

4. DISKUSSION

4.1. POLYCYCLISCHE AROMATISCHE KOHLENWASSERSTOFFE (PAKS)

4.1.1. PAK-Abbauuntersuchungen

In der vorliegenden Arbeit konnte die Abbaubarkeit von PAKs durch Weißfäulepilze gezeigt werden. Sowohl niederkondensierte als auch hochkondensierte PAKs wurden im Festphasensystem innerhalb von 51 Tagen zu über 89 % abgebaut. Ein vergleichbar hoher Abbauerfolg ist in solchen Systemen bisher nicht erreicht worden.

In Flüssigkultur ist ein 70-100%iger Abbau von maximal Vier-Ring-PAKs durch *Phanerochaete chrysosporium* innerhalb von 27 Tagen beschrieben worden (BUMPUS 1989). Vom selben Pilz in Flüssigkultur konnte Benz[a]pyren innerhalb von 30 Tagen zu knapp 10 % mineralisiert werden (BUMPUS et al. 1985). Der beste Abbau in einem solchen System wurde durch einen *Bjerkandera*-Stamm mit einer Abnahme von 85 % innerhalb von 28 Tagen erreicht (FIELD et al. 1992). Das gleiche Abbauergebnis konnte durch Fermentation von PAK-kontaminierten Holzspänen durch verschiedene Weißfäulepilze erreicht werden. Nach fünf bis acht Wochen Inkubation mit *Pleurotus ostreatus* ssp. *florida* betrug die Abnahme der PAK-Summe auf Holz 80-89 %, der Abbau des Benz[a]pyren 99 %. Dabei handelte es sich um ein Gemisch verschiedener Kondensierungsgrade, das durch Extraktion eines Gaswerksbodens erhalten worden war.

Die PAKs wurden unabhängig von ihrem Kondensierungsgrad abgebaut. Es konnten aber zwei bis drei Gruppen von PAKs ermittelt werden, die unterschiedliche Abbauraten aufwiesen. Zur Gruppe der schnell abbaubaren PAKs (in Tabelle 32 mit "+++" bezeichnet) zählten Acenaphthen, Fluoren, Benz[a]pyren, Benz[a]anthracen und Pyren, die bei Inkubation mit *Pleurotus ostreatus* jeweils nach 17 Tagen zu über 75 % abgebaut wurden. Eine Übergangsguppe (++) bildeten Phenanthren und Fluoranthren, die anfänglich langsamer metabolisiert wurden, nach 51 Tagen aber ebenfalls Restgehalte unter 10 % aufwiesen. Die Gruppe der langsamer abbaubaren Substanzen (+) Dibenz[ah]anthracen, Chrysen, Benz[b+k]fluoranthren, Indeno[123-cd]pyren und Benz[e]pyren zeigten nach 51 Tagen Inkubation noch Restgehalte zwischen 10 und 34 %. Im Screening ergab sich die Zuordnung von Perylen zur Gruppe der schwerer abbaubaren PAKs. Im Ergebnis des Screenings nahm Chrysen im Mittel der untersuchten Weißfäulepilze eine Sonderstellung ein, da einige Pilze diese Substanz gar nicht angreifen konnten. Leichter abbaubar waren Perylen und in der Folge Benz[a]pyren, Pyren und Anthracen.

Die Abfolge der Abbaubarkeit ist derzeit schwierig zu interpretieren. Sie entsprach weder dem Kondensationsgrad noch der Wasserlöslichkeit, noch dem Ionisationspotential der

Substanzen. So konnte Phenanthren mit einem IP von ca. 8,1 eV weit besser abgebaut werden als Chrysen oder Benz[e]pyren mit niedrigerem Ionisationspotential.

Das Grenz-Ionisationspotential, bei dem extrazelluläre Ligninperoxidase *in vitro* noch den Abbau von PAKs bewirken kann, beträgt 7,55 eV (HAMMEL et al. 1986), bei Meer-

Tabelle 32: Vergleich der Ionisationspotentiale, der Transformation durch Meerrettichperoxidase HP (CAVALIERI & ROGAN 1985) und Ligninperoxidase LiP (HAMMEL et al. 1986) *in vitro*, sowie der Wasserlöslichkeiten (ca. von FUTOMA et al. 1981) verschiedener kondensierter (K: Anzahl der Ringe) PAKs; n.b. nicht bekannt.

	Abbaugruppe	K	IP[eV]	HP	LiP	WL [$\mu\text{g/l}$]	Struktur
Phenanthren	++	3	8,19	-	-	1000	
Chrysen	+	4	7,8	-	-	4	
Benz[e]pyren	+	5	7,62	-	-	n.b.	
Benz[a]anthracen	+++	4	7,54	-	+	10	
Pyren	+++	4	7,5	-	+	130	
Anthracen	+++	3	7,43	-	+	75	
Benz[a]pyren	+++	5	7,23	+	+	4	
Perylen	+	5	7,06	n.b.	n.b.	0,4	
Acenaphthen	+++	3				3470	
Fluoranthen	++	4	alle	n.b.		260	
Benz[b/k]fluoranthen	+	5				1,2/0,55	

rechtichperoxidase 7,3 eV (CAVALIERI & ROGAN 1985). Es ergibt sich eine tendenzielle Übereinstimmung der Abbaubarkeit der PAKs im Festphasensystem mit der Abbaubarkeit der PAKs durch Ligninperoxidase *in vitro*. Soweit bestimmt, sind alle durch dieses Enzym abbaubaren PAKs auch im Festphasensystem schnell (+++) umsetzbar (HAMMEL et al. 1986). Bei der Betrachtung der Ionisationspotentiale von PAKs ergab sich daher ein Hinweis auf die langsamer abbaubaren Substanzen. So hatten Chrysen und Benz[e]pyren auf Holzspänen mit maximalen Abbauraten von 2 bzw. 1,4 % pro Tag (zweite bis vierte Inkubationswoche) mit 7,65 bzw. 7,8 eV ein höheres Ionisationspotential als Benz[a]anthracen, Pyren, Anthracen und Benz[a]pyren mit einem IP von 7,2 bis 7,55 eV und Abbauraten von über 3 %/Tag. Sowohl Phenanthren als auch Perylen gliedern sich nicht in dieses Schema ein, nehmen aber in bezug auf ihre Wasserlöslichkeit Sonderstellungen ein. Möglicherweise wird Phenanthren trotz hohem IP wegen der hohen Wasserlöslichkeit gut abgebaut und Perylen trotz niedrigem IP wegen der geringen Wasserlöslichkeit dagegen schlecht. Letztlich ist die schwere Abbaubarkeit des Vierring-PAKs Chrysen weder durch die Struktur (nicht symmetrisch) noch durch die bekannten physikalisch-chemischen Eigenschaften monokausal erklärbar.

Eine vergleichbare Reihenfolge der Persistenz der PAKs konnte bei Abbauuntersuchungen von Mykorrhizapilzen in Flüssigkultur beobachtet werden (HÜTTERMANN et al. 1993). Dies

läßt auf noch nicht geklärte allgemeine Eigenschaften der Substanzen schließen und macht eine speziell Weißfäulepilze betreffende, physiologische Erklärung dieses Sachverhalts unwahrscheinlich. Chrysen ist in keiner der Untersuchungen von Weißfäulepilzen und PAKs eingesetzt worden, und die "relative Persistenz" dieser Verbindung ist bisher nirgendwo beschrieben.

In der Literatur wurden Vergleiche verschiedener Weißfäulepilze vor allem hinsichtlich ihrer Ligninabbaufähigkeit (AGOSIN et al. 1985, BLANCHETTE 1984, OTJEN & BLANCHETTE 1987, WALDNER et al. 1988), der Produktion von Exoenzymen oder in bezug auf die Weiterverwertbarkeit lignocellulosehaltiger Abfälle (MÜLLER & TRÖSCH 1986, ZADRAZIL 1985) angestellt. Einige Arbeiten behandeln den Abbau von Xenobiotika durch mehrere Pilze (FIELD et al. 1992, GALENO & AGOSIN 1990, MORGAN et al. 1991, TROJANOWSKI & HÜTTERMANN 1987, SACK et al. 1992) oder mit mehreren Stämmen einer Art (*Phanerochaete*, Lamar 1990c). Obwohl in einigen Publikationen auch die Abbaubarkeit von PAKs durch verschiedene Weißfäulepilze untersucht wurde, liegen systematisch vergleichende Screeningversuche zum PAK-Abbau mit verschiedenen Kondensierungsgraden und strukturisomeren Substanzen, insbesondere im Festphasensystem, nicht vor.

Es wurde daher der Abbau eines aus drei Ringen kondensierten PAKs, eines symmetrischen und eines unsymmetrischen Vierring-PAKs sowie von Benz[a]pyren und Perylen als Strukturisomere der Fünfring-PAKs, bestimmt. Benz[a]pyren diente aufgrund der hohen toxischen Relevanz zudem als Leitsubstanz zur Beurteilung des Abbaus. Die PAKs wurden auf Quarzsand aufgezogen und im System mit Stroh durch 49 verschiedene Pilze abgebaut. Die Auswahl der Pilzstämmen richtete sich nach folgenden Kriterien: Zunächst sollten Vertreter mit unterschiedlicher Enzymausstattung verglichen werden; desweiteren war die Variabilität innerhalb einer Art zu bestimmen. Die *Phanerochaete*-Stämme zeigten auf Stroh schlechteres Wachstum, wurden aber trotzdem in das Screening mit einbezogen, um Vergleichbarkeit mit Literaturdaten zu erhalten. Das Ergebnis des Screenings zeigt, daß fast alle Pilze den Abbau der PAKs herbeiführen können. Die Variabilität innerhalb der Gattung *Pleurotus* war für die leicht abbaubaren PAKs außerordentlich gering. Der geringe Abbau von vier der fünf *Phanerochaete chrysosporium*-Stämmen steht im scheinbaren Widerspruch zu den zahlreich in der Literatur publizierten Daten über diesen Pilz beim Abbau von Xenobiotika in Flüssigkultur unter Optimalbedingungen (39 °C, 100 % O₂). Da es in diesem Versuchsansatz darum ging, die praktische Einsatzfähigkeit der Pilze zu testen, war der thermophile Pilz *Phanerochaete* bei Raumtemperatur von vornherein suboptimal eingesetzt (KIRK et al. 1978). Zudem war die geringe Aktivität vermutlich darauf zurückzuführen, daß der Pilz auf Stroh statt im Flüssigmedium wuchs. Es wurde von KELSCHBACH (1991) gezeigt, daß mit dem Stamm *P. chrysosporium* ATCC 35540 in Flüssigkultur vergleichbare Abbauleistungen wie durch *Pleurotus ostreatus* erreicht werden können.

