

3. ERGEBNISSE

3.1. VERFAHRENSPARAMETER DER FESTSTOFFFERMENTATION

3.1.1. Screening geeigneter Weißfäulepilze im Festphasensystem

Um geeignete Weißfäulepilze für den Einsatz in der Feststofffermentation zu ermitteln, wurden aus der Stammsammlung des Forstbotanischen Institutes verschiedene Pilze ausgesucht, die auf Strohsubstrat gutes Wachstum zeigten. Um die Variabilität innerhalb einer Art zu bestimmen, wurde die Hälfte der Pilze aus der Gattung *Pleurotus* gewählt. Diese sollten auf ihre Fähigkeit zum Abbau polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (Anthracen, Pyren, Chrysen Benz[a]pyren und Perylen) hin untersucht werden.

Das Fermentationssystem bestand aus einer Mischung von autoklaviertem Stroh und Quarzsand, der mit den PAKs belegt worden war. Zur Beurteilung der Abbaufähigkeit der Weißfäulepilze wurde die Verminderung der PAK-Ausgangskonzentrationen nach acht Wochen bestimmt. Beim Übergang vom Strohsubstrat auf die Mischung Stroh-Sand ergaben sich für 49 der 60 angesetzten Pilze keine Wachstumsbeeinträchtigungen. In das Screening wurden nur die voll durchwachsene Ansätze (+++) aufgenommen.

Ergebniszusammenfassung: Die untersuchten Substanzen wurden innerhalb von acht Wochen von den meisten Weißfäulepilzen deutlich abgebaut. Benz[a]pyren wurde aufgrund seiner toxikologischen Relevanz als Leitsubstanz verwendet. Ein sehr großer Teil der untersuchten Pilze bewirkte die Abnahme der Konzentration von Benz[a]pyren um 40 % bis 92 %, wobei sich die untersuchten *Pleurotus*-Stämme als die aktivsten Pilze erwiesen. Pyren wurde zu über 70 %, Perylen zwischen 20 % und 80 % und Chrysen bis zu 60 % abgebaut. Nur für Chrysen ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen den *Pleurotus* Stämmen. Fünf Stämme konnten diese Substanz zu über 50 % abbauen, elf Pilze bewirkten eine Reduktion auf 50-75 % und sieben Stämme zeigten keinen Abbau. Anthracen wurde von fast allen Weißfäulepilzen zu über 95 % abgebaut. Die generelle Reihenfolge des relativen Abbaus der eingesetzten PAKs war damit:

Anthracen > Pyren > Benz[a]pyren > Perylen > Chrysen.

Einzelergebnisse: Im Anhang sind die Abbaudaten der Pilze für die vier hochkondensierten Stoffe dargestellt. Die Pilze wurden nach ihrem Vermögen geordnet, das karzinogene Benz[a]pyren abzubauen (Anhang, A8 Abbildung 3). In den weiteren Abbildungen 4 bis 6 (A9-A11) im Anhang ist die Reihenfolge der Pilze beim Benz[a]pyrenabbau zur besseren Orientierung beibehalten. Die einzelnen Stämme wiesen für die fünf untersuchten Substanzen ein unterschiedliches Abbauverhalten auf. Die nach dem Abbau von

Benz[a]pyren geordnete Pilzliste läßt für Pyren und Perylen eine ähnliche Abfolge der Restgehalte erkennen, während Chrysen auch durch solche Pilze abgebaut wurde, die eher zu den schlechteren Benz[a]pyren-Abbauern gehörten, so z. B. *Chrysosporium purinosum*.

Alle *Pleurotus*-Stämme zeigten einen gleich hohen Abbau von Benz[a]pyren. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen der Unterart *P. ostreatus* ssp. *florida* waren größer als die Unterschiede zwischen den übrigen Arten. *Polyporus melanopus*, *Tyromyces caesius*, *Oudemansiella radicata*, *Trametes versicolor*, *Fomes fomentarius*, ein *Phanerochaete chrysosporium*-Stamm, *Kuehneromyces mutabilis*, sowie *Ganoderma weberianum* erzielten mit den *Pleurotus* Stämmen vergleichbare Abbauergebnisse.

Keine signifikante Abbauleistung zeigten vier von fünf untersuchten Stämmen des Weißfäulepilzes *Phanerochaete chrysosporium*, sowie *Merulius tremellosus*, *Chrysosporium purinosum*, *Ganoderma applanatum* und *Crucibulum laeve*.

Für Pyren war bei allen *Pleurotus*-Stämmen ein Abbau von über 70-95 % feststellbar. Andere Weißfäulepilze waren gleichermaßen zum Abbau befähigt, so vor allem *Tyromyces caesius*, *Trametes versicolor*, *Ganoderma weberianum*, *Oudemansiella radicata*, zwei *Polyporus*-Arten sowie *Phanerochaete chrysosporium* Stamm 31675, die alle eine Reduktion der Pyrenkonzentration unter 20 % der Kontrollkonzentration erzielten.

Chrysen erwies sich im Vergleich zu den anderen PAKs als besonders persistent. Von allen 49 untersuchten Weißfäulepilzen waren nur 9 Pilze (18 %) in der Lage, Chrysen zu über 50 % abzubauen. Dagegen konnten 37 % der Pilze die Konzentration von Chrysen nicht signifikant reduzieren.

Die sich sonst ähnlich verhaltenden *Pleurotus*-Stämme differierten stark in ihrem Abbauverhalten gegenüber Chrysen. Nur in den Ansätzen mit *P. cornucopiae*, *P. spec. P X1*, *P. sajor-caju*, *P. eryngii cardoncello* und *P. spec. Z 10* konnte eine Abnahme von über 50 % der Kontrollkonzentration festgestellt werden. Der maximale Abbau von Chrysen durch *P. cornucopiae* betrug 60 %. Dieser Pilz wurde auch in einem Screening auf Ligninabbau neben *Pleurotus ostreatus* als der Weißfäulepilz mit den höchsten Mineralisationsraten beschrieben (AGOSIN et al. 1985). Im Vergleich der übrigen Weißfäulepilze waren es wiederum die beiden *Polyporus*-Arten, *Oudemansiella radicata*, *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, sowie *Kuehneromyces mutabilis*, die Chrysen teilweise abzubauen vermochten.

Der Abbau von Perylen ähnelte in der Abfolge der Pilze dem von Benz[a]pyren. Dabei zeigten die *Pleurotus* Stämme in ihrer Abbaufähigkeit ebenfalls Unterschiede; es konnte aber nur ein maximaler Abbau von 72 % erreicht werden.

Es gab einige Pilze, die unter den gewählten Bedingungen kaum Transformationen der vier höher kondensierten PAKs bewirkten, so die Mehrzahl der Linien des Weißfäuleerregers

Phanerochaete chrysosporium. Der Pilz war in das Screening aufgenommen worden, um Vergleichbarkeit mit Literaturdaten zu erhalten, obwohl sein Wachstum auf Stroh schlechter als das der übrigen Stämme war. Auf dem Stroh-Sand-Gemisch wuchs der Pilz mit dünnem Mycel und ließ die Matrix über den ganzen Inkubationszeitraum erkennen.

In der Regel lagen die Standardabweichung zwischen Parallelproben mit vergleichbarem Wachstum bei 5 %; später auftretende Kontaminationen (meist grün mit *Trichoderma spec.*) machten sich mit Standardabweichungen von bis zu 25 % bemerkbar (*Trametes versicolor*). Die Pilze wurden in mehreren Teilversuchen angesetzt, wobei einige Stämme mehrmals getestet wurden. Somit konnte die Reproduzierbarkeit der ermittelten Ergebnisse auch für Folgeversuche abgeschätzt werden. Dabei ergab sich grundsätzlich ein ähnliches Ergebnis, wenn auch die Standardabweichung zwischen den Ansätzen größer war als zwischen den Parallelen eines Ansatzes (z. B. *Pleurotus spec.* P 34).

Vergleiche mit anderen Untersuchungen und Auswahl der geeigneten Pilze

MORGAN et al. (1991) konnten beim Vergleich von *Trametes versicolor*, *Chrysosporium lignorum*, *Phanerochaete chrysosporium* und *Stereum hirsutum* eine Abfolge des Abbaus von Phenanthren in der Reihenfolge der obigen Aufzählung beobachten, wobei *Stereum hirsutum* gar keine Fähigkeit zum Abbau mehr zeigte. Sie konnten feststellen, daß *Trametes versicolor* im Vergleich mit *Phanerochaete chrysosporium* eine deutlich höhere Mineralisierung von 3,4-Dichloranilin, Dieldrin und Phenanthren pro Mycel-Trockengewicht erreichte. Auch dieser Pilzvergleich zeigte, daß *Trametes versicolor* nach *Pleurotus ostreatus* gleichfalls die stärkste Abnahme der untersuchten Substanzen bewirkte. Eine Besonderheit dieses Pilzes war die Ausbildung von Abgrenzungen zwischen myceldurchwachsenem Material und pilzarmem Material nach zwei Wochen in Form einer Grenzhaut-Bildung (siehe auch HOLT et al. 1983). Kontaminationen traten teilweise in schwach bewachsenen Bereichen auf und führten zu erhöhten Standardabweichungen.

Ein weiterer Pilz dieses Screenings mit hohem Benz[a]pyrenabbau war *Oudemansiella radicata*. Dies entspricht Ergebnissen, die BRAUN-LÜLLEMANN (1989) bei Vergleich des Abbaus von flüchtigen Aromaten durch verschiedene Weißfäulepilze erzielte und wobei *Oudemansiella radicata* den höchsten Umsatz gezeigt hatte.

Als lignolytisch hochaktiv erwies sich die Gattung *Pleurotus*, speziell die Arten *Pleurotus ostreatus* und *Pleurotus cornucopiae*, auch bei den Pilzvergleichen auf Ligninabbau (AGOSIN et al. 1985, TROJANOWSKI & HÜTTERMANN 1987, PLATT et al. 1984). Darüber hinaus ist die Ausprägung des lignolytischen Enzymsystems nicht durch Stickstoffmangelbedingungen gesteuert, wie es für *Phanerochaete chrysosporium* bekannt ist (LEATHAM & KIRK 1983). Auf Grund dieser Vergleiche und der Ergebnisse des vorliegenden Screenings wurden die Versuche im Festphasensystem in erster Linie mit der Gattung *Pleurotus* speziell der Art *Pleurotus ostreatus* ssp. *florida* F6 durchgeführt. In einigen Versuchen wurde *Trametes versicolor* L12 und *Phanerochaete chrysosporium* Stamm 31675 verwendet.

3.1.2. Substratzusammensetzung bei der Verwendung von Holzspänen

Für den Einsatz von Weißfäulepilzen in Böden erwies sich die Benutzung von Weizenstroh als Substrat nur bedingt geeignet. Zwar konnten einige Böden nach Untermischung von Pilz-inkubiertem Stroh von dem Weißfäulepilz *Pleurotus ostreatus* gut durchwachsen werden (s.a. LOSKE, 1991), Stroh wird jedoch in schweren Böden bei den Homogenisierungsprozessen zu stark von schluffigen und tonigen Partikeln umlagert, so daß das gesamte Material verklumpt und kein gutes Wachstum mehr möglich ist. Dagegen erwiesen sich Holzspäne bzw. Holzchips mit einer Größe von bis zu 2 cm als geeignetes Substrat, zudem konnte damit eine lockere Struktur und damit verbunden eine gute Sauerstoffversorgung erhalten werden.

Nach Vorversuchen, die nur geringes Wachstum der Pilze *Pleurotus ostreatus* ssp. *florida*, *Pleurotus* spec. G241, *Trametes versicolor* und *Oudemansiella radicata* in der Kombination Boden-Holz zeigten, ergab sich die Notwendigkeit der Zugabe von Begleitstoffen. Es wurde daher im folgenden untersucht, unter welchen Bedingungen der intensiv wüchsige Weißfäulepilz *Pleurotus ostreatus* ssp. *florida* ein Lehmboden(BodenA)-Holzspänegemisch optimal zu durchwachsen vermag.

In Vorversuchen wurde beobachtet, daß in Wasser eingeweichte Holzchips keine ausreichende Substratgrundlage für den Weißfäulepilze *Pleurotus ostreatus* boten, um die Matrix ähnlich schnell wie auf Stroh zu durchwachsen. Dazu war die Zugabe von Hilfsstoffen mit höheren Gehalten an leichter verwertbaren Kohlenhydraten notwendig.

Der Pilz zeigte ein optimales Wachstumsverhalten nach einem Monat bei Verwendung der Zuschlagsstoffe Kartoffelpülpe, Flachs und Rapsschalen (Tabelle 9). Stabiles Wachstum konnte auch durch die Zugabe von Getreideresten und Cellulose erhalten werden, während Melasse, Stärke und Altpapierschnitzel als Zuschlagsstoffe weniger gut besiedelt wurden. Die Ansätze mit Malz- und Basidiomycetenmedium erreichten kein entsprechend starkes und stabiles Wachstum wie die mit Kartoffelpülpe, Flachs oder Rapsschalen. Die Verwendung von Getreideresten, Stärke und Altpapier erhöhte die Gefahr von Infektionen.

Im Boden wurde Flachs vom Pilz unter Bildung vieler Fruchtkörperansätze besiedelt. Der Nachteil bei der Verwendung von Flachs ist die schlechte Handhabung des faserigen Materials und, ebenso wie bei Rapsschalen, die geringe Verfügbarkeit dieser Stoffe. Daher wurden Flachs und Rapsschalen nicht für weitere Abbauprobe verwendet, sondern der Hauptteil der Versuche wegen der hervorragenden Wachstumsergebnisse unter Zugabe von Kartoffelpülpe durchgeführt.

Durch Zugabe von Kartoffelpülpe konnte das Wachstum über den Zeitraum von 12 Wochen stabil gehalten werden. Weitere Nährsalzzugaben, zur Erhöhung der Standzeit zugegeben, hatten dabei keinen Einfluß. Das Mycel des Pilzes durchdrang das gesamte Substrat und wies auch zum Ende der Inkubationsperiode keine Anzeichen von Austrocknung oder "Rückzug" auf.

Tabelle 9: Bonitierung des Wachstums von *Pleurotus ostreatus* ssp. *florida* bei Feststofffermentation von Holzspänen im Boden mit verschiedenen Zugaben. Inkubationszeit vier Wochen. Kontaminationen sind mit K angegeben, Totalkontaminationen ohne % Angabe. Keine optisch sichtbare Kontamination: o

Substratzugaben	Gefäß 1	Gefäß 2	Gefäß 3	Gefäß 4	Kontrolle
ohne Zugabe	+	+	+(+)	+	o,o
3 % Malzmedium	++	++(+)	++	++	o,o
Basidiomycetenmedium	++	+,20%K	++	+	K,o
10 % Getreidereste	++, 5-10%K	++, 5%K	+++	(+)	o,10%K
10 % Melasse	+(+)	+(+)	+(+)	++	K (weiß)
3 % Stärke	+, 20%K	+	++,5%K	+	K (rötl.)
5 % Cellulose	++	++	+	+(+)	K (grün)
10 % Altpapierschnitzel	+	20%K	(+)	40%K	40%K
5 % Flachs	+++	+++	+++	+++	o,o
5 % Rapsschalen	++	+++	+++	+++	o,o
10 % Pülpe	+++	++(+)	+++	+++	o,o
10 % Pülpe +K ₂ HPO ₄ (1%)*	+++	+++	+++	+++	o,o
10 % Pülpe + NH ₄ NO ₃ (2,5%)+	+++	+++	+++	+++	o,o
10 % Pülpe + Chitin (6%)+	+++	(+)	+++	+++	K,K
25 % Pülpe	+++!	+++!	+++!	+++	o,o

* Bei der Zugabe von Phosphor, der im Zuschlagsstoff Kartoffelpülpe in minimalen Mengen vertreten ist, wurde folgende Überlegung zugrundegelegt: Bei einem erwarteten durchschnittlichen C/P-Verhältnis bei Mikroorganismen von 20 wurde die Phosphormenge auf den C-Eintrag durch Holzspäne bezogen. Dies bedeutete die maximale Obergrenze wenn alles eingetragene C verfügbar wäre. Bei der Abschätzung wurde der C-Verlust durch Veratmung den Adsorptionseffekten des Phosphors im Boden gegenübergestellt. Es ergab sich bei einem Verhältnis der Holzspäne zu Boden von 1:10 eine Kaliumphosphatkonzentration von 1 %.

+ Die Stickstoffzugabe wurde an einem C/N Verhältnis von 10 bei Mikroorganismen und dem realen C/N-Verhältnis von Holz von ca. 100 bemessen. Es ergab sich eine Ammoniumnitratkonzentration von 2,5 %. Chitin wurde gemäß seines Chitin:N Verhältnisses von 15:1 in einer Konzentration von 6 % eingesetzt.

Bei der täglichen Beobachtung waren die Kulturen kurzzeitig dem Licht ausgesetzt. Diese geringe Beleuchtung führte vermutlich nach sieben Wochen zur Bildung von Fruchtkörperansätzen, die im Laufe der darauffolgenden Wochen den Luftraum der Begasungsgefäße ausfüllten. In einigen Fällen wurde das Substrat durch seitlich wachsende Fruchtkörper von der Glaswand abgedrängt, wodurch ein Begasungskanal entstand.

In der Literatur sind Versuche beschrieben worden, im Boden Abbauvorgänge durch Zugabe von Heu, Holz, Kleie, Borke oder Torf zu stimulieren. Es konnten dabei keine bedeutenden Unterschiede in der Mineralisierung von 3,4-Dichloranilin (1-5 %) und Benz[a]pyren (0,5-2 %) beobachtet werden, wenn auch die Zugabe von Weizenstroh die höchste Mineralisierung bewirkte (MORGAN et al. 1993). LAMAR & DIETRICH (1990) konnten im sterilisierten Boden durch die Zugabe von Torf und Holzchips ein Verschwinden der Ausgangssubstanz Pentachlorphenol, überwiegend durch Festlegung an die Matrix, bewirken. Der Einfluß von einfachen Kohlehydraten auf den Abbau von DDT durch *Phanerochaete chrysosporium* wurde von FERNANDO et al. (1989) untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß Glucose vor Fructose, Mannose, Sucrose, Mannitol und Glycerol die höchsten DDT-Mineralisierungsraten ergab. Die komplexen Kohlehydrate Cellulose und Stärke unterstützten die Mineralisierung mit 15 % deutlich mehr als die einfachen Kohlenhydrate.

