

**Bildung, Stabilität und Struktur gebundener Rückstände  
aus dem mikrobiellen Abbau von TNT im Boden**

**Dissertation**

**Zur Erlangung des akademischen Grades**

**Doctor agriculturæ**

**(Dr. agr.)**

**von Dipl. Ing. agr. Martin Weiß**

**geboren am 20.06.1973 in Siegen**



<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>12</b>
1.1	Vorkommen, Eigenschaften und Verhalten von TNT in der Umwelt	12
1.2	Sanierungsverfahren für TNT-Kontaminationen	15
1.2.1	Physiko-chemische Sanierung	15
1.2.2	Bioremediation	15
1.2.3	Kostenüberblick	17
1.3	Die biologischen Transformations- und Abbauewege	18
1.3.1	TNT-abbauende Bakterien	18
1.3.1.1	Aerober TNT-Abbau	18
1.3.1.2	Anaerober TNT-Abbau	21
1.3.2	TNT-abbauende Pilze	25
1.4	Bildung gebundener Rückstände	28
1.5	Mobilisierung	31
1.6	Aufgabenstellung	32
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>37</b>
2.1	Standort/Boden	37
2.2	Chemikalien / Isotopenmarkierte Verbindungen	39
2.3	Organismen und Enzyme	39
2.4	Stammhaltung, Medien und Kulturbedingungen	40
2.5	Bodenvorbehandlung und Dotierung	42
2.6	Vorbereitung des Stroh-Pilz-Substrates	45
2.7	Probenaufbereitung zwecks Analyse der Eigenschaften und Bindungstypen der Rückstände	46
2.8	Analytik von TNT und seinen Metaboliten	48
2.9	$^{14}\text{C}$ -Analytik / $^{14}\text{C}$ -Szintillationsspektrometrie	49
2.10	Bestimmungen der Isotopensignaturen und $^{15}\text{N}$ -Analytik	50
2.10.1	Stoffmengenberechnung	50
2.10.2	Elementaranalyse-MS	51
2.10.3	Anorganischer Stickstoff im Eluat	52
2.10.4	$^{15}\text{N}$ TNT-Metabolitenbestimmung	52
2.10.5	GC-C-IRMS Analyse von Gasen und Aminosäuren	53
2.10.5.1	Gase	53
2.10.5.2	Aminosäuren	53
2.11	Kernresonanzspektroskopische Untersuchung von TNT-Rückständen	54
2.12	Vorbereitung des Bodens für die Remobilisierungsexperimente	55
2.13	Remobilisierung durch physiko-chemische Behandlung	56
2.13.1	Mechanischer Aufschluss des Bodengefüges	56
2.13.2	Simulation von Temperaturschwankungen	56
2.13.3	Extraktion mittels Wasserdampf	57

2.13.4	Simulation eines 1000-jährigen Regenereignisses	58
2.13.5	Auflösung metall-organischer Komplexe	58
<b>2.14</b>	<b>Biologische Behandlung</b>	<b>58</b>
2.14.1	Zusatz von huminstoffabbauenden bzw. ligninolytischen Pilzen	59
2.14.2	Zusatz von extrazellulären, Radikal-bildenden Enzymen	60
2.14.3	Transfer und Remobilisierung durch Bepflanzung des Bodens	61
<b>2.15</b>	<b>Statistische Auswertungen</b>	<b>61</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>63</b>
<b>3.1</b>	<b>Vorbemerkungen</b>	<b>63</b>
<b>3.2</b>	<b>Festlegung</b>	<b>64</b>
<b>3.3</b>	<b>Bilanzierung des Umsatzes von <sup>14</sup>C - und <sup>15</sup>N-TNT</b>	<b>66</b>
<b>3.4</b>	<b>Transformationsuntersuchungen zur Freisetzung von Stickstoff aus TNT</b>	<b>72</b>
3.4.1	Anorganische Stickstoffspezies	74
3.4.2	Aminosäuren	81
3.4.3	Gase	83
3.4.4	Bewertung aus wissenschaftlicher Sicht	86
<b>3.5</b>	<b>Strukturaufklärung der Festlegungsprodukte</b>	<b>88</b>
<b>3.6</b>	<b>Stabilität der Festlegungsprodukte</b>	<b>93</b>
3.6.1	Physikalische Behandlung	94
3.6.1.1	Mechanischer Aufschluss des Bodengefüges	94
3.6.1.2	Simulation von Temperaturschwankungen	94
3.6.1.3	Extraktion mittels Wasserdampf	95
3.6.2	Chemische Behandlung	98
3.6.2.1	Simulation eines 1000-jährigen sauren Regenereignisses	98
3.6.2.2	Auflösung metall-organischer Komplexe mittels EDTA	99
3.6.3	Biologische Behandlung	102
3.6.3.1	Remobilisierungspotenzial ligninolytischer Pilze	102
3.6.3.2	Remobilisierungspotenzial extrazellulärer, Radikale-bildender Enzyme	104
3.6.3.3	Remobilisierungspotenzial von Pflanzen	106
<b>4</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>109</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>114</b>
<b>6</b>	<b>THESEN ZUR DISSERTATION</b>	<b>120</b>
<b>7</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>121</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG</b>	<b>137</b>

**LISTE DER ABKÜRZUNGEN**

ADNT	Aminodinitrotoluol
<i>B. adusta</i>	<i>Bjerkandera adusta</i>
Da	Dalton
DANT	Diaminonitrotoluol
CP MAS	Cross polarization- magic angle spinning
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOM	Dissolved organic matter
EGME	Ethylglykolmonomethylether
EPA	Environmental Protection Agency
FG	Frischgewicht
FSr	Fulvosäure
GC	Gas Chromatograph
GC-WLD	Gas Chromatograph-Wärmeleitfähigkeitsdetektor
Gly	Glycin (Aminosäure)
HPLC	High performance liquid chromatography
HSr	Huminsäure
Ile	Isoleucin (Aminosäure)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KAK	Kationenaustauschkapazität
KOH	Kaliumhydroxid
LD <sub>50</sub>	Letale Dosis für 50% der Versuchstiere
Leu	Leucin (Aminosäure)
LSC	Liquid scintillation counting
mas%	Massenprozent
<i>N. frowardii</i>	<i>Nematoloma frowardii</i>
NMR	Nuclear magnetic resonance
NT	Nitrotoluol
RDX	Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin
RT	Raumtemperatur

---

<i>S. rugosoannulata</i>	<i>Stropharia rugosoannulata</i>
Ser	Serin (Aminosäure)
TAT	Triaminotoluol
TG	Trockengewicht
Thr	Threonin (Aminosäure)
TLC	Thin layer chromatography
TNT	Trinitrotoluol
TP	Teilprojekt
<i>T. versicolor</i>	<i>Trametes versicolor</i>
UV	Ultraviolett
Val	Valin (Aminosäure)
vol%	Volumenprozent

**Verzeichnis der Abbildungen**

Abbildung 1	Strukturformel von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT).....	12
Abbildung 2	Abbauewege von TNT durch aerobe Mikroorganismen (leicht verändert nach Esteve-Nunez et al., 2001). .....	21
Abbildung 3	Interaktion von reduzierten TNT-Metaboliten in Tonmineralien (Montmorillonit) nach Rieger und Knackmuss (1995). Der Schichtabstand der Anionlagen beträgt 1-2 nm.....	23
Abbildung 4	Einbindungsmöglichkeit von TNT-Metaboliten in die Huminsubstanz nach Rieger und Knackmuss (1995). .....	24
Abbildung 5	Schema der Reaktoranlage (mit Kreislaufbelüftung) zur Festlegung von TNT und seinen Metaboliten mittels Pilzverfahren. ....	43
Abbildung 6	Aufbau der Reaktoren. ....	45
Abbildung 7	Schema der Bodenextraktion und Bilanzierung der <sup>14</sup> C-Verteilung. ....	47
Abbildung 8	Änderung der <sup>14</sup> C-Verteilung im <sup>14</sup> C-TNT-kontaminierten Boden (8,9 bzw. 8,5 g kg <sup>-1</sup> TS, 3268 kBq kg <sup>-1</sup> TS) nach 97, 146 und 176 Tagen aerober Inkubation ohne und mit Zusatz von Pilz-Stroh-Substrat. ....	67
Abbildung 9	Sauerstoffverbrauch während der 1. Inkubationsphase der Immobilisierung in den 5,7-l fassenden Versuchsreaktoren. ....	68
Abbildung 10	Mineralisierung von TNT in den Bodenreaktoren ohne und mit Pilz-Stroh-Substrat unter aeroben Bedingungen.....	68
Abbildung 11	Hemmung des Wachstums von <i>S. rugosoannulata</i> auf Malzagarplatten durch die Wirkung extrahierbarer TNT und seiner Metaboliten (mit MeOH aus dem <sup>15</sup> N- Boden extrahiert). ....	72
Abbildung 12	Versuchsreaktoren im Sapromatensystem D 12 (Voith, Heidenheim, Deutschland).....	73
Abbildung 13	Zeitlicher Verlauf der Nitrit/Nitrat- und Ammonium- Freisetzung ( <sup>15</sup> N isotopisch markierte und unmarkierte Ionen) während des Experimentes. ....	78
Abbildung 14	Vorgeschlagenes Schema zur N-Eliminierung von TNT.....	80
Abbildung 15	Modell zur Hydrolyse des 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT)-Polymers 2,2', 4,6' Tetranitro 6,4' Azoxytoluol.....	84
Abbildung 16	Möglichkeiten der Generierung von angereichertem <sup>15</sup> N <sub>2</sub> O.....	85
Abbildung 17	NMR-Spektren: Die chemische Umgebung von N von im Boden festgelegtem TNT. Der Nullpunkt entspricht dem <sup>15</sup> N-Signal von Nitromethan (= 0 ppm). 90	
Abbildung 18	<sup>15</sup> N-NMR Spektren von TNT-N gebunden an Fulvo (Linie 3) -und Huminsäuren (Linie 4) vor und nach Laccaseeinwirkung (Fulvosäure Linie 1 und Huminsäure Linie 2). Der Nullpunkt entspricht dem <sup>15</sup> N-Signal von Nitromethan (= 0 ppm).....	91
Abbildung 19	Detektion von unmarkiertem <sup>28</sup> N <sub>2</sub> O nach 246 sec. Laufzeit am GC-IR MS. 137	
Abbildung 20	Detektion von markiertem, TNT-bürtigem <sup>29/30</sup> N <sub>2</sub> O nach 240 sec. Laufzeit am GC-IR MS. ....	138
Abbildung 21	Detektion von unmarkiertem <sup>28</sup> N <sub>2</sub> am GC-IR MS. ....	139

Abbildung 22	Detektion von unmarkiertem und markiertem, TNT-bürtigem $^{29/30}\text{N}_2$ am GC-IR MS. ....	140
Abbildung 23	Detektion von unmarkierten und $^{15}\text{N}$ -markierten Aminosäuren (vom TNT-N stammend) am GC-IR MS. ....	141
Abbildung 24	$^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren einzelner Bodenfraktionen ohne (oben) und mit (unten) Laccasebehandlung des unbehandelten Kontrollbodens. ....	142

### Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1	Chemisch-physikalische und mikrobiologische Parameter des eingesetzten Bodens vom Werk "Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld (analysiert in Marburg, Banholz et al. (2000). ....	37
Tabelle 2	Zusammensetzung des Fest- und Flüssigmediums*. ....	40
Tabelle 3	Pufferzusammensetzung für extrazelluläre Enzyme: Für die Meerrettich PO (HRP) und Laccase (Lac) eignete sich der Natrium-Citrat-Phosphatpuffer, für die Mangan PO (MnP) eignete sich der Malonatpuffer am besten*. ....	41
Tabelle 4	HPLC-Retentionszeiten von TNT und seinen Metaboliten. ....	48
Tabelle 5	Temperaturprogramm des GC-Ofens zur Trennung von TNT und seiner Metaboliten. ....	53
Tabelle 6	Temperaturprogramm des GC-Ofens zur Trennung von Aminosäuren. ....	54
Tabelle 7	Verwendete Integrationsbereiche der $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren und ihre mögliche Zuordnung zu chemischen Verbindungen (Knicker et al., 1999). ....	55
Tabelle 8	Die Enzymsysteme verschiedener Pilze zur Remobilisierung von TNT-bürtigen Rückständen. ....	61
Tabelle 9	Zuordnung der $^{15}\text{N}$ - und $^{14}\text{C}$ -TNT-Metabolite der extrahierbaren Fraktionen am Ende der Immobilisierung. ....	69
Tabelle 10	Durchschnittliche Wiederfindung von $^{14}\text{C}$ und $^{15}\text{N}$ nach mikrobieller Umsetzung von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) in kontaminiertem Boden (Versuchsdauer 176 Tage). ....	71
Tabelle 11	Prozentualer Anteil mineralisierter $^{15}\text{N}$ Komponenten vom eingesetzten $^{15}\text{TNT}$ im Boden nach 176 Tagen Inkubation. ....	71
Tabelle 12	Verteilung von $^{15}\text{N}$ auf Fraktionen im pilzlich behandelten Boden (methanolische Extrakte: TNT und primäre Metabolite; KCl-Extrakte: anorganische N Spezies. ....	74
Tabelle 13	Verteilung von $^{15}\text{N}$ auf Fraktionen im unbehandelten Boden (methanolische Extrakte: TNT und primäre Metabolite; KCl-Extrakte: anorganische N Spezies und Gase. ....	75
Tabelle 14	Häufigkeit von $^{15}\text{N}$ in mineralisierten, anorganischen Komponenten. ....	79
Tabelle 15	$^{15}\text{N}$ -Häufigkeit in Aminosäuren nach Transformation von $^{15}\text{N}$ -TNT im unbehandelten Boden und im Boden mit Beimpfung eines streuabbauenden Pilzes. ....	82

Tabelle 16	Verteilung der Radioaktivität in Bodenfraktionen nach unterschiedlichen biologischen Sanierungsverfahren. ....	94
Tabelle 17	Verteilung der $^{14}\text{C}$ -Markierung nach physikalischer Behandlungen der gebundenen Rückstände im Boden. ....	97
Tabelle 18	Verteilung der $^{14}\text{C}$ -Markierung nach chemischer Behandlungen der gebundenen Rückstände im Boden.....	101
Tabelle 19	Verteilung der $^{14}\text{C}$ -Markierung nach biologischer Behandlungen der gebundenen Rückstände im Boden: Effekt von ligninolytischen Pilzen.....	103
Tabelle 20	Verteilung der $^{14}\text{C}$ -Markierung nach biologischer Behandlungen der gebundenen Rückstände im Boden: Effekt von extrazellulären Enzymen.....	105
Tabelle 21	Verteilung der $^{14}\text{C}$ -Markierung nach biologischer Behandlungen der gebundenen Rückstände im Boden: Effekt von wachsenden Pflanzen und Einbindung in pflanzliche Biomasse.....	107

### Verzeichnis der Gleichungen

Gleichung 1	Berechnung der Isotopensignatur eines Elementes .....	50
Gleichung 2	Herleitung der Berechnungsformel der molaren Massen von $^{14}\text{N}$ und/oder $^{15}\text{N}$ bei bekannter Menge $m_{\text{Nges}}$ .....	51

## Danksagung

Diese Arbeit entstand in den Jahren 2000 bis 2003 am Institut für Angewandte Mikrobiologie der Friedrich Schiller- Universität Jena und am Umweltforschungszentrum Leipzig (UFZ), Sektion Sanierungsforschung (SAN). Finanziell unterstützt wurde die vorliegende Arbeit vom BMBF (Förderkennzeichen: 1481162 bzw. 0330280) und dem UFZ Leipzig. Die im Jahr 2000 aktuelle und noch interessante Themenstellung dieser Arbeit verdanke ich Herrn Prof. Matthias Kästner. Frau Prof. Gabriele Diekert möchte ich für die Freiräume danken, die sie mir bei meiner Tätigkeit an der Universität Jena gelassen hat sowie für ihre Hilfsbereitschaft und Fähigkeit, biologische Sachverhalte kurz und präzise zu erklären. Ich danke

- Herrn Prof. Peter Kämpfer für seine Betreuerfunktion und Interesse an der TNT-Thematik und die kritische Durchsicht des Manuskripts
- Herrn Dr. Roland Geyer für die zügige und detaillierte Einarbeitung in die Thematik und den Umgang mit radioaktiven Stoffen sowie für die Hilfestellung bei den radiochemischen Arbeiten als auch für die kritische Durchsicht diverser Berichte,
- Frau Dr. Heike Knicker für die Durchführungen der  $^{15}\text{N}$ -NMR-spektroskopischen Messungen und Auswertungshinweise,
- Herrn Dr. Hans H. Richnow danke ich für die messtechnische Unterstützung bei den Messungen von isotopisch stabilen Verbindungen,
- Herrn Dr. Rolf Russow der Sektion Bodenforschung am UFZ Halle für die Bereitstellung der Wasserdampfdestillationsapparatur,
- Herrn Jens Müller für die Unterstützung bei Problemlösung betreffend Rechnersoftware und mathematischer Sachverhalte,
- Den Herren Prof. R. Ölmüller und Dr. K.-J. Appenroth vom Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie am Institut für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie der FSU Jena für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im dortigen Isotopenlabor,
- den Herren Dr. Spindler und Hanß vom Troposphäreninstitut im Wissenschaftspark Leipzig für das Mischen eines Stickoxidgemisches als Standardgas für GC-Untersuchungen,

und ganz besonders all denen, die hier aus Platzgründen nicht genannt sind.

57250 Netphen, den 25.10.2004

**Selbständigkeitserklärung**

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

A handwritten signature in black ink, reading "Martin Weis". The signature is written in a cursive style with a large, sweeping 'M' and 'W'.

# 1 Einleitung

## 1.1 Vorkommen, Eigenschaften und Verhalten von TNT in der Umwelt

Die Beseitigung von Rüstungsaltslasten ist seit etwa zwei Jahrzehnten eine wichtige Aufgabe. Trinitrotoluol (TNT) ist der meist eingesetzte Sprengstoff in der Rüstungsindustrie. Aufgrund seines Nitrierungsgrades (siehe Abbildung 1) ist es ein hervorragendes Sprengmittel. Es wurde 1863 von dem Deutschen J. Wilbrand entdeckt. Gegenüber Schwarzpulver fand TNT wegen stärkerer Sprengkraft, besserer Handhabbarkeit (Gießbarkeit) und geringerer Hygroskopie bevorzugt Einsatz als Detonationsmittel in der Rüstungs- und Kriegsindustrie aber auch im zivilen Berg- und Tunnelbau.

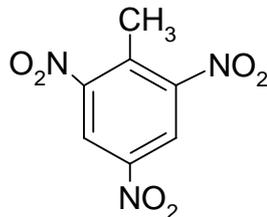


Abbildung 1 Strukturformel von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT).

TNT- Belastungen einiger Böden durch Produktionsunfälle sowie unsachgemäße Lagerung oder Entsorgung auf Gebieten ehemaliger Munitionsfabriken sind ein weltweites Problem. Insbesondere während des zweiten Weltkriegs kam es nach der Bombardierung durch alliierte Streitkräfte zu großflächigen Kontaminationen an ehemaligen deutschen Produktionsstandorten. Auch durch Demontagen oder Sprengungen dieser Anlagen nach dem Krieg wurde TNT tonnenweise im Gelände verstreut. In der Bundesrepublik gab es 1995 3240 militärische Altlaststandorte (Thieme, 1996). An 20 dieser Standorte sind während der Kriegsjahre zwischen 500 und 50000 t TNT pro Monat hergestellt worden (Spain et al., 2000). Als Füllung für Granaten, Mienen, Torpedos und Bomben wurden allein im Deutschen Reich in den letzten Jahren des 2. Weltkrieges 300 000 t TNT produziert (Martinetz, 1990). Von diesen sogenannten Rüstungsaltslasten gehen Gefährdungen für die Umwelt und insbesondere die menschliche Gesundheit aus.

TNT entsteht durch schrittweise Nitrierung von Toluol in einem Gemisch aus Salpeter- und Schwefelsäure. Das generierte  $\text{NO}_2^+$  - Ion substituiert elektrophil die Protonen am Aromaten. Trotz seiner explosiven Eigenschaft ist TNT in der Umwelt stabil, sogar persistent. Die Bioverfügbarkeit von TNT wird aufgrund folgender Tatsachen als gering eingestuft:

- 1) Die Wasserlöslichkeit von TNT beträgt bei 25° C zwischen 100 und 200 mg l<sup>-1</sup> (Ro et al., 1996).
- 2) Die symmetrische Anordnung von drei Nitrogruppen am Aromaten erschwert den Angriff von Dioxygenasen.
- 3) Die Elemente N und O der Nitrogruppen sind elektronegativer. Durch die Anzahl mehrerer Nitrogruppen entsteht im Aromatenring ein Mangel an Elektronen (-M-Effekt) und ein elektrophiler Angriff von Enzymen bzw. deren Kosubstraten wird erschwert. Diese Eigenschaft teilt TNT mit vielen anthropogen entstandenen Umweltgiften mit Halogen-, Sulfonyl-, oder Cyanogruppen als funktionellen Gruppen. Reduzierte Nitrotoluole (Aminonitrotoluole) können effizienter oxidiert werden.
- 4) Wegen des hohen Elektronendefizits im aromatischen Ring von TNT gelingt als initialer Abbauschritt nur eine Oxidationsreaktion zur Nitrobenzoesäure (Blotevogel & Gorontzy, 2000), wobei der Energiegewinn dabei relativ gering ist.

TNT besitzt toxisches Potenzial gegenüber Bakterien (Frtsche et al., 2002) und Pilzen (Bayman & Radkar, 1997), Grünalgen, Ruderfußkrebse und Austernlarven bei Konzentrationen im mg l<sup>-1</sup> Bereich (Ø 2,5 mg l<sup>-1</sup> Wasser) (Honeycutt et al., 1996; Won et al., 1975). Gram-negative Bakterien konnten im Gegensatz zu Gram-positiven Bakterien, die bei 50 mg l<sup>-1</sup> im Wachstum gehemmt wurden, noch bei einer TNT-Konzentration von 100 mg l<sup>-1</sup> wachsen (Klausmeier et al., 1974). Auch gegenüber Würmern zeigte TNT im Boden Giftwirkung (Pennington et al., 2001; Robidoux et al., 1999): Sie reicherten TNT nach Inkubation in TNT- kontaminiertem Boden im Körper an, was zu einer sukzessiven Anreicherung in der Nahrungskette führen kann. In Tierversuchen mit Tigersalamandern beobachteten Johnson et al. (1999) eine raschere Aufnahme von TNT über Hautkontakt mit TNT-kontaminiertem Boden als über die orale Aufnahme von TNT-kontaminierten Würmern. Bei Mäusen wurde eine LD<sub>50</sub> von 660 mg kg<sup>-1</sup> und bei Ratten eine LD<sub>50</sub> von ca. 1000 mg kg<sup>-1</sup> Lebendgewicht ermittelt (Jones et al., 2000). Weitere Fütterungsexperimente mit TNT an Vögeln und Säugetieren mit subchronischen Auslöseschwellen verursachten Krebs (Jones et al., 2000), wobei die Ursache für den kanzerogenen Charakter dieser Substanz die Bildung

von hochreaktiven Zwischenprodukten während biochemischer Reaktionen ist. An Zelltests mit menschlichen, fluoreszenzmarkierten Monozyten wurde bei einer TNT-Konzentration von  $8 \mu\text{g ml}^{-1}$  bei 50 % der Zellen eine signifikante Abnahme der Chemilumineszenz beobachtet (Bruns-Nagel et al., 1999). Ständige Exposition mit TNT führte beim Menschen zu Kopfschmerzen, Schwindelgefühl, Übelkeit, Bewusstlosigkeit, Anämie, Leberschäden, Katarakt und Hautirritationen (Koss et al., 1989; Martinetz, 1990). TNT und seine primären Reduktionsprodukte 2A-4,6-DNT (2-Amino-4,6-Dinitrotoluol) und 4A-2,6-DNT (4-Amino-2,6-Dinitrotoluol) wurden von der Environmental Protection Agency (EPA) als kanzerogen und mutagen eingestuft, weil sie kovalent an DNS binden können (Homma-Takeda et al., 2002). Die Folge sind unkorrekte Basenpaarungen und Ablesefehler bei Transkriptionen.

Um eine Auswaschung von TNT aus kontaminiertem Boden ins Grundwasser zu verhindern und die Anreicherung in der Nahrungskette zu unterbrechen und die allgemeine Gefahr für Mensch, Tier und Umwelt zu minimieren, ist eine Sanierung betroffener Gebiete notwendig. Eine Einbindung von TNT in die Bodenmatrix kann zur dauerhaften Detoxifizierung führen (Dawel et al., 1997; Isbister et al., 1984; Jarvis et al., 1998; Kaplan & Kaplan, 1983). Nitrogruppenreduzierende Enzyme können TNT detoxifizieren. Alle Lebewesen besitzen geeignete Enzyme, nitrierte Aromaten zu reduzieren. Man unterscheidet zwischen sauerstoffsensitiven und -unsensitiven Nitroreduktasen, wobei Säuger i.a. erstere Gruppe besitzen. Durch Reduktion der Nitrogruppe entsteht ein Nitro-Anion-Radikal. Dieses wiederum ist sehr reaktiv und bildet mit Luftsauerstoff ein Superoxidradikal, wobei es selbst wieder zur Nitrogruppe wird (Nivinskas et al., 2000). Bei Abwesenheit von Sauerstoff wird das Nitro-Anion-Radikal weiter zu Nitroso-Hydroxylamino- und Aminoderivaten reduziert. Sauerstoffsensitive Nitroreduktasen übertragen zwei Elektronen und bilden die gleichen Metaboliten ohne den Umweg der Radikalbildung. Bei den sukzessiven Schritten der Reduktion werden zwei Protonen zweier Moleküle  $\text{NADPH}^+$  in die Nitrogruppe eingeschleust, zwei weitere Protonen reagieren mit einem Sauerstoffatom aus der Nitrogruppe und werden zu Wasser.

Neben der biologischen Reduktion der Nitrogruppe ist eine abiotische Reduktion durch Eisen- und Manganbestandteile des Bodens möglich (Hofstetter et al., 1999).

## 1.2 Sanierungsverfahren für TNT-Kontaminationen

### 1.2.1 Physiko-chemische Sanierung

Zur Dekontamination von TNT-belasteten Ab- und Sickerwässern bieten sich die Möglichkeiten der chemischen Reduktion, thermischen Zersetzung, Ozonolyse, photokatalytischen Prozesse (Li et al., 1998; Rodgers & Bunce, 2001; Schmelling et al., 1996; Schmidt & Butte, 1999) und der Extraktion mit subkritischem Wasser (Hawthorne et al., 2000) an. Auch Eisen- und Aktivkohlepartikel fanden Einsatz als Reduktionsmittel und Adsorbentien (Hundal et al., 1997; Vasilyeva et al., 2001). Allerdings gestaltet sich die Adsorption des relativ polaren TNT und seinen Metaboliten aus Abwässern als schwierig. So kann es nach einer solchen Reinigungsmaßnahme dennoch zu messbaren TNT-Belastungen im Auslauf dieser Anlagen kommen (Schmidt et al., 1999). Auch die Voltametrie wurde zur Transformation von TNT erfolgreich getestet (Lee et al., 2003; Rodgers & Bunce, 2001). Der Zuschlag von proteinreichem Material (z.B. Blutmehl) im Rahmen von biologischen Sanierungen kann die Bindung von TNT an Bodenbestandteile durch Ausbildung kovalenter Bindungsstrukturen an schwefelhaltigen Aminosäuren fördern (Leung et al., 1995; Meyns et al., 2002).

Bei Feststoffen bietet sich bei konzentrierten Ablagerungen (> 10 vol%) die Verbrennung oder Detonation an (Duijm & Markert, 2002). Bei verstreuten Kontaminationen im mg bis g kg<sup>-1</sup> Bereich ist eine Verbrennung von TNT-belasteten Feststoffen (Boden) aufgrund von Auskofferungsarbeiten, dem anstehenden Transport und der nötigen Energie zur Verbrennung das zur Zeit kostenintensivste Verfahren der Sanierung. Auch eine Bodenwäsche ist nur *ex-situ* (mit anschließender basischen Hydrolyse (Emmrich, 2001) mit entsprechendem logistischem Aufwand durchzuführen. Biologische Verfahren bieten kostengünstigere Alternativen.

### 1.2.2 Bioremediation

Es gibt bis *dato* keine geeignet mikrobiologische Sanierungstechnik, die auf der Mineralisierung von TNT basiert (Hawari et al., 2000). Man macht sich deshalb Verfahren zu Nutze, die auf Transformation und Immobilisierung beruhen. Hierfür kommen sowohl Bakterien als auch Pilze in Frage. Beide Organismengruppen können TNT und Aminonitroderivate von Toluol bis auf wenige Ausnahmen (siehe Abschnitt 1.3.1) nicht als

Substrate zum Wachstum nutzen, aber kometabolisch transformieren. Für den Kometabolismus müssen den Organismen Substrate als Kohlenstoff, Stickstoff- und Energiequelle zugegeben werden, z.B. in Form preiswerter Kohlenhydrate wie Stroh oder Melasse. Die Mikrobenzellen setzen bei den biochemischen Umsetzungsprozessen auch TNT um. Dabei werden durch Reduktion der Nitrogruppen schrittweise Amino, dann Diaminonitrotoluole und unter stark anaeroben Bedingungen Triaminotoluole gebildet (Abbildung 2). Durch reaktive Intermediate kommt es zu Wechselwirkungen zwischen Kontaminante und Bodenmatrix. Dieses Phänomen nutzt man, um den Schadstoff zu binden und in den Humusturnover als Entgiftungsmaschinerie einzuschleusen.

Als biologische Verfahren zur Sanierung von Rüstungsaltslasten eignen sich Slurry-Verfahren (Schlammverfahren) (Lenke et al., 2000; Lenke et al., 1998; Nishino et al., 1999), Kompostierungen (Bruns-Nagel et al., 1998; Bruns-Nagel et al., 2000; Caton et al., 1994; Isbister et al., 1984), sowie Landfarming und Phytoremediation (Craig et al., 1995; Rodgers & Bunce, 2001). Beim Slurry Verfahren werden einem Boden/Wassergemisch Kosubstrate als Elektronendonatoren und Nährstoffe zugesetzt. Dabei kommen Glukose, Saccharose oder Melasse zum Einsatz. Unter anaeroben Bedingungen werden Dimerisations- und Polymerisationsprozesse, die in Anwesenheit von Luftsauerstoff und seinen Radikalen ablaufen, weitgehend unterdrückt. Belegt wird das durch einen Versuch mit wechselnden Redoxpotential im Boden/Wassergemisch. Hier wurde die Bildung von Azoxynitrotoluolen unter aeroben Bedingungen bis zu einer Konzentration von  $32 \text{ mg kg}^{-1}$  nachgewiesen, nach Einsetzen anaerober Bedingungen stoppte aber diese Bildung (Achnich et al., 1999). Eine geeignete Prozesssteuerung durch zeitweiliges Belüften und Mischen optimiert dieses Dekontaminationsverfahren. Boopathy et al. berichteten eine Mineralisierung von 23% des markierten TNT unter Verwendung von Tensiden zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit von TNT (Boopathy et al., 2002). Kompostierungen sind das meist genutzte biologische Verfahren zur Dekontamination von TNT-belastetem Boden. Auch hier werden zur Unterstützung der mikrobiologischen Umsetzungsprozesse zusätzliche Kosubstrate eingesetzt. Es sind rein aerobe (Breitung et al., 1996; Bruns-Nagel et al., 1996; Isbister et al., 1984), wechselnd anaerob/aerobe (Banholczer et al., 2000; Bruns-Nagel et al., 1998; Bruns-Nagel et al., 2000; Drzyzga et al., 1998) und rein anaerobe Verfahren (Achnich et al., 1999) zum Einsatz gekommen. Bei manchen Verfahren wurden gezielt Pilze (auf Stroh angezüchtet) in den Boden gebracht (Axtell et al., 2000; Fritsche & Michels, 1995; Herre et al., 1998). Das Landfarming wird weniger erfolgreich praktiziert (Craig et al., 1995). Hierbei wird der Boden in geringer Mächtigkeit aufgesetzt und durch regelmäßiges Wenden und Mischen mit

landwirtschaftlichen Geräten belüftet. Geschreddertes Gras, Alfaalfa, Stroh, Dung oder Melasse können als Additive dem Boden zugesetzt werden (Widrig et al., 1997). Die Phytoremediation bietet sich bei geringen TNT-Belastungen an, die auf großen Flächen vorkommen. Bei der Phytoremediation unterscheidet man zwei chemische Prozesse, die zur Verringerung der Kontamination im Boden führen. Neben der Phytoextraktion mit Stoffanreicherung im Pflanzeninneren spricht man von Phytostabilisierung mit Bindung an Pflanzengewebe zur Verringerung der Bioverfügbarkeit (Rodgers & Bunce, 2001). Hier kamen im Bodensystem Pappeln (*Populus* spp.), (Thompson, 1997), Hirse (*Sorghum halepense*) (Sung et al., 2001), Buschbohne (*Phaseolus vulgaris*) (Sens et al., 1998), Weizen (*Triticum aestivum*) (Sens et al., 1999) u.a. Pflanzen zum Einsatz, in Pflanzenkläranlagen waren es Rohrkolbenschilf (*Typha* spp.) oder Flechtbinse (*Scirpus lacustris*) (Xiang, 2001) und in Flüssigmedium waren es Wasserpflanzen wie Tausendblatt (*Myriophyllum* sp.) (Hughes et al., 1997; Vanderford et al., 1997) oder tropisches Immergrün (*Catharanthus roseus*) (Bharda et al., 1999). Sogar eine gentechnisch veränderte Tabakpflanze wurde im Labor zur Dekontamination von TNT-belastetem Wasser erfolgreich eingesetzt (Hannink et al., 2001). Dabei wurde das Genom der Pflanze mit einem bakteriellen Nitroreduktasegen versehen, welches TNT zu Hydroxylamino-Dinitrotoluol reduzierte. Der Erfolg des Verfahrens liegt einerseits in der Aktivierung der bakteriellen Lebensgemeinschaften im Boden durch Wurzelexsudate, zum anderen in der Aufnahme von TNT in die pflanzliche Biomasse. Im Wurzelbereich der Pflanzen wurde oft mehr TNT wiedergefunden als in den oberirdischen Teilen der Pflanzen. Dabei kommt es im allgemeinen bei den biologischen Verfahren nicht zum Abbau von TNT, sondern vielmehr zur Adsorption an Biomasse oder Bodenbestandteile (Achnich et al., 1999).

### 1.2.3 Kostenüberblick

Die Kosten der Verfahren der Photokatalyse und der Ozonierung belaufen sich auf 0,32 bis 1,7 € m<sup>-3</sup> Abwasser, Aktivkohleadsorption kostet zwischen 0,03 und 3 € m<sup>-3</sup> Abwasser. Um die nitrierten Verbindungen in einen m<sup>3</sup> einer 1 mmol TNT-kontaminierten Flüssigkeit zu reduzieren, werden beim derzeitigen Strompreis von 13 ct /KWh immerhin 1,4 € fällig (Rodgers & Bunce, 2001).

Die Verbrennung von Feststoffen kostet hingegen bis zu 740 € t<sup>-1</sup>. Dagegen sind die biologischen Verfahren wie Slurry mit 230 bis 270 € t<sup>-1</sup> und Kompostierung mit 250 bis 300 € t<sup>-1</sup> als kostengünstige Alternative zu sehen (Rodgers & Bunce, 2001). Meyns et al.

kalkulierten die Kosten einer biologischen Behandlung mit 20 % Kompost – und 2 % Proteinzuschlag auf nur 40 bis 50 € t<sup>-1</sup> (Meyns et al., 2002).

### 1.3 Die biologischen Transformations - und Abbauewege

#### 1.3.1 TNT-abbauende Bakterien

##### 1.3.1.1 Aerober TNT-Abbau

Bei dem oft beschriebenen TNT-Abbau handelt es sich meist um einen Umbau (Transformation). Eine 100 %-ige Mineralisierung von TNT konnte bislang wegen seiner chemischen Eigenschaften nicht nachgewiesen werden. Je mehr Nitrogruppen als Substituenten am Toluolring sitzen, umso höher ist das Redoxpotenzial der Verbindung. Mikroorganismen benutzen solche Verbindungen deshalb bevorzugt als Elektronenakzeptoren. Primäre Metaboliten sind also häufiger Aminonitrotoluole statt Nitrobenzoesäuren. Oxygenasen hätten im zweiten Fall kaum eine Möglichkeit, dem C-Skelett mit partiellem Elektronendefizit weitere Elektronen zu entziehen. Mit dem Nachweis von radioaktiv markiertem Kohlenstoff aus markiertem TNT in Biomasse (Lipide) wurde zum ersten Mal die Nutzung von TNT zum Baustoffwechsel (Bruns-Nagel et al., 1996; Drzyzga et al., 1998) und mit einem Schwund von TNT und Metaboliten die Nutzung zum Energiestoffwechsel (Montpas et al., 1997) vermutet. Vanderberg et al. (1995) berichteten von einer Ringspaltung von TNT durch den Stamm *Mycobacterium vaccae* JOB 5 und einem Einbau von 50 % des <sup>14</sup>C vom markierten TNT in die zelluläre Lipidfraktion. Nur wenige Aerobier wie *Pseudomonas acidovorans* No1, *-fluorescens* No2, *mendocina* No3, *aeruginosa* No4. (Boopathy et al., 1994), ein *Alcaligenes* sp.- und ein *Serratia marcescens* Stamm (Montpas et al., 1997) konnten TNT als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen. Bradley beschrieb eine Mineralisierung von <sup>14</sup>C-TNT durch ein Bakterienkonsortium bis zu 11 % (Bradley et al., 1994). Einige Actinomyceten konnten diese Verbindung bis zu 10 % mineralisieren (Pasti-Grigsby et al., 1996). Die bisher intensivste Mineralisierung bis zu 20 % konnte in einem weiteren Abbauersuch nach 22 Tagen Versuchsdauer durch eine nicht näher charakterisierte autochthone Mikroflora beobachtet werden (Widrig et al., 1997). Der biologische Abbaueweg, der zur Freisetzung von TNT-C führt, konnte aber bis heute nicht detailliert aufgezeigt werden.

Als oxidativer Metabolismus für TNT wurde lediglich eine Oxidation der Methylgruppe zur Carboxylgruppe beschrieben (Vanderberg et al., 1995). Diese Reaktionen werden als Seitenkettenoxidationen bezeichnet. Als Metabolite wurden dabei 4-Amino-2,6-Dinitrobenzoesäure und 2-Amino-4,6-Dinitrobenzoesäure detektiert. Außerdem entstanden bei mikrobiellen Abbaureaktionen formylierte und acetylierte Nitrotoluole (Bruns-Nagel et al., 1996). Unter oxidischen Verhältnissen kann es auch zu Kopplungsreaktionen von TNT mit anderen aromatischen Grundkörpern und mit sich selbst kommen. Daraus resultierende Dimere wie z.B. Azoxytetranitrotoluole weisen sogar noch höhere Rekalzitranz auf als die Ausgangsverbindung (Dawel et al., 1997; Esteve-Nuñez et al., 2001).

Besser als das C-Skelett von TNT zur Energiegewinnung eignen sich die Nitrogruppen zur Deckung des Stickstoffbedarfs der Mikroorganismen. Jedoch ist auch unter aeroben Bedingungen ein reduktiver Transformationsschritt zum TNT-Abbau zwingend. Dabei wird TNT entweder von den Bakterien aufgenommen und intrazellulär oder membrangebunden über NADPH-abhängige Nitroreduktasen reduziert. Diese Reaktionen wurden u.a. bei einem der vier oben genannten *Pseudomonas* Stämmen. (Boopathy et al., 1994) sowie bei einem *Escherichia coli*- und einem *Veillonella alcalescens* Stamm (McCormick, 1976), ebenso bei *Bacillus subtilis* B13, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388 und *Enterobacter cloacae* 96-3 (Klausmeier et al., 2001) nachgewiesen.

Durch NAD(P)H-Kofaktoren können Hydridionen ( $H^-$ ) auf TNT übertragen werden. Dieses Molekül wird reduziert und dadurch eine Nitritabspaltung theoretisch möglich (Heiss & Knackmuss, 2002). Bislang ist eine Nitritabspaltung über diesen Weg jedoch nur für Trinitrophenol (Rieger et al., 1995) bewiesen worden, nicht für TNT. Die aus dieser Addition resultierenden TNT-Hydrid-Meisenheimer Komplexe sind Mesomerie-stabilisiert und wurden als relativ stabil beschrieben (Behrend & Heesche-Wagner, 1999). Insbesondere bei sauren pH-Werten kann es zur Bildung von so genannten Meisenheimer-Komplexen kommen. Es wird angenommen, dass durch das Hydridion ( $H^-$ ) (Lenke et al., 2000; Vorbeck et al., 1994), wie bei Pikrinsäure belegt (Behrend & Heesche-Wagner, 1999), die erste Nitrogruppe abgespalten wird. Bis zu einer Anzahl von zwei Nitrogruppen sind Aromate aerob durch Oxygenasen abbaubar (Blotevogel & Gorontzy, 2000; Spanggord et al., 1991; Spain et al., 1995). So konnten Martin et al. zeigen, dass eine Denitrifizierung von TNT durch einen *Pseudomonas savastanoi* Stamm in wesentlich geringerem Umfang stattfindet als die Denitrifizierung von Dinitrotoluolen (Martin et al., 1997).

TNT-Abbauversuche von Duque et al. (1993) zeigten bei abnehmender TNT-Konzentration eine Erhöhung der Nitritkonzentration im Flüssig-Wachstumsmedium. Wurde Ammonium als

N-Quelle dem Kulturmedium entzogen und durch Nitrit ersetzt, so ließ sich der Grad der Denitrifizierung noch steigern (Martin et al., 1997). French et al. wiesen 1998 die Nitritbildung aus TNT durch *Enterobacter cloacae* PB2 nach (French et al., 1998) und Kim et al. bestätigten dieses Phänomen 2002 mit *Klebsiella* sp. Stamm C1 (Kim et al., 2002).  $\text{NO}_2^-$ -Ausschleusung beschrieben auch Kalafut et al. (1998) durch nicht näher charakterisierte Stämme von *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* sp. und *Staphylococcus* sp.. Martin et al. beschrieben eine Nitritbildung für einen *Pseudomonas savastanoi* Stamm (Martin et al., 1997). Nach einer Nitritabspaltung von TNT wurde auch die Inkorporation von reduziertem N (in Form von Ammonium) in Biomasse beschrieben (Esteve-Nuñez et al., 2000). Bei allen Versuchen war die Bakterienvermehrung nie allein auf die Nutzung von TNT-C zurückzuführen. Erst nach Verwendung zusätzlicher Kohlenstoffverbindungen wie Tween 80 oder Benzylalkohol als zusätzliche C-Quelle war ein Biomasseanstieg zu verzeichnen. Bei Versuchen mit Dioxygenasen von *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde eine Abspaltung von Nitrit bei Aminodinitrotoluolen festgestellt (Johnson et al., 2001). Duque et al. behaupteten, es gäbe sowohl Prokaryonten (Bakterien) als auch Eukaryonten (Pilze), welche TNT als Wachstumsquelle nutzen können (Duque et al., 1993). Insgesamt sind aber nur wenige aerobe Mikroorganismen isoliert worden, die TNT als C- oder N-Quelle nutzen (Haidour & Ramos, 1996; Hawari, 2000). Es wurden z.B. Pseudomonaden isoliert, deren Klon zur gleichzeitigen Verwertung von TNT-Stickstoff und -Kohlenstoff in der Lage war (Duque et al., 1993).

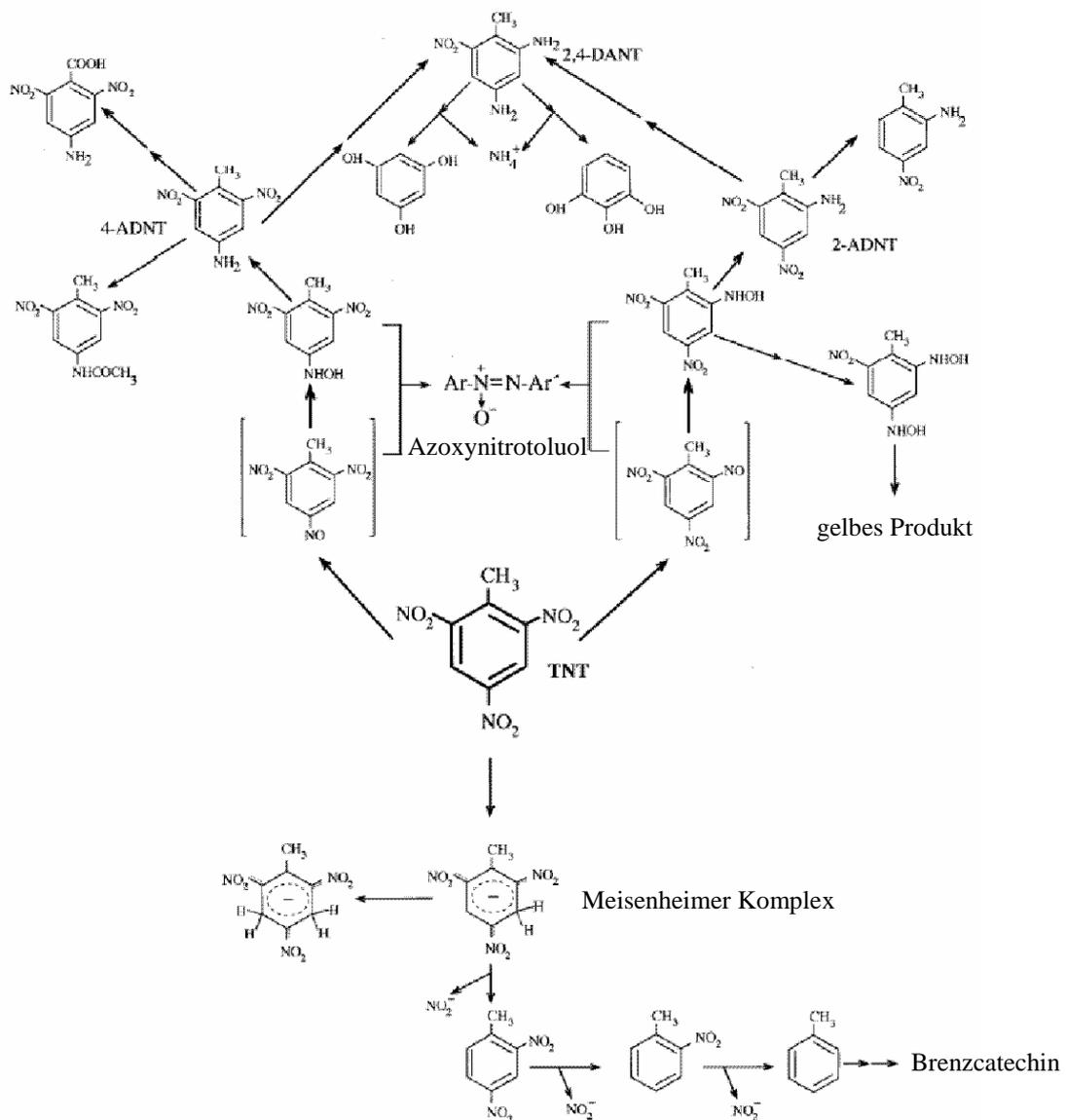


Abbildung 2 Abbauewege von TNT durch aerobe Mikroorganismen (leicht verändert nach Esteve-Nunez et al., 2001).

### 1.3.1.2 Anaerober TNT-Abbau

Für die meisten im Boden lebenden Organismen ist die Spaltung der Aromaten über die Hydrogenierung (durch Oxygenasen) und anschließende  $\beta$ -Oxidation zu energieaufwendig, weshalb leichter verwertbare Verbindungen bevorzugt oxidiert werden (Bradley et al., 1994).

Der anaerobe Abbau von TNT ist rein kometabolisch, da die Organismen keinen Energiegewinn aus ihm erzielen. Konstitutive oder durch andere Substanzen induzierte Enzyme realisieren dabei die Umwandlung von TNT in reduzierte Nitrotoluole. Im anaeroben Milieu liegen viele Redoxpartner im reduzierten Zustand vor. Bei negativem Redoxpotenzial wird nicht ein elektrophiler Angriff wie unter aeroben Bedingungen bevorzugt, sondern ein nucleophiler. Bei diesem werden leicht verwertbare und H-gesättigte Kohlenstoffverbindungen oder reduzierten Fe- oder S-Gruppen als Energiequellen genutzt, deren Protonen bzw. Elektronen statt auf  $O_2$ ,  $NO_3^-$  oder  $SO_4^{2-}$  als terminalem Elektronenakzeptor auf die  $-NO_2^-$  Gruppen von TNT übertragen werden. Dabei werden sukzessiv Nitroso- Hydroxylamino- und Aminogruppen gebildet (Ahmad & Hughes, 2002; Yamashina et al., 1953).

Esteve-Nunez und Ramos formulierten ein Reaktionsschema, bei dem Bakterien TNT als terminalen Elektronenakzeptor in der Atmungskette nutzen und dadurch Energiegewinn erzielen (Esteve-Nuñez et al., 2001). Die durch diese Reaktion gewonnene Energie dient der ATP-Synthese. Die Reduktion der Nitrogruppen ist bis zur Stufe des Triaminotoluols (TAT) möglich. TAT wird nur unter strikt anaeroben Bedingungen gebildet (Redoxpotenzial  $\leq 200$  mV (Preuss et al., 1993), und sobald das Redoxpotenzial ansteigt, reagiert TAT mit der Bodenmatrix und ist nicht mehr nachzuweisen (Hawari et al., 1998; Heiss & Knackmuss, 2002; Rieger et al., 1995). Einige Stämme von Clostridien und Desulfovirbrionen führen diese Reduktionen bis hin zum TAT durch (Ederer, 1997; Esteve-Nuñez et al., 2001), unter entsprechenden Bedingungen aber auch der bei McCormick et al. (1976) beschriebene *Veillonella alkalescens* Stamm oder der von Peterson et al. (1979) beschriebene *Escherichia coli* Stamm. Zur Reduzierung nur einer Nitrogruppe waren auch Lactobacillen (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. lactis*), sowie ein Stamm von *Salmonella enterica* befähigt (Ederer, 1997). Ferredoxin und Hydrogenasen wurden in diesen Fällen für die Reduktionsschritte verantwortlich gemacht (Preuss et al., 1993). Beim TNT-Abbau wurden Kresol und Toluol als Metabolite nach reduktiver Desaminierung von TAT (Boopathy et al., 1993) vermutet. Weil in diesem Versuch aber kein markiertes TNT benutzt wurde, war der Ursprung der Toluolbildung nicht eindeutig auf TNT zurückzuführen. Die Kresol/Toluol-Bildung kann auch über den anaeroben Abbau der Aminosäuren Tryptophan oder Tyrosin verursacht worden sein (Shen et al., 2000). Unter Anwesenheit von Sauerstoff und Metallkationen neigt TAT zur Bildung von Nitrophenolen (Hawari et al., 1998) und Hydroxytoluolen (Heiss & Knackmuss, 2002), zur Autoxidation und Bildung dunkler Polymere, wobei eine Metabolisierung durch die Mikroflora bis heute nicht beobachtet wurde (Rieger und

Knackmuss, 1995). Weil TAT recht schnell als Rückstand an die Bodenmatrix gebunden wird und chemisch rasch zerfällt (Preuss et al., 1993), konnte man es im Boden bis jetzt nie nachweisen. Über die Festkörper  $^{15}\text{N}$ -NMR wäre ein Nachweis von gebundenem TAT möglich. Rieger und Knackmuss (Rieger et al., 1995) erwogen eine Einbindung in Tonminerale und in die organische Humussubstanz (mit jeweils hoher KAK, wenn TAT und DANT protoniert vorliegen).

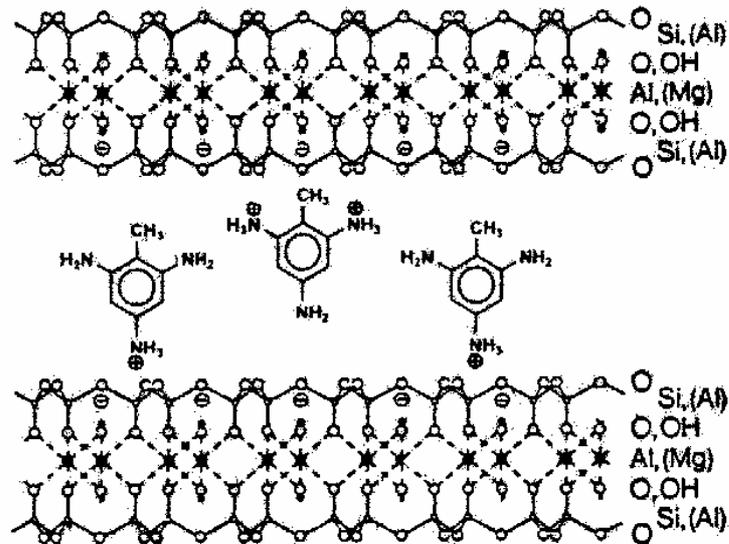


Abbildung 3 Interaktion von reduzierten TNT-Metaboliten in Tonmineralien (Montmorillonit) nach Rieger und Knackmuss (1995). Der Schichtabstand der Anionlagen beträgt 1-2 nm.

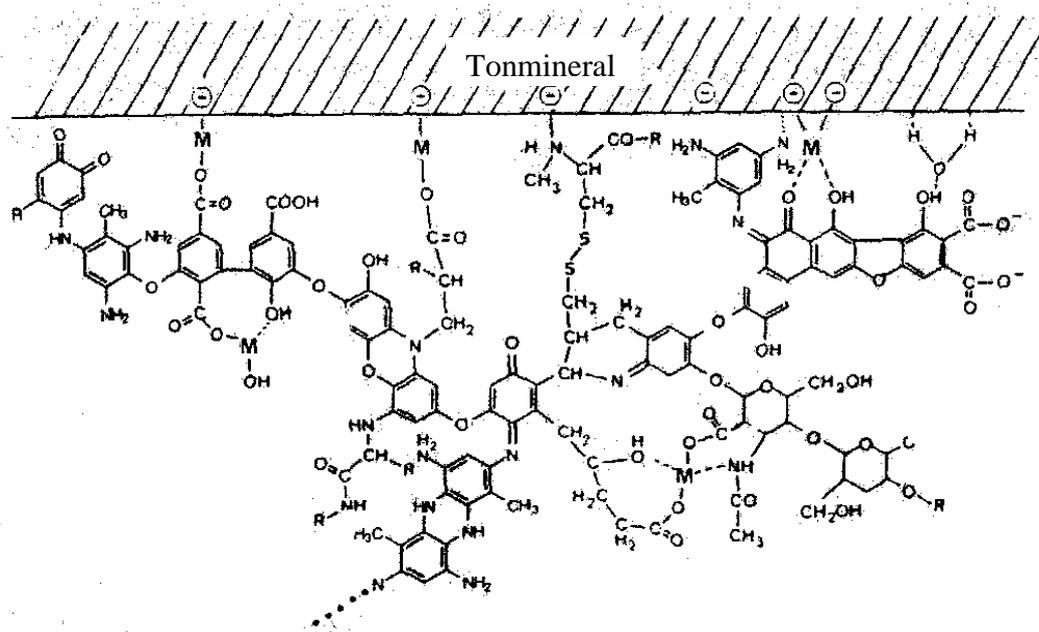


Abbildung 4 Einbindungsmöglichkeit von TNT-Metaboliten in die Huminsubstanz nach Rieger und Knackmuss (1995).

Wenn durch die sukzessiven Reduktionsschritte Hydroxyl-Amino-Nitritoluole gebildet werden, können aus TNT und seinen Metaboliten *via* Bambergerumlagerung Nitrophenole gebildet werden (Hughes et al., 1998). Dieser Reaktionsmechanismus wurde bei Zellextrakten eines *Clostridium acetobutylicum* Stammes nachgewiesen. Zwar kam es nicht zu einem Verlust von Stickstoff, dennoch spielen TNT-Metabolite durch ihre zusätzlichen funktionellen Gruppen und deren chemischen Charakteristika bei der Dekontamination eine Rolle. So ist eine gesteigerte Adsorption an Bodenpartikel oder eine weitere Desaminierung/Denitrifizierung möglich. Man nennt diese intramolekulare Hydroxylierung „Bamberger-Umlagerung“ (Hughes et al., 1998). Sie kann sowohl abiotisch als auch enzymatisch katalysiert erfolgen. Auch eine Abspaltung einer Aminogruppe, die aus weiterer Reduktion von Hydroxylaminotoluol hervorgeht, wurde diskutiert (Preuss et al., 1993). Rieger und Knackmuss (Rieger und Knackmuss, 1995) beschrieben die Eliminierung von Ammonium durch partielle Reduktion von Nitrobenzoesäure (einer dem TNT ähnlichen Verbindung) durch die Wirkung einer Hydroxylaminolyase, wobei Protocatechuat anfällt.

Bei der Reduktion von TNT treten reaktive Zwischenprodukte wie Nitroso- und Hydroxylaminoderivate auf, deren Entstehung Grundlage einer Festlegung (Immobilisierung)

von TNT sind (Acht nich et al., 1999; Ahmad und Hughes, 2002). Auch acetylierte TNT-Derivate wie 4-N-Acetyl-Aminonitrotoluol als dead-end-Produkt einer Transformation kann zu einer Immobilisierung beitragen (Gilcrease und Murphy, 1995). Mit NMR wurde eine partielle kovalente Einbindung von TNT-Metaboliten in die Bodenmatrix (Polymerbildung) ebenso wie die Einbindung in Heterozyklen nachgewiesen (Acht nich et al., 1999; Knicker et al., 1999; Knicker, 2000; Knicker et al., 2001; Thiele et al., 2002; Thorn et al., 2002). Eine Bilanzierung der Umsetzung des markierten  $^{15}\text{N}$ -TNT wurde jedoch nicht durchgeführt. Es lagen zu Beginn der Forschungsarbeit keine Bilanzierungsdaten von TNT-N mit Beobachtung der Massenströme vor. Bislang sind lediglich in der Literatur die Möglichkeiten einer N-Abspaltung erörtert worden. Um welche Abspaltungsgruppen von TNT es sich bei Transformations/Mineralisierungsprozessen handelt wurde aber experimentell nicht untersucht. Das schließt die Beantwortung der Frage mit ein, in wie weit der Stickstoff am originären C gebunden bleibt oder evtl. in andere C-Aggregate übertragen wird.

Kurz erwähnt werden sollte, dass TNT nicht allein durch biologische Prozesse transformiert werden kann. Insbesondere unter anaeroben Bedingungen wie unter Staunässe können reduzierte Metallionen wie  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , gediegene Metalle (Hundal et al., 1997) oder Chinone aus organischen Bodenbestandteilen (Schwarzenbach et al., 1990) Redoxreaktionen mit TNT eingehen (Haderlein & Schwarzenbach, 1995). Die organische Matrix des Bodens, die eine Vielzahl funktioneller Gruppen (Amino-, Carboxyl-, Sulfid- u.a. Gruppen) aufweist, ist zur Festlegung der dieser Produkte bestens geeignet.

### 1.3.2 TNT-abbauende Pilze

Bakterien und Pilze spielen eine entscheidende Rolle im globalen Kohlenstoff- und Stickstoffkreislauf. Sie nutzen organisches Material als Kohlenstoff- und Energiequelle, transformieren und mineralisieren es. Daneben haben sie wesentlichen Anteil an der Bildung und am Umsatz von Humus. Die physiologische Gruppe der holz- und streuabbauenden Pilze ist bei der Umsetzung und Mineralisierung höhermolekularer Substanzen effektiver als Bakterien. Die Vertreter der holzabbauenden Weiß- und Braunfäulepilze und die Streuschicht besiedelnden Basidiomyceten sind am Abbau der Lignozellulosematrix von Pflanzenzellwänden, aber gleichzeitig auch an der Bildung von Humus beteiligt. Weißfäulepilze verwerten den Ligninanteil im Holz, wobei sie die Ether- und C-C-Bindungen der vernetzten Phenylpropaneinheiten des Lignins spalten und anderen Mikroorganismen bereitstellen. Deren weitere Abbauprodukte wie z.B. Acetylgruppen benutzen die

Weißfäulepilze im Gegenzug wieder zur Deckung ihres C-Bedarfs. Die Folge des Weißfäuleprozesses ist also ein heller, zellulosehaltiger Rückstand. Braunfäulepilze benutzen hingegen den zellulosehaltigen Grundbaustein des Holzes und zurück bleibt der polyaromatische Ligninanteil im Holz.

Streuabbauende Pilze wachsen im Gegensatz zur erst genannten Gruppe nicht nur auf Holz, sondern besiedeln die Streuschicht des Bodens. Vertreter dieser Gruppe sind auch unter den Ständerpilzen zu finden.

Zu den Bestandteilen des ligninolytischen Enzymsystems der erwähnten Gruppen von Pilzen gehören die Enzyme Laccasen (Lac), Mangan-Peroxidasen (MnP), Mangan-unabhängige Peroxidasen (Peroxidasen) und Lignin-Peroxidasen (LiP), sowie die Wasserstoffperoxid generierenden Enzyme wie Glukose-Oxidase, Glyoxalat-Oxidase und Arylalkohol-Oxidase. Ihre Fähigkeit, phenolische Strukturen radikalisch abzubauen zu können, nutzte man beim mikrobiologischen Abbau von einer Reihe von Xenobiotika (PAK, chlorierte Phenole ...). Die oxidative Spaltung aromatischer Verbindungen kann sogar zur Generierung von CO<sub>2</sub> führen. Die Wirkungsweise der Enzyme beschreibt Geyer (2000) eingehend in seiner Promotionsarbeit. Für den katalytischen Angriff (enzymatische Verbrennung) auf die Lignozellulose benutzen die Pilze kleine Hilfsmoleküle (Mediatoren), die am Enzym durch Ein-Elektronen-Übertragung oxidiert werden. Die Pilze können Aromaten über Mediatoren (z.B. Chinone oder Porphyrine) aufbrechen. Mediatoren sind natürliche oder synthetische Moleküle, die am Enzym oxidiert werden und im folgenden ihrerseits wieder andere Verbindungen oxidieren können. Für die Oxidation vieler Verbindungen, die aus sterischen Gründen nicht direkt am Enzym oxidiert werden können, sind diese Mediatoren in die Reaktionswege zwischengeschaltet. Schwefelhaltige Verbindungen wie z.B. Glutathion oder L-Cystein haben positiven Effekt auf die Umsetzung von Schadstoffen durch extrazelluläre Enzyme.

Die Unspezifität der Radikalenzyme wird deutlich, wenn man sich das breite Spektrum an Substraten vor Augen führt, das umgesetzt werden kann. Dazu gehören phenolische und nicht-phenolischen Lignin-Modellverbindungen, Phenole und deren chlorierte Vertreter, Azofarbstoffe, Vertreter der Klasse der PAK, Dioxine sowie eine Reihe anderer Xenobiotika (Bollag & Bollag, 1990). Die Spaltungsprodukte können durch weitere Pilze und andere Mikroorganismen weiter abgebaut werden.

Weil in der vorliegenden Forschungsarbeit einige streuabbauende Pilze zum Einsatz kamen, wird im Hinblick auf die pilzliche Umsetzung von TNT und Metaboliten kurz auf ihre Besonderheiten und Fähigkeit beim Xenobiotikaabbau eingegangen.