Es zeigte sich weiter, daß ein Zusammenhang zwischen dem Abbau der PAKs und der aus der Literatur bekannten Ausprägung spezieller Enzyme bei dem vorliegenden Screening im Festphasensystem nicht beobachtet werden konnte. Sowohl die Pilze, von denen die Bildung von Ligninasen bekannt ist, als auch *Pleurotus ostreatus* ssp. *florida*, der dieses Enzym nicht bildet (KEREM et al. 1992), zeigten vergleichbare Abbaueigenschaften. Die Gattung *Pleurotus*, bei der neben Laccasen nur die Bildung unspezifischer, Pyrogallol oxidierender Peroxidasen in geringen Mengen nachgewiesen werden konnte (PLATT et al. 1984), zeigte einen einheitlich hohen Abbau der PAKs. Aber es ist fraglich, in welcher Weise diese Enzyme am Abbau der PAKs beteiligt sind. Wie aus Tabelle 32 hervorgeht, "dürfte" *Phanerochaete chrysosporium* kein Phenanthren abbauen, weil die Ligninase *in vitro* dieses PAK nicht angreifen kann. *In vivo* ist dieser Abbau sehr wohl beschrieben (SUTHERLAND et al. 1991). Das gleiche gilt auch bei den hier untersuchten *Pleurotus*-Stämmen. Die aus ihnen isolierte Laccase war weder im wässrigen Puffer mit Tween noch immobilisiert auf Sepharose in 70 % Dioxan (nach MILSTEIN et al. 1989) in der Lage, selbst nach 24stündiger Inkubation, die PAKs abzubauen (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse zeigen, daß man bei der Suche nach neuen abbauaktiven Stämmen nicht das Vorhandensein einzelner Enzyme testen darf. Selbst ein summarischer Test, wie die Entfärbung von Poly-R 478 - von FIELD et al. (1992) zur Auswahl geeigneter Weißfäulepilze verwendet - läßt die vor allem Laccase sezernierenden Pilze unberücksichtigt (z. B. die Gattung *Pleurotus*; vergleiche auch CHET et al. 1985). Die von FIELD et al. (1992) für den PAK-Abbau ausgewählten Stämme zeigten aber vergleichbare Ergebnisse. So konnten die Weißfäulepilze *Trametes versicolor* und *Bjerkandera adusta* beim Abbau von Benz[a]pyren in Flüssigkultur den höchsten Abbau bewirken. *Bjerkandera adusta* wurde auch beim Abbau von Lignin und TNT eingesetzt und zeigte hohe Mineralisierungsraten (WALDNER et al. 1988, EILERS et al. 1993). Dieser Pilz scheidet in ähnlicher Weise wie *Phanerochaete chrysosporium* in der stationären Phase Arylalkohol oxidierende Enzyme aus, wobei auch H₂O₂ gebildet wird (MUHEIM et al. 1990). Die vorliegende Untersuchung bestätigt die prinzipielle Fähigkeit von *Bjerkandera adusta* zum Abbau von Aromaten, zeigte aber keine herausragenden Fähigkeiten im Vergleich mit den übrigen untersuchten Weißfäulepilzen.

Der Abbau von PAKs im Festphasensystem durch *Phanerochaete chrysosporium* ist von GEORG & NEUFELD (1989) untersucht worden. Sie beschreiben ein Bodenvorbehandlungsverfahren inklusive Sterilisation, das den Abbau von Fluoren bis zu 80 % ermöglicht. In einer anderen Arbeit zeigte die Inkubation von PAK-kontaminiertem Boden mit *Phanerochaete chrysosporium* dagegen nur geringe Abbauvorgänge (MCFARLAND et al. 1992), was die in dieser Arbeit beobachteten geringen Abbauraten der Schadstoffe durch diesen Pilz bestätigte. Zwar beschreibt MCFARLAND et al. (1992) bei einem Benz[a]pyren-kontaminierten Boden eine Abnahme des extrahierbaren Benz[a]pyrens in den ersten Tagen; diese trat jedoch auch in der nicht inkubierten Kontrolle auf. Nach 30 Tagen blieb die Konzentration an Benz[a]pyren im Boden mit *Phanerochaete chrysosporium* konstant, während die Kon-

trolle eine weitere Abnahme verzeichnete. Im Vergleich dazu sind die Abbauwerte auf Quarzsand mit der Mehrzahl der im Screening dieser Arbeit untersuchten Pilze bedeutend höher. Die entsprechenden Ergebnisse mit künstlich kontaminierten Böden erreichten ebenfalls einen hohen prozentualen Abbau (Benz[a]pyren max. 65 %), wenn auch eine deutliche Verminderung durch die letztendlich komplexere Matrix festgestellt werden mußte.

4.1.2. Metabolitenbildung, Anbindung und Toxizität beim PAK-Abbau

Die vorliegenden Untersuchungen zum Abbau von markierten PAKs haben eine Verteilung der eingesetzten Aktivität zwischen gebundenen Rückständen, stoffabhängiger Metabolitenbildung und Mineralisation, d. h. Entstehung von CO₂, ergeben. Die beiden untersuchten Substanzen Anthracen und Benz[a]pyren wurden mit vergleichbarer Rate mineralisiert. Diese betrug ab der 4. Woche 1,5-2 % der eingesetzten Aktivität pro Woche. Bedeutende Unterschiede zwischen den beiden Substanzen ergaben sich jedoch bei der Menge der gebundenen Aktivität. Während von ¹⁴C-Anthracen über die gesamte Versuchsdauer ein Anteil von 17-18 % der Aktivität auf den Holzspänen gebunden vorlag, wurde bei ¹⁴C-Benz[a]pyren mehr als doppelt so viel auf den Holzspänen festgelegt. Dieser Unterschied setzte sich bei der Bestimmung der extrahierbaren Aktivität fort. Im Fall von Anthracen wurde vorzugsweise Anthrachinon als Metabolit gebildet, während bei Benz[a]pyren keine Metaboliten gefunden wurden, sondern die Polymerisation der Ausgangssubstanz beobachtet werden konnte. Es ist zu vermuten, daß der nach der Oxidation von Benz[a]pyren gebildete Metabolit relativ schnell weiterreagiert und sowohl die Bildung von Polymerisationsprodukten, als auch die Anbindung an Komponenten der Matrix bevorzugt ist.

BRODKORB & LEGGE (1992) stellten bei Inkubation von ¹⁴C-Phenanthren-kontaminiertem Boden durch *Phanerochaete chrysosporium* je nach Vorbehandlung des Bodens starke Unterschiede zwischen Mineralisierung und Matrixanbindung fest. In vorsterilisiertem Boden bewirkte die Inkubation mit dem Weißfäulepilz keine nennenswerte Mineralisierung, dagegen eine Anbindung an die Matrix mit 40 % der eingesetzten Aktivität (3 Wochen). Im nicht sterilisierten Boden jedoch traten Mineralisierung und Anbindung in gleicher Größenordnung von knapp 40 % auf. Ein Zusammenspiel von Weißfäulepilzen und anderen Bodenmikroorganismen kann daher für die verschiedenen Endstufen des Abbaus von PAKs mitverantwortlich sein.

Auch in Flüssigkultur sind die Mineralisationsraten bei Inkubation mit verschiedenen Weißfäulepilzen von Phenanthren in Reinkultur (MORGAN et al. 1991) und mit Benz[a]pyren im Boden (MORGAN et al. 1993) sehr gering. Die Bildung verschiedener Phenanthrole bzw. trans-9,10-Phenanthrendihydrodiol aus Phenanthren, aber auch die Kopplung an Medienbestandteile wie Zucker durch glycosidische Bindung sind bevorzugte Reaktionen (SUTHERLAND et al. 1991). Die Bildung von Anthrachinon beim Abbau von Anthracen ist

auch bei den Weißfäulepilzen *Bjerkandera adusta* und *Phanerochaete chrysosporium* gefunden worden (FIELD et al. 1992). Daß auch beim Abbau von Anthracen durch *Pleurotus ostreatus* Anthrachinon gebildet wird, zeigt, daß sowohl Peroxidase- als auch Laccaseproduzenten vergleichbare Abbaumechanismen für Anthracen entwickeln.

Das Auftreten von Chinonen beim Abbau von Benz[a]pyren konnte, anders als mit reiner Ligninase des Pilzes *Phanerochaete chrysosporium* (HAEMMERLI et al. 1986b), weder in dieser Arbeit noch bei FIELD et al. (1992) bestätigt werden.

Durch die Messung hochpolymerer Aktivität beim Abbau von Benz[a]pyren konnte gezeigt werden, daß die Wirkung ein und desselben Enzymsystems auf verschiedene Substanzen sehr unterschiedlich sein kann. Möglicherweise entsteht beim Abbau von Benz[a]pyren zunächst ein Transformationsprodukt, welches notwendigerweise nicht so symmetrisch sein kann wie 1,6-Anthrachinon und das dann weiter polymerisiert. Diese erstmals gezeigte Polymerisationsreaktion eines PAKs durch Lignin abbauende Enzyme ist auch eine mögliche Erklärung für die in anderen Systemen gefundenen hohen Anteile an gebundenen Rückständen.