3.1.3. Wachstum von *Pleurotus ostreatus* in Böden verschiedener Feuchte

Um die Feuchtetoleranz von Weißfäulepilzen in der Praxis zu ermitteln, wurden drei unterschiedliche Böden (BodenA, B und Torfhumus) mit fünf verschiedenen Wassersättigungen kombiniert und das Wachstumsverhalten von *Pleurotus ostreatus* bestimmt. Die Wassersättigungen wurden auf die Wasserhaltekapazität (WK) bezogen, gemessen aus der Aufschwemmung des Bodens und nachfolgendem 24 stündigem Leaching. Zur Erreichung optimaler Wachstumsbedingungen wurde Kartoffelpülpe zugegeben, was durch den hohen Feuchteanteil der Pülpe die Beurteilung der Bodenfeuchteverhältnisse komplizierte. Die "WK" der Kartoffelpülpe ist extrem groß, unter gleichen Bedingungen wie oben aufgeschwemmt und filtriert ergibt sich eine WK von 90-100 ml auf 100 g Frisch-Pülpe bzw. 100 ml pro 10-15 g TG. Es wurde in allen Versuchen 180 ml Wasser pro 100g Pülpe vorgelegt, das den Eintrag der trockenen Holzspäne ("WK" ca. das dreifache des TG) kompensieren sollte und damit nur ein Teil der Gesamt-Wassersättigung gedeckt. Das Mischungsverhältnis Pülpe:Boden:Holzspäne betrug 0,2:1:0,15 und den angegebenen % Wasseranteil (bezogen auf die WK und TG Boden).

Tabelle 10: Wachstum von *Pleurotus ostreatus* bei verschiedenen Ausgangsfeuchten dreier Bodentypen nach zwei und fünf Wochen Inkubation.

Bodenart: Wasserhaltekapazität:	Lehmboden 45 % des TG	Sandboden 23 % des TG	Torfhumus ca. 3 fache des TG
95 % WK 2 Wochen	(+)	(+)	+
85 % WK dto.	+	+(+)	+
75 % WK dto.	+	+(+)	++
65 % WK dto.	++	++	+(+)
50 % WK dto.	+	++	++
95 % WK 5 Wochen	-	(+)	+
85 % WK dto.	+	++	(+)/-
75 % WK dto.	+(+)	+++	(+)
65 % WK dto.	+(+)	++	+
50 % WK dto.	+(+)	++	+

Es war eine Bevorzugung des Bereiches 50-75 % der Wasserhaltekapazität zu erkennen (Tabelle 10). Das beste Wachstum mit voll umschlossener Matrix war im Sandboden nach fünf Wochen zu beobachten. Böden mit 95 % und 85 % der WK sind als zu naß anzusehen. Der Pilz entwickelte sich nicht von den als Inokulum verwendeten Hirsekörnern weg und verschwand im Laufe der Inkubationsperiode, vor allem im Fall der Ansätze mit 95%iger Wassersättigung.

3.1.4. Wachstum in 700 ml-Begasungsgefäßen

In Versuchen mit radioaktiv markierten Verbindungen war es notwendig, die Gefäße stundenweise zu begasen (2000 ml/h). Diese Begasungen erzeugte Schwankungen des Sauerstoff- und Kohlendioxidgehaltes in der Gasphase der Gefäße (Abbildung 8). Meist lagen bei durchwachsenen Ansätzen vor Begasungsbeginn Sauerstoffgehalte von 10 Vol.% vor. Im Fall der Dauerbegasung (100 ml/h) wurde nur Sauerstoffwerte >20 Vol.% ermittelt, sowie Kohlendioxidgehalte von 0,4 Vol.%. Bei der Untersuchung des Sauerstoffeinflusses auf den Abbau von Benz[a]pyren konnte KELSCHBACH (1991) zeigen, daß sowohl *Phanerochaete chrysosporium* als auch eine Reihe von *Pleurotus*-Stämmen eine suboptimale Sauerstoffkonzentration von 15 Vol.% ohne Verlust der Abbauproduktivität gegenüber Benz[a]pyren vertragen. Für einige *Pleurotus* Arten konnten auch noch im Bereich von 10 Vol.% Sauerstoff vergleichbare Benz[a]pyren-Abnahmen wie mit Luftsauerstoff erzielt werden. Es wurde daher auch im Fall der periodischen Begasung von nur leicht- bis ungehindertem Abbau ausgegangen.

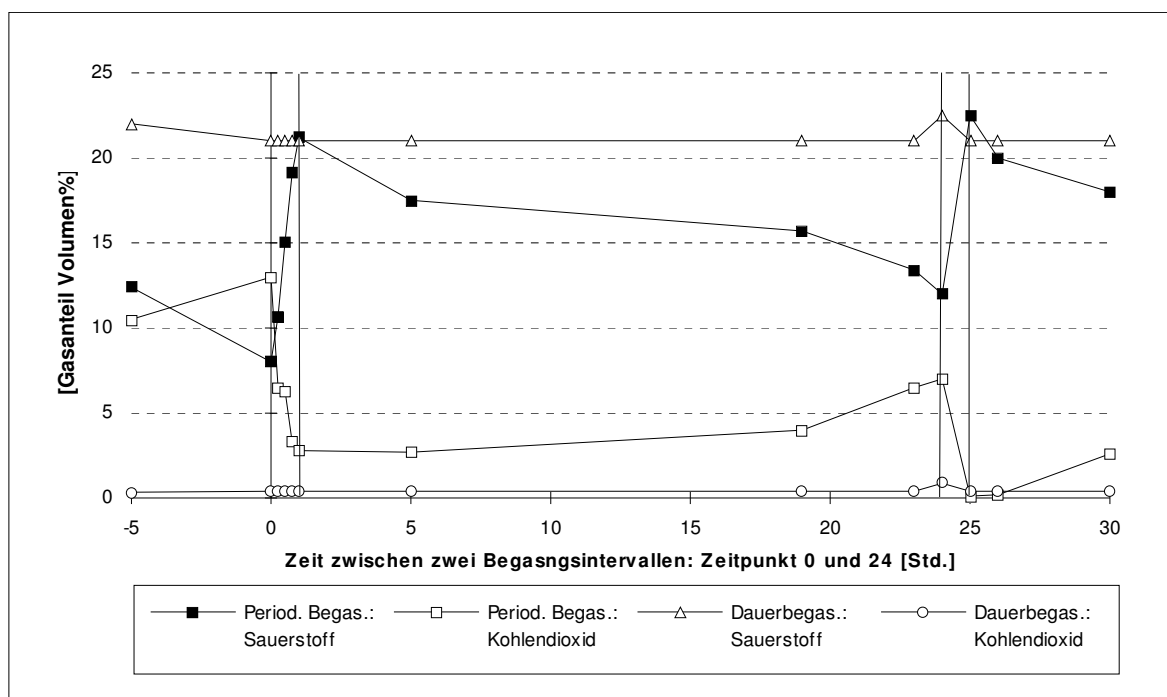


Abbildung 8: Sauerstoff und Kohlendioxid-Gehalte in den Begasungsgefäßen zwischen zwei Intervallen: Zeitpunkt 0-1 Std. und 24-25 Std.

In Bodenansätzen mit unterschiedlicher Ausgangsfeuchte wurde nach zweiwöchiger Dauerbegasung, als auch periodischer Begasung, durch Tensiometermessung (Messung durch Keramiktensiometerkerzen nach SCHEFFER-SCHACHTSCHABEL 1982) die Wasserspannung in der durchwachsenen Matrix ermittelt. Die Werte zeigten mäßige Austrocknungserscheinungen, die einer zu 65-70 % der Wasserhaltekapazität gesättigten Matrix entsprachen. Eine Angleichung verschiedener Ansatzfeuchten konnte beobachtet werden (Tabelle 11).

Tabelle 11: Wasserspannung in der Mitte der Begasungsgefäße nach 2 wöchiger Dauerbegasung.

[cm Wassersäule]	Nullwert	Nullwert + Bodenmatrixpot.
Dauerbegasung 65 % der WK Kontrolle:	- 50 cm	- 62 cm
Dauerbegasung 80 % der WK Kontrolle:	- 51 cm	- 54 cm
Dauerbegasung 65 % der WK mit Pilz :	- 53 cm	- 85 cm
Dauerbegasung 80 % der WK mit Pilz :	- 52 cm	- 87 cm
period. Begasung 65 % der WK mit Pilz:	- 53 cm	- 69 cm
period. Begasung 80 % der WK mit Pilz :	- 51 cm	- 55 cm
Vergleichsboden, sandiger Lehm lufttrocken	- 53 cm	- 640 cm
Ausgangsgemisch 50 % WK	- 53 cm	- 97 cm
Ausgangsgemisch 65 % WK	- 51 cm	- 84 cm
Ausgangsgemisch 80 % WK	- 50 cm	- 52 cm

Der allgemeine Ansatz in den Begasungsgefäßen erfolgte daher mit 80 % der WK. Die Standzeit betrug dabei zwei/drei Monate.

Die typisch gut durchwachsene Matrix mit Holzspänen bzw. mit Boden ist in Abbildung 9 zu erkennen.

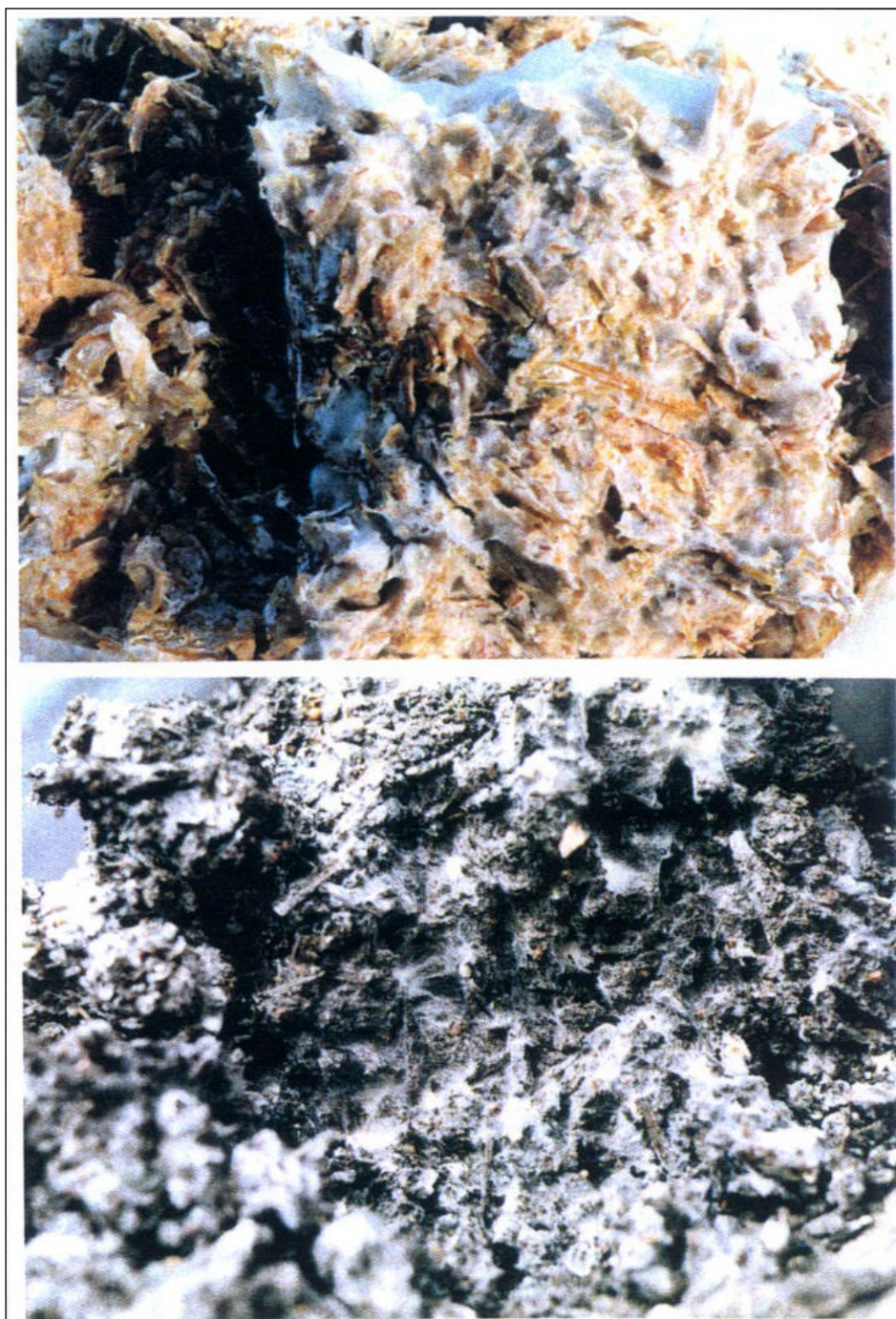


Abbildung 9:
Durchwachsene Holzspäne-Pulpe-Matrix (oben) und Holzspäne-Pulpe-Boden-Matrix (unten) nach Inkubation mit *Pleurotus ostreatus* für drei Wochen.

3.1.5. Scale-up des Wachstums von *Pleurotus ostreatus* in Böden

Durch den Einsatz eines Pflugscharmischers (Lödige, Paderborn) war es möglich, größere Substratmengen zu bearbeiten. Somit konnte untersucht werden, inwieweit die Sanierung kontaminierten Erdreiches unter realistischen Bedingungen betrieben werden kann. Da prinzipiell die Notwendigkeit besteht, sowohl zur Bilanzierung wie zum Umgebungsschutz, eine solche Sanierung mit kontrollierter Abluft durchzuführen, wurden auch in den Inkubationsversuchen sogenannte Big-Bags (Polypropylensack, 1000 l Inhalt, Anhang A30, Abbildung 27) verwendet. Die Anordnung von Zu- und Abluft sowie Sumpf entsprach dem Labormodell der Begasungsgefäße, wobei die Tonsteine durch Holzstücke bis 15 cm Länge ersetzt wurden. Diese Schicht am Boden des Big-Bags diente zudem der Verteilung der von unten einströmenden Luft. Die gute Mischung von Boden, Substrat und Pilz konnte in weniger als einer Minute erreicht werden. Auch im Fall der Flüssighomogenisierung von Boden waren die Aggregate nach 30 sec suspendiert. Das wichtigste Ergebnis dieser Mischversuche war die Beobachtung, daß während des Betriebs eine starke Temperaturerhöhung durch die Stoffwechselfvorgänge des Pilzes erfolgte. In Kontroll-Big-Bags ohne Weißfäulepilz fand eine solche Erhöhung nicht statt.

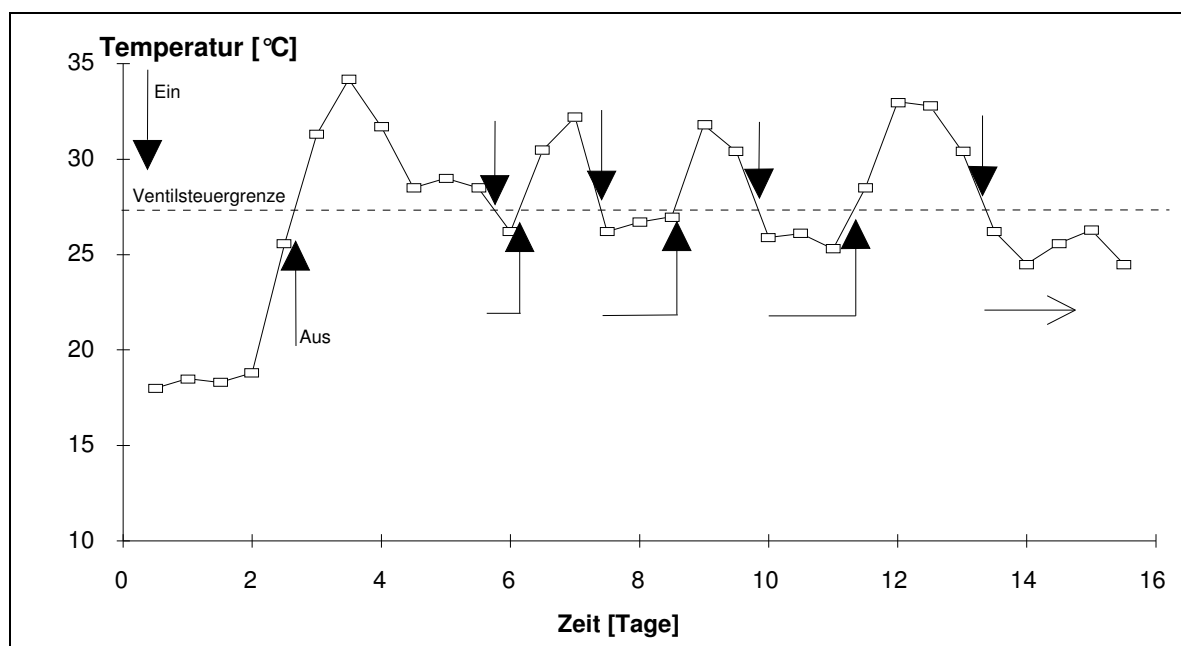


Abbildung 10: Typische Veränderung der Matrixtemperatur in der Mitte des Big-Bags durch diskontinuierliche Begasung. Mischung von Holzspänen, Pülpe und Boden (1:1:5) und Beimpfung mit *Pleurotus ostreatus* ssp. *florida* auf Hirse (3 %). Regelung der Zuluft (Preßluft) durch ein computergesteuertes Ventil, das bei einer Überschreitung der Matrixinnentemperatur von 27 °C die Zuluft blockierte und erst bei Unterschreiten dieser Temperatur diese wieder freigab. Die stündlich aufgenommenen Werte sind zwischen 500-1700 und 1700-500 Uhr gemittelt, was der Darstellung die Auflösung nimmt, aber die täglichen Temperaturschwankungen eliminiert. Der Inkubationszeitraum war der 12. bis 28. Mai.

