
**Bilanzierung eines kombinierten biologisch-chemischen Abbaus
von ^{14}C -2,4,6-Trinitrotoluol (TNT)**

Vom Fachbereich Chemie und Chemietechnik
der Universität Paderborn
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –
genehmigte Dissertation

von

Mario Kröger

aus Delbrück

Paderborn 2002

Eingereicht am:

23. Januar 2002

Mündliche Prüfung am:

22. Februar 2002

Referent:

Prof. Dr. G. Fels

Korreferent:

Prof. Dr. H.-S. Kitzrow

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1999 bis Januar 2002 im Fachgebiet Organische Chemie des Fachbereiches Chemie und Chemietechnik an der Universität Paderborn unter Leitung von Prof. Dr. G. Fels angefertigt.

Herrn Prof. Dr. G. Fels danke ich für die herausfordernde Themenstellung sowie für sein Interesse am Fortgang der Arbeit und seine Unterstützung durch viele anregende Diskussionen. Besonders möchte mich dafür bedanken, dass er mir immer wieder Gelegenheit gegeben hat auch außerhalb des eigenen Labors viele neue Dinge zu lernen, stellvertretend sei hier der Aufenthalt in Moscow, Idaho, genannt.

Herrn Prof. Dr. H.-S. Kitzrow danke ich für die bereitwillige Übernahme des Korreferates.

Dem Land Nordrhein-Westfalen danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit durch ein Stipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz.

Herrn Dave Newcombe und Herrn Prof. R. Crawford danke ich für ihre Gastfreundschaft.

Herrn Dr. Flechtner danke ich für den reibungslosen Ablauf im Isotopenlabor.

Den Diplandinnen Frau Heike Risse und Frau Martina Elisabeth Schumacher danke ich für viele interessante Ergebnisse und das nette Arbeitsklima.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Organischen Chemie danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Insbesondere gilt meine Anerkennung hier Dr. Henry Hildebrandt für Korrekturlesearbeiten, Elmar Linnemann für das außergewöhnliche Laborklima, PD Dr. B. Westermann für viele gute Tipps und Edgar Luttmann für größte Unterstützung in allen denkbaren Bereichen.

Ein besonders herzlicher Dank gebührt meiner Familie, die mich immer nach Kräften unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Rüstungsaltlasten | 1 |
| 1.2 | 2,4,6-Trinitrotoluol | 2 |
| 1.2.1 | Herstellung | 2 |
| 1.3 | Umweltchemie des TNT | 4 |
| 1.3.1 | Emission: Rüstungsaltlastenstandorte | 4 |
| 1.3.2 | Exposition: Persistenz und Reichweite | 5 |
| 1.3.3 | Wirkung: Toxikologie | 6 |
| 1.4 | Abbauwege des TNT | 8 |
| 1.4.1 | Mikrobiologische Transformation von TNT | 8 |
| 1.4.2 | Photochemischer Abbau von TNT | 11 |
| 1.4.3 | Reaktion von TNT mit Basen | 12 |
| 1.5 | Sanierungsmethoden: Stand der Technik | 13 |
| 1.5.1 | Die Entsorgung von TNT aus Delaborierung | 13 |
| 1.5.2 | Die Sanierung TNT-belasteter Böden | 14 |
| 1.5.3 | Die Sanierung TNT-belasteter Abwässer | 15 |
| 2 | Aufgabenstellung | 16 |
| 3 | Ergebnisse der synthetischen Arbeiten | 18 |
| 3.1 | Synthese von Referenzsubstanzen | 18 |
| 3.1.1 | Synthese der Aminodinitrotoluole | 18 |
| 3.1.2 | Synthese von 2,6-Diaminonitrotoluol und 6-Amino-4-nitro-2-N-acetyltoluol | 18 |
| 3.1.3 | Synthese der Tetranitroazoxytoluole | 19 |
| 3.1.4 | Synthese von 2,4,6-Trinitrobenzoësäure | 19 |
| 3.2 | Synthese der radioaktiv markierten Aminonitroverbindungen | 20 |
| 3.2.1 | Syntheseplanung | 20 |
| 3.2.2 | Hefe (<i>Saccharomyces cervisiae</i>) | 21 |
| 3.2.3 | Die Reduktion von TNT mit Hefe | 22 |
| 3.2.4 | Trennung der Regioisomere | 24 |
| 3.2.5 | Regioselektivität | 25 |
| 3.2.6 | Radioaktive Synthese | 27 |
| 3.2.7 | Radioanalytik | 28 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4 | Ergebnisse der biologischen Abbauten..... | 31 |
| 4.1 | Analytik..... | 31 |
| 4.1.1 | Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) | 31 |
| 4.1.2 | Probenvorbereitung: Festphasenextraktion | 33 |
| 4.1.3 | Redoxspannung | 33 |
| 4.2 | Aerobe Abbauten | 34 |
| 4.2.1 | Optimierung der Belebtschlammkonzentration | 34 |
| 4.2.2 | Optimierung der Cofaktoren | 35 |
| 4.2.3 | Ergebnis eines optimierten aeroben Abbaus | 36 |
| 4.2.4 | Radioaktivitätsbilanz eines biologischen Abbaus | 38 |
| 4.3 | Aerobe und anaerobe Abbauten mit kontrolliertem Redoxpotential | 39 |
| 4.3.1 | Redoxpotential bei unterschiedlichen Volumenströmen | 40 |
| 4.3.2 | Ergebnisse der anaeroben Abbauten | 41 |
| 4.4 | Vergleich zwischen den aeroben und anaeroben Abbauten | 43 |
| 5 | Ergebnisse der photochemischen Abbauten | 46 |
| 5.1 | Abbauten mit UV-H ₂ O ₂ | 46 |
| 5.1.1 | Optimierung der H ₂ O ₂ -Konzentration – Mineralisierung von [U-ring- ¹⁴ C]-TNT | 46 |
| 5.1.2 | Mineralisierung von ¹⁴ C-ADNT und ¹⁴ C-DANT per UV-H ₂ O ₂ | 48 |
| 5.2 | Photo-Fenton Abbauten | 51 |
| 5.2.1 | Optimierung der Fe ²⁺ -Konzentration - Mineralisierung von [U-ring- ¹⁴ C]-TNT | 51 |
| 5.2.2 | Mineralisierung von ¹⁴ C-ADNT und ¹⁴ C-DANT per Photo-Fenton | 53 |
| 5.2.3 | Dunkel-Fenton Abbau | 54 |
| 5.3 | Vergleich zweier UV-Lichtquellen..... | 55 |
| 5.4 | Variation der H ₂ O ₂ -Zugabe..... | 56 |
| 5.5 | Vergleich der Abbauversuche..... | 57 |
| 6 | Ergebnisse der kombinierten Abbauten | 59 |
| 6.1 | Ergebnisse verschiedener Verfahrenskombinationen | 59 |
| 6.1.1 | Variation der biologischen Stufe | 59 |
| 6.1.2 | Variation der photochemischen Stufe - Filtration | 62 |
| 6.1.3 | Weitere Optimierung der kombinierten Abbauten | 64 |
| 6.2 | Vergleich und Diskussion der kombinierten Abbauergebnisse | 68 |
| 7 | Zusammenfassung und Ausblick | 73 |

| | | |
|-------|--|----|
| 8 | Experimenteller Teil | 75 |
| 8.1 | Allgemeines | 75 |
| 8.1.1 | Instrumentelle Analytik: Verwendete Geräte | 75 |
| 8.1.2 | Verwendete Chemikalien | 75 |
| 8.2 | Synthesen | 76 |
| 8.2.1 | Synthese von 2-ADNT und 4-ADNT | 76 |
| 8.2.2 | Synthese von 2,6-DANT und 6-Amino-4-nitro-2-N-acetyltoluol | 77 |
| 8.2.3 | Synthese von 2,2',6,6'-Tetranitro-4,4'-azoxytoluol (TN-4,4'-AzT) | 78 |
| 8.2.4 | Synthese von 2,4,6-Trinitrobenzoësäure | 79 |
| 8.2.5 | Radioaktive Synthese von [U-ring- ¹⁴ C]-2-ADNT, [U-ring- ¹⁴ C]-4-ADNT, [U-ring- ¹⁴ C]-2,4-ADNT und [U-ring- ¹⁴ C]-2,6-DANT | 80 |
| 8.3 | Biologische Abbauten | 80 |
| 8.3.1 | Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV) zum biologischen Abbau | 80 |
| 8.3.2 | Biologischer Abbau mit variierenden TNT-Konzentrationen | 81 |
| 8.3.3 | Biologischer Abbau mit variierenden Saccharosemengen | 81 |
| 8.3.4 | Biologischer Abbau mit variierenden Volumenströmen und Gasen | 81 |
| 8.3.5 | Allgemeine Arbeitsvorschrift der biologischen Stufe im kombinierten biologisch-chemischen Abbau | 81 |
| 8.3.6 | Biologischer Abbau mit variierenden Volumenströmen und Gasen | 82 |
| 8.3.7 | Biologischer Abbau mit Schütteln als Mischtechnik | 82 |
| 8.3.8 | Festphasenextraktion | 82 |
| 8.4 | Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Extraktion des Belebtschlammes | 82 |
| 8.4.1 | Extraktion des Belebtschlammes aus einem Ansatz mit [U-Ring- ¹⁴ C]-TNT | 83 |
| 8.5 | Photochemische Abbauten | 83 |
| 8.5.1 | AAV zum photochemischen Abbau mit UV-H ₂ O ₂ | 83 |
| 8.5.2 | Abbau mit ADNTs und DANTs | 83 |
| 8.5.3 | AAV zum Photo-Fenton Abbau | 84 |
| 8.5.4 | Abbau mit verschiedenen Lichtquellen | 84 |
| 8.5.5 | Abbauexperiment zur Dunkel-Fenton-Reaktion | 84 |
| 8.5.6 | Photochemische Stufe im kombinierten Abbau | 84 |
| 9 | Abkürzungsverzeichnis | 85 |
| 10 | Referenzen | 87 |

1 Einleitung

Die Entsorgung und Vernichtung von Militärchemikalien gewinnt zunehmend an Bedeutung und umfasst ein immer größeres Spektrum von Aufgaben, angefangen bei der direkten Abwehr von Chemikalienangriffen über die abrüstungs- oder altersbedingte Vernichtung von Kampfmitteln und die Reinigung von Produktionsabfällen bis zur Sanierung von Rüstungsaltlasten aus vergangenen Kriegen.

In Deutschland liegt die Hauptproblematik (und damit der Forschungsschwerpunkt) bei den Rüstungsaltlasten aus den beiden Weltkriegen, deren häufigster, persistentester und giftigster Kontaminant das 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) ist.

1.1 Rüstungsaltlasten

Es gibt keine gesetzlich verankerte Definition des Begriffs Rüstungsaltlasten, mittlerweile sind aber folgende Begriffsabgrenzungen allgemein anerkannt und gebräuchlich:

- **Altlasten** sind Altstandorte und Altablagerungen, sofern von ihnen Gefährdungen für die Umwelt, insbesondere die menschliche Gesundheit ausgehen oder mit hinreichender Wahrscheinlichkeit zu erwarten sind [1].
- Altlasten, bei denen die Gefährdungen von Boden-, Wasser- und Luftverunreinigungen durch Chemikalien aus chemischen Kampfmitteln ausgehen, werden als **Rüstungsaltlasten** bezeichnet. Bei den kontaminationsauslösenden Stoffen handelt es sich insbesondere um chemische Kampfstoffe, Sprengstoffe, Brand-, Nebel- und Rauchstoffe, Treibmittel, Chemikalien, die den Kampfstoffen zur Erreichung taktischer Erfordernisse zugesetzt wurden, produktionsbedingte Vor- und Abfallprodukte sowie Rückstände aus der Vernichtung chemischer Kampfmittel [2].
- In Anlehnung an die zivilen Altlasten sind **militärische Altlasten** Altstandorte der Militärproduktion und des Militärbetriebs, sofern von ihnen Gefährdungen für die Umwelt, insbesondere für die menschliche Gesundheit, ausgehen oder zu erwarten sind.
- **Altstandorte der Militärproduktion** sind Grundstücke stillgelegter Anlagen zur Entwicklung, Herstellung, Lagerung und Vernichtung von militärischen Ausrüstungsgütern.
- **Altstandorte des Militärbetriebes** sind Grundstücke stillgelegter militärischer Anlagen zur Erprobung und Anwendung von militärischen Ausrüstungsgütern oder zur Ausübung sonstiger militärischer Aktivitäten [3].

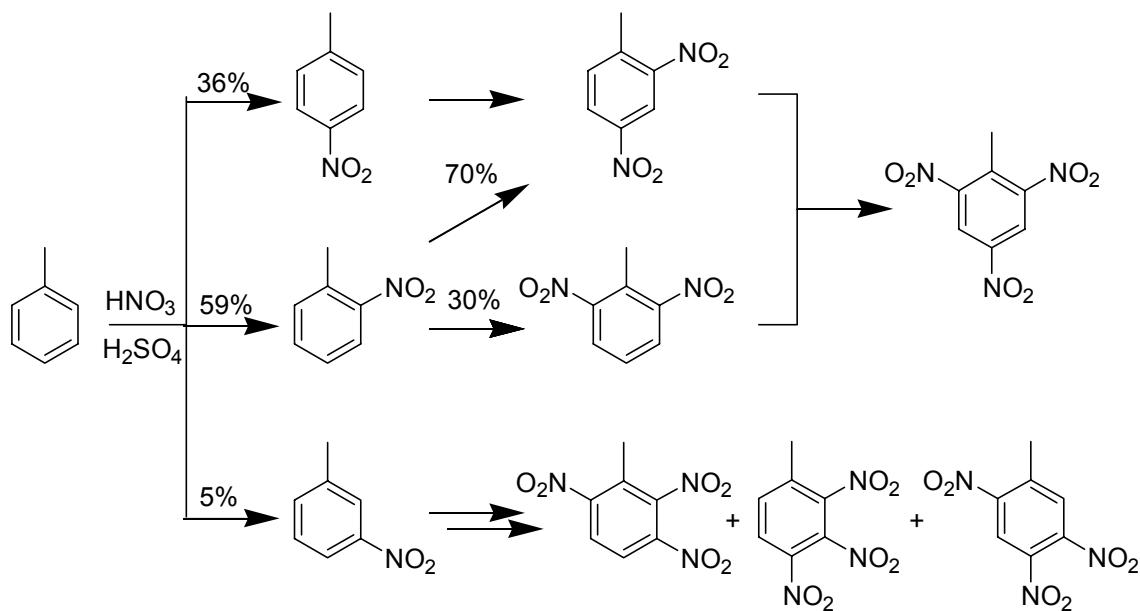
In der Bundesrepublik Deutschland wurden bis Ende 1995 vom Umweltbundesamt 3240 Rüstungsaltlaststandorte erfasst, hierin sind allerdings noch nicht die von der Westgruppe der ehemaligen Sowjetarmee zurückgegebenen Verdachtsflächen enthalten [1].

1.2 2,4,6-Trinitrotoluol

TNT ist ein sehr handhabungssicherer, stoßunempfindlicher Explosivstoff, der sich leicht vergießen lässt und durch Initialsprengstoffe zu heftiger Detonation gebracht werden kann [4]. Durch seine vergleichsweise unproblematische Handhabung war und ist TNT der bedeutendste Sprengstoff, sowohl für militärische als auch für gewerbliche Zwecke. Es wurde unrein erstmals 1863 von Wilbrand synthetisiert, Hepp stellte 1880 die reine Verbindung her. Ab 1900 erfolgte die großtechnische Produktion [5]. Durch den extrem großen Bedarf in den beiden Weltkriegen, wo es als Füllung unter anderem für Granaten, Minen, Torpedos und Bomben diente, wurde es im Millionen Tonnen Maßstab hergestellt und war der am meisten produzierte Sprengstoff der Welt. Allein im Deutschen Reich betrug die jährliche Produktion in den letzten Jahren des zweiten Weltkriegs mehr als 300 000 Tonnen [5]. Heutzutage liegt die Weltproduktion bei über einer Million Tonnen, obwohl die Produktion in den USA und der Bundesrepublik Deutschland eingestellt wurde [6].

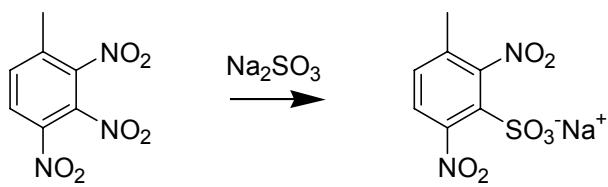
1.2.1 Herstellung

TNT wird großtechnisch durch dreifache Nitrierung von Toluol hergestellt. Die Einführung der Nitrogruppen erfolgt sukzessiv in drei Einzelschritten. Da der Aromat durch den elektronenziehenden Charakter der Nitrogruppe für eine weitere elektrophile Substitution deaktiviert wird, muss man für jede weitere Nitrierungsstufe die Konzentration der Nitriersäure und die Reaktionstemperatur erhöhen.



Schema 1.1: Produktverteilung bei der TNT-Produktion aus Toluol

Für die dritte Nitrierung von den Dinitrotoluolen (DNT) zum TNT verwendet man konzentrierte Salpetersäure in konzentrierter Schwefelsäure als Nitriersäure. Die schwächere, verdünnte und gereinigte Abfallsäure hieraus wird dann für die zweite Nitrierung verwendet usw. Obwohl die dirigierende Wirkung der Substituenten die Bildung des symmetrischen 2,4,6-TNT fördert, treten als Nebenprodukte der TNT-Herstellung auch unsymmetrisch substituierte Nitroaromatene auf (Schema 1.1). Diese werden durch die sogenannte Sulfitwäsche entfernt. Hierzu wird das TNT-Produktgemisch mit einer 7%igen Natriumsulfitlösung behandelt. Durch nucleophile aromatische *ipso*-Substitution wird die unsymmetrische Nitrogruppe durch eine Sulfonatgruppe ersetzt, wie exemplarisch am 2,3,4-TNT gezeigt wird [7]:



Schema 1.2: Sulfitwäsche von 2,3,4-TNT

Die entstehenden Dinitrotoluolsulfonate sind wasserlöslich und werden mit anderen löslichen Nebenprodukten wie den Trinitrobenzoësäuren ausgewaschen. Durch die Sulfonate erhält das Waschwasser eine charakteristische tief rote Färbung. Wegen der Waschprozesse ist der Wasserbedarf der TNT-Produktion enorm: Für eine Tonne TNT benötigt man 15 m^3 Wasser von denen 2 m^3 als kontaminiertes Abwasser anfallen [8].

1.3 Umweltchemie des TNT

Die Bewertung einer Umweltchemikalie sollte nach einem neuen interdisziplinären ethisch-naturwissenschaftlichen Ansatz von Schlesinger sowohl expositions- als auch wirkungsgestützt erfolgen [9]. Die Beurteilung der Chemikalie erfolgt so auf den drei Ebenen der Emission, Exposition und der Wirkung:

- Auf der Ebene der **Emission** wird erfasst, welche Menge einer Substanz in die Umwelt gelangt ist.
- Mit Hilfe der neu eingeführten quantitativen stoffspezifischen Parameter Persistenz und Reichweite soll dann beurteilt werden wie stark ein Stoff zu einer zeitlich und räumlich ausgedehnten **Exposition** beiträgt.
- Im letzten Schritt wird dann die schädigende **Wirkung** dieser Exposition z. B. anhand von Toxizitäts- oder Ökotoxizitätsdaten ermittelt.

Diesem Konzept entsprechend ist die umweltchemische Betrachtung des TNT in drei Abschnitte unterteilt.

