

**Applikation des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors  
auf nitroaromatische Verbindungen am Beispiel von  
Rüstungsaltsen**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Oliver Schulz

aus

Euskirchen

Bonn 2006



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. H. Schnabl
2. Referent: Prof. Dr. D. Volkmann

Tag der Promotion: 13.10.2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert

Erscheinungsjahr: 2006



Für meinen Vater, der immer an mich geglaubt hat.

Ich verstehe Dich auch ohne Worte.

Danke.



<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
1.1	PHOTOSYNTHETISCHER ELEKTRONENTRANSPORT .....	6
1.2	FLUORESZENZ ALS INDIKATOR FÜR INHIBIERENDE EINGRIFFE IN DIE PHOTOSYNTHESE .....	9
1.3	GRUNDLAGEN BIOSENSORISCHER NACHWEISVERFAHREN .....	13
1.4	EIGENSCHAFTEN NITROAROMATISCHER VERBINDUNGEN UNTER BERÜCKSICHTIGUNG VON TNT.....	16
1.5	BISHERIGER UMGANG MIT NITROAROMATISCHEN KONTAMINATIONEN .....	17
1.5.1	Sanierungen auf den Gebieten mit nitroaromatischen Kontaminationen .....	18
1.5.1.1	Nichtbiologische Sanierungsverfahren .....	18
1.5.1.2	Biologische Sanierungsverfahren .....	19
1.5.1.3	Konkrete Sanierungsprojekte an exemplarischen Standorten.....	21
1.6	BESCHREIBUNG NITROAROMATISCHER KONTAMINATIONEN IN BÖDEN ANHAND AUSGEWÄHLTER RÜSTUNGSALTLASTEN.....	23
1.7	ZIELSETZUNG.....	27
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>29</b>
2.1	GERÄTELISTE.....	29
2.2	NITROAROMATISCHE STANDARDS.....	30
2.2.1	Verwendete Standards.....	30
2.2.2	Angefertigte Standardlösungen für die biosensorischen Messungen .....	30
2.3	ISOLIERUNG VON THYLAKOIDMEMBRANEN ALS BIOLOGISCHE EINHEIT .....	32
2.4	LYOPHILISATION DER ISOLIERTEN MEMBRANEN ZUR KONSERVIERUNG.....	34
2.5	PAM-FLUORESZENZ-MESSUNGEN MIT DEM CHLOROPLASTEN-THYLAKOID-BIOSENSOR – AUFBAU UND ZEITLICHER ABLAUF .....	35
2.5.1	Prinzip der Messung.....	36
2.5.2	Durchführung der Messung.....	37
2.6	HPLC-MESSUNG VON NITROAROMATISCHEN VERBINDUNGEN .....	40
2.6.1	HPLC-Methodik.....	40
2.6.2	Durchführung der Messungen .....	41
2.7	DOTIERUNG DER STANDARDBÖDEN MIT TNT.....	42
2.7.1	Für die Dotierung verwendete Bodentypen.....	42
2.7.2	Dotierung der Bodenproben.....	43
2.8	REALKONTAMINIERTER BÖDEN .....	43
2.9	EXTRAKTIONEN NITROAROMATISCHER VERBINDUNGEN AUS BÖDEN.....	44
2.9.1	Lösungsmittel.....	44
2.9.2	Verwendung unterschiedlicher Extraktionsmethoden zur Bestimmung der Wiederfindungsrate von TNT aus Böden .....	45
2.9.3	Getestete Extraktionsverfahren .....	45
2.9.3.1	Extraktion mittels Ultraschallbehandlung .....	45
2.9.3.2	Extraktion mittels Rühren.....	46
2.10	MESSUNG DES PH-WERTES VON BÖDEN.....	47
2.10.1	Bestimmung der realen Acidität.....	47
2.10.2	Bestimmung der potenziellen Acidität .....	47
2.11	BESTIMMUNG DES KOHLENSTOFF- UND STICKSTOFFGEHALTES VON BÖDEN .....	48
2.12	GRUNDLAGEN DER OBERFLÄCHEN-PLASMON-RESONANZ-TECHNOLOGIE UND IHRE BIOSENSORISCHE ANWENDUNG AUF DEN NACHWEIS VON TNT .....	48
2.12.1	Theoretische Grundlagen und Prinzip der Messung.....	48
2.12.2	Nachweis von TNT über einen kompetitiven Immunoassay mittels SPR.....	50
2.12.3	Präparation der Chipoberflächen.....	51
2.12.3.1	Herstellung von Trinitrobenzol-Sulfonsäure-BSA-Kopplungen .....	51
2.12.3.2	Kopplung von TNB-BSA an die Goldoberfläche des SPR-Chips .....	52
2.12.4	Vorbereitung der Messungen .....	53
2.12.4.1	Ansetzen der TNT-Standard-Lösungen.....	53
2.12.4.2	Messung der TNT-Standard-Lösungen .....	54
2.12.4.3	Aufbau und Durchführung der Messungen .....	55
2.12.4.4	Ansetzen und Umpufferung der Proben .....	56
2.12.4.5	Messung der Bodenproben .....	57
2.13	ANGEWENDETE STATISTISCHE VERFAHREN .....	59
2.13.1	Ausreißertest nach Nalimov .....	59
2.13.2	t-Test auf Unterschiedlichkeit zweier Grundgesamtheiten.....	59

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>61</b>
3.1	HEMMUNG DES PHOTOSYNTHETISCHEN ELEKTRONENTRANSPORTS DURCH NITROAROMATISCHE VERBINDUNGEN.....	61
3.1.1	Wirkung von TNT auf den Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor .....	61
3.1.1.1	Wirkung von TNT in wässriger Lösung auf den photosynthetischen Elektronentransport .....	61
3.1.1.1.1	Ohne Behandlung der Lösungen .....	61
3.1.1.1.2	Mit Ultraschallbehandlung.....	63
3.1.1.1.3	Vergleich mit/ohne Ultraschallbehandlung.....	64
3.1.1.2	Zeitlicher Einfluss auf die Inhibierung der photosynthetischen Elektronentransportkette durch TNT .....	65
3.1.1.3	Erstellung einer TNT-Eichkurve mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor .....	66
3.1.2	Wirkung von nitroaromatischen Verbindungen auf den Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor .....	69
3.1.2.1	Reproduzierbarkeit der biosensorischen Messwerte der nitroaromatischen Verbindungen.....	69
3.1.2.2	Beeinflusste Größen der Fluoreszenz durch nitroaromatische Verbindungen .....	71
3.2	ETABLIERUNG EINER CHEMISCHEN REFERENZMETHODE (HPLC) ZUR QUANTITATIVEN ANALYSE VON TNT UND DESSEN METABOLITEN .....	71
3.2.1	HPLC-Eichgerade von TNT und Metaboliten .....	73
3.3	ENTWICKLUNG EINER GEEIGNETEN EXTRAKTIONSMETHODE FÜR NITROAROMATISCHE VERBINDUNGEN AUS BÖDEN.....	76
3.3.1	Einfluss von unterschiedlichen Lösungsmitteln auf die biologische Einheit des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors.....	76
3.3.2	Einfluss verschiedener Extraktionsverfahren auf die Wiederfindungsrate von TNT .....	78
3.3.2.1	Extraktion von TNT aus dotiertem Boden mittels Ultraschall.....	78
3.3.2.2	Extraktion von TNT aus dotiertem Boden durch Rühren .....	79
3.3.2.2.1	Einfluss von Temperaturänderungen.....	79
3.3.2.2.2	Einfluss der Extraktionszeit .....	79
3.4	EINFLUSS VON BODENEXTRAKTEN AUF DIE AKTIVITÄT DER BIOLOGISCHEN EINHEIT DES CHLOROPLASTEN-THYLAKOID-BIOSENSORS .....	80
3.5	EINFLUSS DER BODENMATRIX AUF DIE TNT-WIEDERFINDUNGSRATE IN DOTIERTEN BÖDEN.....	81
3.5.1	TNT-Wiederfindungsraten nach HPLC .....	81
3.5.2	TNT-Wiederfindungsraten nach biosensorischen Messungen mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor.....	83
3.5.3	Gegenüberstellung der mittels HPLC und Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor ermittelten TNT-Konzentrationen .....	84
3.5.4	TNT-Wiederfindungsraten nach HPLC im Verhältnis zum Kohlenstoff-/Stickstoffgehalt .....	85
3.5.4.1	Kohlenstoffgehalt .....	85
3.5.4.2	Stickstoffgehalt.....	86
3.5.4.3	Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnis.....	87
3.5.5	TNT-Wiederfindungsraten nach HPLC in Gegenüberstellung zu den potenziellen und realen pH-Wert der Böden .....	88
3.6	ANALYSE REALKONTAMINierter BODENPROBEN.....	89
3.6.1	Charakterisierung der realkontaminierten Böden.....	89
3.6.2	Analyse der Böden mittels des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors .....	95
3.6.3	Beeinflussung der Wiederfindungsrate durch die Bodenmatrix in den realkontaminierten Böden.....	97
3.6.3.1	Wirkung des Kohlenstoffgehalts auf die Wiederfindungsrate von TNT aus realkontaminierten Böden .....	97
3.6.3.2	Wirkung des Stickstoffgehaltes auf die Wiederfindungsrate von TNT aus realkontaminierten Böden.....	99
3.6.3.3	Einfluss des Kohlenstoff/Stickstoffverhältnisses auf die Wiederfindungsrate von TNT aus realkontaminierten Böden .....	100
3.6.3.4	Wirkung der realen und potenziellen pH-Werte auf die Wiederfindungsrate von TNT aus realkontaminierten Böden .....	100
3.7	UNTERSUCHUNG DER BÖDEN MITTELS EINER BIOSENSORISCHEN REFERENZ-METHODE: OBERFLÄCHEN-PLASMON-RESONANZ .....	101
3.7.1	Erstellung einer TNT-Eichkurve .....	101
3.7.2	Messung von TNT-kontaminierten Böden mittels SPR .....	104
3.7.2.1	SPR-Messungen der artifiziellen Bodenproben.....	104
3.7.2.2	SPR-Messungen der realkontaminierten Bodenproben .....	105
3.7.3	Vergleich der Ergebnisse der SPR mit den Aussagen der HPLC.....	106
3.7.3.1	Dotierte Böden .....	106
3.7.3.2	Realkontaminierte Böden .....	107
3.7.4	Vergleich der Ergebnisse der SPR mit den Aussagen des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors .....	108
3.7.4.1	Dotierte Böden .....	108
3.7.4.2	Realkontaminierte Böden .....	109



<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>113</b>
4.1	WIRKUNG VON NITROAROMATISCHEN VERBINDUNGEN AUF DEN CHLOROPLASTEN-THYLAKOID-BIOSENSOR .....	113
4.2	BIOSENSORISCHE DETEKTION VON TNT .....	116
4.2.1	Einfluss der Extraktionsbedingungen für die Herstellung von biosensorisch verwendbaren Extrakten .....	116
4.2.2	Ergebnisse der TNT-Eichmessungen mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor .....	120
4.3	GENAUIGKEIT DES CHLOROPLASTEN-THYLAKOID-BIOSENSORS IM NACHWEIS VON NITROAROMATEN. ....	122
4.3.1	Eichgeraden .....	122
4.3.2	Dotierte Böden .....	123
4.3.3	Realkontaminierte Böden .....	124
4.3.4	Vergleich dotierte und realkontaminierte Böden.....	125
4.4	EINFLUSS DER BODENMATRIX AUF DIE TNT-WIEDERFINDUNGSRATEN AUS ARTIFIZIELLEN UND REALKONTAMINIERTEN BÖDEN .....	128
4.4.1	Einfluss des Kohlenstoff-/Stickstoffgehaltes auf die Wiederfindungsrate von TNT aus Böden. ....	130
4.4.2	Einfluss des pH-Wertes auf die TNT-Wiederfindungsraten aus Böden.....	133
4.4.3	Abschließende Betrachtung des Bodenmatrix-Einflusses auf die Extrahierbarkeit von TNT.....	134
4.5	DETEKTION VON TNT AUF DER BASIS DER OBERFLÄCHEN-PLASMON-RESONANZ ALS BIOSENSORISCHES REFERENZSYSTEM ZUM CHLOROPLASTEN-THYLAKOID-BIOSENSOR UND DER HPLC .....	136
4.6	VERGLEICH DES CHLOROPLASTEN-THYLAKOID-BIOSENSORS MIT BESTEHENDEN ANALYSE-SYSTEMEN FÜR NITROAROMATEN .....	140
4.6.1	Vergleich mit klassischen Analyse-Systemen.....	140
4.6.2	Vergleich mit biologischen Analyse-Systemen.....	142
4.7	ABSCHLIEBENDE BEURTEILUNG UND AUSBLICK.....	146
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>149</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>153</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGS-/WORTVERZEICHNIS .....</b>	<b>175</b>
<b>8</b>	<b>CHEMIKALIENLISTE.....</b>	<b>179</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>181</b>
9.1	STATISTISCHE TABELLEN .....	181
9.2	NICHT DARGESTELLTE DATEN.....	182



# 1 Einleitung

Unter dem Gesichtspunkt einer zukunftsfähigen, nachhaltigen Entwicklung steht die Wissenschaft in der Verantwortung, Gefahren, die auf Mensch, Natur und Umwelt einwirken können, möglichst vollständig zu erkennen und zu beseitigen. Während im engeren Sinn die nachhaltige Entwicklung auf den heutigen Umgang mit Ressourcen in Hinblick auf zukünftige Generationen gerichtet ist, muss auch berücksichtigt werden, dass selbst die heutige Generation bereits eine große Belastung durch stark kontaminierte Ressourcen vorliegen hat. In den vergangenen Jahrzehnten fanden weniger ökologisch notwendige als vielmehr wirtschaftliche und vor allem machtpolitische Verhaltensweisen Anwendung, wie z. B. der Aufbau der Rüstungsindustrie in Deutschland nach der Machtübernahme der Nationalsozialisten 1933. Die Folgen solchen Handelns gefährden schon heute in Form von Altlasten die natürliche Umwelt.

Hierbei steht vor allem im Blickpunkt des Interesses, dass ein zerstörter Boden nicht wieder hergestellt werden kann, da die ihn erschaffende Pedogenese über Tausende von Jahren zum heute vorliegenden Boden geführt hat (Schachtschabel *et al.*, 1989). Auch bleibt durch die massenhafte Nutzung der natürlichen Ressourcen sowie deren chemischem Gebrauch die biologische Zyklisierung aus, die Einbringung von Kontaminationen forciert die Umweltprobleme weiter (Esteve-Núñez *et al.*, 2001). Vor allem stellen Böden nicht nur ein bedeutendes Puffer-, Filter- und Transformationssystem in der Umwelt dar, sondern sind darüber hinaus auch als Lebensraum im natürlichen Gefüge von essenzieller Bedeutung (Regener und Mekiffer, 1998). Aber auch die Reinhaltung des Grundwassers stellt einen entscheidenden Punkt im Streben nach Nachhaltigkeit dar. Hält man sich vor Augen, dass ca. 70 % des Trinkwassers in der Bundesrepublik Deutschland aus Grundwasser gewonnen werden (Sluys *et al.*, 2000), so lässt sich eine Kontamination desselben schon als eine Lebensmittelverseuchung ansehen (Hwang *et al.*, 2000).

In diesem Zusammenhang zeigt sich besonders in den Altlasten, welche Unmengen an Belastungen für Mensch, Natur und Umwelt bereits heute vorliegen. Auf dem Gebiet der „alten“ Bundesrepublik Deutschland ist die Zahl der bekannten Altlast-Flächen innerhalb der Jahre 1987 bis 2001 von 48.107 auf 258.379 angestiegen, was einer Steigerung um 440 % entspricht. Auf dem ganzen Bundesgebiet wurden 2001 sogar 362.689 Altlastflächen protokolliert (Henke, 2002).

Auch wenn zum Schutz des Menschen und der Umwelt die maximalen Belastungen von Boden und Grundwasser an Kontaminationen über die Bundes-Bodenschutz und Abfall-Verordnung von 1999 festgelegt sind, so ist die hier aufgeführte Liste an Grenzwerten nicht

als vollständig anzusehen. So fehlen z. B. Grenzwertbestimmungen für TNT und dessen Metabolite (Durner, 2002). Das Umweltbundesamt gibt lediglich Empfehlungen für Grenzwerte aus. Diese werden von der jeweilig angestrebten oder ausgeführten Nutzung abhängig gemacht. So liegt der allgemeine Besorgniswert für Böden bei einer Belastung von 5 mg TNT/kg, zur Vorsorge wird ab einem Wert von 1 mg TNT/kg geraten. Zum Schutz des Grundwassers liegt der empfohlene Prüfwert allerdings schon bei 20 mg TNT/kg, ebenso bei einer gewerblichen Nutzung der Fläche. Im Falle von Siedlungsgebieten empfiehlt das Umweltbundesamt einen Prüfwert von 5 mg TNT/kg Boden (Umweltbundesamt, 2004).

Vor allem ist aber zu sehen, dass es sich bei der Gefährdung von Boden und Wasser durch Kontaminationen jeglicher Art nicht um ein regionales, sondern um ein weltweites Problem handelt (Hawari *et al.*, 2000; Felt *et al.*, 2002).

Somit stellt sich der Wissenschaft die Aufgabe, Systeme zu entwickeln, die zum Schutz und zur Erhaltung der natürlichen Ressourcen beitragen, um ein Leben im Jetzt und für zukünftige Generationen zu ermöglichen.

## 1.1 Photosynthetischer Elektronentransport

In der belebten Natur stellt die Photosynthese den grundlegenden Prozess in der Bereitstellung von chemischer Energie und damit die Grundlage für das Leben dar. Die Grundgleichung der Photosynthese ist in Formel 1.1 zusammengefasst.



Ort der Photosynthese sind die Chloroplasten der Pflanzen, genauer die Thylakoide, in deren Membranen die photosynthetische Elektronentransportkette lokalisiert ist. Diese besteht aus drei integralen Membranproteinen, dem Photosystem II, dem Cytochrom-<sup>b</sup>/<sub>f</sub>-Komplex und dem Photosystem I. Kleinere, bewegliche Moleküle stellen zwischen diesen Komplexen eine Verbindung über die Weitergabe von Elektronen her. Durch diese beweglichen Moleküle erfolgt somit die Übertragung der aufgenommenen Lichtenergie auf den Elektronenendakzeptor des photosynthetischen Elektronentransports (PET), das NADP<sup>+</sup> (Richter, 1988).

Am Anfang der photosynthetischen Elektronentransportkette wird die Lichtenergie durch ein Netzwerk an miteinander in Verbindung stehenden Chlorophyllmolekülen und assoziierten Antennenpigmenten, dem so genannten LHC (Light Harvesting Complex = Lichtsammelnder-Komplex), aufgenommen, wodurch eine Elektronenanregung bewirkt wird. Diese Anregungsenergie äußert sich im Chlorophyllmolekül durch die Anhebung eines

Elektrons auf ein höheres Energieniveau bzw. auf ein  $\pi$ -Orbital. Je nach Energie des aufgenommenen Lichtquants erreicht das entsprechende Elektron den ersten (z. B. durch Anregung mit Rotlicht) oder einen höheren Singulett-Zustand (z. B. durch Anregung mit Blaulicht). Lediglich die Energie des ersten Singulett-Zustandes ist photochemisch nutzbar, die Energie höherer Zustände geht in Form von Wärme verloren (Lawlor, 1990; Sitte *et al.*, 1992; Nultsch, 1996; Harbinson und Rosenqvist, 2003, Rosenqvist und Kooten, 2003). Die Energie des ersten Singulett-Zustands geht auf ein Chlorophyll-Molekül mit speziellen Eigenschaften, dem Reaktionszentrum (P680) des Photosystems II (PS II) über, wo es zu einer Ladungstrennung führt. Kann die Anregungsenergie des LHC nicht an ein entsprechendes Reaktionszentrum übertragen werden, so geht sie in Form von Fluoreszenz chemisch ungenutzt verloren (Larcher, 1994, Harbinson und Rosenqvist, 2003).

Im angeregten Zustand überträgt das Reaktionszentrum ein Elektron auf Plastochinon, wodurch dieses in die photosynthetische Elektronentransportkette eintritt. Dabei ermöglicht erst eine anregungsverursachte Formationsänderung eine Reduktion von Plastochinon (Harbinson und Rosenqvist, 2003). Durch ein manganhaltiges Protein, welches in der Lage ist, Wasser zu spalten und Sauerstoff freizusetzen, erhält das nun oxidierte Reaktionszentrum sein Elektron wieder und kehrt in den Grundzustand, in dem alle Elektronen den gleichen energetischen Zustand haben (Harbinson und Rosenqvist, 2003), zurück. Das Plastochinon wird nun durch eine Zwei-Elektronen-Reduktion zum Plastochinol reduziert. Diese Übertragung ähnelt der Elektronenübertragung auf Ubichinon in den Mitochondrien, bei der Sauerstoff „verbraucht“ wird und nicht, wie in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten, wo durch Spaltung von Wasser Sauerstoff „entsteht“. In den Thylakoiden wird diese Elektronenübertragung von Wasser auf Plastochinon also mit Hilfe der Sonnenenergie thermodynamisch bergauf geleitet. Im angeregten Zustand ist das P680 des Reaktionszentrums ein viel stärkeres Reduktionsmittel als im Grundzustand. Die Übertragung der durch die Lichtenergie energetisch angeregten Elektronen erfolgt über Phaeophytin, einem Chlorophyll a ohne Magnesium, in der Weise, dass mit einem Elektron ein Plastochinon in der  $Q_A$ -Bindenische sowie mit einem weiteren Elektron ein Plastochinon in der  $Q_B$ -Bindenische zu einem Radikal-Ion reduziert werden. Anschließend überträgt das Plastochinon-Radikal-Ion der  $Q_A$ -Bindenische, an die es über den gesamten Zyklus gebunden bleibt, sein Elektron an das Plastochinon-Radikal-Ion der  $Q_B$ -Bindenische und reduziert es damit zum Plastochinol (= Plastohydrochinon). Das reduzierte Plastochinol löst sich aus der  $Q_B$ -Bindenische des D1-Proteins am PS II ab, wobei aus einem Pool an Plastochinon diese

Bindestelle unmittelbar wieder neu besetzt wird (Stryer, 1987; Lawlor, 1990; Sitte *et al.*, 1992; Nultsch, 1996).

An dieser Stelle wiederum setzen nun eine Reihe von photosynthesehemmenden Herbiziden an, die durch Bindung in der  $Q_B$ -Bindenische eine Bindung mit oxidierten Plastochinon verhindern. So ist zwar weiterhin die Elektronenübergabe an das Plastochinon in der  $Q_A$ -Bindenische möglich, da sich dieses aber nicht aus der Bindenische löst und auch keine Übertragung zu einem teilweise reduzierten Plastochinon möglich ist, ist der photosynthetische Elektronentransport (PET) somit hier unterbrochen. An dieser Stelle binden neben klassischen PSII-Hemmern, wie dem Herbizid Diuron, auch einige Phenolherbizide (Hock *et al.*, 1995; Trapmann, 1999).

Am Plastocyanin des Cytochrom- $b_6/f$ -Komplexes wird bei funktionstüchtigem PET das reduzierte Plastochinol durch Elektronenübertragung zum Plastochinon rückoxidiert, wodurch es in den Plastochinon-Pool der Elektronentransportkette zurückkehrt. Gleichzeitig werden bei der Elektronenübertragung von Plastochinol zum Plastocyanin Protonen über die Membran in den Innenraum der Thylakoide geleitet und erzeugen auf diese Weise in intakten Chloroplasten mit den Protonen aus der Wasserspaltung eine protonenmotorische Kraft über die Membran (Stryer, 1987, Sitte *et al.*, 1992). An dieser Stelle können nun weitere Herbizide ansetzen und eine Rückoxidation des Plastochinols zum Plastochinon unterbinden. Durch diese Unterbrechung der Rückoxidation kommt es im Folgenden zu einer völligen Erschöpfung des Plastochinon-Pools, wodurch keine, durch den LHC aufgenommene Lichtenregie mehr in die photosynthetische Elektronentransportkette übertragen werden kann (Hock *et al.*, 1995). Im Unterschied zur Inhibierung der  $Q_B$ -Bindenische hat die Inhibition der Rückoxidation zur Folge, dass der gesamte Plastochinon-Pool in reduzierter Form (Plastochinol/Plastohydrochinon) vorliegt. Die Inhibition in der  $Q_B$ -Bindenische wiederum führt dazu, dass der gesamte Plastochinon-Pool in oxidiertem Zustand vorliegt. Da beide Sorten von Hemmungen den PET unterbrechen, kommt es als Folge zu einem Anstieg der Fluoreszenz.

Die Elektronen des Plastocyanins werden im folgenden ungehemmten Schritt einzeln auf das P700 des Photosystems I übertragen, welches durch Licht angeregt wird ( $P700^*$ ) und die Elektronen auf das Akzeptorchlorophyll ( $A_0$ ) überträgt. Dieses ist im reduzierten Zustand ( $A_0^-$ ) mit  $E'_0 = -1,1V$  das Biomolekül mit der stärksten Elektonegativität. Das P700 fällt in einen oxidierten Zustand zurück ( $P700^+$ ), aus dem es durch Elektronenübernahme vom Plastocyanin in seinen Grundzustand zurückkehrt. Aus dem  $A_0^-$  geht das aufgenommene Elektron über  $A_1$  auf eine Serie von Eisen-Schwefel-Zentren über, bevor es auf das Ferredoxin des PS-I-

Komplexes übertragen wird. Die Elektronen von zwei reduzierten Ferredoxin-Molekülen besitzen ein so hohes Potenzial, dass als abschließender Schritt der photosynthetischen Elektronentransportkette die Bildung von NADPH aus  $\text{NADP}^+$  erfolgt (Stryer, 1987). Diese Endübertragung von Elektronen wiederum ist durch die Gruppe der Bipirydylum-Herbizide hemmbar, indem die Elektronen aus der Elektronentransportkette die Herbizide reduzieren. Anschließend erfolgt die Übertragung auf Sauerstoff, was das Superoxid-Anion ( $\text{O}_2^-$ ) entstehen lässt (Hock *et al.*, 1995). Bei einer solchen Inhibition läuft der PET völlig ungestört ab. Lediglich die endständige Festlegung der Lichtenergie in chemische Energie, in Form von NADPH, ist aufgehoben.

Auch sind Substanzen mit herbizider Wirkung bekannt, die in den Chloroplasten ihre Wirkung durch eine protonophore Eigenschaft zeigen, indem sie über ein „Loch“ in der Thylakoidmembran den im PET erzeugten Protonengradienten an der ATP-Synthase vorbei abbauen lassen. Als Resultat ist in einem solchen Fall keine Bildung von ATP aus der Photosynthese möglich. Ein Beispiel für eine so wirkende Substanz zeigt sich in der nitroaromatischen Verbindung 2,4-Dinitrophenol (Hock *et al.*, 1995).

Da es sich bei der Photosynthese mit der an den photosynthetischen Elektronentransport angeschlossenen Dunkelreaktion um einen durch viele Faktoren regulierten Prozess handelt, können auch Substanzen, die an einer völlig anderen Stelle in den Metabolismus der Pflanzen eingreifen, die Effizienz der Photosynthese beeinflussen (Larcher, 1994).

Zusammenfassend lässt sich über die beiden Photosysteme noch aussagen, dass unter dem Einfluss von Licht das PS II ein starkes Oxidationsmittel darstellt, welches zur Bildung von Sauerstoff führt, während seine Eigenschaften als Reduktionsmittel geringer sind. PS I andererseits zeigt sich als ein schwaches Oxidationsmittel auf der elektronenaufnehmenden Seite aber als ein starkes Reduktionsmittel, welches in der Lage ist,  $\text{NADP}^+$  zu  $\text{NADPH} + \text{H}^+$  zu reduzieren (Stryer, 1987).

## **1.2 Fluoreszenz als Indikator für inhibierende Eingriffe in die Photosynthese**

Angaben zur Aktivität der photosynthetischen Elektronentransportkette, zum Verlauf der Photosynthese und zur Ausbildung des zur ATP-Synthase benötigten Protonengradienten sind über die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz in Blättern, Algen sowie isolierten Chloroplasten möglich (Larcher, 1994; Schreiber *et al.*, 1994; Maxwell und Johnson, 2000). Anhand der Fluoreszenz der Chlorophyll-Moleküle lassen sich bereits erste Anzeichen für Stress in der Pflanze nachweisen, wobei die Pflanzen für die Messungen nicht einmal berührt werden müssen (Schreiber *et al.*, 1994).

Nachdem Bradbury und Baker (1981) die Idee hatten, Unterschiede in der Photosynthese über Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen zu ermitteln, eröffnete Schreiber (1986) mittels der Puls-Amplituden-Modulations(PAM)-Fluorometrie die Möglichkeit, physiologische Untersuchungen der photosynthese-spezifischen Parameter durchzuführen, ohne störende Effekte durch die Hintergrundbeleuchtung (Buschmann *et al.*, 2000; Rascher *et al.*, 2000; Maxwell und Johnson, 2000). Inzwischen wurden bereits Geräte entwickelt, die einen Einsatz in Vor-Ort-Messungen zulassen (Schreiber *et al.*, 1994) sowie an spezielle Gebiete der Photosyntheseforschung angepasst sind (Schreiber *et al.*, 2002; 2003).

Die in den Pflanzen gemessene Chlorophyll-Fluoreszenz ist ein direktes Resultat der Anregung der Chlorophyll-Moleküle durch Licht. Die durch die Lichteinstrahlung aufgenommene Energie wird auf drei direkt voneinander abhängigen Wegen „verwertet“. Die meiste Energie wird in einer intakten Pflanze durch die Photosynthese genutzt, die restliche Energie wird in Wärme und Fluoreszenz umgewandelt (Larcher, 1994). Durch die direkte Abhängigkeit bedeutet ein Anstieg in der Fluoreszenz zeitgleich eine herabgesetzte Photosynthese-Leistung (Maxwell und Johnson, 2000). Die Fluoreszenz entsteht durch Zurückfallen aus den sehr kurzlebigen ( $\sim 1$ ps) Vibrations-/Rotationsanregungen (Mohr und Schopfer, 1978) angeregter Chlorophyll-Moleküle, dem ersten Singulett-Zustand in den Grundzustand. Dies ist dann der Fall, wenn die durch Absorption der Lichtquanten aufgenommene Energie nicht an ein offenes Reaktionszentrum weitergegeben werden kann (Sitte *et al.*, 1992). Auf diese Weise gehen in intakten pflanzlichen Geweben ca. 1-2 % der aufgenommenen Lichtenergie verloren (Maxwell und Johnson, 2000).

Je nach Bestrahlung der Pflanzen lassen sich unterschiedlich hohe Fluoreszenz-Werte messen. Sind alle Reaktionszentren in den Thylakoiden offen, wie dies z. B. bei Pflanzen der Fall ist, die über einen längeren Zeitraum im Dunkeln „adaptiert“ wurden, so lässt sich mit nicht photosynthetisch aktivem Licht die Grundfluoreszenz messen (Schreiber *et al.*, 1994, DeEll und Toivonen, 2003). Durch einen, jedes Chlorophyll-Molekül des LHC absättigenden Lichtblitz werden sämtliche Reaktionszentren geschlossen. Alle Energie, die nicht an ein noch offenes Reaktionszentrum weitergegeben werden konnte, wird in Form von Fluoreszenz abgestrahlt. Davon abzugrenzen gilt es die Fluoreszenz, die bei aktinischem Licht, also solchem, das photosynthetisch aktiv ist, vom Chlorophyll abgegeben wird (Schreiber *et al.*, 1994; Maxwell und Johnson, 2000). Die Energiemenge, die in Form von Wärme abgestrahlt wird, kann vernachlässigt werden (Mohr und Schopfer, 1978). In diesem Zusammenhang zeigt der Kautsky-Effekt gut an, wie sich die unterschiedlichen Fluoreszenz-Parameter bei



den jeweiligen Belichtungen in dunkeladaptierten Blättern verhalten (Mohr und Schopfer, 1978; Sitte *et al.*, 1992; Larcher, 1994).

Als bester Parameter zur Kontrolle des photosynthetisch genutzten Lichtes hat sich der so genannte Yield erwiesen, der sich aus dem Quotienten: [(„Fluoreszenz bei Lichtsättigung“ minus „Fluoreszenz bei Grundbestrahlung“) durch „Fluoreszenz bei Lichtsättigung“] (Formel 2.1) ergibt (Genty *et al.*, 1989). Untersuchungen haben weiter gezeigt, dass sich Pflanzen (Algen) mit unterschiedlichen „Licht-Vorgeschichten“ in ihren photosynthetischen Aktivitäten voneinander über Fluoreszenz-Messungen unterscheiden lassen (Bengtson Nash *et al.*, 2005).

Greifen nun Substanzen inhibierend in den photosynthetischen Elektronentransport ein, wie an den jeweiligen Stellen in Kapitel 1.1 beschrieben, so kommt es im Falle der ersten beiden Inhibierungsstellen, der Q<sub>B</sub>-Bindenische und der Plastochinol-Rückoxidation, zu dem „Problem“, dass die energiereichen Reaktionszentren ihre Energie nicht zur Reduktion des Plastochinons übertragen können. Die Plastochinol-Rückoxidation besitzt allerdings *in vivo* keine Bedeutung (Hock *et al.*, 1995). Als Folge dessen bleibt das Reaktionszentrum geschlossen, wodurch die angeregten Chlorophyll-Moleküle des LHC ihre in den Vibrationszuständen der Singulett-Zustände gespeicherte Energie in Form von Fluoreszenz abstrahlen müssen. Je nach Grad der Inhibierung, also je nachdem, wie viele Reaktionszentren durch Herbizideinfluss geschlossen sind, erhöht sich die Fluoreszenz bei aktinischem Licht. Da die Fluoreszenz bei Lichtsättigung denjenigen Wert angibt, der bei völlig geschlossenen Reaktionszentren vorliegt (Bradbury und Baker, 1981; Schreiber *et al.*, 1994; Maxwell und Johnson, 2000), führt eine Inhibierung der genannten Stellen zu einem Absinken des Yields, da die Fluoreszenz bei aktinischem Licht ansteigt. Somit ist festzustellen, dass jede Änderung in der Chlorophyll-Fluoreszenz eine Änderung des Yields verursacht (Harbinson und Rosenqvist, 2003). Fluoreszenz vom PS I stellt sich als so gering und nicht variabel dar, dass sie nicht essenziell für die Betrachtung ist (Schreiber *et al.*, 1994; Harbinson und Rosenqvist, 2003).

Die Herbizidwirkungen, die auf der Wirkung als Elektronenendakzeptor oder der Beseitigung der protonenmotorischen Kraft beruhen (Hock *et al.*, 1995), können über die Chlorophyll-Fluoreszenz nicht nachgewiesen werden, da beide lediglich die Festlegung der Lichtenergie in chemische Energie verhindern und nicht in den PET direkt eingreifen. Auch kommt es durch das Abgreifen der Elektronen vom Ferredoxin nicht zu einem Stau an Redox-Komponenten in der Elektronentransportkette, was ebenfalls der Fluoreszenzentwicklung entgegensteht. Ferner

lässt sich auch keine Fluoreszenz ermitteln, die vom Photosystem I ausgeht (Schreiber *et al.*, 1994).

Ein Absinken der Fluoreszenzwerte, also eine Steigerung der photosynthetischen Aktivität, ließe sich dadurch erreichen, dass die Weitergabe der Elektronen in der photosynthetischen Elektronentransportkette schneller ablaufen würde als in der dazugehörigen Kontrolle. Dies wäre in intakten Chloroplasten unter anderem dadurch erreichbar, dass Stoffwechselprozesse, die peripher über Stoffwechselprodukte in die Photosynthese eingreifen, als normal zeitlich limitierende Schritte schneller ablaufen lassen würden, z. B. durch Bereitstellung von mehr Elektronenakzeptormolekülen innerhalb der photosynthetischen Elektronentransportkette. Unter Zuhilfenahme der Chlorophyll-Fluoreszenz lassen sich auch unterschiedliche Photosyntheseraten bei Pflanzen verschiedener Art und Entwicklungsstadien nachweisen (Larcher, 1994).

Somit stellt sich also die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz als eine gute Methode zur Identifizierung von Substanzen heraus, die auf die Photosynthese in einer Pflanze einwirken. Handelt es sich bei der biologischen Einheit um ganze Pflanzen, so können neben den Stoffen, die direkt den photosynthetischen Elektronentransport hemmen, auch solche Substanzen detektiert werden, die über Hemmung von Stoffwechselfvorgängen in der Pflanzenzelle einen Stau in der Elektronentransportkette verursachen, durch den die Übertragung von Elektronen auf den Endakzeptor oder eine vergleichbare Substanz unterbunden wird. Bei isolierten Thylakoidmembranen hingegen lassen sich nur solche Substanzen nachweisen, die einen direkten Angriff auf den PET ausüben. Bedingt durch die Isolation wurde bei diesen der PET von anderen Stoffwechsel-Prozessen abgetrennt. Eine Beeinflussung der protonenmotorischen Kraft über die Thylakoidmembran lässt sich somit nicht nachweisen, da hierfür voneinander getrennte Kompartimente vorliegen müssen. Bei einer Isolation von Thylakoidmembranen werden diese Kompartimente zerstört.

Dennoch wurden isolierte Thylakoidmembranen bereits mehrfach zum Nachweis ökotoxikologisch relevanter Substanzen eingesetzt. So konnten neben klassischen PS-II-Herbiziden auch phenolische Substanzen und Säuren in Grund- und Oberflächenwasser nachgewiesen werden (Helfrich *et al.*, 1998; Trapmann, 1999; Schnabl und Trapmann, 2001). Auch die Anwendung auf dem Gebiet des biosensorischen Nachweises von phytotoxischen Eigenschaften im Kompostierungsprozess konnte aufgezeigt werden (Helfrich *et al.*, 1998; Schulz, 2000).

### 1.3 Grundlagen Biosensorischer Nachweisverfahren

Ein großes Problem in der analytischen Chemie stellt neben der Selektivität vor allem die Gegenwart interferierender Substanzen dar. Zwar sind empfindliche und selektive Methoden, wie die HPLC oder die Gas-Chromatographie (GC) als instrumentelle Fortschritte in dieser Problematik zu sehen, sie sind aber nicht sehr tauglich für den „on-line-Betrieb“ im Schadstoff-Monitoring. Während für physikalische Größen, wie Temperatur und Druck, entsprechende Sensoren verbreitet sind, sind die qualitativen und quantitativen Bestimmungen chemischer Zusammensetzungen noch recht schwierig. Besonders gilt dies für die Bestimmung von physiologisch aktiven Substanzen und biologischen Makromolekülen (Scheller und Schubert, 1989). Hier stehen chemische Analysen in der Risikobewertung vor dem Problem, dass Reaktionen in der Umwelt nicht abgeschätzt werden können (Rögner, 1998; Pennington und Brannon, 2002). Vor allem aber werden Mess-Systeme gesucht, die sich kostengünstig verhalten (Elkind *et al.*, 1999)

Betrachtet man in diesem Zusammenhang lebende Organismen, so ist festzustellen, dass eine der entscheidenden Grundlagen des Lebens in der Wahrnehmung der Umgebung besteht. Hierbei dienen die von den Organismen durchgeführten „Rezeptionen“, neben der Nahrungsfindung auch dem Bemerken von Gefahr. Diese Rezeption der Umweltparameter liefert die Grundlage der Biosensorik, da dadurch die gesuchten Parameter sichtbar und messbar werden (Tran Minh Canh, 1993; Diamond, 1998).

Mit Biosensoren wird versucht, die in Organismen vorhandenen Rezeptoren für eben diese Stoffe für die Technik nutzbar zu machen. Ausgenutzt wird dabei die biologische Reaktion, in der eine Substanz in ein detektierbares Signal umgewandelt wird. Von hohem Interesse ist hierbei vor allem die hohe Selektivität und Trennschärfe dieser Rezeptoren (Scheller und Schubert, 1989; Tran Minh Canh, 1993), wie auch die Messung von Parametern in Echtzeit (Woodbury *et al.*, 1998).

Nach Schnabl (1991) gelten für biosensorische Nachweisverfahren folgende Ansprüche:

- Die Verfahren sollten schnell und kostengünstig sein
- Die Messungen sollten empfindlich und reproduzierbar sein
- Der Biosensor sollte eine schnelle Reaktion auf die gesuchte Substanz zeigen
- Die Messungen sollten Vor-Ort durchführbar sein
- Die Ergebnisse sollten eine verlässliche Aussagekraft in Bezug auf die untersuchte Problematik haben.

In den letzten 20 Jahren hat die Forschung auf dem Gebiet der Biosensoren stark zugenommen (Diamond, 1998). Erste biosensorische Messungen gehen hierbei auf den Glucosenachweis in Urin unter Verwendung eines glucoseumsetzenden Enzyms zurück (Clark und Lyons, 1962). Von dort ausgehend sind eine Vielzahl an enzymatischen Biosensoren entwickelt worden. Auch membrangebundene Rezeptoren lassen sich zu Biosensoren entwickeln, wobei die komplexe Struktur bisher einige Probleme aufzeigte (Scheller und Schubert, 1989).

Allgemein bestehen Biosensoren aus einer biologischen, analytischen Einheit, die mit einem meist physikalischen Signalwandler in Kontakt stehen (Scheller und Schubert, 1989; Tran Minh Canh, 1993; Diamond, 1998; Mehrvar *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2003). Erst aus der Kombination beider wird ein verwertbares Signal erzeugt, welches Aufschluss über die Konzentration des Analyten oder der zu analysierenden Substanzgruppe gibt (Mehrvar *et al.*, 2000). Die biologische Einheit übernimmt dabei die Aufgabe des Rezeptors. Hierbei kommen die unterschiedlichsten Arten von biologischen Einheiten vor, die aus Enzymen, Geweben, Mikroorganismen, Antikörper-Zell-Rezeptoren oder anderem biologischen Material bestehen (Sharma *et al.*, 2003). Die biologische Einheit ist dazu nötig, die gesuchte Substanz zu detektieren, wobei das entstehende Signal quantifizierbar und reproduzierbar sein muss. Ebenfalls sollte das Signal sowohl selektiv als auch sensitiv sein. Auch sollte das von einem solchen Sensor ausgegebene Signal proportional zur Menge der gemessenen Substanz sein (Sharma *et al.*, 2003) oder sich zumindest durch eine einfache mathematische Formel in die gemessene Menge umrechnen lassen. Des Weiteren sollte das Signal nach einer schnellen Reaktionszeit und nach der Trennung von der signalauslösenden Substanz wieder auf „0“ zurückgehen (Tran Minh Canh, 1993; Diamond, 1998). Der nicht-biologische Teil eines Biosensors übernimmt allgemein die Funktion eines Transducers, der das eingehende, nicht-elektrische Signal in ein elektrisches umwandelt (Sharma *et al.*, 2003). Hierfür steht eine Vielzahl unterschiedlicher Transducer zur Verfügung. Auf der physikalischen Seite wären da die elektronischen, thermometrischen, piezoelektrischen, photometrischen und magnetischen Systeme zu nennen (Tran Minh Canh, 1993; Sharma *et al.*, 2003), auf der chemischen Seite Systeme auf der Basis von Biodetektion und Detektion von Transformationen, Produkten und Kopplungen (Tran Minh Canh, 1993). Jeder dieser Transducer hat seine ihm spezifischen Eigenschaften. So haben z. B. optische Verfahren den Vorteil, dass der Transducer selbst nicht mit der zu analysierenden Substanz in Kontakt kommt, aber auch den Nachteil, dass mit dieser Methode keine Messungen im Dunkeln gemacht werden können (Tran Minh Canh, 1993).

Biosensoren haben die Vorteile, dass sie schnell, empfindlich, einfach in der Handhabung, selektiv, kompakt, kostengünstig und zum „in-situ-Monitoring“ fähig sind sowie biologisch aktive Substanzen und ihre Bioverfügbarkeit nachweisen (Mehrvar *et al.*, 2000; Turner, 2000; Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2004). Dies wiederum bietet die Möglichkeit, über Massenproduktion und Verschaltung mehrerer biologischer Einheiten multi-funktionale Biosensoren zu entwickeln (Bakaltcheva *et al.*, 1999; Mehrvar *et al.*, 2000). Hierbei ist aber auch auf ein den Messungen angepasstes biosensorisches Design in Bezug auf den Messungsaufbau zu achten, um die Schwierigkeiten in der Interpretation der erhaltenen Ergebnisse soweit es geht zu minimieren (Myszka, 1999). Auch ist bei der Herstellung eines Biosensors zu beachten, dass die Größe des Hintergrundrauschens die Nachweisgrenze stark beeinflusst (Tran Minh Canh, 1993; Diamond, 1998).

Da Biosensoren über ihre biologische Aktivität definiert werden, also über ihre spezifische Reaktion auf eine wirkende Substanz, eignen sie sich besonders für die Detektion von Substanzklassen, wie z. B. Pestizide (Merz *et al.*, 1996).

Bedingt durch ihre Bestandteile und ihren Reaktionsverlauf lassen sich Biosensoren wie folgt einteilen:

- *Katalytische Biosensoren*: z. B. Enzyme, Mikroorganismen, subzelluläre Organellen. Sie bemerken und binden den Analyten und wandeln ihn chemisch um, wodurch er für den Transducer detektierbar wird. Nachteilig sind aber benötigte Co-Faktoren, ein relativ hoher Zeitbedarf und eine geringe Selektivität, wobei Letzteres in Bezug auf Umweltverschmutzung auch Vorteile bieten kann (Mehrvar *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2003).
- *Bioaffinitive Substanzen*: z. B. Antikörper oder Zellmembranen. Sie ermöglichen die Detektion von Substanzen und Substanzgruppen aus Gemischen in sehr geringen Konzentrationen über immunologische Techniken. Ihre Vorteile liegen in Selektivität und Sensitivität (Mehrvar *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2003).
- *Nuklein-Säuren*: Sie sind über Basen-Paarungs-Charakteristik sehr selektiv, wobei sich die Anwendung auf die Detektion von DNS (Beschädigungen) und Mikroorganismen beschränkt.
- *Rezeptoren*: Über die Bindung eines Liganden wird eine physiologische Reaktion ausgelöst, wie z. B. das Öffnen von Ionen-Kanälen. Diese Gruppe von Biosensoren eignet sich dazu, eine Reihe von Substanzen oder strukturell ähnlicher Stoffe zu detektieren (Mehrvar *et al.*, 2000).

Betrachtet man die oben dargestellten Punkte, muss festgestellt werden, dass ein idealer Sensor nicht existiert (Diamond, 1998). Zwar kann ein Sensor in einem Medium optimale Ergebnisse erzielen, doch kann es auch vorkommen, dass der gleiche Sensor in einem anderen Medium aufgrund von Druck, Temperatur, Größe oder chemischen Interferenzen nur völlig unzureichend messen kann (Diamond, 1998). Ein Biosensor muss an seine Umgebung spezifisch angepasst werden (Elkind *et al.*, 1999). Dennoch lassen sich biosensorische „Screening“-Tests gut zur Unterstützung der chemischen Analytik verwenden, um den Einsatz der aufwändigen und kostenintensiven chemischen Verfahren in Rahmen entsprechender Grenzen zu gestalten (Schnabl, 1991). Dabei entwickeln sich die „Screening“-Tests in Richtung auf kleine, hochempfindliche Geräte, die viele Aussagen zusammen liefern können (Turner, 2000). Leider sind die meisten biosensorischen Sensorsysteme bisher auf Prototypen beschränkt (Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2004).

#### **1.4 Eigenschaften nitroaromatischer Verbindungen unter Berücksichtigung von TNT**

Nitroaromatische Verbindungen kommen in der Natur nur sehr selten natürlich vor, allerdings stellen sie als umweltrelevante Kontaminationen inzwischen ein sehr verbreitetes Problem dar (Gorontzy *et al.*, 1993). In ihren grundlegenden, ökotoxikologischen Eigenschaften gelten nitroaromatische Verbindungen als kanzerogen und mutagen (Davis *et al.*, 1997; Boopathy, 2000; Weiß und Angerer, 2000; Michels, 2001; Weiß und Angerer, 2001; Banerjee *et al.*, 2003). Polynitroaromaten haben akute und chronisch toxische Wirkungen, und sie stellen weltweit eine erhebliche Kontamination dar (Acht nich und Knackmuss, 2000). Auch ist für nitroaromatische Verbindungen eine entkoppelnde Wirkung für die oxidative und photosynthetische Phosphorylierung nachgewiesen worden (Hock *et al.*, 1995; Davis *et al.*, 1997), wobei des Weiteren ein senkender Einfluss auf die biologische Aktivität beschrieben wird (Eisenträger *et al.*, 1998). In ihren chemischen Eigenschaften zeigen sich nitroaromatische Verbindungen stark elektronenziehend (Kröger, 2002). Auch wenn der Toluolring an sich eher nukleophile Eigenschaften aufweist, sind die Nitroaromaten im Gesamtmolekül, bedingt durch die Nitrogruppen als Substituenten, stark elektronenziehend. Amino-Gruppen als Substituenten wiederum haben einen stark elektronenabgebenden Einfluss (Breitmaier und Jung, 1986).

Diese Eigenschaften gelten auch für die nitroaromatische Verbindung 2,4,6-Trinitrotoluol, kurz TNT (Strukturchemische Darstellung in Abbildung 1.1). Dieser Nitroaromat findet seit 1902 als Sprengstoff Anwendung (Patel *et al.*, 2004) und ist auch daraus folgend der am häufigsten gebrauchte Nitroaromat (Boopathy, 2000; Esteve-Núñez *et al.*, 2001).

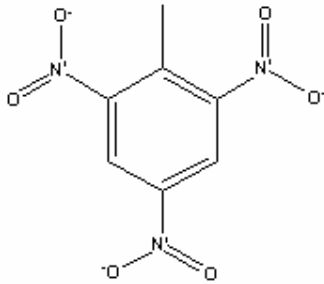


Abb. 1.1: Chemische Struktur von 2,4,6-Trinitrotoluol.

So entsteht er neben der Sprengstoffproduktion auch als Zwischenprodukt der Färb- und Photoindustrie (Opresko, 2001). Ökotoxikologisch schreibt man TNT zu, Brustkrebs auszulösen (Banerjee *et al.*, 2003); vor allem aber durch Schädigung der Leber, Lunge und Hoden Anämien, Leberfunktionsstörungen, Dermatitis, Leukozytose, neurologische Schäden und Impotenz zu verursachen (Weiß *et al.*, 1999; Opresko, 2001). Zusätzlich erfolgt eine Einlagerung von TNT im Fettgewebe (Kröger, 2002).

Die mutagene und kanzerogene Wirkung von TNT (Ribidoux *et al.*, 1999; Frische, 2002C) ist bereits in aquatischen und terrestrischen Tests (Hundal *et al.*, 1997), wie auch über Säuger und Human-Monocyten-Testsysteme belegt worden (Hawari *et al.*, 2000). In den Körper kann TNT durch Resorption über die Haut, die Lunge und den Darm gelangen (Johnson *et al.*, 1999; Beltz *et al.*, 2001; Opresko, 2001; Reifenrath *et al.*, 2002), wobei es in Form von Hämoglobin-Addukten bis zu einem halben Jahr nach Aufnahme im Körper zu finden ist (Weiß und Angerer, 2003). Toxische Wirkung besitzt TNT bereits im  $\mu\text{g/l}$ -Bereich (UFT, 1999).

Als Kontamination liegt TNT in Böden sehr inhomogen verteilt vor (Durner, 2002), so dass es innerhalb kürzester Distanzen zu größten Konzentrationsunterschieden kommt (Wasag-Decon, 2003). Auch zeigt es sich als weitestgehend abbauresistent (Michels, 2001). Ein möglicher Abbau erfolgt sehr langsam, was wiederum eine Auswaschung ins Grundwasser zur Folge hat (Gauger *et al.*, 2001). Hierbei entstehen Abbauprodukte, meistens 2-A-4,6-DNT, die oftmals um ein Vielfaches toxischer sind, und bei direkter Applikation von TNT in Wasser, aufgrund unbekannter Abbauwege, zu unbekanntem Produkten führen, die in aquatischen Organismen, z. B. Welse und Invertebraten, akkumuliert werden (Krausa, 2000; Banerjee *et al.*, 2003; Belden *et al.*, 2005; Ownby *et al.*, 2005).

Somit unterstreichen die aufgeführten Punkte, dass ein schnelles und günstiges System zur Detektion von Nitroaromaten benötigt wird, um eine Gefährdung für Mensch und Umwelt nach besten Möglichkeiten zu minimieren.

## 1.5 Bisheriger Umgang mit nitroaromatischen Kontaminationen

Werden in Böden nitroaromatische Kontaminationen festgestellt, so kam die angewendete Sanierung einer Entsorgung gleich. Bei geringen Konzentrationen ist dies jedoch äußerst unwirtschaftlich (Wasag-Decon, 2003). In letzter Zeit bekommen in-situ-Verfahren immer

mehr Bedeutung (Frische und Höper, 2003), wobei das Problem in der Akzeptanz durch die betroffene Bevölkerung liegt (Heyser und Warrelmann, 2001). Um das Gefährdungspotenzial für eine Region zu bestimmen, müssen des Weiteren Faktoren wie Auswaschung und Transport, aber auch mikrobielle Degradation, Phytotoxizität und Aufnahme in niedere und höhere Tiere berücksichtigt werden (Pennington und Brannon, 2002). Im Folgenden sollen entsprechend unterschiedliche Verfahren für die Sanierung kurz angesprochen werden.

### **1.5.1 Sanierungen auf den Gebieten mit nitroaromatischen Kontaminationen**

Bei der Sanierung von Böden gilt es vor allem, den Anforderungen des BBodSchG zu genügen, was eine dauerhafte Gefahrenabwehr von Kontaminationen der entsprechenden Böden als Ziel haben muss (Dahn und Michels, 2001)

#### **1.5.1.1 Nichtbiologische Sanierungsverfahren**

Im Folgenden sind einige Verfahren aufgeführt, die auf physikalischer und chemischer Basis in der Sanierung von nitroaromatischen Verbindungen, z. B. an Standorten von Rüstungsaltslasten, Einsatz finden.

Die einzige anerkannte und damit auch häufigste Sanierungsmethode liegt in der thermischen Behandlung von Böden (Bruns-Nagel, 1998; Daun *et al.*, 1998; Boopathy, 2000; Hannink *et al.*, 2001). Die Kosten dafür sind allerdings mit ca. 125,- € pro t sehr hoch, weswegen günstigere Methoden gesucht werden (Campenhausen, 1998; Vasilyeva *et al.*, 2002), bei hohen Konzentrationen gibt es aber (noch) keine Alternative (Henke, 2002; MSI Marketing Research for Industry, 2002). Als Endprodukt einer thermischen Sanierung, die je nach Verfahren bei 250 °C (Niedertemperatur-), 250-600 °C (Mitteltemperatur-) oder über 600 °C (Hochtemperaturverfahren) erfolgen (Zeman Explosivstoffe, 2002B), ist der Boden nur noch als Füllmaterial verwendbar (Bruns-Nagel, 1998; Campenhausen, 1998). Zusätzlich fallen aber noch Schlämme und Filterstäube durch Nachverbrennung der Abgase an (Henke, 2002). Da Boden weder als Ressource erneuerbar (Schachtschabel *et al.*, 1989) noch vermehrbar ist (Riepert, 1998), gilt es, Alternativen für diese Methode zu finden.

Eine Möglichkeit bietet sich in der Bodenwäsche, wobei sie nicht auf alle Böden anwendbar ist und, trotz möglichen Wiedereinbaus der unterschiedlichen Fraktionen, ca. 5-10 % als kontaminierte Restmenge übrig behält (Blotevogel und Gorontzy, 1998; Henke, 2002).

Ebenso technisch angewendet wird die Reinigung über Aktivkohle (Sluys *et al.*, 2000; Michels, 2001; Marinovic *et al.*, 2005), wobei durch Zugangsprobleme weniger die



Bodenreinigung als vielmehr die Reinigung von wässrigen Lösungen nutzbar ist (Vasilyeva *et al.*, 2001; 2002).

Eher theoretischen Charakter haben die im Folgenden beschriebenen Methoden. So wird ein photokatalytischer Abbau von TNT unter Einfluss von UV-Licht und TiO<sub>2</sub> als Katalysator beschrieben, wobei Licht und TiO<sub>2</sub> aufeinander stimulierend wirken (Nahen *et al.*, 1997; Son *et al.*, 2004). Ein grenzwert-unterschreitendes, photo-induziertes Verfahren wird bei Haas und Kreysig (2002) beschrieben. Auf der Basis von katalytisch wirkenden Substanzen findet auch reines Eisen Anwendung (Hundal *et al.*, 1997; Oh *et al.*, 2002; Liou *et al.*, 2004), wobei als Produkt Triaminotoluol (TAT) entsteht. Die Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hat hierbei einen fördernden Effekt (Hundal *et al.*, 1997).

### 1.5.1.2 Biologische Sanierungsverfahren

Alternativen zu den erwähnten physikalisch/chemischen Sanierungsverfahren ergeben sich in der Bioremediation, welche den sich am schnellsten entwickelnden Zweig der Sanierungsverfahren darstellt (Dua *et al.*, 2002). Derartige biologische Sanierungsverfahren lassen sich als Metabiose verstehen, in der ein Organismus die Umwelt für die nachfolgenden Organismen vorbereitet (Graefe, 2001). Jedoch sind bislang kaum Verfahren festgestellt worden, die bakteriell eine vollständige Mineralisierung von TNT erreichen (Hawari *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2000). Wichtig bei der Bioremediation ist die Transformation und Verfügbarkeit der Kontamination sowie die biologische Aktivität, da bei geringer Aktivität auch nur eine geringe Reinigung erfolgen kann (Khan *et al.*, 1997; Sluys *et al.*, 2000; Dua *et al.*, 2002). Eine hohe Bodenaktivität senkt also das Gefährdungspotenzial (Frische und Höper, 2003). Meistens werden bei der Bioremediation bodeneigene Mikroorganismen eingesetzt (Boopathy, 2002). Der größte Vorteil von biologischen Sanierungsverfahren liegt in der Tatsache, dass die Verfahren on- und off-site wie auch in- und ex-situ erfolgen und die Böden wiedereingebaut werden können, ohne dass zu entsorgende Reststoffe entstehen (Henke, 2002). Neben dem biologischen Abbau von Kontaminationen wird bei der Bioremediation auch die irreversible Festlegung von Kontaminationen an der Bodenmatrix als Möglichkeit der Sanierung verfolgt (Eschenbach *et al.*, 2001)

Am häufigsten werden in biologisch-mikrobiellen Sanierungsverfahren von Nitroaromaten *Pseudomonaden* verwendet (Khachatryan *et al.*, 2000). Neben dem Umbau von TNT zu TNB und Nitrobenzol bis zur völligen Mineralisierung (Davis *et al.*, 1997) ist der Umbau der Nitrogruppen zu Amino-Gruppen am häufigsten (Khan *et al.*, 1997), was auch durch *Clostridien* erfolgen kann. Hier schreitet der Umbau aber über Toluol zu Anilin fort (Gorontzy *et al.*, 1993). Die *Enterobacteriaceae E. cloacae PB2*, wie auch einige

*Pseudomonaden* und *Pilze* nutzen TNT als Stickstoffquelle (French *et al.*, 1998; Esteve-Núñez *et al.*, 2001). *Desulfovibrio* ist wiederum in der Lage, Nitrogruppen als Elektronenakzeptor zu nutzen (Boopathy *et al.*, 1998). Wie bei Vorbeck *et al.* (1998) beschrieben, erfolgt dieser reduktive Umbau von TNT über Hydrid-Meisenheimer-Komplexe. Problematisch bei der großtechnischen Anwendung dieser Mikroorganismen ist die Tatsache, dass zum einen Co-Substrate benötigt werden (Oh *et al.*, 2001; Boopathy, 2002), z. B. in Form einer Kohlenstoffquelle (Thomas *et al.*, 2004). Zum anderen dürfte sich die Einstellung eines optimalen pH-Wertes für die Bodenorganismen (pH-6-7 (Boopathy *et al.*, 1997)) im Feld stellenweise schwierig gestalten. Hohe Konzentrationen an nitroaromatischen Verbindungen können des Weiteren eine Bioremediation durch ihre Toxizität verhindern (Bruns-Nagel *et al.*, 1996; Ribidoux *et al.*, 2003).

Sehr gute Ergebnisse in der biologischen Sanierung zeigten sich bei der Anwendung von Pilzen, besonders solchen, die in der Lage sind, Holz und Lignin abzubauen (Frische und Höper, 2003), wobei sowohl von vollständigem wie auch von unvollständigem Abbau berichtet wird (Pasti-Grigsby *et al.*, 1996; Zaripov *et al.*, 2002). Der Vorteil von Pilzen liegt darin, dass diese nach der Sanierung eingehen (Campenhausen, 1998).

Auch konnten Pflanzen identifiziert werden, die in der Lage sind, TNT aus Böden zu extrahieren, in den Blättern zu akkumulieren (Larson *et al.*, 1999) und im Falle eines genetisch veränderten Tabaks auch abzubauen (Hannink *et al.*, 2001). Großtechnisch wird zur Zeit ein Sanierungsverfahren bei der WASAG-DECON in Sythen (D) auf der Basis von Phytoremediation erprobt (Zeman Explosivstoffe, 2002B). Auch wenn die Ergebnisse der Phytoremediation ein hohes Potenzial aufzeigen, so wird diese Sanierungsmethode durch geringe Bioverfügbarkeit, bakterielle Aktivität und limitierenden Massentransfer begrenzt (Sung *et al.*, 2002).

Ein weiterer viel versprechender Ansatz in der Sanierung nitroaromatischer Verbindungen wie TNT zeigt sich in der Einbringung von Kompost in die kontaminierten Böden (Breitung *et al.*, 1996; Eschenbach *et al.*, 2001; Meyns *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002). Der fördernde Effekt zeigt sich in einer erhöhten biologischen Aktivität, einer Humifizierung von TNT sowie einer irreversiblen Komplexierung (Bruns-Nagel, 1998; Püttmer, 2003). Auch hier entsteht unter Einsatz von Co-Substraten aus TNT TAT (Lenke *et al.*, 1998). Weiter lassen sich durch Co-Substrate Steigerungen der mikrobiellen Aktivität erreichen (Drzyzga *et al.*, 1999). Gegen den Einsatz von Komposten spricht aber, dass diese Methode intensiv betrieben werden muss und die dabei ablaufenden biologischen Prozesse unbekannt sind (Esteve-Núñez *et al.*, 2001). Auch zeigte sich in entsprechenden Versuchen, dass eine ansteigende

Mutagenität in behandelten Proben aufgefunden wurde (Jarvis *et al.*, 1998). Somit können Risikoabschätzungen solcher Proben, wie auch ihrer Abwässer, nicht ausreichend vorgenommen werden (Rögner, 1998; Pennington und Brannon, 2002).

Je nach eingeschlagenem Abbauweg lassen sich in Böden bis zu 98 % TNT durch Bakterien abbauen (Achnich *et al.*, 2000), wobei auch durch die Zugabe von Eisen ein stimulierender Effekt beobachtet werden konnte. Anaerob erfolgte der Abbau vollständig, während aerob ein unvollständiger Abbau und die Entstehung kanzerogener Substanzen beobachtet werden konnte (Hundal *et al.*, 1997). Der Einsatz von Tensiden wird für biologische Sanierungsverfahren nicht empfohlen (Volkering *et al.*, 1998).

Weitere Konzepte in der biologischen Sanierung von Böden zeigen sich bei Henke (2002). So stellen sich hier biologisch-hydraulische Verfahren dar, in denen in einem Spülkreislauf Nährlösungen in den Grundwasserstrom eingebracht und anschließend wieder abgesaugt werden. Bioventing-Verfahren arbeiten mit Druckluftereinleitung unterhalb des Grundwasserstroms zur Verbesserung der Bedingungen für bodeneigene Organismen. Das Biosparging stellt eine Kombination der beiden anderen Systeme dar. Bei diesen Verfahren beruht die Wirkung allerdings allein auf der Verbesserung der Bodeneigenschaften, ohne dass die biologischen Möglichkeiten der Situation angepasst werden (s. enhanced natural attenuation, Kap. 1.5.1.3).

### **1.5.1.3 Konkrete Sanierungsprojekte an exemplarischen Standorten**

Wie Sanierungsverfahren zum gegenwärtigen Zeitpunkt ablaufen, soll exemplarisch an drei Standorten skizziert werden.

Nach Beendigung des 2. Weltkrieges wurde bis zum Ende der 60er Jahre den Standorten keine besondere Beachtung geschenkt. Erst mit Ausgang der 1960er Jahre wurden Messungen der nitroaromatischen Kontamination im Trinkwasser in Hessisch Lichtenau-Hirschhagen vorgenommen, die zu einer Einstellung der Trinkwassergewinnung in den beginnenden 1970er Jahren führten. Genauere Erkundungen der Belastungen fanden dann erst wieder in den späten 1980er und beginnenden 1990er Jahren statt (HIM-ASG, 2002). Die Sanierung der Altlasten wurden in Hessisch Lichtenau-Hirschhagen 1992 durch die HIM-ASG begonnen, ein Jahr später in der Rüstungsalblast Stadtallendorf. Als Sanierungsmaßnahmen wurde eine hydraulische Sicherung des Grundwassers vorgenommen, kontaminierte Böden ausgekoffert sowie die Kanalsysteme erkundet und saniert. Die Sanierung der kontaminierten Böden erfolgte nutzungsbezogen, wobei nach anfänglicher Erprobung biologischer, physikalischer und chemischer Verfahren aus wirtschaftlichen Gründen eine thermische Sanierung in einer

außerhalb gelegenen 600 °C-Drehrohranlage mit anschließender mehrstufiger Abgasreinigung in Deutzen bei Dresden betrieben wurde. Minderkontaminiertes Material wurde zur externen Haldenrekultivierung verwendet bzw. in Deponien verbracht. Bei Kontaminationen unterhalb von 80 mg TNT-Äquivalente/kg Boden erfolgte die Lagerung im Versatzbergwerk der Glückauf Sondershausen Entwicklungs- und Sanierungsgesellschaft (HIM-ASG, 2002). Bedingt durch geänderte Handlungswerte wurden alternative Sanierungsprojekte verworfen. Die „Tri-Halde“ mit den Neutralisationsschlämmen in Stadtallendorf wurde komplett von der Umwelt abgeschottet, wobei die Abluft über eine Aktivkohlefilterung läuft. Die Sanierung erfolgt analog zu den bereits genannten Schritten. (Hessisches Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft und Forsten, 2000; HIM-ASG, 2002). Bei allen Schritten wird an diesen Standorten die Öffentlichkeit über den Fortschritt der Sanierung laufend informiert (HIM-ASG, 2002).

Ein gänzlich anderer Weg der Sanierung wurde auf dem Gebiet der Rüstungsaltpast „Werk Tanne“ in Clausthal-Zellerfeld beschritten. Hier wurde nach öffentlichem Druck die Sanierung im Rahmen eines Forschungs- und Entwicklungsvorhabens („Mikrobiologische Behandlung Sprengstoffkontaminierter Böden“) mit Hilfe von Weißfäulepilzen in den kontaminierten Böden wie auch in den Neutralisationsschlämmen begonnen (Braedt *et al.*, 2003). Des Weiteren finden hier Versuche zur Kompostierung und einem dynamischen Beetverfahren statt, wobei alle Anlagen den Vorschriften der BImSchG genügen (Dahn und Michels, 2001; Mandl, 2002). Genetisch veränderte Mikroorganismen finden an diesem Standort in der Sanierung keine Verwendung (Geisler, 1998). Im Mai 1999 wurde in diesem Rahmen durch die Firma Umweltschutz Nord ein Projekt zur Phytoremediation erprobt (Bücking, 2002A), welches eine Kombination des erwähnten Weißrottepilzes mit standorttypischen Pflanzen darstellte. Die Fortschritte dieser Sanierungen wurden sowohl über chemische Analytik, biologische Testbatterien wie auch bodenökologische Verfahren überwacht (Warrelmann *et al.*, 2000; Bücking 2002A). Weiter wurden in Clausthal-Zellerfeld Untersuchungen zur Natural Attenuation (Selbstreinigung) durchgeführt, mit (Enhanced Natural Attenuation) und ohne Stimulierungsmaßnahmen, wobei vor allem die Ausbreitung der Kontamination durch den Abbau effektiv eingedämmt werden musste (Totsche *et al.*, 2003). Alle Sanierungsversuche erfolgen maßstabsgerecht, um spätere Anpassungsprobleme zu vermeiden (Dahn und Michels, 2001).