Sowohl in den Holz-Pülpe-, wie Holz-Pülpe-Boden-Mischungen mit geringem Bodenanteil war dieser anfängliche Temperaturanstieg dermaßen ausgeprägt, daß sich der Pilz bei kontinuierlicher Begasung selbst abtötete. Es wurde daher eine Zuluftsteuerung entwickelt, durch die ein Weiterwachsen des Pilzes gesichert werden konnte (Abbildung 10). Durch Zuluftblockade ließ sich die Pilzaktivität zwar bremsen, der Sauerstoffgehalt sank aber unter 1 Vol.% ab. Dies hätte, vor allem in den ersten Wochen, die Periode des vermutlich intensivsten Abbaus, der nur bei Sauerstoffgehalten über 10 % stattfindet (KELSCHEBACH 1991), sehr stark verringert.

Es wurden daher verschiedene Mischungen mit geringerem Pülpeanteil und veränderten Boden-Holzverhältnissen angesetzt, um die Temperaturerhöhung zu vermindern.

Tabelle 12: Verschiedene Mischungsverhältnisse der Substrate in ihrer Auswirkung auf die maximale Matrixtemperatur nach dem ersten Wachstumsschub von *Pleurotus ostreatus* ssp. *florida* (>30 °C ist dabei gleichbedeutend mit Zuluftblockade, also Sauerstoffunterversorgung), sowie die Bonitierung nach zwei Wochen (2Wo). Inkubationszeitraum März-November.

Mischungsart	Temp. nach 5 Tagen	Bon. 2Wo
Holz-Pülpe 1:1 (w/w)	>30 °C	+++
Holz-Pülpe 1:0,5 (w/w)	>30 °C	+++
Holz-Pülpe 1:0,1 (w/w)	23 °C	+(+)
Holz-Pülpe-Boden 1:1: 5 (w/w)	>30 °C	++
Holz-Pülpe-Boden 1:1: 10 (w/w)	22,5 °C	+(+)
Holz-Pülpe-Boden 1:0,5: 10 (w/w)	21 °C	+

Um gutes Wachstum zu erhalten, war die Zugabe von Pülpe in einem Maße notwendig, das gleichzeitig einen Wachstumsschub und damit die Erhitzung der Packung in den ersten Wochen auslöste. Es ließ sich durch die Wahl der Mischungsverhältnisse, speziell im Fall der Holzansätze, noch kein "goldener Mittelweg" finden, der langsames aber doch dichtes Wachstum erzeugte. Zudem wurde der Boden bei zu geringer Pülpe und Holzbeimischung nicht in allen Aggregaten bewachsen.

Es wurde daher das Langzeitverhalten des Wachstums beobachtet. Dabei zeigte sich, daß die Gasversorgung der Matrix der entscheidende Parameter ist, um hohe Standzeiten, gekoppelt mit ständig durchwachsenen Aggregaten, zu erhalten. Um die Austrocknung zu verhindern, mußten die Big-Bags regelmäßig besprüht werden. Dies machte sich auf die Struktur und Gasdurchlässigkeit der Holz-Boden-Matrix unangenehm bemerkbar. Die Big-Bags zeigten in den Randbereichen, in denen sich Strömungskanäle bildeten, hervorragendes Wachstum, während im Innern der Big-Bags Zonen ohne Pilzmycel zu erkennen waren (Anhang, A30, Abbildungen 27). Durch Verwendung grober Holzspäne konnte das Verhältnis von bewachsenem zu nicht bewachsenem Material deutlich verbessert werden. Leider konnte keine weitere Optimierung betrieben werden, da uns die Apparatur nur vorübergehend zur Verfügung gestellt wurde.

3.2. ABBAU VON PAKS IN TYPISCHEN BÖDEN ALTER GASWERKSSTANDORTE

Für die Untersuchungen zum Abbau der Schadstoffe in kontaminierten Böden unter möglichst realistischen Bedingungen wurden zwei Böden verwendet. Der eine Boden entstammte einem ehemaligen Gaswerksgelände in Solingen-Ohligs. Er wurde als Modellboden gewählt, da er die für solche Standorte typischen Verunreinigungen aufwies. Zudem war dieser Boden von der Stadt Solingen in Zusammenarbeit mit dem Land Nordrhein-Westfalen als Modell ausgewählt worden, um die auf dem Markt befindlichen mikrobiologischen Sanierungsmethoden zu testen (STEILEN et al. 1991).

Desweiteren wurde ein in der Zusammensetzung der Schadstoffe wie der Bodenmatrix sehr ähnlicher Boden der Ruhrkohle AG, Essen (im folgenden auch als "RKB" abgekürzt) verwendet, von dem auch genügende Mengen vorhanden waren, um mit mehreren Ansätzen das Problem der Bioverfügbarkeit zu untersuchen.

3.2.1. Extraktabbau auf Holzspänen

Zur Überprüfung der grundsätzlichen Abbaubarkeit der in diesen Böden vorhandenen Schadstoffe durch Weißfäulepilze, wurden die PAKs durch Aceton aus dem Boden extrahiert und mit Pilzen direkt auf Holzspänen inkubiert. Diese Versuche wurden mit der Bestimmung von toxikologischen Parametern gekoppelt.

Dazu wurde der Extrakt aus 200 g Boden auf 200 g Holzspäne aufgezogen. Nach dem Verdunsten des Acetons unter regelmäßigem Wenden wurde die Verteilung der PAKs auf den Spänen bestimmt. Dazu wurden nach intensiver Mischung sieben Proben à 1 g (+/- 0,2 %) auf homogene Verteilung der PAKs überprüft. Die Konzentration der Parallelproben lag bei 113,5 mg PAK/kg TG. Die Standardabweichung der PAK-Summe betrug 1,7 %, die der Einzelsubstanzen zwischen 2 % bis max. 16 %, letzteres im Falle der gering konzentrierten Leichtsieder. Durch die Coevaporation von PAKs mit Aceton kam es zu einer Abreicherung der leichtflüchtigen PAKs, d. h. zu einer leichten Musterverschiebung hin zu den hochsiedenden PAKs.

Um wasserlösliche Störstoffe des Abbaus zu berücksichtigen, wurde der acetonextrahierte Boden mit Wasser aufgeschwemmt, geschüttelt und filtriert (Filtrat I). Der pH des ersten Filtrats lag bei pH 6,7. Um Schwermetalle zu erfassen, wurde der so gespülte Boden ein weiteres Mal mit 0,5 N Schwefelsäure aufgeschwemmt und geschüttelt. Das zweite Filtrat (II) wurde mit NaOH neutralisiert. Die PAK-belegten Späne wurden mit Kartoffelpülpe, sowie Wasser, bzw. den Filtraten I und II, im Verhältnis 1:4,5:2 gemischt, mit *Pleurotus ostreatus* auf Hirse (3 %) beimpft und bei passiver Belüftung inkubiert.

Der Versuch, die Extrakte des RKB auf Holzspänen durch *Pleurotus ostreatus* abzubauen, war erfolgreich. Schon nach elf Tagen, d. h. nach nur vier Tagen vollständiger Durch-

wachung der Matrix mit *P. ostreatus* konnte in der Analyse eines Aliquots der Spänematrix ein deutlicher Abbau von Leichtsiedern bis zu Benz[a]anthracen sowie ein Abbau von Benz[a]pyren von über 60 % beobachtet werden.

Tabelle 13: Restgehalte an PAKs (EPA Summe sowie Benz[e]pyren) nach Inkubation mit *P. ostreatus* ssp. *florida* auf kontaminierter Holzspanmatrix mit Wasser, sowie neutralem bzw. saurem Bodenwasserfiltrat des acetoneextrahierten Bodens.

	Kontrollen		Wasser		neutr. Bodenfiltrat		saures Bodenfiltrat	
11 Tage	95,0 %	± 3,0 %	71,7 %	± 23,0 %	-	-	-	-
17 Tage	98,0 %	± 5,4 %	35,8 %	± 5,9 %	30,1 %	± 2,8 %	30 %	± 2,0 %
37 Tage	89,1 %	± 4,2 %	15,7 %	± 4,4 %	20,4 %	± 4,4 %	20 %	± 1,0 %
51 Tage	86,9 %	± 13,1 %	11,0 %	± 1,9 %	18,1 %	± 7,8 %	15 %	± 2,9 %

Ein Unterschied im Abbau der gleich durchwachsenen Ansätze mit Wasser, dem neutralen und dem sauren Bodeneluat, war nicht zu erkennen. Dies zeigte, daß keine Abbau-hemmenden wasserlöslichen Substanzen (Salze, Schwermetalle) in dem Boden vorhanden waren. Über den gesamten Inkubationszeitraum von 51 Tagen nahmen die Konzentrationen der verschiedenen PAKs weiterhin ab, gleichzeitig kam es zu einer Verschiebung des Musters durch eine relative Anreicherung von Chrysen, sowie Benz[b+k]fluoranthren. Diese Substanzen überwogen charakteristischerweise (wie im Screening) nach Abbau einer PAK-Mischung durch Weißfäulepilze.

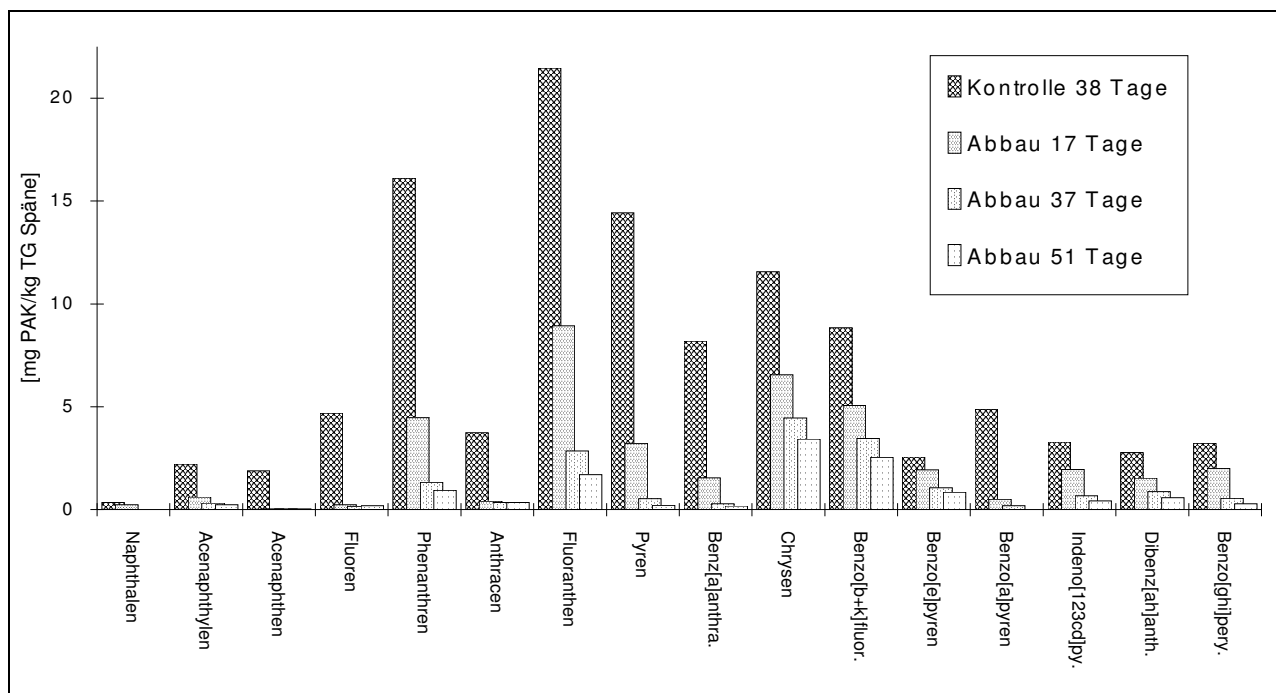


Abbildung 11: Extrakt des Ruhrkohlebodens auf Holzspänen: PAK-Restgehalte nach Inkubation mit *P. ostreatus* ssp. *florida*. Mischung der Matrix mit Pülpe und Wasser im Verhältnis 1:3:2 sowie Beimpfung mit Pilz auf Hirse (3 %).

Sowohl niederkondensierte als auch hochkondensierte PAKs wie Indeno[123cd]pyren, und Benz[ghi]perylen konnten durch den Pilz *Pleurotus ostreatus* deutlich abgebaut werden (Abbildung 11). Restgehalte über 20 % der Kontrolle zeigten die PAKs Chrysen, Benz[b+k]fluoranthren, und Dibenz[ah]anthracen, wobei Benz[e]pyren mit 34 % Restgehalt erstaunlicherweise den geringsten Abbau aufwies.

Der gleiche Abbau konnte mit PAK-Extrakten anderer Herkunft auch erhalten werden.

Im Anhang (A16) ist in Abbildung 7 eine vergleichbare Abnahme von PAKs auf Holzspänen durch die Inkubation mit *Pleurotus ostreatus* und *Trametes versicolor* dargestellt.

Tabelle 14: PAK-Abbaureihenfolge auf Spänen, bezogen auf 17 Tage Inkubation.

PAK-Abbaureihenfolge	17 Tage	51 Tage
Acenaphthen	3 %	3 %
Fluoren	5 %	4 %
Benzo[a]pyren	11 %	1 %
Anthracen	11 %	10 %
Benzo[a]anthracen	19 %	2 %
Pyren	22 %	2 %
Phenanthren	28 %	6 %
Fluoranthren	42 %	8 %
Dibenz[ah]anthracen	55 %	21 %
Chrysen	57 %	30 %
Benzo[b]fluoranthren	57 %	29 %
Indeno[123-cd]pyren	60 %	13 %
Benzo[e]pyren	71 %	34 %

3.2.2. Veränderung der Toxizität beim Abbau von PAK-Extrakten durch Weißfäulepilze

Um die Wirkung von Organismen bei biologischen Abbauvorgängen beurteilen zu können, ist neben der Untersuchung der Konzentrationen von Ausgangssubstanzen und messbaren Metaboliten ein Summenparameter für die Entwicklung der Toxizität notwendig (STIEBLER et al. 1990). Hierzu wurde auf Grund der carcinogenen Wirkung vieler PAKs ein Test auf Gentoxizität (AMES et al. 1973) und auf akute Toxizität (nach DIN 38 412) unternommen.

In Vorversuchen war festgestellt worden, daß die PAK-kontaminierten Böden, trotz der deutlichen Anteile an Benz[a]pyren, nur in stark aufkonzentrierten Extrakten mutagene Wirkung im Ames-Test zeigten. Um die Wirkung des PAK-Abbaus durch die Weißfäulepilze auf die Toxizität festzustellen, war es daher notwendig, alle Extrakte in hohem Maße zu konzentrieren. Die Proben wurden nach Inkubation mit Aceton mittels Soxhlet extrahiert und die unpolaren bis mäßig polaren Substanzen nach Aceton-Dichlormethan-Aufkonzentrierung in Dimethylsulfoxid (DMSO) überführt. Diese hochkonzentrierten Extrakte wurden für Toxizitätstests verwendet. Die dunkelrotbraune Lösung enthielt phenolische Substanzen, die acetonlöslichen Teerprodukte des Originalbodens, die PAKs, sowie die möglichen Transformationsprodukte. Die intensive Färbung dieses Extrakts nahm bei gleicher Aufarbeitungsprozedur durch die Inkubation mit *Pleurotus ostreatus* ab.

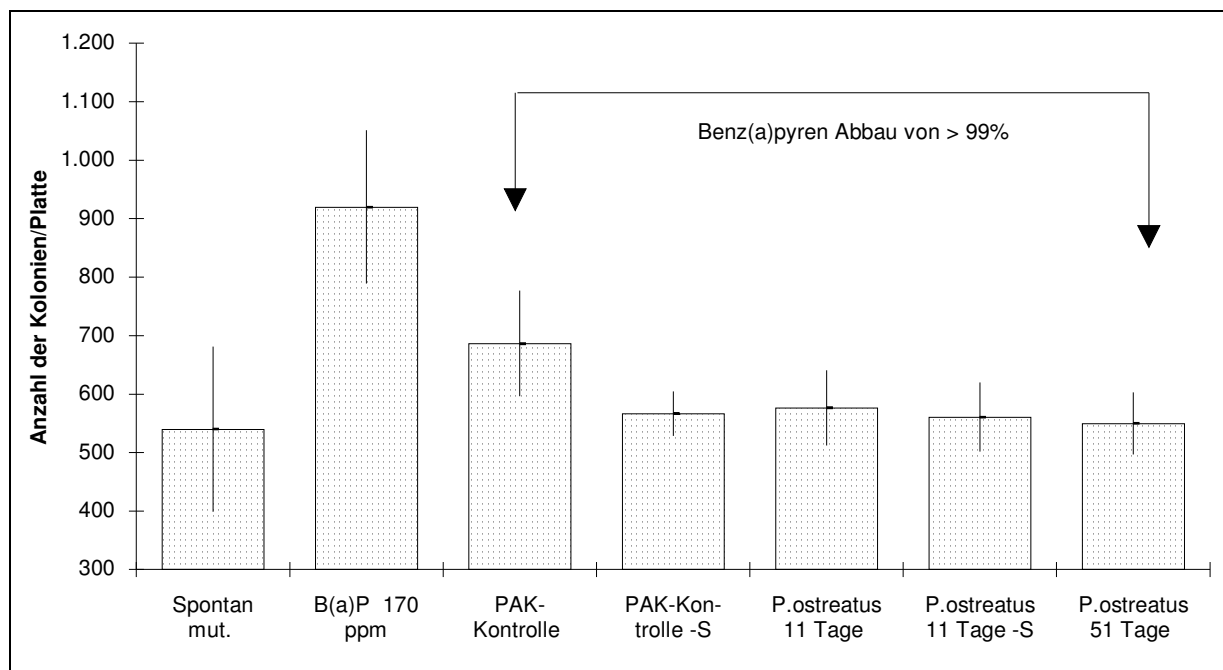


Abbildung 12: Ames-Test von konzentrierten Acetonextrakten der Kontroll- und Abbaueansätze (*Pleurotus ostreatus* ssp. *florida*) PAK-kontaminierter Holzspäne.