1.3.1 Emission: Rüstungsaltlastenstandorte

Im Deutschen Reich gab es während des zweiten Weltkriegs neun große Sprengstoffwerke mit einer TNT-Monatsproduktion von mehr als 1000 Tonnen (Tabelle 1.1), daneben gab es noch 60 weitere Werke die TNT erzeugt oder verfüllt haben. Wegen des hohen Wasserbedarfs bei der TNT-Produktion (Kap. 1.2.1) lagen diese Werke in Gebieten mit hohem Grundwasservorkommen, die heute noch zur Trinkwassergewinnung genutzt werden.

Tabelle 1.1: Standorte der größten Sprengstoffwerke im Dritten Reich [10]

| Standort | Produktion [t/Monat] |
|-----------------------------|----------------------|
| Stadtallendorf | 5000 |
| Hessisch-Lichtenau | 3500 |
| Clausthal-Zellerfeld | 2800 |
| Krümmel (bei Geesthacht) | 2800 |
| Elsnig (bei Torgau) | 2600 |
| Schlebusch (bei Leverkusen) | 1500 |
| Güsen (bei Genthin) | 1300 |
| Dömitz | 1200 |
| Dragahn | 1100 |

Eine Reihe dieser Produktionsanlagen wurde übereilt und ohne endgültige Fertigstellung in Betrieb genommen. Das betraf besonders die Problematik der Abfall- und Abwasserbeseitigung, so dass konzentrierte Abwässer in Teichen “zwischengelagert” oder in Schluckbrunnen eingeleitet und feste Abfälle auf dem Betriebsgelände abgelagert wurden [11]. Allein im Werk “Tanne” bei Clausthal-Zellerfeld wurden, nachdem das Einleiten in den Fluss Bremke für ein Fischsterben gesorgt hatte und sogar das Wasserwerk in Hannover gefährdete, insgesamt 540 000 m³ Abwässer mit einem TNT-Gehalt von ca. 100 mg/L in Schluckbrunnen verpresst [12].

Durch kriegsbedingte Zerstörungen und noch mehr durch die Demontage oder Sprengung der Anlagen nach dem Krieg sind Sprengstoffe zentner- und tonnenweise im Gelände verstreut oder auch planlos vergraben, in alte Schächte, Erdtrichter und Gruben geschüttet oder in Bunkern zugesprengt worden. Noch heute finden an ehemalige Sprengstoffwerke grenzende Anwohner praktisch intakte Klumpen von reinem TNT [11].

Neben TNT können auf den Flächen dieser Werke noch über hundert andere nitroaromatische Verbindungen nachgewiesen werden, die entweder Zwischen- und Abfallprodukte der Produktion waren oder durch natürliche Transformation des TNT entstanden sind. Eine quantitativ wichtige Rolle spielen dabei aber nur die TNT-Vorprodukte 2,4-Dinitrotoluol und 2,6-Dinitrotoluol sowie die reduzierten Metabolite 2-Amino-4,6-dinitrotoluol (2-ADNT) und 4-Amino-2,6-dinitrotoluol (4-ADNT) [13]. Deren relative Häufigkeit auf einer exemplarisch untersuchten Altlast Stadtallendorf sind in Tabelle 1.2 (Seite 7) aufgeführt.

1.3.2 Exposition: Persistenz und Reichweite

Die **Persistenz** beschreibt den zeitlichen Konzentrationsverlauf einer Substanz relativ zur anfänglich vorhandenen Stoffmenge. Die große Persistenz des TNT zeigt sich allein daran, dass es auf über fünfzig Jahre liegenden Altlasten immer noch der Hauptkontaminant und in hohen Konzentrationen nachweisbar ist. Die Persistenz beruht auf seinen chemischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften:

Trotz seiner explosiven Eigenschaften ist TNT chemisch sehr stabil. Die drei Nitrogruppen üben durch einen negativen induktiven und mesomeren Effekt eine stark elektronenziehende Wirkung auf den aromatischen Ring aus. Außerdem schirmen sie das Ringsystem durch ihre symmetrische Anordnung sterisch ab. Dadurch ist ein oxidativer, elektrophiler Angriff auf den Ring nicht möglich. Transformationen des TNT finden daher zuerst an den Substituenten statt: Mikrobiologisch durch Reduktion von Nitrogruppen (Kap. 1.4) und photochemisch durch Oxidation der Methylgruppe und anschließender Decarboxylierung [14]. Da die so

entstehenden Verbindungen aber ähnliche toxikologische Eigenschaften wie das TNT selbst aufweisen, mindert dies nicht die Umweltgefährdung.

Wichtige physikochemische Größen für die Verteilung einer Substanz in der Umwelt sind die Wasserlöslichkeit und der Dampfdruck. Der Dampfdruck von $0,15 \cdot 10^{-3}$ Pa bei 20°C ist so niedrig, dass die Verbreitung des TNT über die Gasphase keine Rolle spielt. Auch der Übergang von der wässrigen in die gasförmige Phase ist bei einer Henry-Konstante von 0,27 Pa·l/mol vernachlässigbar klein. Die Wasserlöslichkeit des TNT ist relativ gering und beträgt bei 20°C 130 mg/L [15,16]. TNT ist damit als gering mobil einzustufen. Das bedeutet, TNT wird an kontaminierten Stellen noch für lange Zeit in kleinen, aber beständigen Mengen aus dem Boden gewaschen und gelangt so permanent ins Grundwasser ohne vollständig ausgewaschen zu werden. Für Abschätzungen von TNT-Belastungen muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass die Lösungskinetik von TNT abhängig von der Korngröße ist [17]. Eine weitere wichtige Verteilungsgröße ist der Bodenadsorptionskoeffizient k_d , der allerdings abhängig von der Bodenart sehr stark variiert und zwischen 470 und 1590 liegen kann [5]. Es konnten z. B. Abhängigkeiten vom Kohlenstoffgehalt, von der Kationen-Austausch-Kapazität und vom Tonanteil des Bodens gezeigt werden [18].

Die **Reichweite** beschreibt den räumlichen Konzentrationsverlauf relativ zur Konzentration am Freisetzungsort. Die Reichweite des TNT ist nur schwierig zu beurteilen, weil schon die Freisetzung auf viele verschiedene Weisen auf relativ breit gestreuten Flächen erfolgte. Wie die Beispiele im vorigen Kapitel zeigen (Fischsterben vom Harz bis nach Hannover), ist die Reichweite des TNT immer dann besonders hoch, wenn es in die wässrige Phase und damit z.B. in Flüsse oder Grundwasser gelangt. Deshalb wurde bei der ersten Sicherung der Altlastenstandorte das Abwasser in Brunnen aufgefangen und über Aktivkohlefilter geleitet.

1.3.3 Wirkung: Toxikologie

TNT ist, wie viele aromatische Nitroverbindungen, für den Menschen akut toxisch. Es reizt die Haut, führt bei oraler Aufnahme zu gastrointestinalen Reizerscheinungen mit Erbrechen und Durchfall und bei resorptiver Aufnahme zu Kopfschmerzen, Schwindel, Übelkeit, Schwäche, Cyanose, Atemstörungen und Blutdruckabfall bis hin zu Kollaps und Bewusstlosigkeit. Als Blutgift wandelt es Hämoglobin in Methämoglobin um, wodurch der Sauerstofftransport im Blut vermindert wird. Folgen davon sind Veränderungen der roten Blutkörperchen, Gelbsucht, Anämie, und Schädigungen des zentralen Nervensystems [19,5,20].

Zusätzlich wurden für TNT kanzerogene und mutagene Effekte im Tierversuch nachgewiesen. Auf Basis zahlreicher Versuchsdaten wurde von der EPA (Environmental Protection Agency, höchste Umweltbehörde der USA) für TNT eine tolerable resorbierbare Dosis (TRD) von 0,33 µg pro kg Körpergewicht und Tag (µg/(kg·d)) berechnet, bei der das zusätzliche Krebsrisiko bei lebenslanger Exposition um nicht mehr als das $1 \cdot 10^{-5}$ fache steigt. Für wichtige TNT Vor- und Abbauprodukte ist die Fähigkeit Krebs zu erzeugen in Tabelle 1.2 relativ zum TNT angegeben. Die Werte für die noch gefährlicheren Dinitrotoluole stammen ebenfalls aus Risikoabschätzungen auf breiter Datenbasis, während die Werte für die Aminodinitrotoluole nur aus *in vitro*-Mutagenitätstests abgeleitet sind [21]. Für die akute toxische Wirkung bei einer kurzfristigen Exposition wurde für TNT eine TRD von 10 µg/(kg·d) berechnet.

Die Metabolisierung des TNT im Körper erfolgt auf den bekannten Reduktionswegen (siehe Kap. 1.4) über Hydroxylamino- und Aminodinitrotoluole. So findet man innerhalb von 24 h im Harn 4-ADNT, 2-ADNT, 2,4-Diaminonitrotoluol (2,4-DANT), 4-Hydroxyaminodinitrotoluol (4-OH-ADNT) und unverändertes TNT. Sowohl für die methämoglobinbildende als auch für die kanzerogene Wirkung des TNT wird der reaktive Metabolit 4-OH-ADNT verantwortlich gemacht. Durch Wasserabspaltung kann er Nitreniumionen bilden, die als starke Elektrophile an nukleophile Zentren der DNA addieren können [21]. Trotz guter Fettlöslichkeit reichert sich TNT im Fettgewebe nicht an, sondern wird über den Urin ausgeschieden [5].

Tabelle 1.2: Häufigkeit und ausgewählte Toxizitätsdaten von relevanten Nitroaromaten

| Substanz | Häufig-keit ^a [13] | akute Toxizität ^b [20] | Krebs-risiko ^b [21] | humane Monocyten EC ₅₀ ^c [µg/L] | aquatische Toxizität [13] | Algen NOEL ^d [mg/L] | Leucht-bakterien EC ₂₀ ^e [mg/L] |
|----------------|----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|--|------------------------------|-----------------------------------|--|
| 2,4-DNT | 15,5 | 1 | 5 | | toxisch | 2,7 | 22 |
| 2,6-DNT | 9,1 | 0,5 | 150 | | sehr toxisch | 12 | 1,6 |
| TNT | 46,8 | 1 | 1 | 8 | sehr toxisch | 0,6 – 3 | 1 |
| 2-ADNT | 9,7 | | 0,5 | >50 | toxisch | 50 | 38 |
| 4-ADNT | 11,3 | | 0,1 | 38 | toxisch | | |

a) Mittelwerte aus 1024 Analysen von einem Rüstungsaltlastenstandort (Stadtallendorf)

b) in Äquivalenten zu den TNT-Werten

c) Effective Concentration₅₀: Konzentration, bei der 50%ige Hemmung des Effektes eintritt [22]

d) No Observed Effect Level: Konzentration unterhalb der kein Effekt mehr zu beobachten ist

e) Effective Concentration₂₀: Konzentration, bei der 20%ige Hemmung des Effektes eintritt [13]

Auch zur Ökotoxikologie des TNT liegen zahlreiche Untersuchungen vor: Bei TNT-Konzentrationen über 50 mg/L ist das Wachstum von Pilzen und Gram-positiven Bakterien unterdrückt oder gehemmt, Gram-negative Bakterien können auch bei Konzentrationen bis zu 100 mg/L noch wachsen [23]. Die aquatische Toxizität mehrerer Nitroaromaten wurde mit einem Leuchtbakterientest mit *Vibrio fischeri* bestimmt, TNT wurde demnach als sehr toxisch eingestuft. Toxische Wirkung zeigt TNT auch gegenüber Fischen und Algen. Ausgewählte Toxizitätsdaten sind in Tabelle 1.2 aufgelistet. Auch gegenüber verschiedenen Bodenorganismen zeigt TNT toxische Effekte, bei Pflanzen kann ab bestimmten Konzentrationen eine Wachstumshemmung auftreten, andererseits können einige Pflanzen TNT aber auch akkumulieren oder metabolisieren. Man versucht zur Zeit, diese Eigenschaften für neue Sanierungsmodelle zu nutzen.

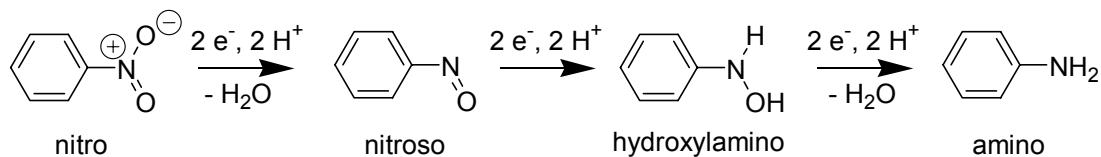
1.4 Abbauwege des TNT

1.4.1 Mikrobiologische Transformation von TNT

Für die xenobiotischen Nitroaromaten gibt es drei gangbare mikrobiologische Transformationswege:

- **oxidativer Angriff** auf den Ring mit Mono- und Dioxygenasen
- **reduktive Hydrierung** des Ringes unter Bildung eines Meisenheimer-Komplexes
- teilweise oder vollständige **Reduktion der Nitrogruppen**

Ein oxidativer Angriff auf TNT ist wegen der Elektronenarmut des aromatischen Ringes unmöglich und wird nur bei Mono- und Dinitrotoluolen beobachtet. Die Bildung des Meisenheimer-Komplexes (siehe auch Kap. 1.4.3) konnte von Knackmuss bei einer *Mycobacterium*-Spezies gezeigt werden, spielt aber sonst nur eine untergeordnete Rolle [24,25]. Fast alle Mikroorganismen transformieren TNT durch Reduktion der Nitrogruppen:

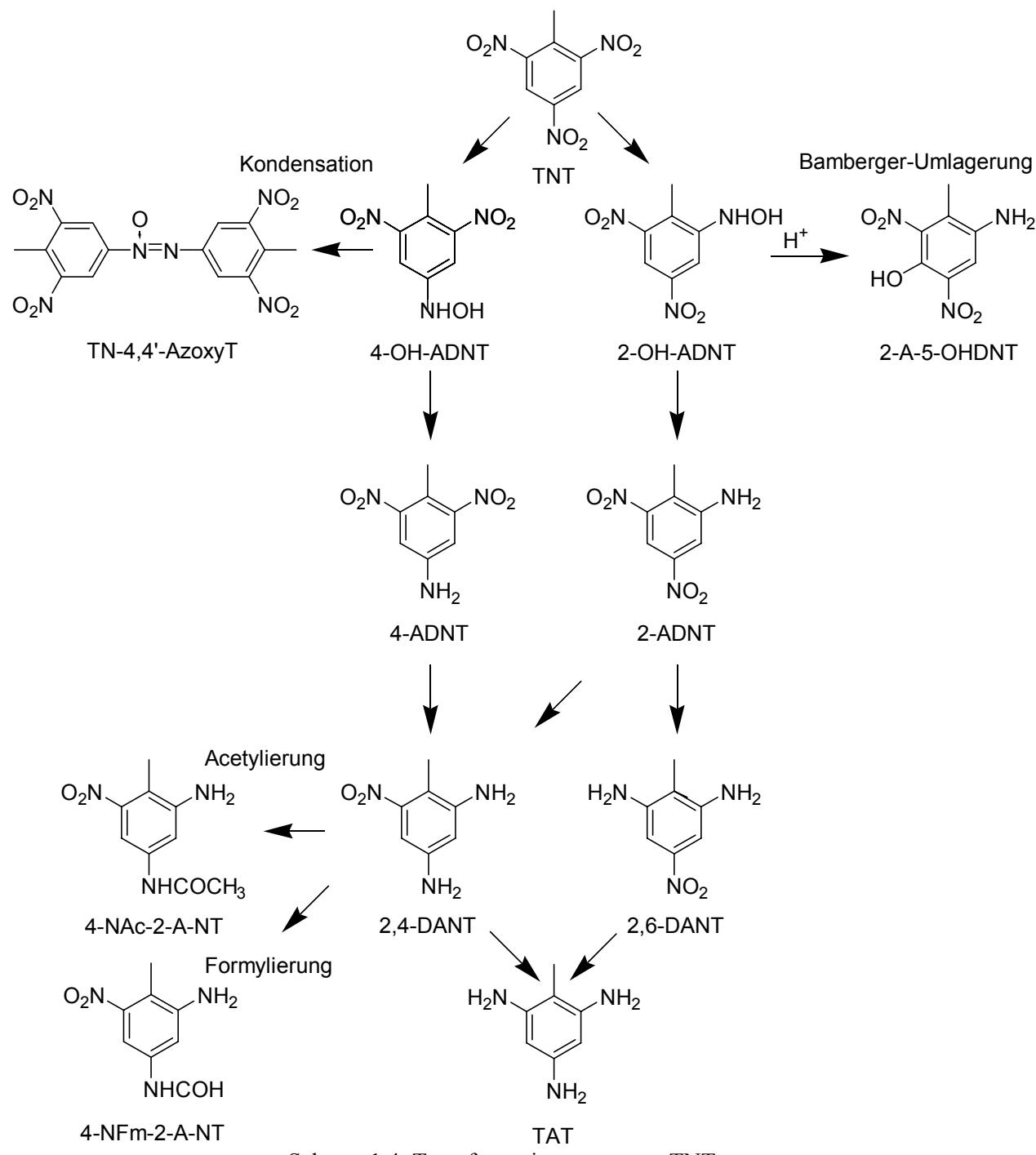


Schema 1.3: Reduktion einer aromatischen Nitro- bis zur Aminogruppe

Die Reduktion erfolgt in drei Schritten in denen jeweils zwei Elektronen transferiert werden, bis zur Aminogruppe. Die Umsetzungen erfolgen cometabolisch und werden z.B. von Nitroreduktasen katalysiert. Die Nitroso- und Hydroxylaminozwischenstufen sind sehr reaktiv und instabil, die Nitrosoaromaten lassen sich kaum nachweisen. Hydroxylaminoverbindungen

sind oxidations- und reduktionsempfindlich aber zumindest für einige Zeit stabil. Unter aeroben Bedingungen werden sie teilweise oxidiert und können zu Azoxyverbindungen dimerisieren (Kap. 3.1.3). Aerobe Organismen reduzieren TNT meist nur bis zu Monoamino-dinitroverbindungen (ADNTs), eventuell auch noch bis zur Diaminomononitroverbindung (DANT). Weil durch den elektronenschiebenden Einfluss der Aminogruppen eine weitere Reduktion erschwert wird, ist eine vollständige Reduktion bis zum Triaminonitrotoluol (TAT) nur unter strikt anaeroben Bedingungen bei einem Redoxpotential $E_h < 200$ mV möglich [26]. Die weiteren Reaktionen des sehr reaktiven TAT sind nicht genau geklärt: In Gegenwart von Sauerstoff, besonders bei Anwesenheit von Metallionen (z.B. Mn^{2+}), erfährt es eine schnelle Autoxidation zu dunklen Polymeren und entzieht sich so einem aeroben Metabolismus. Im Boden vermutet man die Wechselwirkung mit Bodenbestandteilen wie Tonschichten oder Huminsäuren. In Tonschichten erfolgt eine Interkalation, da mit phenolischen Bestandteilen der Huminsäuren kovalente Bindungen möglich sind, die für eine irreversible Bindung des TAT an den Boden sorgen könnten [26].

Das Schema 1.4 gibt einen Überblick über die wichtigsten reduktiven Transformationswege des TNT. Für die Nebenreaktionen wird aus Gründen der Übersicht jeweils nur eine Beispielverbindung gezeigt, auch wenn die Bildung weiterer Regioisomere möglich ist. So kann 2-ADNT entsprechend dem 4-ADNT zur Tetranitro-2,2'-azoxyverbindung kondensieren und auch die Bildung von gemischten Dimeren ist möglich. Die Bamberger-Umlagerung kann nicht nur eine *para*- sondern auch eine *ortho*-Hydroxylgruppe hervorbringen [27]. Auch eine Acetylierung oder Formylierung kann theoretisch an jeder Amino- und Hydroxylaminogruppe erfolgen, weil beide durch das freie Elektronenpaar am Stickstoff über genügend nucleophile Eigenschaften verfügen. Zahlreiche acetylierte und formylierte TNT-Metabolite konnten in mikrobiologischen Untersuchungen identifiziert werden [28].



