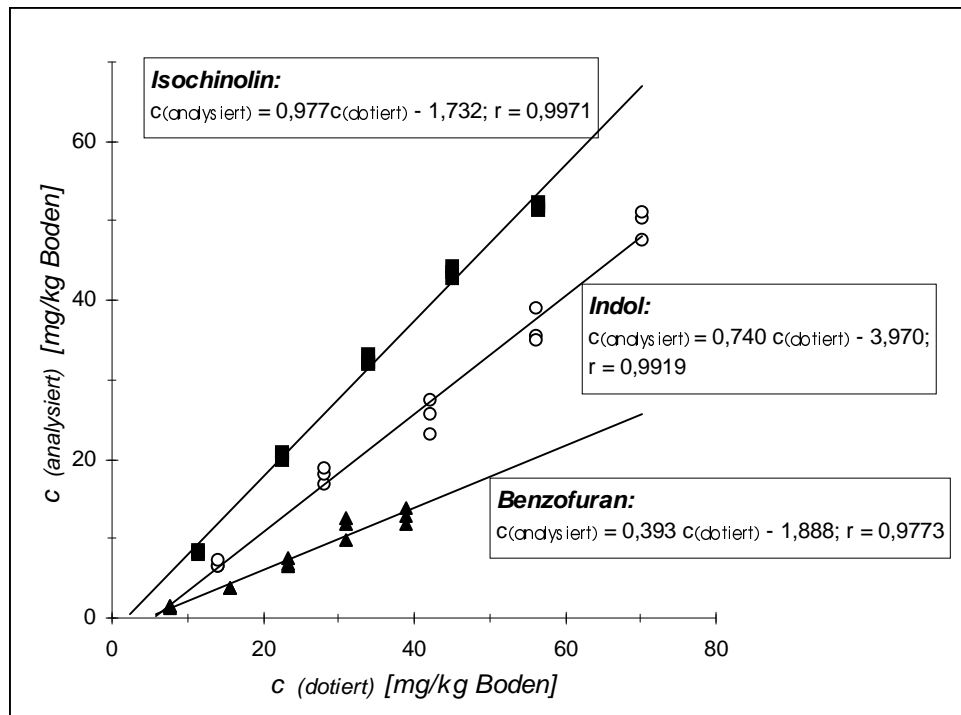


Abb. 6a: Wiederfindungsfunktionen ausgewählter Hetero-PAK

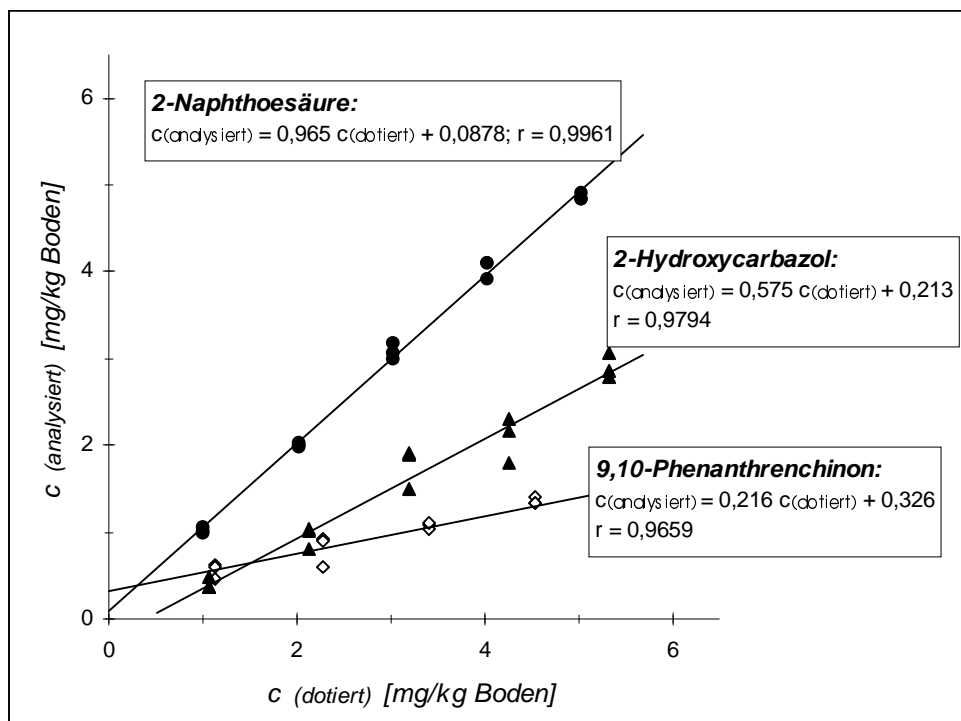


Abb. 6b: Wiederfindungsfunktionen ausgewählter Metaboliten

4.1.6 Anwendung der Methode auf teerölkontaminierte Altlasten

Die Methode wurde auf fünf teerölkontaminierte Altlasten unterschiedlicher Bodenarten und Kontaminationsgrade angewendet (Standortdaten s. 9.4.2). Neben den typischen Teeröl-PAK wurde ein breites Spektrum von Hetero-PAK im mg/kg-Konzentrationsniveau identifiziert. 22 PAK, 20 Hetero-PAK sowie 5 Metaboliten wurden quantifiziert. Die summarischen Ergebnisse der einzelnen Stoffgruppen sind in *Tab. 4* aufgeführt (Einzelergebnisse s. 9.6). Der quantifizierte Hetero-PAK-Anteil macht je nach Kontamination zwischen 5 % (Gaswerks-Altlast) und 21 % (Rüstungs-Altlast 2) des EPA-PAK-Gehalts aus. Auffällig ist insbesondere der niedrige N-PAK-Gehalt in der Gaswerks-Altlast. Da es sich hier um eine Probe aus der gesättigten Bodenzone handelt, besteht die Möglichkeit, daß die polaren N-PAK in das Grundwasser ausgewaschen wurden.

Tab. 4: PAK und Hetero-PAK in den Realkontaminationen [mg/kg]

	Teeröl- Altlast 1	Teeröl- Altlast 2	Gaswerks- Altlast	Rüstungs- Altlast 1	Rüstungs- altlast 2
Σ EPA-PAK	1028,7	1419,9	258,7	1222,3	87,2
Σ Hetero-PAK	194,6	78,2	13,6	116,7	18,0
Σ N-PAK	35,7	19,3	0,1	27,2	5,2
Σ S-PAK	54,2	32,2	13,5	59,3	7,3
Σ O-PAK	104,7	26,7	0,0	30,2	5,5
Σ Metaboliten	1,2	30,9	2,7	8,9	4,9

Die durch die Kationenaustausch-SPE erreichte Trennung von neutralen und basischen N-PAK wird in *Abb. 7* anhand der GC-MSD-SIM-Chromatogramme der entsprechenden Fraktionen der Teeröl-Altlast 2 verdeutlicht. In der neutralen Fraktion (*Abb. 7a*) wurden neutrale 2- bis 4-Ring N-PAK wie Carbazol (m/z 167), Benzocarbazole (m/z 217) und Cyano-PAK (m/z 153, 203) nachgewiesen. Zusätzlich wurden PAK-Metaboliten mit Keton- und Chinonstruktur wie 9,10-Anthrachinon (m/z 208), Cyclopenta[def]phenanthrenon (m/z 204) und Benz[de]anthracen-7-on (m/z 230) identifiziert. In der basischen Fraktion (*Abb. 7b*) wurden 2- bis 4-Ring N-PAK wie Chinolin, Benzochinoline (m/z 179), Dibenzochinoline (m/z 203, 229) und alkylierte Derivate (m/z 143, 181, 217) nachgewiesen. Die Trennung der N-PAK mittels Kationenaustausch-SPE ermöglicht die genaue Identifizierung bzw. Klassifi-

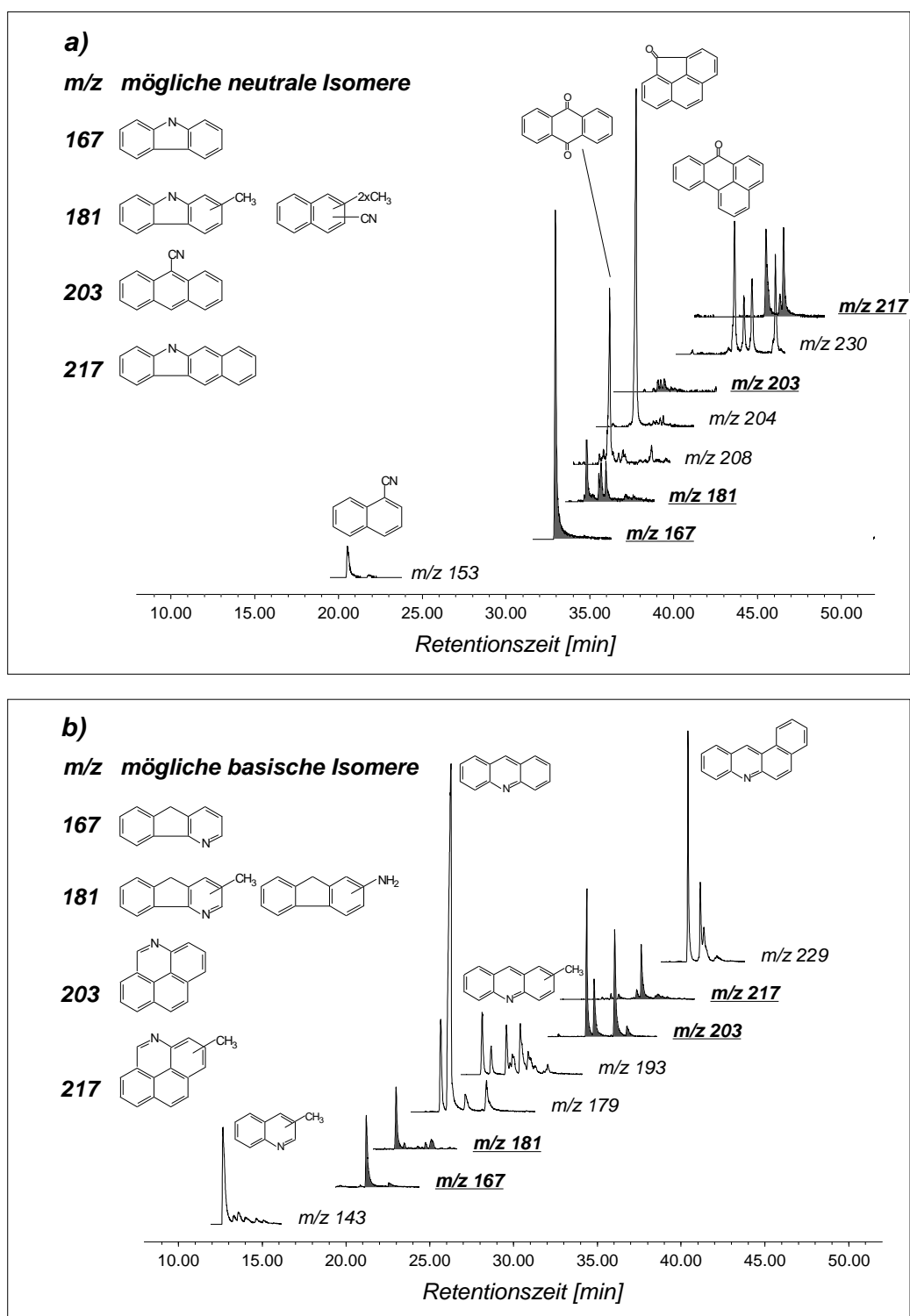


Abb. 7: GC-MSD-SIM-Chromatogramme der Teeröl-Altlast 2: Ionenspuren ausgewählter N-PAK und Metaboliten und Strukturformeln möglicher Isomere **a)** neutrale Fraktion **b)** basische Fraktion

zierung neutraler und basischer Isomere mit nahezu identischen MS-Spektren. Beispielhaft wird diese Klassifizierung in *Abb. 7a* und *b* anhand der Ionenspuren m/z 167, 181, 203, und 217 und der dargestellten isomeren Strukturen verdeutlicht.

4.2 Microtox[®]-Test

Die Durchführung des Leuchtbakterientests mit *Photobacterium phosphoreum* wird in den Deutschen Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung beschrieben (DIN 38 412 - L34, 1989). Während Wasserproben nach Neutralisation, Aufsalzung und Verdünnung direkt zum Test eingesetzt werden können, ist für die Untersuchung von Bodenproben eine methodische Adaption erforderlich. In der Regel werden wäßrige Eluate zum Test eingesetzt, ausgehend von der Theorie, daß nur der bioverfügbare Anteil einer Kontamination toxikologische Relevanz besitzt (GUNKEL et al., 1993). Dagegen kann durch den Einsatz organischer Lösungsmittelextrakte die maximal mögliche Toxizität bestimmt werden (RÖNNPAGEL et al., 1995). In einem Extraktionsmittelvergleich zeigten HO und QUINN (1993), daß sich durch Extraktion von Sedimentproben mit Aceton die höchstmögliche Toxizität (Microtox[®]-Test) extrahieren ließ. KWAN und DUTKA (1990) ermittelten dagegen Methanol als das Extraktionsmittel für Sedimentproben, das die höchste Toxizität extrahierte. In der vorliegenden Arbeit wurden sowohl wäßrige Eluate als auch Methanol-Extrakte in den Verdünnungen G1 bis G24 zum Microtox[®]-Test eingesetzt (Arbeitsvorschrift s. 9.3.7).

4.3 Statistik

Im Rahmen der Abbauersuche wurden Unterschiede im Abbauverhalten einer Substanz in unterschiedlich kontaminierten Ansätzen durch den Vergleich der Mittelwerte festgestellt. Dazu wurden die Einzelwerte einem Ausreißertest nach Grubbs sowie die Varianzen einem F-Test unterzogen. Anschließend wurde das Signifikanzniveau für die Hypothese, daß ein Unterschied zwischen den unterschiedlich kontaminierten Ansätzen vorhanden ist, mittels T-Test berechnet (SACHS, 1997).

Für die Korrelation der Ergebnisse chemischer und ökotoxikologischer Analytik wurde die verteilungsunabhängige Spearman-Rank-Korrelation eingesetzt, die als Abhängigkeitsmaß für nichtlineare Zusammenhänge dienen kann (SACHS, 1997). Auch die Abhängigkeit der Abbaureihenfolge von PAK und Hetero-PAK von ihren jeweiligen Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten wurde mittels Spearman-Rank-Korrelation untersucht.

5 Mikrobieller Abbau eines komplexen PAK- bzw. Hetero-PAK-Gemisches - Abbaustudie 1

5.1 Durchführung

Der Ah-Horizont/Kompost-Modellboden wurde mit den in *Tab. 5* aufgeführten typischen Teeröl-PAK bzw. Teeröl-Hetero-PAK in den angegebenen Konzentrationen dotiert. Die unterschiedlich kontaminierten Bodensysteme - im folgenden „PAK“, „NSO“ bzw. „PAK+NSO“ genannt - wurden dabei jeweils dreifach angesetzt (Durchführung s. 9.7.2). Die Proben wurden wie unter 9.7.3 beschrieben gelagert und nach 24 Stunden (0.Tag) sowie nach 6, 13, 20, 30, 48, 64, 83, 111 und 203 Tagen wie unter 9.7.3 beschrieben untersucht.

Tab. 5: Ausgangskonzentrationen der PAK und Hetero-PAK in den verschiedenen Bodensystemen [mg/kg]

Verbindung (Anzahl kondensierter Ringe)	„PAK“ [mg/kg]	„NSO“ [mg/kg]	„PAK + NSO“ [mg/kg]
PAK:			
Naphthalin (2)	399,6	-	399,6
Acenaphthen (3)	202,3	-	202,3
Fluoren (3)	204,2	-	204,2
Phenanthren (3)	300,4	-	300,4
Anthracen (3)	195,8	-	195,8
Fluoranthren (4)	250,8	-	250,8
Pyren (4)	174,6	-	174,6
Benz[a]anthracen (4)	58,1	-	58,1
Benzo[a]pyren (5)	75,4	-	75,4
Hetero-PAK:			
Indol (2)	-	76,0	76,0
Chinolin (2)	-	76,6	76,6
Benzothiophen (2)	-	75,0	75,0
Benzofuran (2)	-	175,9	175,9
Carbazol (3)	-	174,1	174,1
Acridin (3)	-	77,1	77,1
Dibenzothiophen (3)	-	74,6	74,6
Dibenzofuran (3)	-	175,9	175,9
1-Cyanonaphthalin (2)	-	52,9	52,9
9-Cyanoanthracen (3)	-	50,6	50,6

5.2 Ergebnisse der PAK- und Hetero-PAK-Analytik

5.2.1 Einfluß der Hetero-PAK auf den PAK-Abbau

Während der Untersuchungszeit von 203 Tagen wurden alle neun PAK in den PAK-kontaminierten Bodensystemen („PAK“) sowie den PAK- und Hetero-PAK-kontaminierten Bodensystemen („PAK+NSO“) teilweise oder vollständig abgebaut. Dabei wurde ein hemmender Effekt der Hetero-PAK auf den PAK-Abbau festgestellt, wenn eine der drei folgenden Abbau-Größen eine Änderung zeigte:

1. Verlängerung der Lag-Phase
2. Verringerung der Abbaurate
3. Anstieg der Restkontamination am Ende des Untersuchungszeitraums

In *Tab. 6* sind exemplarisch die PAK-Konzentrationen aller PAK am 0. und am 111. Tag dargestellt (Einzelergebnisse s. 9.7.5, *Tab. 33*). Nur Naphthalin wurde bis zu diesem Zeitpunkt in beiden Bodensystemen vollständig abgebaut. Allerdings wurde Naphthalin in den „PAK“-Bodensystemen innerhalb von 48 Tagen abgebaut, während der Abbau in den „PAK+NSO“-Bodensystemen 111 Tage dauerte (s. auch

Tab. 6: PAK-Konzentration in den „PAK“- und „PAK+NSO“-Bodensystemen nach 0 bzw. 111 Tagen

Verbindung (kondensierte Ringe)	0. Tag	111. Tag	
	c_{dotiert} [mg/kg]	„PAK“ $c_{\text{analysiert}}^a$ (Prozent ^b) [mg/kg (%)]	„PAK + NSO“ $c_{\text{analysiert}}^a$ (Prozent ^b) [mg/kg (%)]
Naphthalin (2)	399,6	n.n. (0)	n.n. (0)
Acenaphthen (3)	202,3	n.n. (0)*	51 ± 1,6 (25,0)*
Fluoren (3)	204,2	n.n. (0)*	145 ± 34,2 (70,8)*
Phenanthren (3)	300,4	5 ± 3,9 (1,5)*	279 ± 7,9 (92,9)*
Anthracen (3)	195,8	23 ± 26,7 (11,5)*	184 ± 6,1 (94,1)*
Fluoranthren (4)	250,8	48 ± 53,4 (19,0)*	234 ± 9,8 (93,5)*
Pyren (4)	174,6	39 ± 43,8 (22,2)*	158 ± 3,6 (90,7)*
Benz[a]anthracen (4)	58,1	33 ± 18,0 (57,0)	52 ± 2,0 (88,6)
Benzo[a]pyren (5)	75,4	69 ± 4,2 (92,0)	69 ± 3,2 (91,4)
Σ 9 PAK	1861	216 ± 148 (11,6)*	1172 ± 38 (63,0)*

^a Mittelwert ± Standardabweichung (n = 3)

^b Prozent der dotierten Konzentration

n.n.: nicht nachweisbar: < 1 % der Ausgangskontamination

* Konzentrationen in den Bodensystemen „PAK“ und „PAK+NSO“ sind signifikant verschieden (T-Test, $\alpha = 0,05$; Signifikanzniveau s. 9.7.5, *Tab. 33*)

Abb. 8a). Entsprechend wurde der Abbau der drei- und vierkernigen PAK in Gegenwart der Hetero-PAK verlangsamt. Während im „PAK“-Bodensystem nach 111 Tagen Restgehalte zwischen 0 % (Acenaphthen und Fluoren) und 57 % (Benz[a]anthracen) der Ausgangskonzentrationen nachgewiesen wurden, waren die Restgehalte im „PAK+NSO“-Bodensystem zu diesem Zeitpunkt höher. In letzterem Bodensystem wurde mit Konzentrationen an Phenanthren, Anthracen bzw. der vierkernigen PAK zwischen 89 % und 94 % kein bzw. nur ein geringer Abbau festgestellt. Nur der Abbau des fünfkernigen Benzo[a]pyrens wurde bis zum 111. Tag nicht durch die Hetero-PAK beeinflusst. In beiden Bodensystemen wurden nahezu identische Konzentrationen dieser Substanz nachgewiesen. Eine statistische Untersuchung der Ergebnisse des 111. Tages zeigte, daß mit Ausnahme von Naphthalin, Benz[a]anthracen und Benzo[a]pyren die PAK-Restkonzentrationen in den „PAK+NSO“-Bodensystemen signifikant höher waren als in den „PAK“-Bodensystemen (T-Test, $\alpha = 0,05$; Einzelergebnisse s. 9.7.5, Tab. 33).

Exemplarisch ist der Abbau einiger ausgewählter PAK - je eine Verbindung mit zwei, drei, vier bzw. fünf kondensierten Ringen - in den verschiedenen Bodensystemen in Abb. 8 dargestellt. Naphthalin (Abb. 8a) wurde ohne Lag-Phase in beiden Bodensystemen schnell abgebaut. Eine statistische Untersuchung der Daten ergab jedoch, daß die Naphthalin-Gehalte am 20., 48. und 64. Tag in den „PAK+NSO“-Bodensystemen signifikant höher waren als in den „PAK“-Bodensystemen (T-Test, $\alpha = 0,05$; s. schwarz markierte Datenpunkte in Abb. 8a).

Exemplarisch für den stark durch die Gegenwart der Hetero-PAK beeinflussten Abbau der dreikernigen PAK ist der Fluoren-Abbau in Abb. 8b dargestellt. In den „PAK“-Bodensystemen wurde Fluoren nach einer Lag-Phase von ca. 13 Tagen innerhalb der folgenden 35 Tage bis zu einem Restgehalt von 49 mg/kg (24 % der Ausgangskonzentration) abgebaut. Nach 111 Tagen war in diesen Ansätzen kein Fluoren mehr nachweisbar. Dagegen zeigte Fluoren in den „PAK+NSO“-Bodensystemen eine bis zum 30. Tag verlängerte Lag-Phase und eine verlangsamte Abbaurate. Mit Ausnahme des 13. und 203. Untersuchungstages wurde der Fluoren-Abbau durch die Hetero-PAK signifikant verlangsamt (T-Test, $\alpha = 0,05$).

Auch der Abbau der vier- und fünfkernigen PAK wurde durch die Gegenwart der Hetero-PAK gehemmt, wenn auch in geringerem Ausmaß als der Abbau der dreiker-

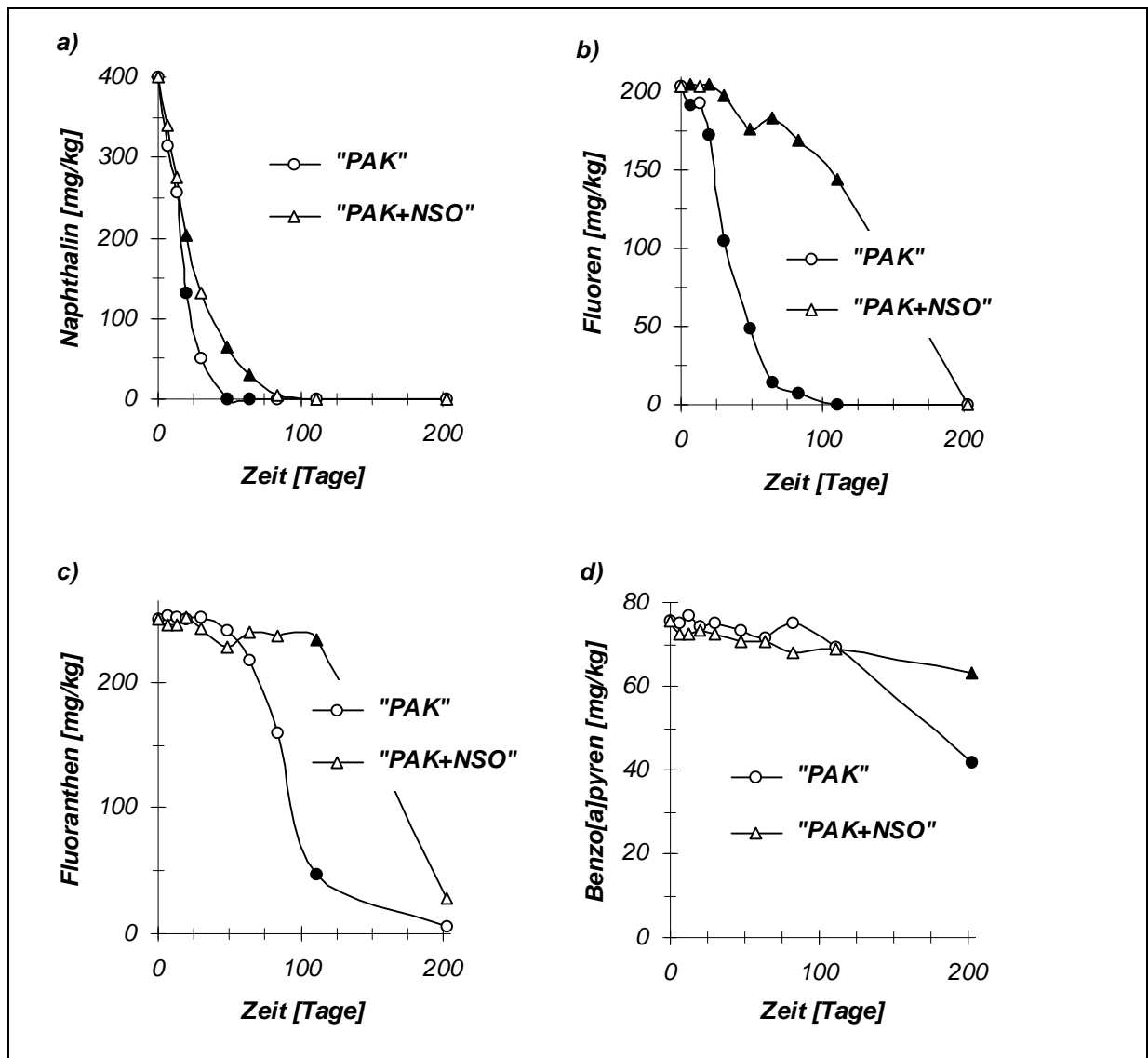


Abb. 8: Konzentrationsverläufe von PAK in den „PAK“- und den „PAK+NSO“-Bodensystemen **a)** Naphthalin, **b)** Fluoren, **c)** Fluoranthen, **d)** Benzo[a]pyren (schwarz markierte Datenpunkte: Unterschiede zwischen „PAK“ und „PAK+NSO“ sind signifikant; T-Test, $\alpha = 0,05$; SN s. 9.7.5, Tab. 33)

nigen PAK. Die Lag-Phase des exemplarisch für die vierkernigen PAK dargestellten Fluoranthen-Abbaus (Abb. 8c) von 48 Tagen in den „PAK“-Bodensystemen wurde in Gegenwart der Hetero-PAK bis zum 111. Tag verlängert; nach den Lag-Phasen folgte in beiden Bodensystemen ein schneller Abbau. Am 111. Tag war die Hemmung des Fluoranthen-Abbaus durch die Hetero-PAK signifikant.

Bei Benzo[a]pyren (Abb. 8d) wurden in beiden Bodensystemen bis zum 111. Tag nur geringe Verluste beobachtet. Nach 203 Tagen waren die in den „PAK+NSO“-Boden

systemen bestimmten Benzo[a]pyren-Gehalte jedoch signifikant höher als die Gehalte in den „PAK“-Bodensystemen, so daß eine Hemmung des Benzo[a]pyren-Abbaus durch die Hetero-PAK nachgewiesen werden konnte.

Obwohl der Abbau aller PAK durch die Hetero-PAK signifikant gehemmt wurde, wurde in beiden Bodensystemen die gleiche durch die Anzahl kondensierter Ringe bedingte Abbaureihenfolge der PAK beobachtet (Tab. 7, s. 5.2.2). Im Gegensatz zu den zwei- und dreikernigen PAK wurde keiner der vier- bis fünfkernigen PAK innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 203 Tagen in einem der Bodensysteme vollständig abgebaut. Eine am 111. und 203. Untersuchungstag an die Lösungsmittelextraktion angeschlossene alkalische Hydrolyse der Bodenmatrix führte zu keinen wesentlich erhöhten Extraktionsausbeuten der PAK (verseifbarer Anteil < 4 % der Ausgangskonzentration; Einzelergebnisse s. 9.7.5, Tab. 33).

5.2.2 Abbau der Hetero-PAK

Der Hetero-PAK-Abbau wurde in den „NSO“- und den „PAK+NSO“-Bodensystemen untersucht. Im Gegensatz zum PAK-Abbau zeigte sich der Hetero-PAK-Abbau nicht nur abhängig von der Anzahl der kondensierten Ringe, sondern auch von der Art des Hetero-Atoms. Während die strukturanalogen N-PAK und O-PAK ähnliche Abbauraten aufwiesen, führte der Ersatz des Stickstoff- bzw. Sauerstoffatoms durch ein Schwefelatom zu einer Verringerung der Abbaurate (Abb. 9). So wurde Benzothiophen langsamer abgebaut als Indol und Benzofuran, Dibenzothiophen langsamer als Carbazol und Dibenzofuran (Einzelergebnisse s. 9.7.5, Tab. 34).

Der Abbau der dargestellten zweikernigen Hetero-PAK Indol, Benzothiophen und Benzofuran wurde in Gegenwart der PAK in den „PAK+NSO“-Bodensystemen gar nicht oder nur geringfügig beeinflusst; der des ebenfalls zweikernigen Chinolins (Abb. 10a) war in Gegenwart der PAK deutlich langsamer als in den „NSO“-Bodensystemen. Die Lag-Phase des Chinolin-Abbaus betrug in den „NSO“-Bodensystemen 6 Tage, in den „PAK+NSO“-Bodensystemen 20 Tage; in beiden Bodensystemen folgte ein schneller Abbau. Zwischen dem 13. und 48. Untersuchungstag waren die Chinolin-Gehalte der „PAK+NSO“-Bodensysteme signifikant höher als in den „NSO“-Bodensystemen (T-Test, $\alpha = 0,05$).

Anders als bei den zweikernigen Hetero-PAK wurde der Abbau aller dreikernigen

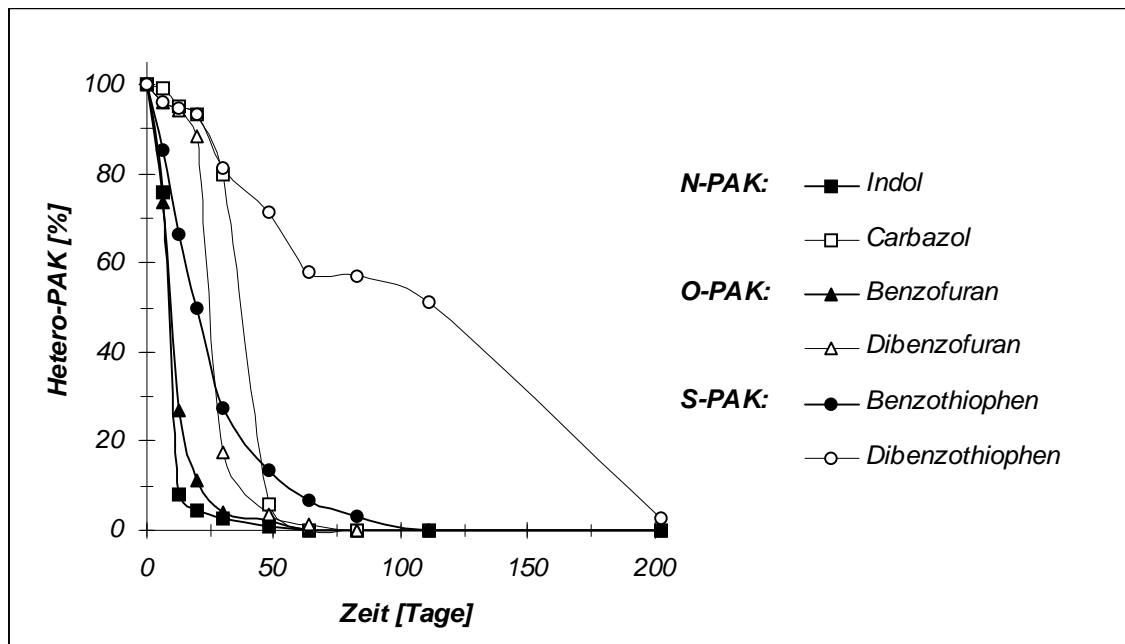


Abb. 9: Konzentrationsverläufe strukturanaloger stickstoff-, schwefel- und sauerstoffhaltiger Hetero-PAK mit zwei bzw. drei kondensierten Ringen in den „NSO“-Bodensystemen

Hetero-PAK - wenn auch in stark unterschiedlichem Maße - durch die PAK beeinflusst. So wurde eine deutliche Hemmung des Carbazol-Abbaus und des Dibenzofuran-Abbaus in Gegenwart der PAK beobachtet. In *Abb. 10b* sind exemplarisch die Konzentrationsverläufe des Carbazol-Abbaus in den unterschiedlichen Bodensystemen dargestellt. In den „NSO“-Bodensystemen wurde Carbazol nach einer Lag-Phase von 20 Tagen bis zum 64. Tag vollständig abgebaut, in den „PAK+NSO“-Bodensystemen dauerte die Lag-Phase 64 Tage, anschließend folgte ein kontinuierlich langsamer Abbau über den gesamten Untersuchungszeitraum.

Dibenzothiophen (*Abb. 10c*) zeigte in den „NSO“-Bodensystemen nach einer Lag-Phase von 20 Tagen einen deutlichen Abbau, der zwischen dem 64. und 111. Untersuchungstag bei 38 - 43 mg/kg (51-58 % der Ausgangskonzentration) stagnierte. Bis zum Ende des Untersuchungszeitraums wurde Dibenzothiophen fast vollständig abgebaut. Dagegen wurden in den „PAK+NSO“-Bodensystemen bis zum 111. Tag deutlich höhere Dibenzothiophen-Konzentrationen nachgewiesen. Bis zum 203. Untersuchungstag kam es zu einem vollständigen Abbau des Dibenzothiophen.

Das dreikernige basische Acridin zeigte eine große Persistenz (*Abb. 10d*). In beiden Bodensystemen wurden am 111. Tag ca. 90 % der Ausgangskonzentration nach-

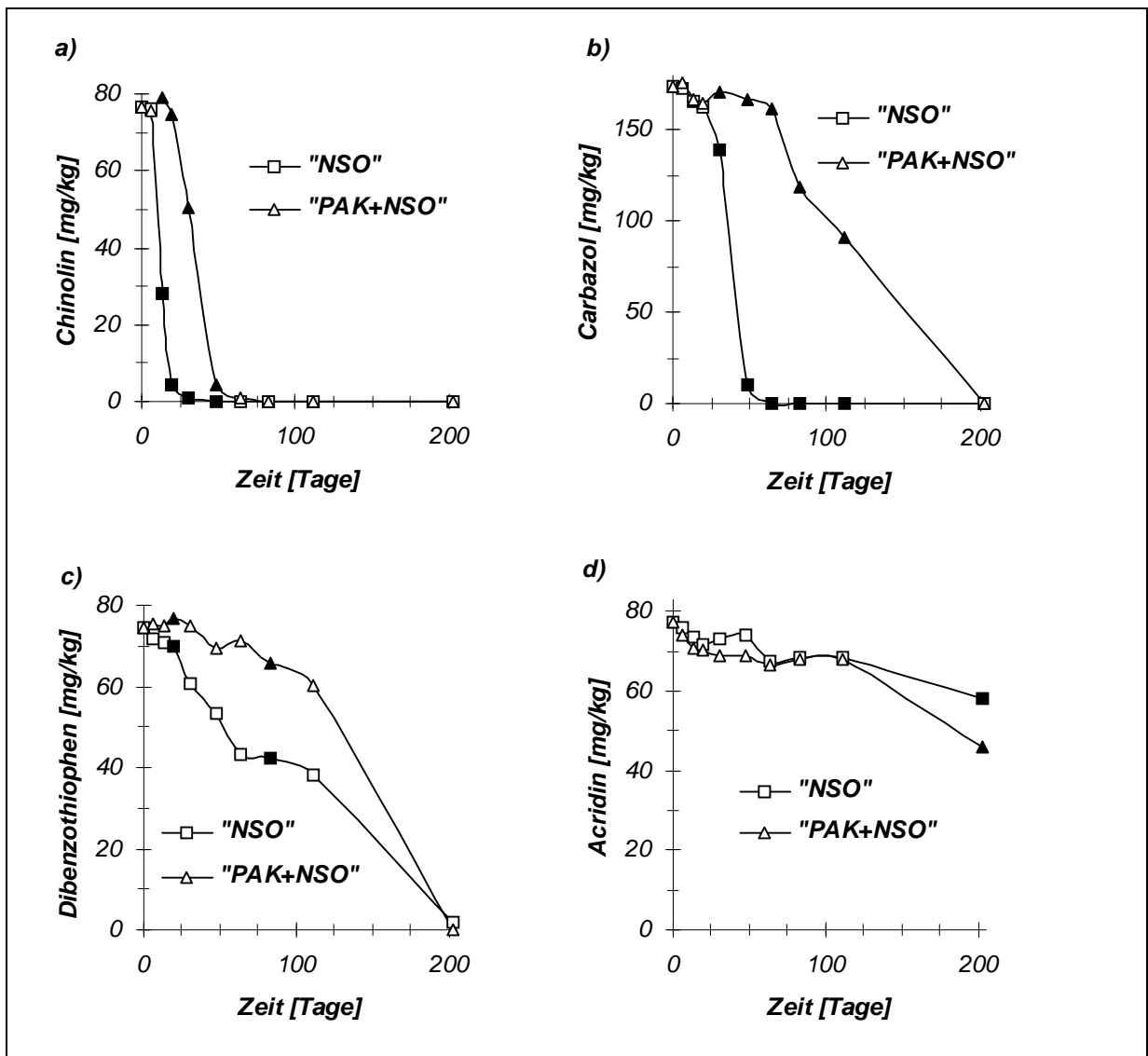


Abb. 10: Konzentrationsverläufe von Hetero-PAK in den „NSO“- und den „PAK+NSO“-Bodensystemen **a)** Chinolin, **b)** Carbazol, **c)** Dibenzothiophen, **d)** Acridin (schwarz markierte Datenpunkte: Unterschiede zwischen „NSO“ und „PAK+NSO“ sind signifikant; T-Test, $\alpha = 0,05$; SN s. 9.7.5, Tab. 34)

gewiesen, bis zum Ende des Untersuchungszeitraums nahmen die extrahierbaren Acridin-Gehalte auf 75 % („NSO“) bzw. 60 % („PAK+NSO“) ab. Zusätzlich zu diesen hohen extrahierbaren Acridin-Gehalten konnten mittels einer am 111. und 203. Untersuchungstag durchgeführten alkalischen Hydrolyse der Bodenmatrix hohe gebundene Acridin-Gehalte freigesetzt werden (Abb. 11). So stieg der gebundene Acridin-Anteil in den „NSO“-Bodensystemen von 13 % (111. Tag) auf 27 % (203. Tag) der Ausgangskonzentration, in den „PAK+NSO“- Bodensystemen von 2 % (111. Tag) auf 20 % (203. Tag). Mit summarischen Gehalten von 102 % der Aus-

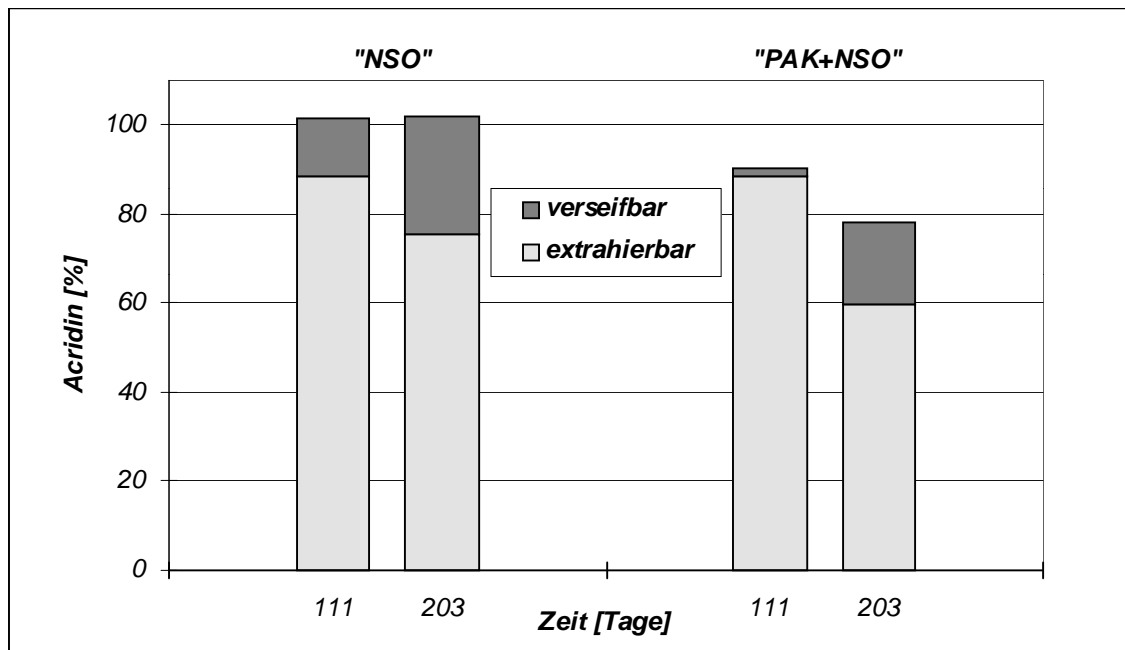


Abb. 11: Extrahierbare und verseifbare Acridin-Gehalte in den „NSO“- und „PAK+NSO“-Bodensystemen am 111. und 203. Untersuchungstag

gangskonzentration („NSO“) bzw. 78 % („PAK+NSO“) konnte innerhalb von 203 Tagen somit kein bzw. nur ein geringer Acridin-Abbau nachgewiesen werden. Die Ergebnisse aller anderen Hetero-PAK wurden gar nicht oder nur zu einem geringen Maße durch die alkalische Hydrolyse beeinflusst (verseifbarer Anteil < 4 % der Ausgangskonzentration; Einzelergebnisse s. 9.7.5, Tab. 34).