Der Kontrollansatz des kontaminierten Bodens ohne Pilz zeigte nach dieser Aufkonzentrierung eine leichte Erhöhung der Mutationsrate (Abbildung 12). Dagegen wiesen die Abbauextrakte weder im Fall der Ansätze mit Wasser noch der Ansätze mit neutralem bzw. saurem Filtrat eine signifikante Erhöhung der Mutationsrate auf.

Die Zugabe des Leberextrakts (SA9-Extrakt) bewirkt die Aktivierung von Procarcinogenen durch Monooxygenasen. Um feststellen zu können, ob durch das Enzymsystem des Pilzes eine ähnliche Aktivierung der Procarcinogene bewirkt wird, wurde der Test auch ohne Leberextrakt durchgeführt. Die Kontrolle zeigte dadurch die erwartete Erniedrigung der Mutagenität. Die Probe wies dagegen sowohl mit als auch ohne Leberextrakt die gleiche, der Spontanmutationsrate entsprechende Anzahl von Revertanten auf.

Im Leuchtbakterientest konnte ebenfalls eine Abnahme der akuten Toxizität der Proben durch die Inkubation mit *Pleurotus ostreatus* ssp. *florida* festgestellt werden.

Im Fall der PAK-Kontrollen war auch bei der höchsten eingesetzten Verdünnungsstufe von 1:32 in den DMSO-Konzentraten keine Biolumineszenz messbar. Die Hemmung durch die Abbauextrakte war deutlich geringer und erreichte die maximale Luminiszenzaktivität von 17 % der nur mit DMSO inkubierten Kontrollen. Eine Probe, die am Rotationsverdampfer ohne vorherige Zugabe von DMSO bis zur Trockene eingengt und erst nachträglich in DMSO aufgenommen worden war, zeigte deutlich die niedrigste Hemmung, was auf das Vorhandensein von flüchtigen toxischen Substanzen im Extrakt hinweist (Tabelle 15).

Tabbelle 15: Hemmung der Biolumineszens im MikroTox-Test durch DMSO Probenextrakte von Kontrolle und *P. ostreatus* Ansätzen in der Verdünnungsstufe 1:32. Bezug auf gleichartig verdünnte DMSO Lösungsmittelkontrollen.

Ansatzart, Inkubationszeit	% Luminiszens
Kontrolle mit PAKs nach 14 Tagen	0 %
Kontrolle mit PAKs nach 49 Tagen	0,3 %
Abbauextrakt nach 17 Tagen	17 %
Abbauextrakt nach 17 Tagen: Ansatz mit neutralem Boden-Eluat	10,3 %
Abbauextrakt nach 17 Tagen: Ansatz mit saurem Boden-Eluat	8,7 %
Abbauextrakt nach 37 Tagen	9,1 %
Abbauextrakt nach 37 Tagen: Ansatz mit neutralem Boden-Eluat	8,9 %
Abbauextrakt nach 37 Tagen: Ansatz mit saurem Boden-Eluat	7,1 %
Abbauextrakt nach 51 Tagen	6,2 %
Abbauextrakt nach 51 Tagen: Ansatz mit saurem Boden-Eluat	10,5 %
Abbauextrakt nach 51 Tagen (Extrakt bei Aufarbeitung trocken)	27,2 %
Pilzholzspäneextrakt ohne PAKs	38,0 %

Die Abnahme der Hemmung war zeitlich nicht linear, da die höchste Biolumineszens in den Abbauextrakten schon nach 17 Tagen in der Probe beobachtet wurde (Tabelle 15). Die akute Toxizität nahm schon nach kurzer Inkubationszeit ab, wohingegen die unterschiedlich lang inkubierten Ansätze je nach Rückhaltevermögen der möglicherweise flüchtigen toxischen Substanzen Schwankungen aufwiesen.

Dem Einsatz und der Interpretierbarkeit des Leuchtbakterientests für die Extrakte hydrophober bzw. DMSO-löslicher Substanzen waren aber deutliche Grenzen gesetzt, da DMSO allein eine starke Hemmwirkung auf die Leuchtbakterien zeigte, die zur Auswertung auf 100 % gesetzt wurde. Da aber auch Pilzholzansätze je nach Gehalt phenolischer Substanzen Hemmung der Leuchtbakterien-Aktivität auslösen können, sind die absoluten Hemmwerte nur ein bedingtes Maß für die Toxizität des Ruhrkohlebodenextraktes auf Holz. Versuche, DMSO gegen Aceton und Dimethylsulfoxid auszutauschen, erbrachten in allen Fällen Hemmungen der Lösungsmittelkontrollreihe, bestätigten aber ebenfalls alle die deutlich erhöhte Biolumineszens der Abbaukonzentrate gegenüber den Kontrolleextrakten, d. h. die Abnahme der akuten Toxizität durch den Einsatz der Weißfäulepilze.

3.2.3. Abbauversuche durch Mischung von PAK-kontaminiertem Boden mit Stroh-Pilz-Substrat

Die Mischung PAK-kontaminierten Sandes mit Stroh-Pilz-Substrat hatte bei Inkubation mit verschiedenen Weißfäulepilzen zu bedeutenden Abnahmen der PAK-Konzentration geführt (siehe Screening). Da auch im Boden Teilerfolge mit der Mischung von kontaminierter Matrix mit Lignocellulosesubstrat erzielt worden waren (siehe LOSKE 1991), wurde versucht, dieses Verfahren auf die realen Boden-PAK-Kontaminationen zu optimieren.

Im ersten Ansatz wurden mehrere Pilze der Gattung *Pleurotus* auf ihre Fähigkeit untersucht, im Boden des ehemaligen Gaswerks Solingen-Ohligs eine Abnahme der Schadstoffe zu bewirken. Der Boden wurde mit pasteurisiertem und vorinkubiertem Stroh gemischt und in Weckgläsern bebrütet. Nach acht Wochen wurden die Proben auf PAK-Gehalte untersucht. Es waren keine Abnahmen der PAKs zu erkennen (Anhang, A15 Abbildung 7). Die Matrix eines Versuchsansatzes zeigte nach Mahlung mit der Planetenmühle eine homogene Verteilung, die bei den Analysen verschiedener Böden mit je 5 Parallelproben, Standardabweichungen zwischen 3-5 % ergab. Feuchtes Mahlen und Extraktion mit Natriumsulfat führte zu keinen Verlusten an niederkondensierten PAKs, wohingegen Trocknung auch bei Zimmertemperatur zu hohen Verlusten an Naphtalin, Acenaphthen und Acenaphthylen führte. Durch Inhomogenitäten in der Ausgangsmatrix waren zwischen den Parallelgefäßen größere Schwankungen möglich und teilweise Konzentrationen über der Kontrollkonzentration meßbar. Diese zeigen die analytischen Schwierigkeiten bei der Verwendung solcher trockener Mischverfahren auf.

Da bei einigen Weißfäulepilzen eine Induktion des Enzymsystems durch Veratrylalkohol (z. B. bei *Phanerochaete chrysosporium*, JÄGER et al. 1985) oder Xylidin (ROGALSKI & LEONOWICZ 1992, NAIK & RASTOGI, 1983) in Flüssigkultur möglich ist, wurde *Pleurotus ostreatus* ssp. *florida*, nach Zugabe dieser Induktorstoffe in den Boden nochmals für acht Wochen inkubiert. Das Wachstum in den Gefäßen war wiederum hervorragend, der Boden wurde vom Pilzmycel vollständig umschlossen. Die Bonitierung ergab für alle Gefäße sehr gutes Wachstum (+++), wobei einige Pilzmycelien den Luftraum über dem Boden vollständig ausgefüllt hatten. Trotzdem konnte in keinem Fall eine Abnahme, weder von nieder- noch hochkondensierten PAKs, beobachtet werden (Anhang, A15, Tabelle12). Die mit *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta* ebenfalls durchgeführten Induktionsversuche erbrachten das gleiche Ergebnis. *Phanerochaete chrysosporium* konnte in diesem Boden auf Stroh-Substrat nicht zu stabilem Wachstum gebracht werden.

Aufgrund der mangelnden Abbaubarkeit der Schadstoffe wurde die Hypothese aufgestellt, daß die Schadstoffe durch zu starke Bindung an die im Boden vorhandenen Kohlenstoffbestandteile (Koks) für die Pilze nicht verfügbar vorlagen. Um die Bioverfügbarkeit zu verbessern, wurde dem frischen Boden ein Detergenz (Duomen T) in Form einer konzentrierten Lösung zugegeben. Zusätzlich wurde, als eine weitere mögliche

Induktionssubstanz, aufgeschlossenes Lignin, sowie der Hilfsstoff LP zur Erhöhung des Bodenwassergehalts eingesetzt. Trotz wiederum sehr guten Wachstums konnte die Gesamt-PAK-Menge nur gering reduziert werden, im Durchschnitt um ca. 20-30 % (Abbildung 13). Ein Einfluß von Detergenz, Lignin oder des Feuchtreulators LP war nicht festzustellen. Die Schadstoffinhomogenitäten, kleine Brocken mit teerigen PAK-Konzentraten, machten sich trotz des Sieb- und Mischprozesses (trocken) durch sprunghafte Erhöhung der Standardabweichung immer wieder bemerkbar.

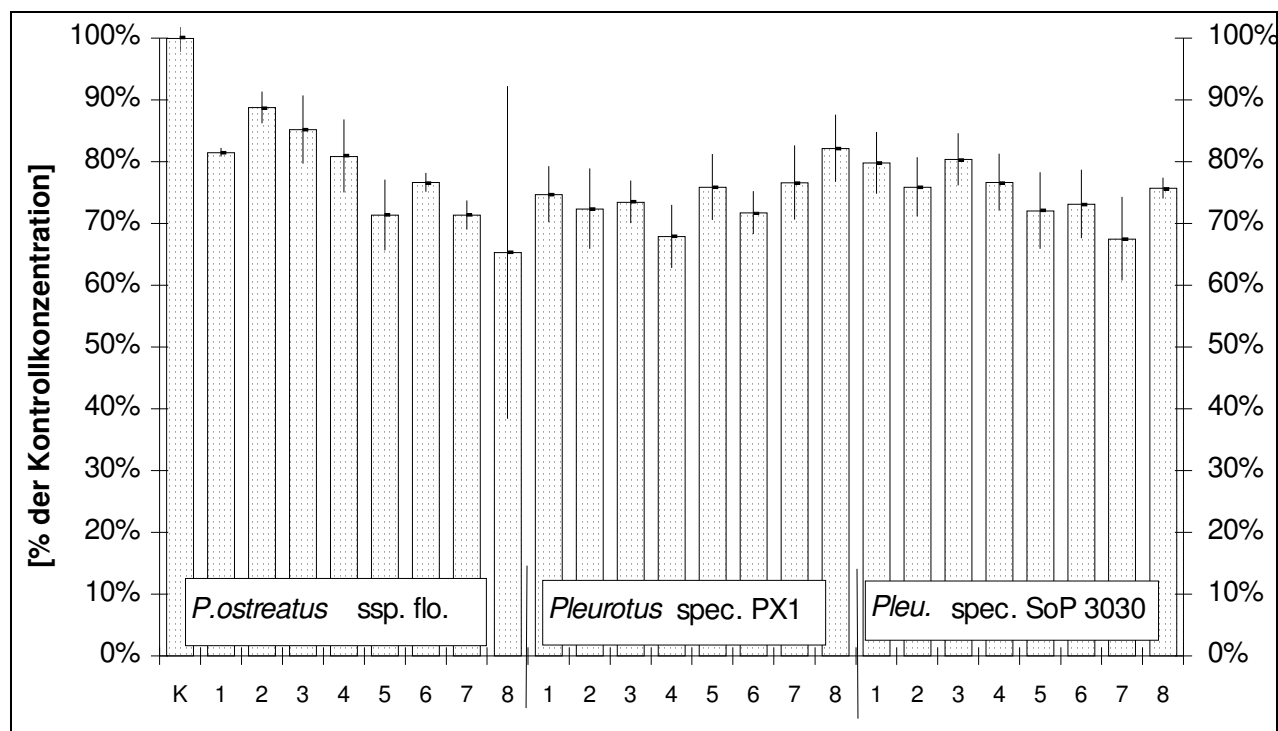


Abbildung 13: Summen - PAKs des Bodens aus Solingen-Ohligs nach einem 25 tägigen Abbaueversuch mit *Pleurotus ostreatus* Stämmen. Inokulum: Pilz auf Stroh leicht untergehoben.

Versuchsbezeichnungen:

- 1: *Pleurotus ostreatus* ssp. *florida* ohne Zusätze
- 3: mit Detergenz (Duomeen T 500 ppm)
- 5: mit Lignin
- 7: mit LP und Detergenz (1000 ppm)

K: Kontrolle

- 2: mit Feuchte-Regulator (LP)
- 4: mit Detergenz (Duomeen T 1000 ppm)
- 6: mit LP und Detergenz (500 ppm)
- 8: mit LP und Lignin

Durch die Inkubation mit den gewählten *Pleurotus*-Stämmen war es in diesem Versuchsteil zu einer leichten Abnahme der PAKs gekommen. Einzelne Substanzen, wie Benz[a]anthracen oder Dibenz[ah]anthracen, zeigten dabei gar keine Reduktion, während die Abnahme von Chrysen und Benz[ghi]perylen durch Ligninzugabe gesteigert werden konnte; dieser Effekt war aber uneinheitlich. Eine Wirkung von Tensid und dem Feuchtereulator (LP) war nicht zu beobachten. In der Summe waren die Abbauwerte von maximal 30 % zu gering, um von biologischer Sanierung sprechen zu können.

3.2.4. Auswahl geeigneter Tenside

Da die Vermischung von konzentrierter Duomeen-Lösung mit Boden keine Wirkung gezeigt hatte, wurde eine eingehende Untersuchung der Tensidwirkung auf den Pilz und die Löslichkeit der PAKs unternommen. Dazu wurden zusätzliche Spezialtenside für die Bodenwäsche (Firma Henkel) verwendet. In einem Vorversuch wurde die Verträglichkeit dieser Tenside für den Weißfäulepilz *Pleurotus ostreatus* getestet.

Tabelle 15: Wachstum von *Pleurotus ostreatus* ssp. *florida* auf Holzspänen, Malzmedium und Tensiden in unterschiedlichen Konzentrationen.

Inkubationszeit Konzentration	5 Tage			15 Tage			21 Tage		
	0,1%	0,5%	2,0%	0,1%	0,5%	2,0%	0,1%	0,5%	2,0%
P3-Ferrolin 8642	xx(x)	xx(x)	xx	xx(x)	xxx	xxx	xxx	xxx	XXX
8643	xx(x)	xx	x/(x)	xx(x)	x(x)1/3	(x)1/4	XXX	x(x)1/2	(x)1/4
8646	xx(x)	xx(x)	x	xx(x)	xx(x)	xx1/2	xxx	XXX	x(x)1/3
SP 8648	xxx!	xx(x)	x(x)	xxx!!	xx	xx1/2	xxx	XX(X)	xx1/2
Tween	xxx	xx(x)	xx(x)	xx(x)	xx(x)	xx(x)	xxx	xxx	XXX
Duomeen	xx(x)	xx(x)	xx(x)	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	XXX
ohne Tensid		xx(x)			xxx			xxx	

Bei Verwendung der Tenside P3 Ferrolin 8643 und P3 Ferrolin 8646 im Konzentrationsbereich um 2 % war eine deutliche Wachstumsverzögerung des Pilzes zu beobachten (Tabelle 15). Diese Hemmung war bei dem Tensid P3 Ferrolin 8643 deutlich am größten.

Um die Effektivität der Tenside bei der Mobilisierung der PAKs beurteilen zu können, wurde in einem ersten Schritt Benz[a]pyren kristallin gegen Tensidlösungen unterschiedlicher Konzentration extrahiert. Damit ergaben sich Hinweise über diejenigen Tensidkonzentrationen, die die Bildung von Micellen gewährleisten. Es zeigte sich, daß das gering toxische anionische Tensid P3 Ferrolin 8642 Benz[a]pyren fast nicht mobilisieren konnte, während das ionische Tensid P3 Ferrolin 8643, auf das *P. ostreatus* am empfindlichsten reagierte, die höchste Benz[a]pyren-Konzentration in Lösung erbrachte. Die Reihenfolge der bei 0,2 % Tensidlösung erhaltenen PAK-Löslichkeit war:

$$\text{P3 Ferrolin 8643} > \text{SP8648} > \text{P3 Ferrolin 8646} > \text{P3 Ferrolin 8642}$$

Es wurde daraufhin untersucht, welche Tenside die Schadstoffe des Bodens in Lösung, bzw. Emulsion bringen können. Dazu wurden verschiedene Kombinationen von Tensidlösung und Öl (zur Emulsionsbildung) in den vorgeschalteten Rührprozeß eingebracht. Es wurden zwei verschiedene Homogenisierungsstufen des Bodens miteinander verglichen. Einmal wurde die minimale Wassermenge verwendet, mit der der Boden gerade in einen rührfähigen Zustand versetzt wurde. Bei Zugabe der dreifachen Wassermenge wurde der Boden in eine wasserähnlich fließfähige Suspension überführt und entsprach den bei der Bodenwäsche verwendeten Verhältnissen von Boden zu Wasser (Beipackzettel, Henkel-Tenside).