Somit zeigt sich anhand dieser Beispiele, dass sowohl nach der klassischen Verfahrensweise wie auch auf biologische Weise Sanierungen von nitroaromatischen Verbindungen

durchgeführt werden können. Auch die Überwachung des Sanierungsfortschritts ist mittels biologischer / bodenökologischer Testsysteme möglich.

## **1.6 Beschreibung nitroaromatischer Kontaminationen in Böden anhand ausgewählter Rüstungsaltslasten**

In der Bundesrepublik Deutschland existieren ca. 3.500 Rüstungsaltslasten (Sluys *et al.*, 2000; Kröger, 2002), wobei ehemalige sowjetische Militärbasen nicht eingerechnet sind. Auf dem Gebiet der „alten EU-Staaten“ geht man von 7.000 Rüstungsaltslasten aus. Durch den hohen Bedarf an Wasser in der Produktion und die damit verbundenen wasserreichen Standorte sind diese Altslasten mit einem hohen Gefährdungspotenzial gleichzusetzen (Sluys *et al.*, 2000). Entsprechend der Praktiken bei der Abfallentsorgung wie auch bei der Entmilitarisierung hat sich die Problematik über die normalen Belastungen hinaus weiter verschärft (Hawari *et al.*, 2000; Pennington und Brannon, 2002).

Zur besseren Verdeutlichung, wie groß die Belastung mit nitroaromatischen Verbindungen, und besonders mit Rüstungsaltslasten ist, soll im Folgenden anhand einiger ausgewählter Beispiele das entstandene und größtenteils noch bestehende Gefährdungspotenzial aufgezeigt werden.

Mit Planungsbeginn des Zweiten Weltkrieges entstanden in Deutschland 80 Sprengstofffabriken, 27 Kampfstoffwerke und 241 Munitionsanstalten (Braedt *et al.*, 2004). In Clausthal-Zellerfeld, ca. 40 km nordöstlich von Göttingen gelegen, wurde im Harz das so genannte „Werk Tanne“ erbaut, welches 1938 in Betrieb genommen wurde. Die Produktion an TNT wurde bis 1943/44 auf 28.000 t/a gesteigert, fiel dann aber aus Rohstoffmangel auf 20.000 t/a 1944/45 zurück (Braedt *et al.*, 2003). Die größten Probleme stellten die Abwässer dar, welche nach ersten Planungen eine Menge von 300 m<sup>3</sup>/d ausmachen und schwach gefärbt sein sollten. Stattdessen zeigten sich bereits in den ersten Probeläufen 1.500 m<sup>3</sup>/d, wobei die Abwässer dunkelrot bis braun gefärbt auftraten. Im Zuge der Produktion wurde die Abwassermenge bis auf 4.000 m<sup>3</sup>/d gesteigert, was ein Gesamt-Abwasseraufkommen von 5,3 Mio. m<sup>3</sup> ausmacht. Diese Abwässer, die schon damals als „widerwärtigste Abwässer der chemischen Industrie“ angesehen wurden, „entsorgte“ man mit folgenden Methoden. Zuerst wurden sie in Schachtbrunnen versenkt, traten aber kurz unterhalb der Brunnen aus und liefen in die Oker. Anschließend nutzte man zwei Speicherbecken, deren Kapazität aber schnell zum Erliegen kam. Also leitete man die Abwässer in die Söse im Südharz, einem „Vorfluter mit ausreichender Wassermenge“, doch zeigten sich die Abwässer in Verdünnungen von 1:200 noch als absolut fischtoxisch, was ein großes Fischsterben auslöste. Eine weitere Verbringung in den Untergrund führte zu einem unbekanntem Verbleib der Abwässer. 1941 erreichten rot

gefärbte Abwässer Hannover (Luftlinie 80 km). Als letzte Überlegung sollte eine Abwasserleitung zusammen mit der Kali-Industrie in die Nordsee gebaut werden. Dies zeigt an, wie umweltschädlich allein an diesem Standort mit den nitroaromatischen Verbindungen umgegangen wurde (Braedt *et al.*, 2003).

Das größte Sprengstoffwerk entstand in Allendorf, heute Stadtallendorf, ca. 20 km östlich von Marburg. Hier wurden bis 1945 130.000 t TNT hergestellt (Hessisches Ministerium für Bildung und Forsten, 2000; HIM-ASG, 2002). Die produzierten Abwässer entsorgte man über eine 24 km lange Rohrleitung in die Lahn. Die anfallenden Neutralisationsschlämme wurden auf einer nicht abgesicherten Halde gelagert, die Maße von 240 m Länge, 50 m Breite und 57.000 m<sup>3</sup> einnimmt (80.000 t). Durch diese Belastungen zeigen sich in diesem Gebiet noch heute das erste Grundwasserstockwerk stark kontaminiert sowie das zweite im oberen Bereich (Hessisches Ministerium für Bildung und Forsten, 2000).

In der Rüstungsalblast Hessisch Lichtenau-Hirschhagen (25 km nordöstlich von Kassel), die eine Gesamt-TNT-Produktionsmenge von 135.000 t besaß, sind als Folge der Rüstungsindustrie heute alle drei Grundwasserstockwerke mit nitroaromatischen Verbindungen kontaminiert (HIM-ASG, 2002).

Erst in den späten 80er Jahren erfolgten auf den genannten Gebieten erste Erkundungen, die dann in entsprechende Sanierungsprojekte übergingen (Hessisches Ministerium für Bildung und Forsten, 2000B). Im Falle der Rüstungsalblast Stadtallendorf konnten bei den Sanierungen der Kanalsysteme bis zum Jahr 2002 in 77 km Kanallänge 2.950 kg TNT geborgen werden (HIM-ASG, 2002). Weiter wurden in hessischen Rüstungsalblasten bis zu 250 g TNT/kg Boden gefunden (Weiß *et al.*, 1999). Die „Tri-Halde“ in Stadtallendorf, mit den erwähnten Neutralisationsschlämmen wurde 1955 abgedeckt und 1971 wurde eine 1 mm dicke Wasserschutzschicht eingebaut. Bedeutend in diesem Zusammenhang ist allerdings, dass in unmittelbarer Nähe dieser „Tri-Halde“ Wohnhäuser stehen. Insgesamt leben auf dem Gebiet der ehemaligen Rüstungsalblast 4.000 Menschen, weitere 8.000 Menschen arbeiten auf diesem Gebiet, z. B. in einer ansässigen Schokoladenfabrik (Hessisches Ministerium für Bildung und Forsten, 2002A; HIM-ASG, 2002).

Aus diesen Darstellungen lässt sich nun sehr leicht ersehen, dass nitroaromatische Verbindungen sowohl an den Orten ehemaliger Rüstungsbetriebe wie auch durch Verteilung in den Abwässern in weiter entfernten Gebieten ein erhebliches gesundheitliches Problem darstellen. So konnten diverse nitroaromatische Abbauprodukte im Grundwasser solcher Standorte nachgewiesen werden (Schmidt *et al.*, 1998). Die Abbauresistenz des TNT (Michels, 2001) macht diese Verbindung zwar zum am wenigsten mobilen Sprengstoff

(Wasag-Decon, 2003), sorgt aber auch dafür, dass er über Jahrzehnte als Kontamination im Boden erhalten bleibt und somit eine große Gefährdung darstellt (Gauger *et al.*, 2001). Dies gilt, auch wenn bislang keine TNT-Rückstände im Urin der auf Rüstungsaltslasten lebenden Bevölkerung nachgewiesen werden konnten (Weiß und Angerer, 2000).

Problematisch bei der Sanierung solcher Gebiete ist die Frage der Kostenregulierung. Zwar werden die größten hessischen Rüstungsaltslasten, Hessisch Lichtenau-Hirschhagen und Stadtallendorf, durch die HIM-ASG auf Landeskosten saniert (Hessisches Ministerium für Bildung und Forsten, 2000; HIM-ASG, 2002), jedoch kann eine Sanierung aus Geldmangel nicht überall durchgeführt werden.

Grund dafür, dass die Verursacher dieser Altslasten nicht haftbar gemacht werden können, ist eine Folge der Verschleierung des Rüstungsprogramms im deutschen Reich, resultierend aus dem Versailler Vertrag von 1919. Im Falle der Sprengstofffabriken wurden die Machenschaften über das so genannte Rüstungsviereck verhüllt. Hierbei erteilte das Oberkommando des Heeres (OKH) der Dynamit Aktien Gesellschaft (DAG, 61%ige Tochter der IG-Farben, heutige Bayer AG) in Troisdorf den Auftrag zum Bau von Sprengstofffabriken. Diese wurden nach Fertigstellung der MONTAN (100%ige Tochter des OKH und dessen Firmendeckmantel) übergeben und von dieser an die Verwert-Chemie (Gesellschaft mbH zur Verwertung chemischer Erzeugnisse, 100%ige Tochter der DAG) zur Produktion verpachtet. Weder OKH noch DAG tauchen in den Büchern der Fabriken auf. Durch Firmen-Fusionen und Aufspaltungen wurde die Rechtsnachfolge weiter verhüllt. Die Verwert-Chemie wurde 1951 liquidiert und ist somit nicht mehr greifbar, Rechtsnachfolger der DAG ist die Marl-Hüls-GmbH, nicht die Dynamit Nobel in Troisdorf, Rechtsnachfolger der Montan ist die im Bundesbesitz befindliche IVG-Holding-AG (Industrie-Verwaltungsgesellschaft-Holding-Aktiengesellschaft) in Bonn (Braedt *et al.*, 2003). Nach einem Urteil des Verwaltungsgerichts Göttingen von 1998 kann die IVG-Holding-AG zwar als Rechtsnachfolgerin zur Verantwortung gezogen werden (Geisler, 1998), nach einer Vergleichs-Zahlung von 25 Mio. DM (ca. 12,8 Mio. €) im Jahr 1990 kann sie allerdings für die hessischen Altslasten, Hessisch Lichtenau-Hirschhagen und Stadtallendorf, nicht mehr belangt werden (Gotthardt, 2002).

Damit an den unterschiedlichen Rüstungsaltslaststandorten eine möglichst effektive und damit kostengünstige Sanierung gewährleistet wird, ist es wichtig, ein kostengünstiges und schnelles Testsystem auf Kontaminationen zu besitzen, um die durch die inhomogene Kontaminationsverteilung im Boden (Durner, 2002) unterschiedlich belasteten Regionen durch ein engmaschiges Testnetz genau zu identifizieren. Hierbei zeigen sich gerade

biosensorische Systeme durch ihren integrativen Charakter als vorteilhaft (Frische und Höper, 2003), da sie sich auch dazu eignen, unbekannte Substanzen anhand ihrer Wirkung zu detektieren (Dahn und Michels, 2001). Sie präsentieren sich auch als geeignete Systeme, um den hohen Zeit- und Personalbedarf und damit die Kosten sowohl in hohen Konzentrationen wie auch bei unterschiedlichen Schadstoffen zu senken (Hirner *et al.*, 1998).



## 1.7 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, den bereits auf Herbizide und Kompostreife angewendeten Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor auf seine Applikationsfähigkeit bezüglich nitroaromatischer Verbindungen in Rüstungsaltslasten zu untersuchen. Die Aussagen des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors sollten dabei mit denen der Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC) verglichen werden, um eine Einschätzung der Ergebnisse zu erhalten.

Ein weiteres Ziel war es, die nitroaromatischen Verbindungen dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor für die Messungen so verfügbar zu machen, dass diese reproduzierbar und quantifizierbar gemessen werden konnten. Dazu war es erforderlich ein Extraktionsverfahren zu entwickeln, durch das nitroaromatische Kontaminationen eines artifiziell belasteten Bodens dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor messbar zur Verfügung gestellt wurden, ohne dessen Messtauglichkeit einzuschränken. Die Ergebnisse der Extraktionen sollten mit bodenspezifischen Parametern in Verbindung gesetzt werden, um eine genaue Abschätzung des Extraktionsvermögens zu ermitteln. Dazu musste die Messgenauigkeit des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors in Extrakten von artifiziell kontaminierten Bodenproben ermittelt werden, um abzuschätzen, ob die Einflüsse der Bodenmatrix in den angefertigten Extrakten die Messergebnisse beeinflussen. Die gewonnenen Erkenntnisse aus den Messungen von Extrakten der artifiziell kontaminierten Böden sollten auf realkontaminierte Bodenproben von Rüstungsaltslaststandorten übertragen werden, um die Einsetzbarkeit des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors als „Screening“-Test auf nitroaromatische Verbindungen in der Praxis zu ermöglichen. Parallel dazu galt es, die mittels Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor gewonnenen Ergebnisse mit denen eines TNT-Antikörper-Verdrängungs-Nachweises auf der Basis der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technologie als biosensorisches Vergleichssystem in ihrer Leistungsfähigkeit zu beurteilen.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräteliste

In den Versuchen dieser Arbeit wurden die in Tabelle 2.1 beschriebenen Geräte verwendet:

Gerät	Ausführung / Firma
Dialyse-Membranen	<i>Spectra Pro® Float-A-Lyzer; 5 ml; MWCO 25.000</i>
Digital-Thermometer	<i>Roth</i>
Homogenisator	<i>HO 4 / Johanna Otto / Edmund Bühler (Hechingen)</i>
HPLC-Säule	<i>RP CC 250/3 Nucleosil 120-3 C18, 250 x 3 mm ID / Macherey und Nagel, Düren</i>
HPLC-Heiz-/Kühlblock Säulenofen	<i>CTO-10AS<sub>VP</sub> / Shimadzu (Japan)</i>
HPLC-Online Vakuum- Degasser	<i>DGU-14A / Shimadzu (Japan)</i>
HPLC-Pumpe	<i>LC10-AD<sub>VP</sub> / Shimadzu (Japan)</i>
HPLC-Schaltventil für quarternäre Gradienten und Lösungsmittelauswahl	<i>FCV-10AL<sub>VP</sub> / Shimadzu (Japan)</i>
HPLC-Stand-alone- fähiger Probengeber	<i>SIL-10AD<sub>VP</sub> / Shimadzu (Japan)</i>
HPLC-System-Controller	<i>SCL-10A<sub>VP</sub> / Shimadzu (Japan)</i>
Laborwaage	<i>Kern EW / Kern &amp; Sohn GmbH (Balingen-Frommen)</i>
Laborzentrifuge	<i>Allegra 21R Centrifuge mit Rotor S4180 / Beckman-Coulter (USA)</i>
Lyophilisationsanlage	<i>Alpha 2-4 LSC / Martin Christ (Osterode)</i>
Magnetrührer mit heizbarer Stellfläche	<i>IKA RH-KT/C / IKA-Werke (Staufen) IKA RET basic C Safety control / IKA-Werke (Staufen)</i>
Nylon-Filtermembranen	<i>0,45µm / MAGMA 0,22µm / MAGMA</i>
Nylonnetze	<i>Maschenweite 200 µm Maschenweite 20 µm</i>
pH-Meter	<i>pH 211 Microprocessor pH-Meter / Hama Instruments (USA)</i>

<b>Gerät</b>	<b>Ausführung / Firma</b>
<b>Puls-Amplituden-Modulations-Fluorometer</b>	<i>ToxY-PAM/R</i> / Heinz Walz GmbH (Effeltrich)
<b>Quarzglasküvetten</b>	692.200.QG / Hellma Mülheim (Baden)
<b>Reinstwasseranlage</b>	ELGA
<b>Schwingkugelmühle</b>	<i>MM200</i> / Retsch
<b>SPR-Messanlage</b>	<i>BIAcore 3000(R)</i> / Biacore (Uppsala, Schweden)
<b>SPR-Chip</b>	<i>CM5</i> / Biacore (Schweden)
<b>SPR-Messanlage</b>	<i>BIAcore 3000</i> / Biacore (Schweden)
<b>Temperaturfühler für IKA RET</b>	<i>IKA ETS-D4 fuzzy</i> / IKA-Werke (Staufen)
<b>Ultraschallbad</b>	<i>Sonorex RK 255 H</i> / Bandelin electric (Berlin)
<b>Ultrazentrifuge</b>	<i>Optima L-100 XP</i> mit Rotor <i>70 Ti</i> / Beckman-Coulter (USA)
<b>UV/UV-VIS DAD-Detektor</b>	<i>SPD-M10A<sub>VP</sub></i> / Shimadzu (Japan)
<b>Vakuum-Filtrationsanlage</b>	Nalgene (USA)
<b>Vakuumpumpe</b>	<i>PC 2004 Vario</i> / VacuBrandt (Wertheim)

Tab. 2.1: Aufstellung der in dieser Arbeit verwendeten technischen Geräte in alphabetischer Reihenfolge.

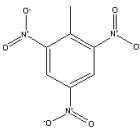
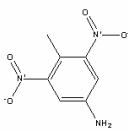
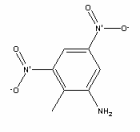
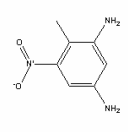
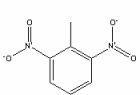
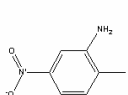
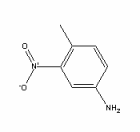
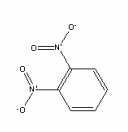
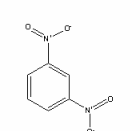
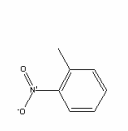
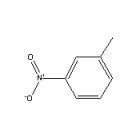
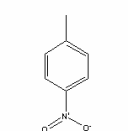
## 2.2 Nitroaromatische Standards

### 2.2.1 Verwendete Standards

Die unterschiedlichen nitroaromatischen Standards, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, stellen eine Auswahl der in kontaminierten Böden anzutreffenden nitroaromatischen Verbindungen dar. Eine Aufstellung der verwendeten Standards liefert Tabelle 2.2.

### 2.2.2 Angefertigte Standardlösungen für die biosensorischen Messungen

Für die spätere Zuordnung der nitroaromatischen Kontaminationen in den Bodenextrakten wurden nitroaromatische Standards angesetzt, um Eichgeraden für die verschiedenen Methoden aufstellen zu können. Hierbei war besonders darauf zu achten, dass die Standardlösungen die entsprechende Substanz in einem für den Biosensor verwendbaren Milieu verfügbar machten. Als solches wurden Standardlösungen in destilliertem Wasser und Methanol angesetzt.

Substanz/ Abkürzung	CAS-Nr.	Chem. Formel/ Struktur	Substanz/ Abkürzung	CAS-Nr.	Chem. Formel/ Struktur
<b>2,4,6- Trinitrotoluol/ TNT</b>	118-96-7	$C_7H_5N_3O_6$ 	<b>4-Amino-2,6- Dinitrotoluol/ 4-A-2,6-DNT</b>	19406- 51-0	$C_7H_7N_3O_4$ 
<b>2-Amino-4,6- Dinitrotoluol/ 2-A-4,6-DNT</b>	35572- 78-2	$C_7H_7N_3O_4$ 	<b>2,4-Diamino- 6-Nitrotoluol/ 2,4-A-6-NT</b>	6629-29- 4	$C_7H_9N_3O_2$ 
<b>2,6- Dinitrotoluol/ 2,6-DNT</b>	606-20-2	$C_7H_6N_2O_4$ 	<b>2-Amino-4- Nitrotoluol/ 2-A-4-NT</b>	99-55-8	$C_7H_8N_2O_2$ 
<b>4-Amino-2- Nitrotoluol/ 4-A-2-NT</b>	119-32-4	$C_7H_8N_2O_2$ 	<b>1,2- Dinitrobenzol/ 1,2-DNB</b>	528-29-0	$C_6H_4N_2O_4$ 
<b>1,3- Dinitrobenzol/ 1,3-DNB</b>	99-65-0	$C_6H_4N_2O_4$ 	<b>2-Nitrotoluol/ 2-NT</b>	88-72-2	$C_7H_7NO_2$ 
<b>3-Nitrotoluol/ 3-NT</b>	99-08-1	$C_7H_7NO_2$ 	<b>4-Nitrotoluol/ 4-NT</b>	99-99-0	$C_7H_7NO_2$ 

**Tab. 2.2:** Aufstellung der in dieser Arbeit verwendeten nitroaromatischen Standards mit verwendeten Abkürzungen, den CAS-Nummern zur eindeutigen Identifikation sowie den chemischen Summen- und Struktur-Formeln.

Die Standard-Lösungen wurden in Konzentrationen von 100 mg/l angesetzt und anschließend nach Bedarf weiter verdünnt, wobei bis auf TNT die Ansätze durchgehend in Methanol erfolgen mussten, da die übrigen nitroaromatischen Verbindungen selbst in diesen geringen Konzentrationen nicht in Wasser löslich waren. Die Löslichkeiten reichten nach Angaben der International Chemical Safety Cards (2002) von unlöslich bis gering löslich in Wasser.

Um eine bessere Lösung der Substanzen zu erreichen, wurden diese beim Ansetzen für einige Zeit in ein Ultraschallbad gestellt.

### 2.3 Isolierung von Thylakoidmembranen als biologische Einheit

Die Isolation von Thylakoidmembranen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll nach Cohen und Baxter (1990).

Für die Isolation der Thylakoidmembranen wurden Pflanzen der Saubohne (*Vicia faba*) verwendet, die in einem Alter von 2-3 Wochen nach der Aussaat geerntet wurden. Zu Beginn dieser Arbeit erfolgte die Anzucht in den Klimakammern des „Instituts für Landwirtschaftliche Botanik“ (ILB) (heute „Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen“/IMBIO), bedingt durch den Wechsel der Arbeitsgruppe zur Stiftung „c.a.e.s.a.r.“ (center of advanced european studies and research) wurden seit Oktober 2003 für die Isolation Anzuchten aus dem Gewächshaus von c.a.e.s.a.r. verwendet. In der Klimakammer erfolgte die Anzucht der Pflanzen bei 20 °C und 80 % Luftfeuchtigkeit in einem 12/12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus bei einer Beleuchtungsstärke von 10.000-14.000 Lux aus Quecksilberdampf-Lampen. Im c.a.e.s.a.r.-Gewächshaus erfolgte die Anzucht bei 20 °C und ca. 80 % Luftfeuchtigkeit. Eine zusätzliche Beleuchtung zum normalen Tag-Nacht-Rhythmus fand nicht statt.

Alle nachfolgenden Schritte der Isolation wurden möglichst abgedunkelt, zügig und auf Eis durchgeführt. Dies diente vor allem dazu, das System vor Photooxidation und temperaturabhängigem Abbau durch Proteasen zu schützen (Mohr und Schopfer, 1978; Sitte *et al.*, 1992). Weiter diente das im Isolationsmedium enthaltene Natriumascorbat zum Abfangen von radikalischen Verbindungen sowie zum Schutz der Proteine vor oxidativen Schäden (Trapmann, 1999).

Für die Isolationen wurden von den Bohnen jeweils das 2. und 3. Blattpaar von unten entfernt und bis zur weiteren Verwendung in kaltes Wasser eingelegt. Dies diente dazu, temperaturabhängige, biologische Abbauprozesse und Reaktionen einzudämmen (Mohr und Schopfer, 1978).

Die abgetrennten Blätter wurden anschließend aus dem Wasser genommen, das Wasser abgeschüttelt sowie die Blätter mit Zellstoff vorsichtig etwas trocken getupft. Anschließend wurden 10-20 g Blattmaterial zerkleinert, in ein Blenderglas gegeben und mit 100 ml eisgekühltem Isolationsmedium (s. Tabelle 2.3) versetzt. Darauf folgend wurden die Blätter im Homogenisator bei einer Messer-Drehzahl von 25.000 U/min bei Eiskühlung für 10 Sekunden homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend durch ein 200 µm und ein 20 µm Nylonnetz filtriert. Die gefilterte Lösung wurde bei 1.300 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Isolationsmedium resuspendiert. Dieser Vorgang wurde noch zwei weitere Male wiederholt, wobei nach der

dritten Zentrifugation das Pellet in kaltem, destilliertem Wasser aufgenommen wurde. Dieser Schritt diente dazu, die bis hierher isolierten Chloroplasten unter osmotischem Druck zum Platzen zu bringen und die Thylakoidmembranen freizulegen (Bausch-Weis *et al.*, 1994).

<b>Substanz</b>	<b>Molarität/Gewichtsprozent</b>
<b>Sorbit</b>	400 mM
<b>Tricine</b>	50 mM
<b>Natriumchlorid</b>	10 mM
<b>Magnesiumchlorid</b>	10 mM
<b>BSA</b>	0,05 % (w/v)
<b>Natriumascorbat</b>	0,1 % (w/v)
Der pH-Wert des Mediums wurde mit KOH auf pH <b>7,8</b> eingestellt	

**Tab. 2.3:** Zusammensetzung des verwendeten **Isolationsmediums** nach Cohen & Baxter (1990).

Die Lösung wurde in Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt, für eine Stunde dunkel auf Eis gestellt und in dieser Zeit einige Male geschüttelt. Von einer Behandlung mit Ultraschall wurde abgesehen, da frühere Untersuchungen gezeigt haben, dass dies bei der Isolation negative Auswirkungen auf das System hat (Schulten, 2001). Nach mikroskopischer Kontrolle des Platzens der Chloroplasten wurden die Proben in der Ultrazentrifuge bei 30.000 g und 2 °C für 10 min zentrifugiert.

<b>Substanz</b>	<b>Molarität/Gewichtsprozent</b>
<b>Saccharose</b>	400 mM
<b>Natriumchlorid</b>	15 mM
<b>Tricine</b>	20 mM
<b>BSA</b>	0,2 % (w/v)
<b>Magnesiumchlorid</b>	10 mM
Der pH-Wert des Mediums wurde mit NaOH auf pH <b>8,0</b> eingestellt	

**Tab. 2.4:** Zusammensetzung des verwendeten **Resuspensionsmediums** nach Zimmermann *et al.*, 1996).

Der Überstand wurde verworfen, das dabei entstehende Pellet wurde wieder in Isolationsmedium aufgenommen, resuspendiert und anschließend in der Ultrazentrifuge bei 10.000 g und 2 °C für 10 min zentrifugiert. Zum Schluss wurde das Pellet in 1 ml Resuspensionsmedium (s. Tabelle 2.4) je Ultrazentrifugen-Röhrchen aufgenommen.

Die Ermittlung der Aktivität der isolierten Thylakoidmembranen und damit ihre Verwendbarkeit als biologische Einheit im Biosensor erfolgte über das Puls-Amplituden-Modulations-(PAM)-Prinzip (Schreiber und Bilger, 1993). Als Fluorometer fand das ToxY-

PAM-Fluorometer der Firma Walz (Effeltrich, Deutschland) Verwendung. Als Kenngröße diente in diesem Zusammenhang der Aktivitätswert Yield. Dieser berechnet sich nach Formel 2.1.

$$(F_m' - F_t) / F_m' = \text{Yield}$$

**Formel 2.1**

Mit  $F_m'$  = maximale Fluoreszenz bei Lichtsättigung;  $F_t$  = Grundfluoreszenz bei Anregungslicht;  
Yield = Aktivitätswert für die photosynthetische Elektronentransportkette.

Die vorliegende Thylakoid-Suspension wurde mit destilliertem Wasser so verdünnt, dass unter Lichtsättigung im ToxY-PAM ein maximaler Fluoreszenzwert ( $F_m'$ ) von 1.500–2.200 erreicht wurde. In der Regel lag der Verdünnungsfaktor bei ca. 1:10, konnte aber je nach Menge an photosynthetisch aktivem Chlorophyll in der Suspension nach oben oder unten zu korrigieren sein. Für die biosensorischen Messungen von Nitroaromaten wurden nur Thylakoide, die einen Aktivitätswert (Yield) von mindestens 0,5 oder größer zeigten, verwendet.

Der genaue Messablauf ist unter Kapitel 2.5.2 dargestellt.

## 2.4 Lyophilisation der isolierten Membranen zur Konservierung

Um eine lange Haltbarkeit der Thylakoide als biologische Einheit zu gewährleisten, wurden diese nach einem modifizierten Protokoll nach Zimmermann *et al.* (1996) lyophilisiert. Da bei der Gefriertrocknung Schrumpfungsprozesse ausbleiben und die Feinstrukturen erhalten bleiben (Oetjen, 1997), handelt es sich um eine sehr schonende Art der Konservierung.

Ebenso haben Erfahrungen gezeigt, dass Messungen, die mit lyophilisierten Thylakoiden, im Vergleich zu frisch isolierten, durchgeführt wurden zum einen einen stabileren Verlauf zeigten, zum anderen sich die Messergebnisse auch wesentlich homogener gestalteten. Auch haben eigene Messungen den Nachweis erbracht, dass die Sensitivität lyophilisierter Thylakoidmembranen, die bei -20 °C gelagert wurden, erhalten bleibt.

Hierfür wurden von den in Kapitel 2.3 erwähnten Thylakoid-Lösungen Aliquots angefertigt, deren Verdünnung bei PAM-Messungen  $F_m'$ -Werte zwischen 1.500–2.200 zeigten. Das entsprechende Volumen wurde in Lyo-Gläschen (3 ml) einpipettiert, verschlossen und bei -20 °C eingefroren.

Die zur Gefriertrocknung verwendete Lyophilisationsanlage Alpha 2-4 LC (Martin Christ, Osterode, Deutschland) verfügt über die Möglichkeit, mittels nutzerspezifischer Programmführung sowohl die Temperatur, als auch das Vakuum während einer



Lyophilisation von der Anlage selbstständig steuern zu lassen. Das in dieser Arbeit angewendete Trocknungsprogramm ist in Tabelle 2.5 aufgeführt.

Mit Erreichen der Ausgangstemperatur von -30 °C startete das eingestellte Zeitprogramm.

Zeit		Temperatur	Druck	Status
	-0:00	> -30 °C	Atm	Beladen
<b>1 h</b>	0:00-1:00	- 30 °C	Atm	Gefrieren
<b>30 min</b>	1:00-1:30	- 20 °C	Atm	Gefrieren
<b>10 min</b>	1:30-1:40	- 20 °C	0,420 mbar	Haupttrocknung
<b>20 h</b>	1:40-21:40	- 20 °C	0,420 mbar	Haupttrocknung
<b>1 h</b>	21:40-22:20	- 10 °C	0,420 mbar	Haupttrocknung
<b>1,5 h</b>	22:20-24:10	- 10 °C	0,420 mbar	Haupttrocknung
<b>1 h</b>	24:10-25:10	0 °C	0,420 mbar	Haupttrocknung
<b>1 h</b>	25:10-26:10	0 °C	0,420 mbar	Haupttrocknung
<b>1 h</b>	26:10-27:10	10 °C	0,420 mbar	Haupttrocknung
<b>1 h</b>	27:10-28:10	10 °C	0,420 mbar	Haupttrocknung
<b>1 h</b>	28:10-29:10	20 °C	0,420 mbar	Haupttrocknung
<b>11 h</b>	29:10-40:10	20 °C	0,420 mbar	Haupttrocknung
<b>10 min</b>	40:10-40:20	20 °C	0,01 mbar	Nachtrocknung
<b>3 h</b>	40:20-43:20	20 °C	0,01 mbar	Nachtrocknung

**Tab. 2.5:** Zeitlicher Ablauf des Gefriertrocknungsprogramms für die isolierten Thylakoidmembranen, inklusive der jeweils anliegenden Temperatur und den vorherrschenden Druckverhältnissen.

Nach Beendigung der Trocknung wurden die Gläschen luftdicht verschlossen, um einen Kontakt mit der in der Luft enthaltenen Feuchtigkeit zu vermeiden. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C im Dunkeln aufbewahrt.

## 2.5 PAM-Fluoreszenz-Messungen mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor – Aufbau und zeitlicher Ablauf

Die unter Kapitel 2.3 isolierten und unter 2.4 lyophilisierten Thylakoidmembranen wurden im Folgenden als biologische Einheit des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors (CT-Biosensor) verwendet, um Substanzen nachzuweisen, die störende Wirkung auf den photosynthetischen Elektronentransport (PET) besitzen. Eine Hemmung des PET kann über drei verschiedene Mechanismen erfolgen:

- *Hemmung der Plastochinon-Reduktion*: Klassische und häufigste Herbizid-Hemmung, verursacht durch Bindung eines Hemmstoffes an der Q<sub>B</sub>-Bindenische des D1-Proteins im PS II. Durch die Lage des D1-Proteins in der Lipidmembran müssen die entsprechenden Hemmstoffe eine lipophile Eigenschaft besitzen.
- *Plastohydrochinon-Oxidation*: Hemmung des PET, die durch Blockade der Rückoxidation von PQH<sub>2</sub> am Cytochrom-<sup>b</sup>/<sub>f</sub>-Komplex entsteht, in vivo aber nicht von Bedeutung ist.
- *PSI-Elektronenübertragung*: Durch Reduktion der Hemmstoffe am PS I zu radikalischen Stoffen und der anschließenden Elektronenübertragung auf Sauerstoff entstehen Superoxid-Anionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)

Mittels der hier angewendeten PAM-Technik können allerdings nur die Hemmungen des PET, die dem ersten Hemm-Typus entsprechen, nachgewiesen werden, da nur diese zu Änderungen in den Fluoreszenzen führen (s. 2.5.1)

### 2.5.1 Prinzip der Messung

Dieser Biosensor dient dazu, Substanzen, die störend in die photosynthetische Elektronentransportkette eingreifen, zu detektieren. Hierbei wird das Phänomen ausgenutzt, dass in intakten Pflanzen nicht alle Energie, die vom Chlorophyll bzw. Light Harvesting Complex aufgenommen wird, in die photosynthetische Elektronentransportkette weitergeleitet wird. Ein Teil dieser Energie wird auch in Form von Wärme- oder Fluoreszenzstrahlung abgegeben. Im Allgemeinen handelt es sich hierbei um eine „Eigenschutzreaktion“ des Chlorophylls, welches im angeregten Zustand, also im ersten Singulett-Zustand, sehr instabil ist (Sitte *et al.*, 1992). Mit Hilfe der Puls-Amplituden-Modulations-(PAM)-Technik (Schreiber und Bilger, 1993) ist es möglich, diese Fluoreszenz als Größe zu bestimmen.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde das ToxY-PAM-Fluorometer der Firma Walz (Effeltrich, Deutschland) verwendet. Die Fluoreszenz-Anregung und -Messung erfolgt nach dem Prinzip der Puls-Amplituden-Modulation (Bradbury und Baker, 1981; Schreiber, 1986) bei einer Wellenlänge von 655 nm, also im Bereich des Absorptionsmaximums für Chlorophyll a in Ether (662 nm nach Sitte *et al.*, 1994). Für die Signaldetektion der Fluoreszenz ist im Gerät intern ein Filter eingebaut, der Fluoreszenz-Messungen erst oberhalb von 690 nm erlaubt. Hierdurch wird verhindert, dass es bei der relativen Nähe von Anregungslicht und Fluoreszenzmaximum (670 nm) zu einer Überlagerung der Lichtsignale von Anregung und Emission kommt (Popp, 2003).

Das Standard-Fluorometer ToxY-PAM mit Blaulicht (Anregungswellenlänge 460 nm, Lichtsättigende Blitze 480 nm und Signaldetektion > 640 nm) konnte nicht verwendet werden, da durch die zu erwartenden Färbungen der Bodenextrakte im Bereich von leicht gelb bis stark braun als Komplementärfarbe zum Anregungslicht Filtereffekte zu erwarten waren, die nicht kompensierbar sind. Somit war das „rote“ ToxY-PAM/R mit Rotlichtanregung trotz des geringeren Messfensters dem „blauen“ ToxY-PAM vorzuziehen.

Die Aktivität der photosynthetischen Elektronentransportkette wird durch die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz bei geringem Anregungslicht sowie der Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz unter lichtsättigenden Bedingungen ermittelt (Formel 2.1). Je stärker eine Substanz in den Elektronentransport eingreift und diesen hemmt, desto stärker steigt die Fluoreszenz des Chlorophylls in Folge der Eigenschutzreaktion an. Daraus ergibt sich, dass der Yield als Quotient von Fluoreszenz bei Anregungslicht und Fluoreszenz unter lichtsättigenden Bedingungen kleiner wird, bis er im Falle einer völligen Hemmung den Wert „0“ erreicht, wenn  $F_t$  und  $F_m'$  sich entsprechen. Ein weiterer Vorteil ergibt sich durch die Verwendung des Yield, und zwar erreicht man durch die Quotientenbildung, dass der ermittelte Messwert unabhängig von der Chlorophyllmenge ist, die sich als Stellgröße von  $F_m'$  und  $F_t$  in diesen Werten wiederfinden lässt.

Als Vergleichsmessung in dieser Arbeit diente eine finale Konzentration von 1,25  $\mu\text{g}$  Diuron/l in der Messkammer.

### **2.5.2 Durchführung der Messung**

Für die Messungen stehen bei den Chlorophyll-Fluorometern der ToxY-PAM-Reihe zwei Messkanäle zur Verfügung, die die parallele Betrachtung von Probe und der dazu gehörigen Kontrolle erlauben. Dies verhindert, dass Schwankungen in der Aktivität der biologischen Einheit zwischen zwei zeitlich aufeinander folgenden Messungen einen Einfluss auf das Messergebnis haben. Auch wird durch die parallele Messung von Probe und Kontrolle der zeitliche Aufwand minimiert. Der Aufbau einer Messkammer ist schematisch in Abbildung 2.1 dargestellt. Ersichtlich ist daraus die seitliche Beleuchtung der Probe durch die ringförmig angeordneten LEDs, welche auf das Zentrum der Messkammer fokussiert sind. Der Fluoreszenz-Detektor befindet sich am Boden der Messkammer (Popp, 2003; Walz, 2003).

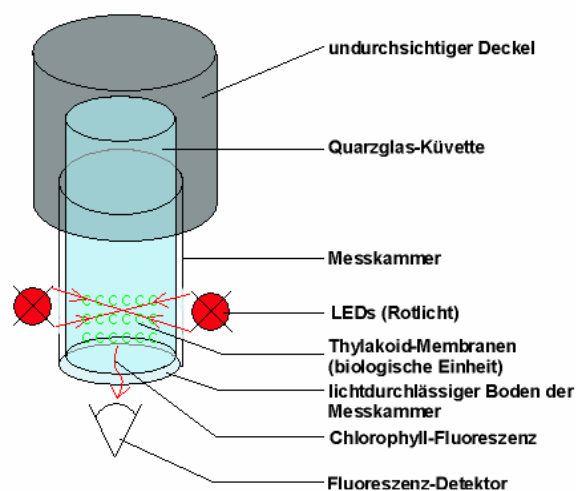


Abb. 2.1: Schematischer Aufbau einer ToxY-PAM-Messkammer.

Für die Messungen wurden Quarzglas-Küvetten (Hellma, Müllheim/Baden) verwendet. Um unterschiedliche Behandlungen der angefertigten Ansätze (Probe und Kontrolle) zu verhindern, war es neben der parallelen Befolgung eines genauen Pipettierschemas nötig, beide Ansätze einer unkontrollierten Lichtexposition soweit möglich zu entziehen. Hierfür diente eine spezielle Anfertigung aus schwarzem Kunststoff, in welche die Küvetten vor dem Befüllen gestellt wurden. Die Halterung war in der Art gestaltet, dass der mit Probe, Messpuffer und Thylakoid-Suspension zu befüllende Bereich in einem dunklen Raum vor Licht geschützt wurde.

Um Temperaturunterschiede zu vermeiden, wurden alle verwendeten Lösungen zwischen den Messungen auf Eis gestellt. Auch konnten dadurch temperaturbedingte Unterschiede in der Fluoreszenz (Agati *et al.*, 2000) vermieden werden.

Substanz	Molarität
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	500 mM
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1.500 mM
$\text{NaCl}$	400 mM
$\text{NH}_4\text{Cl}$	80 mM
Flavinmononukleotid (FMN)	0,5 mM
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	10 mM
pH (KOH)	7,5

Tab. 2.6: Zusammensetzung des bei den PAM-Fluoreszenz-Messungen an den isolierten Thylakoidmembranen zur Aktivitätsbestimmung des photosynthetischen Elektronentransports verwendeten Messpuffers nach Schnabl und Youngmann, (1987) modifiziert nach Bausch-Weis (1994).

Die Befüllungen von Probe und Kontrolle entsprachen den Angaben in Tabelle 2.7, wobei die Reihenfolge der angegebenen Schritte unbedingt eingehalten und auf einen gleichmäßigen Ablauf des Ansetzens geachtet werden musste, um möglichst standardisierte Bedingungen zu gewährleisten. Zu diesem Zweck wurden alle Schritte zuerst für die Kontrolle, dann für die Probe durchgeführt, bevor der nächste Schritt abgearbeitet wurde. Besonders in den Schritten

4-6 war auf Gleichmäßigkeit zwischen den einzelnen Läufen zu achten, da nach Zugabe der Thylakoid-Suspension in den Ansatz eine Reaktion von Testsubstanz mit der biologischen Einheit bereits einsetzt.

	<b>Gesamtvolumen in den Messküvetten 3.000 µl</b>	
<b>Pipetierschritt</b>	Kontrolle	Probe
<b>1. Wasser</b>	1.500 µl dest. Wasser	
<b>2. Lösungsmittel</b>	750 µl Lösungsmittel der Probe	750 µl Probe (Boden/TNT-Standard) in entsprechendem Lösungsmittel
<b>3. Puffer</b>	25 µl Messpuffer (Tab. 2.6)	
<b>4. Thylakoide</b>	25 µl Thylakoid-Suspension	
<b>5. Auffüllen</b>	700 µl dest. Wasser	
<b>6. Mischen</b>	Mehrmaliges kurzes Resuspendieren des Ansatzes zum Mischen	

**Tab. 2.7:** Aufstellung der Probenzusammensetzung für die PAM-Fluoreszenz-Messungen mit dem ToxY-PAM in der durchzuführenden Reihenfolge.

Der benutzte Messpuffer (Tab. 2.6) enthält neben den Puffersubstanzen auch den artifiziellen Elektronenakzeptor FMN, der das bei der Thylakoid-Isolation ausgewaschene NADP<sup>+</sup> ersetzt (Bausch-Weis *et al.*, 1994). Anschließend an Schritt 6 wurden beide Küvetten gleichzeitig der „Ansetzvorrichtung“ entnommen, gleichzeitig in die jeweiligen Kanäle des Fluorometers eingesetzt und gleichzeitig mit lichtundurchlässigen Kappen überdeckt. Unmittelbar darauf wurde die Messreihe gestartet. Eine Messreihe bestand aus sieben Einzelmessungen im Abstand von je einer Minute. Die Gesamtzeit einer Messreihe lag somit bei 6 min. Die Hemmung der Probe wird durch die Steuerungssoftware (ToxY-WIN 1.13) intern anhand der Aktivitäten (Yield) beider Kanäle gemäß Formel 2.2 in ein prozentuales Verhältnis gesetzt (Hemmung der Probe im Vergleich zur Kontrolle).

$$X = (\text{Yield}_{\text{Probe}} / \text{Yield}_{\text{Kontrolle}}) \times 100 \quad \text{Formel 2.2}$$

mit X = Hemmung des PET der Probe im Vergleich zur Kontrolle; Yield<sub>Probe</sub> = Aktivität des PET der Probe; Yield<sub>Kontrolle</sub> = Aktivität des PET der Kontrolle.

Der Messwert einer jeden Reihe wurde im Folgenden aus dem Mittelwert der einzelnen Messpunkte berechnet. Bei der Berechnung wurden die Messpunkte 1-3 einer jeden Messung ausgeschlossen, da die in diesem Zeitraum ablaufende Zeit nötig ist, um eine gleichmäßige Durchmischung der Suspension sowie eine ausreichende Einwirkzeit der Probe auf die

biologische Einheit und damit reproduzierbare Messwerte zu gewährleisten. Des Weiteren unterliegt die erste Messung trotz allen erwähnten Maßnahmen einer hohen Schwankung, die systembedingt nicht ausgeschaltet werden konnte.

## **2.6 HPLC-Messung von nitroaromatischen Verbindungen**

### **2.6.1 HPLC-Methodik**

In der HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ist es möglich, Substanzen quantitativ und qualitativ zu bestimmen, ohne dass diese dafür, wie in der Gas-Chromatographie, verdampft werden müssen. Dies ist vor allem von Vorteil, wenn die zu untersuchende Substanz einer thermischen Zersetzung bzw. Zerstörung unterliegt. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Nitroaromaten konnte eine solche Reaktion nicht ausgeschlossen werden. Bei der Auftrennung über HPLC ist es vor allem notwendig, dass sich die zu untersuchenden Substanzen in dem verwendeten Lösungsmittel lösen lassen.

Während bei der HPLC die Lösungsmittel die Aufgabe einer mobilen Phase übernehmen, kommt der Trennsäule die Funktion der so genannten stationären Phase zu. Hier wird die zu untersuchende Probe von der Säule adsorbiert und anschließend aufgrund von Adsorptions-/Desorptions-Vorgängen nach spezifischen Löslichkeitskriterien und Adsorptionsvermögen aufgetrennt. Die Auftrennung lässt sich durch die so genannte Gradientenelution erreichen, die vor allem bei Substanzgemischen unumgänglich ist. Hierbei wird die Zusammensetzung der Lösungsmittel der mobilen Phase reproduzierbar variiert. Bei der hier verwendeten Umkehr-Phasen-Chromatographie findet die Tatsache Anwendung, dass Substanzen, die schwerer aus der verwendeten Säule eluierbar sind, durch die Änderung von schwachen auf starke Lösungsmittel aus der Säule eluiert werden können. Bei dieser Änderung der Lösungsmittel ist des Weiteren zu gewährleisten, dass sich der verwendete Detektor als gradiententauglich erweist, was bedeutet, dass die Änderung des Lösungsmittelgradienten nicht als Änderung des Signals im Detektor wahrgenommen werden darf.

Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten HPLC-Methode handelt es sich um die RP-(Reversed Phase = Umkehr-Phasen)-HPLC. Bei dieser findet in der Säule eine unpolare stationäre Phase Anwendung. Hierbei werden die an der Säule gebundenen Substanzen um so stärker zurückgehalten, je unpolarer, also wasserunlöslicher sie sind. Da Wasser die Teilchen der RP-Säulen nicht benetzen kann, lassen sich die Elutionszeiten anhand des Wassergehaltes variieren. Erst die Konzentrationserhöhung der Modifier (lösende Bestandteile der mobilen Phase, wie Methanol oder Acetonitril) beschleunigen die Elution. Die Trennung der

Substanzgemische auf einer RP-Säule ist das Resultat einer Wechselwirkung zwischen Fließmittel und Probe in Abhängigkeit mit dem Packungsmaterial der Säule.

In der chromatographischen Auftrennung der einzelnen Substanzen einer Probe spielen neben ihrer Löslichkeit noch eine Vielzahl weiterer Parameter in der Auftrennung eines Gemisches eine Rolle. So ist es vor allem die Säule, die einen Einfluss auf die Auftrennung hat. Hierbei haben Faktoren wie Länge, Durchmesser und Partikelgröße der Säule entscheidende Bedeutung. So wird mit kleineren Partikeln eine höhere Trennwirkung erzielt, mit geringerem Querschnitt verringert sich der Lösungsmittelverbrauch und erhöht sich die Empfindlichkeit des Systems. Neben diesen Faktoren besitzen auch noch weitere Faktoren einen Einfluss auf die Auftrennung. So sind die Art der stationären Phase, die Flussgeschwindigkeit der mobilen Phase sowie die Temperatur von gravierender Wichtigkeit, was die genaue Definition und Reproduzierbarkeit des Aufbaus notwendig macht (Gottwald, 1993).

## 2.6.2 Durchführung der Messungen

Als Lösungsmittelsystem wurden destilliertes Wasser aus der Reinstwasseranlage als polare Phase und Methanol, HPLC-grade, als unpolare Phase verwendet, die gemäß eines modifizierten Zeitprogramms nach Steinbach (2003) in ihrer Konzentration gesteuert wurden. Tabelle 2.8 gibt das verwendete Programm in seinen Schritten wieder. Die Flussrate lag bei 0,35 ml/min.

Die Peak-Detektion erfolgte bei 230 nm, was dem Absorptionsmaximum von TNT entspricht. Der in dieser HPLC verwendete Dioden-Array-Detektor (DAD) besitzt darüber hinaus noch den Vorteil, dass durch das mögliche Lichtspektrum von 180–800 nm nicht nur eine Identifizierung der Peaks anhand der Retentionszeit, sondern auch anhand der substanzspezifischen Absorptionsspektren möglich war. Um die bei den Messungen entstehende Datenmenge möglichst gering zu halten, wurde das verwendete Lichtspektrum des DAD-Detektors auf 200-400 nm eingegrenzt, was sich zur Identifizierung der nitroaromatischen Verbindungen als völlig ausreichend darstellte.

Bei Verwendung von mehreren Proben einer Extraktionsreihe wurde der Autosampler der HPLC-Anlage verwendet, um die Proben selbstständig auf die Säule aufzugeben. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass die unterschiedlichen Proben alle unter gleichen Bedingungen aufgegeben wurden.

Für die Eichmessungen wurden 40 µl Standard-Lösung injiziert, für die anschließenden Messungen der Extrakte in der Regel 80 µl.

Zeitabschnitt [min]		Ausgangsanteil [%]		Zielanteil [%]		Art des Verlaufes
Von	Bis	Wasser	Methanol	Wasser	Methanol	
0:00	2:00	65	35	--		Isokratischer Verlauf
0:01	Injektion der zu untersuchenden Probe in die mobile Phase					
2:00	14:00	65	35	45	55	Linearer Gradient
14:00	34:00	45	55	--		Isokratischer Verlauf
34:00	35:00	45	55	0	100	Linearer Gradient
35:00	45:00	0	100	--		Isokratischer Verlauf
45:00	46:00	0	100	65	35	Linearer Gradient
46:00	60:00	65	35	--		Isokratischer Verlauf
56:00	Rinse Autosampler					
60:00	Stop Run					

Tab. 2.8: Darstellung der zeitlichen Abläufe und Konzentrationsänderungen innerhalb des verwendeten HPLC-Programms.

## 2.7 Dotierung der Standardböden mit TNT

### 2.7.1 Für die Dotierung verwendete Bodentypen

Da sich Böden im Allgemeinen in ihren strukturechemischen Eigenschaften untereinander sehr heterogen verhalten (Püttmer, 2003) war es in der vorliegenden Arbeit notwendig, die anzuwendenden Methoden zuerst an künstlich kontaminierten Böden unterschiedlicher Herkunft und Art zu erproben. Als „Standard-Böden“ standen in dieser Arbeit fünf verschiedene Böden zur Verfügung, die in folgender Tabelle (2.9) aufgeführt sind.

Bodenbezeichnung	Bodenart	Bezugsquelle
<b>Waldboden</b>	Waldboden, Humusreich mit hohem Tongehalt	Institut für Bodenkunde der Universität Bonn
<b>Grünlandboden</b>	Grünlandboden/Löß	
<b>Sandboden</b>	Sandboden von der Düne in Bonn-Tannenbusch, geringer Humusgehalt	
<b>Ackerlandboden</b>	Ackerlandboden/Löß	Grafschafter Zuckerfabrik
<b>Humusboden</b>	Torf / Humus Einheitserde Typ T	Käufliche Einheitserde (TERREAU PROFESSIONEL GEPAC)

Tab. 2.9: Darstellung der zur Dotierung verwendeten Böden, deren Bodenart und Bezugsquelle.



### 2.7.2 Dotierung der Bodenproben

Für die Dotierung wurde die verbreitete Methode in Aceton/Acetonitril gelöste Standards mit der Bodenprobe zu vermischen (Ribidoux *et al.*, 1999; Strong *et al.*, 1999; Psillakis *et al.*, 2000) insoweit geändert, als dass Methanol als Lösungsmittel eingesetzt wurde. Diese Änderung sollte gewährleisten, dass störende Einflüsse durch Aceton/Acetonitril auf den CT-Biosensor möglichst weit ausgeschlossen wurden. Der genaue Einfluss von Lösungsmitteln auf die biologische Einheit des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors wird in Kapitel 2.9 untersucht.

Für die Dotierung wurden je 20 g der lufttrockenen Standard-Böden, in Anlehnung an das United States Army Corps of Engineers (USACE, 2003) in Bechergläser eingewogen. Die zu dotierende Menge an TNT wurde einer TNT-Methanol-Stammlösung definierter Konzentration entnommen und mit Methanol auf ein Gesamtvolumen von 2 ml aufgefüllt. Dieses Volumen wurde zur Gleichbehandlung aller Proben zu Beginn der Versuche festgelegt.

Die Dotierung erfolgte anschließend durch Zugabe der 2 ml TNT-Methanol-Lösung zu den Böden. Vermischt wurden diese Lösung und Boden mit Hilfe eines Spatels, bis die Lösung gleichmäßig im Boden verteilt war. Für Kontrollböden wurden 2 ml Methanol ohne TNT-Zugabe mit dem Boden vermischt. Dies sollte gewährleisten, dass sowohl Probe, als auch Kontrolle bis auf die TNT-Zugabe unter den gleichen Bedingungen angesetzt und hergestellt wurden. Damit das Methanol, das in diesem Zusammenhang als Bindungsvermittler dient, aus den Böden abdampfen konnte, wurden diese mindestens über Nacht unter den Abzug gestellt (Ribidoux *et al.*, 1999). Gleichsam wurden die Proben behandelt, die zur Kontrolle nur mit 2 ml Methanol versetzt wurden.

Setzte man die zugegebene Menge an TNT als zu 100 % löslich voraus, so lagen die maximal zu erreichenden Wiederfindungsraten an TNT in den dotierten Böden zwischen 50 mg TNT/l und 200 mg TNT/l.

## 2.8 Realkontaminierte Böden

In dieser Arbeit fanden insgesamt neun Böden von Standorten Anwendung, die durch die Produktion von TNT in der Zeit zwischen 1939-1945 stark mit TNT verunreinigt wurden. Die Böden wurden von den jeweiligen am Ort ansässigen Sanierungsunternehmen mit freundlicher Genehmigung bereitgestellt. Aus Gründen der Vertraulichkeit können weder der jeweilige Standort, noch der Name des zuständigen Sanierers angegeben werden.

Um dennoch eine Einteilung der einzelnen Böden zu gewährleisten, wurden die Böden über die folgenden Bezeichnungen kodiert:

- *ABC 1-6*: Herkunftsort und Probenbezeichnung für sechs Bodenproben des gleichen Standortes
- *DEF*: Herkunftsort und Probenbezeichnung für eine Bodenprobe eines einzelnen Standortes
- *GHI 1-2*: Herkunftsort und Probenbezeichnung für zwei Bodenproben des gleichen Standortes

## 2.9 Extraktionen nitroaromatischer Verbindungen aus Böden

### 2.9.1 Lösungsmittel

Zum Test, in wie weit die biosensorische Einheit des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors durch Lösungsmittel beeinflusst wird, wurden biosensorische Messungen, mit für die Extraktion potenziell verwendbaren Lösungsmitteln vorgenommen. Hierbei handelte es sich um Acetonitril, Toluol, Methanol, Ethanol und eine 0,01 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung. Die Wirkung der organischen Lösungsmittel auf den CT-Biosensor sollte die mögliche Verwendbarkeit dieser, in der Analytik von Nitroaromaten häufig angewendeten (Breitung *et al.*, 1996; Frische, 2002B; 2002C) Lösungsmittel klären. Die 0,01 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung sollte in diesem Zusammenhang eine mögliche Verbesserung der Bioverfügbarkeit durch Extraktion unter pflanzenverfügbaren Bedingungen durch Simulation eines frisch gepflügten Ackers erreichen (Schachtschabel *et al.*, 1989).

	<b>Gesamtvolumen in den Messküvetten 3.000 µl</b>	
<b>Pipetierschritt</b>	Kontrolle	Lösungsmittel
<b>1. Wasser</b>	1.500 µl dest. Wasser	
<b>2. Lösungsmittel</b>	750 µl dest. Wasser	300 µl Lösungsmittel [Acetonitril / Toluol] 450 µl dest. Wasser [bzw. 750µl Methanol / Ethanol / 0,01 M CaCl <sub>2</sub> ]
<b>3. Puffer</b>	25 µl Messpuffer (Tab. 2.6)	
<b>4. Thylakoide</b>	25 µl Thylakoid-Suspension	
<b>5. Auffüllen</b>	700 µl dest. Wasser	
<b>6. Mischen</b>	Mehrmales kurzes Resuspendieren des Ansatzes zum Mischen	

**Tab. 2.10:** Aufstellung der Probenzusammensetzung für die PAM-Fluoreszenz-Messungen der Lösungsmitteltests mit dem ToxY-PAM in der durchzuführenden Reihenfolge.

Von Acetonitril und Toluol wurden finale Konzentrationen von 10 % auf den Biosensor getestet. Die Wirkung von Methanol, Ethanol und der  $\text{CaCl}_2$ -Lösung wurde bei einem finalen Anteil von 25 % auf den Biosensor untersucht.

Die Befüllung der Messkammer ist unter Kapitel 2.5.2 beschrieben. Die Lösungsmittel als Probe wurden dabei gegen destilliertes Wasser als Kontrolle gemessen. Somit ergibt sich für die Lösungsmittel die in Tabelle 2.10 dargestellte Zusammensetzung der Messkammer.

## **2.9.2 Verwendung unterschiedlicher Extraktionsmethoden zur Bestimmung der Wiederfindungsrate von TNT aus Böden**

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate von TNT aus Böden wurden in dieser Arbeit verschiedene Extraktionsmethoden untersucht, um TNT aus dotierten Böden effektiv herauszulösen. Diese Untersuchungen sollten dazu dienen, ein möglichst effektives Verfahren zur Extraktion von TNT aus realkontaminierten Böden zu erreichen. Da genaue Angaben der TNT-Konzentrationen, bedingt durch die inhomogene Verteilung von TNT in realkontaminierten Böden (Durner, 2002), nur in dotierten Böden möglich sind, fanden diese bei der Entwicklung des geeignetsten Extraktionsverfahrens Anwendung. Hierbei wurden die Alterungsprozesse in Böden, die zu einer verstärkten Festlegung von Inhaltsstoffen und somit auch von Kontaminationen führen (Hatzinger und Alexander, 1995; Durner, 2002) nicht berücksichtigt, da in erster Linie die Betrachtung auf einem reproduzierbaren Verfahren lag.

Bei allen angewendeten Extraktionsverfahren wurde das Verhältnis von Boden zu Lösungsmittel identisch festgelegt, auf ein Teil Boden zu zwei Teilen Lösungsmittel (w/v). Dies entspricht dem bestmöglichen Verhältnis von Extraktionsmenge und aufzuwendender Lösungsmittelmenge (Kördel und Hund, 1998; Kördel, 2001; Frische, 2002B; Frische, 2003; Frische und Höper, 2003).

## **2.9.3 Getestete Extraktionsverfahren**

### **2.9.3.1 Extraktion mittels Ultraschallbehandlung**

Die Anwendung von Ultraschall bei der Extraktion von Böden ist in der Literatur weit verbreitet (Vidal, 1995; Breitung *et al.*, 1996; Larson *et al.*, 1999; Sunahara *et al.*, 1999; Boopathy, 2002; USACE 2003; Bausinger *et al.*, 2004; Lambropoulou *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurde in Anlehnung an Frische (2002B; 2002C) eine Extraktion von TNT mit Hilfe einer 18-stündigen Ultraschallbehandlung angewendet. Das für die Extraktion von Böden mittels Ultraschallbehandlungen bevorzugt verwendete Methanol wurde durch Wasser ersetzt. Wasser wurde verwendet, da es, im Vergleich zu organischen Lösungsmitteln, für die

biologische Einheit des Biosensors nicht toxisch ist und nach DIN-Norm 38414 zur Mobilitätsabschätzung von Kontaminationen in Böden herangezogen wird (Hirner *et al.*, 1998).

Für die Extraktion mittels Ultraschall wurde der dotierte Boden im bereits in Kapitel 2.9.2 erwähnten Verhältnis von 1:2 mit Wasser versetzt und für 18 h in einem Kunststoff-Vial im Ultraschallbad behandelt.

Nachdem Breitung *et al.* (1996), wenn auch in Methanol, mit erheblich kürzerer Behandlungszeit gearbeitet haben, wurde in einem weiteren Schritt die Behandlungszeit auf eine Stunde begrenzt, um auf diese Weise die Ultraschallbehandlung anwendungs- und feldtauglicher zu gestalten und um große Temperaturanstiege bei der Behandlung zu vermeiden. Sowohl bei der Extraktion über 18 h als auch über eine Stunde fand keine zusätzliche Regelung der Temperatur statt.

### **2.9.3.2 Extraktion mittels Rühren**

Neben den Versuchen der Extraktion mit Ultraschall wurden auch Extraktionen mittels Magnetrührer durchgeführt. Das Verhältnis Boden zu Lösungsmittel betrug auch hier 1:2, wobei als Lösungsmittel Wasser verwendet wurde. Hierbei wurde die Geschwindigkeit des Rührers so gewählt, dass eine kontinuierliche Mischung der gesamten Probe mit dem Wasser gewährleistet wurde und keine Sedimentation beobachtet werden konnte (in Anlehnung an Umwelt-online, 2003).

Zur Verbesserung der Löslichkeit von schwerlöslichen Kontaminationen durch Temperaturerhöhung (Breuer, 1987; Geller, 2001), gemäß den Gesetzmäßigkeiten des Henry-Dalton'schen-Gesetzes (Harms, 1994), fanden bei den Rührer-Versuchen Extraktionen bei 60 °C sowie bei 90 °C statt.

Des Weiteren wurde versucht, über eine Verlängerung der Extraktionszeit eine Verbesserung der extrahierten Menge zu erreichen. Hierbei wurden Extraktionen bei einer Temperatur von 60 °C, Extraktionszeiten von einer und vier Stunden verglichen.

Bedingt durch den Zeitpunkt im Verlauf dieser Arbeit, wurden die oben dargestellten Versuche in der Regel mit Proben des Ackerbodens durchgeführt. Proben aus Wald-, Grünland-, Sand- und Humusboden erfolgten anschließend nur nochmals zur Kontrolle in einigen Punkten.

Die Aufreinigung der Bodenextrakte wurde mittels Zentrifugation für 10 min bei 5.445 g und Raumtemperatur durchgeführt, um in diesem Schritt die größten Schwebstoffe aus dem Extrakt zu beseitigen. Der bei der Zentrifugation erhaltene Rückstand wurde verworfen. Die Feinaufreinigung der Extrakte erfolgte anschließend über Filtration der Überstände über

0,45 µm und 0,22 µm Nylonfiltern in einer Vakuum-Filtrationsanlage. Die erhaltenen Extrakte zeigten damit eine ausreichende Reinheit für die chromatographischen Messungen mit der HPLC (Gottwald, 1993).

## **2.10 Messung des pH-Wertes von Böden**

### **2.10.1 Bestimmung der realen Acidität**

Für die Ermittlung der realen Acidität der Böden wurde der pH-Wert der wässrigen Bodenextrakte, die für die Messungen mittels HPLC und Biosensorik verwendet wurden, mit einem digitalen pH-Meter vermessen. Aus den sich ergebenden Messwerten einer Bodensorte wurde das arithmetische Mittel gebildet.

Soweit die Proben nicht unmittelbar nach der Herstellung bzw. den chromatographischen und biosensorischen Analysen auf ihren pH-Wert hin untersucht wurden, wurden diese bei -20 °C im Dunkeln gelagert und vor der Messung im Ultraschallbad auf Raumtemperatur erwärmt.

### **2.10.2 Bestimmung der potenziellen Acidität**

Im Gegensatz zu den pH-Wert-Messungen der wässrigen Bodenextrakte wurden bei den Messungen der (potenziellen) Boden-pH-Werte keine wässrigen Extrakte der Böden verwendet, sondern in Anlehnung an Schachtschabel *et al.* (1989), der Umwelt-Online (2003) und der DIN ISO 10390, 1997-05 (Huhle, 2004) Extrakte einer 0,01 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung. Bei der Verwendung von CaCl<sub>2</sub>-Lösung zur Messung des pH-Wertes von Böden wird durch die Lösung die Situation in einem frisch gepflügten Acker simuliert (Schachtschabel *et al.*, 1989)

Um dennoch eine bessere Vergleichbarkeit zu den durchgeführten Extraktionen mit Wasser zu erhalten, wurde, um das Verhältnis von 1:2 zu erhalten, das Protokoll (Schachtschabel *et al.*, 1989) so abgeändert, dass anstelle von 25 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung auf 10 g Boden 20 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung auf 10 g Boden gegeben wurde. Die Extraktion erfolgte in Anlehnung an Kapitel 2.9.3.2: eine Stunde Rühren auf dem Magnetrührer, anschließend Aufreinigung der Suspensionen in der Zentrifuge bei 5.445 g für 10 min bei Raumtemperatur und Filtrierung der Überstände durch 0,45 µm und 0,22 µm-Filtermembranen mittels Vakuumfiltration.

Die pH-Messungen erfolgten bei Raumtemperatur mit einem digitalen pH-Meter. Aus den Messungen von Lösungen gleicher Böden wurde anschließend das arithmetische Mittel gebildet.

## **2.11 Bestimmung des Kohlenstoff- und Stickstoffgehaltes von Böden**

Um den Einfluss von spezifischen Bodenparametern auf die Extrahierbarkeit von Nitroaromaten abschätzen zu können, erfolgten in diesem Versuchsteil Messungen der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte in den getesteten Böden.

Diese Messungen führten das Institut für Bodenkunde wie auch vom Institut für Pflanzenernährung, beides Institute der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, durch.

Zur Vorbereitung wurden die Bodenproben luftgetrocknet und mittels Schwingkugelmühle, bei maximaler Leistung innerhalb einer Minute staubfein gemahlen. Die erhaltenen Proben wurden aufgeteilt und den beiden Instituten für die weitere Analyse übergeben. Hier erfolgten sowohl die Einwaage der Proben wie auch die eigentliche Messung mittels Elementar-Analysator durch Herrn Dr. Welp am Institut für Bodenkunde bzw. Frau A. Glogau am Institut für Pflanzenernährung der Universität Bonn.

## **2.12 Grundlagen der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technologie und ihre biosensorische Anwendung auf den Nachweis von TNT**

### **2.12.1 Theoretische Grundlagen und Prinzip der Messung**

Die Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) dient in biologischen Untersuchungen als Signaltransducer für biochemische Reaktionen in Echtzeit (Elkind *et al.*, 1999), ohne dass die Analyten einer zusätzlichen Markierung bedürfen (Shankaran *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005).

Bei dem Messprinzip der SPR wird das physikalische Phänomen des Plasmonschwingungsquants (kurz Plasmon) ausgenutzt, bei dem es sich im Allgemeinen um Dichteschwankungen von Ladungsträgern in Halbleitern und Metallen handelt. Im Falle der Oberflächenplasmonen zeigen sich diese in Form evaneszenter Wellen mit longitudinaler Schwingung parallel zur Metalloberfläche.

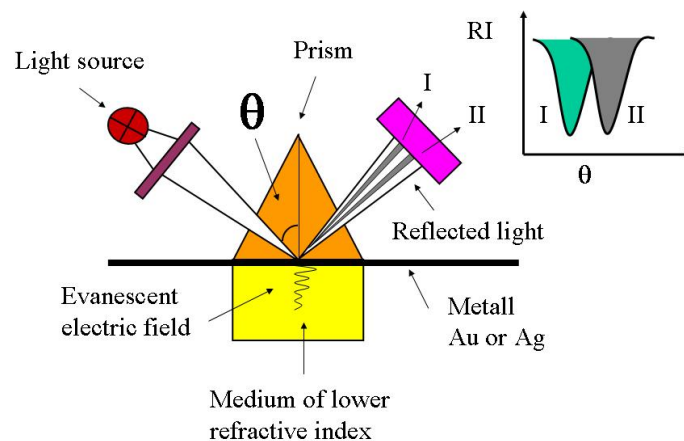
Bei der Oberflächen-Plasmon-Resonanz handelt es sich um ein Messprinzip zum Nachweis von Bindungen zwischen Molekülen durch quantitative Bestimmung der Schichtdicke, welches in der vorliegenden Form dazu verwendet werden kann, Bindungsstudien von „ungelabelten“ Analyten in Echtzeit vorzunehmen (BIAcore AB, 1998). Neben „Spot-Messungen“, wie sie in der Lebensmittel-Industrie benötigt werden, eignet sich die Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Messung auch gut für „kontinuierliche Messungen“, wie sie im Monitoring von Umweltzuständen benötigt werden (Naimushin *et al.*, 2003).