Der initiale Schritt bei der pilzlichen TNT-Transformation ist, wie bei bakterieller Transformation, die Reduktion der Nitrogruppen zu Amino(di)nitrotoluolen durch ein Redoxsystem von Nitroreduktasen im aktiven Mycel (Stahl & Aust, 1995). Nachgewiesen wurden diese Reaktionen des TNT-Abbaus vor allem bei Weißfäulepilzen. Deren ligninolytisches Enzymsystem kann zusätzlich effektiv reduzierte TNT-Metaboliten oxidieren (Axtell et al., 2000; Kim et al., 2000; Köhler et al., 2000; Scheibner et al., 1999; van Aken & Agathos, 2001; Michels & Gottschalk, 1995; Wang et al., 2002). Scheibner et al. (1999) wiesen eine *in vitro*-Verwertung von Aminodinitrotoluolen in einem Gemisch aus extrazellulären Enzymen, Mediatoren und unter Optimierung des pH nach. Die Konzentration an Ammonium-Stickstoff im Boden, welche ligninolytische oder nicht-ligninolytische Enzyme reguliert, kann den Stoffumsatz beeinflussen. Bei allen Studien unterschieden sich die Stickstoffquellen und viele andere wachstumsregulierende Faktoren. Aus diesem Grund ist eine generelle Aussage bezüglich der Effizienz des TNT-Abbaus in Abhängigkeit von Stickstoffgehalten nicht möglich. Unter N-limitierenden Bedingungen sind viele Pilzstämme zum TNT-Abbau befähigt (Michels und Gottschalk, 1995; Rho et al., 2001) und sogar eine Mineralisierung von TNT wurde beschrieben (Michels & Gottschalk, 1995). *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F- 1767 oder Stamm ATCC 32629 (Haider und Martin, 1988) erwiesen sich als effektive Vertreter dieser Spezies von Weißfäulepilzen. Scheibner et al. (1999) fanden nach einem Screening unter ligninolytischen Pilzen zehn, die zum TNT-Abbau befähigt waren und innerhalb von 64 Tagen zwischen 20 und 42 % TNT mineralisierten (Scheibner et al., 1999). Die effizientesten Vertreter waren *Clitocybula duseinii* TMb12 und *Nematoloma frowardii* DSM 11239 sowie *S. rugosoannulata* DSM 11372. Im Flüssigmedium kann die Mineralisierung bei diesen Pilzen im Gegensatz zu Bakterien, die selten > 10 % (Kim et al., 2002; Boopathy et al., 1993) von TNT mineralisieren, auf bis zu 52 % (Scheibner et al., 1999, 141) ansteigen. Bei einem weiteren Screening zur Transformation durch Pilze, z.B. Deuteromyceten (Fungi imperfecti) bzw. Proascomyceten (Hefen) (Bayman & Radkar, 1997; Zaripov et al., 2002), konnte jedoch keine Mineralisierung von TNT festgestellt werden. Dennoch fanden Hefen als günstige Biomasse Einsatz bei der gezielten Reduktion TNT zu ADNT, DANT und OH-ADNT (Kröger et al., 2002). Deuteromyceten bewirkten bei den Transformationsprozessen lediglich einen Anstieg wasserlöslicher Metabolite (Bayman & Radkar, 1997). Der exakte Mechanismus der TNT-Mineralisierung durch Spezialisten unter

den Pilzen ist noch nicht vollständig aufgeklärt (Esteve-Nuñez et al., 2001). Beim TNT-Abbau durch *P. chrysosporium* BKM-F- 1767 wurden acetylierte Zwischenprodukte detektiert (Rho et al., 2001). Zudem konnte dieser Pilz wie die für das Bakterium *Clostridium acetobutylicum* beschriebene Bamberger-Umlagerung von TNT zu Hydroxylaminonitrotoluol durchführen (Hawari et al., 1999).

#### 1.4 Bildung gebundener Rückstände

Durch Untersuchungen zum Umweltverhalten von Pestiziden ist die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen schon lange bekannt. Durch die American Chemical Society wurden bereits 1975 gebundene Rückstände wie folgt definiert: *„Ein bodengebundener Rückstand ist der nicht-extrahierbare und chemisch nicht-identifizierbare Wirkstoffrückstand, der in Fulvosäuren, Huminsäuren und Huminfraktionen nach intensiver sequenzieller Extraktion mit nicht-polaren organischen und polaren Lösungsmitteln verbleibt“*. Die IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) definiert den Begriff folgendermaßen: *„Gebundene Rückstände sind Verbindungen in Böden, Pflanzen oder Tieren, die als Ausgangssubstanz oder deren Metabolite nach Extraktion in der Matrix verbleiben. Die Extraktionsmethoden dürfen weder die Verbindung noch die Struktur der Matrix wesentlich verändern. Die Art der Bindung kann teilweise durch matrixverändernde Extraktionsmethoden und anschließende leistungsfähige analytische Methoden geklärt werden. Auf diese Weise wurden bis jetzt zum Beispiel kovalente, ionische und sorptive Bindungen, wie auch Bindungen in Form von Einschlüssen identifiziert. Generell verringert die Bildung von gebundenen Rückständen signifikant die biologische Zugänglichkeit und die biologische Verfügbarkeit der Verbindung“* (Führ et al., 1998) .

Nicht-extrahierbare Rückstände werden also von originären Schadstoffen oder deren Umwandlungsprodukten unterschieden. Jegliche Art der Festlegung erschwert bzw. verhindert die biologische Umsetzung der Schadstoffe oder den weiteren Abbau von Teilabbauprodukten. Mit zunehmender Verweildauer der Kontaminanten im Boden beobachtete man den Effekt der stärkeren Fixierung im Boden und nannte dieses Phänomen „Alterung (Ageing)“.

Die Festlegung ist jedoch gleichzeitig auch ein Mechanismus der Entgiftung. Im Feinkornanteil von Böden werden Schadstoffe durch Sorption aufgrund der im Verhältnis zum Volumen großen Oberfläche stärker angereichert als in grobkörnigeren Bodenfraktionen und fester gebunden. Dies wurde von Pennington und Brannon bestätigt, die zeigten, dass in

einem tonigen Boden TNT durch Pflanzen weniger effektiv aufgenommen wird als in einem schluffigen Boden (Pennington et al., 2001). Eine Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände findet bei sehr unterschiedlichen Substanzen und Stoffgruppen statt. Nicht-extrahierbare Rückstände sind ein generelles Phänomen, das z.B. bei PAK, TNT und Vertretern der sehr heterogenen Stoffgruppe der Pestizide auftritt (Führ et al., 1998; Thorne & Leggett, 1996; Northcott & Jones, 2000; Kästner et al., 2001; Kästner et al., 1999; Roberts et al., 1984; Verstraete & Devliegher, 1996). Die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände kann auf unterschiedlichen Wechselwirkungen beruhen:

- sorptiven Wechselwirkungen durch reversibel an Huminstoffe gebundene Molekülen,
- praktisch irreversibel an Huminstoffe, Kohlepartikel und andere Bodenbestandteilen (Metall(hydro)xide (Alexander, 1995; Berry & Boyd, 1985; Kördel & Hund, 1998) gebundene, wenig bis nicht bioverfügbare Molekülassoziationen (Sequestrierung)
- kovalent an Huminstoffe gebundene, nicht bioverfügbare höher- und hochmolekulare Produkte,
- eingeschlossen in Mikroporen als nicht bioverfügbare analog der Residualsättigung bei Mineralölkohlenwasserstoffen (Entrapment) (Kästner et al., 2001).

Ob ein Schadstoff vornehmlich gelöst in der wässrigen Phase vorliegt oder eher an der organischen Bodensubstanz oder an den Tonmineralen sorbiert, wird durch schadstoffspezifische Kennwerte, wie die Hydrophobizität, Boden/Wasser-Verteilungskoeffizienten, Wasserlöslichkeiten oder durch Ladungsverhältnisse bestimmt. Biologische Prozesse sind dabei für die Mineralisation, aber auch für die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände verantwortlich. Erst durch die Verwendung von radioaktiv markierten Substanzen sind nicht-extrahierbare Rückstände nachweisbar und quantifizierbar, da sie sich einer konventionellen extraktiven Analytik entziehen. In welcher Art die Festlegung erfolgt, hängt im wesentlichen von den physiko-chemischen Eigenschaften der Schadstoffe ab. Entscheidend ist z.B. auch, ob die Schadstoffe reaktive funktionelle Gruppen tragen, also ob die Schadstoffe direkt als Originalverbindungen eingebaut werden können, oder ob diese Gruppen erst durch mikrobielle Transformation erzeugt werden müssen.

Die jeweiligen bodeneigenen Bedingungen (Sauerstoffversorgung, reduzierende Bedingungen, pH etc.) wirken sich über die mikrobielle Aktivität und die notwendigen Transformationsreaktionen auf die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände aus.

Im Boden ist die Mineralisierung von TNT nicht der einzige Indikator für einen erfolgreichen Abbau. Eine Verringerung einer TNT Kontamination wird v.a. durch Transformationsprozesse erreicht. Diese führen zur Ausbildung eines Kohlenstoff-Depots (Humifizierung) im Boden, welches wiederum einem langsamen unspezifischen Abbau durch Mikroorganismen unterworfen ist. So können auch persistente und toxische Naturstoffe entgiftet und in den Kohlenstoffkreislauf einbezogen werden. Als Humifizierung von Schadstoffen bezeichnet man den Prozess der irreversiblen Festlegung der Schadstoff-Derivate in der organischen Bodenfraktion (Kästner et al., 2001).

Bei einigen Pestizidwirkstoffen kann aber auch eine sehr ausgeprägte und feste Bindung an Tonminerale für die Bildung nicht-extrahierbarer Rückstände ausschlaggebend sein. So verhält es sich bei Diquat und Paraquat, die in die Zwischenschichten von Tonmineralen eingelagert werden (Hayes et al., 1975). Die planare Struktur der Wirkstoffe ermöglicht dabei beispielsweise eine Einwanderung in die Zwischenschichten der aufweitbaren Tonminerale Montmorillonit oder Vermiculit. Tonminerale und die organische Bodenfraktion sind dabei die dominanten Sorbentien. Die Wechselwirkung zwischen TNT und bestimmten Tonmineralen (Schichtsilikaten) beruht auf der Ausbildung von Elektronen-Donator-Akzeptor-Komplexen (EDA-Komplexe). Diese kommen durch Ladungsübertragung zwischen den freien  $d$   $\pi$ -Elektronen von  $\text{SiO}_2$  ( $\pi$ -Donator) auf die elektronen-armen  $\pi$ -Systeme der Aromaten ( $\pi$ -Akzeptor) des TNT-Moleküls zustande (Haderlein & Schwarzenbach, 1995; Rieger et al., 1995). Dadurch kann sich TNT koplanar an Siloxanoberflächen von Tonmineralen anlagern (Haderlein et al., 2000). Reduzierte Metabolite sorbieren schwächer an monomineralische Tone als TNT. Die Sorption von TNT, 2-ADNT und 4-ADNT an Tonminerale ist reversibel. Dagegen wurde gefunden, dass die beiden TNT-Metabolite 2-HADNT und 4-HADNT und TAT irreversibel und DANT partiell irreversibel an Tonminerale sorbieren (Daun et al., 1998; Lenke et al., 2000). Die Wechselwirkung zwischen TNT und organischer Substanz wurde anhand von Standardhuminsäuren (Daun et al., 1998) untersucht. Ionische Wechselwirkungen mit Huminsäuren bewirkten, dass mit steigendem pH und steigender Ionenstärke mehr TNT gebunden wurde.

Direkte Beweise für das beobachtete Auftreten von nicht extrahierbaren Rückständen, die kovalent an natürliche Huminstoffe gebunden sind, konnten über  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektroskopie mit Anilin an verschiedenen Fulvo- und Huminsäuren, später mit partiell reduziertem TNT an organischer Substanz (Achnich et al., 1999) erbracht werden. Der Stickstoff der Aminogruppe wurde dabei fest in neu gebildete Heterozyklen eingebaut (Thorn et al., 1996). Kopplungsexperimente mit 2,4-DANT und Guajacol in Gegenwart einer pilzlichen Laccase

ergaben die Bildung einer trimeren Verbindung aus zwei Guajacolumolekülen und einem Molekül DANT, dessen Struktur eindeutig als 5-(2-Amino-3-Methyl-4-Nitroanilino)-3,3'-Dimethoxy-4,4'-Diphenochinon bestimmt wurde (Dawel et al., 1997). Damit konnte erstmals die Struktur einer spezifischen Kopplung an Huminstoffmodellsubstanzen ermittelt werden.

Diese polymeren Produkte waren Objekt intensiver Forschungsobjekte: einige Forscher befürworteten diese Strategie als naturnahe Detoxifizierung (Bruns-Nagel et al., 1998; Esteve-Nuñez et al., 2001; Fritsche et al. 2000; Rieger et al., 1995), andere sahen die einhergegangene Verringerung der Bioverfügbarkeit des Schadstoffs als Indiz für eine bleibende Kontamination (Pennington et al., 1995), deren Stabilität und Umweltverhalten studiert werden muss, bevor diese Sanierungsmethodik in die Praxis umgesetzt wird.

### *1.5 Mobilisierung*

PAK können durch Lösen in organischen Co-Kontaminanten und durch Assoziation mit gelösten Huminstoffen mobilisiert werden (Kögel-Knabner et. al., 1998). Die Verlagerung von PAK aus humusreichem Oberboden in tiefere Bodenschichten wird dabei auf Mobilisierung durch gelöste Huminstoffe und Co-Transport im Sickerwasser zurückgeführt. Auch Kompost als Zuschlagstoff mit der Tendenz, bei Wassersättigung Huminsäuren abzugeben, hat zunächst eine Mobilisierung bewirkt. Das Bodenwasser (Poren oder Kapillärwasser) enthält abhängig von der Bodenart unterschiedliche Mengen an gelösten, makromolekularen und niedriger molekularen Huminstoffen (DOM). Sie fungieren als Sorbentien und "lösen" die PAK über ihre Wasserlöslichkeit hinaus (Solubilisierung). Durch die Solubilisierung kann die Mobilität der PAK, speziell der nur im  $\mu\text{g l}^{-1}$  löslichen Verbindungen erhöht werden. Von niedriger molekularen Huminstoffen sorbierte PAK können dadurch mit dem Sickerwasser transportiert werden (Co-Transport).

Für eine biologisch erfolgte Festlegung von Schadstoffen bei Sanierungsverfahren muss die Wirksamkeit und Nachhaltigkeit der Festlegung durch wissenschaftliche Untersuchungen nachgewiesen werden. Dabei reicht es nicht aus, die Festlegung der Schadstoffe allein mit Hilfe von radioaktivmarkierten Substanzen als nicht-extrahierbare oder gebundene Rückstände zu beweisen, um diese als langfristig unbedenklich einzustufen. Zusätzlich muss auch nachgewiesen werden, dass von dem Bodenmaterial, welches humifizierte Schadstoffrückstände enthält, unter natürlichen Umständen keine Gefährdung für die Umwelt ausgeht. Auch nach langen Zeiträumen (mehreren Jahrzehnten) darf keine signifikante Wiederfreisetzung der zuvor immobilisierten Schadstoffe erfolgen. Ansonsten bestünde über

Boden, Grundwasser, Atmosphäre oder die Nahrungskette eine erneute Kontaminationsgefahr für Pflanzen und Tiere.

Ziel der hier vorgestellten biologischen Sanierungsverfahren ist es, TNT über Transformationsprozesse zu metabolisieren und im Anschluss daran über die Humifizierung in eine unschädliche Form zu überführen. Dann sind die Verfahren als geeignet einzustufen.

Eine Möglichkeit die Stabilität der gebunden Rückstände zu testen, ist die Simulation von unterschiedlichen Möglichkeiten der Wiederfreisetzung unter *worst case*-Bedingungen. Die nicht-extrahierbaren Rückstände werden dabei unterschiedlichen ökologisch relevanten Stressbedingungen ausgesetzt. Dabei wird das Verhalten bzw. die Stabilität der nicht-extrahierbaren Rückstände ermittelt. Kommt es während der Untersuchungen zu einer erhöhten Freisetzung von zuvor nicht-extrahierbaren Rückständen (z.B. in einer extrahierbaren Fraktion oder sogar wasserlöslichen Fraktion) ist zu überprüfen, ob es sich um die Originalschadstoffe oder Schadstoffderivate handelt, denn in einem solchen Fall ist die Stabilität der nicht-extrahierbar gebundenen Rückstände nicht gegeben. Desweiteren können ökotoxikologische Untersuchungen ebenfalls die Unbedenklichkeit der Schadstoff-Festlegung aufzeigen, wenn das Bodenmaterial langfristig keine erhöhte Toxizität aufweist. Das ist dann der Fall, wenn die Bindungen zwischen Kontaminante und Adsorbens praktisch irreversibel ist; z.B. bei kovalenten Bindungen (z.B. C-C- oder C-N- Bindung). Die Beurteilung der Stabilität festgelegter Bindungen ist wichtig für eine Risikobewertung einer Sanierungsmaßnahme.

## 1.6 Aufgabenstellung

Die erfolgreiche mikrobiologische Sanierung von Rüstungsaltslasten stellt heute immer noch eine Herausforderung dar. Dabei betrifft dies weniger die prozessbedingte Steuerung, als vielmehr die bürokratischen Genehmigungsverfahren. Um der Öffentlichkeit diese Techniken näher zu bringen und auch den Entscheidungsträgern diesbezüglich eine Hilfestellung zu geben, wurde die Entwicklung eines „Leitfadens zur biologischen Bodensanierung und Sanierungsmethodenentwicklung“ initiiert (Fritsche et al., 2000; Gehrke & Michels, 1999; Michels et al., 2000). Untersuchungsschwerpunkt war das TNT-kontaminierte Gebiet „Werk Tanne“ in Clausthal-Zellerfeld (BMBF-Förderkennzeichen 14810925). Der Projektverbund gliederte sich in drei Anwendungsebenen dreier unterschiedlicher biologischer Immobilisierungsverfahren. Die maßstabsgerechte Erprobung wurde vor Ort mit 50-100 to kontaminiertem Bodenaushub durchgeführt. Weiterführende Untersuchungen unter

natürlichen Bedingungen wurden mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem TNT in Bioreaktoren und in Freilandlysimetern im Kubikmetermaßstab durchgeführt. Und schließlich wurden im Labormaßstab mit  $^{14}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$ -markiertem TNT Untersuchung zur Langzeitstabilität und Strukturaufklärung der Rückstände als wissenschaftliche Begleitstudien durchgeführt. Die hier dargestellte wissenschaftliche Arbeit beschreibt das Pilzverfahren zur Immobilisierung von TNT innerhalb der Labormaßstabebene (BMBF-Fördernummer 14810925) für einen Zeitraum von 176 Tagen. Bei den beiden anderen Verfahren zur Immobilisierung handelte es sich um ein Sequenzielles Anaerob/aerob-Verfahren mit einem Inkubationszeitraum von 93 Tagen mit stetig wechselnden Redoxverhältnissen (Fraunhofer- Institut für Grenzflächen und Verfahrenstechnik Stuttgart, BMBF-Fördernummer 1481161) sowie um ein Dynamisches Beetverfahren (Institut für Umwelthygiene der Universität Marburg, BMBF-Fördernummer 1481166) mit 35 Tagen anaerober Inkubation und weiteren 28 Tagen aerober Inkubation. Gemeinsam ist den letzteren Verfahren die Co-Vergärung geeigneter Kompostierungsadditive unter wechselnden Redoxverhältnissen.

Das Verfahrensprinzip beim Sequenziellen Anaerob/aerob-Verfahren besteht darin, daß mit Zuschlagstoffen versetzter, TNT-kontaminierter Boden in einem Festbettreaktor kompostiert wird. Das Substrat wird anfangs täglich, danach unregelmäßig gewendet. Durch die starke Sauerstoffzehrung kommt es zu anaeroben Nischen, in denen die Reduktionen von TNT stattfinden. Durch den Verbrauch der organischen Zuschlagstoffe wird ein fließender Übergang zwischen anaerober und aerober Phase erzielt. Das Dynamische Beetverfahren stellt ein Kompostierungsverfahren unter Kompression dar. In der ersten anaeroben Phase wird TNT so unter Luftausschluss zu aromatischen Aminen reduziert, in einer zweiten aeroben Phase nach dynamischer Belüftung des Materials erfolgt die Humifizierung dieser Verbindungen.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Eignung des Pilzverfahrens als dauerhafter Sanierungsstrategie zu untersuchen und zu dokumentieren. Bei diesem rein aeroben Verfahren wächst ein streuabbauender Pilz in die Bodenschichten ein und metabolisiert dabei an den Grenzflächen zwischen Hyphen und Boden TNT sukzessive zu Verbindungen, welche in die organische Bodenmatrix eingebaut werden. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit umfassende Versuche mit rückstandshaltigen Materialien aus den beiden o.g. anaerob/aerob-Verfahren und dem Pilzverfahren durchgeführt und Ergebnisse vergleichend in die Auswertung zur Stabilität und Strukturaufklärung der Rückstände miteinbezogen.

Um die Festlegung von TNT als Sanierungsmaßnahme mit Standortboden in Großmieten im Labormaßstab untersuchen zu können, musste eine Laboranlage als geschlossenes System mit

mehreren temperierbaren Bodenreaktoren incl. Feuchtere regulierung und Sauerstoffnachdosierung entwickeln werden. Hiermit sollte eine Bilanzierung von eingebrachtem  $^{14}\text{C}$ -TNT im Boden und in der Gasphase erfolgen. Nach erfolgter biologischer Bodensanierung ist ein Anteil der ursprünglichen Kontaminanten biologisch abgebaut, d.h. entweder zu Kohlendioxid mineralisiert worden oder in der organischen Bodenmatrix festgelegt. Dabei ist das Verhältnis zwischen Mineralisation und Festlegung schadstoff- und verfahrensspezifisch. Bei TNT erfolgt i.a. keine oder nur eine äußerst geringe Mineralisation, aber eine nahezu vollständige Festlegung (Achnich et al., 1999 (2); Achnich et al., 2000 (5); Esteve-Nuñez et al., 2001). Durch Anwendung unterschiedlicher Sanierungsverfahren kann – neben dem unterschiedlichen Abbau der Schadstoffe – sowohl das Ausmaß der Bildung der nicht-extrahierbaren Rückstände als auch deren Bindungsstrukturen im Boden variieren und mit ihr die Stabilität der nicht-extrahierbaren Rückstände. Inwieweit sich das Festlegungsmuster von Rückständen aus dem Pilzverfahren von Mustern anderer biologischer Verfahren unterscheidet, sollte hier untersucht werden.

Soweit es sich bei den Rückständen nicht um leicht hydrolysierbare Bindungen (z.B. Ester- oder Peptidbindungen), sondern um stabile C–C-Bindungen handelt, kann bei der Ausbildung stabiler kovalenter Bindungen zwischen Schadstoff bzw. Schadstoffderivat und organischer Bodensubstanz von einer festen Einbindung der Schadstoffe in die Humusmatrix ausgegangen werden. Damit wird es unwahrscheinlich, dass der Schadstoff in ihrer ursprünglichen chemischen Konfiguration wieder freigesetzt wird. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass die eigentlich schadstoffbürtigen Moleküle im Boden wie biogene Moleküle zum Bestandteil der natürlichen organischen Bodensubstanz geworden sind. Da die Schadstoffe dazu aber zunächst metabolisiert werden müssen, um effektiv eingebunden werden zu können, haben die Bedingungen des Sanierungsverfahrens einen großen Einfluss auf den Prozess der Humifizierung. Unterbleibt aufgrund der gewählten Sanierungsbedingungen diese metabolische Transformation, erfolgt die Immobilisierung möglicherweise nur durch räumlichen Einschluss in der Humusmatrix und ohne Bindung. Eine solche Art der Immobilisierung ist aber nicht als stabil einzuschätzen und stellt damit eine potenzielle Gefährdung dar.

Zur näheren chemischen Charakterisierung der Bindungsstrukturen von TNT-Rückständen im Boden sollten die mit  $^{14}\text{C}$ -TNT gleich behandelten  $^{15}\text{N}$ -TNT Proben aus den Ansätzen mittels  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektroskopie untersucht werden. Damit sollte geklärt werden, ob der TNT-N durch die Behandlung mit ligninolytischen Pilzen in Form von Nitrogruppen erhalten bleibt, reduziert oder in andere Bindungsformen wie Amid- oder heterozyklische Bindungen

überführt wird. In Verbindung mit der Quantifizierung aus den  $^{14}\text{C}$ -markierten Ansätzen sollten die  $^{15}\text{N}$ -NMR-Analysen Aussagen über Art und Umfang der kovalenten Bindungen des metabolisierten TNT ermöglichen. Über die Strukturen der TNT-bürtigen Rückstände lagen zu Beginn der Arbeit nur begrenzte Informationen vor. Mit den Ergebnissen dieser Forschungsarbeit sollte diese Informationsbasis ausgeweitet werden.

Ähnlich rar waren Veröffentlichungen über die Stabilität dieser Rückstände. So sollten nach erfolgter Festlegung die Ermittlung der Stabilität der gebundenen Rückstände in Angriff genommen werden. Anhand von isotopisch markierten  $^{15}\text{N}$ - und  $^{14}\text{C}$ -markiertem TNT wurde der rückstandshaltige Boden Remobilisierungsexperimenten unter *worst-case* Bedingungen (simulierter Umweltstress) unterzogen. Remobilisierungs-Testverfahren können als Erfolgskontrolle bei Bodensanierungsverfahren dienen. Zielsetzung war es, mit einer vorgenommenen Testauswahl aus vorausgegangenen Versuchen mit PAK, alle möglicherweise auftretenden Freisetzungsbedingungen (biologische, physikalische und chemische *worst case*-Situationen) zu simulieren. Mit Hilfe dieser Untersuchungen können die Stabilität und das Langzeitverhalten der nicht-extrahierbaren Rückstände zugleich auch im Zeitraffer bewertet werden. Um die Bindungsstrukturen der Rückstände näher zu charakterisieren, wurden in Remobilisierungsexperimenten physikalische und chemische Bindungstypen aufgebrochen. Bei diesen Remobilisierungsversuchen wird der Anteil des eluierbaren und extrahierbaren Anteils der Schadstoffe betrachtet.

Die physikalischen Remobilisierungsexperimente (Kugelmühle, Wasserdampfextraktion) sollten sequestrierte Rückstände (adsorptive Gefügeeinschlüsse) spezifisch rücklösen; chemische Versuche (Simulation von Saurem Regen, Wasserdampfdestillation und EDTA-Komplexierung) sollten gezielt eine maximale Auswaschung bewirken und durch Hydrolyse die Destabilisierung der Bodenaggregate. Dabei sollten kovalente, ionische oder adsorptiv gebundene Rückstände gelöst werden. Die biologischen Remobilisierungsexperimente dienten der enzymatisch/radikalischen Rücklösung kovalenter Bindungen. In Zusammenarbeit mit der Firma JenaBios (Jena) wurden zur Remobilisierung von TNT oder dessen Metaboliten durch radikalbildende Enzyme im ersten Schritt die Bedingungen für die Enzymwirkung in Boden optimiert. Darüber hinaus wurde die Mobilisierung der Rückstände in diesen Böden durch Bepflanzung mit Mono- und Dikotyledonen untersucht.

Die Versuche sollten klimatische Veränderungen, mechanische Bodenbeanspruchungen, aber auch die Wirkung Sauren Regens, Auswaschung und Verwitterung sowie radikalische Depolymerisierung und Wirkung von pflanzlicher Aktivität incl. Wurzelexsudation in Zeitraffer simulieren und deren Wirkung auf gebundene TNT-Rückstände beschreiben.

Sollten Versuche zu einer signifikanten Remobilisierung von TNT, Metaboliten oder Bruchstücken derselben (die  $^{14}\text{C}$ -Markierung macht deren Detektion möglich) führen, müssten die angewandten biologischen Festlegungsprozesse als ineffektiv im Sinne einer dauerhaften Dekontamination eingeschätzt werden. Die  $^{14}\text{C}$ -Bilanzen der Remobilisierungsexperimente mit den TNT-haltigen Böden sowie die Bindungsformen der  $^{15}\text{N}$ -Metabolite im Boden wurden im Rahmen dieses Projekts mit den entsprechenden Ergebnissen der oben genannten Kompostierungsverfahren verglichen.

Untersuchungen an TNT-N sollten zusätzlich Aufschluss über die Prozesse der Festlegung und mögliche Transformationswege von TNT liefern. Viele Forschungsergebnisse zum Umweltverhalten von TNT sind mit  $^{14}\text{C}$ -Markierungen des Moleküls erzielt worden. Um einer einseitigen Bewertung entgegenzuwirken, ist es sinnvoll, unterschiedliche funktionelle Gruppen bei Molekülen zu betrachten. Die moderne Messanalytik bei isotopisch markierten Verbindungen (hier  $^{15}\text{N}$ ) kann so zu einem klareren Bild des Umweltverhaltens von TNT beitragen. Ob z.B. eine N-Abspaltung von TNT im Boden möglich ist und wie sie sich auswirkt, war bis zu Beginn dieser Arbeit noch nicht bekannt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Standort/Boden

Das ehemalige TNT-Sprengstoffwerk „Tanne“ bei Clausthal-Zellerfeld liegt im südlichen Niedersachsen (Harz) auf 560 m üNN. Auf dem 117 ha großen Gelände wurden von 1939 bis 1944 über 100.000 t des Sprengstoffs hergestellt. Bei einer Jahresdurchschnittstemperatur von 6,2 °C fallen durchschnittlich 1300 mm Niederschlag. Bodentyp an diesem Standort ist eine lehmige Braunerde mit Grauwacke im Untergrund (Köhler et al., 2000) (siehe Tabelle 1). Die TNT-Konzentration des Bodens vom Standort des ehemaligen Werkes „Tanne“ betrug ca. 400 mg/kg TS (Winterberg, 1997).

Tabelle 1 Chemisch-physikalische und mikrobiologische Parameter des eingesetzten Bodens vom Werk "Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld (analysiert in Marburg, Banholz et al. (2000).

#### Bodenzusammensetzung:

##### Bodenmikroflora<sup>1</sup>:

gS	21,3 %	47,5 %
mS	14,8 %	
fS	11,4 %	
gU	12,6 %	39,7 %
mU	19,8 %	
fU	7,3 %	
T	12,9 %	12,9 %

#### Bodenparameter:

Boden pH:	7,43
Kalk-gehalt:	2,15 %
Glüh-Verlust (550° C):	13,70 %

Aerobe und fakultativ anaerobe heterotrophe Organismen	4,6 x 10 <sup>7</sup> KBE/g
Clostridien	1,4 x 10 <sup>4</sup> KBE/g
Pilze	1,7 x 10 <sup>5</sup> KBE/g
TNT-reduz. Organismen	1,2 x 10 <sup>6</sup> KBE/g

<sup>1</sup> Bestimmung der Lebendkeimzahl KBE (Kolonien bildende Einheiten) mittels MPN-Methode (Alef, 1991)

g, grob; m, mittel; f, fein ; S, Sand; U, Schluff; T, Ton

Im Projektverbund wurden drei unterschiedliche Immobilisierungstechniken angewendet:

- 1) Das Dynamisches Beetverfahren (Universität Marburg) wurde zusammen mit der Firma Plambeck-ContraCon GmbH, Cuxhaven, entwickelt (Banholz et al., 2000). Die Menge eingesetzter Zuschlagstoffe, bestehend aus pflanzlichen Abfallstoffen der Lebensmittelproduktion, betrug etwa 22,5 mas% (Banholz et al., 2000). Nach Komprimierung des Bodens wird in einer ersten anaeroben Phase TNT zunächst mikrobiell reduziert. Die Einbindung in die organische Matrix des Bodens geschieht in einer sich anschließenden aeroben, zweiten Phase (Bruns-Nagel et al., 1998).
- 2) Beim Sequenziellen Anaerob/aerob-Verfahren wird der kontaminierte Boden einem Kompostierungsprozess im Festbettverfahren unterzogen (Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik Stuttgart). Dieses Verfahren arbeitet mit kontinuierlicher Belüftung. In Abständen wird das Gemisch aus Boden und Zuschlagstoffen umgeschichtet und homogenisiert. Im Boden überwiegen prozessgesteuert zeitweise reduzierende und zeitweise oxidierende Redoxverhältnisse. Das Verfahren wurde in Kooperation von der Fraunhofer Gesellschaft und der Firma Umweltschutz Nord, Ganderkesee entwickelt (Achnich et al., 2001; Achnich et al., 2000). Zur Steigerung der Effizienz wurden 30 mas% organische Zuschlagstoffe eingesetzt, die eine Verdünnung der Ausgangskonzentration der Kontamination mit sich brachten. Das Zuschlaggemisch bestand aus Dung und Abfallstoffen der Landwirtschaft (Michels et al., 2000 ; Kapitel 7.2.2 ).
- 3) Im Gegensatz zu den anaerob/aerob-Verfahren handelte es sich beim Pilzverfahren (Friedrich-Schiller Universität Jena), das dem großtechnischen Verfahren der Firma AWIA GmbH Göttingen (hervorgegangen aus der WISSTRANS Umwelt GmbH) entsprach, um ein rein aerobes Verfahren (Herre et al., 1998). Es beruht auf der Aktivität des streuabbauenden Basidiomyceten *Stropharia rugosoannulata*. Dieser Pilz metabolisiert TNT an der Kontaktstelle von Hyphen zu Bodenkolloiden. Reduziertes TNT reagiert aufgrund seiner höheren Aktivität mit funktionellen Gruppen des Bodens und wird so in die Form gebundener Rückstände überführt.

Der Boden wurde auf 2 mm gesiebt an alle drei Kooperationspartner verteilt, um im Labormaßstab mit unterschiedlichen biologischen Methoden TNT zu immobilisieren. Den Prozess der Immobilisierung muss man sich als Humifizierung vorstellen, bei dem TNT nach dessen Transformation stabile Bindungen mit dem natürlichen Humus eingeht. Resultat ist ein nicht-toxischer Boden, der entsprechend der gesetzlichen Regularien und nach behördlicher

Genehmigung zum Wiedereinbau genutzt werden kann. Drei Varianten der Prozesssteuerung wurden benutzt.

## 2.2 Chemikalien / Isotopenmarkierte Verbindungen

In der Regel ist die Bildung von gebundenen Rückständen nur durch den Einsatz  $^{14}\text{C}$ -markierter Wirkstoffe eindeutig quantifizierbar. Diese Technik erlaubt zwar die summarische Bestimmung der Rückstandsmenge, lässt allerdings keine Rückschlüsse bezüglich der Struktur der Rückstände zu. Im Boden eingebrachtes, radioaktives [U- $^{14}\text{C}$ ]-TNT und nichtradioaktives [ $^{15}\text{N}_3$ ]-TNT dienten in dieser Arbeit als Tracersubstanzen. Damit sollte die Erstellung einer Massenbilanz der Immobilisierung und eine Quantifizierung remobilisierter, vom TNT stammender Verbindungen, möglich sein. Das  $^{14}\text{C}$ -markierte TNT mit einer spezifischen Aktivität von  $30 \text{ mCi mmol}^{-1}$  wurde bei Prof. Dr. G. Fels (Fachbereich 13 - Chemie und Chemietechnik, Lehrstuhl Organische Chemie der Universität Paderborn) synthetisiert und bei allen Projektpartnern in den jeweils biologisch zu behandelnden, TNT-belasteten Boden eingebracht. An der Universität Marburg FB Chemie wurde TNT mit stabiler  $^{15}\text{N}$ -Isotopenmarkierung von Herrn Dr. K. Steinbach mit 95 atom% Reinheit (auf Stickstoff bezogen) synthetisiert.

Durch Bodendotierung und Kontrollverbrennung von Aliquoten der Böden wurden die Anfangswerte eingebrachter Isotope für die Massenbilanzen bestimmt. Alle Chemikalien wurden mit >98% Reinheit von Merck (Darmstadt, Germany) und Sigma Aldrich (Deisenhofen, Germany) bezogen.

## 2.3 Organismen und Enzyme

Die in den Untersuchungen im Abschnitt 3.6.3.1 verwendeten Porlinge *Trametes versicolor* (DSM 11269) und *Bjerkandera adusta* (Isolat der Friedrich-Schiller Universität Jena) sowie der streuabbauende Pilz *S. rugosoannulata* (DSM 11372) und der holzerstörende Pilz *Nematoloma frowardii* (DSM 11239) (alles Basidiomyceten) sind in der Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ GmbH, Braunschweig) hinterlegt. Alle beschriebenen Isolate hatten in vorausgegangen Experimenten mit Umweltchemikalien (Chlorphenole, TNT) ihre besondere Abbauleistung bewiesen (Eilers et al., 1997; Geyer, 2000; Scheibner et al., 1999). Zur Erhöhung ihrer enzymatischen Aktivitäten wurden den

Pilzen vor dem Remobilisierungsversuch Induktoren in einer Konzentration von 50 ppm zugegeben:

Des weiteren wurde der Einfluss pilzlicher, ligninolytischer und pflanzlicher oxidativer Enzyme auf die Remobilisierung von TNT-bürtigen Rückständen für Laccase von *T. versicolor* 11269 (a), MnP von *S. rugosoannulata* 11372 (b) und HRP von Extrakten von Meerrettich (*Amoritia rusticana*) (c) untersucht. Diese Enzyme können organische Schadstoffe metabolisieren oder mineralisieren sowie gebundene Rückstände weiter transformieren oder depolymerisieren. Um die enzymatischen Reaktionen zu stimulieren, wurden den Ansätzen die Mediatoren 2,2'-Azinobis (3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonat (ABTS) (a), MnCl<sub>2</sub> (b), und reduziertes Glutathion (GSH) (c) zugegeben.

#### 2.4 Stammhaltung, Medien und Kulturbedingungen

Die Stammhaltung der o.g. Pilze erfolgte auf Malzextraktagarplatten bei 24° C. Das Mycel der Pilze wurde etwa alle 6 Wochen als Stanzstück (ø 8mm) auf frische Platten überimpft, 1 Woche im Dunkeln inkubiert und dann bei 4° C gelagert. Die Platten wurden durch Parafilm vor dem Austrocknen geschützt.

Für den Ansatz von Flüssigkulturen fanden Agarplatten mit 5-7 Tage altem Mycel Verwendung. Von diesen Platten wurden je 4 Stanzstücke aus dem äußeren Bereich der Mycelmatte auf 28 ml Vorkulturmedium in 200 ml Erlenmeyerkolben überführt.

Tabelle 2 Zusammensetzung des Fest- und Flüssigmediums\*.

<i>Malzextraktagar</i>	
Agar	18 g
Malzextrakt	20 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml
	pH 6,6 - 6,8

*Flüssigmedium pH 4,5*

Glukose	13 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0,5 g
CaCl <sub>2</sub>	0,1 g
2,2-Dimethylsuccinat	2,2 g
di-Ammoniumtartrat	0,5g
Hefeextrakt	0,25 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml
	mit HCl auf pH 4,5

\*nach Geyer, 2000.

Nach zwei Tagen Pilzwachstum in Flüssigkultur wurde die Mediatorenkonzentration (Mn<sup>2+</sup>, Veratrylalkohol, Xylidin) in allen Ansätzen entsprechend der Tabellenangaben in Tabelle 8 auf 50 ppm eingestellt. In den mit sterilen Wattestopfen verschlossenen Kolben wuchs der Pilz innerhalb von 7-10 Tagen, bei 24° C ohne Schütteln zu einer dichten, die Oberfläche bedeckenden Mycelmatte heran. Die folgenden Puffer wurden zur Bestimmung von extrazellulären Enzymaktivitäten und zur Optimierung der Enzymaktivitäten benutzt.

Tabelle 3 Pufferzusammensetzung für extrazelluläre Enzyme: Für die Meerrettich PO (HRP) und Laccase (Lac) eignete sich der Natrium-Citrat-Phosphatpuffer, für die Mangan PO (MnP) eignete sich der Malonatpuffer am besten\*.

*Natrium-Zitrat-Puffer<sup>1)</sup> pH 7*

Zitronensäure · H <sub>2</sub> O	21,014 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	35,6 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1000 ml

<sup>1)</sup> benötigter pH-Wert wird durch Mischen der beiden Lösungen eingestellt

*Malonat-Puffer<sup>2)</sup> pH 4,2*

Malonsäure	0,52 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 100 ml

\* nach Geyer, 2000.

<sup>2)</sup> benötigter pH-Wert mit 10 N NaOH eingestellt

## 2.5 Bodenvorbehandlung und Dotierung

### *Dotierung mit $^{15}\text{N}$ -TNT*

Um das Signal-Rausch-Verhältnis für die CPMAS  $^{15}\text{N}$ -NMR-spektroskopische Analyse zu verbessern, sollten für die Ermittlung der Bindungstypen dem Boden mindestens 6 g kristallines 2,4,6- $^{15}\text{N}$ -TNT  $\text{kg}^{-1}$  TS zugesetzt werden. Eine Menge von 24 g pulverförmigem  $^{15}\text{N}$ -TNT wurde sukzessive in 4 kg Boden gemischt. Dazu wurde es sukzessive im Mörser und dann in einem größeren Gefäß mit ansteigender Menge Boden intensiv vermischt. Nach vier Wochen Alterung bei 4° C im Dunkeln wurde der Wassergehalt des Bodens auf 30 % eingestellt und auf die zwei Reaktoren aufgeteilt. Die Gesamtkonzentration an TNT (incl. der Kontamination aus der Altlast in den Böden der Reaktoren betrug beim Start der Bodenbehandlung 8,5  $\text{g kg}^{-1}$  TS (R 1, mit Pilz) bzw. 8,9  $\text{g kg}^{-1}$  TS (R 2, Kontrolle ohne Pilz). Der Unterschied ergibt sich aus leicht abweichenden Wassergehalten der Bodenpartien. Nach Zugabe dieser Menge von markiertem TNT wies der Bodenstickstoff eine  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit von 24,4 atom%  $\pm$  0,1 auf. Der Gesamtstickstoffgehalt des Bodens nach TNT-Zugabe betrug 0,55 %  $\pm$  0,02.

In einem Zweitversuch zur Untersuchung der Dynamik der Stickstofffreisetzung von TNT wurden geringere Mengen von TNT eingesetzt. Um eine signifikante Anreicherung in Transformationsprodukten von TNT zu detektieren, waren 857 mg TNT  $\text{kg}^{-1}$  Boden (TG) ausreichend. Der Bodenstickstoff wies nach Zugabe des Gemisches aus je 428,5 mg  $^{15}\text{N}$  und unmarkiertem TNT eine  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit von 1.978  $\pm$  0.008 atom% auf. Hier betrug der Gesamtstickstoffgehalt des Bodens zwischen 0,44 und 0,48  $\pm$  0.02 %.

### *Dotierung mit $^{14}\text{C}$ -TNT*

Analog zum  $^{15}\text{N}$ -TNT-Boden wurde ein  $^{14}\text{C}$ -TNT dotierter Boden zur Quantifizierung der Stoffverteilung hergestellt. Dazu wurden zunächst 24 g unmarkiertes, kristallines TNT im Mörser pulverisiert und anschließend 2 ml gelöstes 2,4,6-[U- $^{14}\text{C}$ ]-TNT (6,014 MBq  $\text{ml}^{-1}$  MeOH) tropfenweise eingemischt. Die Einbringung des  $^{14}\text{C}$ -dotierten TNT in den feuchten Boden (30 % Wassergehalt) und dessen weitere Behandlung erfolgte entsprechend der Vorgehensweise mit  $^{15}\text{N}$ -TNT (siehe oben). Die TNT-Konzentrationen im Kontrollreaktor

ohne Pilz betrug  $8,9 \text{ g kg}^{-1}$  TS und im Reaktor mit Pilzbrut  $8,5 \text{ g kg}^{-1}$  TS Boden (zudotiertes und aus der Altlast stammendes TNT).

### *Biologische Behandlung von $^{15}\text{N}$ - und $^{14}\text{C}$ -TNT-markiertem Boden in Bodenreaktoren*

Die Bodenbehandlung in den Reaktoren stellt ein „scale-down“ des von der AWIA GmbH erprobten Pilzverfahrens dar. Dazu wurde eine Anlage mit vier Bodenreaktoren entwickelt, welche über Regulierung von Temperatur- und Luftfeuchtigkeit sowie Dosierung von Sauerstoff verfügen. In diesen geschlossenen Systemen erfolgte die  $^{14}\text{C}$  bzw.  $^{15}\text{N}$ -Bilanz zur Mineralisierung/Metabolisierung von TNT (Schema der Anlage siehe Abbildung 5). Die Luftzirkulation betrug  $32 \text{ ml min}^{-1}$  und die Temperatur des Bodens in dem Reaktorensystem wurde auf  $15\text{-}18^\circ \text{ C}$  eingestellt, um natürliche Bedingungen zu simulieren und ein Überwachsen durch Streptomycceten und bodenbewohnende Schimmelpilze zu verhindern. Mit dem entwickelten Laborreaktor ist eine Simulation anderer standorttypischer Parameter z.B. variierende Temperatur, Wassergehalt, Nährstoffzusammensetzung- oder konzentrationen möglich.

Die Bildung gebundener Rückstände aus TNT durch das Pilzverfahren sollte mit der Festlegung durch die autochthone Bodenflora unter natürlichen Bedingungen verglichen werden.

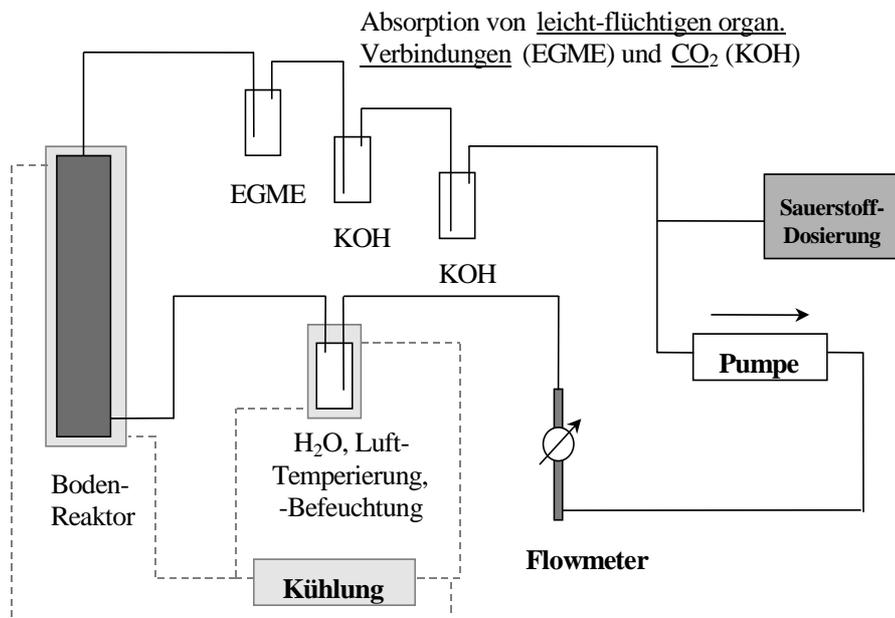


Abbildung 5 Schema der Reaktoranlage (mit Kreislaufbelüftung) zur Festlegung von TNT und seinen Metaboliten mittels Pilzverfahren.

Die Anlage bestand aus vier Einzelreaktoren von 5,7 l Volumen (siehe Abbildung 6). Zwei davon enthielten den mit  $^{14}\text{C}$ -TNT angereicherten Boden (mit Pilz/Strohgemisch beimpfter Boden sowie Kontrolle ohne Zusatz pilzlicher Brut auf Stroh), die anderen beiden Reaktoren den mit  $^{15}\text{N}$ -TNT angereicherten Boden (Reaktorenbestückung entsprechend). Am Behälterboden befand sich eine ca. 8 cm hohe Schicht aus 3 mm (Durchmesser) Glaskugeln, die eine perforierte Glasplatte gegen den darüber befindlichen Boden (2 kg) im Kontrollreaktor bzw. Boden/Strohkörper (2,5 kg) im Pilzreaktor trennte. Letzterer wurde von unten nach oben wie folgt geschichtet: 500 g mit TNT-(isotopisch markiert) kontaminierter Boden, 250 g feuchtes, pilzbewachsenes Stroh, 1000 g Boden, 250 g Stroh, 500 g Boden. Der Wassergehalt im Boden wurde zuvor auf 60 % seiner Wasserhaltekapazität eingestellt. Das pilzbewachsene Stroh wies einen Feuchtegehalt von ca. 65% auf. Beim Pilz handelte es sich um den streuschichtbewohnenden Basidiomyceten *Stropharia rugosoannulata*. Der Versuchszeitraum betrug 176 Tage. Um ein Austrocknen oder eine Bildung von Kondenswasser zu vermeiden, wurde die Luft im System ebenfalls temperiert, befeuchtet und durch eine Schlauchpumpe mit einem Volumenstrom von  $32 \text{ ml min}^{-1}$  von unten durch die Bodensäulen geleitet.



Abbildung 6 Aufbau der Reaktoren.

Die Abluft der Reaktoren wurde durch Waschflaschen mit 100 ml EGME und 2 mal 100 ml 4 N KOH geleitet, um flüchtige organische Verbindungen und CO<sub>2</sub> zu sorbieren. Die regelmäßig ausgetauschten Lösungen wurden u.a. für die <sup>14</sup>C-Bilanz analysiert. Über einen angeschlossenen Luftvorrat (flexibler Gasbeutel, Fa. Tesseraux, Bürstadt, Deutschland) wurde der verbrauchte Sauerstoff ergänzt (Abbildung 5, Abbildung 9). Weitere Details der Reaktoren und der Schichtung des Bodens bzw. des Stroh-Pilz-Substrates wurden in früheren Statusberichten bereits dargestellt (Weiß et al., 2001).

## 2.6 Vorbereitung des Stroh-Pilz-Substrates

Für die biologische Bodenbehandlung wurde der streuschichtbewohnende Basidiomycet *S. rugosoannulata* eingesetzt. Der Pilz wurde zunächst auf Malzagarplatten und auf sterilen Haferkörnern (100 g Körner und 80 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>) vorkultiviert und dann für die Beimpfung von zwei mal sterilisiertem Weizenstroh (150 g und 375 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>) verwendet. Nach einer Inkubationszeit von ca. 4 - 5 Wochen bei 18° C konnte das vollständig durchwachsene Pilz-Stroh-Substrat für Reaktorversuche eingesetzt werden.

## 2.7 Probenaufbereitung zwecks Analyse der Eigenschaften und Bindungstypen der Rückstände

Nach der Behandlung der TNT kontaminierten Böden durch das aerobe Pilzverfahren wurde die Stabilität nicht extrahierbarer Rückstände mittels unterschiedlicher physiko-chemischer und biologischer Methoden untersucht. Die rückstandshaltigen Böden der TP Marburg "Dynamisches Beetverfahren" und Stuttgart "Sequenzielles Anaerob/aerob-Verfahren" wurden folgenden „worst-case“-Szenarien unterzogen: Mahlen des Bodens, Wasserdampfextraktion, Pilzbehandlung mit ligninolytischen Pilzen, Behandlung mit extrazellulären Enzymen, Pflanzenwachstumstests. Der mit *S.rugosoannulata* TNT-immobilisierte Boden wurde zusätzlich Frost/Auftauzyklen, Saurem Regen und einem Test über die Wirkung des Komplexbildners EDTA unterzogen.

Bei Ansätzen mit signifikanter Remobilisierung (quantifizierbar über freigesetzte Radioaktivität) wurden die Versuche dann mit dem  $^{15}\text{N}$ -TNT dotierten und behandelten Boden wiederholt. Für die NMR-spektroskopische Messungen waren messungsbedingt hohe Mengen  $^{15}\text{N}$  Voraussetzung. Die in den Versuchen eingesetzte Bodenmenge musste etwa 160 g Boden (FG) betragen. Die behandelten Böden wurden vor und nach den Experimenten einem, bei allen Projektpartnern einheitlichen, Extraktions- und Analysenverfahren unterzogen.

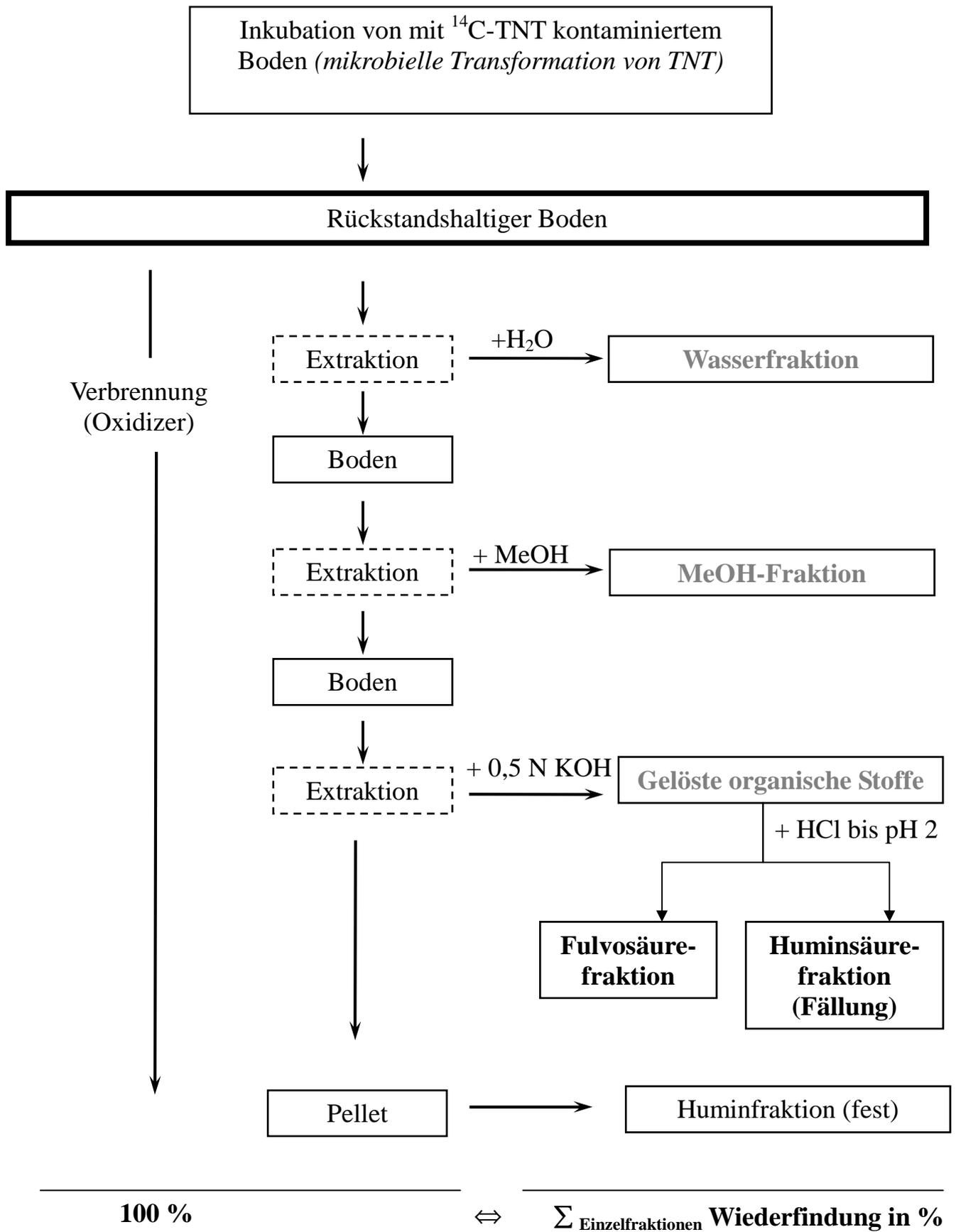


Abbildung 7 Schema der Bodenextraktion und Bilanzierung der  $^{14}\text{C}$ -Verteilung.

Aliquote sowohl der wässrigen als auch der methanolischen Fraktionen wurden mittels HPLC auf freigesetztes TNT und Metabolite untersucht (siehe Tabelle 4).

Die Huminstoffextraktionen wurden dialysiert, eingefroren und gefriertrocknet. Die Dialyse erfolgte im Dunkeln gegen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  (5-8 l) bei Raumtemperatur (RT) bei einer Trenngröße von weniger 1000 Dalton (Da) (Spectrapor, regenerierte Cellulose). Der mineralische Anteil (in der Fraktion Humin eingeschlossen) und die rein organischen Fulvo-Huminsäurefraktionen wurde nach Gewichtsbestimmung zur Aufnahme der NMR-Spektren zu Frau Dr. Knicker an das Institut für Bodenkunde der TU München-Freising geschickt.

## 2.8 Analytik von TNT und seinen Metaboliten

TNT und seine Metaboliten aus wässrigen und methanolischen Extrakten wurden chromatographisch auf fluoreszenzmarkierten Kieselgel-60 DC-Platten (Merck, Darmstadt) getrennt und bei UV-Licht der Wellenlänge 366 nm detektiert. Fließmittel war Petrolether/Isobutylmethylketon im Verhältnis 85/15 (Sohr et al., 1994). Zur Quantifizierung mittels Kontron-HPLC (Neufahrn) kam eine Lichrosphere RP 18-HPLC-Säule (Merck, Darmstadt) zum Einsatz. Die Flussrate betrug  $1\text{ ml min}^{-1}$ . Die UV-Detektionswellenlänge lag bei 254 nm. Für die Analyse der Metaboliten kam ein DAD zum Einsatz. Fließmittel war  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}/\text{MeOH}$  im Verhältnis 55/45, angesäuert mit 0,1 %  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Der Säulenofen wurde auf eine Temperatur von  $30^\circ\text{ C}$  eingestellt.

Tabelle 4 HPLC-Retentionszeiten von TNT und seinen Metaboliten.

Retentionszeit $R_t$ in min	Verbindung
2,33	2,4-DANT
6,25	2A-6NT
6,55	4A-2NT
7,14	2A-4NT
9,70	2,4,6 TNT
10,05	4A,2,6DNT
10,97	2A,4,6DNT
11,78	2,6DNT
12,60	2,4DNT

## 2.9 $^{14}\text{C}$ -Analytik / $^{14}\text{C}$ -Szintillationsspektrometrie

Durch Impulszählung wurden  $^{14}\text{C}$ -Aktivitäten in Szintillations-Cocktails mit einem Szintillationszähler des Typs LSC 1410 (Wallac, Turku, Finnland) gemessen. Für die verschiedenen Proben mit unterschiedlichem Lösungsverhalten (Polarität) wurden folgende Cocktails verwendet:

- für leicht flüchtige organische Verbindungen und  $\text{CO}_2$  eine Kaskade aus Sorbentien und Szintillatoren, bestehend aus 6 ml Optiflour (Packard, Canberra, Dreieich) und 6 ml Optiflour zuzüglich 3 ml Carbosorb (Packard, Canberra, Dreieich) in 20 ml Szintillationsgefäßen,
- für 500  $\mu\text{l}$  wässriger Lösungen (Extraktion) 6 ml Optiflour (Packard, Canberra, Dreieich) in 20 ml Szintillationsgefäßen,
- für 500  $\mu\text{l}$  MeOH-Lösungen (Extraktion) 6 ml UltimaGold (Packard, Canberra, Dreieich) in 20 ml Szintillationsgefäßen,
- für  $\text{CO}_2$ -Sorption von  $^{14}\text{CO}_2$  aus verbrannte Feststoffproben 20 ml Oxysolve C-400 (Zinsser Analytik, Frankfurt) wurden 20 ml Szintillationsgefäße (Sarstedt, Numbrecht) verwendet.

Die Analysen erfolgten in der Regel als Dreifachbestimmung mit externer Standardisierung, Quench- und Chemoluminiszenzkorrektur. Die Mittelwerte wiesen eine maximale relative Standardabweichung von 8 % auf. Wenn das Quenching wegen Trübung oder Färbung zu hoch war, wurden die Aktivitäten der Proben per Standardadditionsverfahren ermittelt. Hier lagen die maximalen relativen Standardabweichungen <11 %. Im Durchschnitt lagen die relativen Standardabweichungen unter 5 %.

Die Quantifizierung des nach 2.8 detektierten  $^{14}\text{C}$ -TNT und seiner  $^{14}\text{C}$ -Metaboliten erfolgte mittels DC und anschließender Auswertung am Phosphoimager Storm 860 (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig). Die DC wurde auf Kieselgel 60-Platten (Merck) mit einem Gemisch aus Petrolether: Isobutylmethylketon (85:15 vol%) als mobile Phase durchgeführt.

## 2.10 Bestimmungen der Isotopensignaturen und $^{15}\text{N}$ -Analytik

Die Isotopensignatur einer Probe wird im  $\delta^{15}\text{N}$  Maßstab ausgedrückt:

$$\delta^{15}\text{N} = \frac{\left(^{15}\text{N}/^{14}\text{N}\right)_{\text{spl}} - \left(^{15}\text{N}/^{14}\text{N}\right)_{\text{std}}}{\left(^{15}\text{N}/^{14}\text{N}\right)_{\text{std}}} \times 1000 (\text{‰})$$

Gleichung 1      Berechnung der Isotopensignatur eines Elementes

Das Isotopenverhältnis zweier Isotope eines Elements zueinander ergeben die Isotopensignatur oder Anreicherung. Bei dem  $^{15}\text{N}$ -Ratio wird die Anzahl Atome mit der Masse 15 auf die Anzahl Atome mit der Masse 14 bezogen. Es wurden wässrige Eluate, methanolische Extrakte, Aminosäuren und Feststoffe untersucht. Durch die Zugabe von künstlich erzeugtem  $^{15}\text{N}$ -TNT lag die Anreicherung der Isotopensignatur in der vorliegenden Arbeit jenseits der natürlichen Signatur von  $-20$  und  $+15 \text{‰}$ .

### 2.10.1 Stoffmengenberechnung

Bei der Berechnung hoch angereicherter Proben durch eine eingebrachte, isotopisch markierte Substanz, lassen sich die Stoffmengen der Isotope mit der atom%-Skala wegen kleinerer Zahlen einfacher berechnen. Die Berechnung der molaren Mengen ( $n^{14}\text{N}$  und  $n^{15}\text{N}$ ) der Stickstoffisotope bei Kenntnis der atom%-Anteile und der Gesamtmasse  $N_{\text{ges}}$  wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$1. \text{ a) } \quad m_{^{14}\text{N}} = n_{^{14}\text{N}} \times 14 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$1. \text{ b) } \quad m_{^{15}\text{N}} = n_{^{15}\text{N}} \times 15 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$2. \quad m_{N_{\text{ges}}} = n_{^{14}\text{N}} \times 14 \frac{\text{g}}{\text{mol}} + n_{^{15}\text{N}} \times 15 \frac{\text{g}}{\text{mol}}$$

$$3. \quad \frac{n_{^{14}\text{N}}}{n_{^{15}\text{N}}} = \frac{\text{at \% } ^{14}\text{N}}{\text{at \% } ^{15}\text{N}}$$

Term 3 wird nach  $n^{14}\text{N}$  aufgelöst und dieser Term ersetzt in Term 2 den Term  $n^{15}\text{N}$  wie folgt:

$$4. \quad m_{N_{ges}} = \underbrace{\frac{at \% \text{ } ^{14}N}{at \% \text{ } ^{15}N} \times n_{\text{ } ^{15}N} \times 14 \frac{g}{mol} + n_{\text{ } ^{15}N} \times 15 \frac{g}{mol}}_{= n_{\text{ } ^{14}N}} \quad \left| \begin{array}{l} n \text{ } ^{15}N \\ \text{ausklammern} \end{array} \right.$$

$$5. \quad m_{N_{ges}} = n_{\text{ } ^{15}N} \times \left( \frac{at \% \text{ } ^{14}N}{at \% \text{ } ^{15}N} \times 14 \frac{g}{mol} + 15 \frac{g}{mol} \right) \quad \left| \begin{array}{l} * \text{ at. \% } ^{15}N \end{array} \right.$$

$$6. \quad m_{N_{ges}} \times at \% \text{ } ^{15}N = n_{\text{ } ^{15}N} \times \left( at \% \text{ } ^{14}N \times 14 \frac{g}{mol} + at \% \text{ } ^{15}N \times 15 \frac{g}{mol} \right) \quad \left| \begin{array}{l} / \text{ atom \%} \\ ^{15}N \end{array} \right.$$

$$7. \quad m_{N_{ges}} = \frac{n_{\text{ } ^{15}N}}{at \% \text{ } ^{15}N} \times \left( at \% \text{ } ^{14}N \times 14 \frac{g}{mol} + at \% \text{ } ^{15}N \times 15 \frac{g}{mol} \right)$$

$$8. \quad \frac{n_{\text{ } ^{15}N}}{at \% \text{ } ^{15}N} = \frac{m_{N_{ges}}}{at \% \text{ } ^{15}N \times 15 \frac{g}{mol} + at \% \text{ } ^{14}N \times 14 \frac{g}{mol}}$$

$$9. \quad n_{\text{ } ^{15}N} = \underbrace{\frac{m_{N_{ges}}}{at \% \text{ } ^{15}N \times 15 \frac{g}{mol} + at \% \text{ } ^{14}N \times 14 \frac{g}{mol}}}_{= \text{Skalierfaktor „F“}} \times at \% \text{ } ^{15}N$$

= Skalierfaktor „F“ dient der Berechnung der Stoffmengen  $n$  der jeweiligen Isotope. Der Faktor ist für jede Gesamtmasse  $m_{N_{ges}}$  (z.B. Bodenmenge) spezifisch und ergibt sich aus Division von  $m_{N_{ges}}$  mit dem Klammerterm aus 7, der das Mengenverhältnis der Isotope zueinander beschreibt.

$$10. \quad \underline{n_{\text{ } ^{14}N} = F \times at \% \text{ } ^{14}N} \quad \text{entsprechend für das andere Isotop:}$$

$$11. \quad \underline{n_{\text{ } ^{15}N} = F \times at \% \text{ } ^{15}N}$$

Gleichung 2 Herleitung der Berechnungsformel der molaren Massen von  $^{14}N$  und/oder  $^{15}N$  bei bekannter Menge  $m_{N_{ges}}$

### 2.10.2 Elementaranalyse-MS

Boden oder eingetrocknete Flüssigkeiten mit mindestens 30  $\mu\text{g}$  N wurden im Elementaranalysator (EA 2000, Hekatech, Wegberg, Deutschland) mit Kopplung an ein

Balzer Quadstar MS, 422 QMH 400-5 (Hekatech, Wegberg, Deutschland) verbrannt, um die N-Isotopensignatur zu bestimmen. Die Signatur wurde bei stark angereicherten Proben als Anreicherung  $^{15/14}\text{N}$  in atom% angegeben, bei weniger stark angereicherten Proben (< 1 atom%) in  $\delta_{\text{‰}}$ . Die relative Standardabweichung betrug, bedingt durch inhomogene Verteilung des  $^{15}\text{N}$  markierten TNT im Boden, maximal  $\pm 8 \%$ . Natürliche N-Signaturen werden mit einer Präzision von  $\pm 0.5 \delta_{\text{‰}}$  ( $\cong 2 \times 10^{-5}$  atom%) gemessen. Der Gesamtstickstoffgehalt wurde mit dem identischen GC-System gemessen, wobei die relative Standardabweichung ebenfalls durch inhomogene Verteilung von TNT im Boden maximal  $\pm 11\%$  betrug. Als Detektor für die quantitative Analyse kam der integrierte Wärmeleitfähigkeitsdetektor zum Einsatz (GC-WLD).