1-Cyanonaphthalin und 9-Cyanoanthracen wurden in beiden Bodensystemen abgebaut (Abb. 12), zeigten jedoch eine höhere Persistenz als vergleichbare unsubstituierte PAK oder Hetero-PAK mit derselben Anzahl kondensierter Ringe. Anders als die anderen zweikernigen PAK und Hetero-PAK, die ohne oder mit kurzer Lag-Phase abgebaut wurden (Abb. 8, Abb. 9 und Abb. 10), wies der 1-Cyanonaphthalin-Abbau eine Lag-Phase von 48 Tagen („NSO“) bzw. 64 Tagen („PAK+NSO“) auf. Erst nach 203 Tagen war der Abbau des 1-Cyanonaphthalin vollständig (Abb. 12a).

Entsprechender Vergleich gilt für 9-Cyanoanthracen, dessen Abbau eine Lag-Phase von 83 („NSO“) bzw. 111 Tagen („PAK+NSO“) aufwies. Vergleichbar lange Lag-Phasen zeigten von den dreikernigen Verbindungen nur Phenanthren und Anthracen in den „PAK+NSO“-Bodensystemen; eine noch größere Persistenz als 9-Cyanoanthracen wies nur Acridin auf. Während 9-Cyanoanthracen in den „NSO“-

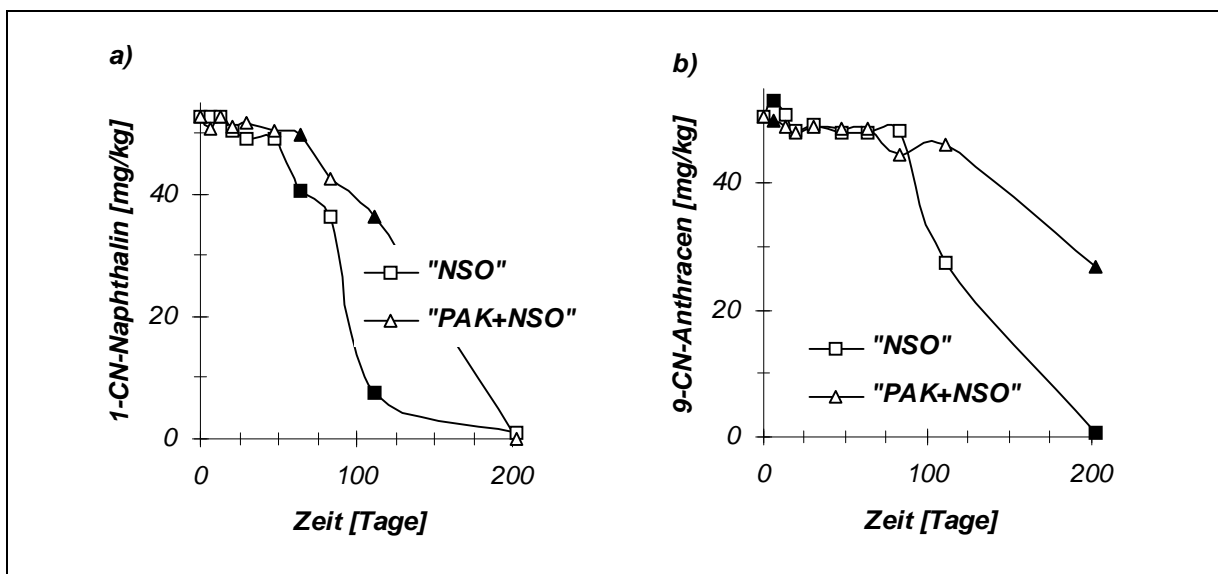


Abb. 12: Konzentrationsverläufe von Hetero-PAK in den „NSO“- und den „PAK+NSO“-Bodensystemen **a)** 1-Cyanonaphthalin, **b)** 9-Cyanoanthracen (schwarz markierte Datenpunkte: Unterschiede zwischen „NSO“ und „PAK+NSO“ sind signifikant; T-Test, $\alpha = 0,05$; SN s. 9.7.5, Tab. 34)

Bodensystemen innerhalb von 203 Tagen fast vollständig abgebaut wurde, wurden in den „PAK+NSO“-Bodensystemen Restgehalte von 53 % der Ausgangskontamination nachgewiesen (Abb. 12b).

Zusammenfassend ist die Reihenfolge der Abbaubarkeit der PAK und Hetero-PAK in den verschiedenen Bodensystemen in Tab. 7 dargestellt.

Tab. 7: Abbaureihenfolge von PAK und Hetero-PAK in den verschiedenen Bodensystemen

Bodensystem	Reihenfolge der Abbaubarkeit <i>leicht abbaubar bis schwer abbaubar</i>
PAK:	
„PAK“	Naphthalin > Acenaphthen \approx Fluoren \approx Phenanthren > Anthracen > Fluoranthren \approx Pyren > Benz[a]anthracen > Benzo[a]pyren
Hetero-PAK:	
„NSO“	Indol \approx Benzofuran \approx Chinolin > Benzothiophen > Dibenzofuran \approx Carbazol > Dibenzothiophen \approx 1-Cyanonaphthalin > 9-Cyanoanthracen > Acridin
PAK und Hetero-PAK:	
„PAK+NSO“	Indol \approx Benzofuran > Naphthalin \approx Benzothiophen > Chinolin > Acenaphthen > Dibenzofuran \approx Carbazol > Fluoren \approx Dibenzothiophen \approx 1-Cyanonaphthalin > Phenanthren \approx Anthracen \approx Fluoranthren \approx Pyren > 9-Cyanoanthracen \approx Acridin \approx Benz[a]anthracen > Benzo[a]pyren

>: leichter abbaubar als; \approx : vergleichbare Abbaubarkeit

5.2.3 Summarischer PAK- und Hetero-PAK-Abbau

Die Konzentrationsverläufe der gesamtextrahierbaren PAK und Hetero-PAK sind in *Abb. 13* dargestellt. Da jeder einzelne PAK im „PAK“-Bodensystem schneller abgebaut wurde, nahm in diesen Bodensystemen der Gesamt-PAK-Gehalt von 1861 mg/kg insgesamt schneller auf 216 mg/kg nach 111 Tagen bzw. 57 mg/kg nach 203 Tagen ab. In den „PAK+NSO“-Bodensystemen waren dagegen Gesamt-PAK-Gehalte von 1172 mg/kg nach 111 Tagen bzw. 151 mg/kg nach 203 Tagen nachweisbar. Eine statistische Auswertung ergab signifikante Unterschiede zwischen den Bodensystemen am 20. Tag sowie zwischen dem 48. und 111. Tag (T-Test, $\alpha = 0,05$, Einzelergebnisse s. 9.7.5, *Tab. 33*).

Ein ähnliches Ergebnis ergab sich für die Gesamt-Hetero-PAK-Gehalte. Während die Ausgangskontamination von 1009 mg/kg Hetero-PAK in den „NSO“-Bodensystemen auf Gehalte von 256 mg/kg (48. Tag) bzw. 141 mg/kg (111. Tag) abnahm, wurden in den „PAK+NSO“-Bodensystemen 574 mg/kg (48. Tag) bzw. 390 mg/kg (111. Tag) nachgewiesen. Zwischen dem 13. und 111. Tag unterschieden sich die

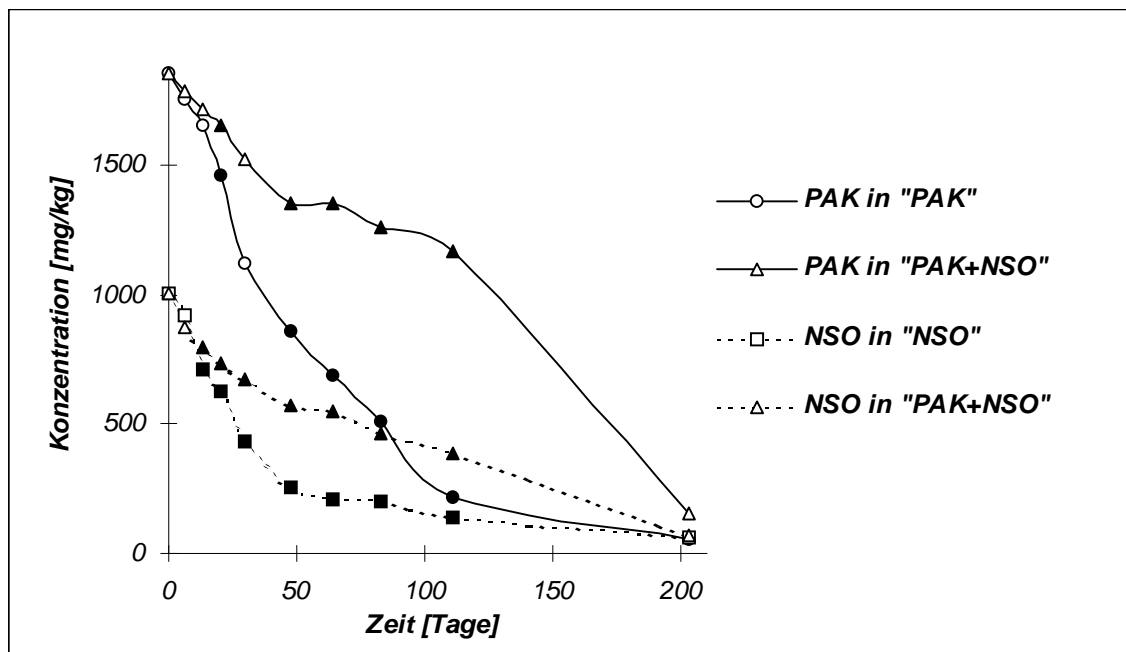


Abb. 13: Konzentrationsverläufe der gesamtextrahierbaren PAK- und Hetero-PAK-Gehalte in den „PAK“--, „NSO“- und „PAK+NSO“-Bodensystemen (schwarz markierte Datenpunkte: Unterschiede zwischen Bodensystemen sind signifikant; T-Test, $\alpha = 0,05$; *SN* s. 9.7.5, *Tab. 33* und *Tab. 34*)

Hetero-PAK-Gehalte signifikant. Am Ende des Untersuchungszeitraumes wurden mit 62 mg/kg („NSO“) bzw. 73 mg/kg („PAK+NSO“) in der Größenordnung vergleichbare Hetero-PAK-Gehalte nachgewiesen (Einzelergebnisse s. 9.7.5, Tab. 34).

Um die eigentliche Abbauleistung der Bodensysteme mit unterschiedlicher Gesamtkontamination zu vergleichen, sind in Abb. 14 die jeweiligen Summen der abgebauten PAK und/oder Hetero-PAK dargestellt. Vom 6. bis zum 20. Tag war die absolute Abbaurrate in den „PAK+NSO“-Bodensystemen höher als in den „PAK“-Bodensystemen, was mit dem höherem Gehalt an leicht verdampfenden zweikernigen Verbindungen in den „PAK+NSO“-Bodensystemen erklärt werden kann. Im Anschluß nahm die Abbaurrate der „NSO“-Bodensysteme, bedingt durch die Annäherung an die maximal abbaubare Menge ab. Die Abbaurrate der „PAK+NSO“-Bodensysteme nahm nach dem 48. Tag ab. Dieser Effektivitätsverlust des Abbaus war im Vergleich mit den „PAK“-Bodensystemen am 64. und 111. Tag signifikant (T-Test, $\alpha = 0,05$). Erst nach dem 111. Tag stieg die Abbaurrate in den „PAK+NSO“-Bodensystemen wieder an (Einzelergebnisse s. 9.7.5, Tab. 35).

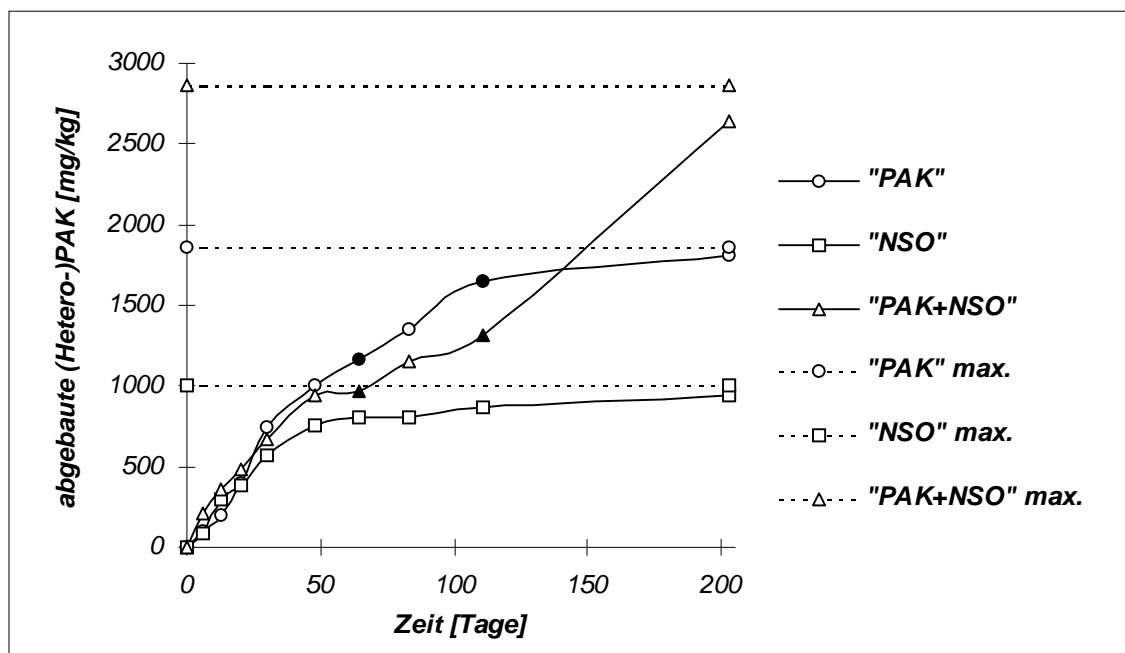


Abb. 14: Gesamtabgebaute Konzentrationen in den verschiedenen Bodensystemen; (gestrichelte Linien: Gesamtkontamination; schwarz markierte Datenpunkte: Unterschiede zwischen „PAK“ und „PAK+NSO“ sind signifikant; T-Test, $\alpha = 0,05$; SN s. 9.7.5, Tab. 35)

5.3 Ergebnisse der Metaboliten-Analytik

5.3.1 Identifizierte PAK- und Hetero-PAK-Metaboliten

Die Identifizierung von PAK- und Hetero-PAK-Metaboliten erfolgte mittels HPLC-DAD und GC-MSD. *Abb. 15* zeigt die Chromatogramme der SPE-Fraktion 2 eines

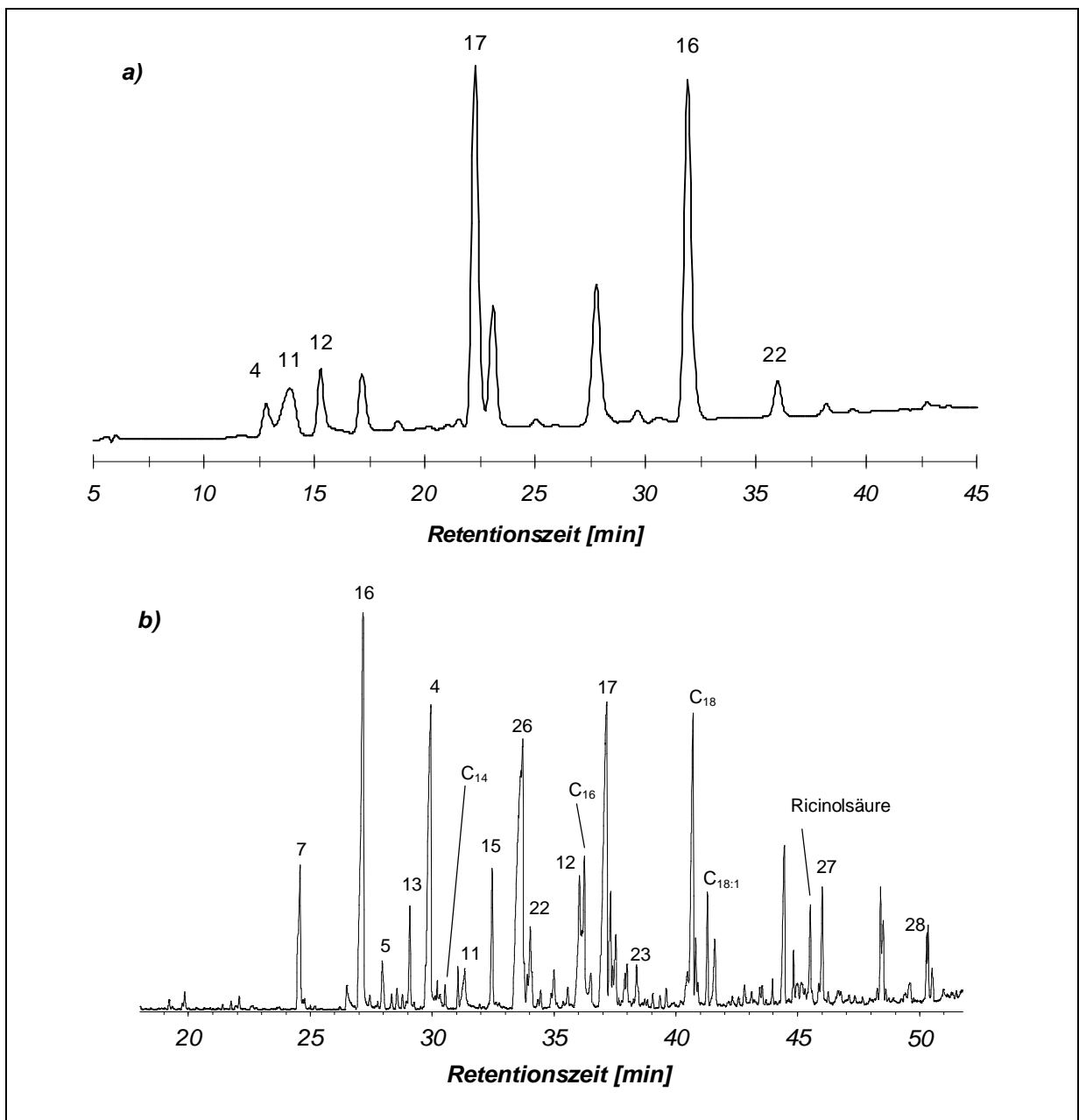


Abb. 15: Chromatogramme der SPE-Fraktion 2 eines „PAK“-Bodensystems nach 48 Tagen (Nr. der Verbindungen s. **Tab. 8**, C₁₄: Tetradecansäure, C₁₆: Hexadecansäure, C₁₈: Octadecansäure, C_{18:1}: Octadecensäure) **a)** HPLC-DAD-Chromatogramm ($\lambda = 251$ nm) **b)** GC-MSD-Chromatogramm, TMS-Derivate

„PAK“-Bodensystems nach 48 Tagen. Diese Chromatogramme verdeutlichen die komplexe Zusammensetzung derartiger Bodenfraktionen. Neben den identifizierten PAK-Metaboliten enthält die Fraktion eine Vielzahl weiterer Verbindungen, bei denen es sich zum Teil um nicht identifizierte PAK-Metaboliten handelt, zum anderen um bodenoriginäre Verbindungen wie langkettige aliphatische Carbonsäuren (*Abb. 15b*). In **Tab. 8** sind alle im Rahmen der Abbaustudie identifizierten Metaboliten mit ihren charakteristischen chromatographischen und spektroskopischen Daten zusammengefasst. Zur Identifizierung dienten Referenzsubstanzen, mit denen die vorliegenden Verbindungen über ihre UV- und/oder MSD-Spektren sowie ihre Retentionszeiten verglichen wurden. Weitere Metaboliten wurden durch MSD-Spektrenvergleich mit Literaturdaten sowie mit Hilfe eines Fragmentierungsschemas von TMS-Derivaten identifiziert (ZINK und LORBER, 1995).

Es wurde eine Vielzahl von Metaboliten verschiedener Strukturgruppen - Hydroxy- und Dihydroxyverbindungen, Ketone, Chinone, Säuren, Lactone und Anhydride - identifiziert. Die Verbindungen, die bisher nicht in Bodenabbaustudien nachgewiesen worden waren, sind in **Tab. 8** mit einem Stern (*) gekennzeichnet. Die UV- und MSD-Spektren dieser Verbindungen finden sich in 9.9.

Quantifiziert wurden nur die über HPLC-DAD nachgewiesenen Substanzen, zu denen Referenzsubstanzen vorlagen, sowie Dibenzothiophensulfoxid, das über einen oxidierten Dibenzothiophen-Standard indirekt quantifiziert wurde (Arbeitsvorschrift s. 9.7.4).

Tab. 8: Identifizierte Metaboliten mit charakteristischen chromatographischen und spektroskopischen Daten

Nr.	Verbindung	Ausgangs- verbindung	Identifizierung	RT [min] HPLC/GC ^a	UV λ_{max} [nm]	MSD m/z ^a	Abb. (s. 9.9)
neutrale PAK-Metaboliten:							
1	Dihydroxydihronaphthalin *	Naphthalin	MSD ¹	- / 25,5	-	306, 291, 217, 191, 147, 73	Abb. 28
2	1-Hydroxynaphthalin *	Naphthalin	Ref.substanz	- / 20,7	-	216, 201, 185, 141, 115, 73	Abb. 29a
3	2-Hydroxynaphthalin *	Naphthalin	Ref.substanz	- / 21,6	-	216, 201, 185, 145, 115, 73	Abb. 29b
4	2,3-Dihydroxynaphthalin *	Naphthalin, Anthracen	Ref.substanz	13,1 / 30,0	229	304, 289, 216, 201, 186, 73	Abb. 30
5	1-Hydroxyacenaphthen *	Acenaphthen	Ref.substanz	18,9 / 28,1	226	242, 241, 153, 152, 75, 73	Abb. 31
6	Hydroxyacenaphthylen *	Acenaphthen	MSD ²	- / 29,9	-	240, 225, 197, 165, 139, 73	Abb. 32a
7	1-Acenaphthenon *	Acenaphthen	MSD ³	- / 24,5	-	168, 140, 139, 113, 70	Abb. 32b
8	1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> -Naphtho[<i>c</i>]pyran-1-on	Acenaphthen	MSD ³	- / 32,6	-	184, 155, 127, 101, 77	-
9	Dihydroxyacenaphthylen *	Acenaphthen	MSD ¹	- / 35,7	-	328, 313, 240, 210, 147, 73	Abb. 33a
10	Dihydroxyacenaphthen *	Acenaphthen	MSD ²	- / 34,0	-	330, 315, 241, 152, 147, 73	Abb. 33b
11	1,2-Acenaphthenchinon	Acenaphthen	Ref.substanz	14,3 / 31,3	225, 249	182, 154, 126, 74, 63	-
12	1,8-Naphthalsäureanhydrid	Acenaphthen	Ref.substanz	15,6 / 36,2	224, 297	198, 154, 126, 87, 74	-
13	9-Hydroxyfluoren	Fluoren	Ref.substanz	22,0 / 29,2	208, 227	254, 253, 239, 165, 139, 73	-
14	2-Hydroxyfluoren *	Fluoren	Ref.substanz	- / 34,2	-	254, 239, 165, 152, 119, 73	Abb. 34a
15	Hydroxyfluoren (nicht 2- o. 9-) *	Fluoren	MSD ⁴	- / 32,5	-	254, 239, 223, 165, 152, 73	Abb. 34b
16	9-Fluoren	Fluoren	Ref.substanz	33,4 / 27,1	251, 258	180, 181, 152, 151, 126, 76	-
17	4-Hydroxy-9-fluoren *	Fluoren	Ref.substanz	23,6 / 37,2	251	268, 253, 237, 225, 165, 73	Abb. 36
18	Dihydroxyfluoren *	Fluoren	MSD ¹	- / 44,5	-	356, 341, 268, 253, 238, 73	Abb. 35
19	Hydroxy-9-fluoren *	Fluoren	MSD ⁴	- / 38,0	-	268, 253, 223, 195, 165, 73	Abb. 37a
20	1-Indanon	Fluoren	Ref.substanz	10,8 / 12,1	206, 247	132, 104, 78, 51	-
21	9,10-Phenanthrenchinon *	Phenanthren	Ref.substanz	20,5 / -	258, 265	-	Abb. 37b

^a bisher nicht in Bodenabbaustudien nachgewiesen

¹ bei Hydroxy- und Carboxyverbindungen Retentionszeit (RT) bzw. Masse/Ladung m/z der entsprechenden TMS-Derivate

² Identifizierung mittels eines Fragmentierungsschemas von TMS-Derivaten (ZINK und LORBER, 1995)

³ ZINK, 1995

⁴ WILEY 138-MASSENSPEKTRENSAMMLUNG, 1992

Identifizierung in Analogie zu einem als Referenzsubstanz vorhandenen Stellungsisomer dieser Verbindung

Tab. 8 (Forts.): Identifizierte Metaboliten mit charakteristischen chromatographischen und spektroskopischen Daten

Nr.	Verbindung	Ausgangs- verbindung	Identifizierung	RT [min] HPLC/GC ^a	UV λ_{max} [nm]	MSD m/z^a	Abb. (s. 9.8.5)
neutrale PAK-Metaboliten:							
22	9,10-Anthracinon	Anthracen	Ref.substanz	35,5 / 34,0	254, 276	208, 180, 152, 126, 76, 63	-
23	Hydroxyphenanthren/-anthracen * (nicht 9-OH-Phenanthren)	Phenanthren, Anthracen	MSD ⁴	- / 38,4	-	266, 251, 235, 165, 73	Abb. 38a
24	Dihydroxyphenanthren/-anthracen *	Phenanthren, Anthracen	MSD ¹	- / 41,6	-	354, 339, 266, 236, 147, 73	Abb. 38b
25	Dihydroxydihydrophenanthren/ -anthracen *	Phenanthren, Anthracen	MSD ¹	- / 39,2	-	356, 341, 266, 178, 147, 73	Abb. 39a
26	Benzocumarin *	Anthracen	MSD ³	- / 33,7	-	196, 168, 139	Abb. 39b
27	Hydroxyfluoranthren/-pyren (nicht 1-OH-Pyren) *	Fluoranthren, Pyren	MSD ⁴	- / 45,0	-	290, 275, 259, 200, 189, 73	Abb. 40a
28	Dihydroxyfluoranthren/-pyren *	Fluoranthren, Pyren	MSD ¹	- / 49,2	-	378, 290, 260, 215, 147, 73	Abb. 40b
29	7,12-Benz[a]anthracinon	Benz[a]anthracen	Ref.substanz	- / 49,5	-	258, 230, 202, 200, 101, 88	-
30	3-Hydroxy-2-naphthoesäure	Anthracen	Ref.substanz	25,3 / 27,4	238	332, 317, 244, 185, 141, 73	-
Hetero-PAK-Metaboliten:							
31	2-Hydroxychinolin *	Chinolin	Ref.substanz	5,6 / 19,3	227, 272	216, 202, 186, 172, 128	Abb. 41
32	Dibenzothiophensulfoxid *	Dibenzothiophen	Ref.substanz	16,3 / 38,2	219, 248	200, 184, 172, 171, 139	Abb. 42
33	Dibenzothiophensulfon *	Dibenzothiophen	Ref.substanz	16,5 / 38,4	234, 242	216, 187, 168, 160, 139, 136	Abb. 43
34	Hydroxydibenzofuran *	Dibenzofuran	MSD ¹	- / 30,9	-	256, 241, 225, 166, 73	Abb. 44

^a bisher nicht in Bodenabbaustudien nachgewiesen

¹ bei Hydroxy- und Carboxyverbindungen Retentionszeit (RT) bzw. Masse/Ladung m/z der entsprechenden TMS-Derivate
Identifizierung mittels eines Fragmentierungsschemas von TMS-Derivaten (ZINK und LORBER, 1995)

² ZINK, 1995

³ WILEY 138-MASSENSPEKTRENSAMMLUNG, 1992

⁴ Identifizierung in Analogie zu einem als Referenzsubstanz vorhandenen Stellungsisomer dieser Verbindung

5.3.2 Konzentrationsverläufe von PAK bzw. Hetero-PAK und ihren Metaboliten in den verschiedenen Bodensystemen

In allen drei verschiedenen Bodensystemen wurden im Versuchszeitraum von 203 Tagen PAK- bzw. Hetero-PAK-Metaboliten identifiziert. Die Konzentrationsverläufe der mittels HPLC-DAD quantifizierten Verbindungen werden im folgenden in den verschiedenen Bodensystemen in Korrelation zu den jeweiligen Ausgangsverbindungen dargestellt (Einzelergebnisse s. 0; UV- und MSD-Spektren s. 9.9).

Metaboliten des Naphthalin-Abbaus

Als Metaboliten des Naphthalin-Abbaus wurden in den „PAK“-Bodensystemen Dihydroxydihydronaphthalin, 1-Hydroxynaphthalin und 2-Hydroxynaphthalin identifiziert sowie 2,3-Dihydroxynaphthalin, bei dem es sich strukturell sowohl um ein Produkt des Naphthalin- als auch des Anthracenabbaus handeln kann. In den „PAK+NSO“-Bodensystemen wurden keine Naphthalin-Metaboliten identifiziert.

Metaboliten des Acenaphthen-Abbaus

In beiden mit Acenaphthen kontaminierten Bodensystemen wurden alle in **Tab. 8** aufgeführten Acenaphthen-Abbauprodukte nachgewiesen. Die Konzentrationsverläufe von Acenaphthen und den quantifizierten Metaboliten 1,2-Acenaphthenchinon und 1,8-Naphthalsäureanhydrid sind in *Abb. 16a* dargestellt. In den „PAK“-Bodensystemen korrelierte das kurzzeitige Konzentrationsmaximum von 7,3 mg/kg 1,2-Acenaphthenchinon (30. Tag) gut mit der maximalen Abbaurate des Acenaphthen. Die zeitliche Verzögerung des Maximums von 1,8-Naphthalsäureanhydrid (6,9 mg/kg am 64. Tag) ist durch den Abbauweg begründet (s. 7.2.1, *Abb. 26*). Dagegen reicherten sich beide Metaboliten in den „PAK+NSO“-Bodensystemen bis zum vollständigem Acenaphthen-Abbau an. Am 203. Tag wurden 18,1 mg/kg 1,2-Acenaphthenchinon bzw. 5,1 mg/kg 1,8-Naphthalsäureanhydrid nachgewiesen.

Metaboliten des Fluoren-Abbaus

In den „PAK“-Bodensystemen wurden alle in **Tab. 8** aufgeführten Fluoren-Metaboliten nachgewiesen. In den „PAK+NSO“-Bodensystemen wurden diese Verbindungen mit Ausnahme von 1-Indanon nachgewiesen. In den „PAK“-Bodensystemen

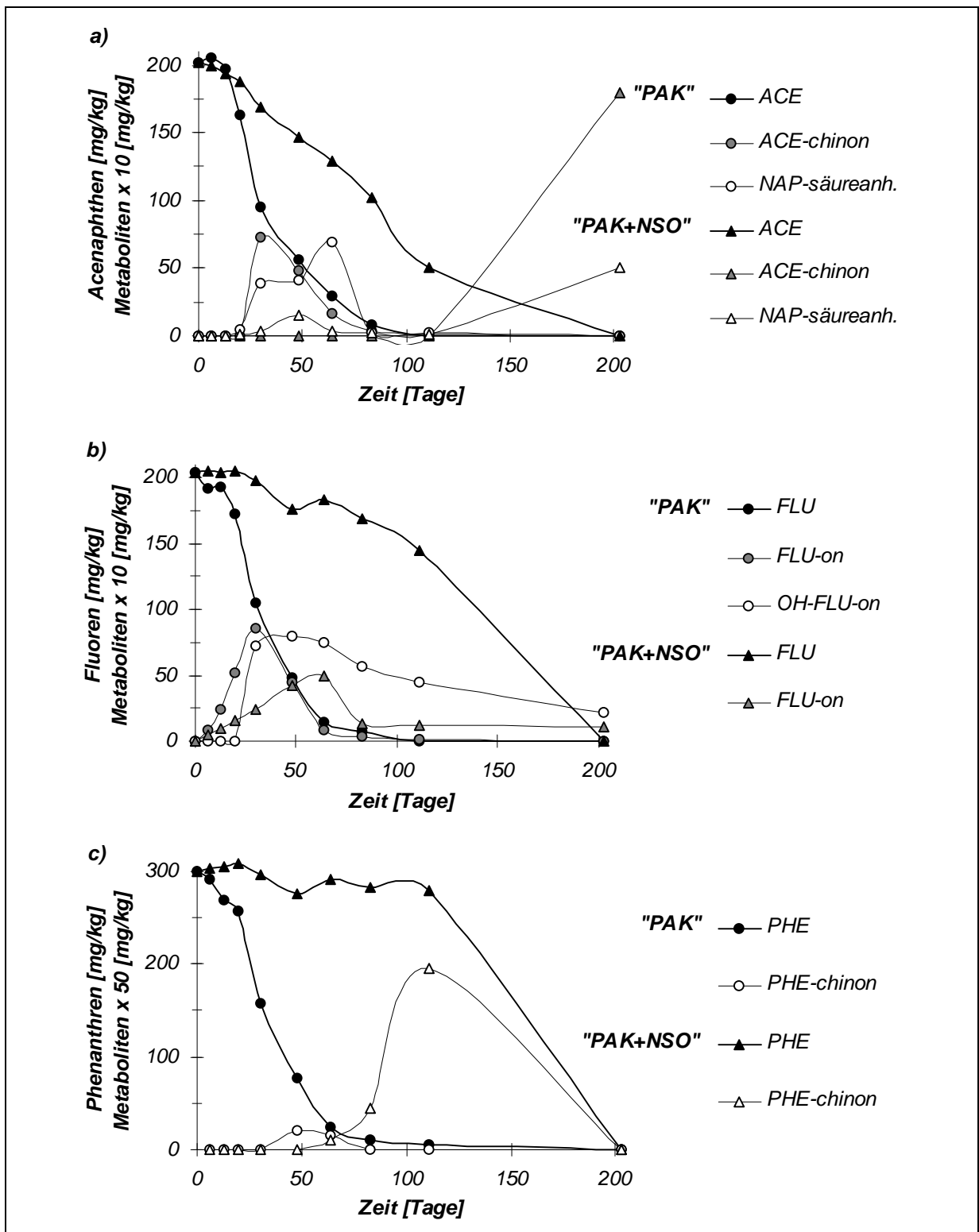


Abb. 16: Konzentrationsverläufe von PAK und ihren Metaboliten in den „PAK“- und „PAK+NSO“-Bodensystemen

a) Acenaphthen (ACE), 1,2-Acenaphthenchinon (ACE-chinon), 1,8-Naphthalensäureanhydrid (NAP-säureanh.)

b) Fluoren (FLU), 9-Fluorenon (FLU-on), 4-Hydroxy-9-fluorenon (OH-FLU-on)

c) Phenanthren (PHE), 9,10-Phenanthrenchinon (PHE-chinon)

korrelierte das Konzentrationsmaximum von 8,6 mg/kg 9-Fluorenon am 30. Tag gut mit der maximalen Abbaurate des Fluoren (*Abb. 16b*). Die zeitliche Verzögerung des Maximums des 4-Hydroxy-9-fluorenon ist durch den Abbauweg zu erklären (s. 7.2.1, *Abb. 27*). 4-Hydroxy-9-fluorenon ist vergleichsweise persistent. Während Fluoren bereits am 111. Tag vollständig abgebaut war, konnten noch am 203. Tag 2,1 mg/kg 4-Hydroxy-9-fluorenon nachgewiesen werden. In den „PAK+NSO“-Bodensystemen verzögerte sich, entsprechend dem langsameren Fluoren-Abbau, auch die Bildung von 9-Fluorenon (Konzentrationsmaximum 5,0 mg/kg am 64. Tag). 4-Hydroxy-9-fluorenon wurde in diesen Ansätzen einmalig am 83. Tag mit 0,1 mg/kg nachgewiesen (nicht dargestellt).

Metaboliten des Phenanthren- bzw. Anthracen-Abbaus

In beiden mit Phenanthren bzw. Anthracen kontaminierten Bodensystemen wurden - mit Ausnahme von 3-Hydroxy-2-naphthoesäure in den „PAK+NSO“-Bodensystemen - alle in **Tab. 8** aufgeführten Abbauprodukte dieser Verbindungen nachgewiesen. Ob es sich bei den Hydroxy- und Dihydroxyverbindungen um Phenanthren- oder Anthracen-Derivate handelt, ließ sich mangels Referenzsubstanzen nicht aufklären, da isomere aromatische Verbindungen üblicherweise identische MSD-Spektren aufweisen.

In den „PAK“-Bodensystemen korrelierte der Phenanthren-Abbau gut mit dem Konzentrationsverlauf von 9,10-Phenanthrenchinon (*Abb. 16c*). Das Maximum der 9,10-Phenanthrenchinon-Konzentration in den „PAK+NSO“-Bodensystemen von 3,9 mg/kg am 111. Tag wurde vor dem Auftreten der maximalen Phenanthren-Abbaurate festgestellt, was evt. darauf zurückgeführt werden kann, daß zwischen dem 111. und 203. Untersuchungstag keine Messungen durchgeführt wurden.

Die Konzentrationsverläufe des Anthracen und seiner Metaboliten sind in *Abb. 17* dargestellt. 9,10-Anthrachinon wurde in beiden Bodensystemen über den gesamten Versuchszeitraum in Konzentrationen von 0,1 bis 1,5 mg/kg nachgewiesen. Das Konzentrationsmaximum der 3-Hydroxy-2-naphthoesäure in den „PAK“-Bodensystemen von 0,9 mg/kg am 83. Tag korrelierte gut mit der maximalen Abbaurate des Anthracen. In den „PAK+NSO“-Bodensystemen wurde 3-Hydroxy-2-naphthoesäure nicht nachgewiesen.

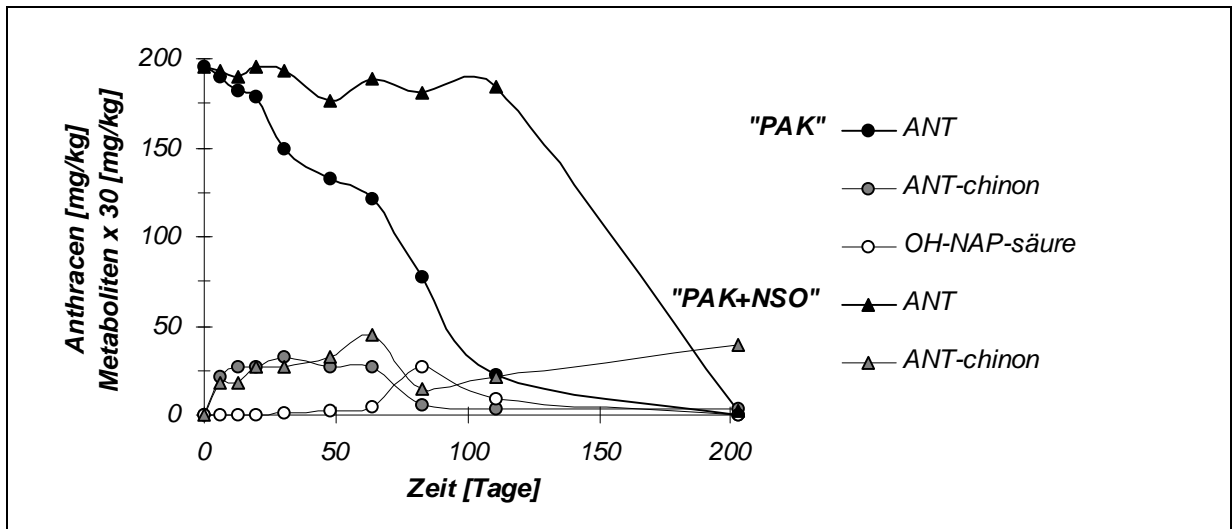


Abb. 17: Konzentrationsverläufe von Anthracen und seinen Metaboliten in den „PAK“- und „PAK+NSO“-Bodensystemen: Anthracen (ANT), 9,10-Anthrachinon (ANT-chinon), 3-Hydroxy-2-naphthoesäure (OH-NAP-säure)

Metaboliten des Fluoranthen- bzw. Pyren-Abbaus

In beiden mit Fluoranthen bzw. Pyren kontaminierten Bodensystemen konnten Hydroxy- und Dihydroxy-Derivate von PAK der Masse 202 nachgewiesen werden, die mangels Referenzsubstanzen nicht näher charakterisiert werden konnten.