Für diese Messungen werden die im Folgenden dargestellten Phänomene ausgenutzt. Fällt Licht durch zwei Medien mit unterschiedlichem refraktären Brechungsindex, so erfolgt an der Grenzfläche beider eine Kombination von Reflexion und Brechung. Ab einem bestimmten Winkel (Winkel der totalen Reflexion) wird das Licht nur noch reflektiert und nicht mehr gebrochen. Dabei wird durch die Anregung des Lichtes eine evaneszente Welle auf der Seite mit geringerem refraktären Index erzeugt. Handelt es sich bei dem eingestrahnten Licht um monochromatisches und p-polarisiertes Licht und liegt zwischen beiden Medien eine sehr dünne Metallschicht, so wird die Intensität des reflektierten Lichtes bei einem bestimmten Winkel des einfallenden Lichtes ausgelöscht, so dass ein scharfer „Schatten“ im reflektierten Licht entsteht. Dieses Phänomen wird als Oberflächen-Plasmon-Resonanz (Surface Plasmon Resonance / SPR) bezeichnet, der entsprechende Winkel als SPR-Winkel.

Dieser SPR-Winkel wiederum hängt von einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren ab, wie der Wellenlänge des einfallenden Lichtes und der Beschaffenheit der Metallschicht (Dicke, optische Konstanz, Uniformität etc.) sowie den refraktären Indices der Medien auf beiden Seiten der Metallschicht, und damit auch der Konzentration an Stoffen auf der lichtabgewandten Seite der Metallschicht. Als Metallschicht findet bei dem in dieser Arbeit verwendeten Gerät der Firma BIAcore [BIAcore 3000<sup>®</sup>] (Uppsala, Schweden) Gold Anwendung, da dieses die besten Eigenschaften in den Bereichen Reflexionswinkel und Wellenlängenverhältnis aufzeigt und sich in den meisten Lösungen chemisch inert verhält (Biacore AB, 1998).

Das Phänomen der SPR wird bei Messungen auf der Basis der SPR-Technologie in der Art ausgenutzt, dass eine monochromatische Lichtquelle, beim BIAcore 3000<sup>®</sup> eine LED im nahen Infrarot-Bereich, Licht über ein Prisma auf einen Chip strahlt, der aus einem Glasplättchen mit aufgelagerter Goldschicht besteht; an diesem ist wiederum über eine Linker-Schicht ein spezifischer Ligand angebunden. Die Goldoberfläche befindet sich dabei auf der lichtabgewandten Seite des Glasplättchens. Über das Prisma wird erreicht, dass ein definierter Bereich an Winkeln auf die Goldoberfläche trifft. Der Winkel des ausgelöschten Lichtstrahls kann über einen entsprechenden Detektor auf der reflektierten Seite gemessen werden. Änderungen an der der Goldschicht aufgelagerten Oberfläche führen zu Änderungen des Winkels (SPR-Winkel) des ausgelöschten Lichtstrahls. Durch die Interaktion der an die Goldoberfläche gebundenen Moleküle (Liganden) mit weiteren Molekülen in Lösung (Analyten), kommt es zur Änderung des refraktären Indexes an der Chipoberfläche.

Das Messprinzip der SPR ist in Abbildung 2.2 dargestellt.



**Abb. 2.2:** Darstellung der optischen Verhältnisse im Prisma einer SPR-Anlage bei sich ändernden Bindungen an der SPR-Fläche (I und II) sowie dem sich daraus ergebenden Signal (Uni-Oldenburg, 2005).

Wird eine zu analysierende Probe auf der lichtabgewandten Seite unter kontinuierlichem Fluss an der Chipoberfläche vorbeigeleitet, so kommt es zu einer Interaktion zwischen dem Analyten in der Lösung und dem Liganden an der Chipoberfläche, und damit zu einer Änderung

des refraktären Indexes, der sich in Form einer Winkeländerung des ausgelöschten reflektierten Lichtstrahls messen lässt (Willis, 2002) (s. auch Abb.:2.2 I/II). Die Stadien I und II in Abbildung 2.2 geben den durch die Bindung geänderten SPR-Winkel (Biacore AB, 1998) wieder.

Auch ist es nötig, dass aufgrund der Temperaturanfälligkeit der SPR-Messungen (Elkind *et al.*, 1999; Naimushin *et al.*, 2003) die Temperatur über den gesamten Verlauf einer Messreihe konstant gehalten wird. In der vorliegenden Arbeit waren dies 25 °C.

### 2.12.2 Nachweis von TNT über einen kompetitiven Immunoassay mittels SPR

In dieser Arbeit wurde, modifiziert nach Elkind *et al.* (1999) und Strong *et al.* (1999), ein Kompetitiver-/Verdrängungs-Immunoassay verwendet. Bei einem solchen kompetitiven Immunoassay werden die Probleme, die durch ein zu kleines Molekulargewicht (< 1.000 Da) auftreten, umgangen (Strong *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2005). Bei einem indirekten Bindungsassay wird der Analyt nicht direkt über die Bindung an den an der Chipoberfläche immobilisierten Liganden gemessen. Der Analyt wird vor der Messung mit einem Antikörper inkubiert, der spezifisch gegen den an der Chipoberfläche immobilisierten Liganden ist. Diese Analyt-Antikörper-Lösung wird über die Chipoberfläche geleitet, wobei die Anwesenheit des Analyten dabei über eine verminderte Bindung des Antikörpers an die Chipoberfläche registriert wird. Vorteil eines solchen indirekten Nachweisverfahrens liegt in der Tatsache, dass die Sensitivität nicht von der Masse des Analyten limitiert wird (Elkind *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2005). Ansonsten stellt sich der Nachweis kleiner Moleküle als problematisch dar



(Shankaran *et al.*, 2005), auch wenn dieser im Prinzip gerade mit der SPR-Technologie möglich ist.

In dieser Arbeit durchgeführte Abweichungen zu den Arbeiten von Elkind *et al.* (1999) und Strong *et al.* (1999) sind zum Teil dadurch zu begründen, dass anstelle des dort verwendeten Speetra SPR-Messgerätes der Firma Texas Instruments in diesen Versuchen das BIAcore 3000<sup>®</sup> der Firma BIAcore (Uppsala, Schweden) benutzt wurde.

Bei dem hier durchgeführten TNT-Immunoassay wurde als Ligand an der Chipoberfläche 2,4,6-Trinitrobenzol verwendet, welches zur Kopplung an den Chip mit BSA verbunden wurde. Als Antikörper-Bindungspartner wurde ein monoklonaler TNT-Antikörper (Strategic Diagnostics, Texas, USA) eingesetzt.

Diesem Versuch liegt die Theorie zu Grunde, dass sich aufgrund der hohen strukturellen Gleichheit von TNT und TNB, auch eine Bindung zwischen monoklonalen TNT-Antikörpern und TNB erreichen lässt (Elkind *et al.*, 1999; Strong *et al.*, 1999). Nachgewiesen werden konnten solche Kreuzreaktionen mit TNT-Antikörpern auch mit anderen nitroaromatischen Verbindungen (Zeck *et al.*, 1999). Hierbei bleibt allerdings eine höhere Affinität des Antikörpers zum TNT erhalten. Wird der TNT-Antikörper an den immobilisierten TNB-BSA-Molekülen vorbei geleitet, kommt es zu Bindungen zwischen dem TNB und dem Antikörper. Wird die TNT-Antikörper-Lösung jedoch mit freiem TNT in einer Lösung zusammen gebracht, so bindet der Antikörper an dieses und nicht mehr an das TNB-BSA. Bei Verwendung fester Konzentrationen an TNT-Antikörper ist es somit möglich, anhand von verringerten Bindungen zwischen TNT-Antikörpern und immobilisiertem TNB-BSA auf der Chipoberfläche auf den Gehalt an TNT in der Lösung zu schließen. Das bedeutet also: je geringer die Bindung des TNT-Antikörpers an das immobilisierte TNB-BSA ist, desto größer ist die Konzentration an TNT in der Lösung.

### **2.12.3 Präparation der Chipoberflächen**

#### **2.12.3.1 Herstellung von Trinitrobenzol-Sulfonsäure-BSA-Kopplungen**

Die Herstellung des 2,4,6-Trinitrobenzol-BSA (TNB-BSA) erfolgte nach der Methode von Strong *et al.* (1999). Zur Kopplung des TNB mit dem BSA wurden 0,4 ml 2,4,6-TNB-Sulfonsäure (in 5 % wässriger Lösung) mit 10 ml einer 20 mg/ml BSA-Lösung in Phosphat-Puffer (pH 8,0) vermischt. Die Reaktion verlief bei Raumtemperatur für zwei Stunden. Anschließend wurde die Reaktionslösung über Nacht in PBS-Puffer (pH 7,4) bei 4 °C dialysiert. Hierzu wurden 5 ml-Float-A-Lyzer-Dialyseschläuche (Spectra Pro<sup>®</sup>) benutzt, die mittels eines Magnetrührers in einer leichten Bewegung gehalten wurden. Zur Lagerung der

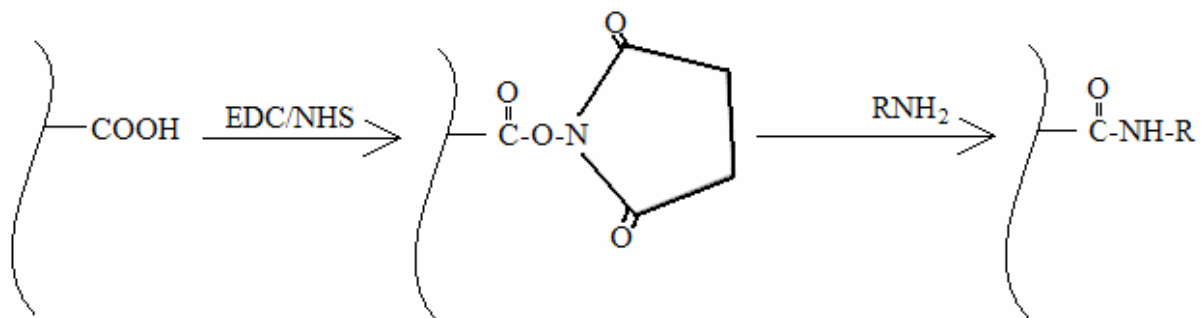
Reaktionsprodukte wurden diese in Glas-Vials überführt und bis zur Verwendung bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

### 2.12.3.2 Kopplung von TNB-BSA an die Goldoberfläche des SPR-Chips

Das, wie unter Abschnitt 2.12.3.1 beschrieben, hergestellte TNB-BSA wurde über die Aminkopplungsmethode kovalent an die Chipoberfläche eines CM5-Chips (BIAcore AB, Uppsala, Schweden) immobilisiert.

Der für die Messung verwendete CM-5-Chip besitzt eine definierte Oberfläche aus carboxymethyliertem (CM) Dextran. Dextran zeigt als Polymer der Glucose eine geringe „Bereitschaft“ zu unspezifischen Bindungen. Die Carboxymethyl-Gruppen am Dextran dienen Bindungen mit unterschiedlichen Liganden. Durch diesen Aufbau wird eine Steigerung der Bindungsfähigkeit gegenüber einer reinen Goldoberfläche von 1-5 ng/mm<sup>2</sup> auf ~ 50 ng/mm<sup>2</sup> erreicht (Biacore AB, 1998).

Aufgrund der zahlreichen Amine, die in BSA-Molekülen vorkommen, wurde die so genannte Aminkopplung für die Immobilisierung der TNB-BSA-Moleküle verwendet. In dieser wird die Chipoberfläche durch 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) / N-Hydroxysuccinimid (NHS) aktiviert, bevor das TNB-BSA über die Amingruppen an die Chipoberfläche gekoppelt wurde. Die genauen Abläufe dieser Kopplungsreaktion sind in Abbildung 2.3 wiedergegeben.



**Abb. 2.3:** Aktivierung und Kopplung eines Liganden (-R) an die Oberfläche eines CM5-Chips über die Aminkopplung. Im vorliegenden Fall entspricht der Rest -R dem -TNB-BSA bzw. dem -BSA.

Die vier Flusszellen des Chips wurden in folgender Weise mit Liganden gekoppelt:

Flusszelle 1: BSA

Flusszelle 2: TNB-BSA

Flusszelle 3: BSA

Flusszelle 4: TNB-BSA

Reines BSA wurde als reales Kontrollprotein verwendet, das in dem gleichen Immobilisierungslevel wie TNB-BSA an die Chipoberfläche gekoppelt wurde. Über den spezifischen Aufbau des Fluss-Systems im BIAcore 3000<sup>®</sup> können dabei zwei voneinander unabhängige Flussysteme geschaltet werden (FC1&2; FC3&4), die sowohl den gewünschten

Liganden (TNB/TNT-Antikörper) auf einer Flusszelle wie auch ein reales Kontrollprotein zum Nachweis von unspezifischen Bindungen besitzt. Um eine mögliche „Verarmung“ der Testlösung an Analyten durch Bindungen an den Liganden (TNB-BSA) zu vermeiden, wurde die Kontrolle (BSA) vor die eigentliche Testoberfläche gesetzt, da hier eine Bindung nicht zu erwarten war. Sollte hier trotzdem eine unspezifische Bindung messbar sein, würde diese sofort über die interne Referenzsubtraktion in der BIAcore-Control-Software (BIAcore AB, Uppsala, Schweden) abgezogen, so dass damit nur die wirkliche Bindung des Antikörpers an das TNB gemessen würde, bereinigt durch die Bindung an das BSA.

Um eine Bindung von Ligand in ausreichender Konzentration an die Chipoberfläche zu gewährleisten, war es vor der Immobilisierung notwendig, über ein pH-Scouting, denjenigen pH-Wert zu ermitteln, an dem sich die größte Konzentration an Ligand an die Chipoberfläche anlagern ließ.

Die Immobilisierung erfolgte anschließend mittels des Aminkopplungs-Programms in der BIAcore-Control-Software. Bei einer Flussrate von 5 µl/min wurde für 10 min EDC und NHS über die Chipoberfläche geleitet, um die Carboxylmethyl-Gruppen zu aktivieren. Anschließend an die Aktivierung erfolgte die Immobilisierung des Liganden TNB-BSA bei einer Konzentration von 2 mg/ml und einem pH von 4,5 auf die Flusszellen 2 und 4, sowie der Kontrollen, bestehend aus BSA (200 µg/ml, pH 4,5) auf den Flusszellen 1 und 3. Dabei wurde darauf geachtet, dass auf die unterschiedlichen Flusszellen die gleiche Menge an Liganden gekoppelt wurde. Dadurch sollte erreicht werden, dass die Aussagen der unterschiedlichen Flusszellen miteinander vergleichbar sind.

Über eine Injektion von Ethanolamin wurden die aktivierten Carboxylgruppen, an die kein Ligand gebunden wurde, deaktiviert (Biacore AB, 1998).

## **2.12.4 Vorbereitung der Messungen**

### **2.12.4.1 Ansetzen der TNT-Standard-Lösungen**

Da sich systembedingt das Messergebnis der SPR-Messungen abhängig vom Einfluss des Puffersystems auf die Chipoberfläche zeigte, war es in diesen Messungen von zentraler Bedeutung, bei allen Schritten stets die gleichen Pufferbedingungen zu erhalten. Somit war es beim Ansetzen der TNT-Standard-Lösungen zwingend notwendig, diese auf die im Gegensatz zu HPLC und Biosensorik geänderten Bedingungen anzupassen. Als solches erfolgte das Ansetzen der Standards in einfachem 0,1 M PBS-Puffer mit 0,1 % Triton X-100, der bei den Messungen auch als Laufpuffer verwendet wurde.

Für die Messung wurden die Standards folgendermaßen angesetzt:

Menge	Lösung	
25 µl	TNT-Standard-Lösung in einfachem PBS-Puffer	Vorverdünnung vor der Messung
57 µl	PBS-Puffer einfach konzentriert	
18 µl	Antikörper-Lösung (1,09 mg TNT-Antikörper/ml)	Endverdünnung im BIAcore 3000 <sup>®</sup>

**Tab. 2.11:** Aufstellung der für die Messungen in den TNT-Eichmessungen der SPR verwendeten Lösung sowie ihrer mengenmäßigen Zusammensetzung für die Messung.

Da die TNT-Standard-Lösungen für die Messungen dabei 1:4 verdünnt wurden, mussten sie vorher in einer 4fach höheren Konzentration angesetzt werden, um die entsprechende Messkonzentration zu erreichen. Die Verdünnung um den Faktor 4 wurde angewendet, um eine Gleichbehandlung mit den Extrakten der undotierten und dotierten Bodenproben zu gewährleisten. Bei diesen wurde eine Verdünnung um den Faktor 4 gewählt, da diese auf den Laufpuffer des Mess-Systems sowie den verfügbaren Messbereich angepasst werden mussten. Für die Eichung wurde ein TNT-Konzentrationsbereich von 0,1-2,5 mg TNT/l vermessen. Dieser Messbereich wurde für die TNT-Eichkurve ausgewählt, da bei einer Bindung von TNT-Antikörpern zu TNT von eins zu zwei (Stryer, 1987; Strong *et al.*, 1999) bei höheren TNT-Konzentrationen mit einer Sättigung des Systems mit TNT zu rechnen gewesen wäre, da die Antikörper-Lösung nicht beliebig konzentriert eingesetzt werden konnte. Auch wurde damit ausgeschlossen, dass höhere TNT-Konzentrationen Rückständen im Mess-System zurücklassen und in den anschließenden Messungen zu Fehlaussagen führten.

#### 2.12.4.2 Messung der TNT-Standard-Lösungen

Für die Messungen wurde sowohl als Laufpuffer wie auch als Aufnahme-Medium für die Proben ein 0,1 M PBS-Puffer mit 0,1 % Triton X-100 verwendet.

Bei der Messung der TNT-Eichkurve wurden die in einfachem PBS-Triton-Puffer 4-fach konzentrierten Standards erst unmittelbar vor der Messung im Gerät auf die zu messende Konzentration herunter verdünnt (Tabelle 2.11). Dadurch sollte erreicht werden, dass die Proben der TNT-Eichung den gleichen Behandlungsschritten unterlagen, wie die bereits mit HPLC und Biosensorik vermessenen, wässrigen Bodenextrakte, die für die Messung auf PBS-Triton-Puffer umgepuffert werden mussten. Dies bedeutet also, dass sowohl die Standards der TNT-Eichung wie auch die Bodenextrakte einer Verdünnung um Faktor 4 unterzogen wurden.

### 2.12.4.3 Aufbau und Durchführung der Messungen

Die Messungen wurden bei 10  $\mu\text{l}/\text{min}$  Flussrate durchgeführt, die Racks wurden zum Probenschutz auf 5  $^{\circ}\text{C}$  gekühlt und die SPR-Oberfläche auf 25  $^{\circ}\text{C}$  Betriebstemperatur temperiert. Eine Temperierung des Systems wurde durchgeführt, da sowohl Proben wie auch die Komponenten von SPR-Messanlagen empfindlich auf Temperaturunterschiede reagieren (Strong *et al.*, 1999; Naimushin *et al.*, 2003).

In dieser selbst geschriebenen Methode wurde von dem „vorverdünnten“ Standard 82  $\mu\text{l}$  (s. Tabelle 2.11) entnommen und in einem leeren Vial mit 18  $\mu\text{l}$  einer 1,09 mg/ml TNT-Antikörperlösung vom Autosampler vermischt, wobei für jede Konzentration ein neues „Mix-Vial“ verwendet wurde. Daraus ergab sich die für die Messung auf dem Chip gewünschte Konzentration an TNT sowie eine TNT-Antikörper-Mess-Konzentration von 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Für die Antikörper-Bindung an das TNT in der Lösung wurde das Gemisch für 10 min bei 5  $^{\circ}\text{C}$  (gekühlte Racks) stehen gelassen. Zum Test des Chips wurde 9 min nach Mischung von Probe und TNT-Antikörper eine einminütige Pufferinjektion (normale Injektion) über die Oberfläche geleitet. Anschließend erfolgte die eigentliche Injektion der Antikörper-TNT-Lösung (30  $\mu\text{l}/3\text{min}$ ) mit einer Dissoziationszeit von 30 Sekunden. Durch Vergleich der Resonanzeinheiten (RU) vor der Injektion mit denen nach der Injektion ergab sich die relative Response der durch die Injektion hervorgerufenen Bindung des TNB-BSA als Liganden an der Chipoberfläche und des TNT-Antikörpers als Analyten aus der Testlösung an das TNB-BSA.

Zum Lösen der TNT-Antikörper-TNB-BSA-Bindung wurde die Chipoberfläche mit 0,1 M NaOH + 0,1 % Triton X-100 regeneriert. Dazu erfolgten mehrere Regenerationsschritte, die in ihrer Durchführung von der Höhe der relativen Response abhängig waren, die zwischen der Resonanz vor Injektion der Testlösung und der Resonanz nach Ende der Dissoziationszeit lag. Die verschiedenen Regenerationsschritte, die abhängig von der gebundenen Menge an TNT-Antikörper waren, sind der Tabelle 2.11 zu entnehmen.

Diese response-abhängige Waschprozedur sollte gewährleisten, dass, abhängig von der Menge des gebundenen Analyten, die Chipoberfläche für die nachfolgenden Messungen möglichst gleich gut wiederhergestellt wurde, und eine unnötige Belastung durch eine zu häufige und zu starke Regeneration vermieden wurde.

Regenerationsschritt	Rel.Response [RU]	Regenerationslösung	Dauer	Flussrate
1	> 1.500	0,1 M NaOH + 0,1 % Triton X-100	3 min	10 µl/min
2	> 450	0,1 M NaOH + 0,1 % Triton X-100	2 min	10 µl/min
3	> 80	0,1 M NaOH + 0,1 % Triton X-100	1 min	30 µl/min
4	> 40	0,1 M NaOH + 0,1 % Triton X-100	1 min	30 µl/min
5	> 20	0,1 M NaOH + 0,1 % Triton X-100	0,5 min	30 µl/min

**Tab. 2.12:** Darstellung der Abhängigkeit der anzuwendenden Chip-Regenerationsbedingungen von der relativen Response vor der möglichen Regeneration.

Im Messungsablauf wurde im Durchschnitt nach jeder dritten gemessenen Probe eine Messung einer reinen Antikörperlösung durchgeführt. Damit sollte über den gesamten Messungsverlauf kontrolliert werden, ob die Chipoberfläche durch die Behandlung mit Proben- und Regenerationslösungen beeinträchtigt worden ist.

#### 2.12.4.4 Ansetzen und Umpufferung der Proben

Bei den hier mit der SPR-Technik untersuchten Böden handelt es sich um Rückstellproben von bereits chromatographisch durch HPLC und biosensorisch mittels Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor untersuchten wässrigen Extrakten. Für die Untersuchungen mit der Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technik war es nötig, die Proben aus dem bestehenden System, in das Puffersystem für die SPR-Technik umzupuffern. Dadurch konnte nicht vermieden werden, dass die vorliegenden Proben einer Verdünnung unterzogen wurden. Wie schon unter Kapitel 2.11.3.1 erwähnt sollte damit erreicht werden, dass keine Änderungen in den Pufferbedingungen zu falschen Messwerten in der SPR-Messung führten. Die Verwendung der Rückstellproben sollte des Weiteren die Vergleichbarkeit der Aussagen mit denen der chromatographischen und der biosensorischen Messungen gewährleisten. Eine eigenständige Extraktion von Proben würde eine Vergleichbarkeit schon aufgrund unterschiedlicher Löslichkeiten in den vorliegenden Puffersystemen der Inhomogenität der Böden (Northcott und Jones, 2000; Püttmer, 2003) und der Kontamination in den realen Böden (Durner, 2002) nicht möglich machen. Die für jeden Boden durchgeführte Verdünnung ist der Tabelle 2.14 zu entnehmen.

### 2.12.4.5 Messung der Bodenproben

Die Messungen der Bodenproben erfolgten in der gleichen Weise wie die Messungen der TNT-Standards. Die verwendeten Extrakte wurden vor der Messung bei  $-20\text{ °C}$  im Dunkeln gelagert.

Um eine Umpufferung der Proben auf ein SPR-kompatibles System zu gewährleisten, um innerhalb des Messbereichs der TNT-Eichkurve zu bleiben und um Extrapolationen der Ergebnisse (Schatten, 1999), wurden die wässrigen Extrakte der Bodenproben vor der Messung entsprechend verdünnt. Die Höhe der jeweiligen Verdünnung ist der Tabelle 2.14 zu entnehmen.

In den angegebenen Verdünnungsfaktoren wurden die verwendeten Extrakte in der Weise behandelt, dass durch Zugabe eines 4-fach konzentrierten PBS-Triton-Puffers im Messansatz eine einfache PBS-Triton-Konzentration vorlag. Ein Beispiel für eine solche Verdünnung zeigt folgende Aufstellung für eine 1:12 Verdünnung (Tab. 2.13).

<b>Lösung</b>	<b>Volumen</b>	<b>Anteil an Endvolumen</b>
<b>PBS-Puffer (4-fach)</b>	250 $\mu\text{l}$	$\frac{1}{4}$
<b>Wässriger Bodenextrakt</b>	83,33 $\mu\text{l}$	1/12
<b>Dest. Wasser (zum Auffüllen)</b>	666,67 $\mu\text{l}$	8/12
<b>Endvolumen</b>	1.000 $\mu\text{l}$	1/1

**Tab. 2.13:** Darstellung einer exemplarischen Umpufferung von angefertigten wässrigen Bodenextrakten auf PBS-Puffer (einfach) sowie der gleichzeitigen Verdünnung um Faktor 12.

Die endgültige Verdünnung, die zu den gemessenen Konzentrationen führte, wurde durch die schon in Tabelle 2.11 beschriebene Mischung erreicht. Hierbei diente die Vermischung von Extrakt (25  $\mu\text{l}$ ) mit einfachem PBS-Puffer (57  $\mu\text{l}$ ) und Antikörper-Lösung (18  $\mu\text{l}$ ) bei allen Bodenproben zur Einstellung der endgültigen Messkonzentration, bei den Extrakten der realen Böden wurde anstelle der nochmaligen Verdünnung mit einfachem PBS-Puffer der vorverdünnte Extrakt zu 82  $\mu\text{l}$  verwendet. Die ungleiche Behandlung von dotierten und realen Bodenproben war nötig, um aufgrund der unterschiedlichen TNT-Gehalte die Messungen im Bereich der TNT-Eichung zu halten.

Bei den Bodenextrakten der dotierten sowie der undotierten Böden wurde durchgehend die gleiche Verdünnung gewählt. Dies sollte dazu dienen, Einflüsse des TNTs im dotierten Boden von eventuellen Einflüssen der unbehandelten Böden zu unterscheiden sowie eine Vergleichbarkeit der Aussagen unter den einzelnen Böden zu erreichen. Bei den Extrakten der

realkontaminierten Proben war eine solche feste Verdünnung, bedingt durch die in ihnen enthaltenen TNT-Konzentrationen, nicht möglich.

<b>Probenbezeichnung</b>	<b>Konzentration nach HPLC [mg/l]</b>	<b>Verdünnungsfaktor</b>	<b>Konzentration bei der SPR-Messung [mg/l]</b>
<b>Waldboden undotiert</b>	---	1:20	---
<b>Grünlandboden undotiert</b>	---	1:20	---
<b>Sandboden undotiert</b>	---	1:20	---
<b>Ackerboden undotiert</b>	---	1:20	---
<b>Humusboden undotiert</b>	---	1:20	---
<b>Waldboden dotiert</b>	32,889	1:20	1,644
<b>Grünlandboden dotiert</b>	45,661	1:20	2,283
<b>Sandboden dotiert</b>	56,847	1:20	2,842
<b>Ackerboden dotiert</b>	38,235	1:20	1,912
<b>Humusboden dotiert</b>	22,294	1:20	1,115
<b>ABC 1</b>			
	9,209	1:14,63	0,629
<b>ABC 2</b>			
	1,031	1:2,44	0,423
<b>ABC 3</b>			
	2,897	1:4,88	0,594
<b>ABC 4</b>			
	8,816	1:14,63	0,602
<b>ABC 6</b>			
	4,355	1:4,88	0,893
<b>DEF</b>			
	6,962	1:4,88	1,427
<b>GHI 1</b>			
	1,687	1:2,44	0,692
<b>GHI 2</b>			
	57,839	1:97,56	0,593

**Tab. 2.14:** Verdünnungsschritte von Bodenextrakten für die Messung im BIAcore 3000<sup>®</sup>; der Verdünnungsfaktor gibt die endgültige Verdünnung auf der SPR-Messfläche wieder.



## 2.13 Angewendete Statistische Verfahren

### 2.13.1 Ausreißertest nach Nalimov

Um in der vorliegenden Arbeit Fehlmessungen verlässlich zu identifizieren und abzuschätzen, wurde ein Ausreißertest nach Nalimov (Lohöfer, 2003) durchgeführt. Dieser entspricht der in Formel 2.3 dargestellten Berechnung.

$$R = |M_{\text{ges}} - T|/s * \sqrt{(n/n-1)} \quad \text{Formel 2.3}$$

$$f = n-2$$

Mit R = Relationsgröße;  $M_{\text{ges}}$  = Mittelwert aller Messpunkte inklusive dem Testwert; T = Testwert; s = Standardabweichung; n = Anzahl der Messpunkte inklusive Testwert; f = Freiheitsgrade. Nach Lohöfer (2003).

Je nach gewünschter Sicherheit wurde die Relationsgröße R anschließend in der entsprechenden Tabelle (Kapitel 10; r-Tabelle) mit einem Sollwert verglichen, der für den entsprechenden Freiheitsgrad übertroffen werden musste. War dies der Fall, so konnte der Messpunkt mit entsprechender Sicherheit aus der Grundgesamtheit dieser Messreihe ausgeschlossen werden. Als Signifikanzniveau lagen in dieser Arbeit wenigstens 99 % an (signifikant).

### 2.13.2 t-Test auf Unterschiedlichkeit zweier Grundgesamtheiten

Zur Prüfung, ob sich 2 Messreihen in dieser Arbeit in ihren Ergebnissen entsprachen, galt es, diese über einen geeigneten Vergleich auf signifikante Unterschiede hin zu betrachten.

Zur Berechnung wurde der in Formel 2.4a/b dargestellte t-Test verwendet.

$$H_w = \sqrt{(((n_1-1) \times s_1^2) + ((n_2-1) \times s_2^2)) / (n_1 + n_2 - 2)} \quad \text{Formel 2.4a}$$

$$t = (|M_1 - M_2| / H_w) \times \sqrt{((n_1 \times n_2) / (n_1 + n_2))} \quad \text{Formel 2.4b}$$

$$f = (n_1 + n_2 - 2)$$

Mit  $H_w$  = Hilfswert;  $n_1/n_2$  = Anzahl der Messungen in Messreihe 1/2;  $s_1/s_2$  = Standardabweichung in Messreihe 1/2;  $M_1/M_2$  = Mittelwert der Messreihe 1/2; t = Testwert; f = Freiheitsgrade. Nach Lohöfer (2003).

Wie schon bei der Betrachtung des Ausreißertests wurde auch hier der berechnete Testwert entsprechend des gewählten Signifikanzniveaus und der gegebenen Freiheitsgrade mit Werten einer Tabelle (Kapitel 10; t-Tabelle) verglichen, die zum Erreichen des jeweiligen Niveaus übertroffen werden mussten. Wurde der für das entsprechende Signifikanzniveau angegebene

Wert erreicht, so ließen sich auch die beiden miteinander verglichenen Grundgesamtheiten mit entsprechender Sicherheit voneinander unterscheiden. Bei einem erreichten Signifikanzniveau von 95 %, konnten die miteinander verglichenen Grundgesamtheiten als wahrscheinlich unterschiedliche angesehen werden, > 99 % entspricht einer signifikanten Unterscheidung.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports durch nitroaromatische Verbindungen**

In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, ob und in wie weit der Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor für die Detektion von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) und dessen Metabolite geeignet ist.

Im Weiteren sollten die Bedingungen für die Detektion von TNT in wässrigen Extrakten von Böden herausgefunden und die Aussagen der biosensorischen Messungen in Hinblick auf enthaltene Kontaminationen mit denen von Referenz-Methoden verglichen werden.

#### **3.1.1 Wirkung von TNT auf den Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor**

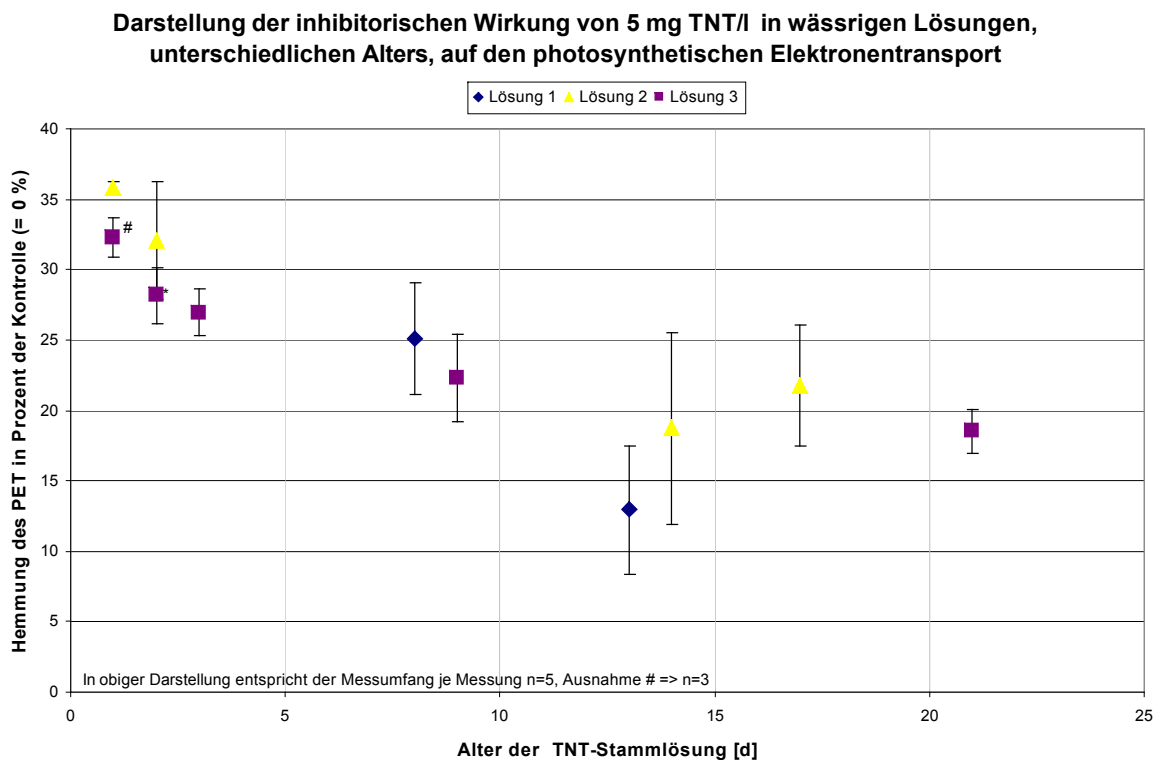
Es sollte geklärt werden, ob TNT in Reinform eine Wirkung auf die biologische Einheit des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors ausübt, bevor in einem weiteren Schritt die Messung in artifizell kontaminierten und realkontaminierten Böden von Rüstungsalblast-Standorten untersucht wurde. Entsprechend bestand im Folgenden die Aufgabe den Einfluss von TNT und seinen möglichen Metaboliten auf die verschiedenen messbaren Parameter des Biosensors zu überprüfen.

##### **3.1.1.1 Wirkung von TNT in wässriger Lösung auf den photosynthetischen Elektronentransport**

###### ***3.1.1.1.1 Ohne Behandlung der Lösungen***

In den ersten Messungen von reinen TNT-Stammlösungen in Wasser war in den biosensorischen Messungen mit dem PAM-Fluorometer eine Erniedrigung des Yields durch TNT im Vergleich zur Kontrolle zu messen. Damit wurde eine Inhibierung der photosynthetischen Aktivität angezeigt. In Wiederholungen waren jedoch Probleme in der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu sehen. Abbildung 3.1 zeigt die Hemmungen des photosynthetischen Elektronentransports von drei unterschiedlichen wässrigen TNT-Stammlösungen, in einer finalen Konzentration von 5 mg/l in der Messkammer, gemessen über mehrere Tage. Dazu wurden die Stammlösungen bei 4 °C im Dunkeln gelagert und ohne weitere Behandlung für die Messung verwendet. Hierbei war mit fortschreitendem Alter der Stammlösungen eine Abnahme der hemmenden Wirkung auf die biologische Einheit ersichtlich. Besonders bei Lösung 3 konnte ein fortschreitender Rückgang in der

inhibierenden Wirkung beobachtet werden. Dieser reichte von 32,8 % Inhibierung des photosynthetischen Elektronentransports am Tag der Herstellung, bis auf 18,5 % Inhibierung nach 21 Tagen. Bei dieser altersbedingten Abnahme unterschieden sich alle Messwerte der Proben mit zunehmendem Alter signifikant von der frischen Lösung. Innerhalb einer Lösung zeigten demgegenüber die Werte, die an aufeinander folgenden Tagen gemessen wurden, keine signifikanten Unterschiede. Ebenso ließen sich auch bei Proben, älter als ca. 14 Tage innerhalb einer Lösung (z. B. Lösung 2), keine signifikanten Unterschiede feststellen. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte aufgrund der Verwendung von nicht weiter behandelten wässrigen TNT-Lösungen keine Reproduzierbarkeit der Messwerte erreicht werden. Bei unterschiedlichen Lösungen gleichen Alters konnte zusätzlich nicht die gleiche inhibierende Wirkung erzielt werden. So waren lediglich in den getesteten Lösungen stets die Messwerte der älteren Lösungen signifikant von denen der frischen Lösung zu unterscheiden.



**Abb. 3.1:** Darstellung die Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports durch unterschiedliche TNT-Lösungen an verschiedenen Tagen, ohne zusätzliche Ultraschallbehandlung mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor. Die dargestellte Konzentration beträgt 5 mg TNT/l in der Messkammer. Die farblichen Kodierungen entsprechen den unterschiedlichen TNT-Stammlösungen. Allgemein gilt n=5, bei „#“ gekennzeichnete Messung gilt n=3; Fehlerindikator = +/- Standardabweichung.

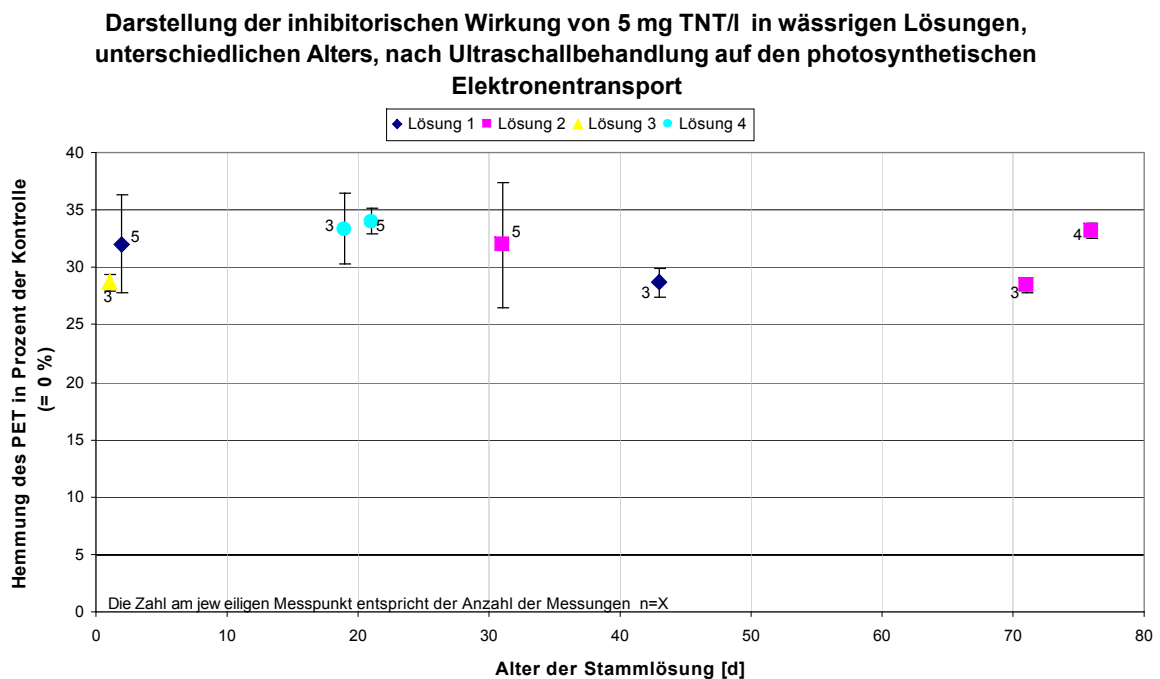
Vergleich man die älteren Messwerte unterschiedlicher Lösungen, so zeigten sich auch hier signifikante Unterschiede, wie z. B. bei den 21 Tage alten Lösungen 2 und 3 der Abbildung 3.1, mit Hemmungen von 18,54 % (+/-1,57 % SD (Lsg.2)) und 25,29 % (+/-1,42 % SD (Lsg.3)).

Mit diesen Ergebnissen konnte zwar eine Wirkung von TNT auf die biologische Einheit aufgezeigt werden, eine Reproduzierbarkeit der Messwerte von nicht weiter behandelten wässrigen TNT-Lösungen ließ sich aber nicht beobachten.

### 3.1.1.1.2 Mit Ultraschallbehandlung

Bei einer 10 min. Ultraschallbehandlung der Stammlösungen vor der Messung zeigten sich reproduzierbare Hemmungen des photosynthetischen Elektronentransports durch TNT.

Die hierbei über einen Zeitraum von 76 Tagen durchgeführten Messungen sind in Abbildung 3.2 wiedergegeben. Die dort dargestellten Ergebnisse zeigten, bis auf die Messungen nach 21 und nach 76 Tagen (34 % +/-1,11 % SD (21 d)/33,26 % +/-0,66 % SD (76 d)), von einer minimalen Hemmung des PET nach 71 Tagen (28,5 % +/-0,66 % SD), bis zur maximalen Hemmung nach 19 Tagen (33,3 % +/-3,08 % SD), keine signifikanten Unterschiede untereinander.



**Abb. 3.2:** Darstellung der Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports durch verschiedene TNT-Lösungen unterschiedlichen Alters, die vor der Messung im Ultraschallbad auf Raumtemperatur erwärmt wurden. Die dargestellte Konzentration beträgt 5 mg TNT/l in der Messkammer. Die farblichen Kodierungen entsprechen den unterschiedlichen TNT-Stammlösungen. Die Zahl der Wiederholungen ist an den jeweiligen Messungen angegeben. Fehlerindikator = +/- Standardabweichung.

Im gesamten Verlauf der Messungen zeigten sich die Ergebnisse der ultraschallbehandelten Proben im Vergleich zu den unbehandelten Stammlösungen homogener als zwischen den einzelnen Messungen derselben, sowie zu den verschiedenen Extrakten.

### 3.1.1.1.3 Vergleich mit/ohne Ultraschallbehandlung

Tabelle 3.1 verdeutlicht den Einfluss der Ultraschallbehandlung nochmals. So ließ sich die Hemmung des PET durch Ultraschallbehandlung einer 19 Tage alten Lösung bei einer Konzentration von 5 mg TNT/l in der Messkammer von 20,04 % (+/-1,16 % SD) auf 33,33 % (+/-3,08 % SD) hochsignifikant steigern. Bei einer Zugabe entsprechend 10 mg TNT/l zeigte sich ebenfalls ein hochsignifikanter Anstieg der Hemmung von 30,91 % (+/-0,29 % SD) auf 44,83 % (+/-1,54 % SD). Ebenfalls signifikante Unterschiede in den Hemmungswerten konnten bei der aufgeführten 31 Tage alten Lösung, sowohl in der 5-mg-TNT/l-Messung wie auch in der 10-mg-TNT/l Messung herausgestellt werden.

Alter der Lösung [d]	TNT-Konzentration in der Messkammer [mg/l]	Hemmung des PET in Prozent zur Kontrolle <b>ohne</b> Ultraschallbehandlung [%] (+/- Standardabweichung)	Hemmung des PET in Prozent zur Kontrolle <b>mit</b> Ultraschallbehandlung [%] (+/- Standardabweichung)
19*	5	20,04 (+/-1,16)	33,33 (+/-3,08)
31°	5	21,30 (+/-1,25)	31,97 (+/-5,44)
19*	10	30,91 (+/-0,29)	44,83 (+/-1,54)
31°	10	33,01 (+/-6,86)	48,65 (+/-2,95)

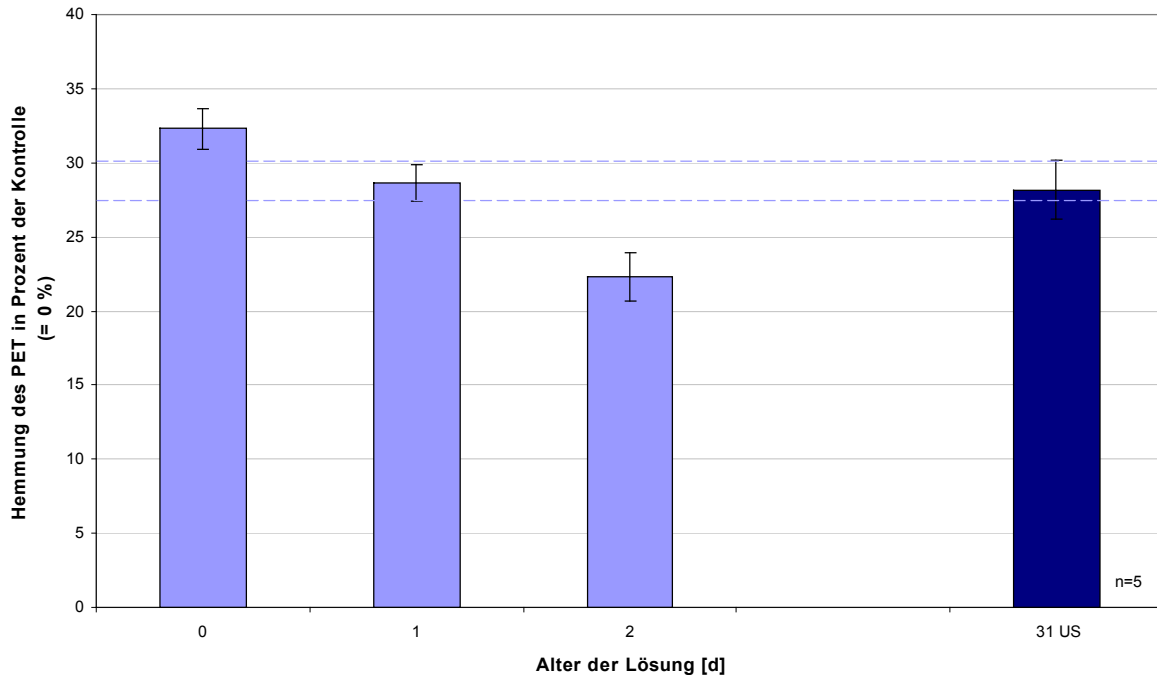
**Tab. 3.1:** Darstellung der unterschiedlichen Hemmungen des PET an isolierten Chloroplasten-Thylakoiden durch TNT-Stammlösungen, die vor den Messungen entweder **nicht** oder **mit** Ultraschall behandelt wurden. Für die dargestellten Messungen gilt n=5 („°“ = signifikanter Unterschied, „\*“ = hochsignifikanter Unterschied zwischen der Probe **vor** und **nach** Ultraschallbehandlung).

Abbildung 3.3 verdeutlicht diesen Zusammenhang nochmals anhand der unterschiedlichen Messungen einer 5 mg/l TNT-Stammlösung an verschiedenen Tagen ohne Ultraschallbehandlung im Vergleich zur Ultraschallbehandlung. Hierbei ist ersichtlich, dass die Hemmung des PET von 32,3 % (+/-1,39 % SD) innerhalb von zwei Tagen hochsignifikant auf 22,3 % (+/-1,67 % SD) fällt.

Die dunkelblau abgesetzte Messung entspricht der verwendeten Konzentration von 5 mg TNT/l derselben TNT-Stammlösung, die allerdings 31 Tage nach dem Ansetzen vor der Messung im Ultraschallbad behandelt wurde (ca. 10 min). Die aufgeführte Hemmung entspricht mit 28,18 % (+/-1,98 % SD) der gleichen Hemmung, die durch die gleiche Lösung nach einem Tag Lagerung ohne Ultraschallbehandlung zu messen war (28,66 %

+/-1,2 % SD). Dies zeigte an, dass über die Behandlung von wässrigen TNT-Lösungen mit Ultraschall eine Reproduzierbarkeit der Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports durch TNT erreicht werden konnte.

**Vergleich der Hemmung des PET von normal gelagerter TNT-Lösung mit der selben Lösung nach Ultraschallbehandlung an unterschiedlichen Tagen**



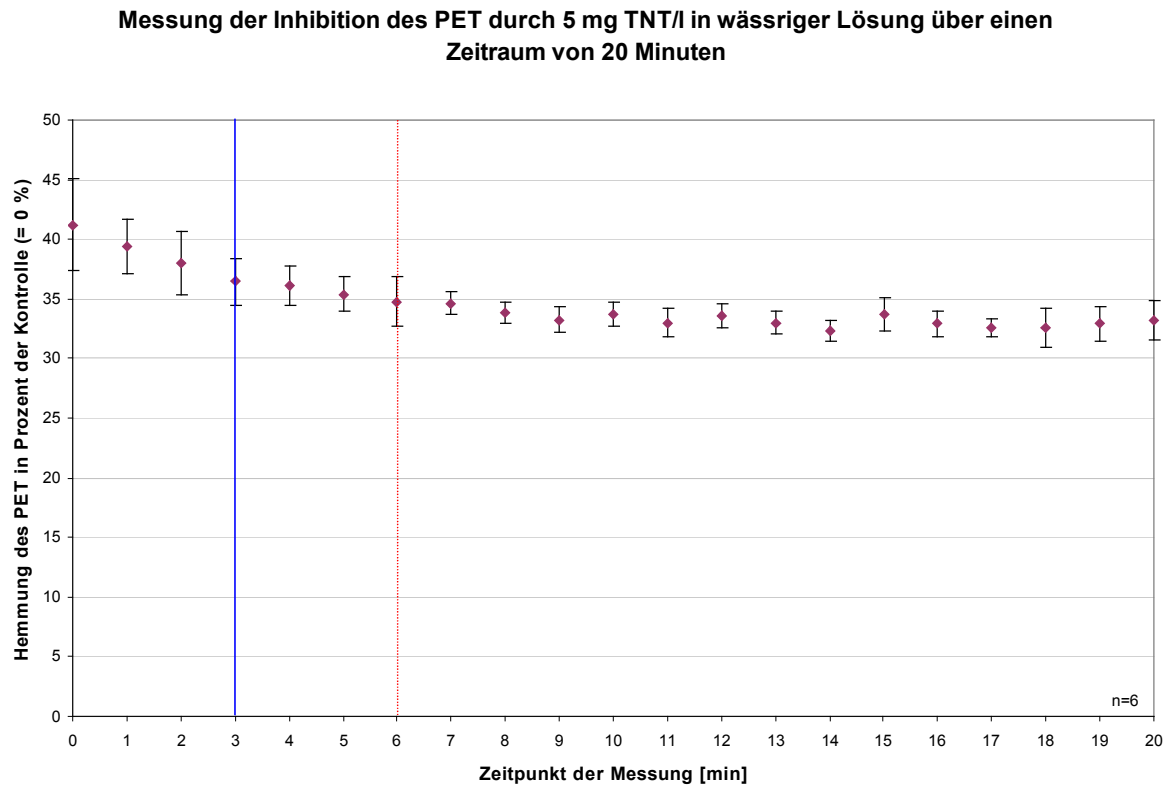
**Abb. 3.3:** Darstellung der abfallenden Hemmwirkung einer 5mg/l TNT-Stammlösung innerhalb von drei Tagen und der Rückführung der Hemmwirkung auf den Wert einer einen Tag alten Lösung durch die Behandlung mit Ultraschall nach 31 Tagen (rechts, dunkler abgesetzte Säule); die hellblauen gestrichelten Linien zeigen als Anhaltspunkt den Bereich der Standardabweichung der Messung nach einem Tag; für die Messungen gilt n=5; Fehlerindikator = +/- Standardabweichung.

Somit ergab sich aus den Abbildungen 3.2 und 3.3, dass TNT-Lösungen sowohl innerhalb einer wie auch unter verschiedenen Lösungen durch eine Ultraschallbehandlung reproduzierbare Hemmungen des photosynthetischen Elektronentransports an isolierten Chloroplasten-Thylakoiden erzeugten.

### 3.1.1.2 Zeitlicher Einfluss auf die Inhibierung der photosynthetischen Elektronentransportkette durch TNT

Der zeitliche Einfluss von TNT auf die Aktivität der photosynthetischen Elektronentransportkette ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Daraus ist ersichtlich, dass die Hemmung des PET innerhalb von 3 min, entsprechend vier Messungen, (bis blaue Linie) nach Beginn der Messung signifikant sinkt (von 41,19 % +/-3,83 % SD auf 36,13 % +/-1,65 % SD). Ab der 4. Messung verlangsamt sich das Absinken der Hemmung, wobei die Messwerte einer geringeren Streuung unterliegen, als zu Beginn der Messreihe. Der Bereich

zwischen der 4. und 7. Messung (3 bis 6 Minuten; blaue bis rote Linie) zeigte sich in diesen Messungen als reproduzierbar und sollte in den anschließenden biosensorischen Messungen als Messbereich verwendet werden. Dies bedeutete für die weiteren Messungen, dass die Messpunkte des genannten Bereiches zu einem Mittelwert zusammengefasst wurden, der als Wert der jeweiligen Messreihe aufgenommen wurde.



**Abb. 3.4:** Darstellung der Inhibition des photosynthetischen Elektronentransports durch eine wässrige 5 mg TNT/l-Lösung über einen Zeitraum von 20 Minuten. Die blaue Linie markiert die 4. Messung nach 3 Minuten und das Ende der sinkenden Hemmung des PET. Die rote Linie markiert zusammen mit der blauen Linie den Bereich der für die folgenden Messungen zusammengefassten Punkte einer Messung. Fehlerindikator = +/- Standardabweichung.

### 3.1.1.3 Erstellung einer TNT-Eichkurve mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor

Für die spätere Ermittlung von TNT-Konzentrationen in kontaminierten Böden wurde eine TNT-Eichgerade mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor erstellt. Wie in Abschnitt 2.10 beschrieben, wurden TNT-Konzentrationen von 0,25–25 mg TNT /l bezüglich ihrer Hemmung auf den Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor hin untersucht (Tabelle 3.2). Abbildung 3.5 stellt graphisch die Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports in Abhängigkeit von der TNT-Konzentration dar und gibt damit den Hemmungsverlauf über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich wieder.



Konz. [mg/l]	Hemmung des PET in % der Kontrolle [= 0%]	Standardabweichung [%]	Konz. [mg/l]	Hemmung des PET in % der Kontrolle [= 0%]	Standardabweichung [%]
0,25	3,21	0,68	7	46,36	0,57
0,5	7,07	0,57	8	48,44	0,40
1	10,07	1,99	9	50,49	0,48
1,5	16,03	1,15	10	53,82	0,46
2	21,80	0,55	12	57,51	0,35
2,5	24,80	0,55	14	62,53	0,94
3	28,42	0,78	15	64,19	0,68
3,5	28,95	0,77	16	66,66	0,55
4	31,87	0,85	18	68,68	2,29
4,5	34,14	2,05	20	71,87	0,45
5	28,96	0,65	25	77,07	0,64
6	41,97	0,25			

Tab. 3.2: Ergebnisse der Eichmessungen wässriger TNT-Lösungen unterschiedlicher Konzentration auf die Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports (PET) im Vergleich zu einer unbelasteten Kontrolle.

### Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports durch TNT in Wasser

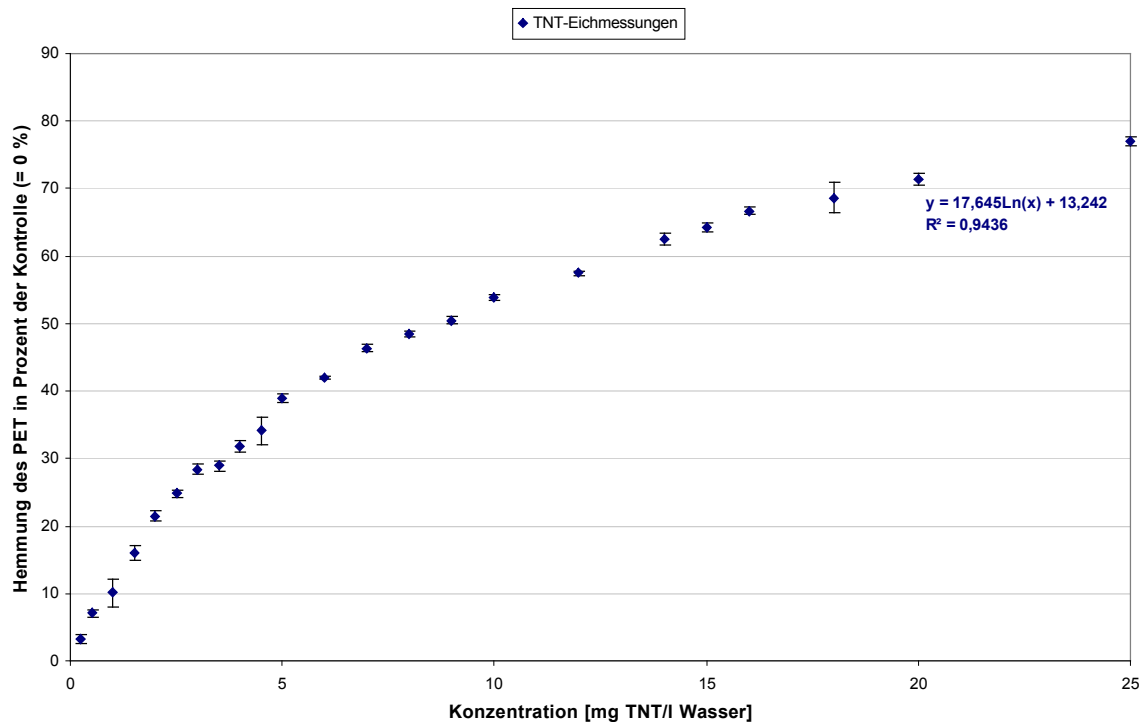


Abb. 3.5: Darstellung der Hemmungen des photosynthetischen Elektronentransports durch unterschiedlich konzentrierte TNT-Standards zur Erstellung einer Eichkurve im Bereich von 0,25mg/l bis 25mg/l; Fehlerindikator = +/- Standardabweichung.

## Applikation des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors auf nitroaromatische Verbindungen Ergebnisse

Mittels Regression konnte eine logarithmische Kurve ermittelt werden, durch die sich eine Relation zwischen Hemmung des PET und Konzentration an TNT in der Probe beschreiben ließ. Als entsprechende Relation ergab sich Formel 3.1 mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,9436$ .

$$y = 17,645 \ln(x) + 13,242 \quad \text{Formel 3.1}$$

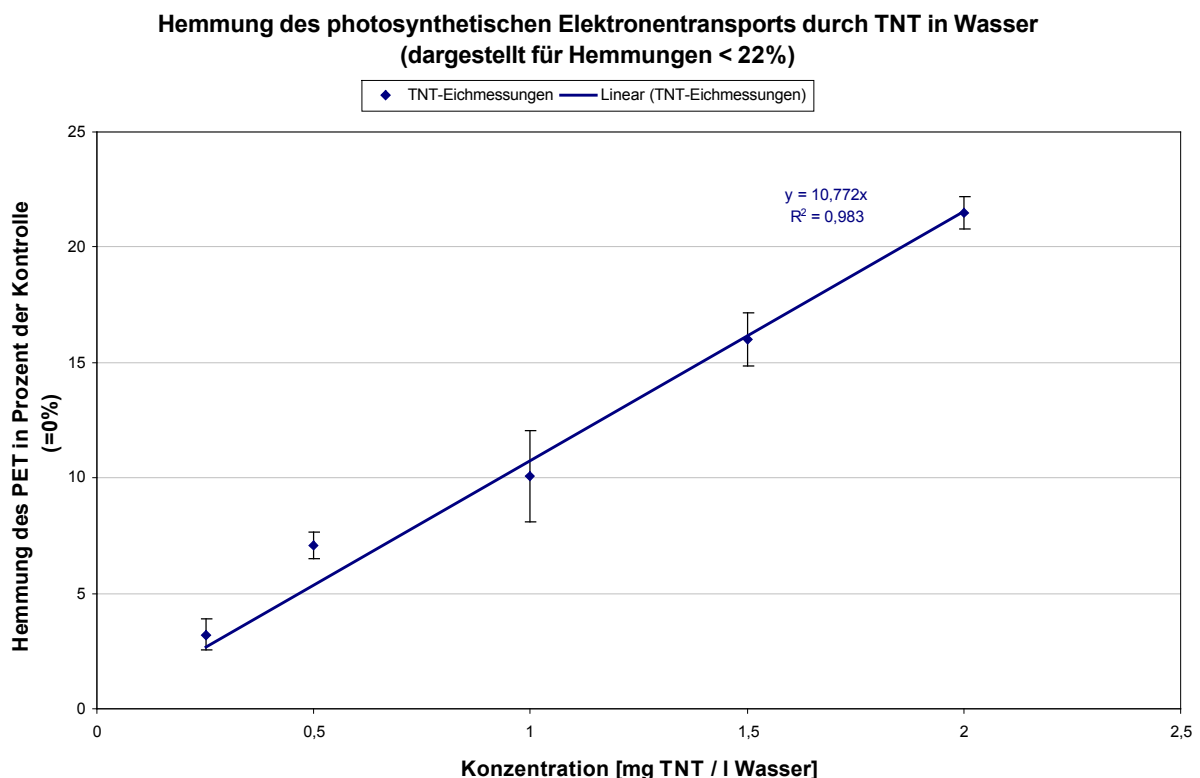
$$R^2 = 0,9436$$

mit  $y$  = Hemmung des PET in Prozent der Kontrolle und  $x$  = Konzentration an TNT in der Messkammer

Für die spätere Ermittlung der TNT-Konzentrationen aus der Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports durch kontaminierte Proben ergab sich durch Umformung Formel 3.2.

$$x = 0,5391e^{0,0535y} \quad \text{Formel 3.2}$$

Im Bereich von 0 bis 22 % Hemmung (0 bis 2 mg TNT/l Wasser) ließ sich ein linearer Verlauf feststellen (Abb. 3.6). Damit ergab sich für diesen Bereich eine genauere Berechnungsmöglichkeit durch lineare Regression nach Formel 3.3 und 3.4.



**Abb. 3.6:** Darstellung der Hemmungen des photosynthetischen Elektronentransports durch unterschiedlich konzentrierte TNT-Standards zur Erstellung einer Eichgerade im Bereich von 0,25mg/l bis 2 mg/l; Fehlerindikator = +/- Standardabweichung.

$$y = 10,772 x$$

**Formel 3.3**

$$x = 0,0925 y$$

**Formel 3.4**

$$R^2 = 0,983$$

mit  $y$  = Hemmung des PET in Prozent der Kontrolle und  $x$  = Konzentration an TNT in der Messkammer.

Durch Ermittlung der Formeln 3.2 und 3.4 war es im Folgenden möglich, anhand der gemessenen Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports auf die TNT-Konzentration in der Messkammer zurückzuschließen. Für die vorliegende Konzentration der Probe musste der durch diese Methode ermittelte Konzentrationswert mit dem Verdünnungsfaktor der Probe in der Messkammer verrechnet werden, wie in Formel 3.5 dargestellt.

$$K_{\text{Eluat}} = K_{\text{Messkammer}} * \text{VF}$$

**Formel 3.5**

Mit  $K_{\text{Eluat}}$  = Konzentration des Eluats;  $K_{\text{Messkammer}}$  = errechnete Konzentration des Eluates in der Messkammer (in Formel 3.2 und 3.4 als „ $x$ “ errechnet); VF = Verdünnungsfaktor; bei einer Extraktzugabe von 25 % des Messkammervolumens hatte dieser bei der Messung in der Regel den Wert 4.

Mittels der in Formel 3.4 ermittelten Steigung der Eichgeraden im unteren Bereich konnte für den in dieser der Arbeit verwendeten Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor nach der deutschen Akkreditierungssystem Prüfwesen GmbH [Schnellabschätzung] (DAP, 2002) eine untere Nachweisgrenze von 0,648 mg TNT/l bestimmt werden.

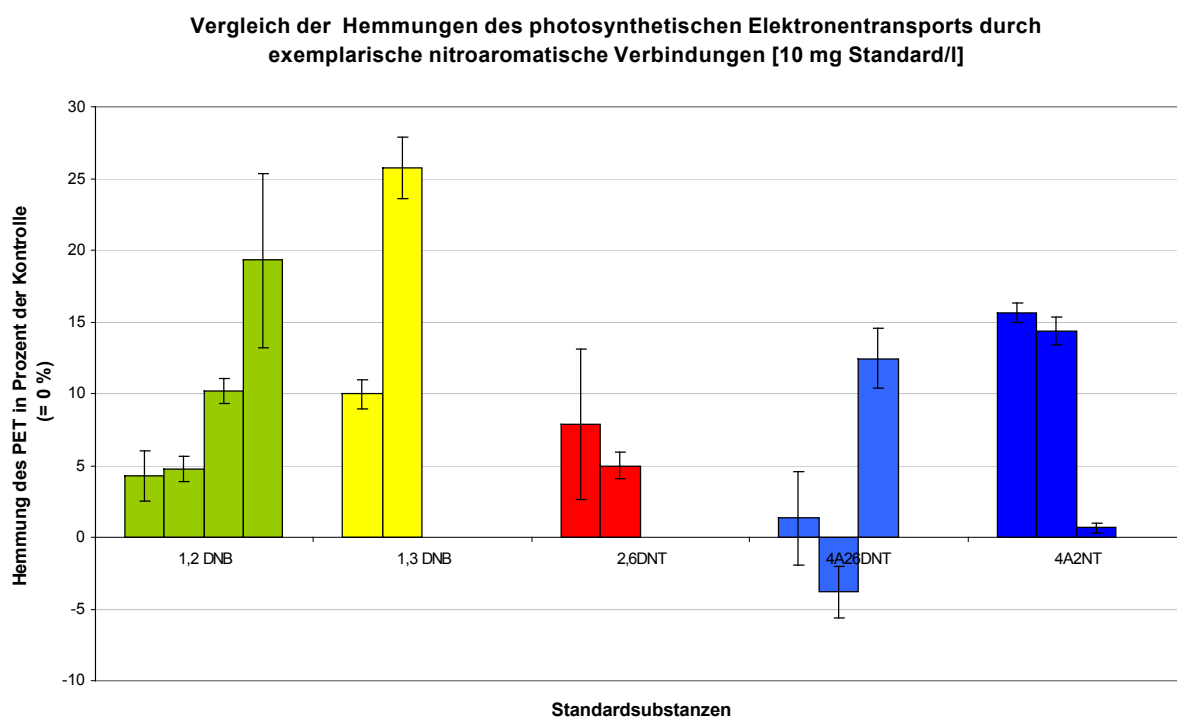
### **3.1.2 Wirkung von nitroaromatischen Verbindungen auf den Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor**

#### **3.1.2.1 Reproduzierbarkeit der biosensorischen Messwerte der nitroaromatischen Verbindungen**

Die Messungen der nitroaromatischen Standards in methanolischen Lösungen zeigten sich in ihren Ergebnissen mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor als nicht reproduzierbar, wie Abbildung 3.7 für die Konzentration von je 10 mg nitroaromatischer Standardsubstanz/l an exemplarischen Verbindungen wiedergibt. Die nitroaromatischen Standards wurden in methanolischen Lösungen gemessen, da sie größtenteils überhaupt nicht in Wasser löslich waren. Als Standards für die nitroaromatischen Verbindungen, als Metabolite des TNT, dienten 2,6-Diamino-4-Nitrotoluol, 2,4-Diamino-6-Nitrotoluol, 4-Amino-2-Nitrotoluol, 2-Amino-4-Nitrotoluol; 1,2-Dinitrobenzol, 1,3-Dinitrobenzol; 2-Amino-4,6-Dinitrotoluol, 4-Amino-2,6-Dinitrotoluol, 2,6-Dinitrotoluol, 2,4-Dinitrotoluol, 2-Nitrotoluol, 4-Nitrotoluol, 3-Nitrotoluol (aufgelistet in der Reihenfolge ihrer Detektion in der HPLC, Kapitel 3.2). In

## Applikation des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors auf nitroaromatische Verbindungen Ergebnisse

Abbildung 3.7 zeigte sich, dass einige der Substanzen in ein und derselben Konzentration signifikante Unterschiede von mehr als das 10-fache an Hemmung aufwiesen, wie z. B. das 4-Amino-2-Nitrotoluol mit Hemmungen des photosynthetischen Elektronentransports zwischen 0,64 % ( $\pm 0,35$  % SD) und 15,62 % ( $\pm 0,65$  % SD). In den durchgeführten Untersuchungen konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse mit nitroaromatischen Verbindungen, mit Ausnahme von TNT, erreicht werden. Nahezu alle Wiederholungen führten zu signifikanten Unterschieden zwischen den Messwerten. Die Standardabweichungen innerhalb der Messreihen zeigten ebenfalls die nicht mögliche Reproduzierbarkeit an.