### 2.10.3 Anorganischer Stickstoff im Eluat

Zur Bestimmung des Isotopenverhältnisses von  $^{15/14}\text{N}$  in Ammonium, Nitrit und Nitrat aus Bodeneluat wurde die Wasserdampfdestillation nach Bremner (1982) angewandt. Zunächst wurden zur Eluierung 20 g TS Boden mit 100 ml KCl-Lösung [1M] 2 h in Glasbehältern bei 0 U min<sup>-1</sup> über Kopf geschüttelt. Nach Abfiltration über Papierfilter wurden Aliquote von  $2 \times 40$  ml (maximale Lagerungsdauer 14 Tagen bei 4° C) mit Devarda-Legierung als Katalysator nach Bremner destilliert (Bremner, 1982). Ergebnis der Destillation waren Ammoniumsulfatlösungen, die bei 90° C zur Trockne eingedampft wurden. Die so gewonnenen Rückstände wurden zur Ermittlung der Anreicherung in den anorganischen Stickstoffverbindungen im Feststoff-EA-MS verbrannt.

### 2.10.4 $^{15}\text{N}$ TNT-Metabolitenbestimmung

Zur Analyse methanolischer Extrakte auf  $^{15}\text{N}$ -TNT und seine Metaboliten wurde ein Autosampler-GC-MS-System von Hewlett Packard (HP 6890, MS 5973, Palo Alto, USA) benutzt. Zur Trennung diente eine Supelco-Säule SPB-5 mit einer Länge von 30 m und 0,32 mm i.D. Die Filmdicke betrug 0,25  $\mu\text{m}$ . Aliquote von 2  $\mu\text{l}$  wurden bei einem Split von 1:50 injiziert. Die Injektortemperatur betrug 120° C. Das Detektionslimit von TNT und seinen Metaboliten (2,4-DANT, 2A-6NT, 4A-2NT, 2A-4NT, 4A,2,6DNT, 2A,4,6DNT) lag bei 0,1 mg kg<sup>-1</sup> Boden. Das entsprachen 0,085  $\mu\text{mol}$   $^{15}\text{N}$  aus isotopisch markiertem TNT. Das Programm der Ofentemperatur ist in Tabelle 5 zusammengefasst:

Tabelle 5 Temperaturprogramm des GC-Ofens zur Trennung von TNT und seiner Metaboliten.

<u>Ofentemperatur</u>	<u>Dauer bzw. Steigung</u>
60° C	3 min
60° C – 182° C	8° C min <sup>-1</sup>
182° C	3 min
182° C – 300° C	8° C min <sup>-1</sup>
300° C 6 min	isokratisch

Entsprechende Standards wurden vom Institut für Immunologie und Umwelthygiene der Philipps-Universität Marburg bereitgestellt.

#### 2.10.5 GC-C-IRMS Analyse von Gasen und Aminosäuren

##### 2.10.5.1 Gase

Die Isotopenzusammensetzung von Distickstoff, Stickoxid und Lachgas wurde mit einem GC-C-IRMS-System (gas-chromatography/combustion/isotope-ratio-monitoring mass spectrometry) der Firma FINNIGAN MAT (Bremen) gemessen. Gasproben mit je 100 µl für die Stickstoffmessung und bis zu 2,5 ml für die Lachgasmessung wurden auf eine Poraplot Q-HAT Plot FS-Kapillarsäule mit 25 m Länge plus 2,5 m Vorsäule (gleiches Material) mit 0.32 mm i.D. und 10 µm Filmdicke (Chrompack, Varian, Darmstadt) gebracht. Das Splitverhältnis betrug 1:5. Die Injektortemperatur betrug 120° C, die Ofentemperatur 30° C. Das GC-IRMS-System bestand aus einer GC-Einheit, die mit der FINNIGAN MAT-Verbrennungseinheit verbunden war. Zur Entfernung von CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O aus den Luftproben wurden im System Kühlfallen vor den Ofen geschaltet. Am Ende detektierte das FINNIGAN MAT 252 Massenspektrometer die <sup>15-14</sup>N Verhältnisse. Die Kalibrierung des Systems erfolgte mit Referenzgas (N<sub>2</sub>) mit einer Anreicherung von -1,960 δ ‰.

##### 2.10.5.2 Aminosäuren

Die Hydrolyse und die Derivatisierung von Aminosäuren wurde nach Richnow et al. (2000) durchgeführt. Dazu wurde 1 g Boden in 5 ml 6 M HCl in geschlossenen Spitzkolben für 22 h

bei 110° C erhitzt. Nach Abkühlen wurde das Hydrolysat durch einen Glasfaserfilter GF6 (Schleicher & Schuell, Düren) mit 0,2 µm Porenweite filtriert und anschließend zur Trockne am Rotationsverdampfer bei 45° C unter Vakuum eingengt. Zur Derivatisierung wurden in einem ersten Schritt 1 ml Isopropanol und 250 µl Acetylchlorid (beide mit einer Temperatur von 4 °C) auf das Pellet gegeben und 10 h bei 70 ° C in einem mit N<sub>2</sub> gefüllten Glaskolben inkubiert. Dieser erste Derivatisierungsschritt diente der Veresterung der Carboxylgruppe. Nach erneuter Trocknung am Rotationsverdampfer wurde die Derivatisierung der Aminogruppe durchgeführt. Dazu wurden je 500 µl auf 4° C gekühltes Dichlormethan und Trifluoressigsäureanhydrid zugegeben und das Gemisch für 10 h bei 70° C in einem mit Stickstoff gefüllten Glaskolben inkubiert. Nach erneuter Einengung wurden die derivatisierten Aminosäuren in einem Gemisch aus 250 µl Hexan und 250 µl Diethylether aufgenommen. Nach dieser chemischen Probenvorbereitung wurden die Isopropyl-Trifluoressigsäureester am IR GC-MS auf ihre Isotopensignatur untersucht. Dazu wurde eine BPX 5-Säule mit 50m Länge, 0,32 mm Innendurchmesser und 0,5 µm Schichtdicke hinter der Vorsäule eingesetzt. Das Temperaturprogramm ist in Tabelle 6 zu ersehen.

Tabelle 6 Temperaturprogramm des GC-Ofens zur Trennung von Aminosäuren.

<u>Ofentemperatur</u>	<u>Dauer/Steigung</u>
50° C	10 min
50° C – 175° C	2° C min <sup>-1</sup>
175° C	10 min
175° C -260° C	4° C min <sup>-1</sup>
260° C	10 min

### *2.11 Kernresonanzspektroskopische Untersuchung von TNT-Rückständen*

Zur näheren Charakterisierung der Festlegungsprodukte von originärem TNT im Boden kam die <sup>15</sup>N-NMR zum Einsatz. Dieses Messverfahren kann auf molekularer Ebene Aussagen zur chemischen Umgebung der <sup>15</sup>N- markierten Atome von <sup>15</sup>N-TNT liefern. Durch ein äußeres, statisches Magnetfeld werden die Kernspins (der <sup>15</sup>N-Atome) entlang diesem ausgerichtet. Durch Einstrahlung eines Radiofrequenzfeldes werden energetische Übergänge erzeugt, die als Signal in einem Spektrum (Bandenmuster) erfasst werden können. Bandenmuster, welche die chemische Umgebung und damit Bindungstypen repräsentieren, werden mit den Banden

von Spektrogrammen von Standardverbindungen verglichen (siehe Tabelle 7). Die Aufnahme der Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren erfolgte an einem Bruker DMX 400 Spektrometer mittels Kreuzpolarizationstechnik (CPMAS-NMR) bei einer Frequenz von 40,55 MHz. Die Anregung durch Magnetisierung eines  $^1\text{H}$ -Spinsystems wird auf ein  $^{15}\text{N}$ -Spinsystems übertragen, wobei die energetischen Übergänge von letzterem gemessen werden. Für die Aufnahme der Spektren wurde das Probenmaterial in einen Rotor aus Zirkoniumoxid (Durchmesser 7 mm) mit KELF-Deckel gefüllt. Die  $^{15}\text{N}$ -chemische Verschiebung ist relativ zu Nitromethan (= 0 ppm) gegeben und wurde extern mit Glycin (= -347.6 ppm) kalibriert (Knicker et al., 1999).

Tabelle 7 Verwendete Integrationsbereiche der  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren und ihre mögliche Zuordnung zu chemischen Verbindungen (Knicker et al., 1999).

Chemischer Verschiebungsbereich (ppm)	Zuordnung
50 bis -25	Nitrogruppen
-25 bis -120	Imine, Phenoxazinone, Pyridine, Chinoline, Azoxyverbindungen
-120 bis -162	Nitrile, Oxazole
-162 bis -270	Imidazole, Indole, Pyrrole, Carbazole, Chinolone, Anilide, Amide, Enaminone, Lactame
-270 bis -309	Anilinderivate, Phenoxazone, Hydrazine
-309 bis -352	Anilin, Phenylamine
-352 bis -450	Ammonium

## 2.12 Vorbereitung des Bodens für die Remobilisierungsexperimente

Für die Remobilisierungsexperimente mit biologischen Systemen mussten nicht festgelegtes TNT und dessen Metabolite weitgehend entfernt werden, um eine Hemmung durch toxisch wirkende Konzentrationen zu verhindern. Die für die Versuche benötigten Bodenmengen wurden mit der zweifachen Menge MeOH (w/w) 30 min im Ultraschallbad in Dispersion gebracht und anschließend 1 h auf einem Horizontalschüttler bei  $100 \text{ U} \times \text{min}^{-1}$  geschüttelt. Nach vollständigem Absetzen der Bodenpartikel wurde der Überstand abgezogen. Der Boden wurde auf einem mit Alufolie ausgekleideten Blech in ca. 1 cm Schichtdicke ausgebreitet und

anschließend das noch im Boden verbliebene MeOH unter einem Abzug abdampfen gelassen (24 h). Die Anfeuchtung des trockenen Bodens auf 30 % Wassergehalt erfolgte mit einer wässrigen Lösung, welche durch Ausschüttung aus einem nicht kontaminierten Referenzboden (Boden aus Clausthal-Zellerfeld; TNT-frei) gewonnen wurde. Damit wurde die mikrobielle Aktivität und krümelige Struktur des Bodens wiederhergestellt.

### *2.13 Remobilisierung durch physiko-chemische Behandlung*

Es sollte die Remobilisierbarkeit der gebundenen Rückstände im Rückstandsboden durch physiko-chemische Prozesse getestet werden. Physiko-chemische Behandlungsmethoden simulierten dabei in Zeitraffer Bodenverwitterung, Aufbruch der Aggregatstruktur, mechanische Beanspruchung, Auswaschung oder den Angriff organischer, komplexlösender Säuren. Die Versuche wurden mit allen rückstandshaltigen Böden der Arbeitsgruppen durchgeführt.

#### *2.13.1 Mechanischer Aufschluss des Bodengefüges*

Der Aufschluss rückstandshaltiger, luftgetrockneter Böden erfolgte mit einer Kugelmühle des Typs S1 (Fa. Retsch, Haan). Je 120 g Boden (TG) wurden in einem 500 ml Becher mit 3 Kugeln ( $\varnothing$  2,5 cm) bei  $75 \text{ U min}^{-1}$  für 30 min gemahlen. Das Experiment wurde unter der Annahme durchgeführt, dass durch eine Zerkleinerung von Bodenkolloiden mit darin eingeschlossenen TNT-bürtigen Rückständen in den  $\mu\text{m}$ -Maßstab Bruchstücke makromolekularer Strukturen bewirken kann.

#### *2.13.2 Simulation von Temperaturschwankungen*

Es sollte untersucht werden, ob Frostsprengung im Aggregatinneren eingeschlossene Schadstoffe freisetzen kann. Je 40 g (FG) Bodenmaterial wurde in 100 ml Rollrandflaschen eingewogen und in zwei Parallelen wiederholten Frost/Tauzyklen ( $-20^\circ \text{ C} / +40^\circ \text{ C}$ ) unterzogen. Einem Zeitraum von einem Monat mit 24-stündige Temperaturwechseln (im 24-h-Takt) folgte eine Inkubationsphase von einem Monat bei stetig  $+20^\circ \text{ C}$ . In den Monaten 3 und 4 wurde analog verfahren. Die Versuchsphase mit konstanten Temperaturen wurden

eingefügt, um den Mikroorganismen die Gelegenheit zu geben, evtl. freigesetzten Schadstoff zu metabolisieren. Im Gegensatz zu einer Kontrolle ohne Frostsprengung der Bodenaggregate sollte nach Frost/Wärmebehandlung eine erhöhte Bioverfügbarkeit des Schadstoffs in einer Abnahme der  $^{14}\text{C}$ -Rückstandsgehalte resultieren. Als Kontrolle wurden zwei Parallelen über die vier Monate hinweg bei Raumtemperatur inkubiert. Der Gasraum in den Proben wurde zweimal pro Woche ausgetauscht. Dazu wurde über Trockeneis geleitete und somit gekühlte, schwerere Luft benutzt, die in die Reaktorenbehälter „fiel“. Die Gasaustauschmenge betrug das zehnfache Behältervolumen ( $10 \times 800 \text{ ml}$ ). und das darin enthaltene  $^{14}\text{CO}_2$  sowie leicht flüchtige organische Verbindungen in einer hintereinander geschalteten Reihe von Szintillationscocktails für organische und wässrige Verbindungen sorbiert und vermessen. Das Austauschvolumen betrug das mindestens zehnfache Volumen der Gasphase im Versuchsgefäß (100 ml Rollrandflaschen). Um den Wassergehalt in den Böden konstant zu halten, wurden die Probengefäße zu Versuchsbeginn gewogen und der Gewichtsverlust durch Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  ausgeglichen.

### *2.13.3 Extraktion mittels Wasserdampf*

Die Extraktion mittels Wasserdampf wurde durchgeführt, um die maximale Remobilisierung über den Wasserpfad abschätzen zu können und erfolgte mit einem handelsüblichen Gerät zur Wasserdampfextraktion von Feststoffen: Espressomaschine Typ LaPavoni Professional (San Guiliano, Italien). Etwa 20 g Boden (TG) wurden in den Probenbehälter eingewogen und mit etwa der 10-fachen Menge überhitzten Wassers ( $121^\circ \text{C}$ , 1 bar) extrahiert. Der Wasserdurchfluss durch die Probe wurde volumetrisch und der dabei ausgespülte Feinkornanteil nach Zentrifugation gravimetrisch erfasst. Danach wurde die Radioaktivität im ausgeschwemmten Feinkornanteil der Huminfraction zugerechnet und die Radioaktivität im Überstand wurde der wässrigen Fraktion ( $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ ) zugerechnet (siehe Abbildung 7). Der durch die Wasserdampfextraktion mit Wasser gesättigte Boden wurde anschließend luftgetrocknet, und mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ , MeOH und NaOH der Standardextraktion nach Abbildung 7 unterzogen und die einzelnen Fraktionen analysiert.

#### *2.13.4 Simulation eines 1000-jährigen Regenereignisses*

Saurer Regen kann durch hydrolytische Spaltungen einen Zerfall von unterschiedlichen chemischen Bindungen verursachen. Auch die gebundenen Rückstände unterliegen einem solchen Einfluss. Die Simulation eines starken Regenereignisses mit angesäuertem Wasser erfolgte nach einer modifizierten EPA-Vorschrift (Caton et al., 1994). Dabei wurde der Einfluss des pH auf die Remobilisierbarkeit der Rückstände untersucht. 2 g TS Boden wurden in drei Parallelen in 50 ml Greinerröhrchen eingewogen und anschließend in 40 ml Wasser dispergiert, welches mit einer Mischung aus Salpetersäure und Schwefelsäure (2:3) auf pH-Wert 5 angesäuert worden war. Die Kontrollen wurden mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  behandelt, dessen pH-Wert 6,5 betrug. Die Proben wurden 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt und am nächsten Tag abzentrifugiert. Diese Prozedur wiederholte sich insgesamt zehn mal. Im Anschluss daran erfolgte der übliche Extraktionsaufschluss nach Protokoll (siehe Abbildung 7). Zur Vermessung der wässrigen Überstände wurden diese zuvor durch einen  $0,45 \mu\text{m}$  Nylonspritzenfilter (Magna-Nylon,  $\varnothing$  13 mm, Osmonics Inc., Minnetonka, USA) von Schwebestoffen gereinigt. Die im Filter zurückgehaltene Radioaktivität der Schwebstoffe wurde der Huminfraction zugerechnet.

#### *2.13.5 Auflösung metall-organischer Komplexe*

Die Lösung metall-organischer Komplexe, in denen TNT oder seine Metabolite eingebunden sein konnte, wurde mit ansteigenden Konzentrationen (0,01 M, 0,025 M und 0,05 M) von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) durchgeführt. Als Kontrolle wurde Bodenmaterial nur mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  behandelt. Bodenmaterial (je 2 g TS) wurde zweimal mit 12 ml EDTA-Lösung bzw.  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  versetzt, je 30 min ultraschallbehandelt und einer anschließenden Extraktion nach Protokoll unterzogen.

### *2.14 Biologische Behandlung*

In diesen Versuchen wurde die Remobilisierbarkeit der gebundenen Rückstände durch Zusatz von verschiedenen Mikroorganismen und Radikal-bildenden Enzymen von allen  $^{14}\text{C}$ -TNT-Böden der Teilprojekte „Sequenzielles Anaerob/aerob-Verfahren“, „Dynamisches

Beetverfahren“ und „Pilzverfahren“ quantifiziert. Mit dem analog behandelten  $^{15}\text{N}$ -TNT-Boden erfolgte dann die Untersuchung der Bindungstypen der Festlegungsprodukte bzw. Analytik der  $^{15}\text{N}$ -Metabolite. Außerdem wurde die Wirkung einer Remobilisierung durch mono- und dikotyle Pflanzen gemessen.

#### 2.14.1 Zusatz von huminstoffabbauenden bzw. ligninolytischen Pilzen

Grundlage dieses Experimentes war die Fähigkeit streuabbauender und holzerstörender Pilze, aromatische Grundkörper sowie bereits humifizierte Strukturen umsetzen zu können. Humifizierte und gebundene Rückstände mit ihrer vernetzten oder makromolekularen Struktur können Zielmoleküle pilzlichen Angriffes sein (Einzelheiten zu Reaktionsmechanismen siehe 2.14.2). Um die Reaktionsoberfläche zu vergrößern, erfolgte zunächst ein vollständiger Gefügeaufbruch des rückstandshaltigen Bodenmaterials durch Zermahlen in luftgetrocknetem Zustand in einer Kugelmühle (Kapitel 2.13.1). Von diesem Boden wurden je 7,5 g TS zu emersen Flüssigkulturen von *Nematoloma frowardii* 11239, *Stropharia rugosoannulata* 11372, *Bjerkanderra adusta* (Institut für Mikrobiologie der Friedrich-Schiller Universität Jena) und *Trametes versicolor* 11269 zugesetzt. Die Überimpfung der Pilze erfolgte nach einer Woche Wachstum bei 24° C von Malzagarplatten durch Überführung von fünf Stanzstücken in 28 ml Nährmedium (Hofrichter et al., 1997). Nach Ausbildung einer Mycelmatte nach 6-8 Tagen wurden 100 µl einer Induktorenlösung zugegeben, so dass im Flüssigmedium eine Konzentration der Induktoren von 50 ppm herrschte (siehe Tabelle 8). Drei Tage später wurde die gesamte Pilz/Nährlösung mitsamt der ausgebildeten extrazellulären Enzyme auf 7,5 g  $^{14}\text{C}$ -TNT-kontaminierten Boden gebracht. Die Reaktionsgefäße waren 250 ml Kulturflaschen, die mit Teflonkappen gasdicht verschließbar waren. Zudem wurde in einer Parallele dem Boden eine Kompostgabe von 20 vol% zugegeben. Kompost weist durch seine Aggregatstruktur und Nährstoffe ein optimales, natürliches Habitat für Mikroben auf. Somit repräsentiert eine Kontrolle mit Kompost mit hoher Besiedlungsdichte von Mikroben einen Vergleich mit einer biologisch sehr aktiven Matrix. Als Nullkontrolle wurde Boden ohne Zusatz analysiert. Pro Ansatz gab es zwei Parallelen. Der Versuchszeitraum belief sich auf 6 Wochen. Gebildetes  $^{14}\text{CO}_2$  wurde in 5 ml 2 N KOH absorbiert und die Versorgung mit  $\text{O}_2$  erfolgte jeden zweiten Tag durch regelmäßige Belüftung der Kulturflaschen beim Auswechseln der Absorptionslösung. Eine mögliche Mineralisierung von  $^{14}\text{C}$ -TNT-bürtigen Rückständen wurde durch  $\beta$ -Szintillationsspektrometrie quantifiziert.

### 2.14.2 Zusatz von extrazellulären, Radikal-bildenden Enzymen

Für diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit der Firma JenaBios Methodenprotokolle entwickelt, die ebenfalls einheitlich für die Böden aus allen Teilprojekten angewandt wurden. Die verwendeten enzymhaltigen Präparate stammten aus verschiedenen Quellen: Laccase (*Trametes versicolor* 11269, JenaBios, Jena), Mangan-Peroxidase (*Nematoloma frowardii* 11239, JenaBios, Jena) und Meerrettich-Peroxidase (SIGMA-ALDRICH). Die Reaktionspuffer und -bedingungen wurden in einer Vorstudie für jedes der eingesetzten Enzyme in Bezug auf maximale Oxidationskraft optimiert. Der Gesamtboden wurde mit den Enzymen behandelt und eine Remobilisierung anhand der Änderung in der  $^{14}\text{C}$ -Verteilung quantifiziert. Die eingesetzten Enzyme sind bekannt für Umsetzungsreaktionen von organischen Umweltschadstoffen, u.a. Polyphenole und PAK (Michels et al., 2000; Kapitel 2.1.2). Mit diesen Enzymen ausgestattete Pilze oxidieren aromatische Verbindungen durch unspezifische radikalische Reaktionen, was zu einer Spaltung der aromatischen Grundkörper führen kann. Bruchstücke können somit durch die Bodenmikroflora weiter abgebaut werden, was zu einer Detoxifizierung der Kontaminante führen kann. Der Grundmechanismus der Oxidation beruht zunächst auf einer Aktivierung eines Mediators durch Entzug eines Elektrons, z.B.  $\text{Mn}^{2+}$  mittels vom Pilz selbst ausgeschiedenem  $\text{H}_2\text{O}_2$ .  $\text{Mn}^{3+}$  ist relativ kurzlebig, kann aber innerhalb weniger Millisekunden aromatischen Grundkörpern ihrerseits Elektronen entziehen. Das führt zu einer Radikalbildung und damit zur Destabilisierung des aromatischen Rings und zu dessen Zerfall.

Je drei Reaktionsgefäße aus Glas enthielten 1 g rückstandshaltigen Boden. Diesem Ansatz wurden insgesamt 5 ml Reaktionspuffer folgender Zusammensetzung (siehe Tabelle 3) zugegeben: (a) 200 mM Citrat-Phosphatpuffer (pH 4.2), 50 U Lac (JenaBios GmbH Jena), 25  $\mu\text{mol}$  ABTS, (b) 200 mM Na- Malonatpuffer (pH 4.2), 54 U MnP, 10  $\mu\text{mol}$   $\text{MnCl}_2$  und 20  $\mu\text{mol}$  GSH, 6.25  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , (c) 200 mM Citrat-Phosphatpuffer (pH 6.8), 6 U HRP (Sigma-Aldrich, Deisenhofen), 25  $\mu\text{mol}$  ABTS, 4  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Nach 24-h Schütteln bei Raumtemperatur wurde die  $^{14}\text{C}$ -Verteilung in den unterschiedlichen Fraktionen des Bodens gemessen.

Tabelle 8 Die Enzymsysteme verschiedener Pilze zur Remobilisierung von TNT-bürtigen Rückständen.

Pilz	Enzym	Induktor
<i>T. versicolor</i> 11269	Laccase (Lac)	2,5-Xylidine (2,5-Dimethylbenzenaminhydrochlorid)
<i>B. adusta</i> (Inst. f. Mikrobiologie, F.S. Universität Jena)	Ligninperoxidase (Lip)	Veratrylalkohol
<i>S. rugoso-annulata</i> 11372	Manganperoxidase (MnP)	Mn (Cl <sup>-</sup> )
<i>N. frowardii</i> 11239	Manganperoxidase (MnP)	Mn (Cl <sup>-</sup> )

### 2.14.3 Transfer und Remobilisierung durch Bepflanzung des Bodens

In diesen Versuchen wurde mono- und dikotyle Pflanzen auf ihre Fähigkeit, Rückstände aufzunehmen oder freizusetzen untersucht. Vier Buschbohnsamen (*Phaseolus vulgaris*), zehn Radieschen (*Raphanus sativa*) - und 400 mg Weidelgrassamen (*Lolium perenne*), jede Gruppe separat, wurde in 40 g rückstandhaltigen Boden gepflanzt. Der Versuch wurde in einem Mini-Treibhaus unter Sommerlicht (ca. 14 h Beleuchtung) durchgeführt. Der Boden befand sich auf perforierten Untersetzern aus Plastik (10 cm Durchmesser, 3 cm Höhe). Zur Nachlieferung von verbrauchtem Wasser wurden diese auf Abstandshaltern in separate Wasserreservoirs gestellt. Der Wassertransport erfolgte über Papierfilterstreifen. Während des Versuchs konnte so die maximale Wasserhaltekapazität sichergestellt werden. Nach 28 Tagen Wachstum wurden die Pflanzen geerntet, kurz mit Wasser und MeOH gewaschen und übernacht bei 50° C getrocknet. Die Biomasse wurde in einem Oxidizer zur Bestimmung aufgenommener <sup>14</sup>C-Aktivität verbrannt. Ebenso wurde im Boden die <sup>14</sup>C-Verteilung in den Fraktionen ermittelt.

### 2.15 Statistische Auswertungen

Alle Versuche wurden jeweils in drei Parallelen angesetzt. Für die Prüfung auf Signifikanz der Remobilisierungsbehandlungen wurden der *t-Test* für unabhängige Proben mit dem Probenumfang  $N = 3$  durchgeführt. Als Null Hypothese  $H_0$  wurde kein Effekt der Remobilisierung angenommen. Das Signifikanzniveau  $\alpha$  wurde mit 0.05 gewählt. Nur wenn

der kritische *t*-Wert oberhalb 2.78 (Quantile  $t_{4;0.975}$ ) (Müller et al., 1973) lag, wurde die Nullhypothese abgelehnt und der Alternativhypothese  $H_{alt}$  zugestimmt, die einen signifikanten Remobilisierungseffekt der Bodenbehandlung annahm.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Vorbemerkungen

Über die Einbindung von TNT in die Bodenmatrix durch Kompostierungsprozesse lagen bereits aus vorausgegangenen BMBF-Projekten Erfahrungen vor (Herre et al., 1998). Im Teilprojekt IV „Bioremediation von TNT-belasteten Böden, Metabolisierung, Mineralisierung und Humifizierung“ (Förderkennzeichen 1450821 A) des Verbundvorhabens „Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten“ wurde mit  $^{14}\text{C}$ -TNT als Tracersubstanz gearbeitet, um den Prozess der Immobilisierung von TNT bilanzieren zu können. Dabei lagen die eingesetzten Konzentrationen von TNT bei  $232 \text{ mg kg}^{-1}$  Boden (TG). Immerhin 86% von eingesetztem TNT wurde innerhalb eines 30 Wochen andauernden Versuchs in die Form von „bound residues“ überführt und waren nicht mehr extrahierbar (Herre et al., 1998). Offen blieb allerdings die Frage, in welcher Form dabei die chemische Bindung von TNT an die Bodenmatrix erfolgte. Um das herauszufinden, wurde das Verbundvorhaben „Langzeit-Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen bei der biologischen Bodensanierung“ im März 1999 gestartet. Grundgedanke des Vorhabens war es, mit einer ausreichend hohen  $^{15}\text{N}$ -TNT-Konzentration die Bindungsformen der gebundenen Rückstände mittels  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektroskopie nachzuweisen und die Stabilität der erbrüteten Rückstände zu quantifizieren. Ausreichend hoch bedeutete in diesem Fall mindestens  $6 \text{ g }^{15}\text{TNT kg}^{-1}$  Boden (TG), denn es musste eine entsprechend starke Signalintensität für die kernresonanzspektroskopische Messung erzeugt werden. Als Parallelansatz dazu wurde ein vergleichbarer Ansatz mit  $^{14}\text{C}$ -TNT dotiert und der Umsatz bilanziert, um die Massenverteilung zu ermitteln. Solch hohe Konzentrationen von  $6 \text{ g TNT}$  sind auf Altlaststandorten real kaum zu finden. Drei unterschiedliche Strategien der biologischen Immobilisierung wurden zur Herstellung von rückstandshaltigem Boden angewandt.

- 1) Das Dynamisches Beetverfahren (Universität Marburg) wurde zusammen mit der Firma Plambeck-ContraCon GmbH, Cuxhaven, entwickelt (Banholczer et al., 2000). Die Menge eingesetzter Zuschlagsstoffe, bestehend aus pflanzlichen Abfallstoffen der Lebensmittelproduktion, betrug etwa 22,5 mas% (Banholczer et al., 2000). Nach Komprimierung des Bodens wurde in einer ersten anaeroben Phase TNT zunächst durch die autochthone Mikroflora reduziert. Die Einbindung in die organische Matrix des Bodens geschah in einer sich anschließenden aeroben, zweiten Phase (Bruns-Nagel et al., 1998).

- 2) Das Sequenzielle Anaerob-/aerob-Verfahren im Festbettreaktor (Fraunhofer Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik Stuttgart) unterschied sich vom Dynamischen Beetverfahren durch die technische Einstellung von reduzierenden/oxidierenden Zuständen im Boden. Es wurde mit der Firma Umweltschutz Nord, Ganderkesee entwickelt (Achnich et al., 2001; Achnich et al., 2000). Das Verfahren setzte zur Steigerung der Effizienz 30% mas% organische Zuschlagstoffe ein, die eine Verdünnung der Ausgangskonzentration der Kontamination mit sich brachten. Das Zuschlaggemisch bestand aus Dung und Abfallstoffen der Landwirtschaft.
- 3) Im Gegensatz zu den anaerob/aerob-Verfahren handelte es sich beim Pilzverfahren (Friedrich-Schiller Universität Jena), das dem großtechnischen Verfahren der Firma AWIA GmbH Göttingen (hervorgegangen aus der WISSTRANS Umwelt GmbH) entsprach, um ein rein aerobes Verfahren (Herre et al., 1998). Seine Effizienz hinsichtlich der Festlegung und Ermittlung der Stoffströme von TNT ist Gegenstand der Dissertation. Es beruht auf der Aktivität des streuabbauenden Basidiomyceten *Stropharia rugoso-annulata*, der TNT in Flüssigmedium mineralisieren und im Boden gebundene Rückstände bilden kann. Nach Inkubation des Pilzes in dem mit TNT kontaminierten Boden wurden in einer Freilandmiete etwa drei bis vier Wochen benötigt, um die gleiche TNT-Eliminierung zu erzielen wie die bei den zwei anaerob-/aerob-Verfahren.

Alle Verfahren sind im Abschnitt 1.6 dargestellt. Die großtechnischen Versuche hatten zuvor auf dem Gelände des Werks „Tanne“ eine erfolgreiche Immobilisierung von TNT gezeigt. Wie sich im Laufe des Projektes herausstellte, konnte durch die Dimensionierung herunter auf den Labormaßstab bei allen erwähnten Verfahren die Massenverteilung von TNT in die Bodenmatrix bilanziert werden.

### 3.2 Festlegung

Es werden unterschiedliche biologische ex-situ Behandlungsmethoden eingesetzt, um TNT und primäre Metabolite zu eliminieren und Auswaschungsprozesse von TNT und toxischen Metaboliten zu unterbinden (Esteve-Nuñez et al., 2001). Dabei kommt es zu einer Verringerung der Bioverfügbarkeit v.a. durch Einbindung von TNT in kovalente Bindungen mit der organischen Matrix des behandelten Bodens (Heiss & Knackmuss, 2002). Hintergrund des hier eingesetzten ligninolytischen Pilzverfahrens ist die Ausbildung oxidativer Polymerisationsreaktionen unterschiedlicher aromatischer Verbindungen, die v. a. auf der Bildung von Radikalen durch die Aktivität der pilzlichen, ligninolytischen Enzyme beruhen (Fritsche et al., 2000; Michels & Gottschalk, 1995). Sie werden durch Analogie ihrer

molekularen Struktur mit der organischen Substanz in den Humus eingebaut und stellen damit eine Humifizierungsvorstufe dar.

Für allgemeingültige Aussagen bezüglich des Verhaltens und der Festlegung von TNT, scheint die Anwendung mit  $^{14}\text{C}$ -Markierung geeignet, aber man sollte beachten, dass es nur wenige Berichte über das Schicksal von Stickstoff aus TNT gibt. Bis zu dieser Arbeit gab es keine völlig geschlossene Massenbilanz von in Boden eingebrachtem  $^{15}\text{N}$  aus markiertem TNT. Um ein besseres Verständnis für die Abbauege von TNT zu bekommen, kann eine solche Markierung hilfreich sein. Das Schicksal von TNT und Informationen über einen Turnover während einer Humifizierung Boden kann so aufgeklärt werden.

Für Untersuchungen zu Transformationswegen von Chemikalien und Bilanzierungen der Massenströme werden oft isotopische Markierungen als Tracersubstanzen eingesetzt. Mit Hilfe radioaktiver Markierung (Isotop  $^{14}\text{C}$ ) konnten Festlegungswege und Mineralisierung von TNT nachgewiesen und quantifiziert werden. Über eine  $^{13}\text{C}$ -Markierung wären zudem Information zur Bindungsstruktur von TNT im Boden während einer Immobilisierung (Sanierung) zu erhalten. Bindungsstrukturaussagen können auch über die  $^{15}\text{N}$ -Signatur der Nitrogruppen vom TNT gemacht werden. Diesbezüglich liegen umfangreiche Informationen vor (Thiele et al., 2002; Knicker et al., 1999; Knicker et al., 2001; Lenke et al., 2000). Einige Autoren haben mittels  $^{15}\text{N}$ -NMR Spektroskopie bereits bewiesen, dass TNT Metaboliten kovalent in die organische Bodensubstanz gebunden werden (Fraktion der gebundenen Rückstände) (Achnich et al., 2000; Bruns-Nagel et al., 2000; Knicker et al., 2001, 2000; Knicker, 2000; Lenke et al., 2000; Thorn et al., 2002; Thorn et al., 1996; Thiele et al., 2002). Dabei wurden Semichinone, Anilino(hydro)chinone, Anilide und Imine als Bindungsstrukturen zwischen TNT Metaboliten und der Humussubstanz nachgewiesen.

Die Mineralisierung von TNT durch Mikroben wird generell als vernachlässigbar gering eingestuft. Insbesondere unter anaeroben Bedingungen wird TNT zunächst im Boden reduziert und es bilden sich Aminodinitro- und Diaminonitrotoluole (ADNTs and DANTs). Zudem wurde die Bildung von Hydroxylaminodinitrotoluolen (HADNTs) beobachtet, die Vorstufen der Ausbildung von Dimeren wie Azoxytetranitrotoluole sind (Zusammenfassung bei (Esteve-Nuñez et al., 2001). Unter einer sich anschließenden aeroben Phase wurde eine drastische Abnahme der löslichen Menge von TNT und Metaboliten dokumentiert (Achnich et al., 1999), wobei die  $^{14}\text{C}$ -Markierung von TNT stets im Boden verblieb.

### 3.3 Bilanzierung des Umsatzes von $^{14}\text{C}$ - und $^{15}\text{N}$ -TNT

Wie mit mehreren Verbindungen gezeigt, führt das „Altern“ aromatischer Xenobiotika im Boden generell zu einer Verringerung der Bioverfügbarkeit und Extrahierbarkeit (Alexander, 1995; Hatzinger & Alexander, 1997; Kästner et al., 1999; Kelsey & Alexander, 1997). Verantwortlich wird dafür u.a. die Sequestrierung gemacht, ein Prozess, bei dem die schädliche Substanz in Mikroporen des Bodens einwandert. Bei der Einbindung von Xenobiotika haben neben diesen physikalischen Vorgängen biologische Transformationsprozesse großen Anteil. Im Folgenden wird speziell auf ein Festlegungsverfahren mit dem Pilz *S. rugosoannulata* 11372 eingegangen.

Die hohe Konzentration von 8 bis 8,9 g TNT kg<sup>-1</sup> Boden wirkte auf den eingesetzten Pilz *S. rugosoannulata* wachstumshemmend (siehe Abbildung 11). Nicht nur das TNT sondern auch die durch die Wirkung des Pilzes an den Grenzschichten zwischen Boden und Substrat gebildeten Metaboliten (z.B. Monoamino- und Diaminonitrotoluole) waren vermutlich daran beteiligt. In Gegenwart des Pilzes wurde eine gegenüber der Kontrolle deutlich höhere Festlegung der Metaboliten in der Bodenmatrix nachgewiesen (Abbildung 8). Der Zeitraum der Festlegung musste wegen wachstumshemmender Wirkung der Kontaminanten und der schlechter als erwarteter Festlegung auf 176 Tage Versuchsphase ausgeweitet werden. In den dargestellten Experimenten konnten am Ende des Versuchs zur Einbindung in Gegenwart des Pilz-/Strohsubstrates dennoch 2,1 g TNT kg<sup>-1</sup> Boden (TG) metabolisiert und als nicht extrahierbare Verbindungen in der Bodenmatrix immobilisiert werden. Die autochthone Mikroflora des Kontrollbodens ohne Pilz konnten dagegen nur 0,9 g TNT kg<sup>-1</sup> TS festlegen (Grafikdarstellung in Abbildung 8). Durch den Nachweis toxischer Effekte auf das Mycelwachstum des Pilzes *S. rugosoannulata* 11372 im Rahmen dieses Projektes ergibt sich für mögliche Sanierungen mit dem Pilzverfahren eine Obergrenze der effektiv behandelbaren TNT-Kontamination von 2 g kg<sup>-1</sup> Boden (TG). Höhere Konzentrationen sind jedoch auf den wenigsten Militäraltlasten zu erwarten, es sei denn TNT liegt in Klumpen und örtlich konzentriert vor. Unabhängig vom biologischen Sanierungsverfahren muss dann zuvor generell eine Siebung des Materials erfolgen, denn annähernd homogene Schadstoffverteilung im Medium gilt bei biologischen Abbauprozessen als Voraussetzung für den Erfolg dieser Techniken.

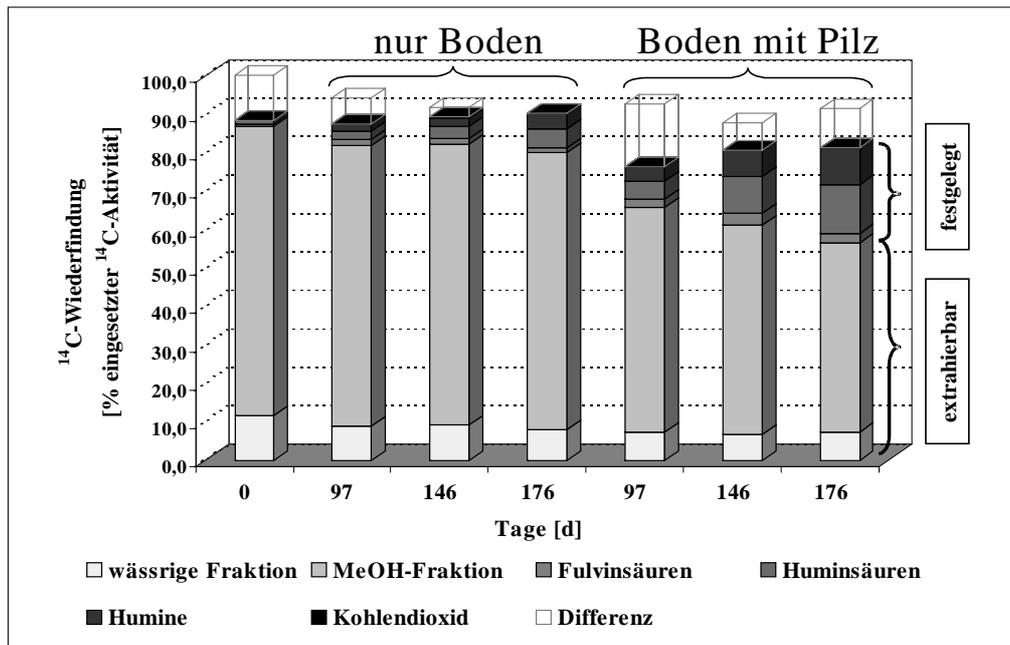


Abbildung 8 Änderung der  $^{14}\text{C}$ -Verteilung im  $^{14}\text{C}$ -TNT-kontaminierten Boden (8,9 bzw.  $8,5 \text{ g kg}^{-1} \text{ TS}$ ,  $3268 \text{ kBq kg}^{-1} \text{ TS}$ ) nach 97, 146 und 176 Tagen aerober Inkubation ohne und mit Zusatz von Pilz-Stroh-Substrat.

Der Sauerstoffverbrauch während der Immobilisierungsphase (siehe Abbildung 9) sowie die Bildung von  $^{14}\text{CO}_2$  (siehe Abbildung 10) durch die mikrobiologischen Aktivitäten wurden regelmäßig erfasst. In den Reaktoren mit Pilz wurde ein deutlich höherer  $\text{O}_2$ -Verbrauch beobachtet. Die Mineralisierung (Bildung von  $^{14}\text{CO}_2$  aus TNT) war im Gegensatz dazu nicht erhöht und betrug  $< 1\%$  der eingesetzten  $^{14}\text{C}$ -Aktivität.

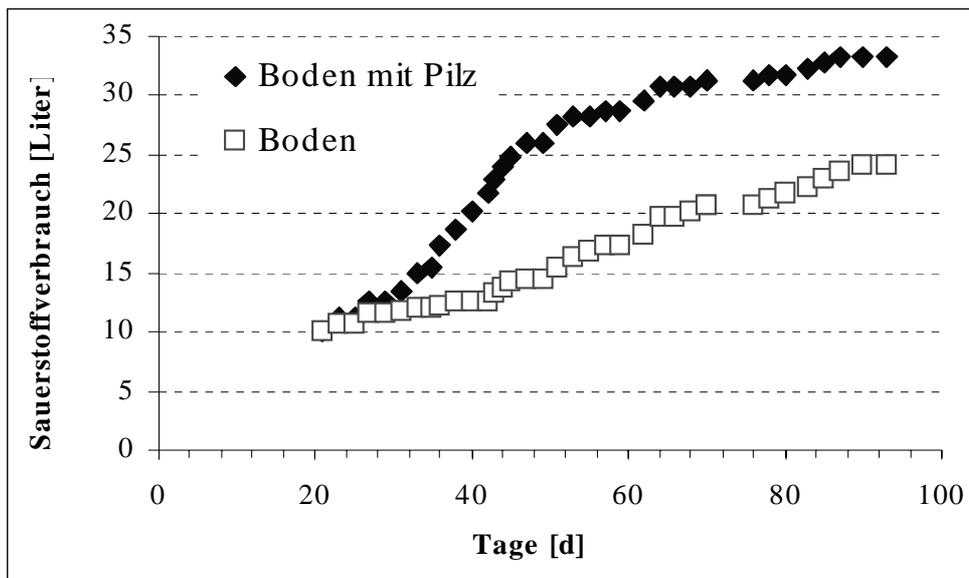


Abbildung 9 Sauerstoffverbrauch während der 1. Inkubationsphase der Immobilisierung in den 5,7-l fassenden Versuchsreaktoren.

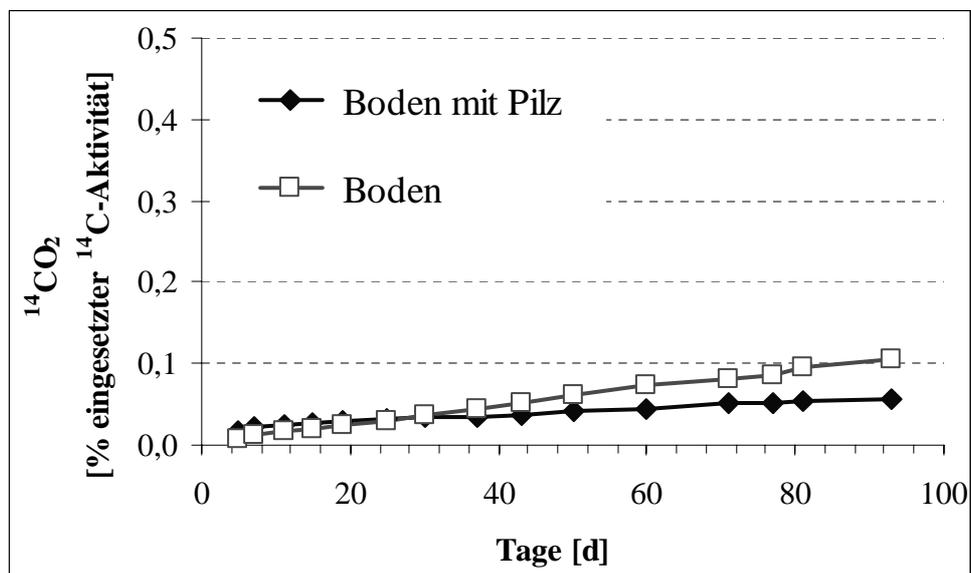


Abbildung 10 Mineralisierung von TNT in den Bodenreaktoren ohne und mit Pilz-Stroh-Substrat unter aeroben Bedingungen.

Im Boden mit Pilz-/Stroh-Substrat lagen am Versuchsende nur noch 20% der eingesetzten Menge als TNT vor, während aus dem nativen Boden (Kontrolle) noch 70-74% des applizierten TNT extrahiert werden konnte. Der Anteil von festgelegten TNT-Metaboliten in

der Bodenmatrix war bezogen auf die eingesetzte TNT-Menge mit 24,7% niedriger als auf Grund von Vorversuchen (Teilprojekt IV im Verbundvorhaben „Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten“ (Scheibner et al., 1999) erwartet, jedoch signifikant höher als in der Kontrolle (10,2%). Die absolut im Boden immobilisierte Menge von TNT-Metaboliten (2,1 g kg<sup>-1</sup> TS, siehe Abbildung 8) waren für eine effektive Durchführung der Remobilisierungsexperimente ausreichend. Die am Versuchsende aus dem Boden extrahierbare <sup>14</sup>C-Aktivität bestand bei den Reaktoren mit Pilzzusatz zu etwa gleichen Teilen aus TNT und der Summe aus Monoamino-Dinitrotoluolen und Diaminonitrotoluolen. In den Kontrollen (Boden ohne Pilz zur aeroben TNT-Einbindung) wurde dagegen fast ausschließlich TNT nachgewiesen (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9 Zuordnung der <sup>15</sup>N- und <sup>14</sup>C-TNT-Metabolite der extrahierbaren Fraktionen am Ende der Immobilisierung.

	<b>Zuordnung % eingesetzter TNT-Konzentration nach 176 Tagen in den löslichen Extrakten</b>			
quantifiziert mit	HPLC/DAD <sup>1)</sup>		DC/Phosphor-Imager <sup>2)</sup>	
Verbindung	<sup>15</sup> N- Boden ohne Pilz	<sup>15</sup> N -Boden mit Pilz	<sup>14</sup> C-Boden ohne Pilz	<sup>14</sup> C -Boden mit Pilz
1,3,5-Trinitrobenzol	0,0	0,0	n.d.	n.d.
1,3-Dinitrobenzol	0,0	0,0	n.d.	n.d.
2,4-Dinitrotoluol	0,1	0,1	n.d.	n.d.
2,6-Dinitrotoluol	0,0	0,0	n.d.	n.d.
2,4,6-Trinitrotoluol	74,3	20,3	70,2	19,8
2-Amino-4,6-dinitrotoluol	1,1	6,8	6,2	16,9
4-Amino-2,6-dinitrotoluol	1,0	14,5		
<b>Summe</b>	<b>76,5*</b>	<b>41,7*</b>	<b>76,4*</b>	<b>36,7*</b>

<sup>1)</sup> Quantifizierung erfolgte über die Peakfläche im Vergleich zu authentischen Standards

<sup>2)</sup> Die prozentuale <sup>14</sup>C-Verteilung auf der DC-Platte (Kieselgel 60; Petrolether: Isobutylmethylketon, 85:15 vol%, als mobile Phase) wurde bezogen auf die im Boden eingesetzte <sup>14</sup>C-Aktivität;

n.d. nicht detektierbar (enthaltene <sup>14</sup>C-Aktivität zu gering);

\* die Differenz zu 100% ergibt sich aus der Summe nicht detektierbarer und mit Huminsäuren maskierter Metabolite (per HPLC und DC nicht eluierbar) und festgelegter Metaboliten (bound residues).

Die Verteilung der <sup>14</sup>C-Markierung bzw. der TNT-Metaboliten im Rückstandsboden wurde sowohl für den <sup>14</sup>C-Boden aus dem vorliegenden Projekt, als auch für die <sup>14</sup>C-Böden des Dynamischen Beetprozesses und des Sequenziellen Aerob/anaerob-Verfahrens (Abschnitt 1.6) untersucht. Die prozentuale Verteilung der <sup>14</sup>C-Aktivitäten bildete die Grundlage für die

Quantifizierung einer möglichen Remobilisierung durch die sich anschließenden physikochemischen oder biologischen Behandlungen. Eine Bilanzierung über absolute immobilisierte Mengen war jedoch nur bei dem Boden aus den Pilzversuchen möglich. Die Versuchsanordnungen des Dynamischen Beetverfahrens und des Sequenziellen Anaerob/aerob- Verfahrens dagegen ließen die Erstellung einer  $^{14}\text{C}$ -Gesamtbilanz und eine Bilanzierung der Remobilisierung in Bezug auf die TNT-Ausgangskonzentrationen wegen der großen Mengen zugesetzter organischer Zuschlagstoffe nicht zu.

In dem mit dem Pilzverfahren behandelten Boden wurden von der Gesamt- $^{14}\text{C}$ -Aktivität (entsprechend  $2,1 \text{ g TNT kg}^{-1} \text{ TS}$ ) 10,3 % in den Fulvosäuren (FSr), 50,6 % in den Huminsäuren (HSr) und 39,1 % in der Huminfraction (H) wiedergefunden. Im Kontrollboden, in dem nur  $0,9 \text{ g kg}^{-1} \text{ TS}$  festgelegt wurden, war die  $^{14}\text{C}$ -Verteilung ähnlich (FSr 14,6 %, HSr 45,6 % und H 39,8 %).

Am Ende der Immobilisierungsverfahren der Arbeitsgruppen wurden die Böden zu Remobilisierungsexperimenten eingesetzt. Kontrollboden und pilzbehandelter Boden wurden wegen zu großer Mengen von noch löslichem TNT einer zweifachen MeOH-Vorextraktion unterzogen.

Nach 176 tägiger Immobilisierung wurde zwischen den unterschiedlich isotopisch markierten Ansätzen ein Verlust der  $^{15}\text{N}$ -Markierung im Boden festgestellt (siehe Tabelle 10). Er betrug in diesem Pilzverfahren 28,1 %, wovon 11,2 % im Stroh detektiert und 6,3 % Mineralisierungsprodukten zugeordnet werden konnten. Im Kontrollansatz betrug der Verlust sogar 18,6 %. Die Untersuchung auf gasförmige Verluste in Form von Stickstoff  $\text{N}_2$  und seiner Oxide  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}$  und  $\text{NO}_2$  konnte den Wiederfindungsverlust nur um 3,9 % verringern (siehe Tabelle 10 und Tabelle 11). Folglich wurde ein weiterer Versuch unternommen, die Transformationsprodukte von  $^{15}\text{N}$ -TNT zu untersuchen und zu bilanzieren (siehe Tabelle 15 und Tabelle 17).

Tabelle 10 Durchschnittliche Wiederfindung von  $^{14}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  nach mikrobieller Umsetzung von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) in kontaminiertem Boden (Versuchsdauer 176 Tage).

		% eingesetzter Markierung [= 100%]		
		$^{14}\text{C}$	$^{15}\text{N}$	
Kontrollansätze <sup>a)</sup>	Boden	<b>88,5</b> <sup>c)</sup>	Boden	<b>77,5</b>
	CO <sub>2</sub>	<b>&lt; 0,2</b>	Mineralisiert <sup>e)</sup>	<b>3,9</b>
	Gesamt	88,5	Gesamt	81,4
Pilzansätze <sup>b)</sup>	Boden	<b>89,1</b> <sup>d)</sup>	Boden	<b>71,9</b>
	Stroh	n.d.	Stroh	<b>11,2</b>
	CO <sub>2</sub>	<b>&lt;0,1</b>	Mineralisiert <sup>e)</sup>	<b>6,3</b>
	Gesamt	89,1	Gesamt	89,4

Tabelle 11 Prozentualer Anteil mineralisierter  $^{15}\text{N}$  Komponenten vom eingesetzten  $^{15}\text{TNT}$  im Boden nach 176 Tagen Inkubation.

N-Spezies	% vom eingesetzten $^{15}\text{N}$ [= 100%]	
	Pilzbehandelter Boden <sup>b)</sup>	unbehandelter Boden <sup>a)</sup>
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0.03	0.29
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.78	0.20
N <sub>ox</sub>	2.34	4.07
N <sub>2</sub>	0.80	1.75
$\Sigma$	3.95	6.32

- a) unbehandelter Boden mit autochthoner Bodenmikroflora  
 b) Boden inmitten pilzbewachsenen Strohs  
 c) Extrahierbare Radioaktivität durch Methanol und alkalische Hydrolyse 76,4%  
 d) Extrahierbare Radioaktivität durch Methanol und alkalische Hydrolyse 36,7%  
 e) mineralisierte N-Spezies wie NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> und gasförmige N-Spezies N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O, NO und NO<sub>2</sub>.

Im Gegensatz zu Vorversuchen mit TNT-Konzentrationen von 0,2 bis 2 g TNT kg<sup>-1</sup> TS (Herre et al., 1998) erfolgte dieser Versuch im Labormaßstab mit Konzentrationen bis zu 8.9 g TNT kg<sup>-1</sup> TS. Es kam zu keinem sichtbaren Einwachsen des Pilzmycels in die Bodenmatrix. Jedoch

gab es später Hinweise (Detektion pilztypischer Fettsäuren) darauf, dass Pilzmycel, mit bloßem Auge nicht sichtbar, doch eingewachsen sein musste.

Mit einem einfachen Toxizitätstest wurde die aus dem Boden extrahierbare und somit als potenziell bioverfügbare Menge an Nitroaromaten beim Hemmtest auf Mycelwachstum eingesetzt (Extraktion nach Kördel und Hund, 1998; Wachstumstest nach Schlosser et al., 1998). Die Bestimmung des Mycelwachstums auf Malzagar bei Schadstoffkonzentrationen von 0 - 1,6 mg/MA-Platte (entspricht 0 - 80 mg kg<sup>-1</sup> Agar) zeigte eine deutliche Hemmung schon bei niedrigen Metaboliten-Konzentrationen (0,8 mg/MA-Platte), siehe Abbildung 11.

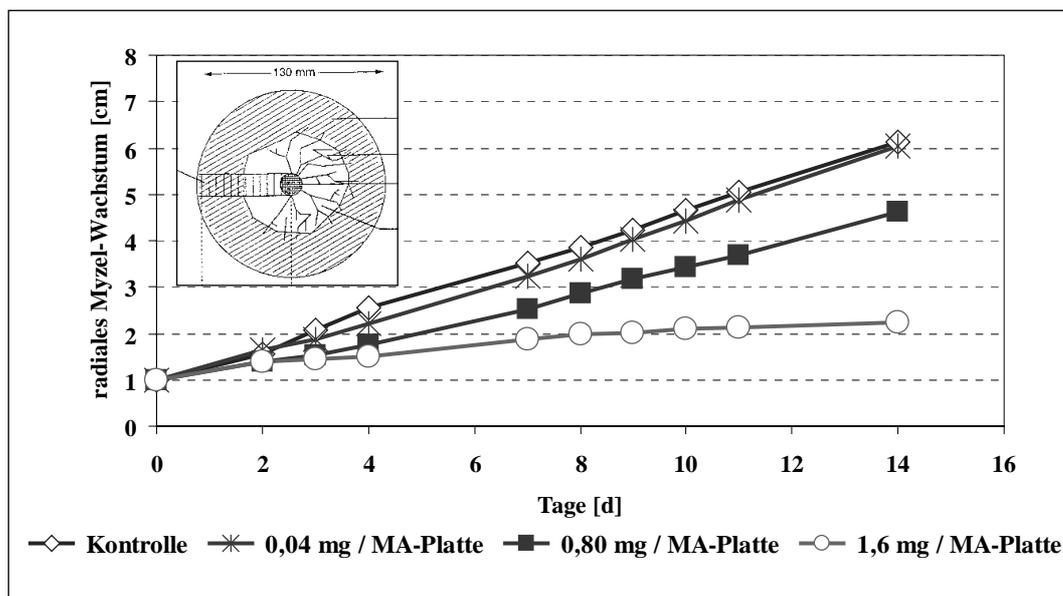


Abbildung 11 Hemmung des Wachstums von *S. rugosoannulata* auf Malzagarplatten durch die Wirkung extrahierbarer TNT und seiner Metaboliten (mit MeOH aus dem <sup>15</sup>N- Boden extrahiert).

### 3.4 Transformationsuntersuchungen zur Freisetzung von Stickstoff aus TNT

Erste Ergebnisse aus Laborversuchen haben uns gezeigt, dass Unterschiede in den Massenbilanzen zwischen <sup>14</sup>C- und <sup>15</sup>N-markiertem TNT unter gleichen Versuchsbedingungen existieren. Während im <sup>14</sup>C-Ansatz kein signifikanter Verlust der Markierung zu verzeichnen war (< 0,2% siehe Tabelle 10), kam es im <sup>15</sup>N-Ansatz zu einem Wiederfindungsverlust der <sup>15</sup>N-Signatur durch Mineralisierung von 6,3 % innerhalb von 176 Tagen. Folglich war das Ziel der Arbeit, den Schwund der <sup>15</sup>N-Markierung von TNT unter aeroben Bedingungen mit und ohne Beimpfung von *S. rugosoannulata* aufzuklären.

Während des Versuchs wurden die Mengen von TNT-Metaboliten, N-Mineralisierungsprodukten wie  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$  und die Einbindung der isotopischen Markierung in biogene Substanz und Boden analysiert. Dabei war zu klären, wie effektiv der Prozess der Freisetzung von  $^{15}\text{N}$  vom TNT verläuft und in welche Prozesse der Stickstoff eingeschleust wird, bevor er letztendlich in Amidbindungen festgelegt wird. Diese repräsentieren die Senken vom TNT-N nach einer Sanierungsmaßnahme. In einem Sapromatensystem wurden je zehn Reaktoren mit Pilzbrut auf Stroh und zehn weitere als Kontrolle (ohne Beimpfung) betrieben. Pro Reaktor wurden 40 g Boden eingesetzt. Die Sapromatenreaktoren fassten ein Volumen von 650 ml. Es wurden 40 g Boden (mit Wasser auf 60 % der Wasserhaltekapazität eingestellt) und 12 g pilzbewachsenes Stroh (mit ca. 50 % Wassergehalt) pro Reaktor eingesetzt. Die Luft-Atmosphäre in diesen Gefäßen wurde durch ein Gemisch aus 80 % Helium und 20 % Sauerstoff ersetzt, um die Hintergrundmenge an  $^{15}\text{N}$  durch die natürliche Häufigkeit dieses Isotops in der Luft zu verringern. Zwei Ansätze von jeweils sechs Reaktoren mit Kontrollboden und mit pilzbewachsenem Stroh wurden bei 18° C inkubiert. Während der Inkubation wurde der 20 %- ige Sauerstoffgehalt durch Elektrolyse der Schwefelsäure in separaten Gefäßen aufrecht erhalten.



Abbildung 12 Versuchsreaktoren im Sapromatensystem D 12 (Voith, Heidenheim, Deutschland).

An den Tagen 2, 7, 15, 28 und 108 wurde je eine Versuchsparallele entnommen und nach Abschnitt 2.10 untersucht. Der natürliche N-Gehalt des untersuchten Bodens lag bei  $4,15 \pm 0,35$  %. Durch die Zugabe von  $850 \text{ mg TNT kg}^{-1}$  Boden wurde der natürliche N-Gehalt im

Boden um 0,16 % N aus TNT erhöht. Das enge C/N-Verhältnis von 2 in TNT kann im Boden mit einem C/N-Verhältnis von 20 als potentielle N-Quelle angesehen werden.

### 3.4.1 Anorganische Stickstoffspezies

Der eingesetzte Boden besaß 20 mg  $\text{NO}_3^-$ -N und 9,3 mg  $\text{NH}_4^+$ -N  $\text{kg}^{-1}$  Boden. Das Verhältnis  $^{14/15}\text{N}$  vom dotierten TNT betrug etwa 48 atom%. Die Stickstoffbilanzen in Tabelle 12 und Tabelle 13 zeigen, dass der Großteil vom TNT-N mit 52 - 65 % in gebundene Rückstände überführt wurde. Reduzierte Nitroaromaten 2A-4,6-DNT und 4A-2,6-DNT wurden lediglich in Konzentrationen von < 2,5 % des eingebrachten TNT detektiert. Es wurden wie in Bodenschlammversuchen (Achnich et al., 1999) weder Nitroso- noch Hydroxylaminoaromaten gefunden. Sie werden durch die Vielzahl im Boden vorkommender Mikroorganismen als reaktive Verbindungen rasch zu Amino-Dinitrotoluolen abgebaut (Nishino et al., 1999; Rieger et al., 1995) oder an die Bodenmatrix fixiert worden sein. Es konnten jedoch Spuren von Azoxytetranitrotoluolen detektiert werden. Nur 1 % des eingesetzten TNT- $^{15}\text{N}$  wurden in der Gasphase in Form von Lachgas, Distickstoff und Spuren von Stickoxiden (keine Quantifizierung möglich gewesen) nachgewiesen. Bis zu 2 % des eingesetzten TNT- $^{15}\text{N}$  wurde in anorganische Stickstoffspezies wie Ammonium, Nitrit und Nitrat überführt (siehe Tabelle 12, Tabelle 13).

Tabelle 12 Verteilung von  $^{15}\text{N}$  auf Fraktionen im pilzlich behandelten Boden (methanolische Extrakte: TNT und primäre Metabolite; KCl-Extrakte: anorganische N Spezies.

		% Gesamt $^{15}\text{N}$						
Extrahierbar		$t_0^a$	$0^b$	2	7	15	28	108 [d]
Methanol	TNT-N <sup>c)</sup>	99.70	98.80	98.00	88.70	76.60	57.80	14.70
	2-A,4,6-DNT-N	n.d.	n.d.	n.d.				
	4-A,2,6-DNT-N	n.d.	n.d.	n.d.	1.23	1.74	1.43	1.78
KCl	$\text{NO}_2^-$				0.68	0.51	0.56	1.33
	$^-\text{NO}_3^-$ -N	0.05	0.05	1.56	1.34	1.24	1.57	2.09
	$\text{NH}_4^+$ -N	0.10	0.05	0.16	0.48	0.43	0.38	1.00
Biomasse im Stroh	$\text{N}_{\text{total}}$	n.d.	n.d.	n.d.				
Gase	$\text{N}_2\text{O}$ -N				0.12	0.64	0.74	1.73
	$\text{N}_2$ -N	n.d.	n.d.	n.d.	0.03	0.04	0.10	0.74
		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.01	0.04	0.66
$\Sigma^{15}\text{N}$ -Rückstand	im Boden	20.40	20.40	20.00	22.10	30.70	45.10	84.00
Wiederfindung		120,25	119,30	119,72	114,68	111,91	107,72	108,03
Verlust		-0.23	0.71	0.27	5.28	8.09	12.20	11.90

$t_o^a$  Wiederfindung von  $^{15}\text{N}$  Zugabe der  $^{15}\text{TNT}$ -Markierung.