Metaboliten des Benz[a]anthracen-Abbaus

In beiden mit Benz[a]anthracen kontaminierten Bodensystemen wurden geringe Mengen an 7,12-Benz[a]anthrachinon mittels GC-MSD nachgewiesen.

Metaboliten des Benzo[a]pyren-Abbaus

Metaboliten des Benzo[a]pyren-Abbaus wurden nicht nachgewiesen.

Metaboliten des Chinolin-Abbaus

Das Chinolin-Abbauprodukt 2-Hydroxychinolin wurde einmalig am 30. Tag in den „PAK-NSO“-Bodensystemen mit 0,8 mg/kg nachgewiesen.

Metaboliten des Dibenzothiophen-Abbaus

In beiden mit Dibenzothiophen kontaminierten Bodensystemen wurde Dibenzothiophensulfoxid nachgewiesen (Abb. 18). In den „NSO“-Bodensystemen wurde zwischenzeitlich eine starke Akkumulation des Metaboliten beobachtet. Hier lagen

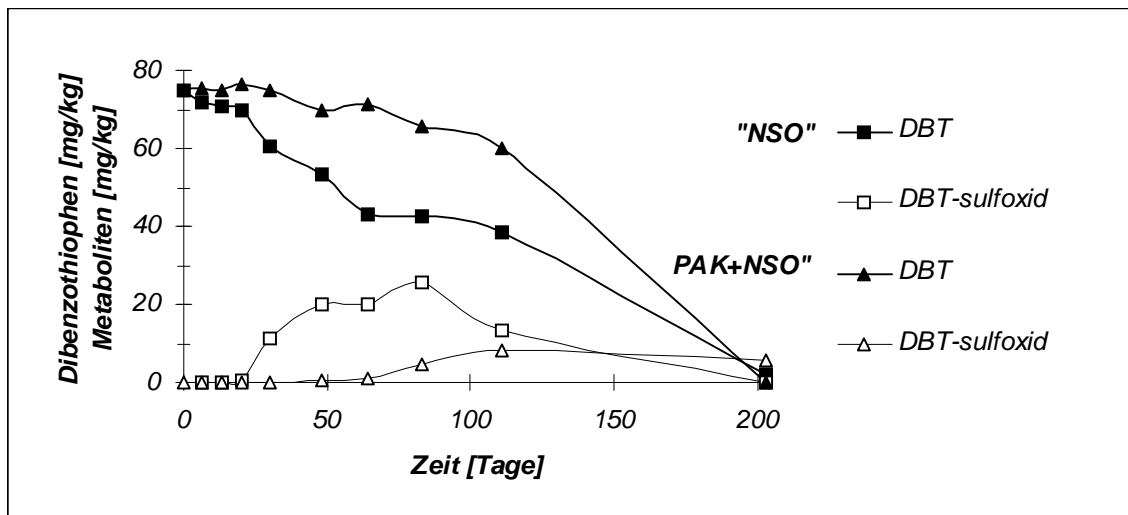


Abb. 18: Konzentrationsverläufe von Dibenzo-thiophen und seinen Metaboliten in den „NSO“- bzw. „PAK+NSO“-Bodensystemen: Dibenzo-thiophen (DBT), Dibenzo-thiophensulfoxid (DBT-sulfoxid)

am 83. Tag mit 26 mg/kg Dibenzo-thiophensulfoxid 32 % des ursprünglich dotierten Dibenzo-thiophen-Gehalts in Form des Metaboliten vor. Zum gleichen Zeitpunkt war in diesen Bodensystemen eine Stagnation des Dibenzo-thiophen-Abbaus feststellbar. In den „PAK+NSO“-Bodensystemen wurden mit maximal 8,0 mg/kg (111. Tag) deutlich geringere Dibenzo-thiophensulfoxid-Konzentrationen nachgewiesen. Das Folgeprodukt Dibenzo-thiophensulfon konnte lediglich in den „PAK+NSO“-Bodensystemen am 83. Tag mit 0,1 mg/kg quantifiziert werden (nicht dargestellt).

Metaboliten des Indol-, Benzothiophen-, Benzofuran-, Carbazol-, Acridin-, 1-Cyanonaphthalin- bzw. 9-Cyanoanthracen-Abbaus

Metaboliten des Indol-, Benzothiophen-, Benzofuran-, Carbazol-, Acridin-, 1-Cyanonaphthalin- bzw. 9-Cyanoanthracen-Abbaus konnten in keinem der Bodensysteme identifiziert werden.

Metaboliten des Dibenzofuran-Abbaus

In den „PAK+NSO“-Bodensystemen wurde Hydroxydibenzofuran nachgewiesen, dessen Stellung nicht näher charakterisiert werden konnte.

5.4 Korrelation von chemischer Analytik und Microtox[®]-Test

5.4.1 Ergebnisse des Microtox[®]-Tests

In Abb. 19 ist die Lumineszenzhemmung der **Methanol-Extrakte** in der Verdünnung G6 dargestellt. Je höher die Gesamtkontamination, desto höher war die gemessene Hemmung der Methanol-Extrakte am Beginn der Untersuchung. Im „PAK“-Bodensystem nahm die anfängliche Hemmung von 39 % nach einem kurzen Anstieg am 6. Tag auf 10 % am 64. Tag ab und blieb danach unverändert. Im „NSO“-Bodensystem betrug die anfängliche Hemmung 27 %. Zwischen dem 20. und 64. Tag wurde eine Abnahme auf 14 % beobachtet, im Anschluß stieg die Hemmung wieder auf 24 % (83. Tag) bzw. 21 % (111. Tag) an. Die anfängliche Hemmung von 54 % im „PAK+NSO“-Bodensystem veränderte sich im gesamten Versuchszeitraum nur geringfügig (Einzelwerte s. 0).

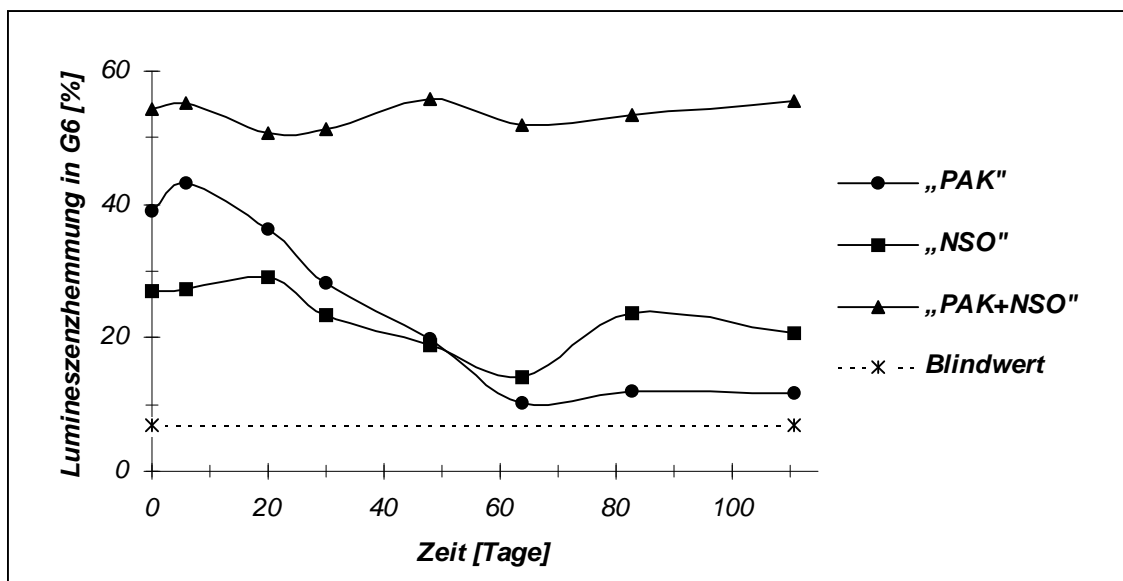


Abb. 19: Lumineszenzhemmung der Methanol-Extrakte in der Verdünnung G6

Die Untersuchung der **wäßrigen Eluate** ergab, bedingt durch deren starke Eigenfärbung, keine reproduzierbaren Ergebnisse. Auch durch den Einsatz von Absorptions-Korrektur-Küvetten, die die Quantifizierung einer nichtphysiologischen Transmissionsminderung durch Eigenfärbung der Testlösung erlauben (KLEIN, 1990), konnten die Ergebnisse nicht verbessert werden. Die Einzelergebnisse wurden daher nicht in die vorliegende Arbeit aufgenommen.

5.4.2 Korrelation von Ausgangsverbindungen und Toxizität im Microtox[®]-Test

Die Lumineszenzhemmung im Microtox[®]-Test wird in *Abb. 20* mit den Ergebnissen der PAK- und Hetero-PAK-Analytik der Soxhlet-Extrakte (Dichlormethan) und der Methanol-Extrakte korreliert. Die PAK- und Hetero-PAK-Gehalte in den Methanol-Extrakten lagen durchschnittlich bei 73 % der mittels Soxhlet extrahierten Kontamination und blieben für jede einzelne Verbindung über den Versuchszeitraum relativ konstant (Einzelergebnisse s. 0). Die Gesamtkontamination des Bodens an PAK und Hetero-PAK wurde somit durch den zum Microtox[®]-Test eingesetzten Methanol-Extrakt gut repräsentiert (Pearson-Korrelation von Gehalten in Soxhlet- und Methanol-Extrakt s. *Tab. 9*). Entsprechend konnte die Lumineszenzhemmung mit den Ergebnissen beider Extrakte korreliert werden.

Für das „PAK“-Bodensystem ergab sich eine signifikante Spearman-Rank-Korrelation von Lumineszenzhemmung und Σ PAK mit Korrelationskoeffizienten von 0,9048 (Dichlormethan-Extrakt) und 0,9286 (Methanol-Extrakt) (*Tab. 9* und *Abb. 20a*). Mit dem PAK-Abbau trat in diesem Bodensystem eine Minderung der Lumineszenzhemmung ein.

Im „NSO“-Bodensystem trat eine Minderung der Lumineszenzhemmung zeitverzögert zur Kontaminationsabnahme erst ab dem 20. Tag ein (*Abb. 20b*). Nach dem 64. Tag stagnierte die Hetero-PAK-Konzentration im Bodensystem nahezu, während die Toxizität deutlich anstieg. Insgesamt ergab sich für dieses Bodensystem ein Korrelationskoeffizient von 0,6607 (Dichlormethan-Extrakt und Methanol-Extrakt).

Die in *Abb. 20c* dargestellten Verläufe von Kontamination und Lumineszenzhemmung des „PAK+NSO“-Bodensystems korrelierten nicht miteinander (Rang-Korrelationskoeffizient -0,1905). Während in beiden Extrakten eine Abnahme der summarischen Kontamination festgestellt wurde, blieb die Toxizität nahezu konstant.

Tab. 9: Koeffizienten der Korrelation von Ausgangskontamination in Dichlormethan (DCM)- und Methanol (MeOH)-Extrakten und Lumineszenzhemmung

Korrelation von	„PAK“	„NSO“	„PAK+NSO“
Kontamination in DCM- ↔ MeOH-Extrakten (Pearson-Korrelation)	0,9900	0,9936	0,9830
Kontamination im DCM-Extrakt ↔ L.hemmung (Spearman-Rank-Korrelation)	0,9048	0,6607	-0,1905
Kontamination im MeOH-Extrakt ↔ L.hemmung (Spearman-Rank-Korrelation)	0,9286	0,6607	-0,1905

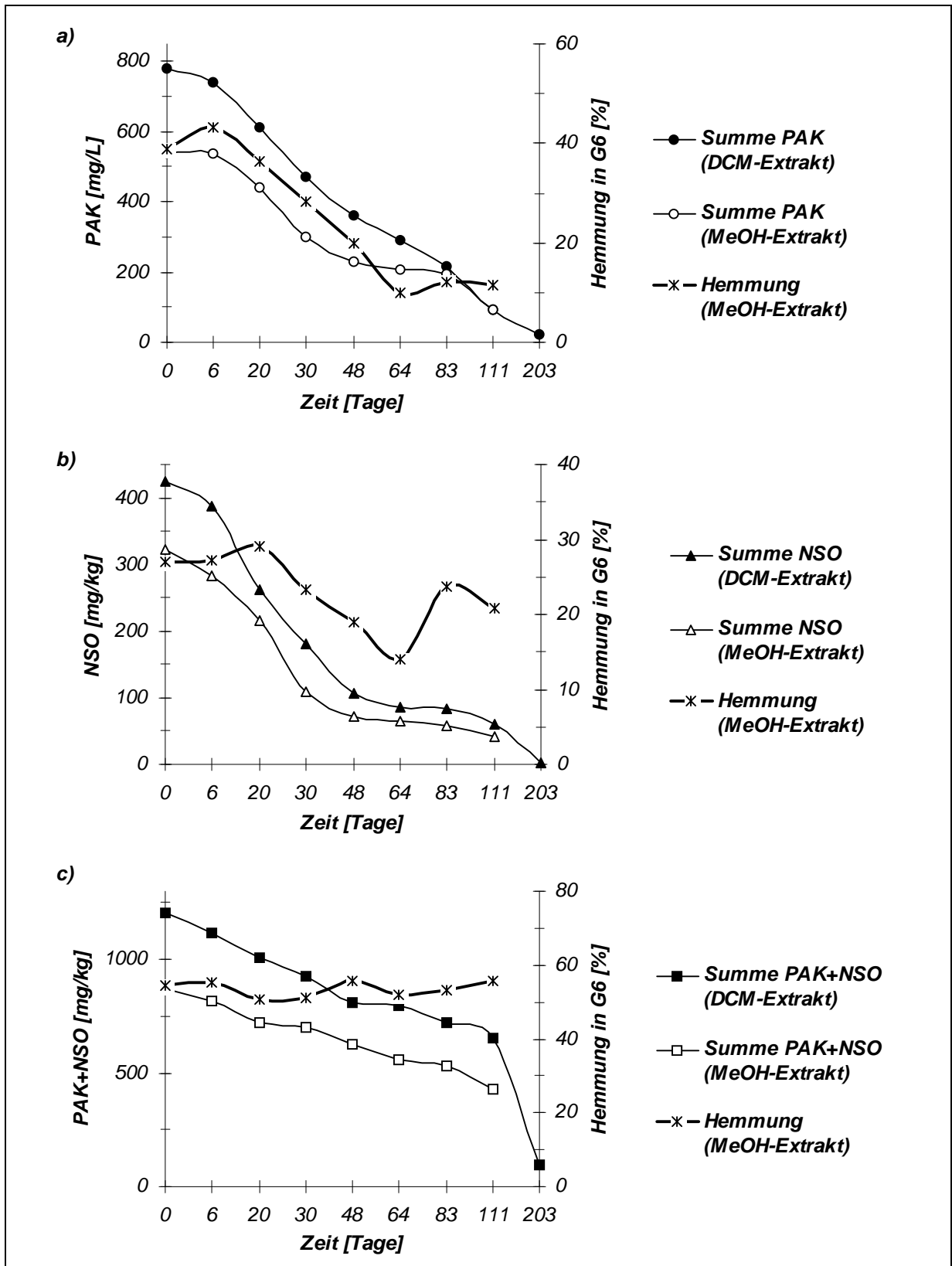


Abb. 20: Korrelation der Gesamtkontamination in Dichlormethan- (DCM) und Methanol- (MeOH) -Extrakten mit der Lumineszenzhemmung der Methanol-Extrakte (Verd. G6) in den Bodensystemen **a)** „PAK“, **b)** „NSO“, **c)** „PAK+NSO“

5.4.3 Korrelation von Metaboliten und Toxizität im Microtox[®]-Test

Da in den zum Microtox[®]-Test eingesetzten Methanol-Extrakten neben PAK bzw. Hetero-PAK auch Metaboliten enthalten waren (s. 9.7.9), werden in *Abb. 21* Metaboliten-Gehalte in den Methanol-Extrakten und Lumineszenzhemmung korreliert. Hierbei ist zu beachten, daß nicht alle mit Methanol extrahierten Metaboliten identifiziert bzw. quantifiziert werden konnten.

Im „PAK“-Bodensystem, in dem bereits PAK-Gehalte und Lumineszenzhemmung sehr gut korrelierten (*Abb. 20a*), war keine direkte Korrelation von Metaboliten und Lumineszenzhemmung erkennbar (*Abb. 21a*). Zum Zeitpunkt der Konzentrationsmaxima der Metaboliten am 20. Tag (1-Indanon), 30. Tag (1,2-Acenaphthenchinon, 9-Fluorenon) bzw. 48. Tag (4-Hydroxy-9-fluorenon) nahm die Lumineszenzhemmung stetig ab.

Im „NSO“-Bodensystem ließen sich die Konzentrationen des einzig quantifizierten Metaboliten Dibenzothiophensulfoxid und die Lumineszenzhemmung ebenfalls nicht korrelieren (*Abb. 21b*). Zum Zeitpunkt des Konzentrationsmaximums des Dibenzothiophensulfoxids am 64. Tag wies die Lumineszenzhemmung ein Minimum auf.

Lumineszenzhemmung und Konzentrationen der quantifizierten Metaboliten des „PAK+NSO“-Bodensystems sind in *Abb. 21c* gegenübergestellt. In diesem Bodensystem, in dem die Toxizität trotz abnehmender PAK- und Hetero-PAK-Gehalte konstant blieb (*Abb. 20c*), wurden ansteigende Metaboliten-Gehalte in den Methanol-Extrakten festgestellt.

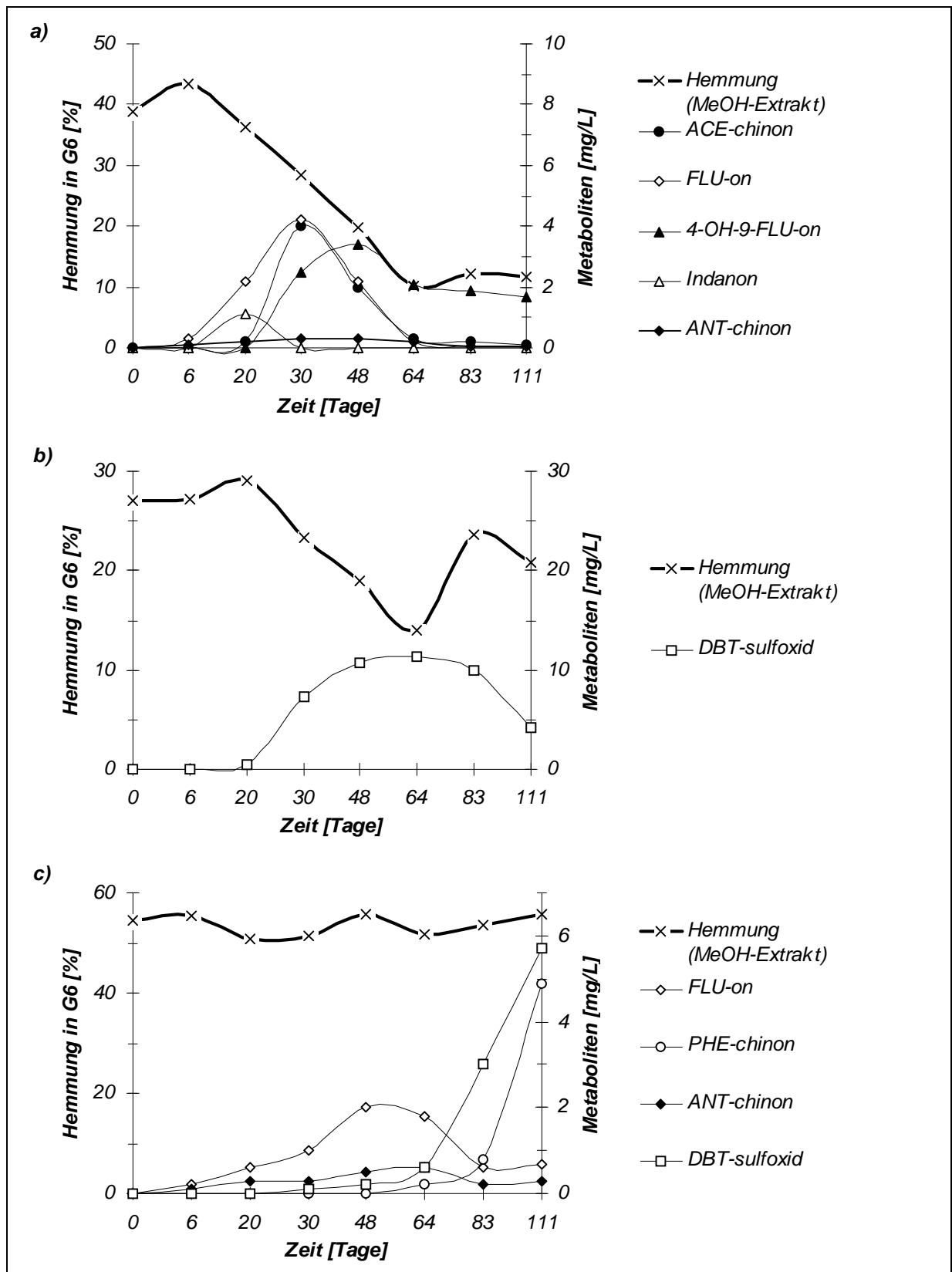


Abb. 21: Korrelation der Metaboliten in den Methanol-Extrakten (MeOH) mit der Lumineszenzhemmung der Methanol-Extrakte (Verd. G6) in den Bodensystemen **a)** „PAK“, **b)** „NSO“, **c)** „PAK+NSO“

6 Mikrobieller Abbau strukturanaloger PAK und Hetero-PAK - Abbaustudie 2

6.1 Durchführung

Der Ah-Horizont/Kompost-Modellboden wurde mit den in *Tab. 10* aufgeführten strukturanalogen PAK bzw. Hetero-PAK Fluoren, Carbazol, Dibenzothiophen und Dibenzofuran in den angegebenen Konzentrationen dotiert. Die unterschiedlich kontaminierten Bodensysteme - im folgenden „*FLU*“, „*CAR*“, „*DBT*“, „*DBF*“ und „*MIX*“ genannt - wurden dabei jeweils dreifach angesetzt (Durchführung s. 9.8.2). Die Proben wurden wie unter 9.8.3 beschrieben gelagert und nach 24 Stunden (0.Tag) sowie nach 7, 14, 28, 42, 61 und 82 Tagen wie unter 9.8.3 beschrieben untersucht.

Tab. 10: Ausgangskonzentrationen der PAK und Hetero-PAK in den verschiedenen Bodensystemen [mg/kg]

	„ <i>FLU</i> “ [mg/kg]	„ <i>CAR</i> “ [mg/kg]	„ <i>DBT</i> “ [mg/kg]	„ <i>DBF</i> “ [mg/kg]	„ <i>MIX</i> “ [mg/kg]
Fluoren	200,1	-	-	-	200,0
Carbazol	-	200,8	-	-	199,9
Dibenzothiophen	-	-	200,3	-	200,0
Dibenzofuran	-	-	-	200,5	208,2

6.2 Ergebnisse der PAK- und Hetero-PAK-Analytik

6.2.1 Abbau der PAK und Hetero-PAK und gegenseitige Wechselwirkungen

Während der Untersuchungszeit von 82 Tagen wurden alle vier PAK und Hetero-PAK in den verschiedenen Bodensystemen teilweise oder vollständig abgebaut. Die Konzentrationsverläufe der einzelnen Verbindungen in den einzeln- bzw. mischkontaminierten Bodensystemen sind in *Abb. 22* dargestellt (Einzelergebnisse s. 0). Fluoren (*Abb. 22a*) wurde in den „*FLU*“-Bodensystemen nach einer Lag-Phase von 7 Tagen bis zum 82. Tag vollständig abgebaut. In den „*MIX*“-Bodensystemen verlängerte sich die Lag-Phase auf 14 Tage, danach folgte eine Konzentrationsabnahme auf 14 mg/kg (7 % der Ausgangskonzentration) nach 82 Tagen. Eine statistische Untersuchung der Daten ergab zwischen dem 14. und 61. Untersuchungstag signifikant höhere Fluorengehalte in den mischkontaminierten Boden-

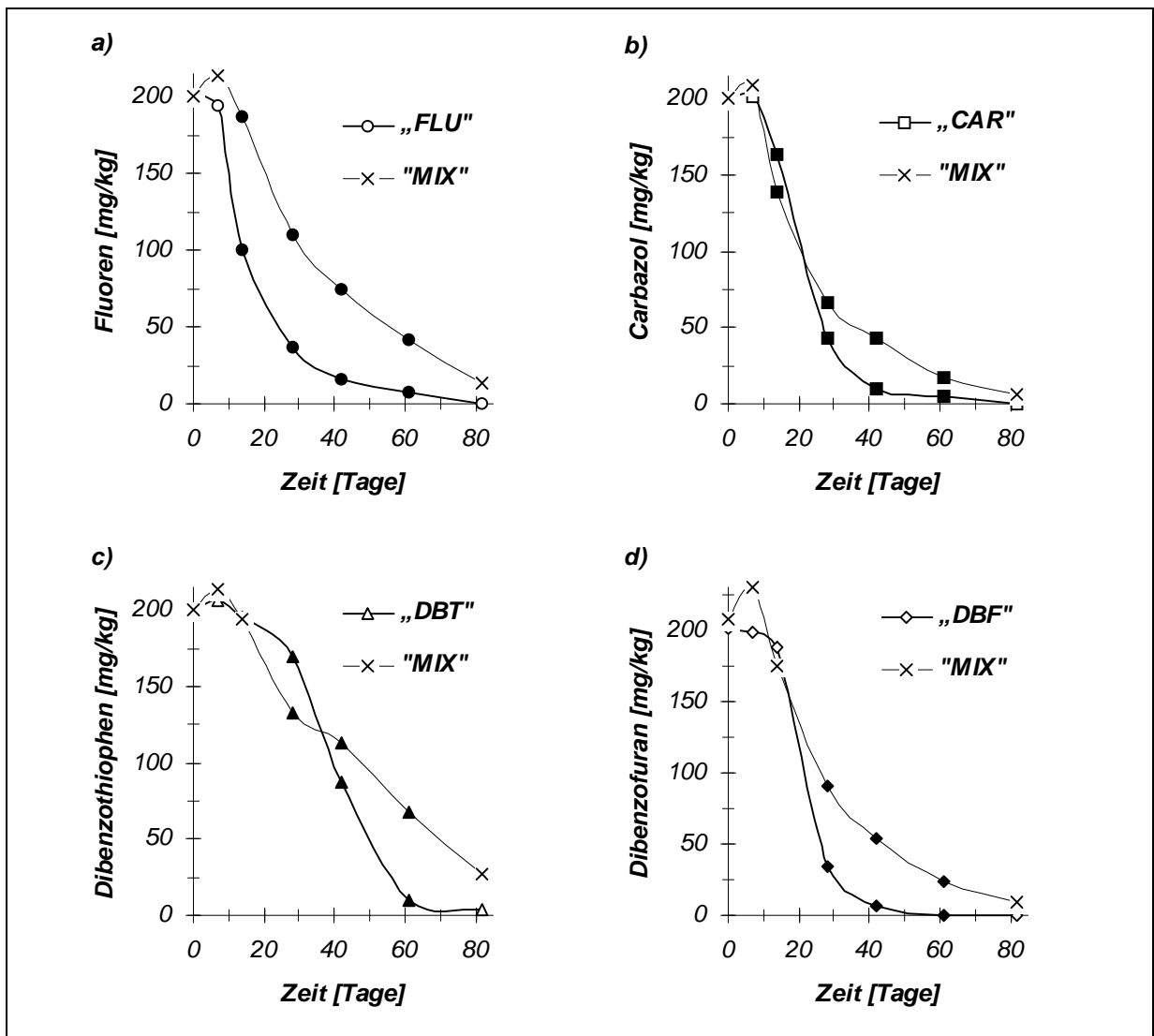


Abb. 22: Konzentrationsverläufe von PAK und Hetero-PAK in den verschiedenen Bodensystemen **a)** Fluoren, **b)** Carbazol, **c)** Dibenzothiophen, **d)** Dibenzofuran (schwarz markierte Datenpunkte: Unterschiede zwischen den einzeln- und mischkontaminierten Bodensystemen sind signifikant; T-Test, $\alpha = 0,05$)

systemen und somit eine Hemmung des Fluoren-Abbaus durch die Hetero-PAK (T-Test, $\alpha = 0,05$, s. schwarz markierte Datenpunkte in *Abb. 22a*).

Carbazol wurde in beiden Bodensystemen nach einer 7-tägigen Lag-Phase abgebaut, danach folgte ein signifikant schnellerer Carbazol-Abbau in den „MIX“-Bodensystemen. Zwischen dem 28. und 61. Untersuchungstag wurden in den mischkontaminierten Bodensystemen jedoch signifikant höhere Carbazol-Gehalte nachgewiesen (*Abb. 22b*).

Ähnlich wie Carbazol wurde Dibenzothiophen nach einer in beiden Bodensystemen 14-tägigen Lag-Phase zunächst bis zum 28. Untersuchungstag in den „MIX“-Boden-

systemen schneller abgebaut (*Abb. 22c*). Im Anschluß wurde der Dibenzothiophen-Abbau in den mischkontaminierten Bodensystemen in Gegenwart der PAK bzw. Hetero-PAK signifikant verlangsamt.

Dibenzofuran wurde nach einer in beiden Bodensystemen ca. 14-tägigen Lag-Phase in den „DBF“-Bodensystemen schneller abgebaut (*Abb. 22d*). Zwischen dem 28. und 61. Untersuchungstag wurden in den mischkontaminierten Bodensystemen signifikant höhere Dibenzofuran-Gehalte nachgewiesen (T-Test, $\alpha = 0,05$).

6.2.2 Abbaureihenfolge der strukturanalogen PAK und Hetero-PAK

In *Abb. 23* ist der Abbau der strukturanalogen Verbindungen in den verschiedenen

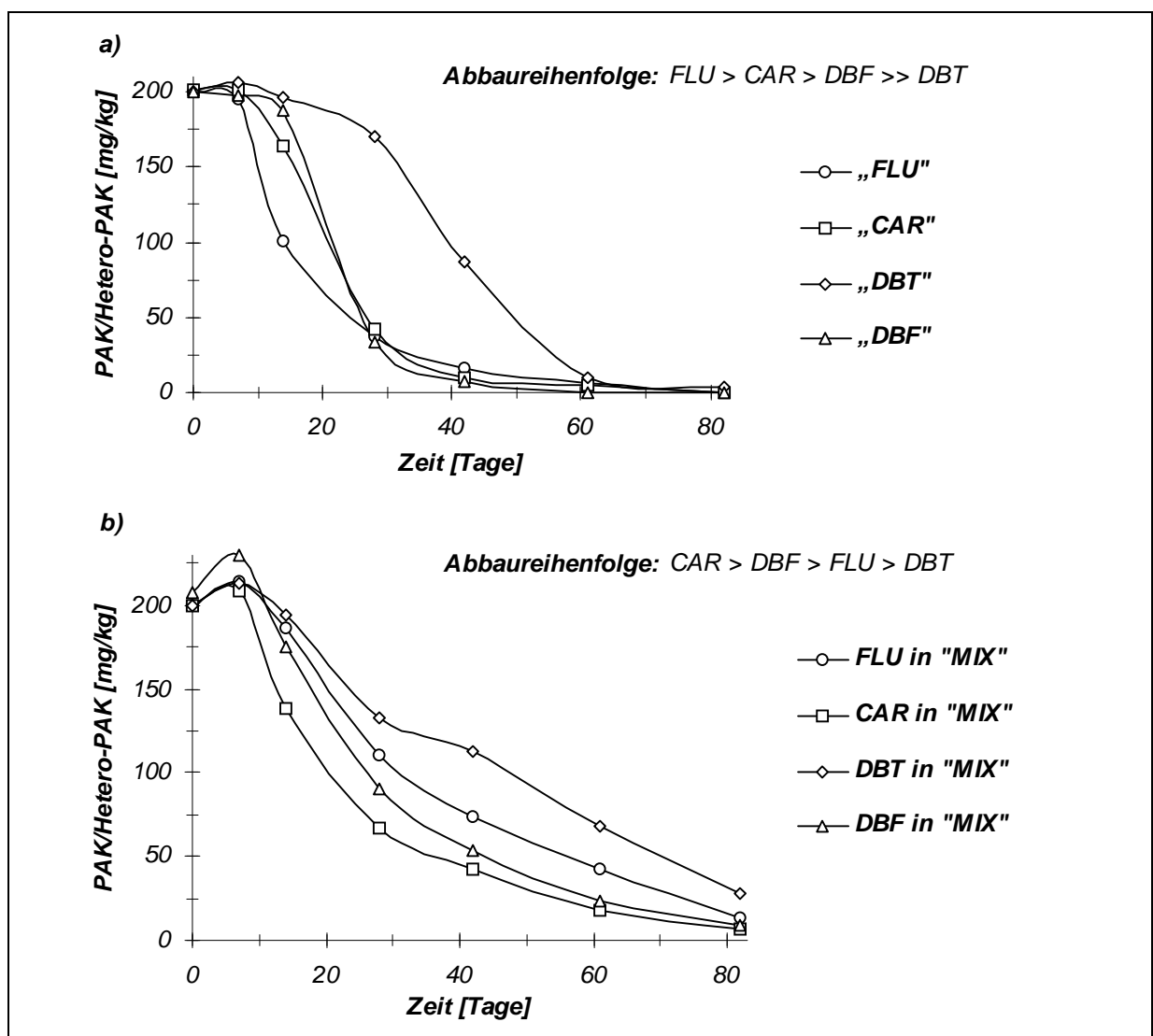


Abb. 23: Konzentrationsverläufe der PAK und Hetero-PAK **a)** einzelnkontaminierte Bodensysteme **b)** mischkontaminierte Bodensysteme

Bodensystemen dargestellt. Der unterschiedliche Konzentrationsverlauf verdeutlicht, daß die Substitution des C₉-Atoms des Fluoren durch Stickstoff, Schwefel bzw. Sauerstoff Einfluß auf die Abbaugeschwindigkeit der Verbindungen hat. In den einzelkontaminierten Bodensystemen (Abb. 23a) wurde durch den Einsatz statistischer Tests die Abbaureihenfolge *Fluoren* > *Carbazol* > *Dibenzofuran* >> *Dibenzothiophen* festgestellt. Dabei unterschieden sich die Fluoren-, Carbazol- und Dibenzofuran-Gehalte nur am 14. Untersuchungstag signifikant. Signifikant höhere Dibenzothiophen-Gehalte wurden zwischen dem 28. und 42. Untersuchungstag nachgewiesen (T-Test, $\alpha = 0,05$; Einzelwerte s. 0). In den mischkontaminierten Ansätzen verschoben sich die relativen Abbaugeschwindigkeiten der einzelnen Verbindungen zu folgender Abbaureihenfolge: *Carbazol* > *Dibenzofuran* > *Fluoren* > *Dibenzothiophen* (Abb. 23b). Dabei unterschieden sich Carbazol- und Dibenzofuran-Gehalte am 14., 28. und 61. Tag signifikant, Dibenzofuran- und Fluoren-Gehalte zwischen dem 14. und 61. Tag sowie Fluoren- und Dibenzothiophen-Gehalte zwischen dem 28. und 82. Tag (T-Test, $\alpha = 0,05$; Einzelwerte s. 0).

6.3 Ergebnisse der Metaboliten-Analytik

Die Identifizierung von Metaboliten der strukturanalogen Polyaromaten wurde mittels HPLC-DAD und GC-MSD durchgeführt. Während aus dem Abbau von Fluoren und Dibenzothiophen einige Metaboliten identifiziert werden konnten, gelang der Nachweis von Metaboliten des Carbazol- bzw. Dibenzofuran-Abbaus nicht.

Quantifiziert wurden nur die über HPLC-DAD nachgewiesenen Substanzen, zu denen Referenzsubstanzen vorlagen, sowie Dibenzothiophensulfoxid, das über einen oxidierten Dibenzothiophen-Standard indirekt quantifiziert wurde (Arbeitsvorschrift s. 9.7.4).

Metaboliten des Fluoren-Abbaus

In beiden mit Fluoren kontaminierten Bodensystemen wurde 9-Fluorenon nachgewiesen. Daneben wurden Spuren von 9-Hydroxyfluoren, 4-Hydroxy-9-fluorenon und einem weiteren Hydroxyfluoren-Isomer (nicht 2- bzw. 9-Hydroxyfluoren) identifiziert,

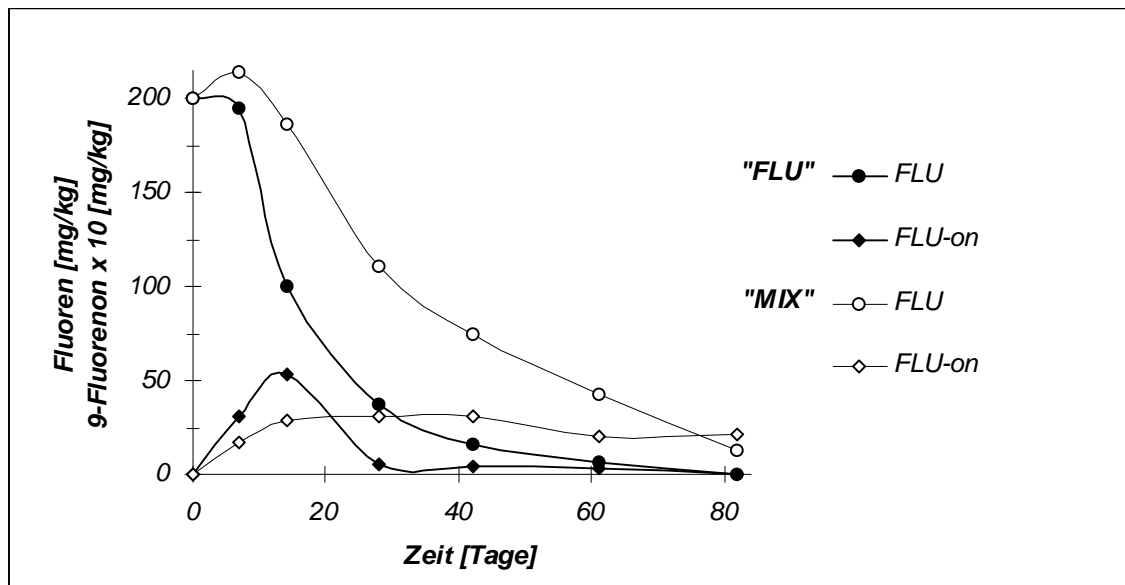


Abb. 24: Konzentrationsverläufe von Fluoren (FLU) und 9-Fluorenon (FLU-on) in den verschiedenen Bodensystemen

die jedoch nicht quantifiziert wurden. *Abb. 24* zeigt die Konzentrationsverläufe von Fluoren und 9-Fluorenon in den verschiedenen Bodensystemen. Während das kurzzeitige Konzentrationsmaximum des 9-Fluorenon (5,4 mg/kg am 14. Tag) in den „FLU“-Bodensystemen gut mit der maximalen Abbaurrate des Fluoren-Abbaus korrelierte, wurde in den „MIX“-Bodensystemen eine dauerhafte Anreicherung von 9-Fluorenon auf Gehalte zwischen 2,1 und 3,1 mg/kg beobachtet.