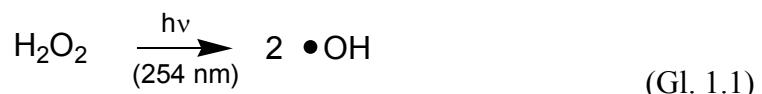
Schema 1.4: Transformationswege von TNT

Als einzige Mikroorganismen, die zu einer Mineralisierung von TNT befähigt sind, sind bisher einige Weißfäulepilze bekannt, allerdings ist die Mineralisierung nicht vollständig und verläuft langsam [29,30,26]. Sie verfügen über ein extrazelluläres Enzymsystem mit großer Oxidationskraft, das sogenannte lignolytische System, mit dem sie natürlicherweise das Lignin von Baumrinden zersetzen. Auch mit aus diesem System isolierten einzelnen Enzymen, speziell der Manganperoxidase, ist eine Mineralisierung von aromatischen Verbindungen wie z.B. ADNT unter Zusatz einiger Cofaktoren möglich [31,32]. Neuere

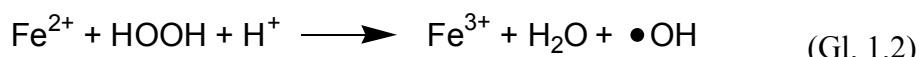
Untersuchungen legen jedoch nahe, dass die Weißfäulepilze das TNT zuerst reduzieren müssen, bevor sie dann die entstandenen ADNTs mineralisieren können. [33]

1.4.2 Photochemischer Abbau von TNT

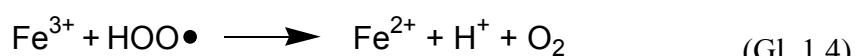
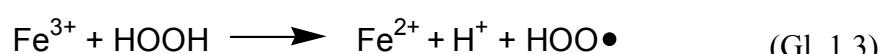
Die Mineralisierung von TNT erfordert eine sehr stark oxidierende Spezies. Das Hydroxylradikal ($\text{OH}\cdot$) ist ein extrem reaktives Oxidans, dessen Redoxpotential mit Werten zwischen 1,83 V [34] und 2,81 V [35] angegeben wird. Es kann auf physikalischem und chemischem Wege generiert werden. Abwasserbehandlungsmethoden, die sich die Wirkung dieses Radikals zu Nutze machen werden als Advanced Oxidation Processes (AOPs) bezeichnet [36]. Physikalisch kann man das OH-Radikal durch Radiolyse und Photolyse herstellen. **Photolytisch** entsteht es durch homolytische Spaltung von Wasserstoffperoxid oder anderen Peroxiden mittels UV-Licht im Wellenlängenbereich zwischen 200 und 300 nm [37]:



In der nach ihrem Entdecker H. J. H. **Fenton** benannten Reaktion wird das Radikal chemisch durch die Umsetzung von Eisen(II)-salzen mit Wasserstoffperoxid in saurer Lösung erzeugt:



Die Rolle des Eisens können auch andere Übergangsmetalle in ihren niedrigeren Oxidationsstufen, wie z.B. Ti^{3+} , Cr^{2+} oder Cu^+ einnehmen. Das nach Gleichung 2 gebildete Fe^{3+} wird entweder durch Reduktion mit intermediär gebildeten organischen Radikalen oder durch Reaktion mit H_2O_2 wieder in das zweiwertige Eisen überführt [35]:



Die Kombination dieser beiden Methoden nennt man **Photo-Fenton**-Reaktion. Hierbei findet zusätzlich eine Reduktion $\text{Fe}(\text{III})$ durch UV-Licht statt:

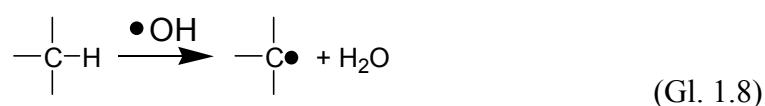
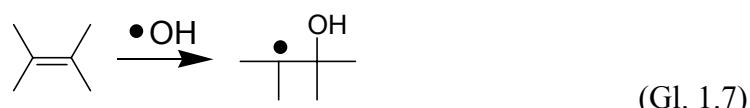


Eine weitere Quelle für Hydroxylradikale bei der Photo-Fenton-Reaktion sind Eisenhydroxo- und Eisenoxo-Komplexe, die durch Hydrolyse von Eisen(III)-ionen in wässrigen Lösungen gebildet werden. Bei pH-Werten zwischen 3 und 5 enthalten die Lösungen $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$, das bei der Bestrahlung mit UV-Licht durch Photodissociation Hydroxylradikale bildet:

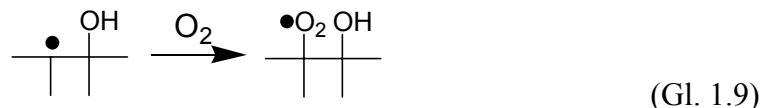


Neben den bereits beschriebenen Methoden zur Bildung von OH-Radikalen gibt es noch die Verfahren der Ozonierung und der Photokatalyse, auf die hier aber nicht ausführlich eingegangen wird, da sie in dieser Arbeit keine Anwendung fanden. Bei der **Photokatalyse** verwendet man den Halbleiter Titandioxid, der in wässriger Phase bei Anregung mit Lichtwellen < 380 nm Leitungsbandelektronen und Valenzbandlöcher bildet. Diese können dann in Redoxreaktionen mit Wasser oder Wasserstoffperoxid Hydroxylradikale erzeugen.

Mit organischen Verbindungen reagiert das OH-Radikal zunächst unter Addition (Gl. 1.7) oder Wasserstoffabstraktion (Gl. 1.8):



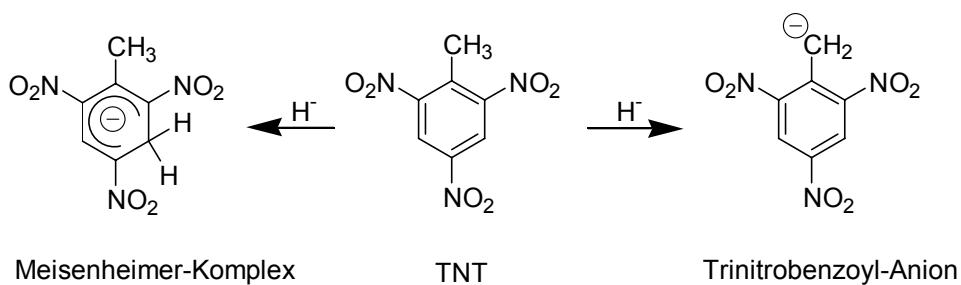
In sauerstoffhaltigen Lösungen können die so gebildeten Kohlenstoff-zentrierten Radikale zu Peroxylradikalen weiter reagieren:



Die Addition von Hydroxylradikalen an aromatische Ringe erfolgt in der Regel sehr schnell mit Geschwindigkeitskonstanten von ca. $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, bei substituierten Systemen sind jedoch auch viele Nebenreaktionen wie z.B. der Angriff auf eine Seitenkette möglich [38]. Folgereaktionen führen zu einer Öffnung des aromatischen Rings und letztlich zu einer Mineralisierung der organischen Verbindung.

1.4.3 Reaktion von TNT mit Basen

Mit starken Basen wie H^- , OH^- und OR^- geht TNT zwei konkurrierende Reaktionen ein, die Bildung eines Meisenheimer-Komplexes und die Bildung eines Trinitrobenzoyl-Anions. Je nach Art und Konzentration der Base kann die eine oder andere der beiden Reaktionen bevorzugt sein. Der Meisenheimer-Komplex (MK) zeigt eine intensive rotbraune Färbung, die z.B. eine Anwendung in der TNT-Analytik ermöglicht [39]. Synthetisiert werden kann der Hydrid-MK durch Hydrierung mit Octahydrotriborat. Bei stärkeren Hydrierungsmitteln wie NaBH_4 geht die Reaktion weiter bis zum Trinitromethylcyclohexadien [40,41]. In Basen wie NaOH oder Alkoxiden überwiegt die Bildung des Trinitrobenzyl-Anions, dessen weitere Reaktionen vermutlich zu einer Polymerisierung führen [42,43].



Schema 1.4: Bildung von Hydrid-Meisenheimer-Komplex und Trinitrobenzyl-Anion

1.5 Sanierungsmethoden: Stand der Technik

Erfahrungen auf dem Gebiet der Sanierung von Rüstungsaltlasten existieren vor allem in den Vereinigten Staaten, wo verschiedenste Behandlungsmethoden entwickelt und teilweise bis zur Anwendungsreife erprobt worden sind. Auch in der Bundesrepublik Deutschland und Kanada sowie in geringerem Ausmaß in Großbritannien und Australien steht entsprechendes “Know how” zur Verfügung. Aus einigen Ländern, z.B. China, Indien, Niederlande und Rußland, liegen Arbeiten zum Abbauverhalten von TNT, nicht jedoch zu Sanierungs-technologien vor [44].

Bei den Entsorgungs- und Sanierungsmethoden für TNT muss man prinzipiell drei Bereiche unterscheiden:

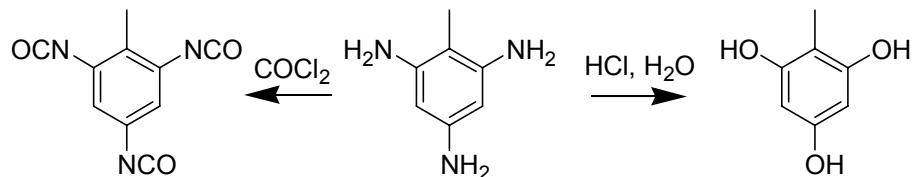
- Die Entsorgung von TNT und TNT-Gemischen aus alter Munition (Delaborierung)
 - Die Sanierung von TNT-belasteten Böden
 - Die Sanierung von TNT-belasteten Abwässern

Erstes Ziel einer solchen Sanierung ist die Umwandlung der Kontaminanten in ungefährliche Substanzen. Erfolgt eine vollständige Zerlegung in anorganische Bestandteile wie Kohlenstoffdioxid, Stickoxide und Wasser, spricht man von einer Mineralisierung. Sofern eine Umwandlung nicht direkt möglich ist oder nur ebenfalls gefährliche Verbindungen hervorbringt, versucht man zunächst die Substanzen zu immobilisieren.

1.5.1 Die Entsorgung von TNT aus Delaborierung

Eine Wiederverwendung oder ein Recycling von TNT aus alter Munition würde eine aufwendige Wiederaufbereitung erfordern und ist deshalb weder ökonomisch noch ökologisch sinnvoll. Ein idealer Weg wäre die chemische Konversion von TNT zu anderen wertvolleren Chemikalien. Als kommerziell interessante Reaktion galt lange die katalytische Reduktion von TNT zu TAT mit Wasserstoff, die in Ausbeuten bis zu 98% möglich ist. Die BASF versuchte in den 70er Jahren nach diesem Verfahren Isocyanate als Edukte für

Polyurethane herzustellen. Aus dem reaktiven TAT ließe sich zudem durch Hydrolyse Trihydroxytoluol herstellen, das ähnlich wie das Phloroglucin (Trihydroxybenzol) als Synthesebaustein für Pharmaprodukte und als Zusatzstoff für Kosmetika und Photoentwickler dienen könnte. Schema 1.5 zeigt diese beiden Reaktionsmöglichkeiten:



Schema 1.5: Umsetzung von TAT zu Toluoltriisocyanat und Trihydroxytoluol

Letztlich ist die industrielle Anwendung solcher Umsetzungen aber am gewaltigen Investitionsbedarf für solche Anlagen und am Überangebot der Produktklassen auf dem Weltmarkt gescheitert [45]. Trotzdem wird heute immer noch nach sinnvollen Umsetzungsmöglichkeiten für TNT geforscht [46,47,48].

Daher bleibt als bezahlbarer und kurzfristig realisierbarer Weg zur Vernichtung von Explosivstoffen aus alter Munition zur Zeit nur deren Verbrennung. Die kontrollierte Verbrennung erfolgt in Drehrohröfen mit nachgeschalteter Abgasreinigung. Als nachteilig erweisen sich die hohen Investitions- und Unterhaltungskosten die entstehen, weil zur vollständigen Verbrennung Fremdenergie zugeführt werden muss und weil die Sicherheits- und Umweltauflagen sehr streng sind. Ein Vorteil ist, dass auch schwer trennbare Gemische verbrannt werden können. Seit 1994 arbeitet eine Verbrennungsanlage für Explosivstoffe im Bundesland Sachsen [45].

1.5.2 Die Sanierung TNT-belasteter Böden

Auch für TNT-belastete Böden ist die Verbrennung ein erprobtes und bereits angewandtes Verfahren, das sich wegen seiner hohen Kosten aber nur für hochkontaminierte Böden lohnt. Ähnliches gilt für die aus der “klassischen” Altlastensanierung stammenden physikalischen Verfahren wie z. B. die Bodenwäsche, die ebenso wie die Verbrennung teuer und nur ex situ durchführbar sind. Im Labormaßstab wurden auch chemische ex situ Verfahren wie die basische Hydrolyse erprobt [49,50]. Eine Sanierung großer, nur geringfügig kontaminierte Flächen ist mit diesen Techniken nicht möglich. Schon seit den siebziger Jahren wurde daher intensiv nach biologischen Methoden geforscht, die einen TNT-Abbau ermöglichen sollten. Es wurde aber bis dato keine geeignete Technik zur mikrobiologischen Mineralisierung von TNT gefunden (siehe Kap. 1.4) [30]. Daher konzentriert man sich zur Zeit auf Sanierungsstrategien, bei denen das TNT durch Transformationen zu immobilen Metaboliten

gesichert werden soll, also z.B. durch Anbindung an die Humusmatrix oder durch Aufnahme in Pflanzen (Phytoremediation) [44]. Die Bindung an Bodenbestandteile erfolgt in Verfahren wie der Kompostierung oder einer anaerob/aeroben Behandlung mit Bakterien. Zwei solcher Verfahren wurden bereits im Werk “Tanne” bei Clausthal-Zellerfeld maßstabgerecht erprobt [51]. Es ist jedoch nur sehr schwierig und langwierig nachzuweisen, ob die Immobilisierung des TNT tatsächlich dauerhaft erfolgt ist und eine irreversible Bindung an die Bodenmatrix stattgefunden hat. Für die beiden oben genannten Verfahren läuft hierzu im Moment eine Langzeituntersuchung mit radioaktiv markiertem TNT am Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie [52]. Hauptproblem der Bodensanierung bleibt die stark unterschiedliche Belastung der kontaminierten Flächen, die von kristallinen Klumpen bis zu wenigen $\mu\text{g}/\text{kg}$ Boden TNT reichen kann und die eine rentable vollständige Sanierung der zumeist riesigen Bodenareale unmöglich machen.

1.5.3 Die Sanierung TNT-belasteter Abwässer

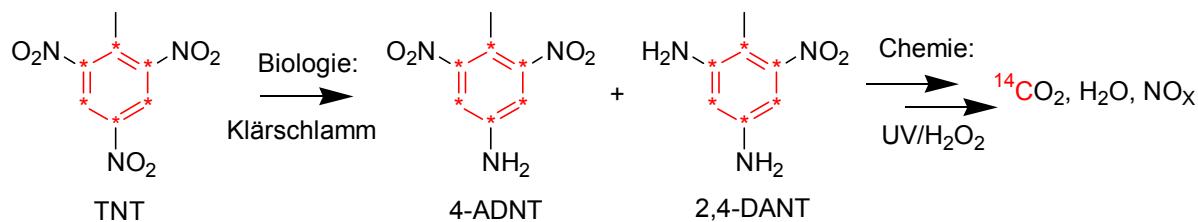
Aufgrund der oben beschriebenen Schwierigkeiten bei der Bodensanierung ist das Auffangen und Aufreinigen der belasteten Gewässer eine sinnvolle und häufig praktizierte Alternative. Zur Zeit ist der Stand der Technik bei der Reinigung mit Nitroaromaten belasteter Gewässer die Adsorption an Aktivkohle. Allerdings ist auch diese Technik mit Problemen behaftet: So erweist sich die Adsorption vor allem bei polaren TNT-Metaboliten als schwierig und oft unvollständig, sodass polare Transformationsprodukte des TNT im Auslauf solcher Anlagen nachgewiesen werden konnten [53]. Außerdem findet durch die Adsorption nur eine Verlagerung der Schadstoffe an ein anderes Medium und keine endgültige Auflösung des Gefährdungspotentials statt. In einigen Staaten der USA wird mit dem gesetzlichen Verbot dieser Technik in den nächsten Jahren gerechnet [54]. Zur Verbesserung der Adsorptionstechnik gibt es Pilotprojekte mit alternativen Adsorbentien. Im Labormaßstab wurden neue biologische Verfahren und Verfahren mit *in-situ* Reaktionswänden getestet. Als einzige erprobte Methode, die eine Mineralisierung des TNT ermöglicht, steht die UV-Oxidation zur Verfügung. In einer vergleichenden Untersuchung von vier Verfahrensanbietern zeigte sich aber, dass im Pilotmaßstab nicht alle Anbieter die Sanierungszielwerte einhalten konnten, obwohl dies im Technikumsmaßstab noch der Fall gewesen war [44]. Zudem ist die UV-Oxidation durch den erforderlichen hohen Energieeintrag eine sehr teure Methode. Einen neuen Ansatz stellen kombinierte biologisch-chemische Verfahren dar, zu denen schon einige vielversprechende Laborversuche vorliegen [8,37,55,54].

2 Aufgabenstellung

Die Sanierung von Rüstungsaltlasten stellt heute weltweit immer noch eine chemische, analytische und technologische Herausforderung dar.

In dieser Arbeit soll die Leistungsfähigkeit eines kombinierten biologisch-chemischen Verfahrens zur Sanierung von TNT-belasteten Abwässern aufgezeigt und das Verfahren optimiert werden. Sanierungsziel ist die vollständige Mineralisierung des Schadstoffes TNT zu den ungefährlichen Substanzen Kohlendioxid und Wasser sowie zu anorganischen Stickstoffverbindungen. Der Nachweis der Mineralisierung kann mit Hilfe von ^{14}C -ringmarkiertem TNT erfolgen, das noch aus unseren früheren Synthesen zur Verfügung steht [56]. Das entstehende $^{14}\text{CO}_2$ wird adsorbiert und ermöglicht so eine komplette Quantifizierung des Abbaus mit Hilfe der Radioisotopentechnik.

Ein Schwerpunkt der Arbeit soll das Auffinden und Ausnutzen von Synergien zwischen Biologie und Chemie sein. Da TNT selbst photochemisch nur schwierig und mit hohem Energieaufwand mineralisierbar ist, soll hier die Strategie evaluiert werden, TNT zunächst biologisch zu reduzieren, um dann die vermutlich leichter oxidierbaren Reduktionsprodukte photochemisch zu behandeln. Das Schema 2.1 verdeutlicht dieses Konzept, wobei die Positionen der radioaktiven Markierung mit dem Isotop C 14 durch einen Stern symbolisiert sind.



Schema 2.1: Konzept für einen kombinierten Abbau zur Mineralisierung von TNT

Zunächst sollen hierzu die beiden Schritte einzeln untersucht und optimiert werden, worauf dann eine Optimierung des Gesamtprozesses folgen soll.