$o^b$  Wiederfindung von  $^{15}\text{N}$  nach 4 Wochen "Alterung" bei  $4^\circ\text{C}$ .

c) [TNT]  $5590\ \mu\text{mol} = 100\%$  eingesetzt.

Tabelle 13 Verteilung von  $^{15}\text{N}$  auf Fraktionen im unbehandelten Boden (methanolische Extrakte: TNT und primäre Metabolite; KCl-Extrakte: anorganische N Spezies und Gase.

		% Gesamt $^{15}\text{N}$						
Extrahierbar		$t_o^a$	$o^b$	2	7	15	28	108 [d]
Methanol	TNT-N <sup>c</sup>	98.80	99.80	94.30	92.80	86.80	65.00	39.10
	2-A,4,6-DNT-N	n.d.	n.d.	0.14	0.76	1.23	0.36	n.d.
	4-A,26-DNT-N	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KCl	$\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ -N	0.05	0.05	0.89	2.10	0.81	0.37	1.58
	$\text{NH}_4^+$ -N	0.10	0.09	0.23	0.41	0.22	0.41	0.79
Gase	$\text{N}_2\text{O}$ -N	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.01	0.07
	$\text{N}_2$ -N	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.01	0.02	0.03
$\Sigma^{15}\text{N}$ -Rückstand im Boden <sup>d</sup>		20.40	20.40	20.00	19.10	27.50	48.60	72.80
<b>Wiederfindung</b>		119.35	120.34	115.56	115.17	116,57	114.77	114.37
<b>Verlust</b>		0.62	-0.29	4.41	4.83	3.38	5.20	5.68

$t_o^a$  Wiederfindung von  $^{15}\text{N}$  nach Zugabe der  $^{15}\text{TNT}$ -Markierung.

$o^b$  Wiederfindung von  $^{15}\text{N}$  nach 4 Wochen "Alterung" bei  $4^\circ\text{C}$ .

c) [TNT]  $5590\ \mu\text{mol} = 100\%$  eingesetzt.

d) Der Anfangsgehalt von natürlichem  $^{15}\text{N}$  im Boden betrug  $20,4\%$ .

Die Möglichkeiten, wie auf biologischen Weg TNT-bürtiger Stickstoff in anorganische Produkte umgesetzt werden kann, sind vielfältig. Bereits 1988 beschrieben Naumova et al. eine Denitrifizierung von polynitrierten Aromaten und vermutete damit eine Freisetzung von Nitrit (Naumova et al., 1988). In dieser Arbeit wurde eine enorme Anreicherung (zwischen 6 und 10 atom%) in Nitrit-Nitrat im Bodeneluat gefunden, was für den Stickstoff-Freisetzungsmechanismus nach erfolgter Meisenheimerkomplex-Bildung spricht (Lenke et al., 2000; Vorbeck et al., 1994). Die schrittweise Reduktion von TNT führt möglicherweise über die Bildung des Meisenheimerkomplexes zu reduktiver Eliminierung von Nitrit. Für Pikrinsäure (2,4,6-Trinitrophenol) und 2,4-Dinitrophenol ist dieser Schritt nachgewiesen bzw. vermutet worden (Behrend & Heesche-Wagner, 1999; Martin et al., 1997; Rieger et al., 1999). Vom TNT stammendes  $\text{NO}_2^-$  kann dann als N-Quelle für verschiedene Bakterien

dienen (z.B. *Pseudomonas* spp. (Esteve-Nuñez et al., 2000; Martin et al., 1997; Nishino et al., 1999) oder *Nocardia* spp. (Behrend & Heesche-Wagner, 1999). Martin et al. (1997) und Duque et al. (1993) konnten *Pseudomonas* spp. isolieren, die TNT als alleinige N-Quelle zum Wachstum nutzen konnten. Als Beweis für die Abspaltung von Nitrit wurden denitrierte Metabolite (2,4-Dinitrotoluol und 2,6-Dinitrotoluol, 2-Nitrotoluol und Toluol) und Nitrit im Flüssigmedium nachgewiesen. McCormick et al. (1976) fanden bei einem Inkubationsversuch mit *Pseudomonas* sp. 6 % des gesamten TNT-N als freigesetztes  $\text{NO}_2^-$  wieder.

Der erste Bericht über  $\text{NH}_4^+$  Freisetzung stammt von Naumova et al. (1989). Die Autoren beschrieben einen *Pseudomonas fluorescens* Stamm, der  $\text{NH}_4^+$  aus reduziertem TNT freisetzen konnte. Hydroxylaminolyasen als Teil von Nitroreduktasen können möglicherweise die Freisetzung von  $\text{NH}_3$  aus Hydroxylaminophenolen (Meulenbergh et al., 1996) bewirken. Boopathy et al. beschrieben die Freisetzung von  $\text{NH}_4^+$  unter anaeroben Bedingungen (Boopathy et al., 1993), aber andere Autoren waren sich unschlüssig, ob eine Denitrifizierung oder Desaminierung von TNT (oder reduzierten Metaboliten) als Spaltungsprozess für die Beobachtung des Auftretens von Dinitrotoluolen waren (Thiele et al. 2002). Oxidative Desaminierungen von ADNT oder DANT durch Oxygenasen stellen einen weiteren Abbauweg dar, der zur Bildung von  $\text{NH}_4^+$  nach Angriff von Mono- oder Dioxygenasen führt (Esteve-Nuñez et al., 2001).

Von einer spontanen hydrolytischen Desaminierung von TAT, welches unter strikt anaeroben Bedingungen gebildet wird, wurde ebenso berichtet (Lenke et al., 2000). Als abiotische Reaktion wurde die Zerstörung von TNT mittels  $\text{Fe}^0$  nachgewiesen, die ebenso in einer Akkumulation von  $\text{NH}_4^+$  mündete (Hundal et al., 1997). Nach TNT-Reduktion zu HADNT kann eine zusätzliche Hydroxylierungsreaktion zu einer Bildung von Phenolen führen. Diese Bambergerumlagerung von nitrierten Aromaten führt zu einer verbesserten Abbaubarkeit der nitrierten Aromaten (Hughes et al., 1998). Ist der Aromat erst einmal hydroxyliert, können Oxygenasen den weiteren Abbau der Verbindungen bewerkstelligen. Hawari et al. (1999) zeigte mit dem Weißfäulepilz *Phanerochaete chrysosporium* die Bildung dieser Bambergerumlagerung als TNT-Umbauschritt. Trotz der Bildung von leichter abbaubaren Metaboliten konnte aber kein Anstieg der Mineralisation gemessen werden. Sie lag unter 1%.

Einige Publikationen berichten über eine Abspaltung von N aus TNT. Diese Fähigkeit wird rein aerobe Kulturen von Pilzen und Bakterien, aber auch anaerobe Bakterienkulturen zugeschrieben (Nishino et al., 1999; Haidour & Ramos, 1996; Haidour and Ramos; Martin et al., 1997; Duque et al. 1993; McCormick et al., 1976).

Zu Freisetzungen von TNT-N im Boden war allerdings keine Information erhältlich. Eine Spaltung von TNT-C und N schien stets als nicht signifikant erachtet worden zu sein. Eine nachgewiesene Abspaltung von TNT-N kann jedoch Fragen zum Zerfall von TNT beantworten und mehr Licht auf die noch nicht vollständig geklärte Frage zum Schicksal gebundener Rückstände werfen. Sollte es zu einer biologischen N-Freisetzung kommen, kann von weitgehender Entgiftung im Sinne von Risikoabschätzung „gebundener Rückstände“ ausgegangen werden.

Anorganische N-Produkte, die von TNT in diesem Experiment freigesetzt wurden, zeigten enorme Anreicherung in ihrer isotopischen Signatur von bis zu 7,6 atom% für Nitrit/nitrat und bis zu 1 atom% bei Ammonium im Vergleich zu der natürlichen  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit von 0,37 atom%. Berücksichtigt man die Anfangssignatur von 48 atom% im Boden, so kann von einer hauptsächlichlichen Abspaltung von Nitrogruppen ausgegangen werden, und in geringerem Umfang von einer Abspaltung reduzierter Aminogruppen. Das freigesetzte Nitrit wurde unter den aeroben Bedingungen rasch zu Nitrat oxidiert. Es gibt einige Veröffentlichungen über die Nitritfreisetzung in Flüssigmedien unter aeroben Bedingungen, aber eine Nitritfreisetzung aus Boden wurde bisher noch nicht veröffentlicht. Der einzig bekannte Weg, der zur Freisetzung von Nitrit aus TNT führen kann, ist der über die Bildung eines Meisenheimer-Komplexes. Während der ersten Tage konnte eine Freisetzung von Nitrit/Nitrat in unbehandeltem Kontrollboden und in Boden mit Pilzbehandlung beobachtet werden. Obwohl die Zunahme im pilzbehandelten Boden geringer war verblieb die Freisetzung auf einem höheren Niveau als im unbehandelten Boden, wo sie nach sieben Tagen abnahm. Die höchste Freisetzung wurde an Tag 7 mit 7,6 atom% erreicht. Ein zweiter Anstieg der Freisetzung von Nitrit/Nitrat im unbehandelten Boden weist auf einen weiteren Freisetzungsprozess hin, der möglicherweise auf der Umsetzung von nicht-extrahierbaren Rückständen beruht (siehe Abbildung 13). Die Menge von so freigesetztem Stickstoff betrug bei beiden Ansätzen 1,5-2,0%. Der Pilz *S. rugosoannulata* spielte bei dieser Freisetzung keine signifikante Rolle.

Die Freisetzung von Ammonium begann ebenso innerhalb der ersten Tage. Verglichen mit der Freisetzung von Nitrit/Nitrat verlief die Ammoniumabspaltung über einen längeren Zeitraum. Auch hier lag die maximale Freisetzung an Tag 7, jedoch mit nur 1,2 atom%. Da die Prozesse zeitgleich abliefen, schließen wir auf eine zeitgleiche Abspaltungsreaktionen von Nitrit und Ammonium. Die Abspaltung von Ammonium muss von den primären Metaboliten ADNT und DANT erfolgt sein. Da die Menge ADNT und DANT etwa  $\frac{1}{4}$  der von TNT ausmacht, kann von einer größeren Denitrifizierung ausgegangen werden. Die Freisetzung von N aus TNT kann basierend auf den Messungen im pilzbehandelten Boden auf 280  $\mu\text{mol}$  (76% Nitrit-N, 24% Ammonium-N) und im unbehandelten Boden auf 380  $\mu\text{mol}$  (46% Nitrit-N,

54% Ammonium-N) pro Jahr veranschlagt werden. Diese Daten sprechen für eine Mineralisierung von 5 bis 7% des hier eingestetzten TNT-N aus gebundenen Rückständen. Diese Rate liegt höher als die 2%, die anhand der Mineralisierung von  $^{14}\text{TNT}$  berichtet wurde (Achnich et al, 2001).

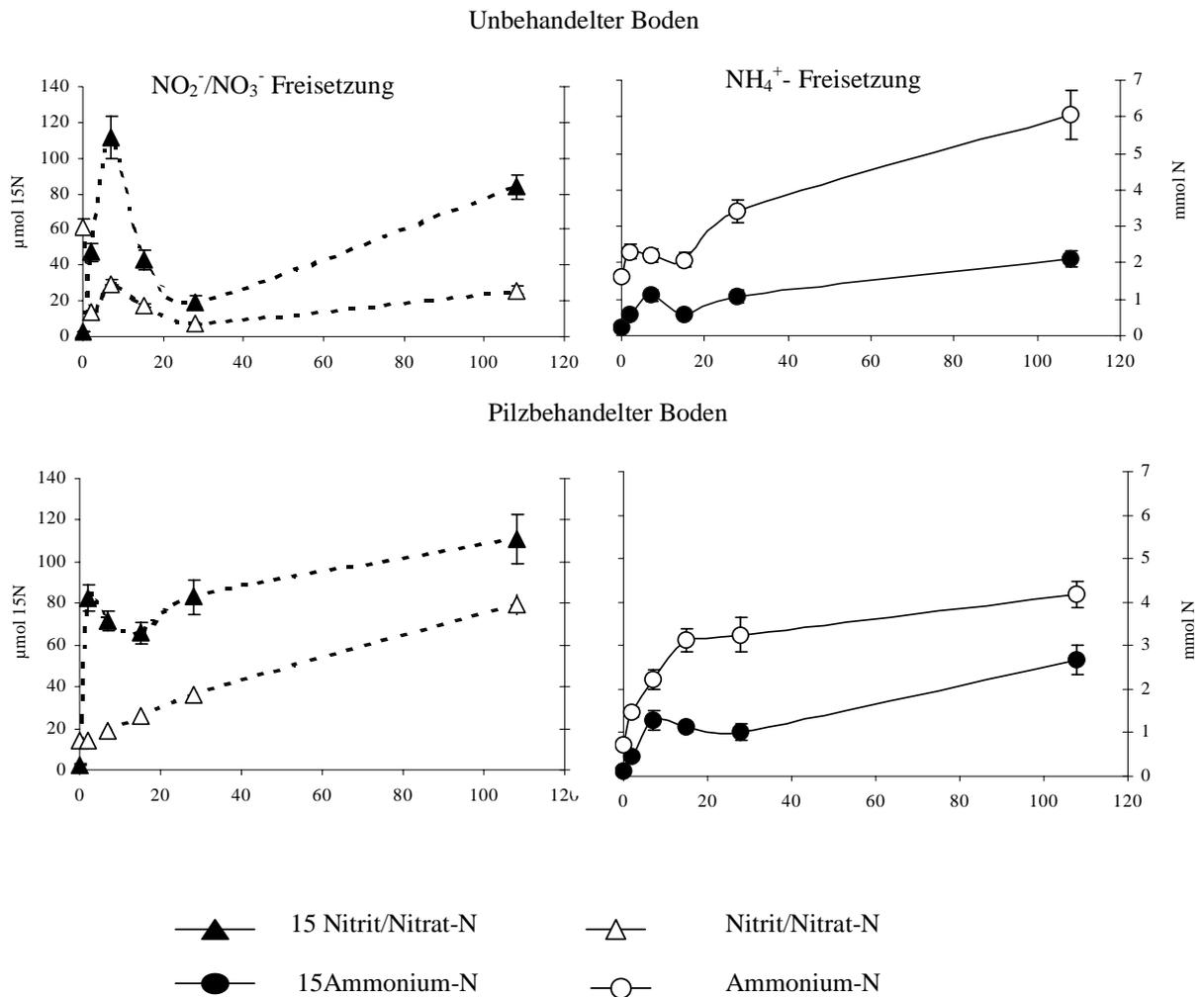


Abbildung 13 Zeitlicher Verlauf der Nitrit/Nitrat- und Ammonium- Freisetzung ( $^{15}\text{N}$  isotopisch markierte und unmarkierte Ionen) während des Experimentes.

Nach Auswertung der Ergebnisse (Tabelle 12, Tabelle 13, Tabelle 14, Abbildung 13) können drei Prozesse zur  $^{15}\text{N}$ -TNT-Mineralisierung und Freisetzung von TNT-N in Betracht gezogen werden. Etwa 2 % der  $^{15}\text{N}$  Markierung wurde als  $\text{NO}_3^-$  und  $\text{NH}_4^+$  vorgefunden, was für simultan ablaufende Prozesse der direkten TNT-Denitrierung (I) und Reduktion mit Abspaltung von Aminogruppen (II) spricht. Die relative Anreicherung in  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  mit bis

zu 7.5 atom% deutet auf die Bildung von Meisenheimer-Komplexen mit Denitrierung von TNT hin. Tabelle 14 zeigt die relative Anreicherung von Mineralisierungsprodukten von  $^{15}\text{N}$ -TNT während des Versuchs zur Aufklärung von biologischen TNT-Transformationsprozessen.

Tabelle 14 Häufigkeit von  $^{15}\text{N}$  in mineralisierten, anorganischen Komponenten.

		Häufigkeit von $^{15}\text{N}$ in $\delta$ -Promille					
	<i>Zeit in Tagen</i>	<i>0<sup>a</sup></i>	<i>2</i>	<i>7</i>	<i>15</i>	<i>28</i>	<i>108</i>
<i>Unbehandelter Boden</i>	$\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$	0.37	6.78	<b>7.56</b>	4.90	5.65	6.52
	$\text{NH}_4^+$	0.37	0.52	1.00	0.55	0.64	0.69
	$\text{N}_2\text{O}$	0.37	0.91	4.75	4.29	<b>11.64</b>	3.82
<i>Pilzlich behandelter Boden</i>	$\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$	0.37	6.53	<b>7.67</b>	5.00	4.59	3.49
	$\text{NH}_4^+$	0.37	0.60	1.16	0.73	0.62	1.28
	$\text{N}_2\text{O}$	0.37	0.98	7.62	12.15	<b>29.69 (38.6)<sup>b</sup></b>	5.22

<sup>a</sup> natürlicher  $^{15}\text{N}$  Hintergrund

<sup>b</sup> am Tag 36 detektiert

1.4 % der isotopischen Markierung wurde in Form von  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2$  freigesetzt. Das Isotopenverhältnis in  $\text{N}_2\text{O}$  (38 atom%) zeigt, dass beide N Atome vom markierten TNT stammen und das bedeutet die Aufdeckung eines neuen Prozesses (III). Die Bildung von Lachgas aus Abspaltung von N kann aus kondensierten Azoxy-Metaboliten stammen (Abbildung 15, Seite 84).

Zusätzliche 1,7 % des eingesetzten  $^{15}\text{N}$  Labels wurde in Form biogener Aminosäuren in mit Pilz bewachsenem Stroh wiedergefunden (Tabelle 15). Insgesamt wurden 60-85 % des eingesetzten  $^{15}\text{N}$ -TNT abgebaut und 52-64 % wurden als nicht extrahierbare Rückstände in der Bodenmatrix eingebunden. Drei % wurden als 2-Amino-4,6-Dinitrotoluol und 4-Amino-2,6-Dinitrotoluol detektiert. Wie sich im Experiment im Sapromatmaßstab zeigte, reduzierte *S. rugosoannulata* während des 108 Tage dauernden Immobilisierungsprozesses die TNT-Konzentration von  $857 \text{ mg kg}^{-1}$  auf  $198 \text{ mg kg}^{-1}$ , während die autochthone Flora die TNT-Kontamination nur bis zu einer Konzentration von  $525 \text{ mg kg}^{-1}$  reduzierte. Die Effizienz der Metabolisierung und Immobilisierung war in den Sapromatenbehältern (siehe Abbildung 12)

schlechter als die im temperatur- und luftfeuchtegeregelten Laborreaktor (siehe Abbildung 5, was eine reduzierte mikrobiologische Tätigkeit zur Folge gehabt haben wird.

Die Bildung von Meisenheimer Komplexen wurde für Hefen beschrieben (Zaripov et al., 2002). In dieser Studie wurden jedoch keine Denitrierungsprodukte von TNT gefunden. Möglicherweise wurden diese, wie bei Nishino et al. (1999) beschrieben, zu rasch an Catechole der organischen Substanz sorbiert. Innerhalb der ersten Woche der Immobilisierung wurde das Maximum an Nitrit/Nitratfreisetzung von 1,79 % erreicht. Am Tag 28 folgte ein lokales Minimum von 0,31 % und danach ein linearer Anstieg bis zum Versuchsende auf 1,35 % der eingesetzten Markierung. Nach Integration dieser Kurve ergibt sich eine Wiederfindung von TNT- $^{15}\text{N}$  in Form von Nitrit/Nitrat von lediglich 0,73 % (Tabelle 12, Tabelle 13, Tabelle 14). Bei der Stickstoffspezies Ammonium wurde mit zwischen 0,52 und 1,28 atom% eine wesentlich geringere Anreicherung von  $^{15}\text{N}$  gemessen.

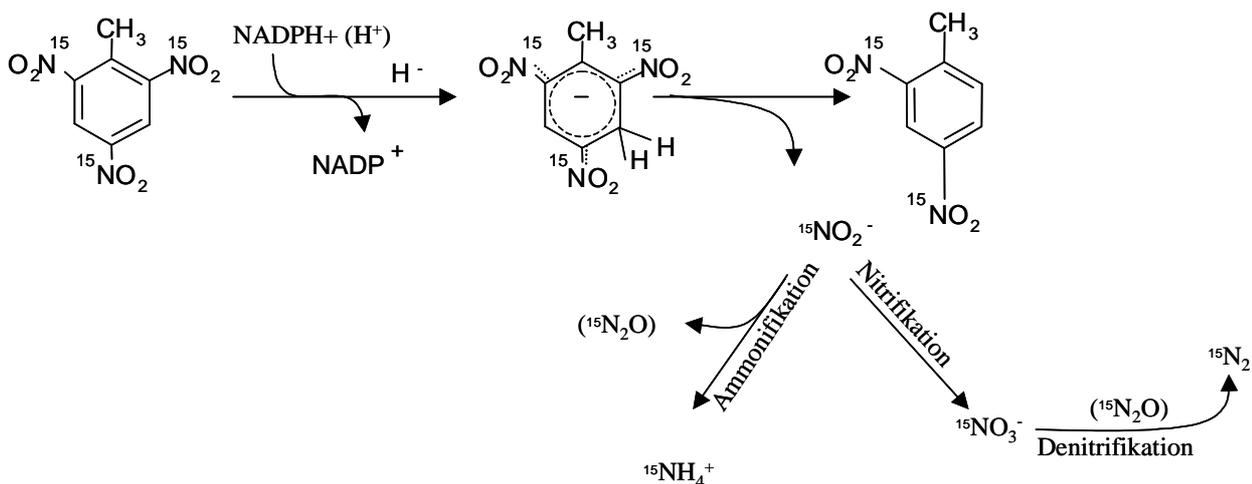


Abbildung 14 Vorgeschlagenes Schema zur N-Eliminierung von TNT.

Lokale Freisetzungsmaxima und -minima erscheinen gleichzeitig zur Nitrit/Nitratfreisetzung, aber auf einem geringeren Niveau (siehe Abbildung 13). Ein erstes lokales Maximum der N-Freisetzung erscheint am 7. Tag des Versuchs als Adaption der Mikroflora auf die Versuchsbedingungen und Nährstoffquellen (u.a. TNT). Diesem ersten Mineralisierungsschub von leicht verfügbarem TNT folgt eine stetig ansteigende, lineare Freisetzung von mineralisiertem TNT-N. Der Grund für eine auf geringerem Niveau ablaufende Mineralisierung liegt möglicherweise in der Verringerung der biologischen Verfügbarkeit von

TNT durch parallel ablaufende Festlegungsvorgänge von TNT und seinen Metaboliten an die Bodenmatrix.

Das geringere Label des Ammonium-Stickstoffs lässt sich auf eine Verdünnung mit in der Probe befindlichem, unmarkiertem Ammonium zurückführen. Das Verhältnis von  $^{14+15}\text{NH}_4^+$  zu  $^{15}\text{NH}_4^+$  betrug 128:1. Bei der Nitrit/Nitratspezies betrug das Verhältnis 17:1. Möglicherweise verdünnt so unmarkiertes Ammonium die Signatur des abgespaltenen Ammonium-Stickstoffs und führt zu einem geringeren Signatur im Vergleich zu der im Nitrit/Nitrat-Stickstoff. Weitere 1,35 % wurden im Stroh/Pilzgemisch, hauptsächlich in Form von Aminosäuren nachgewiesen. Es gelang somit erstmals der Nachweis einer potenziellen Bioverfügbarkeit von TNT-N. So konnte gezeigt werden, dass *S. rugosoannulata* TNT-N in Biomasse (Aminosäuren) einbauen kann. Die Gesamtmineralisierung von TNT-Nitrogruppen wurde in diesem Experiment auf maximal 3,0 % quantifiziert (Tabelle 12, Tabelle 13).

Der nicht aufgeklärte Stickstoffverlust lässt sich durch Undichtigkeiten im System (ein Eindringen von Luftstickstoff wurde gemessen) erklären. Der hohe Stickstoffgehalt der atmosphärischen Luft wurde zur Hintergrundreduzierung von natürlich in der Atmosphäre vorkommendem  $^{29+30}\text{N}_2$  vor Versuchsbeginn mit einem Helium/Sauerstoffgemisch (80:20 vol%) ausgetauscht. Das Prinzip des Sapromaten ist, entstandenes  $\text{CO}_2$  an KOH zu absorbieren und das entstandene Volumendefizit durch Sauerstoffnachdosierung auszugleichen. Der stetige Unterdruck im System sorgte leider nicht nur zu einem Nachströmen von im Sapromaten generiertem Sauerstoff, sondern auch von atmosphärischem Stickstoff durch die Dichtringe und PE-Schläuche hindurch. Die Gesamtwiederfindung lag nach 108 Tagen bei den Parallelen durchschnittlich bei 120% des eingesetzten  $^{15}\text{N}$ . Das Volumen von eingeströmten atmosphärischem Stickstoff konnte per GC-MS quantifiziert werden. Durch das diesem Stickstoff zugrunde liegende natürliche Isotopenverhältnis von 0,3667 atom% konnte der Anteil von außen eingeströmtem  $^{15}\text{N}$  errechnet werden. Diese Isotopenmenge wurde von der tatsächlich gemessenen Isotopenmenge subtrahiert und ergab die bereinigte Isotopenmenge aus  $^{15}\text{N}$ -TNT. Ebenso ist die Bilanzlücke auf inhomogene Verteilung des eingesetzten Labels im Boden zurückzuführen. Die Freisetzung von TNT- $^{15}\text{N}$  zeigt die irreversible Zerstörung von  $^{15}\text{TNT}$  und seinen Metaboliten an.

### 3.4.2 Aminosäuren

Insgesamt wurden 1,7 % des Stickstoffs der eingesetzten  $^{15}\text{TNT}$ -Menge in der Stroh/Mycelschicht wiedergefunden. Neben der Denitrierung, Nitrifikation und Denitrifikation wurde der Einbau von TNT-N in Aminosäuren nachgewiesen, was auf den

Einbau von TNT-N in Biomasse schließen lässt (Tabelle 15). Der Vergleich der isotopischen Signatur des Stickstoffs dieser Fraktion mit nicht-markiertem Referenzmaterial zeigt zum ersten Mal die Transformation von TNT-Stickstoff in Biomasse. In den Aminosäuren kam es während der 108-tägigen Inkubation zu einer linearen Steigerung der relativen Anreicherung mit  $^{15}\text{N}$ . Sie betrug am Tag 108 durchschnittlich 1000  $\delta\%$ . Im Boden betrug die Signatur lediglich 100  $\delta\%$ , was das Einwachsen der Pilzhyphen in den Boden sowie einen Transport des TNT-Stickstoffs beweist. Die Stickstoffmenge, die in der Biomasse detektiert wurde, war mit der Stickstoffmenge vergleichbar, die in anorganischen Spezies (Ammonium, Nitrit/Nitrat) wiedergefunden wurde (2 %). Zudem ist die isotopische Signatur des Stickstoffs in den Aminosäuren mit der des Ammoniums vergleichbar. Dies belegt, dass Ammonium die dominierende Form der mikrobiellen Stickstoffaufnahme und des Einbaus in Aminosäuren (ter Schure et al., 2000) ist. Die geringe Menge an  $^{15}\text{N}$  im unbehandelten Boden ist gering, was die entscheidende Rolle des Pilzes bei der Verfügbarmachung des TNT-Stickstoffs zeigt.

Tabelle 15  $^{15}\text{N}$ -Häufigkeit in Aminosäuren nach Transformation von  $^{15}\text{N}$ -TNT im unbehandelten Boden und im Boden mit Beimpfung eines streuabbauenden Pilzes.

		Häufigkeit von $^{15}\text{N}$ in Aminosäuren in $\delta$ Promille							
		<i>Gly</i>	<i>Thr</i>	<i>Ser</i>	<i>Val</i>	<i>Leu</i>	<i>Ile</i>	<i>Asn</i>	<i>Phe</i>
<i>un-</i> <i>markiert</i>	<i>Std</i> <sup>a)</sup>	-4.0	3.0	6.3	3.2	-0.6	-0.9	-4.8	-3.4
	<i>Referenzboden</i>	n.d.	-3.3	-3.0	14.9	4.9	2.0	7.1	7.6
	<i>Referenzstroh</i>	5.2	10.2	-5.6	1.7	0.7	3.9	5.6	7.6
	<i>Unbehandelter Boden nach 28 d</i>	248	20.0	11.2	13.1	6.0	12.1	44.7	40.5
$^{15}\text{N}$ - <i>markiert</i>	<i>Pilzbehandelter Boden 28 d</i>	304	29.3	21.6	23.9	42.9	40.7	210	n.d.
	<i>Stroh 28 d</i> <sup>b)</sup>	236	139	236	262	315	310	250	234
	<i>Stroh 108</i> <sup>c)</sup>	1004	815	1140	1093	118	1067	978	989

a) Aminosäure- Standardmix (Merck, Darmstadt)

b) Stroh mit Mycel nach 28 tägiger Inkubation

c) Stroh mit Mycel nach 108 tägiger Inkubation

n.d. = nicht detektierbar (unterhalb der Detektionsgrenze)

Gly = Glycin; Thr = Threonin; Ser = Serin; Val = Valin; Leu = Leucin; Ile = Isoleucin; Asn = Asparagin; Phe = Phenylalanin.

Entweder diene das markierte Ammonium (mit ähnlich hoher relativer Anreicherung) als direktes Transformationsprodukt oder Nitrat/Nitrit mit höherer Anreicherung wurde zuvor zu

Ammonium reduziert. Die hohe Anreicherung im Nitrat/Nitrit lässt den Schluss einer direkten Aufnahme und Inkorporation in Aminosäuren nicht zu. Insgesamt wurden 1,35 % des eingesetzten  $^{15}\text{TNT}$  im Stroh wiedergefunden. Der gesamte Stickstoffgehalt des Strohs wurde per GC-WLD ermittelt und betrug 0,3 %.

### 3.4.3 Gase

Die Wiederfindung von Lachgas in Gasproben über der Bodenoberfläche war nicht erstaunlich, da Lachgas durch Denitrifikationsprozesse unter anaeroben Bedingungen emittiert, wie auch unter Nitrifikationsbedingungen mit limitierter Sauerstoffversorgung (Yoshida, 1988). Die emittierte Menge ( $100 \mu\text{mol} \times \text{kg}^{-1} \times \text{d}^{-1}$ ) war in diesem Experiment zehnmals höher als durch natürliche Lachgasemission in Waldböden ( $58 \mu\text{mol} \times \text{kg}^{-1} \times \text{d}^{-1}$ ) (Koch, 2000). Erstaunlich war aber die Wiederfindung einer so enormen Signatur von N im Lachgas. Am Tag 32 der Inkubation wurde im Ansatz mit Pilz eine relative Anreicherung von 32 atom% gemessen, im Kontrollansatz immerhin 12 atom%. Offensichtlich ist  $\text{N}_2\text{O}$ , wenn auch in geringen Mengen, ein wichtiger Metabolit beim Abbau von TNT im Boden. Zwei Theorien können die Bildung von Lachgas erklären:

1. Eine radikalische oder hydrolytische Depolymerisation von Azoxynitrotoluolen mit N=N-O-Brücken erscheint plausibel. Azoxytetranitrotoluole entstehen v.a. durch biogene Polymerisation von TNT mit Aminodinitrotoluolen (Hawari et al., 1998; McCormick et al., 1976). Geringe Mengen dieser Dimere wurden detektiert, jedoch keine Denitrierungsprodukte von TNT wie Dinitrotoluole. Da das Lachgas in der Gasphase über dem Pilzansatz eine höhere Signatur aufwies als in der Gasphase über dem Kontrollansatz, kann davon ausgegangen werden, dass *S. rugosoannulata* die Depolymerisation von Azoxytetranitrotoluolen katalysiert.

2. Abiotische Prozesse, welche Lachgas aus Nitritzerzeugung generieren, werden als Chemodenitrifikation bezeichnet (Chalk & Smith, 1983; Clark, 1962). Alle diese Reaktionen haben eines gemein: Eine der entstehenden Substanzen ist salpetrige Säure oder wird durch sie gebildet. Die Quelle von salpetriger Säure im dargestellten Experiment resultiert möglicherweise aus der Nitritabspaltung durch Meisenheimerkomplex-Bildung (Nitrit ist Produkt der Meisenheimer-Komplex-Bildung mit sukzessiver Stickstofffreisetzung). Unter sauren Bedingungen kann Nitrit zu NO, N<sub>2</sub>O und N<sub>2</sub> reagieren (siehe Abbildung 16). Zwar wies der eingesetzte Boden einen pH-Wert von 6,8 auf, dennoch kann es in Mikrozononen durch mikrobiologische Prozesse bei unterschiedlichen Puffervermögen der Bodenaggregate zwischenzeitlich zur Ausbildung eines sauren Milieus kommen.

Um Lachgas mit annähernd der eingesetzten Signatur von TNT zu bekommen (48 atom%) muss <sup>15</sup>TNT-N untereinander reagiert haben.

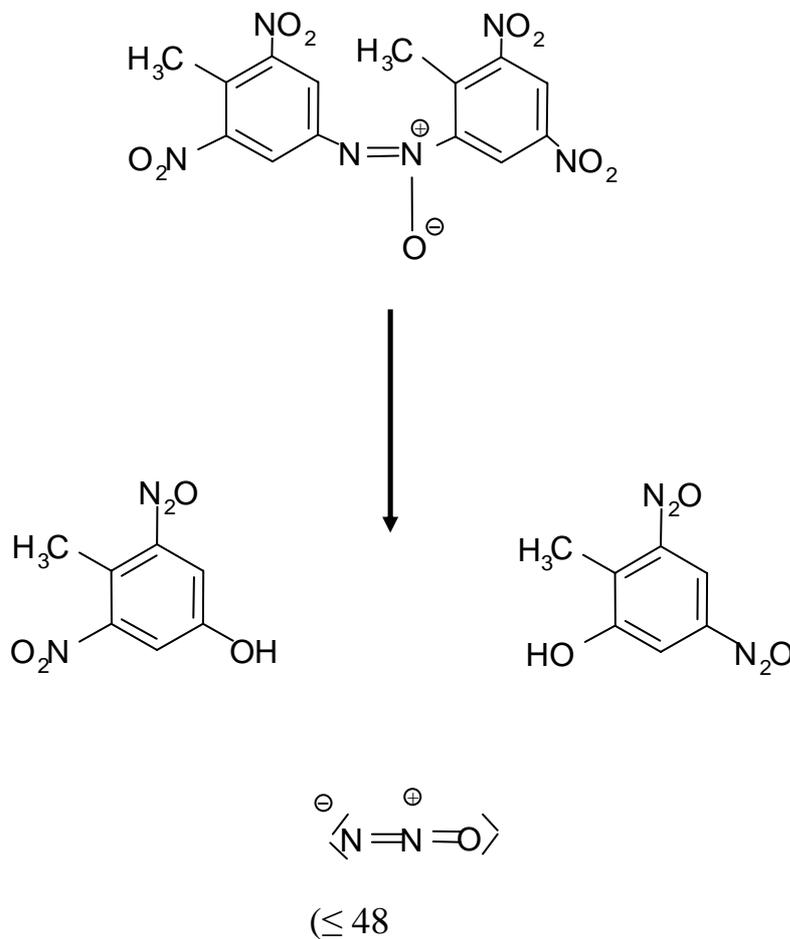
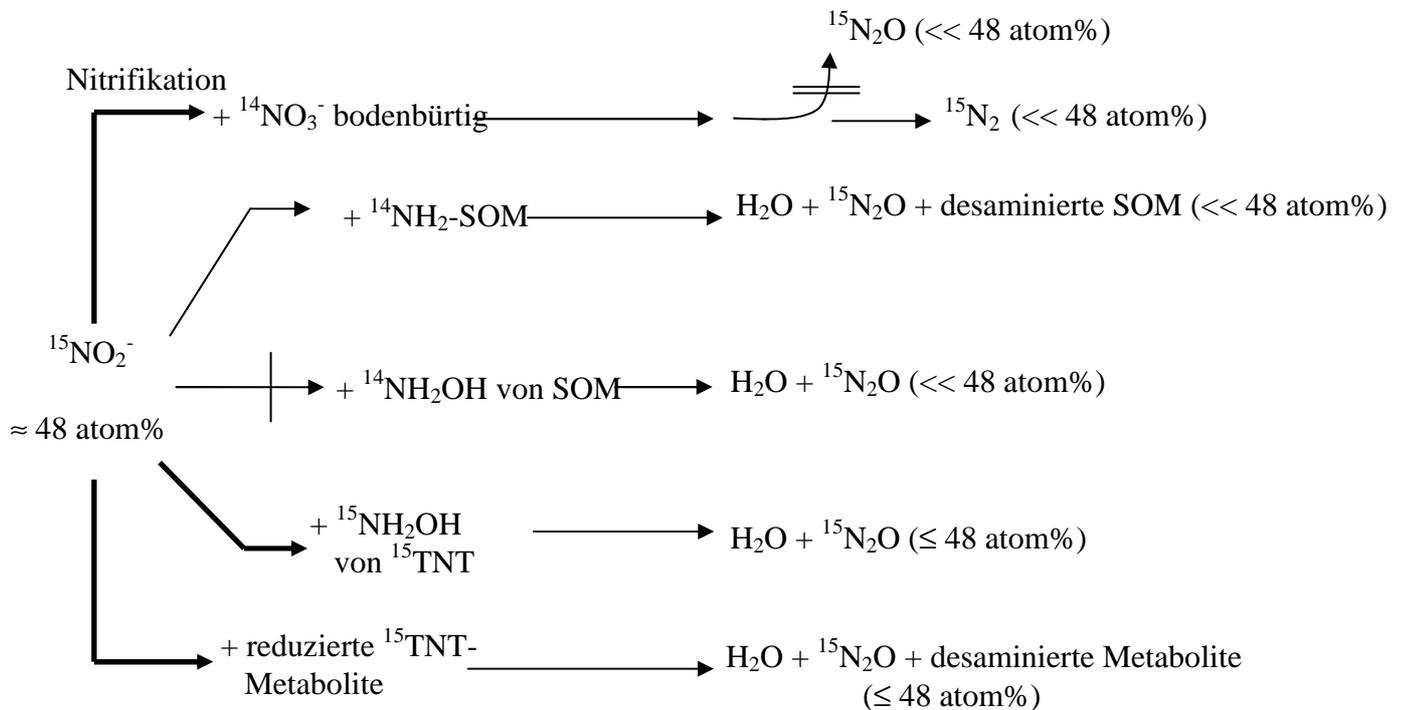


Abbildung 15 Modell zur Hydrolyse des 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT)-Polymers 2,2' 4,6' Tetranitro 6,4' Azoxytoluol.

Bei einer Denitrifikation von Nitrit/Nitrat-Stickstoff mit einer Signatur von 7,6 atom% kann es nicht zu einer Zunahme der Isotopensignatur auf > 30 atom% kommen.

Eine weitere Möglichkeit der Lachgasproduktion liegt in der Reaktion abgespaltenen Nitrits mit  $^{15}\text{N}$ -Hydroxylamin oder umgekehrt. Leider sind in der Literatur keine Daten über die Abspaltung von Hydroxylamin aus TNT verfügbar.

In Abbildung 16 ist eine Prozessmatrix dargestellt, aus welcher sämtliche Reaktionen hervorgehen, die zur Bildung von  $^{15}\text{N}$ -angereichertem Lachgas führen können. Ausgangsstoffe sind vom TNT stammende salpetrige Säure, die im Gleichgewicht mit Nitrit steht  $\text{H}^{15}\text{NO}_2 \leftrightarrow ^{15}\text{NO}_2^-$ , natürliches N aus dem Boden (SOM = Soil Organic Matter) sowie reduzierte TNT-Metabolite in der Bodenlösung. Das Ergebnis ist unterschiedlich isotopisch



angereichertes  $\text{N}_2\text{O}$ .

Abbildung 16 Möglichkeiten der Generierung von angereichertem  $^{15}\text{N}_2\text{O}$ .

Andere theoretische Möglichkeiten der Lachgasentstehung können die hohe Signalintensität nicht erklären:

Eine biologische Denitrifikation würde bei einer Reduktion von Nitrat dessen Signatur übernehmen. Es wurden aber nicht durchschnittlich 8 atom% wie im Nitrit/Nitrat detektiert, sondern wesentlich höhere Werte (bis zu 32 atom%).

Hyposalpetrige Säure ( $\text{HNO} \leftrightarrow \text{H}_2\text{N}_2\text{O}_2$ ) disproportioniert vorzugsweise unter sauren Bedingungen zu Lachgas und Ammonium. Das müsste eine hohe Signatur beim Ammonium zur Folge haben, sie betrug aber lediglich zwischen 0,52 und 1,28 atom%.

Salpetrige Säure ( $\text{HNO}_2$ ) kann mit Aminosäuren zu Distickstoff reagieren und mit Hydroxylamin ( $\text{H}_2\text{NOH}$ ) zu Stickoxid, welches zu NO zerfällt. Die Signatur in den Aminosäuren war jedoch nicht hoch genug, um in einer Signatur im Lachgas von 30 atom% zu resultieren. Eine Bildung von Stickoxiden ist auch mit heterozyklischen Huminsäurebestandteilen möglich (Porter, 1969).

Eine biologische Diskriminierung von unmarkiertem Stickstoff ist unmöglich.

#### 3.4.4 Bewertung aus wissenschaftlicher Sicht

Wie in Experimenten mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem TNT war auch die Mineralisierung unter Berücksichtigung der Nitrogruppen von TNT mit < 3- 6,3 % gering, aber eindeutig höher als in Experimenten mit  $^{14}\text{C}$ -Markierung (Tabelle 10) oder in vergleichbaren Studien für Bodensysteme beschrieben (Achnich & Lenke, 2001; Achnich et al., 1999 (6); Lenke et al., 2000; Shen et al., 1998). In dieser Arbeit wurde über die Analyse der Isotopenanreicherung in Transformationsprodukten von TNT der direkte Beweis erbracht, dass Kohlenstoff von TNT nicht in vollem Umfang sämtliche Transformationsprozesse widerspiegelt. Die Stickstoff tragenden Gruppen von TNT vermitteln uns zusätzliche wichtige Informationen über mögliche molekulare Umwandlungen. Es wurde der indirekte Beweis mindestens zweier Denitrierungsprozesse von TNT erbracht. Eine Abspaltung von Ammonium von reduzierten TNT-Metaboliten wurde nachgewiesen, jedoch bewies die relativ geringe Isotopenanreicherung (0,8 atom%) einen eher untergeordneten Abspaltungsweg. Hierbei kann es sich um die oxidative Desaminierung von ADNT oder DANT durch Mono- oder Dioxygenase handeln, oder auch um eine abiotische Redoxreaktion mit Eisen ( $\text{Fe}^0$ ). Die höhere Anreicherung von bis zu 8 atom% in Nitrit/Nitrat belegt die bevorzugt ablaufende Reaktion der Meisenheimer Reaktion mit Nitritabspaltung. Der Detektion von höchst angereichertem Lachgas als Produkt des TNT-Abbaus liegt vermutlich eine radikalische oder hydrolytische Zersetzung von Axoxytertranitrotoluolen zugrunde. Die Anreicherung in diesem Gas (38 atom%) betrug fast die Isotopensignatur von TNT zu Beginn des Versuchs (48 atom%). Diese Signatur kann nur durch intramolekulare Abspaltungsreaktionen von TNT-Dimeren erklärt werden. Eine Emission von Lachgas aus Denitrifikationsprozessen (siehe Abb. 16) kann ausgeschlossen werden, da molekularer Stickstoff als Endprodukt dieses Prozesses eine ähnlich hohe Signatur wie die im Lachgas hätte tragen müssen, was jedoch

nicht der Fall war. Die ebenso diskutierte Möglichkeit der Chemodenitrifikation nach der van Slyke Reaktion (Porter, 1969) mit Komponenten des natürlichen, nicht-angereicherten N-Pools hätte nicht zu einer solch hohen Signatur geführt.

Über die Frage, warum N mineralisiert wurde, C aber nicht, kann folgende Überlegung angestellt werden: Reduzierte TNT-Metaboliten und Rückstände des aromatischen TNT-Rings scheinen nach Abspaltung von N recht reaktiv zu sein und gehen mit Bestandteilen der organischen Substanz des Bodens Polymerisierungsreaktionen ein (Achnich et al., 1999, Dawel et al., 1997, Thiele et al., 2002). Somit bleibt den Mikroben TNT-C zur Verwertung verschlossen. Nach den Polymerisationsreaktionen ist der TNT-N an der Peripherie der Makromoleküle jedoch weiterhin bioverfügbar. Die Detektion von TNT-bürtigen Stickoxiden zeigt an, dass die einseitige Berücksichtigung von Kohlendioxid als alleinigem Mineralisationsprodukt eine zu starke Vereinfachung der Transformationsprozesse darstellt. TNT-Metabolite werden stark an die organische Bodenmatrix sorbiert und stabilisiert. Ähnlich wie die Stabilisierung von Stickstoff im Boden auch durch Reaktionen mit ligninähnlichen Stoffen geschieht, kann der TNT-bürtige Stickstoff von immobilisiertem TNT mit solchen Verbindungen koppeln und im Laufe der Zeit stabile Humusformen hervorbringen. Der sich gebildete Humus unterliegt dann einer relativ langsamen Mineralisierung von etwa 5 % pro Jahr (Kuntze et al., 1994). Komplexe organische Verbindungen werden dabei zu  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{N}_x\text{O}_y$  abgebaut. Als endgültige Detoxifizierung eingebrachter anthropogener Rückstände gilt ein vollständiger Humusturnover. Auch die eingebundenen anthropogenen Schadstoffe unterliegen ihm. Achnich kalkulierte auf Grundlage einer 2,2%-igen Mineralisierung eine vollständige Detoxifizierung des mit TNT-kontaminierten Bodens nach 45 Jahren (Achnich & Lenke, 2001). Kaplan & Kaplan (1983) und Dawel et al. (1997) sprachen dagegen schon von einer dauerhaften Detoxifizierung, wenn TNT bzw. dessen Metabolite an Bodenfraktionen (auch Huminsäuren) gebunden werden. Dem widerspricht ein Tierversuch mit Ratten, bei dem den Tieren reines TNT, mit Boden vermisches TNT und kompostiertes TNT intratracheal verabreicht wurden. In den beiden ersten beiden Fällen kam es zu einer relativ schnellen Entgiftung im Körper (innerhalb dreier Tage) mit Ausscheidung von Stoffwechselprodukten der eingebrachten Markierung, im dritten Fall wurde zwar wesentlich weniger Radioaktivität über Urin ausgeschieden, dafür aber wesentlich länger anhaltend (bis zu sechs Monaten) (Palmer et al., 1997).

### 3.5 *Strukturaufklärung der Festlegungsprodukte*

Die  $^{15}\text{N}$ -NMR-Analytik der Feststofffraktionen lieferte eine qualitative Aussage zur Bindungsart gebundener- und potenziell remobilisierbarer Rückstände (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18). Bindungsverhältnisse, in denen  $^{15}\text{N}$  vorliegt, können per NMR spektroskopisch erfasst und einer chemischen Verschiebung zu einer Standardsubstanz (hier Nitromethan) zugeordnet werden (siehe Tabelle 7, Seite 55). Liegt TNT weder transformiert noch in irgendeiner Weise gebunden im Boden vor, so befinden sich die Banden der Nitrogruppen im Verschiebungsbereich zwischen 50 und  $-25$  ppm. Sobald  $^{15}\text{N}$  eine Wechselwirkung oder Bindung zu anderen Atomen eingeht, wird die Elektronendichte um  $^{15}\text{N}$  herum dichter oder schwächer. Diese Änderung in der chemischen Umgebung wird als Verschiebung bezeichnet. Durch Wechselwirkung mit weniger elektronegativen Atomen als  $^{15}\text{N}$  kommt es zu einer Erhöhung der Elektronendichte am  $^{15}\text{N}$  Atom ( $^{15}\text{N}$  zieht fremde Elektronen aufgrund seines  $-I$ -oder  $-M$ -Effektes zu sich) und damit zu einer messbaren Abschwächung des Kernspins definitionsgemäß hin zum negativen Verschiebungsbereich. Kommt es dagegen zu einer Wechselwirkung mit Atomen, die elektronegativer sind als  $^{15}\text{N}$ , verringert sich die Elektronendichte und eine Verschiebung in den positiven Verschiebungsbereich wird gemessen. Amidbindungen, in die zwei H-Atome ihre Elektronen einbringen, haben beispielsweise ihr Bandenmaximum im Bereich zwischen  $-162$  bis  $-270$  ppm. Das Bindungsmuster in Ammonium wird entsprechend weiter in den negativen Bereich verschoben. Er liegt zwischen  $-352$  bis  $-450$ . Die Elektronendichte am Stickstoff von Azogruppen dagegen wird durch die Nachbarschaft von Sauerstoff geschwächt und hier liegt die Verschiebung im positiven Bereich zwischen  $148$  und  $50$  ppm (Tabelle 7, Seite 55).

Die Festkörper- $^{15}\text{N}$ -NMR wurde in der Bodenkunde bisher hauptsächlich zur Untersuchung von natürlich entstandenen Huminstoffen eingesetzt (Knicker et al., 1996; Knicker & Lüdemann, 1995). In ersten Untersuchungen, bei denen Huminsäure mit 2,4-Diaminonitrotoluol (DANT) inkubiert wurde, konnten im Spektrum Signale identifiziert werden, die Anilinchinonen, Aniliden und Indolen sowie Iminen zuzuordnen waren. Da ein Initialschritt der TNT-Transformation die Bildung von Amino-Dinitrotoluolen darstellt und aromatische Amine als äußerst reaktionsfreudig mit den bei der Humifizierung gebildeten Chinonen gelten (Schnitzer & Spiteller, 1986), wurde dieser Mechanismus auch für die Einbindung von TNT ins organische Bodenmaterial vorgeschlagen (Rieger et al., 1995). Es galt, diese Vermutung zu überprüfen.

Um die Anzahl der NMR-spektroskopischen Analysen zu minimieren, wurden die Remobilisierungsversuche zunächst mit dem  $^{14}\text{C}$ -TNT dotierten und behandelten Boden durchgeführt. Bei Ansätzen mit signifikanter Remobilisierung (quantifizierbar über freigesetzte Radioaktivität) wurden nur diese Versuche anschließend mit dem  $^{15}\text{N}$ -TNT dotierten und behandelten Boden in gleicher Weise durchgeführt und dann  $^{15}\text{N}$ -NMR-spektroskopisch analysiert.

Die Spektren der Humusfraktionen in Abbildung 18 zeigen Hauptpeaks im Verschiebungsbereich um -262 und -320 ppm. Dabei handelt es sich im ersten Fall um die Gruppe der Säureamide und im zweiten Fall um die Gruppe der aromatischen Aniline. Signale im Nitrogruppenbereich (50 bis -25 ppm) konnten v.a. im Kontrollboden aufgrund der weniger effektiven Immobilisierung von TNT detektiert werden. Im pilzlich vorbehandelten Boden kann jedoch von einer vollständigen Umwandlung des originären TNT in kovalente Bindungen in den Rückständen (Amidbindungen) ausgegangen werden. Schließlich kann schon eine reduzierte TNT-Nitrogruppe ausreichen, das Molekül in die organische Substanz einzubinden. Bei der NMR-Untersuchung lyophilisierter Fraktionen ergaben sich für den Kontrollboden Jena und den mit Pilz inkubierten Boden folgende Spektren:

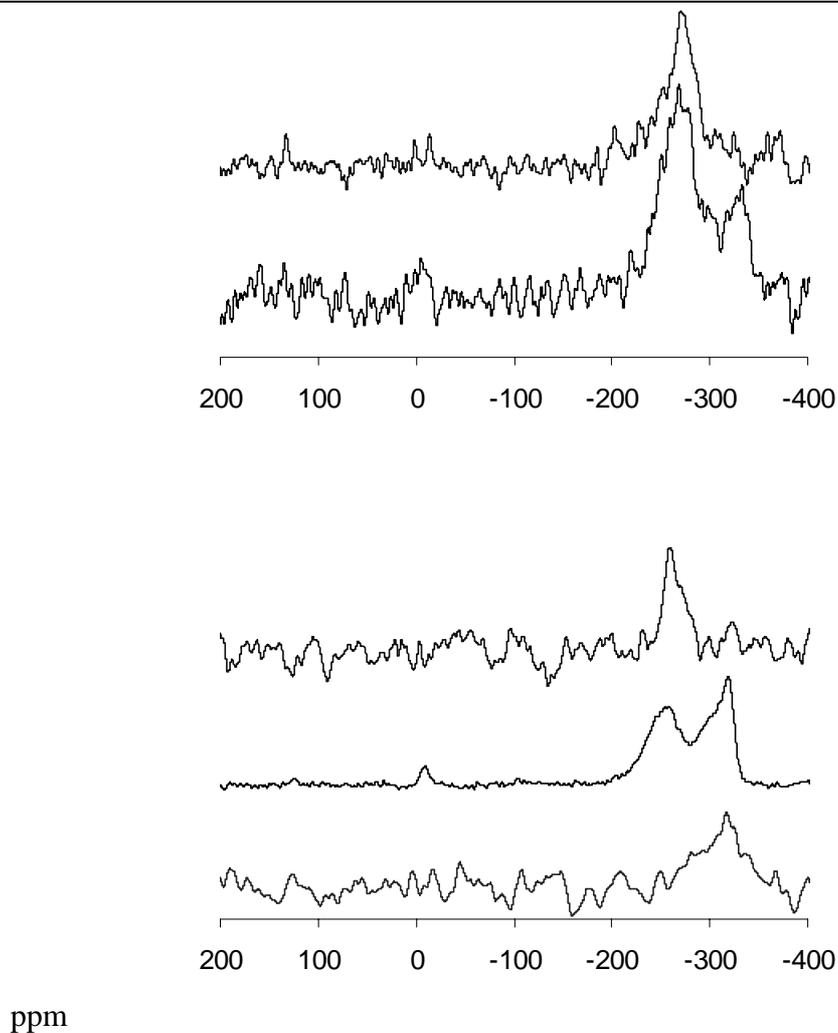


Abbildung 17 NMR-Spektren: Die chemische Umgebung von N von im Boden festgelegtem TNT. Der Nullpunkt entspricht dem  $^{15}\text{N}$ -Signal von Nitromethan (= 0 ppm).

Oben:  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren der Bodenfraktionen im Kontrollboden Pilzverfahren; oben: Fulvosäuren, unten: Huminsäuren, Spektrum der Huminfraction war wegen zu geringer Signalintensität nicht messbar.

Unten:  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren der Bodenfraktionen im pilzbehandelten Boden; oben: Fulvosäuren, Mitte: Huminsäuren, unten: Humin.

Die Abbildung 18 zeigt die  $^{15}\text{N}$  NMR-Spektren von Humin- und Fulvosäuren mit gebundenen TNT-Rückständen aus dem Dynamischen Beetprozess (Abschnitt 1.6). Bei dem Remobilisierungsversuch mit  $^{14}\text{C}$ -TNT war nach Laccasebehandlung eine 14 % ige Remobilisierung der eingesetzten Radioaktivität in die wässrige Fraktion übergegangen (siehe Tabelle 20). Trotz dieser signifikanten Freisetzung konnten im  $^{15}\text{N}$ -TNT-Ansatz mittels NMR

jedoch keine Veränderungen der Bandenstrukturen (Positionen relativ zu 0 ppm oder Bandenhöhen) festgestellt werden. Die beiden unteren Linien im Diagramm zeigen die vorliegenden Bindungsmuster von  $^{15}\text{N}$  im Kontrollansatz ohne enzymatische Einwirkung, die beiden oberen Linien repräsentieren die  $^{15}\text{N}$  Bindungsmuster nach Laccaseeinwirkung.

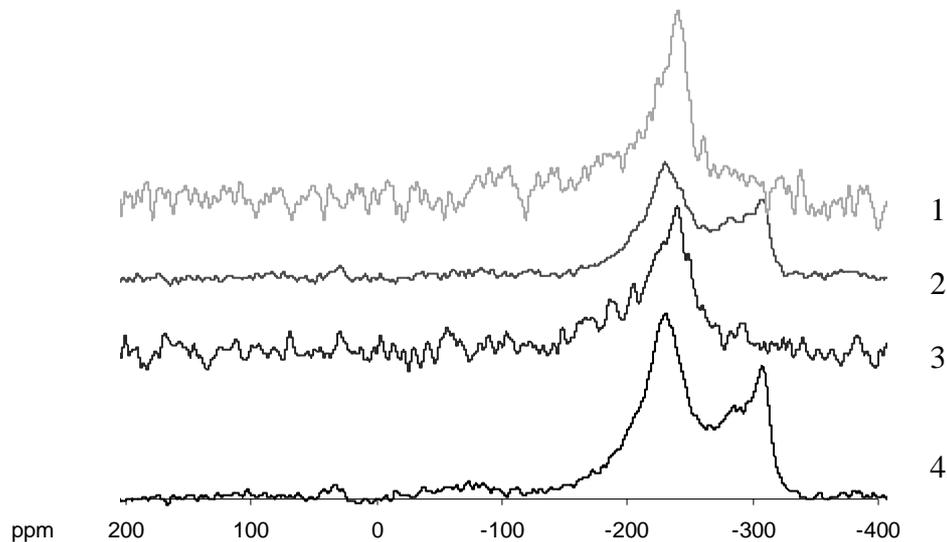


Abbildung 18  $^{15}\text{N}$ -NMR Spektren von TNT-N gebunden an Fulvo (Linie 3) -und Huminsäuren (Linie 4) vor und nach Laccaseeinwirkung (Fulvosäure Linie 1 und Huminsäure Linie 2). Der Nullpunkt entspricht dem  $^{15}\text{N}$ -Singal von Nitromethan (= 0 ppm).

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen zur Einbindung von TNT, dass die Festkörper  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektroskopie, insbesondere in Kombination mit einer  $^{15}\text{N}$ -Massenbilanzierung, wertvolle Informationen über die chemische Umsetzung und Einbindung von TNT in das organische Bodenmaterial geben kann.

Die Untersuchungen an dem in dieser Studie hergestellten Probenmaterial aber auch an Proben der Projektpartner demonstrierten, dass die Gegenwart oder Abwesenheit von Nitroverbindungen auch in der Bodenfestphase angezeigt werden kann und ihre Anteile zumindest für die gebundenen Rückstände quantitativ bestimmt werden können. Sie lässt sich damit als brauchbare Methode in der Qualitätskontrolle von sanierten Böden ehemaliger Rüstungsalasten verwenden.

In der Dissertation konnte weiter gezeigt werden, dass selbst in aeroben Böden eine effektive Immobilisierung von TNT stattfindet. Dennoch ist diese durch eine zusätzliche anaerobe Vorbehandlung verbesserungsfähig. Diese Einbindung erfolgt weitgehend über kondensierte N-Verbindungen, die, basierend auf den Ergebnissen der NMR-Experimenten, vor allem

Amide und N-Alkyl-Verbindungen einschließen. Nahezu identische Ergebnisse ergaben sich für  $^{15}\text{N}$ -TNT versetztes Bodenmaterial, welches mit *S. rugosoannulata* behandelt wurde sowie für Proben, die nach einem Festbettkompostierungsverfahren oder dem Dynamischen Beetverfahren saniert wurden. Sogar im unbehandelten Kontrollboden konnte nach enzymatischer Behandlung keine signifikante Änderung des NMR-Bandenmusters beobachtet werden (Abbildung 24). Bei allen  $^{15}\text{N}$ -NMR-spektroskopischen Untersuchungen ergab sich jedoch der Nachweis der Abschwächung bis hin zum Fehlen des Nitrogruppensignals in den NMR-Banden. Der Nachweis kondensierter N-Verbindungen dagegen zeigte eindeutig, eine feste Einbindung des TNT nach der erfolgten Transformation.

Zudem wurde gezeigt, dass es bei Remobilisierungsversuchen an diesen sanierten Böden zu keiner Signalabschwächung infolge einer Remobilisierung kam. Der größte Teil der einmal in die Huminstofffraktion immobilisierten TNT-Transformationsprodukte wurden kaum remobilisiert. Dies stimmt mit den Untersuchungen zur Stabilität der Festlegungsprodukte mit der  $^{14}\text{C}$ -Markierung in Abschnitt 3.6 überein. Sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen sind die mobilen TNT-Transformationsprodukte vor allem mit der wasserlöslichen Fraktion assoziiert, hauptsächlich über kondensierte N-Verbindungen.

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu Untersuchungen, die zeigen, dass selbst aus Böden älterer Rüstungsaltslasten TNT und seine mobilen Transformationsprodukte isoliert und in erheblichen Konzentrationen nachgewiesen werden können. Eine Erklärung für diese Diskrepanz liegt möglicherweise in der physikalischen Form, in der TNT im Boden vorliegt. Während in real kontaminierten Böden größere TNT-Brocken oder zumindest größere TNT-Aggregate vorhanden sind, wurde es in den hier durchgeführten Experimenten als feines Pulver gleichmäßig unter den Boden gemischt. Hierdurch ergeben sich zum einen größere Angriffsflächen für die Bodenmikroorganismen und zum anderen eine erhöhte Bioverfügbarkeit sowie besseres Löseverhalten von TNT in der Bodenlösung.

In Clausthal-Zellerfeld wurden drei unterschiedliche Bodenbehandlungsverfahren im Pilotmaßstab durchgeführt. Verfahrensspezifisch wurden dem kontaminierten Boden unterschiedliche Mengen Additive zugemischt, was unterschiedliche Nitroraromaten (NA)-konzentrationen bewirkte. Durch das Sequenzielle Anaerob/aerob-Verfahren (Umweltschutz Nord GmbH & Co, Ganderkesee) sank die Nitroaromaten-Konzentration innerhalb von 20 Tagen von 700 mg/kg auf  $< 0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  (Fischer & Walter in: Mahro & Eschenbach, 1998: Kapitel K). Durch das Dynamische Beetverfahren (Plambeck ContraCon GmbH, Cuxhaven) konnte die NA-Konzentration innerhalb von ca. 90 Tagen (davon 42 Tage anaerobe Behandlung und 48 Tage aerobe Behandlung) von 919 mg  $\text{kg}^{-1}$  auf 1,3 mg/kg reduziert werden (Winterberg in: Mahro & Eschenbach, 1998: Kapitel L). Und mit dem Pilzverfahren

(Wisstrans Umwelt GmbH, Göttingen) wurde innerhalb von 14 Wochen die NA-Konzentration von  $2046 \text{ mg kg}^{-1}$  auf  $< 2 \text{ mg kg}^{-1}$  reduziert (Abken et al. in: Mahro & Eschenbach, 1998: Kapitel M).

### 3.6 Stabilität der Festlegungsprodukte

Mit der vorliegenden Arbeit wird zum ersten Mal eine breite Datengrundlage zur Stabilität nicht-extrahierbarer Rückstände aus TNT-kontaminierten Böden präsentiert. Das Ziel der Arbeit war es mit  $^{14}\text{C}$ -markierten Rückständen zu beurteilen, ob unter extremen Umweltbedingungen oder durch einen stattfindenden Humusturnover TNT oder festgelegte Metaboliten wieder freigesetzt werden. Nach 8-tägiger Behandlung von  $^{14}\text{C}$ -TNT-kontaminiertem Boden in einem Slurry-Verfahren konnten  $\sim 40 \%$  der eingesetzten Radioaktivität in der organischen Matrix gebunden werden. Nach erfolgter Silylierung als Methode zur Auflösung sequestrierter Rückstände, wurden erneut TNT und Aminodinitrotoluole freigesetzt ( $54 \%$  der Rückstandsradioaktivität) (Achnich et al., 1999). Bei einer Ausweitung der anaeroben Inkubationszeit auf 82 Tage, wurde jedoch keine radioaktiv markierten bekannten TNT-Metabolite mittels DC/Phosphoimager detektiert ( $R_f < 0,1$ ). Dieses Phänomen deutet darauf hin, dass starke kovalente Bindungen an der Festlegung beteiligt sind.

Mit den folgenden Methoden wurde die Remobilisierbarkeit der gebundenen Rückstände in Rückstandsböden durch physiko-chemische und biologische Prozesse getestet, welche unterschiedliche Umweltbedingungen simulierten. In Tabelle 17 ist die Verteilung der Radioaktivität in Böden der einzelnen TP durch die Standardextraktion nach Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 16 Verteilung der Radioaktivität in Bodenfraktionen nach unterschiedlichen biologischen Sanierungsverfahren.

		% Rückstandsaktivität			
		unbehandelter Boden	Pilzverfahren	Dynamisches Beetverfahren	Sequenzielles Anaerob/aerob-Verfahren
extrahierbar	H <sub>2</sub> O	10	7	4	5
	MeOH	19	26	4	2
nicht-extrahierbare Rückstände	Fulvosäure	13	11	15	3
	Huminsäure	26	29	40	46
	Humin	32	27	37	44
	$\Sigma$ Rückstände	71	67	92	93
<b>Aktuelle Aktivität</b>	<b>Bq kg<sup>-1</sup> (TG)</b>	<b>625*</b>	<b>1350*</b>	<b>140</b>	<b>2300</b>
TNT-Äquivalente#	mg kg <sup>-1</sup> (TG)	900	2100	4900	4900

\* nach zweifacher MeOH-Extraktion (siehe Abschnitt 2.12).