Metaboliten des Dibenzothiophen-Abbaus

In beiden mit Dibenzothiophen kontaminierten Bodensystemen wurde Dibenzothiophensulfoxid nachgewiesen. Zusätzlich wurde Dibenzothiophensulfon in den mischkontaminierten Bodensystemen identifiziert. Die Konzentrationsverläufe von Dibenzothiophen und seinen Metaboliten sind in *Abb. 25* dargestellt. In den „DBT“-Bodensystemen korrelierte das Konzentrationsmaximum von 3,2 mg/kg Dibenzothiophensulfoxid am 28. Tag gut mit dem beginnenden Dibenzothiophen-Abbau. In den mischkontaminierten Bodensystemen wurden hohe Dibenzothiophensulfoxid-Gehalte nachgewiesen, die bis zum Ende des Untersuchungszeitraums jedoch nahezu vollständig abgebaut wurden. Mit 24 mg/kg Dibenzothiophensulfoxid lagen am 28. Tag 11 % des Dibenzothiophen in Form seines Metaboliten vor. Zum Zeitpunkt des Konzentrationsmaximums verlangsamte sich der Dibenzothiophen-

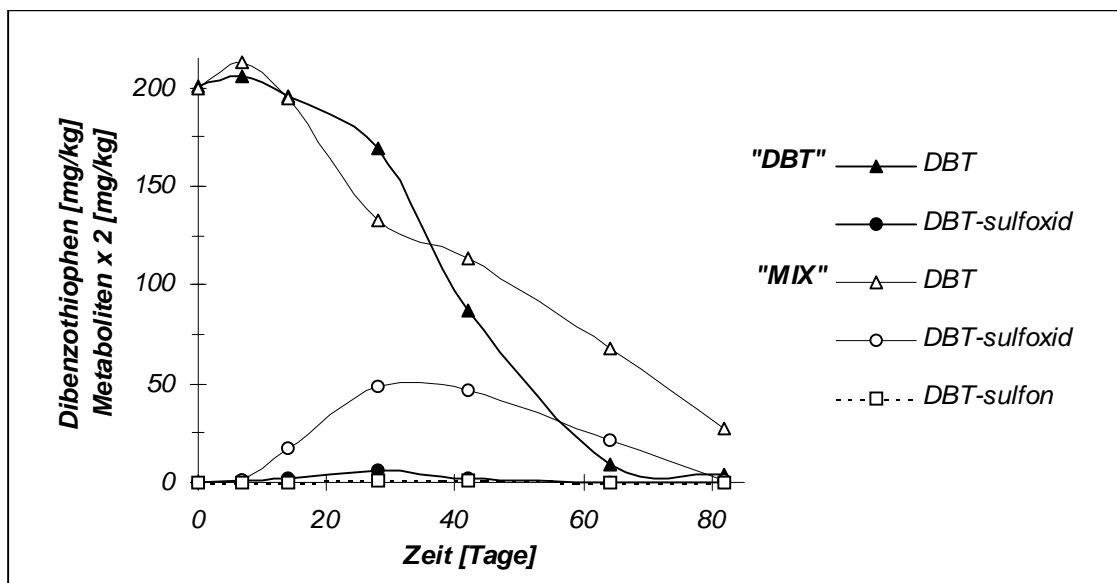


Abb. 25: Konzentrationsverläufe von Dibenzothiophen (DBT), Dibenzothiophensulfoxid (DBT-sulfoxid) und Dibenzothiophensulfon (DBT-sulfon) in den verschiedenen Bodensystemen

Abbau. In den „MIX“-Bodensystemen wurde Dibenzothiophensulfon als Folgeprodukt des Dibenzothiophensulfoxids zwischen dem 28. und 61. Tag in Konzentrationen < 1 mg/kg nachgewiesen.

7 Diskussion

7.1 PAK- und Hetero-PAK-Abbau in den Modellbodensystemen

7.1.1 Abbau der PAK

In allen untersuchten Modellbodensystemen wurden die eingesetzten zwei- bis fünfkernigen PAK während des Untersuchungszeitraums teilweise oder vollständig abgebaut. Dabei zeigte sich die biologische Abbaubarkeit als Funktion der Anzahl kondensierter Ringe: Mit steigender Ringanzahl verringerte sich die Abbaugeschwindigkeit der PAK.

In den „PAK“-Bodensystemen waren innerhalb der dreikernigen PAK sphärische (Acenaphthen) und angulare Verbindungen (Fluoren, Phenanthren) leichter abbaubar als lineare PAK (Anthracen), unter den vierkernigen PAK wurden die sphärischen Verbindungen Fluoranthren und Pyren schneller abgebaut als das angulare Benz[a]anthracen. Diese Abbaureihenfolge steht der thermodynamischen Stabilität von PAK entgegen, wonach angulare PAK die höchste und lineare PAK die geringste Stabilität aufweisen (BLUMER, 1976). Bereits BOSSERT und BARTHA (1986) erklärten jedoch die bessere Abbaubarkeit von Phenanthren gegenüber Anthracen durch die höhere Wasserlöslichkeit des Phenanthren (1,29 mg/L; Anthracen: 0,07 mg/L, MACKAY und SHIU, 1977) und dadurch bedingte bessere Bioverfügbarkeit. Auch Fluoranthren und Pyren weisen mit 0,26 mg/L bzw. 0,14 mg/L höhere Wasserlöslichkeiten als Benz[a]anthracen (0,014 mg/L) auf (MACKAY und SHIU, 1977).

7.1.2 Abbau der Hetero-PAK

Innerhalb der Hetero-PAK zeigte sich die Abbaubarkeit nicht nur als Funktion der Anzahl kondensierter Ringe, sondern auch abhängig von der Art und Einbindung des Hetero-Atoms. In beiden in dieser Arbeit beschriebenen Abbaustudien wiesen jeweils die strukturanalogen N- und O-PAK gleicher Ringanzahl (Indol und Benzofuran bzw. Carbazol und Dibenzofuran) vergleichbare Abbaugeschwindigkeiten auf, während die schwefelhaltigen Analoga Benzothiophen und Dibenzothiophen langsamer abgebaut wurden. Diese höhere Persistenz schwefelhaltiger Aromaten ist ein vielbeschriebenes Phänomen in diversen Umweltmatrizes: GUNDLACH et al. (1983)

untersuchten schwefelhaltige Polyzyklen in gealtertem Rohöl nach der *Amoco Cadiz*-Katastrophe und stellten eine hohe Langzeitstabilität von alkylierten Dibenzothiophenen fest. BERTHOU und VIGNIER (1986) beschrieben die Stabilität von Dibenzothiophenen gegenüber Photooxidation in mit verschiedenen Rohölen kontaminierten Meerwasserproben als Funktion des Alkylierungsgrades: Die Halbwertszeiten der Verbindungen lagen zwischen 8 Tagen (Dibenzothiophen) und 2 Jahren (Trimethyldibenzothiophen). FRIOCOURT et al. (1982) schlugen daher alkylierte Dibenzothiophene als Marker für Ölverschmutzungen vor. Untersuchungen zum anaeroben Abbau verschiedener Aromaten in Grundwasser ergaben eine im Vergleich zu stickstoff- und sauerstoffhaltigen Aromaten schlechtere Abbaubarkeit der Schwefelaromaten (KUHN und SUFLITA, 1989).

Innerhalb der N-PAK wiederum zeigte sich die Abbaubarkeit zusätzlich zur Anzahl der Ringe abhängig von der Basizität der Verbindungen. So wurden die neutralen Verbindungen Indol und Carbazol, bei denen das Stickstoff-Atom in einen fünfgliedrigen Pyrrol-Ring eingebunden ist, schneller abgebaut als die basischen, einen Pyridin-Ring enthaltenden Analoga Chinolin und Acridin. Insbesondere Acridin zeigte eine starke Persistenz in beiden Bodensystemen der Abbaustudie 1. Die Summe des extrahierbaren und verseifbaren Acridin-Gehalts betrug nach 203 Tagen 102 % („NSO“) bzw. 80 % („PAK+NSO“) der dotierten Ausgangskonzentration. Entsprechend wurde Acridin gar nicht oder nur in einem für eine dreikernige Verbindung geringen Ausmaß abgebaut.

Zur biologischen Abbaubarkeit von Acridin liegen nur wenige Literaturdaten vor. KNEZOVICH et al. (1990) wiesen in einem Flüssigkulturmedium unter verschiedenen anaeroben Bedingungen den mikrobiellen Abbau von Acridin nach. Dagegen wurden in einem teerölkontaminierten Grundwasserleiter dreikernige basische N-PAK wie Acridin nicht abgebaut (PEREIRA et al., 1987).

Ein limitierender Faktor für den biologischen Abbau ist die Sorption von Kontaminanten an die Bodenmatrix über verschiedene Mechanismen wie Van-der-Waals-Kräfte, Ionenaustausch-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen, Charge-Transfer-Komplexe und hydrophobe Wechselwirkungen (BOLLAG et al., 1992; NOVAK et al., 1995). Basische Stickstoffverbindungen wie Acridin und Chinolin können über Kationenaustausch-Wechselwirkungen stark an Böden und Tonmineralien sorbiert

werden. Die pH-Abhängigkeit dieser Reaktion wurde von TRAINA und ONKEN (1991) gezeigt: So verringerte sich die Sorption von Chinolin und Acridin an verschiedene Tonminerale, wenn der pH-Wert der Lösung über den pK_S -Wert der Substanzen anstieg. Die biologische Abbaubarkeit sorbierter Verbindungen ist von der Desorptionsrate abhängig. So wurde in Versuchen mit einem Chinolin-abbauenden Bakterium die Abbaugeschwindigkeit von kationisch an Tonmineralien sorbiertem Chinolin gegenüber dem Chinolin-Abbau in Lösung um den Faktor 30 verlangsamt (SMITH et al., 1992).

Aufgrund der obigen Ausführungen kann angenommen werden, daß in den eigenen Abbaustudien Acridin ($pK_S = 5,68$) stark an die Bodenmatrix des Ah-Horizont-/Kompost-Gemisches ($pH = 5,5$) sorbiert wurde und daher gar nicht bzw. nur in geringem Ausmaß für einen biologischen Abbau zugänglich war. Die hohe Freisetzungsrate des Acridin nach alkalischer Hydrolyse der Bodenmatrix (20-27 % der Ausgangskonzentration nach 203 Tagen) unterstützt diese Hypothese. Der Abbau des Chinolins wurde aufgrund des niedrigeren pK_S -Werts von 4,92 in geringerem Ausmaß durch kationische Sorption limitiert.

Die Cyano-PAK 1-Cyanonaphthalin und 9-Cyanoanthracen wurden in beiden Bodensystemen abgebaut, allerdings deutlich langsamer als die entsprechenden unsubstituierten PAK und Hetero-PAK gleicher Ringanzahl. Der Einfluß einer Cyano-Substitution auf den biologischen Abbau könnte mit dem einer Alkylierung des aromatischen Ringsystems verglichen werden. So ist vom Abbau verschiedener PAK wie Naphthalin, Fluoren, Phenanthren, Pyren und Chrysen bekannt, daß die Abbaugeschwindigkeit mit dem Alkylierungsgrad abnimmt (ELMENDORF et al., 1994).

Die in dieser Arbeit entwickelte Kationenaustauschchromatographie zur Trennung neutraler und basischer N-PAK ist ein wichtiges Instrument für die Untersuchung von Teerölkontaminationen. Aufgrund des unterschiedlichen Abbauverhaltens der verschiedenen N-PAK bedarf es dieser Trennung und einer genauen Identifizierung der N-PAK, um Gefährdungsabschätzungen vorzunehmen und möglichst präzise Vorhersagen über die Abbaubarkeit der Einzelverbindungen zu treffen.

7.1.3 Wechselwirkungen von PAK und Hetero-PAK

In beiden Abbaustudien wurde der Abbau aller eingesetzter PAK durch die Hetero-PAK signifikant gehemmt. Je nach Substanz wurden verlängerte Lag-Phasen, verringerte Abbauraten und/oder höhere Restgehalte der PAK am Ende des Untersuchungszeitraums nachgewiesen.

Der Hetero-PAK-Abbau wurde umgekehrt ebenfalls durch die PAK beeinflusst. Hier zeigten sich die auftretenden Phänomene jedoch vielfältiger: So wurde in der Abbaustudie 1 der Benzothiophen-Abbau durch die PAK nicht beeinflusst, der Indol- und Benzofuran-Abbau zeigten nur am 6. Untersuchungstag signifikant höhere Konzentrationen in den mischkontaminierten Bodensystemen. Der Abbau aller anderen Hetero-PAK wurde in dieser Abbaustudie signifikant gehemmt. In der Abbaustudie 2 wurde der Dibenzofuran-Abbau im mischkontaminierten Ansatz durch die Strukturanaloga signifikant gehemmt. Der Abbau von Carbazol und Dibenzothiophen wurde in dieser Studie anfänglich durch die Strukturanaloga gefördert, zu einem späteren Zeitpunkt des Abbaus aber ebenfalls gehemmt.

Hemmende Effekte von Hetero-PAK wie z.B. Indol, Chinolin, Benzothiophen, Benzofuran, Carbazol, Acridin, Dibenzothiophen und Dibenzofuran auf den Abbau von Mono- und Polyaromaten in Flüssigkulturmedien wurden bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben (ARCANGELI und ARVIN, 1995; DYREBORG et al., 1996a und b; LANTZ et al., 1997). DYREBORG et al. (1996a) führten die Hemmung des Toluol-Abbaus auf die toxische Wirkung der Heteroaromaten gegenüber den abbauenden Mikroorganismen zurück. Stehen verschiedene PAK und Hetero-PAK konkurrierend als Substrate für ein abbauendes Enzymsystem zur Verfügung, kann es zu einer *kompetitiven Hemmung* kommen (RESNICK und GIBSON, 1996). STRINGFELLOW und AITKEN (1995) beschrieben die kompetitive Hemmung des Phenanthren-Abbaus durch Naphthalin, Methylnaphthaline und Fluoren. Ebenfalls bekannt ist der kompetitive Metabolismus bei Monoaromaten (CHANG et al., 1993).

Abbaufördernde Phänomene, wie sie in der Anfangsphase des Carbazol- und Dibenzothiophen-Abbaus auftraten, können durch Induktion der für den Abbau des Substrats erforderlichen Enzyme durch ein Cosubstrat oder durch Cometabolismus in Gegenwart eines Primärsubstrats auftreten. ALVAREZ und VOGEL (1991) beschrie-

ben derartige synergistische Phänomene beim Abbau von Benzol und *p*-Xylol in Gegenwart von Toluol durch eine *Pseudomonas*-Spezies.

Bei dem Hemmungsmechanismus der *Katabolit-Repression* wird von zwei konkurrierenden Substraten, zu deren Verwertung unterschiedliche Enzymsysteme erforderlich sind, dasjenige zuerst genutzt, das schnelleres Wachstum ermöglicht. MILLETTE et al. (1995) schlossen aus einem Experiment zu den Wechselwirkungen beim Abbau verschiedener PAK, Hetero-PAK und Phenolen in Flüssigkultur, daß der biologische Abbau des Substrats mit der geringsten Polarität am stärksten durch andere Teeröl-Verbindungen gehemmt wird. Letztlich wird hiernach die Abbaureihenfolge von aromatischen Verbindungen in komplexen Mischungen durch die Polarität und damit die Bioverfügbarkeit der einzelnen Substrate bestimmt.

Als Maß für die Polarität der eingesetzten Substanzen sind in *Tab. 11* die Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten $\log K_{OW}$ dargestellt. Durch Spearman-Rank-Korrelation dieser Daten mit den in *Tab. 7* (s. 5.2.2) dargestellten Abbaureihenfolgen der PAK und Hetero-PAK in den verschiedenen Bodensystemen der Abbaustudie 1 konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Abbaureihenfolge und Polarität bestätigt werden („PAK“: $n = 9$, $r = 0,9500$; „NSO“: $n = 7$, $r = 0,8571$; „PAK+NSO“: $n = 16$, $r = 0,8938$). Für die Abbaustudie 2 konnte keine Korrelation aufgestellt werden, da mit vier eingesetzten Substanzen zu wenig Rangpaare vorlagen. In den „PAK+NSO“-Bodensystemen traten die höchsten Rangdifferenzen bei den basi-

Tab. 11: Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten ($\log K_{OW}$) der untersuchten PAK und Hetero-PAK

PAK	$\log K_{OW}$	Hetero-PAK	$\log K_{OW}$
<i>Naphthalin</i>	3,37 ¹	<i>Indol</i>	-
<i>Acenaphthen</i>	3,92 ²	<i>Chinolin</i>	2,03 ¹
<i>Fluoren</i>	4,18 ³ ; 4,38 ²	<i>Benzothiophen</i>	3,12 ¹
<i>Phenanthren</i>	4,57 ³ ; 4,63 ⁴	<i>Benzofuran</i>	2,67 ¹
<i>Anthracen</i>	4,45 ¹ ; 4,63 ⁴	<i>Carbazol</i>	3,29 ¹
<i>Fluoranthren</i>	5,22 ^{3,4}	<i>Acridin</i>	3,40 ¹
<i>Pyren</i>	5,22 ⁴	<i>Dibenzothiophen</i>	4,38 ⁵
<i>Benz[a]anthracen</i>	5,91 ⁴	<i>Dibenzofuran</i>	4,12 ¹
<i>Benzo[a]pyren</i>	6,50 ³	<i>1-Cyanonaphthalin</i>	-
		<i>9-Cyanoanthracen</i>	-

¹ LEO et al. (1971); ² MACKAY (1982); ³ SCHWARZENBACH et al. (1992); ⁴ YALKOWSKY und VALVANI (1979); ⁵ KARICKHOFF (1981)

schen N-PAK Chinolin und Acridin auf, die deutlich schlechter abgebaut wurden, als ihre $\log K_{OW}$ -Werten es erwarten lassen. Als vorherrschende Ursache sind die ionischen Wechselwirkungen mit der Bodenmatrix anzusehen, so daß trotz hoher Wasserlöslichkeit die Bioverfügbarkeit der Substanzen vermindert wird (s. auch 7.1.2). Entsprechend den Ergebnissen von MILLETTE et al. (1995) wurde der Abbau der polarsten Verbindungen Indol, Benzothiophen und Benzofuran nicht oder nur geringfügig durch die PAK beeinflusst, während mit abnehmender Polarität die Wechselwirkungen zunahmen.

Der summarische Schadstoffabbau war in der Abbaustudie 1 zunächst in den „PAK+NSO“-Bodensystemen signifikant höher als in den „PAK“-Bodensystemen (6. bis 20. Tag). Diese größere Abnahme kann auf höhere Verdampfungsverluste bedingt durch den höheren Gehalt der mischkontaminierten Bodensysteme an leichtflüchtigen zweikernigen Verbindungen zurückgeführt werden. Ab dem 64. Tag war jedoch der summarische Schadstoffabbau in den „PAK“-Bodensystemen höher als in den mischkontaminierten Systemen; in Gegenwart der Hetero-PAK ergab sich ein Effektivitätsverlust im absoluten Abbau der Gesamtkontamination.

Diese Ergebnisse zu den Wechselwirkungen von PAK und Hetero-PAK beim biologischen Abbau haben entscheidende Bedeutung für die Praxis der biologischen Bodenreinigung. Da organische Verbindungen wie Hetero-PAK die Effektivität des PAK-Abbaus im Boden limitieren können, muß ihre Anwesenheit bei der Erkundung von Teerölkontaminationen und der Auswahl geeigneter Sanierungsverfahren berücksichtigt werden. Die in der Praxis in der Regel eingesetzten Analysenparameter wie 16 PAK nach der US-EPA Priority Pollutant List sind somit nicht ausreichend. Vielmehr müssen Analysenverfahren eingesetzt werden, mit denen zumindest die Hauptinhaltsstoffe des Teeröls erfaßt werden, um deren Anwesenheit in Gefährdungsabschätzungen und Vorhersagen über mögliche Sanierungserfolge einzubeziehen. Um eine akzeptable Vorhersagegenauigkeit zu erreichen, sind jedoch noch weitere Abbaustudien zum Einfluß von Struktur sowie Konzentration der Hetero-PAK auf den PAK-Abbau erforderlich.

7.2 Bildung von PAK- und Hetero-PAK-Metaboliten

7.2.1 Identifizierung von PAK-Metaboliten

In beiden Abbaustudien wurden 30 PAK-Metaboliten verschiedener Strukturgruppen identifiziert. Eine Übersicht über die Verbindungen und ihre bisherige Identifizierung in Kulturmedien und Böden gibt *Tab. 12*. Insgesamt wurde eine Vielzahl insbesondere hydroxylierter und dihydroxylierter Verbindungen identifiziert, die bisher nur in Kulturmedien, nicht jedoch im Boden nachgewiesen wurden. WISCHMANN (1997) wies in Bodenabbaustudien vor allem Ketone und Chinone als PAK-Metaboliten nach. Er vermutete, daß phenolische Verbindungen im Boden ohne Anreicherung metabolisiert bzw. sofort irreversibel in die Huminstoffmatrix eingebaut werden.

Unter den identifizierten Metaboliten befinden sich typische Vertreter des Bakterien- als auch des Pilzstoffwechsels der PAK: So sind *cis*-Dihydroxydihydro-PAK, und Hydroxycarbonsäuren typische Produkte des bakteriellen PAK-Abbaus, Hydroxy-PAK, *trans*-Dihydroxydihydro-PAK und Chinone werden durch Pilze gebildet. Dihydroxy-PAK sind Produkte beider Stoffwechselwege (CERNIGLIA, 1984; GIBSON und SUBRAMANIAN, 1984; vgl. auch *Abb. 3*, Kapitel 1). Da es jedoch auch Ausnahmen gibt, bei denen bestimmte Bakterien-Spezies PAK zu Produkten des Pilzstoffwechsels transformieren - z.B. Umsetzung von Naphthalin zu 1-Hydroxynaphthalin durch *Bacillus cereus* (CERNIGLIA et al., 1984) - , ist aufgrund der entstandenen Metaboliten kein Rückschluß auf die abbauenden Organismen möglich.

Während bei Naphthalin, Phenanthren, Anthracen, Fluoranthen, Pyren und Benz[a]-anthracen Abbauewege nur punktuell an einzelnen Verbindungen erkennbar waren, konnten bei Acenaphthen und Fluoren längere Abbausequenzen verfolgt werden: Der von SELIFONOV et al. (1996 und 1998) beschriebene Abbaueweg des Acenaphthen im Kulturmedium konnte erstmalig auch im Boden nahezu vollständig nachvollzogen werden (*Abb. 26*). Zusätzlich zu den in bisherigen Bodenabbaustudien identifizierten Metaboliten 1H,3H-Naphtho[cd]pyran-1-on (2a), 1,2-Acenaphthenchinon (5) und 1,8-Naphthalsäureanhydrid (7) (BUNDT, 1991; WISCHMANN und STEINHART, 1997) wurden hydroxylierte und dihydroxylierte Derivate sowie 1-Acenaphthenon identifiziert. KELLEY et al. (1993) wiesen 1-Acenaphthenon als Metabolit des Fluoranthen-Abbaus nach. Da 1-Acenaphthenon bei den eigenen Versuchen

Tab. 12: Identifizierte Metaboliten und bisheriger Nachweis in Kulturmedien und Böden

Metabolit (identifiziert in Abbaustudie 1)	Nachweis im Kulturmedium (exemplarisch)	Nachweis im Boden
Naphthalin-Metaboliten:		
Dihydroxydihydronaphthalin	CERNIGLIA, 1984 u. 1992	-
1-Hydroxynaphthalin	CERNIGLIA, 1984 u. 1992	-
2-Hydroxynaphthalin	CERNIGLIA, 1984 u. 1992	-
Acenaphthen-Metaboliten:		
1-Hydroxyacenaphthen	SELIFONOV et al., 1996 u. 1998	-
Hydroxyacenaphthylen	-	-
1-Acenaphthenon	SELIFONOV et al., 1996 u. 1998	-
1H,3H-Naphtho[cd]pyran-1-on	-	BUNDT, 1991
Dihydroxyacenaphthylen	SELIFONOV et al., 1996	-
Dihydroxyacenaphthen	SELIFONOV et al., 1996 u. 1998	-
1,2-Acenaphthenchinon	SELIFONOV et al., 1996 u. 1998	WISCHMANN u. STEINHART, 1997
1,8-Naphthalsäureanhydrid	SELIFONOV et al., 1996 u. 1998	WISCHMANN u. STEINHART, 1997
Fluoren-Metaboliten:		
9-Hydroxyfluoren	CASELLAS et al., 1997	WISCHMANN u. STEINHART, 1997
2-Hydroxyfluoren	SELIFONOV et al., 1996	-
Hydroxyfluoren	SELIFONOV et al., 1996	-
9-Fluorenon	CASELLAS et al., 1997	WISCHMANN u. STEINHART, 1997
4-Hydroxy-9-fluorenon	CASELLAS et al., 1997	-
Dihydroxyfluorenon	-	-
Hydroxy-9-fluorenon	POTHULURI et al., 1993	-
1-Indanon	CASELLAS et al., 1997	WISCHMANN u. STEINHART, 1997
Phenanthren- und Anthracen-Metaboliten:		
9,10-Phenanthrenchinon	HAMMEL et al., 1992	-
9,10-Anthrachinon	CERNIGLIA, 1992	WISCHMANN u. STEINHART, 1997
3-Hydroxy-2-naphthoesäure	GIBSON u. SUBRAMANIAN, 1984	-
2,3-Dihydroxynaphthalin	PREUß et al., 1997	-
Hydroxyphenanthren o. -anthracen	CASILLAS et al., 1996	-
Dihydroxyphenanthren o. -anthracen	GIBSON u. SUBRAMANIAN, 1984	-
Dihydroxydihydrophenanthren o. -anthracen	GIBSON u. SUBRAMANIAN, 1984	-
Benzocumarin	GIBSON u. SUBRAMANIAN, 1984	-
Fluoranthren- und Pyren-Metaboliten:		
Hydroxyfluoranthren o. -pyren	LAMBERT et al., 1994	-
Dihydroxyfluoranthren o. -pyren	LAMBERT et al., 1994; ZINK, 1995	-
Benz[a]anthracen-Metaboliten:		
7,12-Benz[a]anthrachinon	-	ANDERSSON u. HENRYSSON, 1996 WISCHMANN u. STEINHART, 1997

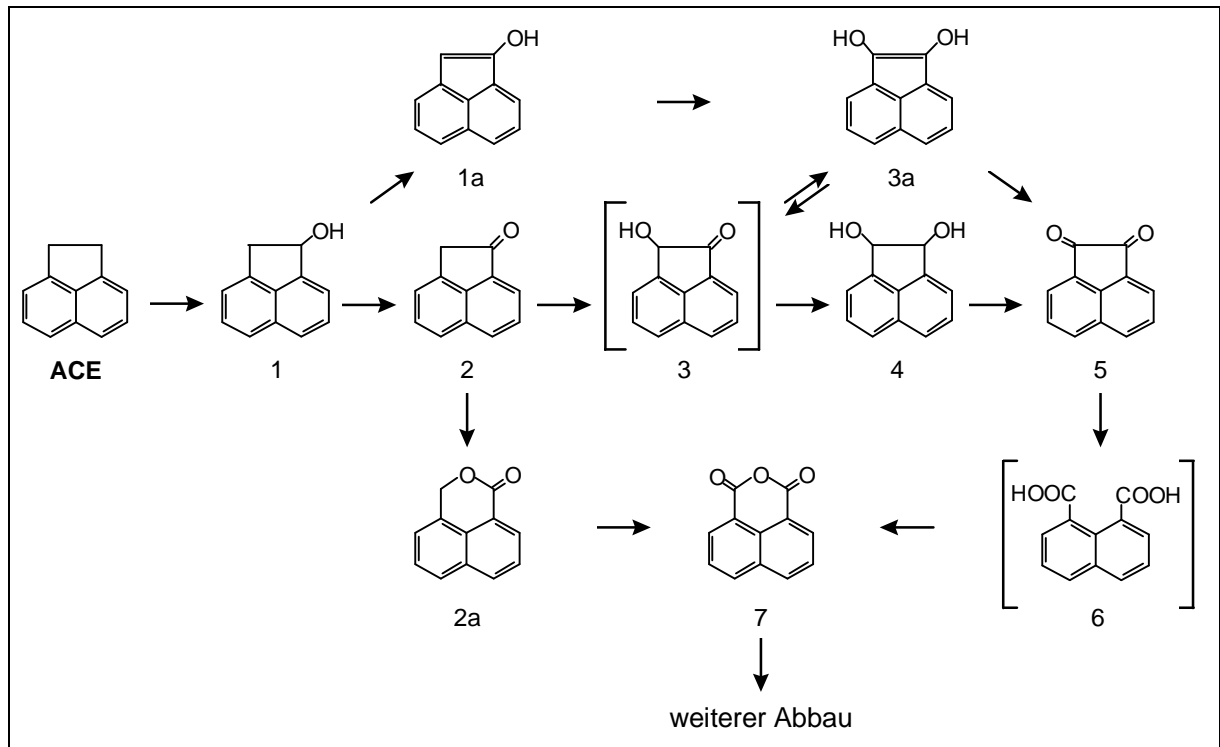


Abb. 26: Abbaueweg von Acenaphthen im Boden (Metaboliten in Klammern wurden nicht identifiziert): 1: 1-Hydroxyacenaphthen, 1a: Hydroxyacenaphthylen, 2: 1-Acenaphthenon, 2a: 1H,3H-Naphtho[cd]pyran-1-on, 3: Hydroxyacenaphthenon, 3a: Dihydroxyacenaphthylen, 4: Dihydroxyacenaphthen, 5: 1,2-Acenaphthenchinon, 6: 1,8-Naphthalindicarbonsäure, 7: 1,8-Naphthalsäureanhydrid

zeitlich jeweils deutlich vor dem Einsetzen des Fluoranthren-Abbaus nachgewiesen wurde, kann angenommen werden, daß es sich hier bei 1-Acenaphthenon und seinen Folgeprodukten um Acenaphthen-Metaboliten handelt.

Als Metaboliten des Fluoren-Abbaus wurden neben den bereits mehrfach auch in Bodenabbaustudien nachgewiesenen Metaboliten 9-Hydroxyfluoren, 9-Fluorenon und 1-Indanon (WISCHMANN et al., 1996; WISCHMANN und STEINHART, 1997) weitere hydroxylierte Derivate des Fluoren und 9-Fluorenon nachgewiesen. Der gefundene Abbaueweg des Fluorens ist in *Abb. 27* dargestellt. Die identifizierten Verbindungen sind aus Kulturmedien als Metaboliten des Fluoren-Abbaus durch Bakterien und/oder Pilze bekannt (POTHULURI et al., 1993; SELIFONOV et al., 1996; CASELLAS et al., 1997). 9-Hydroxyfluoren und 9-Fluorenon wurden von KELLEY et al. (1993) auch als Fluoranthren-Metaboliten nachgewiesen. Auch diese Verbindungen wurden jedoch deutlich vor dem einsetzenden Fluoranthren-Abbau gebildet, so daß auch hier davon ausgegangen werden kann, daß es sich um Fluoren-Metaboliten handelt.

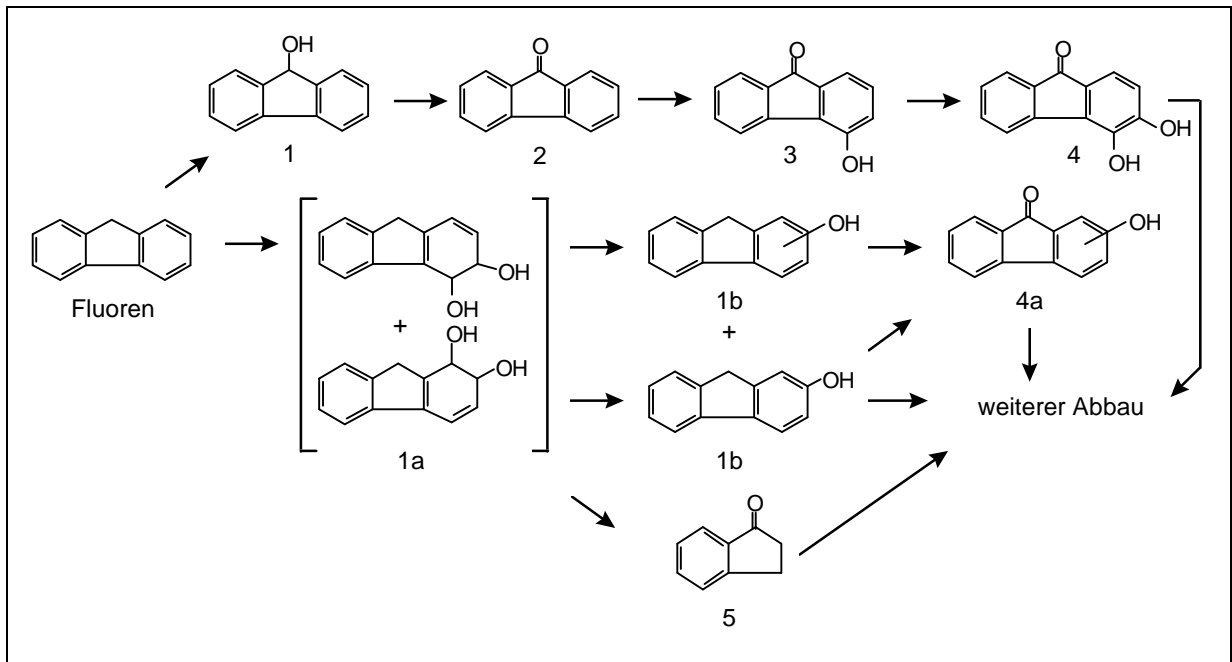


Abb. 27: Abbaupfad von Fluoren im Boden (Metaboliten in Klammern wurden nicht identifiziert): 1: 9-Hydroxyfluoren, 1a: Dihydroxydihydrofluoren, 1b: Hydroxyfluoren, 2: 9-Fluorenon, 3: 4-Hydroxy-9-fluorenon, 4: Dihydroxy-9-fluorenon, 4a: Hydroxy-9-fluorenon, 5: 1-Indanon

7.2.2 Identifizierung von Hetero-PAK-Metaboliten

In den Abbaustudien wurden 4 Hetero-PAK-Metaboliten identifiziert. Als Abbauprodukt des Chinolin wurde 2-Hydroxychinolin identifiziert, das aus Kulturmedien als initiales Produkt des bakteriellen Chinolin-Stoffwechsels bekannt ist (SCHWARZ et al., 1989).

Dibenzothiophensulfoxid und Dibenzothiophensulfon wurden als Metaboliten des Dibenzothiophen-Abbaus nachgewiesen. Den Abbau von Dibenzothiophen über das Schwefelatom mit Dibenzothiophensulfoxid und Dibenzothiophensulfon als Metaboliten wiesen u.a. VAN AFFERDEN et al. (1990) nach.

Als Metabolit des Dibenzofuran-Abbaus wurde Hydroxydibenzofuran nachgewiesen. Aus Kulturmedien ist die Dioxygenierung von Dibenzofuran zum Dihydroxydihydrodibenzofuran bekannt (ENGESSER et al., 1989). Hydroxydibenzofuran als Folgeprodukt wurde bisher nicht beschrieben; die Bildung von Monohydroxyverbindungen aus den entsprechenden Dihydrodiolen ist für den PAK-Abbau durch Pilze jedoch generell beschrieben (MAHRO und KÄSTNER, 1993; vgl. auch Abb. 3, Kapitel 1).

7.2.3 Konzentrationsverläufe der Metaboliten und Wechselwirkungen von PAK und Hetero-PAK auf die Metabolitenbildung

In den Abbaustudien wurden Wechselwirkungen von PAK und Hetero-PAK auf die Konzentrationsverläufe der Metaboliten beobachtet. Bedingt durch den verlangsamten Abbau der Polyaromaten in den mischkontaminierten Bodensystemen setzte in beiden Abbaustudien die Metabolitenbildung in diesen Bodensystemen zeitverzögert ein. Der Einfluß der Art der Ausgangskontamination auf die maximale Konzentration eines Metaboliten und auf die Tendenz zu Akkumulation oder Persistenz im Boden ist in *Tab. 13* zusammenfassend dargestellt. Nur im Fall des 1,2-Acenaphthenchinon konnte ein signifikant höheres Konzentrationsmaximum in den „PAK+NSO“-Bodensystemen nachgewiesen werden (T-Test, $SN = 96\%$).

In den mischkontaminierten Bodensystemen wurde bei einer größeren Anzahl der Metaboliten eine Tendenz zur Akkumulation bzw. Persistenz am Ende des Untersuchungszeitraums festgestellt. Insbesondere 1,2-Acenaphthenchinon und 1,8-Naphthalsäureanhydrid zeigten in diesen Bodensystemen einen deutlichen Konzentra-

Tab. 13: Maximale Konzentrationen der Metaboliten in den verschiedenen Bodensystemen und Tendenz zur Akkumulation bzw. Persistenz - Abbaustudie 1

Substanz	„PAK“ bzw. „NSO“		„PAK+NSO“		SN ^b [%]
	C _{max.} [mg/kg]	Akkumulation + / - ^a	C _{max.} [mg/kg]	Akkumulation + / - ^a	
2,3-Dihydroxynaphthalin	7,2 ± 6,3	-	n.n.	-	81
1,8-Naphthalsäureanhydrid	6,9 ± 6,5	-	5,1 ± 1,4	++	32
1,2-Acenaphthenchinon	7,3 ± 6,1	-	18,1 ± 1,8	++	96
9-Hydroxyfluoren	0,5 ± 0,1	-	0,2 ± 0,2	-	82
9-Fluorenon	8,6 ± 4,7	-	5,0 ± 1,3	+	73
4-Hydroxy-9-fluorenon	8,0 ± 8,0	+	0,1 ± 0,2	-	77
1-Indanon	1,4 ± 1,2	-	n.n.	-	82
9,10-Anthrachinon	1,1 ± 0,2	-	1,3 ± 0,5	+	70
9,10-Phenanthrenchinon	0,4 ± 0,6	-	3,9 ± 6,1	-	58
3-Hydroxy-2-naphthoesäure	0,9 ± 0,9	-	n.n.	-	79
2-Hydroxychinolin	n.n.	-	0,8 ± 1,4	-	58
Dibenzothiophensulfoxid	26 ± 15,8	-	8,0 ± 6,5	++	85
Dibenzothiophensulfon	n.n.	-	0,1 ± 0,2	-	58

^a ++: starke Tendenz zur Akkumulation

+ : Tendenz zur Persistenz

- : keine Tendenz zur Akkumulation oder Persistenz

^b Signifikanzniveau für die Hypothese, daß ein Unterschied zwischen den Konzentrationsmaxima in den verschiedenen Bodensystemen besteht (T-Test, beidseitig)

tionsanstieg am Ende des Untersuchungszeitraums; bei den anderen Metaboliten mit Tendenz zur Akkumulation bzw. Persistenz drückte sich diese durch eine Stagnation der Gehalte bzw. langsame Konzentrationsabnahme aus.

Die Akkumulation sogenannter *dead-end*-Metaboliten ist aus Kulturmedien bekannt. So wurden 9-Fluorenon und 1,2-Acenaphthenchinon bereits als *dead-end*-Produkte des bakteriellen Fluoren- bzw. Acenaphthen-Abbaus beschrieben (SCHOCKEN und GIBSON, 1984; GRIFOLL et al., 1992), 9,10-Anthrachinon ist als *dead-end*-Produkt des Anthracen-Abbaus durch Weißfäulepilze bekannt (ANDERSSON und HENRYSSON, 1996). WISCHMANN und STEINHART (1997) konnten bei PAK-Abbaustudien in dem auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten Ah-Horizont/Kompost-Gemisch keine *dead-end*-Metaboliten nachweisen; dagegen akkumulierte beim PAK-Abbau in dem nicht-supplementierten reinen Ah-Horizont eine Reihe von PAK-Metaboliten. Neben diesem von WISCHMANN und STEINHART (1997) festgestellten Einfluß des organischen Kohlenstoffgehalts des Bodens ist aufgrund der eigenen Ergebnisse ein Einfluß der Hetero-PAK auf die Akkumulation bzw. Persistenz von Metaboliten festzustellen.

In der Studie zum Abbau strukturanaloger PAK und Hetero-PAK wurde eine Akkumulation von 9-Fluorenon sowie ein deutlich höherer Dibenzothiophensulfoxid-Gehalt in den mischkontaminierten Bodensystemen beobachtet. Da die Metabolitenanalytik in dieser Abbaustudie jedoch nur als Einzelbestimmung durchgeführt wurde, ist keine statistisch abgesicherte Aussage möglich.

7.3 Korrelation von chemischer Analytik und Microtox -Test

Zum Microtox -Test wurden wäßrige Eluate und Methanol-Extrakte eingesetzt. Aufgrund stark variierender Eigenfärbung der Eluate konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden, so daß über die Toxizität des bioverfügbaren Anteils der Kontamination keine Aussage möglich ist. Dagegen ließ sich mit Hilfe des Methanol-Extrakts eine Aussage über die Toxizität der im Boden vorliegenden Gesamtkontamination treffen.

Diverse Autoren untersuchten den PAK-Abbau und die Toxizität wäßriger Eluate im Microtox -Test im Rahmen von biologischen Bodenreinigungsverfahren (SCHEIBEL et al., 1991; HOSLER et al., 1992; WITTMAYER et al., 1992). Dabei wurden sowohl signifikante Korrelationen als auch Diskrepanzen zwischen den beiden Parametern festgestellt. Die Diskrepanzen - hohe Toxizität trotz geringer Schadstoffbelastung sowie geringe Toxizität trotz hoher Schadstoffbelastung - wurden auf die schlechte Wasserlöslichkeit von PAK und eventuelle Anreicherung von polaren Nebenprodukten in der Wasserphase und dadurch bedingte Verschiebung der relativen Zusammensetzung von Boden und Eluat zurückgeführt.