Für den biologischen Reduktionsschritt wird herkömmlicher Klärschlamm verwendet, weil dieser kostengünstig, einfach zu handhaben, vielseitig und wenig spezialisiert ist. Im Laufe der Versuche soll geklärt werden, wie TNT möglichst schnell und vollständig in Mono- oder sogar Diaminonitrotoluole umgesetzt werden kann. Zu optimierende Parameter sind dabei unter anderem die Menge des Cosubstrats, die Sauerstoffzufuhr und die Adsorption der Nitroaromaten am Schlamm.

Im photochemischen Teilschritt erfolgt dann die eigentliche Mineralisierung mit Hilfe von Prozessen, die auf der hohen Oxidationskraft von Hydroxylradikalen beruhen. Es sollen verschiedene Methoden zur Generierung des Radikals verglichen werden, zum Beispiel die lichtinduzierte homolytische Spaltung von Wasserstoffperoxid und die als Fenton-Reaktion bekannte Aktivierung von Wasserstoffperoxid mit Eisen. Die effektivste Methode soll optimiert und auf die reduzierten TNT-Derivate angewandt werden. Das Mineralisierungsverhalten der Aminonitrotoluole (ANTs) soll bilanziert und verglichen werden. Hieraus können dann wieder wichtige Schlüsse für den Gesamtabbau gezogen werden.

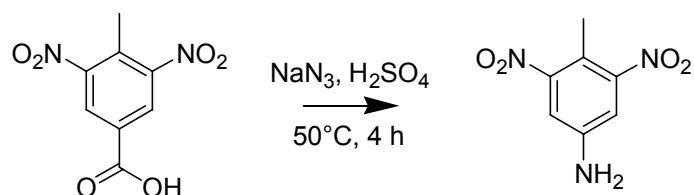
Um das Mineralisierungsverhalten der reduzierten TNT-Transformationsprodukte untersuchen zu können, müssen die Monoaminoverbindungen 2-ADNT und 4-ADNT sowie die Diaminoverbindungen 2,4-DANT und 2,6-DANT jedoch auch als radioaktiv markierte Verbindungen vorliegen. Hierfür müssen ausgehend vom ^{14}C -TNT zuverlässige Synthesen erarbeitet werden, die, wenn möglich, das schon bekannte mikrobiologische Reduktionsverhalten des TNT ausnutzen. Die Reaktionsbedingungen müssen den Sicherheits- und Reproduzierbarkeitsanforderungen einer Radiosynthese angepasst werden. Für die analytische Verfolgung der Abbauwege ist außerdem die Synthese weiterer nicht radioaktiv markierter Referenzsubstanzen erforderlich.

Hauptziel ist die vollständige Bilanzierung des kombinierten Abbaus unter besonderer Berücksichtigung von anwendungstechnischen Aspekten. Aus den Ergebnissen sollte sich ableiten lassen, in wie weit das neu entwickelte kombinierte biologisch-chemische Verfahren eine technisch und ökonomisch sinnvolle Möglichkeit zur Sanierung TNT-belasteter Abwässer sein kann.

3 Ergebnisse der synthetischen Arbeiten

3.1 Synthese von Referenzsubstanzen

3.1.1 Synthese der Aminodinitrotoluole

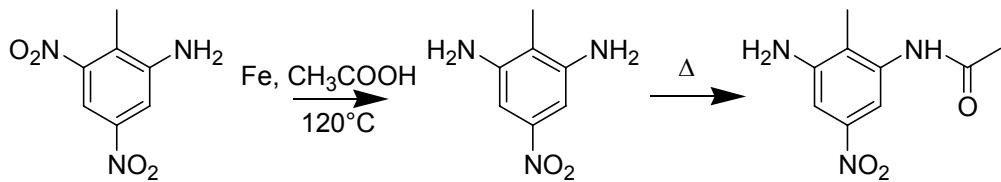


Schema 3.1: 4-ADNT aus 3,5-Dinitro-*p*-toluolsäure

Die beiden Aminodinitrotoluole, 4-ADNT und 2-ADNT, wurden durch Schmidt-Reaktion aus den jeweiligen 3,5-Dinitrotoluolsäuren, 3,5-Dinitro-*p*-toluolsäure und 3,5-Dinitro-*o*-toluolsäure gemäß Literaturvorschrift hergestellt [57]. Die Ausbeuten lagen jeweils bei 90%, damit ist dieses Verfahren der ebenfalls in der Literatur beschriebenen Hoffmann-Umlagerung deutlich überlegen [58].

3.1.2 Synthese von 2,6-Diaminonitrotoluol und 6-Amino-4-nitro-2-N-acetyltoluol

Bis vor kurzem war 2,6-DANT nur über eine sechsstufige Synthese ausgehend von 2,6-Dichlortoluol erhältlich [59]. Mit einer neuen Methode ist aber nun durch Eisenpulver in Eisessig eine selektive *ortho*-Reduktion von TNT zum 2-ADNT und weiter zum 2,6-DANT möglich [60,46]. Bei der Adaption dieser Versuchsbedingungen entstand 2,6-DANT allerdings nicht selektiv, sondern es bildete sich außerdem das 6-Amino-4-nitro-2-N-acetyl-toluol.

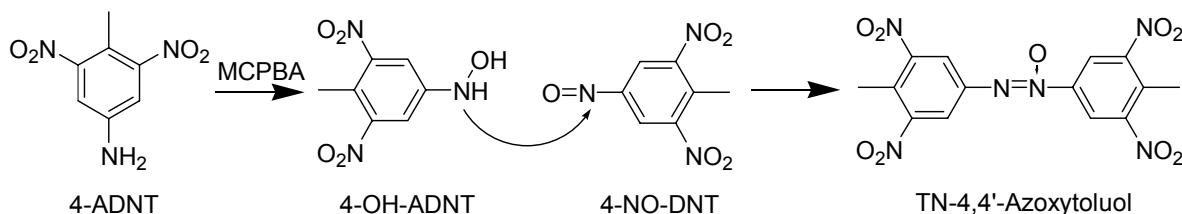


Schema 3.2: Reduktion von 2-ADNT mit Fe/Eisessig

Die Acetylierung kam vermutlich zustande, weil bei der hohen Reaktionstemperatur von 120° und der zu schnellen Zugabe des Eisenpulvers die stark exotherme Reaktion sehr heftig verlief und hierbei eine Aktivierung des Lösungsmittels Essigsäure erfolgte. Das 6-Amino-4-

nitro-2-N-acetyltoluol ist im Gegensatz zu seinem Regioisomeren 2-Amino-6-nitro-4-N-acetyltoluol bisher nicht literaturbekannt.

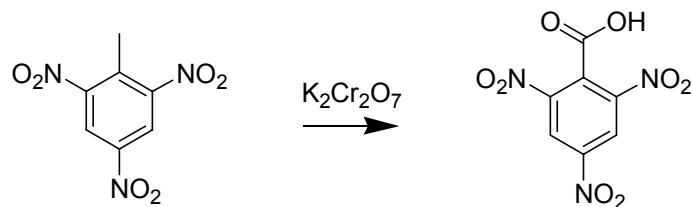
3.1.3 Synthese der Tetranitroazoxytoluole



Schema 3.3: Bildung von 2,2',6,6'-Tetranitro-4,4'-azoxytoluol

Die Herstellung der Azoxyverbindungen erfolgte nach einer Vorschrift von Sitzmann durch Oxidation von ADNT zur Hydroxylamino- und Nitrosogruppe mittels Metachlorperbenzoësäure [61]. Diese beiden Verbindungen können dann zur Azoxyverbindung kondensieren. Auf diese Weise wurden das 2,2' und das 4,4'-Isomer hergestellt.

3.1.4 Synthese von 2,4,6-Trinitrobenzoësäure



Schema 3.4: Oxidation von TNT zur Trinitrobenzoësäure

2,4,6-Trinitrobenzoësäure wurde durch Oxidation von TNT mit Kaliumdichromat hergestellt, nachdem Oxidationsversuche mit Kaliumpermanganat nicht erfolgreich waren [62,58]. Die Ausbeute war aufgrund der drastischen Bedingungen mit 20% gering, entsprach aber den Literaturdaten [62].

3.2 Synthese der radioaktiv markierten Aminonitroverbindungen

Für die Bilanzierung der einzelnen Mineralisierungsmethoden sollten die vier reduzierten TNT-Derivate 2-ADNT, 4-ADNT, 2,4-DANT und 2,6-DANT auch in radioaktiv markierter Form hergestellt werden. Als Ausgangsmaterial stand ^{14}C -ringmarkiertes TNT zur Verfügung [56]. Durch die Markierung des stabilsten Molekülteiles, des Ringes, kann die vollständige Mineralisierung des Schadstoffmoleküls am Entstehen von radioaktivem $^{14}\text{CO}_2$ eindeutig belegt werden.

3.2.1 Syntheseplanung

Das Isotop C 14 besitzt eine Halbwertszeit von 5730 Jahren und eine maximale Energie von 0,155 MeV [63]. Da es sich lediglich um einen β -Strahler handelt, kann bei entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen wie z.B. einer ausreichenden Abschirmung gefahrlos mit dem radioaktiven Material gearbeitet werden. Arbeiten mit flüchtigen, markierten Stoffen müssen jedoch in einem geschlossenen System durchgeführt werden. Aus solchen Sicherheitserwägungen und aufgrund des hohen Wertes der radioaktiven Ausgangsmaterialien muss die Durchführung einer organischen Synthese mit radioaktivem Material sorgfältig geplant und durchgeführt werden. Vor der eigentlichen “heißen” Synthese mit den radioaktiven Substanzen sollten mehrere Probedurchläufe mit den “kalten” Isotopomeren erfolgen. Bei vier radioaktiven Synthesen für die vier gewünschten Verbindungen würde dies einen erheblichen Arbeitsaufwand bedeuten.

Da TNT Ausgangspunkt der Synthese sein sollte, waren die in Kap. 3.1.1. beschriebenen, von den Dinitrobenzoësäuren ausgehenden Abbaureaktionen zur Darstellung der ADNTs nicht anwendbar. Von TNT ausgehend erhält man die ADNTs durch Reduktion mit ammoniakalischer Schwefelwasserstofflösung (H₂S). Dabei hängt die Regioselektivität der Reaktion stark von der Wahl des Lösungsmittels ab: Während man in Ethanol ein 5:1 *para*:*ortho*-Gemisch und zudem noch Edukt und OH-ADNTs erhält, verläuft die Reaktion in Dioxan fast vollständig und selektiv (99:1) zum 4-ADNT, allerdings nur in einer Ausbeute von 37%. Auch frühere Arbeiten mit anderen Reduktionsmitteln ergaben 4-ADNT als das Hauptprodukt [64]. Die Reduktion bis zum 2,4-DANT kann ebenfalls mit ammoniakalischem H₂S erreicht werden, wobei die Ausbeute jedoch noch geringer (ca. 20%) ist [65].

Die unter Kap. 3.1.2 beschriebene Herstellung des 2,6-DANT durch selektive *ortho*-Reduktion von TNT mit Eisen in Eisessig war zu Beginn der Arbeiten noch nicht

veröffentlicht, sodass weder für 2-ADNT noch für 2,6-DANT ein von TNT ausgehender Syntheseweg zur Verfügung stand.

Radioaktiv waren die Aminodinotoluole bis dato nur im sehr kleinen Maßstab (μCi) enzymatisch hergestellt worden. Michels und Gottschalk verwendeten dazu Xanthin-Oxidase und NADH als Cofaktor und erhielten ein Gemisch aus 4-ADNT und 2-ADNT. Auf dem selben Wege hatten sie auch die OH-ADNTs präpariert [66,67].

Die beschriebenen chemischen Verfahren zur Reduktion von TNT weisen zahlreiche Nachteile wie schlechte Ausbeuten, schwere Zugänglichkeit zu *ortho*-reduzierten Produkten und den Einsatz von gesundheitsschädlichen, geruchsintensiven Reagenzien (H_2S , NH_3) auf. Da andererseits bekannt war, dass sehr viele Mikroorganismen in der Lage sind, TNT zu reduzieren, sollte versucht werden, einen biologischen Syntheseweg für die vier radioaktiv markierten ANTs zu erarbeiten. Hierfür war Hefe der Mikroorganismus der Wahl.

3.2.2 Hefe (*Saccharomyces cervisiae*)

Die gewöhnliche Brauer- und Bäckerhefe (*Saccharomyces cervisiae*) ist ein zur Klasse der *Asomyceten* gehöriger Pilz. Sie gehört in der Ordnung der Hefen (*Endomycetales*) zur Familie der *Saccharomycetaceae*. Hefe ist ein eukaryontischer, einzelliger, sphärischer Organismus von 5-10 μm Durchmesser [68]. Das Enzymsystem der Hefe ist natürlicherweise für die Fermentation von Glucose zu Alkohol verantwortlich. Sie wurde jedoch schon früh als Katalysator für andere organische Reaktionen entdeckt und ist heute wegen ihrer Vielseitigkeit einer der wichtigsten und beliebtesten Biokatalysatoren überhaupt [69].

Die Anwendung von Hefe in der organischen Synthese hat zahlreiche **Vorteile**:

- Sie ist sehr billig und jederzeit in großen Mengen erhältlich
- Sie ist auch für Nicht-Biologen ohne spezielles Gerät einfach zu handhaben
- Sie ist ungiftig, arbeitet in Wasser und ist somit sehr umweltfreundlich
- Für Redoxreaktionen müssen nicht, wie bei reinen Enzymen, Cofaktoren zugesetzt werden (Ein wichtiger Vorteil gegenüber der Reduktion mit Xanthin-Oxidase, die das teure NADH als Cofaktor benötigt)
- Vielfältige Enzymsysteme erlauben ein vielseitiges Reaktionsspektrum

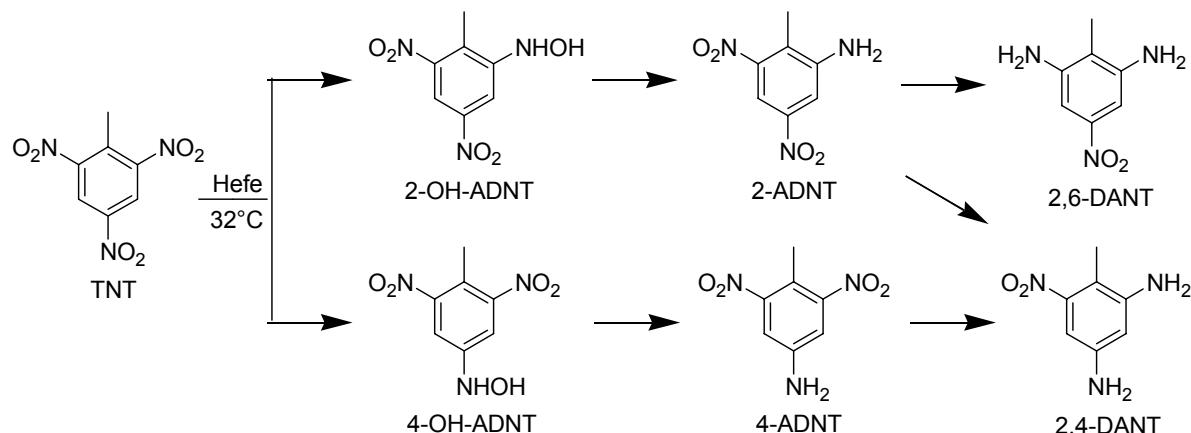
Gegen den Einsatz von Hefe sprechen dagegen nur wenige **Nachteile**:

- Die Reproduzierbarkeit kann problematisch sein (wie bei jedem lebenden System)
- Man muss große Zellmassen für geringe Substratkonzentrationen einsetzen
- Die Umsetzungen sind in der Regel nur in Wasser möglich

Das traditionelle, weitverbreitetste Einsatzgebiet von Hefen in der organischen Synthese ist die Umsetzung von Aldehyden zu optisch aktiven Alkoholen [70,69]. Doch bereits 1914 konnten Neuberg und Welde mit fermentierender Hefe Nitrobenzol zu Anilin reduzieren [71]. In den neunziger Jahren kam dann wieder ein größeres Interesse an Reduktionen von funktionellen Gruppen mit Stickstoff-Sauerstoff-Bindung auf. So untersuchte Takeshita die Selektivität und Nachbargruppeneinflüsse bei der Reduktion von N-Oxiden [72]. Die Reduktion von aromatischen Nitrogruppen verläuft nur dann gut, wenn ein zweiter elektronenziehender Substituent am Ring vorhanden ist. Wells und Turner gelang so unter anderem die Reduktion von DNTs zu ANTs mit Ausbeuten zwischen 50 und 70% [71,73,74]. Aufbauend auf deren Procedere wurde die Reduktion von TNT mit Hefe untersucht, die in der Literatur noch nicht beschrieben war [75].

3.2.3 Die Reduktion von TNT mit Hefe

In ersten Vorversuchen ergab sich, dass die Reaktionen mit frischer Bäckerhefe weniger gut zu reproduzieren ist, als die mit im Einzelhandel erhältlicher Trockenhefe. Also wurden alle weiteren Versuche mit getrockneten Backhefen der Firmen RuF und Dr. Oetker durchgeführt. Zur Umsetzung von 0,5 mmol TNT (114 mg) wurde eine wässrige Suspension von 5 – 10 g Hefe gebraucht. Durch das hohe Zellmasse/Substrat-Verhältnis waren keine fermentierenden Bedingungen und damit auch kein weiterer Zusatz von Zucker nötig, was wiederum die Reproduzierbarkeit der Reaktion verbesserte (siehe hierzu auch [68]). Um das TNT in die wässrige Lösung zu bringen, wurden es zunächst in wenigen mL heißem Ethanol gelöst und dann zur Hefesuspension gegeben. Als optimale Reaktionstemperatur wurden 32 °C ermittelt, während der Reaktion stellten sich pH-Werte zwischen 5 und 6 ein. Das Schema 3.5 zeigt den Verlauf der Reaktion des TNT:



Schema 3.5: Reduktionsverlauf von TNT mit Hefe

Einige Stunden nach Reaktionsbeginn zeigte eine Gelbtönung der vorher hellbraunen Suspension das Entstehen von Aminoaromaten an. Der Verlauf der Reaktion wurde mit Hilfe der Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) kontrolliert. Nach einem halben Tag war ein Großteil des TNT zum OH-ADNT reduziert, nach einem Tag machten schon die ADNTs den Hauptanteil im Reaktionsgemisch aus. In der Regel war die Reaktion am dritten Tag so weit abgelaufen, dass fast ausschließlich ADNTs und DANTs im Reaktionsgemisch vorlagen. Eine Weiterreaktion zum TAT konnte nicht beobachtet werden. Die Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf der Reduktion, die *ortho* und *para*-Regioisomere wurden übersichtshalber zusammengefasst:

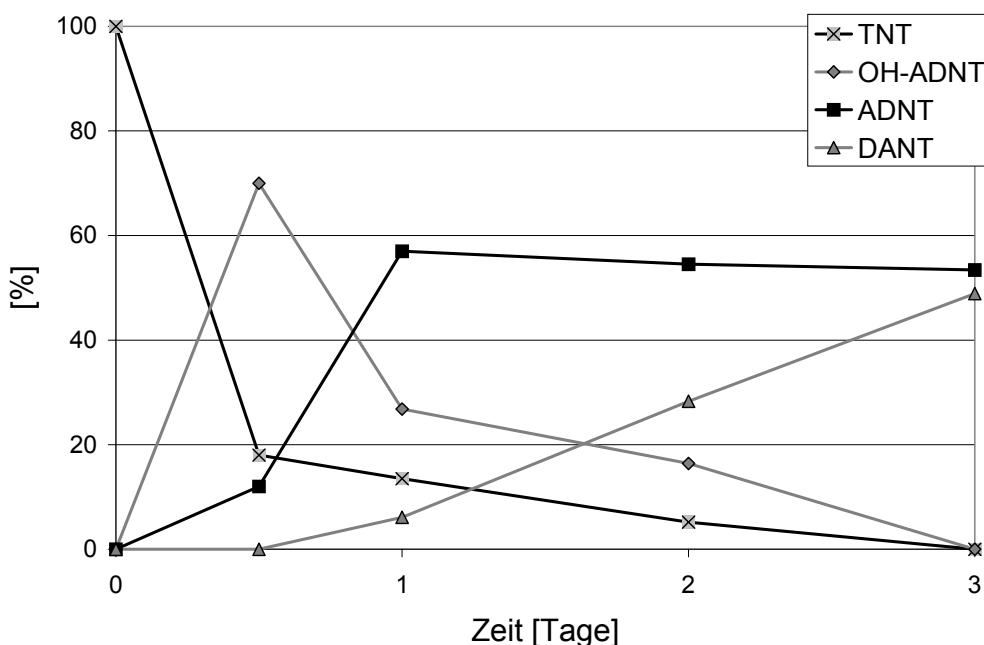


Abbildung 3.1: Zeitverlauf der Hefereduktion von TNT

Da die Reduktion des TNT bis zu den DANTs verlief, war es möglich, alle vier gewünschten Produkte, d. h. jeweils beide ADNTs und DANTs, in einer Reaktion zu erzeugen. Die Reaktion wurde daher möglichst an einem Punkt abgebrochen, an dem ADNTs und DANTs in gleichen Mengen vorlagen, um von jedem Isomer ungefähr die gleiche Menge zu erzeugen. Falls die Reduktion nach 3-4 Tagen noch nicht ausreichend fortgeschritten war, wurde weitere Hefe zugegeben bis genügend DANTs im Gemisch vorhanden waren. Andererseits war es durch ein früheres Abbrechen der Reaktion auch möglich, die OH-ADNTs herzustellen. Sie wurden aber nur in kleinen Mengen als Referenzsubstanz für die Analytik gewonnen, weil sie instabil und lufempfindlich sind.