# gebundene TNT-Äquivalente am Ende des Immobilisierungsprozesses

### 3.6.1 Physikalische Behandlung

#### 3.6.1.1 Mechanischer Aufschluss des Bodengefüges

Der mechanische Gefügaufbruch der Böden durch Behandlung per Kugelmühle führte bei keinem der eingesetzten Böden zu einer signifikanten Remobilisierung festgelegter TNT-bürtiger Rückstände. Die Verteilung der durch <sup>14</sup>C-TNT eingebrachten Radioaktivität in den löslichen Fraktionen (H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und MeOH) vor und nach Versuch änderten sich nicht (siehe Tabelle 17). Folglich sind gebundene Rückstände durch die mechanische Zerkleinerung der Bodenaggregate nicht freigesetzt worden und eine Depolymerisierung höhermolekularer Strukturen unwahrscheinlich. Es erübrigte sich die weitere Fraktionierung der Huminsäuren.

#### 3.6.1.2 Simulation von Temperaturschwankungen

Diese Versuche simulierten zeitraffend die natürlichen, physikalischen Prozesse der Erosion und der Frostsprengung in Böden der Länder der gemäßigten Klimazone. Die Simulation mehrjähriger Temperaturschwankungen erfolgte über einen Zeitraum von 4 Monaten

entsprechend der für alle Teilprojekte (TP) gleichen Vorschrift durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen. Für das aus dem durch Dynamisches Beetverfahren erbrütete Material (Universität Marburg) lagen bei Abschluss der vorliegenden Studie noch keine Daten vor. Für den Boden nach Behandlung mit dem Sequenziellen Anaerob/aerob-Verfahren (Fraunhofer Institut Stuttgart) kam es zu keiner Remobilisierung und erhöhter Bioverfügbarkeit durch Frostsprengung der gebundenen Rückstände (Achnich et al., 2001). Bei einer Gesamtmineralisierung von 0,5% der eingesetzten Radioaktivität war die Mineralisierung in den untersuchten Böden nach Pilzbehandlung (Universität Jena) verschwindend gering. Wie es die Verteilung der Radioaktivität in den Fulvo- und Huminsäuren der Böden des Pilzverfahrens anzeigt, kam zu einer 5%-igen, nicht signifikanten De/Polymerisierung der gebundenen Rückstände in den Huminsäurefraktionen (siehe Tabelle 17). Scheibner et al. (1999) wiesen bei Frost/Auftauzyklen ebenso eine Depolymerisierung (Verschiebung der Radioaktivitäten zwischen Humin und Huminsäure-Fulvosäurefraktionen) gebundener Rückstände der Huminfraktion nach. Diese betrug 15 % (Scheibner et al., 1999). Die Versuchszeiträume dieses Versuchs mit 28 Wochen war dem hier vorgestellten Versuchszeitraum über 25 Wochen vergleichbar.

Bezüglich Remobilisierung durch die rein physikalischen Methoden Gefügeaufbruch mittels Kugelmühle und Frost-Auftau-Zyklen ergaben sich keine Unterschiede zwischen den unterschiedlich vorbehandelten Böden (siehe Tabelle 17). Es wurde keine signifikante Remobilisierung (weniger 2% Verschiebung der Radioaktivität in die löslichen Phasen nach Versuchsende) gemessen. Bei der statistischen Auswertung der auf Gefügeaufbruch mittels *t*-test lagen die kritischen *t*-Werte  $< 2,78$ , im Durchschnitt  $< 2,77$ . Das unterstützte die *H<sub>0</sub>*-Hypothese keines signifikanten Unterschieds der Radioaktivitätsverteilung in den Bodenfraktionen.

### 3.6.1.3 Extraktion mittels Wasserdampf

Bei der Methode der Wasserdampfextraktion kam es in allen untersuchten Böden zu einem signifikanten Remobilisierungseffekt der im Boden festgelegten Radioaktivität (siehe Tabelle 17). Im Vergleich zur Aktivität der löslichen Fraktionen  $H_2O_{\text{bidest}}$  und MeOH vor dem Versuch stieg die Aktivität in diesen Fraktionen nach Versuchsdurchführung im Kontrollboden auf 34,8 % der Gesamtaktivität, die sich im rückstandshaltigen Boden befand. Die kritischen *t*-Werte der Mittelwertvergleiche der wässrigen Fraktionen lagen bei 4,3, was für eine signifikante Remobilisierung von  $^{14}C$  spricht. Nach wenigen Stunden der Inkubation

der Überstände kam es zu einem Niederschlag gelb-brauner Flocken. Dieser frische, makromolekulare Niederschlag wies maximal 92 % der Rückstandsaktivität des Überstands auf. Keine bekannten Metaboliten wurden per DC detektiert. Es ist daher von einer Remobilisierung von an Huminsäuren gebundenen Rückständen auszugehen und nicht von einer Rücklösung von TNT oder bekannten Metaboliten.

Die letzte Spalte in der Tabelle 17 zeigt, dass die Remobilisierung mittels Wasserdampfextraktion bei den physikalischen Behandlungen den größten Effekt erzeugte. Das Pilzverfahren (mit einem Remobilisierungseffekt von  $^{14}\text{C}$ -TNT Radioaktivität in den löslichen Fraktionen von 12,5 %) hat im Vergleich zu den beiden anderen anaerob/aerob-Verfahren (Dynamisches Beetverfahren mit 9,1 % Remobilisierungseffekt, Festbettreaktor-Verfahren mit 13,2 % Remobilisierungseffekt) zu einer uneffektiveren Art der Festlegung geführt. Es ist weiterhin zu erkennen, dass eine Remobilisierung mit einer Auflösung organischer Moleküle bis zu 15 % gekoppelt sein kann (Abnahme der Radioaktivität der TNT-Äquivalente in den Huminsäurefraktionen). Die Auflösung der Huminsäuren kann durch die 20-fache Menge Extraktionsmittel (Wasser) gegenüber der Menge des eingesetzten Bodenvolumens erklärt werden, denn Huminsäuren zerfallen in wässriger Lösung in kleinere Bestandteile.

Tabelle 17 Verteilung der <sup>14</sup>C-Markierung nach physikalischer Behandlungen der gebundenen Rückstände im Boden.

		% Rückstandsaktivität					
		Frieren/Auftauen		Kugelmühle		Wasserdampf-extraktion	
		- <sup>a</sup>	+	-	+	-	+
<b>Pilzverfahren<sup>c</sup></b>							
extrahierbar	H <sub>2</sub> O	2.1	1.8	6.5	6.5	6.5	<b>35.4<sup>g</sup></b>
	MeOH	17.3	19.1	25.6	25.9	25.4	<b>9.0</b>
nicht-extrahierbare Rückstände	Fulvosäure	10.8	9.0	-	-	10.4	<b>4.9</b>
	Huminsäure	29.7	24.5	-	-	30.1	<b>2.5</b>
	Humin	38.1	39.6	-	-	27.2	<b>37.9</b>
	$\Sigma$ Rückstände	78.6	73.1	67.8 <sup>b)</sup>	68.8 <sup>b)</sup>	67.9	45.3
Wiederfindung		98.0	94.0	99.9	101.2	99.8	89.7
<b>unbehandelter Boden<sup>d</sup></b>							
extrahierbar	H <sub>2</sub> O	5.8	4.0	9.9	8.8	9.8	<b>61.4<sup>h</sup></b>
	MeOH	19.6	15.0	19.2	16.9	18.7	<b>1.9</b>
nicht-extrahierbare Rückstände	Fulvosäure	15.2	15.8	-	-	13.0	<b>4.4</b>
	Huminsäure	24.8	20.8	-	-	26.1	<b>2.5</b>
	Humin	50.2	54.3			32.0	28.3
	$\Sigma$ Rückstände	90.2	90.9	71.89 <sup>b)</sup>	74.7 <sup>b)</sup>	71.1	35.2
Wiederfindung		115.6	109.9	101.9	100.4	99.6	98.5
<b>Dynamisches Beetverfahren<sup>e</sup></b>							
extrahierbar	H <sub>2</sub> O			4.5	5.6	3.9	<b>15.0<sup>i</sup></b>
	MeOH			4.3	4.6	4.0	2.0
nicht-extrahierbare Rückstände	Fulvosäure			-	-	15.0	<b>0.2</b>
	Huminsäure			-	-	39.8	<b>21.2</b>
	Humin			-	-	37.0	<b>60.5</b>
	$\Sigma$ Rückstände			87.5 <sup>b)</sup>	87.1 <sup>b)</sup>	91.8	81.9
Wiederfindung			96.3	98.3	99.7	98.9	
<b>Festbettreaktor-Verfahren<sup>f</sup></b>							
extrahierbar	H <sub>2</sub> O			5.5	7.0	5.0	<b>18<sup>k</sup></b>
	MeOH			1.6	0.6	2.0	2.2
nicht-extrahierbare Rückstände	Fulvosäure			-	-	3.2	1.1
	Huminsäure			-	-	46.2	<b>25.0</b>
	Humin			-	-	44.5	<b>54.0</b>
	$\Sigma$ Rückstände			92.8 <sup>b)</sup>	94.4 <sup>b)</sup>	93.9	80.1
Wiederfindung			99.9	102.0	100.9	100.3	

- Kontrolle/ ohne Behandlung, + mit Behandlung

a) Kontrolle wurde 4 Monate bei 4° C im Dunkeln gelagert

b) als Summenparameter gemessen

c) Pilzverfahren der Universität Jena: aerober Prozess. Rückstandsaktivität: 1350 Bq × g<sup>-1</sup> als 100%

d) unbehandelter Boden. Rückstandsaktivität: 625 Bq × g<sup>-1</sup> als 100%

- e) Dynamisches Beetverfahren der Universität Marburg (Aerob/Anaerobverfahren). Rückstandsaktivität:  $140 \text{ Bq} \times \text{g}^{-1}$  als 100%
- f) Festbettreaktor-Verfahren des Fraunhofer Instituts Stuttgart (Aerob/aerobverfahren). Rückstandsaktivität:  $2300 \text{ Bq} \times \text{g}^{-1}$  als 100%
- g) Wiederfindung von 2,5% in der Fraktion der Feinpartikel
- h) Wiederfindung von 11% in der Fraktion der Feinpartikel
- i) Wiederfindung von 1% in der Fraktion der Feinpartikel
- k) Wiederfindung von 3% in der Fraktion der Feinpartikel

### 3.6.2 Chemische Behandlung

#### 3.6.2.1 Simulation eines 1000-jährigen sauren Regenereignisses

Saurer Regen verursacht durch die in ihm enthaltenen Säuren chemische Reaktionen wie die der hydrolytischen Spaltung von polymeren Substanzen. Im Vergleich zur Standardextraktion ergaben sich auch hier Remobilisierungseffekte durch die enormen Wassermengen. Bei dem Versuch wurden in den Böden des TP Pilzverfahrens signifikante Remobilisierungen in die lösliche Phase beobachtet. Bei der Simulation des Regenereignisses wurde die 200-fache Menge des Bodenvolumens eingesetzt. Im Kontrollboden ohne vorausgegangene TNT-Einbindung lag der Remobilisierungseffekt bei 33,2% der eingesetzten Gesamtradioaktivität des Bodens. Nach TNT-Einbindung mit Hilfe von *S. rugosoannulata* war der Effekt auf 14,5 % reduziert (siehe Tabelle 18). Bei der Ermittlung dieser Werte wurde die Summe aus MeOH und  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ -Fraktion vor und nach Versuch auf die Werte der Standardextraktion bezogen. Die kritischen *t*-Werte dieser Fraktionen als auch der Huminfraktionen weisen einen Wert größer 2,8 auf, was die Alternativhypothese einer signifikanten Remobilisierung unterstützt. Es konnte aber in den untersuchten Böden kein signifikanter hydrolytischer Effekt durch Sauren Regen (pH 5,0) im Vergleich zu einer  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ -Behandlung (pH 6,8) gefunden werden. Bei dem Boden aus Vorbehandlung durch das dynamische Beetverfahren fanden Remobilisierungseffekte von 6 % (Michels et al., 2000) bzw. 15% nach Behandlung im Festbettreaktor (Achnich et al., 2001; Michels et al., 2000).

Die Methoden der Wasserdampfextraktion und die Simulation eines 1000-jährigen Sauren Regenereignisses spiegeln die über den Wasserpfad maximal remobilisierbare Menge gebundener Rückstände wieder. Durch die relativ großen Wassermengen kam es zu signifikanten Remobilisierungseffekten. Nach Einengung der enormen Mengen gelöster

Rückstände mittels Rotationsverdampfer konnte nachgewiesen werden, dass es sich um niedermolekulare Huminsäuren handelte, die ausgeschwemmt worden waren. Nach Filtration durch 0,45 µm-Porenfilter koagulierte die klare Lösung innerhalb weniger Stunden wieder, was für Huminsäuren typisch ist (Jones & Bryan, 1998; Myneni et al., 1999). Bei Untersuchungen mit DC und HPLC- Analytik wurden im Wasserdampfextrakt des Kontrollbodens des TP Jena nur Spuren von originärem TNT und seinen Metaboliten nachgewiesen (wobei es sich um TNT handelte, welches zuvor nicht in den Immobilisierungsprozess eingegangen war), während im Boden des Pilzreaktors weder TNT noch seine Metaboliten detektiert werden konnten. Bei der Wasserdampfdestillation kam es bei allen untersuchten Böden neben der Zerkleinerung der Huminsäuren und deren besseren Löslichkeit in Wasser zu einer Verlagerung dieser Stoffe in den nicht löslichen Huminteil des Bodens (siehe Tabelle 17). Übertragen auf natürliche Bedingungen und eine Sanierung vor Ort könnten diese Stoffe in sandigen Böden ausgewaschen werden, wie es beim Prozess der Podsolierung bei der Bodengesehe geschieht. Es handelt sich dann aber weder um lösliches TNT noch um Metaboliten, sondern um humifiziertes Material, das vermutlich nicht die akut-toxischen Effekte von Nitroaromaten verursacht (Palmer et al., 1997). Der pH-Wert des sauren Regens hatte keinen Einfluss auf die Remobilisierung der Rückstände, in welche die Isotopensignatur eingebaut wurde.

### 3.6.2.2 *Auflösung metall-organischer Komplexe mittels EDTA*

Ein weiterer Versuch zielte auf eine Änderung der Humusstruktur ab. Organische Substanz ist mit der mineralischen Substanz über Erdalkalimetalle, vor allem Calciumionen verbunden. Werden diese zweiwertigen Kationen dem System z.B. durch Komplexbildner entzogen, werden die organischen Moleküle (im vorliegenden Fall TNT) wieder freigesetzt und können aus dem Boden über den Wasserpfad ausgeschwemmt werden. Die Methode eignet sich also zur Abschätzung der Dauerhaftigkeit einer Einbindung. In der Literatur wurde über rückstandshaltigen Boden nach mikrobiellem Abbau von <sup>14</sup>C-PAK berichtet, in dem nach Zugabe von EDTA als Komplexlöser (Eschenbach et al., 1998) eine Rücklösung von <sup>14</sup>C-gebundenen PAK-Rückständen bis zu 9 % erfolgte. Bereits 1999 wurden in einem EDTA-Komplexbildungsversuch zur gezielten Remobilisierung der Effekt einer Remobilisierung von bis zu 18 % vom eingesetzten TNT erreicht (Herre et al., 1998). In den hier dargestellten Versuchen liegen die Werte in der gleichen Größenordnung. Allerdings waren in diesen Versuchen wesentlich höhere Konzentrationen TNT-bürtiger gebundener Rückstände im Boden. Die Remobilisierung von <sup>14</sup>C-TNT stammender Radioaktivität nahm mit steigender

EDTA-Konzentration (0,01; 0,025; 0,05) linear zu. Die 0,05 molare EDTA-Lösung könnte eine Menge von  $24 \text{ g Ca}^{2+} \times \text{kg}^{-1}$  Boden komplexieren, was einem Kalkgehalt eines Bodens von ca. 6% entspräche (wenn vereinfacht  $\text{Ca}^{2+}$  als einziges bivalente Kation in der Bodenlösung vorhanden ist). In Wirklichkeit steht  $\text{Ca}^{2+}$  natürlich in Wechselwirkung mit anderen bivalenten Kationen, aus der Bodenlösung (nicht an Oxide und Hydroxide gebunden). Das sind vor allem  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  oder  $\text{Mn}^{2+}$ . Für einen Boden mit einem durchschnittlichen Kalkgehalt von 0,5 bis 1% stellt das hier durchgeführte Experiment ein „*worts-case*“ Experiment dar.

Steigende Konzentrationen von EDTA (Tabelle 18), welches durch Komplexierung zweiwertiger Kationen Huminmoleküle separiert, ergab keinen signifikanten Anstieg der Radioaktivität in wässrigen Extrakten. Eine maximale Remobilisierung von 15,7% in die löslichen Fraktion konnte bei der höchsten EDTA-Konzentration von 0,05 M in der unbehandelten Kontrolle des Pilzverfahrens erzielt werden (kritischer *t*-Wert: 3.18 bei 0.05 M EDTA), wobei im Boden mit pilzlicher Behandlung der Effekt (5,2 %) um 10,5 % geringer als im Kontrollansatz (siehe Tabelle 18) war (kritischer *t*-Wert: 2.77 bei 0.05 M EDTA). Die  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität in den Fraktionen der Fulvo- und Huminsäuren und des Humins verringerten sich etwas, aber nicht signifikant.

Die Ergebnisse der Versuche mit den Böden nach Behandlung per Dynamischem Beetverfahren und Festbettreaktorverfahren berichten von Remobilisierungseffekten von 22 % bzw. 25,3 % der Rückstandsradioaktivität (Michels et al., 2000). Folglich können enorme Mengen Wasser oder metall-komplexierender Reagenzien eine signifikante Mobilisierung rückstandshaltiger Radioaktivität hervorrufen. Mit diesen Methoden konnte aber per DC weder originäres TNT noch seine Metaboliten detektiert werden. Auch nach Anwendung hochkonzentrierter HCl oder EDTA-Lösungen konnten Bruns-Nagel et al. (2000) eine signifikante Rücklösung erzielen (12,5 bzw. 5,9 %). Jedoch wurden auch hier weder TNT noch Metabolite gefunden. Größenausschlusschromatographie zeigte, dass > 99 % der Radioaktivität an makromolekularen Strukturen > 5000 Da gebunden war.

Tabelle 18 Verteilung der <sup>14</sup>C-Markierung nach chemischer Behandlungen der gebundenen Rückstände im Boden.

Pilzverfahren		% Rückstandsaktivität						
		Saurer Regen			[EDTA]			
		-	H <sub>2</sub> O	Saurer Regen	-	0.01	0.025	0.05
extrahierbar	H <sub>2</sub> O	6.5	<b>39.3</b>	<b>40.1</b>	11.6	<b>15.6</b>	<b>19.2</b>	<b>22.2</b>
	MeOH	25.6	<b>6.3</b>	<b>6.5</b>	16.4	20.1	22.3	21.0
nicht-extrahierbare Rückstände	Fulvosäure	10.6	3.4	3.5	4.6	4.0	3.7	3.4
	Huminsäure	28.0	19.3	22.7	27.8	24.9	25.6	23.3
	Humin	27.2	31.3	26.2	26.1	25.6	26.0	25.1
	$\Sigma$ Rückstände	65.8	54.0	52.4	58.5	54.5	55.3	51.8
Wiederfindung		97.9	99.6	99.0	86.8	90.1	96.9	95.0
<b>Unbehandelter Boden</b>								
extrahierbar	H <sub>2</sub> O	9.9	<b>56.8</b>	<b>57.8</b>	27.0	<b>31.9</b>	<b>35.8</b>	<b>39.2</b>
	MeOH	18.2	<b>3.5</b>	<b>3.5</b>	24.0	24.5	26.8	27.5
nicht-extrahierbare Rückstände	Fulvosäure	12.8	3.5	3.4	4.9	5.0	4.5	4.5
	Huminsäure	26.6	12.4	15.2	23.0	24.6	23.2	22.2
	Humin	31.8	<b>22.2</b>	<b>20.1</b>	31.4	<b>23.6</b>	<b>25.4</b>	<b>19.4</b>
	$\Sigma$ Rückstände	71.2	38.1	38.7	59.3	53.2	53.1	<b>46.1</b>
Wiederfindung		99.2	98.4	100.0	110.2	109.6	115.7	112.8

- Kontrolle ohne Behandlung

### 3.6.3 Biologische Behandlung

#### 3.6.3.1 Remobilisierungspotenzial ligninolytischer Pilze

Biologische Systeme zur Remobilisierung wie ligninolytische Pilze und deren Enzyme zeigen auf, inwieweit biologische Prozesse, die bei der Humifizierung die große Rolle spielen, Einfluss auf eine Wiederfreisetzung gebundener Rückstände haben können. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich keine Anzeichen einer signifikanten Auswirkungen derartiger Prozesse. Vielmehr konnte die These einer dauerhaft festen Einbindung untermauert werden.

Bei denen in dieser Studie eingesetzten Pilzen handelte es sich um *N. frowardii*, *S. rugosoannulata*, *B. adusta* und *T. versicolor*. Es konnte nur eine geringe Mineralisierung des eingestzten  $^{14}\text{C}$ -TNT beobachtet werden (siehe Tabelle 19). Die Pilze *S. rugosoannulata*, *N. frowardii* und *T. versicolor* konnten im Kontrollansatz ohne pilzliche Bodenbehandlung 1,3 %, 2,6 % bzw. 1,5 % der Radioaktivität des Bodens in  $^{14}\text{CO}_2$  freisetzen. Im pilzlich behandelten Boden lagen die Werte bei 1,1 %, 0,9 % bzw. 0,8 %. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass restlich verbliebenes TNT oder dessen Metabolite mineralisiert wurden, da kein Boden eine 100 %-ige Immobilisierung der Rückstände aufwies. Bei den Böden des Dynamischen Beetverfahrens und des Festbettreaktorverfahrens mit höherer Immobilisierung lagen die Werte der kumulativen Mineralisierung durchgehend lediglich bei 0,3 % ( $\pm 0,1$ ). Die Behandlung der Böden mit ligninolytischen Pilzen oder die Zugabe von Kompost hatten auf die Verteilung der Radioaktivität in den Fraktionen des Bodens keinen Einfluss. Kompost, *S. rugosoannulata*, *T. versicolor* führten sogar zu einer weitergehenden Festlegung in die Huminfraction. Eine Remobilisierung war mit  $t$ -Werten  $> 2,7$  zwar im Vergleich zur Kontrolle ohne Veränderung statistisch signifikant, aber bei  $< 2$  % bezogen auf die Gesamtradioaktivität in biologisch behandelten Böden nicht relevant.

Methodenvergleichend können die Ergebnisse eines Versuch mit Flüssigkultur des Pilzes *Phanerochaete chrysosporium* bei der Diskussion hilfreich sein. Hierbei konnte bei einem Perkolationsversuch TNT-rückstandshaltigen Bodens von Achtnich et al. (1999) (Mischungsverhältnis Boden zu Rindenmulch zu Sand 3:1:1) keine Freisetzung von Radioaktivität festgestellt werden.

Tabelle 19 Verteilung der <sup>14</sup>C-Markierung nach biologischer Behandlungen der gebundenen Rückstände im Boden: Effekt von ligninolytischen Pilzen.

		% Rückstandsaktivität					
		Kontrolle	Kompost	<i>B. adusta</i>	<i>N. frowardii</i>	<i>S. rugoso-annulata</i>	<i>T. versicolor</i>
<b>Pilzverfahren</b>							
CO <sub>2</sub>		0.3	0.7	0.5	0.9	1.1	1.0
Extrahierbar	H <sub>2</sub> O	1.3	0.8	1.8	1.6	2.5	1.4
	MeOH	5.4	3.2	5.4	5.8	5.6	5.5
Nicht-extrahierbare Rückstände	Fulvosäure	3.0	2.8	2.9	3.5	2.9	3.1
	Huminsäure	32.1	29.8	34.1	35.9	36.1	37.4
	Humin	62.0	63.2	<b>48.1</b>	<b>47.2</b>	57.2	65.0
	$\Sigma$ Rückstände	97.1	95.8	85.1	86.6	96.2	105.5
Wiederfindung		104.1	100.5	92.8	94.9	105.4	113.4
<b>unbehandelter Boden</b>							
CO <sub>2</sub>		0.3	0.7	1.0	<b>2.7</b>	<b>1.3</b>	<b>1.8</b>
extrahierbar	H <sub>2</sub> O	1.0	0.2	0.9	<b>5.1</b>	<b>5.5</b>	<b>3.0</b>
	MeOH	3.9	2.2	5.1	<b>8.6</b>	<b>12.3</b>	<b>8.3</b>
nicht-extrahierbare Rückstände	Fulvosäure	2.0	1.3	1.7	1.7	1.7	1.6
	Huminsäure	35.0	27.0	37.2	<b>31.7</b>	33.3	36.7
	Humin	48.8	<b>67.3</b>	51.4	<b>55.3</b>	46.3	<b>56.4</b>
	$\Sigma$ Rückstände	85.8	95.6	90.3	88.7	81.3	94.7
Wiederfindung		91.0	98.7	97.3	105.1	100.4	107.8
<b>Dynamisches Beetverfahren</b>							
CO <sub>2</sub>		0.4	0.3	0.5	0.2	0.3	0.3
extrahierbar	H <sub>2</sub> O	1.0	0.0	1.0	0.8	1.1	0.0
	MeOH	2.7	1.5	2.0	1.8	2.1	1.7
nicht-extrahierbare Rückstände	Fulvosäure	9.5	6.5	7.8	8.9	4.5	9.0
	Huminsäure	34.6	35.3	36.4	35.5	35.2	36.9
	Humin	45.7	43.6	<b>36.1</b>	41.5	<b>39.1</b>	<b>40.5</b>
	$\Sigma$ Rückstände	89.8	85.4	80.3	85.9	78.8	86.4
Wiederfindung		93.9	87.2	83.8	88.7	82.3	88.4
<b>Festbettreaktor-Verfahren</b>							
CO <sub>2</sub>		0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.4
extrahierbar	H <sub>2</sub> O	0.9	<b>1.9</b>	<b>2.5</b>	<b>2.7</b>	<b>1.9</b>	<b>3.0</b>
	MeOH	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
nicht-extrahierbare Rückstände	Fulvosäure	1.6	1.5	1.4	1.6	1.4	1.3
	Huminsäure	41.9	39.0	44.6	40.1	45.2	45.9
	Humin	54.5	54.2	<b>45.6</b>	53.2	52.3	<b>47.0</b>
	$\Sigma$ Rückstände	98.0	94.7	91.6	94.9	98.9	94.2
Wiederfindung		99.6	97.3	94.8	98.3	101.6	98.1

*Bijerkandera adusta* (*B. adusta*), *Nematoloma frowardii* (*N. frowardii*), *Stropharia rugosoannulata* (*S. rugosoannulata*) und *Trametes versicolor* (*T. versicolor*); MeOH = Methanol

### 3.6.3.2 Remobilisierungspotenzial extrazellulärer, Radikale-bildender Enzyme

Der Effekt ligninolytischer und oxidativer pflanzlicher Enzyme auf eine Remobilisierung von Rückständen wurde mittels Laccase von *T. versicolor*, MnP von *S. rugosoannulata* und HRP Peroxidase des Meerrettichs untersucht. Bekannterweise können diese Enzyme Huminstoffe depolymerisieren und dieses Potenzial kann auch auf die Metabolisierung nicht-extrahierbarer Rückstände übertragen werden. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in Tabelle 20 veranschaulicht. HRP veränderte die Verteilung der Radioaktivität in Böden nicht signifikant. Lac konnte die wasserlösliche  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität in dem Boden nach Immobilisierung mit dem Dynamischem Beetverfahren um 13,9% erhöhen und die entsprechende Verteilung nach der Vorbehandlung mit dem Sequenziellen Anaerob-aerob-Verfahren um 4,5%. Die *t*-Werte dieser beiden Versuchsreihen von 3.18 zeigen Signifikanz. Durch biologische Behandlung rückstandshaltiger Bodenmaterialien wurden lediglich Unterschiede in der ungleichen biologischen Vorbehandlung deutlich: Mit Zufuhr organischen Materials wurden insbesondere im Boden des TP Marburg lignocellulosehaltige Materialien in den Boden eingebracht, die möglicherweise die Wirkung der Laccase (eines der untersuchten pilzlichen extrazellulären Enzyme) verstärkt haben. Dadurch könnte eine geringe (14%-ige) Remobilisierung bewirkt worden sein. Die Verteilung im TNT-kontaminierten Kontrollboden und pilzlich behandelten Boden wurden durch die extrazellulären Enzyme HRP und Lac nicht signifikant verändert.

Die Daten zeigen, dass Huminsäure-abbauende, Radikal-erzeugende, ligninolytische Pilze und sogar relativ hohe Konzentrationen deren Enzyme generell nicht vermögen, hohe Mengen rückstandshaltiger  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität von biologisch festgelegten TNT-Rückständen zu remobilisieren.

Tabelle 20 Verteilung der  $^{14}\text{C}$ -Markierung nach biologischer Behandlungen der gebundenen Rückstände im Boden: Effekt von extrazellulären Enzymen.

		% Rückstandsaktivität					
		HRP		Lac		MnP	
		-	+	-	+	-	+
<b>Pilzverfahren</b>							
extrahierbar	H <sub>2</sub> O	34.6	37.9	22.5	25.6	16.6	16.4
	MeOH	20.1	21.0	20.3	17.8	21.5	19.1
nicht-extrahierbare Rückstände	$\Sigma$ Huminstoffe	39.1	38.5	58.1	54.8	56.4	<b>63.6</b>
Wiederfindung		93.8	97.4	100.9	98.2	94.5	99.1
<b>unbehandelter Boden</b>							
extrahierbar	H <sub>2</sub> O	31.3	30.9	38.7	39.1	32.9	33.7
	MeOH	34.0	33.9	27.6	26.3	25.3	24.4
nicht-extrahierbare Rückstände	$\Sigma$ Huminstoffe	29.6	33.5	39.8	36.9	42.4	40.3
Wiederfindung		94.9	98.3	106.1	102.3	100.6	98.4
<b>Dynamisches Beetverfahren</b>							
extrahierbar	H <sub>2</sub> O	19.5	20.5	34.4	<b>48.3</b>	17.4	17.3
	MeOH	6.5	7.8	4.8	4.4	1.7	1.9
nicht-extrahierbare Rückstände	$\Sigma$ Huminstoffe	74.3	75.8	56.5	51.1	73.8	76.1
Wiederfindung		100.3	104.1	95.7	103.8	92.9	95.3
<b>Festbettreaktor-Verfahren</b>							
extrahierbar	H <sub>2</sub> O	9.9	7.4	31.0	<b>35.5</b>	4.6	5.8
	MeOH	5.1	3.6	2.9	2.6	1.3	1.1
nicht-extrahierbare Rückstände	$\Sigma$ Huminstoffe	84.8	87.0	65.6	62.8	91.8	92.7
Wiederfindung		99.8	98.0	99.5	100.9	97.7	99.6

- Kontrolle/ohne

+ mit Behandlung

Mangan-Peroxidasen (MnP), Meerrettich-Peroxidase (HRP) and Laccase (Lac)

### 3.6.3.3 Remobilisierungspotenzial von Pflanzen

Die hier in Pflanzversuchen eingesetzten Mono- und Dikotylen zeigten keine Inkorporationsneigung für gebundene Rückstände während Keimung und Wachstum. Bei allen Böden, die durch eine gezielte Immobilisierung des Schadstoffs gekennzeichnet waren, lagen die Werte einer Remobilisierung zwischen 0,06 und 0,69 % der Rückstandsradioaktivität (siehe Tabelle 21). Im unbehandelten Kontrollboden konnten die Pflanzen bis zu 2,6 % der im Boden befindlichen Radioaktivität aufnehmen, wobei es sich um Reste von löslichem TNT gehandelt haben wird, denn die Aufnahme dieser Stoffe in pflanzliche Biomasse ohne Transformierung ist eingehend beschrieben (Sens et al., 1998 und Sens et al., 1999). Lediglich bei der geringfügigen Aufnahme von  $^{14}\text{C}$  in pflanzliche Biomasse und bei zwei Mittelwerten der wässrigen Fraktionen wurden die kritischen *t*-Werte von 2,78 überschritten. Generell werden keine makromolekularen Huminstoffe (auch an Huminstoffe gekoppelte Rückstände) von Pflanzen aufgenommen, TNT und lösliche Metaboliten dagegen reichern sich in deren Wurzelgewebe an (Bharda et al., 1999; Scheidemann et al., 1998). Pflanzen wie Hafer und Kresse nahmen bei Versuchen mit  $^{14}\text{C}$ -PAK-Rückständen keine  $^{14}\text{C}$ -Aktivität auf. Gebundene PAK-Rückstände aus teerölkontaminiertem Boden zeigten in Remobilisierungsexperimenten weder eine hohe Verfügbarkeit zur Mineralisierung noch zur Mobilisierung (Nordlohne et al., 1995).

Tabelle 21 Verteilung der  $^{14}\text{C}$ -Markierung nach biologischer Behandlungen der gebundenen Rückstände im Boden: Effekt von wachsenden Pflanzen und Einbindung in pflanzliche Biomasse.

		% Rückstandsaktivität			
		Kontrolle	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Raphanus sativa</i>	<i>Lolium perenne</i>
<b>Pilzverfahren</b>		-	+	+	+
Biomasseeinbindung		-	0.7	0.3	0.4
Extrahierbar	H <sub>2</sub> O	6.2	4.2	5.7	6.3
	MeOH	25.5	25.7	24.8	24.1
nicht-extrahierbare Rückstände	$\Sigma$ Huminstoffe <sup>a)</sup>	67.2	66.8	67.9	68.1
Wiederfindung		98.9	97.4	98.7	98.9
<b>Unbehandelter Boden</b>					
Biomasseeinbindung		-	2.6	1.7	1.7
Extrahierbar	H <sub>2</sub> O	9.3	7.4	10.4	9.5
	MeOH	18.8	19.1	18.6	15.7
nicht-extrahierbare Rückstände	$\Sigma$ Huminstoffe <sup>a)</sup>	73.5	60.8	63.9	64.8
Wiederfindung		101.6	89.9	94.6	91.7
<b>Dynamisches Beetverfahren</b>					
Biomasseeinbindung		-	0.3	0.1	0.0
Extrahierbar	H <sub>2</sub> O	4.4	3.8	5.8	<b>4.2</b>
	MeOH	4.1	2.8	5.4	4.6
nicht-extrahierbare Rückstände	$\Sigma$ Huminstoffe <sup>a)</sup>	86.8	88.1	87.9	92.4
Wiederfindung		95.3	95.0	99.2	101.2
<b>Festbettreaktor-Verfahren</b>					
Biomasseeinbindung		-	0.1	0.0	0.1
Extrahierbar	H <sub>2</sub> O	6.8	8.9	5.4	<b>5.2</b>
	MeOH	0.4	0.2	2.4	1.4
nicht-extrahierbare Rückstände	$\Sigma$ Huminstoffe <sup>a)</sup>	93.2	88.3	84.3	96.0
Wiederfindung		100.4	97.5	92.1	102.7

- Kontrolle ohne Pflanzen

a) als Summenparameter gemessen.

Insgesamt können die Ergebnisse dahingehend zusammengefasst werden, dass eine Remobilisierung unter *worst-case*-Bedingungen nur in sehr geringem Ausmaß und nur unter drastischen Bedingungen wie enormem Wasserüberschuss erfolgt. Die Stabilität der Rückstände, die durch das Pilzverfahren wie auch durch die Verfahren der anderen TP erzeugt wurden, kann auch unter ungünstigsten Bedingungen als sehr hoch eingeschätzt

werden. Die Befunde des vorliegenden Projektes zeigen eindeutig, dass vor allem Amidbindungen an der Immobilisierung von TNT bzw. dessen Metaboliten beteiligt sind und durch den kovalenten Charakter dieses Bindungstyps eine hohe Stabilität gewährleistet wird. Von den mit dem Pilzverfahren immobilisierten Transformationsprodukten von TNT geht nach dem derzeitigen Stand der Erkenntnisse keine Gefahr einer wiederholten Freisetzung von bekannten TNT-Metaboliten mit entsprechendem toxischen Gefahrenpotenzial aus.

## 4 Summary

As a consequence of TNT production and disarmament of former ammunition plants during the First and Second World War, TNT is a main contaminant of the arms industry. In the contaminated ground TNT usually appears as dust or lumps. As TNT is toxic, the leaching into the ground water is problematic. Thus, a remediation of these concerned areas is advisable.

Besides physical remediation like heating of contaminated soil, biological remediation techniques are applicable. Bioremediation of TNT-contaminated soil is considered to be the most cost-effective and sustainable technique. For assessment of the success of a remediation method which aims at the immobilization of contaminants, experiments have to be conducted to reveal the potential of hazard of the bound residues.

Isotopic labeling of TNT was used to first quantificate the fate of TNT in soil fractions and second to trace the moieties of the TNT molecule during transformation processes. The  $^{14}\text{C}$ -radio label of the molecule was used for the quantification while the  $^{15}\text{N}$  label was used for transformation studies.

Since high amounts of TNT-derived  $^{14}\text{C}$  remained in soil after effective microbial transformation of  $^{14}\text{C}$ -TNT, the goal of the present work was to evaluate whether environmental factors or humus turnover may mobilize  $^{14}\text{C}$ -labeled residues and release TNT or metabolites. This study investigated the stability of TNT residues derived from different bioremediation processes for TNT-contaminated soils. All here investigated biological soil treatment processes aimed at the irreversible binding of reduced TNT metabolites to soil components. The effectiveness of the litter decaying fungus *Stropharia rugosoannulata* DSM-Nr. 11372 to immobilize TNT was examined in detail. Wheat straw containing the fungi was mixed between the soil layers to enable a complete growth of soil aggregates with hyphae. Thus, the fungi successively metabolize TNT at the surface layers between hyphae and soil. The cellular transformation is followed by an integration of the transformation products into the soil matrix. The ability of *S. rugosoannulata* to biotransform xenobiotics was demonstrated with the metabolization and generation of bound residues with the

chemical group of polyaromatic hydrocarbons (PAH). By the expression of extracellular manganese peroxidase and the use of mediators the fungi can withdraw electrons from the aromatic ring system and destroy the aromatic. In the case of manganese peroxidase  $Mn^{3+}$  is the mediator. It is generated by the  $H_2O_2$ -dependent oxidation of  $Mn^{2+}$ .

After an incubation time of 176 days 2.1 g from 8.5 g of TNT per kg soil was immobilized by the fungal inoculum. In the setup with solely the autochthonous flora only 0.9 g from 8.9 g TNT per kg soil was immobilized. In both setups the mineralization of the added  $^{14}C$ -TNT was less than 0.1%. The upper limit to which *S. rugosoannulata* can be used in this remediation technique can be set to 2 g TNT  $kg^{-1}$  soil. Higher concentrations of TNT are toxic to fungal hyphae.

A package of five physical-chemical and three biological remobilization experiments was used for the assessment of three different biological remediation techniques. In addition to the mentioned purely aerobic fungal process two anaerobic/aerobic processes were used. Their effectiveness is based on the biological reduction of TNT under anaerobic conditions and the integration of reduced TNT metabolites under aerobic conditions. These were, by name the dynamic anaerobic/aerobic bed process and the alternating redox process.

The applicability of those tests was proven in several publications dealing with the remediation of PAH contaminated soils. In addition to the decreasing concentrations of soluble contaminants a detoxification was attested with test batteries.

The TNT residues, that were incorporated into the humic fraction by the bioremediation processes were highly resistant to mobilization by physical, chemical, and biological treatments designed to simulate harsh environmental conditions. Neither physical treatment (e.g., grinding of soil, cyclic freezing and thawing or steam extraction) nor chemical methods (e.g., incubation with complexing agents, simulation of an acid rain event) caused a mobilization of the residues of more than 15%. A shift of 4% of the  $^{14}C$ -TNT radioactivity was observed in the experiment with changing incubation temperatures. Heavy rainfall or high amounts of acid water may cause significant mobilization of TNT residues into the aqueous phase of the soil. In the fungal treated soil this effect accounted 14% while it was 32% in the untreated soil. In the direct comparison to the control set with distilled water the

remobilization effect accounted only 1%. However, the precipitates of the clear, yellow-brownish supernatants contained nearly the total initial  $^{14}\text{C}$  radioactivity. This indicates the contribution of humic substances to mobilization. With excess leaching, the nonextractable residues may be degradation products of humic macromolecules since no relative increase in the concentration of either parent compounds or TNT metabolites (TNT, hydroxylamino-dinitrotoluenes, azoxyderivates, aminodinitrotoluenes, or diaminonitrotoluenes) were detected in our experiments. Thus, simple physical sequestration of the parent compounds or its metabolites is not very likely to be the dominant process for the formation of residues. These results indicate that the proximate metabolites were further transformed during residue formation and that strong, presumably covalent interactions are responsible for the binding of TNT metabolites.

Humic acid-degrading, ligninolytic fungi and highly concentrated oxidative enzymes were not able to mobilize the residual  $^{14}\text{C}$  radioactivity or appreciably alter its partitioning. A slight increase in the extractable amounts of  $^{14}\text{C}$  radioactivity was found only in the native TNT-contaminated soil, accompanied by an increase of the  $^{14}\text{C}$  radioactivity in the humin fraction after incubation with these fungi. Isolated ligninolytic enzymes exhibited a significant mobilization effect (maximum 13.9%) only with the soil from the dynamic bed bioremediation process. In addition, growth of bush beans (*Phaseolus vulgaris*) also did not cause significant mobilization of  $^{14}\text{C}$  radioactivity of more than 2.2%, whereas decomposition of the plant tissue led to a mobilization of approximately 8%.

The general turnover of humic matter determines the time frame that controls the long-term fate of TNT residues. From present knowledge, no hazardous impact is expected from TNT residues contained in soils after long-term microbial elimination of the methanol-extractable compounds by the respective treatment processes.

Very few authors have proposed in previous papers that nitrogen from TNT may undergo a different fate in comparison to the carbon from the same compound. The comparison of the mass balances of  $^{14}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$  from labeled TNT in soil bioreactors showed significant differences in the fate of nitrogen and carbon in this experimental work. The fates of the labels from [ $^{14}\text{C}$ ] and [ $^{15}\text{N}$ ] trinitrotoluene were analyzed in bioreactors under aerobic conditions in soil treated by a fungal bioremediation

process with *Stropharia rugosoannulata* and in control soil. Radiolabeled [ $^{14}\text{C}$ ]TNT was mineralized to  $< 0.1\%$  and was metabolized to 69.3% after fungal treatment of the soil over a period of 176 d. About 16.9% was metabolized to ADNT and DANT and 52.3% was converted to nonextractable soil residues. The reactor with [ $^{15}\text{N}$ ]TNT metabolized 21.4% to ADNT and DANT but only 30.2% to nonextractable soil residues. In comparison to the reactor with  $^{14}\text{C}$ , this reactor clearly showed a much higher N mineralization and 6.3% was converted to  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_x$ , and  $\text{N}_2$ . Surprisingly, 11.2% of the  $^{15}\text{N}$  were converted to biogenic  $^{15}\text{N}$  compounds or unknown metabolites in the straw layer containing the fungus, which indicates the use of TNT as nitrogen source. Up to 17.5% of the  $^{15}\text{N}$  label had a different fate than the  $^{14}\text{C}$  label.

Three N-mineralization processes were identified in detailed experiments with [ $^{15}\text{N}$ ]TNT. About 2% of the  $^{15}\text{N}$  label was found as  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$ , showing simultaneous processes of direct TNT denitration (I) and reduction with cleavage of the amino groups (II). The enrichment of up to 7.5 atom%  $^{15}\text{N}$  abundance indicates the formation of Meisenheimer complexes with a denitration of [ $^{15}\text{N}$ ]TNT. A 1.4% of the label was found distributed between  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2$ . However, the  $^{15}\text{N}$  enrichment of the  $\text{N}_2\text{O}$  (up to 38 atom%) demonstrated that both N atoms were generated from the labeled TNT and clearly indicates a novel formation process (III). We propose, as an explanation, the generation of  $\text{N}_2\text{O}$  by cleavage from condensed azoxy metabolites. In addition, 1.7% of the  $^{15}\text{N}$  label was detected as biogenic amino acids in the wheat straw containing the fungus. Our investigations with [ $^{15}\text{N}$ ]TNT have shown the different fates of C and N from TNT and have elucidated processes that cannot be observed with  $^{14}\text{C}$ -labeled TNT. Thus, stable isotope labeling is a powerful tool for analyzing compound turnover in complex environmental systems. Details of the new cleavage reaction of azoxytetranitrotoluenes still have to be investigated in additional experiments. By the application of different remediation processes the extent of the generation of bound residues as well as the peculiarity of the binding of the contaminant to the soil matrix can vary. As far as the type of binding is not a question of molecular interchanges but stable C-C or peptide binding the immobilization of the contaminant can be considered to be stable. In the last years NMR spectrometry has turned to a useful tool for investigations of the chemical bonds. Complex structures can be characterized with this non-degradative technique.

NMR-spectra of bound residues proof the covalent binding of transformed TNT metabolites to the soil organic matter. There are no significant differences between the NMR-spectra of the immobilized products of the different biological remediation processes. The spectra of the fractions of the humic acids showed main peaks at -262 and -320 ppm which represents bonds of amides respectively aromatic anilines. The detected enrichment of  $^{15}\text{N}$  in amino acids has shown that the transformation of TNT-N in the soil matrix can be connected to the production of biomass. The resulting amount of  $^{15}\text{N}$  fixed to the biomass was with 2% in the range of the amount of  $^{15}\text{N}$  turned into inorganic nitrite/nitrate and ammonia. Conducted NMR investigations confirmed the attested stability of the bonds by the long-term and remobilization experiments. About 14% of the  $^{14}\text{C}$ -TNT radioactivity from the soil spiked with non-extractable TNT-residues was mobilized into the water- and methanol soluble fraction by the treatment with laccase as extracellular enzyme. But no structure of the bonds or detectable metabolite could be identified. This again is in accordance with another result of this work that humic acids may become a vehicle of transformed TNT. Regarding the structure of these products there is no similarity to the native TNT, but much more to humic matter.

Moreover, the generation of non-extractable residues can be considered as harmless as a release of the native TNT is not to be expected within long periods of time.

## 5 Zusammenfassung

In Folge der Produktion von TNT, Havarien und Demontage von ehemaligen TNT-Produktionsstätten während des Ersten und Zweiten Weltkriegs stellt TNT eine Hauptgruppe von Kontaminanten der Rüstungsindustrie dar. Auf belastetem Gelände liegt TNT als Staub oder in Form von Klumpen vor. Als problematisch ist die Schadstoffverlagerung ins Grundwasser zu betrachten, denn TNT ist toxisch. Einer Sanierung betreffender Gebiete ist deshalb anzuraten. Neben physikalischen Sanierungen wie die Erhitzung von kontaminierten Böden kommen biologische Verfahren hierfür in Frage. Bioremediation von TNT-kontaminiertem Boden ist die günstigste und nachhaltigste Technik. Um den Erfolg eines Sanierungsverfahrens, welches auf die Immobilisierung von Schadstoffen abzielt zu bewerten, müssen Untersuchungen durchgeführt werden, die nachweisen, dass die festgelegten Rückstände kein Gefährdungspotenzial darstellen.

Um erstens eine eindeutige Quantifizierung zum Verbleib von TNT in Bodenfraktionen und eine zweitens eine Verfolgung der Einzelbestandteile des TNT-Moleküls während Transformationsprozessen nachvollziehen zu können, wurde in dieser Arbeit isotopisch markiertes TNT eingesetzt. Die Markierung des Moleküls mit radioaktivem  $^{14}\text{C}$  als Tracer diente erstem Aspekt, während die Markierung mit  $^{15}\text{N}$  zweitem Aspekt diente.

Da trotz effektiver mikrobiologischer Transformation von  $^{14}\text{C}$ -TNT große Mengen von  $^{14}\text{C}$ -markierten Rückständen im Boden verbleiben, war das Ziel dieser Arbeit zu bewerten, ob Umweltfaktoren oder der Humusturnover zu einer Mobilisierung von  $^{14}\text{C}$ -markierten Rückständen und Freisetzung von TNT oder Metaboliten führen können. Diese Arbeit untersuchte die Stabilität von TNT-bürtigen Rückständen unterschiedlicher biologischer Festlegungsprozesse von mit TNT kontaminierten Böden. Alle hier untersuchten biologischen Bodenbehandlungsprozesse zielten auf die irreversible Einbindung von reduzierten TNT-Metaboliten ab. Im Detail wurde die Effizienz der Festlegung von TNT durch den streuabbauenden Pilz *Stropharia rugosoannulata* DSM-Nr. 11372 untersucht. Bei diesem rein aeroben Verfahren wächst ein streuabbauender Pilz, welcher auf Stroh vorinkubiert wurde, in die Bodenschichten ein und metabolisiert dabei an den Grenzflächen zwischen Hyphen und Boden TNT sukzessive zu Verbindungen, welche dann in die organische Bodenmatrix eingebaut werden. Die Fähigkeit des Pilzes zur Metabolisierung und Bildung gebundener

Rückstände wurde unter anderem an der Stoffgruppe der polyaromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK) nachgewiesen. Durch die Expression seiner extrazellulären Mangan-Peroxidasen vermag dieser Pilz unter Verwendung von Mediatoren aromatischen Grundkörpern Elektronen zu entziehen und so ein Aufbrechen des Ringsystems herbeizuführen. Als Mediator dient im Fall der Manganperoxidase das durch Oxidation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  gebildete  $\text{Mn}^{3+}$  Kation.

Nach einer Inkubationszeit von 176 Tagen konnten von den  $8,5 \text{ g TNT kg}^{-1}$  Boden  $2,1 \text{ g}$  immobilisiert werden. In der vergleichenden Kontrolle ohne Inkubation mit Pilz auf Stroh konnten von  $8,9 \text{ g TNT kg}^{-1}$  Boden hingegen nur  $0,9 \text{ g TNT}$  in die Bodenmatrix festgelegt werden. In beiden Ansätzen wurde vom eingebrachten  $^{14}\text{C}$ -TNT weniger als  $0,1\%$  mineralisiert. Durch den Nachweis toxischer Effekte auf das Mycelwachstums ergibt sich für dieses Verfahren eine Obergrenze der effektiv behandelbaren TNT-Kontamination von  $2 \text{ g TNT kg}^{-1}$  Boden.

Fünf physiko-chemische und drei biologische Remobilisierungs-Testverfahren wurden in dieser Arbeit als Methodenpaket zur Erfolgskontrolle dreier biologischer Sanierungsverfahren eingesetzt. Neben dem zuvor erwähnten aeroben Pilzverfahren kamen zwei anaerob/aerob-Verfahren zum Einsatz. Deren Wirksamkeit gründet auf der biologischen Reduktion von TNT unter anaeroben Bedingungen und dem Einbau reduzierter TNT-Metabolite in die organische Bodenmatrix unter aeroben Verhältnissen. Namentlich handelte es sich um das Dynamisches Anaerob/aerob-Verfahren und um das Sequenzielle Anaerob/aerob-Verfahren.

Die Anwendbarkeit dieser Tests war zuvor in wissenschaftlichen Arbeiten über die Sanierung von mit PAK belasteten Böden abgesichert worden und hatten sich als geeignet erwiesen. Neben einer Verringerung der Konzentration an löslichen Schadstoffen konnte eine Detoxifizierung mittels Testbatterien nachgewiesen werden.

Die TNT-Rückstände, welche durch Bioremediation in die Huminfraction eingebaut worden waren, erwiesen sich als höchst resistent gegenüber physikalischen, chemischen und biologischen Behandlungen, welche widrige Umweltbedingungen simulieren sollten. Weder physikalische Behandlung (Mahlen des Bodens, zyklisches Frieren und Auftauen oder Extraktion mittels Wasserdampf, noch chemische Methoden (Inkubation mit Komplexbildnern, Simulation eines sauren Regenereignisses) führte zu einer Mobilisierung von mehr als  $30\%$ . Beim Experiment mit schwankenden Inkubationstemperaturen kam es

innerhalb der Bodenfraktionen zu einer Verlagerung von bis zu 4% der  $^{14}\text{C}$ -TNT-Radioaktivität. Ein simuliertes Starkregenereignis und enorme Mengen sauren Wasser schienen zu einer signifikanten Mobilisierung von TNT-Rückständen in die wässrige Phase des Bodens zu führen. Im mit Pilz vorbehandelten Boden lag dieser Effekt bei ca. 14%, während er im unbehandelten Boden bei 32% lag. Im Vergleich zu dem Kontrollansatz mit destilliertem Wasser lag der Remobilisierungseffekt jedoch nur bei 1%. Jedoch wies die Ausfällung des klaren, gelblich-braunen Überstandes fast die gesamte  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität auf. Das zeigt, dass Huminsäuren an einer Mobilisierung beteiligt sein können. Da es zu keiner relativen Zunahme in den Konzentrationen von Ausgangsverbindung oder TNT-Metaboliten kam (TNT, Hydroxylamino-Dinitrotoluol, Azoxyderivate, Aminodinitrotoluole oder Diaminonitrotoluole), kann man schließen, dass es sich bei den ausgewaschenen nicht-extrahierbaren Rückständen um Abbauprodukte makromolekularer Huminstoffe handelte. Folglich ist einfache Sequestrierung des originären TNT und seiner Metaboliten sehr wahrscheinlich nicht der bedeutendste Weg der Bildung gebundener Rückstände. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Primärmetaboliten im Laufe der Rückstandsbildung weiteren Transformationsprozessen unterliegen und dass wahrscheinlich kovalente Wechselwirkungen für die Bindung von TNT-Metaboliten verantwortlich sind.

Huminsäure-abbauende, ligninolytische Pilze und hohe Konzentrationen oxidativer Enzyme konnten rückstandshaltige  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität nicht mobilisieren oder deren Verteilung in den Bodenfraktionen signifikant ändern. Eine schwache Zunahme in der extrahierbaren Menge der  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität begleitet von einer Zunahme der  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität in der Huminfraktion wurde nach Zugabe und Inkubation mit diesen Pilzen nur im unbehandelten Kontrollboden vorgefunden. Isolierte ligninolytische Enzyme zeigten nur im Boden nach Behandlung mit dem Dynamischen Beetverfahren einen signifikanten Remobilisierungseffekt von 13,9% bewirken. Auch durch das Wachstum von Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) wurde keine Zunahme größer 2,2% in der  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität in der wässrigen Bodenfraktion gemessen. Das Pflanzengewebe hingegen muss bis zu 8%  $^{14}\text{C}$ -Radioaktivität aufgenommen haben. Der allgemeine Humus-Turnover gibt den zeitlichen Rahmen vor, der das Schicksal der TNT-Rückstände bestimmt. Nach dem heutigen Kenntnisstand geht von TNT-bürtigen Rückständen in Böden nach langfristig erfolgter mikrobieller Eliminierung methanol-extrahierbarer Verbindungen durch die hier beschriebenen Verfahren keine Gefährdung aus.

Nur wenige Autoren haben in neuen Veröffentlichungen vermutet, dass Stickstoff von TNT im Vergleich zum Kohlenstoff dergleichen Verbindung ein anderes Schicksal trifft. Der Vergleich der Massenbilanzen von  $^{14}\text{C}$ - und  $^{15}\text{N}$  markiertem TNT in Bodenreaktoren zeigte in dieser Arbeit signifikante Unterschiede beim Verbleib von  $^{14}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$ . In Bioreaktoren unter aeroben Bedingungen wurden in einem pilzlichen Verfahren mit *Stropharia rugosoannulata* und in einem Kontrollansatz ohne Beimpfung die Stoffflüsse von  $^{14}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  TNT analysiert. Über 176 Tage hinweg wurde  $^{14}\text{C}$ -markiertes TNT zu weniger als 0,1 % mineralisiert und zu 69,3% durch pilzliche Aktivität im Boden metabolisiert. Etwa 16,9% wurden zu ADNT und DANT und 52,3% wurden in nicht-extrahierbare Rückstände umgewandelt. Im Reaktor mit  $^{15}\text{N}$ -TNT wurden 21,4% zu ADNT und DANT aber nur 30,2% zu nicht-extrahierbaren Rückständen metabolisiert. Mit einer N-Mineralisierung von 6,3% in Form von  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_x$  und  $\text{N}_2$  wies dieser Reaktor im Vergleich zum  $^{14}\text{C}$ -Reaktor eine wesentlich höhere Mineralisierung auf. Überraschenderweise wurden 11,2% des  $^{15}\text{N}$  in biogene und unbekannte Verbindungen in der mit Pilz versetzten Strohmasse überführt. Das beweist, dass TNT als N-Quelle genutzt werden kann. Bis zu 17,5% der  $^{15}\text{N}$ -Markierung unterlag anderen Abbauegen als die  $^{14}\text{C}$  Markierung.

Wir identifizierten drei Prozesse der N-Mineralisierung in detaillierten Experimenten mit  $^{15}\text{N}$ -TNT. Etwa 2 % der Markierung wurde als  $\text{NO}_3^-$  und  $\text{NH}_4^+$  detektiert, was für simultan ablaufende Prozesse der TNT-Denitrifizierung (I) und Reduktion mit anschließender Aminogruppenspaltung (II) spricht. Die Anreicherung von 7,5 atom% der  $^{15}\text{N}$  Häufigkeit spricht für die Bildung von Meisenheimer-Komplexen mit anschließender Denitrifizierung von  $^{15}\text{N}$ . 1,4% der Markierung verteilte sich auf  $\text{N}_2\text{O}$  und  $\text{N}_2$ . Jedoch zeigte die Anreicherung im Lachgas (bis zu 38 atom%), dass beide N Atome vom markierten TNT stammen müssen, was für einen bis dato unbekanntes Abbaumechanismus (III) spricht. Als Erklärung vermuten wir die  $\text{N}_2\text{O}$  Bildung durch Abspaltung von kondensierten Azoxy-Metaboliten. Zusätzlich wurden 1,7% der Markierung in Form biogener Aminosäuren im mit Pilz versetzten Weizenstroh vorgefunden.

Unsere Untersuchungen mit [ $^{15}\text{N}$ ]TNT haben offenbart, dass während der Umsetzung von TNT dessen C und N nicht unbedingt zusammen umgesetzt werden, sondern dass sie unterschiedliche Wege einschlagen können. Das kann allein mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem TNT nicht beobachtet werden. Folglich stellen Untersuchungen mit stabilen Isotopen ein

ausgezeichnetes Werkzeug zur Analyse von Stoffumsätzen in komplexen Umweltsystemen dar. Details der neuartigen Ringspaltungsreaktion von Azoxytertranitrotoluolen sollten in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Bei der Anwendung unterschiedlicher Sanierungsverfahren kann sowohl das Ausmaß der Bildung von gebundenen Rückständen als auch die Art der Schadstoff-Einbindung in den Boden variieren. Sofern es sich bei den Bindungstypen nicht um instabile ionische Bindungen oder Bindungen durch molekulare Wechselwirkungen handelt, sondern um stabile C-C-Bindungen oder Peptidbindungen, so kann von einer festen Einbindungen der Schadstoffe ausgegangen werden. Für die Untersuchung von Bindungsmustern hat sich in den letzten Jahren die Methode der Kernresonanzspektrometrie (NMR) durchgesetzt. Mit dieser nicht-degradativen Technik lassen sich auch unlösliche und komplexe Strukturen charakterisieren.

NMR-Spektren von gebundenen TNT-Rückständen bewiesen unabhängig vom biologischen Verfahrenstyp der Sanierung von TNT-kontaminierten Böden die kovalente Einbindung von transformierten TNT-Metaboliten in die organische Bodenmatrix. Die Spektren der Humusfraktionen zeigten Hauptbanden im Verschiebungsbereich um -262 und -320 ppm. Dabei handelt es sich im ersten Fall um die Gruppe der Säureamide und im zweiten Fall um die Gruppe der aromatischen Aniline. Die gemessene Anreicherung von  $^{15}\text{N}$  in Aminosäuren zeigte dass eine Transformation von TNT-bürtigem Stickstoff in der Bodenmatrix mit der Bildung von Biomasse gekoppelt sein kann. Die hierdurch in die Biomasse eingebundene Menge lag mit ca. 2% im gleichen Bereich wie die Menge TNT-bürtigen Stickstoffs, der als anorganisches Nitrit/Nitrat und Ammonium vorlag.

Die Stabilität der Bindungen, welche durch die Langzeit- und Remobilisierungsexperimente nachgewiesen worden war, konnte somit mit den zusätzlich durchgeführten NMR Untersuchungen untermauert werden. Aus dem mit nicht extrahierbaren TNT-Rückständen angereicherten Boden konnten durch eine Behandlung mit Laccase als extrazellulärem Enzym ca. 14% der eingebrachten  $^{14}\text{C}$ -TNT Radioaktivität in wasser- und methanol-lösliche Bestandteile überführt werden. Dieser Remobilisierung konnten jedoch keine Bindungsstrukturmuster geschweige denn detektierbare Metaboliten zugeordnet werden. Dies steht im Einklang mit dem in dieser Arbeit erbrachten Befund, dass Huminsäuren im Rahmen des Humifizierungsprozesses Träger von umgesetztem TNT werden. Dieses TNT

jedoch ist strukturell nicht mehr mit dem originären TNT zu vergleichen, sondern weist vielmehr Huminsäure-Charakter auf.

Die Bildung von nicht-extrahierbaren Rückständen kann als unbedenklich angesehen werden, da eine Freisetzung des originären TNT durch widrige Umwelteinflüsse und nach langen Zeiträumen nicht zu erwarten ist.

## 6 Thesen zur Dissertation

- 1) Biologische Sanierungsmaßnahmen stellen zu konventionellen physikalisch-chemischen Behandlungen eine effektive und kostengünstige Alternative dar.
- 2) Der Pilz *S. rugosoannulata* kann unter den beschriebenen Bedingungen eine maximale TNT-Konzentration von bis zu 2 g TNT kg<sup>-1</sup> Boden in Form gebundener Rückstände festlegen. Der Zusatz eines Pilz-Strohgemisches bewirkt eine biogene Transformation von TNT mit weiterem Zerfall von TNT.
- 3) Die gebildeten Rückstände erwiesen sich gegenüber *worst-case* Bedingungen, die unterschiedliche Umweltstressbedingungen simulierten, als stabil.
- 4) Einmal in den Huminstofffraktionen immobilisierte TNT-Transformationsprodukte werden kaum wieder mobilisiert. Sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen sind die mobilen TNT-Transformationsprodukte vor allem mit der wasserlöslichen Fraktion assoziiert (niedermolekulare Huminsäuren), hauptsächlich über kondensierte N-Verbindungen.
- 5) Die Festkörper-<sup>15</sup>N-NMR-Spektroskopie liefert wertvolle Informationen über die chemische Umsetzung und Einbindung von TNT in das organische Bodenmaterial. Diese Einbindung erfolgt weitgehend über kondensierte N-Verbindungen, die, basierend auf den Ergebnissen der DCPMAS-NMR-Experimente, vor allem Amide und N-Alkyl-Verbindungen einschließen. Jedoch sind quantitative Aussagen zum Bindungsmuster nur grob möglich.
- 6) In der vorliegenden Studie wurde weiterhin gezeigt, dass auch unter rein aerober Inkubation TNT-kontaminierte Böden (mit *S. rugosoannulata* versetztes Bodenmaterial Universität Jena/WISSTRANS Umwelt GmbH) effektiv saniert werden können und dabei die gewünschte Immobilisierung von TNT stattfindet. Die Effizienz kann durch eine zusätzliche anaerobe Behandlung (z.B. durch Festbettkompostierungsverfahren oder mittels eines Dynamischen Beetverfahrens) verbessert werden.
- 7) Mit isotopisch markiertem <sup>15</sup>N-TNT wurde weiter gezeigt, dass TNT am Stickstoff- und Humuskreislauf im Boden teilnimmt. Die Freisetzung von Nitrit/Nitrat, die Aufnahme von Ammonium in die Biomasse des Bodens und vom TNT stammende Lachgasemissionen lassen auf eine in längeren Zeiträumen bioverfügbare Substanz schließen, die die Omnipotenz der Mikroflora des Bodens beweist.