**Abb. 3.7:** Darstellung der Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports durch methanolische nitroaromatische Standard-Lösungen unter Verwendung derselben wie auch frischer Lösungen an unterschiedlichen Tagen; Methanol-Konzentration in der Messkammer lag bei 10 %, allgemein gilt  $n=4$ , Fehlerindikator =  $\pm$  Standardabweichung.

Wie die nitroaromatischen Metabolite von TNT waren auch die Messungen von methanolischen TNT-Lösungen mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor nicht reproduzierbar.

Ähnliche Ergebnisse (hier nicht dargestellt) zeigten sich mit ethanolischen Lösungen der Nitroaromaten.

Aufgrund der Löslichkeitsunterschiede zwischen Wasser und Methanol bzw. Ethanol ist zu erwarten, dass die gemessenen Unterschiede das Resultat von ausgefallenen Standards sind, die somit nicht mehr der Messung zur Verfügung standen.

### **3.1.2.2 Beeinflusste Größen der Fluoreszenz durch nitroaromatische Verbindungen**

In den oben dargestellten Ergebnissen wurde als Messgröße der Yield betrachtet, als Maß der Aktivität des photosynthetischen Elektronentransports, berechnet als abhängige Größe der Fluoreszenz bei Lichtsättigung ( $F_m$ ) und der Fluoreszenz bei normalem Anregungslicht (Grundfluoreszenz/ $F_t$ ) nach Formel 2.1. Beachtet man die Fluoreszenzwerte an sich, so zeigte die Fluoreszenz bei Lichtsättigung als auch bei normalem Anregungslicht durch Gegenwart von TNT geringere Werte, als dies in der unbelasteten Kontrolle der Fall war. Bei 4,5 mg TNT/l betrug die Abnahme in der Fluoreszenz im Grundzustand ca. 23 % und 40 % unter lichtsättigenden Bedingungen. Gleichzeitig wurde eine Inhibierung des PET um 34,14 % (+/-2,05 % SD) gemessen. Als beispielhafte, nitroaromatische Verbindung zeigte das 2-Amino-4,6-Dinitrotoluol bei einer 25 % gesättigten Lösung und einer Hemmung des PET von 6,23 % (+/-1,74 % SD) keine Änderung in der Grundfluoreszenz, aber eine Abnahme in der Fluoreszenz bei Lichtsättigung um ca. 5-10 %.

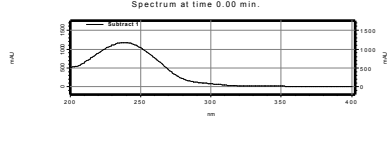
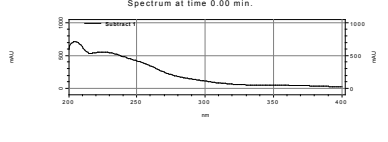
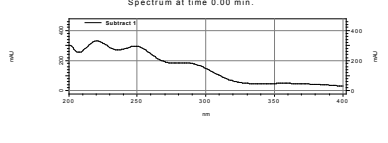
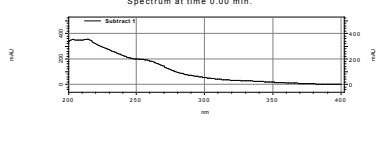
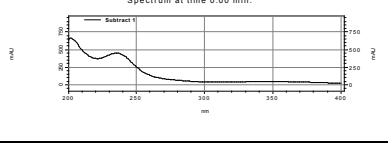
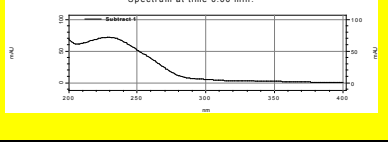
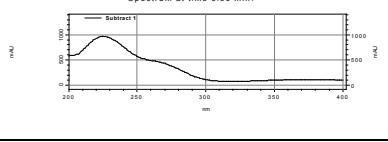
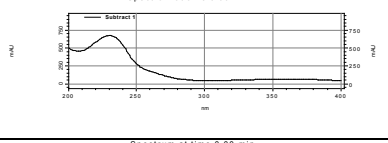
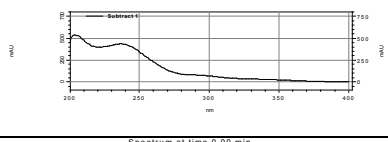
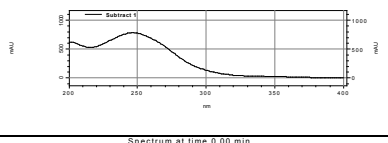
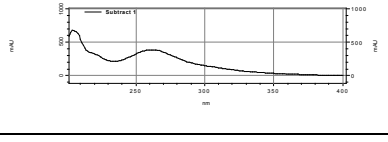
Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Messungen, die mit dem Standard-Herbizid Diuron durchgeführt wurden. Diese Ergebnisse zeigten eine Steigerung der Grundfluoreszenz um 20 % und eine Steigerung der Fluoreszenz bei Lichtsättigung um 5 % bei einer Konzentration von 1,25 µg Diuron/l in der Messkammer. Bei dieser Konzentration wurde gleichzeitig eine Inhibierung des Yields um 15,99 % (+/-0,97 % SD) gemessen.

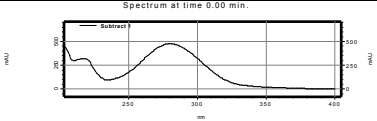
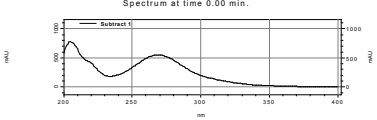
## **3.2 Etablierung einer chemischen Referenzmethode (HPLC) zur quantitativen Analyse von TNT und dessen Metaboliten**

Um die Aussagen des verwendeten Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors in Beziehung zu einem etablierten analytischen Verfahren setzen zu können, wurden parallel zu den biosensorischen Messungen Analysen mittels Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography/HPLC) als chemische Referenz-Methode durchgeführt. In dieser fanden nach einem modifizierten Verfahren nach Steinbach (2003) die Messungen der nitroaromatischen Standardverbindungen statt. Tabelle 3.3 gibt im Folgenden eine Übersicht über die getesteten nitroaromatischen Verbindungen. Dargestellt sind deren Retentionszeiten, ihre Peakflächen bei einer Konzentration des Standards von 50 mg/l und das mittels DAD-Detektor ermittelte Spektrum im Bereich von 200-400 nm.

# Applikation des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors auf nitroaromatische Verbindungen

## Ergebnisse

Substanz	Retentionszeit [min] (+/- Standardabweichung)	Peakfläche bei einer Konzentration von 50 mg/l (+/- Standardabweichung )	Spektrum am gemessenen Peak
2,4-DA-6-NT	5,371 (+/-0,079)	29.268.504 (+/-0,408 %)	
4-A-2-NT	9,081 (+/-0,005)	15.878.743 (+/-0,973 %)	
2-A-4-NT	13,835 (+/-0,002)	16.387.394,3 (+/-1,006 %)	
1,2-DNB	17,623 (+/-0,005)	18.768.191,7 (+/-0,242 %)	
1,3-DNB	17,668 (+/-0,004)	32.601.613 (+/-0,762 %)	
<b>TNT</b>	<b>19,609 (+/-0,064)</b>	<b>25.307.975 (+/-1,912 %)</b>	
2-A-4,6-DNT	22,247 (+/-0,012)	27.385.285,7 (+/-0,171 %)	
4-A-2,6-DNT	22,255 (+/-0,006)	33.449.384,7 (+/-0,740 %)	
2,6-DNT	23,552 (+/-0,008)	17.538.771 (+/-0,618 %)	
2,4-DNT	24,213 (+/-0,005)	20.896.258,3 (+/-0,866 %)	
2-NT	25,851 (+/-0,010)	7.373.220,33 (+/-0,545 %)	

Substanz	Retentionszeit [min] (+/- Standardabweichung)	Peakfläche bei einer Konzentration von 50 mg/l (+/- Standardabweichung)	Spektrum am gemessenen Peak
4-NT	26,611 (+/-0,008)	8.142.415,33 (+/-0,797 %)	
3-NT	27,449 (+/-0,014)	5.256.373 (+/-2,208 %)	

**Tab. 3.3:** Darstellung der Retentionszeiten und Peakflächen der HPLC-Standardmessungen mit den verwendeten Nitroaromaten in methanolischen Lösungen (50 mg/l) bei einer Zugabe von 40 µl Standard-Lösung auf die Säule. Die Werte in Klammern unter den Retentionszeiten und Peakflächen geben die Standardabweichung der Messungen an. Die Sortierung in der Tabelle entspricht den Retentionszeiten im Programm und ist unabhängig von der ökotoxikologischen Bedeutung des Standards. Die Spektren der Standards entsprechen bereinigten Abbildungen der vorliegenden Substanzen.

Aus den Daten der Tabelle 3.3 lässt sich ersehen, dass die gemessenen Standards zwar alle unterschiedliche Retentionszeiten aufwiesen, die stöchiometrisch gleichen Substanzen aber stets in einer relativen Nähe zueinander anzutreffen sind. Die für diese Arbeit bedeutendste Standardsubstanz TNT (in Tabellen 3.3 gelb unterlegt), zeigte eine Retentionszeit von 19,609 min (+/-0,06 min SD).

Die Retentionszeiten und Peakflächen konnten in den folgenden Untersuchungen der Arbeit zur Bestimmung der Kontaminationen und Konzentrationen in den Böden über HPLC verwendet werden.

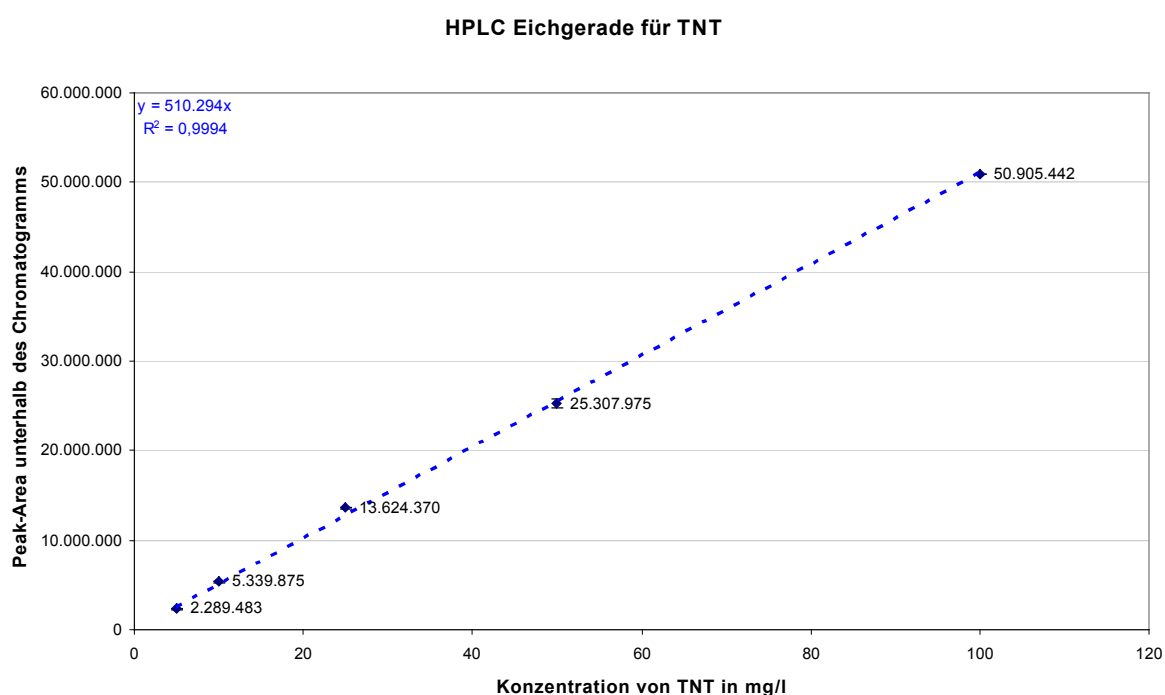
### 3.2.1 HPLC-Eichgerade von TNT und Metaboliten

Durch Messung der in Tabelle 3.4 aufgeführten TNT-Konzentrationen konnte eine HPLC-Eichgerade für TNT mittels linearer Regression ermittelt werden. Eine graphische Darstellung der Messpunkte und der Regressionsgeraden gibt Abbildung 3.8.

## Applikation des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors auf nitroaromatische Verbindungen Ergebnisse

Gemessene Konzentration	Peakfläche	Standardabweichung
5 mg/l (n=3)	2.289.483	+/-19.453
10 mg/l (n=3)	5.339.875	+/-135.705
25 mg/l (n=3)	13.624.370	+/-70.927
50 mg/l (n=3)	25.307.975	+/-483.954
100 mg/l (n=3)	50.905.442	+/-45.225

**Tab. 3.4:** Darstellung der Peakflächen, zwischen Chromatogramm und Baseline, der chromatographischen Eichmessungen von TNT mittels HPLC, Werte angegeben für 40 µl Standard-Zugabe auf die Säule, bei einer Flussrate von 0,35 ml/min.



**Abb. 3.8:** Darstellung der Eichgeraden für TNT mittels HPLC. Die angegebene Formel entspricht der Steigung der durch die Eichpunkte gelegten Geraden. Es gilt n=3 Fehlerindikator = +/- Standardabweichung.

Durch die in der Eichgeraden ermittelte Steigung ( $y = 510,294x$ ;  $R^2 = 0,9994$ ) war es im Folgenden möglich, mit Hilfe von Formel 3.6 die TNT-Konzentrationen anhand von Peakflächen der gemessenen Extrakte zu berechnen. Hierbei musste neben der Steigung auch die auf die Säule zugegebene Menge an Extrakt einberechnet werden, da diese die Menge der Test-Substanz direkt beeinflusst und nur in Verbindung mit der Flüssigkeitsmenge eine entsprechende Konzentrationsberechnung möglich ist. In der Arbeit wurden bei den Messungen der Bodenextrakte 80 µl auf die Säule gegeben, wodurch sich für die Berechnung der Konzentration nach Formel 3.6 ein Konzentrationsfaktor von 2 ergab.



$$F_{\text{Probe}} / s / \text{SZ} = K_{\text{Probe}}$$

**Formel 3.6**

Mit  $F_{\text{Probe}}$  = Peakfläche der Probe;  $s$  = Steigung der Eichgeraden (für TNT 510.294); SZ = Säulenzugabe als Vielfaches von 40  $\mu\text{l}$  (hier in der Regel 2 aufgrund von 80  $\mu\text{l}$  Zugabe auf die Säule, bei Nachmessungen hoher Konzentrationen 1);  $K_{\text{Probe}}$  = Konzentration an TNT in der Probe.

Bei der Berechnung der Eichgeraden der restlichen nitroaromatischen Standardverbindungen, also den Metaboliten von TNT, konnten die in Tabelle 3.5 zusammengestellten Geradengleichungen aufgestellt werden. Auch hier konnten die ermittelten Steigungen der Regressionsgeraden im Folgenden nach Formel 3.6 dazu verwendet werden, über die Peakflächen zwischen Chromatogramm und Baseline die in den Proben gemessenen Konzentrationen dieser nitroaromatischen Verbindungen zu berechnen.

Nitroaromatische Standardverbindung	Geradengleichung nach linearer Regression	Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) der Geradengleichung	Nachweisgrenze [ $\mu\text{g/l}$ ]
2,4-DA-6-NT	$y = 492.607 x$	0,9946	4,97
4-A-2-NT	$y = 561.273 x$	1	4,36
4-A-2-NT	$y = 362.791 x$	0,9998	6,75
1,3-DNB	$Y = 106 x$	0,9993	2,45
2,4,6-TNT	$y = 510.294 x$	0,9994	4,80
4-A-2,6-DNT	$y = 484.094 x$	0,9995	5,06
2-A-4,6-DNT	$y = 642.271 x$	0,9994	3,81
2,6-DNT	$y = 282.627 x$	1	8,67
2,4-DNT	$y = 380.613 x$	1	6,44
2-NT	$y = 181.080 x$	0,9977	13,53
4-NT	$y = 83.159 x$	0,9995	29,46
3-NT	$y = 142.005 x$	0,9999	17,25

**Tab. 3.5:** Geradengleichungen der nitroaromatischen Standardverbindungen/Metabolite von TNT, ermittelt nach linearer Regression. Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  gibt an, wie gut die Punkte der Eichgeraden durch die angegebene Geradengleichung wiedergegeben werden (Bewertungsskala 0-1).

### 3.3 Entwicklung einer geeigneten Extraktionsmethode für nitroaromatische Verbindungen aus Böden

Bei der Entwicklung eines für diese Arbeit geeigneten Extraktionsverfahrens war es von großer Bedeutung, die Ansprüche der biologischen Einheit des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors zu berücksichtigen. Dies galt besonders im Hinblick auf die Tatsache, dass dieser aufgrund seiner Physiologie hauptsächlich in wässrigen Lösungen einsetzbar ist bzw. dass eine Vielzahl an organischen Lösungsmitteln die Aktivität der biologischen Einheit bereits stark einschränkt.

#### 3.3.1 Einfluss von unterschiedlichen Lösungsmitteln auf die biologische Einheit des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors

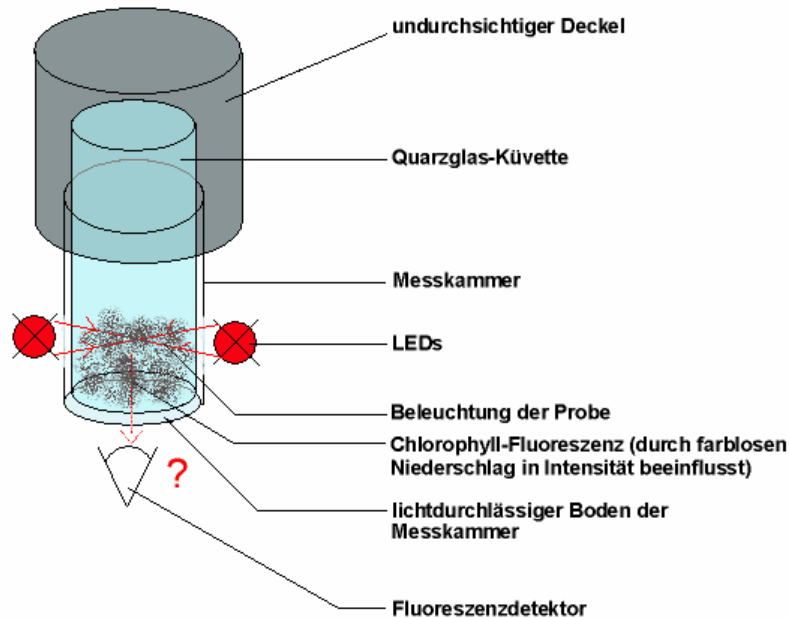
Bei der Untersuchung der unterschiedlichen Lösungsmittel, die in der Analyse von nitroaromatischen Verbindungen Anwendung finden, wurden die Lösungen, wie schon unter Kapitel 2.9.1 angegeben, in relevanten Konzentrationen erprobt. Die Aufgabe der Lösungsmittel lag nicht in der Lösungsvermittlung, sondern in der vollkommenen Lösung der Nitroaromaten aus den Böden. Die entsprechende Wirkung der Lösungsmittel in 10%iger Konzentration auf die biologische Einheit des Biosensors ist in Tabelle 3.6 wiedergegeben.

Lösungsmittel	Konzentration [%]	Hemmung des PET [%]	Standardabweichung [%]
Acetonitril	10	87,26	+/-4,92
Toluol	10	57,84	+/-25,13
Methanol	25	37,79	+/-3,36
Ethanol	25	52,81	+/-5,48

**Tab. 3.6:** Darstellung der inhibitorischen Wirkung unterschiedlicher organischer Lösungsmittel auf die photosynthetische Elektronentransportkette (PET). Da Toluol nicht mit Wasser mischbar ist, unterstreicht der oben genannte Wert die Toxizität dieses Lösungsmittels. Der dargestellte Hemmungswert entspricht also lediglich der Hemmung des PET, des in Wasser löslichen Bruchteils an Toluol.

Die Lösungsmittel Toluol wie auch 0,01 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung (nicht in Tabelle 3.6 aufgeführt), die standardmäßig in chemischen Analysen zum Lösen von TNT aus Böden eingesetzt werden, zeigten eine völlige Unbrauchbarkeit. Toluol war, entsprechend seiner physikalischen Eigenschaften, nicht wasserlöslich. In Toluol gelöste Substanzen könnten also nicht ihre Wirkung auf die biologische Einheit, die Thylakoidmembranen und damit den photosynthetischen Elektronentransport, entfalten, da dieser nur in wässrigen Lösungen aktiv vorliegen kann. Auch die CaCl<sub>2</sub>-Lösung erwies sich als ungeeignet, da diese in Kontakt mit dem für die Messungen benötigten Messpuffer sofort einen farblosen Niederschlag bildete.

Dieser bewirkte, dass die von den Thylakoidmembranen ausgehende Fluoreszenz nicht frei von dem Detektor auf dem Boden der Messkammer aufgenommen werden konnte. Abbildung 3.9 verdeutlicht diese Zusammenhänge graphisch.



**Abb. 3.9:** Darstellung der Störung des Fluoreszenzsignals durch Niederschlagsbildung in der Messkammer des ToxY-PAMs; durch den dargestellten Niederschlag lässt sich das Fluoreszenzsignal mittels des Detektors am Boden der Messkammer nicht eindeutig quantifizieren.

Aus den Daten der weiteren Lösungsmittel, die sich mit Wasser mischen ließen und keine Reaktionen mit dem Messpuffer zeigten, war ersichtlich, dass Acetonitril, ebenfalls häufig zur Extraktion verwendet, schon in Konzentrationen von 10 % mit einer Hemmung von 87,26 % (+/-4,92 % SD) einen viel zu großen Einfluss auf die biologische Einheit aufzeigte, um für die weiteren Versuche Verwendung zu finden. 25%ige Zugaben von Methanol und Ethanol erwiesen sich mit Hemmungen des PET von 37,79 % (+/-3,36 % SD) für Methanol und 52,81 % (+/-5,48 % SD) für Ethanol als ebenfalls zu hohe Konzentrationen, um in den biosensorischen Messungen Verwendung finden zu können. Wie schon unter Kapitel 3.1.2.1 dargestellt, konnten TNT und dessen Metabolite in 10 % methanolischer und ethanolischer Lösung mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor nicht gemessen werden. Da jedoch Konzentrationen über 10 % zu einer erheblichen Beeinflussung des Biosensors führten (siehe Tabelle 3.6), wurde in den Bodenextraktionen auf den Einsatz von Lösungsmitteln verzichtet und lediglich destilliertes Wasser verwendet. Ebenfalls für die Verwendung von Wasser sprach, dass nach Kördel und Hund (1998) Lösungsmittel von Bioassays keine toxischen Wirkungen haben sollen.

### 3.3.2 Einfluss verschiedener Extraktionsverfahren auf die Wiederfindungsrate von TNT

Durch Festlegung des Lösungsmittels auf Wasser erfolgte anschließend die Entwicklung eines Extraktionsverfahrens auf der Basis von Wasser. Als Mess-System für die Analyse des Extraktionserfolges bzw. der Wiederfindungsrate des dotierten TNTs wurde die HPLC herangezogen.

Die folgenden Punkte sollten zur Findung eines geeigneten Extraktionsverfahrens führen.

#### 3.3.2.1 Extraktion von TNT aus dotiertem Boden mittels Ultraschall

Die Extraktionen der dotierten Böden mittels Ultraschall erreichten die in Tabelle 3.7 dargestellten Wiederfindungsraten.

Aus den dargestellten Ergebnissen ist ersichtlich, dass die Extraktion mit Ultraschall keine ausreichenden Wiederfindungsraten lieferte. Auch unterschiedliche Behandlungszeiten der jeweiligen Böden mit Ultraschall ließen sich nicht signifikant unterscheiden. So ergab sich bei der Extraktion des Sandbodens nur eine Steigerung der TNT-Wiederfindungsrate von 2,31 % (+/-0,42 % SD) auf 6,59 % (+/-0,51 % SD) nach der 18fachen Zeit. Auch zeigt die Tabelle, dass durch unterschiedlich lange Behandlungen die Temperaturen in den Extrakten stark variierten.

Bodensorte	Behandlung	Konzentration +/- SD [mg/l]	Wiederfindungsrate +/- SD [%]	Kommentar
<b>Waldboden</b>	1h Ultraschall	1,04 +/-0,75	1,38 +/-1,00	Erwärmung auf 35 °C
<b>Grünlandboden</b>	1h Ultraschall	0,02 +/-0,66	0,03 +/-0,88	Erwärmung auf 35 °C
	18h Ultraschall	1,74 +/-0,32	4,40 +/-0,96	Erwärmung auf 75 °C
<b>Sandboden</b>	1h Ultraschall	3,30 +/-0,72	2,31 +/-0,42	Erwärmung auf 35 °C
	18h Ultraschall	4,94 +/-0,38	6,59 +/-0,51	Erwärmung auf 75 °C

**Tab. 3.7:** Darstellung der Extraktionserfolge durch Ultraschallbehandlungen der mit Wasser versetzten dotierten Bodenproben für 1 bzw. 18h. Die in der Kommentarzeile angegebenen Temperaturen entsprechen den Extrakttemperaturen, die durch Selbsterwärmung des Ultraschallbades systembedingt in den Proben erreicht wurden.

### **3.3.2.2 Extraktion von TNT aus dotiertem Boden durch Rühren**

Da die Extraktion von TNT aus Böden mittels Ultraschall nicht möglich war, wurde in den folgenden Punkten die Extraktion von TNT aus Böden mittels gerührter Proben getestet.

#### ***3.3.2.2.1 Einfluss von Temperaturänderungen***

Um einen Temperaturbereich zu finden, in dem möglichst viel TNT aus den Böden lösbar ist, wurde der Ackerboden zum entsprechenden Zeitpunkt als Referenzboden herangezogen, dotiert und bei unterschiedlichen Temperaturen einer Rührerextraktion unterzogen. Hierbei zeigte sich, dass bei einer Temperatur von 60 °C bei der Extraktion in diesem Boden 34,27 % (+/-5,29 % SD) des dotierten TNTs wieder aus dem Boden heraus gelöst werden konnten. Bei einer Temperatur von 90 °C ergab sich eine TNT-Wiederfindungsrate aus dem dotierten Ackerboden von nur 15,73 % (+/-0,58 % SD). Beides jeweils in einer Extraktionszeit von einer Stunde. Da die Extraktion bei 60 °C um ca. 120 % höhere Extraktionsmengen lieferte, wurde diese Temperatur (60 °C) für die folgenden Extraktionen verwendet.

In Wald-, Grünland-, und Sandboden konnten TNT-Wiederfindungsraten von 18,71 % +/-7,14 % SD (Waldboden), 36,20 % +/-5,15 % SD (Grünlandboden) und 55,41 % +/-5,29 % SD (Sandboden) nachgewiesen werden.

#### ***3.3.2.2.2 Einfluss der Extraktionszeit***

Des Weiteren galt es, den Einfluss der Zeit auf die Extraktion zu klären. Durch Erhöhung der Extraktionszeit von einer auf vier Stunden auf dem Rührer änderte sich beim Ackerboden die Wiederfindungsrate von 34,27 % (+/-5,29 % SD) nach einer Stunde auf 36,25 % (+/-13,30 % SD) nach vier Stunden. Eine signifikante Steigerung der Extrahierbarkeit konnte also über eine Verlängerung der Extraktionszeit in den vorliegenden Böden nicht erreicht werden.

Im Vergleich der TNT-Wiederfindungsraten aus dotierten Böden zeigte sich, dass die Ergebnisse der Rührerextraktion hochsignifikant größer waren, als nach gleicher Zeit in der Ultraschallextraktion. So wurde z. B. beim Waldboden durch die Rührerextraktion eine Wiederfindungsrate von 36,220 % (+/-5,15 % SD) gegenüber 1,38 % (+/-1,00 % SD) in der Ultraschallextraktion gemessen.

Die Wiederfindungsraten der anderen dotierten Böden mit Werten von 18,71 % (+/-7,14 % SD) für den Waldboden, 36,20 % (+/-5,15 % SD) für den Grünlandboden und 55,41 % (+/-11,80 % SD) für den Sandboden waren ebenfalls hochsignifikant höher, als die zeitlich gleichen Extraktionen mittels Ultraschall.

Die Ausrichtung der verwendeten Biosensorik lag auf einem Testsystem, welches keine toxischen Lösungsmittel im Messvorgang verwendet, sowie der Tatsache, dass das hier

angewandte Verfahren möglichst simpel aufgebaut sein sollte, um eine einfache Handhabung in der Praxis zu gewährleisten. Aufgrund der oben dargestellten Verfahren wurde für die Extraktion der nitroaromatischen Verbindungen, unter besonderer Berücksichtigung des TNTs, Wasser als Lösungsmittel verwendet. Als bestes Extraktionsverfahren für die weiteren Untersuchungen erwies sich Rühren über eine Stunde bei 60 °C.

### **3.4 Einfluss von Bodenextrakten auf die Aktivität der biologischen Einheit des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors**

Die Böden, die in dieser Arbeit für die Experimente zur Ermittlung eines geeigneten Extraktionsverfahrens dienten, sollten auch einen ersten Eindruck über die Einflüsse der Bodenmatrix auf die Detektion von TNT aus Böden gewähren. Tabelle 3.8 vermittelt in diesem Zusammenhang einen Überblick über den Kohlenstoff-, Stickstoff- und Humusgehalt, das C/N-Verhältnis sowie dem potenziellen wie realen pH-Wert. Die Berechnung des Humusgehaltes erfolgte gemäß der bodenkundlichen Faustformel (Püttmer, 2003), dargestellt in Formel 3.7.

$$\text{HG} = 2 \times \text{C}$$

**Formel 3.7**

Mit HG = Humusgehalt [%]; C = Gehalt des Bodens an Kohlenstoff [%].

Um einen möglichen Einfluss der Bodenmatrix in den Extrakten auf den Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor ausschließen zu können, wurden parallel zu den ersten Versuchen der Extraktion von TNT-dotierten Böden Extraktionen von undotierten Bodenproben gleicher Art durchgeführt, die mit dem Biosensor vermessen wurden. Hierbei zeigte sich bei undotierten Proben des Ackerbodens eine durchschnittliche Beeinflussung des CT-Biosensors von -1,832 % (+/-0,344 % SD) Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports. In diesem Fall konnte also nicht von einer Beeinträchtigung der Messungen durch die Bodenmatrix ausgegangen werden. Spätere Messungen an Wald-, Grünland- und Sandboden wiesen mittlere Beeinflussungen von -4,31 % Hemmung des PET (+/-0,73 % SD) beim Grünlandboden, über -1,90 % (+/-1,62 % SD) beim Waldboden und bis 0,245 % (+/-0,75 % SD) beim Sandboden auf.

<b>Boden</b>	<b>Potenzielle Acidität</b> +/- SD [pH]	<b>Reale Acidität</b> +/- SD [pH]	<b>Kohlenstoff-/Humusgehalt</b> +/- SD [%]	<b>Stickstoffgehalt</b> +/- SD [%]	<b>C/N-Verhältnis</b> +/- SD
<b>Waldboden</b>	4,90 +/-0,27	5,87 +/-0,25	2,23 +/-0,17 / 4,47 +/-0,33	0,18 +/-0,01	12,20 +/-0,52
<b>Grünlandboden</b>	4,52 +/-0,30	4,86 +/-0,23	1,48 +/-0,14 / 2,96 +/-0,28	0,15 +/-0,01	9,75 +/-0,52
<b>Sandboden</b>	7,13 +/-0,13	7,60 +/-0,10	0,45 +/-0,01 / 0,89 +/-0,02	0,01 +/-0,00	44,45 +/-1,06
<b>Ackerboden</b>	7,34 +/-0,14	7,44 +/-0,54	1,68 +/-0 / 3,36 +/-0	0,18 +/-0,00	9,59 +/-0,08
<b>Humusboden</b>	6,11 +/-0,24	7,32 +/-0,55	17,56 +/-0,25 / 35,12 +/-0,59	0,38 +/-0,01	46,15 +/-0,47

**Tab. 3.8:** Darstellung der Eigenschaften der Bodenmatrix in Bezug auf den potenziellen und realen pH-Wert, sowie den Gehalten an Kohlenstoff/Humus und Stickstoff sowie deren Verhältnis zueinander. Der Humusgehalt entspricht der Berechnung nach der in Formel 3.7 dargestellten bodenkundlichen Faustformel aus dem Wert der Kohlenstoffmessung; die angegebenen Abweichungen entsprechen den Standardabweichungen der Messwerte.

Bedingt durch die Tatsache, dass es bei den realkontaminierten Böden keine Möglichkeit gab, einen identischen, unbelasteten Boden zur Kontrolle zu messen, musste in den Messungen der realkontaminierten Böden darauf verzichtet werden, gegen eine unkontaminierte Bodenprobe zu messen.

### 3.5 Einfluss der Bodenmatrix auf die TNT-Wiederfindungsrate in dotierten Böden

#### 3.5.1 TNT-Wiederfindungsraten nach HPLC

Die dotierten Böden zeigten in den chromatographischen Messungen mittels HPLC, in Abhängigkeit zur vorherigen Eichung (Kapitel 3.2.1) durch die wässrigen TNT-Standards, die in Abbildung 3.10 dargestellten Wiederfindungsraten an TNT. Weitere Metabolite des TNTs, die bedingt durch Remediationsprozesse entstehen können, konnten in den dotierten Böden nicht nachgewiesen werden.

Wiederfindungsrate von TNT in dotierten Böden ermittelt mit der HPLC

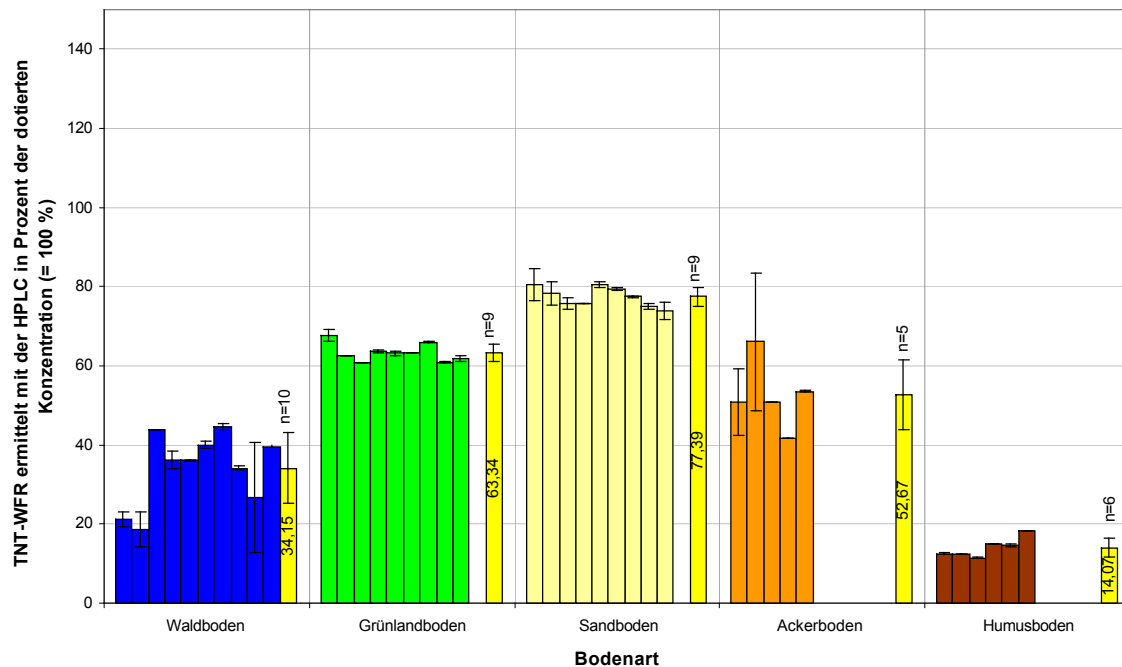


Abb. 3.10: Darstellung einzelner Wiederfindungsraten dotierter Böden nach HPLC-Messungen; die gelben Säulen (ganz rechts) geben die mittlere Wiederfindungsrate des jeweiligen Bodens wieder, auch angegeben als Zahlenwert in der Säule. Es gilt n=3, bei Mittelwerten angegeben; Fehlerindikator = +/- Standardabweichung.

Die in der Graphik angegebene Wiederfindungsrate ermittelte sich aus Berechnungen anhand der dotierten Menge an TNT in den Böden. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass sich hypothetisch alles TNT mittels Wasser aus dem Boden heraus lösen lässt. Zur Verdeutlichung dient Formel 3.8.

Weitere Metabolite des TNT, die bedingt durch Remediationsprozesse entstehen können, konnten in den dotierten Böden nicht nachgewiesen werden

$$K_{\text{Test}} \times \text{VF} / K_{\text{dot}} * 100 = \text{WFR} [\%] \quad \text{Formel 3.8}$$

mit  $K_{\text{Test}}$  = gemessene Konzentration im Bodenextrakt [mg/l];  $K_{\text{dot}}$  = dotierte Konzentration an TNT im Boden [mg/kg], VF = Verdünnungsfaktor, der bei der Extraktion durch das Lösungsmittel erreicht wird, hier gilt VF = 2 (gilt, da Verhältnis Boden zu Wasser = 1:2); WFR = Wiederfindungsrate [%].

Aus der Abbildung 3.10 ergab sich deutlich eine Abhängigkeit der TNT-Wiederfindung im Verhältnis zur Bodenart. So fand sich die geringste bis höchste Wiederfindung in der Reihenfolge Humusboden (14,07 % +/-2,48 % SD), Waldboden (34,15 % +/-9,05 % SD), Ackerboden (52,67 % +/-8,74 % SD), Grünlandboden (63,34 % +/-2,28 % SD) und Sandboden (77,39 % +/-2,42 % SD).

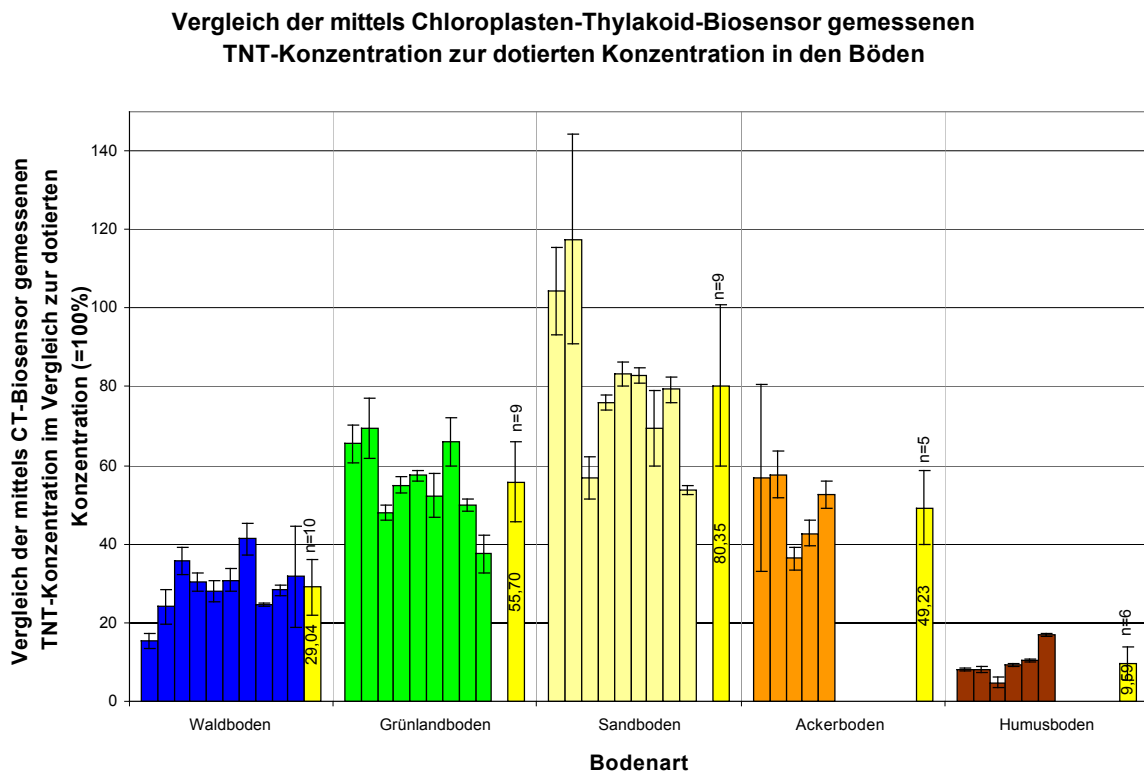


Vor allem wurde aus den dargestellten Daten ersichtlich, dass sich die verschiedenen Böden bezüglich der Wiederfindungsrate an TNT in ihren Mittelwerten hochsignifikant voneinander unterscheiden. Bei der Unterscheidung zwischen Grünland und Ackerboden konnte „nur“ ein signifikantes Niveau erreicht werden.

### 3.5.2 TNT-Wiederfindungsraten nach biosensorischen Messungen mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor

In den biosensorischen Messungen der dotierten Böden konnten diese nicht ganz so deutlich voneinander unterschieden werden wie in den Ergebnissen der HPLC. Zwar erreichten die Vergleiche meist ein hochsignifikantes Unterscheidungsniveau, Grünlandboden und Sandboden bzw. Ackerboden und Sandboden waren „nur“ signifikant unterschiedlich. Grünlandboden und Ackerboden ließen sich in den biosensorischen Messungen nicht unterscheiden.

Wie aus Abbildung 3.11 hervorgeht, wiesen die Messungen mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor - bis auf die Werte des Sandbodens (80,35 % +/-20,53 % SD) - durchgehend geringere TNT-Konzentrationen im Vergleich zur dotierten Menge auf, als diese mit der HPLC ermittelt wurden.



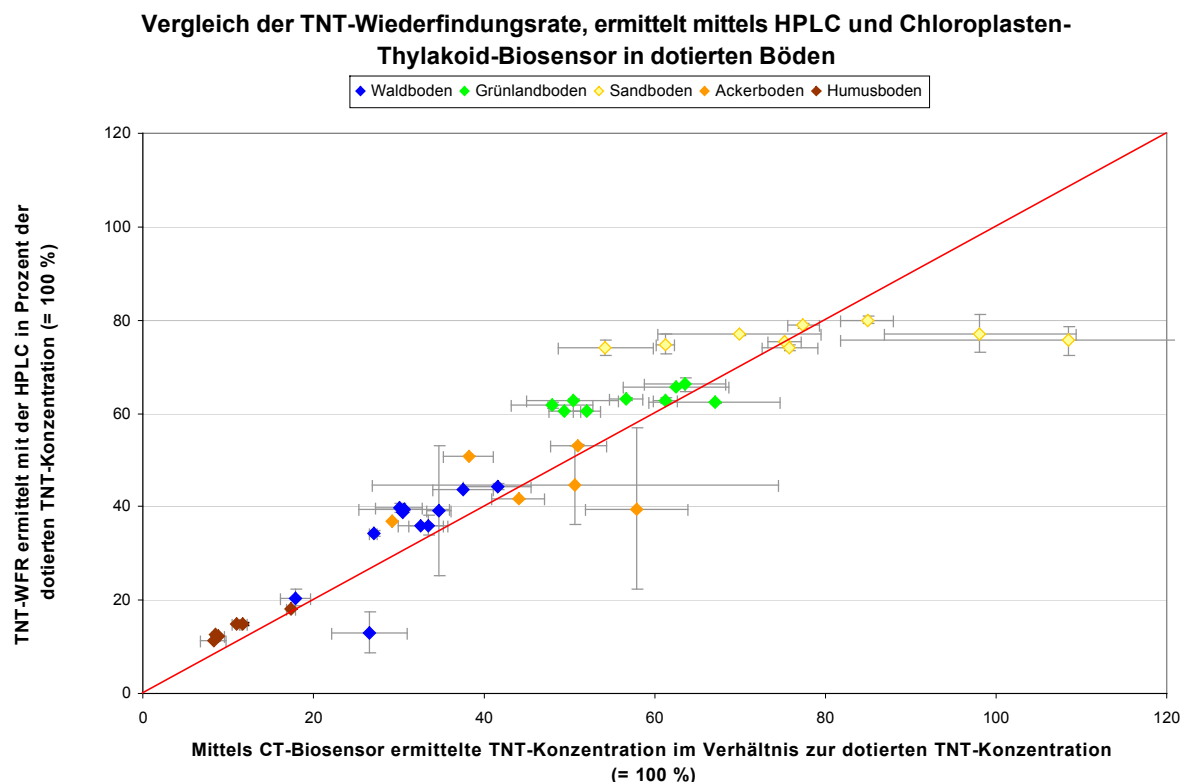
**Abb. 3.11:** Darstellung der mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor gemessenen TNT-Konzentration im Vergleich zur dotierten Menge an TNT in den Böden. Die gelben Säulen (ganz rechts) fassen die vorhergehende Werte arithmetisch zusammen, auch angegeben als Zahlenwert in der Säule; im Allgemeinen gilt n=5, bei Mittelwerten angegeben; Fehlerindikator = +/- Standardabweichung.

Aus dem dargestellten Vergleich geht hervor, dass die dotierte Konzentration an TNT am schlechtesten im Humusboden wiederzufinden war (9,59 % +/-4,06 % SD). Der Nachweis verbesserte sich in der Reihenfolge Waldboden (29,04 % +/-6,99 % SD), Ackerboden (49,23 % +/-9,29 % SD), Grünlandboden (55,70 % +/-10,23 % SD) und Sandboden (80,35 % +/-20,53 % SD). Hierbei wurden aber nur die mittleren Wiederfindungsraten verglichen.

### 3.5.3 Gegenüberstellung der mittels HPLC und Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor ermittelten TNT-Konzentrationen

Im Vergleich der biosensorischen Messungen mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor mit denen der HPLC konnten die ermittelten Werte, im Vergleich zur dotierten Konzentration, nicht unterschieden werden. Lediglich die Ergebnisse des Humusbodens stellten sich davon abweichend als wahrscheinlich unterschiedlich dar (Signifikanzniveau 95 %).

Setzte man zum Vergleich der beiden Systeme die Ergebnisse der Biosensorik mit denen durch die HPLC gemessenen Konzentrationen in eine Graphik, so ergab sich die in Abbildung 3.12 gezeigte Darstellung.



**Abb. 3.12:** Gegenüberstellung der TNT-Wiederfindungsraten der HPLC- und der biosensorischen Messungen von dotierten Böden, jeweils im Verhältnis zur maximalen Konzentration entsprechend der Dotierung. Für die Darstellung der HPLC-Messungen gilt  $n=3$ , für die biosensorischen Messungen gilt  $n=5$ . Die eingefügte rote Gerade zeigt die Gerade mit optimaler Steigung ( $y = 1x$ ) als Vergleich an. Fehlerindikator = +/- Standardabweichung.

Zum besseren Vergleich der mit beiden Systemen gemessenen Konzentrationen, wurden diese in Form ihres Verhältnisses zur dotierten Menge an TNT gesetzt und graphisch gegeneinander aufgetragen. Hierbei gruppieren sich die Ergebnisse entlang einer Geraden mit einer Steigung von  $y = 1,004 x$  ( $R^2 = 0,7909$ ).

Auch in dieser Gegenüberstellung wurde der Einfluss der Bodenmatrix auf die Wiederfindungsrate von TNT ersichtlich. So zeigte der Humusboden mit durchschnittlich 14,07 % ( $\pm 2,48$  % SD) TNT-Wiederfindung nach HPLC die geringsten Werte, klar abgegrenzt von den anderen Böden. Diesem folgten der Waldboden mit durchschnittlich 34,15 % ( $\pm 9,05$  % SD) und der Ackerboden mit 52,67 % ( $\pm 8,74$  % SD), wobei sich hier die Bereiche der einzelnen Extrakte überlappten. Der Grünlandboden war mit einer durchschnittlichen TNT-Wiederfindungsrate von 63,34 % ( $\pm 2,28$  % SD) von diesen, wie auch dem Sandboden, mit einer mittleren Wiederfindungsrate an TNT von 77,39 % ( $\pm 2,42$  % SD), abgegrenzt. Aus Abbildung 3.12 geht weiter hervor, dass die nach HPLC ermittelten Wiederfindungsraten für die jeweiligen Bodentypen näher aneinander lagen. Die Wiederfindungsraten der biosensorischen Messungen streuten demgegenüber stärker für ein und denselben Bodentyp.

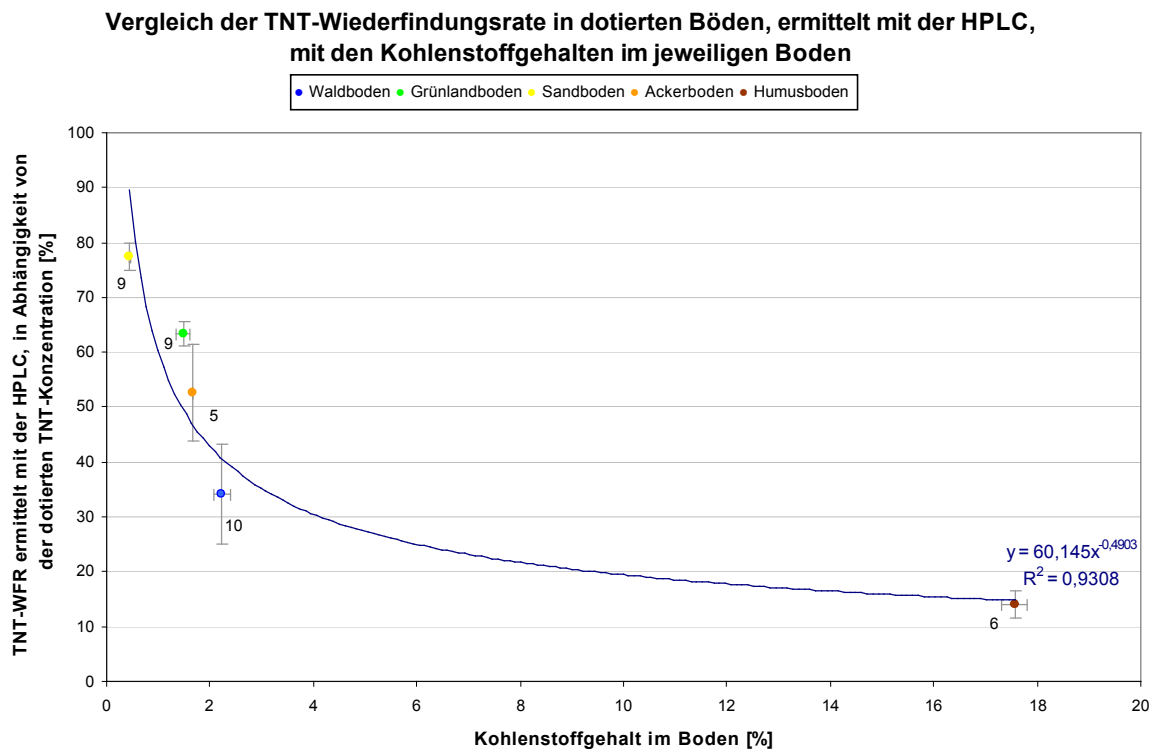
Im Vergleich der Systeme zeigt sich aus Abbildung 3.12, dass besonders die Extrakte des Sandbodens in den Messungen mittels CT-Biosensor wesentlich stärker streuten als die gleichen Extrakte mittels HPLC vermessen. Etwas weniger stark ausgeprägt ist dies auch beim Ackerboden zu erkennen.

### **3.5.4 TNT-Wiederfindungsraten nach HPLC im Verhältnis zum Kohlenstoff-/Stickstoffgehalt**

#### **3.5.4.1 Kohlenstoffgehalt**

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse der mit der HPLC ermittelten Wiederfindungsraten zu den Ergebnissen der Kohlenstoffmessungen der dotierten Böden zeigten sich die in Abbildung 3.13 dargestellten Verhältnisse. Aus diesen geht hervor, dass der Kohlenstoffgehalt und damit auch der Humusgehalt in einer Abhängigkeit, in Form einer Potenz-Funktion, zur TNT-Wiederfindungsrate standen ( $y = 60,145x^{-0,4903}$ ;  $R^2 = 0,9308$ ). Beim höchsten Kohlenstoffgehalt, dem des Humusbodens mit 17,56 % ( $\pm 0,25$  % SD), wurde die geringste TNT-Wiederfindungsrate von 14,07 % ( $\pm 2,48$  % SD) gemessen. Bei dem geringsten Kohlenstoffgehalt, dem des Sandbodens (0,45 %  $\pm 0,01$  % SD), wurde entsprechend die höchste TNT-Wiederfindungsrate von 77,39 % ( $\pm 2,42$  % SD)

nachgewiesen. Die anderen, in diesen Versuchen vorliegenden Böden zeigten dementsprechend fallende TNT-Wiederfindungsraten mit ansteigendem Kohlenstoffgehalt.

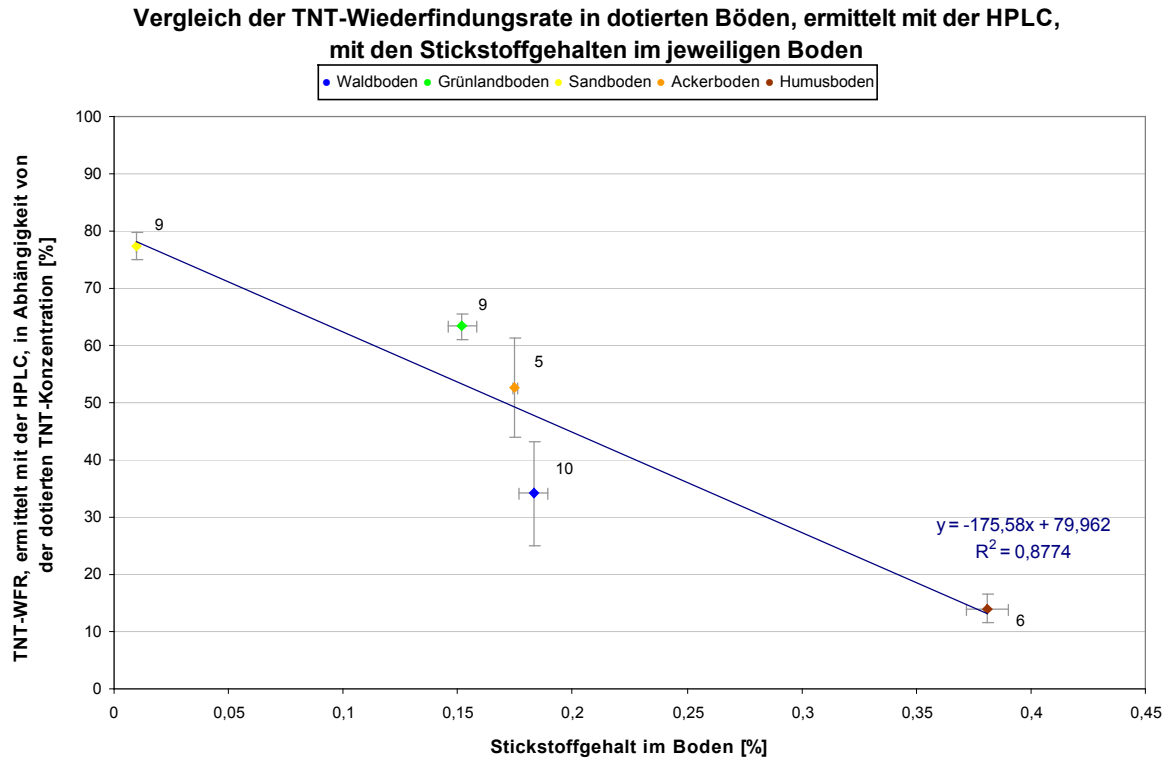


**Abb. 3.13:** Darstellung des Vergleiches der ermittelten TNT-Wiederfindungsraten in dotierten Böden, über chromatographische Messungen mit der HPLC gegen die Kohlenstoffgehalte gleicher Böden. Für die Kohlenstoffmessungen gilt  $n=2$ , für die TNT-Wiederfindungsraten  $n$ =der an den Messpunkten angegebene Zahlenwert; Fehlerindikator = +/- Standardabweichung.

Hierbei war festzustellen, dass, bis auf den Humusboden mit einem hochsignifikant höheren Gehalt, keiner der getesteten Böden über 2,5 % Kohlenstoff aufweisen konnte. Während sich Wald-, Acker- und Grünlandböden in ihren Kohlenstoffgehalten nicht signifikant unterschieden, zeigte der Sandboden einen signifikant geringeren und der Humusboden einen signifikant höheren Gehalt.

### 3.5.4.2 Stickstoffgehalt

Setzte man die Wiederfindungsraten des dotierten TNTs ins Verhältnis zum Stickstoffgehalt in den getesteten Böden, so zeigte sich auch dort eine Beziehung zwischen beiden Werten, dargestellt in Abbildung 3.14. Bei der mathematischen Beschreibung dieses Verhältnisses konnte eine lineare Beziehung gefunden werden, die der Formel  $y = -175,58x + 79,962$  mit einem  $R^2$  von 0,8774 genügte. Auch hierbei führten hohe Gehalte an Stickstoff zu geringen Wiederfindungsraten an TNT. Wie schon bei den Aussagen des Kohlenstoffgehaltes zeigte der Humusboden mit dem höchsten Stickstoffanteil (0,38 % +/-0,01 % SD) die geringste TNT-Wiederfindungsrate (14,07 % +/-2,48 % SD).



**Abb. 3.14:** Darstellung des Vergleiches der ermittelten TNT-Wiederfindungsraten in dotierten Böden, über chromatographische Messungen mit der HPLC gegen die Stickstoffgehalte gleicher Böden, ermittelt vom Institut für Pflanzenernährung der Universität Bonn. Für die Stickstoffmessungen gilt  $n=2$ , für die TNT-Wiederfindungsraten der an den Messpunkten angegebene Zahlenwert; Fehlerindikator = +/- Standardabweichung.

Ebenso zeigte der Sandboden, wie beim Kohlenstoffgehalt, mit 0,01 % Stickstoffanteil (+/-0,0 % SD) die höchste TNT-Wiederfindungsrate. Die anderen getesteten Böden zeigten entsprechend mit ansteigendem Stickstoffgehalt eine abnehmende Wiederfindungsrate. Wie schon bei den Kohlenstoffgehalten waren auch hier Wald-, Acker- und Grünlandboden im Stickstoffgehalt nicht signifikant zu unterscheiden. Sand- und Humusboden hingegen zeigten jeweils signifikant unterschiedliche Gehalte im Vergleich zu den anderen Böden.

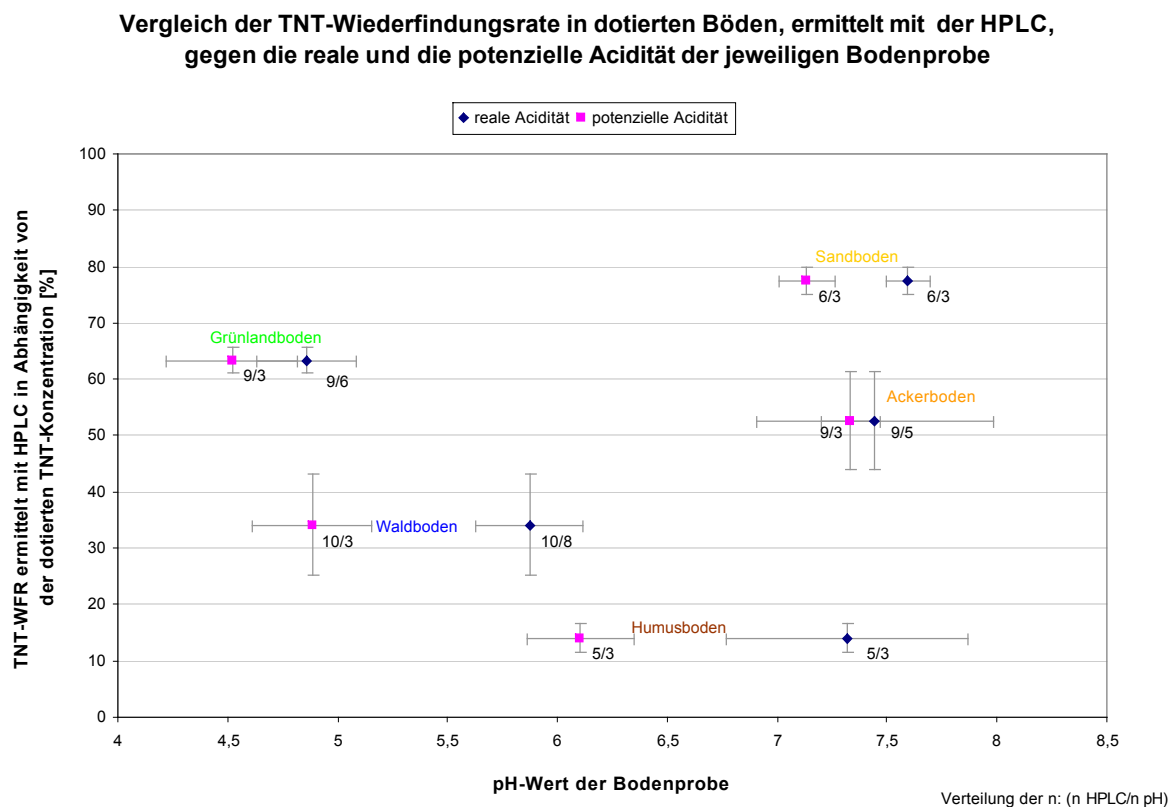
### 3.5.4.3 Kohlenstoff/Stickstoff-Verhältnis

Bei dem Versuch, eine Beziehung zwischen dem C/N-Verhältnis und der TNT-Wiederfindungsrate, ermittelt mittels HPLC, zu erreichen, konnte nicht direkt eine Beziehung gefunden werden. Erst durch die Eliminierung des C/N-Verhältnisses des Sandbodens (44,45 +/-1,061 SD) ließ sich eine potenzielle Abhängigkeit finden ( $y = 370,62x^{-0,8622}$ ;  $R^2 = 0,9321$ ). Hierbei ließ sich eine Verringerung der TNT-Wiederfindungsrate bei Weitung des Kohlenstoff-Stickstoff-Verhältnisses ersehen (Ergebnisse sind nicht graphisch dargestellt).

### 3.5.5 TNT-Wiederfindungsraten nach HPLC in Gegenüberstellung zu den potenziellen und realen pH-Wert der Böden

Im Vergleich der durchschnittlichen TNT-Wiederfindungsraten, ermittelt mit der HPLC, und den realen pH-Werten (in wässriger Lösung, siehe Abschnitt 2.10.1) in den vermessenen Bodenextrakten, ließ sich keine zu identifizierenden Abhängigkeiten erkennen. Weder mit steigendem noch mit fallendem pH-Wert war eine Korrelation zur TNT-Wiederfindungsrate zu ersehen. Gleiches ließ sich für den Vergleich der potenziellen Acidität, in  $\text{CaCl}_2$ -Lösung der getesteten Böden, zu den Wiederfindungsraten sagen. Auch hier konnten keine Abhängigkeiten voneinander aufgezeigt werden. In Abbildung 3.15 sind die reale wie auch die potenzielle Acidität dargestellt.

Betrachtet man die potenziellen pH-Werte der Böden alleine, so konnten Wald- und Grünlandboden von Acker-, Sand- und Humusboden signifikant unterschieden werden. Bei den realen pH-Werten ließen sich die gleichen Unterschiede finden, bis auf den Humusboden, der von keiner anderen Bodensorte im pH-Wert unterschieden werden konnte.



**Abb. 3.15:** Vergleich der ermittelten durchschnittlichen TNT-Wiederfindungsrate in den dotierten Böden, gemessen mittels HPLC, in Gegenüberstellung zur realen und der potenziellen Acidität der Bodenproben. Die Zahlen an den Messpunkten zeigen die Anzahl der in diesem Wert gemittelten Messungen an: über dem Bruchstrich die Anzahl der HPLC-Messungen, unterhalb des Bruchstriches die Anzahl der pH-Messungen. Die Aufteilung der einzelnen Böden entspricht den zugeordneten Beschriftungen. Fehlerindikator = +/- Standardabweichung.

Im Vergleich der potenziellen pH-Werte, in  $\text{CaCl}_2$ -Lösung, von den realen pH-Werten, in wässriger Lösung, konnte gezeigt werden, dass die potenziellen pH-Werte immer saurer waren als die realen.

### **3.6 Analyse realkontaminierter Bodenproben**

#### **3.6.1 Charakterisierung der realkontaminierten Böden**

Aus den durchgeführten Untersuchungen der realkontaminierten Böden aus ABC (ABC 1-6), DEF (DEF) und GHI (GHI 1-2), sowie den Angaben, die durch die Sanierer über die Kontaminationen der Böden vorlagen, konnten die in Tabelle 3.8 dargestellten Bodenparameter zusammengestellt werden.