Die Korrelation von PAK-, Hetero-PAK- und Metaboliten-Gehalten in den Methanol-Extrakten mit den Schadstoff-Gehalten in den Dichlormethan-Extrakten zeigt, daß der Methanol-Extrakt die summarische Schadstofftoxizität gut repräsentiert. PAK, Hetero-PAK und Metaboliten werden somit in den Konzentrationsverhältnissen bewertet, in denen sie im Boden vorliegen.

Die mittels Spearman-Rank-Korrelation für das „PAK“-Bodensystem festgestellte signifikante Korrelation zwischen PAK-Gehalten und Toxizität eines organischen Lösungsmittelextrakts im Microtox -Test entspricht den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen für Sedimentproben: SCHIEWE et al. (1985) extrahierten Sedimente mit einem Gemisch aus Dichlormethan und Methanol und stellten eine signifikante Spearman-Rank-Korrelation zwischen Toxizität im Microtox -Test und summarischen Schadstoffkonzentrationen (aromatische und chlorierte Kohlenwasserstoffe) fest. JACOBS et al. (1993) nutzten Acetonitril als Extraktionsmittel für Sedimente und beschrieben eine signifikante Spearman-Rank-Korrelation von Toxizität (Microtox)

und summarischen PAK-Konzentrationen. Dagegen war eine lineare Korrelation der beiden Parameter nicht signifikant.

In Tab. 14 sind die im Methanol-Extrakt des „PAK“-Bodensystems am 30. Tag quantifizierte PAK- und Metaboliten-Konzentrationen, deren Konzentrationen in der zum Microtox -Test eingesetzten Verdünnung G6 sowie in der Literatur dokumentierte EC 50-Werte der Verbindungen dargestellt. Die im Microtox -Test vorliegenden PAK-Konzentrationen in der Verdünnung G6 sind von der gleichen Größenordnung wie die jeweiligen EC 50-Werte; Ausnahmen sind Naphthalin, Pyren und Benzo[a]pyren, bei denen die Konzentrationen in der Verdünnung G6 mindestens eine Zehnerpotenz niedriger liegen als die EC 50-Werte. Die Konzentrationen der Metaboliten 1,2-Acenaphthenchinon und 9-Fluorenon liegen in der Verdünnung

Tab. 14: PAK- und PAK-Metaboliten-Konzentrationen im Methanol-Extrakt und Verdünnung G6 des „PAK“-Bodensystems nach 30 Tagen sowie EC 50-Werte der enthaltenen PAK und Metaboliten

Verbindung	30. Tag		EC 50-Wert [mg/L]
	c MeOH-Extrakt [mg/L]	c Verd. G6 [mg/L]	
PAK:			
Naphthalin	7,4	0,04	0,90 ¹ ; 0,68 ² ; 0,91 ³
Acenaphthen	25,4	0,13	0,75 ¹ ; 0,74 ²
Fluoren	25,9	0,13	0,50 ¹ ; 3,2 ² ; 10,1 ⁴
Phenanthren	41,3	0,21	0,48 ¹ ; 0,53 ⁵ ; 0,049 ³ ; 2,1 ⁴
Anthracen	46,5	0,23	0,64 ¹ ; 33,4 ² ; 31,0 ⁶
Fluoranthren	71,6	0,36	0,83 ¹ ; 2,0 ² ; 1,3 ⁶
Pyren	49,8	0,25	> 500 ⁷
Benz[a]anthracen	15,9	0,08	0,73 ¹ ; 0,26 ²
Benzo[a]pyren	17,0	0,09	10,7 ¹ ; 8,1 ²
Metaboliten:			
1,2-Acenaphthenchinon	4,0	0,02	4,8 ⁴
9-Fluorenon	4,2	0,02	3,8 ³
4-Hydroxy-9-fluorenon	2,5	0,01	-
9,10-Anthrachinon	0,3	0,002	unwirksam ⁶

¹ JOHNSON und LONG (1998); 5 Minuten Inkubation, < 5 % Dimethylsulfoxid

² JACOBS et al. (1993); 15 Minuten Inkubation, 5 % Dimethylsulfoxid

³ KAISER und PALABRICA (1991); 15 Minuten Inkubation

⁴ AHLF (1998); 30 Minuten Inkubation, ≤ 3 % Methanol

⁵ MCCONKEY et al. (1997); 15 Minuten Inkubation, ≤ 0,1 % Dimethylsulfoxid

⁶ ZINK (1995); keine Angaben zur Durchführung

⁷ HAUSER et al. (1997); 30 Minuten Inkubation

G6 ca. zwei Zehnerpotenzen niedriger als ihre EC 50-Werte, für 4-Hydroxy-9-fluorenon ist kein EC-Wert bekannt, 9,10-Anthrachinon zeigte bis zur Grenze seiner Löslichkeit keine Toxizität (Tab. 14).

Unter dem Vorbehalt, daß EC 50-Werte verschiedener Datenquellen generell schlecht vergleichbar sind (Tab. 14, Tab. 1, Kapitel 1), kann aufgrund der Konzentrationsverhältnisse der Verbindungen in der Verdünnung G6 und der EC 50-Werte der PAK angenommen werden, daß die überwiegende Zahl der PAK direkt zur gemessenen Toxizität beiträgt. Dagegen ist ein Beitrag der Metaboliten zur Toxizität aufgrund ihrer geringen Konzentrationen in der Verdünnung G6 - wenn überhaupt - nur über Kombinationswirkungen möglich. Über die Wirkung von 4-Hydroxy-9-fluorenon ist in diesem Zusammenhang keine Aussage möglich.

Kombinationswirkungen von Ausgangsverbindungen und Metaboliten wurden von BOYD et al. (1997) beschrieben: So waren Mischungen von Benzol und seinem Metaboliten Catechol in einem Leuchtbakterienhemmtest mit dem genmodifizierten Bakterium *Pseudomonas fluorescens* signifikant toxischer als die Summe der Einzelwirkungen. Natürlich können in den eigenen Versuchen auch weitere nicht identifizierte oder nicht quantifizierte Metaboliten die Toxizität beeinflussen.

Im „NSO“-Bodensystem wurde keine signifikante Korrelation von Toxizität und summarischen Hetero-PAK-Konzentrationen festgestellt. Die anfängliche Stagnation der Toxizität in diesem System kann nicht auf die höhere Toxizität der Verbindungen, die erst nach einer Lag-Phase abgebaut werden, zurückgeführt werden. Dies wird anhand der in Tab. 15 dargestellten EC 50-Werte der Hetero-PAK deutlich. Allerdings liegen für die Cyano-PAK keine EC 50-Werte vor.

Tab. 15: EC 50-Werte der Hetero-PAK

Verbindung (Anzahl der Ringe)	EC 50-Wert [mg/L]	Verbindung (Anzahl der Ringe)	EC 50-Wert [mg/L]
Indol (2)	2,39 ¹	Acridin (3)	7,0 ¹
Chinolin (2)	0,36 ¹	Dibenzothiophen (3)	0,11 ¹ ; 9,0 ³ ; 0,16 ²
Benzothiophen (2)	1,7 ²	Dibenzofuran (3)	0,86 ¹ ; 9,7 ³
Benzofuran (2)	3,49 ¹	1-Cyanonaphthalin (2)	-
Carbazol (3)	10,6 ¹	9-Cyanoanthracen (3)	-

¹ KAISER und PALABRICA (1991); 15 Minuten Inkubation

² SEYMOUR et al. (1997); 15 Minuten Inkubation

³ AHLF (1998); 30 Minuten Inkubation, ≤ 3 % Methanol

Der in dem „NSO“-Bodensystem beobachtete Wiederanstieg der Lumineszenzhemmung am 83. Tag ließ sich nicht durch die Ergebnisse der chemischen Analytik erklären. Der einzige in dem Methanol-Extrakt quantifizierte Metabolit Dibenzothiophensulfoxid erreichte bereits am 64. Tag mit 11,3 mg/L sein Konzentrationsmaximum. Der EC 50-Wert von Dibenzothiophensulfoxid überschreitet mit 2,1 mg/L den der Ausgangsverbindung Dibenzothiophen von 0,16 mg/L um den Faktor 13 (SEYMOUR et al., 1997), so daß auf dem Metabolisierungspfad eine Entgiftung des Dibenzothiophen erreicht wird. Daher kommen für den Wiederanstieg der Lumineszenzhemmung nur nicht identifizierte Metaboliten sowie Kombinationswirkungen verschiedener Hetero-PAK und/oder Metaboliten in Frage.

Im „PAK+NSO“-Bodensystem war trotz Kontaminationsabnahme keine Toxizitätsminderung feststellbar. Eine mögliche Erklärung könnten Kombinationswirkungen verschiedener Ausgangsverbindungen oder von Ausgangsverbindungen und Metaboliten sein. Während den in den Methanol-Extrakten des „PAK+NSO“-Bodensystems quantifizierten Metaboliten 9-Fluorenol, 9,10-Anthrachinon und Dibenzothiophensulfoxid in den „PAK“- bzw. „NSO“-Bodensystemen keine direkte Wirkung auf die Toxizität zugeordnet werden konnte, liegt die Konzentration von 9,10-Phenanthrenchinon im „PAK+NSO“-Bodensystem in der Verdünnung G6 am 111. Tag mit 0,025 mg/L in der Größenordnung des EC 50-Werts der Verbindung von 0,067 mg/L (KAISER und PALABRICA, 1991) und könnte direkt zur Toxizität beitragen. Weiterhin könnten auch hier nicht identifizierte bzw. nicht quantifizierte Metaboliten zur Toxizität beitragen.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß ökotoxikologische Untersuchungen für die Bewertung des biologischen Abbaus unerlässlich sind, um Gefährdungen aufzuzeigen, die trotz Schadstoffabbau anhalten. Obwohl keine Metaboliten quantifiziert wurden, deren Beitrag zur Gesamtoxizität aufgrund ihrer Konzentrationen bzw. ihres Konzentrationsverlaufs direkt ersichtlich war, können erst weitere Untersuchungen darüber Aufschluß geben, ob Einflüsse von Metaboliten über Kombinationswirkungen oder Wirkungen nicht identifizierter Metaboliten auf die Gesamtoxizität zu erwarten sind.

8 Zusammenfassung - Summary

8.1 Zusammenfassung

Biologische Bodenreinigungsverfahren stellen eine aus ökologischen und ökonomischen Gesichtspunkten bedeutende Alternative zu herkömmlichen physikalisch-chemischen Verfahren dar. Trotz eines in der Vergangenheit großen Forschungsaufwands werden in der Praxis insbesondere beim Abbau komplexer Gemische wie Teeröl häufig die Sanierungsziele nicht erreicht. Ursache können unter anderem Wechselwirkungen der verschiedenen Teerölinhaltsstoffe auf den biologischen Abbau sein, die in der vorliegenden Arbeit am Beispiel der PAK und Hetero-PAK in einem Modellboden untersucht wurden. Entstehende Abbauprodukte wurden identifiziert und quantifiziert und die verbleibende Ökotoxizität des Bodens wurde mit einem standardisierten Test bewertet. Für die Einzelstoffanalytik wurde eine Methode zur simultanen Bestimmung von PAK, Hetero-PAK und Metaboliten aus Böden - bestehend aus Extraktion, Festphasenextraktion, Kationenaustauschchromatographie und HPLC- bzw. GC-Bestimmung - entwickelt, validiert und anhand realer Teerölkontaminationen auf Anwendbarkeit überprüft.

Die Wechselwirkungen von typischen Teeröl-PAK und Hetero-PAK wurden in einem Modellboden/Kompost-Gemisch untersucht. Der Abbau aller eingesetzten PAK wurde in Gegenwart der Hetero-PAK signifikant gehemmt, umgekehrt wurde der Abbau nur einiger Hetero-PAK durch die PAK signifikant gehemmt. Diese unterschiedlichen Wechselwirkungen ergaben sich in Abhängigkeit von der Polarität der Verbindungen: Je polarer eine Substanz war, umso weniger wurde ihr Abbau durch die Gegenwart weiterer Polyzyklen beeinflusst. Es wurde eine Abbaureihenfolge der Verbindungen festgestellt, die signifikant mit der Abnahme der Polarität korrelierte. Eine Ausnahme stellte das Abbauverhalten der basischen N-PAK Chinolin und Acridin dar, die aufgrund ionischer Wechselwirkungen mit der Bodenmatrix schlechter abgebaut wurden als aufgrund ihrer Polarität angenommen werden konnte. Auch die Cyano-PAK wurden nur langsam abgebaut. Innerhalb der strukturanalogen Hetero-PAK waren die S-PAK persistenter als ihre korrespondierenden neutralen N-PAK sowie O-PAK.

Diese Ergebnisse haben entscheidende Bedeutung für die Praxis der biologischen Bodenreinigung: Da organische Begleitkontaminanten wie Hetero-PAK die Effektivität des biologischen PAK-Abbaus limitieren können, muß ihre Anwesenheit berücksichtigt werden, um präzisere Vorhersagen über Sanierungserfolge zu treffen. Die in der Praxis häufig angewendete Bestimmung der 16 EPA-PAK ist zu diesem Zweck nicht ausreichend, vielmehr müssen Analyseverfahren eingesetzt werden, mit denen zumindest die Hauptinhaltsstoffe des Teeröls erfaßt werden, um deren Anwesenheit in Gefährdungsabschätzungen und Vorhersagen über mögliche Sanierungserfolge einzubeziehen. Die in dieser Arbeit entwickelte Analyseverfahren - insbesondere die Kationenaustauschchromatographie zur Trennung neutraler und basischer N-PAK - hat sich bei der Untersuchung realer Teeröl-Altlasten für diesen Zweck hervorragend bewährt.

Im Rahmen der Abbaustudien wurden 30 PAK-Metaboliten und 4 Hetero-PAK-Metaboliten identifiziert, darunter diverse hydroxylierte und dihydroxylierte Verbindungen, die bisher nur aus Flüssigkulturmedien bekannt waren. In den mischkontaminierten Bodensystemen zeigte sich eine stärkere Tendenz zur Akkumulation bzw. Persistenz von Metaboliten am Versuchsende als in nur PAK-kontaminierten Bodensystemen.

Begleitende Untersuchungen des PAK- bzw. Hetero-PAK-Abbaus mittels Microtox - Test zeigten, daß eine ökotoxikologische Bewertung des Schadstoffabbaus unerlässlich ist, um Gefährdungen aufzuzeigen, die trotz Schadstoffabbau anhalten. Während bei reiner PAK-Kontamination Schadstoffabbau und Toxizitätsminderung signifikant korrelierten, trat bei einer Mischkontamination aus PAK und Hetero-PAK trotz Schadstoffabbau keine Abnahme der Toxizität ein. Obwohl keine Metaboliten quantifiziert wurden, deren wesentlicher Beitrag zur Gesamtoxizität aufgrund ihrer Konzentrationen bzw. ihres Konzentrationsverlaufs direkt ersichtlich war, können erst weitere Untersuchungen darüber Aufschluß geben, ob Einflüsse von Metaboliten über Kombinationswirkungen oder Wirkungen nicht identifizierter Metaboliten auf die Gesamtoxizität zu erwarten sind.

8.2 Summary

Biological treatment of contaminated soil is from the ecological and economical point of view an important alternative to conventional physico-chemical remediation strategies. Despite great research efforts in recent years bioremediation procedures have often failed their targets in practice particularly in case of degradation of complex mixtures of contaminants such as tar oil. The presence of different tar oil compounds might cause interaction phenomena on their biodegradability. Such interaction phenomena between PAH and hetero-PAH in a model soil were investigated in the present study. Degradation products were identified and quantified and the remaining ecotoxicity was assessed using a standardised test system. An analytical method was developed, which provides the simultaneous determination of PAHs, hetero-PAHs and their metabolites from soil - consisting of an extraction step, solid-phase extraction, cation exchange chromatography, HPLC-, and GC-methods. This procedure was validated and successfully applied to different authentic tar oil contaminations.

The interaction phenomena of typical tar oil PAHs and hetero-PAHs were investigated in an artificially contaminated model soil/compost mixture. Degradation of all PAHs was significantly inhibited by the presence of hetero-PAHs, whereas degradation of just some hetero-PAHs was inhibited by the presence of PAHs. These different interaction phenomena depended on the polarity of the substances: With increasing polarity biodegradation was less affected by other polycyclic compounds. The order of degradability correlated significantly with decreasing polarity. Degradability of basic N-PAHs quinoline and acridine were exceptional. Due to ionic interaction with the soil matrix they were less degradable than it could be expected from their polarity. The cyano-PAHs were slowly degraded as well. Among the structural analogous hetero-PAHs the sulfur-containing compounds were less susceptible to degradation than the corresponding oxygen- or nitrogen-containing analogues.

These results are relevant to the practice of biological remediation procedures: As the presence of concomitant organic substances can limit the efficiency of

bioremediation processes, predictions about success and duration of remediation processes must take the presence of such compounds into account. Therefore determination of only 16 PAHs included in the EPA list of environmental priority pollutants is insufficient. However, a determination of at least major coal tar compounds is essential to increase the success of biological treatment of contaminated soil. The analytical procedure, which has been developed in this study - particularly the cation exchange chromatography, which ensures the separation of neutral and basic N-PAHs - proved its excellent practicability during application to authentic tar oil contaminations.

In the course of the biodegradation studies 30 PAH-metabolites and 4 hetero-PAH-metabolites were identified including various hydroxylated and dihydroxylated compounds, which have not yet been known from soil degradation studies. In the mixed contaminated soil systems there was a stronger tendency to accumulation or persistence of metabolites at the end of the investigation period than in the PAH-contaminated soil systems.

Accompanying investigations using the Microtox -test showed, that ecotoxicological assessment of the degradation of contaminants is essential to indicate risks, which persist despite decrease of contaminants. Whereas in the PAH-contaminated soils degradation of contaminants and detoxification correlated significantly, in the PAH- and hetero-PAH-contaminated soil systems ecotoxicity persisted, although degradation of contamination was noted. None of the quantified metabolites could contribute substantially to the total ecotoxicity due to their concentrations or courses of concentrations. Anyway, further studies are required to evaluate, whether contributions of metabolites via combined toxic effects or effects of not-identified metabolites to the total ecotoxicity have to be expected.

9 Anhang

9.1 Chemikalien

Tab. 16: Chemikalienverzeichnis

<i>Name</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Gefahren- symbol</i>	<i>R-Sätze</i>	<i>S-Sätze</i>
Acenaphthen	Aldrich	Xn	36/37/38	26-36
1,2-Acenaphthenchinon	Merck	Xi	37/38	
Acenaphthylen	EGA	T		
Acetonitril	Merck, dest.	F,T	11-23/24/25	16-27-44
Acridin	Merck	Xi	36/37	24
Ammoniaklösung 25%ig	Merck	Xi	36/37/38	2-26
Anthracen	Merck	K2, Xi	36/37/38	26-36
9,10-Anthrachinon	Merck	K2		
Benz[a]anthracen	Aldrich	K2, T		
7,12-Benz[a]anthrachinon	Aldrich	K2, Xi	36/37/38	26-37/39
Benz[de]anthracen-7-on	Aldrich	K2, Xi	36/37/38	26-37/39
Benzo[b]fluoranthren	Aldrich	K2, T		
Benzo[a]pyren	Merck	K2, M2, RF2, RE2, T	45-46-60-61	53-45
Benzo[b]naphtho[2,3-d]furan	Acros	K2, T		
Benzo[b]naphtho[1,2-d]thiophen	Promochem	K2, T		
Benzo[b]naphtho[2,3-d]thiophen	Acros	K2, T		
Benzofuran	Aldrich	Xn, F	45-20/21/22	53-45-36/37/39-23
Benzo[ghi]perylen	Fluka	K2, T		
Benzo[h]chinolin	Acros	K2, T		
Benzo[k]fluoranthren	Promochem	K2, T	45	53-45
Benzo[thiophen]	Aldrich	Xi		
Biphenyl	Merck			
N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoracetamid	Merck		10	22-24/25
Carbazol	Fluka	Xi		
Chinolin	Merck	Xn	21/22-36	36/37
9-Chloranthracen	Aldrich	K2		
Chlortrimethylsilan	Merck	F, C	11-14-34	16-26-36/37/39-45
Chrysen	Aldrich	K2, T	45-46-20/21/22	53-45-36/37/39-3/7
Cumarin	Merck	Xn	22	
9-Cyanoanthracen	Aldrich		20/21/22	36
1-Cyanonaphthalin	Aldrich	Xi	20/21/22-36/37/38	26-37/39
9-Cyanophenanthren	Aldrich	K2, Xn	20/21/22-36/37/38	26-37/39
Dibenz[a,c]acridin	Promochem			
Dibenz[a,h]anthracen	Aldrich		45	53-45
Dibenzo[a,i]carbazol	Promochem			

Tab. 16 (Forts.): Chemikalienverzeichnis

Name	Hersteller	Gefahren- symbol	R-Sätze	S-Sätze
Dibenzofuran	Aldrich	Xn		
Dibenzothiophen	Merck	K2		
Dibenzothiophensulfon	Aldrich	K2		
Dichlormethan	Merck	K3,Xn	40	23.2-24/25-36/37
2,3-Dihydroxynaphthalin	Aldrich	Xi	36/37/38	26
1,3-Dimethylnaphthalin	Merck			
Essigsäure, 100%	Merck	C	10-35	2-23-26
Fluoranthren	Aldrich	K2	20/21/22-40	36-22-45-7
Fluoren	Merck	K2		
9-Fluorenon	Merck			
9-Fluorenon-1-carbonsäure	Aldrich			
<i>n</i> -Heptan	Biomol	F	11	9-16-23.2-29-33
<i>n</i> -Hexan	Biomol	F,Xn	11-21/22-40	9-16-23
1-Hydroxyacenaphthen	Aldrich	Xn		
4-Hydroxy-9-fluorenon	Aldrich	K2, Xi		
2-Hydroxycarbazol	Aldrich	Xi	36/37/38	26-37/39
2-Hydroxychinolin	Aldrich	Xi	36/37/38	26-37/39
2-Hydroxyfluoren	Aldrich		36/37/38	26-37/39
9-Hydroxyfluoren	Aldrich			
2-Hydroxynaphthalin	Merck	Xn	20/22	24/25
1-Hydroxy-2-naphthoesäure	Merck		36/37/38	26-37/39
3-Hydroxy-2-naphthoesäure	Janssen	Xn	22-36/37/38	26-36
9-Hydroxyphenanthren	Aldrich			
1-Indanon	Aldrich	Xn		
Inden	Fluka			
Indeno[1,2,3-cd]fluoranthren	Promochem			
Indol	Merck	Xn	21/22	36/37
Isochinolin	Acros	Xn	21/22-36/38	24/25
Kaliumcarbonat	Merck	Xn	22-36	22-26
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck			
Kaliumhydroxid	Merck	C	35	26-37/39-45
Kieselgel	Baker			
Methanol, dest.	Merck	F,T	11-23/25	7-16-24-45
2-Methylchinolin	Fluka	Xn	21/22-36/37/38	26-36/37
4-Methylchinolin	Aldrich	Xn	36/37/38-40	26-36
4,5-Methylenphenanthren	Aldrich	K2,Xn		
1-Methylfluoren	Aldrich			
1-Methylnaphthalin	Merck	F,Xn	22	
2-Methylnaphthalin	Merck	F,Xn	22	
2-Methylphenanthren	Aldrich			
Naphthalin	Merck	Xn	45-11-20/21/22- 36/37/38-43	53-16-45-26- 36/37/39

Tab. 16 (Forts.): Chemikalienverzeichnis

Name	Hersteller	Gefahren- symbol	R-Sätze	S-Sätze
1,8-Naphthalsäureanhydrid	Aldrich	Xi	36/37/38	26-37/39
1-Naphthoesäure	Aldrich	Xi	36/37/38	26-36
2-Naphthoesäure	Aldrich	Xi	36/37/38	26-36
Natriumsulfat	Merck			
Perhydrol 30%	Merck	C	34	3-26-36/37/39-45
Phenanthren	Merck	Xi	38	
9,10-Phenanthrenchinon	Aldrich	Xi		
Phenanthridin	Fluka		40-20/21/22	22-45-36/37/39
Pyren	Merck	Xn	22	36
Salicylsäure	Aldrich	Xn	22-36	26
Salzsäure, 32 %	Merck	C	34-37	26-6/37/39-45
Trifluoressigsäure	Merck	C	20-35	9-26-27-28-45

9.2 Geräte und Meßbedingungen

9.2.1 Gaschromatographie-FID

Gerät:	HRGC 5160 - Mega Series (Carlo Erba Instruments/Fisons, Wiesbaden)
Injektor:	300 °C, Split 1:4
Injektionsvolumen:	1 µL (manuell)
Trennsäule:	DB-5, 30 m x 0,32 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (J&W Scientific, Folsom, USA)
Trägergas:	Helium, 2 mL/min
Temperaturprogramme:	1. PAK, S-PAK, O-PAK (Validierung: 4.1.5): 60 °C (4 min), 60 - 300 °C (6 °C/ min), 10 min isotherm 2. PAK, S-PAK, O-PAK (Abbaustudie: 5.2): 60 °C (3 min), 60 - 200 °C (7 °C/ min), 200 - 300 °C (13 °C/ min), 6 min isotherm. 3. N-PAK (Abbaustudie: 5.2): 70 - 220 °C (6 °C/ min), 220 - 300 °C (25 °C/ min), 4 min isotherm
Detektion:	FID, 320 °C
Auswertung:	Chromstar Software 4.0 (SCPA, Stuhr-Brinkum)
Quantifizierung:	Kalibriergerade, Methode des internen Standards

9.2.2 Gaschromatographie-MSD

Gerät:	5890 Series II (Hewlett Packard, Palo Alto, USA)
Injektor:	300 °C, Splitless 1 min, dann Split 1:10
Injektion:	7673 Autosampler (Hewlett Packard, Palo Alto, USA)
Injektionsvolumen:	1 µL
Trennsäule:	DB-5, 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke (J&W Scientific, Folsom, USA)
Trägergas:	Helium, 1 mL/min

Temperaturprogramme: **1. PAK, S-PAK, O-PAK** (reale Altlasten: 4.1.6):

60 °C (5 min), 60 - 240 °C (3 °C/ min), 240 - 300 °C
(6 °C/ min), 8 min isotherm

2. neutrale N-PAK u. Metaboliten (reale Altlasten: 4.1.6):

80 °C (1 min), 80 - 240 °C (2,5 °C/ min), 240 - 300 °C
(8 °C/ min), 10 min isotherm

3. basische N-PAK (reale Altlasten: 4.1.6):

80 °C (1 min), 80 - 170 °C (5 °C/ min), 5 min isotherm, 170 -
300 °C (6,5 °C/ min), 11 min isotherm

4. neutrale u. saure Metaboliten (Abbaustudien 5.3 u. 6.3):

80 °C (1 min), 80 - 250 °C (3,5 °C/ min), 250 - 300 °C
(12 °C/ min), 6 min isotherm

Detektion: 5971 Mass Selective Detector (Hewlett Packard, Palo Alto,
USA)

EI 70 eV, 50-450 amu, 1,2 Scans/s, Interface 300 °C

Auswertung: MS ChemStation G1043C Rev C.02.00 (Hewlett Packard,
Palo Alto, USA)

Quantifizierung: Kalibriergerade, Methode des internen Standards

9.2.3 Hochleistungsflüssigchromatographie-DAD

Pumpe: L-6200 Niederdruckgradienten-Pumpe (Merck/Hitachi, Darmstadt)
 Injektion: AS-4000 Autosampler (Merck/Hitachi, Darmstadt), 20 µL
 Vorsäule: CC 8/4 Nucleosil[®] 120-5 C₁₈ (Macherey & Nagel, Düren)
 Trennsäule: CC 150/4 Nucleosil[®] 100-5 C₁₈-PAH (Macherey & Nagel, Düren)
 Detektion: Diodenarraydetektor 994 (Millipore/Waters, Eschborn)
 Auswertung: Auswertungssoftware DART (Ifas, Hamburg)
 Quantifizierung: Kalibriergerade, Methode des externen Standards

1. Gradient zur Trennung neutraler N-PAK und Metaboliten (Validierung 4.1.5) sowie neutraler und saurer Metaboliten (Abbaustudie 5.3):

Temperatur: 35 °C (T-6300 Säulenofen, Merck/Hitachi, Darmstadt)
 Eluenten: A: Acetonitril
 B: 0,1 % Trifluoressigsäure in bidest. Wasser
 C: Methanol
 Wellenlänge: 228, 251, 258, 265, 272 und 288 nm

Tab. 17: Gradientenprogramm 1

<i>t [min]</i>	<i>Eluent A [%]</i>	<i>Eluent B [%]</i>	<i>Eluent C [%]</i>	<i>Fluß [mL/min]</i>
0	10	73	17	1,0
6	10	70	20	1,0
12	10	60	30	1,0
17	5	53	42	1,0
22	0	48	52	1,0
30	0	40	60	1,0
42	0	25	75	1,0
50	0	0	100	1,0
55	0	0	100	1,0

2. Gradient zur Trennung basischer N-PAK (Validierung 4.1.5):

Temperatur: 35 °C (T-6300 Säulenofen, Merck/Hitachi, Darmstadt)

Eluenten: A: Acetonitril

B: Phosphatpuffer (0,68 g KH_2PO_4 + 40 mL KOH (c = 0,1 mol/L) ad
1 L bidest. Wasser, pH 7,5)

C: Methanol

Wellenlänge: 225, 250, 277 und 281 nm

Tab. 18: Gradientenprogramm 2

<i>t [min]</i>	<i>Eluent A [%]</i>	<i>Eluent B [%]</i>	<i>Eluent C [%]</i>	<i>Fluß [mL/min]</i>
0	20	60	20	1,0
1	20	60	20	1,0
12	40	60	0	1,0
23	53	47	0	1,0
36	100	0	0	1,0
42	100	0	0	1,0

3. Gradient zur Trennung von PAK und Hetero-PAK nach Verseifung und in Eluaten und Extrakten (Abbaustudie 5):

Temperatur: 30 °C (T-6300 Säulenofen, Merck/Hitachi, Darmstadt)

Eluenten: A: Acetonitril

B: Phosphatpuffer (0,68 g KH_2PO_4 + 40 mL KOH (c = 0,1 mol/L) ad
1 L bidest. Wasser, pH 7,5)

C: Methanol

Wellenlänge: 225, 235, 251 und 286 nm

Tab. 19: Gradientenprogramm 3

<i>t [min]</i>	<i>Eluent A [%]</i>	<i>Eluent B [%]</i>	<i>Eluent C [%]</i>	<i>Fluß [mL/min]</i>
0	12	55	33	1,0
1	12	55	33	1,0
14	20	35	45	1,0
28	49	22	29	1,0
38	70	0	30	1,0
45	70	0	30	1,0

4. Gradient zur Trennung von PAK und Hetero-PAK (Abbaustudie 6.2):

Temperatur: 30 °C (T-6300 Säulenofen, Merck/Hitachi, Darmstadt)

Eluenten: A: Acetonitril
 B: bidest. Wasser
 C: Methanol

Wellenlänge: 230 und 251 nm

Tab. 20: Gradientenprogramm 4

<i>t [min]</i>	<i>Eluent A [%]</i>	<i>Eluent B [%]</i>	<i>Eluent C [%]</i>	<i>Fluß [mL/min]</i>
0	10	35	55	1,0
7	10	35	55	1,0
15	35	28	42	1,0
20	45	18	37	1,0

5. Gradient zur Trennung von neutralen/sauren Metaboliten (Abbaustudie 6.3):

Temperatur: 35 °C (T-6300 Säulenofen, Merck/Hitachi, Darmstadt)

Eluenten: A: Acetonitril
 B: 0,1 % Trifluoressigsäure in bidest. Wasser
 C: Methanol

Wellenlänge: 234 und 250 nm

Tab. 21: Gradientenprogramm 5

<i>t [min]</i>	<i>Eluent A [%]</i>	<i>Eluent B [%]</i>	<i>Eluent C [%]</i>	<i>Fluß [mL/min]</i>
0	0	70	30	1,0
1	0	70	30	1,0
10	0	60	40	1,0
20	5	40	55	1,0
30	5	20	75	1,0

9.2.4 LumineszenzmessungGerät: Luminoskan[®] (Dr. Bruno Lange GmbH, Berlin)

9.3 Arbeitsvorschriften

9.3.1 Soxhlet-Extraktion von PAK, Hetero-PAK und Metaboliten

Durchführung:

20 g Boden werden mit 1 mL Salzsäure ($c = 1 \text{ mol/L}$) in einem Mörser verrieben, anschließend mit 25 g Natriumsulfat getrocknet. Der getrocknete Boden wird quantitativ in eine Soxhlethülse überführt, die in einer 200-mL-Soxhletapparatur 7,5 Stunden (5-6 Abläufe/h) mit 210 mL des Lösungsmittelgemisches Dichlormethan/*n*-Heptan (21/1; v/v) extrahiert wird. Der Extrakt wird am Rotationsverdampfer bei $40 \text{ }^\circ\text{C}$ und 600 mbar auf ein Volumen von ca. 5 mL eingengt.

9.3.2 Ultraschall-Extraktion der strukturanalogen PAK und Hetero-PAK

Durchführung:

20 g Boden werden mit 20 g Natriumsulfat getrocknet. Der getrocknete Boden wird in einem 100-mL-Zentrifugenglas mit dem Aufarbeitungsstandard 1-Methylfluoren und 50 mL Dichlormethan versetzt, fest verschlossen und 30 min im Ultraschallbad (Digital Ultrasonic Cleaner T 480 H-2, Elma, Singen) auf höchster Leistungsstufe extrahiert. Die Extrakte werden bei $1000 \times g$ zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstands wird verdünnt und zur HPLC-Analyse eingesetzt.

9.3.3 Alkalische Hydrolyse der Bodenmatrix

Durchführung nach Soxhlet-Extraktion:

Der extrahierte und getrocknete Bodenrückstand (9.3.1) wird aus der Soxhlet-Hülse in ein 100-mL-Zentrifugenglas überführt, mit 50 mL Kaliumhydroxid-Lösung ($c = 0,5 \text{ mol/L}$ in Methanol/Wasser 4/1; v/v) versetzt und 60 Minuten bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ im Ultraschallbad extrahiert. Nach dem Abkühlen wird die Lösung zentrifugiert ($1400 \times g$). Ein Aliquot wird mit Salzsäure neutralisiert und zur HPLC-Analyse eingesetzt.

Durchführung nach Ultraschall-Extraktion:

Der nach Entnahme eines definierten Extraktionsmittelaliquots verbleibende Rückstand mit Restextraktionsmittel wird mit 30 mL Kaliumhydroxid-Lösung ($c = 0,5 \text{ mol/L}$ Methanol) versetzt und 60 Minuten bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ im Ultraschallbad extrahiert. Nach dem Abkühlen wird die Lösung zentrifugiert ($1400 \times g$). Ein Aliquot wird mit Salzsäure neutralisiert und zur HPLC-Analyse eingesetzt.

9.3.4 Festphasenextraktion**Material:**

- 8-mL-Glastrennsäulen (Baker, Groß-Gerau)
- PTFE-Fritten (Baker, Groß-Gerau)
- Messing-Durchflußhähne (Baker, Groß-Gerau)
- SPE-Vakuum-Kammer
- stark basischer Anionenaustauscher Chromabond[®] SB (Macherey & Nagel, Düren)
- Kieselgel, Korngröße $40 \text{ } \mu\text{m}$ ($30\text{-}60 \text{ } \mu\text{m}$) (Baker, Groß-Gerau), vollständig aktiviert bei $180 \text{ }^\circ\text{C}$ (25 h); anschließend desaktiviert mit 10 % bidest. Wasser (2 h konditionieren auf der Schüttelmaschine)

Durchführung:

In einer Glastrennsäule werden 0,7 g Anionenaustauscher (unten) und 2 g Kieselgel (oben) zwischen drei PTFE-Fritten fixiert. Durch vorsichtiges Klopfen wird eine möglichst dichte Packung der Sorbentien erreicht. Die Säule wird mit 12 mL *n*-Hexan equilibriert. Anschließend wird der auf ca. 5 mL eingeeengte Soxhlet-Extrakt in *n*-Heptan auf die Säule appliziert. Während der Probenapplikation werden 4 mL Eluat verworfen (Totvolumen der Säule). Folgende Fraktionen werden mit einer Durchflußgeschwindigkeit von ca. 2 Tropfen/s eluiert:

Tab. 22: Elutionsschema der Festphasenextraktion

Fraktionen	Eluenten
1. PAK, S-PAK, O-PAK	<ul style="list-style-type: none"> – 5 mL Soxhlet-Extrakt (9.3.1) – 3 x 1 mL <i>n</i>-Hexan (Spülen des Probengefäßes) – 12 mL <i>n</i>-Hexan/Dichlormethan (85/15; v/v) – 2 mL Dichlormethan
2. N-PAK, neutrale Metaboliten	<ul style="list-style-type: none"> – 1 mL Dichlormethan – 6 mL Methanol – 3 mL Salzsäure (c = 0,05 mol/L in Methanol)
3. saure Metaboliten	<ul style="list-style-type: none"> – 6 mL Salzsäure (c = 0,05 mol/L in Methanol)

9.3.5 Kationenaustausch-Chromatographie

Material:

- stark saurer Kationenaustauscher Chromabond[®] SA (Fertigsäule, Polypropylen, 500 mg, Macherey & Nagel, Düren)
- Messing-Durchflußhähne (Baker, Groß-Gerau)
- SPE-Vakuum-Kammer

Durchführung:

Die Fertigsäule wird mit 5 mL Methanol equilibriert. Fraktion 2 der Festphasenextraktion (9.3.4) wird direkt - ohne Einengen - auf die Säule gegeben. Während der Probenapplikation wird 1 mL Eluat verworfen (Totvolumen der Säule). Folgende Fraktionen werden mit einer Durchflußgeschwindigkeit von ca. 2 Tropfen/s eluiert:

Tab. 23: Elutionsschema der Kationenaustauschchromatographie

Fraktionen	Eluenten
2a. neutrale N-PAK, neutrale Metaboliten	<ul style="list-style-type: none"> – 10 mL Fraktion 2 (SPE, 9.3.3) – 5 mL Methanol
2b. basische N-PAK	<ul style="list-style-type: none"> – 5 mL Ammoniak (c = 1 mol/L in Methanol)

9.3.6 Trimethylsilylierung der polaren Oxidationsprodukte

Durchführung:

100 - 2000 μL Probelösung werden in einem 4-mL-Braunglas-Vial unter dem Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft. Nach der Trocknung werden 100 μL BSTFA/TMCS (99/1, v/v) zugesetzt. Das geschlossene Vial wird in einem Thermo-block 60 Minuten auf 70 °C erhitzt. Nach Abkühlen wird 1 μL der Lösung direkt in den Gaschromatographen injiziert.

9.3.7 Microtox[®]-Test

Herstellung der Eluate:

8,8 g Boden (= 7,0 g Trockensubstanz) werden mit 21 mL bidest. Wasser in einer 50-mL-Schottflasche 24 h auf der Schüttelmaschine eluiert. Die Lösung wird bei 5000 \times g 10 Minuten zentrifugiert. 10 mL des Überstandes werden mit 200 mg Natriumchlorid versetzt (\Rightarrow Salinität der Lösung = 2 %) und mit Natronlauge ($c = 0,1 \text{ mol/L}$) auf einen pH-Wert von $7,0 \pm 0,2$ eingestellt. Die Lösung wird im Dunkeln bei 4 °C gelagert und innerhalb einer Woche vermessen.

Herstellung der Methanol-Extrakte:

6,3 g Boden (= 5,0 g Trockensubstanz) werden mit 15 mL Methanol in einer 50-mL-Schottflasche 1 Stunde auf der Schüttelmaschine extrahiert. Die Lösung wird bei 5000 \times g 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

Durchführung des Tests:

Der Microtox -Test wird nach DIN 38412 - L 34 durchgeführt. Die wäßrigen Eluate werden direkt in den Verdünnungsstufen G1 bis G24 eingesetzt. Die Verdünnungsstufen G1 bis G24 der Methanol-Extrakte werden aus einer Vorverdünnung 1:33,3 angesetzt.