3.2.4 Trennung der Regioisomere

Durch die Reduktion von TNT mit Hefe konnten alle vier Aminoaromaten gleichzeitig als Gemisch erzeugt werden. Zur Herstellung der Reinsubstanzen musste nun eine Möglichkeit zur Trennung des Gemisches gefunden werden, die auch für préparative Mengen um die 100 mg noch tauglich ist. Diese war mit der préparativen Dünnschichtchromatographie gegeben, bei der Kieselgelplatten mit einer Schichtdicke von 2 mm eingesetzt wurden. Es konnte zwar kein Laufmittelgemisch gefunden werden, das in der Lage war, alle vier Substanzen in einem Lauf zu trennen, aber in zwei aufeinanderfolgenden Trenngängen mit zwei unterschiedlichen Laufmittelgemischen konnten letztlich alle Verbindungen rein isoliert werden. Im ersten Trennschritt wurden mittels eines 9:1 Toluol-Methanol-Gemisches die ADNTs von den DANTs getrennt. Im zweiten Schritt wurden dann die Regioisomere, das 2-ADNT vom 4-ADNT und das 2,4-DANT vom 2,6-DANT, mit einem 1:1 Hexan-Ethylacetat-Gemisch getrennt. Die Detektion der einzelnen Fraktionen wurde durch die Farbgebung der Aromaten sehr erleichtert. Mit zunehmendem Grad der Reduktion wird die Intensität der Farbe intensiver: Während TNT nur im UV sichtbar ist und OH-ADNTs nur eine blassgelbe Färbung aufweisen, sind die ADNTs intensiv gelb und die DANTs orange gefärbt. Die analytischen Daten der einzelnen Substanzen sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst:

Tabelle 3.1: Analytische Daten

| Verbindung | Farbe | R _t (HPLC) [min] | R _f (DC) | pK _{S1} [76] |
|------------|-----------|-----------------------------|---------------------|-----------------------|
| TNT | - (UV) | 23,3 | 0,90 | |
| 2-OH-ADNT | blassgelb | 21,1 | 0,54 | |
| 4-OH-ADNT | blassgelb | 21,1 | 0,54 | |
| 2-ADNT | gelb | 26,3 | 0,60 | 0,59 |
| 4-ADNT | gelb | 25,5 | 0,66 | 1,23 |
| 2,4-DANT | orange | 5,7 | 0,32 | 3,54 |
| 2,6-DANT | orange | 5,1 | 0,39 | 3,37 |

Als Alternative zum 1. Trennschritt wurde versucht, die ADNTs und DANTs durch Protonierung der DANTs und anschließende Extraktion der ADNTs mit Toluol zu trennen. Diese von Glover et al. beschriebene Trennung beruht auf den unterschiedlichen pK_s-Werten für die Protonierung der ersten Aminogruppe [76] (siehe Tabelle 3.1). Bei einem pH-Wert von 1,5 sind die DANTs im Gegensatz zu den ADNTs vollständig protoniert. Bei der Extraktion mit Toluol bleiben sie in der wässrigen Phase zurück. Die Trennversuche mit dieser Methode verliefen jedoch nicht immer vollständig quantitativ, sodass sie in der

radioaktiven Synthese nur als zusätzliche Vortrennung vor der doppelten Dünnschicht-Trennung verwendet wurde.

3.2.5 Regioselektivität

Der Regioselektivität der Reduktion kam eine wichtige Bedeutung zu, weil alle vier ANTs produziert werden sollten, wenn möglich in ähnlich großen Mengen. Die Reproduktion der Selektivitäten erwies sich aber als sehr schwierig. Selbst bei Verwendung der selben Hefemarke variierten in Abhängigkeit von der jeweiligen Charge sowohl die Aktivität als auch die Regioselektivität. Generell kann aber festgehalten werden, dass die Reduktion in *para*-Position, also die Bildung von 4-ADNT, gegenüber der *ortho*-Reduktion, also der Bildung von 2-ADNT, bevorzugt war. 2,6-DANT war in der Regel das am wenigsten gebildete Produkt, weil sein Vorgänger, das 2-ADNT auch zum 2,4-DANT reduziert werden kann. Die Hefen der Firma Dr. Oetker zeigten eine deutlich Bevorzugung der *para*-Reduktion, 2-ADNT und 2,6-DANT wurden kaum gebildet, wie der in Tabelle 3.2 aufgeführte Versuch D22 belegt. Deswegen wurden im folgenden nur noch Hefechargen der Firma RuF verwendet. Die Tabelle 3.2 zeigt exemplarisch die Ergebnisse einiger dieser Versuche:

Tabelle 3.2: Ausbeuten der einzelnen Nitroaromaten bei ausgewählten Reduktionsversuchen mit Hefe
(in Molprozent im Verhältnis zum eingesetzten TNT)

| Versuch-Nr. | 37 | 32 | 30 | 21 | 20 | 16 | 13 | D 22 |
|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 4-ADNT | 17,3 | 37,6 | 26,4 | 16,1 | 13,2 | 20,3 | 16,3 | 42,8 |
| 2-ADNT | 10,2 | 1,5 | 8,1 | 20,3 | 23,4 | 9,2 | 10,2 | 2,9 |
| 2,4-DANT | 28,7 | 28,7 | 21,6 | 10,8 | 15,6 | 30,0 | 19,2 | 6,2 |
| 2,6-DANT | 4,8 | 9,6 | 13,2 | 15,6 | 9,6 | 11,0 | 12,0 | 1,5 |
| gesamt | 61 | 77 | 69 | 63 | 62 | 70 | 57 | 53 |

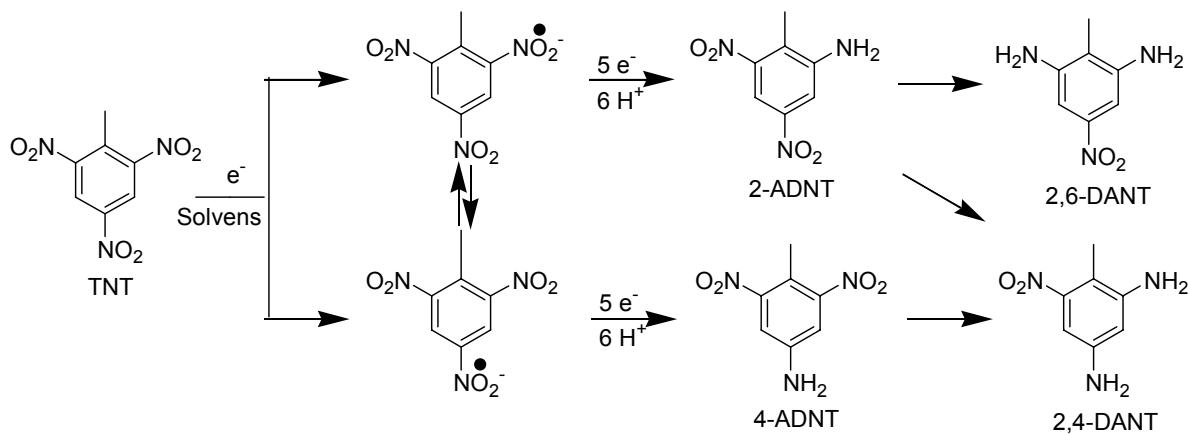
Die Ergebnisse dokumentieren deutlich, dass die Selektivität extrem von der verwendeten Charge abhängt. So zeigte die Charge APR 01 9424, mit der die Versuche 30 und 32 gemacht wurden, genau wie die Dr. Oetker-Hefe, eine starke *para*-Selektivität. Bei den anderen Versuchen war die Verteilung der einzelnen vier Substanzen deutlich ausgewogener: In den mit einer gleichen Charge durchgeführten Versuchen 20 und 21 überwog sogar die Bildung von 2-ADNT durch *ortho*-Reduktion, allerdings überwiegte bei 21 die Bildung von 2,6-DANT und bei 20 die Bildung von 2,4-DANT. In den restlichen Versuchen überwog die Bildung von 4-ADNT leicht mit *para*:*ortho*-Verhältnissen von ungefähr 2:1. Für die radioaktive Synthese wurde schließlich die Charge JAN 01 9303 aus Versuch 37 gewählt. Insgesamt verdeutlichen

die Resultate, dass sowohl eine Reproduktion als auch eine Vorhersage der Selektivitäten und Ausbeuten kaum möglich ist. Das liegt vor allem an der Komplexität des vorliegenden Systems. Bei der Hefe hat dies unter anderem die Ursache, dass für die Reduktion von Nitrogruppen drei verschiedene Enzyme, sogenannte Nitroreduktasen, gefunden wurden, die diese Reaktion katalysieren können [77]. Sie sind in Tabelle 3.3 aufgeführt.

Tabelle 3.3: In Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) enthaltene Nitroreduktasen [77]

| Name | Nr. | Gewicht [kDa] |
|--------------------------------|-------------|---------------|
| NADPH Dehydrogenase 2 | EC 1.6.99.1 | 44,9 |
| Thioredoxin Reductase | EC 1.6.4.5 | 34,1 |
| Dihydrolipoamide Dehydrogenase | EC 1.8.1.4 | 51,6 |

Theoretisch könnte jede dieser Nitroreduktasen eine andere Regioselektivität aufweisen, das Auftreten der einzelnen Enzyme wiederum könnte von Charge zu Charge verschieden sein. Generell greifen bei der Reduktion vom TNT bis zum DANT sehr viele Reaktionen ineinander die teilweise im Gleichgewicht stehen können, genau wie einige Übergangszustände. Man geht davon aus, dass bei den Reduktionsschritten mit Beteiligung zweier Elektronen jeweils die Übertragung des ersten Elektrons der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist, daher kommt den zunächst als Übergangszustand gebildeten Radikal anionen eine entscheidende Bedeutung für den weiteren Verlauf der Reaktion zu. Im Falle der elektrochemischen Reduktion von TNT stehen die so gebildeten Radikale miteinander im Gleichgewicht [48]:



Schema 3.6: Gleichgewicht der *ortho* und *para*-Radikal anionen im ersten Schritt der TNT-Reduktion

Laut theoretischen Berechnungen ist das *para*-Radikal anion stabiler und demzufolge müsste bei der elektrochemischen Reduktion von TNT überwiegend 4-ADNT entstehen. Im Experiment fanden die Autoren jedoch nur eine *para-ortho*-Selektivität von 3:1 [48]. Sicherlich ist die Situation bei der enzymatischen Reduktion von TNT hiermit nicht direkt vergleichbar, weil dort vermutlich andere Übergangszustände durchlaufen werden. Es war aber bei den Reduktionen mit Hefe zu beobachten, dass sich die Produktverteilung umso weiter in Richtung des 4-Amino-Isomers verschob je länger die Reaktion dauerte. Das wäre mit einem Einstellen eines Gleichgewichts zugunsten des thermodynamisch stabileren 4-ADNT erklärbar, während das 2-ADNT vornehmlich aus kinetischen Gründen bevorzugt gebildet wird. Immerhin ist die statistische Wahrscheinlichkeit für eine *ortho*-Reduktion beim TNT doppelt so hoch wie die einer *para*-Reduktion. Turner findet bei der Reduktion von Dinitrobenzolen außerdem, dass eine unterschiedliche dritte, elektronenspendende funktionelle Gruppe (im Fall des TNT die Methyl-Gruppe) einen entscheidenden Einfluss auf die Regioselektivität haben kann. Er führt eine Förderung der *ortho*-Reduktion vor allem auf den elektronischen Einfluss dieser Nachbargruppe zurück, während er als Hauptgrund für das entstehen des *para*-Produktes vor allem sterische Gründe verantwortlich macht [73,77]. Bei der Entstehung der DANTS spielt zudem eine Rolle, wie (unterschiedlich) schnell sich die beiden regiosomeren ADNTs weiter reduzieren lassen. Hierüber sollte vor allem ihr Redoxpotential Auskunft gegeben, das aber an anderer Stelle noch genauer diskutiert wird (Kap. 4.4).

3.2.6 Radioaktive Synthese

Im Laufe der bisher beschriebenen Untersuchungen wurde das Syntheseverfahren ständig darauf hin optimiert, in einem Durchgang sämtliche vier ANTs, 2-ADNT, 4-ADNT, 2,4-DANT und 2,6-DANT, darzustellen. Nachdem dies in zahlreichen Probedurchläufen gelungen war, wurde dann die “heiße Synthese” mit dem [U-Ring-¹⁴C]-TNT als Edukt in Angriff genommen. Hefe der Charge “JAN 01 9303” wurde in Leitungswasser suspendiert und auf 32 °C temperiert. Zum Start der Reaktion wurde das in heißem Ethanol gelöste, vorher umkristallisierte [U-Ring-¹⁴C]-TNT in die Suspension gegeben. Der Verlauf der Reaktion wurde per HPLC überwacht und parallel lief zur Kontrolle ein “kalter” Ansatz. Da sich nach vier Tagen noch nicht genügend DANTS gebildet hatten (ca. 30%), wurde nochmals etwas Hefe zugegeben. Nach fünf Tagen wurde die Reaktion dann abgebrochen. Zur Aufarbeitung wurde die schwach saure Suspension (pH 5,5) neutralisiert und mit Dichlormethan über mehrere Stunden im Perforator extrahiert. Durch Protonieren der DANTS

bei pH 1.4 und anschließender Extraktion mit Dichlormethan erfolgte eine Grobtrennung in eine ADNT- und eine DANT-Fraktion. Die Fraktionen wurden dann wie in Kap. 3.2.4 beschrieben mit präparativer Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Zunächst wurde ein 9:1 Toluol-Methanol-Gemisch verwendet, dann ein 1:1 Hexan-Ethylacetat-Gemisch. Zur vollständigen Trennung der ADNT-Fraktion musste ein dritter Trennlauf mit dem zweiten Gemisch gemacht werden. Schließlich konnten alle vier gewünschten Substanzen rein in den folgenden Ausbeuten isoliert werden:

Tabelle 3.4: Ergebnisse der radioaktiven Synthese

| Verbindung | Ausbeute | Aktivität [MBq (mCi)] | Radiochemische Reinheit (HPLC) |
|--------------------------|------------|-----------------------|--------------------------------|
| ¹⁴ C-4-ADNT | 25% | 148 (4,0) | > 98% |
| ¹⁴ C-2-ADNT | 6% | 40 (1,1) | > 98% |
| ¹⁴ C-2,4-DANT | 19% | 114 (3,1) | > 85% |
| ¹⁴ C-2,6-DANT | 2% | 11 (0,2) | > 96,5% |
| gesamt | 52% | 512 (8,4) | |

Die Gesamtausbeute liegt mit 52% im unteren Bereich der in den Vorversuchen erzielten Ergebnisse, die zwischen 50% und 70% lagen. Das liegt hauptsächlich daran, dass bei der Trennung der Substanzen mehr Wert auf die Reinheit der Einzelsubstanzen als auf die Gesamtausbeute gelegt wurde. 4-ADNT und 2-ADNT wurden im Verhältnis 4:1, 2,4-DANT und 2,6-DANT sogar im Verhältnis 10:1 erhalten. Die hohe *para*-Selektivität könnte an der relativ langen Reaktionsdauer liegen (siehe Kap. 3.2.5). Man muss aber auch berücksichtigen, dass bei der Aufreinigung die Verluste bei dem sowieso in kleineren Mengen vorhandenen Produkt anteilmäßig viel höher sind, als bei den in großen Mengen entstandenen Produkten, sodass sich die ursprünglichen Verhältnisse noch einmal zu Gunsten der Hauptprodukte verschoben haben.

3.2.7 Radioanalytik

Die radiochemische Reinheit der einzelnen Substanzen wurde mit einer Radio-HPLC überprüft. Dafür wurden die in der HPLC getrennten Fraktionen gesammelt und im β -Counter vermessen. Die ADNTs hatten von vornherein hohe radiochemische Reinheiten von > 98%. Die Reinheit der DANTs lag aber jeweils nur zwischen 85 und 90%. Daher wurden diese beiden Substanzen abermals auf eine DC-Platte aufgetragen und mit dem 1:1 Hexan-

Ethylacetat-Gemisch getrennt. Im Falle des 2,6-DANT ergab das eine Steigerung der radiochemischen Reinheit auf über 96,5%.