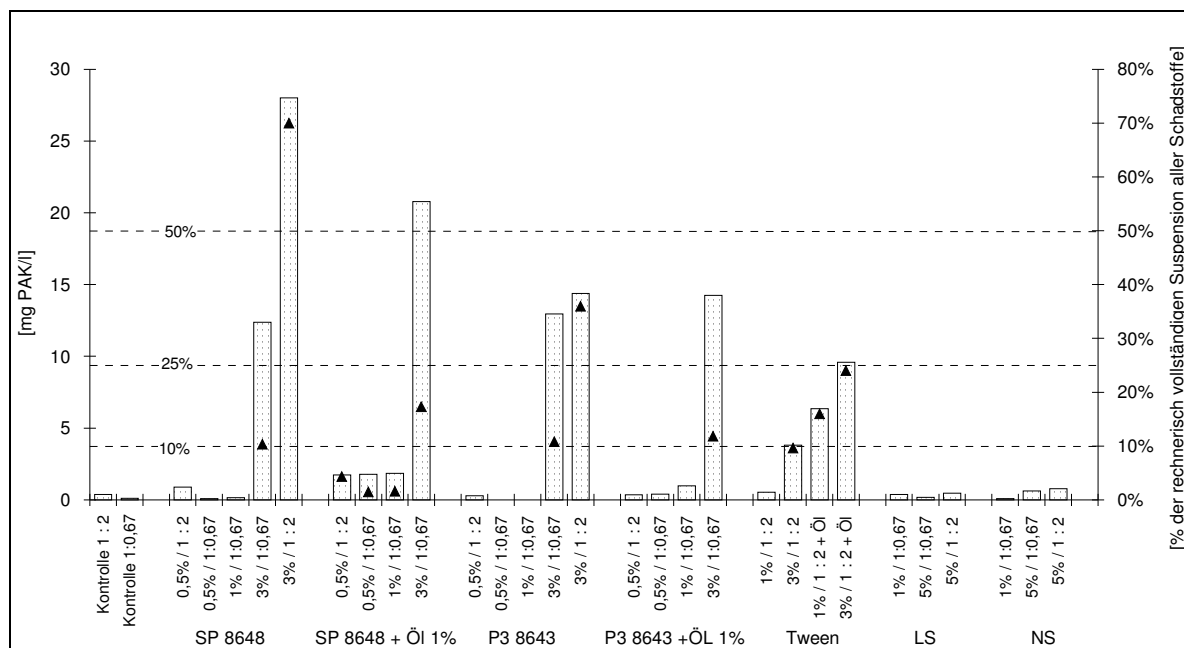


Abbildung 14: Summen-PAK-Konzentration im Bodenwasser nach einem Naß-Homogenisierungsverfahren des RKBs unter Zusatz verschiedener Tenside (%-Zahlen der Abszisse/Gruppenachse beziehen sich auf % Tensid bzw. Öl in zugegebenem Wasser) und Wassermengen. Die %-Angaben der rechten Ordinate bilden die Größenachsenbezeichnung in Bezug auf die schwarzen Dreiecke. Diese markieren die Prozentgehalte der errechneten Maximalkonzentration, bei 100 % Lösung aller Schadstoffe in die Wasser-Tensid(-Öl)-Emulsion. Der Boden wurde für 15 min in einer Rührmaschine mit Strömungsbrechern homogenisiert und ein Aliquot zentrifugiert. Die wässrigen Überstände wurden gegen Isooktan extrahiert und der GC-Analyse zur Bestimmung des Gesamt-PAK-Gehaltes zugeführt.

1 : 2 = 50 g Boden mit 100 ml Wasser/Tensidlösung homogenisiert (wässrige Bodensuspension)

1 : 0,67 = 50 g Boden mit 33 ml Wasser/Tensidlösung homogenisiert (dicker Brei)

SP 8648 = Spezialtensid für die Bodenwäsche, Firma Henkel, Deutschland

P3 F. 8643 = P3 Ferrolin 8643, Spezialtensid für die Bodenwäsche, Firma Henkel, Deutschland

Tween = Tween 80 LS = Ligninsulfonat, NS = Naphtalinsulfonsäure

Es waren deutliche Unterschiede der Tenside erkennbar, PAKs aus dem Boden zu lösen bzw. zu suspendieren (Abbildung 14). Die höchsten Konzentrationen konnten bei Verwendung des Spezialtensids SP 8648 in 3% iger Lösung erhalten werden. Das zugegebene Rapsöl hatte bei diesen Spezialtensiden in der Konzentration von 1% (bezogen auf die Wasserzugabe) wenig Einfluß. Die Wirkung von Tween konnte dagegen durch gleichzeitige Zugabe von Öl gesteigert werden.

Die Verwendung größerer Flüssigkeitsmengen erwies sich als sinnvoll, wenn auch nicht als ausschlaggebend für die Größenordnung der Mobilisierung von PAKs aus dem Boden. Erst bei der Betrachtung der maximal möglichen PAK-Konzentrationen in der Suspension fielen die Unterschiede der Boden-Wasser-Verhältnisse stärker aus. Bei gleicher absoluter PAK-Freisetzung aus dem Boden ist die rechnerische PAK-Konzentration im Brei höher als in der flüssigeren Bodensuspension. Eine gleiche Konzentration in der Lösung macht sich daher mit einem Drittel des %-Bezuges bemerkbar. Der Vergleich der Konzentrationen in Lösung ist aber besser geeignet, da der Gehalt von PAKs in Emulsion offensichtlich von der absolut eingesetzten Tensidmenge abhängt.

Bei Verwendung des Tensids P3 Ferrolin 8643 war der Unterschied der PAK-Konzentration in den beiden Suspensionsverhältnissen so gering, daß insgesamt davon ausgegangen wurde, daß das Wasser-Boden-Verhältnis bei Abbaueversuchen im größeren Maßstab ohne zu großen Verlust an Mobilisierung der Schadstoffe minimiert werden kann. Dies ist wünschenswert, da eine größere Flüssigkeitsmenge durch erhöhten Späneeinsatz und damit einhergehender Volumenvergrößerung "erkaufte werden muß".

Es besteht die Möglichkeit, daß Tenside einzelne PAKs aufgrund deren Struktur bevorzugt mobilisieren können, andere unverändert am Boden adsorbiert bleiben. Bei Betrachtung der Einzelsubstanzen war aber zu erkennen, daß eine Konzentrationszunahme des Gesamtspektrums der PAKs im Bodenwasser eintrat. So war bei Tween eine Erhöhung der Einzel-PAK-Konzentrationen durch die Verwendung von 3%- statt 1%-Lösung um den Faktor 10 erkennbar. Auch die Zugabe von Öl bewirkte für die meisten PAKs eine Verdopplung der Konzentration. Eine tendenzielle Abhängigkeit der Tensid-Wirkung bestand dagegen hinsichtlich der Konzentration. PAKs, die im Ausgangsboden eine Konzentration von über 2,5 mg/kg TG aufwiesen zeigten alle ein 'Tween 3 % / Tween 1 %' Verhältnis von über 10, während bei gering konzentrierten PAKs Indeno[123-cd]pyren, Dibenz[a,h]anthracen und Acenaphtylen dieses Verhältnis kleiner als 10 war. Die beiden Spezialtenside der Firma Henkel zeigten bei Löslichkeitserhöhung ein ähnlich "breites" Verhalten, wohingegen Naphtalinsulfonat eine deutliche Konzentrationserhöhung der niederkondensierten Aromaten (bei einer Konzentration von 5 %) gegenüber hochkondensierten PAKs zeigte. Unter Einbeziehung der Toxizitätsuntersuchungen wurde das Tensid P3 Ferrolin 8643, sowie die Emulsion mit Rapsöl für die folgenden Abbaueversuche ausgewählt.

3.2.5. PAK-Abbau durch Weißfäulepilze nach Tensidaufschluß

Um Festphasenreaktoren zur Dekontamination PAK-verseuchter Materialien einzusetzen, muß eine bedeutende Abnahme kontaminationstypischer PAK-Muster innerhalb der Inkubationszeit, die durch die Standzeit des Reaktors begrenzt wird, erfolgen. Mit dem bis zu diesem Zeitpunkt praktizierten Verfahren der Untermischung von Pilzsubstrat in die kontaminierte Matrix war eine solche PAK-Abnahme nicht zu erhalten. Es wurde daher untersucht, inwieweit durch andere Mischverfahren ein engerer Kontakt zwischen Pilz und Schadstoff hergestellt werden konnte.

Für die folgenden Versuche wurde daher ein Naß-Homogenisierungsverfahren eingesetzt. Dabei wurden die Erfahrungen beim Ansatz von kontaminiertem Schlamm mit Holzspänen und Pülpe auf den festen Boden übertragen. Es hatte sich gezeigt, daß eine Mischung breiiger Substrate mit strukturbildenden lignocellulosehaltigen Stoffen wie Holzspänen (nicht Sägespänen, da zu fein) einen höheren Durchwachsungsgrad der Aggregate als bei trockenen Mischverfahren erreichte. Bei der Verwendung von bewachsener Hirse als Inokulum und nachträglicher Eindickung des breiigen Substrates mit Holzspänen ließ sich zudem

beobachten, daß das Wachstum der Pilze im Inneren der neu gebildeten Aggregate begann und aus diesen heraus sich in den Aggregatzwischenraum fortsetzte. Der Boden wurde daher mit wässrigen Lösungen in einen zementähnlichen Bodenbrei überführt, der durch Rühren eine Gleichverteilung der Schadstoffe gewährleistete und diese teilweise in Suspension brachte. Als Kontrollen wurden neben Natriumazid behandelten Boden-Holzspäne-Pülpe-Mischsubstraten auch Inkubationen ohne Zuschlagsstoff und reine Ölzugaben vorangestellt. Es wurden beide Böden nach Siebung und Naßhomogenisierung untersucht.

Tabelle 16: PAK-Restgehalte nach sechswöchiger Inkubation von RKB mit *Pleurotus ostreatus*.

Ansatzart	mittl. Wachstum	RKB 1	RKB2
<i>Pleurotus ostreatus</i> nur Pülpe	+++	93 % ± 2,7 %	107 % ± 6,1 %
<i>Pleurotus ostreatus</i> mit Öl 0,5 %	+++!	105 % ± 3,2 %	96 % ± 2,6 %
<i>Pleurotus ostreatus</i> mit Öl 2 %	+++	110 % ± 4,1 %	107 % ± 2,8 %
<i>Pleurotus ostreatus</i> + P3 Ferrolin 8643	+++	104 % ± 1,8 %	108 % ± 1,9 %
<i>Pleurotus ostreatus</i> +Tensid + Öl 0,5%	++	89 % ± 5,2 %	91 % ± 4,1 %
<i>Pleurotus ostreatus</i> auf Holzchips	(+)	96 % ± 4,1 %	101 % ± 2,8 %
<i>Pleurotus ostreatus</i> mit Öl	-	101 % ± 2,2 %	105 % ± 3,9 %
<i>Pleurotus ostreatus</i> mit Tween	+(+)	104 % ± 6,8 %	99 % ± 3,0 %
Kontrollen ohne Pilz	-	100 % ± 1,5 %	100 % ± 2,2 %

Die Kontrollen, d. h. sowohl die Ansätze nur mit *Pleurotus ostreatus* als auch Ansätze mit Pilz und nur Öl oder nur Tensid zeigten keinerlei Änderung der PAK-Konzentrationen (Tabelle 16). Der Versuch, durch den Einsatz von P3-Ferrolin 8643 und 0,5 % Rapsöl eine Emulsion während des Homogenisierungsprozesses zu erhalten, so daß PAKs für den Abbau durch *Pleurotus ostreatus* verfügbar sein sollten, war im ganzen nicht erfolgreich. Es konnte zwar eine leichte Abnahme festgestellt werden - so wurden 29 % (± 3 %) des Benz[a]pyrens bezogen auf die Kontrollen beim Ansatz von "Boden 1" abgebaut - der durchschnittliche Verlust an PAKs betrug aber nur 11 %. Dieser Abbauwert ist real möglicherweise höher, da in Substraten, die von Pilzmycel gut durchwachsen sind, die Poren des Bodengefüges verschlossen werden und Ausgasungsprozesse, die auch in Kontrollansätzen stattfinden, unterdrückt werden. Dadurch kann es bei mangelhaftem Abbau zu PAK-Konzentrationen über der in gleichlang inkubierten Kontrollen kommen. In Kontrollansätze dieses Versuches wurde ein Gehalt von durchschnittlich 83 % der eingesetzten Eingangs-PAK-Konzentration analysiert.

Ein Teil der sehr stark durchwachsenen und unkontaminierten Ansätze wurde zur Beurteilung der Langzeitwirkung nach 10 Wochen analysiert. Auch in diesem Fall konnte keine Abnahme der PAK-Ausgangskonzentration festgestellt werden.

Es wurde untersucht, inwieweit die geringe Abnahme durch eine zu starke Bindung der PAKs in und an die Tensid-Öl-Micellen zustande kam. Zu diesem Zweck wurde der Emulsionsspalterspalter P3-Ferrolin 8680 nach dem Homogenisierungsprozess, direkt vor

der Spänezugabe zugefügt. Auch in diesem Fall konnte nach vier wöchiger Inkubation mit *Pleurotus ostreatus* keine höhere PAK-Abnahme beobachtet werden.

3.2.6. Abbauuntersuchung von Extrakten auf verschiedenen Böden

Da der Gaswerksboden der Ruhrkohle AG, Essen, weder in den Ansätzen mit Tensid oder ÖL noch in der Kombination der beiden Abbau durch Weißfäulepilze zeigte, schien entweder die Bioverfügbarkeit sehr schlecht oder der Prozeß der Alterung der Schadstoffe zu stark ausgeprägt zu sein. Um letzteres zu klären, wurde ein Acetonextrakt des RKB sowohl auf dem extrahierten RKB, als auch auf unterschiedliche andere Böden aufgetragen.

Dabei wurden folgende Böden in zwei Parallelen ausgewählt:

	Gefäß 1	Gefäß 2
- der nach der Acetonextraktion zurückgebliebenen Boden	++(+)	++(+)
- der Sandanteil des extrahierten Bodens, gewonnen durch 15 min Sedimentation der Bodenaufschwemmung und Dekantierung der Fraktion < 10-20 µm, sowie der leichten Koksbestandteile	+++!	+++!
- Sandboden (BodenB)	++k	-k
- Sandboden und zusätzliche Zugabe des wässrigen RKB-Extraktes	++	+(+)k
- humoser Gartenboden (Oberboden, BodenC)	++(+)	+++
- lehmigen Boden (Forstbotanischer Garten, BodenA)	+++!	+++k

Die Abbauversuche dieser Böden nach fünf Wochen Abbauzeit ergaben Restgehalte an PAKs von minimal 50 % der gleich inkubierten Kontrollansätze (Abbildung 15).

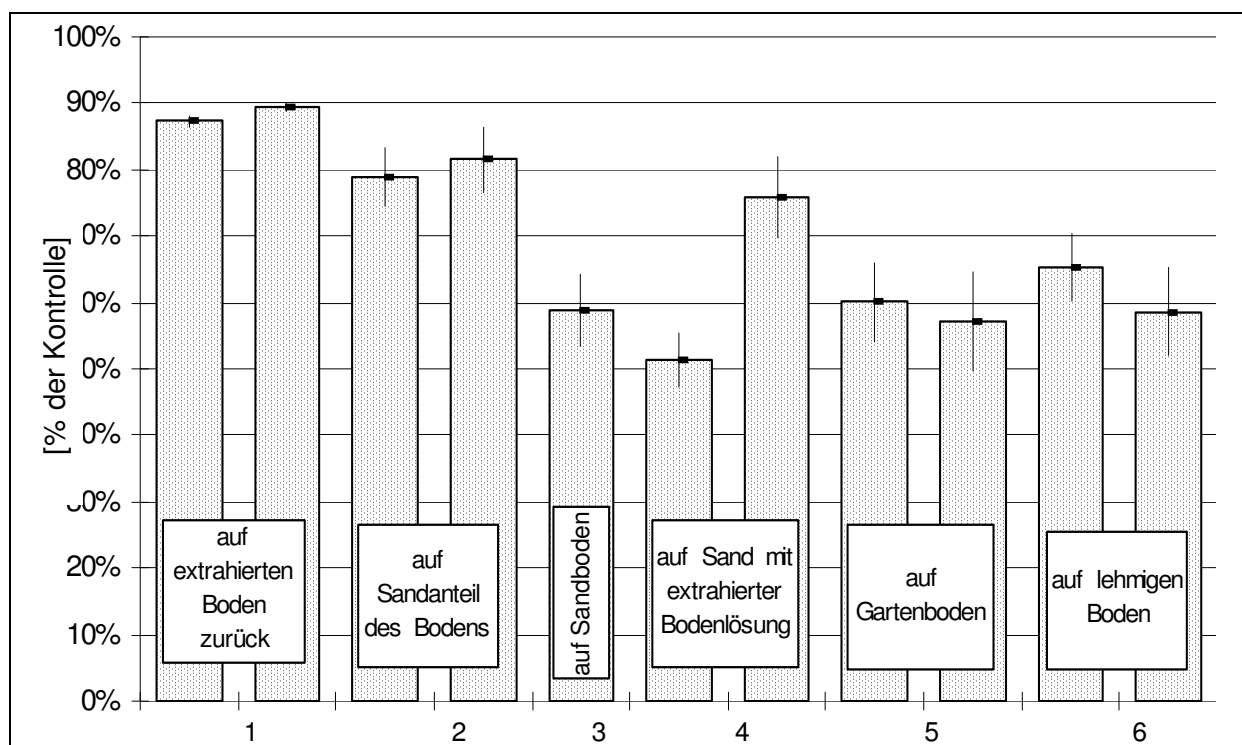


Abbildung 15: Restgehalte der Summe der 16 EPA-PAKs nach Auftrag des RKB-Acetonextrakts auf die oben angegebenen Böden und fünfwöchiger Inkubation mit *Pleurotus ostreatus*. Bezugsgröße: gleichartig belegte Kontrollböden.

Folgende Beobachtungen ergaben sich aus den Versuchen: Der Abbau des Schadstoffextrakts auf Sand-, Lehm- und humosem Oberboden durch *Pleurotus ostreatus* war deutlich höher als im Originalboden der Ruhrkohle AG. Die Unterschiede zwischen den Bodentypen war sehr gering. Selbst in humosem Oberboden konnte ein Abbau vergleichbar dem im Sandboden gemessen werden, obwohl höhere Adsorptionskräfte und Bindungsstellen abbauhemmend hätten sein können. Die drei genannten Böden verzeichneten einen Abbau von 40 % der Summe der PAKs innerhalb von fünf Wochen.