Die Anbindung der PAKs an die Matrix konnte durch keine Aufschlußmethode gelöst werden - ein Beweis dafür, daß diese über kovalente Bindungen erfolgt.

Beim Einsatz von Weißfäulepilzen ist auf Grund der bekannten Enzymreaktivität mit einer erhöhten Möglichkeit des Auftretens solcher Anbindungsvorgänge im Prinzip zu rechnen, da das den Abbau verursachende Enzymsystem ungerichtete radikalische Vorgänge in Gang setzt. Schon FREUDENBERG (1965) hatte gezeigt, daß die Polymerisation der Ligninbausteine enzymatisch durch Laccase / Sauerstoff bzw. Peroxidase und H_2O_2 erreicht werden kann. Im Boden sind Laccasen in hohem Maße bei der Huminstoffbildung beteiligt (FILIP & PREUSSE 1985). Peroxidasen und Laccase sind aber auch in die Abbauprozesse der Weißfäulepilze involviert, das bedeutet, daß sowohl die Polymerisation wie der Abbau von den gleichen Enzymen gesteuert wird. Eine Einteilung, nach der der Laccase polymerisierende und Peroxidasen abbauende Eigenschaften zugeschrieben wird, scheint nur begrenzt zuzutreffen, da die oxidative Wirkung der Enzyme gleich sein kann (KERSTEN et al. 1990). Zudem ist auch die aus *Phanerochaete chrysosporium* isolierte Ligninase befähigt, *in vitro* Lignineinheiten zu polymerisieren (HAEMMERLI et al. 1986a).

Es wird inzwischen vermutet, daß die Vorgänge, die beim Ligninabbau *in vivo* stattfinden, nicht geradlinig sind, sondern in Zyklen ablaufen müssen, wobei sich Abbau- und Polymerisierungsreaktionen abwechseln und ergänzen können (SARKANEN et al. 1991, HARVEY & PALMER 1990, SCHOEMAKER et al. 1991, EICHHORN & HÜTTERMANN 1993).

Dies wird durch die Tatsache unterstützt, daß bei der Verwendung der zellfreien Enzyme eines Organismus andere Ergebnisse beim Abbau von Xenobiotika erhalten werden als beim Einsatz des gesamten Organismus (DAVIS & BURNS 1990). Das Vorhandensein der Zellmembran und weiterer daran gebundener Enzyme bzw. des daran gebildeten Gradienten scheint beim Abbau der aromatischen Strukturen unerlässlich. Physiologisch verständlich

sind diese anscheinend widerstreitenden Mechanismen, wenn man berücksichtigt, daß phenolische Aromaten immer auch ein toxisches Potential besitzen und die Organismen die Möglichkeit haben müssen, dem Überhandnehmen dieser Giftstoffe (durch Polymerisation) entgegenzuwirken (FILIP & PREUSSE 1985).

Welcher Prozeß *in vivo* überwiegt, wird durch die Lage des Gleichgewichts innerhalb eines dynamischen Polymerisations-/Depolymerisations-Systems bestimmt. Möglicherweise sind an dieser Steuerung weitere Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels beteiligt (SCHOEMAKER et al. 1991). Im Fall des Weißfäulepilzes *Phanerochaete chrysosporium* wird auch berichtet, daß der relative Anteil von Mineralisation und Polymerisation über das Vorhandensein von Mangan gesteuert wird (PEREZ & JEFFRIES 1992). Zur Problematik der Zuordnung von lignolytischen Eigenschaften der Weißfäulepilze und Enzymausprägungen seien SARKANEN et al. (1991) zitiert: "Offensichtlich ist die Frage, welches Enzym letztlich für die Depolymerisation *in vivo* verantwortlich ist, heute ebensowenig geklärt, wie vor der Entdeckung der Lignin-Peroxidase (des Weißfäulepilzes *Phanerochaete chrysosporium*) 1983".

Die Prozesse der Steuerung des Lignin-Auf- und Abbaus ähneln enzymatisch auffällig dem Gleichgewicht von Huminstoffbildung und -abbau (SJOBLAD & BOLLAG 1981, HAIDER & MARTIN 1988, EICHORN & HÜTTERMANN 1993). Die für sie typischen Enzyme sind auch im Boden anzutreffen. Sie werden entweder als Exoenzyme oder nach Autolyse der Organismen an Humus stabilisiert (BURNS 1978, KHAZIYEV & GULKO 1990) und können dort abgetrennt vom Organismus wirken (SUFLITA & BOLLAG 1981, BOLLAG et al. 1980). Es ist daher nicht ausgeschlossen, daß der Prozeß der Festlegung des Benz[a]pyrens dem der Humifizierung entspricht.

Für die Stoffklasse der PAKs ist die Unterscheidung zwischen gebundenen und abgebauten Anteilen der Ausgangssubstanz nicht in dem Maße relevant wie für chlorierte Verbindungen, da auch eine Polymerisation an organischem Material einer Dekontamination gleichkommt.

Wichtig ist das toxische Potential der Abbauprodukte, das eine Aussage darüber liefern kann, ob die gemessenen Stoffabnahmen einer wirklichen Entgiftung der Matrix entsprechen. Da die Bildung von Chinonen z. B. im Fall des Pyrens eine Erhöhung der mutagenen Toxizität darstellen kann (KÄSTNER et al. 1993), muß in jedem Fall eine Kontrolle des Abbaus über Toxizitätstests erfolgen.

Dieses wurde im Fall des PAK-Abbaus auf Holzspänen mit dem Ames-Test, sowie dem Leuchtbakterientest untersucht. Der Ames-Test stellt das Mutagenitätsrisiko des Bodenextrakts dar und ermöglicht damit Aussagen über die mutagenen PAKs (vor allem Benz[a]pyren). Da die Proben sowohl mit als auch ohne Leberextrakt getestet wurden, ist eine Aussage über mögliche Aktivierung (bei PAKs sind dies Hydroxylierungen) durch Weißfäulepilze möglich. Eine solche Aktivierung war nicht zu beobachten, vielmehr nahm die Mutationsrate durch Inkubation mit *Pleurotus ostreatus* ab. Der Leuchtbakterientest bestätigte diese Entgiftung durch deutlich meßbare Minderung der akuten Toxizität.

4.2. ABBAU VON POLYCHLORIERTEN BIPHENYLEN

PCB-kontaminierte Holzspäne (hauptsächlich drei- und vierfach chlorierte Biphenyle) konnten unter verschiedenen Bedingungen und von mehreren Weißfäulepilzen innerhalb von sechs Wochen zu über 95 % abgebaut werden. Nachträgliches Untermischen von Lehmboden im gleichen System beeinträchtigte den Abbau der PCBs nicht. Auf Boden adsorbierte PCBs konnten zu über 50 % abgebaut werden. Trotz Boden-Vorbehandlung (Rührprozeß und Tensidaufschluß) war ein vergleichbar hoher Abbau wie in den beiden anderen Systemen nicht zu erhalten.

In einem bakteriell vorgereinigten Boden des Großprojekts "Sanierung des Pintsch-Geländes" konnten die PCB-Kontaminationen, die nach zweijähriger Off-site-Sanierung (Mieten) noch im Boden verblieben waren (hauptsächlich Kongenere mit mehr als drei Chloratomen), im Bereich der Tri-, Tetra- und Pentachlorbiphenyle weiter reduziert werden. Für die meisten Trichlorbiphenyle erreichte der Abbau Werte unterhalb der Nachweisgrenze. Hochchlorierte PCBs (Penta- und Hexachlorbiphenyle) wurden in diesem Boden durch den Pilz nur teilweise abgebaut.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die biologische Entsorgung schwerst abbaubarer Substanzen im Festphasensystem durch Weißfäulepilze möglich ist, wenn ein enger Kontakt von Schadstoff und Pilz vorhanden ist. Durch den Einsatz der Weißfäulepilze ist somit eine nicht thermische, biologisch sehr wirksame Entsorgung sowohl von (z. B. Boden-) Extrakten als auch - unter günstigen Bedingungen - des Boden selbst, möglich. Eine Feststoff-Fermentation von PCBs ist in dieser Form bisher nicht beschrieben, Kompostierungsversuche mit 2,2'-Dichlorbiphenyl kontaminiertem Material führte zu DiCB-Restgehalten von 98 % (MÜLLER et al. 1974).

Für den bakteriellen Abbau von PCBs gibt es zwei prinzipiell getrennte Wege. Der aerobe Abbau, meist mit Biphenyl als zugefügter C-Quelle, steht der anaeroben Dechlorierung hochchlorierter PCBs gegenüber, wie sie sich natürlicherweise auch in Sedimenten ereignet. Der erste Abbaumechanismus bevorzugt im allgemeinen niederchlorierte Biphenyle und reichert PCBs mit einem Chlorgehalt höher als drei an. Anaerobe Dechlorierung führt zu niedrig chlorierten PCBs. Diese beiden Vorgänge, verbunden mit der erhöhten Ausgasungstendenz der einfach und zweifach chlorierten PCBs, haben ein verstärktes Auftreten von PCBs mit Chlorierungsmustern zwischen drei und fünf Chloratomen pro Biphenyl in belasteten, sich selbst belassenden Böden zur Folge (BROWN et al. 1987). Die anaerobe Dechlorierung von PCBs konnte in Sedimenten verschiedener Flüsse und durch eine Reihe natürlicher Bakterienpopulationen bewirkt werden (ABRAMOWICZ 1990). Im Labor konnte die Bildung von 2-CB, 2,2'-DiCB und 2,6-DiCB als Endprodukte der Dechlorierung durch anaerobe Bakterien beobachtet werden (BEDARD 1990).