## 7 Literatur

- (1) Achtnich, C., Knackmuss, H.-J., Lenke, H., **2001**, Schlußbericht-Alternierender Anaerob/Aerob-Prozess: Analyse der Bindungsstrukturen von metabolisiertem und humifiziertem TNT im Boden, *UB/TIB, Hannover (Germany)*, <http://edok01.tib.uni-hannover.de/edoks/e01fb01/332140733.pdf>.
- (2) Achtnich, C., Fernandes, E., Bollag, J.-M., Knackmuss, H.-J., Lenke, H., Covalent binding of reduced metabolites of [<sup>15</sup>N<sub>3</sub>] TNT to soil organic matter during a bioremediation process analyzed by <sup>15</sup>N NMR spectroscopy, *Environ Sci Technol*, **1999**, *33*, 4448-4456.
- (3) Achtnich, C., Lenke, H., Stability of immobilized 2,4,6- trinitrotoluene metabolites in soil under long-term leaching conditions, *Environ Tox Chem*, **2001**, *20*, 280-283.
- (4) Achtnich, C., Lenke, H., Klaus, U., Spitteller, M., Knackmuss, H.-J., Stability of immobilized TNT derivatives in soil as a function of nitro group reduction, *Environ Sci Technol*, **2000**, *34*, 3698-3704.
- (5) Achtnich, C., Peters, D., Lenke, H., Knackmuss, H.-J., **2000**, Alternierender Anaerob-/Aerob-Prozeß: Analyse der Bindungsstrukturen von metabolisiertem und humifiziertem TNT im Boden, *In: Verbundvorhaben Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen bei der biologischen Bodensanierung. 2. Statusseminar 22. Februar 2000 in Bremen. Bundesumweltamt, Berlin, Germany, Seiten 106-122.*
- (6) Achtnich, C., Sieglén, U., Knackmuss, H.-J., Lenke, H., Irreversible binding of biologically reduced 2,4,6-Trinitrotoluene to soil, *Environ Tox Chem*, **1999**, *18*, 2416-2423.
- (7) Ahmad, F., Hughes, J.B., Reactivity of partially reduced Arylhydroxylamine and nitrosoarene metabolites of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) towards biomass and humic acids. Biological degradation of of 2,4,6-trinitrotoluene, *Environ Sci Technol*, **2002**, *36*, 4370-4381.
- (8) Alef, K., **1991**, Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie: Aktivitäten, Biomasse, Differenzierung, ecomed Verlag, Landsberg/Lech, Deutschland.
- (9) Alexander, M., How toxic are toxic chemicals in soil? *Env Sci Technol*, **1995**, *29*, 2713-2717.
- (10) America Institute of Biological Science, Environmental Task Group, **1975**, Registration of pesticides in the United States, Proposed guidelines, *Fed Reg*, *40*, 123.

- (11) Axtell, C., Johnston, C.G., Bumpus, J.A., Bioremediation of soil contaminated with explosives at the Naval Weapons Station Yorktown, *Soil Sediment Contam*, **2000**, 9, 537-548.
- (12) Banholczer, A., Bruns-Nagel, D., von Löw, E., Fründt, J, Gemsa, D., **2000**, BMBF-Zwischenbericht „Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen, TV 4: Analyse der Bindungsstrukturen nicht extrahierbarer TNT-Transformationsprodukte“, Zentrum für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie, Bereich Umwelthygiene, Marburg.
- (13) Bayman, P., Radkar, V., Transformation and tolerance of TNT (2,4,6-Trinitrotoluene) by fungi, *Intern Biodet Biodegrad*, **1997**, 39, 45-53.
- (14) Behrend, C. and Heesche-Wagner, K., Formation of Hydride-Meisenheimer Complexes of Picric Acid (2,4,6-Trinitrophenol) and 2,4-Dinitrophenol during Mineralization of Picric Acid by strain *Nocardoides* sp. Strain CB 22-2, *Appl Env Microbiol*, **1999**, 65, 1372-1377.
- (15) Berry, D.F., Boyd, S.A., Decontamination of soil through enhanced formation of bound residues, *Environ Sci Technol*, **1985**, 19, 1132-1133.
- (16) Bharda, R., Wayment, D.G., Hughes, J.B., Shanks, J.V., Confirmation of conjugation processes during TNT metabolism by axenic plant roots, *Environ Sci Technol*, **1999**, 33, 446-452.
- (17) Blotevogel, K-H., Gorontzy, T., **2000**, Microbial degradation of compounds with nitro functions, *In: Biotechnology*, Edited by, H-J. Rehm and Reed, G. Wiley-VCH, Weinheim, Deutschland, 274-294.
- (18) Bollag, J-M., Bollag, W.B., A model for enzymatic binding of pollutants in the soil, *Intern J Environ Anal Chem*, **1990**, 39, 147-157.
- (19) Boopathy, R., Effect of food-grade surfactant on bioremediation of explosives-contaminated soil, *J Haz Mat*, **2002**, 2794, 1-12.
- (20) Boopathy, R., Kulpa, C.F., Manning, J., Montemagno, C.D., Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by a *Pseudomonas* consortium under aerobic conditions, *Biores Technol*, **1994**, 47, 205-208.
- (21) Boopathy, R., Kulpa, C.F., Wilson, M., Metabolism of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) by *Desulfovibrio* sp. (B strain), *Appl Microbiol Biotechnol*, **1993**, 39, 270-275.
- (22) Bradley, P.M., Chapelle, F.H., Landmeyer, J.E., Schumacher, J.G., Microbial transformation of Nitroaromatics in surface soils and aquifer materials, *Appl Environ Microbiol*, **1994**, 60, 2170-2175.

- (23) Breitung, J., Bruns-Nagel, D., Steinbach, K., Kaminski, L., Gemsa, D., von Löw, E., Bioremediation of 2,4,6- trinitrotoluene-contaminated soils by two different aerated compost systems, *Appl Microbiol Biotechnol*, **1996**, *44*, 795-800.
- (24) Bremner, J.M., **1982**, In: Page, A.L. (ed.). Methods of soil analysis; Part 2: Chemical and microbiological properties. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison, WI, US, 643-658.
- (25) Bruns-Nagel, D., Breitung, J., von Löw, E., Steinbach, K., Gorontzy, T., Kahl, M., Blotevogel, K-H., Gemsa, D., Microbial Transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene in aerobic soil columns, *Appl Environ Microbiol*, **1996**, *62*, 2651-2656.
- (26) Bruns-Nagel, D., Drzyzga, O., Steinbach, K., Schmidt, C., von Löw, E., Gorontzy, T., Blotevogel, K-H., Gemsa, D., Anaerobic/aerobic composting of 2,4,6-Trinitrotoluene-contaminated soil in a reactor system, *Environ Sci Technol*, **1998**, *32*, 1676-1679.
- (27) Bruns-Nagel, D., Scheffer, S., Casper, B., Garn, H., Drzyzga, O., von Löw, E., Gemsa, D. Effect of 2,4,6-Trinitrotoluene and its metabolites on human monocytes, *Environ Sci Technol*, **1999**, *33*, 2566-2570.
- (28) Bruns-Nagel, D., Knicker, H., Drzyzga, O., Bütehorn, U., Steinbach, K., Gemsa, D., von Löw, E., Characterization of <sup>15</sup>N-TNT residues after an anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures by solid-state <sup>15</sup>N NMR spectroscopy. 2. Systematic investigation of whole soil and different humic fractions, *Environ Sci Technol*, **2000**, *34*, 1549-1556.
- (29) Bruns-Nagel, D., Steinbach, K., Gemsa, D., von Löw, E., **2000**, Composting (Humification) of nitroaromatic compounds, In: Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives. Spain, J., Hughes, J.B. Knackmuss, H-J Eds.; Lewis Publishers, Washington D.C., U.S., 357-393.
- (30) Caton, J.E., Ho, C.-h., Williams, R.T., Griest, W.H., Characterization of insoluble fractions of TNT transformed by composting, *J Environ Sci Health A*, **1994**, *29*, 659-670.
- (31) Chalk, P.M., Smith, C.J., **1983**, Chemodenitrification. In: Gaseous Loss of Nitrogen from Plant-Soil Systems, J.R. Freney, and J.R. Simpson, (Eds.), Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, *The Hague*, 65-90.
- (32) Clark, F.E., Losses of nitrogen accompanying nitrification, *Trans Int Soc Soil Sci Comm*, **1962**, *IV and V*, 173-176.
- (33) Craig, H.D., Sisk, W.E., Nelson, M.D., Dana, W.H., **1995**, Bioremediation of explosives contaminated soils: A status review, Proceedings of the 10th Annual

- Conference on hazardous waste research, 23rd and 24th May at the Kansas State University, USA, Internet: <http://www.engg.ksu.edu/HSRC/95Proceed/craig.html>.
- (34) Daun, G., Lenke, H., Reuss, M., Knackmuss, H.J., Biological treatment of TNT contaminated soil.1. Anaerobic cometabolic reduction and interaction of TNT and metabolites with soil components, *Environ Sci Technol*, **1998**, *32*, 1956-1963.
- (35) Dawel, G., Kästner, M., Michels, J., Poppitz, W., Günther, W. and Fritsche, W., Structure of a laccase-mediated product of a coupling of 2,4-Diamino-6-nitrotoluene to guaiacol, a model for coupling of 2,4,6- trinitrotoluene metabolites to a humic organic soil matrix, *Appl Environ Microbiol*, **1997**, *63*, 2560-2565.
- (36) Drzyzga, O., Bruns-Nagel, D., Gorontzy, T., Blotevogel K.-H., Gemsa, D., von Löw, E., Mass Balance studies with <sup>14</sup>C-labeled 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) mediated by an anaerobic *Desulfovibrio* species and an aerobic *Serratia* species, *Curr Microbiol*, **1998**, *37*, 380-386.
- (37) Drzyzga, O., Bruns-Nagel, D., Gorontzy, T., Blotevogel, K.H., Gemsa, D., von Löw, E., Incorporation of <sup>14</sup>C-labeled 2,4,6- trinitrotoluene metabolites into different soil fractions after anaerobic and anaerobic-aerobic treatment of soil/molasses mixtures, *Environ Sci Technol*, **1998**, *32*, 3529-3535.
- (38) Duijm, N.J., Markert, F., Assessment of technologies for disposing explosive waste, *J. Haz. Mat. A.*, **2002**, *90*, 137-153.
- (39) Duque, E., Haidour, A., Godoy, F., Ramos, J.L., Construction of a *Pseudomonas* hybrid strain that mineralizes 2,4,6-trinitrotolunene, *J Bacteriol*, **1993**, *175*, 2278-2283.
- (40) Ederer, 2,4,6- Trinitrotoluene (TNT) transformation by clostridia isolated from a munition-fed bioreactor: comparison with non-adapted bacteria, *J Ind Microbiol Biotechnol*, **1997**, *18*, 82-88.
- (41) Eilers, A., Spreinat, A., Gottschalk, G., **1997**, Entwicklung eines Kompostierungsverfahrens mit Pilzen -Schadstoffbilanzierung und Qualität des sanierten Bodens- In: Verbundvorhaben Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten, Teilvorhaben 3, 3. Statusseminar am 26. 27. Februar in Berlin, BMBF, I 1-6.
- (42) Emmrich, M., Kinetics of the alkaline hydrolysis of 2,4,6-trinitrotoluene in aqueous solution and high contaminated soils, *Environ Sci Technol*, **2001**, *35*, 874-877.
- (43) Eschenbach, A. Wienberg, R., Mahro, B., Fate and stability of nonextractable residues of [<sup>14</sup>C] PAH in contaminated soils under environmental stress conditions, *Environ Sci Technol*, **1998**, *32*, 2585-2590.

- (44) Esteve-Nuñez, A; Lucchesi, G; Philipp, B; Schink, B; Ramos, J L., Respiration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain JLR11, *J Bacteriol*, **2000**, *182*, 1352-1355.
- (45) Esteve-Nuñez, Caballero, A., Ramos, J L., Biological Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene, *Microbiol Mol Biol R.*, **2001**, *65*, 335-352.
- (46) French, C.E., Nicklin, S., Bruce, N.C., Aerobic degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by Pentaerythritol Tetranitrate Reductase, *Appl Environ Microbiol*, **1998**, *64*, 2864-2868.
- (47) Friedel, J.K., Scheller, E., Composition of hydrolysable amino acids in soil organic matter and soil microbial biomass, *Soil Biol & Biochem*, **2002**, *34*, 315-325.
- (48) Frische, T., Screening for soil toxicity and mutagenicity using luminescent bacteria-a case study of the explosive 2,4,6-trinitrotoluene (TNT), *Ectox Environ Safety*, **2002**, *51*, 133-144.
- (49) Fritsche, W., Michels, J., Beiträge der Autoren-2. Statusseminar 9.-10. Oktober **1995** in Jena-, BMBF-Verbundvorhaben " Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten".
- (50) Fritsche, W., Scheibner, K., Herre, A. and Hofrichter, M., Fungal Degradation of Explosives: TNT and Related Nitroaromatic Compounds, **2000**, In: Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives. Spain, J., Hughes, J.B. Knackmuss, H-J Eds.; Lewis Publishers, Washington D.C., U.S., 227-233.
- (51) Führ, F., H. Ophoff, P. Burauel, Wanner, U., Haider, K., Modification of the definition of bound residues, **1998**, In Deutsche Forschungsgemeinschaft (Ed.) Pesticide bound residues in soil, Wiley-VCH, Weinheim, 175-177.
- (52) Gehrke, U., Michels, J., Eds., **1999**, Processes for the bioremediation of Soil, Compilation of current projects, Umweltbundesamt, Berlin, Germany.
- (53) Geyer, R., **2000**, Metabolisierung von Chlorphenolen durch die Basidiomyceten *Trametes versicolor* und *Stropharia rugosoannulata*, Dissertationsschrift, Universität Jena.
- (54) Gilcrease, C. P., Murphy, V. G., Bioconversion of 2,4-diamino-6-nitrotoluene to a novel metabolite under anoxic and aerobic conditions, *Appl Environ Microbiol*, **1995**, *61*, 4209-4214.
- (55) Haderlein, S.B., Hofstetter, T.B., Schwarzenbach, R.P., **2000**, Subsurface chemistry of nitroaromatic compounds, In: Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives. Spain, J., Hughes, J.B. Knackmuss, H-J Eds.; Lewis Publishers, Washington D.C., U.S., 311-357.

- (56) Haderlein, S.B., Schwarzenbach, R.P., **1995**, Environmental processes influencing the rate of abiotic reduction of nitroaromatic compounds in the subsurface. In: Biodegradation of Nitroaromatic Compounds. Edt.: Spain, J.C., Plenum Press, New York, 199-225.
- (57) Haidour, A., Ramos, J.L., Identification of products resulting from the biological reduction of 2,4,6-trinitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene, and 2,6-dinitrotoluene by *Pseudomonas* sp., *Environ Sci Technol*, **1996**, *30*, 2365-2370,
- (58) Hannink, N., Rosser, S.J., French, C.E., Basran, A., Murray, J.A.H., Nicklin, S., Bruce, N.C., Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase, *Nature*, **2001**, *19*, 1168-1172.
- (59) Hatzinger, P.B., Alexander, M., Biodegradation of organic compounds sequestered in organic solids or in nanopores within silica particles. Declining bioavailability and inappropriate estimation of risk of persistent compounds, *Environ Chem*, **1997**, *16*, 2215-2221.
- (60) Hawari J., **2000**, Biodegradation of RDX and HMX: From Basic Research to Field Application in: Chapter 11 from "Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives". Edited by Spain, J., Hughes, J.B. and Knackmuss, H-J. Lewis Publishers, Washington, D.C.
- (61) Hawari, J., Beaudet, S., Halasz, A., Thiboutot, S., Ampleman, G., Microbial degradation of explosives: biotransformation versus mineralization, *Appl Microbiol Biotechnol*, **2000**, *54*, 605-618.
- (62) Hawari, J., Halasz, A., Paquet, L., Zhou, E., Spencer, G., Ampleman, G., Thiboutot, S., Characterization of metabolites in the biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene with anaerobic sludge: role of triaminotoluene, *Appl Environ Microbiol*, **1998**, *64*, 2200-2206.
- (63) Hawari, J; Halasz, A; Beaudet, S; Paquet, L; Ampleman, G; Thiboutot, S., Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene with *Phanerochaete chrysosporium* in agitated cultures at pH 4.5, *Appl Environ Microbiol*, **1999**, *65*, 2977-2986.
- (64) Hawthorne; S.B., Lagadec, A.J.M., Kalderis, D., Lilke, A.V., Miller, D.J., Pilot scale destruction of TNT, RDX, and HMX on contaminated soils using subcritical water, *Environ Sci Technol*, **2000**, *34*, 3224-3228.
- (65) Hayes, M. H. B., Pick, M. E., Toms, B. A., Interactions between clay minerals and bipyridylum herbicides, *Residue Rev*, **1975**, *57*,1-25.

- (66) Heiss, G. and Knackmuss, H-J., Bioelimination of nitroaromatic compounds: immobilization versus mineralization, *Curr Opin Microbiol*, **2002**, 5, 282-287.
- (67) Herre, A., Scheibner, K., Kästner, M., Fritsche, W., **1998**, Aerobe Behandlung von UR-14C-TNT-dotiertem Boden mit ligninolytischen Pilzen, Bildung und Remobilisierbarkeit gebundener Rückstände, *In: Verbundvorhaben Lanzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen*,. Statusseminar 22 + 23. September in Bremen, G 1-17.
- (68) Herre, A., Scheibner, K., Fritsche, W., Bioremediation von 2,4,6-Trinitrotoluol-kontaminiertem Boden durch Pilze auf einem Rüstungsalblaststandort, *TerraTech*, **1998**, 4, 52-55.
- (69) Hofrichter, M., Fritsche, W., Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems. II. The ligninolytic enzymes of the coal-humic-acid-depolymerizing fungus *Nematoloma frowardii* b 19, *Appl Microbiol Biotechnol*, **1997**, 47, 419-424.
- (70) Hofstetter, T.B., Heijman, C.G., Haderlein, S.B., Holliger, C., Schwarzenbach, R.P., Complete Reduction of TNT and other (poly)nitroaromatic compounds under iron-reducing subsurface conditions, *Environ Sci Technol*, **1999**, 33, 1479-1487.
- (71) Homma-Takeda, S., Hiraku, Y., Ohkuma, Y., Oikawa, S., Murata, M., Ogawa, K., Iwamuro, T., Li, S., Sun, GF., Kumagai, Y., Shimojo, N., Kawanishi, S., 2,4,6-trinitrotoluene-induced reproductive toxicity via oxidative DNA damage by its metabolite, *Free Rad Res*, **2002**, 36, 555-566.
- (72) Honeycutt, M.E., Jarvis, A.S., McFarland, V.A., Cytotoxicity and mutagenicity of 2,4,6- trinitrotoluene and its metabolites, *Ecotox Environ Safe*, **1996**, 35, 282-287.
- (73) Hughes, J.B., Shanks, J., Vanderford, M., Lauritzen, J., Bharda, R., Transformation of TNT by aquatic plants and plant tissue cultures, *Environ Sci Technol*, **1997**, 31, 266-271.
- (74) Hughes, J.B., Wang, C., Yesland, K., Richardson, A., Bharda, R., Bennett, G., Rudolph, F., Bamberger rearrangement during TNT metabolism by *Clostridium acetobutylicum*, *Environ Sci Technol.*, **1998**, 32, 494-500.
- (75) Hundal, L.S., Singh, J., Bier, E.L., Shea, P.J., Comfort, S.D., Powers, W.L., Removal of TNT and RDX from water and soil using Iron Metal, *Environ Poll*, **1997**, 97, 55-64.
- (76) Isbister, J.D., Anspach, G.I., Kitchens, J.F., Doyle, R.C., Composting for decontamination of soil containing explosives, *Microbiologica*, **1984**, 7, 47-75.

- (77) Jarvis, A.S., McFarland, V.A., Honeycutt, M.E., Assessment of the Effectiveness of Composting for the Reduction of Toxicity and Mutagenicity of Explosive-Contaminated Soil, *Ecotox Environ Safe*, **1998**, *39*, 131-135.
- (78) Johnson, G.R., Smets, B.F., Spain, J.C., Oxidative transformation of aminonitrotoluene isomers by multicomponent dioxygenases, *Appl Environ Microbiol*, **2001**, *67*, 5460-5466.
- (79) Johnson, M.S., Franke, L.S., Lee, R.B., Holladay, S.D., Bioaccumulation of 2,4,6-trinitrotoluene and polychlorinated biphenyls through two routes of exposure in a terrestrial amphibian: is the dermal route significant?, *Environ Tox Chem*, **1999**, *18*, 873-878.
- (80) Johnson, M.S., Vodela, J.K., Reddy, G., Holladay, S.D., Fate and the biochemical effects of 2,4,6-trinitrotoluene exposure to Tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*), *Ecotox Environ Safety*, **2000**, *46*, 186-191.
- (81) Jones; M.N., Bryan, N.D., Colloidal properties of humic substances. Imaging of humic substance macromolecular structures in water and soils, *Adv colloid Interfac*, **1998**, *78*, 1-48.
- (82) Kalafut, T., Wales, M.E., Rastogi, V.K., Naumova, R.P., Zaripova, S.K., Wild, J.R., Biotransformation patterns of 2,4,6-trinitrotoluene by aerobic bacteria, *Curr Microbiol*, **1998**, *36*, 45-54.
- (83) Kaplan, D.L., Kaplan, A.M., **1983**, Reactivity of TNT & TNT microbial reduction products with soil components, Technical report, United states army natick research, TR 83/041, Massachusetts, USA.
- (84) Kästner, M., Richnow, H.H., **2001**, Interaction of Xenobiotic Compounds with Humic Substances, *In: Treatment of Contaminated Soil. Fundamentals, Analysis, Applications.* Stegmann, R., Brunner, G., Calmano, W., Matz, G., Eds.; Springer, Berlin Heidelberg, Deutschland, 224-229.
- (85) Kästner, M., S. Lotter, J. Heerenklage, M.Breuer-Jammali, R. Stegmann, Mahro, B., Fate of <sup>14</sup>C-labeled anthracene and hexadecane in compost manured soil, *Appl Microbiol Biotechnol*, **1995**, *43*, 1128-1135.
- (86) Kästner, M., Streibich, S., Beyrer, M., Richnow, H.H., Fritsche, W., Formation of bound residues during microbial degradation of [<sup>14</sup>C] Anthracen in soil, *Appl Environ Microbiol*, **1999**, *65*, 1834-1842.
- (87) Kelsey, J.W., Alexander, M., Declining bioavailability and inappropriate estimation of risk of persistent compounds, *Environ Toxicol Chem*, **1997**, *16*, 582-585.

- (88) Kim, H-Y., Song, H-G., Comparison of 2,4,6-Trinitrotoluene degradation by seven strains of white rot fungi, *Curr Microbiol*, **2000**, *41*, 317-320.
- (89) Kim, H-Y., Bennett, G.N., Song, H-G., Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Klebsiella* sp. isolated from activated sludge, *Biotechnol Lett*, **2002**, *24*, 2023-2028.
- (90) Klausmeier, R.E., Osmon, J.L., Walls, D.R., the effect of trinitrotoluene on microorganisms, *Dev Ind Microbiol*, **1974**, *15*, 309-317.
- (91) Klausmeier, R.E., Appleton, J.A., DuPre, E.S., Tenbarger, K., The enzymology of trinitrotoluene reduction, *Int. Biodet Biodeg*, **2001**, *48*, 67-73.
- (92) Knicker, H., Bruns-Nagel, D., Drzyzga, O., von Löw, E., Steinbach, K., Characterization of 15N-TNT residues after an anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures by solid-state 15N NMR spectroscopy. 1. Determination and optimization of relevant NMR spectroscopic parameters, *Environ Sci Technol*, **1999**, *33*, 343-349.
- (93) Knicker, H., Lüdemann, H.-D., N-15 and C-13 CPMAS and solution NMR studies of 15N- enriched plant material during 600 days of microbial degradation, *Org. Geochem.*, **1995**, *23*, 329-341.
- (94) Knicker, H., Scaroni, A.W., Hatcher, P.G., 13C and 15N spectroscopic investigation on the formation of fossil algal residues, *Org Geochem*, **1996**, *24*, 661-669.
- (95) Knicker, H; Achtnich, C; Lenke, H., Solid-state nitrogen-15 nuclear magnetic resonance analysis of biologically reduced 2,4,6-trinitrotoluene in a soil slurry remediation, *J Environ Qual*, **2001**, *30*, 403-410.
- (96) Knicker, H., Incorporation of 15N-TNT transformation products into humifying plant organic matter as revealed by one- and two-dimensional solid state NMR spectroscopy, *Sci Total Environ*, Article in press, available online 12 February, **2003**.
- (97) Koch, A-S., **2000**, Prozess und Regulation der N<sub>2</sub>O- und N<sub>2</sub>-Freisetzung aus Waldböden. Dissertationschrift. Universität Göttingen.
- (98) Koehler, H., Warrelmann, L., Frische, T., Behrend, P., Walter, U., In-situ phytoremediation of TNT-contaminated soil. Metabolism and detoxification of TNT by *Phanerochaete chrysosporium*, *Acta Biotechnol*, **2000**, *22*, 67-80.
- (99) Kögel-Knabner, I., Raber, B, Totsche, K.U., 1998, Einfluß gelöster Huminstoffe auf die Mobilität hydrophober Schadstoffe im Boden, FET&WW, Band 6, Wirtschaft, Wissenschaften und Umwelt, VDI Reihe 15, Nr. 206. VDI Verlag Düsseldorf, Seite 68 ff.

- (100) Kördel, W., Hund, K., **1998**, Bodenextraktionsverfahren zur Bewertung des ökotoxikologischen Potentials von Böden. Statusseminar zum BMBF-Forschungsverbund, „Biologische Verfahren zur Bodensanierung“, Tagungsband, Clausthal-Zellerfeld, Umweltbundesamt, Fachgebiet III 3.6 (PT AWAS).
- (101) Koss, G., Lommel, A., Ollroge, I., Tesseraux, I., Haas, R., Kappos, A.D., *Bundesgesundheitsblatt*, **1989**, 12, 527-536.
- (102) Kröger, M., **2002**, Bilanzierung eines kombinierten biologisch-chemischen Abbaus von 14C-2,4,6-Trinitrotoluol (TNT), Dissertationsschrift, Universität Paderborn.
- (103) Bodenkunde, **1994**, Kuntze, H., Röschmann, G., Schwerdtfeger, G., 5. Auflage, UTB-Verlag, Stuttgart, Deutschland, 113 ff.
- (104) Lee, K.B., Gu, M.B., Moon, S-H., Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by immobilized horseradish peroxidase and electrogenerated peroxide, *Wat Res*, **2003**, 37, 983-992.
- (105) Leitfaden-Biologische Verfahren zur Bodensanierung. Michels, J., Track, T., Gehrke, U., Sell, D., Eds.; Umweltbundesamt, Berlin, Germany, **2000**, Verbundvorhaben 5 Langzeit- und Remobilisierungsuntersuchungen, siehe CD-ROM-Inhaltsverzeichnis.
- (106) Lenke, H., Achtnich, C., Knackmuss, H-J. Perspectives of Bioelimination of Polynitroaromatic Compounds, *In: Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives*. Spain, J., Hughes, J.B., Knackmuss, H-J. Eds.; Lewis Publishers, Washington, D.C., U.S., **2000**, 91-126.
- (107) Lenke, H., Warrelmann, J., Daun, G., Hund, K., Sieglén, U., Walter, U., Knackmuss, H-J., Biological treatment of TNT-contaminated soil. 2. Biologically induced immobilization of the contaminants and full-scale application, *Environ Sci Technol*, **1998**, 32, 1964-1971.
- (108) Leung, K.H., Yao, M., Stearns, R., Lee Chiu, S-H., Mechanism of bioactivation and covalent binding of 2,4,6-trinitrotoluene, *Chemico-Biological Interactions*, **1995**, 97, 37-51.
- (109) Li, Z.M., Shea, P.J., Comfort, S.D., Nitrotoluene Destruction by UV-catalyzed Fenton Oxidation, *Chemosphere*, **1998**, 36, 1849-1865.
- (110) Mahro, B., Eschenbach, A., **1998**, Verbundvorhaben Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen, Statusseminare am 22. und 23. September in Bremen, BMBF, Umweltbundesamt, Berlin.
- (111) Martin, J.L., Comfort, S.D., Shea, P.J., Kokjohn, T.A., Drijber, R.A., Denitration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas savastano*, *Can. J. Microbiol.*, **1997**, 43, 447-455.

- (112) Martinetz, D., **1990**, *Handbuch Umweltchemikalien*, Rippen, G., Ed. 3. Aufl., Bd. 2, Kap. 2.6, ecomed Verlag, Landsberg/Lech, Deutschland.
- (113) McCormick, N., Feeherry, F.E., Levinson, S., Microbial transformation of 2,4,6-trinitrotoluene and other nitroaromatic compounds, *Appl Environ Microbiol*, **1976**, *31*, 949-958.
- (114) Meulenbergh, R., Pepi, M. de Bont, J.A.M., Degradation of 3-nitrophenol by *Pseudomonas putida* B2 occurs via 1,2,4-benzenetriol, *Biodeg*, **1996**, *7*, 303-311.
- (115) Meyns, B., van de Wiele, T., Doulamy, F., Marlé, C., de Sloovere, A., van de Wiele, K., Fant, F., Verstraete, W., Remediation of TNT-contaminated soils by anaerobic proteinaceous immobilisation, *Wat. Air Soil Poll*, **2002**, *138*, 37-49.
- (116) Michels, J., Gottschalk, G., **1995**, Pathway of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *In: Biodegradation of Nitroaromatic Compounds*, Eds.: Spain, J. Plenum Press, New York, 135-149.
- (117) Michels, J., Track, T., Gehrke, U., Sell, D., **2000**, Leitfaden-Biologische Verfahren zur Bodensanierung, Dechema im Auftrag des BMBF, Umweltbundesamt, Berlin.
- (118) Montpas, S., Samson, J., Langlois, E., Lei, J., Piche, Y., Chevernet, R., Degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Serratia marcescens*, *Biotechnol Lett*, **1997**, *19*, 291-294.
- (119) Müller, P.H., Neumann, P., Storm, R., **1973**, *Tafeln der mathematischen Statistik*. VEB Fachbuchverlag, Leipzig, Germany.
- (120) Myneni, S.C.B., Brown, J.T., Martinez, G.A., Meyer-Ilse, W., *Science*, **1999**, *286*, 1335-1337.
- (121) Naumova, R.P., Selivanovskaya, S.L.U., Mingatina, F.A., Possibilities for the deep bacterial destruction of 2,4,6-trinitrotoluene, *Mikrobiologica*, **1988**, *57*, 218-222.
- (122) Nishino, S.F., Spain, J.C., Lenke, H., Knackmuss, H.-J., Mineralization of 2,4- and 2,6-Dinitrotoluene in Soil Slurries, *Environ Sci Technol*, **1999**, *33*, 1060-1064.
- (123) Nivinskas, H., Koder, R.L., Anusevicius, Z., Sarlauskas, J., Miller, A-F., Cenas, N., Two electron reduction of nitroaromatic compounds by *Enterobacter cloacae* NAD(P)H nitroreductase: Description of quantitative structure-activity relationships, *Acta Biochem Pol*, **2000**, *47*, 914-949.
- (124) Nordlohne, L., Eschenbach, A., Wienberg, R., Mahro, B., Kästner, M., **1995**, Versuche in Kleinreaktoren und Batchversuche mit Zudosierung <sup>14</sup>C-markierter Schadstoffe. Sanierungsbegleitende Untersuchungen zur Stoffbilanz und Metabolitenbildung bei der Durchführung eines Weißfäule-Mietenverfahrens zur Reinigung des PAK-

- kontaminierten Bodens von dem Schadensfall „Veringstraße 2“. Abschlußbericht an die Umweltbehörde der Hansestadt Hamburg.
- (125) Northcott, G.L., Jones, K.C., Experimental approaches and analytical techniques for determining organic compound bound residues in soil and sediment, *Environ Poll*, **2000**, *108*, 19-43.
- (126) Palmer, W.G., Beaman, J.R., Walters, D.M., Creasia, D.A., Bioavailability of TNT residues in compost of TNT-contaminated soil, *J Tox Environ Health A*, **1997**, *51*, 97-108.
- (127) Pasti-Grigsby, M.B., Lewis, T.A., Crawford, D.L., Crawford, R.L., Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by actinomycetes isolated from TNT-contaminated and uncontaminated environments, *Appl Environ Microbiol*, **1996**, *62*, 1120-1123.
- (128) Pennington, J.C. Brannon, J.M., Environmental fate of explosives, *Thermochimia Acta*, **2001**, *6859*, 1-10.
- (129) Pennington, J.C. Hayes, C.A., Myers, K.F., Ochman, M., Gunnison, D., Felt, D.R., McCormick, E.F., Fate of 2,4,6-trinitrotoluene in a simulated compost system, *Chemosphere*, **1995**, *30*, 429-438.
- (130) Peterson, F. J., Mason, R. P., Horspian, J., Holtzman, J. L., Oxygensensitive and insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microcosomes., *J Biol Chem*, **1979**, *254*, 4009–4014.
- (131) Porter, L.K., Gaseous products produced by anaerobic reaction of sodium nitrite with oxime compounds and oximes synthesized from organic matter, *Soil Sci Soc Am Proc*, **1969**, *33*, 696-702.
- (132) Preuss, A., Fimpel, J., Diekert, G., Anaerobic transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT), *Arch Microbiol*, **1993**, *159*, 345-353.
- (133) Richnow, H.H., Annweiler, E., Koning, M., Lüth, J.-C., Stegmann, R., Garms, C., Francke, W., Michaelis, W., Tracing the transformation of labelled [1-<sup>13</sup>C]phenanthrene in a soil bioreactor, *Environ Poll*, **2000**, *108*, 91-101.
- (134) Rieger, P-G., Knackmuss, H-J., **1995**, Basic knowledge and perspectives on biodegradation of 2,4,6- trinitrotoluene and related nitroaromatic compounds in contaminated soil, In: Biodegradation of Nitroaromatic Compounds. Spain, J.C. Ed., Plenum Press, New York, U.S, 1-18.
- (135) Rieger, P-G., Sinnwell, V., Preuß, A., Francke, W., Knackmuss, H-J., Hydride-Meisenheimer Complex Formation and Protonation as a Key Reaction of 2,4,6-

- Trinitrophenol Biodegradation by *Rhodococcus erythropolis*, *J Bacteriol*, **1999**, *181*, 1189-1195.
- (136) Rho, D., Hodgson, J., Thiboutot, S., Ampleman, G, Hawari, J., Transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) by immobilized *Phanerochaete chrysosporium* under fed-batch and continuous TNT feeding conditions, *Biotechnol Bioeng*, **2001**, *73*, 271-281.
- (137) Ro, K.,S., Venugopal, A., Adrian, D.D., Constant, D., Qaisi, k., Valsaraj, K.T., Thibodeaux, L.J., Roy, D., Solubility of 2,4,6- trinitrotoluene (TNT) in water, *J Chem Eng Dat*, **1996**, *41*, 758-761.
- (138) Roberts, T.R., Klein, W., Still, G.G., Kearny, P.C., Drescher, Desmoras, J. Esser, H.O., Aharonson, N., Vonk, J.W., Nonextractable pesticide residues in soil and plants, *Pure Appl Chem*, **1984**, *56*, 945-956.
- (139) Robidoux, P.Y, Hawari, J., Thiboutot, S., Ampleman, G., Sunahara, G.I., Acute Toxicity of 2,4,6-Trinitrotoluene in Earthworm (*Eisenia andrei*), *Ecotox. Environ. Safety* **1999**, *44*, 311-321.
- (140) Rodgers, J.D, Bunce, N.J., Treatment methods for the remediation of nitroaromatic explosives, *Wat Res*, **2001**, *35*, 2101-2111.
- (141) Scheibner, K., Herre, A., Fritsche, W., Abschlußbericht Verbundvorhaben „Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten“ Teilprojekt IV, Förderkennzeichen 1450821 A, **1999**, BMBF, Berlin.
- (142) Scheibner, K., Hofrichter, M., Herre, A., Michels, J., Fritsche, W., Screening for fungi intensively mineralizing 2,4,6-trinitrotoluene, *Appl Microbiol Biotechnol*, **1997**, *47*, 452-457.
- (143) Scheidemann, P., Klunk, A., Sens, C., Werner, D., Species dependent uptake and tolerance of nitroaromatic compounds by higher plants, *J Plant Physiol*, **1998**, *152*, 242-247.
- (144) Schlosser, D., Grey, R., Höfer, C., Fahr, K., **1998**, Chapter 26: Degradation of chlorophenols by basidiomycetes. Remediation of hazardous waste contaminated soils. Wise, D. L., D. J. Trantolo, H. I. Inyang et al. New York, Marcel Dekker. 2nd Ed.: 393-408.
- (145) Schmelling, D.C., Gray, K.A., Kamat, P.V., Role of reduction in the photocatalytic degradation of TNT, *Environ Sci Technol*, **1996**, *30*, 2547-2555.
- (146) Schmidt, A., Butte, W., Photocatalytic degradation of reduction products of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT), *Chemosphere*, **1999**, *38*, 1293-1298.

- (147) Schmidt, T.C., Steinbach, K., von Löw, E., Stork, G., Highly polar metabolites of nitroaromatic compounds in ammunition wastewater, *Chemosphere*, **1998**, 37, 1079-1090.
- (148) Schnitzer, M., Spiteller, M., **1986**, The chemistry of the „unknown“ soil nitrogen, *Transact 13th Conf Intern Soil Society Hamburg*, 3, 473-474.
- (149) Schwarzenbach, R.P., Stierli, R., Lanz, K., Zeyer, J., Quinone and iron porphyrin mediated reduction of nitroaromatic compounds in homogeneous aqueous solution, *Environ Sci Technol*, **1990**, 24, 1566-1574.
- (150) Sens, C., Scheidemann, P., Klunk, A., Werner, D., Distribution of <sup>14</sup>C-TNT and derivatives in different biochemical compartments of *Phaseolus vulgaris*, *Environ Sci Pollut Res*, **1998**, 5, 202-208.
- (151) Sens, C., Scheidemann, P., Werner, D., The distribution of <sup>14</sup>C-TNT in different biochemical compartments of monocotyledonous *Tritium aestivum*, *Environ Poll*, **1999**, 104, 113-119.
- (152) Shen, C.F., Guiot, S.R., Thiboutot, S., Ampleman, G., Hawari, J., Fate of explosives and their metabolites in bioslurry treatment processes, *Biodegradation*, **1998**, 8, 339-347.
- (153) Shen, C.F., Hawari, J.A., Ampleman, G., Thiboutot, S., Guiot, S.R., Origin of p-Cresol in the anaerobic degradation of trinitrotoluene, *Can J Microbiol.*, **2000**, 46, 119-124.
- (154) Sohr, J., Janes, W., Bongartz, A., Planar chromatography on the road. Instrumental TLC the best choice for environmental analysis via mobile lab station, *CBS CAMAG bibliography service*, **1994**, 72, 8-11.
- (155) Spain, J., Biodegradation of nitroaromatic compounds, *Ann Rev Microbiol*, **1995**, 49, 523-555.
- (156) Spain, J., Hughes, J.B. and Knackmuss. **2000**. Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives. Edited by, H-J. Lewis Publishers, Washington, D.C., 4-5.
- (157) Spanggord, R.J., Spain, J.C., Nishino, S.F., Mortelmans, K.E., Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by *Pseudomonas* sp., *Appl Environ Microbiol*, **1991**, 57, 3200-3205.
- (158) Stahl, J.D., Aust, S.D., **1995**, Biodegradation of 2,4,6-trinitrotoluene by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. In: Spain, J.C., Ed., Biodegradation of nitroaromatic compounds. Plenum Press, New York, U.S.
- (159) Sung, K., Corapcioglu, M.Y., Drew, M.C., Munster, C.L., Plant contamination by organic pollutants in phytoremediation, *J Environ Qual*, **2001**, 30, 2081-2090.

- (160) Thiele, S., Fernandes, E., Bollag, J.-M., Enzymatic transformation and binding of labeled 2,4,6-trinitrotoluene to humic substances during an anaerobic/aerobic incubation, *J Environ Qual*, **2002**, *31*, 437-444.
- (161) Thieme, J., **1996**, Bericht in *Bestandsaufnahme von Rüstungsaltslastverdachtsstandorten in der Bundesrepublik Deutschland*, Umweltbundesamt, Ed., 2. Auflage, Band 1, UBA-Texte 25/96, Berlin.
- (162) Thompson, P.L., **1997**, Phytoremediation of munitions (RDX, TNT) waste at the Iowa Army Ammunition Plant with hybrid poplar trees, Ph.D. Thesis, University of Iowa.
- (163) Thorn, K.A., Pennington, J.C., Hayes, C.A., <sup>15</sup>N NMR investigation of the reduction and binding of TNT in an aerobic bench scale reactor simulating windrow composting, *Environ Sci Technol*, **2002**, *36*, 3797-3805.
- (164) Thorn, K.A., Pettigrew, P.J., Goldenberg, W.S., Covalent binding of aniline to humic substances. 2. <sup>15</sup>N NMR studies of nucleophilic addition reactions, *Env. Sci. Technol.*, **1996**, *30*, 2764-2775.
- (165) Thorne, P.G., Leggett, D.C., Hydrolytic release of bound residues from composted soil contaminated with 2,4,6-trinitrotoluene, *Environ Toxic Chem*, **1996**, *16*, 1132-1134.
- (166) Van Aken, B., Agathos, S.N., Biodegradation of nitro-substituted explosives by white-rot fungi: a mechanistic approach, *Adv Appl Microbiol*, **2001**, *48*, 1-77.
- (167) Vanderberg, L.A., Perry, J.J., Unkefer, P.J., Catabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by *Mycobacterium vaccae*, *Appl Microbiol Biotechnol*, **1995**, *43*, 937-945.
- (168) Vanderford, M., Shanks, J.V., Hughes, J.B., Phytotransformation of trinitrotoluene (TNT) and distribution of metabolic products in *Myriophyllum aquaticum*, *Biotechnol Lett*, **1997**, *19*, 277-280.
- (169) Vasilyeva, G., Kreslavski, V.D., Oh, B.-T., Shea, P.J., Potential of activated carbon to decrease 2,4,6-trinitrotoluene toxicity and accelerate soil decontamination, *Environ Toxic Chem*, **2001**, *20*, 965-971.
- (170) Verstraete, W., Devliegher, W., Formation of non-bioavailable organic residues in soil: perspectives for site remediation, *Biodegradation*, **1996**, *7*, 471-485.
- (171) Vorbeck, C., Lenke, H., Fischer, P., Knackmuss, H.-J. Identification of a hydrid-meisenheimer complex as a metabolite of 2,4,6-trinitrotoluene by a mycobacterium strain, *J Bacteriol*, **1994**, *176*, 932-934.
- (172) Wang, C.-J., Thiele, S., Bollag, J.-M., Interaction of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) and 4-Amino-2,6-Dinitrotoluene with humic monomers in the presence of oxidative enzymes, *Arch Environ Toxicol*, **2002**, *42*, 1-8.

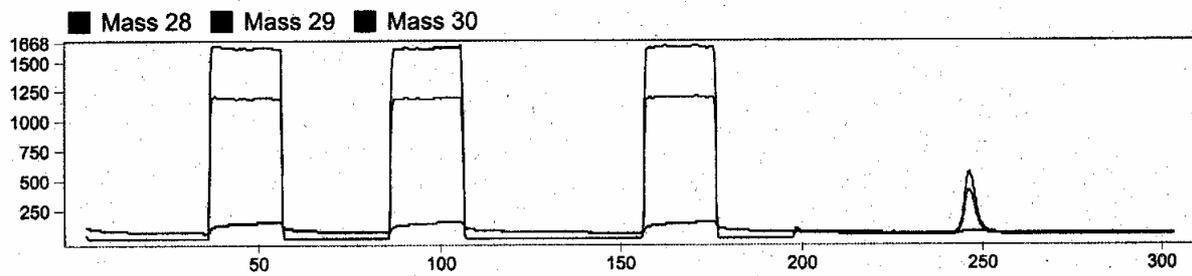
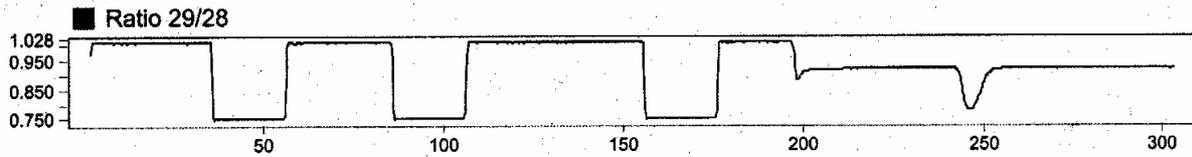
- (173) Weiß, M., Geyer, R., Kästner, M., Geyer, R., Kästner, M. and Diekert, G., **2001**, Analyse der Bindungsstrukturen gebundener TNT-Rückstände im Boden nach biologischer Behandlung und Remobilisierungsversuche. In Verbundvorhaben: Biologische Verfahren zur Bodensanierung. Teilverbund 5: Langzeit- und Remobilisierungsverhalten von Schadstoffen. *UB/TIB, Hannover (Germany)*, <http://edok01.tib.uni-hannover.de/edoks/e01fb01/332140733.pdf>
- (174) Widrig, D.L., Boopathy, R., Manning, J.F., Bioremediation of TNT-contaminated soil: a laboratory study, *Environ Toxicol Chem*, **1997**, *16*, 1141-1148.
- (175) Winterberg, R., 1997, Optimierung eines dynamischen Beetverfahrens zur Behandlung Nitroaromaten-kontaminierter Böden In: Verbundvorhaben Biologische Sanierung von Rüstungsaltslasten, Teilvorhaben 3, 3. Statusseminar am 26. 27. Februar in Berlin, BMBF, H 1-8.
- (176) Won, W.D., DiSalvo, L.H., Ng, J., Toxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites, *Appl Environ Microbiol*, **1975**, *31*, 576-580.
- (177) Xiang, X., **2001**, Treatment of Trinitrotoluene (TNT)-contaminated wastewater in constructed wetland, Dissertationsschrift, Technische Universität München.
- (178) Yamashina, I., Shikata, S., Egami, F., Enzymatic reduction of aromatic nitro, nitroso and hydroxylamino compounds, , *Bull Chem Soc, Jpn*, **1953**, *27*, 44-45.
- (179) Yoshida, N., 15N depleted N<sub>2</sub>O as a product of nitrification, *Letters to Nature*, **1988**, *335*, 528-529.
- (180) Zaripov, S.A., Naumov, A.V., Abdrakhmanova, J.F., Garusow, A.V., Naumova, R.P., Models of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) initial conversion by yeast, *FEMS Microbiol Lett*, **2002**, *217*, 213-217.

8 Anhang

ISODAT NT  
GC II-III Interface Results

C:\FINNIGAN\ISODAT NT\Global\User\GC II-III Interface\Results\martin-w\Test.28.09.01.CF

1	Disabled	gas	200 ng	705	N2O-splitless.met
---	----------	-----	--------	-----	-------------------



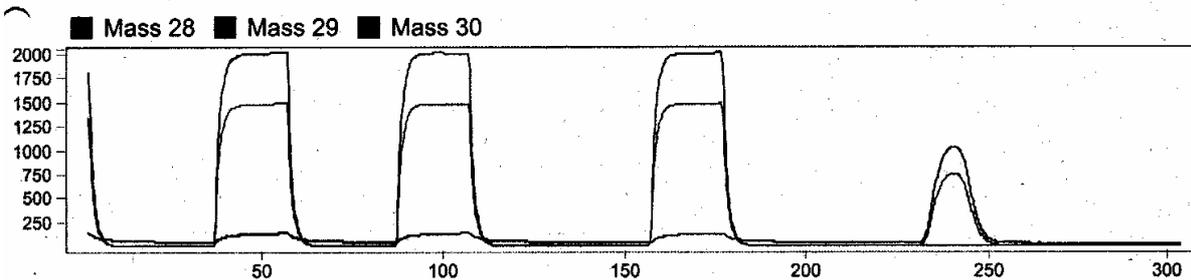
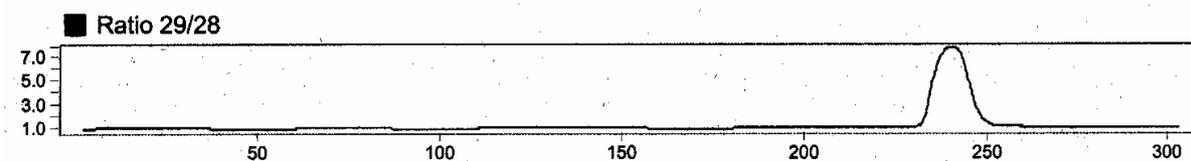
1	37.8	22.8	1629	2.4	3.7	55.8	0.0073419	32.103	-1.972	0.365752
2*	105.7	22.8	1626	2.5	3.7	57.1	0.0073420	32.026	-1.960	0.365756
3	170.9	22.8	1634	2.4	3.7	51.7	0.0073417	32.140	-1.996	0.365743
4	198.6	10.7	87	2.5	3.7	60.0	0.0072608	0.540	-12.993	0.361728
5	246.1	14.3	510	51.0	39.1	51.0	0.0073381	1.850	-2.490	0.365563

Abbildung 19 Detektion von unmarkiertem <sup>28</sup>N<sub>2</sub>O nach 246 sec. Laufzeit am GC-IR MS.

## ISODAT NT GC II-III Interface Results

C:\FINNIGAN\ISODAT NT\Global\User\GC II-III Interface\Results\martin-w\24.10.01.Pilz-1.CF

1	Disabled	gas	200 ng	972	N2O-splitless.met
---	----------	-----	--------	-----	-------------------



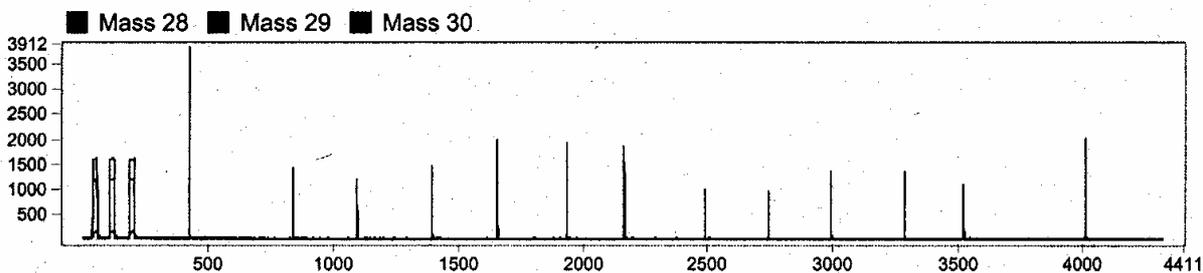
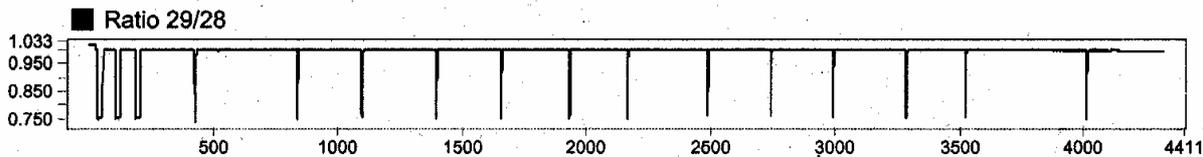
1	56.5	31.8	2013	2.5	4.5	40.5	0.0073421	39.953	-1.948	0.365761
2*	99.2	31.8	2004	2.5	4.4	41.6	0.0073420	39.985	-1.960	0.365756
3	176.5	31.8	2007	2.4	4.4	36.1	0.0073426	39.876	-1.882	0.365785
4	240.3	16.4	6	3.6	5.4	34.6	1.3241834	0.165	179004.267	39.834848

Abbildung 20 Detektion von markiertem, TNT-bürtigem  $^{29/30}\text{N}_2\text{O}$  nach 240 sec. Laufzeit am GC-IR MS.

## ISODAT NT GC II-III Interface Results

C:\FINNIGAN\ISODAT NT\Global\User\GC II-III Interface\Results\martin-w\probe190901-2.CF

1	Disabled	gas	200 ng	528	N2-gas.met
---	----------	-----	--------	-----	------------



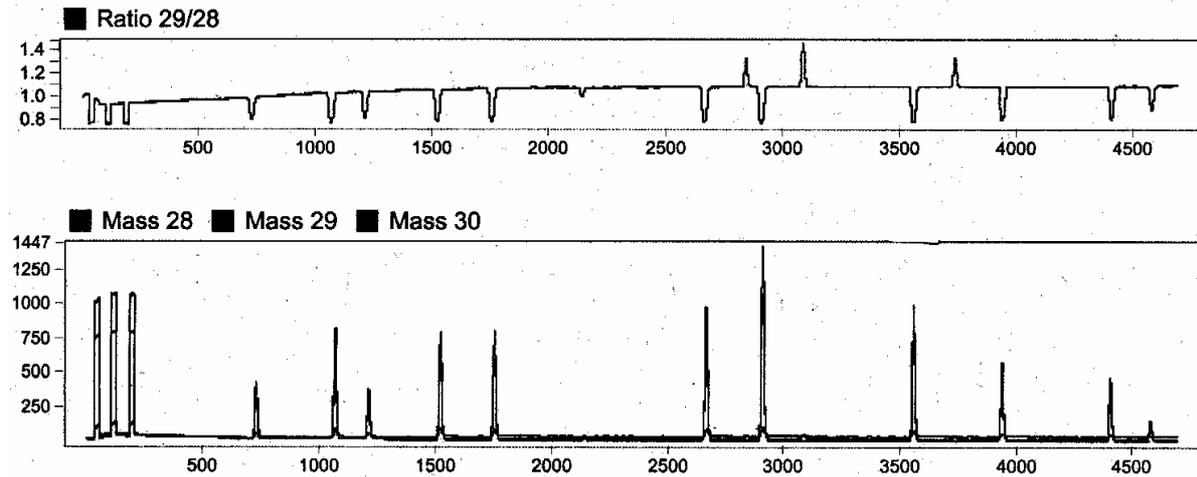
1	53.5	23.1	1601	8.3	8.2	32.9	0.0073427	31.657	-1.865	0.365791
2*	116.8	22.8	1603	7.9	7.9	31.9	0.0073420	31.680	-1.960	0.365756
3	205.6	22.8	1598	7.9	7.9	32.0	0.0073425	31.662	-1.887	0.365783
4	427.2	11.8	3829	7.7	7.8	22.9	0.0073312	5.561	-3.423	0.365222
5	840.2	10.2	1422	7.7	7.7	18.4	0.0073247	2.111	-4.311	0.364898
6	1097.4	10.8	1190	7.7	7.6	15.8	0.0073255	1.732	-4.198	0.364939
7	1396.8	10.5	1462	7.6	7.6	16.5	0.0073222	2.168	-4.644	0.364776
8	1658.0	11.0	1978	7.6	7.6	14.0	0.0073364	2.861	-2.713	0.365481
9	1935.1	10.5	1926	7.7	7.6	14.8	0.0073385	2.787	-2.428	0.365585
10	2166.5	10.8	1843	7.6	7.5	15.0	0.0073402	2.657	-2.201	0.365668
11	2491.1	10.0	993	7.6	7.5	14.3	0.0073298	1.470	-3.609	0.365154
12	2742.6	9.7	963	7.6	7.5	14.1	0.0073310	1.408	-3.448	0.365213
13	2993.2	10.3	1350	7.6	7.5	14.1	0.0073269	1.960	-4.015	0.365006
14	3284.3	10.2	1358	7.6	7.5	13.9	0.0073308	1.985	-3.483	0.365200
15	3521.8	10.0	1094	7.5	7.5	13.2	0.0073242	1.625	-4.376	0.364874
16	4012.5	12.6	2024	8.5	8.2	14.0	0.0073237	3.923	-4.445	0.364849

Abbildung 21 Detektion von unmarkiertem <sup>28</sup>N<sub>2</sub> am GC-IR MS.

## ISODAT NT GC II-III Interface Results

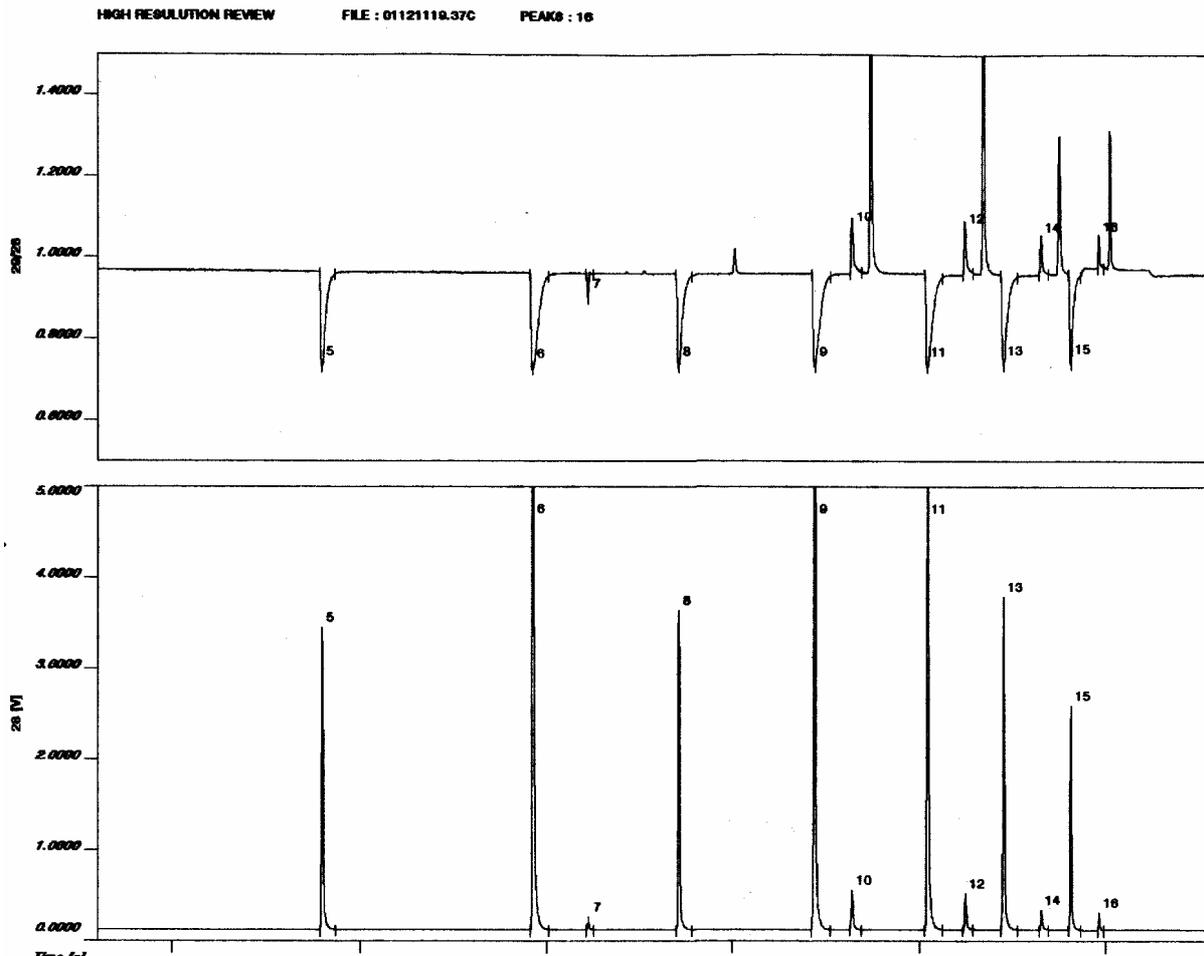
C:\FINNIGAN\ISODAT NT\Global\User\GC II-III Interface\Results\martin-w\N2.0602.2002.CF

1	Disabled	gas	200 ng	2056	N2-gas.met
---	----------	-----	--------	------	------------



1	55.8	22.6	1031	7.7	8.8	20.3	0.0073414	20.315	-2.040	0.365727
2*	108.5	22.0	1022	56.0	44.6	32.6	0.0073420	20.237	-1.960	0.365756
3	204.0	22.1	1025	49.3	39.9	34.5	0.0073410	20.321	-2.098	0.365706
4	731.0	39.5	410	22.8	20.8	23.0	0.0073735	5.593	2.324	0.367321
5	1069.1	42.0	861	15.0	18.0	29.6	0.0073578	11.633	0.185	0.366540
6	1213.5	40.3	371	13.1	17.3	32.4	0.0073707	5.011	1.938	0.367180
7	1522.0	43.9	783	9.9	16.3	33.9	0.0073643	10.676	1.068	0.366862
8	1755.3	41.9	797	8.5	15.4	33.6	0.0073764	11.103	2.719	0.367465
9	2667.9	43.9	1015	6.2	14.4	33.6	0.0074439	13.623	11.900	0.370817
10	2910.1	45.3	1413	5.9	14.5	35.2	0.0074404	19.331	11.419	0.370641
11	3557.1	43.4	983	5.5	14.3	35.0	0.0074461	13.170	12.196	0.370925
12	3937.1	41.4	575	5.3	14.3	35.5	0.0073572	7.702	0.107	0.366511
13	4407.7	40.5	461	5.2	14.5	35.7	0.0073454	6.122	-1.492	0.365927
14	4583.7	38.7	152	5.2	14.5	36.3	0.0074539	2.131	13.257	0.371312

Abbildung 22 Detektion von unmarkiertem und markiertem, TNT-bürtigem  $^{29/30}\text{N}_2$  am GC-IR MS.



Sample Name : Martin1.12.01/6.LaufN2/  
 Time Code : 011211193747  
 Spec.-no. : 7759

Peak	tR [sec]	Width [sec]	Ampl. [V]	Background[counts/s]			AREA [Vs]	Delta vs. Air 29/28
				28	29	30		
1	53.98	28.79	5.882	275.7	256.3	305.3	35.756	-1.89
2	122.28	24.92	1.017	227.2	221.7	317.5	20.435	-1.89
3*	148.94	24.91	1.016	229.1	223.1	326.1	20.424	-1.96
4	194.20	24.92	1.019	230.7	224.3	330.3	20.488	-1.86
5	900.96	42.63	3.288	237.7	229.4	303.2	17.438	
6	1463.73	49.65	10.781	239.7	230.8	300.5	58.595	
7	1612.64	19.46	0.098	241.9	232.6	309.8	0.541	174.65
8	1853.27	42.63	3.471	241.7	232.4	304.0	18.406	0.22
9	2218.87	49.67	8.334	240.7	231.5	301.8	47.023	8.99
10	2319.50	31.08	0.394	242.4	232.7	312.7	2.653	507.60
11	2521.94	47.38	7.463	242.8	233.2	304.2	41.134	8.94
12	2622.71	26.48	0.353	245.3	235.0	313.5	2.321	505.58
13	2725.45	44.39	3.619	245.6	235.6	309.4	20.104	8.69
14	2826.89	25.80	0.175	246.0	235.6	311.6	1.126	505.74
15	2905.91	32.92	2.425	245.3	236.2	310.2	11.113	6.63
16	2982.39	17.64	0.150	230.1	224.2	309.6	0.693	508.19

Abbildung 23 Detektion von unmarkierten und  $^{15}\text{N}$ -markierten Aminosäuren (vom TNT-N stammend) am GC-IR MS.