Applikation des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors auf nitroaromatische Verbindungen  
Ergebnisse

<b>Boden</b>	<b>C/N-Verhältnis</b>	<b>Kohlenstoff-/Humusgehalt [%]</b>	<b>Stickstoffgehalt [%]</b>	<b>Potenzielle Acidität [pH]</b>	<b>Reale Acidität [pH]</b>	<b>Kontamination nach Angaben der Sanierer [mg/l]</b>	<b>Mittelwert der Kontaminationen in den wässrigen Extrakten nach HPLC [mg/l]</b>
<b>ABC 1</b>	12,75 +/-0,65	1,06 +/-0,02 / 2,12 +/-0,03	0,08 +/-0,01	6,76	8,24 +/-0,22	2,4,6-TNT: 73,2 4-A-2,6-DNT: 12 2,4-DNT: 0,10 2-A-4,6-DNT: 15,1 Σ Nitroaromaten: 100	2,4,6-TNT: 5,91 +/-2,54 4-A-2,6-DNT: 0,57 +/-0,60 2,6-DNT: 0,24 +/-0,13 4-A-2-NT: 2,91 +/-0,73 (n=18)
<b>ABC 2</b>	31,57 +/- 18,82	0,84 +/-0,03 / 1,69 +/-0,07	0,04 +/-0,02	7,35	8,51 +/-0,47	2,4,6-TNT: 15,6 4-A-2,6-DNT: 3,84 2-A-4,6-DNT: 6,45 Σ Nitroaromaten: 26,3	2,4,6-TNT: 1,02 +/-0,99 4-A-2,6-DNT: 0,26 +/-0,07 2,6-DNT: 0,05 +/-0,06 4-A-2-NT: 0,01 +/-0,89 (n=17)
<b>ABC 3</b>	15,35 +/-0,91	1,31 +/-0,02 / 2,62 +/-0,04	0,09 +/-0,01	7,37	8,47 +/-0,36	2,4,6-TNT: 11,1 4-A-2,6-DNT: 3,51 2-A-4,6-DNT: 3,76 Σ Nitroaromaten: 18,4	2,4,6-TNT: 1,71 +/-1,72 4-A-2,6-DNT: 0,19 +/-0,15 2,6-DNT: 0,16 +/-0,10 4-A-2-NT: 2,45 +/-0,89 (n=16)
<b>ABC 4</b>	16,31 +/-0,98	0,95 +/-0,05 / 1,90 +/-0,10	0,06 +/-0,01	5,61	7,54 +/-0,25	2,4,6-TNT: 223 4-A-2,6-DNT: 33 2-A-4,6-DNT: 47 Σ Nitroaromaten: 303	2,4,6-TNT: 18,59 +/-35,91 4-A-2,6-DNT: 0,38 +/-0,28 2,6-DNT: 0,32 +/-0,20 4-A-2-NT: 0,01 +/-0,02 (n=20)
<b>ABC 5</b>	27,09 +/- 15,21	0,72 +/-0,02 / 1,44 +/-0,04	0,03 +/-0,02	5,96	7,73 +/-0,48	2,4,6-TNT: 4,42 4-A-2,6-DNT: 1,34 2-A-4,6-DNT: 1,34 Σ Nitroaromaten: 7,1	2,4,6-TNT: 0,13 +/-0,07 2,6-DNT: 0,19 +/-0,12 (n=16)



<b>Boden</b>	<b>C/N-Verhältnis</b>	<b>Kohlenstoff- / Humusgehalt [%]</b>	<b>Stickstoffgehalt [%]</b>	<b>Potenzielle Acidität [pH]</b>	<b>Reale Acidität [pH]</b>	<b>Kontamination nach Angaben der Sanierer [mg/l]</b>	<b>Mittelwert der Kontaminationen in den wässrigen Extrakten nach HPLC [mg/l]</b>
<b>ABC 6</b>	14,55 +/-0,92	1,01 +/-0,03 / 2,02 +/-0,05	0,07 +/-0,01	6,68	8,22 +/-0,21	2,4,6-TNT: 38,4 4-A-2,6-DNT: 6,73 2-A-4,6-DNT: 8,58 Σ Nitroaromaten: 53,8	2,4,6-TNT: 2,29 +/-1,50 4-A-2,6-DNT: 0,38 +/-0,25 2,6-DNT: 0,28 +/-0,28 (n=18)
<b>DEF</b>	31,56 +/-18,70	0,63 +/-0,01 / 1,27 +/-0,02	0,03 +/-0,02	6,58	8,76 +/-0,36	2,4,6-TNT: 12,9 4-A-2,6-DNT: 2,19 2-A-4,6-DNT: 2,27 Σ Nitroaromaten: 17,7	2,4,6-TNT: 7,18 +/-5,34 4-A-2,6-DNT: 0,19 +/-0,09 4-A-2-NT: 0,09 +/-0,11 2,6-DNT: 0,22 +/-0,18 (n=19)
<b>GHI 1</b>	19,80 +/-0,48	6,51 +/-0,13 / 13,01 +/-0,26	0,33 +/-0,01	3,63	5,37 +/-0,13	2,4,6-TNT: 14,0 4-A-2,6-DNT: 8,3 2-A-4,6-DNT: 17,0 Σ Nitroaromaten: n.b.	2,4,6-TNT: 0,92 +/-0,61 4-A-2,6-DNT: 0,08 +/-0,02 2,6-DNT: 0,12 +/-0,05 4-A-2-NT: 0,02 +/-0,04 (n=19)
<b>GHI 2</b>	17,01 +/-0,27	10,05 +/-0,44 / 20,1 +/-0,88	0,52 +/-0,02	3,37	4,83 +/-0,10	2,4,6-TNT: 854,0 4-A-2,6-DNT: 61,0 2-A-4,6-DNT: 55,0 Σ Nitroaromaten: n.b.	2,4,6-TNT: 67,93 +/-21,88 4-A-2,6-DNT: 2,10 +/-0,46 2,6-DNT: 4,79 +/-1,04 4-A-2-NT: 0,08 +/-0,12 (n=20)

**Tab. 3.9:** Zusammenfassung der Bodenparameter der realkontaminierten Bodenproben, die angegebenen Fehler entsprechen den Standardabweichungen der Messwerte. Bei den Kontaminationen nach Angaben der Sanierer entsprechen die Daten den Konzentrationen, die diese bestimmt haben; die Abkürzung n.b. bei der Summe der nitroaromatischen Verbindungen (Σ Nitroaromaten) steht für „nicht bestimmt“, diese Angaben lagen also von Saniererseite nicht vor. Die Kontaminationen in den eigenen Extrakten mittels HPLC entsprechen den Mittelwerten aller angefertigten Extrakte. Die Angaben der Humusgehalte entsprechen den Berechnungen nach Püttmer (Formel 3.7).

## Applikation des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors auf nitroaromatische Verbindungen

### Ergebnisse

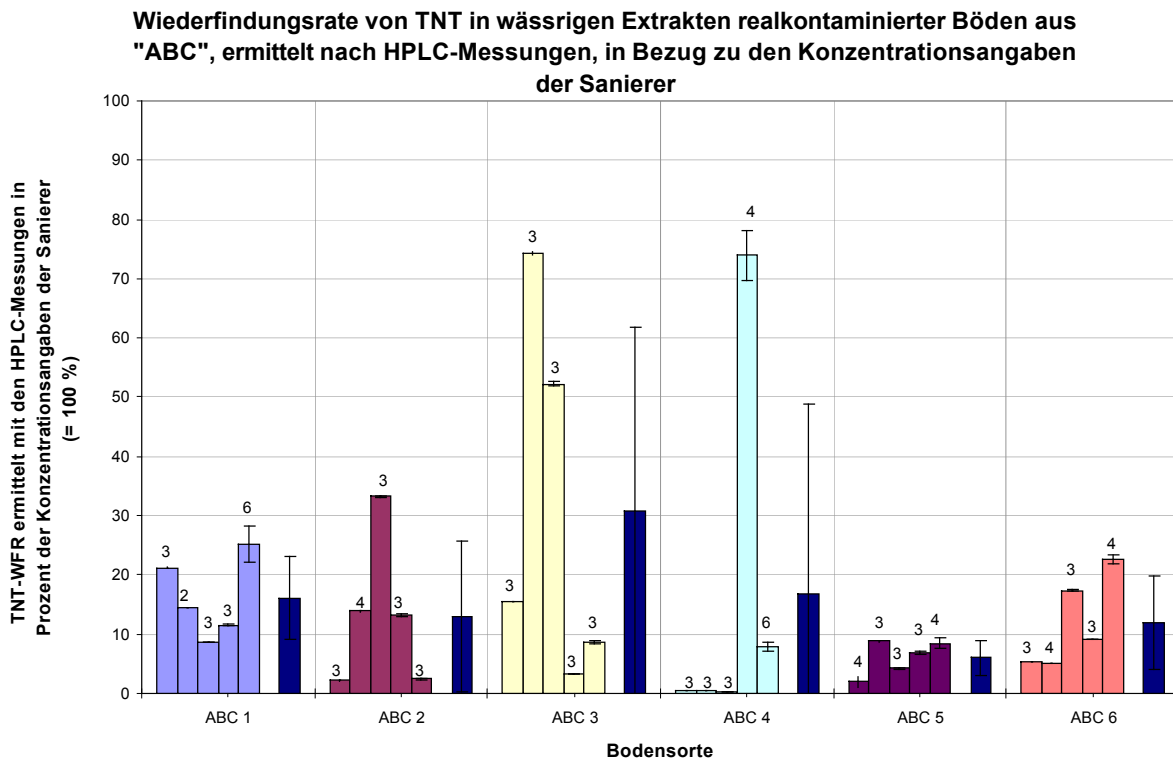
Auffällig in den dargestellten Ergebnissen der HPLC-Messungen der eigenen Extrakte war, dass sich diese innerhalb eines Bodens mitunter erhebliche unterschieden, was in den extremen Standardabweichungen wiedergegeben wird. So wurde für die Extrakte der Probe GHI 1 bei einer mittleren Konzentration von 67,93 mg TNT/l eine Standardabweichung von 21,88 mg TNT/l gemessen, bei den Extrakten der Probe DEF entsprachen sich Konzentration (7,18 mg TNT/l) und Standardabweichung (5,34 mg TNT/l) annähernd und bei Boden ABC 4 überstieg die Standardabweichung mit 35,91 mg TNT/l die ermittelte mittlere Konzentration von 18,59 mg TNT/l.

Um die gemessenen TNT-Konzentrationen, ermittelt mittels HPLC, in wässrigen Extrakten ins Verhältnis mit den Angaben der Kontaminationen der Sanierer setzen zu können, mussten die Konzentrationen in den Extrakten entsprechend umgerechnet werden. Durch Beibehaltung des festen Boden-Wasser-Verhältnisses von 1:2 bei der Extraktion, konnten die TNT-Konzentrationswerte der Extrakte (g/l) durch den Korrelationsfaktor 2 (l/g) in die der Bodenprobe entsprechenden Konzentration an löslichem TNT pro kg Boden umgerechnet werden. Tabelle 3.10 gibt die sich daraus ergebenden Wiederfindungsraten wieder.

<b>Boden</b>	<b>TNT-Konzentration im Boden nach Saniererangaben [mg/kg]</b>	<b>TNT-Konzentration im Extrakt (+/- SD) ermittelt mittels HPLC [mg/l]</b>	<b>Konzentration an löslichem TNT im Boden (+/- SD) ermittelt mittels HPLC [mg/l]</b>	<b>Wiederfindungsrate an löslichem TNT (+/- SD) [%]</b>
<b>ABC 1</b>	73,2	5,91 +/-2,54	11,92 +/-5,07	16,28 +/-6,93
<b>ABC 2</b>	15,6	1,02 +/-0,99	2,03 +/-1,97	13,03 +/-12,65
<b>ABC 3</b>	11,1	1,71 +/-1,72	3,42 +/-3,43	30,79 +/-30,94
<b>ABC 4</b>	223	18,59 +/-35,91	37,19 +/-71,83	16,68 +/-32,21
<b>ABC 5</b>	4,42	0,13 +/-0,07	0,27 +/-0,13	6,06 +/-2,94
<b>ABC 6</b>	38,4	2,29 +/-1,50	4,58 +/-3,00	11,92 +/-7,82
<b>DEF</b>	12,9	7,18 +/-5,34	14,35 +/-10,68	111,24 +/-82,79
<b>GHI 1</b>	14,0	0,92 +/-0,61	1,85 +/-1,21	13,19 +/-8,64
<b>GHI 1</b>	854,0	67,93 +/-21,88	135,86 +/-43,76	15,98 +/-5,15

**Tab. 3.10:** Darstellung der TNT-Konzentrationen in realkontaminierten Böden nach Angaben der Sanierer, der mit HPLC gemessenen TNT-Konzentration in den Extrakten, der sich daraus ergebenden Konzentration an löslichem TNT in den Böden und der Wiederfindungsrate von TNT in den Böden, im Vergleich zu den Gesamtkonzentrationen nach Saniererangaben.

Zur genaueren Darstellung der Extraktionsfähigkeit von TNT aus realkontaminierten Böden mit der angewandten Methodik stellen die Abbildungen 3.16, 3.17 und 3.18 die mit der HPLC ermittelten TNT-Wiederfindungsraten in den getesteten Extrakten, im Vergleich zu den Gesamtkonzentrationen an TNT, in den realkontaminierten Böden laut Sanierer dar. Zur detaillierteren Präsentation der Daten wurde eine Aufgliederung in die Proben der einzelnen Standorte gewählt.



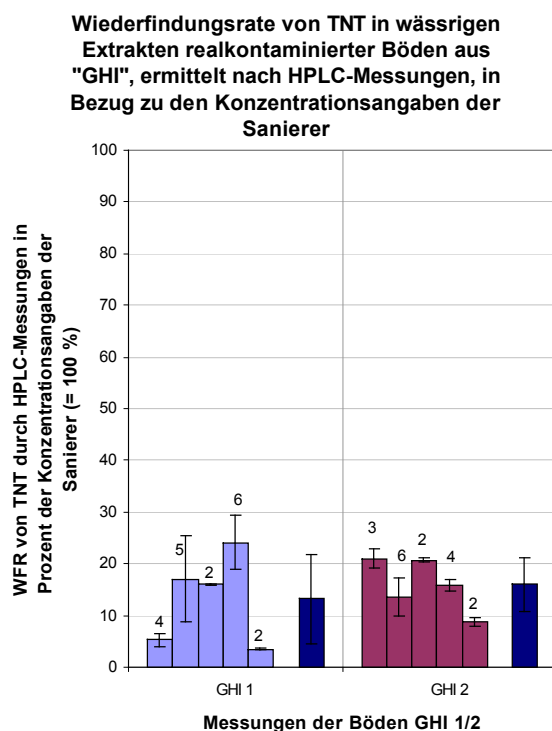
**Abb. 3.16:** Darstellung der Wiederfindungsrate an TNT in den Böden der Rüstungsalast ABC mit der verwendeten Extraktionsmethode, gemessen mittels HPLC gegenüber den Konzentrationsangaben der Sanierer. Die dunkelblauen Säulen geben den Mittelwert der vorherigen Messungen wieder; für die Darstellung gilt n= angegeben über der Säule; Fehlerindikator = +/- Standardabweichung.

Wie für die Böden aus ABC in Abbildung 3.16 gut ersichtlich ist, lag nach der angewendeten Extraktionsmethode die TNT-Wiederfindungsrate in fast allen Böden unterhalb von 20 %. Nur in sieben der insgesamt 30 Extrakte konnten Wiederfindungsraten oberhalb von 20 % gemessen werden, orientiert an den Konzentrationsangaben der Sanierer für die Gesamtkonzentrationen. Im Durchschnitt lagen die Wiederfindungsraten der einzelnen Böden bei 16,28 % (+/-6,93 %) für ABC 1, 13,03 % (+/-12,65 %) für ABC 2, 30,79 % (+/-30,94 %) für ABC 3, 16,68 % (+/-32,21 %) für ABC 4, 6,06 % (+/-2,94 %) für ABC 5 und 11,92 % (+/-7,82 %) für den Boden ABC 6.

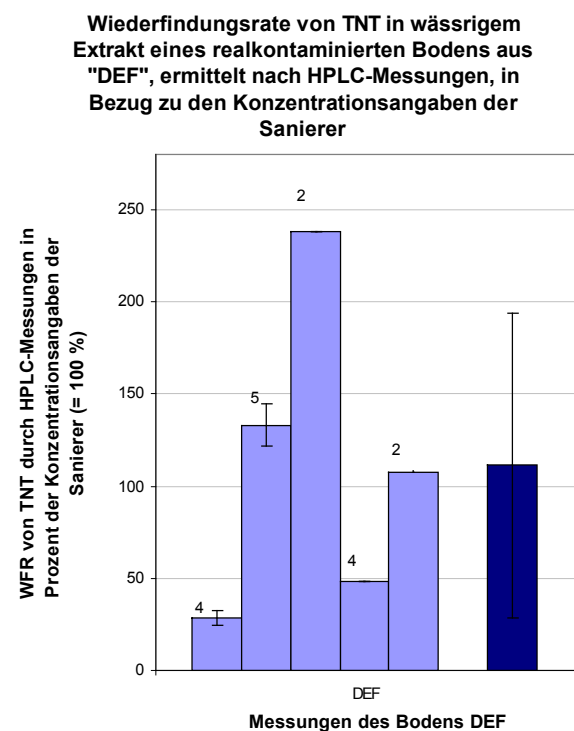
## Applikation des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors auf nitroaromatische Verbindungen Ergebnisse

Ebenso zeigten die Böden aus GHI in ihren Extrakten das gleiche Bild (Abbildung 3.17). Auch hier wurden Wiederfindungsraten, orientiert an den Gesamtkonzentrationsangaben der Sanierer, von weniger als 20 % im Mittel gemessen. Bei GHI 1 lag diese bei 13,19 %  $\pm$  8,64 % SD, bei GHI 2 waren es 15,98 %  $\pm$  5,15 % SD. Aus den Ergebnissen der realkontaminierten Böden fiel allerdings der Boden aus DEF deutlich heraus (Abbildung 3.18). Dieser besaß mit einer mittleren Wiederfindungsrate von 111,24 %  $\pm$  82,79 % die höchste durchschnittliche Wiederfindung aller getesteten realkontaminierten Böden. Die Einzelmessung von 238,25 %  $\pm$  0,14 % stellte sich zwar auf den ersten Blick als ein nicht möglicher Wert dar (Kontamination > 100 %), ist aber durch die Tatsache der starken heterogenen Verteilung von TNT in Böden von Rüstungsaltslasten (Durner, 2002) gut zu erklären.

Eine Unterscheidung der Bodenextrakte anhand ihrer ermittelten TNT-Wiederfindungsraten ließ sich nicht erreichen. Signifikante Unterschiede konnten nur zwischen ABC 1 und ABC 4, sowie zwischen GHI 1 und ABC 4 und 5 ermittelt werden.



**Abb. 3.17:** Darstellung der Wiederfindungsrate an TNT in den Böden der Rüstungsaltslast GHI mit der verwendeten Extraktionsmethode, gemessen mittels HPLC in Bezug zur Konzentrationsangabe der Sanierer. Die dunkelblauen Säulen auf der rechten Seite eines jeden Bodens geben den Mittelwert der vorherigen Messungen wieder; die Zahl oberhalb einer jeden Säule entspricht der Zahl der Messungen nach Korrektur der Daten mittels Ausreißertest nach Nalimov; Fehlerindikator =  $\pm$ -Standardabweichung.

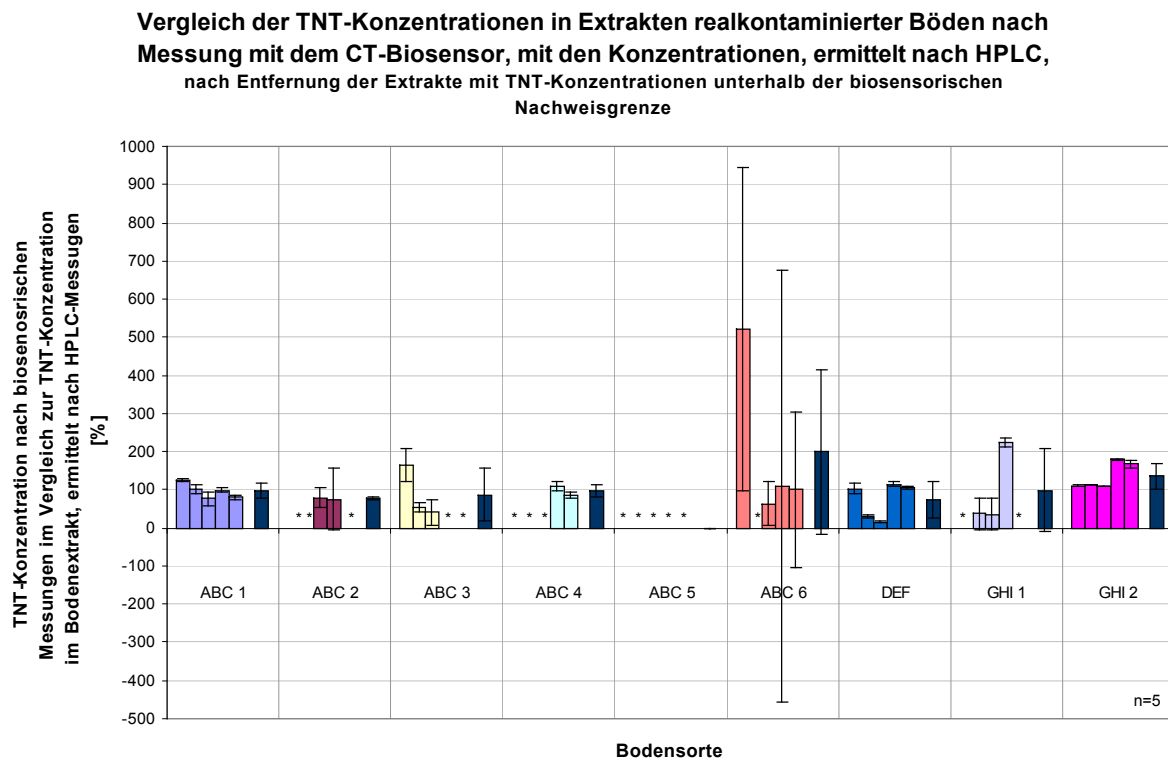


**Abb. 3.18:** Darstellung der Wiederfindungsrate an TNT in den Böden der Rüstungsaltslast DEF mit der verwendeten Extraktionsmethode, gemessen mittels HPLC in Bezug zur Konzentrationsangabe der Sanierer. Die dunkelblaue Säule auf der rechten Seite des Bodens gibt den Mittelwert der vorherigen Messungen wieder; die Zahl oberhalb einer jeden Säule entspricht der Zahl der Messungen nach Korrektur der Daten mittels Ausreißertest nach Nalimov; Fehlerindikator =  $\pm$ -Standardabweichung.

### 3.6.2 Analyse der Böden mittels des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors

Die Ergebnisse der biosensorischen Messungen mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor wichen für die Extrakte der realkontaminierten Proben mitunter stark von denen der HPLC ab. Die Unterschiede zwischen beiden Systemen stellt Abbildung 3.19 in Form eines Vergleichs der mittels CT-Biosensor ermittelten TNT-Konzentrationen in den wässrigen Extrakten, zu denen die mittels HPLC gemessen wurden, dar. Hierbei sind die Bodenextrakte ausgelassen worden, deren TNT-Konzentrationen, nach HPLC-Messungen, unterhalb der biosensorischen Nachweisgrenze lagen.

Bei den getesteten realkontaminierten Böden fielen, im Vergleich von Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor und HPLC, die Extrakte der Proben der ABC 5 und ABC 6 besonders auf. Von den Extrakten der Probe ABC 5 konnten keine biosensorischen Messungen vorgenommen werden, da alle, nach HPLC-Messungen, in ihren TNT-Konzentrationen unterhalb der biosensorischen Nachweisgrenze von 0,65 mg TNT/l lagen. Bei den Extrakten der Probe ABC 6 fiel besonders auf, dass der erste Extrakt im Vergleich zur HPLC eine über 500 % höhere TNT-Konzentration mit dem CT-Biosensor aufzeigte.



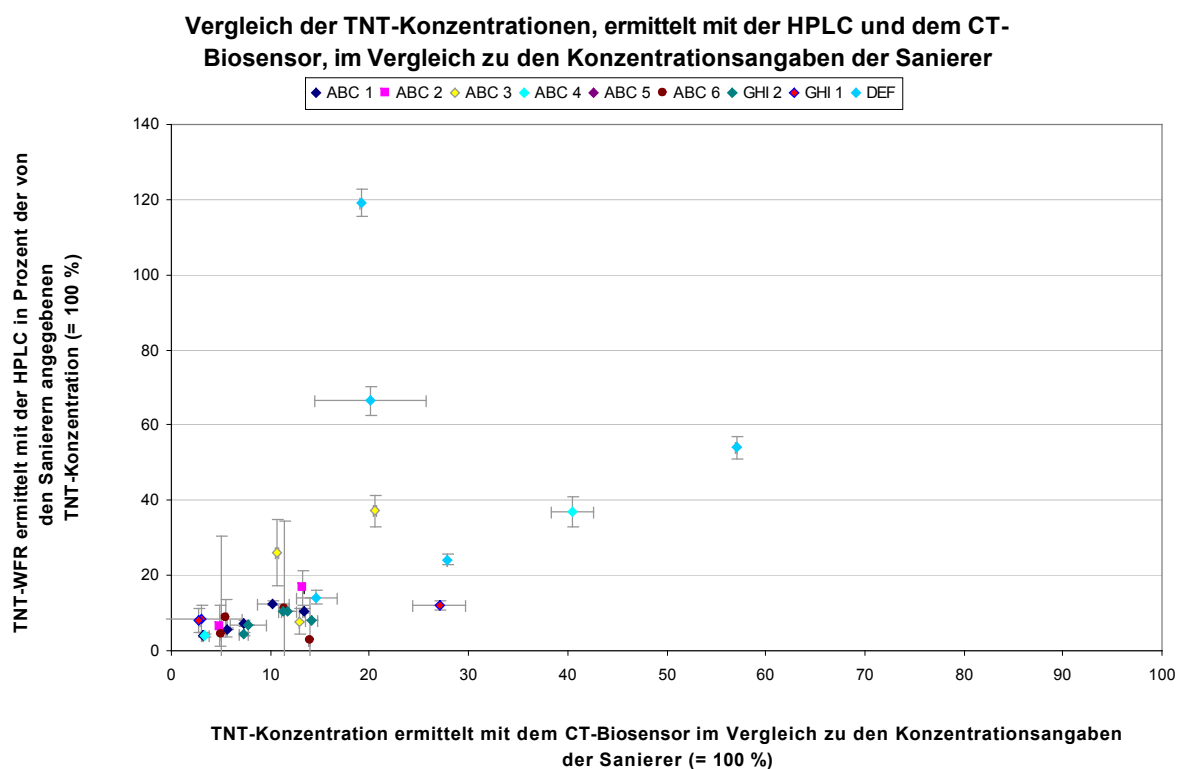
**Abb. 3.19:** Darstellung der TNT-Wiederfindungsraten mittels biosensorischer Messungen mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor in Relation zu den eigenen Messungen der HPLC (= 100 %), „\*“ kennzeichnet nicht mögliche Messungen des CT-Biosensors (TNT-Kontaminationen unterhalb der biosensorischen Nachweisgrenze); es gilt n=5; Fehlerindikator = +/- Standardabweichung.

## Applikation des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors auf nitroaromatische Verbindungen Ergebnisse

Entsprechend der Abbildung 3.19 ließen sich zwischen den Ergebnissen des CT-Biosensors und der HPLC Übereinstimmungen im Bereich von 74,00 % ( $\pm 46,92$  % SD) für die Probe DEF und 136,28 % ( $\pm 34,11$  % SD) für die Probe GHI 2 finden. Da nach den Ergebnissen der HPLC alle Extrakte der Probe ABC 5 unterhalb der biosensorischen Nachweisgrenze lagen, fanden diese Extrakte hier keine Beachtung. Von den betrachteten Extrakten wichen in den Ergebnissen des CT-Biosensors drei weniger als 4 % gegenüber der HPLC ab. Die Probe ABC 6 stellt mit 198,99 % ( $\pm 216,44$  % SD) eine Ausnahme dar, die im Mittel weit über der mit der HPLC gemessenen TNT-Konzentration lag.

Trotz dieser tendenziellen Unterschiede in der Gesamtheit aller Böden konnten im Vergleich der biosensorisch gemessenen TNT-Konzentrationen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Extrakten der verschiedenen Böden nachgewiesen werden.

Auch zwischen den Ergebnissen der HPLC-Messungen und denen der Biosensorik konnten für die jeweiligen Böden im Mittel keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.



**Abb. 3.20:** Gegenüberstellung der TNT-Wiederfindungsraten ermittelt mittels HPLC und Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor, in Prozent der von den Sanierern angegebenen TNT-Konzentrationen (ohne die Extrakte, die nach HPLC-Messungen unterhalb der biosensorischen Nachweisgrenze lagen). Für die Darstellung der HPLC-Messungen gilt  $n=3$ , für die biosensorischen Messungen gilt  $n=5$ ; Fehlerindikator =  $\pm$  Standardabweichung.

Betrachtete man die Gegenüberstellungen der TNT-Konzentrationen, die mittels HPLC und CT-Biosensor im Vergleich zu den Konzentrationsangaben der Sanierer ermittelt wurden, so zeigte sich die in Abbildung 3.20 aufgeführte Verteilung. Aus diesen Ergebnissen (dargestellt in unterschiedlichen Farben für jeden Bodenextrakt) ließen sich keine Einflüsse des

Bodentyps auf die gemessenen TNT-Konzentrationen herleiten. Auch eine Einteilung der einzelnen realkontaminierten Böden war, wie bei den dotierten Proben, nicht möglich. Während bei den Extrakten der dotierten Böden diese anhand der aus ihnen extrahierten TNT-Konzentration im Vergleich zur Dotierung unterschieden werden konnten, waren sich die realkontaminierten Böden in ihren spezifischen Eigenschaften zu ähnlich, um entsprechend ihrer extrahierbaren TNT-Konzentrationen unterschieden werden zu können.

Des Weiteren stellte sich im vorliegenden Vergleich heraus, dass sich zwar die Ergebnisse des CT-Biosensors nicht von denen der HPLC als chemisches Referenz-System unterschieden, sie aber dennoch stärkere innerhalb einer Probe schwankten. Bedingt durch die Feststellung der Gesamtoxizität einer Probe zeigten sich in den biosensorischen Ergebnissen oftmals Überbewertungen gegenüber HPLC-ermittelten TNT-Konzentrationen. Somit lässt sich feststellen, dass sich die HPLC besser dazu eignet, eine Probe bezüglich der einzelnen in ihr enthaltenen Konzentrationen zu bewerten, der Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor besitzt allerdings die Möglichkeit eines schnellen „Screenings“ zur Ermittlung der Gesamtoxizität einer Probe.

### **3.6.3 Beeinflussung der Wiederfindungsrate durch die Bodenmatrix in den realkontaminierten Böden**

Um den Einfluss der Bodenmatrix auf die TNT-Wiederfindungsrate zu ermitteln, wurden in den folgenden Punkten die TNT-Wiederfindungsraten, nach HPLC, mit den Kohlenstoff-/Humus- und Stickstoffgehalten sowie dem realen und potenziellen pH-Wert der Böden in Verbindung gebracht.

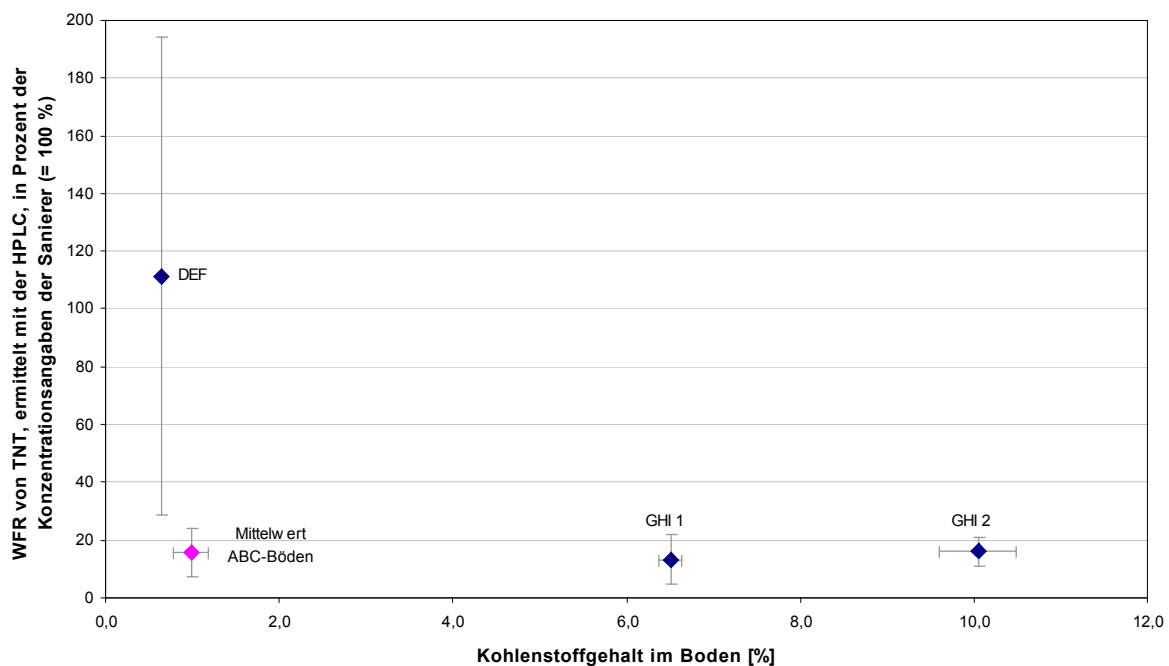
Hierbei war festzustellen, dass diese Vergleiche bei den realkontaminierten Böden nicht so gut miteinander in eine Beziehung gebracht werden konnten, wie bei den dotierten Böden.

#### **3.6.3.1 Wirkung des Kohlenstoffgehalts auf die Wiederfindungsrate von TNT aus realkontaminierten Böden**

Um den Einfluss der Bodenmatrix in den realkontaminierten Proben besser heraus zu stellen, wurden die Ergebnisse der Proben aus ABC, bedingt durch ihre gleiche Pedogenese, sowohl in der TNT-Wiederfindungsrate nach HPLC (7,67 % WFR +/-4,14 % SD), im Vergleich zu den Sanierer-Angaben, sowie die Kohlenstoffgehalte (0,98 % C +/-0,20 % SD) zu einem Mittelwert zusammengefasst. Abbildung 3.21 stellt die TNT-Wiederfindungsrate, ermittelt mit der HPLC, in Bezug auf die Konzentrationsangaben der Sanierer, in Gegenüberstellung zu den Kohlenstoffgehalten der realkontaminierten Proben graphisch dar.

Die Bodenprobe mit dem geringsten Kohlenstoff-/Humusgehalt (DEF mit 0,63 % +/-0,01 % SD an Kohlenstoff) besaß die höchste Wiederfindungsrate (111,24 % +/-82,79 % SD). Gegengleich dazu konnten in den beiden Böden mit dem höchsten Gehalt an Kohlenstoff (GHI 1 mit 6,51 % +/-0,13 % SD und GHI 2 mit 10,05 % +/-0,44 % SD Kohlenstoffgehalt) recht geringe Wiederfindungsraten (GHI 1: 13,19 % +/-8,64 % SD; GHI 2: 15,98 % +/-5,15 % SD), aber nicht die geringsten, nachgewiesen werden. Die geringsten Wiederfindungsraten wurden im Gegensatz dazu, bei der Probe ABC 5 detektiert (6,06 % +/-2,94 % SD an TNT-Wiederfindungsrate), welche mit einem Kohlenstoffgehalt von 0,72 % (+/-0,02 % SD) nur einen gering höheren Kohlenstoffgehalt aufwies, als die Probe DEF mit der höchsten Wiederfindungsrate. (In Abbildung 3.21 sind die Böden der ABC zu einem Mittelwert zusammengefasst, wodurch die Probe ABC 5 in dieser Abbildung nicht separat dargestellt ist, die Aussage des Mittelwertes entspricht aber der oben aufgeführten Aussage).

**Vergleich der TNT-Wiederfindungsrate mit dem Kohlenstoffgehalt in realkontaminierten Böden**



**Abb. 3.21:** Gegenüberstellung der TNT-Wiederfindungsrate in realkontaminierten Böden zum Kohlenstoffgehalt der Böden. Dargestellt sind die mittleren TNT-Wiederfindungsraten/Kohlenstoffgehalte über alle Messungen eines Bodens. Bei den Kohlenstoffgehalten beträgt die Zahl der Wiederholungen für DEF und GHI (1/2) n=4, für Mittelwert-ABC-Böden n=24; für die Wiederfindungsraten gelten für DEF n=16, GHI 2 n=17, GHI 1 n=19, Mittelwert-ABC-Böden n=98; Fehlerindikator = +/- Standardabweichung.

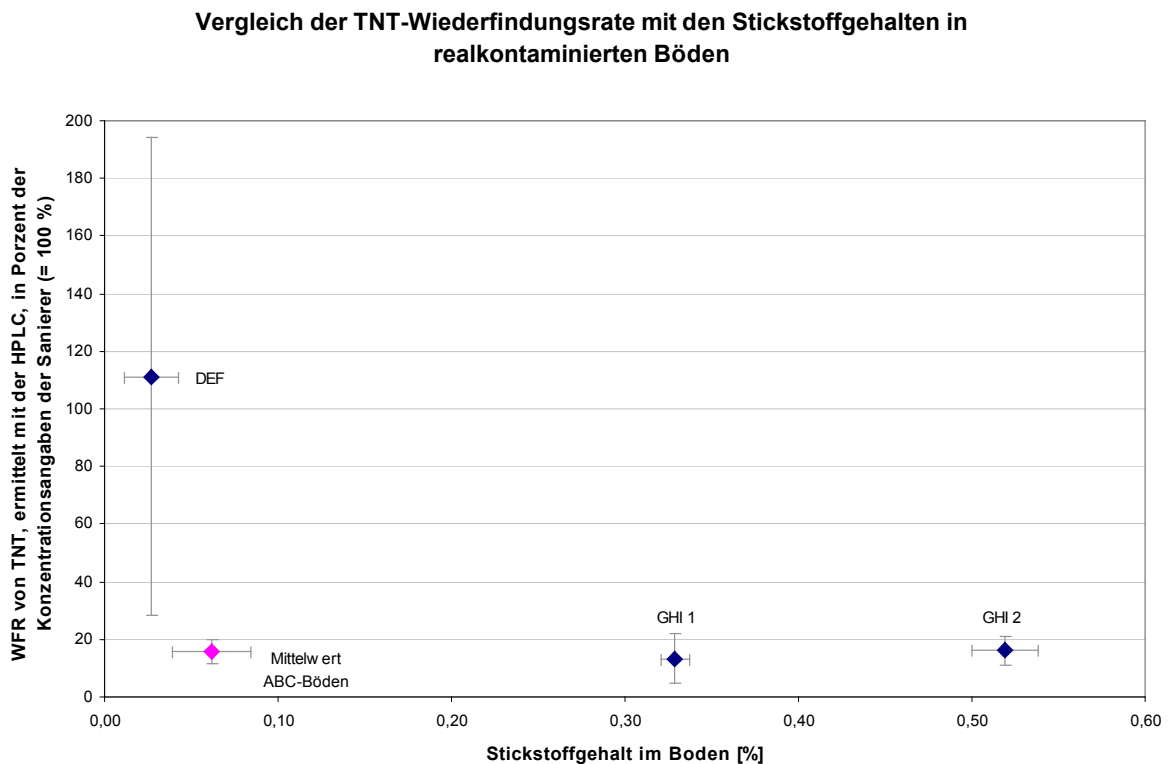
Trotzdem zeigte sich, dass bei Betrachtung unterschiedlicher Bodentypen, auch in den realkontaminierten Böden, zumindest tendenziell eine Beziehung zwischen TNT-Wiederfindungsrate und Kohlenstoffgehalt, ähnlich der bei den dotierten Böden, gefunden werden konnte, auch wenn diese nicht so ausgeprägt war.



Bei einem Vergleich der Kohlenstoffgehalte der verschiedenen, realkontaminierten Böden ließen sich diese nahezu durchgehend hochsignifikant voneinander unterscheiden. Besonders die Böden aus GHI wiesen Testwerte auf, die die Grenzwerte zum Erreichen des Signifikanzniveaus um ein Vielfaches überragten.

### 3.6.3.2 Wirkung des Stickstoffgehaltes auf die Wiederfindungsrate von TNT aus realkontaminierten Böden

Durch Zusammenfassung der Messwerte des Rüstungsalblaststandortes ABC zu einem gemeinsamen Mittelwert des Stickstoffgehalts (0,06 % N +/-0,02 % SD) (s. Abschnitt 3.6.3.1) ließ sich auch beim Vergleich der Stickstoffgehalte zur TNT-Wiederfindungsrate eine Beziehung feststellen, in der die Wiederfindungsrate von „geringen“ zu „hohen“ Stickstoffgehalten sank. So konnte wiederum bei der Bodenprobe der DEF mit dem geringsten Gehalt an Stickstoff (0,03 % +/-0,02 % SD) die höchste TNT-Wiederfindungsrate ermittelt werden.



**Abb. 3.22:** Darstellung des Vergleiches der TNT-Wiederfindungsrate in realkontaminierten Böden zum Stickstoffgehalt der Böden. Dargestellt sind die mittleren TNT-Wiederfindungsraten/Stickstoffgehalte über alle Messungen eines Bodens. Bei den Stickstoffgehalten beträgt die Zahl der Wiederholungen für DEF und GHI (1/2) n=4, für Mittelwert-ABC-Böden n=24; für die Wiederfindungsraten gelten für DEF n=16, GHI 1 n=17, GHI 2 n=19, Mittelwert ABC-Böden n=98; Fehlerindikator = +/- Standardabweichung.

Auf der anderen Seite zeigten die Böden aus GHI mit den höchsten Stickstoffgehalten von 0,33 % +/-0,01 % SD bei GHI 1 und mit 0,52 % +/-0,02 % SD bei GHI 2 die geringsten Wiederfindungsraten an TNT, wie sie schon bei der Betrachtung des Kohlenstoffgehaltes zu finden waren.

Im Vergleich der Stickstoffgehalte konnten unter den Böden der Rüstungsalzlast ABC nur vereinzelt Signifikanzen ermittelt werden. Diese Gleichheit der ABC-Proben beruht wiederum auf die gemeinsame Pedogenese. Die Böden aus GHI hingegen unterschieden sich durch hochsignifikant höhere Stickstoffgehalte von allen anderen Bodenproben.

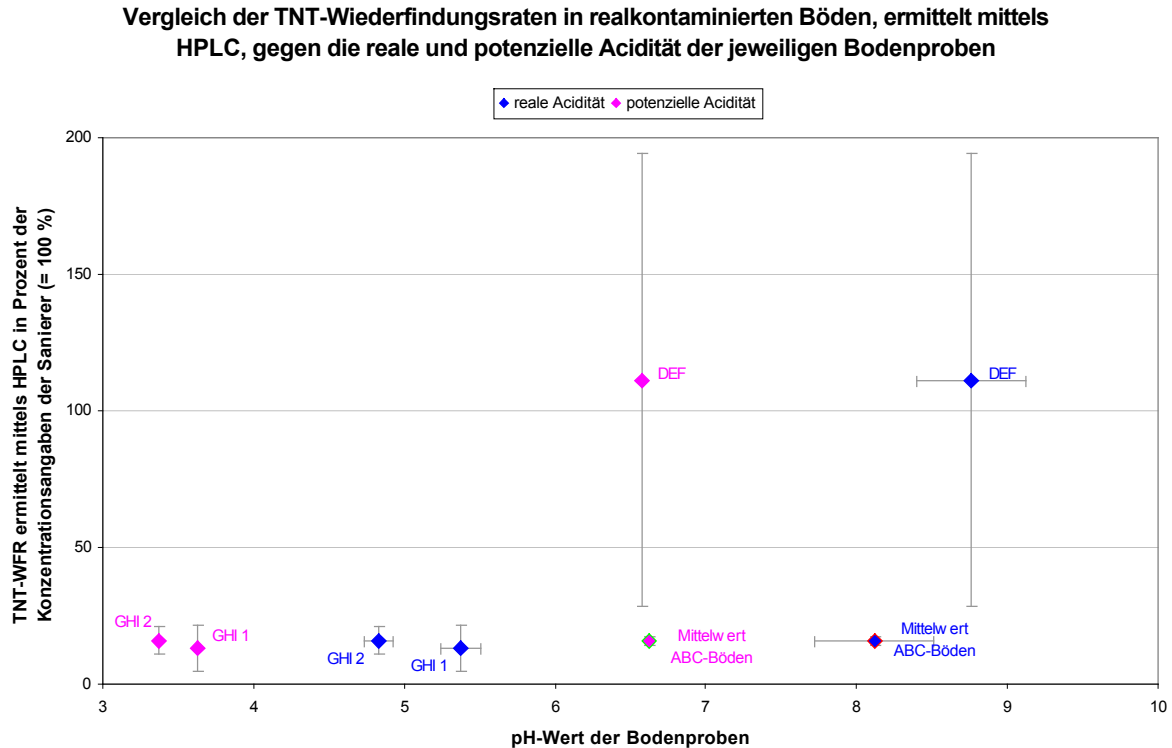
### **3.6.3.3 Einfluss des Kohlenstoff/Stickstoffverhältnisses auf die Wiederfindungsrate von TNT aus realkontaminierten Böden**

Bei der Betrachtung der C/N-Verhältnisse ließen sich im Vergleich zu den TNT-Wiederfindungsraten in den realkontaminierten Böden in der Gesamtbetrachtung aller Proben keine Beziehung zwischen diesen Parametern herausstellen (graphisch hier nicht dargestellt). Auch durch Zusammenfassung der Messungen gleicher Pedogenese, also der Proben aus ABC, waren kaum Verbesserungen in der Abhängigkeit beider Parameter nachzuweisen.

### **3.6.3.4 Wirkung der realen und potenziellen pH-Werte auf die Wiederfindungsrate von TNT aus realkontaminierten Böden**

Setzte man in den Untersuchungen der realkontaminierten Böden die pH-Werte der Extrakte, wobei die Werte der Proben aus ABC wiederum zusammengefasst wurden, mit den Mittelwerten der chromatographischen Messungen mittels HPLC in Beziehung zueinander, so konnten auch hier keine Abhängigkeit der Werte voneinander festgestellt werden (s. Abschnitt 3.2.3).

Die Böden aus GHI besaßen sowohl bei den realen pH-Werten in Wasser, wie auch bei den potenziellen pH-Werten in CaCl<sub>2</sub>, die geringsten Wiederfindungsraten, während andererseits die Probe DEF zwar die höchste Wiederfindungsrate aufwies, sich aber von ihren pH-Werten nicht von dem Mittelwert der Böden aus ABC (ABC1-6) unterscheiden ließ. Diese wiederum unterschieden sich in den Wiederfindungsraten nicht von den Proben GHI 1/2, wie Abbildung 3.23 verdeutlicht.



**Abb. 3.23:** Darstellung des Vergleiches der TNT-Wiederfindungsrate in realkontaminierten Böden, ermittelt mit der HPLC in Gegenüberstellung der realen und potenziellen Acidität der Böden. Dargestellt sind die Mittelwerte der aufgenommenen Ergebnisse +/- der Standardabweichung in Form der Fehlerbalken, in den potenziellen pH-Werten gilt n=1, in den realen n=5, für den Mittelwert ABC-Böden gilt abweichend beim potenziellen pH n=6, beim realen pH n=30, für die Wiederfindungsraten gelten entsprechend der durchgeführten HPLC-Messungen für DEF n=16, GHI 1 n=17, GHI 1 n=19, Mittelwert ABC-Böden n=98; Fehlerindikator = +/- Standardabweichung.

### 3.7 Untersuchung der Böden mittels einer biosensorischen Referenz-Methode: Oberflächen-Plasmon-Resonanz

Neben den Messungen mit der HPLC, die als chemische Referenz-Methode des getesteten Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors verwendet wurden, wurde die Oberflächen-Plasmon-Resonanz (Surface-Plasmon-Resonance = SPR)-Methodik in dieser Arbeit als biosensorisches Referenz-Verfahren ausgewählt. Dies sollte den direkten Vergleich von zwei verschiedenen biosensorischen Methoden zum Nachweis von TNT ermöglichen. Zum Nachweis wurde ein Anti-TNT-Antikörper-TNT-Inhibierungsassay verwendet. Dazu wurde an BSA gebundenes Trinitrobenzol (TNB), ein TNT-Analogon, an eine CM5-Chipoberfläche gekoppelt, um damit TNT über eine verminderte Bindung eines mit TNT inhibierten Anti-TNT-Antikörpers nachweisen zu können.

#### 3.7.1 Erstellung einer TNT-Eichkurve

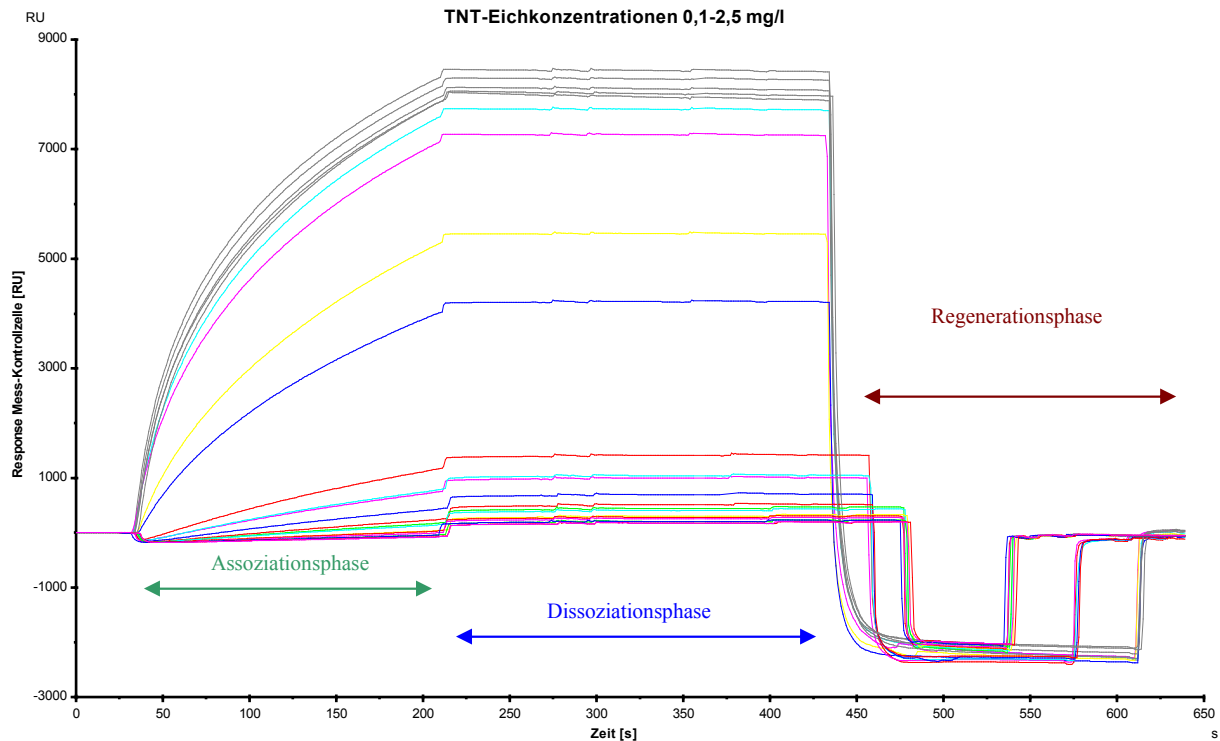
Das für diese Messungen an der Chip-Oberfläche benötigte TNB-BSA wurde mit einer Bindungsrate von ca. 10.000 RU immobilisiert. Auf einer Kontrollflusszelle wurde reines

## Applikation des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors auf nitroaromatische Verbindungen Ergebnisse

BSA als reale Kontrolle in einer ähnlichen Höhe, von ca. 11.000 RU an die Chipoberfläche gekoppelt, um damit unspezifische Bindungen festzustellen und um als Referenz-Flusszelle dienen zu können, die von der Messzelle abgezogen werden konnte. Über die genaue Festlegung der Bindungsraten des Liganden auf allen Flusszellen sollte eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse erreicht werden. Die Verwendung von reinem BSA als Vergleichsprotein auf der Referenz-Flusszelle sollte die gleichen Bedingungen wie auf den Messzellen schaffen.

Da in den vorliegenden Messungen das TNT in den Proben indirekt nachgewiesen wurde, also durch verminderte Anbindung des TNT-Antikörpers an das am Chip immobilisierte TNB-BSA durch vorherige Bindung an freies TNT in der Probe, erfolgte bei der Messung eine Abnahme der Bindungsrate im Vergleich zu einer unbelasteten Kontrolle. Entsprechend verringerten sich die Bindungswerte des TNT-Antikörpers bei einer Erhöhung der TNT-Konzentration in der Probe.

Die Messungen der TNT-Eichkonzentrationen (0,1–2,5 mg TNT/l) sind in der Abbildung 3.24 wiedergegeben. Die dargestellten Kurven zeigen die Resonanz-Differenz zwischen Mess-Flusszelle, gekoppelt mit TNB-BSA, und der Kontroll-Flusszelle, gekoppelt mit einfachem BSA, zum Zeitpunkt der TNT-Antikörper-Bindung an das TNB-BSA [RU].



**Abb. 3.24:** Darstellung der Resonanz-Änderung durch Bindung des TNT-Antikörpers an das an die Chip-Oberfläche gebundene TNB-BSA im Vergleich zur Kontroll-Flusszelle (mit BSA an die Chip-Oberfläche gekoppelt). Die grauen Kurven stellen die Kontroll-Messungen ohne TNT (= maximale Bindung) dar, die farbigen Kurven stellen die Messungen der unterschiedlichen TNT-Konzentrationen dar.

Die grauen Kurven entsprechen den Messungen von TNT-freien Kontrollen, die farbigen Kurven stellen die Bindungsabnahmen des TNT-Antikörpers durch steigende TNT-Eichkonzentrationen in der Lösung dar. Dargestellt sind die Assoziationsphase (Bindung des TNT-Antikörpers an das immobilisierte TNB-BSA), die Dissoziationsphase sowie die Regeneration. Die Regeneration erfolgte mit 0,1 M NaOH + 0,1 % Triton X-100. Über ein durchgeführtes „Regeneration-Scouting“ konnte gezeigt werden, dass die mit TNB-BSA immobilisierten Chipoberflächen ohne Bindungsverluste mit 0,1 M NaOH + 0,1 % Triton X-100 regeneriert werden konnten.

Konz. [mg/l]	Bindungs- abnahme [RU]	Konz. [mg/l]	Bindungs- abnahme [RU]	Konz. [mg/l]	Bindungs- abnahme [RU]
0,1	-715,83	0,7	-7.121,45	1,6	-7.789,37
0,2	-1.104,03	0,8	-7.436,85	1,8	-7.597,26
0,3	-2.923,56	0,9	-7.624,76	2,0	-7.640,90
0,4	-4.097,34	1,0	-7.657,54	2,2	-7.422,54
0,5	-6.836,09	1,2	-7.679,58	2,4	-7.392,32
0,6	-7.249,13	1,4	-7.784,21	2,5	-7.393,49

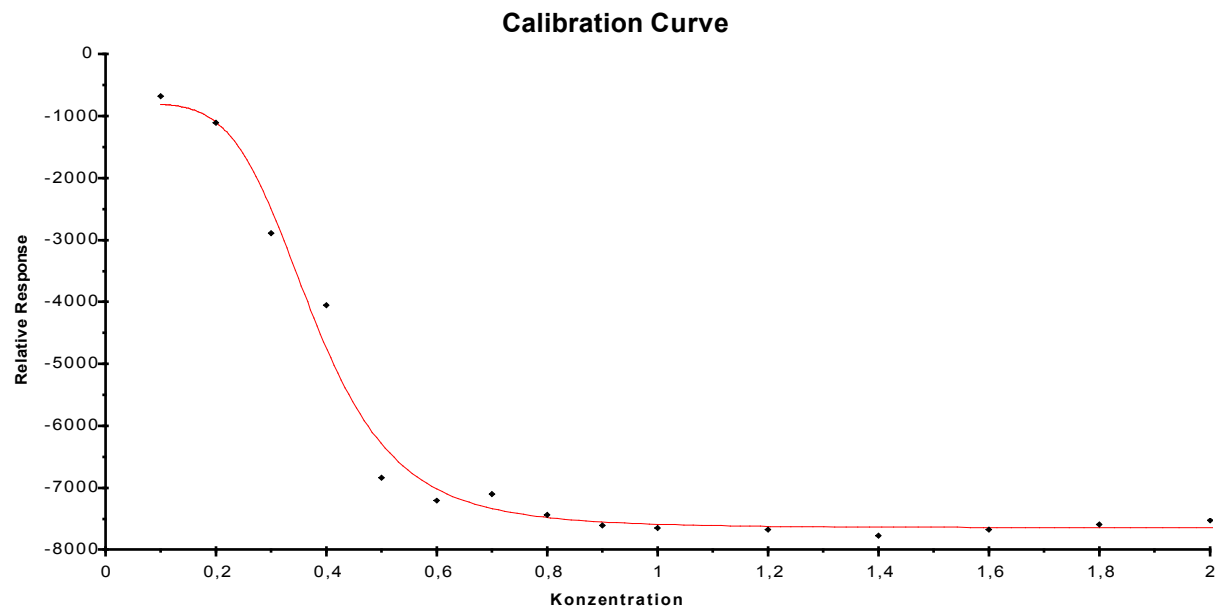
**Tab. 3.11:** Darstellung der Bindungsabnahmen von TNT-Antikörpern an der Oberfläche eines mit TNB-BSA gekoppelten SPR-Chips abzüglich der Referenz-Flusszelle. Bindungsabnahme [RU] gibt die Verringerung der Antikörperbindung an die Chipoberfläche in Resonance Units (RU) wieder.

Tabelle 3.11 gibt die gemessenen Minderungen der Bindungsraten in „Resonance Units“ (RU), abzüglich der Referenz-Flusszelle wieder.

Aus den in Tabelle 3.11 dargestellten Werten konnte mit Hilfe der BIAevaluation Software eine Eichkurve bis 2.0 mg TNT/l erstellt werden (Abbildung 3.25). Die Berechnung der Eichkurve erfolgte über 4-Parameter-Berechnung entsprechend der Formel 3.9.

<b>Response = <math>R_{hi} - (R_{hi} - R_{i0}) / (1 + (\text{conc} / A_1)^{A_2})</math></b>	<b>Formel 3.9</b>
Mit $R_{hi}$ = Response bei unendlicher Konzentration (hier $R_{hi} = 7.645$ ); $R_{i0}$ = Response bei Null-Konzentration (hier $R_{i0} = 797$ ); conc = Konzentration des Analyten; $A_1/A_2$ Fitting-Konstanten (hier $A_1 = 0,3761$ ; $A_2 = 4,91$ )	

Über diese Eichkurve konnten später die TNT-Gehalte in den Bodenextrakten mittels SPR-Messungen bestimmt werden.



**Abb. 3.25:** Darstellung der TNT-Eichkurve für die TNT-Messungen mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz, anhand der Bindungsabnahme eines TNT-Antikörpers an auf der Chip-Oberfläche immobilisiertes TNB-BSA, im Bereich von 0,1-2,0 mg TNT /l erstellt durch die BIAevaluation Software.

### 3.7.2 Messung von TNT-kontaminierten Böden mittels SPR

#### 3.7.2.1 SPR-Messungen der artifiziellen Bodenproben

Die Messung der dotierten Bodenproben sowie der undotierten Böden als Kontrolle entsprachen nach Umrechnung der Bindungsabnahme in die TNT-Konzentration über die Eichkurve den in Tabelle 3.12 aufgeführten Werten. Zur Messung der Proben in einem mit dem SPR-Mess-System kompatiblen Puffer und um im Messbereich der Eichkurve zu liegen, mussten die Proben verdünnt werden. Daher mussten die gemessenen Werte an TNT in die Konzentrationen der ursprünglichen Proben zurückgerechnet werden. Bei den dotierten/undotierten Böden fand dabei der Verdünnungsfaktor 20 Anwendung, um die die Originalproben zur Messung auf der Chipoberfläche verdünnt werden mussten.

Aus Tabelle 3.12 geht hervor, dass auch die undotierten Böden Bindungsabnahmen des TNT-Antikörpers an die Chip-Oberfläche bewirkten, die die Effekte der Bodenmatrix auf das verwendete SPR-System wiedergeben. Diese Aussage wird dadurch unterstützt, dass in den jeweiligen undotierten Böden mittels HPLC auch keine nitroaromatischen Verbindungen festgestellt werden konnten.

Durch Abzug der Bindungsabnahmen der undotierten Böden von denen der dotierten Böden, ließ sich die alleinige Wirkung des TNTs auf das Antikörper-Bindungs-System in der SPR-Messung herausstellen.

Undotierter Boden	Bindungsabnahme undotierter Boden [RU]	Dotierter Boden	Bindungsabnahme dotierter Boden [RU]	Bindungsabnahme dot. Boden abzüglich undot. Boden [RU]	TNT-Konzentration im gemessenen Extrakt (verdünnt) [mg TNT/l]	TNT-Konzentration im ursprünglichen Bodenextrakt [mg/l]
Waldboden	-677,89	Waldboden +	-7.364,70	-6.686,81	0,544	10,88
Grünlandboden	-566,82	Grünlandboden +	-7.226,48	-6.659,66	0,541	10,82
Sandboden	-632,04	Sandboden +	-7.291,93	6.659,89	0,541	10,82
Ackerboden	-945,30	Ackerboden +	-6.930,15	5.984,85	0,474	9,48
Humusboden	-807,21	Humusboden +	-6.651,15	5.843,94	0,464	9,28

**Tab. 3.12:** Darstellung der durch die SPR-Messungen ermittelten Bindungsabnahmen des TNT-Antikörpers an immobilisiertes TNB-BSA durch die getesteten Extrakte undotierter und dotierter Böden; dazu die sich aus der Eichkurve ergebenden Konzentrationen an TNT, in der verdünnten Probe für die Messungen im Biacore (blau) und dem unverdünnten ursprünglichen Bodenextrakt. Die mit „+“ gekennzeichneten Proben entsprechen den mit TNT-dotierten Böden.

Die in Tabelle 3.12 dargestellten Werte entsprechen den Messungen auf einer Flusszelle. Durch die Doppelbestimmung der Böden auf zwei verschiedenen Messflusszellen, abzüglich der Referenz-Zellen des gleichen SPR-Chips wurden für die dotierten Böden, abzüglich der Kontrollmessungen mit undotierten Böden, die in Tabelle 3.13 dargestellten Konzentrationen an TNT berechnet. Damit konnte die Messungen von TNT in den Extrakten dotierter Böden mit diesem System selbst bei Messungen auf zwei verschiedenen mit TNB-BSA immobilisierten Flusszellen reproduziert werden.

Dotierter Boden	TNT-Konzentration im Extrakt [mg TNT/l]	Standardabweichung [mg TNT/l]
Waldboden	10,25	0,85
Grünlandboden	10,24	0,82
Sandboden	10,16	0,94
Ackerboden	9,14	0,48
Humusboden	8,91	0,52

**Tab. 3.13:** Darstellung der TNT-Konzentrationen in dotierten Böden, nachgewiesen mittels SPR nach Abzug der Effekte durch die Bodenmatrix (gemessen in den undotierten Böden). Die Werte stellen den Mittelwert aus zwei Messreihen unterschiedlicher Fluss-Systeme des gleichen SPR-Chips dar.

### 3.7.2.2 SPR-Messungen der realkontaminierten Bodenproben

Bei der Betrachtung der realkontaminierten Böden ließen sich die in Tabelle 3.14 dargestellten TNT-Konzentrationen mittels der TNT-Antikörper SPR-Messung nachweisen. Wie schon in Kapitel 3.7.2.1 mussten auch die realkontaminierten Böden zur Messung mit

dem SPR-System verdünnt werden. Um die ursprünglichen TNT-Konzentrationen in den Originalproben zu erhalten, musste der Verdünnungsfaktor zurückgerechnet werden. Um die Bodenextrakte im Messbereich der eingestellten Eichkurve messen zu können, mussten diese unterschiedlich stark verdünnt werden, die Verdünnungsfaktoren der jeweiligen Probe sind der Tabelle 2.12 zu entnehmen. Hierbei ist die Verdünnung durch den Reaktionsansatz mit dem Antikörper zu berücksichtigen, wobei eine Verdünnung um den Faktor 1,22 stattgefunden hat (82 µl verdünnte Probe +18 µl Antikörper auf 100 µl Gesamt-Reaktionsansatz) was die unüblichen Verdünnungswerte verursachte.

Boden	TNT-Konzentration der verdünnten Probe im Biacore [mg/l] (+/- SD)	TNT-Konzentration im ursprünglichen Bodenextrakt [mg/l] (+/- SD)	Boden	TNT-Konzentration der verdünnten Probe im Biacore [mg/l] (+/- SD)	TNT-Konzentration im ursprünglichen Bodenextrakt [mg/l] (+/- SD)
ABC 1	0,476 (+/-0,107)	6,96 (+/-0,26)	ABC 6	0,478 (+/-0,033)	2,33 (+/-0,16)
ABC 2	1,611 (+/-1,624)	3,393 (+/-3,96)	DEF	0,556 (+/-0,129)	2,71 (+/-0,63)
ABC 3	0,334 (+/-0,166)	1,63 (+/-0,81)	GHI 1	0,431 (+/-0,098)	1,05 (+/-0,24)
ABC 4	0,304 (+/-0,230)	4,45 (+/-3,36)	GHI 2	0,461 (+/-0,014)	44,98 (+/-1,38)

**Tab. 3.14:** Darstellung der durch die SPR-Messungen ermittelten Bindungsabnahmen, +/- Standardabweichung an TNT-Antikörpern durch die getesteten Extrakte realkontaminierter Böden sowie der sich über die TNT-Eichkurve ergebenden Konzentrationen an TNT in der Messkammer und in der Probe (in Klammern), n=2.

### 3.7.3 Vergleich der Ergebnisse der SPR mit den Aussagen der HPLC

Um die Aussagen der TNT-Messungen mittels SPR-Methodik im Kontext zu bewerten, wurden die mittels des SPR-TNT-Antikörper-Systems ermittelten TNT-Konzentrationen in den Bodenextrakten mit denen der HPLC verglichen.

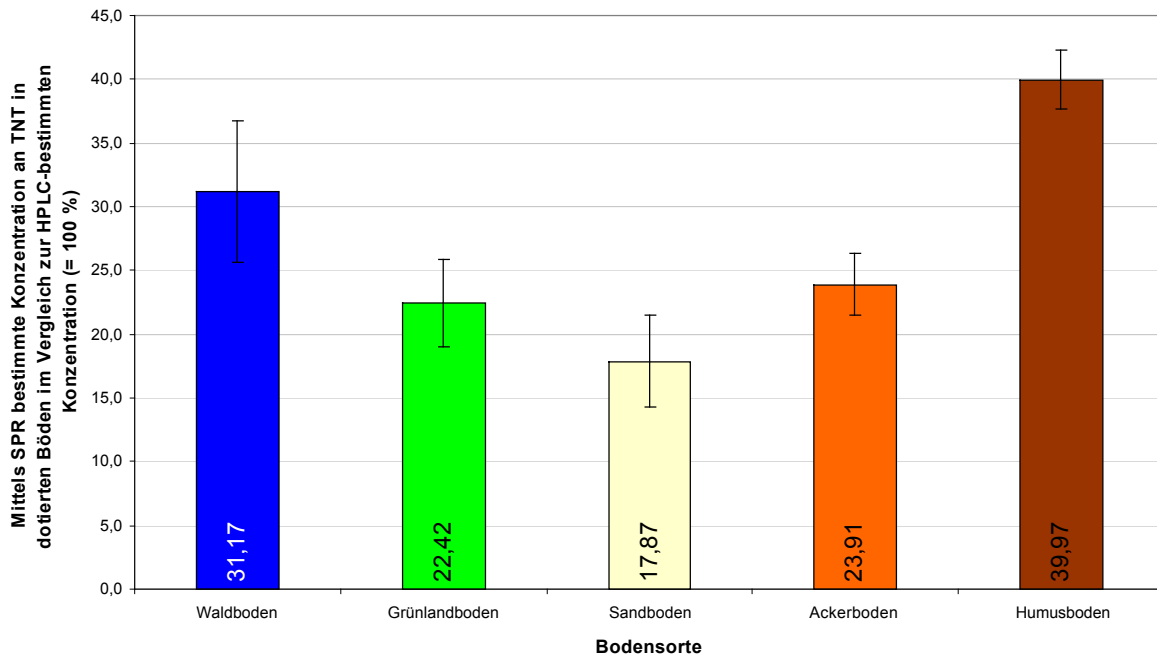
#### 3.7.3.1 Dotierte Böden

Aus dem Vergleich der Ergebnisse der SPR mit den nach HPLC detektierten Konzentrationen ergaben sich die in Abbildung 3.26 dargestellten Verhältnisse für die dotierten Böden. Für keine der getesteten Bodenarten konnten, im Vergleich zu den HPLC-Messungen, TNT-Konzentrationen von über 50 % mittels SPR nachgewiesen werden. Im Vergleich steigerte sich die über SPR-Messungen detektierte Konzentration an TNT, im Vergleich zu den HPLC-Messungen vom Sandboden mit 17,87 % (+/-3,58 % SD) über den Grünlandboden mit 22,42 % (+/-3,43 % SD), den Ackerboden mit 23,91 % (+/-2,46 % SD), den Waldboden mit 31,17 % (+/-5,53 % SD) bis zum Humusboden mit 39,97 % (+/-2,34 % SD).

Weiter unterschieden sich die Ergebnisse der SPR-Messungen bei allen Bodensorten hochsignifikant von denen der HPLC.