Eine Reihe von Bakterien ist zum aeroben Abbau von Mono- und Dichlorbiphenylen befähigt; einzelne Bakterienstämme konnten aerob auch drei- bis vierfach chlorierte Biphe-

nyle im Kometabolismus mit unchloriertem Biphenyl abbauen (ABRAMOWICZ 1990, BEDARD et al. 1983). Zudem sind Spezialstämme wie *Pseudomonas* strain LB400 und *Acinetobacter* Stamm P6 isoliert worden, die auch aerob mehrfach chlorierte Biphenyle bis hin zu den Hexachlorbiphenylen abzubauen in der Lage sind (BOPP 1986, KOHLER et al. 1988).

Bakterien bevorzugen beim Abbau von PCBs bestimmte Chlorierungsmuster (FAVA et al. 1991). Dioxygenasen aus *Acinetobacter* und *Corynebacterium* MB1 vermögen planare und einfach ortho-chlorierte Biphenyle abzubauen (z. B. 4,4'-DiCB, 2,4,4',5-TetraCB), nicht dagegen mehrfach ortho-chlorierte PCBs oder solche, die keinen freien o-m-Abschnitt aufwiesen. Dagegen wurde für die Klasse der Dioxygenasen aus *Alcaligenes eutrophus* H850 und *Pseudomonas* spec. LB400 eine deutliche Bevorzugung des Abbaus von ortho-chlorierten Biphenylen festgestellt, mit Abbaubehinderung bei para-chlorierten PCBs (BEDARD 1990).

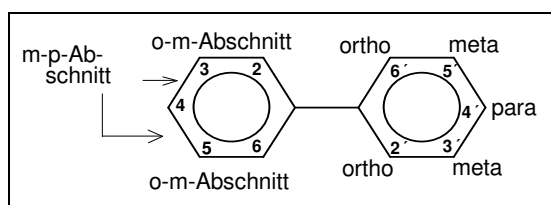


Abbildung 57: Chlorierungspositionen und Abschnittsbezeichnung des Biphenyl-Grundkörpers.

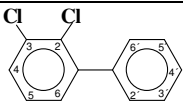
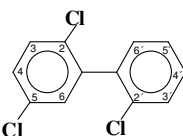
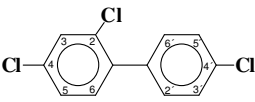
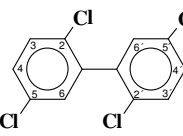
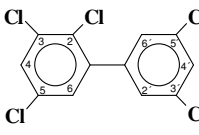
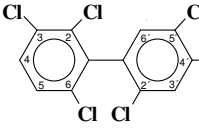
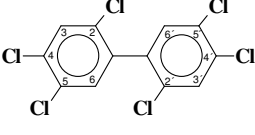
Weißfäulepilze zeigten ebenfalls Unterschiede beim Abbau von PCB-Isomeren, die dem Chlorierungsmuster zugeordnet werden können. Betrachtet man die Chlorbindungsstellen der "relativ persistenteren" PCBs aus den verschiedenen Versuchen mit *Pleurotus ostreatus* und *Trametes versicolor*, so läßt sich erkennen, daß die Belegung beider para-

Bindungsstellen (damit aller m-p-Abschnitte, siehe Abbildung 57) durch 4,4'-Chlorierung eine Verminderung des Abbaus bewirkt hat. Ähnliches trifft auch für die Belegung aller o-m-Abschnitte des Biphenylringes durch mindestens ein Chloratom zu.

Diese strukturellen Restriktionen des Abbaus durch das Chlorierungsmuster waren bei den in der Arbeit untersuchten Weißfäulepilzen bei weitem nicht so ausgeprägt, wie es bei Bakterien der Fall ist. Dies wird in Tabelle 31 verdeutlicht, wo, angelehnt an eine Einteilung von BEDARD et al. (1986), an Hand von sechs ausgesuchten PCB-Isomeren der Abbau von *Pleurotus ostreatus* mit dem von zwei typischen Bakterienstämmen verglichen wird. Mit Ausnahme von Gruppe G, wies keine der unterschiedenen Gruppen eine absolute Persistenz nach Inkubation mit Weißfäulepilzen auf. Die PCBs der Gruppe C bzw. D wurden deutlich langsamer abgebaut als vergleichbare PCB-Isomere der Gruppe A oder B. Dies führte im Falle der Tetrachlorbiphenyl-Isomere zu einer breiten Spanne zwischen 100-70 % Abbau. Erst PCBs mit 2,2',4,4',5,5'-Muster besitzen auf keinem der beiden Ringe des Biphenyls freie C-C-Ringbindungen. Sie sind damit sehr schwer abbaubar und konnten auch in anderen aeroben biologischen Modellsystemen bisher nur von wenigen Spezialisten angegriffen werden. Zusammen mit der sterische Hinderung des mehrfach ortho-substituierten Biphenyls brachte dies den Abbau durch Weißfäulepilze zum Erliegen.

Interessanterweise reichte allein das Vorhandensein einer freien para- oder meta-Seite des Biphenylgerüsts (BSZ 149, 171, 177) aus, um trotz hoher Chloratomanzahl und sterischer Hinderung einen deutlichen Abbau zu ermöglichen. Diese Beispiele zeigen die grundsätzlich unterschiedlichen Strategien, die die verschiedenen Organismen-Gruppen einsetzen. Bei Bakterien sind auf Grund der spezifischen Enzymreaktion manche PCB-Isomere nicht abbaubar, während bei den Pilzen im Bereich bis Pentachlorbiphenyl alle Substanzen unspezifisch angegriffen werden können. Für den Fall, daß der Abbau, wie postuliert, über radikalische Überträgermoleküle initiiert wird, scheint eine nicht chlorierte Seite des Biphenylrings für die Eliminierung des Elektrons notwendig zu sein.

Tabelle 31: Chlormuster und Numerierung verschiedener PCBs nach BALLSCHMITTER & ZELL (1980). Sie werden angeführt als Beispiel für die an BEDARD et al. (1986) angelehnte Gruppierung der Abbaubarkeit der PCBs anhand des Chlormusters. Weiter aufgeführt ist der prozentuale Abbau der PCB-Kongeneren nach vierwöchiger Inkubation von PCB-kontaminiertem Holz mit dem Weißfäulepilz (WP) *Pleurotus ostreatus* im Vergleich mit den Abbaumöglichkeiten der Bakteriellen: *Corynebacterium* sp. MB1 und *A. eutrophus* H850 in den Abbau-Bereichen 0 (kein Abbau), 1 (<20 %), 3 (20-39 %), 5 (40-59 %), 7 (60-79 %) und 9 (80-100 %) nach BEDARD et al. (1986 und 1983).

Beispielisomere			Abbau durch		
chem. Formel	Name/Abkürz.	Beispiel für	WP	MB1	H850
	2,3-Dichlorbiphenyl (5)	Gr. A: ein freier Ring	99 %	9	9
	2,2',5-Trichlorbiphenyl (18)	Gr. B: sowohl ein m-p-, als auch ein o-m-Abschnitt ist frei	97 %	5	9
	2,4,4'-Dichlorbiphenyl (28)	Gr. C: kein freier m-p-Abschnitt	84 %	9	5
	2,2',5,5'-Tetrachlorbiphenyl (52)	Gr. D: keine freier o-m-Abschnitt	70 %	0	9
	2,3(4),3',5,5'-Pentachlorbi.--> BSZ 111	Gr. E: kein unchlorierter C-C-Abschnitt, keine sterische Behinderung	54 %	9	0
	2,2',3,4',5',6-Hexachlorbi.--> BSZ 149	Gr. F: mehr als zwei ortho-Chloratome, jedoch ein freier m-p-Abschnitt	14 %	5	0
	2,2',4,4',5,5'-Hexachlorbi.--> BSZ 153	Gr. G: keine freien Biphenylabschnitte, sterische Behinderung	0 %	0	1

Der Einsatz von Bakterien im Boden gestaltet sich im allgemeinen schwierig. Durch Zugabe von Nährsalzen konnte z. B. der Abbau in einem kontaminierten Boden durch autochthone Bakterien gesteigert werden, so daß einige auch vierfach chlorierte PCB-Kongenerne deutlich abgebaut wurden (FIEBIG et al. 1993).