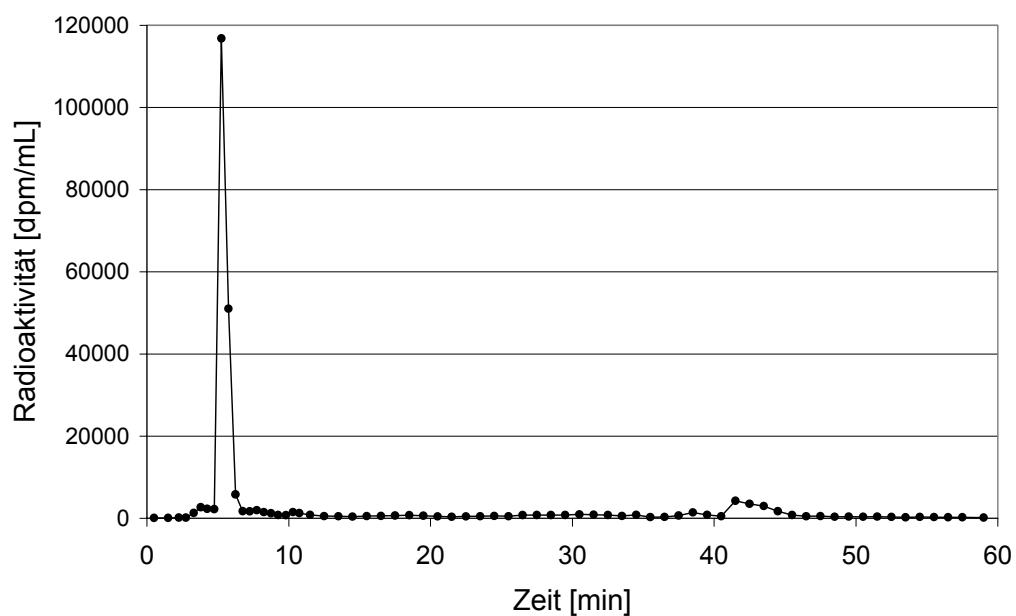


Abbildung 3.2: Radio-HPLC von 2,6-DANT

Überraschenderweise zersetzte sich aber bei der gleichen Trennprozedur das 2,4-DANT fast völlig. Es konnte nur noch ein kleiner Rest von 2-3 mg erhalten werden, dessen Radio-HPLC folgendes Bild zeigte:

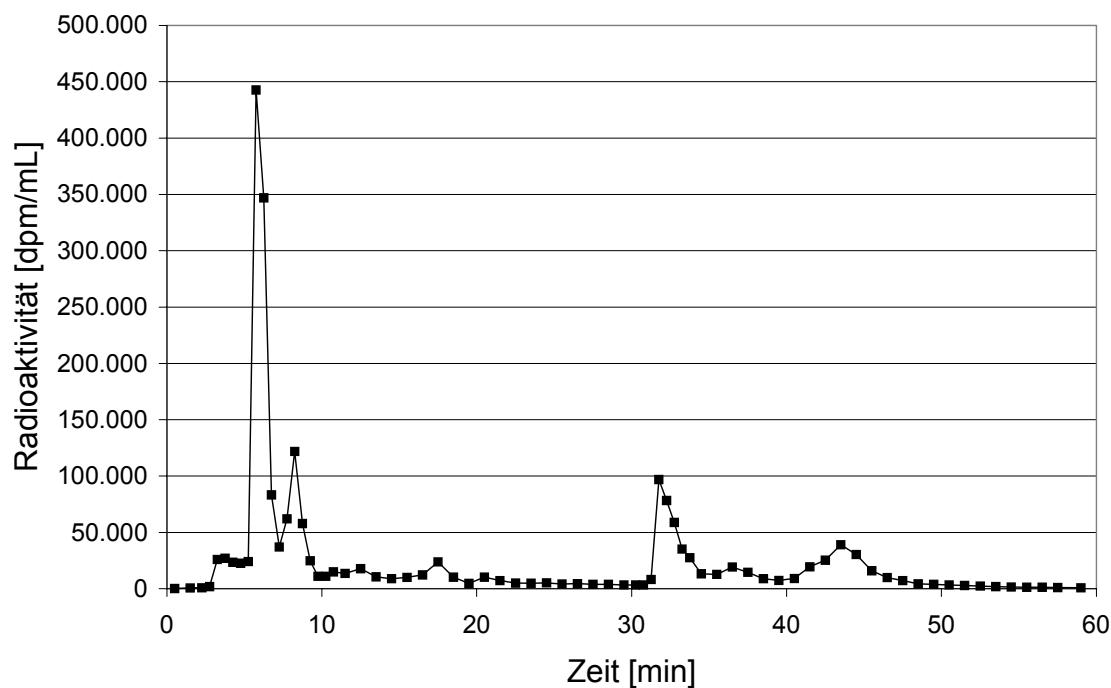


Abbildung 3.3: Radio-HPLC von 2,4-DANT

Dieser Rest hatte eine radiochemische Reinheit von > 60%. Um eine weitere Zersetzung zu vermeiden, wurde kein weiterer Aufreinigungsversuch unternommen. Die Ursache für diese unerwartete Umsetzung war nicht aufzuklären. In den Experimenten mit unmarkiertem TNT war dieses Problem nie aufgetreten. Das Hauptumsetzungsprodukt war die nach einer Retentionszeit von neun Minuten im HPLC-Spektrum erscheinende Substanz. In einigen Fraktionen war überhaupt kein 2,4-DANT vorhanden und dafür zu 50 – 60% diese neue Substanz entstanden. Immerhin zeigt die noch vorhandene UV-Aktivität der Zerfallsprodukte, dass das aromatische Ringsystem, welches die radioaktive Markierung enthält, intakt geblieben ist. Eine Aufklärung der Struktur der Umsetzungsprodukte ist nicht vorgenommen worden.

4 Ergebnisse der biologischen Abbauten

Ziel der biologischen Abbauuntersuchungen sollte es sein, TNT möglichst schnell, einfach und billig in seine leichter mineralisierbaren Transformationsprodukte ADNT und DANT umzusetzen und eine vollständige Bilanz dieser Umsetzung zu erstellen.

In allen Versuchen wurde herkömmlicher Belebtschlamm aus der Großkläranlage (GKA) Paderborn-Sande eingesetzt. Bei Belebtschlamm handelte es sich um eine mikrobiell nicht definierte Mischkultur, die typischerweise aus bis zu einigen hundert verschiedenen Arten von Bakterien (Prokaryonten) und tierischen Einzellern (Protozoen) besteht [78]. Er bildet bei Belüftung unregelmäßig geformte Flocken mit einem Durchmesser von 50-300 μm , die neben Bakterien und Protozoen auch organische Verbindungen, Exoenzyme, tote Zellen und anorganische Anteile beinhalten [79]. Den größten Stoffumsatz beim Abbau organischen Materials haben dabei die Bakterien, weil sie trotz ihrer geringen Größe von 1-2 μm eine sehr große Oberfläche besitzen [80].

Für den Abbau wurde Klärschlamm verwendet, weil dessen großtechnische Anwendung bereits etabliert und kostengünstig ist und er auch im Labormaßstab einfach zu handhaben ist. Sämtliche Versuche wurden im 1L-Maßstab in einem Dreihalskolben durchgeführt. Zunächst wurde für die Versuche eine Rezeptur von Schleßelmann adaptiert, die dann unter den eigenen Versuchsbedingungen optimiert werden sollte [81]. Neben TNT und Belebtschlamm enthielt die Abbaulösung Saccharose als Cosubstrat, eine Nährstofflösung für die Versorgung mit Stickstoff, Phosphor und weiteren Spurelementen sowie einen Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,0. Während des Abbaus wurde die Lösung mit Sauerstoff aus der Umgebungsluft belüftet. Optimiert werden sollten unter anderem die Masse des Belebtschlamm, die Saccharose-Konzentration und die Sauerstoffzufuhr.

4.1 Analytik

4.1.1 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

Die Abnahme der TNT-Konzentration und die Bildung der Metabolite in der biologischen Stufe wurde mit der HPLC verfolgt. Die HPLC-Trennung wurde der Trennung per Gas-Chromatographie (GC) vorgezogen, weil vor allem die beim Abbau entstehenden DANTs in der GC schlecht zu chromatographieren sind. Die Aromaten wurden über ihre UV-Aktivität mittels eines Photo-Dioden-Array-Detektors (DAD) detektiert. Die Trennung erfolgte mit einem Methanol-Wasser-Gradientenprogramm auf einer Reversed-Phase-C18-Säule.

Tabelle 4.1: Arbeitsbedingungen der Reversed-Phase-HPLC

| Säule: | Nucleosil 120-5 C18 (250 X 4 mm) | | |
|---|----------------------------------|-------------|---------------|
| Eluent - Fluss: | Methanol und Wasser - 0,7 mL/min | | |
| Injektionsvolumen: | 20 µL | | |
| Detektion: | DAD-Detektor, $\lambda = 235$ nm | | |
| Temperatur: | Raumtemperatur | | |
| Gradientenprogramm | | | |
| Zeit [min] | Vol-% Methanol | | Funktion |
| 0 - 1 | 45 | isokratisch | Trennung |
| 1 - 20 | 45 - 55 | linear | |
| 20 - 35 | 55 - 65 | linear | |
| 35 - 39 | 65 - 100 | linear | |
| 39 - 62 | 100 | isokratisch | Spülen |
| 62 - 63 | 100 - 45 | linear | Equilibrieren |
| 63 - 78 | 45 | isokratisch | |
| Gradientenprogramm II (zur Analyse der Tetranitroazoxyloluole) | | | |
| 0 - 20 | 80 | isokratisch | Trennung |
| 20 - 20,5 | 80 - 100 | linear | |
| 20,5 - 28 | 100 | isokratisch | Spülen |
| 28 - 30 | 100 - 80 | Linear | Equilibrieren |
| 30 - 48 | 45 | isokratisch | |

Die Tetranitroazoxyloluole konnten mit dem Standard-Gradientenprogramm nicht erfasst werden und wurden daher mit einem speziellen isokratischen Programm getrennt und vermessen (Gradientenprogramm II).

Tabelle 4.2: Kalibrierfunktionen der wichtigsten TNT-Transformationsprodukte

| Prog. | Standardsubstanz | Retentionszeit [min] | Kalibrierfunktion $y = ax + b$ | | |
|-------|------------------|-------------------------|--------------------------------|---------|--------|
| | | | a | b | R^2 |
| I | TNT | 17,88 | 57,132 | -0,138 | 0,9997 |
| I | 4-ADNT | 21,33 | 64,556 | 0,236 | 0,9997 |
| I | 2-ADNT | 22,52 | 54,893 | 4,857 | 0,9993 |
| I | 2,4-DANT | 6,02 | 53,837 | -4,496 | 0,9995 |
| I | 2,6-DANT | 5,34 | | | |
| II | TN-4,4'-AzT | 10,48 | 38,189 | -11,223 | 0,9998 |
| II | TN-2,2'-AzT | 7,38 | | | |

Für die wichtigsten Transformationsprodukte des biologischen Abbaus wurden mit Hilfe von Standardlösungen Kalibrierfunktionen erstellt, die eine quantitative Analyse ermöglichen. Bei den Retentionszeiten handelt es sich um durchschnittliche Werte, weil die Messungen bei Raumtemperatur gemacht wurden und die Säule Temperatur- und Druckschwankungen ausgesetzt war.

4.1.2 Probenvorbereitung: Festphasenextraktion

Vor der Trennung und Detektion in der HPLC wurden die Proben gefiltert und angereichert. Das Filtern erfolgte direkt bei der Probennahme durch einen Spritzenfilter mit einem Porendurchmesser von $0,45\text{ }\mu\text{m}$.

Die Anreicherung der Proben erfolgte mit Hilfe der Festphasenextraktion: Die unpolaren organischen Substanzen aus einer wässrigen Probe werden an einer Reversed-Festphasen-Kartuschen adsorbiert und mit einem kleineren Volumen eines organischen Lösungsmittels wieder in Lösung gebracht. Anschließend können die aufkonzentrierten Proben direkt in der HPLC vermessen werden. Theoretisch ist mit solchen Einweg-Kartuschen eine Anreicherung bis zu einem Faktor von 500 möglich. Aus den biologischen Abbaulösungen wurden pro Probe 4 mL der wässrigen vorgefilterten Lösung auf die Kartusche gegeben und mit 1 mL Methanol wieder eluiert, wodurch ein Anreicherungsfaktor von 4 erreicht wurde. In Experimenten zur Anreicherung von TNT-, ADNT- und DANT-Standardlösungen lag die Wiederfindungsrate mit dieser Methode bis auf eine Ausnahme (88,6%) immer über 90% [82].

4.1.3 Redoxspannung

Mit Hilfe der pH-Messung können orientierende Angaben wie “sauer, neutral oder alkalisch” durch präzise Zahlenwerte ersetzt werden. In ähnlicher Weise können die Aussagen “oxidierend oder reduzierend” durch den Wert der Redoxspannung ersetzt werden. Die Redoxspannung ist also ein Maß für die Kraft, mit der eine Substanz Elektronen abgeben oder aufnehmen kann. Sie ist eine thermodynamische elektrochemische Größe und gehorcht der Nernst'schen Gleichung:

$$E = E^0 + 2,3 * \frac{RT}{zF} * \log \frac{[\text{ox}]}{[\text{red}]} \quad 4.1$$

Darin bedeuten E^0 = Potential des Redoxsystems unter Standardbedingungen, R = Gaskonstante, T = absolute Temperatur in K, F = Faraday-Konstante, z = Zahl der übertragenen Elektronen, $[\text{ox}]$ = Konzentrationen der oxidierten Reaktionsteilnehmer, $[\text{red}]$ = Konzentrationen der reduzierten Reaktionsteilnehmer.

Sobald Protonen in der Redoxgleichung vorkommen, ist die Redoxspannung also neben der Temperatur auch vom pH-Wert abhängig. Je stärker die Oxidationskraft einer Lösung ist, desto höher ist ihre Redoxspannung. Prinzipiell ist mit dem Redoxpotential eine Vorhersage möglich, ob eine Oxidation oder Reduktion abläuft oder nicht. Allerdings laufen viele Reaktionen, die aufgrund der thermodynamischen Vorhersage über das Redoxpotential eigentlich ablaufen müssten, aufgrund kinetischer Hemmungen nicht ab. Theoretisch müsste z. B. Alkohol in Wasser oxidiert werden, was ja zum Glück nicht der Fall ist. Hauptanwendungsgebiet der Redoxpotentialmessung ist die Wasser- und Abwasserbehandlung [83].

Die Messung der Redoxspannung erfolgte mit einer Einstabmesskette, die aus einer Platin-Messelektrode, einer 3 mol/L KCl-Elektrolytmesslösung und einer Silber/Silberchlorid-Bezugselektrode bestand. Da das gemessene Potential immer von der Bezugselektrode abhängt, muss diese immer mit angegeben werden. Als standardisierte Bezugselektrode wird die Standardwasserstoffelektrode (SWE) verwendet. Sie besteht aus einem Platinblech, das mit Wasserstoff bei 1 bar umspült wird und in eine Lösung mit $c(H^+) = 1 \text{ mol}$ eintaucht. Das dabei durch Oxidation von Wasserstoff entstehende Potential wird gleich Null gesetzt. Die Standardspannung des verwendeten Bezugssystems der Silber/Silberchloridelektrode mit 3 molarer KCl (E_{Bez}) beträgt bei 20 °C 210 mV. Für die Umrechnung der gemessenen Werte (E) auf die Standardwerte (E_h) gilt: $E_h = E + E_{Bez}$. Es mussten also immer 210 mV zu den Messwerten addiert werden um das Potential auf die SWE zu beziehen. In der Mikrobiologie verwendet man daneben auch noch ein auf die Wasserstoffelektrode bei pH 7 bezogenes Standardpotential (E'_h), das einen Wert von – 420 mV gegen die SWE hat.

4.2 Aerobe Abbauten

Die ersten biologischen Abbauversuche wurden so stark belüftet (30 – 40 L/min), dass die Lösungen mit Sauerstoff gesättigt waren, sodass strikt aerobe Bedingungen vorlagen.

4.2.1 Optimierung der Belebtschlammkonzentration

In einer ersten Versuchsreihe wurde die für eine vollständige Umsetzung von TNT notwendige Belebtschlammmenge bei einer TNT-Konzentration von 4 mg/L ermittelt. Die Zuckerkonzentration war jeweils 26 mg/L, Nährlösung und Phosphatpuffer wurden in den üblichen Mengen zugegeben. Der Schlamm hatte eine Trockenmasse von 3,16 g/L. In zwei späteren Versuchen wurden mit 1880 mg/L Schlamm einmal 20 und einmal 40 mg TNT umgesetzt.

Tabelle 4.3: Biologische Abbauten mit verschiedenen Belebtschlammkonzentrationen

| Versuch-Nr. | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | A6 | A7 |
|----------------------------------|------|------|-----|-----|-----|------|------|
| $c(TNT)_0$ [mg/L] | 2,0 | 4,0 | 3,9 | 4,2 | 3,4 | 42,4 | 20,0 |
| $c(\text{Belebtschlamm})$ [mg/L] | 0 | 79 | 158 | 315 | 394 | 1880 | 1880 |
| Verhältnis Schlamm:TNT | 0 | 20 | 40 | 80 | 100 | 45 | 94 |
| $c(TNT)$ nach 24 h | | | | | | | |
| [% von c_0] | 81,6 | 16,4 | 1,8 | 0,2 | 0 | 47,7 | 10,6 |

Auch ohne Schlamm nahm die TNT-Konzentration um 20% ab, was vermutlich auf Reaktionen mit den Cofaktoren zurückzuführen war. Generell verbesserte sich die Umsetzung des TNT mit steigender Schlammkonzentration. Bei höheren TNT-Konzentrationen musste aber ein höheres Schlamm zu TNT-Verhältnis gewählt werden, um eine befriedigende Umsetzung des TNT zu erhalten. In den weiteren Versuchen wurde mit einem 100fachen Überschuss an Belebtschlamm gearbeitet, um einen ausreichenden Abbau der TNT-Konzentration zu erreichen.

4.2.2 Optimierung der Cofaktoren

Als Kohlenstoffquelle wurde in allen biologischen Abbauversuchen normaler Haushaltsszucker (Saccharose) eingesetzt, weil er billig ist und in vergleichenden Arbeiten gegenüber anderen Kohlenstoffquellen wie Melasse keine Nachteile aufwies [81]. Durch eine Versuchsreihe mit variierender Saccharosekonzentration konnte eine für den kompletten Abbau des TNTs ausreichende Konzentration ermittelt werden:

Tabelle 4.4: Biologische Abbauten mit verschiedenen Saccharosekonzentrationen

| Versuch-Nr. | Z1 | Z2 | Z3 | Z4 | Z5 | Z6 | Z7 |
|-------------------------------|------|------|-------|-------|-----|------|-------|
| $c(TNT)_0$ [mg/L] | 21,0 | 20,0 | 21,1 | 20,1 | 4,1 | 3,4 | 4,4 |
| $c(\text{Saccharose})$ [mg/L] | 0 | 26,0 | 130,0 | 200,0 | 0 | 26,0 | 100,0 |
| Verhältnis Zucker : TNT | 0 | 1,3 | 6,2 | 10,0 | 0 | 7,6 | 22,7 |
| $c(TNT)$ nach 24 h | | | | | | | |
| [% von c_0] | 44,2 | 10,6 | 5,0 | 1,5 | 1,2 | 0 | 0,5 |

Auch ohne Zugabe von Zucker fand ein signifikanter Abbau statt. Das ist so zu erklären, dass die Zellen des frisch aus dem Klärwerk stammenden Belebtschlammes noch genügend Cofaktoren gespeichert hatten, um zumindest einen Teil des TNTs reduzieren zu können. Der

Vorrat an Cofaktoren reichte aus, eine TNT-Menge von 4 mg fast vollständig zu reduzieren (Z5). Daher sind die Ergebnisse der Versuche Z6 und Z7 nicht aussagekräftig, weil die dort eingesetzte TNT-Menge von ebenfalls 4 mg auch ohne Zucker-Zusatz fast komplett abgebaut worden wäre. In den anderen Versuchen zeigt sich, dass mit steigender Saccharosekonzentration auch die Abbauleistung des Belebtschlams steigt. Laut Reuß et al. [84] sollte die Cosubstratkonzentration jedoch nicht zu hoch gewählt werden, weil mit steigendem Cosubstratanteil die cometabolische Ausbeute, definiert als der Anteil vollständig reduzierten TNTs pro fermentierter Cosubstratmenge, abnimmt. Zudem verursacht die Zugabe einer größeren Menge an Cosubstrat auch höhere Kosten. Trotzdem wurde in unseren weiteren Versuchen mit einer Saccharosekonzentration von 200 mg/L gearbeitet, mit der innerhalb von 24 h 98,5% der TNT-Ausgangskonzentration transformiert werden konnte (Z4), um eine möglichst vollständige Reduktion des TNT zu erreichen.