**Darstellung der mit SPR-Technik bestimmten TNT-Konzentration im Vergleich zu den TNT-Konzentrationen, ermittelt mit der HPLC, in TNT-dotierten Bodenproben**

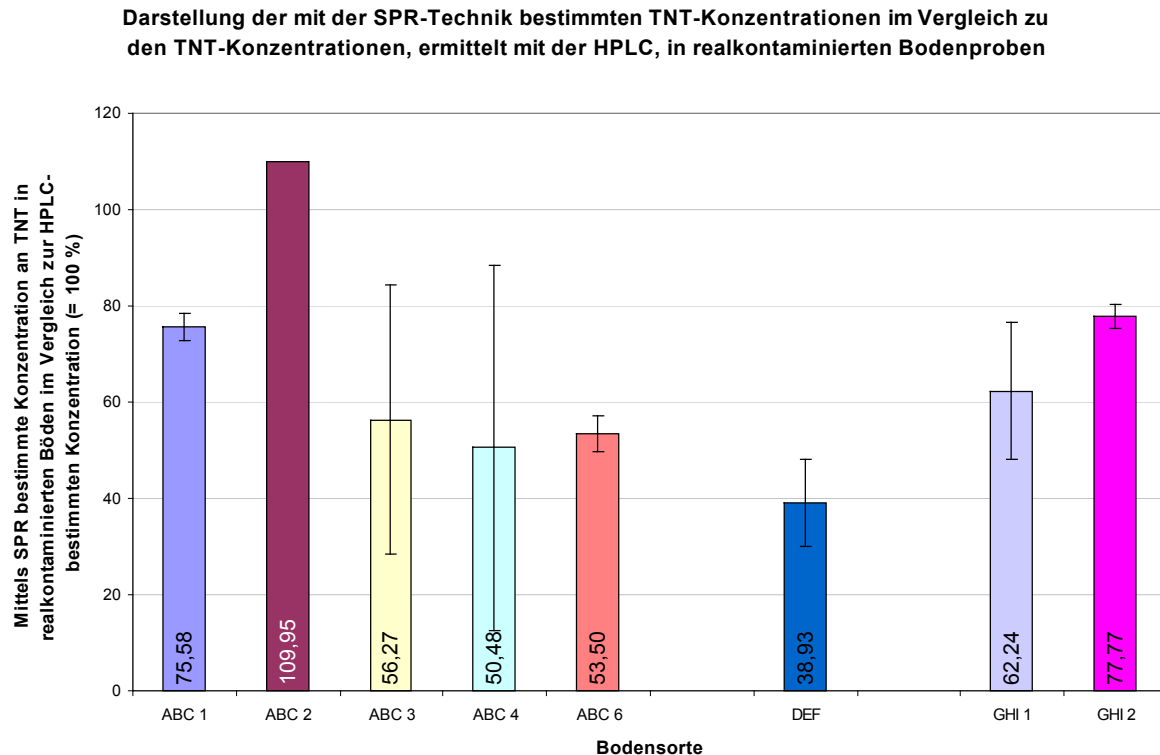


**Abb. 3.26:** Darstellung der mittels Antikörper-Assay und Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technik detektierten TNT-Konzentration in Extrakten dotierter Böden im Vergleich zu der durch HPLC ermittelten Konzentration. Es gilt  $n=2$ ; Fehlerindikator = +/- Standardabweichung.

### 3.7.3.2 Realkontaminierte Böden

Betrachtete man die mittels SPR-Messungen gefundenen TNT-Konzentrationen in den realkontaminierten Böden im Vergleich zu den mittels HPLC-Messungen gefundenen Konzentrationen dieser Bodenextrakte, so zeigten sich Verhältnisse beginnend mit 38,93 % (+/-9,05 % SD) für die Bodenprobe DEF bis 109,96 % für die Bodenprobe ABC 2 (aufgrund einer Fehlmessung lag für die Bewertung der Probe ABC 2 nur ein Datenpunkt in der SPR-Messung vor). In eine Reihenfolge gebracht steigerten sich die Verhältnisse mittels SPR detektierten TNT-Konzentrationen von der Probe DEF (s. o.) in der folgenden Weise: ABC 4 (50,48 % +/-38,11 % SD), ABC 6 (53,5 % +/-3,67 % SD), ABC 3 (56,27 % +/-27,96 % SD), GHI 1 (62,24 % +/-14,23 % SD), ABC 1 (75,58 % +/-2,82 % SD), GHI 2 (77,77 % +/-2,39 % SD) bis hin zur Probe ABC 2 (s. o.). Abbildung 3.27 verdeutlicht dies nochmals graphisch.

Im Vergleich der Ergebnisse von HPLC und SPR ließen sich die Proben DEF signifikant und die Probe ABC 6 hochsignifikant zwischen den beiden Methoden unterscheiden. In den anderen realkontaminierten Böden konnten die Ergebnissen der HPLC nicht von denen der SPR unterschieden werden.



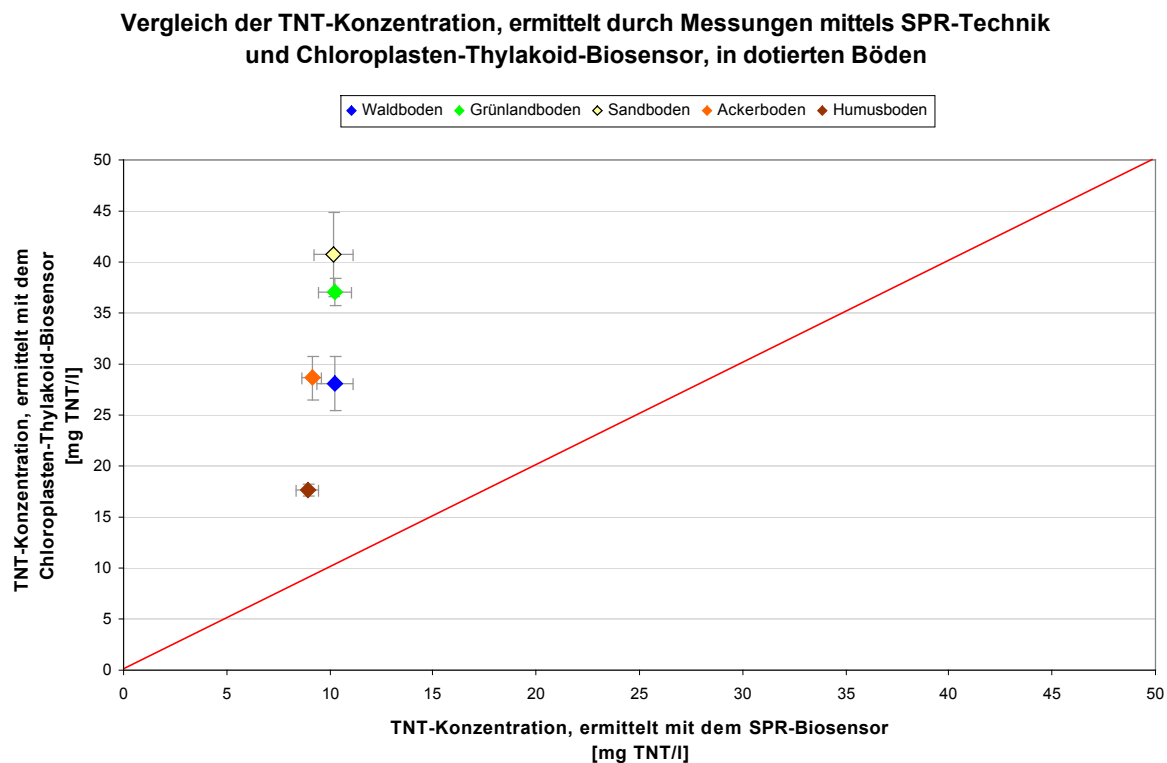
**Abb. 3.27:** Darstellung der mittels indirektem TNT-Antikörper-Assay und Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Technik in Extrakten realkontaminierter Böden detektierten TNT-Konzentration im Vergleich zur ermittelten Konzentration durch HPLC. Allgemein gilt n=2; bei ABC 2 gilt n=1 (Fehlmessung); Fehlerindikator = +/- Standardabweichung.

### 3.7.4 Vergleich der Ergebnisse der SPR mit den Aussagen des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors

#### 3.7.4.1 Dotierte Böden

Im Vergleich der beiden Mess-Systeme SPR-Antikörper-Biosensor und Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor konnten die beiden Methoden bezüglich ihrer detektierten TNT-Konzentrationen in den dotierten Böden hochsignifikant unterschieden werden.

Die TNT-Konzentrationen, die in den dotierten Böden mit beiden Systemen ermittelt wurden, sind graphisch in Abbildung 3.28 einander gegenüber gestellt. Würden sich die Ergebnisse beider Systeme in ihren TNT-Konzentrationen entsprechen, würden die dargestellten Punkte in Abbildung 3.28 entlang der roten Linie verlaufen. Diese Linie stellt den Bereich dar, in der die TNT-Konzentrationen nach CT-Biosensor den TNT-Konzentrationen der SPR-Methodik eins zu eins entsprechen.



**Abb. 3.28:** Vergleich der TNT-Konzentrationen, ermittelt mittels SPR- und Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor von Extrakten dotierter Böden; für die biosensorischen Messungen gilt  $n=5$ , für die SPR-Messungen gilt  $n=2$ ; Fehlerindikator =  $\pm$  Standardabweichung.

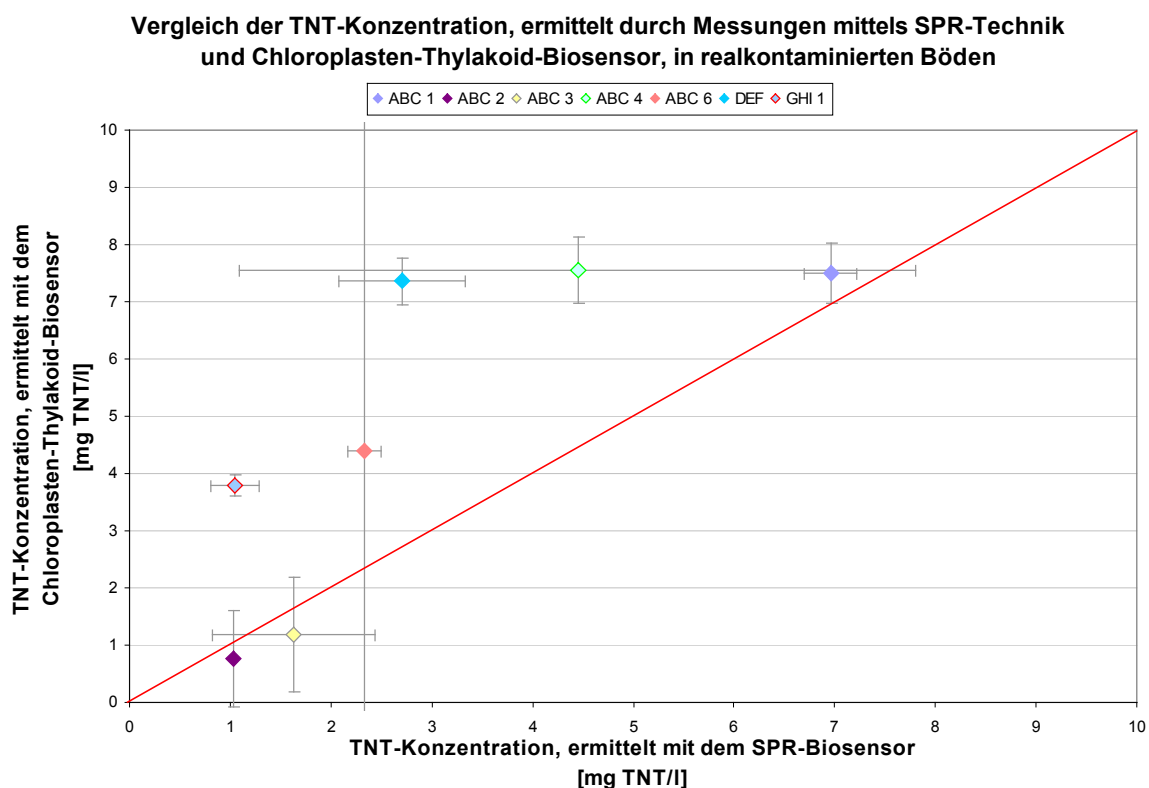
Somit zeigt sich aus dieser Gegenüberstellung, dass mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor durchgehend höhere TNT-Konzentrationen nachgewiesen werden konnten als über die Oberflächen-Plasmon-Resonanz. TNT-Konzentrationen, die in den dotierten Böden mittels CT-Biosensor gemessen wurden, lagen zwischen 17,59 mg TNT/l ( $\pm 0,60$  mg TNT/l SD) für den Humusboden bis 40,68 mg TNT/l ( $\pm 4,13$  mg TNT/l SD) für den Sandboden. Demgegenüber konnten bei den Messungen mittels SPR-Technik nur 8,91 mg TNT/l ( $\pm 0,52$  mg TNT/l SD) für den Humusboden bis 10,25 mg TNT/l ( $\pm 0,89$  mg TNT/l SD) für den Waldboden festgestellt werden.

Bezüglich der schon in den Kapiteln 3.5.2, für HPLC- und CT-Biosensor, und 3.7.3, für HPLC- und SPR-Sensor, gemachten Vergleiche lässt sich herausstellen, dass sich der Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor im Vergleich zum SPR-Biosensor als besser geeignet darstellte, die in Extrakten dotierter Böden enthaltenen TNT-Konzentrationen zu bestimmen.

### 3.7.4.2 Realkontaminierte Böden

Abbildung 3.29 stellt die TNT-Konzentrationen in den Extrakten der realkontaminierten Bodenproben, ermittelt durch SPR- und Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor, einander gegenüber. Wie schon in Kapitel 3.7.4.1 für die Gegenüberstellung von SPR- Biosensor und

Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor in den dotierten Böden, zeigte sich auch in den realkontaminierten Böden, dass mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor in den meisten Proben höhere Konzentrationen an TNT nachgewiesen werden konnten, als der SPR-Sensor bei dem gleichem Bodenextrakt festzustellen vermochte. Nur in 2 Extrakten, ABC 2 und ABC 3, konnte über die SPR-Messung eine höhere TNT-Konzentration detektiert werden. Im Vergleich mit den Konzentrationen der HPLC, die von den gleichen Extrakten gemessen wurden, entsprach auch in dieser Gegenüberstellung der CT-Biosensor besser den TNT-Konzentrationen im Extrakt als der SPR-Sensor (siehe auch Kapitel 3.6.2 und 3.7.3.2). Zu Abbildung 3.29 gilt des Weiteren, dass der Datenpunkt der Probe GHI 2 nicht graphisch dargestellt ist, da er mit TNT-Konzentrationen von 44,98 +/-1,38 mg TNT/l in der SPR-Messung und 66,38 +/-0,103 mg TNT/l in der Messung mit dem CT-Biosensor die Darstellung in der Graphik im Bereich der anderen Bodenproben zu weit eingeschränkt hätte. Im Vergleich der von SPR-Biosensor und Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor ermittelten TNT-Konzentrationen in den Extrakten realkontaminierter Böden ließen sich die Proben aus DEF (DEF) sowie aus GHI (GHI 1/2) hochsignifikant zwischen den beiden Methoden unterscheiden. Die Proben aus ABC hingegen ließen sich nicht unterscheiden.



**Abb. 3.29:** Vergleich der TNT-Konzentrationen, bestimmt mittels SPR- und Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor von Extrakten realkontaminierter Böden. Die rote Linie gibt den Bereich an, in dem sich die Ergebnisse von CT-Biosensor und SPR entsprechen, für die biosensorischen Messungen gilt n=5, für die SPR-Messungen gilt n=2; Fehlerindikator = +/- Standardabweichung.

Die Allgemeingültigkeit der Aussagen der SPR-Messungen wird allerdings insofern eingeschränkt, als dass die Aussagen, die hier getroffen werden konnten, nur auf der Basis von jeweils einem einzigen Extrakt der verwendeten Bodenproben beruhen. Bedingt durch den Messungsaufbau war es nicht möglich, Messungen an weiteren Extrakten durchzuführen. Dennoch zeigte sich auch bei den realkontaminierten Böden, dass sich der Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor besser zur Detektion von TNT in wässrigen Extrakten dieser Proben eignete, als der TNT-Antikörper-SPR-Biosensor.



## 4 Diskussion

In den folgenden Punkten soll anhand der Ergebnisse, die im Kapitel 3 dargestellt wurden, aufgezeigt werden, in wie weit sich der Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor dazu eignet, auf die Detektion von nitroaromatischen Verbindungen angewendet zu werden. In diesem Zusammenhang stellen neben der Detektion der reinen Standards sowie von Nitroaromaten aus Extrakten dotierter Böden vor allem die Ergebnisse der Extraktmessungen realkontaminierter Böden im Hinblick auf Rüstungsaltpasten einen entscheidenden Punkt dar. Dies gilt vor allem in der möglichen Anwendung dieses biosensorischen Verfahrens als „Screening“-Test.

### 4.1 Wirkung von nitroaromatischen Verbindungen auf den Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor

Ebenso wie bei den Herbiziden, lagen auch in den Messungen der nitroaromatischen Verbindungen Inhibierungen der photosynthetischen Elektronentransportkette vor (Kap. 3.1.2.2). Diese war bei diesen beiden Stoffklassen in Form einer Abnahme der photosynthetischen Aktivität im Messwert Yield sichtbar (Genty *et al.*, 1989), der sich anhand der Formel 2.1 aus den messbaren Fluoreszenzparametern errechnen lässt. Dennoch sind starke Unterschiede in den Fluoreszenz-Parametern zwischen der Wirkung von Herbiziden und von nitroaromatischen Verbindungen zu ersehen. Während sich bei den Herbiziden die Verringerung der photosynthetischen Aktivität anhand von Fluoreszenzzunahmen zeigte, wurden bei den Nitroaromaten Abnahmen in den Fluoreszenzwerten gemessen. Hierbei wurden sowohl die Fluoreszenz bei aktinischem Anregungslicht ( $F_t$ ) wie auch unter lichtsättigenden Bedingungen ( $F_m'$ ) in ihren Absolutwerten, im Vergleich zur unbelasteten Kontrolle, vermindert.

Das unter Kapitel 3.1.2.2 verwendete Diuron als klassisches PS-II-Herbizid bindet an die  $Q_B$ -Bindenische des D1-Proteins im Photosystem II (PS II) und blockiert damit die Plastochinon-Reduktion (Hock *et al.*, 1995; Heredia und Rivas, De Las, 2003). Diese Blockade des PS II durch Diuron verhindert wiederum das photochemische Quenching der Fluoreszenz (Maxwell und Johnson, 2000), bei dem die Fluoreszenz durch den Ablauf der PET-Kette und dem damit verbundenen Energietransfer, also der Übertragung der Lichtenergie in chemische Energie, vermindert wird. Da die durch den Licht sammelnden Komplex (LHC) aufgenommene Lichtenergie immer durch die drei voneinander abhängigen Wege, die Photosynthese, Fluoreszenz- und Wärmeabstrahlung, weitergeleitet wird, steigt somit bei Blockade des photosynthetischen Elektronentransports durch Diuron die Bedeutung von Fluoreszenz- und

Wärmeabstrahlung. Aus diesem Grund ist die beobachtete Erhöhung der abgestrahlten Fluoreszenz bei einer Behandlung mit Diuron als klassischem PS-II-Herbizid in den vorliegenden Chloroplasten-Thylakoiden zu erwarten.

Die Tatsache, dass nitroaromatische Verbindungen sowohl auf die oxidative wie auch photosynthetische Phosphorylierung entkoppelnd wirken (Davis *et al.*, 1997), führt zu der Annahme, dass diese Entkopplung der Grund für die Abnahme der gemessenen Fluoreszenzparameter ist. Hock *et al.* (1995) beschreiben in diesem Zusammenhang, dass z. B. 2,4-Dinitrophenol als nitroaromatische Verbindung unter anderem über eine protonophore Eigenschaft seine entkoppelnde Wirkung erhält. Hierbei tritt aber das Problem auf, dass die vorliegende biologische Einheit nur aus Thylakoidmembranen besteht. Eine Entkopplung der Phosphorylierung durch ein Loch in der Membran könnte also keine Wirkung entfalten, da keine voneinander separierten Kompartimente im verwendeten Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor bestehen, zwischen denen eine protonenmotorische Kraft aufgebaut werden könnte (Stryer, 1987). Auch müssten Behinderungen, die zwischen den drei integralen Membranproteinen, PS II, Cytochrom-<sup>b</sup>/<sub>f</sub>-Komplex und PS I (Hock *et al.*, 1995; Heredia und Rivas, De Las, 2003) durch eine eingelagerte nitroaromatische Verbindung entstehen, durch behinderte Elektronenweitergabe zu einem Stau an Reduktionsmitteln in der Weiterleitung der Elektronen führen. Dies hätte aber wiederum zur Folge, dass aufgrund des damit verringerten photochemischen Quenchings (Schreiber *et al.*, 1994) die Fluoreszenz sowohl unter Lichtsättigung wie auch unter Grundbestrahlung mit aktinischem Licht ansteigt (Hock *et al.*, 1995; Heredia und Rivas, De Las, 2003). Auch die dritte Möglichkeit von Herbizidwirkung, die Hemmung der Plastohydrochinon-Rückoxidation (Hock *et al.*, 1995) würde aus demselben Grund zu einer gleichartigen Erhöhung der Fluoreszenzwerte führen.

In diesem Zusammenhang ist vor allem erstaunlich, dass unter der Einwirkung der nitroaromatischen Verbindungen die Werte des  $F_m'$  im Vergleich zur Kontrolle sinken, da die mit dem ToxY-PAM auf die biologische Einheit abgegebenen Lichtblitze, im Falle der  $F_m'$ -Bestimmung sättigend sind. Dies bedeutet aber auch, dass in der Kontrolle alle Reaktionszentren geschlossen sind (Schreiber *et al.*, 1994, DeEll und Toivonen, 2003). Daraus resultiert auch die maximale Fluoreszenz, da alle durch den Lichtblitz aufgenommene Energie in Form von Fluoreszenz abgegeben wird. Da im vorliegenden Fall die Fluoreszenz der Thylakoidmembranen unter Nitroaromateneinfluss bei „Lichtsättigung“ nicht die  $F_m'$ -Werte der Kontrolle erreicht, muss davon ausgegangen werden, dass für die TNT-haltige Probe keine lightsättigenden Bedingungen mehr erreicht werden.



Die bei Kröger (2002) angegebene elektronenziehende Eigenschaft nitroaromatischer Verbindungen stellt hierbei eine weitere Möglichkeit für die Wirkung der Nitroaromaten und besonders des TNTs auf die photosynthetische Elektronentransportkette dar. Durch ihre elektronenziehende Wirkung könnten die Nitroaromaten Elektronen direkt aus der Transportkette abgreifen. Hiermit würde eine Reduktion der eigentlichen Elektronenakzeptoren kurzfristig unterbleiben, wodurch ein größerer Pool an Reduktionsmitteln, Plastochinon ( $Q_A$ ) und nitroaromatische Verbindung zur Verfügung stünde. Somit könnte die photosynthetische Elektronentransportkette bis zu dieser Stelle schneller ablaufen, was wiederum zu einer schnelleren Öffnung der durch Lichtanregung geschlossenen LHCs führen könnte. Dabei wäre dann die gegensätzliche Reaktion zu beobachten wie beim Entstehen des nichtphotochemischen Quenchings. Diese entsteht, wenn beim photochemischen Quenching alles  $Q_A$  reduziert wird und damit im Pool keine oxidierten Verbindungen mehr vorliegen (Schreiber *et al.*, 1994). Durch die Übernahme von Elektronen, durch z. B. das TNT, würde die Reduzierung von  $Q_A$  vermindert und der Pool stärker gefüllt bzw. nicht „entleert“ werden. Dies hätte demnach ein „pseudo-photochemisches Quenching“ zur Folge, bei dem trotz Hemmung der photosynthetischen Aktivität, erkennbar durch einen verringerten Yield, die Fluoreszenzparameter gegenüber einer Kontrolle sinken.

Für diese Theorie spricht des Weiteren, dass TNT, was nicht natürlich vorkommt, nur sehr schwer oxidierbar ist, und somit ein reduktiver Angriff zu dessen Abbau erfolgen muss (Achnich und Knackmuss, 2000). So ist *Desulfovibrio* in der Lage, die Nitro-Gruppen nitroaromatischer Verbindungen als Elektronenakzeptoren zu verwenden (Boopathy *et al.*, 1998). Clostridien reduzieren TNT ebenfalls zu Triaminotoluol (TAT) (Gorontzy *et al.*, 1993), welches anschließend an die Bodenmatrix gebunden werden kann (Lenke *et al.*, 1998). Auch erfolgen die meisten biologischen Sanierungen unter anaeroben, reduzierenden Bedingungen (Wang *et al.*, 2002). Bereits beschrieben wurde, dass das Cytochrom  $P_{450}$  ein Schlüsselenzym in der biologischen Degradation von TNT darstellt (Eilers *et al.*, 1999). Dieses wiederum ist als Bestandteil einer Elektronentransportkette in der Lage, Elektronen zu übertragen (Stryer, 1987), was ebenfalls für die Theorie sprechen würde, dass die Nitroaromaten Elektronen aus der photosynthetischen Elektronentransportkette abgreifen. Weiter müssen für die bereits beschriebene Entkopplung der photosynthetischen Phosphorylierung (Davis *et al.*, 1997) wie auch einer protonophoren Eigenschaft die Verbindungen eine lipophile Eigenschaft besitzen, die sie befähigt, in und durch die Thylakoidmembran zu treten (Hock *et al.*, 1995). Dies zeigt sich durch die hydrophoben

Eigenschaften der Nitroaromaten bestätigt (Breitmaier und Jung, 1986). Somit wäre die Grundlage für eine Elektronenübernahme in der Thylakoidmembran gegeben.

Das Auftreten einer Änderung der Fluoreszenz spricht weiter dafür, dass unabhängig vom Wirkmechanismus eine Wirkstelle von TNT und seiner Metabolite im Bereich des PS II liegen muss, da das PS I essenziell nicht fluoresziert (Schreiber *et al.*, 1994). Somit lässt sich eine Funktion der Nitroaromaten als artifizieller Elektronenendakzeptor am PS I zwar, wenn vorhanden, nicht fluorometrisch messen, dennoch liegt zumindest ein Wirkort der Nitroaromaten im Bereich des PS II, womit hier die Beeinflussung detektierbar ist.

Abschließend ist davon auszugehen, dass unabhängig welcher Wirkmechanismus vorliegt, die Festlegung der Lichtenergie in Form von  $\text{NAPH}+\text{H}^+$  sowohl durch Diuron wie auch durch nitroaromatische Verbindungen stark beeinflusst wird.

## **4.2 Biosensorische Detektion von TNT**

Aufgrund dieser unter 4.1.2 dargestellten Wirkungen der nitroaromatischen Verbindungen auf die photosynthetische Elektronentransportkette, zeigte sich die Messung von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor als möglich. Hierbei musste allerdings die geeignete Extraktionsmethode für die Proben gefunden werden, um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erreichen.

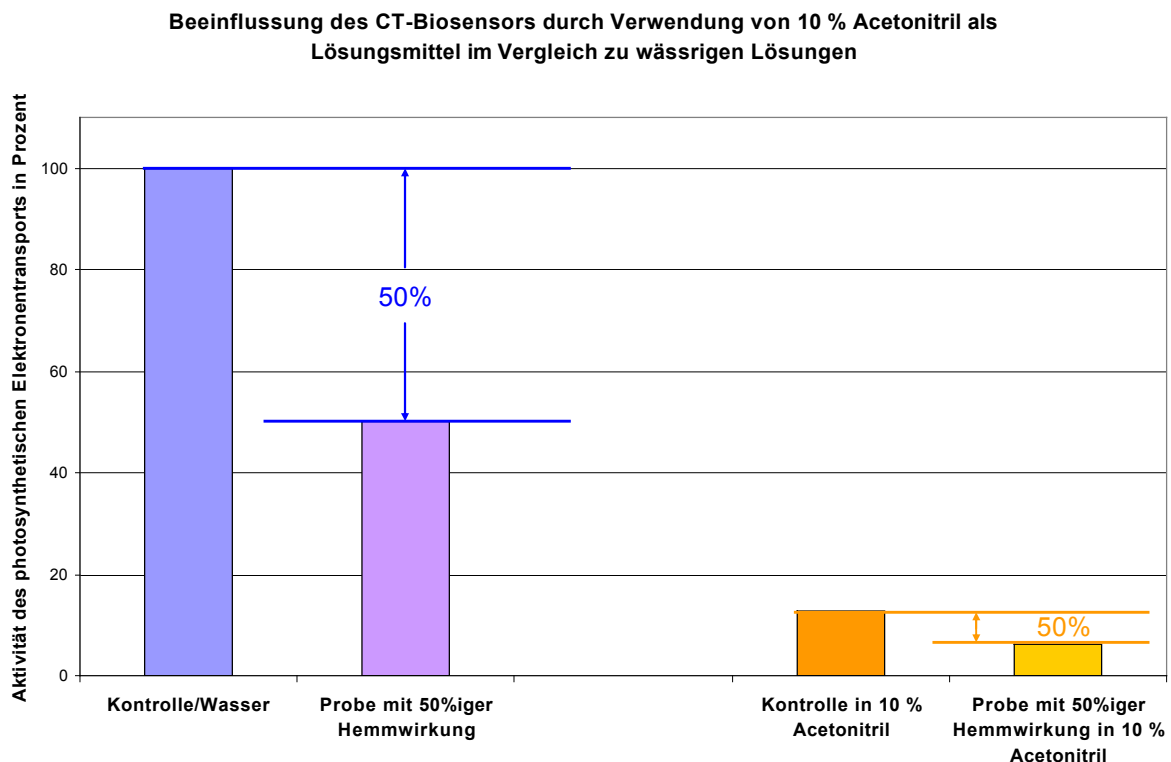
### **4.2.1 Einfluss der Extraktionsbedingungen für die Herstellung von biosensorisch verwendbaren Extrakten**

Nach der Literatur werden für die Analyse von nitroaromatischen Verbindungen vor allem organische Lösungsmittel eingesetzt. So benutzt Jenkins (1990) Aceton zum Lösen von TNT aus Böden, bei Larson *et al.* (1999) sowie dem USACE (2003) findet zur Extraktion Acetonitril Anwendung. Frische (2002A) nutzt die Löslichkeit von Nitroaromaten in Methanol, und das Umweltbundesamt gibt zur Extraktion von Nitroaromaten aus Böden die Verwendung von Acetonitril, Methanol und Diethylether, aus Wasser Dichlormethan und Toluol an (Umweltbundesamt, 2003; 2004). Diese Aufstellung soll nur einige Beispiele geben, da noch eine Vielzahl weiterer Arbeitsgruppen auf dem Gebiet nitroaromatischer Verbindungen arbeitet. Dies wird schon allein durch die Tatsache dargelegt, dass TNT als der am Besten erforschte Sprengstoff gilt (Boopathy *et al.*, 1998). Die aufgeführten Lösungsmittel dienen aber durchgehend dazu, TNT im Anschluss an die Extraktion in einer nicht biologischen Messung zu detektieren. Für die Verwendung in biologischen Assays gilt an die verwendeten Lösungsmittel aber der Anspruch, keine toxischen Wirkungen zu besitzen (Kördel und Hund, 1998). Für Algen ist die toxische Wirkung von Methanol unter anderem

bei Podola und Melkonian. (2003) beschrieben, wobei gleicher Nachweis auch auf der Basis der hier verwendeten Puls-Amplituden-Modulations-Technik durchgeführt wurde (Podola *et al.*, 2004).

Dennoch wurde versucht, in dieser Arbeit ein Extraktionsverfahren zu entwickeln, welches einen möglichst guten Kompromiss zwischen TNT-Löslichkeit, biosensorischer Verträglichkeit und Reproduzierbarkeit der Messungen gewährleistet.

Um TNT also in späteren Messungen gut messen zu können und um eine Löslichkeit in für die Messungen ausreichenden Konzentrationen zu erhalten, wurde die Wirkung von organischen Lösungsmitteln auf den CT-Biosensor untersucht. Nach Taha *et al.* (1997) besitzt TNT eine Löslichkeit von 1.000 g/l in Acetonitril. Dies sprach zwar für Acetonitril als gutes Lösungsmittel für TNT, aber wie in Tabelle 3.6 dargestellt, war die Beeinflussung des CT-Biosensors durch 10 % Acetonitril mit 87,262 % (+/-4,918 % SD) zu hoch, um nitroaromatische Verbindungen nachweisen zu können. Abbildung 4.1 stellt in diesem Zusammenhang graphisch dar, wie weit sich der Messbereich durch eine 10%ige Acetonitril-Zugabe in der Kontrolle einschränken würde.



**Abb. 4.1.:** Darstellung der Beeinflussung des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors durch 10 % Acetonitril als Lösungsmittel im Vergleich zu wässrigen Lösungen anhand der Gegenüberstellung der Kontrollen sowie einer theoretischen Probe mit 50 % Hemmwirkung.

Die blauen Säulen geben in diesem Zusammenhang die Kontrolle einer reinen Wasser-Lösung neben einer Probe mit 50%iger Hemmungswirkung an. Die orangen Säulen stellen die gleiche theoretische Messung dar, jedoch mit zusätzlich 10 % Acetonitril in Probe und Kontrolle.

Aus der Graphik wird deutlich, dass Messungen in einem solch stark eingeschränkten Messbereich kaum Spielraum für den Nachweis von Hemmstoffen des PET bzw. für Messungen unterschiedlicher Konzentrationen bieten, wodurch Acetonitril als Lösungsmittel nicht angewendet werden konnte.

Auch die Betrachtung der organischen Lösungsmittel Ethanol und Methanol ließ eine Beeinflussung des photosynthetischen Elektronentransports erkennen (siehe Abschnitt 3.3.1). Wenn auch diese nicht so stark waren wie bei Acetonitril, sind auch die maximal löslichen TNT-Konzentrationen im Vergleich zu Acetonitril wesentlich geringer. So wird die maximale Konzentration von TNT in Ethanol mit 12,3 g/l (Taha *et al.*, 1997) angegeben, für Methanol mit 95 g/l (Jenkins, 1990). Aus der gleichzeitigen Betrachtung der Beeinflussung des CT-Biosensors durch Ethanol (52,81 % +/-5,48 % SD) und Methanol (37,79 % +/-3,36 % SD) sowie der maximalen löslichen TNT-Konzentrationen in diesen Lösungsmitteln, fanden auch Ethanol und Methanol keine Verwendung für biosensorische Messungen nitroaromatischer Verbindungen. Gerade bei geringen TNT-Konzentrationen, die im Bereich der Prüf- und Vorsorgewerte (5 bzw. 1 mg TNT/kg Boden) der UBA liegen (2004), waren Probleme aus dem Zusammenspiel von geringer Schadstoffwirkung der Testsubstanz sowie der „Grundschadwirkung“ durch das Lösungsmittel zu erwarten.

Die in Kapitel 3.3.1 beschriebene CaCl<sub>2</sub>-Lösung konnte für den Nachweis von nitroaromatischen Verbindungen mittels des CT-Biosensors ebenfalls keine Verwendung finden. Zwar finden CaCl<sub>2</sub>-Lösungen als ungepufferte Salzlösungen in der Bestimmung leichtlöslicher Schadstoffe Anwendung (Schachtschabel *et al.*, 1989), hier musste jedoch eine Verwendung, aufgrund des sich bildenden farblosen Niederschlages bei den biosensorischen Messungen, ausgeschlossen werden. Zwar konnte mit dem ToxY-PAM noch eine Fluoreszenz in den Chloroplasten-Thylakoiden nachgewiesen werden, die Bildung des Niederschlages führte aber, wie die Abbildung 3.9 verdeutlichte, zu einer nicht quantifizierbaren Einschränkung der Lichtbestrahlung zur Fluoreszenzanregung wie auch der Fluoreszenzdetektion. So ist z. B. die Sedimentation des Niederschlages auf dem Grund der Messküvette, und damit direkt vor dem Fluoreszenzdetektor, nicht zu standardisieren.

Die Verwendung von Wasser als Lösungsmittel zeigte demgegenüber mehrere Vorteile. Durch die Verwendung von Wasser kommt es zu keiner Beeinflussung der biologischen Einheit, den Chloroplasten-Thylakoiden. Des Weiteren werden gerade durch die Verwendung

von Wasser die freien sowie die im Boden gelösten und damit bioverfügbaren Schadstoffe der Messung zugeführt (Schachtschabel *et al.*, 1989). So gilt es in der ökotoxikologischen Betrachtung von kontaminierten Böden, die Gesamtkonzentration eines Schadstoffes von dem toxikologisch relevanten Teil zu unterscheiden (Schachtschabel *et al.*, 1989), was die Grundlage für Risikoabschätzungen bildet (Lanno *et al.*, 2004). Wässrige Extrakte bilden hierbei eine verlässliche Grundlage für Mobilitätsabschätzungen von Schadstoffen (Hirner *et al.*, 1998), da die gelösten Stoffe eine Übersicht über die Bioverfügbarkeit bieten (Chung und Alexander, 1998).

In diesem Zusammenhang simuliert zwar die Verwendung von  $\text{CaCl}_2$ -Lösungen die Bedingungen eines gepflügten Ackers in der Pflanzenverfügbarkeit von Schadstoffen (Schachtschabel *et al.*, 1989), der Einsatz von  $\text{CaCl}_2$  wird aber als manipulativ für die Bodenlösungen beschrieben, wodurch wässrige Extrakte einer solchen  $\text{CaCl}_2$ -Lösung vorzuziehen sind (Kördel, 2001). Auch galt es, der Anforderung zu genügen, dass das Lösungsmittel für die durchzuführenden biologischen Untersuchungen anwendbar war (Strong *et al.*, 1999). Wie in Kapitel 3.3.1 dargestellt, war  $\text{CaCl}_2$ , durch die Bildung des farblosen Niederschlages, in Bezug auf die Anwendbarkeit in den biologischen Messungen ebenfalls nicht brauchbar.

Auch hat Wasser gegenüber den organischen Lösungsmitteln den Vorteil, dass es der Anforderung von Bioassays an Lösungsmitteln genügt, da diese in Bioassays nicht toxisch sein sollen (Kördel und Hund, 1998). Eine Anforderung die, wie schon am Beispiel von Methanol beschrieben, für organische Lösungsmittel nicht zutrifft (Podola und Melkonian, 2003; Podola *et al.*, 2004).

Somit fanden in dieser Arbeit weder organische Lösungsmittel noch  $\text{CaCl}_2$ -Lösungen in der Extraktion von TNT Verwendung. Im Hinblick auf die toxischen Eigenschaften organischer Lösungsmittel sowie die Wiedergabe der Bioverfügbarkeit von TNT durch Verwendung von Wasser wurde in Kauf genommen, dass im Durchschnitt nur 40 % des enthaltenen TNTs als in Wasser löslich galt (Strong *et al.*, 1999), dieser Anteil dafür aber die lösliche und bioverfügbare TNT-Fraktion in der Probe widerspiegelt (Schachtschabel *et al.*, 1989). Somit kann mit wässrigen Extrakten zwar nicht die Gesamtmenge der Kontamination betrachtet werden, jedoch der ökotoxikologisch bedeutende Teil, den es von ersterer zu unterscheiden gilt (Schachtschabel *et al.*, 1989). Per Definition der IUPAC gilt, dass solche Substanzen als gebunden gelten, die sich nicht lösen lassen, ohne dass das Lösungsmittel die chemische Natur des Bodens signifikant ändert (Northcott und Jones, 2000). Um eine ökotoxikologische

Aussage zu erreichen, sollte gleichstehend eine Änderung der Natur der Böden bei der Extraktion vermieden werden.

Entsprechend der oben aufgeführten Ergebnisse wurde Wasser für die Extraktionen von Nitroaromaten aus Böden als Lösungsmittel verwendet, um die löslichen und ökotoxikologisch relevanten Konzentrationen zu erhalten. Die Erhöhung der Temperatur bei der Extraktion gegenüber der Raumtemperatur diente hierbei zur Erhöhung der allgemeinen Löslichkeit (Harms, 1994; Geller, 2001). Obwohl Ultraschallextraktionen in der Herstellung von Bodenextrakten, auch im Hinblick auf nitroaromatische Verbindungen, eine breite Verwendung finden (Breitung *et al.*, 1996; Eisenträger *et al.*, 1998; Frische und Höper, 2003), ließen sich in den vorliegenden Versuchen gegenüber der Extraktion durch Rühren keine besseren Wiederfindungsraten erzielen. Die wahrscheinlichste Begründung hierfür liegt in der Durchmischung der Proben mit dem Lösungsmittel Wasser. Während beim Rühren darauf geachtet wurde, dass sich die gesamte Probe im Lösungsmittel bewegte, konnte eine anhaltende Durchmischung in den Ultraschallextraktionen systembedingt nicht gewährleistet werden. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Kördel und Hund (1998) in der Unterscheidung von geschüttelten zu nicht geschüttelten Extraktionen. Bei den Ansätzen, die mit Ultraschall extrahiert wurden, war das Wasser, das im direkten Kontakt zur Bodenmatrix und somit auch zu den Kontaminationen stand, wahrscheinlich schnell an Nitroaromaten gesättigt. Eine Verdünnung der Konzentration durch Austausch mit dem umgebenden Wasser war nicht ausreichend gegeben. Die Verteilung des TNTs in der Lösung erfolgte somit wahrscheinlich bei den Ultraschallextrakten nur per Diffusion. Eventuell erreicht die Ultraschallbehandlung direkt in der Kontaktzone zwischen Wasser und Bodenmatrix die Sättigung an Kontaminationen schneller als ohne Ultraschallbehandlung, ein Austausch mit dem restlichen Wasser war aber nicht gewährleistet. Da die zu geringe Durchmischung in der vorliegenden Arbeit aber den limitierenden Faktor darstellte, wurde eine Anwendung von Ultraschallbehandlungen bei der Extraktion ausgeschlossen.

Damit konnte hier eine neue Methode für die wässrige Extraktion der nitroaromatischen Verbindungen, unter besonderer Berücksichtigung des TNTs, durch Rühren für eine Stunde mit einer Erwärmung auf 60 °C zur Verbesserung der Löslichkeit der ökotoxikologischen Bestandteile der Bodenkontaminationen entwickelt werden.

#### **4.2.2 Ergebnisse der TNT-Eichmessungen mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor**

In dieser Arbeit konnte erstmals dargestellt werden, dass der Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor zum Nachweis von TNT eingesetzt werden kann (siehe Kapitel 3.1.1.5). Durch die

Erstellung einer Eichkurve war es möglich, TNT-Konzentrationen in unbekanntem Lösungen anhand ihrer inhibitorischen Wirkung auf den CT-Biosensor zu bestimmen.

Die für den Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor nach der Nachweisgrenzenbestimmung der deutschen Akkreditierungssystem Prüfwesen GmbH (DAP, 2002) bestimmte untere Nachweisgrenze von 0,65 mg TNT/l lag unterhalb der Anforderungen, die das Umweltbundesamt für TNT in Böden fordert. So werden dort als Versorgungswert 1 mg TNT-Äquivalent/kg Boden angegeben, als Prüfwert im Siedlungsbereich 5 mg TNT-Äquivalent/kg Boden und im Gewerbebereich 20 mg TNT-Äquivalent/kg Boden (Umweltbundesamt, 2004). Bei diesen Grenzwerten gilt es zu beachten, dass sie auf der Basis von Tierversuchen erstellt wurden. Bei der Umsetzung auf Grenzwerte für den Menschen wird zwar ein Sicherheitsfaktor von 100 einberechnet, aber verlässlich lassen sich diese Aussagen nicht auf humantoxische Eigenschaften übertragen (Schachtschabel *et al.*, 1989).

Abweichend zum TNT konnten reproduzierbare Ergebnisse nicht für dessen Metabolite ermittelt werden (siehe Kapitel 3.1.2). Da die TNT-Metabolite nicht in ausreichender Konzentration in Wasser gelöst werden konnten - ihre Löslichkeiten lagen entsprechend der International Chemical Safety Cards (2002) zwischen nicht und gering in Wasser löslich - konnten sie nur als methanolische Standards angewendet werden. Wie aber in Abschnitt 4.2.1 schon diskutiert, wies Methanol eine zu hohe Beeinflussung des CT-Biosensors auf. Weiter hätte die Verwendung eines methanolischen Extrakts, angewendet auf Böden, wie bereits beschrieben (Abschnitt 4.2.1), eine verlässliche Abschätzung der Bioverfügbarkeit nicht zugelassen (Schachtschabel *et al.*, 1989). Vor allem stellen diese nitroaromatische Verbindungen als Metabolite des TNTs unter realen Bedingungen nicht die primäre Kontamination in Böden dar. Sie kommen nur durch Fehler in der Produktion und Abfallbeseitigung sowie als Produkte von Ab- und Umbauprozessen durch mikrobielle, pilzliche und pflanzliche Stoffwechselwege gering in den kontaminierten Böden vor (Khan *et al.*, 1997; Dua *et al.*, 2002; Patel *et al.*, 2004).

Weiter fordert das Umweltbundesamt die Bestimmung der Grenzwerte in Form von TNT-Äquivalenten, deren Berechnung auf der Toxizität der Metabolite im Tierversuch beruhen (Schachtschabel *et al.*, 1989). Zwar lässt sich aus den über analytische Verfahren, wie der HPLC, einzeln ermittelten Konzentrationen eine Umrechnung in TNT-Äquivalente durchführen, bei den toxischen Wirkungen auf biosensorische Messverfahren ist jedoch eine Aufteilung in die einzelnen Wirksubstanzen nicht möglich. Zwar ist auch hier das Ergebnis mit TNT-Äquivalenten gleichzusetzen, da keine Unterscheidung getroffen werden kann. Die

Grundlage dieser Äquivalente bilden aber, beim vorliegenden CT-Biosensor, phytotoxische und nicht humantoxische Aussagen.

### **4.3 Genauigkeit des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors im Nachweis von Nitroaromaten**

Zur Beurteilung der Ergebnisse des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors in Bezug auf seine Genauigkeit war es nötig, diese in ihren Aussagen mit den Ergebnissen der HPLC als chemische Referenz-Methode zu vergleichen. In den folgenden Punkten sollen die Ergebnisse des CT-Biosensors in den verschiedenen Anwendungsgebieten auf ihre Tauglichkeit zum Nachweis der nitroaromatischen Kontamination dargestellt werden.

Wie in Kapitel 3.1.1.5 und 3.2.1 dargestellt, zeigten sich zwar alle nitroaromatischen Standardverbindungen mittels HPLC nachweis- und quantifizierbar, mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor ließ sich allerdings nur das TNT in wässriger Lösung reproduzierbar nachweisen. Bei den anderen verwendeten nitroaromatischen Verbindungen waren zwar Beeinflussungen der Biosensorik festzustellen, diese ließen sich aber weder quantifizieren noch reproduzieren. Eine mögliche Begründung dafür liegt in der Tatsache, dass, bedingt durch die biosensorische Beeinflussung durch organische Lösungsmittel (s. Kapitel 3.3.1), die Standards nicht biosensorisch verfügbar vorlagen. Die geringen Löslichkeiten der nitroaromatischen Standards in Wasser (International Chemical Safety Cards, 2002) haben wahrscheinlich dazu geführt, dass diese in der Messkammer des Biosensor ausgefallen sind bzw. sich zu nicht mehr messbaren, für das Auge aber unsichtbaren Komplexen zusammengelagert haben. Messungen mittels HPLC wiederum waren, aufgrund der bloßen Ausnutzung des Adsorptions-/Desorptions-Verhaltens sowie der Tatsache, dass Methanol als organisches Lösungsmittel und Modifier eingesetzt werden konnte, in der Lage, die Verbindungen dennoch zu testen.

#### **4.3.1 Eichgeraden**

Bei der Betrachtung der Eichungen von CT-Biosensor und HPLC auf die Rüstungsaltplast TNT war ersichtlich, dass mit beiden Systemen reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden konnten (s. Kap. 3.1 und 3.2). Die zur Verfügung stehenden Messbereiche unterschieden sich aber stark voneinander. So konnte bei der HPLC eine untere Nachweisgrenze von 4,8 µg TNT/l ermittelt werden, während die des CT-Biosensors mit 0,648 mg TNT/l errechnet wurde. Auch zeigte sich bei der HPLC eine durchgehend lineare Beziehung zwischen der TNT-Konzentration und der gemessenen Peakfläche zwischen Chromatogramm und Baseline bis zu einer Konzentration von 100 mg TNT/l. Beim CT-Biosensor konnte nur im Bereich bis



2 mg eine lineare Beziehung zwischen TNT-Konzentration und Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports hergestellt werden. Über den gesamten Hemmungsbereich bis 25 mg TNT/l verlief die Eichkurve dann logarithmisch. Dieser Unterschied lässt sich einfach mit dem Design der Methoden erklären. Während bei der HPLC die Messung nur von der Adsorption und Desorption von der stationären Phase in der Trennsäule abhängt, finden beim Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor Konkurrenzen um die freien Inhibitionsstellen durch das TNT statt, ähnlich einer Enzym-Sättigungs-Kurve (Stryer, 1987; Larcher, 1994), womit dieser Inhibitionsverlauf verursacht wird.

Für die Berechnung der TNT-Konzentrationen aus den jeweilig erzielten Eichungen folgt daraus, dass diese zwar bei beiden Kurvenverläufen prinzipiell möglich sind, die errechneten TNT-Konzentrationen allerdings durch den logarithmischen Hemmungsverlauf beim CT-Biosensor vor allem im flacheren oberen Bereich stärker gegenüber Schwankungen in den Messwerten anfällig sind, als die Ergebnisse der HPLC.

Es gilt zu berücksichtigen, dass kein Mess-System existiert, das als ideal angesehen werden kann. Das Ziel in analytischen Messungen ist jedoch eine möglichst realistische Abschätzung der vorherrschenden Gegebenheiten (Durner, 2002). In der vorliegenden Arbeit bietet die HPLC die Abschätzungen der Konzentrationen an nitroaromatischen Verbindungen, während der CT-Biosensor das toxische Potenzial der Proben erfasst.

#### **4.3.2 Dotierte Böden**

Bei den artifiziellen Böden stimmten im Vergleich der beiden Mess-Techniken, dem CT-Biosensor und der HPLC, ihre Ergebnisse in Bezug auf die wässrigen Extrakte sehr gut überein. Im Mittel der gefundenen TNT-Konzentrationen der einzelnen Bodensorten konnte nur die TNT-Konzentration für den Humusboden zwischen HPLC und CT-Biosensor signifikant unterschieden werden. In diesem Zusammenhang stellt die Abbildung 3.12 die Gegenüberstellungen der TNT-Wiederfindungsraten, in den Extrakten der dotierten Böden nach chromatographischen und biosensorischen Messungen dar. Betrachtete man alle Messpunkte in der Gesamtheit, so konnte eine lineare Beziehung zwischen HPLC und CT-Biosensor mit  $y = 1,004 x$  bei einem  $R^2$  von 0,7909 festgestellt werden. Dies bedeutet also, dass sich in der Gesamtheit der in dieser Arbeit durchgeführten Messungen an Extrakten von dotierten Böden die TNT-Wiederfindungsraten nach HPLC und CT-Biosensor relativ gut entsprachen. Umgerechnet bedeutet die angegebene Steigung, dass für 1 mg mit der HPLC nachgewiesenem TNT/l im Durchschnitt aller Messungen 0,996 mg TNT/l mit der Biosensorik in den Bodenextrakten nachgewiesen werden konnten. In diesem Vergleich zeigt

sich also, dass sich die Ergebnisse, die mittels CT-Biosensor an TNT-kontaminierten Böden ermittelt wurden, kaum durch Matrixeffekte der Böden in ihrer Detektion beeinflussen ließen. Die Unterscheidungen in die einzelnen Böden, die in Abbildung 3.12 getroffen werden konnten, ließen erkennen, dass die TNT-Wiederfindungsraten abhängig von den unterschiedlichen Bodentypen waren. In Kapitel 4.4 sollen diese Unterschiede weiter erläutert werden.

### 4.3.3 Realkontaminierte Böden

Die bei den dotierten Böden gefundenen Übereinstimmungen zwischen den Wiederfindungsraten von HPLC und Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor waren nicht direkt von diesen auf die realkontaminierten Böden übertragbar.

Ein Problem im Vergleich von biosensorischen und chromatographischen Messungen von realkontaminierten Böden ergab sich durch die in den Extrakten enthaltenen Konzentrationen an TNT. In den realkontaminierten Böden wurde im Gesamten weniger TNT gefunden, als in den dotierten Böden. So konnte in keinem Extrakt, der aus einem dotierten Boden hergestellt wurde, eine TNT-Konzentration unterhalb von 5,5 mg TNT/l festgestellt werden. In den realkontaminierten Böden zeigten aber nur 12 der 45 erstellten Extrakte Konzentrationen oberhalb von 5,5 mg TNT/l. Andererseits konnte in allen wässrigen Extrakten der realkontaminierten Bodenproben mittels HPLC, aufgrund der wesentlich geringeren Nachweisgrenze als beim CT-Biosensor, eine TNT-Kontamination festgestellt werden. Diese lagen aber in 14 der 45 Proben unterhalb der Nachweisgrenze des CT-Biosensors für TNT (0,648 mg TNT/l). Somit konnte in diesen Bodenextrakten keine Bestimmung der TNT-Konzentration mittels CT-Biosensorik durchgeführt werden. Diese geringen Konzentrationen lassen sich damit begründen, dass systembedingt für den Biosensor keine Extraktionen mit organischen Lösungsmitteln vorgenommen werden konnten (s. Kapitel 3.3.1). Somit ließen sich die von den Sanierern vorgegebenen Konzentrationen, schon allein der geringen Löslichkeit wegen (International Chemical Safety Cards, 2002) mit der angewendeten Extraktionsmethode nicht erzielen. Dieses stellte im Hinblick auf den löslichen, ökotoxikologischen Bestandteil (Schachtschabel *et al.*, 1989; Northcott und Jones, 2000) der Kontamination auch nicht das primäre Ziel dar.

Im Vergleich der Messwerte von HPLC und Biosensorik war festzustellen, dass im Allgemeinen keine signifikanten Unterschiede in den TNT-Konzentrationen zwischen beiden Systemen festgestellt werden konnten.

Die Böden selbst konnten weder mit der HPLC noch mit dem CT-Biosensor signifikant untereinander unterschieden werden. Besonders die Bodenproben ABC 1-6 zeigten sich sehr homogen in ihren Werten.

Eine auf den ersten Blick unmögliche Messung war bei zwei Extrakten aus DEF festzustellen, die sowohl in den Messungen der HPLC wie auch in denen des CT-Biosensors höhere TNT-Raten detektierten, als nach den Angaben der Sanierer überhaupt im Boden vorkommen sollten. Dennoch sind diese Messungen nicht als Fehlmessungen zu bewerten. Trotz eines Extraktes mit einer Wiederfindungsrate von 238,25 %, lag die mittlere Wiederfindungsrate der Probe DEF im Vergleich zu den Angaben der Sanierer bei 111,25 % (+/-82,78 % SD) (s. Abb. 3.18). Dies hat seine Begründung in der Tatsache, dass TNT in Böden nur sehr inhomogen verteilt vorliegt (Durner, 2002; Thomas *et al.*, 2004). Somit konnte nicht durchgängig gewährleistet werden, dass immer die gleiche TNT-Menge in einer Probe eingewogen wurde. In der besagten Probe aus DEF scheint also, im Vergleich zu den anderen angefertigten Proben, zuviel TNT mit eingewogen und anschließend gelöst worden zu sein. Da hier nur relativ geringe Mengen an Bodenmaterial eingewogen wurden (15-20 g), bedingt durch das geringe Gesamtvolumen an durch die Sanierer zur Verfügung gestellten, realkontaminierten Bodenproben, äußern sich schon geringste Unterschiede in der Menge an eingewogenen Kontaminationen anschließend stark in schwankenden Konzentrationen und damit in unterschiedlichen Messwerten. Auch wenn diese Unterschiede bei den anderen realkontaminierten Proben nicht, wie bei der Probe aus DEF, in Wiederfindungsraten über 100 % resultierten, so wurden auch hier diese Effekte gefunden, wie in den Abbildungen 3.16 und 3.17 zu ersehen. Dass dieses Ergebnis sich nicht auf die Messungen der HPLC beschränkte, zeigte sich darin, dass sich die Ergebnisse von HPLC und Biosensorik recht gut entsprachen. Lediglich beim ersten Extrakt der Probe ABC 6 wurden mittels CT-Biosensor 5,34 mg TNT/l nachgewiesen, während der Extrakt nach HPLC nur 1,024 mg TNT/l besaß, was einer Steigerung des biosensorischen Nachweises um 422,27 % entspricht. Dieses Ergebnis kann dadurch erklärt werden, dass die nach HPLC ermittelte TNT-Konzentration nahe der Nachweisgrenze des CT-Biosensors lag.

#### **4.3.4 Vergleich dotierte und realkontaminierte Böden**

Was die TNT-Wiederfindungsraten aus den dotierten und realkontaminierten Böden angeht, so unterschieden sich die Messungen der HPLC für beide recht stark voneinander. So konnten in den dotierten Böden, abhängig von der Bodensorte, 14,02 % beim Humusboden bis 76,29 % beim Sandboden der dotierten Konzentration an TNT gemessen werden, während die

Ergebnisse in den realkontaminierten Böden von 6,06 % für Probe ABC 5 bis 30,79 % für ABC 3 reichten, jeweils im Vergleich zu den Angaben der Sanierer. Probe DEF stellte dabei mit einer Wiederfindungsrate von 111,24 % eine Ausnahme dar, allerdings auch mit 82,78 % Standardabweichung. Sowohl die Extraktionen in den dotierten Böden wie auch in den realkontaminierten Böden erreichen nicht die von Kördel und Hund (1998) geforderten 70 % Wiederfindungsrate. Dabei gilt es zu beachten, dass die angewendete Extraktionsmethode nicht darauf ausgelegt war, die TNT-Gesamtkonzentration zu erfassen, sondern nur die ökotoxikologisch relevante Konzentration zu extrahieren, wobei beide Konzentrationen im Allgemeinen nicht identisch sind (Schachtschabel *et al.*, 1989). Im Vergleich zu Strong *et al.* (1999) gilt festzustellen, dass dort maximal 40 % des zu Böden dotierten TNTs wieder extrahiert werden konnten, was in der angewendeten Extraktionsmethode bei drei der fünf Böden - Acker-, Grünland- und Sandboden - übertroffen werden konnte.

Dass in den Extrakten der realkontaminierten Böden wesentlich geringere TNT-Wiederfindungsraten gefunden wurden, lässt sich daraus begründen, dass die angewendete Extraktionsmethode auf der einen Seite nur den löslichen, bioverfügbaren Anteil der Kontamination erfasst. Auf der anderen Seite wiederum, sorgt der Alterungsprozess der Böden für eine verstärkte Festlegung von TNT an der Bodenmatrix, wodurch die Bioverfügbarkeit begrenzt wird (Hatzinger und Alexander, 1995; Eschenbach *et al.*, 2001; Nam und Kim, 2002; Pennington und Brannon, 2002). Da über die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln, wie bei den Sanierern betrieben, auch nichtlösliche Bestandteile extrahiert wurden, äußert sich die hier wieder gefundene Konzentration an TNT in entsprechend geringeren Werten. Bei den dotierten Böden entfallen die alterungsbedingten Festlegungen, wodurch entsprechend höhere Wiederfindungsraten erzielt wurden.

Die Ergebnisse der dotierten Böden waren in sich wesentlich einheitlicher in ihren Wiederfindungsraten als die der realkontaminierten Böden (s. Abb. 3.10 und 3.16). Gleichsam stellten sich auch die Ergebnisse mit dem CT-Biosensor dar. So zeigten die Mittelwerte der Extrakte der dotierten Böden in den Messungen des CT-Biosensors lediglich beim Sandboden eine Standardabweichung von über 20 %, während bei den realkontaminierten Proben nur die Standardabweichung der Probe ABC 1 mit 19,59 % unterhalb dieser Marke lag. Begründet liegen diese Unterschiede in einer Vielzahl von Faktoren. Zum einen ergeben, durch die geringen TNT-Konzentrationen der Extrakte der realkontaminierten Böden, geringe absolute Fehler bereits größere prozentuale Fehler wie die gleichen Abweichungen bei den dotierten Böden mit höheren Konzentrationen. Die höhere Wiederfindungsrate an TNT in den dotierten Böden lässt sich zum anderen damit begründen, dass im Rahmen der Bodenalterung eine

verstärkte Festlegung von Inhaltsstoffen, also auch TNT, im Boden beobachtet wird (Schachtschabel *et al.*, 1989; Hatzinger und Alexander, 1995; Durner, 2002). Hierbei handelt es sich zum Beispiel um einen natürlichen Um- oder Abbau von TNT durch Mikroorganismen (Fuller und Manning, 1997; Semple *et al.*, 2001; Sung *et al.*, 2004), wobei sich die entsprechenden Produkte mittels HPLC nachweisen lassen (Reifenrath *et al.*, 2002). Die in dieser Arbeit mittels HPLC detektierten Metabolite des TNTs sind in der Tabelle 3.9 mit dargestellt. Aus diesen Ab- und Umbauprozessen ergibt sich aber auch, dass die in den Extrakten der realkontaminierten Böden vorkommenden nitroaromatischen Verbindungen Beeinflussungen des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor besaßen, diese aber, wie aus Kapitel 3.1.2.1 hervorgeht, nicht quantifizierbar waren. Die Festlegung der Kontaminationen in gealterten Böden bedeutet weiter, dass realkontaminierte Böden weniger toxisch sind, als künstlich dotierte Bodenproben (Dodard *et al.*, 2003; Ribidoux *et al.*, 2003), womit sich die im Gesamten höhere Hemmung des CT-Biosensors bei den Extrakten der dotierten Böden im Vergleich zu den Extrakten der realkontaminierten Böden weiter erklären lässt.

An dieser Stelle ist ein systembedingter Unterschied zwischen den chromatographischen Messungen mittels HPLC und den biosensorischen Messungen mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor ersichtlich. Während die HPLC jede Substanz in einem Extrakt, entsprechend ihrer Absorptionseigenschaften aufzutrennen vermag, lassen sich die gleichen Substanzen mit dem Biosensor nur zusammen als Summenparameter der Gesamttoxizität erfassen. Dieser Unterschied zeigt aber auch an, dass es nicht direkt zu erwarten war, dass sich die nach HPLC und Biosensorik ermittelten TNT-Konzentrationen entsprechen. Beide Systeme erfüllen aber dennoch die Aufgabe eines Analyse-Systems, die realen Gegebenheiten darzustellen (Durner, 2002), wenn auch mit unterschiedlichen Aussagen: als einzelne Konzentration bei der HPLC und als gesamte Toxizität beim CT-Biosensor.

Des Weiteren wurde beschrieben, dass gebundenes TNT in Böden zu 40 % nicht mit organischen Lösungsmitteln löslich ist (Pfortner *et al.*, 1998), was auch auf eine verringerte Löslichkeit in Wasser rückschließen lässt. Auch ist beschrieben, dass die höchste Wiederfindungsrate von TNT bei dotierten Böden 2 Stunden nach der Dotierung erreicht wird (Reifenrath *et al.*, 2002). Dies weist ebenfalls darauf hin, dass in den dotierten Böden noch keine starke Bindung von TNT an die Bodenmatrix vorliegt. Um eine feste Bindung an die Bodenmatrix zu gewährleisten, sind vor allem mikrobielle Vorgänge nötig (Schachtschabel *et al.*, 1989), deren Umsatz erst nach einiger Zeit quantifizierbar ist (Fuller und Manning, 1997; Northcott und Jones, 2000). Als Resultat dieser Vorgänge ergaben sich die mit den beiden

Mess-Systemen festgestellten Unterschiede in den Wiederfindungsraten zwischen dotierten und realkontaminierten Böden.

Die unterschiedlichen Wiederfindungsraten an TNT innerhalb einer jeden Bodensorte können über eine hohe struktur- und physikochemische Heterogenität in Böden (Schachtschabel *et al.*, 1989; Northcott und Jones, 2000; Püttmer, 2003) begründet werden. Für die Unterschiede in den realkontaminierten Böden lassen sich vor allem die geringe Mobilität von TNT (Gerth *et al.*, 2000) und die damit verbundene heterogene Verteilung in den Böden (Durner, 2002), heranziehen. Daraus folgt, dass sich bei den in dieser Arbeit verwendeten mengenmäßigen Zusammensetzungen bei der Extraktion auf der Grundlage von 15-20 g realkontaminierten Boden plus 30-40 ml Wasser, immer im Verhältnis 1:2, keine statistisch homogene Verteilung der Kontamination TNT erreichen ließ. Daraus ergaben sich in den angefertigten Extrakten TNT-Konzentrationen, die untereinander stark abwichen. Der Einsatz größerer Mengen war jedoch aufgrund des begrenzten Probenmaterials und einer angestrebten, ausreichenden Anzahl an Wiederholungen nicht möglich. Bei den dotierten Böden waren diese Unterschiede zwischen den einzelnen Böden nicht zu beobachten, da für jeden angefertigten Extrakt erst der Boden eingewogen wurde und anschließend mit der entsprechenden Menge an TNT dotiert wurde. Darauf folgend wurde der gesamte Boden für die Extraktion verwendet. Somit war das Verhältnis von Boden zu TNT immer genau definiert. Für die, wenn auch geringen Abweichungen in diesen Extrakten müssen dann wieder die bereits erwähnten strukturellen Unterschiede in den jeweiligen Böden verantwortlich gemacht werden.

#### **4.4 Einfluss der Bodenmatrix auf die TNT-Wiederfindungsraten aus artifiziellen und realkontaminierten Böden**

Als Erstes ließ sich in allen Extraktionsversuchen feststellen, dass keine 100%ige Wiederfindung der enthaltenen nitroaromatischen Kontamination erreicht werden konnte. Eine völlige Extraktion von TNT wäre zwar wünschenswert gewesen, die eigentliche Frage in ökotoxikologischen Untersuchungen ist allerdings, welche Konzentration biologisch verfügbar ist (Calderbank, 1989). Nach Schachtschabel *et al.* (1989) und Hirner *et al.* (1998) ergibt sich mit wässrigen Extrakten die Konzentration, die ökotoxikologisch relevant ist. Somit konnte auf schärfere Extraktionsmethoden, die darüber hinaus den Biosensor beeinflusst hätten, verzichtet werden.

Im Folgenden ließ sich ein Einfluss der Bodenmatrix auf die TNT-Wiederfindungsrate in den durchgeführten Messungen, besonders bei den dotierten Böden, gut ersehen. Aus Abbildung 3.10 gehen die unterschiedlichen TNT-Wiederfindungsraten für die einzelnen dotierten Böden hervor, die sich in ihren durchschnittlichen Wiederfindungsraten untereinander

hochsignifikant unterschieden. Lediglich Grünland- und Ackerboden erreichten für die Unterscheidung nur ein Signifikanzniveau von 95 %, womit sich die TNT-Wiederfindungsraten in diesen beiden Böden nur wahrscheinlich unterscheiden. Eine mögliche Begründung hierfür liegt in der Tatsache, dass diese beiden Böden in den getesteten Parametern (Kohlenstoff, Stickstoff und pH) in ihren Ergebnissen immer relativ nahe aneinander lagen. Für alle getesteten Extrakte zeigte sich in der Gegenüberstellung der chromatographisch wie auch biosensorisch ermittelten TNT-Konzentrationen im Vergleich zur Dotierung die Wiederfindungsrate ansteigend, in der Reihenfolge Humusboden → Waldboden → Ackerboden → Grünlandboden → Sandboden für beide Systeme. Dabei ließen sich die Extrakte in den chromatographischen Messungen besser voneinander abgrenzen als mit dem CT-Biosensor.

Mit der in dieser Arbeit angewendeten Extraktionsmethode konnten in Acker-, Grünland- und Sandboden mehr als 40 % des verfügbaren TNTs aus den Böden extrahiert werden (s. Abb. 3.10), was nach Strong *et al.* (1999) die maximal extrahierbare Menge an TNT aus dotierten Böden darstellt.

Im Gegensatz zu den Aussagen in den dotierten Böden, standen die Ergebnisse der realkontaminierten Böden. Bei den realkontaminierten Böden konnte in Extrakten keine Abhängigkeit zwischen der Bodenprobe und der TNT-Wiederfindungsrate festgestellt werden (s. Abb. 3.20). Lediglich die Bodenprobe DEF ließ sich aufgrund ihrer hohen TNT-Wiederfindungsrate sichtlich von den anderen Böden unterscheiden. Signifikante Unterschiede waren aber nur bei den TNT-Wiederfindungsraten in den Extrakten der Proben GHI 2 und ABC 5 festzustellen.