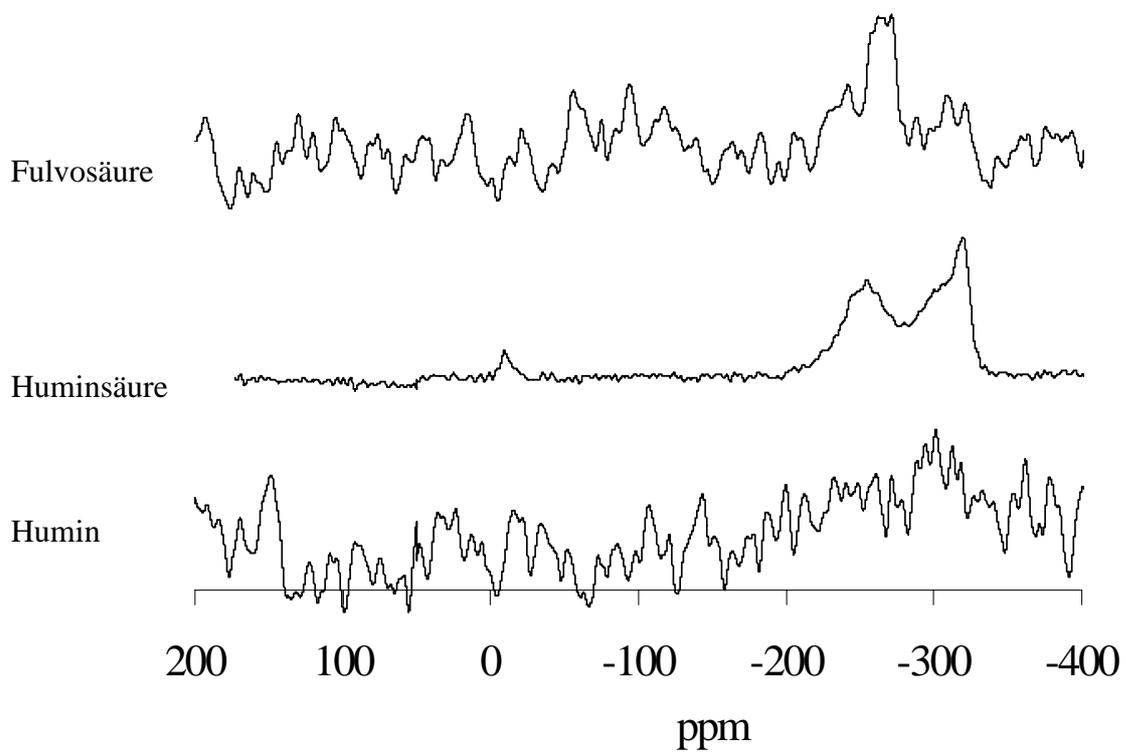
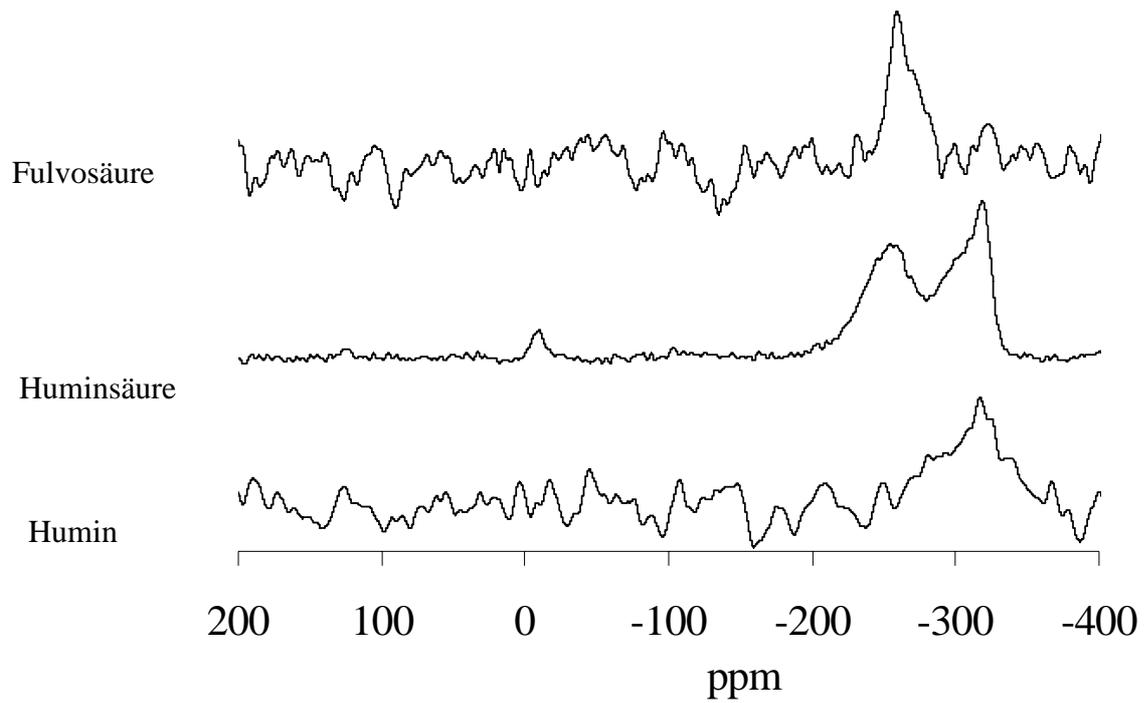


Abbildung 24  $^{15}\text{N}$ -NMR-Spektren einzelner Bodenfraktionen ohne (oben) und mit (unten) Laccasebehandlung des unbehandelten Kontrollbodens

*Environmental Chemistry*FATE AND STABILITY OF <sup>14</sup>C-LABELED 2,4,6-TRINITROTOLUENE IN CONTAMINATED SOIL FOLLOWING MICROBIAL BIOREMEDIATION PROCESSES

MARTIN WEIß,† ROLAND GEYER,‡ THOMAS GÜNTHER,§ and MATTHIAS KAESTNER\*†

†Centre for Environmental Research Leipzig-Halle, Department of Bioremediation, Permoserstraße 15, D-04318 Leipzig, Germany

‡Center for Biomarker Analysis, University of Tennessee, 10515 Research Drive, Suite 300, Knoxville, Tennessee 37932-2575, USA

§JenaBios, Loebstetter Straße 78, D-07749 Jena, Germany

(Received 12 March 2003; Accepted 16 February 2004)

**Abstract**—Biological treatment of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in soil rarely results in complete mineralization of the parent compound. More often, the largest proportion of the TNT carbon is incorporated into the soil organic matrix. Therefore, we evaluated the stability of nonextractable residues from various bioremediation processes of <sup>14</sup>C-TNT in soils. The extractable amounts of the residual radioactivity varied between 7 and 33% and thus the nonextractable amount between 93 and 67% (3–15% in fulvic acids, 26–46% in humic acids, and 27–44% in the humin fraction). The residue-containing soils were analyzed for the release of radioactivity after treatment by physical (freeze and thaw, grinding of soil, and steam extraction), chemical (acid rain and addition of metal complexing agent), and biological methods (addition of compost, white rot fungi, radical-generating enzymes, and germination of plants). Freeze and thaw treatment and grinding of the soil did not alter the partitioning of the label significantly. Steam extraction and acid rain extraction increased the water extractability to 11 to 29% and to 51.6% in the native TNT-contaminated soil. The addition of ethylenediamine-tetraacetate (EDTA) increased the extractability from 7 to 12%. After biological treatment, only slightly increased extractability (<<10%) was observed. No increase of extractable TNT or known metabolites was observed with any of the treatments. Thus, under the treatment conditions applied in this study, the residues formed during microbial transformation of TNT may be biogenic residues with low mobilization potential and low hazardous impact.

**Keywords**—2,4,6-Trinitrotoluene    Bioremediation    Nonextractable residues    Bound residue stability

**INTRODUCTION**

The most widely used military explosive during World Wars I and II was 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). To date, soil and groundwater contaminations by explosives and related compounds is a worldwide problem related to production sites, ammunition plants, burning sites, and demilitarization activities [1]. The release of TNT to the environment may represent a potential hazard because of the TNT itself, its metabolites from degradation, or by-products of the manufacturing process or incomplete combustion. Trinitrotoluene and related compounds (4-hydroxylamino-2,6-dinitrotoluene, 4-amino-2,6-dinitrotoluene, 2-amino-4,6-dinitrotoluene) are toxic and mutagenic for a variety of organisms [2,3]. Treatment processes using microbial degradation, such as composting, land farming, aerobic and anaerobic bioslurry, and fungal incubation, are considered to be the most cost-effective treatment technologies for remediating TNT-contaminated soil [4,5]. The TNT is relatively resistant to mineralization but can be metabolized in many different ways [5,6]. Ligninolytic fungi have been found to mineralize TNT cometabolically by the activity of peroxidases and phenoloxidases [7,8]. Most bacteria and fungi reduce the nitro moieties of TNT sequentially to amino groups [5] via hydroxylamines, monoamino-dinitro, and diaminonitrotoluenes under anoxic or anaerobic conditions. During the sequential reduction via hydroxylamino- and nitroso derivatives [5], the compounds may bind to themselves to form tetranitroazoxytoluenes [6] or may be sequestered [9,10]. Although detected as intermediates during composting, the tetranitroazoxytoluene compounds were not detectable at the end

of most remediation processes [6,11]. In the further course of reduction, the diaminonitrotoluenes may be reduced to triaminotoluene as shown in strictly anaerobic liquid cultures [12,13].

Trinitrotoluene and its reduced metabolites are highly reactive compounds [6,10,14] that undergo various reactions with humic constituents forming amide or imine bonds, heterocyclic structures, or even azo moieties [15–17]. Composting techniques [6,12,18] support the reactivity by adding large amounts of reactive organic substrates. Diaminonitrotoluenes are particularly prone to react with hydroxylated aromatic structures in humic substances, as shown in reactions with the oxidative enzymes peroxidase or laccase [9,16,17]. After reduction of at least one nitro group, TNT transformation products were incorporated into soil organic matter [6,16,17]. Mineralization in soil was generally found to be negligible [1,11], and radiolabeled carbon from <sup>14</sup>C-TNT remained in soil as nonextractable residues. The formation of bound residues is a well-known process and is described in several reviews [19]. The concept of binding or controlled humification to create nonextractable residues during treatment of contaminated soil has been proposed by many authors for various xenobiotics, such as TNT, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pesticides [9,10,20–24]. The approach has been applied by several scientists [1,25,26] and the process demonstrated for TNT by composting contaminated soil with additives such as molasses [25,27,28]; poultry dung [20]; glucose or sucrose [21,29,30]; acetate, citrate, succinate, and malic acid [28]; postcompost mixtures [11,25,31]; and ligninolytic fungi [1,32].

The main matrix for the binding processes is the macromolecular fraction of soil organic matter (humic substances). Covalent bonds between TNT or metabolites and soil organic

\* To whom correspondence may be addressed (matthias.kaestner@ufz.de).

matter are considered to be stable as long as humic substances remain stable [23], and thus the use of easily degradable carbon sources under anaerobic conditions with a subsequent aerobic humification phase forms the strategy for most bioremediation processes [12,20,26,27,31]. However, no information about definite molecular structures of the residues is available at present. Relatively little information exists regarding long-term stability of residue products from the bioremediation of  $^{14}\text{C}$ -TNT in soil [6,21]. The few published data for single  $^{14}\text{C}$ -TNT bioremediation processes indicate that only a slight potential exists for mobilization of residue products from  $^{14}\text{C}$ -TNT in soil.

The goal of the present work was to use an empirical approach to evaluate the long-term stability of nonextractable residues derived from microbial degradation of  $^{14}\text{C}$ -labeled TNT in bioremediated soils. Soils containing TNT residues from biodegradation were obtained from earlier research that evaluated the efficacy of various bioremediation processes used in pilot-scale systems in Germany [33]. Residue mobilization potential was assessed for these soils by subjecting them to various physical, chemical, and biological treatment in order to simulate environmental conditions thought to maximize their mobilization.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals

All chemicals except for those specified were purchased in >98% purity grade from Merck (Darmstadt, Germany) and Sigma Aldrich (Deisenhofen, Germany). Radiolabeled [ $^{14}\text{C}$ ]-TNT with a specific activity of 30 mCi/mmol was obtained from W. Fels (University of Paderborn, Paderborn, Germany).

### Soil

Soil samples stemmed from a former production site, Werk Tanne in Clausthal-Zellerfeld, Germany, that has been contaminated with TNT and its intermediates for about 50 years. The soil from the surface (~70 cm depth) was collected and homogenized for a pilot-scale treatment. This material was brought to the laboratory, sieved (<2 mm), and stored at 4°C. The contamination of the soil amounted to  $1,193 \pm 423$  mg TNT,  $81 \pm 4$  mg 4-amino-2,6-dinitrotoulene, and  $53 \pm 3$  mg 2-amino-4,6-dinitrotoulene/kg soil (dry wt). The carbon content was 13.7%, the lime content 2.2%, and the pH 7.4. The mineral fractions of the resulting anthropogenic soil on greywacke were 47.5% sand, 39.7% silt, and 12.8% clay.

### Organisms and culture conditions

The fungus *Stropharia rugosoannulata* with the ability to mineralize TNT (7) was used for the bioremediation of TNT-contaminated soil. For inoculation of soil treatments, *S. rugosoannulata* (11372, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, Germany) was preincubated on oatseeds and then transferred to autoclaved wheat straw (70% water content) in sterilized bags sealed with cotton plugs. The mycel formed on the straw was applied in layers between the soil in the reactors for bioremediation of the  $^{14}\text{C}$  TNT.

Four organisms were used in the mobilization experiments: *Nematoloma frowardii* (11239, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen), *Bijerkandera adusta* (Institute of Microbiology, University of Jena, Germany), *Trametes versicolor* (11269, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen), and *S. rugosoannulata* (see previous discussion). The organisms were grown on malt agar plates at 20°C and then transferred

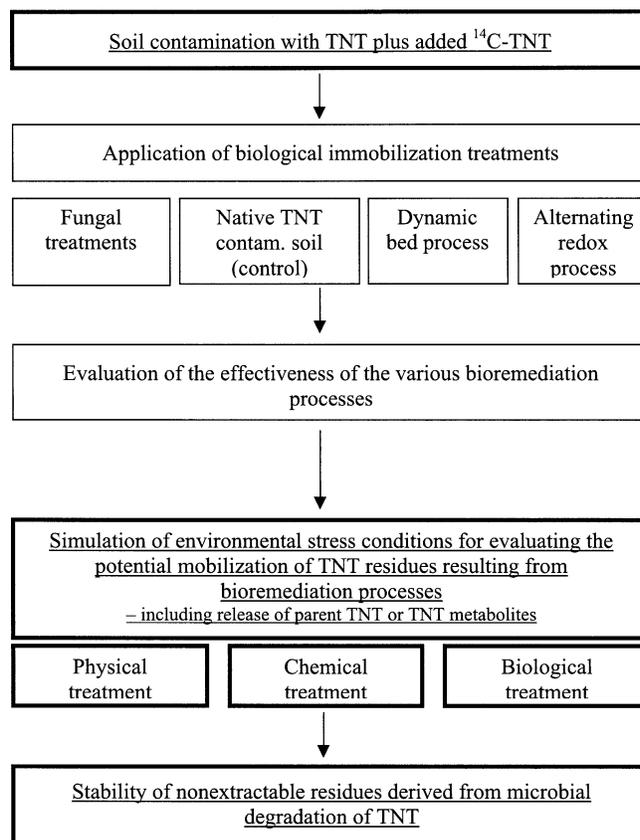


Fig. 1. Experimental scheme for determining nonextractable residues from different bioremediation processes.

to 25 ml nitrogen-sufficient medium [34] in 250-ml vessels and incubated for 12 d at 24°C in the dark. After a mycelium had grown on the surface, the cultures were each induced with 50 mg/L of inductor compounds to stimulate the formation of ligninolytic enzymes: *S. rugosoannulata* and *N. frowardii* with  $\text{MnSO}_4$  for manganese peroxidase (MnP), *B. adusta* with veratryl alcohol for lignin peroxidase, and *T. versicolor* with 2,5-xylidine for laccase (Lac) [7]. After 12 d of incubation, the cultures were used for the mobilization experiments.

### Bioremediation treatments of $^{14}\text{C}$ -labeled TNT in soil

**Experimental design.** Soil from a site contaminated with TNT ( $^{14}\text{C}$ -labeled TNT added) was subjected to four bioremediation processes resulting in TNT residue formation (Fig. 1). These bioremediation processes [33] included a fungal treatment process [1] with native TNT-contaminated soil as control; a dynamic bed process [11,12] that involved anaerobic composting with addition of sugar beet and chopped straw, changed after 35 d to aerobic maturation conditions (63 d); and an alternating redox process that involved aerobic/anaerobic composting (93 d) with addition of sucrose-containing agricultural wastes and poultry dung under non-water-saturated conditions [20], with redox changes analogous to the previously published soil slurry process [6,10,29].

The soil for the fungal treatment process was prepared by spiking the soil with 8.5 g radiolabeled TNT per kg soil (dry wt) for analyses of mass balance and carbon distribution. The radiolabeled TNT was mixed into the native TNT-contaminated soil to obtain a specific activity of 81  $\mu\text{Ci}/\text{kg}$  soil (dry wt). The water content was adjusted to 30% (wt/wt; 60% of

water-holding capacity). For aging of the added TNT, the soil was stored for four weeks at 4°C. Two kilograms of soil were incubated by an aerobic process in soil bioreactors of 5.7-L volume [24]. Wheat straw containing *S. rugoso-annulata* was mixed into the soil in the reactor as 5-cm layers inserted between three 10-cm layers of  $^{14}\text{C}$ -TNT-contaminated soil. A similar reactor was operated without fungal inoculation in order to evaluate the immobilization by the indigenous microflora in the native TNT-contaminated soil. The bioreactors were operated for 176 d as closed systems with wet aeration flow of 32 ml/min and temperature control (18°C). The final concentration of TNT in the soil used for the treatment study after the addition of radiolabeled TNT was 8.2 g/kg soil.

After the TNT bioremediation process in the reactors, 100 g (dry wt) of each soil were preextracted with 200 ml methanol to reduce the background of soluble radiolabeled TNT or metabolites in order to have similar levels of nonextractable residues in comparison to the soil from the other processes. The soils treated by the other processes were spiked in a similar way [11,20,35] and were provided for the following experiments.

#### Mobilization experiments

**Physical and chemical mobilization.** Several types of physical treatments were performed to assess mobilization of residual TNT or its transformation and degradation products in soil. They were applied in order to simulate natural impacts on soil and its constituents, which may release or destroy immobilized TNT or metabolites. The first physical treatment was a simulation of natural freezing and thawing cycles within soil, as a procedure for liberating residual TNT or its metabolites. The water contents of the soils were adjusted to 50% of water saturation. Forty grams of each residue-containing soil were placed in each of two closed 100-ml flasks as duplicates, which were exposed to alternating 24-h periods of -20°C and 40°C for a period of one month. During the next month, the cultures were incubated at a constant 22°C. The treatment procedure was repeated once again. Two controls were carried out in parallel and stored at 22°C. The vessels were flushed with ambient air (3.5 volume exchanges) twice a week;  $^{14}\text{CO}_2$  was absorbed in Opti-Fluor/Carbosorb (Cannerra-Packard, Dreieich, Germany) and measured by  $\beta$ -scintillation counting.

The second type of physical treatment involved mechanical destruction of soil aggregates, performed in an S1 grinding mill (Retsch, Haan, Germany) containing 120 g of soil (dry wt) in a 500-ml vessel with three zircon balls (2.5-cm diameter) for 30 min at 75 rpm. To investigate the maximum amount of water-leachable compounds in a fast and simple way, two different extractions with high volumes of water were performed. A steam extraction was carried out in a commercial solid-sample extractor (Europicola-professionel, LaPavoni, San Giuliano, Italy). This experiment was applied to simulate a maximum of water leaching. Ten grams of soil (dry wt) were extracted with approximately 120 ml of steam at 1 bar pressure. The fine clay portion washed out from the soil by the procedure was analyzed after centrifugation. In addition, an acid rain extraction was performed analogous to U.S. Environmental Protection Agency protocol SW-846 [36]. The water used for extraction was acidified with nitric and sulfuric acid (2:3; v: v) to pH 5. Two grams of each of the treated soils was extracted with 40 ml of acidified  $\text{H}_2\text{O}$  in 50-ml Falcon tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Ten sequential extrac-

tions were conducted: Each tube was shaken for 24 h at 22°C in a reciprocal shaker at 120 cycles/min and then centrifuged. Controls were carried out using deionized water at pH 6.4. To eliminate suspended matter, the supernatants were passed through a 0.45- $\mu\text{m}$  nylon filter, and the filtrate was analyzed for radioactivity. Physical treatments were performed in triplicate.

Chemical mobilization treatment was conducted by extracting the soil with the complexing agent EDTA in order to estimate the effects of bivalent cations on the aggregation of macromolecular organic compounds and for potentially releasing entrapped TNT metabolites [37]. Duplicate samples of 2 g of soil (dry wt) were extracted in 15-ml Hungate tubes (Bellco International, Asbach, Germany) with 12 ml  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  solutions of 0.01, 0.025, and 0.05 M. After treating the soils with EDTA, the samples were then extracted with 12 ml of deionized water. During each extraction step, the tubes were sonicated for 30 min at 35 KHz in a water bath (Schmidtbauer, Singen, Germany). Both extracts were combined and analyzed; the results are presented in the data tables as the percentages of residual activity present as water-extractable  $^{14}\text{C}$ -labeled compounds.

**Biological mobilization.** Experiments with ligninolytic fungi were carried out on the soil samples processed with the grinding mill as described previously. Twenty-five milliliters of 12-d-old liquid cultures containing mycelia of either *S. rugoso-annulata*, *N. frowardii*, *B. adusta*, or *T. versicolor* were each added to 7.5 g (dry wt) of the milled soils in 250-ml vessels. The cultures were carefully transferred in order to keep the mycelia on the surface, not contaminated with the soil slurry. Two nested glass tubes were placed in the vessels, the inner one filled with 5 ml 2-N potassium hydroxide (KOH) to adsorb  $^{14}\text{CO}_2$ . The vessels were then closed and incubated for 42 d. Twice a week, the KOH tubes were exchanged and the atmosphere in the vessels was purged with oxygen to maintain aerobic conditions. In addition to ligninolytic fungi, mature garden compost (20% volume percentage) was applied under similar conditions; nontreated residue-containing soil was used as control. All cultures were set up in duplicates.

The effects of ligninolytic and oxidative plant enzymes on the mobilization of the residues was investigated using isolated Lac of *T. versicolor*, MnP of *S. rugoso-annulata*, and horseradish peroxidases (HRP). These enzymes are known to depolymerize humic substances, and they can be expected to metabolize the nonextractable residues. To enhance the oxidative strength of the enzyme reaction, the mediators 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate (ABTS), MnCl<sub>2</sub>, and reduced glutathione were added to the mixtures. A set of glass tubes each contained  $1 \pm 0.01$  g of milled soil in a 5-ml reaction buffer plus one of the following reaction mixtures. For investigating the mobilization of the residual TNT-C by *T. versicolor*, we used a 200-mM citrate-phosphate buffer (pH 4.2) with 50 U Lac (JenaBios, Jena, Germany) and 25  $\mu\text{mol}$  ABTS. For the investigations on *S. rugosoannulata*, we used a 200-mM sodium-malonate buffer (pH 4.2) with 54 U MnP, 10  $\mu\text{mol}$  MnCl<sub>2</sub>, 20  $\mu\text{mol}$  glutathione, and 6.25  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . For the HRP investigations, we used a 200-mM citrate-phosphate buffer (pH 6.8) with 6 U HRP (Sigma Aldrich), 25  $\mu\text{mol}$  ABTS, and 4  $\mu\text{mol}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . After shaking on a reciprocal shaker at 120 cycles/min at room temperature for 24 h, the  $^{14}\text{C}$  distribution was quantified. All mixtures were made in triplicate.

Finally, monocotyledenous and dicotyledenous plants were examined with respect to their ability to incorporate or mo-

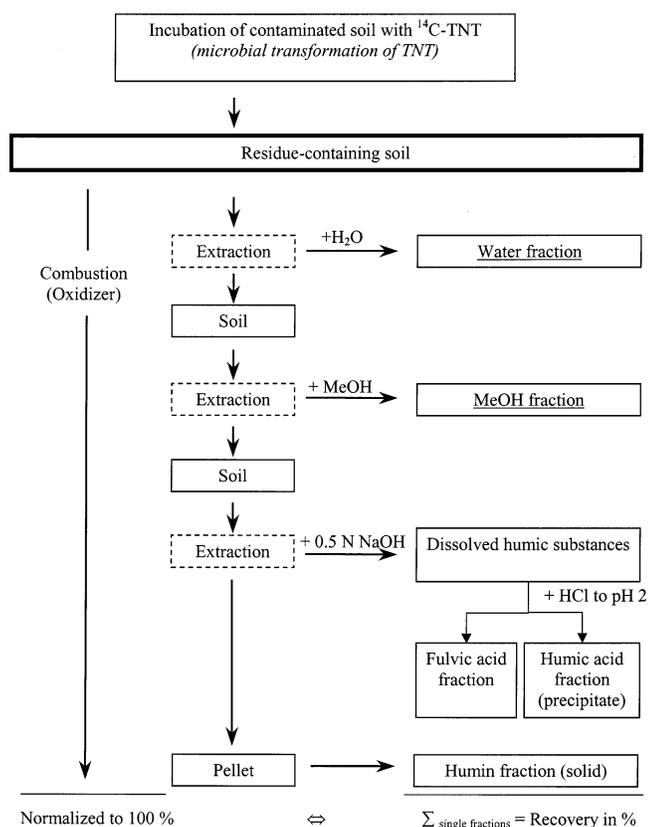


Fig. 2. Extraction scheme for bioremediated soils containing  $^{14}\text{C}$ -2,4,6-trinitrotoluene (TNT) residues. MeOH = methanol; NaOH = sodium hydroxide.

bilize the residues. The plants were grown in 40 g (dry wt) of residue-containing soil in a greenhouse under natural light (summer daylight conditions with  $\sim 14$  h sunlight). Four bush beans (*Phaseolus vulgaris*), 10 radishes (*Raphanus sativa*), and 400 mg of rye grass (*Lolium perenne*) seeds, each species grouped, were planted into the soil in bottomless plastic containers on a fiber mat (10-cm diameter, 3-cm height). Water was added to the mat to keep it moist in order to simulate the water-holding capacity within the soil. After 28 d, the plants were harvested, washed with water and methanol, and dried overnight at  $50^\circ\text{C}$ . The biomass was combusted in an oxidizer for radio analysis.

#### Analytical procedures

The general scheme of extractions and analysis is presented in Figure 2. For analysis of the carbon distribution in the soil fractions, triplicate sets of samples (4 g, dry wt) were first extracted with 10 ml deionized  $\text{H}_2\text{O}$  in Hungate tubes (Bellco International) [38]. The tubes were sonicated for 15 min at 35 KHz in an ultrasonic water bath (Schmidbauer) and centrifuged; the supernatant was then analyzed for radioactivity and organic compounds. The second extraction entailed sonicating the soil in 10 ml MeOH and was repeated two further times for a total of three sequential extractions. After drying of the extracted soil at  $22^\circ\text{C}$  for 12 h, three sequential alkaline extractions each with 20 ml of 0.5-N NaOH followed in order to dissolve humic acids. Fulvic and humic acids in the supernatant were separated by precipitating the humic fraction using 1.5 ml concentrated HCl to bring the solution to pH 2. The pellet containing the humin fraction was then dried at  $50^\circ\text{C}$ .

The  $^{14}\text{C}$  radioactivity in all liquid fractions was determined by liquid  $\beta$ -scintillation counting. Solid fractions were dried and combusted for  $^{14}\text{C}$  radiometric analysis.

Solubilized residues in the supernatant extraction solutions were examined by thin-layer chromatography (TLC) using silica gel plates (10  $\times$  20 cm, Silica gel Si 60, Merck) in order to determine whether TNT or its metabolites were present. The mobile phase consisted of petrolether and isomethylbutylketone at a ratio of 85:15. Peak identification was carried out at 254 nm with reference compounds.

Radioactivity on the TLC plates was determined using a TLC linear analyzer (LB Multitracemaster 20, Berthold SGE, Bad Wildbad, Germany) with standard deviations  $< 5\%$ . Solid samples were combusted in an oxidizer (OX 500, Zinsser-Analytik, Frankfurt, Germany) at  $900^\circ\text{C}$ . The  $\text{CO}_2$  from the oxidation was absorbed in Oxysolve 400 scintillation liquid (Zinsser-Analytik) and was analyzed by  $\beta$ -scintillation spectroscopy. Calibration was performed using  $^{14}\text{C}$ -labeled TNT on quartz sand, and the resulting standard deviations for these measurements were  $< 3\%$ .

Depending on which experimental design was used,  $^{14}\text{CO}_2$  was either discontinuously absorbed from a gas stream by a two-step trapping system (Opti-Fluor, 6 ml) or absorbed continuously within the culture vessels by 5 ml of 2-N KOH in an open tube. Radioactivity in liquid samples was quantified by  $\beta$ -scintillation spectroscopy (LS 6500 Beckman, Fullerton, CA, USA). All determinations of trapped  $^{14}\text{C}$ -labeled  $\text{CO}_2$  were performed in triplicate analyses, using 10 ml per sample of the appropriate scintillation fluid (Opti-Fluor for aqueous phases near neutral pH; UltimaGold for organic, alkaline, and acid samples; Packard Instruments, Dreieich, Germany).

#### Statistics

All radiometric samples were analyzed in triplicate by  $\beta$ -scintillation spectroscopy, and the analyses were performed using quench correction plus external standardization for samples with color. Mean values were calculated, resulting in relative standard deviations  $< 5\%$  (for samples without intense coloration). For highly colored extracts, standard addition analysis was performed, yielding relative standard deviations  $< 8\%$ . The significance of the possible mobilization of radioactivity was determined using the paired  $t$  test method for independent samples ( $n = 3$ ). The  $H^0$  hypothesis was that no mobilization effects would occur following soil remediation treatment. The significance level used for  $\alpha$  was 0.05. Only when the critical  $t$  value was  $> 2.78$  (quantile  $t_{4,0.975}$ ),  $H^0$  was rejected and  $H^{\text{alt}}$  assumed, indicating a significant effect of the respective treatment. Statistically significant changes in the distribution of  $^{14}\text{C}$  are printed underlined in the Tables 1 through 6.

## RESULTS

For evaluating the fate and the stability of nonextractable residues after bioremediation, different approaches (physical, chemical, and biological treatment) were applied in order to simulate environmental conditions that may cause mobilization of such residues in the long run. The three examined soils varied in their amount of TNT-derived residues depending on the different immobilization techniques as represented in Table 1.

Physical treatment of the native TNT-contaminated soil and the bioremediated soils did not result in greater mobilization of the  $^{14}\text{C}$  label (Table 2). After the soil freeze and thaw treatments, less than 0.5% of the total residual radioactivity was

Table 1. Average distribution of the radioactivity in soil fractions after various bioremediation processes

	Residual $^{14}\text{C}$ radioactivity (%)			
	Control soil <sup>ab</sup>	Fungal treatment <sup>a</sup>	Dynamic bed process	Alternating redox process
Extractable				
H <sub>2</sub> O	10	7	4	5
Methanol	19	26	4	2
Nonextractable residues				
Fulvic acid	13	11	15	3
Humic acid	26	29	40	46
Humin fraction	32	27	37	44
$\Sigma$ residues	71	67	92	93
Present activity Bq/kg (dry wt)	625	1,350	140	2,300
TNT equivalents <sup>c</sup> mg/kg (dry wt)	900	2,100	4,900	4,900

<sup>a</sup> Relative standard deviations were <5%.

<sup>b</sup> Control soil is the native trinitrotoluene (TNT)-contaminated soil.

<sup>c</sup> Bound 2,4,6-TNT equivalents at the end of the treatment processes.

converted to  $^{14}\text{CO}_2$ . At the end of the experiment, the only significant shift in the distribution of radioactivity was the increase of radioactivity in steam-extractable soluble fractions observed in both the fungal-treated soil and the native TNT-contaminated soil (control). Grinding the soil did not produce significant changes of the distribution of the radioactivity in the native TNT-contaminated soil or in any of those that were bioremediated. Thus, the physical treatments of previously bioremediated soil did not cause a significant mobilization effect on TNT residues except by steam extraction. This was underlined by the statistical tool *t* test, which showed *t* values below the limit of <2.78 in each soil fraction, supporting the  $H^0$  hypothesis of no mobilization effect (for details, see the previous discussion).

Only the steam extraction shifted approximately 29% of the radioactivity into the aqueous phase of the soil from the fungal treatment process (Table 2). In the native TNT-contaminated soil, the shift was even higher (~52%), and a few percent of mobilized residues were related to fine particles. Analogous effects at a lower level (15–18%) were observed in the soils from the dynamic bed and alternating redox processes. The critical *t* values of the water-soluble fractions as well as of the humic acids fractions were 4.30, which indicated a significant effect of this mobilization procedure. However, after a few days, the clear, yellow-brownish supernatant flocculated; this macromolecular precipitate contained more than 92% of the formerly measured radioactivity. As shown for the fungal-treated soil, the amount of radioactivity in the humin fraction increased, while that in the methanol extract decreased. With the exception of the native TNT-contaminated soil, the high temperature of steam extraction led to increased amounts of radioactivity in the humins. However, no evidence for increasing residual TNT or metabolites was found during steam extraction. The mobilized  $^{14}\text{C}$  radioactivity could not be separated by TLC under the conditions applied and remained at the origin ( $R_f < 0.1$ ), whereas TNT, aminonitrotoluenes, and diamonitrotoluenes have  $R_f$  values >0.4. The data led to the conclusion that the increased extractable radioactivity was caused by low-molecular-weight breakdown products of polymeric humic fractions.

Chemical treatment of the residue-containing soil by acid rain extraction showed an increased amount of radioactivity in the water-extractable fraction at the expense of the methanol fraction and the humic or fulvic acid fractions (Table 3). The

effect was much higher in the native TNT-contaminated soil (~47%) than in the fungal-treated soil (~33.5%), where even the  $^{14}\text{C}$  radioactivity in the humin fraction decreased slightly. The critical *t* values in the water and the humin fraction were >2.8, indicating significant mobilization. However, a modified protocol with deionized water showed similar results. In soil from the alternating redox remediation process [20], acid rain caused 27% mobilization in the water leachate, whereas 20 to 35% mobilization was found in the leachate of the soil from the dynamic bed process [33]. Intense leaching (200 ml H<sub>2</sub>O/g soil) may have caused this mobilization effect, indicating that the results from the steam extraction may be more directly related to the amount of water than to the temperature. As found with the steam extraction, no release of TNT or metabolites could be observed in the supernatants; the mobilized radioactivity could not be eluted on TLC plates ( $R_f < 0.1$ ).

Increasing concentrations of EDTA (Table 3), which is considered to deaggregate humic molecules because of complexing bivalent metal cations, resulted in significantly increasing amounts of radioactivity in the water extracts of the control soil up to 12% (critical *t* values = 3.18 for 0.05 M EDTA). For the fungal-treated soil, the EDTA exposure had no significant effect (the critical *t* values were 2.77 for 0.05 M EDTA). Slightly increasing  $^{14}\text{C}$  radioactivity in methanol extracts was also observed but without significance for either soil. The  $^{14}\text{C}$  radioactivity in the fulvic and humic acids and humin fractions decreased slightly but not significantly, except for the humin fraction soil of the native TNT-contaminated soil. The EDTA-treatment data for soil from the alternating redox bioremediation process [20] amounted to >25% mobilization into the water fraction and to 22% mobilization for soil from the dynamic bed bioremediation process [33]. Thus, high amounts of water or metal complexing agents can cause a significant mobilization of the residual radioactivity. However, even with this treatment, no increase of parent TNT or metabolites could be detected by TLC.

Ligninolytic fungi that generate radicals by oxidative enzymes are involved in the turnover of humic substances [23], so we investigated their potential for mobilizing TNT residues in soil that were nonextractable with methanol. In addition, compost was applied under the same conditions, and nonsupplemented TNT-remediated soil was used as a control. Such biological treatment of the residue-containing soil resulted in slight but significant changes in the  $^{14}\text{C}$  partitioning between

Table 2. Distribution of the  $^{14}\text{C}$  radiolabel after physical treatments of bioremediated soils containing trinitrotoluene (TNT) residues; MeOH = methanol

	Residual $^{14}\text{C}$ radioactivity (%) <sup>a</sup>					
	Freeze/thaw		Grinding mill		Stream extraction	
	-	+	-	+	-	+
Fungal treatment						
Extractable						
H <sub>2</sub> O	2.1	1.8	6.5	6.5	6.5	35.4 <sup>b</sup>
MeOH	17.3	19.1	25.6	25.9	25.4	9.0
Nonextractable residues						
Fulvic acid	10.8	9.0	—	—	10.4	4.9
Humic acid	29.7	24.5	—	—	30.1	2.5
Humic fraction	38.1	39.6	—	—	27.2	37.9
Σ residues	78.6	73.1	67.8 <sup>c</sup>	68.8 <sup>c</sup>	67.9	45.3
Recovery	98.0	94.0	99.9	101.2	99.8	89.7
Native TNT-contaminated soil						
Extractable						
H <sub>2</sub> O	5.8	4.0	9.9	8.8	9.8	61.4 <sup>d</sup>
MeOH	19.6	15.0	19.2	16.9	18.7	1.9
Nonextractable residues						
Fulvic acid	15.2	15.8	—	—	13.0	4.4
Humic acid	24.8	20.8	—	—	26.1	2.5
Humic fraction	50.2	54.3	—	—	32.0	28.3
Σ residues	90.2	90.9	71.89 <sup>c</sup>	74.7 <sup>c</sup>	71.1	35.2
Recovery	115.6	109.9	101.9	100.4	99.6	98.5
Dynamic bed process						
Extractable						
H <sub>2</sub> O			4.5	5.6	3.9	15.0 <sup>e</sup>
MeOH			4.3	4.6	4.0	2.0
Nonextractable residues						
Fulvic acid			—	—	15.0	0.2
Humic acid			—	—	39.8	21.2
Humic fraction			—	—	37.0	60.5
Σ residue			87.5 <sup>c</sup>	87.1 <sup>c</sup>	91.8	81.9
Recovery			96.3	98.3	99.7	98.9
Alternating redox process						
Extractable						
H <sub>2</sub> O			5.5	7.0	5.0	18.0 <sup>f</sup>
MeOH			1.6	0.6	2.0	2.2
Nonextractable residues						
Fulvic acid			—	—	3.2	1.1
Humic acid			—	—	46.2	25.0
Humic fraction			—	—	44.5	54.0
Σ residues			92.8 <sup>c</sup>	94.4 <sup>c</sup>	93.9	80.1
Recovery			99.9	102.0	100.9	100.3

<sup>a</sup> - = control; + = with treatment.

<sup>b</sup> 2.5% found as fine particles.

<sup>c</sup> Measured as summarized parameter.

<sup>d</sup> 11% found as fine particles.

<sup>e</sup> 1% found as fine particles.

<sup>f</sup> 3% found as fine particles.

the extractable fraction and the nonextractable residues fraction (Table 4). Ligninolytic fungi in general caused a statistically significant but low mineralization of the residues of <2.7%. In the soil from the fungal treatment, only *B. adusta* and *N. frowardii* caused a significant decrease of the humin fraction up to 14%. The most significant changes were observed in the native TNT-contaminated soil. Compost, *N. frowardii*, and *T. versicolor* caused an increase of radioactivity in the humin fraction of up to 18.5%. An increase in the water and methanol extractable fractions of the untreated soil (up to 13.9%) was observed with *N. frowardii*, *S. rugosoannulata*,

and *T. versicolor*. A slight decrease of residual radioactivity on the soil humin fraction from the dynamic bed process was found with all fungi, whereas this effect was only found with *B. adusta* and *T. versicolor* in the soil from the alternating redox process. However, in soil bioremediated by the alternating redox process, a slight increase in the water fraction was observed after exposure to the fungi. According to the *t* test, significant mobilizations into the water and methanol fractions were caused by *T. versicolor* in the control soil, by *S. rugosoannulata* and *N. frowardii* in the fungal-treated soil, and by *S. rugosoannulata* and by all fungi in the soil treated

Table 3. Distribution of the <sup>14</sup>C radiolabel after chemical treatments of bioremediated soils containing trinitrotoluene (TNT) residues; MeOH = methanol

	Residual <sup>14</sup> C radioactivity (%)						
	Acid rain			[EDTA] <sup>a</sup>			
	–	H <sub>2</sub> O	Acid rain	–	0.01	0.025	0.05
Fungal treatment							
Extractable							
H <sub>2</sub> O	6.5	39.3	40.1	11.6	15.6	19.2	22.2
MeOH	25.6	6.3	6.5	16.4	20.1	22.3	21.0
Nonextractable residues							
Fulvic acid	10.6	3.4	3.5	4.6	4.0	3.7	3.4
Humic acid	28.0	19.3	22.7	27.8	24.9	25.6	23.3
Humic fraction	27.2	31.3	26.2	26.1	25.6	26.0	25.1
Σ residues	65.8	54.0	52.4	58.5	54.5	55.3	51.8
Recovery	97.9	99.6	99.0	86.8	90.1	96.9	95.0
Native TNT-contaminated soil							
Extractable							
H <sub>2</sub> O	9.9	56.8	57.8	27.0	31.9	35.8	39.2
MeOH	18.2	3.5	3.5	24.0	24.5	26.8	27.5
Nonextractable residues							
Fulvic acid	12.8	3.5	3.4	4.9	5.0	4.5	4.5
Humic acid	26.6	12.4	15.2	23.0	24.6	23.2	22.2
Humic fraction	31.8	22.2	20.1	31.4	23.6	25.4	19.4
Σ residues	71.2	38.1	38.7	59.3	53.2	53.1	46.1
Recovery	99.2	98.4	100.0	110.2	109.6	115.7	112.8

<sup>a</sup> EDTA = ethylenediamine-tetraacetate.

with alternating redox bioremediation processes plus compost addition. According to the *t* test, no significant mobilization effects were found in the soil treated with the dynamic bed bioremediation process.

Experiments with isolated radical-generating enzymes of plants (HRP) and fungi (MnP and Lac) showed different results (Table 5). Horseradish peroxidases did not significantly change the partitioning in any soil. Laccase slightly increased the water-extractable <sup>14</sup>C radioactivity both in the soil from the dynamic bed bioremediation process (13.9%) and in that from the alternating redox bioremediation processes (4.5%), and both *t* values were 3.18, indicating significance. The native TNT-contaminated soil and the soil from the fungal treatment were not significantly affected by HRP or Lac. The data clearly show that humic acid-degrading, radical-generating ligninolytic fungi and even relatively high concentrations of such enzymes generally were not able to mobilize high amounts of the residual <sup>14</sup>C radioactivity from biogenically formed TNT residues.

Finally, monocotyledonous and dicotyledonous plants were examined for their ability to incorporate or mobilize <sup>14</sup>C radioactivity from the soils containing <sup>14</sup>C-TNT residues from bioremediation treatments (Table 6). The experiments show that the uptake by plants was very low (Table 6). Bush beans (*P. vulgaris*) showed 2.6% uptake of <sup>14</sup>C radioactivity into biomass after germination and growth for 28 d in the native TNT-contaminated soil, with rye grass (*L. perenne*) and radish (*R. sativa*) each incorporating 1.7%. In the soil from the fungal treatment, the amounts of <sup>14</sup>C radioactivity incorporated into biomass were found to be between a quarter and a third of these values. In soils from the dynamic bed and alternating redox bioremediation processes, only between 0.02 and 0.3% of the <sup>14</sup>C radioactivity was incorporated into the plant biomass. All plants showed the highest enrichment of <sup>14</sup>C radio-

activity within the roots, followed by stems and leaves. According to *t* tests, no significant mobilization or changes in partitioning of the <sup>14</sup>C residues were observed during growth of the plants, except for the <sup>14</sup>C incorporated into biomass and two <sup>14</sup>C radioactivity values for water-soluble fractions.

## DISCUSSION

Since high amounts of TNT-derived <sup>14</sup>C remained in soil after effective microbial transformation of <sup>14</sup>C-TNT, the goal of the present work was to evaluate whether environmental factors or humus turnover may mobilize <sup>14</sup>C-labeled residues and release TNT or metabolites. This study investigates the stability of TNT residues derived from different bioremediation processes for TNT-contaminated soils. The TNT residues, nonextractable by methanol, that were incorporated into the humic fraction by the bioremediation processes were highly resistant to mobilization by physical, chemical, and biological treatments designed to simulate harsh environmental conditions. Neither physical treatment (e.g., grinding of soil or cyclic freezing and thawing) nor chemical methods (e.g., incubation with complexing agents) caused a mobilization of the residues of more than 15%. No release of TNT, hydroxylamino-dinitrotoluenes, azoxyderivates, aminodinitrotoluenes, or diaminonitrotoluenes was detected in these experiments. Presumably, sorbed TNT or its reduced metabolites should have been detected in the water-based extracts if these compounds were the dominant species of the residues after the bioremediation processes. It is highly probable that simple physical sequestration would have led to release of <sup>14</sup>C radioactivity due to the presence of trapped <sup>14</sup>C-TNT or its <sup>14</sup>C metabolites. Thus, simple physical sequestration of the parent compounds or its metabolites is not very likely to be the dominant process for the formation of residues nonextractable by methanol.

As shown for several compounds, aging of aromatic xe-

Table 4. Distribution of the  $^{14}\text{C}$  radiolabel after biological treatment of bioremediated soils containing trinitrotoluene (TNT) residues—effects of ligninolytic fungi: *Bijerkandera adusta* (*B. adusta*), *Nematoloma frowardii* (*N. frowardii*), *Stropharia rugosoannulata* (*S. rugosoannulata*), and *Trametes versicolor* (*T. versicolor*); MeOH = methanol

	Residual $^{14}\text{C}$ radioactivity (%)					
	Control	Compost	<i>B. adusta</i>	<i>N. frowardii</i>	<i>S. rugosoannulata</i>	<i>T. versicolor</i>
Fungal treatment						
CO <sub>2</sub>	0.3	0.7	0.5	0.9	1.1	1.0
Extractable						
H <sub>2</sub> O	1.3	0.8	1.8	1.6	2.5	1.4
MeOH	5.4	3.2	5.4	5.8	5.6	5.5
Nonextractable residues						
Fulvic acid	3.0	2.8	2.9	3.5	2.9	3.1
Humic acid	32.1	29.8	34.1	35.9	36.1	37.4
Humin fraction	62.0	63.2	48.1	47.2	57.2	65.0
Σ residues	97.1	95.8	85.1	86.6	96.2	105.5
Recovery	104.1	100.5	92.8	94.9	105.4	113.4
Native TNT-contaminated soil						
CO <sub>2</sub>	0.3	0.7	1.0	2.7	1.3	1.8
Extractable						
H <sub>2</sub> O	1.0	0.2	0.9	5.1	5.5	3.0
MeOH	3.9	2.2	5.1	8.6	12.3	8.3
Nonextractable residues						
Fulvic acid	2.0	1.3	1.7	1.7	1.7	1.6
Humic acid	35.0	27.0	37.2	31.7	33.3	36.7
Humin fraction	48.8	67.3	51.4	55.3	46.3	56.4
Σ residues	85.8	95.6	90.3	88.7	81.3	94.7
Recovery	91.0	98.7	97.3	105.1	100.4	107.8
Dynamic bed process						
CO <sub>2</sub>	0.4	0.3	0.5	0.2	0.3	0.3
Extractable						
H <sub>2</sub> O	1.0	0.0	1.0	0.8	1.1	0.0
MeOH	2.7	1.5	2.0	1.8	2.1	1.7
Nonextractable residues						
Fulvic acid	9.5	6.5	7.8	8.9	4.5	9.0
Humic acid	34.6	35.3	36.4	35.5	35.2	36.9
Humin fraction	45.7	43.6	36.1	41.5	39.1	40.5
Σ residues	89.8	85.4	80.3	85.9	78.8	86.4
Recovery	93.9	87.2	83.8	88.7	82.3	88.4
Alternating redox process						
CO <sub>2</sub>	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.4
Extractable						
H <sub>2</sub> O	0.9	1.9	2.5	2.7	1.9	3.0
MeOH	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Nonextractable residues						
Fulvic acid	1.6	1.5	1.4	1.6	1.4	1.3
Humic acid	41.9	39.0	44.6	40.1	45.2	45.9
Humin fraction	54.5	54.2	45.6	53.2	52.3	47.0
Σ residues	98.0	94.7	91.6	94.9	98.9	94.2
Recovery	99.6	97.3	94.8	98.3	101.6	98.1

nobiotics in soil generally leads to decreasing bioavailability and increasing resistance to extraction, which is attributed to sequestration into humic matter [39]. Other authors have found that after rigid extraction procedures such as silylation, these compounds may be released and detected [21]. Silylation agents such as trimethylchlorosilane replace active hydrogen atoms in functional groups such as carboxy, hydroxy, amino, or thiol groups. This leads to a deactivation of target positions for binding and to a minimum of entrapment. After 8 d of anaerobic treatment in the slurry-phase process, approximately 40% of the initial  $^{14}\text{C}$  radioactivity from labeled TNT was bound to the organic matrix of the soil. Using silylation procedures, more than half of these nonextractable residues were

released and were identified by TLC as TNT and aminodinitrotoluenes, whereas after 82 d with extended anaerobic incubation, none of the extracted  $^{14}\text{C}$  radioactivity could be eluted in a similar TLC ( $R_f < 0.1$ ) [21]. Others have found that reduced TNT metabolites were released by hydrolysis from fresh composts, whereas this effect was not observed after maturation of the composts [40]. This finding seems to show a general trend for aromatic xenobiotic compounds [12,26,29]. The application of solid-state  $^{15}\text{N}$ -NMR spectroscopy to  $^{15}\text{N}$ -TNT-spiked soil from the dynamic bed bioremediation process has revealed that the major amount of the  $^{15}\text{N}$  in humic matter is converted to amino derivatives and heterocyclic condensation products [35,41]. Major resonance signals were detected in the

Table 5. Distribution of the <sup>14</sup>C radiolabel after biological/enzymatic treatment of bioremediated soils containing trinitrotoluene (TNT) residues—effects of extracellular enzymes: Manganese-peroxidase (MnP), horseradish-peroxidase (HRP), and laccase (Lac); MeOH = methanol

	Residual <sup>14</sup> C radioactivity (%) <sup>a</sup>					
	HRP		Lac		MnP	
	-	+	-	+	-	+
Fungal treatment						
Extractable						
H <sub>2</sub> O	34.6	37.9	22.5	25.6	16.6	16.4
MeOH	20.1	21.0	20.3	17.8	21.5	19.1
Nonextractable residues						
Σ humic substances	39.1	38.5	58.1	54.8	56.4	63.6
Recovery	93.8	97.4	100.9	98.2	94.5	99.1
Native TNT-contaminated soil						
Extractable						
H <sub>2</sub> O	31.3	30.9	38.7	39.1	32.9	33.7
MeOH	34.0	33.9	27.6	26.3	25.3	24.4
Nonextractable residues						
Σ humic substances	29.6	33.5	39.8	36.9	42.4	40.3
Recovery	94.9	98.3	106.1	102.3	100.6	98.4
Dynamic bed process						
Extractable						
H <sub>2</sub> O	19.5	20.5	34.4	48.3	17.4	17.3
MeOH	6.5	7.8	4.8	4.4	1.7	1.9
Nonextractable residues						
Σ humic substances	74.3	75.8	56.5	51.1	73.8	76.1
Recovery	100.3	104.1	95.7	103.8	92.9	95.3
Alternating redox process						
Extractable						
H <sub>2</sub> O	9.9	7.4	31.0	35.5	4.6	5.8
MeOH	5.1	3.6	2.9	2.6	1.3	1.1
Nonextractable residues						
Σ humic substances	84.8	87.0	65.6	62.8	91.8	92.7
Recovery	99.8	98.0	99.5	100.9	97.7	99.6

<sup>a</sup> - Control; + = with treatment.

regions of five-ring heterocyclic nitrogen, aniline derivatives, and primary amines [35]. Solid-state <sup>15</sup>N-NMR analyses of the <sup>15</sup>N-TNT spiked soil from the slurry process has resulted in the majority of the signals being assigned to condensation products of TNT metabolites [15]. However, spectra of silylated humin indicated the contribution of azoxy and nitro functions still remaining at the end of incubation [10]. In the present paper, even after release of residual radioactivity by different mobilization treatments, no increase of TNT or metabolites was observed, and the extracted <sup>14</sup>C radioactivity could not be eluted in TLC chromatograms. These results indicate that the proximate metabolites were further transformed during residue formation and that strong, presumably covalent interactions are responsible for the binding of TNT metabolites.

Humic acid-degrading, ligninolytic fungi and highly concentrated oxidative enzymes were not able to mobilize the residual <sup>14</sup>C radioactivity or appreciably alter its partitioning. These fungi are considered to be able to metabolize (<sup>14</sup>C-labeled) anilines and other aromatic compounds that are bound to humic acids and lignins [42]; however, such degradation products tend to repolymerize [43]. A slight increase in the extractable amounts of <sup>14</sup>C radioactivity was found only in the native TNT-contaminated soil, accompanied by an increase of the <sup>14</sup>C radioactivity in the humin fraction after incubation with these fungi. Isolated ligninolytic enzymes exhibited a significant mobilization effect (maximum 13.9%) only with the soil

from the dynamic bed bioremediation process. Mobilization experiments performed with soils containing residues from microbial degradation of <sup>14</sup>C-labeled polycyclic aromatic hydrocarbons [37] also showed relatively low levels of increased mobilization into the soluble fractions after cyclic freezing and thawing (<5%), drying and wetting (no significant change), incubation with fungal and bacterial inoculum (≪10%), or addition of metal complexing agents such as EDTA (<12%). A previous investigation of the fate of TNT residues in soil after a long composting process showed little mobilization by alkaline or acid hydrolysis or by ultraviolet radiation [18]. Other experiments were carried out with residue containing soil from the anaerobic/aerobic soil slurry [26] and the dynamic bed process [5,35]. After the aerobic maturation phase deemed necessary for stable residue formation, polar metabolites disappeared nearly completely from the extractable fractions. Only after applying HCL or EDTA at relatively high concentrations was significant mobilization observed (12.5 and 5.9%, respectively), but no TNT or reduced metabolites were detected. Size exclusion chromatography of extracted humic acids showed that >99% of the <sup>14</sup>C radioactivity was bound to molecules >5,000 Da [44]. Leaching of this soil with a nonnitrogen-limited grown liquid culture of the white rot fungus *P. chrysosporium* led to nonsignificant release (≲1%) of residual <sup>14</sup>C radioactivity [44]. However, that soil was mixed with sand and crushed bark (3:1:1) before leaching [26]. In

Table 6. Distribution of the  $^{14}\text{C}$  radiolabel after biological treatments of bioremediated soils containing trinitrotoluene (TNT)-residues—effects of growing seeds and incorporation into plant biomass; MeOH = methanol

	Residual $^{14}\text{C}$ radioactivity (%)			
	Control	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Raphanus sativa</i>	<i>Lolium perenne</i>
	—	+	+	+
Fungal treatment				
Biomass <sup>a</sup>	—	0.7	0.3	0.4
Extractable				
H <sub>2</sub> O	6.2	4.2	5.7	6.3
MeOH	25.5	25.7	24.8	24.1
Nonextractable residues				
$\Sigma$ residues <sup>b</sup>	67.2	66.8	67.9	68.1
Recovery	98.9	97.4	98.7	98.9
Native TNT-contaminated soil				
Biomass	—	2.6	1.7	1.7
Extractable				
H <sub>2</sub> O	9.3	7.4	10.4	9.5
MeOH	18.8	19.1	18.6	15.7
Nonextractable residues				
$\Sigma$ residues <sup>b</sup>	73.5	60.8	63.9	64.8
Recovery	101.6	89.9	94.6	91.7
Dynamic bed process				
Biomass <sup>a</sup>	—	0.3	0.1	0.0
Extractable				
H <sub>2</sub> O	4.4	3.8	5.8	4.2
MeOH	4.1	2.8	5.4	4.6
Nonextractable residues				
$\Sigma$ residues	86.8	88.1	87.9	92.4
Recovery	95.3	95.0	99.2	101.2
Alternating redox process				
Biomass <sup>a</sup>	—	0.1	0.0	0.1
Extractable				
H <sub>2</sub> O	6.8	8.9	5.4	5.2
MeOH	0.4	0.2	2.4	1.4
Nonextractable residues				
$\Sigma$ residues <sup>b</sup>	93.2	88.3	84.3	96.0
Recovery	100.4	97.5	92.1	102.7

<sup>a</sup> Radiolabel incorporated into biomass.<sup>b</sup> Measured as summarized parameter.

addition, single freezing, varying temperatures, and growth of bush beans (*P. vulgaris*) also did not cause significant mobilization of  $^{14}\text{C}$  radioactivity, whereas decomposition of the plant tissue led to a mobilization of approximately 8%. The results of the present investigation and a review of related data led us to conclude that nonextractable (methanol) residues derived from long-term microbial degradation of TNT are relatively resistant to mobilization and appear to exhibit a common behavior under environmental stress conditions. In this study, the plant uptake of TNT equivalents is generally lower than described in the literature because of the use of non-bioavailable TNT and bound residues of TNT in the soil.

Heavy rainfall or high amounts of water may cause significant mobilization of TNT residues into the aqueous phase of the soil. With excess leaching, the ionic strength of soil solution decreases, and divalent cations are diminished in the soil humic matter. As a result, humic substances may convert from colloidal into linear structures and become more soluble at moderate pH values [43]. Therefore, the nonextractable (methanol) residues may be degradation products of humic

macromolecules since no relative increase in the concentration of either parent compounds or TNT metabolites were detected in our experiments. Other authors have found that simulation of heavy rainfall with subsequent percolation through columns of soil containing TNT residues from a soil slurry bioremediation process yielded mobilization of 3.8% [26]. However, in our experiment, between 11.1 and 28.9% of the residual radioactivity from  $^{14}\text{C}$ -TNT was mobilized by leaching the bioremediated soils with relatively high amounts of water. After a few days, the clear, yellow-brownish supernatants flocculated; the precipitates contained nearly the total initial  $^{14}\text{C}$  radioactivity, both indicating the contribution of humic substances to mobilization. More soluble compounds may strongly decrease the sorption of more hydrophobic ones, and sorption levels generally decrease with decreasing ionic strength [43]. Thus, sorbed TNT or its reduced metabolites presumably should have been detected in the extractable fractions if these compounds were the dominant species of the TNT residues that are nonextractable by methanol.

In addition, no significant mobilization and changes in par-

tioning of the <sup>14</sup>C residues were observed during germination and growth of plants in the bioremediated soils (<0.3%), whereas in the native TNT-contaminated soil a significant amount (~2.6%) was incorporated into the tissues of the bush bean (*P. vulgaris*). The higher plant incorporation from the native TNT-contaminated soils and from the fungal treatment bioremediation process was probably due to the higher amount of soluble <sup>14</sup>C radioactivity in those soils. This indicates that incorporation may be correlated to the amount of immediately bioavailable <sup>14</sup>C compounds [45]. In general, macromolecular humic substances are not taken up by the plants, whereas TNT or its metabolites can be incorporated into plants, especially in the roots [46]. Because of the lack of TNT or metabolites detected at the end of all our mobilization experiments, we conclude that TNT-derived bound residues in soil have a relatively high degree of resistance to mobilization by common environmental stresses. We found a lower uptake of <sup>14</sup>C radioactivity by plants compared to other studies with radiolabeled TNT [45] because the plants were not in contact with water-soluble TNT or metabolites but rather with bound residues.

Nearly all relevant biological soil treatment processes aim at the irreversible binding of reduced TNT metabolites to soil components. The data presented clearly indicate that the proximate metabolites of TNT are further transformed during residue formation in all the bioremediation processes tested and that covalent interactions may be responsible for the binding of TNT metabolites. Thus, the general turnover of humic matter determines the time frame that controls the long-term fate of TNT residues. From present knowledge, no hazardous impact is expected from TNT residues contained in soils after long-term microbial elimination of the methanol-extractable compounds by the respective treatment processes. Residue formation by microbial activity may be considered a biogenic transformation in terms of natural humification processes. The relatively high stability of TNT-derived residues supports the effectiveness of the bioremediation processes investigated, and controlled humification is therefore a promising approach for long-term bioremediation.

**Acknowledgement**—We gratefully acknowledge G. Diekert and R. Oelmüller from the University of Jena for providing laboratory space and support for this project, and we thank K.-J. Appenroth for technical assistance and Hans-Hermann Richnow for helpful discussions. Particularly, we thank the reviewers for their suggestions to improve the manuscript. The work was funded within the joint Project 5 14810925—Long-term stability and mobilization potential of residual xenobiotics during bioremediation, subprojects 5.3.1, 5.3.2, and 5.3.3, of the German Federal Ministry of Education and Research and by a grant from the Centre for Environmental Research.

## REFERENCES

- Fritsche W, Scheibner K, Herre, A, Hofrichter M. 2000. Fungal degradation of explosives: TNT and related nitroaromatic compounds. In Spain J, Hughes JB, Knackmuss HJ, eds, *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp 227–233.
- Won WD, DiSalvo LH, James NG. 1975. Toxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its microbial metabolites. *Appl Environ Microbiol* 31:576–580.
- Honeycutt ME, Jarvis AS, McFarland VA. 1996. Cytotoxicity and mutagenicity of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolites. *Ecotoxicol Environ Saf* 35:282–287.
- Rodgers JD, Bunce NJ. 2001. Treatment methods for the remediation of nitroaromatic explosives. *Water Res* 35:2101–2111.
- Esteve-Nunez A, Caballero A, Ramos J. 2001. Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:335–352.
- Lenke H, Achtnich C, Knackmuss HJ. 2000. Perspectives of bio-elimination of polynitroaromatic compounds. In Spain J, Hughes JB, Knackmuss HJ, eds, *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp 91–126.
- Scheibner K, Hofrichter M, Herre A, Michels J, Fritsche W. 1997. Screening for fungi intensively mineralizing 2,4,6-trinitrotoluene. *Appl Microbiol Biotechnol* 47:452–457.
- Van Aken B, Agathos SN. 2001. Biodegradation of nitro-substituted explosives by white-rot fungi: A mechanistic approach. *Adv Appl Microbiol* 48:1–77.
- Wang CJ, Tiele S, Bollag JM. 2002. Interaction of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) and 4-amino-2,6-dinitrotoluene with humic monomers in the presence of oxidative enzymes. *Arch Environ Toxicol* 42:1–8.
- Achtnich C, Fernandes E, Bollag JM, Knackmuss, HJ, Lenke H. 1999. Covalent binding of reduced metabolites of [<sup>15</sup>N3] TNT to soil organic matter during a bioremediation process analyzed by <sup>15</sup>N NMR spectroscopy. *Environ Sci Technol* 33:4448–4456.
- Bruns-Nagel D, Steinbach K, Gemsa D, von Löw E. 2000. Composting (humification) of nitroaromatic compounds. In Spain J, Hughes JB, Knackmuss HJ, eds, *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp 357–393.
- Drzyzga O, Bruns-Nagel D, Gorontzy T, Blotvogel KH, Gemsa D, von Löw E. 1998. Incorporation of <sup>14</sup>C-labeled 2,4,6-trinitrotoluene metabolites into different soil fractions after anaerobic and anaerobic-aerobic treatment of soil/molasses mixtures. *Environ Sci Technol* 32:3529–3535.
- Daun G, Lenke H, Reuss M, Knackmuss HJ. 1998. Biological treatment of TNT contaminated soil. 1. Anaerobic cometabolic reduction and interaction of TNT and metabolites with soil components. *Environ Sci Technol* 32:1956–1963.
- Hawari J, Beaudet S, Halsz A, Thiboutot S, Ampleman G. 2000. Microbial degradation of explosives: Biotransformation versus mineralization. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:605–618.
- Knicker H, Achtnich C, Lenke H. 2001. Solid-state nitrogen-15 nuclear magnetic resonance analysis of biologically reduced 2,4,6-trinitrotoluene in a soil slurry remediation. *J Environ Qual* 30:403–410.
- Dawel G, Kästner M, Michels J, Poppitz W, Günther W, Fritsche W. 1997. Structure of a laccase-mediated product of a coupling of 2,4-diamino-6-nitrotoluene to guaiacol, a model for coupling of 2,4,6-trinitrotoluene metabolites to a humic organic soil matrix. *Appl Environ Microbiol* 63:2560–2565.
- Thiele S, Fernandes E, Bollag JM. 2002. Enzymatic transformation and binding of labeled 2,4,6-trinitrotoluene to humic substances during an anaerobic/aerobic incubation. *J Environ Qual* 31:437–444.
- Pennington JC, Brannon JM. 2001. Environmental fate of explosives. *Thermochimica Acta* 685:1–10.
- Northcott GL, Jones KC. 2000. Experimental approaches and analytical techniques for determining organic compound bound residues in soil and sediment. *Environ Pollut* 108:19–43.
- Achtnich C, Knackmuss HJ, Lenke H. 2000. Schlußbericht-Alternierender Anaerob/Aerob-Prozess: Analyse der Bindungsstrukturen von metabolisiertem und humifiziertem TNT im Boden, tib Univeritätsbibliothek-Hannover, Germany.
- Achtnich C, Lenke H, Klaus U, Spiteller M, Knackmuss HJ. 2000. Stability of immobilized TNT derivatives in soil as a function of nitro group reduction. *Environ Sci Technol* 34:3698–3704.
- Verstraete W, Devliegher W. 1996. Formation of nonbioavailable organic residues in soil: Perspectives for site remediation. *Biodegradation* 7:471–485.
- Kästner M, Richnow HH. 2001. Interaction of xenobiotic compounds with humic substances. In Stegmann R, Brunner G, Calmano W, Matz G, eds, *Treatment of Contaminated Soil: Fundamentals, Analysis, Applications*. Springer, Berlin Heidelberg, Germany, pp 224–229.
- Kästner M, Lotter S, Heerenklage J, Breuer-Jammali M, Stegmann R, Mahro B. 1995. Fate of <sup>14</sup>C-labeled anthracene and hexadecane in compost manured soil. *Appl Microbiol Biotechnol* 43:128–1135.
- Drzyzga O, Bruns-Nagel D, Gorontzy T, Blotvogel KH, von Löw E. 1999. Anaerobic incorporation of the radiolabeled explosive TNT and metabolites into the organic soil matrix of contaminated

- soil after different treatment procedures. *Chemosphere* 38:2081–2095.
26. Achtnich C, Sieglen U, Knackmuss HJ, Lenke H. 1999. Irreversible binding of biologically reduced 2,4,6-trinitrotoluene to soil. *Environ Toxicol Chem* 18:2416–2423.
  27. Widrig DL, Boopathy R, Manning JF. 1997. Bioremediation of TNT-contaminated soil: A laboratory study. *Environ Toxicol Chem* 16:1141–1148.
  28. Boopathy R, Kulpa CF, Manning J, Montemagno CD. 1994. Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by a *Pseudomonas* consortium under aerobic conditions. *Bioresour Technol* 47:205–208.
  29. Lenke H, Warrelmann J, Daun G, Hund K, Sieglen U, Walter U, Knackmuss HJ. 1998. Biological treatment of TNT-contaminated soil. 2. Biologically induced immobilization of the contaminants and full-scale application. *Environ Sci Technol* 32:1964–1971.
  30. Boopathy R. 2002. Effect of food-grade surfactant on bioremediation of explosives-contaminated soil. *J Hazard Mater* 2794:1–12.
  31. Breitung J, Bruns-Nagel D, Steinbach K, Kaminski L, Gerns D, von Löw E. 1996. Bioremediation of 2,4,6-trinitrotoluene-contaminated soils by two different aerated compost systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 44:795–800.
  32. Axtell C, Johnston CG, Bumpus JA. 2000. Bioremediation of soil contaminated with explosives at the Naval Weapons Station Yorktown. *Soil Sediment Contam* 9:537–548.
  33. Michels J, Track T, Gehrke U, Sell D. 2000. Leitfaden—Biologische Verfahren zur Bodensanierung. Kapitel 2.1.9.3, 2.2.3 und 9.4. Umweltbundesamt, Berlin, Germany.
  34. Hofrichter M, Fritsche W. 1997. Depolymerization of low-rank coal by extracellular fungal enzyme systems. II. The ligninolytic enzymes of the coal-humic-acid-depolymerizing fungus *Nematoloma frowardii* b 19. *Appl Microbiol Biotechnol* 47:419–424.
  35. Bruns-Nagel D, Knicker H, Drzyzga O, Bütehorn U, Steinbach K, Gerns D, von Löw E. 2000. Characterization of <sup>15</sup>N-TNT residues after an anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures by solid-state <sup>15</sup>N NMR spectroscopy. 2. Systematic investigation of whole soil and different humic fractions. *Environ Sci Technol* 34:1549–1556.
  36. Caton JE, Ho CH, Williams RT, Griest WH. 1994. Characterization of insoluble fractions of TNT transformed by composting. *J Environ Sci Health A* 29:659–670.
  37. Eschenbach A, Wienberg R, Mahro B. 1998. Fate and stability of nonextractable residues of [<sup>14</sup>C] PAH in contaminated soils under environmental stress conditions. *Environ Sci Technol* 32:2585–2590.
  38. Kästner M, Streibich S, Beyrer M, Richnow HH, Fritsche W. 1999. Formation of bound residues during microbial degradation of [<sup>14</sup>C] anthracene in soil. *Appl Environ Microbiol* 65:1834–1842.
  39. Kelsey JW, Alexander M. 1997. Biodegradation of organic compounds sequestered in organic solids or in nanopores within silica particles. *Environ Toxicol Chem* 16:582–585.
  40. Thorne PG, Leggett DC. 1996. Hydrolytic release of bound residues from composted soil contaminated with 2,4,6-trinitrotoluene. *Environ Toxicol Chem* 16:1132–1134.
  41. Knicker H, Bruns-Nagel D, Drzyzga O, von Löw E, Steinbach K. 1999. Characterization of <sup>15</sup>N-TNT residues after an anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures by solid-state <sup>15</sup>N NMR spectroscopy. 1. Determination and optimization of relevant NMR spectroscopic parameters. *Environ Sci Technol* 33:343–349.
  42. Haider KM, Martin JP. 1988. Mineralization of <sup>14</sup>C-labeled humic acids and of humic-acid bound <sup>14</sup>C-xenobiotics by *Phanerochaete chrysosporium*. *Soil Biol Biochem* 20:425–429.
  43. Myneni SCB, Brown JT, Martinez GA, Meyer-Ilse W. 1999. Imaging of humic substance macromolecular structures in water and soils. *Science* 286:1335–1337.
  44. Achtnich C, Lenke H. 2001. Stability of immobilized 2,4,6-trinitrotoluene metabolites in soil under long-term leaching conditions. *Environ Toxicol Chem* 20:280–283.
  45. Scheidemann P, Klunk A, Sens C, Werner D. 1998. Species dependent uptake and tolerance of nitroaromatic compounds by higher plants. *J Plant Physiol* 152:242–247.
  46. Bharda R, Wayment DG, Hughes JB, Shanks JV. 1999. Confirmation of conjugation processes during TNT metabolism by axenic plant roots. *Environ Sci Technol* 33:446–452.