Die Menge der restlichen Nährstofflösung wurde ohne weitere Optimierungsversuche von Schleßelmann übernommen [81]. Das verwendete Dünger-Basismedium bestand aus 7 mg/L Ammoniumsulfat, 2,5 mg/L des Spurenelementpräparates "Fetrlon Combi" und 0,1 mL des Düngers "Basfoliar 12 + 4 + 6" der BASF. Insgesamt beinhaltet das Nährstoffmedium die folgenden Elemente in den aufgeführten Konzentrationen:

Tabelle 4.5: Zusammensetzung des Dünger-Nährstoffmediums [81]

| Hauptelemente: | N | P | S | K | Mn | Fe |
|----------------------|-------|--------|-------|-------|-------|------|
| Konzentration [mg/L] | 15,78 | 4,8 | 1,6 | 7,2 | 0,11 | 0,11 |
| Spurenelemente: | Mg | Mo | Zn | Cu | B | |
| Konzentration [mg/L] | 0,002 | 0,0037 | 0,044 | 0,049 | 0,024 | |

Damit stimmte die Zusammensetzung der Cofaktoren ungefähr mit dem in der Literatur empfohlenen Nährstoffverhältnis C : N : P : S = 100 : 10 : 1 : 1 überein [85].

Die optimierte Rezeptur des biologischen Abbaus hatte in den weiteren Versuchen etwa ein Verhältnis von Belebtschlamm : Saccharose : TNT = 100 : 10 : 1.

4.2.3 Ergebnis eines optimierten aeroben Abbaus

In den Abbauten mit dieser optimierten Rezeptur konnte TNT innerhalb von 24 h immer vollständig abgebaut werden. Als Produkte der Transformation konnten die reduzierten Metabolite 4-ADNT, 2-ADNT und 2,4-DANT und das Kondensationsprodukt TN-4,4'-AzT identifiziert werden. Hauptprodukte waren die ADNTs, wobei bevorzugt 4-ADNT entstand. Das Verhältnis der beiden Regioisomeren lag in den verschiedenen Versuchen zwischen 2:1

und 5:1 zugunsten des *para*-reduzierten 4-ADNT. Das 2,4-DANT und das TN-4,4'-AzT entstanden nur in kleinen Mengen (< 5%) und konnten in einigen Versuchen überhaupt nicht nachgewiesen werden. Die folgende Abbildung zeigt den zeitlichen Verlauf eines ausgewählten Abbaus:

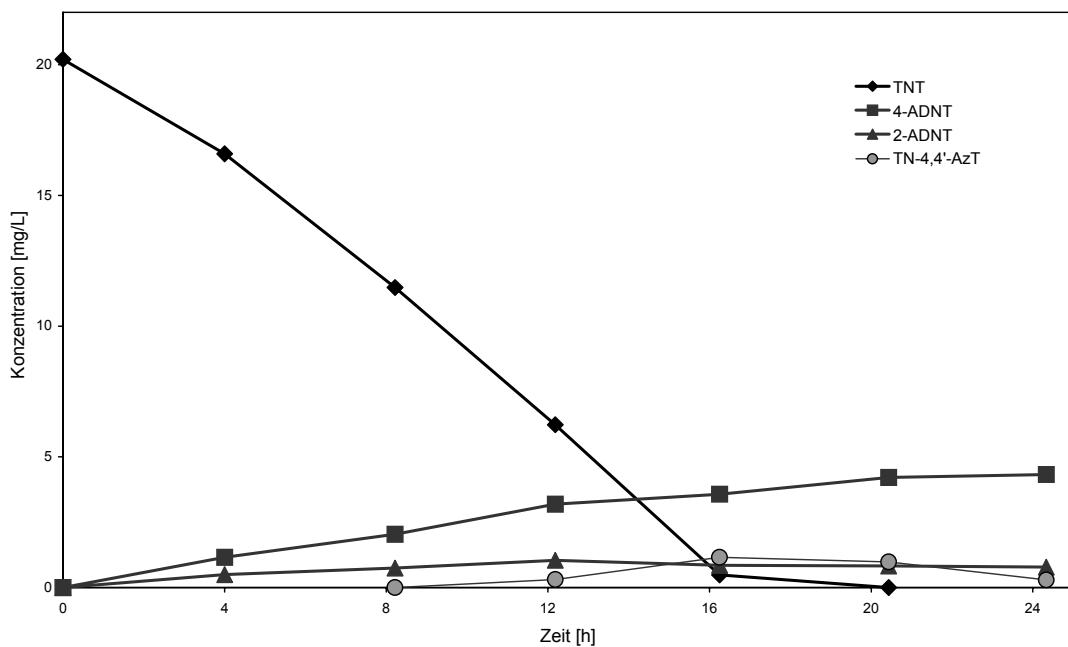


Abbildung 4.1: Zeitverlauf eines aeroben biologischen Abbaus (BA1: 20 mg/L TNT, 1,88 g/L Belebtschlamm, 200 mg/L Saccharose, Nährstoffmedium, Phosphatpuffer pH 7, Belüftung: 41 L Luft/h)

Der Verlauf zeigt, dass der Abbau des TNT schon nach 16 h so gut wie abgeschlossen war. Warum die Konzentration des TN-4,4'-AzT nach einer Spitzenkonzentration von 1,2 mg/L nach 16 h wieder sank, konnte nicht geklärt werden. Da die Mengen der nach 24 h detektierten TNT-Transformationsprodukte nur ca. 30% der ursprünglichen TNT-Menge ausmachten, andererseits aber keine Mineralisierung zu CO₂ nachweisbar war, lag es nahe, dass ein großer Teil der entstandenen Produkte am Schlamm adsorbiert war. Durch Zentrifugation und zwei Extraktionsschritte sollten die adsorbierten Nitroaromaten wieder in Lösung gebracht werden: Die Zentrifugation sollte zunächst lose anhaftende Aromaten vom Schlamm trennen, jedoch wurden nur 1,1% weitere ADNTs gefunden. Im Extraktionsschritt mit Methanol sollten durch physikalische Wechselwirkungen adsorbierte Abbauprodukte gelöst werden, wodurch insgesamt 10,1% der Nitroaromaten detektiert wurden. Bemerkenswert war vor allem, dass 3,5% 2,4-DANT extrahiert werden konnten, obwohl die Substanz zunächst nicht in der Abbaulösung gefunden wurde. Das deutet darauf hin, dass die Wechselwirkung zwischen DANT und Schlamm größer ist, als die zwischen ADNT und

Schlamm. Auch vom TN-4,4'-AzT wurden 3,5% extrahiert. In dem zweiten Extraktionsschritt sollten mit 5M-HCl-Lösung auch chemische Bindungen wieder gelöst werden, hierdurch wurden aber nur weitere 3,4% an ANTs freigesetzt.

Tabelle 4.6: Abbau- und Extraktionsbilanz eines aeroben biologischen Abbaus (**BA1**)

| | 4-ADNT | 2-ADNT | 2,4-DANT | TN-4,4'-AzT | gesamt |
|---------------------------|--------|--------|----------|-------------|--------|
| 24 h Abbau [%] | 24,6 | 4,5 | - | 0,8 | 29,9 |
| Zentrifugation [%] | 0,8 | 0,3 | - | - | 1,1 |
| MeOH-Extr. [%] | 2,4 | 0,7 | 3,5 | 3,5 | 10,1 |
| 5M-HCl-Extr. [%] | 1,6 | 0,3 | 1,5 | - | 3,4 |
| gesamt | 29,4 | 5,8 | 5,0 | 4,3 | 44,5 |

Die Übersicht zeigt, dass trotz der Extraktionsversuche nicht einmal die Hälfte (44,5%) der ursprünglich eingesetzten TNT-Menge als Transformationsprodukte wiedergefunden werden konnte. Von einem weiteren biologischen Abbau wurde daher eine genaue Radioaktivitätsbilanz erstellt, um den Verbleib des TNTs aufzuklären.

4.2.4 Radioaktivitätsbilanz eines biologischen Abbaus

Dieser Bilanzierungsversuch wurde mit nur etwa 2 mg/L radioaktivem TNT (3,1 MBq/L) durchgeführt, daher war TNT schon nach 12 h vollständig abgebaut. Die prozentuale Zusammensetzung der Abbaulösung nach 24 h entspricht den vorherigen Ergebnissen: 34% der eingesetzten TNT-Menge wurden als ADNT oder DANT wiedergefunden, aber 63% der Radioaktivität waren noch in Lösung. In diesem Abbau fand keine Detektion der Azoxytoluole statt, die vermutlich einen Teil der radioaktiven Lösung ausmachten, der nicht aus den ANTs bestand. Daneben müssen aber auch noch andere nicht identifizierte, vermutlich polare Metabolite entstanden sein. Da in den Waschflaschen nur 0,1% der Radioaktivität gefunden wurde, mussten die restlichen 37% des radioaktiven Materials am Schlamm zu finden sein.

Tabelle 4.7: Bilanz des biologischen Abbaus mit radioaktivem TNT

| | 4-ADNT | 2-ADNT | 2,4-DANT | gesamt | Radioaktivität |
|---|--------|--------|----------|--------|----------------|
| 24 h Abbau [%] | 27,2 | 4,8 | 2,2 | 34,2 | 62,6 |
| Zentrifugation [%] | - | - | - | - | 13,5 |
| Wasser-Extr. [%] | 1,6 | 0,2 | 1,1 | 2,9 | 4,9 |
| MeOH-Extr. [%] | 0,5 | - | - | 0,5 | 1,9 |
| CH₂Cl₂-Extr. [%] | - | - | - | - | 1,5 |
| gesamt | 29,3 | 5,0 | 3,3 | 37,6 | 84,4 |

Für die Extraktionen wurde der Schlamm zuerst durch Zentrifugation abgetrennt, dabei gingen 13,5% der Radioaktivität vom Schlamm wieder in Lösung, die aber nicht in der HPLC untersucht wurden. Der Schlamm wurde zunächst mit 30 mL Wasser extrahiert, um weitere lose haftende Teile abzuspülen. Dadurch wurden 5% der Gesamtaktivität gefunden, darunter auch 4-ADNT, 2-ADNT und 2,4-DANT. Die Extraktionen mit Methanol und Dichlormethan sollten dann die durch physikalische Wechselwirkungen adsorbierten polaren und unpolaren Moleküle vom Schlamm ablösen, es lösten sich aber nur noch 1,9% bzw. 1,5% der Aktivität. Die im Schlamm verbliebene Radioaktivität hielt allen Extraktionsversuchen stand und muss deshalb kovalent an den Schlamm gebunden sein. Zur Vervollständigung der Radioaktivitätsbilanz wurde der restliche Schlamm im Kernforschungszentrum Jülich von V. Linnemann verascht und vermessen. Der Rückstand enthielt 15,6% der Ausgangsradioaktivität. Insgesamt konnten 100% der Radioaktivität wiedergefunden und bilanziert werden:

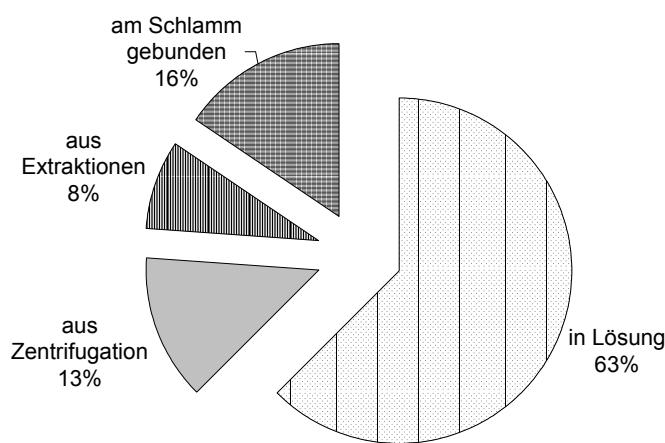


Abbildung 4.2: Gesamtbilanz der Radioaktivität

Auch andere Autoren haben bei aeroben Abbauten ähnliche Resultate gefunden: Carpenter et al. fanden das radioaktive TNT vor allem in der Lipid- und Proteinfraktion des Schlammes [86].

4.3 Aerobe und anaerobe Abbauten mit kontrolliertem Redoxpotential

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluss des Sauerstoffs auf den biologischen Abbau untersucht. Dazu wurden Volumenstrom und Gas bei der Belüftung variiert und das Redoxpotential gemessen. Allgemein teilt man Bakterien anhand ihres Verhaltens zum gelösten Sauerstoff in vier Gruppen ein:

- **Obligate Aerobe**, die sich nur in Gegenwart von Sauerstoff entwickeln

- **mikroaerophile Organismen**, die bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen optimal gedeihen
- **fakultativ Anaerobe/Aerobe**, die sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Sauerstoff wachsen
- **obligat Anaerobe**, die sich nur bei Abwesenheit von Sauerstoff entwickeln. Dieser wirkt toxisch, da sich Wasserstoffperoxid infolge des Fehlens von Cytochromen und Katalase anreichern kann [78]

Eine obligat anaerobe Lösung liegt bei einem Redoxpotential < 200 mV vor [78].

4.3.1 Redoxpotential bei unterschiedlichen Volumenströmen

Es wurden drei Abbauten mit Umgebungsluft und Volumenströmen von 41 L/h, 5 L/h und 0,2 L/h und ein Abbau mit Stickstoff bei einem Volumenstrom von 5 L/h gemacht:

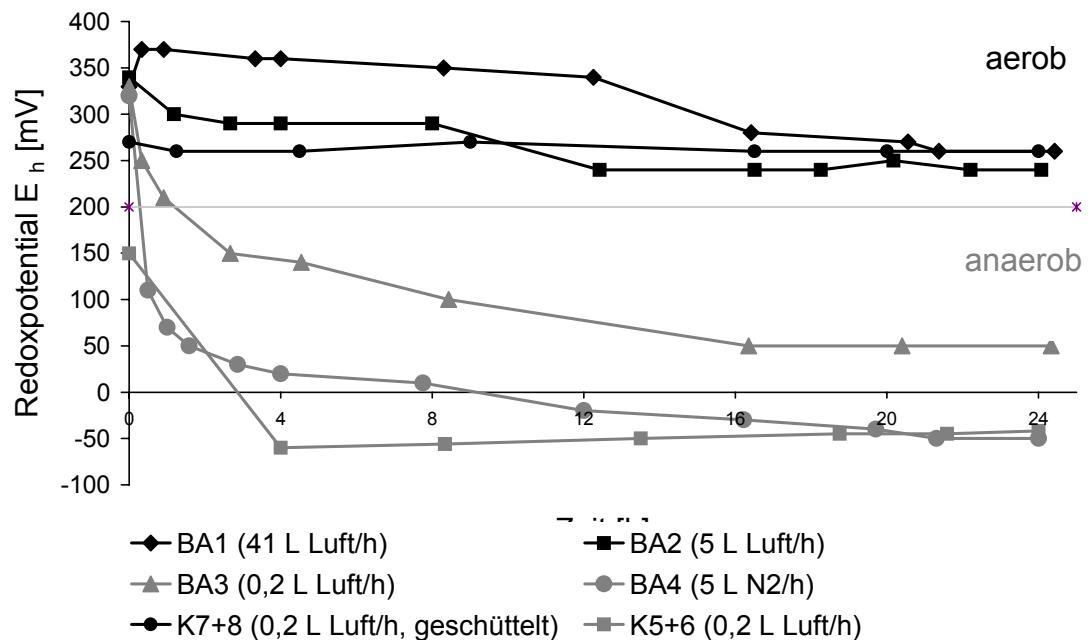


Abbildung 4.3: Einfluss der Volumenströme auf das Redoxpotential

Bei den beiden Abbauten BA1 und BA2 stellte sich jeweils eine Redoxspannung von ca. 250 mV ein, obwohl der Unterschied der jeweiligen Volumenströme (41 vs. 5 L/h) hoch war. Daher ist davon auszugehen, dass beide Volumenströme für eine weitgehende Sättigung der Abbaulösung mit Sauerstoff sorgten und somit eindeutig aerobe Bedingungen vorlagen. Auch die Ergebnisse der beiden Abbauten sind sehr ähnlich. Die Resultate von BA1 (41 L Luft/h)

sind in Abschnitt 4.2.3 ausführlich beschrieben. BA2 stimmte in fast allen wesentlichen Punkten damit überein: TNT war nach 16 h zum größten Teil abgebaut, nach 24 h vollständig. Haupttransformationsprodukte sind die ADNTs (4-ADNT: 20%, 2-ADNT 11%), es wurden aber lediglich ca. 30% (27,5%) der eingesetzten TNT-Menge als transformierte Nitroaromaten wiedergefunden. Als Nebenprodukte traten 2,4-DANT (1,6%) und TN-4,4'-AzT auf, letzteres war aber nach 24 h schon nicht mehr in der Lösung zu finden, nachdem nach 20 h 1,6% vorlagen.

In den Abbauten mit 0,2 L Luft/h und 5 L N₂/h wurde der noch in Lösung befindliche Sauerstoff aufgebraucht und es stellten sich unter den sauerstoffarmen Bedingungen deutlich niedrigere Redoxspannungen ein. Bei einem Versuch mit 0,2 L Luft/h wurde ein Endpotential von 50 mV erreicht, bei einem weiteren Versuch mit 0,2 L Luft/h sank die Redoxspannung genau wie im Versuch mit 5 L/h Stickstoffbegasung sogar auf -50 mV. Da die Redoxspannung unter 200 mV liegt, sind die Bedingungen als anaerob einzustufen, es muss allerdings noch berücksichtigt werden, dass in diesem Falle nicht nur der Sauerstoffgehalt der Lösung, sondern auch die Nitroaromaten zur Gleichgewichtsredoxspannung der Lösung beitragen. Trotz des leichten Unterschiedes im Redoxpotential zeigten die unter sauerstoffarmen Bedingungen durchgeföhrten Abbauten wiederum sehr ähnliche Ergebnisse.

4.3.2 Ergebnisse der anaeroben Abbauten

Im anaeroben Abbau waren bis auf den Volumenstrom sämtliche Parameter so, wie sie für die aeroben Abbauten optimiert worden waren. Stellvertretend wird ein Zeitverlauf über 24 h gezeigt:

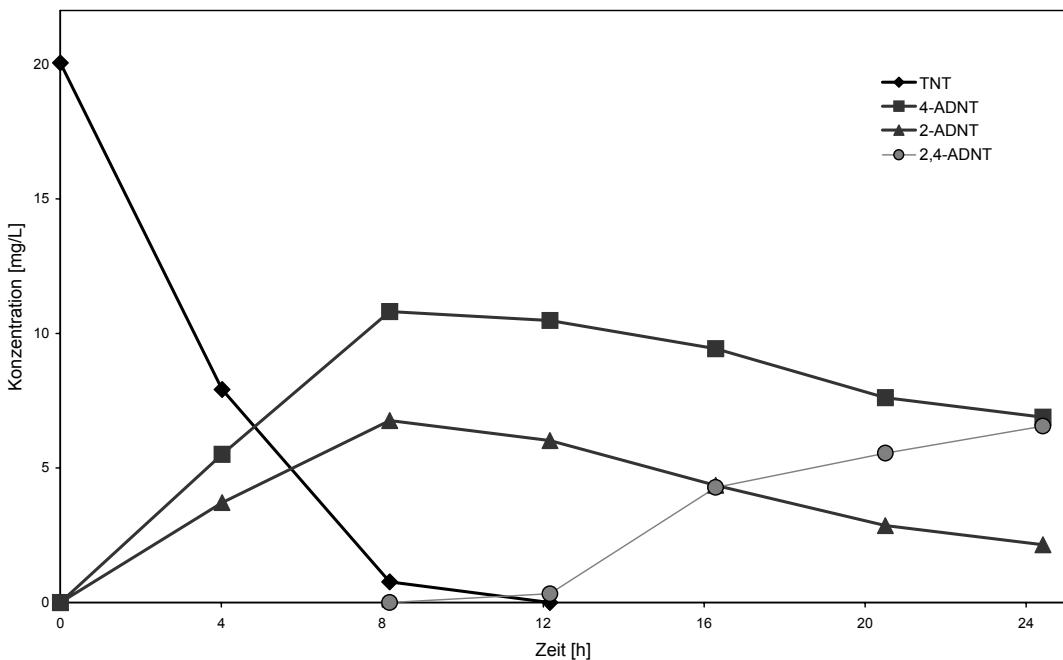


Abbildung 4.4: Zeitverlauf eines anaeroben biologischen Abbaus (BA3: 20 mg/L TNT, 1,88 g/L Belebtschlamm, 200 mg/L Saccharose, Nährstoffmedium, Phosphatpuffer pH 7, Belüftung: 0,2 L Luft/h)

In diesem Abbauversuch ist TNT schon nach 8 h zu über 95% abgebaut, nach 12 h vollständig. Haupttransformationsprodukte sind 2,4-DANT, 4-ADNT und in etwas kleineren Mengen 2-ADNT.