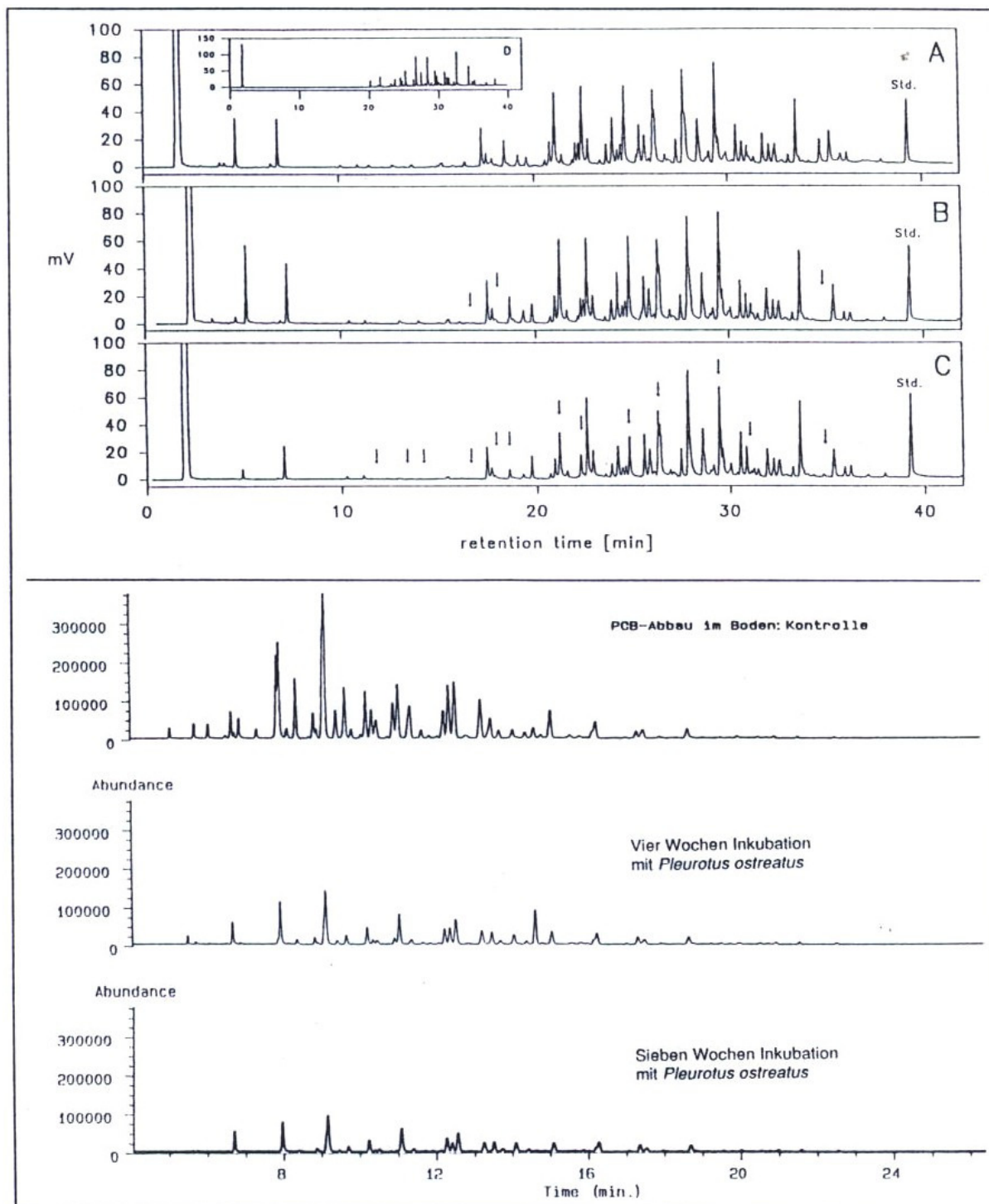


Abbildung 58: Aerober Abbau von polychlorierten Biphenylen in einem kontaminierten Boden durch Berieselung mit einer Nährsalz-Vitaminlösung: C; A: unbehandelter Boden, B: Berieselung mit Leitungswasser, D: 10 ppm Clophen A 60, Std.: interner Standard, ↓ abgebaute PCB-Kongenerne (nach FIEBIG 1993), im Vergleich mit dem Abbau durch Weißfäulepilze (untere beide Chromatogramme).

Ein Vergleich des aeroben Abbaus durch Bakterien und dem durch Weißfäulepilze zeigt die starken Unterschiede in der Selektivität der abbauenden Mechanismen (Abbildung 58).

Im Boden wurden Versuche zum Abbau der PCBs mit den in den Laborversuchen erfolgreichen Stämmen *Acinetobacter* P6 (BRUNNER et al. 1985) und *Corynebacterium* MB1 (UNTERMANN et al. 1988) unternommen. Bei der Verwendung von ¹⁴C-markierten Gemischen von Arochlor 1242 (hauptsächlich Trichlorbiphenyle) konnten keine Mineralisierungen über 3 % der eingesetzten Aktivität festgestellt werden (BRUNNER et al. 1985). Erst durch Zugabe von Biphenyl als Substrat waren deutliche Mineralisierungsraten von 20 % zu erhalten.

Die Adaptation von speziell gezüchteten Mikroorganismen an einen Boden ist schwierig. So überlebte der Stamm *Pseudomonas* (LB400) im Boden lediglich zwei Tage. Dreimal pro Woche mußte daher eine Beimpfung des Bodens erfolgen, um die Bakterien auf der zum Abbau erforderlichen Besiedlungsdichte zu halten; dennoch wurden nur 25 % der PCBs in einer Schicht von 1 cm eines ungestörten Bodens und 19 % der PCBs in den oberen 15 cm eines gut durchmischten Bodens abgebaut (UNTERMAN et al. 1988). Man hat versucht, durch Gentransfer die Abbaufähigkeit vom *Pseudomonas* Stamm LB400 auf andere Bodenbakterien zu übertragen und dadurch die Überlebensfähigkeit des abbauenden Systems zu steigern (ABRAMOWICZ 1990). In neueren Untersuchungen ist Arochlor 1242 im Boden durch verschiedene Bakterienstämme nach Zugabe von Biphenyl (300 mg/kg) bis maximal 32,5 % abgebaut worden (22,7 % in den Kontrollen ohne Inokulum); ferner wird berichtet, daß durch einzelne Stämme die PCBs zu 25 % (Kontrollen 3 %) mineralisiert wurden (HICKEY et al. 1993). Dennoch scheint die Möglichkeit, Bakterien zur Reinigung von PCB-kontaminierten Feststoffen einzusetzen, nicht praktikabel zu sein, da hohe Mengen an Biphenyl zugeführt werden müssen.

Der Abbau von PCBs durch Weißfäulepilze wurde schon 1985 für die Stämme *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia brevispora*, *Coriolus versicolor* u. a. untersucht. Es konnte beobachtet werden, daß *Phanerochaete chrysosporium* in Flüssigkultur fähig ist, 250 ppb eines ¹⁴C-markierten Arochlor 1254 zu mehr als 10 % in CO₂ zu mineralisieren; dabei wurden die Ausgangssubstanzen nahezu vollständig transformiert. Die übrigen Weißfäulepilze mineralisierten das zugesetzte PCB in dieser Versuchsanordnung nicht (EATON 1985). Auch in höheren Konzentrationen ließen sich in Flüssigkultur 2-Chlorbiphenyl und 2,2',4,4'-Tetrachlorbiphenyl durch den Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* abbauen, wobei 9 % bzw. 0,9 % der beiden PCBs mineralisiert wurden (THOMAS et al. 1992).

Im Festphasensystem ist bisher nur das Zusammenwirken von *Phanerochaete chrysosporium* mit Bakterien von VINEY & BEWLEY (1990) untersucht worden. Diese konnten durch Coinkubation von *Phanerochaete chrysosporium* mit Biphenyl abbauenden Bakterien die höchsten Abbauraten für PCBs in einem künstlich kontaminierten Boden

erhalten. Innerhalb von 14 Wochen konnte dabei ein Trichlorbiphenyl bis zu 70 % und ein Tetrachlorbiphenyl bis zu 64 % abgebaut werden.

In dieser Arbeit konnte das erste Mal gezeigt werden, daß der Einsatz von Weißfäulepilzen unterschiedlichster Herkunft, vor allem aber die Gattung *Pleurotus*, geeignet ist, PCBs auch in hohen Konzentrationen (2500 ppm und vermutlich höher) in Festphase und Boden abzubauen. Damit ist die von ABRAMOWICZ (1990) aufgestellte Forderung erfüllt.

4.3. METABOLISIERUNG VON POLYCHLORIERTEN BIPHENYLEN

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist der Nachweis der Mineralisation der Chloranteile der Ausgangssubstanzen. Da die Verwendung von ^{36}Cl -markierten Verbindungen in Abbauntersuchungen von chlorierten organischen Verbindungen bisher noch nicht unternommen worden war, liegen keine Vergleichswerte zu dieser Arbeit vor. Der Anteil von fällbarem Chlorid an dem durch "Verschwinden" der Ausgangssubstanz ermittelten Abbau liegt weit über der durch ^{14}C -Markierung ermittelten Mineralisierung des Kohlenstoffgerüsts. Dies ist insofern wichtig, da von organisch gebundenem Chlor potentielle Gefahren auch für den Menschen ausgehen können. Die Tatsache, daß dennoch mäßig unpolare und wasserlösliche, jedoch nicht AgNO_3 -fällbare Aktivität gemessen werden konnte, die zudem chemisch nicht eindeutig identifizierbar war, läßt ein gewisses Risiko offen. Bei längerer Inkubation verringerte sich allerdings der nicht fällbare wasserlösliche Anteil zugunsten des Chloridanteils, was die Bildung von stabilen, chlorierten, wasserlöslichen dead-end-Produkten unwahrscheinlich macht.

Beim Einsatz von ^{14}C -markiertem Monochlor- und Tetrachlorbiphenyl stellten THOMAS et al. (1992) ebenfalls erhöhte Aktivitätsgehalte in der Wasserphase fest. Die Radioaktivität der eingesetzten PCBs konnte dabei durch *Phanerochaete chrysosporium* bis zu 65 % in wasserlösliche Metaboliten transformiert werden.

In den beschriebenen Versuchen war es bei der Verwendung von ^{14}C -markierten PCBs ebenfalls zur Anreicherung der wasserlöslichen Aktivität gekommen. Beim Vergleich mit den Daten aus den ^{36}Cl -Ansätzen zeigt sich aber, daß es sich hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit nicht mehr um chlorierte Abbauprodukte des Kohlenstoffgerüsts handelt. In keiner der bisher veröffentlichten Arbeiten zum Abbau radioaktiv markierter PCBs mit Weißfäulepilzen ist - abgesehen von der Messung von $^{14}\text{CO}_2$ und der Verteilung zwischen wäßriger und organischer Phase - bisher eine Aussage über den Verbleib der Restaktivität gemacht worden.

Bei der Suche nach Metaboliten des Abbaus der PCBs konnten in dieser Arbeit eine Reihe von Substanzen identifiziert werden, die als Abbauprodukte der PCBs anzusprechen sind.

Dabei waren die verschiedenen Oxidationsstufen des chlorierten Toluols am deutlichsten vertreten und machten etwa bis zu 10 % der eingesetzten Aktivität aus. Diese Substanzen

entsprechen den in der Literatur von Bakterien bekannten Metaboliten des Abbaus von PCBs (BEDARD 1990). Chlorbenzoesäuren sind typische Zwischenprodukte sowohl beim Abbau durch einzelne Bakterienstämme (BEDARD & HABERL 1990) als auch durch Mischkulturen (BALLSCHMITTER et al. 1977).