9.4 Bodenmaterialien

9.4.1 Modellboden

Ah-Horizont: schwach lehmiger Sand

Kompost: Hausmüllkompost, 6 Monate gereift, Rottegrad 5

Tab. 24: Kenndaten des verwendeten Modellbodens

Kenndaten	Ah-Horizont	Ah-Horizont/Kompost (9:1; m:m)
Sand [%]	78,2	-
Schluff [%]	15,4	-
Ton [%]:	6,4	-
Gesamtkohlenstoff (TC) [%]	1,1	2,6
max. Wasserhaltekapazität [%]	31,7	45,9
pH-Wert:	4,5	5,5
Keimzahl [KBE/g Boden]	5×10^6	5×10^6

9.4.2 Teerölkontaminierte Altlasten

Teeröl-Altlast 1: Hamburg-Veringstraße: stark schluffiger Sand, ehemaliges Faßlager, ungesättigte Zone

Teeröl-Altlast 2: Heide-Sand-Boden, Holzverarbeitender Betrieb, ungesättigte Zone

Gaswerks-Altlast: ehemaliges Gaswerksgelände, gesättigte Zone

Rüstungs-Altlast 1: Achim: Rüstungsaltlast, ungesättigte Zone

Rüstungs-Altlast 2: Lübeck-Herrenwyk: ehemalige Metallhütte in Verbindung mit weiteren Verarbeitungsbetrieben wie z.B. einer Kokerei, ungesättigte Zone

9.5 Verfahrenskenndaten der validierten Methode

Tab. 25: Analytische Kenndaten der validierten Methode (5-Level-15-Punkt-Kalibrierung, n = 3)

Verbindung	λ [nm]	Standard-Kalibriergerade			Matrix-Kalibriergerade			WF		NG [mg/kg]
		Bereich [mg/L]	r	CV [%]	Bereich [mg/kg]	r	CV [%]	MW [%]		
S-PAK (GC-FID):										
Benzothiophen	-	3,8 - 19,2	0,9988	2,92	3,8 - 19,2	0,9895	7,39	55,3	0,71	
Dibenzothiophen	-	6,0 - 30,2	0,9994	1,70	6,0 - 30,2	0,9992	2,05	92,2	0,34	
Benzob[<i>b</i>]naphtho[2,3- <i>d</i>]thiophen	-	2,3 - 11,5	0,9968	5,65	2,3 - 11,5	0,9954	4,84	102,0	0,47	
O-PAK (GC-FID):										
Benzofuran	-	7,8 - 38,9	0,9983	2,92	7,8 - 38,9	0,9773	10,98	29,8	1,55	
Dibenzofuran	-	52,0 - 259,8	0,9992	1,97	52,0 - 259,8	0,9984	2,86	89,8	0,21	
Benzob[<i>b</i>]naphtho[2,3- <i>d</i>]furan	-	4,5 - 22,5	0,9999	1,34	4,5 - 22,5	0,9980	3,21	98,6	0,93	
basische N-PAK (HPLC-DAD):										
Chinolin	225	12,1 - 60,2	0,9995	1,60	30,1 - 150,6	0,9984	2,89	95,4	0,32	
Isochinolin	225	4,5 - 22,6	0,9996	1,47	11,3 - 56,4	0,9971	3,90	96,0	0,57	
2-Methylchinolin	225	2,1 - 10,5	0,9999	0,88	5,3 - 26,3	0,9982	3,07	100,8	0,84	
4-Methylchinolin	225	1,4 - 7,0	0,9998	0,98	3,5 - 17,4	0,9981	3,09	99,3	0,69	
Acridin	250	5,1 - 25,5	0,9995	1,56	12,8 - 63,8	0,9883	7,81	98,2	0,07	
Phenanthridin	250	2,1 - 10,5	1,0000	0,41	5,3 - 26,31	0,9968	4,03	98,9	0,06	
Benzof[<i>h</i>]chinolin	225	1,8 - 9,2	0,9999	0,57	4,6 - 22,9	0,9986	2,65	96,3	0,99	
Benz[<i>a</i>]acridin *	277	0,5 - 2,1	1,0000	0,40	1,3 - 5,2	0,9983	2,88	91,4	0,08	
Benz[<i>c</i>]acridin *	277	0,5 - 1,9	1,0000	0,20	1,2 - 4,7	0,9978	3,23	91,8	0,05	
Dibenz[<i>a,c</i>]acridin *	281	0,5 - 2,1	1,0000	0,36	1,3 - 5,3	0,9982	3,93	91,7	0,02	

r: Korrelationskoeffizient; CV: Variationskoeffizient; WF: Wiederfindung; MW: Mittelwert; NG: Nachweisgrenze; *: 4-Level-Kalibrierung

Tab. 25 (Forts.): Analytische Kenndaten der validierten Methode (5-Level-15-Punkt-Kalibrierung, n = 3)

Verbindung	λ [nm]	Standard-Kalibriergerade			Matrix-Kalibriergerade			WF		NG [mg/kg]
		Bereich [mg/L]	r	CV [%]	Bereich [mg/kg]	r	CV [%]	MW [%]		
neutrale N-PAK (HPLC-DAD):										
Indol	272	2,8 - 14,1	0,9999	2,42	14,1 - 70,3	0,9919	6,49	60,2	1,74	
Carbazol	258	6,1 - 30,0	0,9999	0,55	30,0 - 150,2	0,9950	4,91	94,0	0,68	
Dibenzo[a,i]carbazol *	288	0,3 - 1,1	0,9998	0,90	1,1 - 4,4	0,9983	22,70	80,8	0,22	
1-Cyanonaphthalin	228	0,9 - 4,6	0,9997	1,22	4,6 - 22,8	0,9994	1,70	97,6	0,78	
9-Cyanophenanthren	258	0,4 - 2,1	0,9999	0,86	2,1 - 10,5	0,9992	2,03	96,1	0,35	
9-Cyanoanthracen	258	0,5 - 2,3	0,9999	0,61	2,3 - 11,3	0,9981	3,13	89,7	0,20	
neutrale Metaboliten (HPLC-DAD):										
2-Hydroxychinolin	228	1,2 - 6,2	0,9992	2,08	1,2 - 6,2	0,9972	3,80	93,3	0,36	
Cumarin	251	1,1 - 5,6	0,9987	3,01	1,1 - 5,6	0,9988	2,44	84,2	0,86	
1-Indanon	251	1,3 - 6,4	0,9985	2,81	1,3 - 6,4	0,9963	4,40	75,8	0,32	
1,2-Acenaaphthenchinon	228	1,4 - 7,0	0,9994	1,71	1,4 - 7,0	0,9687	12,97	45,2	1,55	
Dibenzothiophensulfon	228	1,0 - 5,2	0,9994	1,77	1,0 - 5,2	0,9987	2,55	90,1	0,42	
2-Hydroxynaphthalin	228	1,1 - 5,5	0,9997	1,18	1,1 - 5,5	0,9971	3,88	87,2	0,42	
2-Hydroxycarbazol	228	1,1 - 5,3	0,9989	2,24	1,1 - 5,3	0,9794	10,43	55,3	1,00	
9,10-Phenanthrenchinon	265	1,1 - 5,7	0,9997	1,27	1,1 - 5,7	0,9659	13,57	31,5	0,72	
9-Hydroxyfluoren	272	1,1 - 5,4	0,9990	2,27	1,1 - 5,4	0,9983	2,92	93,7	0,38	
9-Fluoren	258	1,1 - 5,7	1,0000	0,49	1,1 - 5,7	0,9979	3,31	87,4	0,12	
9,10-Anthrachinon	251	1,3 - 6,5	1,0000	0,42	1,3 - 6,5	0,9991	2,18	96,4	0,19	
7,12-Benz[<i>a</i>]anthrachinon	288	1,2 - 6,0	1,0000	0,36	1,2 - 6,0	0,9995	1,64	89,8	0,19	

r: Korrelationskoeffizient; CV: Variationskoeffizient; WF: Wiederfindung; MW: Mittelwert; NG: Nachweisgrenze; *: 4-Level-Kalibrierung

Tab. 25 (Forts.): Analytische Kenndaten der validierten Methode (5-Level-15-Punkt-Kalibrierung, n = 3)

Verbindung	λ [nm]	Standard-Kalibriergerade			Matrix-Kalibriergerade			WF	NG
		Bereich [mg/l]	r	CV [%]	Bereich [mg/kg]	r	CV [%]	MW [%]	[mg/kg]
saure Metaboliten (HPLC-DAD):									
Salicylsäure	238	1,0 - 5,0	0,9998	1,08	1,0 - 5,0	0,9378	18,74	89,1	0,11
1-Naphthoesäure	238	1,0 - 5,1	0,9999	0,76	1,0 - 5,1	0,9981	3,10	98,1	0,27
9-Fluorenon-1-carbonsäure	261	1,1 - 5,5	1,0000	0,44	1,1 - 5,5	0,9823	9,66	77,5	0,01
2-Naphthoesäure	238	1,0 - 5,0	1,0000	0,44	1,0 - 5,0	0,9961	4,49	102,9	0,04
3-Hydroxy-2-naphthoesäure	238	1,1 - 5,4	0,9999	0,82	1,1 - 5,4	0,9564	15,47	87,8	0,19
1-Hydroxy-2-naphthoesäure	252	1,1 - 5,4	0,9997	1,23	1,1 - 5,4	0,9919	6,47	86,4	0,15

r: Korrelationskoeffizient; CV: Wiederfindung; WF: Mittelwert; MW: Nachweisgrenze

Tab. 26: Analytische Kenndaten der validierten Methode (5-Level-15-Punkt-Kalibrierung, n = 3)

PAK (GC-FID):	Anzahl der PAKs	Standard Kalibriergerade			Matrix Kalibriergerade			WF
		r	CV [%]	r	CV [%]	MW [%]		
2-Ring PAK	6	0,9981 - 0,9991	2,15 - 3,12	0,9801 - 0,9980	3,22 - 10,24	30,7 - 84,2		
3-Ring PAK	6	0,9981 - 0,9996	1,36 - 3,13	0,9981 - 0,9993	1,93 - 3,15	78,4 - 94,1		
4-Ring PAK	5	0,9955 - 0,9998	0,99 - 4,83	0,9965 - 0,9989	1,94 - 4,27	91,0 - 103,5		
5-Ring PAK	3	0,9973 - 0,9993	1,85 - 3,76	0,9953 - 0,9988	2,52 - 4,93	88,3 - 96,7		
6-Ring PAK	1	0,9993	1,83	0,9982	3,08	97,9		

r: Korrelationskoeffizient; CV: Wiederfindung; WF: Mittelwert

9.6 PAK-, Hetero-PAK- und Metaboliten-Gehalte in den Altlasten

Tab. 27: PAK-Konzentrationen [mg/kg TS] in den Altlasten

Substanz	„Teeröl-Altlast 1“	„Teeröl-Altlast 2“	„Gaswerks-Altlast“	„Rüstungs-Altlast 1“	„Rüstungs-Altlast 2“
Indan	1,2	< 0,01	< 0,005	< 0,01	< 0,005
Inden	1,0	3,2	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Naphthalin *	116,2	< 0,01	10,3	< 0,01	2,3
1-Methylnaphthalin	41,3	3,4	19,1	< 0,20	1,7
2-Methylnaphthalin	82,4	2,4	19,0	< 0,20	2,1
Biphenyl	27,6	< 0,02	< 0,01	< 0,02	4,9
Acenaphthylen *	4,3	15,1	9,0	2,5	< 0,03
Acenaphthen *	120,3	284,3	12,1	6,5	1,9
Fluoren *	119,1	153,8	14,0	34,4	1,4
Phenanthren *	399,9	89,1	53,4	28,4	7,3
Anthracen *	19,8	63,7	15,6	19,5	2,4
4,5-Methylenphenanthren	29,2	76,9	7,3	80,0	0,9
Fluoranthren *	125,6	380,7	19,9	580,7	12,6
Pyren *	56,5	281,1	42,9	300,0	8,4
Benz[<i>a</i>]anthracen *	19,6	48,7	14,6	72,6	9,4
Chrysen *	14,1	42,5	10,2	75,3	6,2
Benzofluoranthren (b+k) *	13,8	31,5	15,9	50,9	12,6
Benzoflapyren *	7,6	14,5	17,5	19,7	7,2
Indeno[1,2,3- <i>cd</i>]pyren *	5,4	7,3	9,8	14,1	6,6
Dibenz[<i>a,h</i>]anthracen *	3,5	3,6	3,8	3,7	3,3
Benzoflhioperilen *	3,0	4,0	9,7	14,0	5,6
Σ EPA-PAK	1028,7	1419,9	258,7	1222,3	87,2
Σ PAK (quantifiziert)	1245,2	1505,8	304,1	1302,3	96,8

* EPA-PAK

Tab. 28: Hetero-PAK-Konzentrationen [mg/kg TS] in den Altlasten

Substanz	„Teeröl-Altlast 1“	„Teeröl-Altlast 2“	„Gaswerks-Altlast“	„Rüstungs-Altlast 1“	„Rüstungs-Altlast 2“
S-PAK:					
Benzothiophen	1,5	< 0,01	0,3	< 0,01	0,1
Dibenzothiophen	39,7	11,2	5,5	12,6	1,0
Benzo[b]naphtho- [2,1-d]thiophen	8,1	15,8	4,8	33,3	3,4
Benzo[b]naphtho- [2,3-d]thiophen	4,9	5,2	2,9	13,4	2,8
Σ S-PAK	54,2	32,2	13,5	59,3	7,3
O-PAK					
Benzofuran	< 0,04	< 0,01	< 0,005	< 0,01	< 0,005
Dibenzofuran	95,7	5,7	< 0,04	< 0,09	3,1
Benzo[b]naphtho- [2,1-d]furan	9,0	21,0	< 0,04	30,2	2,4
Σ O-PAK	104,7	26,7	-	30,2	5,5
basische N-PAK					
Chinolin	0,18	< 0,02	< 0,01	< 0,02	0,01
Isochinolin	< 0,08	0,15	< 0,08	0,30	0,14
Acridin	12,7	2,4	0,02	2,6	0,17
Phenanthridin	0,34	2,1	< 0,003	1,2	0,12
Benzo[h]chinolin	1,7	0,85	< 0,01	1,8	0,08
Benz[a]acridin	1,7	1,6	< 0,002	4,3	0,74
Benz[c]acridin	3,2	7,3	0,05	13,3	0,97
Dibenz[a,c]acridin	0,24	0,38	0,01	0,68	0,48

Tab. 29: Hetero-PAK- und Metaboliten-Konzentrationen [mg/kg TS] in den Altlasten

Substanz	„Teeröl-Altlast 1“	„Teeröl-Altlast 2“	„Gaswerks-Altlast“	„Rüstungs-Altlast 1“	„Rüstungs-Altlast 2“
neutrale N-PAK:					
Indol	< 0,05	0,81	< 0,05	0,87	0,42
Carbazol	11,7	1,0	< 0,02	0,90	1,0
Dibenzo[a,i]carbazol	0,29	0,36	< 0,16	< 0,16	0,31
1-Cyanonaphthalin	3,2	1,1	< 0,03	< 0,03	0,61
9-Cyanoanthracen	0,47	1,2	< 0,08	1,2	0,17
Σ N-PAK	35,7	19,3	0,1	27,2	5,2
(neutral und basisch)					
Σ Hetero-PAK	194,6	78,2	13,6	116,7	18,0
Metaboliten:					
1-Indanon	< 0,08	< 0,08	< 0,08	< 0,08	0,4
9-Fluorenol	< 0,03	1,6	0,07	4,1	1,3
9,10-Anthracinon	0,17	20,2	0,3	2,0	1,4
Benz[de]anthracen-7-on	1,0	6,6	2,3	1,3	1,2
7,12-Benzanthracinon	< 0,05	2,5	< 0,05	1,5	0,6
Σ Metaboliten	1,2	30,9	2,7	8,9	4,9

9.7 Abbau eines komplexen PAK- bzw. Hetero-PAK-Gemisches

9.7.1 Standardlösungen

- PAK-Mischstandard mit den in *Tab. 30* angegebenen Konzentrationen
- N-PAK-Mischstandard mit den in *Tab. 31* angegebenen Konzentrationen
- S- und O-PAK-Mischstandard mit den in *Tab. 32* angegebenen Konzentrationen
- Interner Standard 1 (für Fraktion 1: PAK, S-PAK, O-PAK): 9-Chloranthracen und Indeno[1,2,3-cd]fluoranthren: je 500 mg/L in Dichlormethan
- Interner Standard 2 (für Fraktion 2: N-PAK): 4-Methylchinolin: 500 mg/L

Tab. 30: PAK-Mischstandard zur Dotierung des Modellboden/Kompost-Gemisches

Substanz	c [mg/L Dichlormethan]
<i>Naphthalin</i>	27970,0
<i>Acenaphthen</i>	14158,2
<i>Fluoren</i>	14292,0
<i>Phenanthren</i>	21029,7
<i>Anthracen</i>	13704,4
<i>Fluoranthen</i>	17556,4
<i>Pyren</i>	12218,7
<i>Benz[a]anthracen</i>	4070,0
<i>Benzo[a]pyren</i>	5274,9

Tab. 31: N-PAK-Mischstandard zur Dotierung des Modellboden/Kompost-Gemisches

Substanz	c [mg/L Dichlormethan]
<i>Indol</i>	5316,6
<i>Chinolin</i>	5362,2
<i>Carbazol</i>	12188,3
<i>Acridin</i>	5400,0
<i>1-Cyanonaphthalin</i>	3699,3
<i>9-Cyanoanthracen</i>	3544,7

Tab. 32: S- und O-PAK-Mischstandard zur Dotierung des Modellboden/Kompost-Gemisches

Substanz	c [mg/L Dichlormethan]
<i>Benzothiophen</i>	5248,8
<i>Dibenzothiophen</i>	5223,1
<i>Benzofuran</i>	12310,5
<i>Dibenzofuran</i>	12309,6

9.7.2 Verschieden kontaminierte Ah-Horizont/Kompost-Modellsysteme

Zur Kontamination von 700 g Ah-Horizont/Kompost-Gemisch (9/1, v/v; 55 % WHK_{max}.) wurden folgende Stoffe nacheinander gut vermischt:

- 100 g Ah-Horizont (lufttrocken, ≤ 2 mm gesiebt)
- je nach Ansatzart 10 mL des PAK- und/oder des N-PAK-Mischstandards und/oder 5 ml des S- und O-PAK-Mischstandards (s. 9.7.1), Lösungsmittel mit Stickstoff vorsichtig abgeblasen,
- 407,9 g Ah-Horizont (lufttrocken, ≤ 2 mm gesiebt),
- 78,1 g Kompost (feucht, ≤ 4 mm gesiebt) ,
- 114,0 mL bidest. Wasser.

Jeder Ansatz wurde dreifach angesetzt.

9.7.3 Probenahme und Untersuchung

Die kontaminierten Böden wurden in 1-L-Weckgläser gegeben, mit Polyethylenfolie abgedeckt, gewogen und während der gesamten Abbaustudie abgedunkelt bei Raumtemperatur gelagert. Vor jeder Probenahme - nach 24 Stunden (0.Tag) sowie nach 6, 13, 20, 30, 48, 64, 83, 111 und 203 Tagen - wurden die Gläser erneut gewogen und verdampftes Wasser ersetzt. Nach gutem Durchmischen wurde aus allen Ansätzen 20 g Probe für die chemische Analytik (PAK, Hetero-PAK und Metaboliten) entnommen. Für den Microtox[®]-Test wurden mit Ausnahme des 13. und 203. Tages Proben von 20 g aus einem Ansatz jeder Kontaminationsart entnommen.

Für die chemische Analytik wurden die Proben mittels Soxhlet extrahiert (s. 9.3.1) und mittels Festphasenextraktion fraktioniert (s. 9.3.4). Die Quantifizierung der PAK und Hetero-PAK erfolgte mit GC-FID (s. 9.2.1) mittels Fünf-Stufen-Kalibrierung nach der Methode des internen Standards. Neutrale und saure Metaboliten wurden mittels HPLC-DAD (s. 9.2.3) sowie nach Trimethylsilylierung (s. 9.3.6) mittels GC-MSD (s. 9.2.2) identifiziert. Die Quantifizierung erfolgte mittels HPLC-DAD nach der Methode des externen Standards.

Die getrockneten Soxhlet-Rückstände des 111. und 203. Untersuchungstags wurden einer alkalischen Hydrolyse der Bodenmatrix unterzogen (s. 9.3.3). Die Quantifi-

zierung der enthaltenen PAK erfolgte mittels HPLC-DAD nach der Methode des externen Standards (s. 9.2.3).

Für den Microtox[®]-Test (s. 9.3.7) wurde von jeder Probe ein wäßriges Eluat sowie ein Methanol-Extrakt hergestellt. Der Test wurde wie in 9.3.7 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich wurden die Konzentrationen der PAK, Hetero-PAK und Metaboliten in Eluaten und Methanol-Extrakten mittels HPLC-DAD nach der Methode des externen Standards bestimmt (s. 9.2.3).

9.7.4 Quantifizierung von Dibenzothiophensulfoxid

0,5 mL eines Dibenzothiophen-Standards (c: 1884 mg/L) wurden mit 0,25 mL Eisessig und 0,1 mL 30 %iger Wasserstoffperoxid-Lösung in einem Braunglas-Vial unter Rühren 40 Minuten bei 65 °C umgesetzt. Der gesamte Reaktionsansatz wurde mit Methanol/Wasser (70/30; v/v) ad 25 mL aufgefüllt. Dibenzothiophen- und Dibenzothiophensulfon-Gehalte wurden mittels HPLC-DAD quantifiziert (HPLC-Bedingungen s. 9.2.3). Der dem Dibenzothiophensulfoxid-Peak entsprechende Gehalt der Verbindung wurde aus dem eingesetzten Dibenzothiophen als Differenz berechnet. Der ermittelte Response des Dibenzothiophensulfoxids wurde zur Quantifizierung der Dibenzothiophensulfoxid-Gehalte in den Proben herangezogen.

9.7.5 Ergebnisse der PAK- und Hetero-PAK-Analytik

Tab. 33: PAK-Konzentrationen [mg/kg] \pm Standardabweichung (n = 3) bzw. Signifikanzniveau SN [%] (T-Test, beidseitig) für die Hypothese, daß ein Unterschied zwischen den Bodensystemen „PAK“ und „PAK+NSO“ besteht

Substanz	Bodensystem	Extrahierbare PAK			
		6. Tag	13. Tag	20. Tag	30. Tag
Naphthalin	„PAK“	316 \pm 22,2	256 \pm 33,8	132 \pm 10,4	52 \pm 70,3
	„PAK+NSO“	340 \pm 11,8	276 \pm 2,3	204 \pm 32,9	132 \pm 53,9
	SN (T-Test)	82	57	98	81
Acenaphthen	„PAK“	205 \pm 0,7	197 \pm 7,1	163 \pm 9,8	95 \pm 39,2
	„PAK+NSO“	199 \pm 4,1	193 \pm 3,1	188 \pm 1,9	169 \pm 8,7
	SN (T-Test)	86	55	95	92
Fluoren	„PAK“	192 \pm 6,4	193 \pm 8,0	173 \pm 2,3	105 \pm 38,1
	„PAK+NSO“	205 \pm 4,0	204 \pm 2,4	206 \pm 1,9	198 \pm 5,5
	SN (T-Test)	97	91	100	95
Phenanthren	„PAK“	292 \pm 5,4	269 \pm 9,2	258 \pm 3,7	158 \pm 89,5
	„PAK+NSO“	303 \pm 4,7	305 \pm 4,7	308 \pm 3,9	297 \pm 2,7
	SN (T-Test)	94	100	100	89
Anthracen	„PAK“	190 \pm 9,6	182 \pm 10,3	179 \pm 13,1	149 \pm 5,9
	„PAK+NSO“	194 \pm 2,7	190 \pm 1,3	196 \pm 2,4	193 \pm 7,7
	SN (T-Test)	46	65	86	100
Fluoranthren	„PAK“	254 \pm 3,0	251 \pm 8,4	250 \pm 9,2	251 \pm 10,7
	„PAK+NSO“	246 \pm 4,7	246 \pm 5,0	252 \pm 5,9	243 \pm 5,5
	SN (T-Test)	93	63	15	69
Pyren	„PAK“	176 \pm 4,4	176 \pm 5,9	174 \pm 6,6	177 \pm 4,8
	„PAK+NSO“	171 \pm 1,9	172 \pm 4,2	174 \pm 3,9	167 \pm 2,7
	SN (T-Test)	87	54	7,6	97
Benz[a]anthracen	„PAK“	59 \pm 1,4	58 \pm 2,7	56 \pm 1,6	57 \pm 3,7
	„PAK+NSO“	59 \pm 2,7	58 \pm 0,7	57 \pm 0,5	52 \pm 1,9
	SN (T-Test)	6	19	31	87
Benzo[a]pyren	„PAK“	75 \pm 3,1	77 \pm 1,5	74 \pm 2,3	75 \pm 0,9
	„PAK+NSO“	73 \pm 3,1	72 \pm 2,6	73 \pm 2,1	73 \pm 1,4
	SN (T-Test)	66	93	41	94
Σ PAK	„PAK“	1758 \pm 23	1660 \pm 37	1459 \pm 17	1120 \pm 273
	„PAK+NSO“	1789 \pm 38	1715 \pm 22	1657 \pm 18	1524 \pm 84
	SN (T-Test)	71	91	100	93

n.n.: < 1 % der Dotierung; n.n.*: < 1 mg/kg FG

Tab. 33 (Forts.): PAK-Konzentrationen [mg/kg] \pm Standardabweichung (n = 3) bzw. Signifikanzniveau SN [%] (T-Test, beidseitig) für die Hypothese, daß ein Unterschied zwischen den Bodensystemen „PAK“ und „PAK+NSO“ besteht

Extrahierbare PAK					Verseifbare PAK	
48. Tag	64. Tag	83. Tag	111. Tag	203. Tag	111. Tag	203. Tag
n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.*	n.n.*
65 \pm 9,6	29 \pm 16,2	4 \pm 7,2	n.n.	n.n.	n.n.*	n.n.*
100	98	81	-	-	-	-
57 \pm 36,3	30 \pm 14,9	9 \pm 3,4	n.n.	n.n.	n.n.*	n.n.*
146 \pm 18,2	129 \pm 4,5	103 \pm 12,7	51 \pm 1,6	n.n.	n.n.*	n.n.*
98	100	100	100	-		
49 \pm 36,8	15 \pm 1,8	7 \pm 1,4	n.n.	n.n.	n.n.*	n.n.*
176 \pm 8,4	183 \pm 5,7	169 \pm 11,5	145 \pm 34,2	n.n.	n.n.*	n.n.*
98	100	100	99	-		
78 \pm 56,0	23 \pm 4,9	11 \pm 1,7	5 \pm 3,9	n.n.	n.n.*	n.n.*
275 \pm 22,6	291,6 \pm 2,2	282,2 \pm 7,1	279 \pm 7,9	n.n.	n.n.*	n.n.*
100	100	100	100	-		
133 \pm 8,0	121 \pm 3,5	78 \pm 48,6	23 \pm 26,7	n.n.	n.n.*	n.n.*
177 \pm 14,6	189 \pm 1,9	181 \pm 7,9	184 \pm 6,1	2 \pm 3,6	n.n.*	1 \pm 0,4
99	100	94	99	81		
242 \pm 9,4	218 \pm 59,7	160 \pm 111,0	48 \pm 53,4	6 \pm 0,1	n.n.*	n.n.*
229 \pm 14,7	240 \pm 2,7	238 \pm 3,4	234 \pm 9,8	29 \pm 16,9	n.n.*	1 \pm 0,1
75	42	65	98	86		
173 \pm 4,4	156 \pm 30,5	119 \pm 79,4	39 \pm 43,8	5 \pm 0,2	n.n.*	n.n.*
161 \pm 1,4	166 \pm 2,0	164 \pm 1,5	158 \pm 3,6	24 \pm 11,9	n.n.*	n.n.*
99	38	57	96	90		
53 \pm 2,0	55 \pm 3,5	51 \pm 5,2	33 \pm 18,0	5 \pm 0,5	n.n.*	n.n.*
51 \pm 3,1	52 \pm 2,1	53 \pm 0,6	52 \pm 2,0	33 \pm 6,4	n.n.*	1 \pm 0,5
53	76	39	78	98		
73 \pm 0,7	72 \pm 2,9	75 \pm 3,8	69 \pm 4,2	42 \pm 7,8	2 \pm 1,0	4 \pm 0,0
71 \pm 2,7	71 \pm 1,1	68 \pm 2,5	69 \pm 3,2	63 \pm 5,2	n.n.*	2 \pm 1,7
82	38	94	12	98		
857 \pm 129	690 \pm 76	510 \pm 247	216 \pm 148	57 \pm 7		
1351 \pm 69	1351 \pm 16	1261 \pm 22	1172 \pm 38	151 \pm 43		
100	100	97	100	94		

Tab. 34: Hetero-PAK-Konzentrationen [mg/kg] \pm Standardabweichung (n = 3) bzw. Signifikanzniveau SN [%] (T-Test, beidseitig) für die Hypothese, daß ein Unterschied zwischen den Bodensystemen „NSO“ und „PAK+NSO“ besteht

Substanz	Bodensystem	Extrahierbare Hetero-PAK			
		6. Tag	13. Tag	20. Tag	30. Tag
Indol	„NSO“	58 \pm 5,9	6 \pm 2,8	3 \pm 1,1	2 \pm 0,3
	„PAK+NSO“	50 \pm 1,9	29 \pm 1,3	10 \pm 4,1	4 \pm 1,1
	SN (T-Test)	90	100	94	92
Chinolin	„NSO“	76 \pm 2,8	28 \pm 20,0	4 \pm 4,1	1 \pm 1,0
	„PAK+NSO“	76 \pm 2,8	79 \pm 2,9	75 \pm 2,4	50 \pm 6,0
	SN (T-Test)	30	96	100	100
Benzothiophen	„NSO“	64 \pm 1,1	50 \pm 7,5	37 \pm 12,1	21 \pm 2,4
	„PAK+NSO“	64 \pm 2,6	53 \pm 0,1	39 \pm 5,6	25 \pm 8,9
	SN (T-Test)	21	39	18	58
Benzofuran	„NSO“	129 \pm 19,6	48 \pm 13,1	20 \pm 6,1	7 \pm 2,1
	„PAK+NSO“	83 \pm 8,4	45 \pm 13,5	26 \pm 22	14 \pm 14,9
	SN (T-Test)	98	19	31	50
Carbazol	„NSO“	173 \pm 9,3	166 \pm 16,2	163 \pm 13,3	139 \pm 10,7
	„PAK+NSO“	175 \pm 7,3	167 \pm 3,6	165 \pm 12,7	171 \pm 0,2
	SN (T-Test)	26	5	12	96
Acridin	„NSO“	76 \pm 1,3	74 \pm 2,0	72 \pm 3,5	73 \pm 0,6
	„PAK+NSO“	74 \pm 2,6	71 \pm 3,6	70 \pm 2,4	69 \pm 5,5
	SN (T-Test)	58	75	47	67
Dibenzothiophen	„NSO“	72 \pm 2,5	71 \pm 4,0	70 \pm 1,7	61 \pm 11,0
	„PAK+NSO“	75 \pm 1,1	75 \pm 1,2	77 \pm 1,0	75 \pm 2,9
	SN (T-Test)	92	85	100	90
Dibenzofuran	„NSO“	169 \pm 11,3	166 \pm 9,7	156 \pm 7,5	31 \pm 5,9
	„PAK+NSO“	176 \pm 2,7	174 \pm 2,6	174 \pm 2,0	165 \pm 5,1
	SN (T-Test)	61	77	99	100
1-Cyanonaphthalin	„NSO“	53 \pm 2,5	53 \pm 2,3	51 \pm 0,3	49 \pm 2,7
	„PAK+NSO“	51 \pm 2,2	53 \pm 2,6	51 \pm 1,7	52 \pm 3,9
	SN (T-Test)	62	9	46	61
9-Cyanoanthracen	„NSO“	53 \pm 1,3	51 \pm 2,0	48 \pm 0,6	49 \pm 1,5
	„PAK+NSO“	50 \pm 1,4	49 \pm 3,2	48 \pm 0,9	49 \pm 2,0
	SN (T-Test)	95	55	20	15
Σ Hetero-PAK	„NSO“	923 \pm 3	712 \pm 24	623 \pm 7	433 \pm 21
	„PAK+NSO“	874 \pm 23	794 \pm 20	734 \pm 14	673 \pm 29
	SN (T-Test)	93	99	100	100

n.n.: < 1 % der Dotierung; n.n.*: < 1 mg/kg FG

Tab. 34 (Forts.): Hetero-PAK-Konzentrationen [mg/kg] \pm Standardabweichung (n = 3) bzw. Signifikanzniveau SN [%] (T-Test, beidseitig) für die Hypothese, daß ein Unterschied zwischen den Bodensystemen „NSO“ und „PAK+NSO“ besteht

<i>Extrahierbare Hetero-PAK</i>					<i>Verseifbare Hetero-PAK</i>	
48. Tag	64. Tag	83. Tag	111. Tag	203. Tag	111. Tag	203. Tag
n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.*	n.n.*
2 \pm 0,4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.*	n.n.*
82	-	-	-	-		
n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.*	n.n.*
4 \pm 1,6	1 \pm 0,9	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.*	n.n.*
96	82	-	-	-		
10 \pm 1,0	5 \pm 1,4	3 \pm 0,6	n.n.	n.n.	n.n.*	n.n.*
12 \pm 1,5	5 \pm 2,6	1 \pm 1,3	n.n.	n.n.	n.n.*	n.n.*
87	21	90	-	-		
4 \pm 0,5	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.*	n.n.*
4 \pm 3,3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.*	n.n.*
17	81	-	-	-		
10 \pm 4,9	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.*	n.n.*
166 \pm 6,3	162 \pm 2,6	118 \pm 66,6	91 \pm 61,9	n.n.	n.n.*	n.n.*
100	100	98	97	-		
74 \pm 3,2	67 \pm 1,9	68 \pm 3,2	68 \pm 0,1	58 \pm 3,5	10 \pm 2,3	20 \pm 4,0
69 \pm 4,2	67 \pm 0,5	68 \pm 2,1	68 \pm 1,2	46 \pm 1,5	1 \pm 0,6	15 \pm 6,4
81	35	6	7	100		
53 \pm 18,7	43 \pm 14,3	43 \pm 13,3	38 \pm 18,7	2 \pm 2,2	n.n.*	n.n.*
70 \pm 2,3	71 \pm 0,8	66 \pm 4,6	60 \pm 8,1	n.n.	n.n.*	n.n.*
73	92	95	86	90		
7 \pm 2,9	3 \pm 4,6	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.*	n.n.*
149 \pm 11,8	146 \pm 4,5	121 \pm 18,0	88 \pm 37,8	n.n.	n.n.*	n.n.*
100	100	100	99	-		
49 \pm 1,9	41 \pm 1,4	36 \pm 3,5	7 \pm 8,7	1 \pm 2,0	n.n.	n.n.*
51 \pm 5,5	50 \pm 4,4	43 \pm 0,8	36 \pm 0,3	n.n.	n.n.	n.n.*
33	97	92	97	58		
48 \pm 0,6	48 \pm 0,8	48 \pm 2,3	28 \pm 23,5	1 \pm 0,9	n.n.*	2 \pm 0,5
49 \pm 0,6	49 \pm 2,1	45 \pm 3,0	46 \pm 1,0	57 \pm 4,8	n.n.*	n.n.*
72	41	85	70	99		
256 \pm 23	207 \pm 20	198 \pm 13	141 \pm 48	62 \pm 4		
574 \pm 11	553 \pm 5	461 \pm 94	390 \pm 102	73 \pm 6		
100	100	96	98	94		

Tab. 35: PAK/Hetero-PAK abgebaut [mg/kg] \pm Standardabweichung (n = 3) bzw. Signifikanzniveau SN [%] (T-Test, beidseitig) für die Hypothese, daß ein Unterschied zwischen den Bodensystemen „PAK“, „NSO“ bzw. „PAK+NSO“ besteht

Ansatz	6. Tag	13. Tag	20. Tag	30. Tag	48. Tag	64. Tag	83. Tag	111. Tag	203. Tag
„PAK“									
Σ abgebaut	103 \pm 23,1	202 \pm 37,6	402 \pm 17,3	741 \pm 273,0	1004 \pm 128,9	1171 \pm 76,2	1352 \pm 249,6	1645 \pm 147,6	1804 \pm 7,1
„NSO“									
Σ abgebaut	86 \pm 3,0	297 \pm 24,0	385 \pm 7,3	576 \pm 20,8	752 \pm 23,4	802 \pm 20,0	811 \pm 13,2	867 \pm 48,4	947 \pm 3,6
„PAK+NSO“									
Σ abgebaut	207 \pm 60,1	362 \pm 27,3	479 \pm 30,9	673 \pm 112,0	945 \pm 79,1	966 \pm 19,3	1148 \pm 114,9	1308 \pm 136,6	2646 \pm 48,7
„PAK“ \leftrightarrow „NSO“									
SN (T-Test)	67	98	81	60	93	100	94	100	100
„PAK“ \leftrightarrow „PAK+NSO“									
SN (T-Test)	95	100	98	29	46	99	73	96	100
„NSO“ \leftrightarrow „PAK+NSO“									
SN (T-Test)	93	96	99	73	98	100	96	99	100

9.7.6 Ergebnisse der Metaboliten-Analytik

Tab. 36: Konzentrationen an PAK-Metaboliten [mg/kg] \pm Standardabweichung (n = 3)

Substanz	6. Tag	13. Tag	20. Tag	30. Tag	48. Tag	64. Tag	83. Tag	111. Tag	203. Tag
2,3-Dihydroxynaphthalin									
„PAK“	n.n.	n.n.	n.n.	7,0 \pm 6,3	7,2 \pm 6,3	6,1 \pm 6,1	4,8 \pm 4,1	3,7 \pm 4,4	0,5 \pm 0,8
„PAK+NSO“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
1,8-Naphthalsäureanhydrid									
„PAK“	n.n.	n.n.	0,5 \pm 0,0	3,9 \pm 4,7	4,1 \pm 6,2	6,9 \pm 6,5	0,2 \pm 0,3	0,2 \pm 0,3	n.n.
„PAK+NSO“	n.n.	n.n.	0,1 \pm 0,2	0,4 \pm 0,3	1,5 \pm 0,7	3,0 \pm 0,9	2,1 \pm 2,0	1,0 \pm 0,5	5,1 \pm 1,4
1,2-Acenaphthenchinon									
„PAK“	n.n.	n.n.	n.n.	7,3 \pm 6,1	4,8 \pm 5,6	1,6 \pm 2,0	0,4 \pm 0,5	0,1 \pm 0,2	n.n.
„PAK+NSO“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	18,1 \pm 1,8
9-Hydroxyfluoren									
„PAK“	0,3 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
„PAK+NSO“	0,1 \pm 0,2	0,2 \pm 0,2	0,1 \pm 0,1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
9-Fluoren									
„PAK“	0,9 \pm 0,2	2,4 \pm 0,4	5,2 \pm 1,3	8,6 \pm 4,7	4,4 \pm 3,2	0,9 \pm 0,3	0,3 \pm 0,4	0,1 \pm 0,1	n.n.
„PAK+NSO“	0,5 \pm 0,0	1,0 \pm 0,1	1,5 \pm 0,5	2,5 \pm 0,7	4,2 \pm 1,3	5,0 \pm 1,3	1,3 \pm 0,4	1,2 \pm 0,7	1,1 \pm 0,3
4-Hydroxy-9-fluoren									
„PAK“	n.n.	n.n.	n.n.	7,3 \pm 7,1	8,0 \pm 8,0	7,5 \pm 7,7	5,7 \pm 5,8	4,4 \pm 4,2	2,1 \pm 2,0
„PAK+NSO“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,1 \pm 0,2	n.n.	n.n.
1-Indanon									
„PAK“	n.n.	1,4 \pm 1,2	0,3 \pm 0,6	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
„PAK+NSO“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

Tab. 36 (Forts.): Konzentrationen an PAK-Metaboliten [mg/kg] \pm Standardabweichung (n = 3)

Substanz	6. Tag	13. Tag	20. Tag	30. Tag	48. Tag	64. Tag	83. Tag	111. Tag	203. Tag
9,10-Anthrachinon									
„PAK“	0,7 \pm 0,2	0,9 \pm 0,2	0,9 \pm 0,1	1,1 \pm 0,2	0,9 \pm 0,4	0,9 \pm 0,3	0,2 \pm 0,2	0,1 \pm 0,2	0,1 \pm 0,1
„PAK+NSO“	0,6 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	0,9 \pm 0,1	0,9 \pm 0,0	1,1 \pm 0,2	1,5 \pm 0,5	0,5 \pm 0,1	0,7 \pm 0,4	1,3 \pm 0,5
9,10-Phenanthrenchinon									
„PAK“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,4 \pm 0,6	0,3 \pm 0,6	n.n.	n.n.	n.n.
„PAK+NSO“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,2 \pm 0,4	0,9 \pm 1,5	3,9 \pm 6,1	n.n.
3-Hydroxy-2-naphthoesäure									
„PAK“	n.n.	n.n.	n.n.	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,9 \pm 0,9	0,3 \pm 0,4	n.n.
„PAK+NSO“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

Tab. 37: Konzentrationen an Hetero-PAK-Metaboliten [mg/kg] \pm Standardabweichung (n = 3)

Substanz	6. Tag	13. Tag	20. Tag	30. Tag	48. Tag	64. Tag	83. Tag	111. Tag	203. Tag
2-Hydroxychinolin									
„NSO“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
„PAK+NSO“	n.n.	n.n.	n.n.	0,8 \pm 1,4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Dibenzothiophensulfoxid									
„NSO“	n.n.	0,1 \pm 0,1	0,6 \pm 0,5	11,5 \pm 7,8	20 \pm 11,6	20 \pm 12,0	26 \pm 15,8	13,4 \pm 0,7	0,1 \pm 0,1
„PAK+NSO“	n.n.	n.n.	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	1,0 \pm 0,6	4,6 \pm 4,3	8,0 \pm 6,5	5,6 \pm 2,6
Dibenzothiophensulfon									
„NSO“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
„PAK+NSO“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,1 \pm 0,2	n.n.	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