Bei Rückauftrag der PAKs auf den extrahierten Boden war nur eine geringe Abnahme der Schadstoffe feststellbar. Obwohl die Schadstoffe durch die Acetonextraktion von den Bodenadsorbieren getrennt worden waren, war durch die Überführung des Extrakts auf den Boden eine sofortige "Rückbindung" zu verzeichnen. Die im Boden enthaltenen adsorbierenden Partikel, vermutlich die Koksteilchen, besaßen so hohe Affinität zu den PAKs, daß keine "Alterung" der eingebrachten Schadstoffe nötig war, um den Abbau zu hemmen. Dennoch war eine signifikante Abnahme der PAKs, sowohl in der Summe als auch in bedeutenden Mengen bei Einzelsubstanzen (Anthracen) zu verzeichnen, die über das im Original RKB erzielte Maß hinausging. Die (kurzzeitige) Ablösung der PAKs durch Acetonextraktion erhöhte die Bioverfügbarkeit.

Trotz des hervorragenden Wachstums war auch auf dem Sandanteil des Originalbodens kein Abbau zu erreichen, der vergleichbar wäre mit dem auf normalem Sandboden oder Gartenboden. Der Sortierungseffekt bestand in der Abtrennung der leichten und in Lösung auf der Oberfläche schwimmenden Koksteilchen, wie aus der Abdekantierung der Feinstpartikel. Es war vermutet worden, daß speziell die Abtrennung der leichten Grobteilchen, im Vergleich zum Originalboden zu einer deutlichen Verbesserung des Abbaus führen würde. Dies war nicht erkennbar. Ob die leicht höhere Abnahme der PAKs auf (optisch) besseres Wachstum oder auf den Sortierungseffekt zurückzuführen ist, war durch die Schwierigkeit, im Boden andere als optische Bonitierungen anzuwenden, nicht entscheidbar.

3.2.7. Abbauuntersuchung klassierten Materials

Der Boden mit erhöhtem Anteil von PAKs im Grobsandbereich (Boden1) wurde an der TU-Hamburg-Harburg einem Bodenwäscheverfahren unterworfen. Anhand der erhaltenen Fraktionen wurde das sehr unterschiedlich strukturierte Material eingehend auf die PAK-Konzentration untersucht. Um die Verschiedenartigkeit der Fein- und Grobfraktionen auf ihre PAK-Eluierbarkeit hin zu vergleichen, wurden 4 Extraktionsverfahren eingesetzt.

Es war bei allen vier verwendeten Extraktionsverfahren erkennbar, daß die leichte Grobkornfraktion den größten Anteil der PAKs beinhalten (Abbildung 16). Die Bodenwäsche hatte es in der eingesetzten Weise nicht vermocht, die auf den groben Partikeln sitzenden Schadstoffe abzulösen.

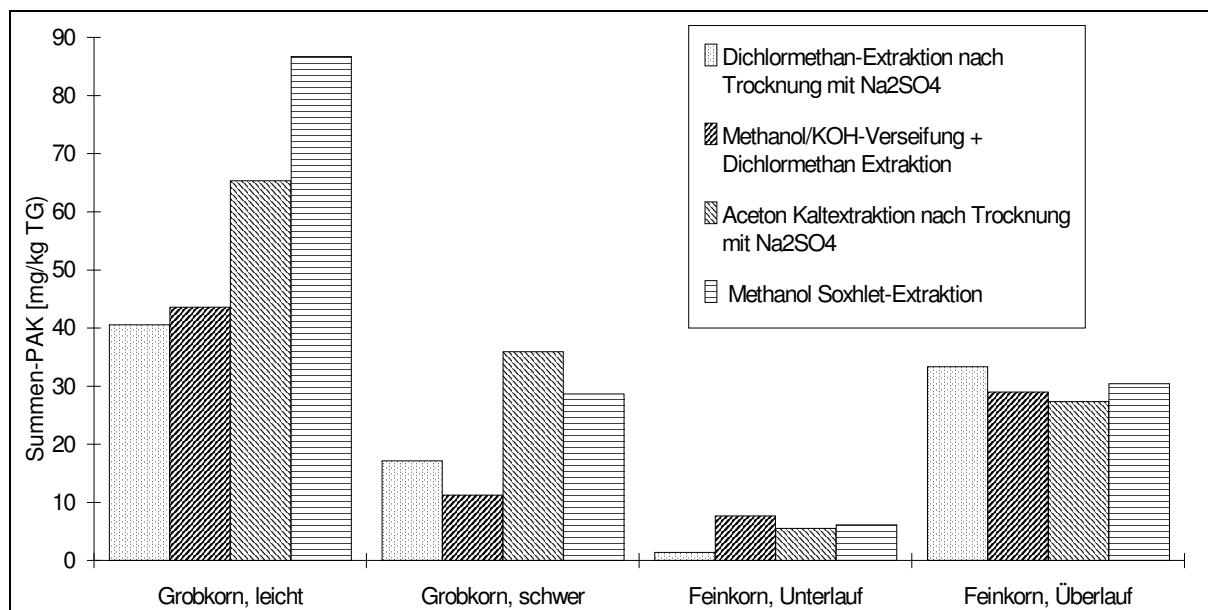


Abbildung 16: Die PAK-Gehalte der nach Bodenwäsche erhaltenen Fraktionen :

- Grobkorn > 300 µm, schwere Fraktion (Aufstromklassierung)
- Grobkorn > 300 µm, leichte Fraktion (Aufstromklassierung)
- Feinkorn ca. 20- 300 µm, Unterlauf des Hydrozyklons
- Feinkorn < ca. 30 µm, Oberlauf des Hydrozyklons

wurden mittels folgender Extraktionsverfahren bestimmt:

- > Extraktion mit Dichlormethan: 5 g Boden, 15 g Na₂SO₂ mit 50 ml Dichlormethan über Nacht extrahieren. Dichlormethanextrakt direkt zur Messung auf PAKs am GC-MS.
- > Verseifung: 5 g Boden mit 50 ml Merthanol/KOH (5 %) über Nacht verseifen. 2 ml davon mit 2 ml Dichlormethan und 5 ml Wasser extrahieren. Dichlormethanphase zur Messung auf PAKs.
- > Extraktion mit Aceton: 5 g Boden, 15 g Na₂SO₂ mit 50 ml Aceton über Nacht extrahieren. 1 ml zur Aufreinigung über Sep-Pack.
- > Extraktion am Soxhlet: 50 g Boden mit 250 ml Methanol extrahieren. 2 ml Extrakt mit 5 ml Wasser gegen 2 ml Dichlormethan ausschütteln. Messung der Dichlormethanphase ohne Aufreinigung.

Verteilung der PAKs bei Bezug auf:

Trockengewichts-Masseverteilung

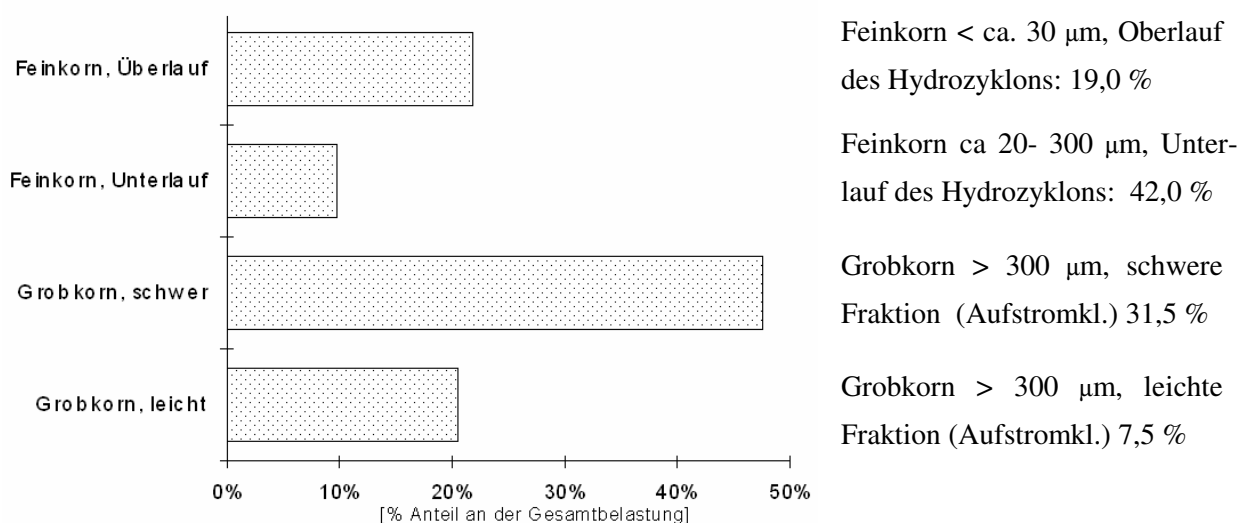


Abbildung 17: Verteilung der PAK-Summenkonzentration des Ruhrkohlebodens "Boden1" nach der Bodenwäsche. Rechts die zur Berechnung verwendete Massenverteilung der Fraktionen.

Die im Grobkorn enthaltenen PAKs ließen sich durch Acetonkaltextraktion und Soxhletextraktion am besten eluieren. Soxhletextraktion war für den leichten Grobkornanteil effektiver in der Extraktion der vermutlich auch in den Kokspartikeln eingeschlossenen PAKs. Dichlormethanextraktion sowie Verseifung mit Methanol/KOH waren für den Grobkornanteil als Extraktionsmethode ungünstig, bei der Extraktion der Feinbestandteile waren die Ergebnisse mit den anderen Extraktionsmethoden dagegen gleichwertig. Die PAKs waren in dieser Fraktion den Extraktionsmethoden gleich zugänglich.

Durch die unterschiedlichen Massenanteile verschiebt sich der Belastungsschwerpunkt von den hochkonzentrierten leichten Bestandteilen der Grobkornfraktion zu der sandigen schwereren Fraktion (Abbildung 17).

Mit den Fraktionen, Grobkorn leicht, Grobkorn schwer, sowie Feinkornfraktion <30 µm (Oberlauf) wurden Mischungen mit Pülpe, Holzspänen und *Pleurotus ostreatus* angesetzt und für acht Wochen inkubiert. Die Analyseergebnisse, bezogen auf gleichartig angesetzte Kontrollen (mit Natriumazid 200 ppm), ließen weiterhin keine Abbau-/Umbauvorgänge erkennen (Anhang, A16, Abbildung 8). Die Ergebnisse der anderen Fraktionen sind nicht weiter dargestellt, da ebenfalls keinerlei Änderung der PAK-Konzentration zu beobachten war.

3.2.8. Homogenisierung mit starken Scherkräften

Eine weitergehende Bearbeitung des Ruhrkohlebodens (RKB) nach der nicht erfolgreichen Bodenwäsche stellte die Homogenisierung im Lödige-Mischer dar. Dieser Pflugscharmischer sollte bei der Ablösung und Suspendierung der Schadstoffhüllen auf den Aggregaten hohe Scherkräfte mit dem Einsatz von Tensiden verbinden, was bei dem Bodenwaschverfahren an der TU-Hamburg nicht möglich gewesen war.

Es wurde dazu die Kombination Tween und Tween mit Rapsöl in den Homogenisierungsintervallen 1 min, 10 min und 30 min untersucht in einem Verhältnis der Komponenten von

RKB-Boden² (10 kg) : Kartoffelpülpe (2 kg) : Tween (250 ml) : Rapsöl (1l)

In diesem Maßstab ließen sich in der Bodenlösung (Extraktion des abfiltrierten wässrigen Anteils mit n-Hexan) nur niederkondensierte Aromaten nachweisen, wobei eine Konzentrationssteigerung durch Zugabe von Tween/ÖL nicht analysierbar war.

Die daraus angesetzten Abbauversuche führten wie zuvor zu keinem Abbauergebnis.

3.2.9. Homogenisierung unter Acetonzugabe

Da wässrige Aufschwemmungen des RKB's mit Wasser und Fermentation in Holzspäneaggregaten zu keinen ausreichenden Abbauhinweisen führten, wurde der Boden bei der Homogenisierung mit Anteilen von organischem Lösungsmittel "teilextrahiert".

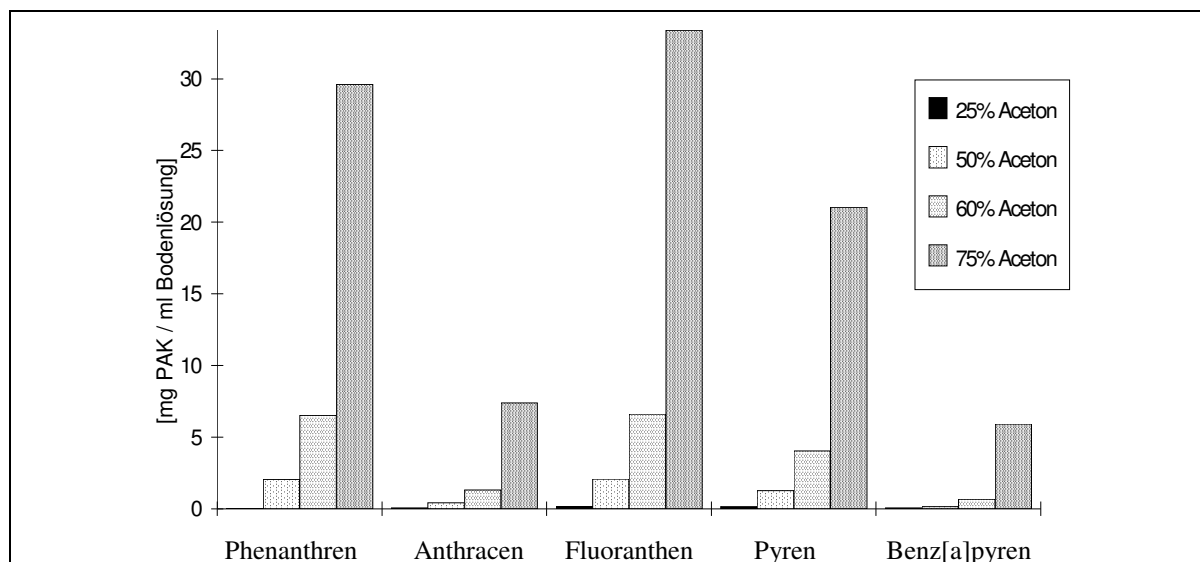


Abbildung 18: Löslichkeit von PAKs bei Homogenisierung des RKB's mit Aceton-Wassergemischen. Nach Homogenisierung und einer Absetzzeit von 5 min wurden aus dem breiigen Überstand 2x 10 ml Probe gezogen, zentrifugiert und vom klaren Überstand 2 ml abgenommen. Nach Zugabe von i. Std., 2 ml Isooktan und 5 ml Wasser wurden die Proben extrahiert und die Isooktanphase auf PAKs untersucht.

Die Erhöhung der Löslichkeit unterschiedlich kondensierter PAKs durch steigende Anteile von Aceton in der Homogenisierungsflüssigkeit erreichte mit der höchsten Konzentration von 75 % Aceton bei einem Verhältnis Boden : Wasser/Aceton von 2 : 1 Löslichkeitsanteile von maximal 85-95 % der Bodenkonzentration an PAKs (Abbildung 18).

Die Zugabe der Holzspäne erfolgte in diese nochmals durchgemischte Lösungsmittel-Wasser-Mischung hinein, so daß die Schadstoffe aus der Suspension auf die Oberfläche der Späne aufgetragen wurden. Es entstand damit die weiteste Annäherung an die Aufbringung des Extraktes direkt auf Späne. Die Lösungsmittel wurden durch zweitägige Begasung ausgeblasen, die Matrix je nach Anteil des Lösungsmittels nachbefeuchtet und mit *Pleurotus ostreatus* beimpft. Das Wachstum entwickelte sich in fast allen Ansätzen hervorragend.

Tabelle 17: Bonitierung des Wachstums von *Pleurotus ostreatus* nach fünf Wochen. Die Bewertung ist stellvertretend für drei Parallelen; abweichende Bonitierungen sind mit "/" abgetrennt.

Ansatzverfahren	1 Woche	2 Woche	4 Woche	5 Woche
(Wachstums-)Kontrolle H ₂ O	++	+++	+++!	+++!
1 % Isopropanol	++	+++	+++!	+++!
5 % Isopropanol	+	+ / ++	++(+)	++
10 % Isopropanol	+	+ / -	++ / -	++(+)/-
1 % Aceton	++	++	++(+)	+++!
5 % Aceton	++	+++	+++!	+++!
10 % Aceton	++	+++	+++	+++
25 % Aceton	++	++	+++!	+++!
50 % Aceton	+++	+++	+++!	+++!
60 % Aceton	+++	+++	+++	+++!
75 % Aceton	++	+++	+++	+++

Es zeigte sich, daß Isopropanol durch die zweitägige Ausblasung nicht vollständig aus der Matrix entfernt werden konnte, wodurch das Wachstum des Pilzes bei höherer Konzentration empfindlich gestört wurde. Die Ansätze mit 10 % Isopropanol entwickelten erst nach drei Wochen aktives Mycel. Aceton konnte aus den Ansätzen gut entfernt werden, und das Wachstum entwickelte sich entsprechend der Wasserkontrolle.