Die ermittelten Unterschiede in den verschiedenen dotierten Böden lassen sich auf die schon in Abschnitt 3.5.3 beschriebene struktur- und physikochemische Heterogenität zurückführen (Northcott und Jones, 2000; Püttmer, 2003). Die dotierten Böden unterschieden sich durch die unterschiedlichen Herkunftsorte stark, wobei die Heterogenität innerhalb einer Probe eine weniger bedeutende Rolle spielte. Demgegenüber verhielten sich bei den realkontaminierten Böden gerade die Proben aus ABC, mit einem abgegrenzten, gleichen Herkunftsort, recht ähnlich bezüglich ihres TNT-Bindungsverhaltens. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass sich die Unterschiede der Böden aus ABC auf den (geringen) Humusgehalt und die Kontamination an TNT und dessen Metabolite beschränkten. Im Grundaufbau des Bodens entsprechen sich die Böden, da sie in ihrer Entstehung die gleiche Pedogenese durchlaufen haben. Unterschiede in ihren Bindungsfähigkeiten konnten somit aufgrund ihrer struktur- und physikochemischen Homogenität nicht gemacht werden.

#### **4.4.1 Einfluss des Kohlenstoff-/Stickstoffgehaltes auf die Wiederfindungsrate von TNT aus Böden**

Die für diese Arbeit verwendeten Böden, sowohl die für die Dotierung verwendeten wie auch die realkontaminierten, entsprachen in ihren Gehalten an Kohlenstoff und Stickstoff, (s. Tabelle 3.8 und 3.9) den in der Literatur beschriebenen Werten, im Rahmen natürlicher Schwankungen (Schachtschabel *et al.*, 1989; Püttmer, 2003; Stoeckel, 2003).

Aus den schon beschriebenen Unterschieden in den TNT-Wiederfindungsraten der dotierten Böden ergab sich für die Betrachtung des Einflusses von Kohlenstoff bzw. Humus und Stickstoff ein zu erwartendes Bild. So konnte eine starke Beziehung zwischen dem Kohlenstoff- bzw. Humusgehalt und der TNT-Wiederfindungsrate in den dotierten Böden festgestellt werden (s. Kapitel 3.5.3.1), wobei mit steigendem Gehalt an Humus in einem Boden die Wiederfindungsrate an TNT sank. Ebenso sank mit steigendem Stickstoffgehalt die Wiederfindungsrate an TNT in den dotierten Böden.

Bei den realkontaminierten Böden konnte sowohl für die Kohlenstoff- wie auch die Stickstoffgehalte beim geringsten Gehalt (DEF) stets die höchste Wiederfindungsrate und beim höchsten Gehalt (GHI 2) die geringste Wiederfindungsrate gefunden werden. In der Einzelbetrachtung aller Böden ließen sich die Proben aus ABC (1-6) nicht mit den anderen Proben in eine Beziehung bringen. So ließ sich einerseits die mittlere TNT-Wiederfindungsrate der ABC-Böden nicht von der der Proben aus GHI unterscheiden, andererseits zeigten aber auch die mittleren Gehalte von Kohlenstoff und Stickstoff keine signifikanten Unterschiede zur Bodenprobe aus DEF (s. Kapitel 3.6.3).

Die beobachteten Unterschiede können dadurch erklärt werden, dass in den realkontaminierten Böden abgelaufene Alterungsprozesse eine stärkere Bindung von Inhaltsstoffen an die Bodenmatrix verursachen (Durner, 2002). Biologische Aktivitäten beeinflussen die Bioverfügbarkeit, durch die in Kapitel 1.2.4 beschriebenen Reaktionen, wobei diese in der Regel einige Zeit benötigen, um einen messbaren Umsatz zu erreichen (Fuller und Manning, 1997; Northcott und Jones, 2000). Auch lassen sich die biologischen Prozesse nicht aus Böden entfernen (Sung *et al.*, 2004). Dadurch waren die dotierten Böden für die reine Betrachtung des Einflusses durch Humus auf die Wiederfindungsrate besser geeignet als die realkontaminierten Böden, die unter dem Einfluss obiger Faktoren standen.

Der bei den dotierten Böden beobachtete Anstieg der TNT-Wiederfindungsrate mit sinkender Humusrate steht in direktem Einklang mit den Aussagen der Literatur. Reifenrath *et al.* (2002) beschreiben, dass mit steigendem Humusgehalt die Wiederfindungsrate sinkt. Entsprechend zeigt sich auch die durch Humus veränderte Bioverfügbarkeit von TNT (Kördel und Hund,



1998; Hatzinger *et al.*, 2004), als sinkend mit steigendem Humusgehalt (Northcott und Jones, 2000). Die Bindung von TNT an den Humus (Kördel, 2001) im Boden hängt mit einer Vielzahl von Faktoren zusammen. So erweisen sich die Humusmoleküle im Boden als stark heterogen, wodurch sie in ihren (Bindungs-)Eigenschaften aber sehr multifunktional sind (Eschenbach *et al.*, 2001; Tipping, 2002) und wiederum auch unterschiedliche Sorptionseigenschaften besitzen (Baoshan und Pignatello, 1997; Perminova und Hatfield, 2005). Dabei besitzen Huminstoffe eine große geochemische Bedeutung durch ihre komplexierenden Eigenschaften (Püttmer, 2003), wobei die eigentliche Bindung von TNT und anderen nitroaromatischen Verbindungen an Humus kovalent erfolgt (Knicker, 2003). Bei der Bindung nitroaromatischer Substanzen an Humus besitzen enzymatische Änderungen der Humus-Monomere ebenso eine große Bedeutung (Wang *et al.*, 2002). Weiter wurde beschrieben, dass TNT an Humusfraktionen bindet, die eine negative Ladung aufweisen (Taha *et al.*, 1997). Dieses Verhalten geht wahrscheinlich auf die bei Kröger (2002) und Breitmaier und Jung (1986) beschriebene elektronenziehende Eigenschaft nitroaromatischer Verbindungen zurück. Als funktionelle Gruppen des Humus wurden vor allem Carboxyl-, Hydroxyl-, Methoxyl- und Aminogruppen beschrieben (Eschenbach *et al.*, 2001).

Neben der Bindung an Humus sind aber noch weitere Bindungssysteme von TNT in Böden möglich. So hängt die Bindungsfähigkeit der Bodenmatrix weiter auch vom Mineraltongehalt des Bodens, der Partikelgröße und der Heterogenität des Bodens ab (Weber *et al.*, 1992; Wolff-Boenisch *et al.*, 1996; Püttmer, 2003). Der Einfluss der Huminstoffe wird erst ab einem Gehalt von über 5 % als für Analysen relevant angesehen, unterhalb dieser Grenze kommt vor allem Tonen eine hohe Bedeutung zu (Vidal, 1995). Diese können, genau wie Humus, als Sorbens für TNT dienen (Michels, 2001). Je geringer also der Humusgehalt einer Probe, desto mehr Nitroaromaten binden an Ton (Wienberg, 1989). Die Bedeutung von Ton für die Sorption von TNT liegt in der großen Oberfläche sowie der Möglichkeit der Elektronen-Donator/Akzeptor-Komplexierung. Diese Effekte werden aber, analog zu den schon getroffenen Aussagen (s. o.), leicht durch organischen Kohlenstoff überlagert (Wolff-Boenisch *et al.*, 1996).

Da unter den realkontaminierten Böden nur die Proben aus GHI über Humusgehalte über 5 % verfügten, konnte kein Einfluss des Humusgehaltes auf die TNT-Wiederfindungsrate unter den realkontaminierten Bodenproben festgestellt werden. Zwar wies auch bei den Böden, die für die Dotierung verwendet wurden, nur der Humusboden einen Humusgehalt über 5 % auf; (35,12 % Humus +/-0,59 % SD), bei den verbliebenen Böden konnte aber eine Bindung von TNT über die enthaltenen Tone erreicht werden (Wienberg, 1989; Vidal, 1995; Michels,

2001). Per Definition besitzt Ton eine Korngröße von unter 0,002 mm, Sand hingegen eine Korngröße von 0,063 bis 2 mm (Schachtschabel *et al.*, 1989). Somit schließt sich schon per Definition ein hoher Tongehalt in einem Sandboden aus. Entsprechend fand sich bei dem hier verwendeten Sandboden, in Ergänzung zum geringen Humusgehalt und bedingt durch den fehlenden Ton, die höchste Wiederfindungsrate für dotiertes TNT bzw. die geringste Bindungsfähigkeit in den getesteten dotierten Böden. Beim Grünland- und Ackerboden, die aus dem Bonner Raum stammen, kann davon ausgegangen werden, dass sie über einen bestimmten Löss-Anteil verfügen. Dieser besitzt per Definition eine Tonfraktion von 10-25 % (Schachtschabel *et al.*, 1989). In diesen beiden Bodentypen kann also davon ausgegangen werden, dass eine Bindung des TNTs an den in den Böden enthaltenen Ton stattgefunden hat. Beim Waldboden mit einem Humusgehalt von 4,47 %, der ebenfalls aus dem Bonner Raum stammt, kann die Wiederfindungsrate an TNT über eine Ergänzung der Bindungseinflüsse von Ton und Humus erklärt werden. Somit erklärt sich, dass unter den dotierten Böden der Waldboden die zweithöchste Wiederfindungsrate hinter dem Humusboden feststellen ließ.

Ein Einfluss der Bodenmatrix auf die TNT-Wiederfindungsrate, in den realkontaminierten Böden konnte nicht direkt beobachtet werden, da unter den neun verwendeten Bodenproben sechs Proben, ABC 1-6, vom gleichen Standort stammten. Diese besitzen zwar unterschiedliche TNT-Konzentrationen wie auch Humusgehalte, aber bedingt durch die gemeinsame Pedogenese sollte bei diesen der enthaltene Tongehalt annähernd gleich sein. Somit fallen die Humusgehalte, die mit Gehalten von 1,44–2,62 % sehr nahe zusammen lagen, wie auch unterschiedliche Ton-Gehalte für eine Aussage über den Einfluss auf die TNT-Wiederfindungsrate nicht ins Gewicht.

Bei der Vielzahl an beschriebenen Bindungssystemen im Boden lassen sich nicht alle Bindungen von Nitroaromaten rein auf die beschriebenen Bindungen an Humus und Ton beschränken. Einige der Unterschiede in den vergleichenden Betrachtungen können evtl. auch auf van-der-Waals-Kräfte, elektrostatische Kräfte,  $\pi$ -Bindungen, Wasserstoffbrücken, Liganden-Austausch-Reaktionen, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen oder Chemisorption (Northcott und Jones, 2000) zurückgeführt werden.

Somit zeigte sich auch hier in diesem Zusammenhang, dass der Einfluss der Bodenmatrix auf die TNT-Wiederfindungsrate in den realkontaminierten Proben schwerer zu definieren war als in den dotierten Böden, da Alterungs- sowie biologische Ab- und Umbauprozesse einen großen Einfluss auf die Festlegung von nitroaromatischen Verbindungen in Böden besitzen. Ab- und Umbauprozesse werden vor allem durch die Interaktion von nicht gebundenen Kontaminationen, Bodenpartikeln, Wasser und Mikroorganismen beeinflusst (Volkering *et*

*al.*, 1998; Robertson und Jjemba, 2005), wobei die Bioverfügbarkeit weiter von Wasserhärte und organischen Inhaltstoffen abhängig ist (Akkanen und Kukkonen, 2001). Diese beeinflussen weiter die Extrahierbarkeit (Chung und Alexander, 1998).

Auch ließen sich in den dotierten Böden eher durch die Bodenmatrix bedingte Unterschiede feststellen, da diese ein wesentlich breiteres Spektrum unterschiedlicher Böden abdeckten als die realkontaminierten Böden.

Eine eher theoretische Überlegung kommt den angegebenen TNT-Konzentrationen in den realkontaminierten Böden zu, die von den Sanierern mit den Böden geliefert wurden. Zwar wurden diese Nitroaromaten-Konzentrationen von den Sanierern auf der Basis von Extraktionen mit organischen Lösungsmitteln gemessen, aber wie schon erwähnt, werden bei Extraktionen mit organischen Lösungsmitteln 40 % der Gesamtkonzentration an gebundenem TNT in Böden als unlöslich angesehen (Pfortner *et al.*, 1998). Dies kann auch hier durch die physikochemischen Eigenschaften der Böden erklärt werden. Somit sind auch bei den TNT-Konzentrationen der Sanierer bodenspezifische Wiederfindungsraten zu vermuten.

#### **4.4.2 Einfluss des pH-Wertes auf die TNT-Wiederfindungsraten aus Böden**

In der vorliegenden Arbeit konnte weder bei den dotierten, noch bei den realkontaminierten Bodenproben eine Abhängigkeit der TNT-Wiederfindungsraten von den pH-Werten der Proben gefunden werden (s. Abb. 3.15, Kap. 3.5.5; Abb. 3.23, Kap. 3.6.3.4). Hierbei zeigten sich auch keine Unterschiede in der Betrachtung der realen oder der potenziellen Acidität der Proben.

Die maximalen Aussagen, die bezüglich der pH-Werte getroffen werden können, dienen zur Abgrenzung der Böden auf der Basis ihrer pH-Werte. So ließen sich in den dotierten Proben Wald- und Grünlandböden mit niedrigeren pH-Werten von Acker-, Sand- und Humusböden signifikant unterscheiden. Bei den realkontaminierten Böden konnte man lediglich die Böden aus GHI, mit niedrigeren pH-Werten, von denen aus ABC und DEF signifikant abgrenzen.

Diese Aussagen, dass keine Beziehung zwischen pH-Wert und TNT-Wiederfindungsrate besteht, stehen auf den ersten Blick im Gegensatz zur Literatur, in der eine enge Beziehung zwischen beiden Größen beschrieben wird, wobei mit einem steigenden pH-Wert die Bindungsfähigkeit für TNT im Boden ebenfalls steigt (Michels, 2001) und somit die Wiederfindungsrate sinkt. Die Festlegung von TNT, abhängig vom pH-Wert, ließe sich dadurch erklären, dass Huminstoffe pH-induzierten Konformationsänderungen unterliegen, die ihr Bindungsverhalten ändern (Geller, 2001). Demnach kommt bei der pH-Abhängigkeit der TNT-Wiederfindungsrate bzw. der TNT-Bindungsrate im Boden dem Humusgehalt eine

besondere Bedeutung zu. Erst durch die Konformationsänderung der Humusfraktion kommt es zu der benannten Abhängigkeit von pH-Wert und TNT-Bindung. Da sich Humus aber als stark heterogen darstellt und viele multifunktionale Eigenschaften besitzt (Tipping, 2002; Perminova und Hatfield, 2005) sowie in dieser Arbeit unterschiedliche Böden verwendet wurden, die an sich schon als heterogen in ihren Eigenschaften angegeben werden müssen (Schachtschabel *et al.*, 1989; Northcott und Jones, 2000; Püttmer, 2003), kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Humusfraktionen sich als homogen genug zeigen würden, als dass eine Abhängigkeit der TNT-Wiederfindungsrate vom pH-Wert festgestellt werden könnte. Hierbei scheint auch vor allem die Huminsäure einen stärkeren Einfluss zu haben, da ein höherer Gehalt an Huminsäure (niedrigere pH) die Bioverfügbarkeit erhöht (geringere Bindungsfähigkeit) (Haderlein, 2001; Holman *et al.*, 2002).

In den Böden unterhalb von 5 % Humusanteil kommt, wie schon in Kapitel 4.3.1.1 beschrieben, dem Ton eine bedeutende Rolle zu (Wienberg, 1989; Vidal, 1995). Dadurch ließe sich die in dieser Arbeit gefundene Unabhängigkeit von pH-Wert und Wiederfindungsrate ebenso durch den geringen Humusgehalt erklären, der somit nur einen geringen Einfluss auf diese Abhängigkeit hat. Dadurch kommen anderen Bodenfraktionen, wie z. B. Tonen, größere Bedeutung in der TNT-Bindung zu. Für die Bindung des TNTs an die Tone ist wahrscheinlich ein Zusammenspiel der permanenten Ladung von Ton (Geo-Science, 2005) mit der elektronenziehenden Eigenschaft von nitroaromatischen Verbindungen (Breitmaier und Jung, 1986; Kröger, 2002) verantwortlich. Dies sowie der geringe Humusgehalt haben wahrscheinlich dazu beigetragen, dass eine pH-Abhängigkeit der TNT-Wiederfindungsrate weder in den dotierten, noch in den realkontaminierten Bodenproben festgestellt werden konnte.

#### **4.4.3 Abschließende Betrachtung des Bodenmatrix-Einflusses auf die Extrahierbarkeit von TNT**

Aus den dargestellten Punkten geht hervor, dass erst die zusammenfassende Betrachtung aller Bodenparameter erlaubt, die Extraktion von TNT aus Böden richtig zu erfassen (Halasz *et al.*, 2002). So zeigten zwar die dotierten Böden in den Vergleichen ihrer Bodeneigenschaften, zumindest in Bezug auf ihren Humusgehalt, eine gute Übereinstimmung mit den Beobachtungen in der Literatur. Die Aussagen der realkontaminierten Böden waren jedoch schwerer mit den Literaturangaben in Einklang zu bringen, da die betreffenden Parameter, bedingt durch die Grundvoraussetzung von realkontaminierten Böden, nicht standardisierbar waren.

Eine Vielzahl von Faktoren ist dafür verantwortlich, dass die Proben der dotierten Böden sich nicht mit den realkontaminierten Proben gleichsetzen lassen. So ist z. B. beschrieben, dass die Umsetzung von TNT zu anderen Verbindungen einige Tage in Anspruch nimmt (Fuller und Manning, 1997; Northcott und Jones, 2000). Damit zeigt sich, dass die Belastungen der dotierten Böden, in Bezug auf nitroaromatische Verbindungen, auf die alleinige Kontamination mit TNT zurückzuführen sind. In den realkontaminierten Böden kommen, wie in Tabelle 3.9 dargestellt, neben TNT noch weitere nitroaromatische Verbindungen vor. Die genauen Abbauwege von TNT im Freiland und unkontrollierbare biologische Prozesse sind dabei nicht bekannt (Esteve-Núñez *et al.*, 2001; Durner, 2002). Bekannt ist aber, dass bei der biologischen Sanierung der Böden der Umbau des TNTs eine wesentlich höhere Bedeutung hat, als der Abbau (Boopathy, 2000), und dass biologische Prozesse nicht aus Böden zu entfernen sind (Sung *et al.*, 2004). Somit ist davon auszugehen, dass alle realkontaminierten Böden, zumindest in einem gewissen Umfang, diese Prozesse durchlaufen mussten. Dabei wird in realkontaminierten Böden in der Regel als häufigstes Umbauprodukt, das kanzerogene Amino-Dinitrotoluol gebildet (Wang *et al.*, 2002; Banerjee *et al.*, 2003). Eine vollständige Mineralisierung von TNT in kontaminierten Böden erfolgt biologisch meist nicht (Hwang *et al.*, 2000), auch wenn Untersuchungen bei Fritsche *et al.* (2001) ergeben haben, dass nach 70 Tagen einer biologischen Bodenbehandlungen kein TNT mehr ausgewaschen werden kann. Bei einer aerob-anaerob-Behandlung von Böden erfolgt die Festlegung von TNT über kovalente, irreversible Bindungen von TNT an Amine/Amide, die auch mit 0,5 M HCl nicht lösbar sind (Achtlich, 2001).

Aus diesen Punkten ist somit ersichtlich, dass die TNT-Wiederfindungsraten in den dotierten Böden zwar vom Humusgehalt abhängig waren, wie in Kapitel 4.3.1.1 bereits ausführlich beschrieben, aber neben dieser einfachen Bindung von TNT an Humus (Kördel, 2001) auch noch eine Vielzahl weiterer Faktoren in die bioverfügbare TNT-Löslichkeit aus realkontaminierten Böden mit eingreifen (Chung und Alexander, 1998; Volkering *et al.*, 1998; Sunahara *et al.*, 1999; Akkanen und Kukkonen, 2001; Knicker und Müller, 2003; Robertson und Jjemba, 2005), wodurch hier Beziehungen zwischen TNT-Extraktion und Bodenart nicht ohne weiteres ersichtlich sind.

#### **4.5 Detektion von TNT auf der Basis der Oberflächen-Plasmon-Resonanz als biosensorisches Referenzsystem zum Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor und der HPLC**

Über den Anti-TNT-Antikörper-Assay konnte mit der SPR-Technik TNT erfolgreich nachgewiesen werden. Durch die kovalente Immobilisierung des Liganden TNB-BSA an der Sensoroberfläche mit der Aminkopplungsmethode (s. Kapitel 2.12.3) konnte eine reproduzierbare, mehrfach verwendbare Messfläche ohne Ligandenverluste erzeugt werden. Bisher wurden für die SPR-Biosensoren zum Nachweis von TNT über einen Anti-TNT-Antikörper-Assay nur nicht-kovalente Kopplungsmethoden für die Liganden beschrieben (Elkind *et al.*, 1999; Strong *et al.*, 1999). Bei Elkind *et al.* (1999) und Strong *et al.* (1999) wurden die Liganden durch einfaches Aufpipettieren auf die Goldoberfläche aufgelagert. Im Unterschied dazu konnte in dieser Arbeit eine Ligandenoberfläche hergestellt werden, die zum einen ohne Austausch von Liganden verlustfreie Messungen erlaubte und zum anderen auch in den gekoppelten Mengen an Ligand reproduzierbar war.

Auch bot die Möglichkeit der Temperaturregulation, die in dieser Arbeit verwendet wurde, einen großen Vorteil der hier durchgeführten Untersuchungen gegenüber bisher durchgeführten Messungen. Da die Methode der SPR stark durch geringe Änderungen der Temperatur beeinflusst werden kann (Strong *et al.*, 1999; Naimushin *et al.*, 2003), konnten hier Einflüsse durch die Temperatur, im Gegensatz zu den in der Literatur durchgeführten Messungen (Strong *et al.*, 1999), überwunden werden.

Im ersten Vergleich der Aussagen der Eichungen mittels HPLC, Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor und SPR waren systembedingte Unterschiede festzustellen. Während mit der HPLC über den gesamten Konzentrationsverlauf (1-100mg TNT/l) eine lineare Eichgerade erstellt werden konnte, konnte beim Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor nur bis 2 mg TNT/l einen linearen Verlauf gefunden werden. Oberhalb von 2 mg TNT/l zeigte sich hier ein logarithmischer Verlauf. Die Eichkurve der Oberflächen-Plasmon-Resonanz ergab, von 0,1-2,5 mg TNT/l, einen sigmoiden Verlauf. Neben dem Verlauf der Eichungen stellte sich in diesem Zusammenhang sehr deutlich dar, dass von allen drei Systemen die SPR den schmalsten Messbereich aufwies. Dieser war vorbestimmt durch die spezifischen Eigenschaften von Antikörpern. Durch die zwei Antigen-Bindungsstellen jedes Antikörpers ist dieser in der Lage, je zwei Antigene, hier TNT, zu binden (Stryer, 1987; Strong *et al.*, 1999). Dadurch wird der Messbereich der SPR-Anwendung stark eingegrenzt. TNT-Konzentrationen, die die doppelte molare Konzentration des Antikörpers übersteigen, können nicht quantifiziert werden. Höhere Konzentrationen an TNT-Antikörper würden aber neben

einer höheren, maximal messbaren TNT-Konzentration zu einer geringeren Sensitivität führen (Strong *et al.*, 1999), da durch den indirekten Nachweis systembedingt nicht die Bindung des TNT-Antikörpers an das TNT, sondern an das TNB-BSA an der Chipoberfläche gemessen wurde. Hätte man höhere Konzentrationen an TNT-Antikörper verwendet, so hätten auch höhere Konzentrationen an TNT aufgebracht werden müssen, um den gleichen messbaren Effekt zu erzeugen wie in der dargestellten Methode. Zwar würde sich auf diese Weise die maximal quantifizierbare TNT-Konzentration, entsprechend der Konzentrationserhöhung des TNT-Antikörpers erhöhen, gleichzeitig wäre aber auch eine Abnahme der Sensitivität zu erwarten (Strong *et al.*, 1999). Daneben ist auch zu berücksichtigen, dass bei einem indirekten Mess-Verfahren vor allem der Antikörper den entscheidenden Kostenfaktor darstellt. Eine Änderung der Antikörper-Konzentration hat somit auch einen direkten Einfluss auf die Kosten eines solchen Mess-Systems.

Im Vergleich der Systeme zeigte sich bei den dotierten Böden, dass hier große Unterschiede in den TNT-Wiederfindungsraten zwischen den Messungen der HPLC und denen der SPR vorlagen. Mit der HPLC konnten deutlich höhere Wiederfindungsraten ermittelt werden als mit dem SPR-Biosensor, wobei, bis auf den Humusboden, die Wiederfindungsraten bei den einzelnen Bodenextrakten signifikant zwischen den Systemen unterschieden werden konnten. Auch erzeugten die undotierten Böden Matrixeffekte auf den SPR-Biosensor. Solche biologischen Effekten können mit der HPLC nicht nachgewiesen werden. Diese Matrixeffekte können durch Beeinflussung der Messungen durch andere, in der Bodenmatrix enthaltene Stoffe erklärt werden. Arbeiten von Strong *et al.* (1999), Zeck *et al.* (1999) und Shankaran *et al.* (2005) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass neben nitroaromatischen Verbindungen auch Pestizide und Dünger zu Kreuzreaktionen mit TNT-Antikörpern führen und somit in der SPR zu Falschaussagen führen können. Da mittels der HPLC in den undotierten Böden keine Nitroaromaten festgestellt werden konnten, sind die Beeinflussungen der SPR wahrscheinlich auf Matrixeffekte der undotierten Böden zurückzuführen. Um diesen Einfluss der Bodenmatrix auf den SPR-Sensor zu eliminieren wurden die undotierten Bodenextrakte als Kontrolle der dotierten Bodenextrakte verwendet und von diesen abgezogen (s. Kapitel 3.7.2). Auch die Messungen mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor stellten eine, wenn auch geringe Beeinflussung der photosynthetischen Elektronentransportkette durch die Extrakte der undotierten Böden fest. Dennoch ließen sich die Ergebnisse des CT-Biosensors durchgehend besser mit denen der HPLC in Korrelation bringen als die des SPR-Biosensors.

Bei den dotierten Böden konnten mit dem Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor deutlich höhere TNT-Konzentrationen in den Extrakten detektiert werden als mit dem SPR-Biosensor. Eine mögliche Begründung liegt in der Tatsache, dass die Messungen der SPR, im Gegensatz zu HPLC und CT-Biosensor, nur auf der Basis von einem einzigen Extrakt je Boden beruhen, da messungsbedingt nicht mehr Proben untersucht werden konnten, unter anderem aufgrund des Antikörperbedarfs bei der SPR-Messung. Auch muss beachtet werden, dass die Proben, die mittels SPR gemessen wurden, vor den Versuchen aus dem Milieu der HPLC- und CT-Biosensor-Messungen in den PBS-Puffer der SPR-Messungen überführt werden mussten. Zwar erwies die Messung von TNT in dieser Pufferlösung mittels SPR als prinzipiell möglich, die Aussagen lassen sich aber nicht ohne Weiteres auf Böden übertragen, da hier auch im Zusammenspiel mit den nitroaromatischen Kontaminationen weitere Reaktionen ablaufen können, die eine Messung mit der SPR entsprechend einschränken.

In den Messungen der realkontaminierten Böden waren die Unterschiede zwischen der SPR und den beiden anderen Mess-Systemen nicht so ausgeprägt. So konnten im Vergleich der realkontaminierten mit den dotierten Böden größere Übereinstimmungen zwischen den beiden biosensorischen Mess-Systemen bei den realkontaminierten Böden gefunden werden. Die Übereinstimmungen dürften in der Hauptsache daran liegen, dass die in den realkontaminierten Böden enthaltenen Konzentrationen sehr gering waren. Weiter gilt es zu berücksichtigen, dass andere nitroaromatische Verbindungen neben TNT einen nachgewiesenen nicht reproduzierbaren Einfluss auf den CT-Biosensor besitzen (Kap. 3.1.2.1) sowie die Bodenmatrix eine Beeinflussung auf die SPR-Methodik zeigt (Kap. 3.7.2.1). Diese Beobachtungen haben zur Folge, dass in den Proben der realkontaminierten Böden Unterscheidungen zwischen beiden biosensorischen Systemen durch erhöhte Standardabweichungen erschwert wurden bzw. nicht möglich waren.

In der Betrachtung der einzelnen Ergebnisse der drei Systeme im Nachweis von TNT-Kontaminationen in Bodenextrakten erwies sich die HPLC als das sensitivste System von allen dreien, das zudem auch noch eine genaue qualitative und quantitative Bestimmung der Kontaminationen zulässt. Aussagen über das ökotoxikologische Potenzial einer Bodenprobe konnten aber weder mit der HPLC noch mit dem SPR-Biosensor, im Gegensatz zum CT-Biosensor, getroffen werden. Letzterer wiederum zeigte sich, schon bedingt durch den integrativen Charakter von Biosensoren (Frische und Höper, 2003), als wesentlich besser für diese Aufgabe geeignet, zumal die Ausrichtung der mit ihm durchgeführten Messungen auf die ökotoxikologische Relevanz ausgelegt ist. Die beiden biosensorischen Systeme unterscheiden sich stark auf der Ebene ihrer biologischen Einheit. So stellt sich der SPR-



Biosensor zwar als Antikörper-basierendes System als sehr sensitiv in diesem Bereich, jedoch auch, wie bereits beschrieben, anfälliger gegenüber Matrixeffekten als die Chloroplasten-Thylakoide des CT-Biosensors dar. Die Ergebnisse des SPR-Antikörper-Biosensors können rein auf der Ebene der Antikörper-Bindung erhalten werden, während die Ergebnisse des CT-Biosensors über die phytotoxische Wirkung der nitroaromatischen Verbindungen auf die Thylakoidmembranen erhalten werden können. Vor allem aber stellt sich der CT-Biosensor in seinem gesamten Aufbau wesentlich kostengünstiger heraus als die SPR-Methodik, sowohl in den Kosten für eine Messung, bedingt durch den Antikörperverbrauch bei der SPR, wie auch in den Kosten für die jeweils benötigten Messgeräte.

Weitere Vorteile des CT-Biosensors gegenüber dem SPR-Biosensor sind die einfachere Handhabung sowie die Feldtauglichkeit. Ein großes Problem innerhalb der Feldtauglichkeit der SPR stellt die Temperatur-Regulation dar, die bei der SPR-Methodik für stabile Werte essenziell ist (Strong *et al.*, 1999; Naimushin *et al.*, 2003). Das feldtaugliche SPR-System, das bei Naimushin *et al.* (2003) beschrieben wird, soll dies zwar ermöglichen, ist aber momentan noch nicht frei käuflich. Auch stellt sich das dort angegebene System in seinen weiteren SPR-Spezifikationen entsprechend den Geräten von Elkind *et al.* (1999) und Strong *et al.* (1999) dar, welche nicht denen des in dieser Arbeit verwendeten BIAcore 3000<sup>®</sup> gleichkommen, z. B. in der Weise der Oberflächenpräparation.

Es ist allerdings auch anzumerken, dass die Ergebnisse der SPR auf Messungen eines einzigen Extraktes jeder Bodensorte beruhen (Boden ABC 5 wurde konzentrationsbedingt nicht mit vermessen). Weiteren Messungen stand u. a. der Kostenfaktor des Antikörpers entgegen, was andererseits eine genauere Einschätzung der Ergebnisse erlaubt hätte.

Somit erwies sich der Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor als besser geeignet für den Nachweis von TNT aus Böden als der SPR-Biosensor, auf Basis eines Antikörper-Verdrängungsassays, wobei sich der CT-Biosensor auch durch die einfachere Handhabung auszeichnet. Zwar zeigt der SPR-Biosensor, bedingt durch die hohe Spezifität der Antikörper-Bindung, eine größere Möglichkeit der Identifizierung von TNT, auch wenn gewisse Kreuzreaktionen nicht ausgeschlossen werden können (Strong *et al.*, 1999; Zeck *et al.*, 1999; Shankaran *et al.*, 2005), aber lediglich der Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor ist von den hier getesteten Systemen in der Lage, das ökotoxikologische Potenzial einer Bodenprobe zu erfassen.

## **4.6 Vergleich des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors mit bestehenden Analyse-Systemen für Nitroaromaten**

Im Vergleich des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors mit anderen Analyse-Systemen sind diese vor allem in klassische bzw. chemische Analyse- sowie biosensorische Analyse-Verfahren zu unterscheiden.

### **4.6.1 Vergleich mit klassischen Analyse-Systemen**

Im Gegensatz zu dem verwendeten CT-Biosensor, dessen Ergebnisse ein „Screening“ der Gesamtoxizität darstellen, können sowohl über Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC), am Besten in Verbindung mit einem DAD-Detektor (Wasag-Decon, 2003), wie auch über Gas-Chromatographie (GC) mit unterschiedlichen Detektoren (Zeman Explosivstoffe, 2002A) die zu detektierenden Substanzen in ihrer Qualität wie auch Quantität bestimmt werden, vorausgesetzt die entsprechende Substanz kann über einen Standard identifiziert werden (Schmidt *et al.*, 1999). Die untere Nachweisgrenze der HPLC wird dabei in einem Bereich von 0,1-0,5 µg/l angegeben (Wasag-Decon, 2003). Unbekannte Stoffwechselwege der Nitroaromaten im Feld (Durner, 2002) sowie deren Ab- und Umbauprodukte können mit den klassischen analytischen Verfahren weder erkannt noch bewertet werden. Eine Auftrennungsmethode über zwei Chromatographie-Säulen, wie in der Methode 8330 der United States Environmental Protection Agency (USACE, 2003), erreicht zwar eine gute Auftrennung, erweist sich aber, genau wie andere klassische Analyseverfahren, als nicht feldtauglich. Ebenfalls als nicht feldtauglich stellt sich eine Methode dar, in der Sprengstoffe über Kernspin nachgewiesen werden (Röhrlich, 2002). Gleichsam sind Infrarot- und massenspektroskopische Messungen (Zeman Explosivstoffe, 2002A) ebenso wenig für den Feldeinsatz geeignet, wie die Sprengstoff-Detektion über die spezifischen H-C-N-O-Verhältnisse (Vourvopoulos und Womble, 2001) und die Messung spezifischer Abbauewege über C/N-Isotope (Coffin *et al.*, 2001). Über die Bindung von TNT an Silicium-Ketten (Muralidharan *et al.*, 2003) und eine damit verbundene Auslöschung von Photolumineszenz ist ein Nachweis im Bereich von 1 mg TNT/l Luft und 50 mg TNT/l Seewasser möglich (McDonalds *et al.*, 2001; Muralidharan *et al.*, 2003).

Im Gegensatz dazu sind auch feldtaugliche Systeme vorhanden. Einer der ältesten Schnelltests beruht auf der so genannten Janowsky-Reaktion, einer Farbreaktion auf der Basis der Bildung von Meisenheimer-Ionen aus der Reaktion von Nitroaromaten mit KOH, wobei Mengenaussagen mit dieser Methode nicht möglich sind bzw. einer Abschätzung unterliegen (Jenkins und Walsh, 1992; Gauger *et al.*, 2001). Eine Abwandlung hierzu findet sich bei Üzer

*et al.* (2004; 2005), die über die Reaktion mit NaOH je nach Sprengstoff unterschiedlich gefärbte Komplexe erhalten. Die untere Nachweisgrenze eines solchen Schnell-Tests wird je nach Bodenmatrix in einem Bereich von 10-50 mg/kg Boden angesehen (Wasag-Decon; 2003), Lu *et al.* (2002) geben für die Meisenheimer-Anionen eine Nachweisgrenze von 4-8 mg/l an. Weiter hat auch die Fraunhofer-Gesellschaft ein portables Verfahren zum Nachweis von TNT entwickelt, dessen Nachweisgrenze bei 0,1-1 mg/l angegeben wird. Auch die Messung von anderen Substanzen ist hierbei nach vorheriger Eichung möglich (Krausa, 2000; Gajovic-Eichelmann *et al.*, 2002). Als „Screening“-Verfahren geben Fu *et al.* (2005) ein elektrochemisches Verfahren auf der Basis der Reduktion von TNT zu TAT an, welches die Messung in Echtzeit ermöglicht und einen Nachweis im Bereich von 0,1 mg/l zulässt.

Die Nachweisgrenze des CT-Biosensors lag demgegenüber bei 0,648 mg TNT/l. Zwar zeigten sich einige Verfahren in einem geringeren Nachweisgrenzenbereich wie der CT-Biosensor, im Vergleich des CT-Biosensors zu den klassischen Verfahren liegt der entscheidende Unterschied aber in der Tatsache, dass anhand der klassischen Analytik keine Aussagen bezüglich des toxischen Potenzials getroffen werden können. Somit sind die meisten klassischen Verfahren auch als problematisch in der Risikoabschätzung anzusehen, wenn es sich um reale Proben handelt, da die Reaktionen von Kontaminationen mit der Umwelt nicht eindeutig abgeschätzt werden können (Rögener, 1998; Pennington und Brannon, 2002). Das Hauptproblem in dieser Beziehung liegt in der Tatsache, dass die entsprechenden Standards zum Vergleich vorhanden sein müssen. Bei der Feststellung des toxischen Potenzials einer Probe fallen die Einzelsubstanzen aber nicht ins Gewicht, bedeutend ist deren Wirkung. Weitere Nachteile in den klassischen Verfahren sind der hohe zeitliche und personelle Bedarf. Laboruntersuchungen von kontaminierten Böden benötigen bis zu einem Monat, was off-site durchgeführt, wiederum einen entsprechenden Kostenfaktor darstellt (Gauger *et al.*, 2001; Shriver-Lake *et al.*, 2003). Auch sind diese Verfahren größtenteils nicht feldtauglich. Weiter benötigen einige der sensitiven, klassischen Analyseverfahren, wie die HPLC, Lösungsmittel, um entsprechende Auftrennungen erreichen zu können. Diese stellen aber im Anschluss an eine Analyse wieder das Problem, dass, unabhängig von einer nachgewiesenen Kontamination, ein nicht zu unterschätzender Anteil an zu entsorgendem Abfall entsteht. Bei dem verwendeten CT-Biosensor entstehen, bedingt durch den gesamten Messungs- und Testaufbau, keine zusätzlichen zu entsorgenden Abfallstoffe. Dies gilt insbesondere deshalb, weil auch für die Extraktion der Böden in dieser Arbeit keine organischen Lösungsmittel Verwendung gefunden haben.

Einige Verfahren zeigen zwar eine Feldtauglichkeit, haben aber im Vergleich zum CT-Biosensor den Nachteil, dass sie sich nicht quantifizieren lassen, wie die Farbreaktion der Meisenheimer-Anionen (Jenkins und Walsh, 1992; Gauger *et al.*, 2001; Üzer *et al.*, 2004; 2005).

Auch wurden bei der Rüstungsalblast in Clausthal-Zellerfeld aus den bestehenden Punkten heraus die Sanierungsfortschritte über eine gemeinsame Betrachtung von chemischer Analytik mit biologischer Testbatterie und bodenökologischen Indikatoren bewertet (Warrelmann *et al.*, 2000; Bücking, 2002A; 2002B). On-site-Testsysteme gelten dabei als kostengünstiger als Off-Site-Systeme (Üzer *et al.*, 2004), was den Wunsch nach solchen Systemen unterstreicht (Jenkins und Walsh, 1992).

Damit stellt der CT-Biosensor im Vergleich zu den klassischen Verfahren einen kostengünstig einsetzbaren, feldtauglichen Sensor dar, der TNT über dessen ökotoxikologische Wirkung in einem guten, realen Nachweisbereich messen und quantifizieren kann.

#### **4.6.2 Vergleich mit biologischen Analyse-Systemen**

Die biosensorischen Methoden, die auf dem Gebiet der nitroaromatischen Verbindungen Anwendung finden, zeichnen sich, wie schon der CT- und der SPR-Biosensor, durch ihren integrativen Charakter aus (Frische und Höper, 2003). Auch bietet sich mit diesen Methoden oft die Möglichkeit, sowohl den hohen Zeit- wie auch Personalbedarf, der bei der klassischen Analytik meist benötigt wird, zu verringern (Hirner *et al.*, 1998), wobei „Mono-Spezies-Tests“ in der Regel zur toxikologischen Abschätzung von Kontaminationen dienen (Riepert, 1998). Angaben von Fuller und Manning (1997), dass Organismen erst ab einer Konzentration von 50 mg TNT/l auf diese Kontamination reagieren, sollen in den folgenden Beispielen widerlegt werden.

Einer der bekanntesten biologischen „Tests“ auf Sprengstoff ist die Anwendung von Spürhunden (Lorenzo *et al.*, 2003), wobei eine Quantifizierung der Sprengstoffmenge über diese Methode kaum möglich ist. Weiter sind für den Nachweis von Nitroaromaten auf dem biologischen Gebiet vor allem Immunoassays aufzufinden, die sich allerdings in der Art der Detektoren unterscheiden. Goldman *et al.* (2003) benutzen z. B. einen ELISA-Test mit einem TNT-Antikörper für den Nachweis in wässrigen Proben, wobei TNB als Antagonist für TNT fungiert. Unter dem Namen FAST 2000/Analyte 2000 wird bereits ein Durchfluss-Immunosensor-System vertrieben, das als Detektor das physikalische Prinzip der Wellenauslöschung benutzt, bei einer unteren Nachweisgrenze für TNT von 1 µg/l (Research

International, 2001). Gleichsam auf einem Immunoassay beruhende Systeme finden bei Dosch *et al.* (1998) und der United States Environmental Protection Agency (Methode 4050) (USACE, 2001) Anwendung. Hier werden Nachweisgrenzen von ~0,5 mg/l erreicht. Mittels eines Verdrängungsassays mit einem TNT-Antikörper erreichten Bakaltcheva *et al.* (1999) eine Nachweisgrenze von 5 µg TNT/l. Ciomasu *et al.* (2005) erreichen mit ihrem Immunosensor auf der Basis von Chemilumineszenz sogar eine Nachweisgrenze von 0,1 µg TNT/l. Und Charles *et al.* (2004) erreichen mittels eines Cy5-markierten TNB-Antikörpers eine Nachweisgrenze von 0,25 µg TNT/l. Mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern werden weiter Detektionen im µg/l Bereich beschrieben (Shriver-Lake *et al.*, 2003).

Somit konnten für einige biologische Sensorsysteme untere Nachweisgrenzen aufgezeigt werden, die unterhalb der des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors lagen. Hierbei gilt allerdings zu beachten, dass die Aussagen des CT-Biosensors vollkommen ohne die Inanspruchnahme von Aufkonzentrierungen entstanden sind, was demgegenüber in der Literatur oft der Fall war. So verwenden Bengtson Nash *et al.* (2005) zur Aufkonzentrierung ihrer Proben die SPE (solid phase extraction)-Methodik. Als Mess-System wurden dort ebenfalls die Chlorophyll-Fluoreszenz-Messungen mittels PAM-Technik verwendet, wobei allerdings Diatomeen als biologische Einheit dienten. Über die Verwendung von SPME (solid phase micro extraction) sind sogar Steigerungen um Faktor 450 möglich (Lu *et al.*, 2002). Allerdings müsste bei diesen Systemen für die Anwendung auf den CT-Biosensor eine Möglichkeit gefunden werden, die Messungsprobleme dieses Biosensors mit organischen Lösungsmitteln (s. Kapitel 3.3.1) zu überwinden. Neben der möglichen Verwendung einer Aufkonzentrierung ließen sich geringere Nachweisgrenzen des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors durch Variation im Pipetierschema (Tabelle 2.7) erreichen. Durch höhere Zugaben an wässrigem Standard, z. B. 50 % (1,5ml) statt 25 % (0,75ml) (s. Kap. 2.5.2), ließe sich die gleiche inhibierende Wirkung durch eine halb so hoch konzentrierte Standard-Lösung erreichen. Theoretisch ließe sich so die Zugabe an Standard bzw. auch der späteren wässrigen Proben auf bis zu 98,3 % des Gesamtvolumens in der Messkammer erhöhen und damit die untere Nachweisgrenze senken. Vor der Verwendung müsste der CT-Biosensor nur mit den entsprechenden Volumina geeicht werden. Die 25%ige Messkammerfüllung mit Probe / Standard wurde in dieser Arbeit verwendet, um Matrixeffekte wie auch eventuelle Eigenfluoreszenzen der Böden gering zu halten.

Betrachtet man des Weiteren die klassischen biologischen Testverfahren zum Nachweis von Kontaminationen aller Art, also auch von Nitroaromaten, so stellte sich heraus, dass diese sehr stark von den ausgewählten Testpflanzen abhängen. So werden dikotyle Pflanzen als

empfindlicher gegenüber einer nitroaromatischen Kontamination beschrieben als monokotyle Pflanzen (Gong *et al.*, 1999; Ribidoux *et al.*, 2003). Dabei konnten in Wachstumstests Nachweisgrenzen für TNT von z. B. 1,04 mg/kg Boden für Salat und von 55,9 mg/kg Boden für Gerste bestimmt werden (Gong *et al.*, 1999). Der Keimungstest mit Kresse gilt für ökotoxikologische Untersuchungen als gut verwendbar (Thomas *et al.*, 2004). Oberhalb von 200 mg TNT/kg Boden findet bei Kresse kein Wachstum mehr statt, Hafer hingegen toleriert bis 1.600 mg TNT/kg (Gong *et al.*, 1999). Bei der Auswertung solcher pflanzlichen Tests gilt, wenn eine Probe nicht phytotoxisch ist, dass diese auch als ungiftig angesehen wird (Thomas *et al.*, 2004). Vor allem ist bei solchen klassischen Tests ein wesentlich höherer Zeitbedarf einzurechnen (5-14 Tage) als beim CT-Biosensor (6 min). Die Verwendung von isolierten Thylakoidmembranen stellt darüber hinaus auch eine Loslösung von artspezifischen Unterschieden dar, da, je zellulärer / molekularer ein Testsystem aufgebaut ist, dessen Aussagen, bedingt durch die starke Verbreitung der biologischen Einheit, auf größere Bereiche/Pflanzenarten ausweitbar ist (Calow, 1989). Bei der Verwendung von Chloroplasten-Thylakoiden lassen sich also, aufgrund der ubiquitären Verbreitung in allen Pflanzen, auch die getroffenen Aussagen auf alle Pflanzen erweitern. Dies gilt vor allem auch aufgrund der Tatsache, dass artspezifische, zelluläre Anpassungen (Sitte *et al.*, 1992) an Schadstoffe durch die Isolation entfernt wurden.

In Bezug auf diese Ausführungen zeigte sich eine sehr interessante Arbeit bei Altamirano *et al.* (2004). Hier wurde über die PAM-Fluorometrie die Aktivität von Algen (Wildtyp und Mutante) gemessen, um anschließend auf eine TNT-Kontamination zu schließen. Dabei sollen Konzentrationen zwischen 0,5-31,3 mg TNT/l nachgewiesen worden sein. Die Ergebnisse von Altamirano *et al.* (2004) sind jedoch kritisch zu betrachten. So wurden dort Fluoreszenzen von Algen-Wildtypen mit solchen von auf TNT-wachsenden Algen-Mutanten verglichen. Sowohl Wildtyp wie auch Mutant sind Algen der Spezies *Dictyosphaerium chlorelloides*. Die Mutanten unterscheiden sich von den Wildtypen dadurch, dass sie in einem Medium mit 30 mg TNT/l nach einem Zeitraum von 5-90 Tagen noch überlebt haben, was als Selektionsgrundlage in der Arbeit von Altamirano *et al.* (2004) ausreichte. Daneben verwenden Altamirano *et al.* (2004) zum Vergleich nur die Fluoreszenz unter lightsättigenden Bedingungen ( $F_m'$ ) und nicht den Yield als Maß für die Aktivität der photosynthetischen Elektronentransportkette (Genty *et al.*, 1989). Die Fluoreszenzwerte, die dort mittels PAM-Fluorometern (PAM-2000) gemessen wurden, sind aber im Gegensatz zum Yield abhängig von der verwendeten Chlorophyll-Menge. In ihren Versuchen haben Altamirano *et al.* (2004) zwar die Anzahl der Algenzellen je Ansatz und Algentyp abgezählt, nur lässt sich daraus nicht

die Menge an Chlorophyll in einer Messung bestimmen, da diese je nach Individuum und Lichtbedingung unterschiedlich sein kann. Somit sind die Unterschiede in der Chlorophyllmenge zwischen Algen-Wildtyp (Probe) und Mutant (Kontrolle) nicht zu unterschätzen. Hier erweist sich die Arbeit von Bengtson Nash *et al.* (2005) als wichtig, in der schon Fluoreszenzunterschiede an einem Algentyp mit unterschiedlicher Licht-Vorgeschichte gemessen wurden. Dies gilt um so mehr, als dass die Mutanten nur durch Wachstum auf TNT-haltigem Medium selektiert wurden, der Anzuchtzeitraum aber variabel gestaltet war (5-90 Tage). In diesem Zusammenhang zeigen aber auch die Arbeiten von Bruns-Nagel *et al.* (1996) und Ribidoux *et al.* (2003), dass ein Wachstum von Organismen auf hohen TNT-Konzentrationen durch Abtöten des Testorganismus unterbleibt. Aussagen über die photosynthetische Aktivität der „TNT-resistenten Mutante“ werden bei Altamirano *et al.* (2004) nicht getroffen. Somit ergab sich zwar, dass der Nachweis von TNT mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen an Algen möglich sein sollte, jedoch ist die mit dem CT-Biosensor verwendete Methode der Betrachtung des Yields demgegenüber als wesentlich genauer anzusehen, da durch den Quotienten aus Formel 2.1 (s. Kapitel 2.3) die Chlorophyllmenge „herausgekürzt“ wird. Der Yield ist somit unabhängig von der Chlorophyllmenge. Unterschiede im Chlorophyllgehalt machen also bei der Betrachtung des Yields keinen Unterschied zwischen zwei Proben. Des Weiteren wird beim CT-Biosensor für alle Messungen die gleiche biologische Einheit verwendet, wodurch eine Vergleichbarkeit erreicht wird. Durch die Verwendung von Algen-Wildtyp und Mutanten kann bei der Arbeit von Altamirano *et al.* (2004) nicht von einer Vergleichbarkeit der biologischen Einheiten und damit der Daten gesprochen werden.

#### 4.7 Abschließende Beurteilung und Ausblick

Anhand der vorliegenden Daten kann also gesagt werden, dass das in dieser Arbeit verwendete Extraktionsverfahren nicht dazu geeignet ist, die tatsächliche, gesamte Konzentration an nitroaromatischen Kontaminationen aus Böden heraus zu lösen (s. Kapitel 3.5 und 3.6). Dennoch eignet sich dieses Verfahren sehr gut, um das mögliche Gefährdungspotenzial, das von einem mit Nitroaromaten kontaminierten Boden ausgeht, unter natürlichen Bedingungen abzuschätzen (Hirner *et al.*, 1998).

Im Vergleich zu anderen biosensorischen Systemen zeigte sich der Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor mit einer vergleichbar geringen Nachweisgrenze, darüber hinaus aber auch als feldtauglich, kostengünstig, schnell und einfach in der Handhabung. Auch konnten gute Übereinstimmungen in den Resultaten zur chemischen Referenz-Analyse mittels HPLC dokumentiert werden.

Aus den dargestellten Punkten lässt sich festhalten, dass sich der in dieser Arbeit verwendete Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor als durchaus in der Lage zeigte, die Rüstungsaltplast TNT in wässrigen Extrakten verlässlich nachzuweisen. Dennoch ist es nicht möglich, mit der in dieser Arbeit entwickelten Extraktionsmethode die Gesamt-TNT-Belastung eines Bodens herauszustellen, da die extrahierte Konzentration sich lösungsmittel- und bindungsbedingt auf die löslichen, damit bioverfügbaren und ökotoxikologisch relevanten Menge beschränkt.

Aufgrund der hohen Übereinstimmung der erzielten Ergebnisse des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors in Bezug auf TNT mit den Ergebnissen der HPLC sowie der Tatsache, dass TNT in den entsprechenden Gebieten die hauptsächliche nitroaromatische Kontamination darstellt, ließe sich dieser Biosensor dazu verwenden, in entsprechend kontaminierten Gebieten als „Screening“-Methode eingesetzt zu werden. Eine Beschränkung der Aussage durch eine Bodenbeeinflussung kann weitestgehend ausgeschlossen werden.

Eine mögliche Anwendung liegt vor allem auf dem Gebiet der Kartierung von TNT-Kontaminationen in einem Gebiet, da auf der einen Seite die Kontamination sehr inhomogen auftritt, auf der anderen Seite sowohl das Extraktionsverfahren wie auch der Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor sich als durchaus tauglich erweisen, eine größere Anzahl an Proben in einer relativ kurzen Zeit einem aussagefähigem „Screening“ zu unterziehen, um die ökotoxikologisch wirksame Konzentration an TNT zu ermitteln. Auch ein Einsatz in entsprechend kontaminierten Gewässerproben wäre nach weiterer Optimierung durchaus möglich. In Verbindung mit einer chemischen Analytik ließe sich somit abschließend die



umfassende Beurteilung der Kontaminationen einer Region sowohl ökotoxikologisch wie auch chemisch-analytisch vervollständigen.



## 5 Zusammenfassung

Für die menschliche Gesundheit bedeutet eine Exposition zu nitroaromatischen Verbindungen ein hohes Risiko, da bereits deutliche Gefährdungen für aquatische und terrestrische Systeme, inklusive Säugern, festgestellt werden konnten. Ihre toxische Wirkung wird bereits im  $\mu\text{g/l}$ -Bereich angesehen. So stellen sich Nitroaromaten als akut und chronisch toxisch heraus, zeigen mutagene und kanzerogene Wirkungen, die sich besonders in Schädigungen von Leber, Lunge und Hoden manifestieren und unter anderem Anämien, Leberfunktionsstörungen, Dermatitis, Leukozytose, neurologische Schäden und Impotenz auslösen können. Nach Angaben des Umweltbundesamtes geht man in Deutschland von ca. 3.500 Flächen aus, die mit Rüstungsaltslasten belastet sind, von denen durch Produktion und Abfüllung von Sprengstoff 70 Standorte als „stark kontaminiert“ gelten.

Aufgrund dieses Gefährdungspotenzials wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals die Eignung des Chloroplasten-Thylakoid-Biosensors (CT-Biosensor) als schnelles „Screening“-System zum Nachweis von nitroaromatischen Verbindungen, unter besonderer Berücksichtigung von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT), in Böden untersucht.

Der Einfluss der nitroaromatischen Verbindungen auf den CT-Biosensor wurde anhand der Hemmung des photosynthetischen Elektronentransports von Chloroplasten-Thylakoiden, mittels der physikalischen Messgröße Fluoreszenz durch die Puls-Amplituden-Modulationstechnik (PAM), erfasst. Als Vergleichsgröße wurde die aus den Fluoreszenz-Parametern bestimmte Aktivität der photosynthetischen Elektronentransportkette (Yield) verwendet. Durch die verwendete Messapparatur konnten sowohl Probe wie auch Kontrolle in einem Arbeitsschritt simultan gemessen werden, was die Möglichkeit zur einfachen und schnellen Anwendung dieses Systems im Feld unterstreicht.

Parallel zu diesen Untersuchungen diente die in der Analytik zum Nachweis von Nitroaromaten standardmäßig angewendete High-Performance-Liquid-Chromatographie (HPLC) als chemisches Referenz-System, um eine Einschätzung der mittels CT-Biosensor erhaltenen Ergebnisse zu gewährleisten.

Als ein biosensorisches Referenz-Verfahren wurde ein TNT-Antikörper-Assay, gekoppelt mit der Surface-Plasmon-Resonance (SPR) Technik, verwendet.

Durch die Einwirkung der nitroaromatischen Verbindungen auf den photosynthetischen Elektronentransport zeigte sich eine Verringerung der abgestrahlten Fluoreszenz der Chloroplasten-Thylakoide. Die Aktivität der photosynthetischen Elektronentransportkette wurde hierbei gegenüber der Kontrolle vermindert. Die Verringerung der Fluoreszenz kann wahrscheinlich auf die elektronenziehende Eigenschaft nitroaromatischer Verbindungen, die eine Entnahme von Elektronen aus dem PET bewirken, zurückgeführt werden.

Mit 0,65 mg TNT/l Wasser lag die für den CT-Biosensor ermittelte Nachweisgrenze zwar deutlich über der Nachweisgrenze der hier verwendeten HPLC (4,8 µg/l), sie liegt jedoch auch deutlich unterhalb der Richtwerte des Umweltbundesamtes, um, in Bezug auf den Nachweis von TNT-Konzentrationen in Böden, den Anforderungen zu genügen. Diese fordern je nach Art der Nutzung Prüfwerte zwischen 5–20 mg TNT/kg Boden sowie einen Vorsorgewert von 1 mg TNT/kg Boden.

Ein in dieser Arbeit entwickeltes kombiniertes Extraktionsverfahren für nitroaromatische Verbindungen aus Böden, bestehend aus Rühren und einer zeitgleichen Erwärmung auf 60 °C in wässriger Lösung, erwies sich als am besten geeignet, die ökotoxikologisch relevante Menge an TNT aus Böden herauszulösen und gleichzeitig biosensorisch verfügbar zu machen. Bedingt durch das Extraktionsverfahren in Wasser ohne Lösungsmittel, ergaben sich jedoch bodenabhängig große Unterschiede in der Wiederfindungsrate von TNT. Eine Lösung der Gesamt-TNT-Menge war über dieses Verfahren nicht zu erreichen.

Im Vergleich der gemessenen TNT-Konzentrationen in Extrakten kontaminierter Böden konnten zwischen CT-Biosensor und HPLC keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Dies gilt sowohl für Extrakte von dotierten wie auch von realkontaminierten Böden.

Im Vergleich der beiden biosensorischen Mess-Systeme, CT-Biosensor und Anti-TNT-Antikörper-Assay mittels SPR, zeigte sich der CT-Biosensor für den Nachweis von TNT als besser geeignet, was sich über den Vergleich mit der HPLC aufzeigen ließ. Darüber hinaus erweis sich der CT-Biosensor im Vergleich zur SPR als kostengünstiger und in einem breiteren Konzentrationsbereich anwendbar.

Zur Beurteilung des Einflusses der Bodenmatrix in den kontaminierten Bodenproben auf die TNT-Wiederfindungsrate diente die Untersuchung des Kohlenstoff- und Stickstoffgehaltes wie auch des realen und potenziellen pH-Wertes der verwendeten Böden. Die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften der Bodenmatrix auf die Beeinflussung der TNT-Wiederfindungsraten konnten in der vorliegenden Arbeit größtenteils bestätigt werden. Bei der Beurteilung der Böden in Bezug auf die Bodenmatrix zeigten sich die Wiederfindungsraten stark abhängig vom Humusgehalt der Böden. Mit steigendem Humusgehalt sanken die Wiederfindungsraten. Eine Abhängigkeit der Wiederfindungsrate vom pH-Wert ließ sich nur tendenziell finden, wobei diese gegenüber dem Humusgehalt eine zurückgestellte Bedeutung hat. Weiter zeigte sich, dass der Alterungsprozess der Böden, in der Unterscheidung von dotierten zu realkontaminierten Böden, erheblichen Einfluss auf die Wiederfindungsraten hatte.

Somit erwies sich das hier verwendete und in seinen Eigenschaften auf biosensorische Applikationen ausgerichtete Extraktionsverfahren zwar als nicht fähig, die Gesamt-TNT-Konzentration der Böden zu extrahieren, zur Risikoabschätzung des ökotoxikologisch relevanten Anteils an löslichem TNT zeigte es sich aber als geeignet.

Zusammenfassend kann der CT-Biosensor als schnelles, kostengünstiges und einfach zu handhabendes System besonders in wässrigen (Extrakt)-Proben sowie Grund- oder Oberflächenwasser aus TNT-kontaminierten Regionen zur Detektion von TNT eingesetzt werden. Zusammen mit der chemischen Analytik ergibt sich das Gesamtbild einer Kontamination an ökotoxikologischen Schadstoffen.