9.7.7 Ergebnisse des Microtox -Tests

Tab 38: Hemmung der Methanol-Extrakte [%] in der Verdünnung G6 (n = 4)

Ansatz	0. Tag	6. Tag	20. Tag	30. Tag	48. Tag	64. Tag	83. Tag	111. Tag
„PAK“	39 ± 4,2	43 ± 2,1	36 ± 3,5	28 ± 1,4	20 ± 1,5	10 ± 0,2	12 ± 0,5	12 ± 1,6
„NSO“	27 ± 1,8	27 ± 2,4	29 ± 3,4	23 ± 1,2	19 ± 3,5	14 ± 0,7	24 ± 1,4	21 ± 1,7
„PAK+NSO“	54 ± 8,4	55 ± 5,2	51 ± 3,7	51 ± 7,0	56 ± 2,8	52 ± 1,6	53 ± 1,4	56 ± 2,7
Blindwert	7							

9.7.8 PAK- und Hetero-PAK-Gehalte in den Methanol-Extrakten

Tab. 39: PAK in den Methanol-Extrakten [mg/L] und in Prozent [%] () der Soxhlet-extrahierten PAK (n = 1)

Ansatz	0. Tag	6. Tag	20. Tag	30. Tag	48. Tag	64. Tag	83. Tag	111. Tag
Naphthalin	„PAK“	112,9 (67)	89,4 (73)	36,8 (67)	7,4 (73)	n.n.	n.n.	n.n.
	„PAK+NSO“	112,0 (67)	94,7 (72)	46,2 (51)	27,0 (58)	11,8 (44)	5,5 (44)	2,5 (85)
Acenaphthen	„PAK“	59,8 (70)	60,1 (70)	50,1 (79)	25,4 (67)	11,4 (67)	6,3 (61)	3,2 (66)
	„PAK+NSO“	67,7 (80)	66,2 (80)	62,4 (80)	59,8 (87)	55,4 (79)	47,0 (84)	38,8 (79)
Fluoren	„PAK“	60,6 (71)	63,5 (81)	54,0 (74)	25,9 (69)	7,6 (64)	3,1 (56)	2,4 (70)
	„PAK+NSO“	62,2 (73)	61,2 (71)	60,2 (70)	61,0 (74)	58,2 (77)	53,7 (72)	47,9 (73)
Phenanthren	„PAK“	89,7 (71)	95,7 (77)	83,5 (78)	41,3 (71)	11,9 (67)	4,6 (58)	3,8 (79)
	„PAK+NSO“	89,3 (71)	89,1 (70)	90,3 (70)	92,0 (73)	90,6 (73)	87,3 (72)	89,7 (78)
Anthracen	„PAK“	56,5 (69)	61,0 (76)	56,9 (73)	46,5 (75)	40,3 (69)	34,9 (67)	31,4 (68)
	„PAK+NSO“	56,7 (69)	56,8 (70)	57,3 (70)	58,7 (73)	55,6 (70)	55,0 (70)	55,8 (77)
Fluoranthren	„PAK“	73,9 (70)	79,5 (74)	73,6 (70)	71,6 (70)	72,4 (70)	71,8 (65)	68,7 (71)
	„PAK+NSO“	72,6 (69)	73,3 (71)	73,8 (69)	76,1 (74)	74,2 (73)	71,9 (71)	76,5 (78)
Pyren	„PAK“	50,8 (69)	54,3 (75)	51,0 (69)	49,8 (69)	51,9 (72)	51,8 (72)	50,2 (71)
	„PAK+NSO“	50,6 (69)	50,6 (71)	50,9 (69)	52,5 (74)	50,6 (75)	49,7 (71)	52,0 (76)
Benz[a]anthracen	„PAK“	15,9 (65)	17,2 (68)	16,2 (69)	15,9 (72)	16,4 (76)	16,4 (74)	16,0 (71)
	„PAK+NSO“	16,0 (66)	16,2 (63)	15,8 (66)	16,3 (72)	15,3 (69)	15,3 (72)	16,2 (73)
Benzo[a]pyren	„PAK“	17,2 (54)	18,6 (61)	16,9 (53)	17,0 (54)	17,5 (58)	17,5 (58)	16,8 (54)
	„PAK+NSO“	17,5 (55)	17,2 (58)	16,8 (54)	17,1 (57)	16,2 (53)	16,0 (53)	17,0 (61)
Σ PAK	„PAK“	537,4 (69)	539,2 (73)	439,1 (72)	300,7 (64)	229,3 (64)	206,5 (71)	192,5 (90)
	„PAK+NSO“	544,7 (70)	525,3 (70)	473,5 (68)	460,5 (72)	427,9 (75)	401,4 (71)	396,4 (75)

n.n.: nicht nachweisbar

Tab. 40: Hetero-PAK in den Methanol-Extrakten [mg/L] u. in Prozent [%] () der Soxhlet-extrahierten Hetero-PAK (n=1)

Ansatz	0. Tag	6. Tag	20. Tag	30. Tag	48. Tag	64. Tag	83. Tag	111. Tag
Indol	„NSO“ 22,6 (71)	8,3 (34)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	„PAK+NSO“ 20,6 (65)	12,5 (59)	1,9 (45)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Chinolin	„NSO“ 25,6 (80)	25,4 (79)	0,6 (34)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	„PAK+NSO“ 24,7 (77)	24,3 (77)	23,3 (74)	17,3 (82)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Benzothiophen	„NSO“ 18,9 (60)	14,7 (55)	6,7 (43)	4,4 (51)	2,3 (54)	1,1 (53)	n.n.	n.n.
	„PAK+NSO“ 18,6 (59)	14,9 (56)	6,9 (42)	3,5 (33)	1,6 (31)	0,7 (32)	n.n.	n.n.
Benzofuran	„NSO“ 37,5 (51)	15,7 (29)	2,0 (24)	0,5 (18)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
	„PAK+NSO“ 41,2 (56)	23,4 (67)	3,2 (30)	2,3 (39)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Carbazol	„NSO“ 68,3 (93)	68,6 (94)	65,9 (96)	21,3 (36)	2,0 (46)	n.n.	n.n.	n.n.
	„PAK+NSO“ 68,4 (94)	67,2 (91)	65,6 (95)	66,2 (92)	54,7 (78)	22,0 (33)	17,8 (36)	14,0 (37)
Acridin	„NSO“ 18,9 (58)	19,8 (62)	20,2 (67)	20,5 (67)	20,6 (66)	20,7 (73)	20,1 (70)	18,4 (64)
	„PAK+NSO“ 17,9 (55)	18,7 (60)	19,6 (66)	20,7 (71)	21,6 (74)	20,9 (75)	20,7 (72)	20,4 (71)
Dibenzothiophen	„NSO“ 27,5 (88)	27,6 (92)	26,5 (90)	17,9 (70)	11,9 (53)	10,5 (58)	10,0 (56)	6,5 (41)
	„PAK+NSO“ 26,0 (83)	25,7 (81)	25,7 (80)	26,2 (84)	26,3 (90)	24,9 (83)	22,7 (83)	16,9 (67)
Dibenzofuran	„NSO“ 63,8 (86)	63,3 (89)	55,3 (85)	9,9 (76)	1,6 (57)	0,7 (63)	n.n.	n.n.
	„PAK+NSO“ 69,2 (94)	68,2 (92)	65,9 (90)	65,3 (94)	62,0 (96)	55,0 (90)	41,3 (81)	16,7 (45)
1-CN-Naphthalin	„NSO“ 20,8 (94)	21,4 (97)	19,0 (90)	17,6 (86)	16,8 (82)	16,2 (95)	13,9 (92)	3,0 (97)
	„PAK+NSO“ 20,4 (92)	19,6 (92)	19,5 (91)	19,5 (90)	19,6 (92)	17,6 (84)	17,1 (96)	13,8 (91)
9-CN-Anthracen	„NSO“ 18,9 (88,6)	19,0 (86)	18,6 (92)	16,4 (79)	15,7 (78)	14,9 (74)	14,3 (70)	13,6 (74)
	„PAK+NSO“ 18,2 (86)	17,7 (84)	17,9 (89)	18,5 (90)	16,0 (78)	15,3 (75)	14,9 (80)	15,2 (78)
Σ Hetero-PAK	„NSO“ 322,7 (76)	283,9 (73)	214,8 (82)	108,6 (60)	70,9 (66)	64,0 (74)	58,3 (70)	41,5 (70)
	„PAK+NSO“ 325,1 (77)	292,0 (80)	249,4 (81)	239,5 (85)	199,8 (83)	156,4 (67)	134,6 (70)	97,0 (59)

n.n.: nicht nachweisbar

9.7.9 Metabolitengehalte in den Methanol-Extrakten

Tab. 41: PAK-Metaboliten in den Methanol-Extrakten [mg/L] und in Prozent [%] () der Soxhlet-extrahierten Metaboliten (n = 1)

Substanz	6. Tag	20. Tag	30. Tag	48. Tag	64. Tag	83. Tag	111. Tag
2,3-Dihydroxynaphthalin							
„PAK“	n.n.	0,3 (9)	0,3 (7)	0,2 (4)	0,1 (5)	0,1 (12)	n.n.
„PAK+NSO“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
1,8-Naphthalsäureanhydrid							
„PAK“	n.n.	n.n.	n.n. (0)	n.n. (0)	n.n. (0)	n.n.	n.n.
„PAK+NSO“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n. (0)	n.n. (0)	n.n. (0)
1,2-Acenaphthenchinon							
„PAK“	n.n.	0,2 (>100)	4,0 (90)	2,0 (136)	0,3 (61)	0,2 (152)	0,1 (>100)
„PAK+NSO“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
9-Hydroxyfluoren							
„PAK“	0,1 (127)	0,5 (>100)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
„PAK+NSO“	n.n.	n.n. (0)	n.n. (0)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
9-Fluoren							
„PAK“	0,3 (92)	2,2 (96)	4,2 (91)	2,2 (80)	0,2 (58)	0,04 (60)	0,03 (35)
„PAK+NSO“	0,2 (88)	0,6 (80)	1,0 (84)	2,0 (87)	1,8 (77)	0,6 (81)	0,7 (80)
4-Hydroxy-9-fluoren							
„PAK“	n.n.	n.n.	2,5 (80)	3,4 (99)	2,1 (73)	1,9 (81)	1,7 (80)
„PAK+NSO“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n. (0)	n.n.
1-Indanon							
„PAK“	n.n.	1,1 (128)	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
„PAK+NSO“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

Tab. 41 (Forts.): PAK-Metaboliten in den Methanol-Extrakten [mg/L] und in Prozent [%] () der Soxhlet-extrahierten Metaboliten (n = 1)

Substanz	6. Tag	20. Tag	30. Tag	48. Tag	64. Tag	83. Tag	111. Tag
9,10-Anthrachinon							
„PAK“	0,1 (49)	0,2 (66)	0,3 (69)	0,3 (70)	0,2 (52)	0,04 (39)	0,06 (56)
„PAK+NSO“	0,1 (60)	0,3 (70)	0,3 (82)	0,5 (82)	0,6 (71)	0,2 (65)	0,3 (61)
9,10-Phenanthrenchinon							
„PAK“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
„PAK+NSO“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,2 (75)	0,8 (77)	4,9 (105)

n.n.: nicht nachweisbar

Tab. 42: Hetero-PAK-Metaboliten in den Methanol-Extrakten [mg/L] und in Prozent [%] () der Soxhlet-extrahierten Metaboliten

Substanz	6. Tag	20. Tag	30. Tag	48. Tag	64. Tag	83. Tag	111. Tag
2-Hydroxychinolin							
„NSO“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
„PAK+NSO“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Dibenzothiophensulfoxid							
„NSO“	n.n. (0)	0,5 (97)	7,3 (86)	10,7 (83)	11,3 (83)	9,9 (54)	4,2 (80)
„PAK+NSO“	n.n.	n.n. (0)	0,1 (111)	0,2 (111)	0,6 (85)	3,0 (75)	5,7 (88)
Dibenzothiophensulfon							
„NSO“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
„PAK+NSO“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n. (0)	n.n.

9.8 Abbau strukturanaloger PAK und Hetero-PAK

9.8.1 Standardlösungen

- Aufarbeitungsstandard 1-Methylfluoren: 1800 mg/L
- Einzelstandards von Fluoren, Carbazol, Dibenzothiophen und Dibenzofuran: je 24 000 mg/L in Dichlormethan
- Mischstandard von Fluoren, Carbazol, Dibenzothiophen und Dibenzofuran: je 24 000 mg/L in Dichlormethan

9.8.2 Verschieden kontaminierte Ah-Horizont/Kompost-Modellsysteme

Zur Kontamination von 600 g Ah-Horizont/Kompost-Gemisch (9/1, v/v; 55 % WHK_{max.}) wurden folgende Stoffe nacheinander gut vermischt:

- 100 g Ah-Horizont (lufttrocken, ≤ 2 mm gesiebt),
- jeweils 5 mL der Einzelstandards bzw. des Mischstandards (s. 9.8.1), Lösungsmittel mit Stickstoff vorsichtig abgeblasen,
- 333,7 g Ah-Horizont (lufttrocken, ≤ 2 mm gesiebt),
- 66,4 g Kompost (feucht, ≤ 4 mm gesiebt),
- 99,9 mL bidest. Wasser.

Jeder Ansatz wurde dreifach angesetzt.

9.8.3 Probenahme und Untersuchung

Die kontaminierten Böden wurden in 1-L-Weckgläser gegeben, mit Polyethylenfolie abgedeckt, gewogen und während der gesamten Abbaustudie abgedunkelt bei Raumtemperatur gelagert. Vor jeder Probenahme - nach 24 Stunden (0.Tag) sowie nach 7, 14, 28, 42, 61 und 82 Tagen - wurden die Gläser erneut gewogen und verdampftes Wasser ersetzt. Nach gutem Durchmischen wurde aus allen Ansätzen 20 g Probe für die PAK- und Hetero-PAK-Analytik entnommen. Für die Analytik der Metaboliten wurde nur aus einem Ansatz jeder Kontaminationsart 20 g Probe entnommen.

Die PAK- und Hetero-PAK-Gehalte wurden nach Ultraschall-Extraktion (s. 9.3.2) mittels HPLC bestimmt (s. 9.2.3). Die Quantifizierung erfolgte nach der Methode des

externen Standards mittels einer Sechs-Stufen-Kalibriergerade ($c = 0,5 - 10 \text{ mg/L}$). Verluste des Extraktionslösungsmittels Dichlormethan wurden auf Basis der Wiederfindung des Aufarbeitungsstandards 1-Methylfluoren korrigiert.

Die Metaboliten wurden nach Soxhlet-Extraktion (s. 9.3.1) mittels Festphasenextraktion fraktioniert (s. 9.3.4). Neutrale und saure Metaboliten wurden mittels HPLC-DAD (s. 9.2.3) sowie nach Trimethylsilylierung (s. 9.3.6) mittels GC-MSD (s. 9.2.2) identifiziert. Die Quantifizierung erfolgte mittels HPLC-DAD nach der Methode des externen Standards.

9.8.4 Ergebnisse der PAK-, Hetero-PAK- und Metaboliten-Analytik

Tab 43: PAK- und Hetero-PAK-Konzentrationen [mg/kg] \pm Standardabweichung (n = 3) bzw. Signifikanzniveau SM [%] (T-Test, beidseitig) für die Hypothese, daß ein Unterschied zwischen den einzeln- und mischkontaminierten Bodensystemen besteht

Verbindung	0. Tag	7. Tag	Extrahierbare PAK und Hetero-PAK				61. Tag incl. Verseifung	
			14. Tag	28. Tag	42. Tag	61. Tag	82. Tag	Verseifung
Fluoren:								
„FLU“	200	195 \pm 8,2	100 \pm 11,2	37 \pm 7,8	16 \pm 7,6	7 \pm 5,6	< 2,0	9 \pm 6,0
„MIX“	200	214 \pm 5,6	187 \pm 6,2	110 \pm 2,2	41 \pm 7,4	42 \pm 12,0	14 \pm 9,8	48 \pm 15,4
SN	-	-	99	99	99	99	-	-
Carbazol:								
„CAR“	201	201 \pm 5,8	164 \pm 4,8	43 \pm 7,6	10 \pm 8,8	5 \pm 4,4	< 2,0	3 \pm 1,4
„MIX“	200	209 \pm 6,2	139 \pm 13,8	67 \pm 2,4	43 \pm 10,2	18* \pm 0,2	6 \pm 5,6	26 \pm 12,2
SN	-	-	96	99	99	97	-	-
Dibenzothiophen:								
„DBT“	200	206 \pm 7,8	196 \pm 2,4	170 \pm 7,8	87 \pm 9,6	10 \pm 2,0	4* \pm 0,2	33 \pm 6,2
„MIX“	200	213 \pm 6,4	195 \pm 2,4	133 \pm 2,4	113 \pm 8,2	68 \pm 7,2	28 \pm 19,8	67* \pm 0,2
SN	-	-	-	99	98	99	-	-
Dibenzofuran:								
„DBF“	201	198 \pm 2,6	188 \pm 11,8	34 \pm 18,2	7 \pm 3,8	< 2,0	< 2,0	< 2,0
„MIX“	208	230 \pm 7,5	175 \pm 2,7	91 \pm 3,1	54 \pm 6,9	24* \pm 0,4	9 \pm 6,7	26 \pm 1,0
SN	-	-	90	97	99	99	-	-

*: n = 2 (Ausreißertest nach Grubbs), -: SN < 90 %

Tab. 44: Signifikanzniveau SN [%] (T-Test, beidseitig) für die Hypothese, daß ein Unterschied in der Abbaugeschwindigkeit der PAK bzw. Hetero-PAK besteht

Ansatz	0. Tag	7. Tag	14. Tag	28. Tag	42. Tag	61. Tag	82. Tag
einzelkontaminierte Ansätze:							
SN „FLU“ ↔ „CAR“	< 90	< 90	99	< 90	< 90	< 90	< 90
SN „CAR“ ↔ „DBF“	< 90	< 90	97	< 90	< 90	< 90	< 90
SN „DBF“ ↔ „DBT“	< 90	< 90	< 90	99	99	< 90	< 90
mischkontaminierte Ansätze:							
SN CAR ↔ DBF in „MIX“	< 90	< 90	98	99	< 90	99	< 90
SN DBF ↔ FLU in „MIX“	< 90	< 90	99	99	98	99	< 90
SN FLU ↔ DBT in „MIX“	< 90	< 90	90	99	99	99	99

Tab 45: Konzentrationen an PAK- und Hetero-PAK-Metaboliten in den verschiedenen Bodensystemen [mg/kg] (n = 1)

Ansatz	0. Tag	7. Tag	14. Tag	28. Tag	42. Tag	61. Tag	82. Tag
9-Fluorenon							
„FLU“	n.n.	3,1	5,4	0,5	0,4	0,4	n.n.
„MIX“	n.n.	1,7	2,9	3,1	3,1	2,1	2,2
Dibenzothiophensulfoxid							
„DBT“	n.n.	0,5	0,9	3,2	1,0	0,2	n.n.
„MIX“	n.n.	0,3	8,8	24,4	23,2	10,5	0,7
Dibenzothiophensulfon							
„DBT“	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
„MIX“	n.n.	n.n.	n.n.	0,5	0,4	0,2	n.n.

n.n.: nicht nachweisbar

9.9 UV- und MSD-Spektren identifizierter Metaboliten

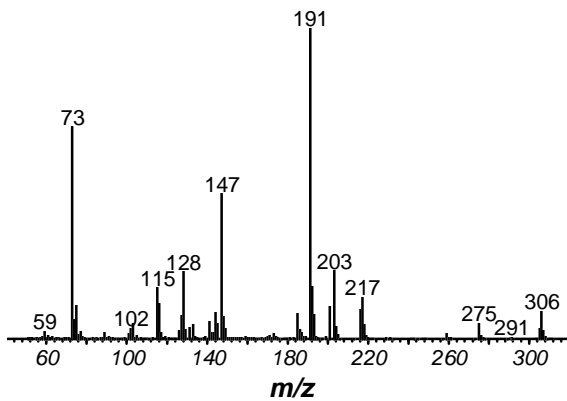


Abb. 28: MSD-Spektrum (TMS-Derivat) von Dihydroxydihydronaphthalin

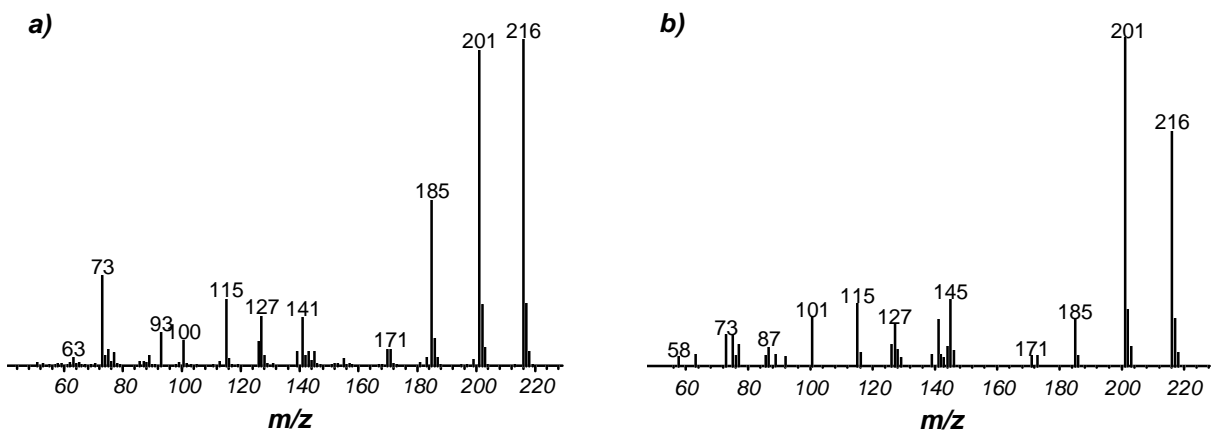


Abb. 29: MSD-Spektren (TMS-Derivate) von **a) 1-Hydroxynaphthalin** und **b) 2-Hydroxynaphthalin**

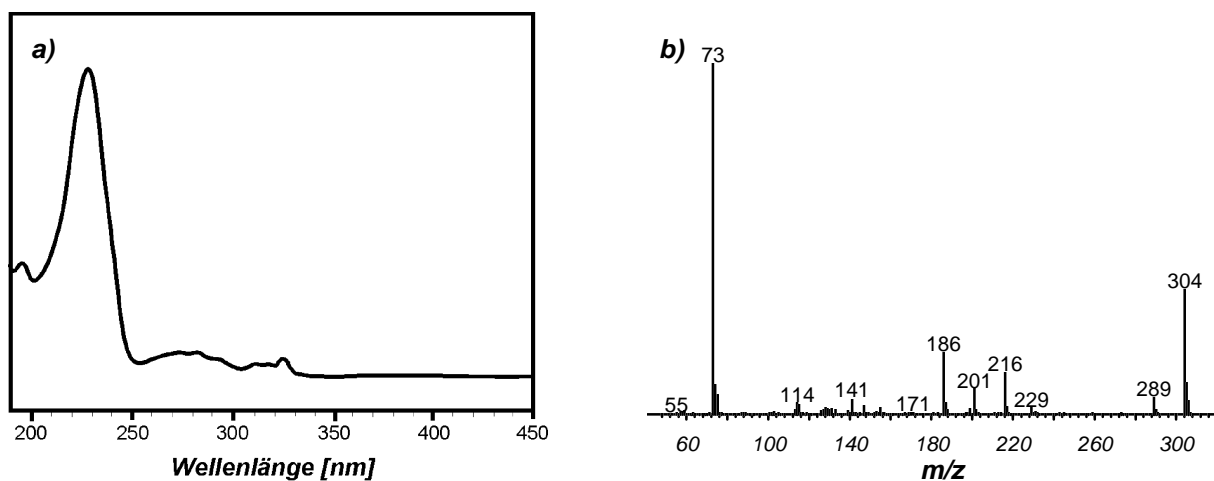


Abb. 30: **a)** UV- und **b)** MSD-Spektrum (TMS-Derivat) von 2,3-Dihydroxynaphthalin

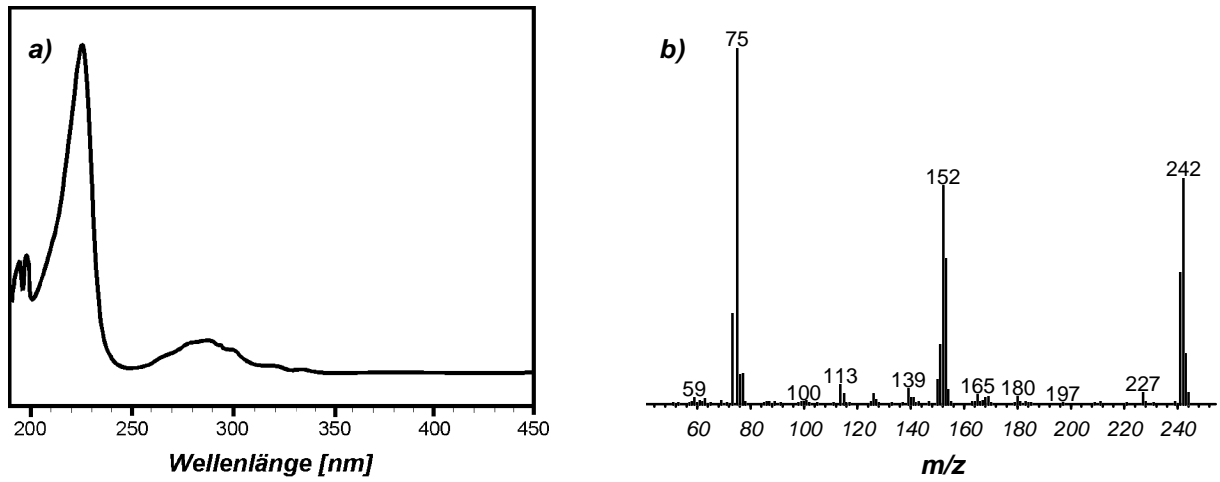


Abb. 31: a) UV- und b) MSD-Spektrum (TMS-Derivat) von 1-Hydroxyacenaphthen

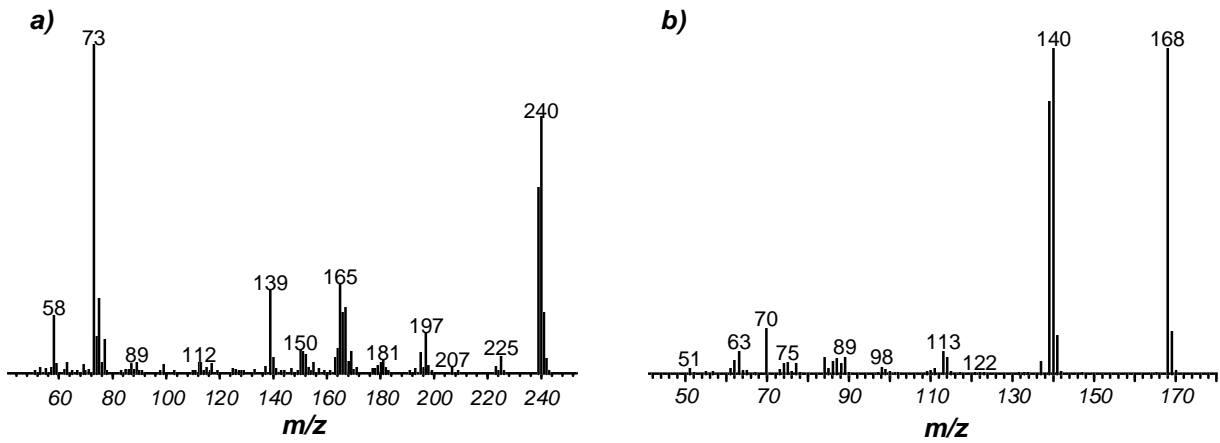


Abb. 32: MSD-Spektren von a) Hydroxyacenaphthylen (TMS-Derivat) und b) 1-Acenaphthenon

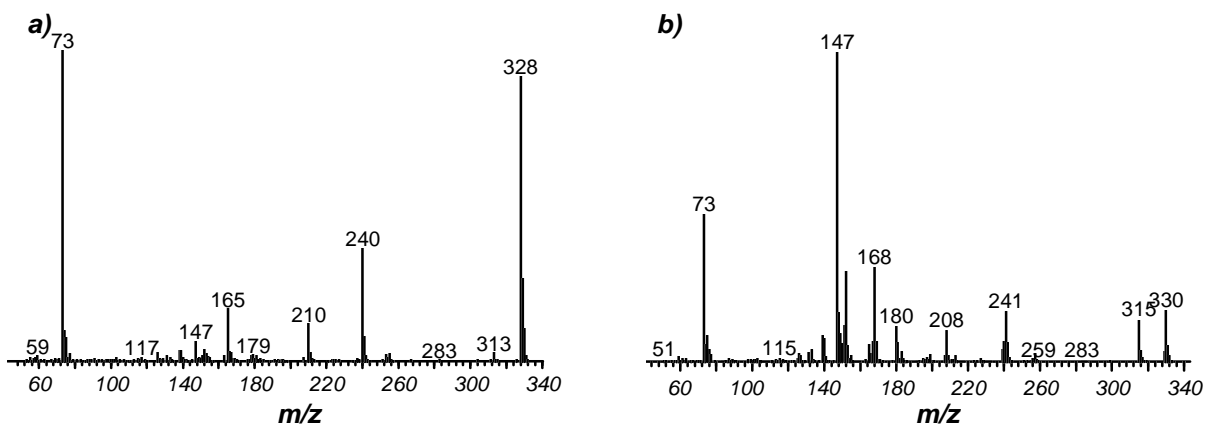


Abb. 33: MSD-Spektren (TMS-Derivate) von a) Dihydroxyacenaphthylen und b) Dihydroxyacenaphthen

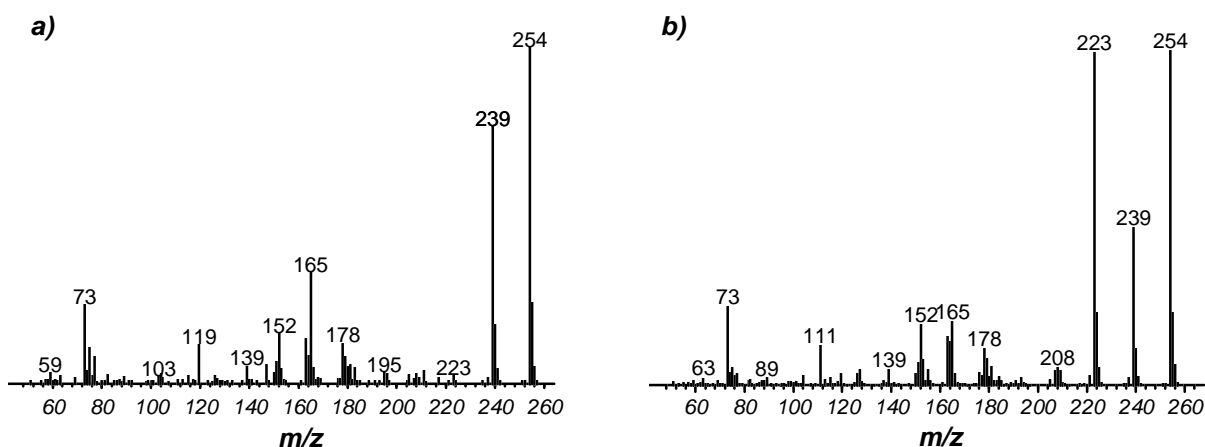


Abb. 34: MSD-Spektren (TMS-Derivate) von **a)** 2-Hydroxyfluoren und **b)** Hydroxyfluoren

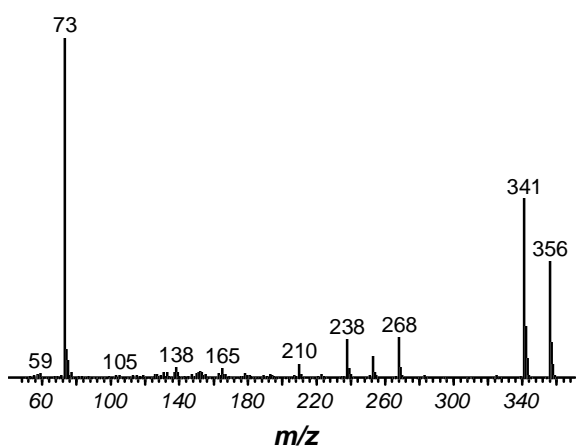


Abb. 35: MSD-Spektrum (TMS-Derivat) von Dihydroxyfluoren

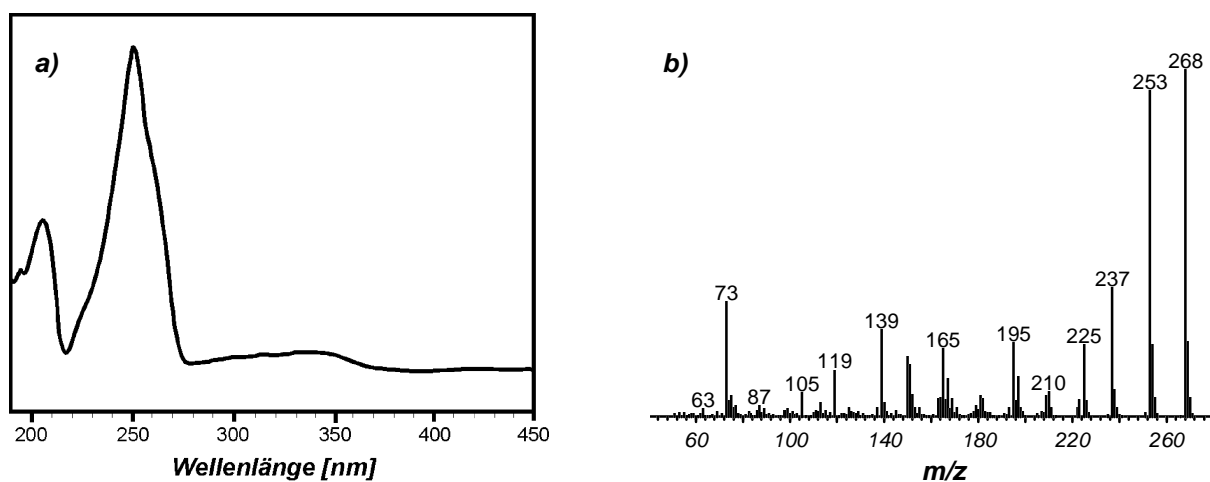


Abb. 36: **a)** UV- und **b)** MSD-Spektrum (TMS-Derivat) von 4-Hydroxy-9-fluoren

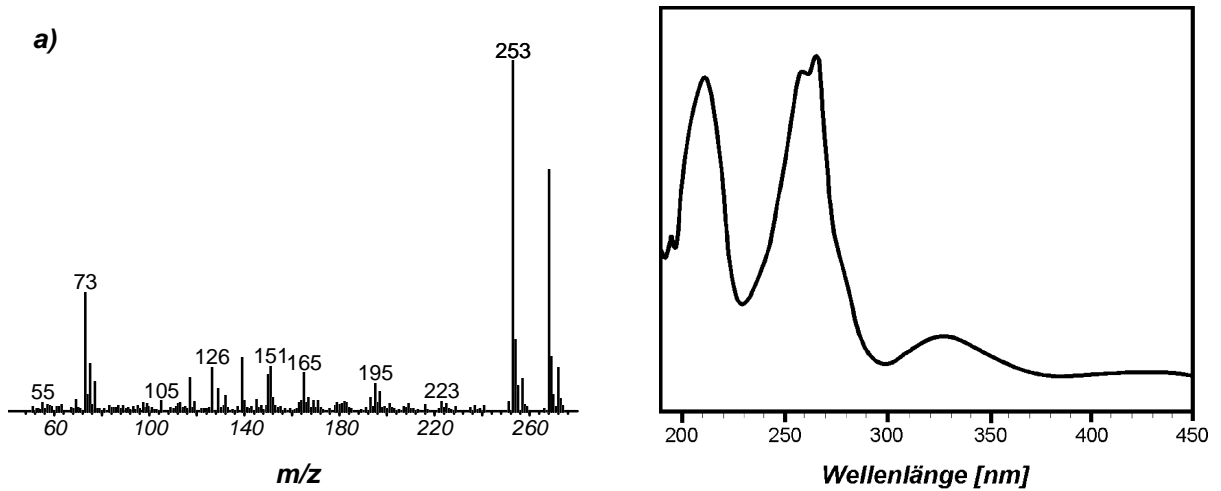


Abb. 37: a) MSD-Spektrum (TMS-Derivat) von Hydroxy-9-fluorenol und b) UV-Spektrum von 9,10-Phenanthrenchinon

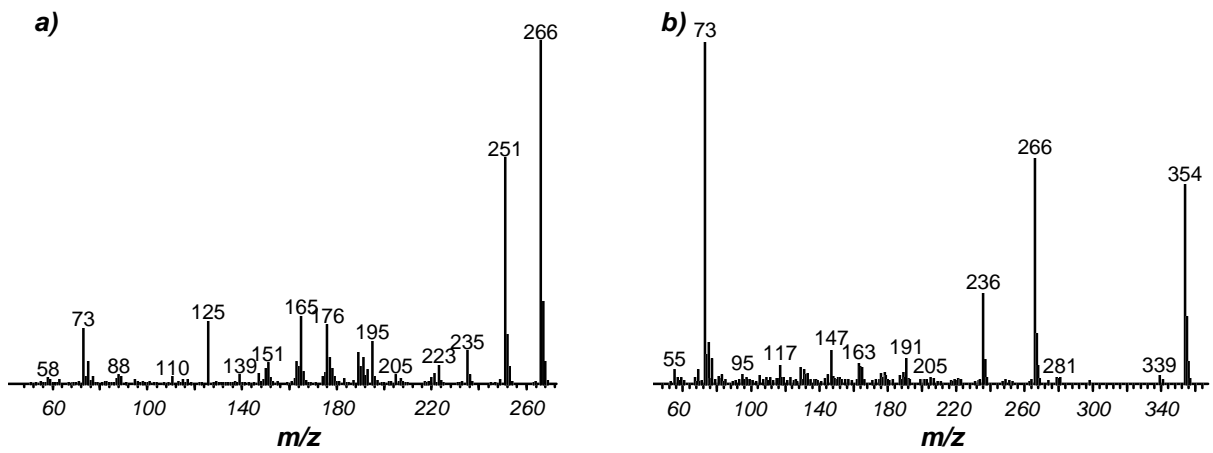


Abb. 38: MSD-Spektren (TMS-Derivate) von a) Hydroxyphenanthren o. -anthracen und b) Dihydroxyphenanthren o. -anthracen

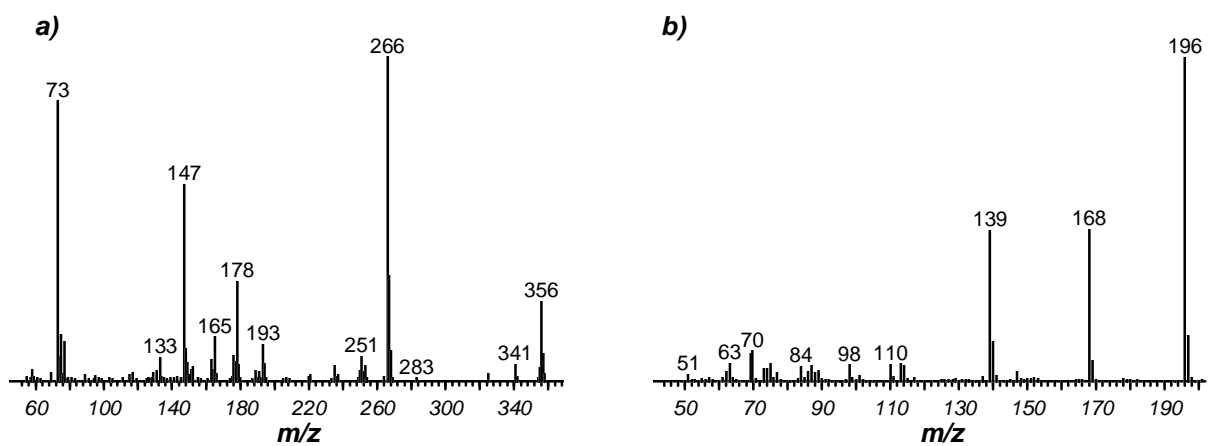


Abb. 39: MSD-Spektren (TMS-Derivate) von a) Dihydroxydihydrophenanthren o. -anthracen und b) Benzocumarin