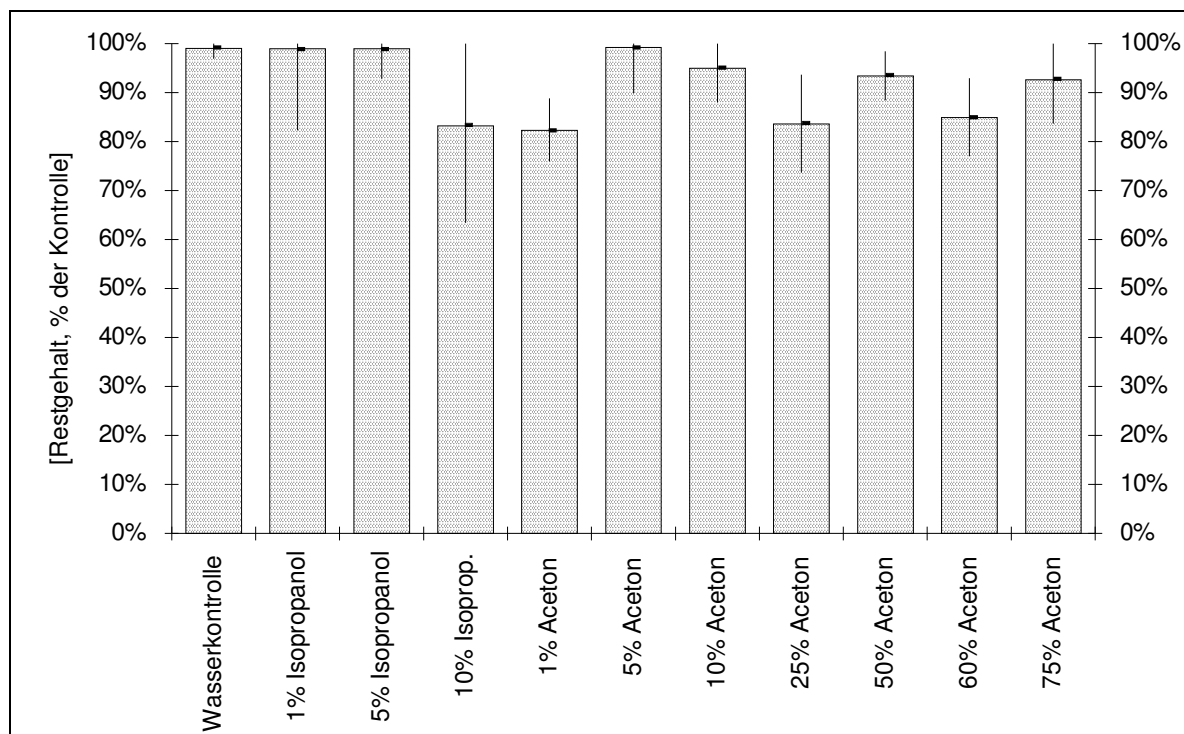


Abbildung 19: Prozentuale Restgehalte der Summe der 16 EPA-PAKs für unterschiedliche Boden- Homogenisierungsmethoden (s.o.) nach fünf wöchiger Inkubation mit *Pleurotus ostreatus* ssp. *florida* bezogen auf folgende Kontrollansätze: Wasser (für 0 und 1 % Ansätze), 5 % Isopropanol, 10 % Isopropanol, 5 % Aceton, 10 % Aceton, 50 % Aceton (für 25 % und 50 %) und 75 % Aceton (für 60 % und 75 %).

In keinem der unterschiedlichen Homogenisierungsansätze war ein signifikanter Einfluß der Lösungsmittelzugabe zu erkennen (Abbildung 20). Im Gegenteil macht sich eine längere Anwachsphase bis zur vollständigen Überwachsung der Matrix in höheren Verdampfungsverlusten der PAKs bemerkbar, so daß der Ansatz 10 % Isopropanol stellenweise die höchsten Verluste zu verzeichnen hat. In der Einzelstoffbetrachtung ergeben sich ebensowenig Unterschiede zwischen Kontrollansätzen und Ansätzen mit *Pleurotus ostreatus*. Die Überführung der Schadstoffe vom Boden auf die Holzspäne mittels Lösungsmittel-Wasser Extraktion war somit nicht erfolgreich.

Diese, im ganzen unbefriedigenden Abbauergebnisse haben insofern große Bedeutung, als daß die Grenzen der Einsetzbarkeit biologischer Verfahren bei speziellen Problemböden aufgezeigt werden konnten. Die Ergebnisse wurden ausführlich dargestellt, um zu zeigen, daß das Problem der Bioverfügbarkeit, besonders bei Böden mit hohem Anteil von Adsorberflächen, das ausschlaggebende Kriterium der Anwendbarkeit des biologischen Potentials der Weißfäulepilze ist.

3.3. UNTERSUCHUNGEN ZUR BILANZIERUNG DES ABBAUS VON PAKS

Um die Mineralisierung der PAKs nachzuweisen zu können und Abbauprodukte zu untersuchen, wurde ^{14}C -radioaktiv markiertes Anthracen und Benz[a]pyren auf Holzspäne aufgezogen und in 700 ml-Begasungsgefäßen mit *Pleurotus ostreatus* inkubiert. Dabei wurde die Entwicklung von radioaktiv markiertem CO_2 beobachtet (Abbildung 20).

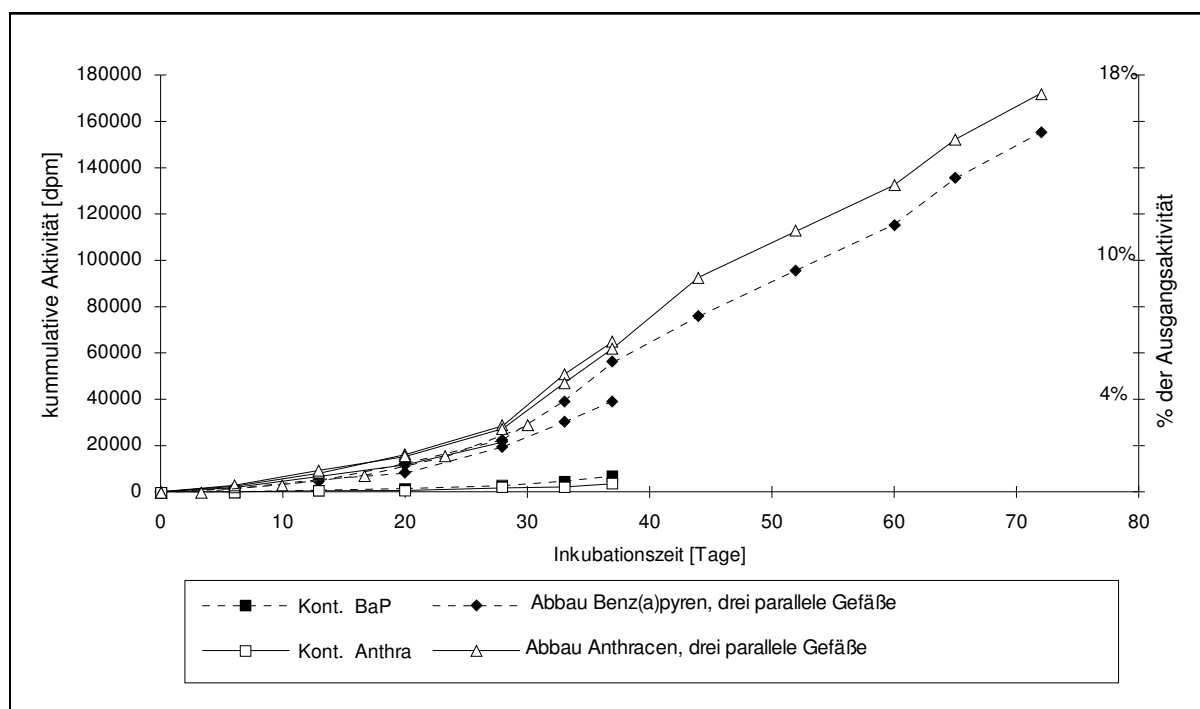


Abbildung 20: Mineralisierung von ^{14}C -Anthracen und ^{14}C -Benz[a]pyren. $^{14}\text{CO}_2$ dargestellt als kumulative Aktivität, die sich bei Inkubation von kontaminierten Holzspänen mit *Pleurotus ostreatus* entwickelt. Eine Kontrolle auf flüchtige (organische) Aktivität (vorgeschaltete Isooktanfalle) zeigte keine messbare Aktivität.

Die Entwicklung von $^{14}\text{CO}_2$ aus den Versuchsansätzen war bei beiden Substanzen ähnlich hoch und erfolgte kontinuierlich. Nach der Anfangsphase von drei bis vier Wochen, in der eine Freisetzung von ca. 0,6 % der Ansatzaktivität/Woche zu beobachten war, folgte eine höhere Freisetzungsrates mit ca. 1,5-2 % Aktivität/Woche. Der Hauptteil der Gefäße wurde nach 37 Tagen geerntet, da in den Kontrollen Infektionen (mit Weißfäulepilzen) auftraten. Die Konzentration der Ausgangssubstanzen wurde nach Extraktion des Späne-Pilz-Substrates mit Aceton und Überführung in Isooktan am GC-MS bestimmt. Bereits nach 18 Tagen waren nur noch Spuren der Ausgangssubstanzen nachweisbar. Die Analyseergebnisse dieser und der nach 37 Tagen erfolgten Probenahme sind als Chromatogramm dargestellt (Abbildung 21).

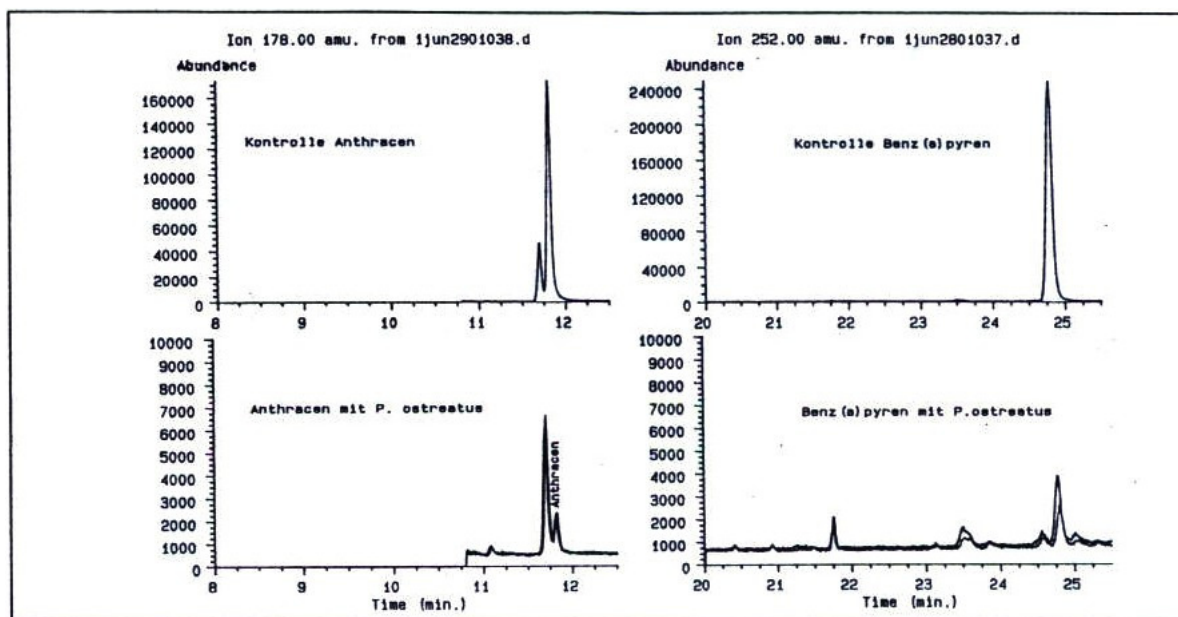


Abbildung 21: Überlagerte Chromatogramme von Kontrolle und Inkubationsansätzen mit *Pleurotus ostreatus* nach 18 und 37 Tagen Inkubation.

Die Bilanzierung der Abbauprodukte der eingesetzten Verbindungen erfolgte in den Phasen Luft, organisch und wässrig extrahierbare Bestandteile und nicht extrahierbare Bestandteile. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Ansatz am Soxhlet mit Aceton extrahiert. Die Aktivität des Acetons und der Späne wurden bestimmt, das Gefäß sowie die Tonsteinschicht mit Aceton gespült und in die Bilanzierung mit aufgenommen. Die Aktivität des eingesetzten Anthracens konnte in den Probenahmen bis fünf Wochen zu 87-89 % wiedergefunden werden, nach 73 Tagen betrug das Bilanzdefizit 19 %. Die Aktivität von Benz[a]pyren in den verschiedenen Phasen betrug in der Summe zwischen 78-84 %.

In den Versuchen verteilte sich die Aktivität von Anthracen und Benz[a]pyren unterschiedlich (Abbildung 22). Während im Fall des Anthracens ein Hauptteil der Aktivität auch noch nach zehnwöchiger Inkubation mit Aceton extrahiert werden konnte, war schon nach 18 Tagen die Aktivität des Benz[a]pyrens zu 38,5 %, nach 37 und 72 Tagen sogar zu 47 % an der Matrix nicht-acetonlöslich festgelegt. Es wurde untersucht, ob durch andere Lösungsmittel noch weitere Aktivität an unpolaren Substanzen aus der Matrix freigesetzt werden konnte. Weder mit Dichlormethan, noch mit Isooktan konnten bedeutende Mengen radioaktiver Substanzen extrahiert werden. Dagegen war durch Ultraschallextraktion wasserlösliche Radioaktivität messbar.

Die Festlegung der Substanzen erfolgt schon in der ersten Phase der Besiedlung durch den Weißfäulepilz, wobei aber in der Folge der Inkubation der Anteil der wasserlöslichen Anteile im Fall der Substanz Benz[a]pyren zunahm. Durch Ultraschall-Wasser-Extraktion konnte maximal 22 % der an den Spänen sitzenden Aktivität von Benz[a]pyren in das Wasser gelöst werden (Tabelle 18).

Tabelle 18: Extraktion der hydrophilen Bestandteile der Matrix des Anthracen- (Anthra) und Benz[a]pyren- (B[a]P) Ansatzes durch dreistündige Ultraschall-Behandlung, anschließende Filtration und erneute Trocknung der Späne, sowie Prüfung auf unpolare, aktive Restgehalte eines Aliquots der acetoneextrahierten Spänematrix (Sp.) durch Dichlormethan- (DCM) und Isooktan- (ISO) Extraktion. T=Tage Inkubation.

Substanz Inkubations- zeit [Tage]	DCM Extraktion % von Sp.	ISO Extraktion % von Sp.	nach Ultraschall-Wasser Extraktion		
			Späne % von Sp.	Wasser % von Sp.	Bilanz
Anthra 17T	1,8 %	0,8 %	90,0 %	9,5 %	99,5 %
Anthra 24T	0,8 %	0,2 %	87,3 %	8,2 %	95,5 %
Anthra 38T	1,2 %	0,5 %	88,4 %	11,8 %	100,2 %
Anthra 73T	1,7 %	1,1 %	83,3 %	10,0 %	93,3 %
B[a]P 18T	0,3 %	0,0 %	99,5 %	0,2 %	99,7 %
B[a]P 25T	0,4 %	0,1 %	93,7 %	9,6 %	103,3 %
B[a]P 37T	0,4 %	0,0 %	94,2 %	13,7 %	107,9 %
B[a]P 72T	0,8 %	0,0 %	73,7 %	22,2 %	95,9 %

Der Hauptteil dieser Aktivität war aber weiterhin so fest gebunden, daß auch eine Verseifung der Proben mit 10 % KOH (wässrig und in Methanol) und eine saure Hydrolyse kaum messbare Aktivität aus den Proben freisetzen konnte (Tabelle 19).

Tabelle 19: Radioaktive Substanzen, die aus der mit ^{14}C -Anthracen und ^{14}C -Benz[a]pyren belegten Holzspänematrix nach Inkubation mit *Pleurotus ostreatus* und Extraktion mit Aceton und Wasser durch chemischen Aufschluß noch extrahierbar sind. Messung eines 1 ml Aliquots der filtrierten Lösung (dpm-Angabe nach Abzug des entsprechenden Hintergrundrauschens der Kontrolleextrakte). S=Summe der Matrixaktivität

Substanz Inkubations- zeit [Tage]	10 % KOH in Methanol			10 % KOH in Wasser			saure Hydrolyse		
	dpm	dpm	% S	dpm	dpm	% S	dpm	dpm	% von S
		Summe			Summe			Summe	
Anthra 17T	112	18.816	11 %	115	17.250	11 %	19	2.850	2 %
Anthra 24T	89	15.485	9 %	118	17.700	10 %	28	4.200	2 %
Anthra 38T	100	16.572	10 %	128	19.200	12 %	33	4.950	3 %
Anthra 73T	100	12.522	13 %	102	15.300	15 %	43	6.450	6 %
B[a]P 18T	130	25.740	6 %	184	27.600	6 %	111	16.650	4 %
B[a]P 25T	110	21.503	4 %	229	34.350	7 %	24	3.600	1 %
B[a]P 37T	120	22.046	4 %	98	14.700	3 %	17	2.550	1 %
B[a]P 72T	190	22.732	12 %	187	28.050	15 %	19	2.850	1 %

Die Tabelle zeigt noch geringe extrahierbare Aktivität bis maximal 15 % der eingesetzten Späne-Aktivität, wobei aber die absolute Zerfallsrate durch das hohe Hintergrundrauschen von 50-150 dpm, hervorgerufen durch die Lumineszens der konzentriert alkalischen und auch der dunkelschwarzen, sauren Extrakte (30-50 dpm), relativiert ist. Diese Bestimmung der Aktivität/g Späne durch Verbrennung am Oximaten zeigte kaum Veränderung vor und

nach dem Aufschluß. Es zeigte sich deutlich, daß der Großteil der auf den Spänen gebundenen Aktivität bei beiden Substanzen auf der Matrix fest gebunden verblieb.

Bei der Betrachtung der acetonlöslichen Aktivität wurde zwischen polaren und unpolaren Bestandteilen differenziert. Als Extraktionsverfahren wurde die Aceton-Dichlormethan-Aufkonzentrierung verwendet. Die Dichlormethanextrakte wiesen im Fall von Anthracen den Großteil an Aktivität auf, während sich die Radioaktivität der acetonlöslichen Substanzen der Benz[a]pyren-Ansätze von ca. 40 % der eingesetzten Aktivität in nahezu gleichen Teilen auf unpolare und wasserlösliche Substanzen verteilte.