## 6 Literaturverzeichnis

- **Achtnich C.** (2001) Sanierung von TNT-kontaminiertem Boden durch Immobilisierung des Schadstoffes: Stabilität und Charakterisierung der Festlegung. Schriftenreihe Nr. 15 des IGB. [http://www.igb.fhg.de/PuPa/dt/Schriftenreihe/15\\_Achtnich.dt.html](http://www.igb.fhg.de/PuPa/dt/Schriftenreihe/15_Achtnich.dt.html)
- **Achtnich C. und Knackmuss H.-J.** (2000) Perspektiven der biologischen Elimination von Trinitroaromaten aus Rüstungsaltslasten. *Biospektrum*. Vol. 4: 271-273
- **Achtnich C., Lenke H., Klaus U., Spitteller M. und Knackmuss H.-J.** (2000) Stability of Immobilized TNT Derivates in Soil as a Funktion of Nitro Group Reduction. *Environmental Science and Technology*. Vol. 34 No. 17: 3698-3704
- **Agati G., Cerovic Z.G. und Moya I.** (2000) The Effect of Decreasing Temperature up to Chilling Values on the in vivo F685/F735 Chlorophyll Fluoreszenz Ratio in Phaseolus vulgaris and Pisum sativum: The Role of the Photosystem I Contribution to the 735 nm Fluoreszenz Band. *Photochemistry and Photobiology*. Vol. 72 No. 1:75
- **Akkanen J. und Kukkonen J.V.** (2001) Effects of water hardness and dissolved organic material on bioavailability of selected organic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 20 No. 10: 2303-2308
- **Altamirano M., Carcía-Villada L., Agrelo M., Sánchez-Martín L., Martín-Otero L., Flores-Moya A., Rico M., López-Rodas V. und Costas E.** (2004) A novel approach to improve specificity of algal biosensors using will-type and resistant mutants: an application to detect TNT. *Biosensors and Bioelectronics*. Vol. 19: 1319-1323
- **Bakaltcheva I.B., Ligler F.S., Patterson C.H. und Shriver-Lake L.C.** (1999) Multi-analyte explosive detection using a fiber optic biosensor. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 399: 13-20
- **Banerjee H., Hawkins Z., Dutta S. und Smoot D.** (2003) Effects of 2-amino-4,6-dinitrotoluene on p53 tumor suppressor gene expression. *Molecular and Cellular Biochemistry*. Vol. 252: 387-389

- **Baoshan X. und Pignatello J.J.** (1997) Dual-Mode Sorption of Low-Polarity Compounds in Glassy Poly(Vinyl Chloride) and Soil Organic Matter. *Environmental Science and Technology*. Vol. 37: 792-799
- **Bausinger T., Dehner U. und Preuß J.** (2004) Determination of mono-, di-, and trinitronaphthalenes in soil contaminated with explosives. *Chemosphere*. Vol. 57: 821-829
- **Belden J.B., Ownby D.R., Lotufo G.R. und Lydy M.J.** (2005) Accumulation of trinitrotoluene (TNT) in aquatic organisms: Part 2 – Bioconcentration in aquatic invertebrates and potential for trophic transfer to channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Chemosphere*. Vol. 58: 1161-1168
- **Beltz L.A., Neira D.R., Axtell C.A., Iverson S., Deaton W., Waldschmitt T.J., Bumpus J.A. und Johnston C.G.** (2001) Immunotoxicity of Explosives-Contaminated Soil Before and After Bioremediation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 40: 311-317
- **Bengtson Nash S.M., Schreiber U., Ralph P.J. und Müller J.F.** (2005) The combined SPE:ToxY-PAM phytotoxicity assay; Application and appraisal of a novel biomonitoring tool for the aquatic environment. *Biosensors and Bioelectronics*. Vol. 20: 1443-1451
- **Biacore AB** (1998) BIAtechnology Handbook, version AB. *BIAcore AB*. Uppsala, Sweden
- **Blotevogel K.-H. und Gorontzy T.** (1998) Detoxifikation durch Extraktion. <http://www.uni-oldenburg.de/biologie/ag/ag04/mikrobiologie/Status-Clausthal-1998.pdf>
- **Boopathy R.** (2000) Bioremediation of explosives contaminated soil. *International Bioremediation & Biodegradation*. Vol. 46: 29-36
- **Boopathy R.** (2002) Effect of Food-grade surfactant on bioremediation of explosives-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 92: 103-114
- **Boopathy R., Gurgas M., Ullian J. und Manning J.F.** (1998) Metabolism of Explosive Compounds by Sulfate-Reducing Bacteria. *Current Microbiology*. Vol. 37: 427-431
- **Boopathy R., Manning J. und Kulpa C.F.** (1997) Optimization of Environmental Factors for the Biological Treatment of Trinitrotoluene-contaminated Soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 32: 94-98



- **Bradbury M. und Baker N.R.** (1981) Analysis of the slow phases of the in vivo chlorophyll fluorescence induction curve. Changes in the redox state of photosystem II electron acceptors and fluorescence emission from photosystem I and II. *Biochim. Biophys. Acta*. Vol. 63: 542-551
- **Braedt M., Hörseljau H., Jacobs F. und Knolle F.** (2003) Zur Geschichte der „Entsorgungspfade“ der toxischen Abwasser der Sprengstofffabrik „Tanne“ in Clausthal-Zellerfeld. <http://home.t-online.de/home/detro/publika/uns-harz/47/23-27/tanne.htm>
- **Braedt M., Hörseljau H., Jacobs F. und Knolle F.** (2004) Die Sprengstofffabrik „Tanne“ in Clausthal-Zellerfeld. <http://www.hausarbeiten.de/faecher/hausarbeit/geo/3543.html>
- **Breitmaier E. und Jung G.** (1986) Organische Chemie I. *Georg Thieme Verlag*. Stuttgart, New York
- **Breitung J., Bruns-Nagel D., Steinbach K., Kaminski L., Gemsa D. und Löw E. von** (1996) Bioremediation of 2,4,6-Trinitrotoluene-contaminated soils by two different aerated compost systems. *Applied Microbiological Biotechnology*. Vol. 44: 795-800
- **Breuer H.** (1987) dtv Atlas zur Physik. *Deutscher Taschenbuch Verlag*. München
- **Bruns-Nagel D.** (1998) Mikrobiologische Sanierung von Rüstungsaltslasten. <http://www.med.uni-marburg.de/stpg/lt/umwelthyg/ruest01.htm>
- **Bruns-Nagel D., Breitung J., Löw E. von, Steinbach K., Gorontzy T., Kahl M., Blotevogel K.-H. und Gemsa D.** (1996) Microbial Transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene in Aerobic Soil Columns. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 62 No. 7: 2651-2656
- **Bücking H.** (2002A) Natural Attenuation (Selbstreinigung). <http://www.uft.uni-bremen.de/pflanzenanatomie/attenuation.htm>
- **Bücking H.** (2002B) Phytoremediation. <http://www.uft.uni-bremen.de/pflanzenanatomie/phytoremed.htm>
- **Calderbank A.** (1989) The occurrence and significance of bound pesticide residues in soil. *Reviews in Environmental Contamination and toxicology*. Vol. 108: 71-103
- **Calow, P.** (1989) The choice and implementation of environmental bioassays. *Hydrobiologia*. Vol. 188/189: 61-64

- **Campenhausen, J. von** (1998) Speisepilze und Bakterien sanieren sprengstoffverseuchte Böden. *Textarchiv der Berliner Zeitung* vom 15.04.1998. <http://www.berlinonline.de>
- **Charles P.T., Rangasammy J.G., Anderson G.P., Romanoski T.C. und Kusterbeck A.W.** (2004) Microcapillary reversed-displacement immunosensor for trace level detection of TNT in seawater. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 525: 199-204
- **Chung N. und Alexander M.** (1998) Differences in sequestration and bioavailability of organic compounds aged in dissimilar soils. *Environmental Science and Technology*. Vol. 32 No. 7: 855-860
- **Ciumasu I.M., Krämer P.M., Weber C.M., Kolb G., Tiemann D., Windisch S., Frese I. und Kettrup A.A.** (2005) A new, versatile filed immunosensor for environmental pollutants Development and proof of principle with TNT, diuron and atrazine. *Biosensor and Bioanalytics*. Vol. 21: 354-364
- **Clark L.C. und Lyons C.** (1962) Electrode Systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annual New York Academic Science*. Vol. 102: 29-45
- **Coffin R.B., Miyares P.H., Kelley C.A., Cifuentes L.A. und Reynolds C.M.** (2001) Stable Carbon and Nitrogen Isotope Analysis of TNT: Two-Dimensional Source Identification. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 20 No. 12: 2676-2680
- **Cohen W.S. und Baxter D.R.** (1990) Sulfhydryl Reagents and Energy-Linked Reactions in Monocot Thylakoids<sup>1</sup>. *Plant Physiology*. Vol. 98: 1005-1010
- **Dahn A. und Michels J.** (2001) 7. Biologische Bodensanierung in der Praxis. Erfahrungen am Beispiel der maßstabsgerechten Erprobung biologischer Sanierungsverfahren im „Werk Tanne“. Leitfaden „Biologische Verfahren zur Bodensanierung“ Bericht im Auftrag des BMBF, Kap. 7. *Verlag des Umweltbundesamtes: 445-472*
- **DAP** (2002) DAP-TM 17 Rev. 1.0 - Validierung von Prüfverfahren im Geltungsbereich des Scopes des SK-Chemie. *Deutsches Akkreditierungssystem Prüfwesen GmbH*.
- **Daun G., Lenke H., Reuss M. und Knackmuss H.-J.** (1998) Biological Treatment of TNT-contaminated Soil. 1. Anaerobic Cometabolic Reduction and Interaction of TNT and Metabolites with Soil Components. *Environmental Science and Technology*. Vol. 32 No. 13: 1956-1963

- **Davis E.P., Boopathy R. und Manning J.** (1997) Use of Trinitrobenzene as a Nitrogen Source by *Pseudomonas vesicularis* Isolated from Soil. *Current Microbiology*. Vol. 34: 192-197
- **DeEll J. und Toivonen P.M.A.** [Hrsg] (2003) Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology. *Kluwer Academic Publishers*. Boston, Dordrecht, London
- **Diamond D.** (1998) Principles of Chemical and Biological Sensors. Chemical Analysis. *Wiley-Interscience Publication*. New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto
- **Dodard S.G., Renoux A.Y., Powlowski J. und Sunahara G.I.** (2003) Lethal and subchronic effects of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) on *Enchytraeus albidus* in spiked artificial soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 54: 131-138
- **Dosch M., Weller M.G., Bückmann A.F. und Niessner R.** (1998) Homogeneous immunoassay for the detection of trinitrotoluene (TNT) based on the reaction of apoglucose oxidase using a novel FAD-trinitrotoluene conjugate. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. Vol. 361: 174-178
- **Drzyzga O., Bruns-Nagel D., Gorontzy T., Blotevogel K.-H. und Löw E. von** (1999) Anaerobic incorporation of radiolabeled explosive TNT and metabolites into the organic soil matrix of contaminated soil after different treatment procedures. *Chemosphere*. Vol. 38 No. 9: 2081-2095
- **Dua M., Singh A., Sethunathan N. und Johri A.K.** (2002) Biotechnology and Bioremediation: successes and limitations. *Applied Microbiological Biotechnology*. Vol. 59: 143-152
- **Durner W.** (2002) Elutionsverfahren vs. Perkolationsverfahren zur Mobilitätsabschätzung von sprengstofftypischen Verbindungen. *GAB-Altlastensymposium 15./16.07.2002*. Regensburg,
- **Eilers A., Rüngeling E., Stündl U.M. und Gottschalk G.** (1999) Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* DSM 3375 depends on cytochrome P-450. *Applied Microbiological Biotechnology*. Vol. 53: 75-80
- **Eisenträger A., Maxam G., Rila J.-P. und Dott W.** (1998) Respiratorische Aktivität der Bodenmikroflora als ein Kriterium für Bodenqualität – Stufenkonzept zur Bewertung von hoch mit organischen Verbindungen belasteten Böden. *Bodenökologie und Bodengenese*. Vol. 26: 1-12

- **Elkind J.L., Stimpson D.I., Strong A.A., Bartholomew D.U. und Melendez J.L. (1999)** Integrated analytical sensors: the use of the TISPR-1 as a biosensor. *Sensors and Actuators B*. Vol. 54: 182-190
- **Eriksson J. und Skyllberg U. (2001)** Binding of 2,4,6-Trinitrotoluene and its Degradation Products in a Soil Organic Matter Two-Phase System. *Journal of Environmental Quality*. Vol. 30: 2053-2061
- **Eschenbach A., Mescher H., Wienberg R. und Mahro B. (2001)** Humifizierung von Schadstoffen. Leitfaden „Biologische Verfahren zur Bodensanierung“ Bericht im Auftrag des BMBF, Kap. 2.2. *Verlag des Umweltbundesamtes*: 147-190
- **Esteve-Núñez A., Caballero A. und Ramos J.L. (2001)** Biological Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 65 No. 3: 335-352
- **Felt D.R., Larson S.L. und Valente E.J. (2002)** UV-VIS spectroscopy of 2,4,6-trinitrotoluene-hydroxide reaction. *Chemosphere*. Vol. 49: 287-295
- **French C.E., Nicklin S. und Bruce N.C. (1998)** Aerobic Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene by *Enterobacter cloacae* PB2 and by Pentaerythritol Tetranitrate Reductase. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 64 No. 8: 2864-2868
- **Frische T. (2002A)** Extraktionsmethoden von TNT-kontaminierten Bodenproben [Nach UFT] persönlich zugesendeter Ausdruck.
- **Frische T. (2002B)** TNT-kontaminierte Bodenproben und Bodeneluate. Persönliche Zusammenstellung mit Bodeninformationen zu den Proben aus GHI
- **Frische T. (2002C)** Screening for Soil Toxicity and Mutagenicity Using Luminescent Bacteria – A Case Study of the Explosive 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 51: 133-144
- **Frische T. (2003)** Ecotoxicological evaluation of in situ bioremediation of soils contaminated by the explosive 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Environmental Pollution*. Vol. 121: 103-113
- **Frische T. und Höper H. (2003)** Soil microbial parameters and luminescent bacteria assays as indicators for in-situ bioremediation of TNT – contaminated soils. *Chemosphere*. Vol. 50: 415-427

- **Fritsche W., Scheibner K. und Herre A. (2001)** Bioremediation von TNT-belasteten Böden mit Pilzen; Untersuchungen zur Metabolisierung, Mineralisierung und Humifizierung (TV3.4). Leitfaden „Biologische Verfahren zur Bodensanierung“ Bericht im Auftrag des BMBF, Kap. 9.2.6. *Verlag des Umweltbundesamtes*: 1-36
- **Fu X., Benson R.F., Wang J. und Fries D. (2005)** Remote underwater electrochemical sensing system for detecting explosive residues in the field. *Sensors and Actuators B*. Vol. 106: 296-301
- **Fuller M.E. und Manning jr. J.F. (1997)** Aerobic Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria Exhibit Differential Sensitivity to and Transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT). *Current Microbiology*. Vol. 35: 77-83
- **Gajovic-Eichelmann N., Bier F.F. und Fuhr G.R. (2002)** TNT (Trinitrotoluol)-Detektion aus Bodenproben. *Jahresbericht der Fraunhofer Gesellschaft 2002*: 55
- **Gauger P.R., Holt D.B., Patterson jr. C.H., Charles P.T., Shriver-Lake L. und Kusterbeck A.W. (2001)** Explosives detection in soil using a field portable continuous flow immunosensor. *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 83: 51-63
- **Geisler S. (1998)** Werk Tanne – Mahnmal und Rüstungsalzlast. [http://home.tu-clausthal.de/~insg/werk\\_tanne/werk\\_tanne.html](http://home.tu-clausthal.de/~insg/werk_tanne/werk_tanne.html)
- **Geller A. (2001)** Maßnahmen zur Steuerung der biologischen Aktivität und ihre Wirkungen (TV4.3.1). Leitfaden „Biologische Verfahren zur Bodensanierung“ Bericht im Auftrag des BMBF, Kap. 2,4. *Verlag des Umweltbundesamtes*: 235-258
- **Genty B.E., Briantais J.M. und Baker N.R. (1989)** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta*. Vol. 990: 87-92
- **Geo-Science (2005)** Kapitel IV: Physikalisch-Chemische Bodeneigenschaften. [http://www.hennig-online.net/benjamin/geo-science/Bodenkunde/4\\_physchem/start.html](http://www.hennig-online.net/benjamin/geo-science/Bodenkunde/4_physchem/start.html)
- **Gerth A., Böhler A., Eulerling B. und Thomas H. (2000)** Biologische in situ Sanierung TNT-kontaminierter Böden. *TerraTech* 4: 61-63. <http://www.wasag-decon.de/terratech.htm>
- **Goldman E.R., Hayhurst A., Lingerfelt B.M., Iverson B.L., Georgiou G. und Anderson G.P. (2003)** 2,4,6-Trinitrotoluene detection using recombinant antibodies. *Journal of Environmental Monitoring*. Vol. 5 No. 3: 380-383

- **Gong P., Wilke B.-M. und Fleischmann S. (1999)** Soil-Based Phytotoxicity of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) to Terrestrial Higher Plants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 36: 152-157
- **Gorontzy T., Küver J. und Blotevogel K.-H. (1993)** Microbial Transformation of Nitroaromatic Compounds under Anaerobic Conditions. *Journal of General Microbiology*. Vol. 139: 1331-1336
- **Gotthardt F. (2002)** Lager für kontaminierte Böden in Hessisch Lichtenau geht in Betrieb. *News aus der Entsorgungswirtschaft*. <http://www.abfallshop.de/news/aktuell.php?news-id=1162>
- **Gottwald W. (1993)** In: Gruber U., Klein W. [Hrsg.] RP-HPLC für Anwender. *VCH-Verlag*. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo
- **Graefe U. (2001)** Metabiotische Steuerung der Diversität im System Bodenbiozönose/Humusform. *Mitteilungen der Deutschen Bodenkundlichen Gesellschaft*. Vol. 95: 47-50
- **Haas R. und Kreysig D. (2002)** Photolytischer Abbau von Explosivstoffen in ausgewählten Wasserproben. <http://haas.purespace.de/F12.html>
- **Haderlein A., Legros R. und Ramsay B. (2001)** Enhancing pyrene mineralization in contaminated soil by addition of humic acids or composted contaminated soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 56: 555-559
- **Halasz A., Groom C., Zhou E., Paquet L., Beaulieu C., Deschamps S., Corriveau A., Thiboutot S., Ampelman G., Dubois C. und Hawari J. (2002)** Detection of explosives and their degradation products in soil environments. *Journal of Chromatography A*. Vol. 963: 411-418
- **Hannink A., Rosser S.J., French C.E., Basran A., Murray J.A.H., Nicklin S. und Bruce N.C. (2001)** Phytodetoxification of TNT by transgenic plants expressing a bacterial nitroreductase. *Nature Biotechnology*. Vol. 19: 1168-1172
- **Harbinson J. und Rosenqvist E. (2003)** An Introduction to Chlorophyll Fluorescence. In: DeEll J., Toivonen P.M.A. Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology. *Kluwer Academic Publishers*. Boston, Dordrecht, London
- **Harms V. (1994)** Physik für Mediziner und Pharmazeuten. *Harms Verlag*. Kiel-Mönkeberg

- **Hatzinger P.B. und Alexander M.** (1995) Effect of Aging of Chemicals in Soil and Their Biodegradability and Extractability. *Environmental Science and Technology*. Vol. 29: 537-545
- **Hatzinger P.B., Fuller M.E., Rungmakol D., Schuster R.L. und Steffan R.J.** (2004) Enhancing the attenuation of explosives in surface soils at military facilities: sorption-desorption isotherms. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 23 No. 2: 306-312
- **Hawari J., Beudet S., Halasz A., Thiboutot S. und Ampelman G.** (2000) Microbial degradation of explosives: biotransformation versus mineralization. *Applied Microbiological Biotechnology*. Vol. 54: 605-618
- **Helfrich, P., Chefetz, B., Hadar, Y., Chen, Y. und Schnabl H.** (1998) A Novel Method For Determining Phytotoxicity In Composts. *Compost Science and Utilization*. Vol. 6 No. 3: 6-13
- **Henke G.A.** (2002) Entwicklung der Altlastensanierung in Deutschland. Bodenbehandlung – Stand der Technik und neue Entwicklungen. *Fachtagung des Bayrischen Landesamtes für Umweltschutz*. Augsburg
- **Heredia P. und Rivas J. De Las** (2003) Fluorescence induction of Photosystem II membranes shows the steps till reduction and protonation of the quinone pool. *Journal of Plant Physiology*. Vol. 160 No. 12: 1499-1506
- **Hessisches Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft und Forsten** (2002A) Rüstungsalblast in Stadtallendorf. [http://www.mulh.hessen.de/umwelt/wasser\\_boden/bodenschutz/altlasten/altlasten\\_a6.htm](http://www.mulh.hessen.de/umwelt/wasser_boden/bodenschutz/altlasten/altlasten_a6.htm)
- **Hessisches Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft und Forsten** (2002B) Rüstungsalblast in Hessisch Lichtenau. [http://www.mulh.hessen.de/umwelt/wasser\\_boden/bodenschutz/altlasten/altlasten\\_a5.htm](http://www.mulh.hessen.de/umwelt/wasser_boden/bodenschutz/altlasten/altlasten_a5.htm)
- **Hessisches Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft und Forsten** [Hrsg.] (2000) Modellhafte Sanierung von Altlasten am Beispiel des TNT-Sanierungsprojektes Stadtallendorf/Hessen – Kurzfassung - *Hessisches Ministerium für Umwelt, Landwirtschaft und Forsten*
- **Heyser W. und Warrelmann J.** (2001) Forschungsschwerpunkt 2: Sanierung, Selbstreinigung, Melioration und Restaurierung. <http://www.uft.uni-bremen.de/sp02.htm>
- **HIM-ASG** (2002) Jahresbericht 2002 der HIM-GmbH – Bereich Altlastensanierung. *HIM-GmbH*. Weisbaden

- **Hirner A.V., Pestke F.M. und Busche U. (1998)** Konzepte zur Mobilitätsabschätzung von Schadstoffen in Boden und Abfallmaterialien. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*. Vol. 26: 226-229
- **Hock B., Fedtke C. und Schmidt R.R. (1995)** Herbizide – Entwicklung, Anwendung, Wirkung, Nebenwirkung. *Georg Thieme Verlag*. Stuttgart, New York
- **Holman H.-Y.N., Nieman K., Sorensen D.L., Miller C.D., Martin M.C., Borch T., McKinney W.R. und Sims R.C. (2002)** Catalysis of PAH Biodegradation by Humic Acids Shown in Synchrotron Infrared Studies. *Environmental Science and Technology*. Vol. 36: 1276-1280
- **Huhle B. (2004)** Bodenuntersuchung einer Sprengfläche im Pockautal. Studienarbeit an der TU Bergakademie Freiberg. [http://www.goek.tu-Freiburg.de/oberseminar/OS\\_03\\_04/beate\\_huhle.pdf](http://www.goek.tu-Freiburg.de/oberseminar/OS_03_04/beate_huhle.pdf)
- **Hundal L.S., Singh J., Bier E.L., Shea P.J., Comfort S.D. und Powers W.L. (1997)** Removal of TNT and RDX from Water and Soil using iron Metal. *Environmental Pollution*. Vol. 97 No. 1-2: 55-64
- **Hwang H.-M., Slaughter L.F., Cook S.M. und Cui H. (2000)** Photochemical and Microbial Degradation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) in Freshwater Environment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 65: 228-235
- **International Chemical Safety Cards (2002)** [www.cdc.gov/niosh/ipcsngrm](http://www.cdc.gov/niosh/ipcsngrm)
- **Jarvis A.S., McFarland V.A. und Honeycutt M.E. (1998)** Assessment of the Effectiveness of Composting for the Reduction of Toxicity and Mutagenicity of Explosive-Contaminated Soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 39: 131-135
- **Jenkins T.F. (1990)** Development of a Simplified Field Method for the Determination of TNT in Soil. *U.S.Army Cold Regions Research and Engineering Laboratory*, Special Report 90. Vol. 38
- **Jenkins T.F. und Walsh M.E. (1992)** Development of Field Screening Methods for TNT, 2,4-DNT and RDX in Soil. *Talanta*. Vol. 39: 419-428
- **Johnson M.S., Franke L.S., Lee R.B. und Holladay S.D. (1999)** Bioaccumulation of 2,4,6-Trinitrotoluene and Polychlorinated Biphenyls Through Two Routes of Exposure in a Terrestrial Amphibian: Is the Dermal Route Significant. *Toxicology and Chemistry*. Vol. 18 No. 5: 873-878



- **Khachatryan G.E., Mkrtchyan N.I., Simonyan N.V., Khachatryan T.V. und Tatikyan S.Sh (2000)** Two unidentified aerobic bacterial strains that transform 2,4,6-trinitrotoluene. *World Journal of Microbiology and Biochemistry*. Vol. 16: 393-395
- **Khan T.A., Bhadra R. und Hughes J. (1997)** Anaerobic transformation of 2,4,6-TNT and related nitroaromatic compounds by *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biochemistry*. Vol. 18: 198-203
- **Knicker H. (2003)** Incorporation of  $^{15}\text{N}$ -TNT transformation products into humifying plant organic matter as revealed by one- and two-dimensional solid state NMR spectroscopy. *The Science of the Total Environment*. Vol. 308: 211-220
- **Knicker H. und Müller P. (2003)** Binding of trinitrotoluene (TNT) to water extractable humus. *Environmental Chemistry Letters*. Vol. 1: 121-125
- **Kördel W. (2001)** Bodenextraktionsverfahren zur Bewertung des ökotoxikologischen Potentials von Böden. Teil A Entwicklung und Erprobung eines Verfahrens zur Herstellung von Bodeneluaten für die chemische Analytik und ökotoxikologische Tests (TV4.4). Leitfaden „Biologische Verfahren zur Bodensanierung“ Bericht im Auftrag des BMBF, Kap. 9.3.5. *Verlag des Umweltbundesamtes*: 1-29
- **Kördel W. und Hund K. (1998)** Untersuchungsstrategie zur Erfassung des Grundwassergefährdungspotentials durch kontaminierte Böden. *Bodenökologie & Bodengenese*. Vol. 26: 86-99
- **Krausa M. (2000)** TNT-Sensor - Nase für explosive Böden. [http://www.ict.fhg.de/deutsch/projects/means/tnt\\_sensor.html](http://www.ict.fhg.de/deutsch/projects/means/tnt_sensor.html)
- **Kröger M. (2002)** Bilanzierung eines kombinierten biologisch-chemischen Abbaus von  $^{14}\text{C}$ -2,4,6-Trinitrotoluol (TNT). Dissertation. <http://ubdata.uni-paderborn.de/ediss/13/2002/kroeger/disserta.pdf>
- **Lanno R., Wells J., Conder J., Bradham K. und Basta N. (2004)** The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicological and Environmental Safety*. Vol. 57: 39-47
- **Larcher W. (1994)** Ökophysiologie der Pflanzen 5. Auflage. *Verlag Eugen Ulmer*. Stuttgart
- **Larson S.L., Weiss C.A., Escalon B.L. und Parker D. (1999)** Increased extraction efficiency of Acetonitrile/Water mixtures for explosives Determination in Plant Tissues. *Chemosphere*. Vol. 38 No. 9: 2153-2162

- **Lawlor D.W.** (1990) Photosynthese. *Georg Thieme Verlag*. Stuttgart, New York
- **Lenke H., Warrelmann J., Daun G., Hund K., Sieglen U., Walter U. und Knackmuss H.-J.** (1998) Biological Treatment of TNT-contaminated Soil. 1. Biologically Induced Immobilization of Contaminants and Full-Scale Application. *Environmental Science and Technology*. Vol. 32 No. 13: 1964-1971
- **Liou M.-J., Lu M.-C. und Chen J.-N.** (2004) Oxidation of TNT by photo-Fenton process. *Chemosphere*. Vol. 57: 1107-1114
- **Lohöfer H.** (2003) Mathematische und statistische Hilfsmittel für Pharmazeuten. Fachbereich Mathematik und Informatik der Philipps-Universität Marburg. <http://www.mathematik.uni-marburg.de/lohöfer/pharma/pharma.html>
- **Lorenzo N., Wan T.L., Harper R.J., Hsu Y.-L., Chow M., Rose S. und Furton K.G.** (2003) Laboratory and field experiments used to identify *Canis lupus var. familiaris* active odor signature chemicals from drugs, explosives , and humans. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Vol. 376: 1212-1224
- **Lu Q., Collins G.E., Smith M. und Wang J.** (2002) Sensitive capillary electrophoresis microchip determination of trinitroaromatic explosives in nonaqueous electrolyte following solid phase extraction. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 469: 253-260
- **Mandl J.R.** (2002) Stand der Technik bei der off-site-Bodenbehandlung. Bodenbehandlung – Stand der Technik und neue Entwicklungen – 11.Juni 2002. BayLfU Fachtagung 2002. *Bayrisches Landesamt für Umweltschutz*. Augsburg
- **Marinovic V., Ristic M. und Dostanic M.** (2005) Dynamic adsorption of trinitrotoluene on granular activated carbon. *Journal of Hazardous Materials B*. Vol. 117: 121-128
- **Maxwell K. und Johnson G.N.** (2000) Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 51 No. 345: 659-668
- **McDonald K., Trogler W. und Sailor M.** (2001) USCD Chemists develop tiny silicon wires to detect trace residues of explosives. <http://ucsdnews.ucsd.edu/newsrel/science/mctnt.htm>
- **Mehrvar M., Bis C., Scharer J.M., Moo-Young M. und Luong J.H.** (2000) Fiber-optic Biosensors – Trends and Advances. *Analytical Sciences*. Vol. 16: 677-692

- **Merz D., Geyer M., Moss D.A. und Ache H.-J.** (1996) Chlorophyll fluorescence biosensor for the detection of herbicides. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. Vol. 354: 299-305
- **Meyns B., Wiele T. Van De, Doujami F., Marlé C., Sloovere A. De, Wiele K. Van De, Fant F. und Verstraete W.** (2002) Remediation of TNT-contaminated soils by anaerobic proteinaceous immobilisation. *Water, Air and Soil Pollution*. Vol. 138: 37-49
- **Michels J.** (2001) Nitroaromaten (Schwerpunkt TNT). Leitfaden - Biologische Verfahren zur Bodensanierung; Bericht im Auftrag des BMBF, Kap. 9.2.6. *Verlag des Umweltbundesamtes*: 127-146
- **Mohr H. und Schopfer P.** (1978) Lehrbuch der Pflanzenphysiologie. *Springer Verlag*. Berlin, Heidelberg, New York
- **MSI Marketing Research for Industry** (2002) Altlastenerkundung und -sanierung in Deutschland. *MSI-Verlag*.
- **Muralidharan G., Wig A., Pinnaduwege L.A., Hedden D., Thundat T. und Lareau R.T.** (2003) Adsorption-desorption characteristics of explosive vapors investigated with microcantilevers. *Ultramicroscopy*. Vol. 97: 433-439
- **Myszka D.G.** (1999) Improving biosensor analysis. *Journal of molecular recognition*. Vol. 12: 279-284
- **Nahen M., Bahnemann D., Dillert R. und Fels G.** (1997) Photocatalytic degradation of trinitrotoluene: reductive and oxidative pathways. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. Vol. 110: 191-199
- **Naimushin A.N., Soelberg S.D., Bartholomew D.U., Elkind J.L. und Furlong C.E.** (2003) A portable surface plasmon resonance (SPR) sensor system with temperature regulation. *Sensors and Actuators B*. Vol. 96: 253-260
- **Nam K. und Kim J.Y.** (2002) Role of loosely bound humic substances and humin in the bioavailability of phenanthrene aged in soil. *Environmental Pollution*. Vol. 118: 427-433
- **Northcott G.L. und Jones K.C.** (2000) Experimental approaches and analytical techniques for determining organic compound bound residues in soil and sediment. *Environmental Pollution*. Vol. 108: 19-43
- **Nultsch W.** (1996) Allgemeine Botanik. *Georg Thieme Verlag*. Stuttgart, New York
- **Oetjen G.-W.** (1997) Gefriertrocknung. *VCH-Verlagsgemeinschaft*. Weinheim

- **Oh B.-T., Sarath G. und Shea P.J. (2001)** TNT nitroreductase from *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from TNT-contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry*. Vol. 33: 875-881
- **Oh S.-Y., Cha D.K., Kim B.J. und Chiu P.C. (2002)** Effects of Adsorption to elemental Iron on the Transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene and Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine in Solution. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 21 No. 7: 1384-1389
- **Opresko D.M. (2001)** Toxicity Summary for 2,4,6-Trinitrotoluene. [http://risk.lsd.ornl.gov/tox/profiles/2\\_4\\_6\\_trinitrotoluene\\_c\\_V1.shtml](http://risk.lsd.ornl.gov/tox/profiles/2_4_6_trinitrotoluene_c_V1.shtml)
- **Ownby D.R., Belden J.B., Lotufo G.R. und Lydy M.J. (2005)** Accumulation of trinitrotoluene (TNT) in aquatic organisms: Part I – Bioconcentration and distribution in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Chemosphere*. Vol. 58: 1153-1159
- **Pasti-Grigsby M.B., Lewis T.A., Crawford D.L. und Crawford R.L. (1996)** Transformation of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) by Actinomycetes Isolated from TNT-Contaminated and Uncontaminated Environments. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 62 No. 3: 1120-1123
- **Patel N., Cardoza V., Christensen E., Rekapalli B., Ayalew M. und Stewart jr. N.C. (2004)** Differential gene expression of *Chlamydomonas reinhardtii* in response to 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) using microarray analysis. *Plant Science*. Vol. 167: 1109-1122
- **Pennington J.C. und Brannon J.M. (2002)** Environmental fate of explosives. *Thermochimica Acta*. Vol. 384: 163-172
- **Perminova I.V. und Hatfield K. (2005)** Remediation Chemistry of Humic Substances : Theory and Implications for Technology. In Perminova et al. [Hrsg] Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: From Theory and Practice. *Springer Verlag*. Berlin, Heidelberg, New York: 3-36
- **Pfortner P., Weller M.G. und Niessner R. (1998)** Detection of bound nitroaromatic residues in soil by immunoassay. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. Vol. 360: 781-783
- **Podola B. und Melkonian M. (2003)** A long-term operating algal biosensor for rapid detection of volatile toxic compounds. *Journal of Applied Physiology*. Vol. 15: 415-424

- **Podola B., Nowack E.C.M. und Melkonian M.** (2004) The use of multiple algal sensor chips for the detection and identification of volatile organic compounds. *Biosensors and Bioelectronics*. Vol. 19: 1253-1260
- **Popp P.** (2003) wissenschaftlicher Mitarbeiter der Firma Walz, Eiffeltrich, persönliches Gespräch
- **Psillakis E., Naxakis G. und Kalogerakis N.** (2000) Detection of TNT-contamination in spiked-soil samples using SPME and GC/MS. *Global Nest: The International Journal*. Vol. 2 No. 3: 227-236
- **Püttmer S.** (2003) Entfernung von Schwermetallen aus kontaminierten Böden und anschließende Aufarbeitung der anfallenden Extraktionslösungen. Dissertation. <http://tumb1.biblio.tu-muenchen.de/publ/ch/2003/puetmer.pdf>
- **Rascher U., Liebig M. und Lüttge U.** (2000) Evaluation of instant light-response curves of chlorophyll fluorescence parameters obtained with a portable chlorophyll Fluorometer on site in the field. *Plant, Cell and Environment*. Vol. 23: 1397-1405
- **Regener M. und Mekiffer B.** (1998) Belastungen und Gefährdungspotentiale urbaner Böden. *Bodenökologie & Bodengenese*. Vol. 26: 3-22
- **Reifenrath W.G., Kammen H.O., Palmer W.G., Major M.M. und Leach G.L.** (2002) Percutaneous Absorption of Explosives and Related Compounds: An Empirical Model of Bioavailability of Organic Nitro Compounds from Soil. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Vol. 182: 160-168
- **Research International** (2001) Chem-Bio Products. <http://www.nbcindustrygroup.com/reseinte.htm>
- **Ribidoux P.Y., Bardai G., Paquet L., Ampelman G., Thiboutot S., Hawari J. und Sunahara G.I.** (2003) Phytotoxicity of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) and Octahydro-1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5,7-Tetrazocine (HMX) in Spiked Artificial and Natural Forest Soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 44: 198-209
- **Ribidoux P.Y., Hawari J., Thiboutot S., Ampelman G. und Sunahara G.I.** (1999) Acute Toxicity of 2,4,6-Trinitrotoluene in Earthworm (*Eisenia andrei*). *Ecotoxicology and Environmental Savety*. Vol. 44: 311-321
- **Richter G.** (1988) Stoffwechselphysiologie der Pflanzen, 5. Auflage. *Thieme Verlag*. Stuttgart, New York

- **Riepert F.** (1998) Ökotoxikologische Testverfahren für die Prüfung der Bodenqualität am Beispiel aktueller Richtlinien mit Organismen der Bodenfauna. *Bodenökologie und Bodengene*. Vol. 26: 1-12
- **Robertson B.K. und Jjemba P.K.** (2005) Enhanced bioavailability of sorbet 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by bacterial consortium. *Chemosphere*. Vol. 58: 263-270
- **Rodriguez-Mozaz S., Marco M.-P., Lopez M.J. de Alda und Barceló D.** (2004) Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: a review article. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Vol. 378: 588-598
- **Rögner W.** (1998) Räumkommando Flowerpower. *Die tageszeitung*. <http://www.taz.de/pt/1998/08/08/a0217.nf/text>
- **Röhrlich D.** (2002) Mit einer Hightech-Spürnase auf Minenjagd. Forschung aktuell des Deutschlandfunks. <http://www.dradio.de/cgi-bin/es/neuforschak/26806.html>
- **Rosenqvist E. und Kooten O. van** (2003) Chlorophyll Fluorescence: A General Description and Nomenclature. In: DeEll J., Toivonen P.M.A. [Hrsg] Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology. *Kluwer Academic Publishers*. Boston, Dordrecht, London
- **Schachtschabel P., Blume H.-P., Brümmer G., Hartge K.-H. und Schwertmann U.** (1989) Lehrbuch der Bodenkunde. *Ferdinand Enke Verlag*. Stuttgart
- **Schatten A.** (1999) Statistik für Chemiker ein "Kochbuch". <http://131.130.57.239/scripten/EDV/stat/Statistik%20fuer%20Chemiker.pdf>
- **Scheller F. und Schubert F.** (1989) Biosensoren. *Birnenhäuser Verlag*. Basel, Boston, Berlin
- **Schmidt T., Steinbach K., Buetehorn U., Volkwein U. und Stork G.** (1999) Synthesis of reference substances for highly polar metabolites of nitroaromatic compounds. *Chemosphere*. Vol. 38 No. 13: 3119-3130
- **Schmidt T.C., Steinbach K., Löw E. von und Stork G.** (1998) Highly polar metabolites of nitroaromatic compounds in ammunition wastewater. *Chemosphere*. Vol. 37 No. 6: 1079-1090
- **Schnabl H.** (1991) Schadstoffe in Gewässern. Biologische Indikatoren und ihre Anwendung. In: Huber, M. [Hrsg] Umweltkrise. *Wiss. Buchgesellschaft*. Darmstadt

- **Schnabl H. und Trapmann S. (2001)** Biomonitor systems derived from thylakoids for the detection of phytotoxic substances. In: Hock, B., M. Bahadir, H.-J. Collins [Hrsg.]. Bioresponse-linked instrumental analysis. Teubner Reihe Umwelt, *B.G. Teubner Verlag*. Stuttgart, Leipzig, Wiesbaden
- **Schnabl H. und Youngmann R.Y. (1987)** A characterization of the effects of ecotoxicological substances on plant cell metabolic reactions. *Angewandte Botanik*. Vol. 61: 493-504
- **Schreiber U. (1986)** Detection of rapid induction kinetics with a new of high high-frequency modulated chlorophyll fluorescence. *Photosynthesis Research*. Vol. 9: 261-272
- **Schreiber U. und Bilger W. (1993)** Progress in chlorophyll research: Major development during the past years in retrospect. *Progress in Botany*. Vol. 54: 151-173
- **Schreiber U., Bilger W. und Neubauer C. (1994)** Chlorophyll Fluorescence as a Nonintusive Indicator for rapid Assessment of In Vivo Photosynthesis. *Ecophysiology of Photosynthesis*. Vol. 100: 49-70
- **Schreiber U., Müller J., Haugg A. und Gardemann R. (2002)** New type of dual-channel PAM chlorophyll fluorometer for highly sensitive water toxicity biotests. *Photosynthesis Research*. Vol. 74: 317-330
- **Schreiber U., Walz H. und Kolbowski J. (2003)** Propagation of spatial variations of chlorophyll fluorescence parameters in dandelion leaves induced by spot laser heating. *PAM News*. Vol. 01. <http://www.pam-news.com>
- **Schulten C. (2001)** Qualitätskriterien phenolhaltiger Lebensmittel auf der Basis biosensorischer Methoden. Diplomarbeit am Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn.
- **Schulz O. (2000)** Vergleich des Chloroplastenthylakoid-Biosensor mit Standardverfahren zur Substratanalyse. Diplomarbeit am Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Universität Bonn.
- **Semple K.T., Reid B.J. und Fermor T.R. (2001)** Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Pollution*. Vol. 112: 269-283
- **Shankaran D.R., Gobi K.V., Sakai T., Matsumoto K., Toko K. und Miura N. (2005)** Surface plasmon resonance immunosensor for highly sensitive detection of 2,4,6-trinitrotoluene. *Biosensor and Bioelectronics*. Vol. 20: 1750-1756

- **Sharma S.K., Sehgal N. und Kumar A. (2003)** Biomolecules for development of biosensors and their applications. *Current Applied Physics*. Vol. 3: 307-316
- **Shriver-Lake L.C., Charles P.T. und Kusterbeck A.W. (2003)** Non-aerosol detection of explosives with a continuous flow immunosensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. Vol. 377: 550-555
- **Sitte P., Ziegler H., Ehrendorfer F. und Bresinsky A. (1992)** Strasburger – Lehrbuch der Botanik. *Gustav Fischer Verlag*. Stuttgart, Jena, New York
- **Sluys J., Levsen K. und Rakel K. (2000)** Pilotversuch zur Aufarbeitung von explosivstoff-verunreinigtem Grundwasser mit neuem extraktiven Verfahren. *Wasser, Luft und Boden*. Vol. 9: 70-71
- **Son H.-S., Lee S.-J., Cho I.-H. und Zoh K.-D. (2004)** Kinetics and mechanism of TNT degradation in TiO<sub>2</sub> photocatalysis. *Chemosphere*. Vol. 57: 309-317
- **Steinbach (2003)** Chromatographie. *Katalog der Firma Macherey und Nagel*. Düren
- **Stoeckel. (2003)** Klassifizierung von Böden nach DIN 18 196. <http://www.ing-stoeckel.de/erarbeiten/bodenarten.html>
- **Strong A.A., Stimpson D.I., Bartholomew D.U., Jenkins T.F. und Elkind J.L. (1999)** Detection of trinitrotoluene (TNT) extracted from soil using a surface plasmon resonance (SPR)-based sensor platform. *SPIE – The international Society for Optical Engineering, Aerosense XIII, Proceeding*. September
- **Stryer L. (1987)** Biochemie. *Spektrum Akademischer Verlag GmbH*. Heidelberg, Berlin, Oxford
- **Sunahara G.I., Dodard S., Sarrazin M., Paquet L., Hawari J., Greer C.W., Ampelman G., Thiboutot S. und Renoux A.Y. (1999)** Ecotoxicological Characterization of Energetic Substances Using a Soil Extraction Procedure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Vol. 43: 138-148
- **Sung K., Corapcioglu M.Y. und Drew M.C. (2004)** Plant aided bioremediation in the vadose zone: model development and applications. *Journal of contaminant Hydrology*. Vol. 73: 65-98
- **Sung K., Munster C.L., Rhykerd R., Drew M.C. und Corapcioglu M.Y. (2002)** The Use of Box Lysimeters with Freshly Contaminated Soils To Study the Phytoremediation of Recalcitrant Organic Contaminants. *Environmental Science and Technology*. Vol. 36: 2249-2255



- **Taha M.R., Soewarto I.H., Acar Y.B., Gale R.J. und Zappi M.E. (1997)** Surfactant Enhanced Desorption of TNT from Soil. *Water, Air and Pollution*. Vol. 100: 33-48
- **Thomas H., Gerth A., Eulerling B. und Böhler A. (2004)** Neue Erkenntnisse zur biologischen in-situ Sanierung TNT kontaminierter Böden [http://www.wasag-decon.de/insitu\\_n.htm](http://www.wasag-decon.de/insitu_n.htm)
- **Tipping E. (2002)** Cation Binding by Humic Substances. Cambridge Environmental Chemistry Series 12. *Cambridge University Press*, Cambridge
- **Totsche K.U., Jann S. und Kögel-Knabner I. (2003)** Natürliches Selbstreinigungsvermögen in der ungesättigten Bodenzone PAK kontaminierter Anthropogener Standorte. Symposium zum Bayrischen Forschungsvorhaben „Nachhaltige Altlastenbewältigung unter Einbeziehung des natürlichen Reinigungsvermögens“ 10. und 11. November 2003. *Landesamt für Umweltschutz*. Augsburg
- **Tran Minh Canh (1993)** Biosensors. *Chapman & Hall*. London, Glasgow, New York, Melbourne, Madras
- **Trapmann S. (1999)** Bestimmung von Herbizid-Kontaminationen durch einen Thylakoidsensor: Optimierung und Charakterisierung der biologischen Einheit. Dissertation am Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- **Turner A.P.F. (2000)** Biosensors - Sense and Sensitivity. *Science*. Vol. 290. No. 5495: 1315-1317
- **UFT (1999)** Verlagerung von TNT im Boden. <http://www.bodenkunde.uni-bremen.de/profiltnt.htm>
- **Umweltbundesamt (2003)** Praxisleitfaden für die systematische Untersuchung eines Rüstungsalblastverdachtsstandortes: Probenaufarbeitung. <http://umweltbundesamt.de/altlast/web1/berichte/leitfaden/leitfa34.htm>
- **Umweltbundesamt (2004)** Anlage 6: Schwellenwerte für rüstungsspezifische Stoffe im Boden und Grundwasser. <http://umweltbundesamt.de/altlast/web1/berichte/leitfaden/leitfa42.htm>
- **Umwelt-online (2003)** Bestimmung der Ökotoxizität/C.18. Adsorption/Desorption nach einer Schüttelmethode. [http://www.umwelt-online.de/recht/eu/65\\_69/vc18a.htm](http://www.umwelt-online.de/recht/eu/65_69/vc18a.htm)

- **Uni-Oldenburg** (2005) . <http://www.uni-oldenburg.de/biochemie/bilder/surface.plasmon.resonance.jpg.htm>
- **USACE** (2001) United States Army Corps of Engineers EPA Method 4050 – Screening Procedure to Determine TNT Explosives in Water and Soil by Immunoassay. <http://www.crrel.usace.army.mil/techtransfer/products/pepmanual/method4050.html>
- **USACE** (2003) United States Army Corps of Engineers EPA Method 8330 – Determination of concentration of nitroaromatics and nitroamines by high-performance liquid chromatography (HPLC). <http://www.crrel.usace.army.mil/techtransfer/products/pepmanual/method8330.html>
- **Üzer A., Erçağ E. und Apak R.** (2004) Selective spectrophotometric determination of trinitrotoluene, trinitrophenol, dinitrophenol and mononitrophenol. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 505 : 83-93
- **Üzer A., Erçağ E. und Apak R.** (2005) Selective spectrophotometric determination of TNT in soil and water with dicyclohexylamine extraction. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 534 No. 2: 307-317
- **Vasilyeva G.K., Kreslavski V.D. und Shea P.J.** (2002) Catalytic oxidation of TNT by activated carbon. *Chemosphere*. Vol. 47: 311-317
- **Vasilyeva G.K., Kreslavski V.D., Oh B.-T. und Shea P.J.** (2001) Potential of activated carbon to decrease 2,4,6-Trinitrotoluene toxicity and accelerate soil decontamination. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 20 No. 5: 965-971
- **Vidal C.** (1995) Abbauverhalten von Explosivstoffen in Böden – mikrobiologischer und photochemischer Abbau. <http://www.vidal-online.de/diplomarbeit.html>
- **Volkering F., Breure A.M. und Rulkens W.H.** (1998) Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Bioremediation*. Vol. 8: 401-417
- **Vorbeck C., Lenke H., Fischer P., Spain J.C. und Knackmuss H.-J.** (1998) Initial Reductive Reactions in Aerobic Microbial Metabolism of 2,4,6-Trinitrotoluene. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 64 No. 1: 246-252
- **Vourvopoulos G. und Womble P.C.** (2001) Pulsed Fast/Thermal Neutron Analysis: A Technique for Explosives Detection. *Talanta*. Vol. 54: 459-468
- **Walz** (2003) Produktinformationen. <http://www.walz.com>

- **Wang C.-J., Thiele S. und 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. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 42: 1-8
- **Warrelmann J., Koehler H., Frische T., Dobner I., Walter U. und Heyser W. (2000)** Erprobung und Erfolgskontrolle eines Phytoremediationsverfahrens zur Sanierung Sprengstoffkontaminierter Böden (Teil I): Konzeption und Einrichtung eines Freilandexperiments –Zusammenfassung-. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung*. <http://www.scientificjournals.com/sj/php/sjAbstract.php?ArtikelId=3064>
- **Wasag-Decon (2003)** Probennahme und Analytik sprengstofftypischer Verbindungen unter besonderer Berücksichtigung von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT). <http://www.wasag-decon.de/analytik.htm>
- **Weber W.J., McGinley P.M. und Katz L.E. (1992)** A Distributed Reactivity Model for sorption by soils and Sediments. 1. Conceptual Basis and Equilibrium Assessments. *Environmental Science and Technology*. Vol. 26: 1955-1962
- **Weiß T. und Angerer J. (2000)** Belastung der Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland durch nitroaromatische Verbindungen. Zwischenbericht anlässlich des Statusseminars des BWPLUS, 1. und 2.3.2000 im Forschungszentrum Karlsruhe. <http://www.bwplus.fzk.de>
- **Weiß T. und Angerer J. (2001)** Belastung der Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland durch nitroaromatische Verbindungen. Zwischenbericht anlässlich des Statusseminars des BWPLUS, 28.2. und 1.3.2001 im Forschungszentrum Karlsruhe. <http://www.bwplus.fzk.de>
- **Weiß T. und Angerer J. (2003)** Belastung der Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland durch nitroaromatische Verbindungen. Zwischenbericht anlässlich des Statusseminars des BWPLUS, 11. und 12.3.2003 im Forschungszentrum Karlsruhe. <http://www.bwplus.fzk.de>
- **Weiß T., Käfferlein H.U. und Angerer J. (1999)** Belastung der Bevölkerung der Bundesrepublik Deutschland durch nitroaromatische Verbindungen. Zwischenbericht anlässlich des Statusseminars des BWPLUS, 9. und 10.3.1999 im Forschungszentrum Karlsruhe. <http://www.bwplus.fzk.de/berichte/ZBer/99/ZBerU97009.pdf>

- **Wienberg R.** (1989) Bewertung der Altlasten hinsichtlich der Desorption und Mobilität von organischen Schadstoffen im Boden. In: Franzius V., Stegmann R., Wolf K. [Hrsg.] Handbuch der Altlastensanierung 4.Lieferung 11/89. *CF Verlag*. Heidelberg: 1-15
- **Willis R.J.** (2002) The E-Scent of danger. *Today's Chemist at work*: 43-48
- **Wolff-Boenisch D., Track T., Schenk D. und Oberhänsli R.** (1996) Sorptionsverhalten von 2,4,6-Trinitrotoluol und 1,3-Dinitrobenzol an unterschiedlichen Bodenmodellsubstanzen. *Grundwasser – Zeitschrift der Fachsektion Hydrologie*. Vol. 2: 63-68
- **Woodbury R.G., Wendin C., Clendenning J., Melendez J., Elkind J., Bartholomew D., Brown S. und Furlong C.E.** (1998) Construction of biosensors using a gold-binding polypeptide and a miniature integrated surface plasmon resonance sensor. *Biosensor and Bioelectronics*. Vol. 13: 1117-1126
- **Yu Q., Chen S., Taylor A.D., Homola J., Hock B. und Jiang S.** (2005) Detection of low-molecular-weight domoic acid using surface plasmon resonance sensor. *Sensors and Actuators B*. Vol. 107: 193-201
- **Zaripov S.A., Naumov A.V., Abdrakhmanova J.F., Garusov A.V. und Naumova R.P.** (2002) Models of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) initial conversion by yeast. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 217: 213-217
- **Zeck A., Weller M.G. und Niessner R.** (1999) Characterization of a monoclonal TNT-antibody by measurement of the cross-reactivities of nitroaromatic compounds. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. Vol. 364: 113-120
- **Zeman Explosivstoffe** (2002A) Zeman Explosivstoffe 6. [http://unibw-muenchen.de/campus/MB/we6/Zeman/explo/zeman\\_explo\\_6.htm](http://unibw-muenchen.de/campus/MB/we6/Zeman/explo/zeman_explo_6.htm)
- **Zeman Explosivstoffe** (2002B) Zeman Explosivstoffe 13. [http://unibw-muenchen.de/campus/MB/we6/Zeman/explo/zeman\\_explo\\_13.htm](http://unibw-muenchen.de/campus/MB/we6/Zeman/explo/zeman_explo_13.htm)
- **Zimmermann G.M., Kramer G.N. und Schnabl H.** (1996) Lyophilization of thylakoids for improved handling in a bioassay. *Environmental toxicology and chemistry*. Vol. 15 No. 9: 1461-1463

## 7 Abkürzungs-/Wortverzeichnis

1,2-DNB	1,2-Dinitrobenzol
1,3-DNB	1,3-Dinitrobenzol
2,4-A-6-DNT / DANT	2,4-Diamino-6-Nitrotoluol
2,4-DNT / DNT	2,4-Dinitrotoluol
2,6-DNT / DNT	2,6-Dinitrotoluol
2-A-4,6-DNT / ADNT	2-Amino-4,6-Dinitrotoluol
2-A-4-NT / ANT	2-Amino-4-Nitrotoluol
2-NT	2-Nitrotoluol
3-NT	3-Nitrotoluol
4-A-2,6-DNT / ADNT	4-Amino-2,6-Dinitrotoluol
4-A-2-NT / ANT	4-Amino-2-Nitrotoluol
4-NT	4-Nitrotoluol
a	Jahr
A <sub>0</sub>	Akzeptormolekül im PS I
Abb.	Abbildung
ABC 1-6	Bezeichnung für realkontaminierte Proben aus ABC (Bereitgestellt vom dortigen Sanierer) ) mit Probenident.Nr.
ATP	Adenosintriphosphat
BBodSchG	Bundes-Boden-Schutz-Gesetz
BImSchG	Bundes-Immissions-Schutz-Gesetz
BSA	Bovine Serum Albumin / Rinder-Serum-Albumin
°C	Temperatur in Grad Celsius
ca.	circa
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CM5-Chip	für SPR-Messungen verwendeter Gold-Chip mit aufgelagerter definierter Dextran-Matrix der Firma BIAcore
CT-Biosensor	Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor
d	Tag
DAG	Dynamit Aktien Gesellschaft
DAP	Deutsches Akkreditierungssystem Prüfwesen GmbH

DEF	Bezeichnung für eine realkontaminierte Probe aus DEF (Bereitgestellt vom dortigen Sanierer)
dest.	destilliert
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EPA	Environmental Protection Agency
ex-situ	aus der natürlichen Lage entfernt
FC	Flow Cell / Flusszelle
Fm'	(Chlorophyll-) Fluoreszenz bei Lichtsättigung
FMN	Flavinmononukleotid
Ft	Chlorophyll-) Fluoreszenz bei Grundbestrahlung
g / g	Gramm / <i>Erdbeschleunigung</i> ( $9,81 \text{ m s}^{-2}$ )
GC	Gas-Chromatographie
GHI 1 / 2	Bezeichnung für realkontaminierte Proben aus GHI (Bereitgestellt von dortigem Sanierer) mit Probenident.Nr.
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
I.G. Farben	Interessengemeinschaft der Farbenindustrie AG; größter Chemiekonzern der 1930er Jahre, durch Alliierte in Bayer AG, BASF AG, Hoechst AG, Agfa Camerawerk AG und Leuna Werke zerschlagen
in-situ	in natürlicher Lage
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry: Internationale Union für Reine und Angewandte Chemie
kg	Kilogramm
Konz.	Konzentration
LHC	Light-Harvesting-Complex / Lichtsammelnder Komplex
M	Mol
m	Meter
m <sup>3</sup>	Kubikmeter (1.000 l)
Metabiose	Vorbereitung einer Umwelt für Organismen durch Organismen
mg	Milligramm (0,001g)

min	Minute
Mio.	Million
Mix-Vial	hier: ein zum Mischen von Lösungen verwendetes Gefäß im BIAcore 3000®
ml	Milliliter (0,001 l)
mm	Millimeter (0,001 m)
mM	Millimol (0,001 M)
MONTAN	Verwertungsgesellschaft für Montanindustrie GmbH
n	Anzahl an Messungen einer Messreihe
n.b.	nicht bestimmt
NADP <sup>+</sup>	Niconiamid-Adenin-dinucleotid-Phosphate
NADPH + H <sup>+</sup>	reduzierte Form des NADP <sup>+</sup>
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid-Anion
off-site	vom natürlichen Ort entfernt
OKH	Oberkommando des Heeres
on-site	am natürlichen Ort
P680	Reaktionszentrum des PS II
P700	Reaktionszentrum des PS I
PAM	Puls-Amplituden-Modulation
Pedogenese	Bodenentstehung
PET	photosynthetischer Elektronentransport
pH	pouvoir hydrogène / negative, dekadische Logarithmus der Konzentration an H <sup>+</sup> -Ionen in einer Lösung
PQH <sub>2</sub>	Plastohydrochinon / Plastochinol
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
PS-II-Hemmer	Substanz mit Hemmender Wirkung auf das PS II
PS-II-Herbizid	Herbizidgruppe mit einem Wirkort im Bereich des Photosystems II
Regeneration-Scouting	Verfahren zur Aufklärung der Belastung von Regenerationsverfahren bei SPR-Messungen
RP	Reversed Phase / Umkehr Phasen (Art der HPLC)

RU	Resonance Unit / Resonanzeinheit
Screening	Reihenuntersuchung
SD	Standard Deviation / Standardabweichung
SPE	Solid Phase Extraction / Fest-Phasen-Extraktion
SPME	Solid Phase Micro Extraction / Fest-Phasen-Micro-Extraktion
SPR	Surface Plasmon Resonance / Oberflächen-Plasmon-Resonanz
t	Tonne (1.000 kg)
Tab.	Tabelle
TAT	2,4,6-Triaminotoluol
TiO <sub>2</sub>	Titandioxid
TNB	2,4,6-Trinitrobenzol
TNB-BSA	2,4,6-Trinitrobenzol gekoppelt mit Rinder-Serum-Albumin
TNT	2,4,6-Trinitrotoluol
TNT-WFR	Wiederfindungsrate an TNT
Tri-Halde	Begriff für eine Lagerstätte Neutralisationsschlämmen aus der TNT-Produktion der Rüstungsalzlast Stadallendorf
UBA	Umweltbundesamt
USACE	United States Army Corps of Engineers
USEPA	United States Environmental Protection Agency
UV	Ultraviolett
Verwert-Chemie	Gesellschaft mbH zur Verwertung chemischer Erzeugnisse
w/v	weight per volume / Gewicht pro Volumen
WFR	Wiederfindungsrate
Yield	Maß für die Aktivität des photosynthetischen Elektronentransports
z. B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter (0,000.001 l)
µm	Mikrometer (0,000.001 m)



## 8 Chemikalienliste

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in der folgenden Tabelle aufgeführt

<b>Chemikalie</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Besonderheit</b>
<b>2,4,6-Trinitrobenzol-Sulfonsäure</b>	Sigma	5% (w/v)
<b>Acetonitril</b>	Promochem	
<b>Ammoniumchlorid</b>	Merck	
<b>BSA</b>	Sigma	
<b>Dikaliumhydrogenphosphat</b>	Merck	Trihydrat
<b>Diuron</b>	Ehrendorfer	
<b>EDC</b>	BIAcore AB	
<b>Ethanol</b>	Merck	
<b>Ethanolamin</b>	BIAcore AB	
<b>Flavinmononukleotid (FMN)</b>	Boehringer	
<b>Kaliumdihydrogenphosphat</b>	Merck	
<b>Magnesiumchlorid</b>	Merck	Hexahydrat
<b>Methanol</b>	Merck	
<b>Monoklonaler TNT-Antikörper</b>	Strategic Diagnostics (Texas, USA)	5 mg in 10,9mg /l lot 107415
<b>Natriumascorbat</b>	Sigma	
<b>Natriumchlorid</b>	J.T. Baker	
<b>NHS</b>	BIAcore AB	
<b>PBS-Lösung pH 7,4</b>	Sigma	
<b>Phosphatpuffer pH 8,0</b>	Eigene Herstellung	
<b>Saccharose</b>	Merck	
<b>Sorbit</b>	AppliChem	
<b>Toluol</b>	Alfa Aesar	
<b>Tricine</b>	AppliChem	
<b>Trifluoressigsäure</b>	Sigma	
<b>Triton X-100</b>	AppliChem	

<b>Chemikalie</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Besonderheit</b>
<b>2,4,6-Trinitrotoluol</b>	Dynamit Nobel / Troisdorf	Direktabnahme
<b>4-Amino-2,6-Dinitrotoluol</b>	Promochem	
<b>2-Amino-4,6-Dinitrotoluol</b>	Sigma	
<b>2,4-Diamino-6-Nitrotoluol</b>	Promochem	
<b>2,4-Dinitrotoluol</b>	Aldrich	
<b>2,6-Dinitrotoluol</b>	Aldrich	
<b>2-Amino-4-Nitrotoluol</b>	Sigma-Aldrich	
<b>4-Amino-2-Nitrotoluol</b>	Aldrich	
<b>1,2-Dinitrobenzol</b>	Sigma-Aldrich	
<b>1,3-Dinitrobenzol</b>	Aldrich	
<b>2-Nitrotoluol</b>	Sigma-Aldrich	
<b>3-Nitrotoluol</b>	Aldrich	
<b>4-Nitrotoluol</b>	Aldrich	

## 9 Anhang

### 9.1 Statistische Tabellen

r-Tabelle:

<i>f</i>	Sicherheit in %;		
	95%	99%	99,9%
1	1,409	1,414	1,414
2	1,645	1,715	1,730
3	1,757	1,918	1,982
4	1,814	2,051	2,178
5	1,848	2,142	2,329
6	1,870	2,208	2,447
7	1,885	2,256	2,540
8	1,895	2,294	2,616
9	1,903	2,324	2,678
10	1,910	2,348	2,730
11	1,916	2,368	2,774
12	1,920	2,385	2,812
13	1,923	2,399	2,845
14	1,926	2,412	2,874
15	1,928	2,423	2,899
16	1,931	2,432	2,921
17	1,933	2,440	2,941
18	1,935	2,447	2,959
19	1,936	2,454	2,975
20	1,937	2,460	2,990
25	1,942	2,483	3,047
30	1,945	2,498	3,085
35	1,948	2,509	3,113
40	1,949	2,518	3,152
45	1,950	2,524	3,152
50	1,951	2,529	3,166
100	1,956	2,553	3,227
200	1,958	2,553	3,227
300	1,958	2,566	3,271
400	1,959	2,568	3,275
500	1,959	2,570	3,279
600	1,959	2,571	3,281
700	1,959	2,572	3,283
800	1,959	2,573	3,285
∞	1,960	2,576	3,291

t-Tabelle:

<i>f</i>	Sicherheit in %;		
	95%	99%	99,9%
1	12,71	63,66	636,62
2	4,30	9,92	31,60
3	3,18	5,84	12,92
4	2,78	4,60	8,61
5	2,57	4,03	6,86
6	2,45	3,71	5,96
7	2,37	3,50	5,41
8	2,31	3,36	5,04
9	2,26	3,25	4,78
10	2,23	3,17	4,59
11	2,20	3,11	4,44
12	2,18	3,06	4,32
13	2,16	3,01	4,22
14	2,15	2,98	4,14
15	2,13	2,95	4,07
16	2,12	2,92	4,02
17	2,11	2,90	3,96
18	2,10	2,88	3,92
19	2,09	2,86	3,88
20	2,08	2,85	3,85
25	2,060	2,787	3,725
30	2,042	2,750	3,646
35	2,030	2,724	3,592
40	2,021	2,704	3,551
45	2,014	2,689	3,521
50	2,009	2,678	3,496
100	1,984	2,626	3,390
200	1,972	2,601	3,340
300	1,969	2,595	3,328
400	1,967	2,590	3,318
500	1,965	2,586	3,310
600	1,964	2,585	3,307
700	1,963	2,584	3,304
800	1,963	2,583	3,302
∞	1,960	3,576	3,291

## 9.2 Nicht dargestellte Daten

Tab. 11.1a: Aufstellung der dotierten TNT-Mengen in den verwendeten Standardböden, sowie den gemessenen Konzentrationen mittels HPLC, Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor und Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Biosensor

Bodensorte	Dotierte Konzentration im Boden [mg TNT/l]	Mittels HPLC ermittelte TNT-Konzentration im Extrakt [mg TNT/l]	+/- SD	Mittels CT-Biosensor ermittelte TNT-Konzentration im Extrakt [mg TNT/l]	+/- SD	Mittels SPR-Biosensor ermittelte TNT-Konzentration im Extrakt [mg TNT/l]	+/- SD
Waldboden	150	15,344	1,843	11,552	1,382	n.b.	--
	150	9,732	4,38	19,884	3,285	n.b.	--
	150	32,661	0	28,177	2,675	10,25	0,89
	116,66	21,005	1,275	19,538	1,363	n.b.	--
	83,32	14,979	0,073	13,587	1,114	n.b.	--
	200	39,709	0,887	30,012	2,714	n.b.	--
	300	66,629	1,045	62,264	6,023	n.b.	--
	150	25,666	0,427	20,264	0,329	n.b.	--
	50	9,788	3,459	8,682	0,349	n.b.	--
	200	39,356	0,074	30,599	5,327	n.b.	--
Grünlandboden	150	49,671	1,116	49,074	3,625	n.b.	--
	150	46,723	0,027	50,252	5,733	n.b.	--
	150	45,345	0	37,057	1,386	10,24	0,82
	116,66	36,807	0,183	33,025	1,144	n.b.	--
	83,32	26,147	0,247	25,503	0,582	n.b.	--
	200	62,874	0,137	50,375	5,449	n.b.	--
	300	98,324	0,061	93,721	9,193	n.b.	--
	150	45,365	0,049	38,992	1,164	n.b.	--
	50	15,451	0,172	11,984	1,193	n.b.	--
	Sandboden	150	57,828	3,024	78,207	8,413	n.b.
150		56,713	2,29	81,309	20,034	n.b.	--
150		55,621	1,184	40,68	4,132	10,82	0,94
116,66		43,888	0,065	43,894	1,114	n.b.	--
83,32		33,3	0,335	35,361	1,299	n.b.	--
200		78,773	0,404	77,355	1,851	n.b.	--
300		115,322	0,13	104,859	14,443	n.b.	--
150		55,542	0,544	56,88	2,45	n.b.	--
50		18,718	0,56	15,303	0,251	n.b.	--
Ackerboden		150	33,461	6,294	42,557	17,848	n.b.
	150	29,675	13,024	43,422	4,479	n.b.	--
	150	37,969		28,645	2,163	9,14	0,48
	150	31,354	0,047	32,992	2,347	n.b.	--
	200	53,182	0,093	51,036	3,333	n.b.	--
	Humusboden	200	12,503	0,109	8,544	0,233	n.b.
150		9,232	0,072	6,612	0,533	n.b.	--
100		5,694	0,035	4,126	0,747	n.b.	--
200		14,931	0,019	10,989	0,485	n.b.	--
300		22,294	0,606	17,592	0,595	8,91	0,52
400		36,285	0,055	34,606	0,985	n.b.	--

**Tab. 11.1b: Aufstellung der TNT-Konzentrationen realkontaminierten Böden nach Saniererangaben, sowie den gemessenen Konzentrationen mittels HPLC, Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor und Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Biosensor**

Bodenprobe	Konzentration im Boden nach Saniererangaben [mg TNT/kg]	Mittels HPLC ermittelte TNT-Konzentration im Extrakt [mg TNT/l]	+/- SD	Mittels CT-Biosensor ermittelte TNT-Konzentration im Extrakt [mg TNT/l]	+/- SD	Mittels SPR-Biosensor ermittelte TNT-Konzentration im Extrakt [mg TNT/l]	+/- SD
ABC 1	73,3	7,771	0,049	9,787	0,371	n.b.	--
		5,269	0	5,322	0,680	n.b.	--
		3,061	0,021	2,327	0,561	n.b.	--
		4,23	0,013	4,159	0,253	n.b.	--
		9,209	1,149	7,505	0,522	6,96	0,26
ABC 2	15,6	0,173	0,005	0,082	0,655	n.b.	--
		1,085	0,008	-0,807	0,277	n.b.	--
		2,598	0,011	2,072	0,698	n.b.	--
		1,031	0,019	0,771	0,841	1,134	--
		0,193	0,006	-0,135	0,119	n.b.	--
ABC 3	11,1	0,864	0,003	1,433	0,369	n.b.	--
		4,124	0,011	2,279	0,465	n.b.	--
		2,897	0,022	1,185	0,988	1,63	0,81
		0,183	0,001	-0,614	0,148	n.b.	--
		0,479	0,013	-0,555	0,406	n.b.	--
ABC 4	223,0	0,545	0,004	1,081	0,500	n.b.	--
		0,679	0,001	-0,423	0,156	n.b.	--
		0,406	0,013	0,760	0,269	n.b.	--
		82,517	4,718	90,276	9,105	n.b.	--
		8,816	0,901	7,555	0,580	4,45	3,36
ABC 5	4,4	0,043	0,019	0,396	0,163	n.b.	--
		0,195	0,002	-0,326	0,259	n.b.	--
		0,093	0,003	-0,368	0,436	n.b.	--
		0,153	0,006	-0,416	0,282	n.b.	--
		0,186	0,02	-0,426	0,302	n.b.	--
ABC 6	38,2	1,024	0,002	5,348	4,344	n.b.	--
		0,963	0,01	-0,363	3,113	n.b.	--
		3,343	0,023	2,121	1,883	n.b.	--
		1,762	0,012	1,925	10,000	n.b.	--
		4,355	0,134	4,398	8,870	2,33	0,16

**Tab. 11.1c: Aufstellung der TNT-Konzentrationen realkontaminierten Böden nach Saniererangaben, sowie den gemessenen Konzentrationen mittels HPLC, Chloroplasten-Thylakoid-Biosensor und Oberflächen-Plasmon-Resonanz-Biosensor**  
Fortsetzung

Bodenprobe	Konzentration im Boden nach Saniererangaben [mg TNT/kg]	Mittels HPLC ermittelte TNT-Konzentration im Extrakt [mg TNT/l]	+/- SD	Mittels CT-Biosensor ermittelte TNT-Konzentration im Extrakt [mg TNT/l]	+/- SD	Mittels SPR-Biosensor ermittelte TNT-Konzentration im Extrakt [mg TNT/l]	+/- SD
<b>DEF</b>	12,9	1,836	0,26	99,418	0,356	n.b.	--
		8,585	0,733	66,377	0,103	n.b.	--
		15,367	0,009	95,739	0,311	n.b.	--
		3,126	0,002	120,241	0,386	n.b.	--
		6,963	0,014	62,331	3,843	2,71	0,63
<b>GHI 1</b>	14,0	0,366	0,095	0,521	0,239	n.b.	--
		1,195	0,577	0,434	0,494	n.b.	--
		1,119	0,015	0,392	0,468	n.b.	--
		1,687	0,369	3,783	0,188	1,05	0,24
		0,247	0,005	-6,070	0,398	n.b.	--
<b>GHI 2</b>	854,0	89,248	7,436	1,893	0,239	n.b.	--
		57,839	15,572	2,590	0,494	44,98	1,38
		88,172	1,592	2,467	0,468	n.b.	--
		67,247	4,769	3,593	0,188	n.b.	--
		37,136	3,652	7,357	0,398	n.b.	--

**Tab. 11.2: Aufstellung der inhibitorischen Wirkung von 5 mg TNT/l auf den PET isolierter Thylakoidmembranen über einen Zeitraum von 20 min**

Zeit in Minuten	Hemmung des PET in Prozent der Kontrolle [%]	SD [%]
0	41,190	3,832
1	39,385	2,305
2	37,992	2,685
3	36,457	1,952
4	36,127	1,645
5	35,383	1,466
6	34,755	2,107
7	34,615	0,946
8	33,803	0,899
9	33,225	1,083
10	33,718	0,969
11	33,005	1,198
12	33,605	1,053
13	32,973	0,964
14	32,293	0,895
15	33,717	1,357
16	32,917	1,052
17	32,605	0,763
18	32,552	1,603
19	32,930	1,468
20	33,222	1,602

**Tab. 11.3: Aufstellung der inhibitorischen Wirkung von 10 mg nitroaromatischen Standards/l Methanol (bei 10% Methanol in der Messkammer)**

Nitroaromatische Verbindung	<u>Inhibition des PET</u>			
	<i>Standardabweichung</i>			
1,2 DNB	4,29	4,729	10,211	19,301
+/-	1,772	0,864	0,851	6,087
1,3 DNB	9,974	25,744		
+/-	1,032	2,125		
2,4DNT	15,26			
+/-	6,149			
2,6DNT	7,871	4,999		
+/-	5,207	0,944		
2A46DNT	19,393			
+/-	0,566			
4A26DNT	1,324	-3,823	12,463	
+/-	3,267	1,768	2,099	
2A4NT	2,544			
+/-	1,398			
2NT	28,345			
+/-	2,426			
3NT	24,342			
+/-	1,041			
4NT	6,572			
+/-	4,929			
4A2NT	15,615	14,349	0,636	
+/-	0,654	0,966	0,345	



## Danksagung

Mein herzlichster Dank für die Unterstützung bei dieser Arbeit gilt

- Frau Prof. Dr. H. Schnabl für die Überlassung dieses interessanten und problemorientierten Arbeitsthemas sowie der anregenden Vorschläge bei gemeinsamen Arbeitsgesprächen,
- Herrn Prof. Dr. D. Volkmann für die Übernahme des Ko-Referates,
- Herrn Prof. Dr. S. F. Perry für die Übernahme der Aufgaben als fachnahes Mitglied in meiner Promotionskommission,
- Frau Prof. Dr. G. König für die Übernahme der Aufgaben als fachangrenzendes Mitglied in meiner Promotionskommission,
- Herrn Dr. Welp vom Institut für Bodenkunde der Universität Bonn und Frau A. Glogau vom Institut für Pflanzenernährung der Universität Bonn für ihre Unterstützung bei den Kohlenstoff-/Stickstoffanalysen,
- Herrn Dr. Pätzold vom Institut für Bodenkunde der Universität Bonn für die Bereitstellung von unterschiedlichen Test-Böden,
- den Sanierern an den Rüstungsalblaststandorten, die mir für diese Arbeit einige ihrer realkontaminierten Bodenproben samt der dazugehörigen Analytik zur Verfügung gestellt haben,
- allen Mitarbeitern des Instituts für molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen für Motivationshilfen, Denkanstöße und Spaß während meiner dortigen Arbeit,
- meinen Kollegen bei der Stiftung c.a.e.s.a.r., für anregende Gespräche,
- Herbert Beeskow für seinen unermüdlichen Einsatz beim Korrekturlesen dieser Arbeit,
- Rebekka und Elvira Schulten sowie Yvonna Ludwig für ihre Hilfe und das gute Essen in der Zeit des Zusammenschreibens,
- sowie allen, die mich in dieser Zeit unterstützt und mir geholfen haben.

Besonderer Dank gilt meine Eltern, die mir diesen Lebensweg ermöglichten und mich stets nach besten Kräften unterstützt haben.

Vor allem möchte ich mich bei Carmen bedanken, die mich über die gesamte Zeit bei meiner Arbeit begleitet hat und bei allen Problemen für mich da war.







## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selber verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt, sowie alle Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Wortlaut oder Sinn nach entnommen sind kenntlich gemacht zu haben.

Diese Arbeit ist keinem anderen Prüfungsamt eingereicht

Bonn, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Oliver Schulz