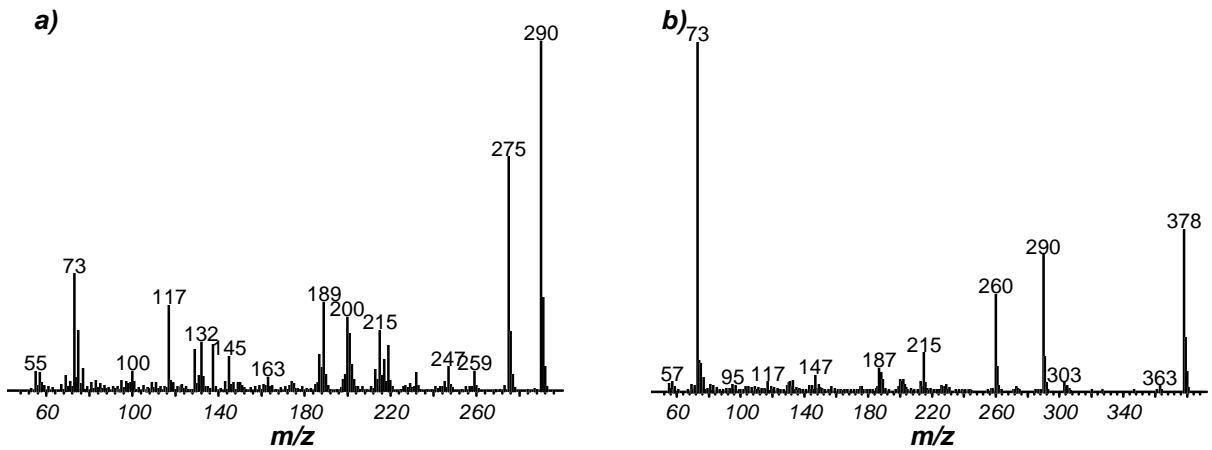


Abb. 40: MSD-Spektren (TMS-Derivate) von **a)** Hydroxyfluoranthen o. -pyren und **b)** Dihydroxyfluoranthen o. -pyren

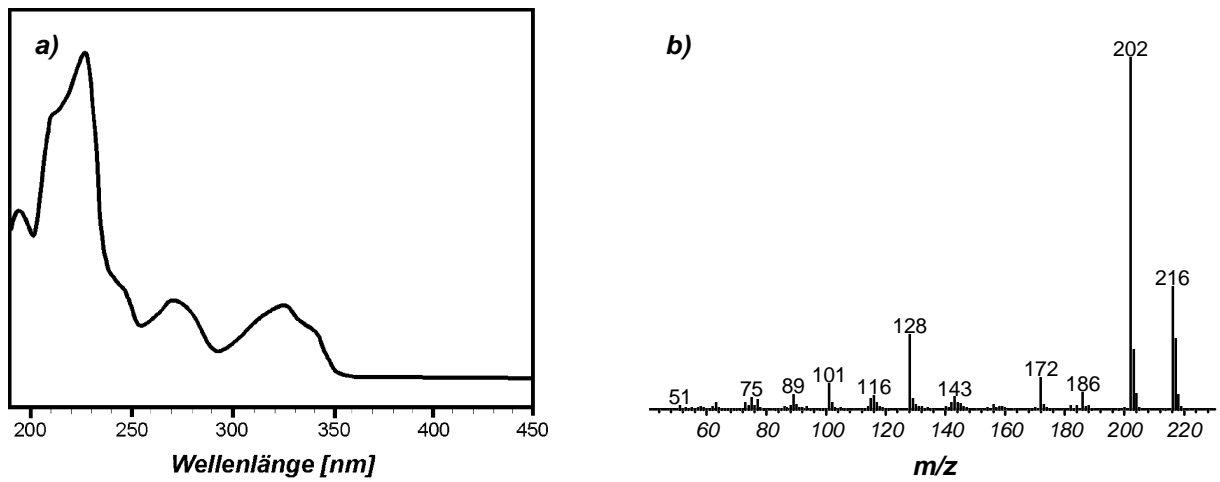


Abb. 41: **a)** UV- und **b)** MSD-Spektrum (TMS-Derivat) von 2-Hydroxychinolin

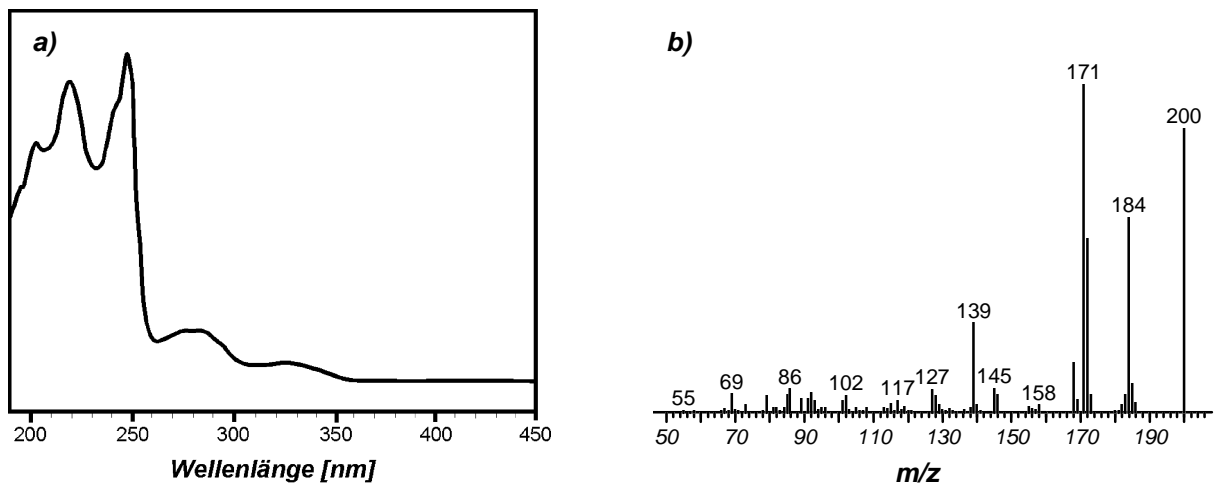


Abb. 42: **a)** UV- und **b)** MSD-Spektrum von Dibenzothiophensulfoxid

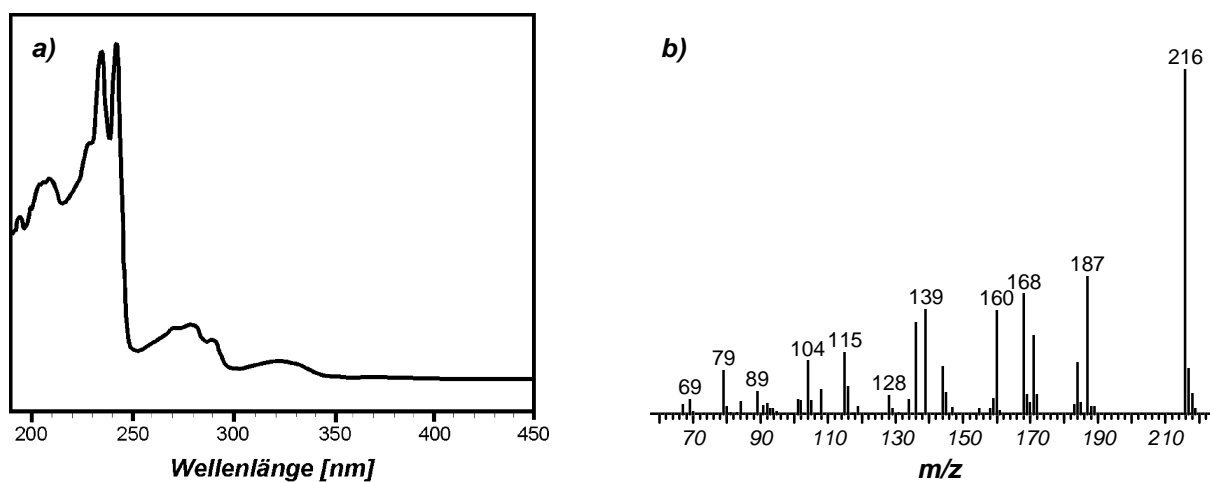


Abb. 43: a) UV- und b) MSD-Spektrum von Dibenzothiophensulfon

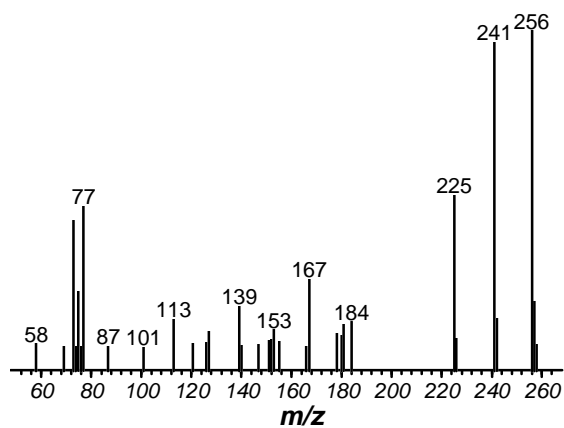


Abb. 44: MSD-Spektrum (TMS-Derivat) von Hydroxydibenzofuran

10 Literaturverzeichnis

Aamot, E., Krane, J., Steinnes, E. (1987): Determination of trace amounts of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **328**, 569-571.

Adams, J., Glam, C.-S. (1984): Polynuclear azaarenes in wood preservative wastewater, *Environ. Sci. Technol.* **18**, 391-394.

Ahlf, W. (1995): Ökotoxikologische Sedimentbewertung, *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.* **7**, 94-91.

Ahlf, W. (1998): Persönliche Mitteilung.

Alvarez, P.J.J., Vogel, T.M. (1991): Substrate interactions of benzene, toluene, and *para*-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries, *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2981-2985.

Andersson, B.E., Henrysson, T. (1996): Accumulation and degradation of dead-end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white-rot fungi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 647-652.

Andersson, J.T. (1992): Polycyclic aromatic sulfur heterocycles. I. Use of hydrogen peroxide oxidation for the group separation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their sulfur analogs, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **48**, 1-15.

Andersson, J.T., Schmid, B. (1995): Polycyclic aromatic heterocycles IV. Determination of polycyclic aromatic compounds in a shale oil with the atomic emission detector, *J. Chromatogr. A* **693**, 325-338.

Arcangeli, J.-P., Arvin, E. (1995): Biodegradation rates of aromatic contaminants in biofilm reactors, *Wat. Sci. Technol.* **31**, 117-128.

Belkin, S., Stieber, M., Tiehm, A., Frimmel, F.H., Abeliovich, A., Werner, P., Ulitzur, S. (1994): Toxicity and genotoxicity enhancement during polycyclic aromatic hydrocarbons' biodegradation, *Environ. Toxicol. Water Qual.* **9**, 303-309.

Berthou, F., Vignier, V. (1986): Analysis and fate of dibenzothiophene derivatives in the marine environment, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **27**, 81-96.

- Bisa, B. (1991):** Der Leuchtbakterientest als Beurteilung der Bioverfügbarkeit von Schadstoffen in Böden: Sinnvolle Ergänzung, *ENTSORGA-Magazin*, 95-98.
- Blumer, M. (1976):** Polycyclic aromatic compounds in nature, *Sci. Amer.* **234**, 35-45.
- Bodzek, D., Tyrpien, K., Warzecha, L. (1993):** Identification of oxygen derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulate matter of Upper Silesia (Poland), *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **52**, 75-85.
- Bollag, J.-M., Myers, C.J., Minard, R.D. (1992):** Biological and chemical interactions of pesticides with soil organic matter, *Sci. Total Environ.* **123/124**, 205-217.
- Bos, R.P., Hulshof, C.T.J., Theuws, J.L.G., Henderson, P.T. (1983):** Mutagenicity of creosote in the Salmonella/microsome assay, *Mutat. Res.* **119**, 21-25.
- Bossert, I.D., Bartha, R. (1986):** Structure-biodegradability relationships of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **37**, 490-495.
- Bouchez, M., Blanchet, D., Vandecasteele, J.-P. (1995):** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined associations: inhibition phenomena and cometabolism, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 156-164.
- Boyd, E.M., Meharg, A.A., Wright, J., Killham, K. (1997):** Assessment of toxicological interactions of benzene and its primary degradation products (catechol and phenol) using a *lux*-modified bacterial bioassay, *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 849-856.
- Brumley, W.C., Brownrigg C.M., Brilis, G.M. (1991):** Characterization of nitrogen-containing aromatic compounds in soil and sediment by capillary gas chromatography-mass spectrometry after fractionation, *J. Chromatogr.* **558**, 223-233.
- Bryniok, D., Schuster, E., Eckardt, H., Kratz, W. (1996):** Positionspapier des ITVA, FuE-Bedarf im Bereich Biologische Verfahren, *Altlasten Spektrum*, 148-151.
- Bundes-Bodenschutzgesetz (1998):** Gesetz zum Schutz vor schädlichen Bodenveränderungen und zur Sanierung von Altlasten vom 17.3.1998 (BGBl. I S. 502).
- Bundt, J. (1991):** Bestimmung von Mineralölinhaltsstoffen und deren Abbauprodukten im Boden unter besonderer Berücksichtigung aromatischer Verbindungen, Dissertation aus dem Fachbereich Chemie der Universität Hamburg.

Bundt, J., Herbel, W., Steinhart, H. (1992): Determination of polycyclic aromatic sulfur heterocycles (PASHs) in diesel fuels by high performance liquid chromatography, *J. High Resol. Chromatogr.* **15**, 682-685.

Bundt, J., Herbel, W., Steinhart, H., Franke, S., Francke, W. (1991): Structure-type separation of diesel fuels by solid phase extraction and identification of the two- and three-ring aromatics by capillary GC-mass spectrometry, *J. High Resol. Chromatogr.* **14**, 91-97.

Casellas, M., Grifoll, M., Bayona, J.M., Solanas, A.M. (1997): New metabolites in the degradation of fluorene by *Arthrobacter* sp. strain F101, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 819-826.

Casillas, R.P., Crow, S.A., Heinze, T.M., Deck, J., Cerniglia, C.E. (1996): Initial oxidative and subsequent conjugative metabolites produced during the metabolism of phenanthrene by fungi, *J. Industrial Microbiol.* **16**, 205-215.

Cerniglia, C.E. (1984): Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Adv. Appl. Microbiol.* **30**, 31-71.

Cerniglia, C.E. (1992): Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Biodegradation* **3**, 351-368.

Cerniglia, C.E., Freeman, J.P., Evans, F.E. (1984): Evidence for an arene oxide-NIH shift pathway in the transformation of naphthalene to 1-naphthol by *Bacillus cereus*, *Arch. Microbiol.* **138**, 283-286.

Chang, M.-K., Voice, T.C., Criddle, C.S. (1993): Kinetics of competitive inhibition and cometabolism in biodegradation of benzene, toluene, and *p*-xylene by two *Pseudomonas* isolates, *Biotechnol. Bioeng.* **41**, 1057-1065.

Chemikalien-Verbotsverordnung (1993): Verordnung über Verbote und Beschränkungen des Inverkehrbringens gefährlicher Stoffe, Zubereitungen und Erzeugnisse nach dem Chemikaliengesetz vom 14.10.1993 (BGBl. I S. 1720).

Collin, G., Zander, M. (1985): Teer und Pech., in *Ullmanns Enzyklopädie der Technischen Chemie* (Hrsg. E. Bartholomé, E. Biekert, H. Hellmann, H. Ley, H. Weigert, E. Weise), Kapitel 22, 411-446, Verlag Chemie, Weinheim.

Davis, J.W., Madsen, S. (1996): Factors affecting the degradation of toluene in soil, *Chemosphere* **33**, 107-130.

DIN 38 407 - F7 (1991): Vorschlag für ein deutsches Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung: Gemeinsam erfaßbare Stoffgruppen (Gruppe F), Bestimmung von 6 polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) mittels Hochleistungs-Dünnschicht-Chromatographie.

DIN 38 407 - F8 (1995): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung: Gemeinsam erfaßbare Stoffgruppen (Gruppe F), Bestimmung von 6 polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) in Wasser mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Fluoreszenzdetektion.

DIN 38 407 - F9 (1991): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung: Gemeinsam erfaßbare Stoffgruppen (Gruppe F), Bestimmung von Benzol und einigen Derivaten mittels Gaschromatographie.

DIN 38 409 - H13 (1981): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung: Summarische Wirkungs- und Stoffkenngößen (Gruppe H), Bestimmung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) in Trinkwasser.

DIN 38 409 - H16 (1984): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung: Summarische Wirkungs- und Stoffkenngößen (Gruppe H), Bestimmung des Phenol-Index.

DIN 38 412 - L34 (1989): Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung: Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L), Bestimmung der Hemmwirkung von Abwasser auf die Lichtemission von *Photobacterium phosphoreum*.

Drushel, H.V., Sommers, A.L. (1967): Isolation and characterization of sulfur compounds in high-boiling petroleum fractions, *Anal. Chem.* **39**, 1819-1829.

Dyreborg, S., Arvin, E., Broholm, K. (1996a): The influence of creosote compounds on the aerobic degradation of toluene, *Biodegradation* **6**, 97-107.

Dyreborg, S., Arvin, E., Broholm, K. (1996b): Effects of creosote compounds on the aerobic bio-degradation of benzene, *Biodegradation* **7**, 191-201.

- Dyreborg, S., Arvin, E., Broholm, K., Christensen, J. (1996c):** Biodegradation of thiophene, benzothiophene, and benzofuran with eight different primary substrates, *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 2290-2292.
- Elmendorf, D.L., Haith, C.E., Douglas, G.S., Prince, R.C. (1994):** Relative rates of biodegradation of substituted polycyclic aromatic hydrocarbons, in *Bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbon compounds* (Hrsg. R.E. Hinchee, A. Leeson, L. Semprini, S. Kee Ong), Lewis Publishers, Boca Raton, 188-201.
- Engesser, K.H., Strubel, V., Christoglou, K., Fischer, P., Rast, H.G. (1989):** Dioxygenolytic cleavage of aryl ether bonds: 1,10-dihydro-1,10-dihydroxyfluoren-9-on, a novel arene dihydrodiol as evidence for angular dioxygenation of dibenzofuran, *FEMS Microbiol. Letters* **65**, 205-210.
- Ensley, B.D. (1984):** Microbial metabolism of condensed thiophenes, In *Microbial degradation of organic compounds* (Hrsg. D.T. Gibson), Marcel Dekker Inc., New-York, 309-317.
- Eschenbach, A., Kästner, M., Bierl, R., Schaefer, G., Mahro, B. (1994):** Evaluation of a new, effective method to extract polycyclic aromatic hydrocarbons from soil samples, *Chemosphere* **28**, 683-692.
- Eschenbach, A., Wienberg, R., Mahro, B. (1997):** Bildung und Langzeitstabilität von nicht-extrahierbaren PAK-Rückständen im Boden, *Altlasten Spektrum*, 292-297.
- Fedorak, P.M. (1990):** Microbial metabolism of organosulfur compounds in petroleum, in *Geochemistry of sulfur in fossil fuels* (Hrsg. W.L. Orr, C.M. White), Kapitel 6, American Chemical Society, Washington D.C., 93-112.
- Franck, H.G., Knop, A. (1979):** Kohleveredelung, Springer Verlag, Berlin.
- Franzius, V. (1994):** Perspectives on remediation of contaminated land in Germany, Vortrag im Rahmen des Environment & Water Group Symposium, 9. September 1994, London.
- Friocourt, M.P., Berthou, F., Picart, D. (1982):** Dibenzothiophene derivatives as organic markers of oil pollution, *Toxicol. Environ. Chem.* **5**, 205-215.
- Gala, W.R., Giesy, J.P. (1992):** Photo-induced toxicity of anthracene to the green alga, *Selenastrum capricornutum*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **23**, 316-323.

Gibson, D.T., Subramanian, V. (1984): Microbial degradation of aromatic hydrocarbons, In *Microbial degradation of organic compounds* (Hrsg. D.T. Gibson), Marcel Dekker Inc., New-York, 181-252.

Grifoll, M., Casellas, M., Bayona, J.M., Solanas, A.M. (1992): Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium: Identification of ring oxidation and ring fission products, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2910-2917.

Grifoll, M., Selifonov, S.A., Chapman, P.J. (1995): Transformation of substituted fluorenes and fluorene analogs by *Pseudomonas* sp. strain F274, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3490-3493.

Grimmer, G. (1983): Entwicklung eines Verfahrens zur Profilanalyse von basischen stickstoffhaltigen polyzyklischen aromatischen Verbindungen in Mineralölprodukten, *Bericht zum DGMK-Projekt 325*.

Grimmer, G., Brune, H., Dettbarn, G., Jacob, J., Misfeld, J., Mohr, U., Naujack, K.-W., Timm, J., Wenzel-Hartung, R. (1991): Relevance of polycyclic aromatic hydrocarbons as environmental carcinogens, *Fresenius J. Anal. Chem.* **339**, 791-795.

Grimmer, G., Jacob, J., Naujack, K.-W. (1983): Profile of the polycyclic aromatic compounds from crude oils, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **314**, 29-36.

Grosser, R.J., Warshawsky, D., Vestal, J.R. (1991): Indigenous and enhanced mineralization of pyrene, benzo[a]pyrene, and carbazole in soils, *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3462-3469.

Grosser, R.J., Warshawsky, D., Vestal, J.R. (1995): Mineralization of polycyclic and N-heterocyclic aromatic compounds in hydrocarbon contaminated soils, *Environ. Toxicol. Chem.* **14**, 375-382.

Gundlach, E.R., Boehm, P.D., Marchand, M., Atlas, R.M., Ward, D.M., Wolfe, D.A. (1983): The fate of *Amoco Cadiz* oil, *Science* **221**, 122-129.

Gunkel, J., Rönnpagel, K., Ahlf, W. (1993): Eignung mikrobieller Biotests für gebundene Schadstoffe, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **21**, 215-220.

- Hammel, K.E., Gai, W.Z., Green, B., Moen, M.A. (1992):** Oxidative degradation of phenanthrene by the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1832-1838.
- Hartmann, R. (1996):** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in forest soils: Critical evaluation of a new analytical procedure, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **62**, 161-173.
- Harvey, R.G. (1991):** Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry and carcinogenicity, Cambridge University Press, Cambridge.
- Hauser, B., Schrader, G., Bahadir, M. (1997):** Comparison of acute toxicity and genotoxic concentrations of single compounds and waste elutriates using Microtox/Mutatox test system, *Ecotoxicol. Environ. Safety* **38**, 227-231.
- Ho, K.T.Y., Quinn, J.G. (1993):** Physical and chemical parameters of sediment extraction and fractionation that influence toxicity, as evaluated by Microtox[®], *Environ. Toxicol. Chem.* **12**, 615-625.
- Hosler, K.R., Bulman, T.L., Booth, R.M. (1992):** The persistence and fate of aromatic constituents of heavy oil production waste during landfarming, in *Hydrocarbon contaminated soils* (Hrsg. P.T. Kostecki, E.J. Calabrese, M. Bonazountas), Band 2, Lewis Publishers, Chelsea, 591-606.
- Jacobi, A. (1995):** Forschung und Entwicklung im Bereich der biologischen Sanierung PAK-kontaminierter Böden, *Umwelt-Technik Aktuell*, 542-548.
- Jacobs, M.W., Coates, J.A., Delfino, J.J., Bitton, G., Davis, W.M., Garcia, K.L. (1993):** Comparison of sediment extract Microtox[®] toxicity with semi-volatile organic priority pollutant concentrations, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **24**, 461-468.
- Johansen, S.S., Licht, D., Arvin, E., Mosbæk, H., Hansen, A.B. (1997):** Metabolic pathways of quinoline, indole and their methylated analogs by *Desulfobacterium indolicum* (DSM 3383), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 292-300.
- Johnson, B.T., Long, E.R. (1998):** Rapid toxicity assessment of sediments from estuarine ecosystems: A new tandem in vitro testing approach, *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 1099-1106.

- Kaiser, J.-P., Feng, Y., Bollag, J.-M. (1996):** Microbial metabolism of pyridine, quinoline, acridine, and their derivatives under aerobic and anaerobic conditions, *Microbiol. Rev.* **60**, 483-498.
- Kaiser, K.L.E., Palabrica, V.S. (1991):** Photobacterium phosphoreum toxicity data index, *Water Poll. Res. J. Canada* **26**, 361-431.
- Karickhoff, S.W. (1981):** Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils, *Chemosphere* **10**, 833-846.
- Karickhoff, S.W., Brown, D.S., Scott, T.A. (1979):** Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments, *Water Res.* **13**, 241-248.
- Kästner, M., Lotter, S., Heerenklage, J., Breuer-Jammali, M., Stegmann, R., Mahro, B. (1995):** Fate of ¹⁴C-labeled anthracene and hexadecane in compost-manured soil, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 1128-1135.
- Kästner, M., Mahro, B. (1996):** Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 668-675.
- Kelley, I., Freeman, J.P., Evans, F.E., Cerniglia, C.E. (1993):** Identification of metabolites from the degradation of fluoranthene by *Mycobacterium* sp. strain PYR-1, *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 800-806.
- Klein, B. (1990):** Möglichkeiten und Grenzen der Farbkorrektur im Leuchtbakterientest mit Hilfe von Absorptions-Korrektur-Küvetten, *Z. Wasser-Abwasser-Forsch.* **23**, 70-74.
- Klimisch, H.-J., Beiss, A. (1976):** Zur Trennung N-heteropolyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen: Abtrennung durch Ionenaustauschchromatographie und Fraktionierung von Zigarettenrauchkondensat, *J. Chromatogr.* **128**, 117-124.
- Knezovich, J.P., Bishop, D.J., Kulp, T.J., Grbic-Galic, D., Dewitt, J. (1990):** Anaerobic microbial degradation of acridine and the application of remote fiber spectroscopy to monitor the transformation process, *Environ. Toxicol. Chem.* **9**, 1235-1243.
- Krengel-Rothensee, K. (1993):** PAH-Analytik von Bodenproben, *BioEngineering* **9**, 13-18.

Krone, C.A., Burrows, D.G., Brown, D.W., Robisch, P.A., Friedman, A.J., Malins, D.C. (1986): Nitrogen-containing aromatic compounds in sediments from a polluted harbor in Puget Sound, *Environ. Sci. Technol.* **20**, 1144-1150.

Kuhn, E.P., Suflita, J.M. (1989): Microbial degradation of nitrogen, oxygen, and sulfur heterocyclic compounds under anaerobic conditions: Studies with aquifer samples, *Environ. Toxicol. Chem.* **8**, 1149-1158.

Kwan, K.K., Dutka, B.J. (1990): Simple two-step sediment extraction procedure for use in genotoxicity and toxicity bioassays, *Toxicity Assess.* **5**, 395-404.

Lambert, M., Kremer, S., Sterner, O., Anke, H. (1994): Metabolism of pyrene by the basidiomycete *Crinipellis stipitaria* and identification of pyrenequinones and their hydroxylated precursors in strain JK375, *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 3597-3601.

Langbehn, A., Steinhart, H. (1994): Determination of organic acids and ketones in contaminated soils, *J. High Resol. Chromatogr.* **17**, 293-297.

Lantz, S.E., Montgomery, M.T., Schultz, W.W., Pritchard, P.H., Spargo, B.J., Mueller, J.G. (1997): Constituents of an organic wood preservative that inhibit the fluoranthene-degrading activity of *Sphingomonas paucimobilis* strain EPA505, *Environ. Sci. Technol.* **31**, 3573-3580.

Later, D.W., Lee, M.L., Bartle, K.D., Kong, R.C., Vassilaros, D.L. (1981): Chemical class separation and characterization of organic compounds in synthetic fuels, *Anal. Chem.* **53**, 1612-1620.

Later, D.W., Pelroy, R.A., Mahlum, D.D., Wright, C.W., Lee, M.L., Weimer, W.C., Wilson, B.W. (1982): Identification and comparative genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and related nitrogen-containing heteroatomic species in products from coal liquefaction processes, in *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: Formation, Metabolism, and Measurement* (Hrsg. M. Cooke, A.J. Dennis), Battelle Press, Columbus, Ohio, 771-783.

Leo, A., Hansch, C., Elkins, D. (1971): Partition coefficients and their uses, *Chem. Rev.* **71**, 525-616.

Lopez-Avila, V., Kraska, S., Flanagan, M. (1988): Mass spectrometric analysis of azaarenes in a coal tar, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **33**, 91-112.

Lümmen, P. (1988): Bakterielle Biolumineszenz: Biochemie, Physiologie und Molekulargenetik, *Forum Mikrobiologie*, 428-434.

Mackay, D. (1982): Correlation of bioconcentration factors, *Environ. Sci. Technol.* **16**, 274-278.

Mackay, D., Shiu, W.-Y (1977): Aqueous solubility of polynuclear aromatic compounds, *J. Chem. Eng. Data* **22**, 399-402.

Mahro, B., Kästner, M. (1993): Der mikrobielle Abbau polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAK) in Böden und Sedimenten: Mineralisierung, Metabolitenbildung und Entstehung gebundener Rückstände, *BioEngineering* **9**, 50-58.

Manilal, V.B., Alexander, M. (1991): Factors affecting the microbial degradation of phenanthrene in soil, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 401-405.

McConkey, B.J., Duxbury, C.L., Dixon, D.G., Greenberg, B.M. (1997): Toxicity of a PAH photooxidation product to the bacteria *Photobacterium phosphoreum* and the duckweed *Lemna gibba*: Effects of phenanthrene and its primary photoproduct phenanthrenequinone, *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 892-899.

Means, J.C., Wood, S.G., Hassett, J.J., Banwart, W.L. (1980): Sorption of polynuclear aromatic hydrocarbons by sediment and soils, *Environ. Sci. Technol.* **14**, 1524-1528.

Millette, D., Barker, J.F., Comeau, Y., Butler, B.J., Frind, E.O., Clément, B., Samson, R. (1995): Substrate interaction during aerobic biodegradation of creosote-related compounds: A factorial batch experiment, *Environ. Sci. Technol.* **29**, 1944-1952.

Mueller, J.G., Chapman, P.J., Prichard, P.H. (1989): Creosote-contaminated sites, *Environ. Sci. Technol.* **23**, 1197-1201.

Mueller, J.G., Lantz, S.E., Blattmann, B.O., Chapman, P.J. (1991): Bench-scale evaluation of alternative biological treatment processes for the remediation of pentachlorophenol- and creosote-contaminated materials: solid-phase bio-remediation, *Environ. Sci. Technol.* **25**, 1045-1055.

Novak, J.M., Jayachandran, K., Moorman, T.B., Weber, J.B. (1995): Sorption and binding of organic compounds in soils and their relation to bioavailability, *SSSA Special Publication* **43**, 13-31.

Onuska, F.I., Terry, K.A. (1989): Identification and quantitative analysis of nitrogen-containing polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments, *J. High Resol. Chromatogr.* **12**, 362-367.

Paschke, A. (1993): Beitrag zur Untersuchung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen in Schmierölen und Mineralölatlasten, Dissertation aus dem Fachbereich Chemie der Universität Hamburg.

Paschke, A., Herbel, W., Steinhart, H., Franke, S., Francke, W. (1992): Determination of mono- to tetracyclic aromatic hydrocarbons in lubricating oil, *J. High Resol. Chromatogr.* **15**, 827-833.

Pereira, W.E., Rostad, C.E., Updegraff, D.M., Bennett, J.L. (1987): Fate and movement of azaarenes and their anaerobic biotransformation products in an aquifer contaminated by wood treatment chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.* **6**, 163-176.

Peters, C.A., Luthy, R.G. (1993): Coal tar dissolution in water-miscible solvents: Experimental evaluation, *Environ. Sci. Technol.* **27**, 2831-2843.

Pieper, D.H., Timmis, K.N., Ramos, J.L. (1996): Designing bacteria for the degradation of nitro- and chloroaromatic pollutants, *Naturwissenschaften* **83**, 201-213.

Pothuluri, J.V., Freeman, J.P., Evans, F.E., Cerniglia, C.E. (1993): Biotransformation of fluorene by the fungus *Cunninghamella elegans*, *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 1977-1980.

Preuß, S., Wittneben, D., Lorber, K.E. (1997): Microbiological degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: anthracene, benzo[k]fluoranthene, dibenzothiophene, benzo[h]quinoline and 2-nitronaphthalene, *Toxicol. Environ. Chem.* **58**, 179-195.

Pudill, R. (1992): Biolumineszenz in der Umweltanalytik, *Biotec*, 31-41.

Reiter, C., Schwedt, G. (1995): Einsatz des Biolumineszenz-Hemmtests zur Untersuchung kontaminierter Böden, *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.* **7**, 159-163.

- Ren, L., Huang, X.-D., McConkey, B.J., Dixon, G., Greenberg, B.M. (1994):** Photo-induced toxicity of three polycyclic aromatic hydrocarbons (fluoranthene, pyrene, and naphthalene) to the duckweed *Lemna gibba* L. G-3, *Ecotoxicol. Environ. Safety* **28**, 160-171.
- Resnick, S.M., Gibson, D.T. (1996):** Regio- and stereospecific oxidation of fluorene, dibenzofuran, and dibenzothiophene by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain NCIB 9816-4, *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4073-7080.
- Rojo, F., Pieper, D.H., Engesser, K.-H., Knackmus, H.-J., Timmis, K.N. (1987):** Assemblage of ortho cleavage route for simultaneous degradation of chloro- and methylaromatics, *Science* **238**, 1395-1398.
- Rönnpapel, K., Liß, W., Ahlf, W. (1995):** Microbial bioassays to assess the toxicity of solid-associated contaminants, *Ecotoxicol. Environ. Safety* **31**, 99-103.
- Sachs, L. (1997):** Angewandte Statistik: Anwendung statistischer Methoden, 8. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Sanden, J., Freier, K. (1998):** The german federal soil conservation act - Encountering the challenge of soil protection and rehabilitation of contaminated sites, in *Contaminated Soil '98* (Hrsg. W. Harder, F. Arendt, I. Hart), Thomas Telford Publishing, London, 43-50.
- Scheibel, H.-J., Harborth, P., Lang, E., Hanert, H.H. (1991):** Einsatz des Leucht-bakterien- und Daphnien-Tests zur toxikologischen Bewertung von Grundwasser- und Bodenreinigung bei der Altlastensanierung, *gwf Wasser Abwasser* **132**, 441-447.
- Schiewe, M.H., Hawk, E.G., Actor, D.I., Krahn, M.M. (1985):** Use of bacterial bioluminescence assay to assess toxicity of contaminated marine sediments, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **42**, 1244-1248.
- Schocken, M.J., Gibson, D.T. (1984):** Bacterial oxidation of the polycyclic aromatic hydrocarbons acenaphthene and acenaphthylene, *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 10-16.

Schwarz, G., Bauder, R., Speer, M., Rommel, T.O., Lingens, F. (1989): Microbial metabolism of quinoline and related compounds II. Degradation of quinoline by *Pseudomonas fluorescens* 3, *Pseudomonas putida* 86 and *Rhodococcus spec.* B1, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **370**, 1183-1189.

Schwarzenbach, R.P., Gschwend, P.M., Imboden, D.M. (1992): Environmental organic chemistry, Wiley, New York.

Selifonov, S.A., Chapman, P.J., Akkerman, S.B., Gurst, J.E., Bortiatynski, J.M., Nanny, M.A., Hatcher, P.G. (1998): Use of ¹³C nuclear magnetic resonance to assess fossil fuel biodegradation: Fate of [1-¹³C]acenaphthene in creosote polycyclic aromatic compound mixtures degraded by bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1447-1453.

Selifonov, S.A., Grifoll, M., Eaton, R.W., Chapman, P.J. (1996): Oxidation of naphthoaromatic and methyl-substituted aromatic compounds by naphthalene 1,2-dioxygenase, *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 507-514.

Seymour, D.T., Verbeek, A.G., Hrudey, S.E., Fedorak, P.M. (1997): Acute toxicity and aqueous solubility of some condensed thiophenes and their microbial metabolites, *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 658-665.

Sims, R.C., Overcash, M.R. (1983): Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil plant systems, *Residue. Rev.* **88**, 1-68.

Smith, S.C., Ainsworth, C.C., Traina, S.J., Hicks, R.J. (1992): Effects of sorption on the biodegradation of quinoline, *Soil Sci. Soc. Am. J.* **56**, 737-746.

Starke, U., Herbert, M., Einsele, G. (1995): Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) in Boden und Grundwasser, in *Bodenschutz; Ergänzbare Handbuch der Maßnahmen und Empfehlungen für Schutz, Pflege und Sanierung von Böden, Landschaft und Grundwasser* (Hrsg. D. Rosenkranz, G. Bachmann, G. Einsele, H.-M. Harreß), 19. Ergänzungslieferung, Erich-Schmidt-Verlag, Berlin.

Stringfellow, W.T., Aitken, M.D. (1995): Competitive metabolism of naphthalene, methylnaphthalenes, and fluorene by phenanthrene-degrading pseudomonads, *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 357-362.

Teeröl-Verordnung (1991): Verordnung zur Beschränkung des Herstellens, des Inverkehrbringens und der Verwendung von Teerölen zum Holzschutz vom 27.5.1991 (BGBl. I S. 1195).

Tiehm, A., Fritzsche, C. (1995): Utilization of solubilized and crystalline mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Mycobacterium* sp., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 964-968.

Traina, S.J., Onken, B.M. (1991): Cosorption of aromatic N-heterocycles and pyrene by smectites in aqueous solutions, *J. Contam. Hydrol.* **7**, 237-259.

Trinkwasserverordnung (1990): Bekanntmachung der Neufassung der Trinkwasserverordnung vom 5.12.1990 (BGBl. I S. 2612), ber. 23.1.1991 (BGBl. I S. 227) in der Fassung der Zuständigkeitsanpassungsverordnung vom 26.2.1993 (BGBl. I S. 278).

Umweltbundesamt (1997): Modellhafte Sanierung von Altlasten, Fachübergreifende Auswertung der Ergebnisse, Fortschrittsbericht 1997.

van Afferden, M., Schacht, S., Klein, J., Trüper, H.G. (1990): Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium* sp. DO, *Arch. Microbiol.* **153**, 324-328.

Weissenfels, W.D., Klewer, H.-J., Berger, F. (1993): Mikrobielle Abbaubarkeit und Biotoxizität von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) in Böden, *BioEngineering* **9**, 29-34.

Weissenfels, W.D., Klewer H.-J., Langhoff, J. (1992): Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 689-696.

Wiley 138-Massenspektrensammlung (1992): Hewlett-Packard Chem-Station Library, Palo Alto, USA.

Wilson, S.C., Jones, K.C. (1993): Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): A review, *Environ. Pollution* **81**, 229-249.

Wischmann, H. (1997): Analytik von PAK-Abbauprodukten in Bodenhorizonten und Boden/Kompost-Gemischen, Dissertation aus dem Fachbereich Chemie der Universität Hamburg.

Wischmann, H., Steinhart, H. (1997): The formation of PAH oxidation products in soils and soil/compost mixtures, *Chemosphere* **35**, 1681-1698.

Wischmann, H., Steinhart, H., Hupe, K., Montresori, G., Stegmann, R. (1996): Degradation of selected PAHs in soil/compost and identification of intermediates, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **64**, 247-255.

Wittmaier, M., Harborth, P., Hanert, H.H. (1992): Biological activity, pollutant degradation and detoxification in soil highly contaminated with tar oil, in *Soil decontamination using biological processes* (Hrsg. DECHEMA), Dechema Eigendruck, Frankfurt/Main, 611-617.

Wright, C.W., Later, D.W., Wilson, B.W. (1985): Cooperative chemical analysis of commercial creosotes and solvent refined coal-II materials by high resolution gas chromatography, *J. High Resol. Chromatogr.* **8**, 283-289.

Yalkowsky, S.H., Valvani, S.C. (1979): Solubilities and partitioning - 2. Relationship between aqueous solubility, partition coefficients and molecular surface areas of rigid aromatic hydrocarbons, *J. Chem. Eng. Data* **24**, 127-129.

Zink, G. (1995): Identifizierung von Metaboliten beim mikrobiologischen Abbau von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK), Dissertation aus dem Fachbereich 6 der Technischen Universität Berlin.

Zink, G., Lorber, K.E. (1995): Mass spectral identification of metabolites formed by microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), *Chemosphere* **31**, 4077-4084.

Lebenslauf

Name: Susanne Meyer
Adresse: Fraenkelstr. 4
D-22307 Hamburg

Geburtsdatum: 24. Juni 1970 in Bielefeld
Familienstand: ledig

Schulbildung

08/1976 - 06/1980 Grundschule in Hamburg
08/1980 - 06/1989 Gymnasium in Hamburg, Abschluß: Abitur

Studium und Praktika

10/1989 - 10/1994 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Hamburg
Abschluß: Erstes Staatsexamen und Diplom in Lebensmittelchemie
11/1994 - 10/1995 Praktikum
Dr. Kaiser und Dr. Woldmann, Handels- und Umweltschutzlabor
Chemische und Lebensmitteluntersuchungsanstalt, Hamburg
Abschluß: Zweites Staatsexamen in Lebensmittelchemie
seit 11/1995 Promotionsarbeit „Mikrobieller Abbau typischer Teeröl-PAK und Hetero-PAK (N,S,O) in einem Modellbodenhorizont“ im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 188 „Reinigung kontaminierter Böden“ am Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg
09/1999 Promotion in Lebensmittelchemie

Praktische Tätigkeiten

seit 11/1995 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hamburg