Während von den meisten PCB-abbauenden Bakterien Chlorbenzoesäuren nicht weiter verwertet werden (BEDARD & HABERL 1990), ist in der vorliegenden Arbeit keine Akkumulation dieser Substanzen beim Abbau durch Weißfäulepilze beobachtet worden. In Flüssigkultur konnte zudem gezeigt werden, daß durch den Pilz *Phanerochaete chrysosporium* chlorierte Benzoesäuren abgebaut werden (ZEDDEL 1987). Auch dies ist ein typisches Kennzeichen der unspezifischen Vorgehensweise der Weißfäulepilze.

In geringem Ausmaß wurden Methoxylierungen des PCB-Ausgangskörpers beobachtet. In der Literatur sind Hydroxylierungsreaktionen von PCBs durch Bakterien beschrieben worden (BOPP 1986). Der Mechanismus der Methylierung von Hydroxyverbindungen durch Weißfäulepilze ist ebenfalls bekannt. So ist die Methylierung von Pentachlorphenol zu Pentachloranisol im Boden durch Inkubation mit *Phanerochaete chrysosporium* von LAMAR & DIETRICH (1990a) beschrieben worden. Dabei wurden bis zu 13 % des abgebauten Pentachlorphenols in Pentachloranisol umgewandelt, dessen Gehalt aber über den Inkubationszeitraum von 45 Tagen stabil blieb. Auch beim Abbau von Dichlorphenol mit demselben Pilz konnte nach Oxidierung zu Chlor-Benzochinon und der nachfolgender Reduktion zu Chlor-Hydrochinon, die Methylierung unter Bildung von Chlor-Dimethoxybenzol beschrieben werden (VALLI & GOLD 1991). Sehr ähnlich verlief der Abbaumechanismus im Fall von 2,7-Dichlordibenzo-p-Dioxin. Es konnte wiederum die Bildung von hydroxylierten Chloraromaten, wie auch Methoxylierungen beobachtet werden (VALLI et al. 1992b). In keinem Fall ist aber die Methoxylierung einer Verbindung, die keine Sauerstofffunktion hat, bisher für Weißfäulepilze nachgewiesen worden.

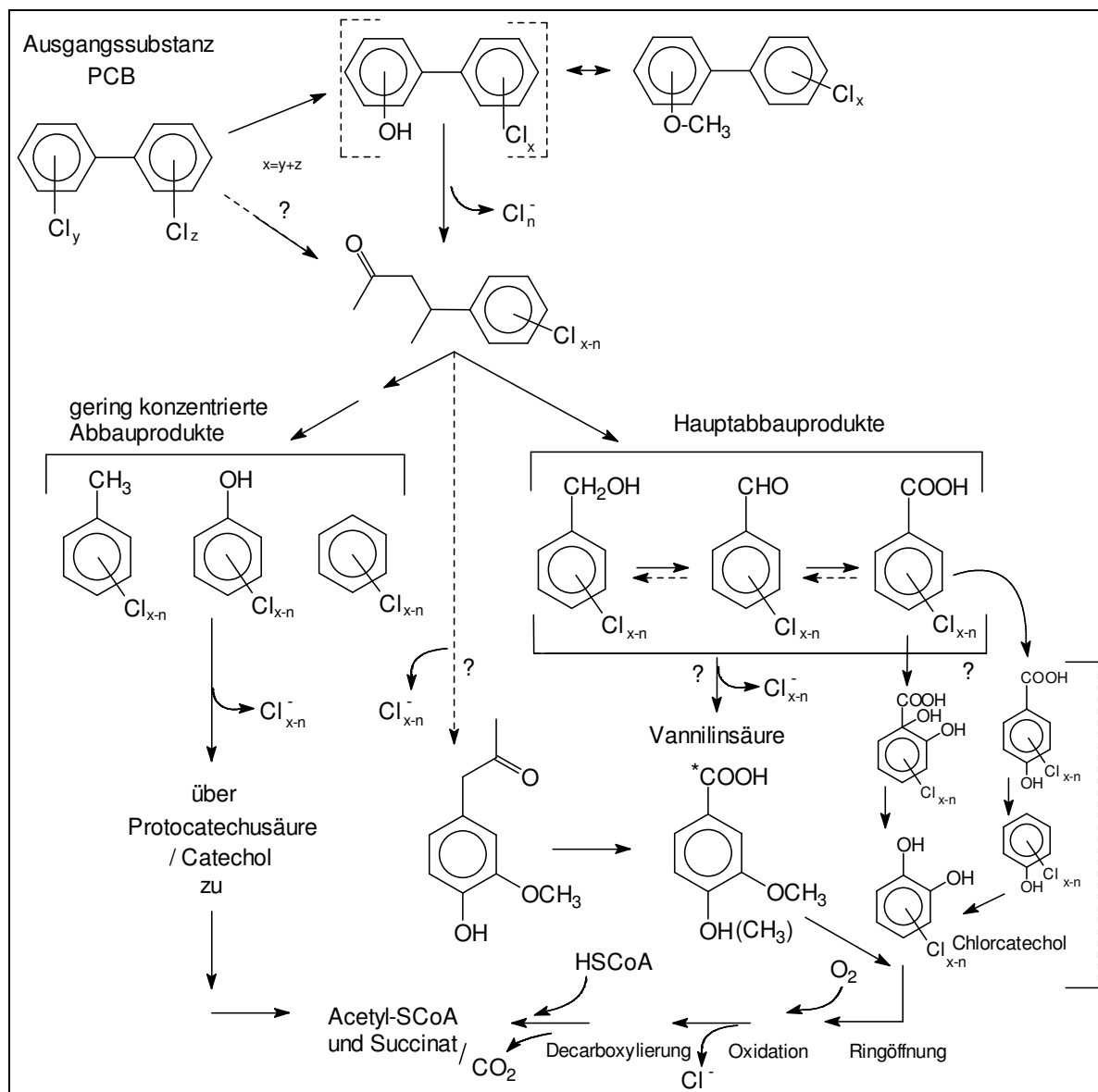
Als Bindeglied des PCB-Abbaus zwischen dem chlorierten Biphenyl und den verschiedenen Oxidationsstufen des chlorierten Toluols konnte ein chlorierter Phenyl-C₅-Körper identifiziert werden, der mit der Masse von 230 und der Summenformel von C₁₁H₁₂OCl₂ als 4-(oder 5)-Dichlorphenyl-2-Pentanon beschrieben wurde. Beim Bruch eines der beiden aromatischen Ringe des Biphenyls wurde dabei offensichtlich eine C₁-Einheit eliminiert (CO₂?). Eine solche Substanz als Abbauprodukt von PCBs anzunehmen setzt voraus, daß die nach Öffnung des Ringes weiterhin vorliegenden Doppelbindungen hydriert worden wären. Eine derartige Verbindung ist beim Abbau von PCBs bisher nicht gefunden worden. Es wurden in dieser Arbeit weitere chlorhaltige Aromaten identifiziert, die im Zusammenhang des PCB-Abbaus durch Mikroorganismen noch nicht beschrieben wurden. So hat weder die Bildung von Chlorphenolen noch von Chlortoluol gezeigt werden können. Die Tatsache, daß diese Verbindungen nur in sehr geringen Mengen zu finden waren, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit darauf zurückzuführen, daß dichlorierte und die meisten trichlorierten Phenole durch Weißfäulepilze sehr gut und schnell abgebaut werden. Dies

wurde von BRAUN-LÜLLEMANN (1989) für eine Vielzahl von Weißfäulepilzen gezeigt. JOSHI & GOLD (1993) stellten eingehend den Abbau von 2,4,5-Trichlorphenol durch die Enzyme des Weißfäulepilzes *Phanerochaete chrysosporium* dar. Somit ist nicht zu erwarten, daß es beim Abbau von PCBs durch Weißfäulepilze zur Bildung von dead-end-Produkten kommt, wie sie z. B. bei der meta-Spaltung von 3-Chlorbrenzcatechin entstehen können und bei einigen Bakterien zur irreversiblen Enzymschädigung führen (NEILSON et al. 1986).

Als mögliche nicht chlorierte Abbauprodukte konnten in den Versuchsansätzen eine Reihe hydroxylierter und methoxylierter aromatischer Säuren und Aldehyde sowie die Substanz Veratrylalkohol festgestellt werden. In hohen Konzentrationen ließ sich ein Phenyl-C4-Körper, vermutlich Anisylidenaceton, in den Abbauproben identifizieren. Von *Phanerochaete chrysosporium* ist bekannt, daß der Pilz während des Wachstums eine Reihe von aromatischen Verbindungen *de novo* bildet, so vor allem Veratrylalkohol und Derivate (LUNDQUIST & KIRK 1978, SHIMADA & HIGUCHI 1983). Für *Pleurotus ostreatus* trifft dies offensichtlich in gleicher Weise zu. Zeitweise stellte diese Substanz den Basispeak des Totalionenchromatogramms dar. Verschiedene davon abgeleitete Verbindungen wurden in den Abbauproben wie auch in den Pilzkontrollen ohne PCBs identifiziert. In einigen Fällen ließen sie sich in den Abbauproben in größeren Mengen als in den Pilzkontrollen beobachten, so im Fall von 4-Methoxybenzaldehyd, aber auch von Vanillin und Vanillinsäure. Aus den insgesamt gefundenen Abbauprodukten läßt sich mit aller Vorsicht folgender Abbauweg diskutieren (Schema 3).