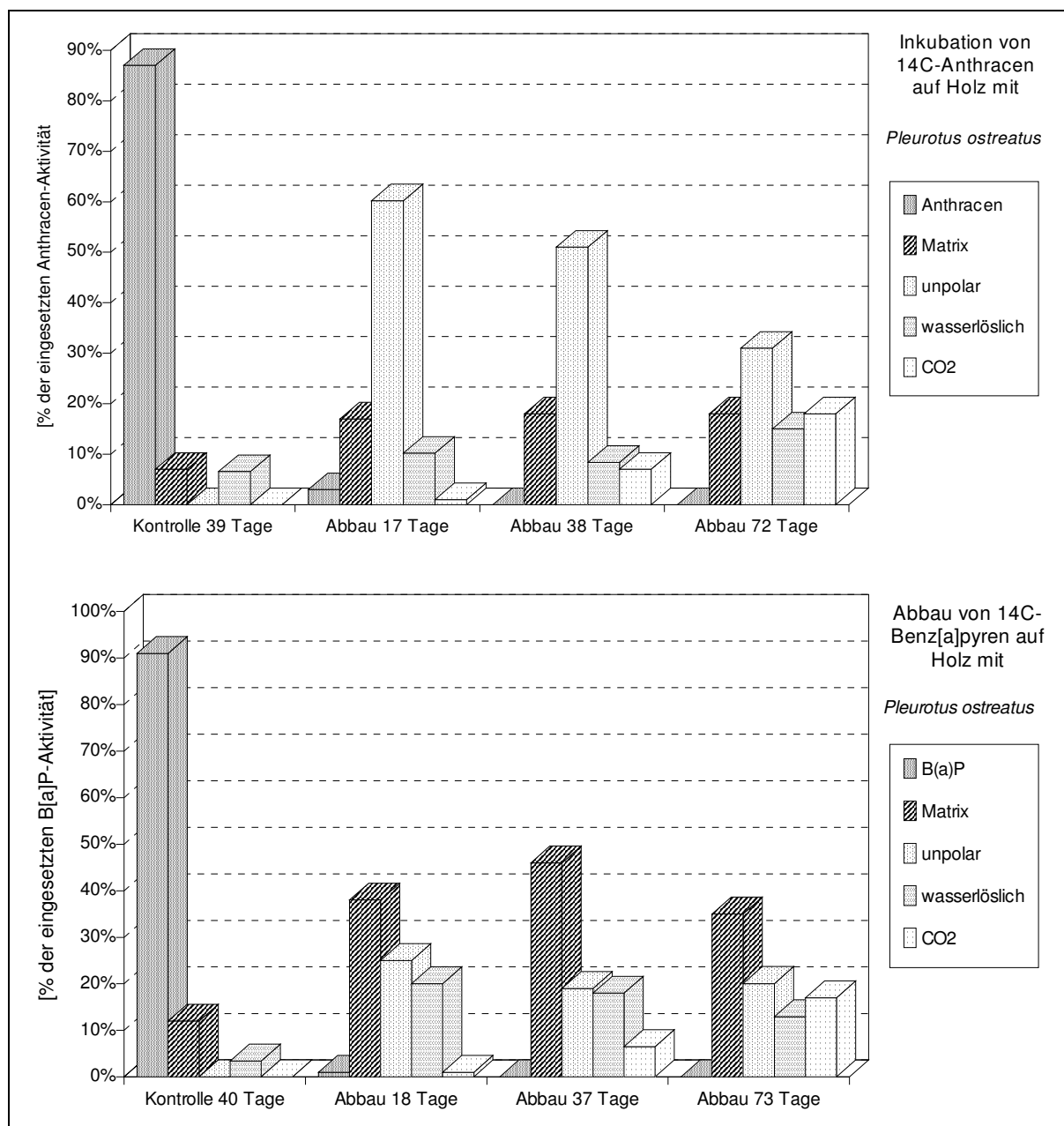


Abbildung 23: Verteilung der ^{14}C -Anthracen- und ^{14}C -Benz[a]pyren -Aktivität auf die verschiedenen Phasen durch Inkubation mit *Pleurotus ostreatus*. Der Gehalt an Ausgangssubstanz wurde durch GC-MS-Messung bestimmt und als % der Ausgangskonzentration im gleichen Anteil von der unpolaren Aktivität abgezogen.

Die eingegangenen Dichlormethanextrakte wurden über Sephadex L15 getrennt (Abbildung 24). Dabei ergaben sich für Anthracen und Benz[a]pyren völlig unterschiedliche Elutionsmuster.

Im Fall von Anthracen konnte die Aktivität des Dichlormethanextrakts von höhermolekularen, phenolischen und farbigen Bestandteilen der Probe getrennt werden. Dabei eluierte die Aktivität der Probe in der ähnlicher Fraktion wie das Anthracen der Kontrolle. Dies ließ auf Transformationsprodukte schließen, die vom Molekulargewicht in der Größenordnung der Ausgangssubstanz liegen.

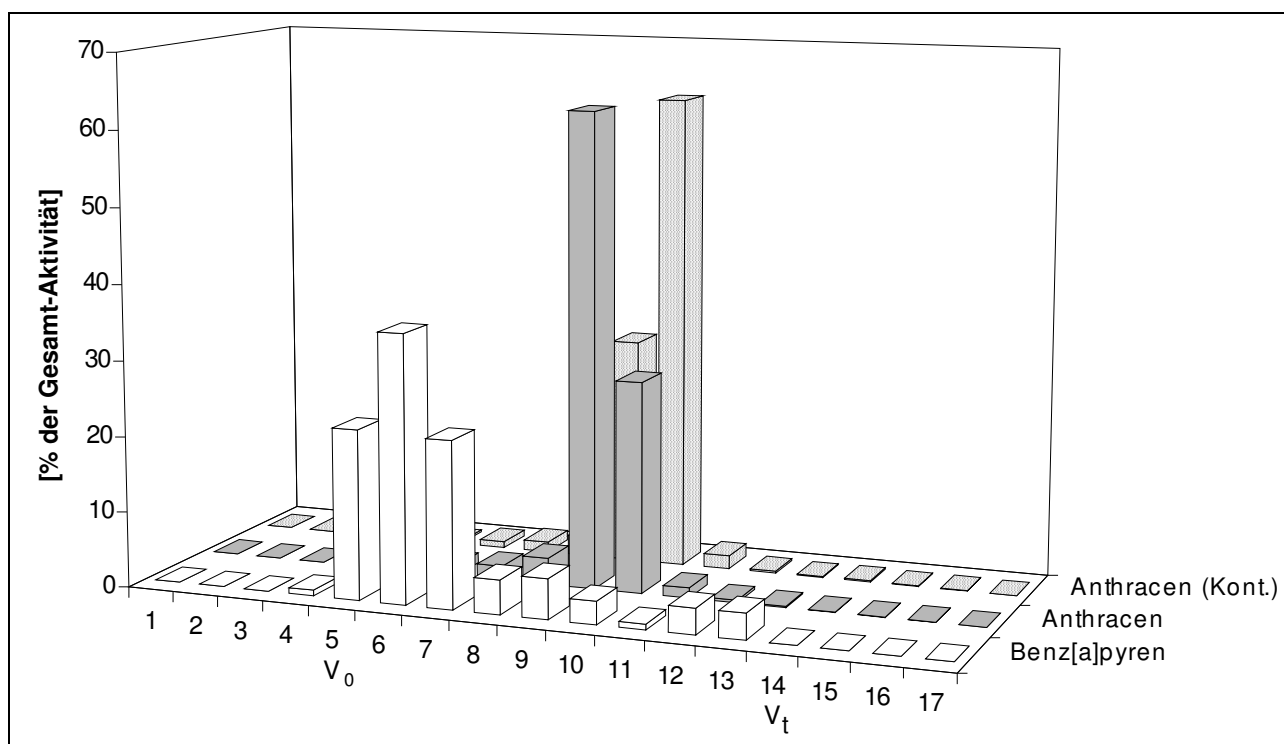


Abbildung 25: Gelchromatographische Trennung der radioaktiven Komponenten des Benz[a]pyrens (37 Tage)- und Anthracen (17 Tage)-Dichlormethanextraktes an Sephadex L15 durch Elution mit 100 % Methanol. Säulendimension 18 x 1,5 cm, Fließgeschwindigkeit 1,5 ml · min⁻¹. Elutionsvolumen normiert auf das auf das Ausschlußvolumen V_0 ; V_t Bettvolumen der Säule; Kont.=Kontrolle

Im Fall des Benz[a]pyrens eluierten die Transformationsprodukte nach der Gelchromatographie kurz nach dem Ausschlußvolumen der Säule. Es handelte sich daher um höhermolekulare Verbindungen als die Ausgangssubstanz Benz[a]pyren. Die Fraktionen mit der Hauptaktivität wurden eingengt, getrocknet und siliert. Im Fall des Benz[a]pyrens waren im GC-Chromatogramm keine isolierten Peaks darstellbar.

Es wurde eine weitere Auftrennung der Aktivität der gelchromatographisch gereinigten, aktiven Fraktionen an einer HPLC-C18-Nukleosil-Säule unternommen. Die drei benachbarten radioaktiven Fraktionen, wurden zusammengefaßt, siliert und am GC-MS ausgewertet. In der Abbauprobe des Anthracens wurden eine Reihe von aromatischen Substanzen identifiziert, die als Metaboliten in Frage kommen konnten. Die mengenmäßig wichtigste

Substanz war Anthrachinon (Abbildung 26). Diese Substanz war weder in der Kontrolle ohne Pilz noch in der Kontrolle mit Pilz ohne Anthracen vorhanden (Anhang, A22, Abbildung 12).

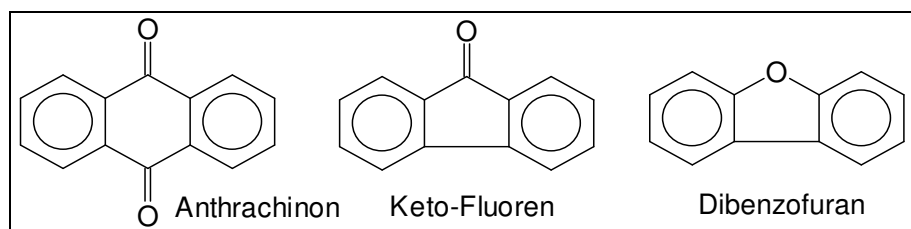


Abbildung 26: Identifizierte Substanzen in den Extrakten der Anthracen-Abbauansätze

Die Substanz eluierte mit dem Referenzstandard 9,10-Anthrachinon und konnte in dem Konzentrat, bezogen auf diesen Standard, maximal in einer Gesamtmenge von ca. 35 µg (in 1/10 der Probe) quantifiziert werden.

Mit geringer Signalintensität wurden in den Extrakten der Abbauproben folgende Substanzen anhand der Spektrenbibliothek identifiziert:

- Dibenzofuran: m/e 168 (100 %), 169 (12 %), 139 (34 %), 84 (10 %), das von der Spektrenbibliothek mit 97 % Wahrscheinlichkeit erkannt wurde.
- Keto-Fluoren mit den Massen: m/e 180 (100 %), 181 (14 %), 152 (39 %), 151 (20,5 %), 76 (19 %), das von Spektrenbibliothek mit 93 % Wahrscheinlichkeit identifiziert wurde.

Eine Substanz, die nicht eindeutig identifiziert werden konnte, obwohl sie in deutlichen Mengen im Extrakt sowohl nach 18 Tagen als auch 38 Tagen auftrat, wurde anhand der zwei relevanten Ionen 342 und 327 von der Spektrenbibliothek als ein Naphtalendicarbonsäure(anhydrid)-Derivat ausgegeben. Die Verhältnisse der deutlichsten Ionen betragen: m/e 73 (63 %), 261 (21 %), 327 (59 %), 342 (100 %), 401 (29 %), 445 (27 %), 460 (8 %). Die im Vergleich zum Bibliotheksvorschlag um m/e 118 höhere und damit höchste detektierte Masse dieses Peaks ließ sich nicht eindeutig erklären. Bei einer Abspaltung von HCOO-TMS (118) ergab sich mit der Summenformel $C_{22}H_{32}O_5Si_3$ keine schlüssige Molekülzusammensetzung.

Desweiteren wurde in den silierten Abbauproben 3,4-Dihydroxy-TMS-Cinamylsäure-TMS-ester mit den Ionen 396 (100 %), 381 (22 %), 307 (12 %), 219 (73 %), 191 (11 %), einem Molekulargewicht von 396 und der Summenformel ($C_{18}H_{32}O_4Si_3$) gefunden (Abbildung 27).

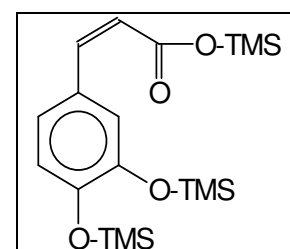


Abbildung 26: Cinamylsäurederivat

Erstaunlich war ein deutlich höherer Gehalt an Veratrylalkohol in den Abbauextrakten. Diese Substanz, die im Sekundärmetabolismus von *Phanerochaete chrysosporium* wie offensichtlich auch von *Pleurotus ostre-*

atus produziert wurde, konnte in den Pilzkontrollextrakten mit nur 1/20 der Konzentration der Abbauprodukte beobachtet werden. Desgleichen wurden die verschiedenen Reduktionsstufen des Methoxy-Hydroxybenzoats in den Proben detektiert. In der über HPLC aufgereinigten, radioaktiven Fraktion war dabei das 3-Methoxy-4-TMS-Oxo-Benzaldehyd angereichert: m/e 73 (29 %), 165 (8 %), 194 (100 %), 209 (47 %), 224 (28 %), während die entsprechende Säure und der Alkohol in weiteren Fraktionen analysiert werden konnten.

Im zeitlichen Verlauf des Auftretens der besprochenen Metaboliten war nach dem ersten Erscheinen nach zwei Wochen, sowohl bei Anthrachinon, wie auch bei den in Spuren nachgewiesenen Substanzen Dibenzofuran und Keto-Fluoren bis zur zehnten Inkubationswoche eine stetige Abnahme zu beobachten. In den letzten Extrakten, nach 73 Tagen, konnten weiterhin Anthrachinon und geringere Mengen des nicht identifizierten Peaks mit den Massen 342, 460 identifiziert werden.

Eine halbquantitative Bestimmung (Ausbeute der beiden Aufreinigungsschritte wurde willkürlich mit 80 % angenommen) der Anthrachinongehalte aus den Extrakten der Dichlormethanfraktion innerhalb der ersten Inkubationswochen ergab, daß ca. 35-40 % der eingesetzten Substanzmenge im Ansatz in Anthrachinon umgewandelt worden war. Bis zur zehnten Wochen-Analyse sank dieser Anteil auf unter 15 % (Abbildung 28). Da der Anteil an Radioaktivität in der unpolaren Fraktion nach 17 Tagen bei 60 % lag, ist das Vorhandensein von weiteren Metaboliten mit ca. 20-25 % der Aktivität möglich.

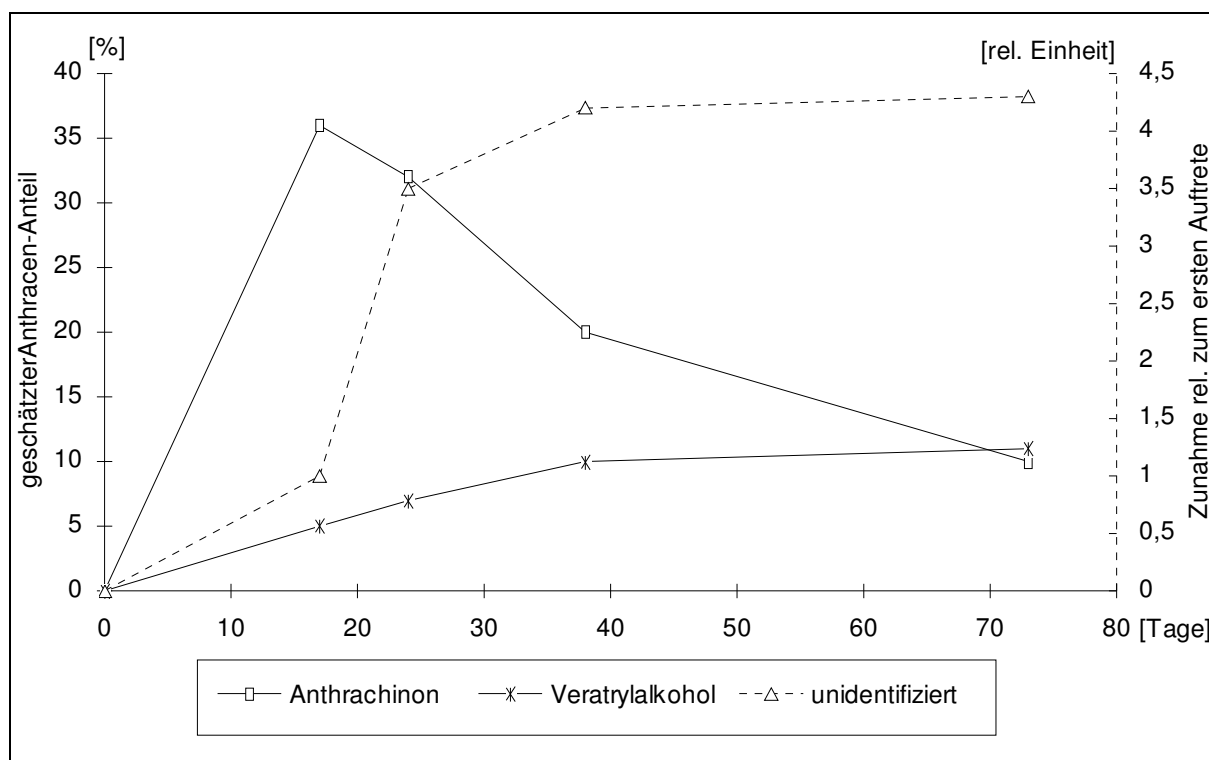


Abbildung 28: Zeitliche Entwicklung von Anthrachinon und dem möglicherweise ebenfalls als Anthracen-Abbauprodukt gebildeten Metaboliten Veratrylalkohol. Linke Scala für Anthrachinon und Veratrylalkohol als geschätzter Anteil der Ausgangskonzentration von Anthracen, rechte Scala in relativen Einheiten des unidentifizierten Produkts als vielfaches der Fläche des ersten Auftretens.