FATE AND METABOLISM OF [<sup>15</sup>N]2,4,6-TRINITROTOLUENE IN SOILMARTIN WEIß,<sup>†</sup> ROLAND GEYER,<sup>‡</sup> ROLF RUSSOW,<sup>§</sup> HANS H. RICHNOW,<sup>†</sup> and MATTHIAS KÄSTNER<sup>\*†</sup><sup>†</sup>Department of Bioremediation, Centre for Environmental Research Leipzig-Halle UFZ, Permoserstraße 15, D-04318 Leipzig, Germany<sup>‡</sup>Center for Biomarker Analysis/Mass Spectroscopy Lab, University of Tennessee, Knoxville, Tennessee 37932-2575, USA<sup>§</sup>Department of Soil Science, UFZ, Theodor-Lieser-Straße 4, D-06120 Halle, Germany

(Received 18 July 2003; Accepted 11 January 2004)

**Abstract**—The fates of the labels from [<sup>14</sup>C] and [<sup>15</sup>N] trinitrotoluene were analyzed in bioreactors under aerobic conditions in soil treated by a fungal bioremediation process with *Stropharia rugosoannulata* and in control soil. Up to 17.5% of the <sup>15</sup>N label had a different fate than the <sup>14</sup>C label. Three N-mineralization processes were identified in detailed experiments with [<sup>15</sup>N]TNT. About 2% of the <sup>15</sup>N label was found as NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, showing simultaneous processes of direct TNT denitration (I) and reduction with cleavage of the amino groups (II). The enrichment of NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (up to 7.5 atom% <sup>15</sup>N abundance) indicates the formation of Meisenheimer complexes with a denitration of [<sup>15</sup>N]TNT. A 1.4% of the label was found distributed between N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub>. However, the <sup>15</sup>N enrichment of the N<sub>2</sub>O (up to 38 atom%) demonstrated that both N atoms were generated from the labeled TNT and clearly indicates a novel formation process (III). We propose, as an explanation, the generation of N<sub>2</sub>O by cleavage from condensed azoxy metabolites. In addition, 1.7% of the <sup>15</sup>N label was detected as biogenic amino acids in the wheat straw containing the fungus. Overall, 60 to 85% of the applied [<sup>15</sup>N]TNT was degraded and 52 to 64% was found as nonextractable residues in the soil matrix. Three percent was detected as 2-amino-4,6-dinitrotoluene and 4-amino-2,6-dinitrotoluene.

**Keywords**—[<sup>15</sup>N]2,4,6-Trinitrotoluene    Biodegradation    Fungi    Azoxytetranitrotoluene    Dinitrogen oxide

## INTRODUCTION

During World War II, 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) was the major component of explosives and ammunition. During both production and disarmament, many sites were contaminated heavily with TNT [1]. Due to its recalcitrance and toxicity, TNT may be a severe hazard to human health. Thus, the remediation of soils contaminated with TNT is of particular concern because these compounds endanger groundwater quality at many sites [1]. Bioremediation of TNT-contaminated soil is considered to be the most cost-effective and sustainable technique. Fungal treatment is one of the bioprocesses applied for decontamination [1,2]; others are composting and various aerobic and anaerobic treatment processes [3–5].

Radiolabeled [<sup>14</sup>C]TNT has been used in micro- and mesocosm studies for balancing the TNT turnover processes in soils [5–7]. Most examinations of the fate of TNT during bioremediation processes in soil indicated a bio-immobilization rather than a mineralization of the compound [8] and the organic carbon of the molecule mainly was incorporated into the organic soil matrix. However, a considerable mineralization of TNT in soil also was reported recently [9]. For drawing general conclusions regarding the behavior and fate of TNT, <sup>14</sup>C is the appropriate label, but as yet very few reports on the fate of nitrogen from TNT exist. Furthermore, to the best of our knowledge, no mass balances of <sup>15</sup>N in soil systems have yet been published. For tracing the degradation pathways of TNT, <sup>15</sup>N mass balances may provide an improved understanding of the fate of TNT in bioremediation processes, including residue formation in complex soil systems. Evidence was presented by <sup>15</sup>N nuclear magnetic resonance spectroscopy that TNT metabolites were bound covalently to soil organic matter [10–13]. Semiquinones, anilino(hydro)quinones, anilides, and im-

ine derivatives of TNT were found to be the species that bind to humic matter [12–15].

The mineralization of TNT by bacterial activity generally is considered to be negligible [1,3–7]. Particularly with initial anaerobic treatment, the nitro groups of TNT mainly are reduced in soils to aminodinitrotoluenes (ADNT) and diaminodinitrotoluenes (DANT) with accompanying formation of hydroxylaminodinitrotoluenes (HADNT), which may react via condensation to form azoxytetranitrotoluenes (for review see [5]). Abiotic reductions catalyzed by Fe(0) also may be involved in the reduction of TNT [16]. The activity of ligninolytic fungi results in higher mineralization of TNT and additional formation of N-formylated or acetylated ADNT metabolites [5]. After supplementation of readily degradable carbon sources and establishment of strictly anaerobic conditions in soil, a reduction of TNT to triaminotoluene and disappearance of the metabolites was observed [17,18]. Subsequent aerobic incubation of the soils treated by anaerobic processes was shown to decrease the overall amount of TNT metabolites drastically [17,18] but the carbon derived from [<sup>14</sup>C]TNT still remained in the soil. Nitrogen also was assumed to remain in the soil after the aerobic maturation phase [10]. The TNT-transformation studies revealed in most cases overall <sup>14</sup>C-label recoveries of 92 to 99% with about 90% nonextractable residues [7,18].

Several reports have been published on the cleavage of nitrogen from TNT by pure cultures of aerobic bacteria [5,19–23], anaerobic bacteria [24], and fungi [25]. The first report about NH<sub>4</sub><sup>+</sup> release was published in 1989 [23] but the extent of N release in soils has not been analyzed until now. Additional reductive processes involving the TNT molecule also lead to reductive elimination of nitrite by the formation of Meisenheimer complexes with hydride addition to the aromatic ring, as shown a few years ago for picric acid (2,4,6-trinitrophenol) and 2,4-dinitrophenol [26]. The NO<sub>2</sub><sup>-</sup> derived from

\* To whom correspondence may be addressed  
(matthias.kaestner@ufz.de).

TNT may then serve as a N source for various bacteria [26–28]. These processes result in a different fate for C and N from TNT in environmental systems. However, most authors do not consider the various fates of C and N derived from TNT in soil experiments. A cleavage of N from the TNT molecule would provide evidence for the decomposition of the compound and for the decrease in hazardous potential of nonextractable residues after biotransformation of TNT in soils.

Therefore, the goal of the present work was to compare the mass balances of C- and N turnover in tracer experiments using [<sup>14</sup>C] and [<sup>15</sup>N]2,4,6-TNT in native soil and in soil treated by a fungal remediation process with the litter-decaying fungus *Stropharia rugosoannulata*. The question of whether the specific fate of N from [<sup>15</sup>N]TNT is different from the fate of C was studied together with the processes of N mineralization. During the soil experiments, the formation of [<sup>15</sup>N]NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, -NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, -NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, -N<sub>2</sub>O, -N<sub>2</sub>, and the incorporation of the label into biomass were determined.

## MATERIAL AND METHODS

### Chemicals

All chemicals except where otherwise specified were purchased in p.a. grade from Merck (Darmstadt, Germany) and Sigma Aldrich (Deisenhofen, Germany). The [U-<sup>15</sup>N]-labeled TNT with a purity of 95% was obtained from K. Steinbach (Department of Chemistry, University of Marburg, Marburg, Germany). Radiolabeled [U-<sup>14</sup>C]-TNT with a specific activity of 30 mCi mmol<sup>-1</sup> was obtained from W. Fels (University of Paderborn, Paderborn, Germany).

### Soil

Soil samples were collected from Werk Tanne, a former TNT production plant in Clausthal-Zellerfeld, Germany. The soil was mixed, sieved (< 2 mm), and stored at 4°C. The contamination of the native soil amounted to 1190 ± 420 mg TNT, 80 ± 3 mg 4-ADNT, and 53 ± 3 mg 2-ADNT kg<sup>-1</sup> soil (dry wt). The composition of the soil was: Sand 47.5%, silt 39.7%, clay 12.9%, organic carbon 13.7%, carbonate 2.15%, nitrogen 4.2%, with a pH of 7.4.

### Organisms and culture conditions

The litter-decaying fungus *S. rugosoannulata* was found to be capable of metabolizing and mineralizing TNT to a certain extent in liquid cultures [29]; it also can be grown in soil and has low nutritional requirements. For inoculation of the soil reactor, a malt agar culture plate of *S. rugosoannulata* (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, [DSM] 11372) was added to 100-g autoclaved oat seeds moistened with 50 ml of distilled H<sub>2</sub>O in 500-ml flasks that were incubated in the dark for 14 d at 22°C. The oat seeds containing the mycelia were then transferred to 200 g autoclaved wheat straw moistened with 500 ml of distilled H<sub>2</sub>O in plastic bags sealed with cotton plugs. After four weeks of incubation, the mycelia on the straw were transferred to the soil as described below.

### Experimental setup

The soils for the comparison of <sup>14</sup>C and <sup>15</sup>N mass balances were spiked with 7.5 g [<sup>14</sup>C]TNT or with 7.5 g of [<sup>15</sup>N]TNT per kg soil (dry wt). The radiolabeled TNT was diluted with nonlabeled TNT, resulting in a specific activity of 81 μCi kg<sup>-1</sup> soil (dry wt). Crystalline TNT was mixed thoroughly into air-dried native soil and the water content of the soil finally was adjusted to 30% (weight/weight; ≈ 60% of water-holding ca-

capacity). To age the added TNT, the soil was stored for 30 d at 4°C. Two kilograms of the aged soils were filled into soil bioreactors of 5.7 l volume and the wheat straw containing the mycelia of *S. rugosoannulata* was supplied to the soil in layers of 5 cm between three 10-cm layers of TNT-contaminated soil. The bioreactors were operated with a closed gas atmosphere pumped in a circulation flow of 2 l/h. Oxygen was provided to the reactor by a 10-l flexible gas bag and the dosage was performed by volume reduction of the gas atmosphere due to absorption of CO<sub>2</sub> within two gas-washing bottles filled with 2 N potassium hydroxide. The bioreactors were operated at 18°C for 176 d.

The soil for the <sup>15</sup>N tracer experiment was prepared by spiking the soil with 428.5 mg <sup>15</sup>N-labeled and 428.5 mg non-labeled TNT per kg resulting in a <sup>15</sup>N abundance of 48 atom%. The soil finally was adjusted to 30% water content. Forty grams of the contaminated soil was filled into 650-ml soil bioreactors and was incubated under synthetic atmosphere of 80% helium and 20% oxygen in order to eliminate the natural N content of the atmosphere. Two sets of six reactors with native soil and two sets with fungal inoculation (10 g of straw-mycelia as a layer on top of the soil) were incubated at 18°C. The oxygen content of the atmosphere in the soil reactors was maintained at 20% by electrolysis of sulfuric acid in separate vessels using a modified apparatus for long-term biological oxygen demand measurement (Sapromat D 12, Voith, Heidenheim, Germany). The initial quantity of <sup>15</sup>N in TNT per vessel amounted to 5,590 ± 20 μmol and was set to 100% for the turnover calculations. The overall <sup>15</sup>N abundance in the soil amounted to 1.9 ± 0.008 atom%. The amount of gaseous N species was analyzed by gas sampling at several points of time. Two reactors were sacrificed for each sampling time up to 108 d and were analyzed for the content and isotopic composition of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, TNT, and metabolites.

### Analytical procedures

For extraction of TNT and primary metabolites, 2 g of dry soil was extracted sequentially three times with 10 ml methanol in Hungate tubes (Bellco International, Feltham, UK). The tubes were sonicated for 15 min in an ultrasonic water bath (Schmidbauer, Singen, Germany) and centrifuged at 8,000 rpm for 5 min; the supernatants were then combined and analyzed by gas chromatography mass spectroscopy (GC-MS). For analysis of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 20 g soil was extracted with 100 ml 1 N KCl-solution for 3 h on a rotary shaker at 20 rpm. Soil pellets were saved for elemental analysis.

The concentrations of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> were determined by anion exchange chromatography with an IonPac 4 × 250 mm column coupled to the AD 25 ultraviolet-detector at 212 nm (Dionex DX-100, Idstein, Germany).

Hydrolysis of proteins and derivatization of amino acids were performed according to Richnow et al. [30]. A 1-g soil sample was heated for 22 h at 110°C with 5 ml of 6 M HCl in a closed vessel filled with N<sub>2</sub>. After cooling, the hydrolysate was filtered through a 0.2-μm GF6 sterile glass fiber filter (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) and the filtrate was dried completely in a rotary evaporator at 45°C under vacuum. For methylation of the carboxyl groups of the amino acids, 1 ml of iso-propanol and 250 μl acetyl chloride (both cooled to 4°C) were added to the dried residues and the reaction mixture was incubated for 10 h at 70°C under N<sub>2</sub> atmosphere. This solution was then evaporated and 500 μl dichloromethane and 500 μl trifluoroacetic acid were added for the acetylation.

The isopropyltrifluoroacetates of the amino acids were analyzed for structure and isotope composition using GC-MS and GC-combustion-isotope ratio MS (GC-C-IR-MS) techniques as described below.

For elemental analysis, the soil and the dried residues from the extractions were dried at 45°C and were combusted in an elemental oxidizer (EA 2000) coupled to a Balzer Quadstar MS, 422 QMH 400–5 (Hekatech, Wegberg, Germany) in order to determine the N isotopic composition in the soil. The fraction of nonextractable residues was calculated by subtraction of the extractable fractions from the total soil content. The peak area of the ion traces  $m/z$  28 and 29 was used to calculate the isotopic composition and the concentration of nitrogen. The isotopic composition of a sample generally was measured as atom% abundance with relative standard deviations of <8% due to the inhomogeneity of the soil. The total N content was measured with the same system.

Both TNT and metabolites were analyzed in a GC-MS system (HP 6890, MS 5973, Hewlett-Packard, Avondale, PA, USA). Two  $\mu$ liters of the methanol extracts was injected and separated on an SPB-5 column, 30 m  $\times$  0.32 mm, 0.25  $\mu$ m film thickness (Suppelco, Taufkirchen, Germany), and the split ratio was set to 1:50. The temperature program was: 3 min at 60°C, heating with 8°C/min to 182°C, then 3 min at 182°C, heating with 8°C/min to 300°C, and finally 6 min at 300°C. The detection limit of TNT and metabolites was <0.1 mg kg<sup>-1</sup>, which corresponds to 0.013% of the applied [<sup>15</sup>N–]TNT. The relative standard deviation amounted to <10% for the amounts of metabolites. The concentrations of gaseous N species such as N<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O were analyzed on a GC-C-IR-MS system as described below for compound-specific isotope analysis.

The <sup>15</sup>N-isotopic composition of TNT and metabolites was analyzed on the GC-MS system used for the identification and determination of the concentrations as described above. To determine the amount and the <sup>15</sup>N-isotopic composition of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, a steam distillation according to Bremner [31] was applied. Duplicates (40 ml) of the filtered KCl extracts of each sample were distilled for 3 to 5 min depending on the N content. The two-step distillation procedures generated first the quantitative amount of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> with MgO as reagent and second the amount of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> after addition of Devarda alloy. This procedure recovered 95 to 98% of the inorganic N. For isotopic ratio measurement, the dried distillates were combusted in the elemental analyzer described above. The <sup>15</sup>N-isotopic compositions of gaseous N species such as N<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>O were analyzed on a GC-C-IR-MS system (Finnigan Mat, Bremen, Germany) consisting of a gas chromatography unit connected to a Finnigan Mat combustion device coupled to a Finnigan Mat 252 mass spectrometer. Gaseous samples (100  $\mu$ l for N<sub>2</sub>, 2.5 ml for N<sub>2</sub>O) were injected on-column and were separated on a Poraplot Q-HAT Plot FS capillary column (25 m + 2.5 m precolumn  $\times$  0.32 mm, Chrompack, Varian, Darmstadt, Germany). The oven temperature was set to 40°C. The instrument was calibrated using N<sub>2</sub> reference gas with an isotopic composition of 0.366 atom% against air. Samples were measured with relative standard deviations of  $\pm$  0.5%. The detection limit for N<sub>2</sub>O was 0.12  $\mu$ mol <sup>15</sup>N. The isotopic composition of amino acids was determined on the GC-C-IR-MS described above. A BPX 5 column (50 m  $\times$  0.32 mm, 0.5- $\mu$ m film thickness, SGE, Weiterstadt, Germany) was used for the separation of these compounds. The temperature program was: 10 min held at 50°C, 2°C/min heating to 175°C, 10 min at 175°C, 4°C/min heating to 260°C, and finally 10 min at

Table 1. Recovery of <sup>14</sup>C and <sup>15</sup>N after microbial degradation of [<sup>14</sup>C]- and [<sup>15</sup>N]-labeled 2,4,6-TNT in soil inoculated with *Stropharia rugosoannulata* on straw

Recovery	Percent of applied label [%]*	
	<sup>14</sup> C	<sup>15</sup> N
TNT	19.8	20.3
Mineralization	(CO <sub>2</sub> ) <0.1	( $\Sigma$ ) 6.3 (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , 0.2) (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , 0.3) (NO, 4.1) (N <sub>2</sub> , 1.7)
Metabolites <sup>a</sup>	16.9	21.4
Nonextractable residues	52.3	30.2
Straw	<0.1	11.2
$\Sigma$	89.1	89.4
TNT metabolized	69.3	69.1
Soil <sup>b</sup>	89.0	72.4

\* [<sup>14</sup>C]TNT = 3,268 kBq/kg (dry wt); [<sup>15</sup>N]TNT = 8,500 mg/kg  $\approx$  total TNT.

<sup>a</sup> Aminodinitrotoluenes and diaminonitrotoluenes.

<sup>b</sup> Soil without straw; determined by combustion and elemental analysis.

260°C. These samples were measured with standard deviation of <4% and the detection limit in terms of isotopic compositions was 16  $\mu$ g <sup>15</sup>N. Due to the much lower enrichment of the single amino acids, the isotopic ratios were reported as  $\delta$  ‰ (1,000  $\delta$  ‰  $\approx$  0.75 atom% or 0.39 atom% excess).

The <sup>14</sup>C-radioactivity in liquid samples was quantified by  $\beta$ -scintillation spectroscopy in an LS 6500 counter (Beckman, Fullerton, USA). All determinations were performed in triplicate analyses with 10 ml optimized scintillation fluid (Opti-Fluor for aqueous phases and UltimaGold, for organic, alkaline and acid samples, both purchased from Packard Instruments, Dreieich, Germany). Solid samples were combusted in an oxidizer (OX 500, Zinsser-Analytik, Frankfurt, Germany) at 900°C. The CO<sub>2</sub> from oxidation was absorbed in Oxysolve 400-scintillation liquid (Zinsser-Analytik) and was analyzed by  $\beta$ -scintillation spectroscopy for the <sup>14</sup>C content. Calibration was performed with labeled TNT on quartz sand and standard deviations of the measurements amounted to <3%. Radioactivity of TNT and metabolites in the methanol extracts were analyzed on thin-layer chromatography plates by a thin-layer chromatography linear analyzer (LB Multitracemaster 20, Berthold SGE, Bad Wildbad, Germany) with a standard deviation <5%. The CO<sub>2</sub> in the exhaust gas of the soil bioreactors was absorbed continuously by a two-stage trapping system in 2 N potassium hydroxide that was then analyzed for radioactivity.

## RESULTS AND DISCUSSION

The comparison of the mass balances of <sup>14</sup>C and <sup>15</sup>N from labeled TNT in soil bioreactors showed significant differences in the fate of nitrogen and carbon. Radiolabeled [<sup>14</sup>C]TNT was mineralized to <0.1% and was metabolized to 69.3% after fungal treatment of the soil over a period of 176 d. About 16.9% was metabolized to ADNT and DANT and 52.3% was converted to nonextractable soil residues (Table 1). The transformation activity in the native soil was much lower in comparison to the fungal treatment (data not shown). The reactor with [<sup>15</sup>N]TNT metabolized 21.4% to ADNT and DANT but only 30.2% to nonextractable soil residues. In comparison to the reactor with <sup>14</sup>C, this reactor clearly showed a much higher

Table 2. Speciation of <sup>15</sup>N derived from [<sup>15</sup>N]TNT in soil inoculated with *Stropharia rugosoannulata* on straw. ND = Below detection limit

Fraction		% Total <sup>15</sup> N						
		t <sub>0</sub> <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	2	7	15	28	108 [d]
Methanol extracts	TNT-N <sup>c</sup>	99.7 ± 8.5	98.8 ± 7.5	98.0 ± 10	88.7 ± 9.3	76.6 ± 6.8	57.8 ± 6.3	14.7 ± 1.9
	2-amino-4,6-dinitrotoluene-N	ND	ND	ND	1.23 ± 0.1	1.74 ± 0.1	1.43 ± 0.1	1.78 ± 0.2
	4-amino-2,6-dinitrotoluene-N	ND	ND	ND	0.68 ± 0.1	0.51 ± 0.1	0.56 ± 0.1	1.33 ± 0.2
KCl extracts	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	0.05 ± 0.0 <sup>e</sup>	0.05 ± 0.0	1.56 ± 0.2	1.34 ± 0.1	1.24 ± 0.1	1.57 ± 0.2	2.09 ± 0.3
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	0.10 ± 0.0	0.05 ± 0.0	0.16 ± 0.0	0.48 ± 0.1	0.43 ± 0.1	0.38 ± 0.0	1.00 ± 0.1
Biomass on straw	N <sub>total</sub>	ND	ND	ND	0.12 ± 0.0	0.64 ± 0.1	0.74 ± 0.1	1.73 ± 0.3
Volatiles	N <sub>2</sub> O-N	ND	ND	ND	0.03 ± 0.0	0.04 ± 0.0	0.10 ± 0.0	0.74 ± 0.1
	N <sub>2</sub> -N	ND	ND	ND	ND	0.01 ± 0.0	0.04 ± 0.0	0.66 ± 0.1
Residual <sup>15</sup> N in soil	Σ <sup>d</sup>	20.4 ± 3.2	20.4 ± 3.0	20.0 ± 3.0	22.1 ± 3.3	30.7 ± 2.8	45.1 ± 4.0	84.0 ± 10
Recovery		120 ± 12	119 ± 11	120 ± 13	115 ± 13	112 ± 10	108 ± 11	109 ± 13
Loss of label		-0.23	0.71	0.27	5.28	8.09	12.2	11.9

<sup>a</sup> Recovery of <sup>15</sup>N after spiking of the soil.

<sup>b</sup> Recovery of <sup>15</sup>N after four weeks of aging at 4°C.

<sup>c</sup> 5,590 μmol [<sup>15</sup>N]TNT = 100% was applied initially.

<sup>d</sup> The initial content of natural <sup>15</sup>N compounds in the soil was 20.4%.

<sup>e</sup> 0.0 = <0.02.

N mineralization and 6.3% was converted to NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>x</sub>, and N<sub>2</sub>. Surprisingly, 11.2% of the <sup>15</sup>N were converted to biogenic <sup>15</sup>N compounds or unknown metabolites in the straw layer containing the fungus, which indicates the use of TNT as nitrogen source. Thus, the first comprehensive <sup>15</sup>N mass balance of TNT transformation in soil showed at least 17.5% of the <sup>15</sup>N label to be metabolized via different pathways in comparison to the <sup>14</sup>C-label (Table 1). Very few authors have proposed in previous papers that nitrogen from TNT may undergo a different fate in comparison to the carbon from the same compound [4,10].

Therefore, detailed <sup>15</sup>N-turnover experiments were conducted in order to investigate the processes governing the specific fate of C and N derived from TNT in soil. With addition of the litter-decaying fungus *S. rugosoannulata* pregrown on straw, the concentrations of [<sup>15</sup>N]TNT decreased during 108 d of incubation from 857 mg TNT kg<sup>-1</sup> to 127 mg kg<sup>-1</sup> soil (dry wt), which corresponds to a degradation of 85% of the applied TNT in the treated soil. The amount of TNT decreased only to 335 mg kg<sup>-1</sup> (63% degradation) in the presence of the autochthonous microflora of the native soil (Tables 2 and 3). The total formation of nonextractable <sup>15</sup>N residues in soil amounted to 64% after fungal treatment and to 52% in the native soil.

The metabolites 2-amino-4,6-dinitrotoluene and 4-amino-2,6-dinitrotoluene that generally are observed in similar soil experiments were detected only transiently in amounts ≤3% of the applied TNT. During anaerobic treatments of TNT-contaminated soils, ADNT and DANT initially were detected in amounts one order of magnitude higher than after aerobic treatments [6,7]. Formylated or acetylated metabolites known from fungal metabolism of TNT [5], as well as HADNT, were not detected in the present experiments. However, traces of azoxytetranitrotoluenes could be identified (M. Kröger, University of Paderborn, Germany, personal communication). Significant amounts of the <sup>15</sup>N label (up to 3%) were detected as water-soluble N-mineralization products NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (see also Table 4), up to 1.5% as gaseous compounds N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub>, and about 1.7% as certain biomass components in the straw (see also Table 5). These data prove for the first time that a significant mineralization of N from TNT occurred and that several processes are involved. Nitrite was released directly from TNT and the compound or the oxidation product NO<sub>3</sub><sup>-</sup> may be consumed as terminal electron acceptors to form N<sub>2</sub>O and N<sub>2</sub>. The TNT also served as a nonspecific electron acceptor for the microorganisms leading to the release of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. In ad-

Table 3. Speciation of <sup>15</sup>N derived from [<sup>15</sup>N]TNT in the native soil. ND = Below detection limit

Fraction		% Total <sup>15</sup> N						
		t <sub>0</sub> <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	2	7	15	28	108 [d]
Methanol extracts	TNT-N <sup>c</sup>	98.8 ± 8.5	99.8 ± 7.5	94.3 ± 9.5	92.8 ± 9.4	86.8 ± 7.0	65.0 ± 6.6	39.1 ± 3.6
	2-amino-4,6-dinitrotoluene-N	ND	ND	0.14 ± 0.0 <sup>e</sup>	0.76 ± 0.1	1.23 ± 0.1	0.36 ± 0.0	ND
	4-amino-2,6-dinitrotoluene-N	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
KCl extracts	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> /NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	0.05 ± 0.0	0.05 ± 0.1	0.89 ± 0.1	2.1 ± 0.3	0.81 ± 0.8	0.37 ± 0.0	1.58 ± 0.2
	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	0.10 ± 0.0	0.09 ± 0.0	0.23 ± 0.0	0.41 ± 0.1	0.22 ± 0.1	0.41 ± 0.0	0.79 ± 0.1
Volatiles	N <sub>2</sub> O-N	ND	ND	ND	ND	ND	0.01 ± 0.0	0.07 ± 0.0
	N <sub>2</sub> -N	ND	ND	ND	ND	0.01 ± 0.0	0.02 ± 0.0	0.03 ± 0.0
Residual <sup>15</sup> N in soil	Σ <sup>d</sup>	20.4 ± 3.2	20.4 ± 3.1	20.0 ± 3.0	19.1 ± 3.0	27.5 ± 2.6	48.6 ± 4.6	72.8 ± 6.4
Recovery		119 ± 12	120 ± 11	116 ± 13	115 ± 13	117 ± 10	115 ± 11	114 ± 10
Loss of label		0.62	-0.29	4.41	4.83	3.38	5.20	5.68

<sup>a</sup> Recovery of <sup>15</sup>N after spiking of the soil.

<sup>b</sup> Recovery of <sup>15</sup>N after four weeks of aging at 4°C.

<sup>c</sup> 5,590 μmol [<sup>15</sup>N]TNT = 100% was applied initially.

<sup>d</sup> The initial content of natural <sup>15</sup>N compounds in the soil was 20.4%.

<sup>e</sup> 0.0 = <0.02.

Table 4. Abundance of  $^{15}\text{N}$  in inorganic nitrogen species derived from [ $^{15}\text{N}$ ]TNT during microbial transformation in native soil and in soil inoculated with *Stropharia rugosoannulata* grown on wheat straw

Sample	Time (d)	$^{15}\text{N}$ [atom%] Abundance					
		0 <sup>a</sup>	2	7	15	28	108
Native soil	$\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$	0.37	6.78	7.56	4.90	5.65	6.52
	$\text{NH}_4^+$	0.37	0.52	1.00	0.55	0.64	0.69
	$\text{N}_2\text{O}$	0.37	0.91	4.75	4.29	11.6	3.82
Fungal process	$\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$	0.37	6.53	7.67	5.00	4.59	3.49
	$\text{NH}_4^+$	0.37	0.60	1.16	0.73	0.62	1.28
	$\text{N}_2\text{O}$	0.37	0.98	7.62	12.2	29.7 (38.6) <sup>b</sup>	5.22

<sup>a</sup> Natural  $^{15}\text{N}$  background.<sup>b</sup> Detected at day 36.

dition, the N was assimilated by microbial biomass, which clearly indicates the use of TNT as N source.

In comparison to the processes of N release, the carbon mineralization of [ $^{14}\text{C}$ ]TNT by microbial activity generally is considered to be very low and the labeled carbon from [ $^{14}\text{C}$ ]TNT remained in the soil [3–8,27]. Thus, the question of why N was mineralized and C was not, remained to be answered. Obviously, the reduced TNT metabolites and the residual carbon skeleton of the molecules after cleavage of the N appear to be highly reactive in coupling reactions to soil organic matter [14,18,32] so that the microbes do not have access to the carbon. However, even after coupling, the nitro or amino groups of the molecules may still be available to cleavage reactions. Nonextractable residues are suspected to contain still toxic primary TNT metabolites but are resistant to further microbial degradation, with a turnover <2% per year [3]. A cleavage of nitro groups from TNT or of amino groups from primary reduction products ADNT or DANT improves the biodegradability of the compounds [28] and thus can be considered as a detoxification mechanism. Inorganic N products released from TNT in the experiments showed a dramatic increase in the  $^{15}\text{N}$  enrichment of up to 7.6 atom% abundance for  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  and up to 1 atom% for  $\text{NH}_4^+$  during incubation in comparison to the natural  $^{15}\text{N}$  abundance of 0.37 atom% (Table 4). Considering an initial  $^{15}\text{N}$  abundance of 48 atom% in the applied TNT and predominantly oxic conditions in the soil, it can be seen that the major process of N release was a result of the cleavage of the nitro groups from TNT and only smaller amounts were released by cleavage of  $\text{NH}_2$ -groups after reduction of TNT. However, the released  $\text{NO}_2^-$  must be oxidized to  $\text{NO}_3^-$  immediately by microbial or abiotic processes. The results show for the first time that the release of inorganic N species from  $^{15}\text{N}$ -labeled organic compounds in

complex soil systems can be assessed semiquantitatively by analyzing the isotope enrichment of the products.

Gaseous compounds such as  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2$  also were found in significant amounts of up to 1.5% (Tables 2 and 3). The amounts released show that  $\text{N}_2\text{O}$  formation and denitrification were not the predominant processes of TNT mineralization in the soil. However,  $\text{N}_2\text{O}$  was found to be generated in the experiments with exceptional  $^{15}\text{N}$  abundances of 12 to 30 atom% (Table 4) and up to a maximum of 38 atom% at day 36 in the soil treated by the fungal process. The high  $^{15}\text{N}$  enrichment indicates that both N atoms of the  $\text{N}_2\text{O}$  are derived from the parent [ $^{15}\text{N}$ ]TNT. Therefore, we propose that  $\text{N}_2\text{O}$  must have been formed by a novel process extracting both labeled N from TNT (see below) and that  $\text{N}_2\text{O}$  obviously is a relevant metabolite of TNT degradation in soil.

Several reports about nitrite release by pure bacterial cultures in aerobic liquid media are available, but a denitration of TNT in soils has not been reported until now. A denitration of polynitrated aryls already has been described two decades ago [23]. The release of  $\text{NO}_2^-$  and the formation of the corresponding hydroxylated catechols were observed at a later date in pure cultures of *Pseudomonas fluorescense* that used TNT as sole source of N [19]. The denitration product 2,4-DNT led to the conclusion that nitrite was cleaved from the ring via a formation of a TNT-Meisenheimer complex [20]. The Meisenheimer complex is formed after hydride addition to the aromatic ring as shown for di- and trinitrophenols [26] and leads to the reductive cleavage of nitrite. The pentaerythritol reductase isolated from *Enterobacter cloacae* was shown to be the enzyme responsible for the reduction of TNT to the complex and for the release of nitrite [33]. A *Staphylococcus* sp. [34] and a *Pseudomonas savastanoi* strain [21] were able to release nitrite from TNT, generating 2A–4NT, by a similar

Table 5.  $^{15}\text{N}$  isotopic composition of amino acids after degradation of [ $^{15}\text{N}$ ]TNT in native soil and in soil after treatment with *Stropharia rugosoannulata* on wheat straw<sup>a</sup>

Sample	Amino acid	$^{15}\text{N}$ $\delta$ permille <sup>b</sup>							
		Gly	Thr	Ser	Val	Leu	Ile	Asn	Phe
Nonlabeled	Standard <sup>b</sup>	-4.0	3.0	6.3	3.2	-0.6	-0.9	-4.8	-3.4
	Reference soil	ND	-3.3	-3.0	14.9	4.9	2.0	7.1	7.6
	Reference straw	5.2	10.2	-5.6	1.7	0.7	3.9	5.6	7.6
	Native soil 28 d	248	20.0	11.2	13.1	6.0	12.1	44.7	40.5
$^{15}\text{N}$ -labeled	Soil + Fungus 28 d	304	29.3	21.6	23.9	42.9	40.7	210	ND
	Straw 28 d	236	139	236	262	315	310	250	234
	Straw 108 d	1,004	815	1,140	1,093	1,118	1,067	978	989

<sup>a</sup> Gly = glycine; Thr = threonine; Ser = serine; Val = valine; Leu = leucine; Ile = isoleucine; Asn = asparagine; Phe = phenylalanine.<sup>b</sup> 1,000  $\delta$  permille  $\approx$  0.75 atom%  $\approx$  0.39 atom% excess.

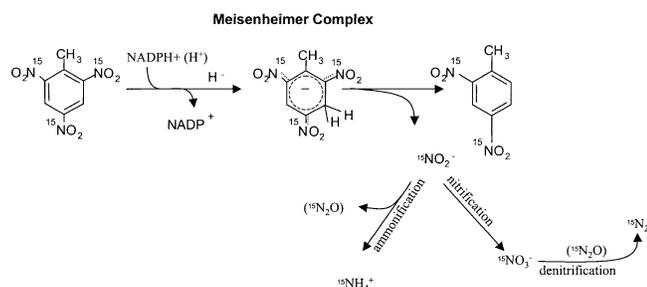


Fig. 1. Proposed scheme of [<sup>15</sup>N]nitrite release from [<sup>15</sup>N]TNT via reduction and formation of a Meisenheimer complex. The released nitrite may be either oxidized to nitrate and subsequently reduced to N<sub>2</sub>, or initially reduced to ammonia. Both reactions also may result in the formation of N<sub>2</sub>O. (NADPH = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate.)

type of reaction. NO<sub>2</sub><sup>-</sup> derived from TNT then serves as N source for several bacteria (e.g., *Pseudomonas* sp. [20,27,28] or *Nocardioides* sp. [26]). The only known pathway that releases NO<sub>2</sub><sup>-</sup> from TNT is the generation of a Meisenheimer complex; therefore, we propose that the cleavage of <sup>15</sup>N from TNT proceeds via this reaction (Fig. 1). Whereas until now the Meisenheimer complex only has been monitored in liquid media [3,26], we present indirect evidence here for the relevance of this reaction in soil, namely the isotopic enrichment of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Denitrated metabolites could not be detected in the present soil experiments. This lack of detection is considered to be caused by a rapid coupling of the products to soil organic matter or by microbial degradation of such compounds as described for soil slurries [28]. However, if the bacterial mineralization of denitrated compounds were to play a relevant role in this soil, a much higher mineralization of the <sup>14</sup>C label should have been observed and thus coupling reactions to soil organic matter are much more likely.

Under anaerobic conditions, *Pseudomonas* strain JLR11 was able to release nitrite from TNT with subsequent reduction to NH<sub>4</sub><sup>+</sup> [27]. The sequential reduction of the nitro groups of TNT to ADNT and DANT also involves the cleavage of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> from the aromatic ring. Pure cultures of obligate anaerobic bacteria [5] were found to be able to eliminate NH<sub>4</sub><sup>+</sup> from reduced primary TNT metabolites. A *Pseudomonas fluorescens* strain also was found able to release NH<sub>4</sub><sup>+</sup> from TNT under such conditions [23]. In the present experiments, a cleavage of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> from TNT in soils was proven for the first time by the enrichment of <sup>15</sup>NH<sub>4</sub><sup>+</sup> up to 0.8 atom% (Table 4). Hydroxylaminolyases belong to the nitroreductase enzymes and may cause a release of NH<sub>3</sub> from hydroxylaminophenols [22]. Boopathy et al. [24,35] observed the release of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> under anaerobic conditions by *Desulfovibrio* sp., but some authors argued whether a denitration or a deamination of TNT was the initial cleavage process for the generation of the dinitrotoluene [14]. Oxidative deamination of ADNT or DANT by mono- or dioxygenases may provide another pathway leading to the formation of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> [5,23]. Even a disintegration of TNT by abiotic reactions with Fe<sup>0</sup> may result in a release of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> [36]. After the reduction of TNT to a HADNT, an additional hydroxylation reaction may lead to a rearrangement forming phenolic compounds. This reaction is called Bamberger rearrangement and makes nitrated aryls more bioavailable [37]. Once the ring is hydroxylated, oxygenases degrade these products more readily. Hawari et al. [25] found the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* able to degrade TNT via the

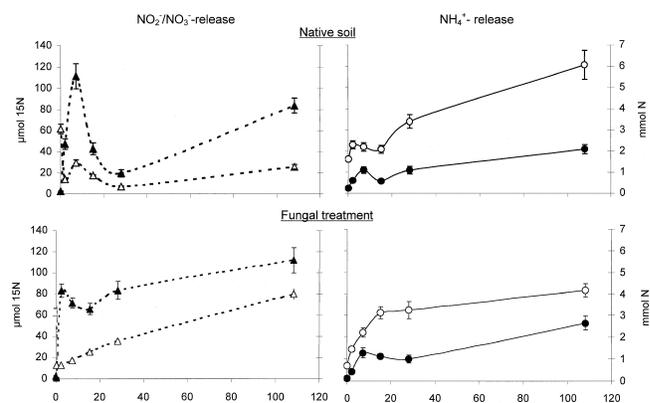


Fig. 2. Total nitrite/nitrate-N, ammonia-N, and [<sup>15</sup>N] release during the time course of the experiment. ▲ = NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-<sup>15</sup>N [μmol]; △ = NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N<sub>total</sub> [mmol]; ● = NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-<sup>15</sup>N [μmol]; ○ = NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N<sub>total</sub> [mmol].

Bamberger rearrangement in liquid cultures. However, despite the formation of more readily degradable metabolites, the C-mineralization of TNT did not exceed 1% [25], which suggests that TNT only acts as N source. The low <sup>15</sup>N enrichment of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (≈0.8 atom%) observed in the present experiments shows that NH<sub>4</sub><sup>+</sup> release is a relevant but not the dominant process of <sup>15</sup>N release. No other processes of N release with formation of hydroxylamine have been reported and no information on fungal denitration capabilities is available. Therefore, the most likely major process of <sup>15</sup>N release from TNT with formation of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> is summarized in Figure 1.

Considering the time course of the occurrence of [<sup>15</sup>N]TNT mineralization products and the <sup>15</sup>N abundance, we can provide evidence for the relevant degradation pathways of microorganisms coping with the toxic substrate TNT. The measured amounts and <sup>15</sup>N abundances in NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> are presented in Figure 2 and in Table 4. During the first few days of incubation, an immediate increase of [<sup>15</sup>N]NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> was observed in both native soil and with the fungal treatment. Although the increase was slower with the fungal treatment, it remained on a high level during the experiment whereas the release slowed down after 7 d in the native soil. The highest release was reached at day 7, when almost 7.6 atom% abundance of <sup>15</sup>N was detected. The increase in the <sup>15</sup>N abundance occurred in parallel to the general increase of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> release in the native soil, but with the fungal treatment a continuously increasing release of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> was observed. A second increase of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> release after 20 d of incubation in the native soil of about 5 to 6 atom% indicates an additional process of N release that may be related to the turnover of nonextractable soil residues (see also Table 3). We detected only a release of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> but not of NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, which also was observed in experiments with Fenton's reagents [38]. Thus, the released NO<sub>2</sub><sup>-</sup> has to be oxidized immediately to NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. The amount of released <sup>15</sup>NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/<sup>15</sup>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> represents 1.5 to 2% of the applied <sup>15</sup>N from [<sup>15</sup>N]TNT both in the native soil and in the soil treated by the fungal process, respectively. The inoculation of the soil with the fungus *S. rugosoannulata* did not result in a significantly higher release of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> compared to the autochthonous microflora (Tables 1 and 2) although a much higher amount of TNT was metabolized. This is probably due to the assimilation of released N compounds by the fungal biomass.

The release of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> started immediately within the first few days, but at a lower level compared to the NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> release,

and remained nearly constant during the incubation period. The maximum  $^{15}\text{N}$  abundance of 1.2 atom% was reached by the fungal treatment on day 7. The release of  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  occurred simultaneously, suggesting at least two processes of  $^{15}\text{N}$  release. The  $^{15}\text{NH}_4^+$  is considered to be cleaved from the molecule after the reduction of TNT to ADNT or DANT; this may explain the fact that the initial amount of  $^{15}\text{N}$  released as  $\text{NH}_4^+$  was only a quarter of the amount released as  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ . Thus, denitrification must be considered to be the dominant pathway of  $^{15}\text{N}$  release from TNT. The time courses of  $\text{NH}_4^+$  release in native soil and with fungal treatment were similar, indicating that the effect of the fungal-mediated  $\text{NH}_4^+$  release was not very pronounced.

After the initial bursts of  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  release, a lower release was observed between 30 and 107 d of incubation. Based on the release within this period, the average release of  $^{15}\text{N}$  can be estimated to 280  $\mu\text{mol}$  TNT-N per year (76% as nitrite-N and 24% as ammonia-N) with fungal treatment and as 380  $\mu\text{mol}$  TNT-N per year (46% as nitrite-N and 54% as ammonia-N) in the native soil. These data would represent an N mineralization of 5 to 7% of the applied TNT-N and/or of nonextractable residues per year under these incubation conditions. These rates are higher than the turnover of 2% calculated for the carbon-derived residues from  $^{14}\text{C}$ TNT [39]. With the addition of fungi, the release of  $^{15}\text{N}$  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  occurred simultaneously to the general N release at a high level, whereas in the native soil a higher  $^{15}\text{N}$  release was observed at the beginning.

Both  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$  are known to be products of TNT-Meisenheimer complexes or of reduced metabolites such as HADNT, ADNT, or DANT. In a combined anaerobic/aerobic soil slurry experiment, HADNT and azoxytetranitrotoluenes also appeared in concentrations up to 33 mg/kg soil in the initial incubation phase but were nearly undetectable after the final aerobic incubation period [17]. Fast processes of binding 2-HADNT or 4-HADNT to soil organic matter were proposed as the reasons for the disappearance of these compounds at the end of the experiments [3]. Under aerobic conditions, the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium* degraded azoxytetranitrotoluenes quickly; other fungi are considered to be able to degrade such azo-compounds as well [5]. However, to the best of our knowledge,  $\text{N}_2\text{O}$  never has been described as a product of primary TNT degradation until now. With a  $^{15}\text{N}$  abundance of around 30 atom% (Table 4) and a maximum of up to 38 atom% determined at day 36 in soil subjected to the fungal treatment, we present evidence that  $\text{N}_2\text{O}$  is a metabolite of TNT and that both N atoms of the molecule must have been derived from the parent  $^{15}\text{N}$ TNT (48 atom%).

The different processes that theoretically may generate  $\text{N}_2\text{O}$  from TNT are depicted in Figure 3. Bold arrows represent more probable routes, whereas thin-lined arrows are considered to be unlikely. It is not possible for  $\text{N}_2\text{O}$  to have been generated by incomplete oxidation of  $\text{NH}_4^+$  (nitrification) cleaved from reduced TNT metabolites. In this process, the  $^{15}\text{N}$  abundance of <1.2 atom% in the  $\text{NH}_4^+$  cannot lead to the formation of  $\text{N}_2\text{O}$  carrying a higher abundance. On the other hand,  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  could have been the origin of  $\text{N}_2\text{O}$  in a denitrification process. If  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  with an  $^{15}\text{N}$  enrichment of 8 atom% cleaved from the labeled TNT were to be used for an incomplete denitrification process, a similar  $^{15}\text{N}$  enrichment of  $\text{N}_2\text{O}$  and  $\text{N}_2$  should occur (Fig. 3a). However, the oxic conditions of incubation and the fact that two labeled molecules would have to be combined clearly indicate against this

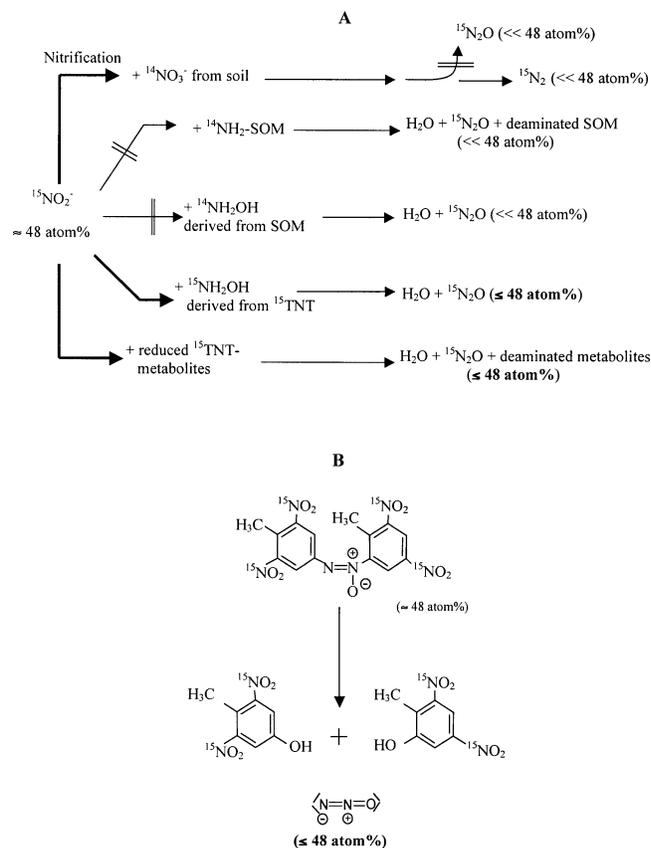


Fig. 3. Proposed scheme of  $^{15}\text{N}_2\text{O}$ -formation from  $^{15}\text{N}$ TNT incubated in soil. The source of the  $^{15}\text{N}_2\text{O}$  may be either (A) nitrite or nitrate with different formation pathways or (B) an azoxytetranitrotoluene compound with subsequent hydrolysis. The cleavage of azoxytetranitrotoluenes provides an isotopic composition of the  $\text{N}_2\text{O}$  that can be similar to the parent TNT (for details see text). SOM = soil organic matter.

possibility. Indeed, the process of denitrification would result in a decrease rather than an increase of the abundance due to dilution with N species derived from native N pools with natural abundance (0.37 atom%). If  $\text{NO}_2^-$  derived from  $^{15}\text{N}$ TNT were to react with amino groups from soil organic matter according to the van Slyke reaction [40], the  $^{15}\text{N}$  abundance of  $\text{N}_2\text{O}$  would be much smaller. This also would apply for the reaction with soil-derived hydroxylamines. The possibility that TNT-derived  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  could react with TNT-derived hydroxylamines, ADNT, or DANT is not very likely in the presence of natural N compounds in the soil that would dilute the  $^{15}\text{N}$  content significantly.

The most probable explanation of  $\text{N}_2\text{O}$  formation is the hydrolysis or a hydroxyl radical attack at azoxytetranitrotoluenes with subsequent hydrolysis. Azoxytetranitrotoluenes were detected in trace amounts in the described experiments; they generally are present under anoxic degradation conditions [18] as well as under oxic conditions and were even found with the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium* [5]. The proposed cleavage of azoxytetranitrotoluenes leads to  $\text{N}_2\text{O}$  and two denitrated toluenes: 2,4-dinitro-6-hydroxytoluene and 2,6-dinitro-4-hydroxytoluene (Fig. 3b). Because both  $^{15}\text{N}$  atoms would stem from a single molecule, the reaction clearly explains the observed  $^{15}\text{N}$  abundance of  $\text{N}_2\text{O}$  of up to 38 atom%, which almost reaches the initial abundance of the parent labeled TNT of (48 atom%).

In addition, the TNT-derived <sup>15</sup>N transferred into the straw–mycelia layer amounted to up to 1.7% of the applied TNT (Table 2). Therefore, we compared the incorporation of the <sup>15</sup>N label into amino acids in soil and straw after 28 d and at the end of incubation to nonlabeled reference materials (Table 5). The <sup>15</sup>N enrichment of certain amino acids shows for the first time that the transformation of TNT-N in soil is coupled to the formation of biomass. The amount incorporated into the biomass was found to be in the same range as the amount of TNT-derived N recovered in the inorganic N species NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (~2%).

The isotopic signature of amino acids in soil increased only slightly during the experiment, whereas a pronounced enrichment was observed in the straw–mycelium layer. This indicates hyphal growth into the soil and an active transport of the <sup>15</sup>N label within the mycelium from soil to the straw layer. The <sup>15</sup>N derived from TNT was first found in glycine. The enrichment increased with incubation time: At the end of the experiment, the <sup>15</sup>N abundance of each amino acid in the straw layer was reported on the more sensitive δ ‰ scale at an average of ≈1,000, which corresponds to 0.75 atom% or 0.39 atom% excess. The <sup>15</sup>N enrichment of the amino acids in the biomass on straw was determined as being in the same range as that detected for ammonia in both soil types (Tables 2 and 3). This indicates that the uptake of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> was the dominant pathway of N assimilation, which is consistent with the observations on other soil fungi [41]. However, only small amounts of <sup>15</sup>N were found in the amino acids of the native soil, indicating that the fungus itself plays a decisive role in making the N from TNT bioavailable to serve as N source for the growth of the fungus *S. rugosoannulata*.

Our investigations with [<sup>15</sup>N]TNT have shown the different fates of C and N from TNT and have elucidated processes that cannot be observed with <sup>14</sup>C-labeled TNT. Thus, stable isotope labeling is a powerful tool for analyzing compound turnover in complex environmental systems. Details of the new cleavage reaction of azoxytetranitrotoluenes still have to be investigated in additional experiments.

**Acknowledgement**—The work was funded by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF, Grant 14810925) and by a grant from the Centre for Environmental Research. We thank Matthias Gehre for assistance with the GC-C-IR-MS analyses and Mario Kröger, University of Paderborn for the determination of azoxy-compounds.

## REFERENCES

- Fritsche W, Scheibner K, Herre A, Hofrichter M. 2000. Fungal degradation of explosives: TNT and related nitroaromatic compounds. In Spain J, Hughes JB, Knackmuss H-J, eds, *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp 213–215.
- Axtell C, Johnston CG, Bumpus JA. 2000. Bioremediation of soil contaminated with explosives at the Naval Weapons Station, Yorktown. *Soil and Sediment Contamination* 9:537–548.
- Lenke H, Achtnich C, Knackmuss H-J. 2000. Perspectives of biodegradation of polynitroaromatic compounds. In Spain J, Hughes JB, Knackmuss H-J, eds, *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp 91–126.
- Bruns-Nagel D, Steinbach K, Gamsa D, von Löw E. 2000. Composting (humification) of nitroaromatic compounds. In Spain J, Hughes JB, Knackmuss H-J, eds, *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp 357–393.
- Esteve-Núñez A, Caballero A, Ramos JL. 2001. Biological degradation of 2,4,6-trinitrotoluene. *Microbiol Mol Biol Rev* 65:335–352.
- Achtnich C, Lenke H, Klaus U, Spittler M, Knackmuss H-J. 2000. Stability of immobilized TNT derivatives in soil as a function of nitro group reduction. *Environ Sci Technol* 34:3698–3704.
- Drzyzga O, Bruns-Nagel D, Gorontzy T, Blotvogel KH, Gamsa D, von Löw E. 1998. Incorporation of <sup>14</sup>C-labeled 2,4,6-trinitrotoluene metabolites into different soil fractions after anaerobic and anaerobic–aerobic treatment of soil/molasses mixtures. *Environ Sci Technol* 32:3529–3535.
- Heiss G, Knackmuss H-J. 2002. Bioelimination of nitroaromatic compounds: Immobilization versus mineralization. *Curr Opin Microbiol* 5:282–287.
- Boopathy R. 2002. Effect of food-grade surfactant on bioremediation of explosives-contaminated soil. *J Hazard Mater* 92:103–140.
- Bruns-Nagel D, Knicker H, Drzyzga O, Bütehorn U, Steinbach K, Gamsa D, von Löw E. 2000. Characterization of <sup>15</sup>N-TNT residues after an anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures by solid-state <sup>15</sup>N NMR spectroscopy. 2. Systematic investigation of whole soil and different humic fractions. *Environ Sci Technol* 34:1549–1556.
- Knicker H. 2002. Incorporation of <sup>15</sup>N-TNT transformation products into humifying plant organic matter as revealed by one- and two-dimensional solid state NMR spectroscopy. *Sci Total Environ* 308:211–220.
- Knicker H, Bruns-Nagel D, Drzyzga O, von Löw E, Steinbach K. 1999. Characterization of <sup>15</sup>N-TNT residues after an anaerobic/aerobic treatment of soil/molasses mixtures by solid-state <sup>15</sup>N NMR spectroscopy. 1. Determination and optimization of relevant NMR spectroscopic parameters. *Environ Sci Technol* 33:343–349.
- Thorn KA, Pennington JC, Hayes CA. 2002. <sup>15</sup>N NMR investigation of the reduction and binding of TNT in an aerobic bench scale reactor simulating windrow composting. *Environ Sci Technol* 36:3797–3805.
- Thiele S, Fernandes E, Bollag J-M. 2002. Enzymatic transformation and binding of labeled 2,4,6-trinitrotoluene to humic substances during an anaerobic/aerobic incubation. *J Environ Qual* 31:437–444.
- Wang C-J, Tiele S, Bollag J-M. 2002. Interaction of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) and 4-amino-2,6-dinitrotoluene with humic monomers in the presence of oxidative enzymes. *Arch Environ Toxicol* 42:1–8.
- Haderlein SB, Hofstetter Th B, Schwarzenbach RP. 2000. Sub-surface chemistry of Nitroaromatic Compounds. In Spain J, Hughes JB, Knackmuss H-J, eds, *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp 311–356.
- Achtnich C, Fernandes E, Bollag J-M, Knackmuss H-J, Lenke H. 1999. Covalent binding of reduced metabolites of [<sup>15</sup>N3] TNT to soil organic matter during a bioremediation process analyzed by <sup>15</sup>N NMR spectroscopy. *Environ Sci Technol* 33:4448–4456.
- Achtnich C, Sieglén U, Knackmuss H-J, Lenke H. 1999. Irreversible binding of biologically reduced 2,4,6-trinitrotoluene to soil. *Environ Toxicol Chem* 18:2416–2423.
- Duque E, Haidour A, Godoy F, Ramos JL. 1993. Construction of a *Pseudomonas* hybrid strain that mineralizes 2,4,6-trinitrotoluene. *J Bacteriol* 175:2278–2283.
- Haidour A, Ramos JL. 1996. Identification of products resulting from the biological reduction of 2,4,6-trinitrotoluene, 2,4-dinitrotoluene and 2,6-dinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. *Environ Sci Technol* 30:2365–2370.
- Martin JL, Comfort SD, Shea PJ, Kokjohn TA, Drijber RA. 1997. Denitration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas savastanoi*. *Can J Microbiol* 43:447–455.
- Meulenbergh R, Pepi M, de Bont JAM. 1996. Degradation of 3-nitrophenol by *Pseudomonas putida* B2 occurs via 1,2,4-benzenetriol. *Biodegradation* 7:303–311.
- Naumova RP, Selivanovskaya SY, Cherepneva IE. 1989. Conversion of 2,4,6-trinitrotoluene under conditions of oxygen and nitrate respiration of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl Biochem Microbiol* 24:493–498.
- Boopathy R, Kulpa CF. 1992. Trinitrotoluene as a sole nitrogen source for a sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio* sp. (B strain) isolated from an anaerobic digester. *Curr Microbiol* 25: 235–241.
- Hawari J, Halasz A, Beaudet S, Paquet L, Ampleman G, Thiboutot S. 1999. Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene with *Phaner-*

- ochaete chrysosporium* in agitated cultures at pH 4.5. *Appl Environ Microbiol* 65:2977–2986.
26. Behrend C, Heesche-Wagner K. 1999. Formation of hydride-meisenheimer complexes of picric acid (2,4,6-trinitrophenol) and 2,4-dinitrophenol during mineralization of picric acid by strain *Nocardoides* sp. Strain CB 22–2. *Appl Environ Microbiol* 65:1372–1377.
  27. Esteve-Núñez A, Luchessi G, Philipps B, Schink B, Ramos JL. 2000. Respiration of 2,4,6-trinitrotoluene by *Pseudomonas* sp. strain JLR11. *J Bacteriol* 182:1352–1355.
  28. Nishino SF, Spain JC, Lenke H, Knackmuss H-J. 1999. Mineralization of 2,4- and 2,6-dinitrotoluene in soil slurries. *Environ Sci Technol* 33:1060–1064.
  29. Scheibner K, Hofrichter M, Herre A, Michels J. 1997. Screening for fungi intensively mineralizing 2,4,6 trinitrotoluene. *Appl Microbiol Biotechnol* 47:452–457.
  30. Richnow HH, Annweiler E, Koning M, Lüth J-C, Stegmann R, Garms C, Francke W, Michaelis W. 2000. Tracing the transformation of labeled [ $^{13}\text{C}$ ] Phenanthrene in a soil bioreactor. *Environ Pollut* 108:91–101.
  31. Bremner JM. 1982. Nitrogen-inorganic forms. In Page AL, ed, *Methods of Soil Analysis; Part 2: Chemical and Microbiological Properties*. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison, WI, pp 643–658.
  32. Dawel G, Kästner M, Michels J, Poppitz W, Günther W, Fritsche W. 1997. Structure of a laccase-mediated product of a coupling of 2,4-diamino-6-nitrotoluene to guaiacol, a model for coupling of 2,4,6-trinitrotoluene metabolites to a humic organic soil matrix. *Appl Environ Microbiol* 63:2560–2565.
  33. French CE, Nicklin S, Bruce NC. 1998. Aerobic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by penterythritol tetranitrate reductase. *Appl Environ Microbiol* 64:2864–2868.
  34. Kalafut T, Wales ME, Rastogi VK, Naumova RP, Zaripova SK, Wild JR. 1998. Biotransformation patterns of 2,4,6-trinitrotoluene by aerobic bacteria. *Curr Microbiol* 36:45–54.
  35. Boopathy R, Kulpa CF, Wilson M. 1992. Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Desulfovibrio* sp. (B strain). *Appl Microbiol Biotechnol* 39:270–275.
  36. Hundal LS, Singh J, Bier EL, Shea PJ, Comfort SD, Powers WL. 1997. Removal of TNT and RDX from water and soil using iron metal. *Environ Pollut* 97:55–64.
  37. Hughes JB, Wang C, Yesland K, Richardson A, Bharda R, Bennett G, Rudolph F. 1998. Bamberger rearrangement during TNT metabolism by *Clostridium acetobutylicum*. *Environ Sci Technol* 32:494–500.
  38. Li ZM, Shea PJ, Comfort SD. 1998. Nitrotoluene destruction by UV-catalyzed fenton oxidation. *Chemosphere* 36:1849–1865.
  39. Achtnich C, Lenke H. 2001. Stability of immobilized 2,4,6-trinitrotoluene metabolites in soil under long-term leaching conditions. *Environ Toxicol Chem* 20:280–283.
  40. Porter LK. 1969. Gaseous products produced by anaerobic reaction of sodium nitrite with oxime compounds and oximes synthesized from organic matter. *Soil Sci Soc Am Proc* 33:696–702.
  41. Hawkins H-J, George E. 2001. Reduced  $^{15}\text{N}$ -nitrogen transport through Arbuscular mycorrhizal hyphae to *Triticum aestivum* L. supplied with ammonia vs. nitrate nutrition. *Ann Bot (Lond)* 87:303–311.