Da dies nur ein aus Einzelbeobachtungen zusammengestelltes Schema des Abbaus der PCBs ist, bleiben eine Reihe von Fragen offen. So konnte kein Hinweis darauf erhalten werden, über welchen molekularen Mechanismus die Abspaltung der Chloratome und die Einführung von Hydroxygruppen erfolgt. Wegen des identifizierten Monohydroxybiphenyls scheint der dafür verantwortliche Mechanismus der Wirkung einer Monooxygenase ähnlich zu sein. Inwieweit es hierbei schon zur Dechlorierung kommen kann, müßte mit Einzelsubstanzen untersucht werden.

Ebenso bleibt die Frage der Konjugatbildung mit wasserlöslichen Edukten offen, wie sie der erhöhte Anteil wasserlöslicher ¹⁴C-Aktivität innerhalb der Versuchsreihen nahelegt. Daß die Anbindung von hydroxylierten Aromaten z. B. an Kohlenhydrate durch Weißfäulepilze bewirkt werden kann, konnte verschiedentlich gezeigt werden (KONDO et al. 1993, ARJMAND & SANDERMANN 1987, HALLINGER et al. 1988). Da in den Probenextrakten immer eine Vielzahl aromatischer Substanzen gefunden werden konnte, wären ähnliche Reaktionen möglich.



Schema 3: Postulierter Abbauweg der PCBs durch Weißfäulepilze. Mischung aus identifizierten Verbindungen (große Verbindungen, nicht Hydroxy-PCB) und Verbindungen (gestrichelter Bereich bzw. kleine Verbindungen), die dem aus der Literatur bekannten Hauptabbauweg der Chlorbenzoesäuren durch Bakterien entsprechen (BEDARD 1990, PARSONS et al. 1988).
* Vanillinäure oder etwaige andere Oxidationsstufe, bzw. deren hydroxylierte und methoxylierte Derivate.

Es fiel auf, daß die Extrakte, meist ein Gemisch hydroxylierter und methoxylierter aromatischer Säuren, Aldehyde und Benzylalkohole d. h. unterschiedliche Oxidationsstufen aufwiesen. Die Vorgänge, welche für die Methoxylierung des Biphenyls wie für die Bildung von Chlorbenzoesäure bis Chlorbenzylalkohol verantwortlich waren, waren insofern unspezifisch, als sie offensichtlich ebenso auch nicht chlorierte Aromaten betrafen. Die Ähnlichkeit des Abbaus von Biphenyl zum pilzeigenen Stoffwechsel (z. B. Phenylalanin), hat eine Identifizierung von Zwischenprodukten des C-Gerüst-Abbaus sehr erschwert. Möglicherweise ist die Trennung von pilzeigenen Substanzen durch baldiges Einschleusen dechlorierter aromatischer Bruchstücke in den Aromatenstoffwechsel unmöglich.

Im Ganzen werden die gefundenen nicht chlorierten Verbindungen als nicht bedeutend eingeschätzt. Einerseits ist durch die Nähe zum pilzeigenen Stoffwechsel nicht mit Akkumulation von möglicherweise toxisch wirksamen Substanzen zu rechnen, zum anderen sind keine Verbindungen in den verschiedenen Versuchsextrakten vorhanden, die von ihrer Intensität des Auftretens (GC-MS Totalionen-Signalintensität) denen der PCB-Ausgangssubstanzen entsprechen.

Interessant ist die gleichzeitige Anwesenheit der drei Oxidationsstufen des Chlortoluols. Zu vermuten ist, daß diese Verbindungen das Produkt oxidativer Ringspaltung sind. In diesem Fall muß von Reduktionsvorgängen beim Abbau von PCBs ausgegangen werden. Bei Laccase produzierenden Pilzen sind Reduktionsvorgänge/Reduktionscyclen bisher nicht beobachtet worden. Für das System mit Peroxidase ist dagegen in synthetischen Medien mit Glucose als hauptsächlichlicher C-Quelle das Auftreten von reduktiven Vorgängen mehrfach beschrieben (ANDER et al. 1980, LEISOLA & FIECHTER 1985, LEONOWICZ et al. 1991, SHIMAZONO et al. 1978, VALLI & GOLD 1991, VALLI et al. 1992b). Aber auch auf anderen Substraten mit leicht verfügbarer C-Quelle wurden aromatische Säuren noch vor anderen Transformationsreaktionen reduziert (HATAKKA & PIRHONEN 1985). Bei Inkubation von chlorierten Benzoesäuren mit dem Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* in Flüssigkultur (Medium nach KIRK et al. 1978) wurde innerhalb von 10 Stunden die stufenweise Bildung von chlorierten Benzaldehyden und chlorierten Benzylalkoholen beobachtet, die erst über eine Inkubationsdauer von zwei Wochen, nach Rückoxidation, über dechlorierte Zwischenprodukte abgebaut wurden (ZEDDEL 1987). Auch für Nitrotoluole ist die unmittelbare Reduktion durch *Phanerochaete chrysosporium* im Glucosemedium und in der Folge die Bildung des inhibierenden Hydroxylamino-dinitrotoluols sowie im Fall von DNT die Bildung verschiedener Chinone beschrieben worden (MICHELS & GOTTSCHALK 1993, VALLI et al. 1992a). LEONOWICZ et al. (1991) konnte zudem zeigen, daß weder die Reduktion noch die Demethylierungen im Fall von *T. versicolor* u. a. Weißfäulepilzen mit der Ausprägung von Laccase oder Ligninperoxidase einhergingen sondern durch eigene Enzyme bewirkt werden müssen. Das Auftreten dieser Enzyme wie auch der Reduktasen ist nachgewiesen worden; diese konnten jedoch wegen hoher Instabilität bisher nicht isoliert werden (LEONOWICZ et al. 1991).

Sehr wesentlich für die Beurteilung der "Verträglichkeit" eines Sanierungsverfahrens mit Weißfäulepilzen ist die Frage, ob auch beim Abbau chlorierter Verbindungen ein Einbau der nur leicht modifizierten und weiterhin chlorierten Ausgangssubstanz in die Matrix (den Boden) erfolgt. Die hier vorgelegten Ergebnisse haben gezeigt, daß eine solche Festlegung von PCBs tatsächlich stattfindet. Im Fall der Versuche mit ³⁶Cl-PCBs wurden bis zu 13 % der eingesetzten Aktivität unlöslich in der Matrix wiedergefunden. Somit ist zu vermuten, daß beim Abbau von PCBs in Böden auch chlorierte Produkte nach der PCB-Transformation zu einem geringen Teil in der Humusfraktion festgelegt werden.

Der Einbau von chlorierten phenolischen Verbindungen in Humus konnte *in vitro* durch die Wirkung von Peroxidasen ausgelöst werden (DEC et al. 1990). Zudem konnte gezeigt werden, daß eine Reihe von Xenobiotika im Boden durch die Anbindung an Huminstoffe "entsorgt" werden können (BOLLAG & MYERS 1992, BOLLAG et al. 1992, MARCO & NOVAK 1991). Der Einbau dieser Substanzen wird über radikalische Mechanismen eingeleitet und ist anscheinend ebenso unspezifisch wie die radikalisch bewirkten Abbauvorgänge. In der natürlichen Humusschicht konnte durch die Wirkung der autochthon erzeugten Peroxidasen sogar der radikalische Einbau von molekularem Chlorid in Humus nachgewiesen werden. Dabei beschränkt sich das Spektrum dieser neuartigen chlororganischen Verbindungen nicht auf die hochmolekularen Humusfraktionen, sondern es konnten auch niedermolekulare chlorierte Organika wie Chloroform und Trichloressigsäure nachgewiesen werden (HOEKSTRA & LEER 1993). Somit gehören chlororganische Verbindungen in einem weit größeren Ausmaß als bisher angenommen (vor allem bei marinen Arten beschrieben, ferner Antibiotika) zu den auch natürlicherweise im Ökosystem vorhandenen Naturstoffen (NAUMANN 1993). Es zeigt sich also, daß auch chlorhaltige Verbindungen in das Wechselspiel von Auf- und Abbau der Humusbestandteile eingebunden sind und hierbei möglicherweise ein natürlicher Kreislauf existiert. Dies soll die Feststellung nicht abschwächen, daß von chlorhaltigen gebundenen Rückständen beim Abbau von PCBs potentielle Gefahren ausgehen. Es muß aber auch die Möglichkeit erwogen werden, daß die Abspaltung von Chlor als Chlorid in einem Milieu hoher "Dichte" radikalischer Überträgermoleküle einen erhöhten Rückeinbau dieses Chlors in die Matrix bewirken kann. Auf jeden Fall ist festzustellen, daß bei einer Behandlung von Böden mit Weißfäulepilzen ein Teil des organisch gebundenen Chlors in die stabile Humusfraktion überführt wird und somit in die Humusdynamik eingebunden ist. Eine Bewertung dieser Tatsache ist daher erst auf der Grundlage eingehender toxikologischer Untersuchungen möglich.

4.4. DIE SANIERUNG VON BÖDEN MIT WEIßFÄULEPILZEN: VERSUCH EINER BEWERTUNG UND AUSBLICK

Wie die Versuche sowohl mit PAKs als auch mit PCBs gezeigt haben, ist das System "Schadstoffe auf Holz - mit Boden", in dem Abbau stattfindet, keineswegs auf das System "Schadstoffe auf Boden - mit Holz" übertragbar. Ein Hauptproblem bei biologischen Abbauprozessen in der Bodenmatrix ist die in dieser Arbeit behandelte Bioverfügbarkeit der Schadstoffe.

Am Beispiel der Böden von zwei ehemaligen Gaswerksanlagen ist deutlich zu erkennen, daß die Kombination von PAK-Kontaminationen mit zusätzlichen Verunreinigungen und hohen Adsorptivkräften in Form von Koksteilchen den biologischen Abbau unmöglich machen kann.

Besonders bei den wasserunlöslichen Schadstoffen ist es das Zusammenwirken von biologischer Schranke (Aufnahmehinderung) und physikalischer Schranke (Massentransferhinderung, die durch Bodenaggregation und das Bodenporenprofil bestimmt wird), das als Ausgangspunkt der Abbaubarkeitsbeurteilung von Böden herangezogen werden muß. Dies macht sich bei einer Schadstoffgruppe wie den PAKs, deren Auftreten eng an das Vorhandensein von Kohle und Kokspartikeln gekoppelt ist, auf Grund der vom Makro- bis in den Mikrobereich reichenden Porenstruktur besonders bemerkbar. Die Bildung von Exoenzymen und Mikroporen gängigen Übertragungsmolekülen kann als "Lösung" dieses Problems erst in dem Moment zur Geltung kommen, wenn der Kontakt des Bodenpartikels mit der Organismenoberfläche unter Auflösung jeder Art von Aggregatsbildung gewährleistet ist.

Um dem Pilz und den von ihm ausgeschiedenen Exoenzymen einen möglichst engen Kontakt mit dem Schadstoff zu ermöglichen, wurde neben dem Trockenmischverfahren nach effektiveren Methoden gesucht, wobei sich das Verfahren der Naßhomogenisierung als vorläufig beste, da kontrollierbare Methode erwiesen hat.

Der Gedanke, die Bodenlösung und die darin suspendierten Kleinstteilchen mit den an der Oberfläche vorhandenen Schadstoffen durch Holzspäne "aufzusaugen", also die Holzoberfläche damit zu belegen, stellt mithin die größte Annäherung an das System der direkt auf Holzspänen aufgezogenen Schadstoffe dar. Der Pilz, der auf dem Holz als eigentlicher Nahrungsgrundlage wächst, muß durch, um und über die Boden-Schadstoff-Partikel wachsen und durchdringt dabei die gesamte Bodenmatrix aus dem Innern der Aggregate heraus. Für diese Art der Mischung sprechen weitere Vorteile. Da geringe Bioverfügbarkeiten aromatischer Substanzen immer auch mit geringen Löslichkeiten gekoppelt sind (STUCKI & ALEXANDER 1987), sind Verfahren zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit durch Tenside in einem der Mischung vorgeschalteten Rührprozeß weit effektiver anzuwenden als durch Mischung im "Trockenen" (d. h. bei Ausgangsfeuchte). Hinzu kommt, daß kontaminierte Böden in fast allen Fällen inhomogene Schadstoffverteilungen aufweisen. Dies kann sowohl makroskopisch in Form von Schadstoffbrocken (Teerklumpen) als auch mikroskopisch (stark kontaminierte Aggregatoberflächen) der Fall sein. Speziell der Alterungsprozeß eines Schadensfalles kann durch die Umlagerung von Aggregaten zu einem Einschluß stark belasteter Oberflächen ins Innere der Bodenpartikel und damit zu einer noch weiteren Hemmung des Abbaus führen. Durch einen nassen Homogenisierungsprozeß kann eine sehr einheitliche Schadstoffverteilung erhalten werden, so daß auch von seiten der Analytik die Probenahme nicht nur vereinfacht, sondern "justiziabel" gemacht werden kann (vergleiche THOMANETZ 1992).

Die Versuche mit diesem Homogenisierungs-Verfahren erbrachten zwar hervorragendes Wachstum der Weißfäulepilze, doch das Problem der Bioverfügbarkeit der PAKs aus Gaswerksböden konnte nicht gelöst werden. Die auf der Matrix festgelegten PAKs waren

weder durch Tensideinsatz in diesem System noch durch ein Hochdruckwaschverfahren, noch durch Scherkräfte in Verbindung mit Tensiden dem Abbau durch Weißfäulepilze in ausreichendem Maße zugänglich.

Die mangelnde Bioverfügbarkeit von Schadstoffen ist von mehreren Autoren als Grund für unerwartet (im Vergleich zu Laborbedingungen) schlechten biologischen Abbau bei "echten" Böden vermutet und beschrieben worden (STIEBLER et al. 1990, WALTER et al. 1993). In dieser deutlichen Ausprägung ist aber die Hemmung eines biologisch hochaktiven Systems durch die mangelnde Bioverfügbarkeit bisher nicht gezeigt worden.

Selbst durch die Homogenisierung mit Lösungsmittel-Wasser-Gemischen (siehe auch BYNOIK et al. 1992) war die Verfügbarkeit der Substanzen im Originalboden nicht zu steigern.

Der im Jahr 1990 durchgeführte Vergleich verschiedener biologischer Sanierungsmethoden anhand der Abbaubarkeit der PAKs im Bodens des Gaswerks Solingen-Ohligs hat diese Schwierigkeit ebenfalls deutlich gemacht. Sowohl die beiden bakteriellen Verfahren der Firmen Umweltschutz Nord und ESTE GmbH als auch das mit Weißfäulepilzen betriebene Mietenverfahren der Firma KRC GmbH erreichten nur die Abnahmen an PAKs, die in der Kontrollmiete der Stadt Solingen-Ohligs gemessen wurden (STEILEN et al. 1991).

Prinzipiell kann sich die Frage stellen, ob Schadstoffe, die so gering verfügbar sind, überhaupt noch für Mensch oder Tier wirksam werden können. Nicht flüchtige, gebundene Xenobiotika, die nur durch eine organische Extraktion freigelegt werden können, sind zwar nicht als akut gefährlich anzusehen. Aber einerseits sind die Freisetzungsprozesse über lange Zeiträume (verbunden mit Teilumwandlungen, die mobilisierungsfördernd sind) nicht abzuschätzen, und auf der anderen Seite kann ein Boden heute nicht als harmlos "verkauft werden", selbst wenn diese Schadstoffe im Ton-Humuskomplex eingeschlossen über geologische Zeiträume festliegen, solange analytisch (mit organischen Lösungsmitteln) oder durch die Einwirkung von Tensiden Giftstoffe meßbar sind. Letztlich muß die Wirkung der Lösungsmittel mit möglichst geringem Aufwand und mit dem geringst möglichen zusätzlichen Stoffeintrag beim Bodenaufschluß nachgeahmt werden. Bei der Verwendung von Tensiden bleibt offen, wann der Eintrag zusätzlicher Substanzen höhere Gefahren bringt, als sie die immobilisierten Schadstoffe darstellen. Im Zweifelsfall kann es ungefährlicher sein, kontaminierten Boden mit einem Lösungsmittel (z. B. Aceton) zu extrahieren, den Extrakt auf Holzspäne aufzubringen und mit Weißfäulepilzen zu entsorgen.

Angesichts dieser Schwierigkeiten ist die Frage zulässig, ob andere Methoden zur Sanierung kontaminierter Standorte nicht besser geeignet sind. Ein Vergleich der angebotenen Verfahren sprengt den Rahmen dieser Arbeit. Um eine Einordnung der biologischen Verfahren zu erhalten, sind in der Einleitung (Kapitel 1.4.) dazu kurze Verweise aufgeführt.

Prinzipiell ist aber gerade die Methode, innerhalb einer organisch kontaminierten Matrix reaktive Verbindungen zu erzeugen, um in der Folge einen chemischen Angriff auf die persistenten Verbindungen herbeizuführen, ein häufig beschrittener Weg. So wurde versucht, die photochemische Dechlorierung von PCBs, die auf radikalischen Kettenreaktionen beruht, durch die Zugabe geeigneter Photokatalysatoren zur Reinigung PCB-kontaminierter Böden einzusetzen (TiO_2 , PELIZZETTI 1992; Phenothiazin, HAWARI 1992).

Es sind Versuche unternommen worden, Schadstoffe im Boden allein durch die Umsetzung von H_2O_2 und Eisen (Fentons Reagenz) zu zerstören (MACKENPRANG 1993). Bei dieser Technik mußte durch Hochdrucksonden der Kontakt von H_2O_2 mit einem größeren Bodenvolumen gewährleistet werden. Vor allem in Anbetracht der Tatsache, daß sich H_2O_2 im Boden zersetzt und 50 % der eingesetzten H_2O_2 Konzentration je nach Bodenart und organischem Gehalt nach Minuten bis wenigen Stunden in Sauerstoff und Wasser umgewandelt sind (LAWES 1991), ist die rein chemische Methode der Erzeugung reaktiver Spezies im Boden problematisch.

Trotz der beschriebenen Schwierigkeiten bleibt daher die über lange Zeit anhaltende Bildung von reaktiven (radikalischen) Verbindungen durch die enzymatische Wirkung der Exoenzyme der Weißfäulepilze eine wirkungsvolle Kombination eines biologischen und in der Folge dann (biologisch-) chemischen Verfahrens. In Kombination mit geeigneten Wasch- und Aufschlußverfahren werden sich bei vielen Böden, wenn auch nicht bei allen, Sanierungserfolge erreichen lassen.

Der hohe Abbau von Tri-, Tetra- und Pentachlorbiphenylen durch Weißfäulepilze legt eine weitere Anwendungsmöglichkeit nahe. Da die hochchlorierten PCBs wie HexaCB und HeptaCB von Anaerobiern relativ unspezifisch unter Bildung von niederchlorierten PCBs dechloriert werden können, wäre eine Kombination zweier solcher unspezifischer Verfahren eine aussichtsreiche Methode, um alle Kongeneren eines PCB-kontaminierten Bodens abzubauen. In einer ersten Phase würden bakterielle anaerobe Prozesse PCBs mit mehr als fünf Chloratomen reduktiv in mono- bis tetrachlorierte Biphenyle umwandeln. Dies könnte im homogenisierten, aufgeschlammten Boden in abgeschlossenen Reaktoreinheiten stattfinden. In einer zweiten Phase würde dieser Schlamm durch Untermischung von Holzspänen in der in dieser Arbeit beschriebenen Weise für die aerobe Besiedlung vorbereitet. Durch Beimpfung mit Weißfäulepilzen können die PCBs im Bereich von Mono- bis Pentachlorbiphenyl dann abgebaut werden.