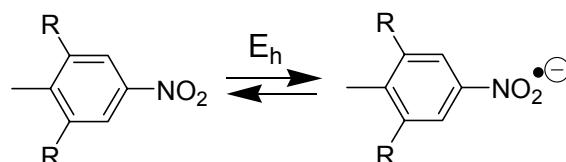
Tabelle 4.8: Ergebnisse der anaeroben biologischen Abbauten nach 24 h

| Nach 24 h [%] in | 4-ADNT | 2-ADNT | 2,4-DANT | gesamt |
|-----------------------------|--------|--------|----------|--------|
| BA3 (0,2 L Luft/h) | 39,5 | 12,3 | 44,4 | 96,2 |
| BA4 (5 L N ₂ /h) | 18,6 | 13,2 | 47,5 | 79,3 |

Die Bildung von TN-4,4'-AzT fand unter den sauerstoffarmen Bedingungen nicht statt, eine nennenswerte Mineralisierung konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Auch eine Adsorption der Nitroaromaten an den Belebtschlamm fand kaum statt. In den anaeroben Versuchen mit Radioaktivität verblieb immer mehr als 95% der Ausgangsaktivität in Lösung. Einzige Ausnahme war der BA4, in dem in der HPLC nur 79,3% des eingesetzten TNT als ANTs wiedergefunden werden konnte. Da aber in späteren kombinierten Abbauten unter denselben Bedingungen (K2, Kap. 6.1.1) sowohl in der HPLC als auch in der Bilanz der Radioaktivität über 95% der Ausgangskonzentration detektiert wurden, ist dieser Wert als Ausreißer einzustufen.

4.4 Vergleich zwischen den aeroben und anaeroben Abbauten

Ein wesentlicher Unterschied zwischen aeroben und anaeroben biologischen Abbauten ist die Geschwindigkeit, mit der das TNT reduziert wurde. Die anaeroben Abbauten sind deutlich schneller verlaufen und ergaben nach 12 h vollständige TNT-Reduktion, während unter aeroben Bedingungen 20 h benötigt wurden. Die Begründung für diesen Befund ist das niedrigere Redoxpotential bei anaeroben Bedingungen, das per Definition ein Maß für die Oxidations- (bei hoher Spannung) bzw. Reduktionskraft (bei niedriger Spannung) einer Lösung ist. Wie schnell die Reduktion einer bestimmten Substanz abläuft, hängt wiederum von deren eigenem Redoxpotential ab. Die Reduktionsgeschwindigkeit von Polynitroaromaten hängt linear von deren Ein-Elektronen Reduktionspotential ab, weil die Übertragung des ersten Elektrons der energieaufwendigste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist (siehe dazu auch Kap. 3.2.5):



Schema 4.1: Ein-Elektronen Reduktion eines Nitrotoluols

Für die zur Diskussion stehenden Nitroaromaten sind aus der Literatur die folgenden E_h -Werte bekannt:

Tabelle 4.9: Ein-Elektronen Redoxpotentiale E_h

| | TNT | 2-ADNT | 4-ADNT | 2,6-DANT | 2,4-DANT |
|-------------------------|-----|--------|--------|----------|----------|
| E_h [mV] ^a | 167 | 3 | - 29 | | - 82 |
| E_h [mV] ^b | 120 | 30 | - 10 | - 75 | - 95 |

a) gemessen mit Puls-Radiolyse [87]

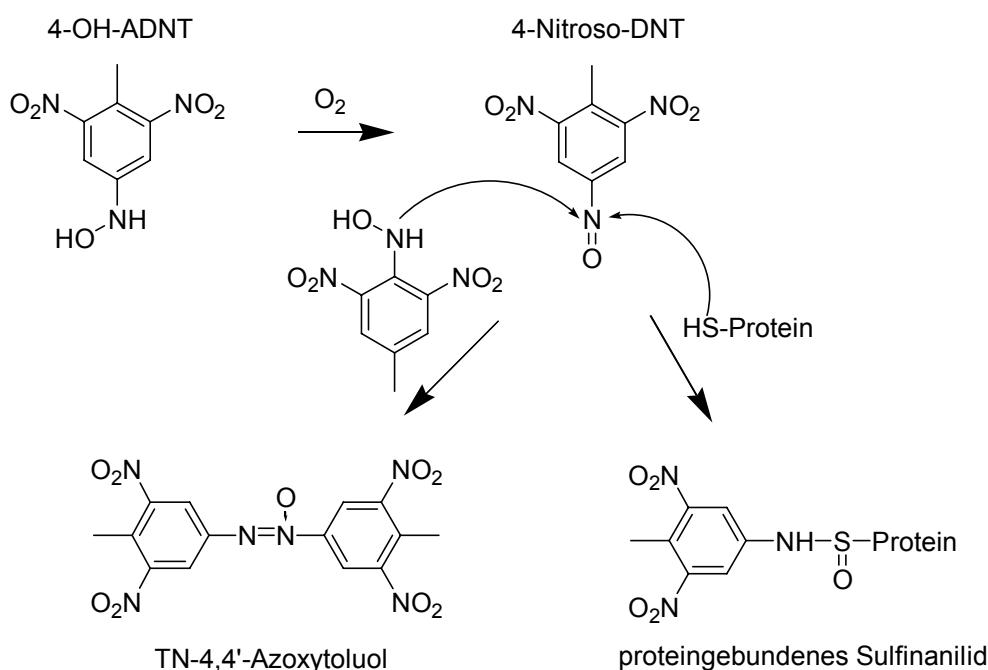
b) berechnet aus Daten anderer Nitroaromaten [88]

Aus den Daten ist ersichtlich, dass die Reduktion von TNT deutlich einfacher sein muss als die der ADNTs. Dies wurde in unseren Versuchen bestätigt, TNT konnte innerhalb der ersten 12 h komplett reduziert werden, die dabei entstandenen ADNTs wurden aber nicht innerhalb der nächsten 12 h vollständig zum DANT reduziert. Das 2-ADNT wird schneller weiter reduziert als das 4-ADNT, was ein Grund dafür sein könnte, warum mehr 4-ADNT als 2-ADNT in den Abbaulösungen zu finden war. Bei der Diskussion der Regioselektivität spielen aber noch zahlreiche andere Faktoren eine Rolle, die an anderer Stelle (Kap. 3.2.5) schon

ausführlich analysiert wurden. Die Reduktion der DANTs verläuft nochmals deutlich langsamer und ist nur unter strikt anaeroben Bedingungen möglich. Im Zeitrahmen unserer Versuche konnte sie nicht beobachtet werden.

Der zweite wesentliche Unterschied zwischen den Abbaubedingungen ist die Adsorption der Transformationsprodukte am Belebtschlamm und die Ausbeute an ANTs. Unter den anaeroben Bedingungen fand keine Wechselwirkung mit dem Schlamm statt und über 95% der eingesetzten TNT-Konzentration wurden als ADNT und DANT wiedergefunden. Dieses Ergebnis steht im scheinbaren Gegensatz zu einigen anderen Untersuchungen aus der Literatur in denen radioaktives TNT unter anaeroben Bedingungen in die Biomasse eingebunden wurde, allerdings dauerte dieser Prozess mehrere Wochen [89,90].

Unter aeroben Bedingungen war die Wechselwirkung mit dem Schlamm viel stärker und nach 24 h Abbau waren über 35% der eingesetzten TNT-Menge am Schlamm adsorbiert. Davon waren 21% durch Zentrifugation und Extraktion wieder abtrennbar, 16% ließen sich dagegen nicht mehr ablösen und waren irreversibel am Schlamm gebunden. Eine kovalente Bindung von TNT an biologische Systeme kann z. B. über das OH-ADNT erfolgen. So haben z. B. Leung et al. bei Versuchen mit Proteinen aus Rattenlebern zeigen können, dass bei direkter Applikation von radioaktiv markiertem OH-ADNT die Bildung von kovalenten Addukten deutlicher höher war als bei Applikation von ^{14}C -TNT [91]. Die Bindungsbildung ist aber abhängig von der Anwesenheit des Sauerstoff [92,91]. Die eigentliche reaktive Spezies ist das oxidierte Intermediat, das Nitrosodinitrotoluol.



Schema 4.2: Entstehung und Reaktionswege von Nitrosodinitrotoluol unter aeroben Bedingungen
44

Die Nitrosogruppe ist sehr reaktiv und elektrophil. In biologischen Systemen kann sie mit Nucleophilen reagieren. In Schema 4.2 wird als Beispiel die Reaktion mit der Thiolgruppe eines Proteins gezeigt [91,93]. Der Mechanismus der Bindung an Proteine läuft also ähnlich ab, wie die ebenfalls in Schema 4.2 gezeigte Kondensationsreaktion eines Hydroxylamino- mit einem Nitrosoaromaten zum Azoxydimer. Dementsprechend war unter aeroben Bedingungen das TN-4,4'-AzT nachweisbar, unter anaeroben Bedingungen hingegen nicht. Die Verbindung kann demnach als Indikator für eine kovalente Bindung an den Schlamm unter aeroben Bedingungen verstanden werden. Das Entstehen der Azoxydimere ist für den weiteren Abbau aber unerwünscht, weil ihre Mineralisierung aufwendiger ist und eine weitere Behandlung durch ihren stark unpolaren Charakter und ihre geringe Reaktivität erschwert wird [92]. Eine weitere Möglichkeit zur Bildung von kovalenten Bindungen verläuft über das TAT, bei dem die Aminogruppen so reaktiv sind, dass sie nukleophil mit den Bestandteilen einer Schlamm- oder Bodenmatrix reagieren können [26]. Manche Autoren halten schon die Nukleophilie des DANT für ausreichend, um kovalente Bindungen z.B. mit Sedimenten einzugehen [94]. Die irreversible Bindung an den Belebtschlamm wird auch als Sanierungsmethode erprobt, bei der TNT in einer anaeroben Behandlungsphase bis zum TAT reduziert werden und in einer darauf folgenden aeroben Behandlungsstufe an den Schlamm gebunden werden soll [95].

Während der Einfluss des Sauerstoffs auf die Bildung von kovalenten Bindungen anhand der beschriebenen Mechanismen erklärt werden kann, ist es überraschend, dass auch die physikalische Bindung an den Schlamm unter anaeroben Bedingungen deutlich weniger ausgeprägt ist, als unter aeroben Bedingungen. Die Ergebnisse der Extraktionen zeigen, dass die reversible Adsorption mit steigender Zahl der Aminosubstituenten zunimmt (TNT < ADNT < DANT), was den Ergebnissen anderer Autoren entspricht [94,96]. Eine plausible Erklärung für die Sauerstoffabhängigkeit der Adsorption ergibt sich hieraus aber nicht. Elovitz und Weber [94] finden bei Adsorptionsversuchen mit Sedimenten, dass mit der Zeit die physikalisch gebundenen extrahierbaren ANTs auf Kosten des irreversibel gebundenen Anteils abnehmen und folgern daraus, dass die physikalische Adsorption eine Vorstufe für die spätere chemische Bindung an den Schlamm sein könnte. In dieser Arbeit wurde auf eine genauere Klärung dieser Adsorptionsmechanismen verzichtet.

Da der aerobe biologische Abbau der Abbaulösung durch Adsorption einen beträchtlichen Teil der ANTs entzieht, ist er weniger attraktiv für das anvisierte kombinierte Verfahren. Die anaerobe Verfahrensvariante ist zu bevorzugen, weil sie TNT schneller und vollständiger in die gewünschten ADNTs und DANTs überführen kann.

5 Ergebnisse der photochemischen Abbauten

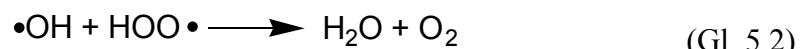
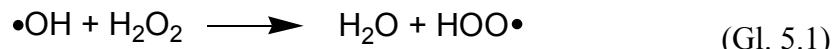
Ziel der photochemischen Abbauten war eine effektive vollständige Mineralisierung der Nitroaromaten zu CO_2 , NO_x und H_2O . Zur Generierung der dazu notwendigen Hydroxylradikale wurden die photolytische Spaltung von H_2O_2 und die Photo-Fenton Reaktion eingesetzt (Grundlagen hierzu in Kap. 1.4.2).

Die Photoabbauten wurden auf einer optischen Bank in einem 50 mL-Quarzglaskolben durchgeführt. Als Quelle für das UV-Licht diente eine 150 W-Xenonlampe. Das luftdicht abgeschlossene System wurde mit 5 L Luft/h begast. Die Abluft wurde durch zwei mit dem CO_2 -Absorber Carbosorb gefüllte Waschflaschen und eine Aktivkohlepatrone geleitet, um das Austreten flüchtiger radioaktiver Stoffe zu verhindern. Der Abbauvorgang wurde über die Bilanzierung der Radioaktivität und die HPLC verfolgt. Zur Bilanzierung der Radioaktivität wurde während des Abbaus die Abnahme der Radioaktivität im Reaktor gemessen und der Mineralisierung und $^{14}\text{CO}_2$ -Entstehung gleichgesetzt. Am Ende eines Abbaus wurde dann der $^{14}\text{CO}_2$ -Gehalt in den Waschflaschen gemessen und eine Gesamtbilanz aufgestellt. Da der Fenton Abbau nur unter sauren Bedingungen abläuft, wurden sämtliche Photoabbauten bei pH 3 durchgeführt, um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Methoden sicherzustellen.

5.1 Abbauten mit UV- H_2O_2

5.1.1 Optimierung der H_2O_2 -Konzentration – Mineralisierung von [U-ring- ^{14}C]-TNT

Die Optimierung der H_2O_2 -Konzentration erfolgte bei Abbauten mit einer [U-ring- ^{14}C]-TNT-Konzentration von 50 mg/L und UV-Bestrahlung über 24 h. Mit verdünnter Schwefelsäure wurde der pH-Wert 3 eingestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.1 graphisch dargestellt. Die Mineralisierungsrate stieg mit steigenden Konzentrationen bis zu 1% H_2O_2 . Eine weitere Erhöhung der Konzentration auf 2,5% H_2O_2 brachte keine weitere Steigerung der Mineralisierung. Das ist darauf zurückzuführen, dass bei zu hoher H_2O_2 -Konzentration die Reaktion des Wasserstoffperoxids mit OH-Radikalen (Gl. 5.1 und 5.2) in Konkurrenz zur Reaktion der Radikale mit den Aminoaromaten (Gl. 1.7 und 1.8) tritt [97].



Daher wurde in den weiteren Versuchen mit einer Wasserstoffperoxidkonzentration von 1% gearbeitet. Das entspricht einem molaren H_2O_2 : TNT Verhältnis von 1350 : 1. Dillert et al fanden unter anderen Bedingungen (Hg-Lampe, 22 mg/L TNT) ein optimales Verhältnis von 200 : 1 [37]. Der vertikale Balken bei 24 h zeigt exemplarisch die Menge des entstandenen $^{14}\text{CO}_2$ (32,6% der Gesamtaktivität) bei einer H_2O_2 -Konzentration von 1%. Zusammen mit der im Reaktor verbliebenen Radioaktivität von 62,4% ergibt sich eine Wiederfindung von 95% der Ausgangsaktivität. Die fehlenden 5% in der Gesamtbilanz sind hauptsächlich auf die Adsorption von Radioaktivität an Gefäßwänden und Schläuchen zurückzuführen. Zudem kommt es bei der Radioaktivitätsmessung ganz natürlich zu Schwankungen von bis zu 3% [63]. So ist z.B. auch zu erklären, warum beim Abbau ohne H_2O_2 nach 23 h (97,7%) wieder mehr Aktivität gefunden wurde als nach 21 h (95,4%). Insgesamt lag die Wiederfindung der Ausgangsaktivität in der Gesamtbilanz bei allen Versuchen zwischen 88% und 98%.

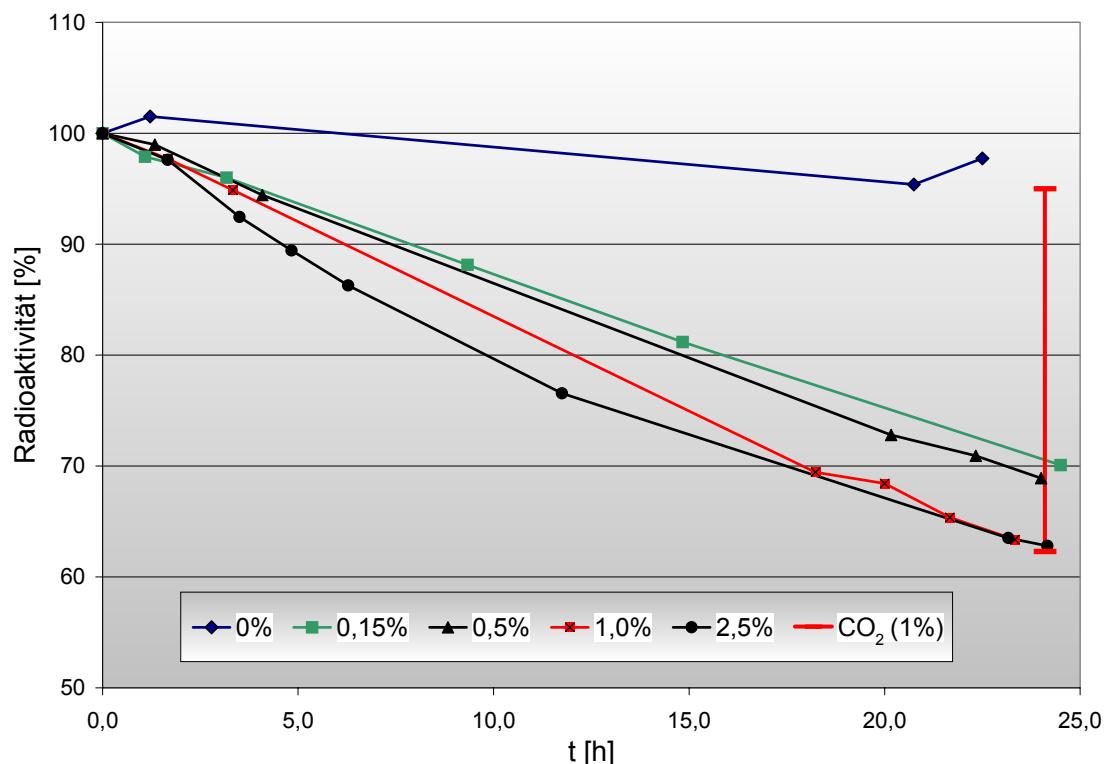


Abbildung 5.1: Radioaktivitätsabnahme bei H_2O_2 -Konzentrationen von 0%, 0,15%, 0,5%, 1% und 2,5% sowie entstandenes CO_2 bei 1% H_2O_2 (vertikaler Balken) (50 mL Abbaulösung, 50 mg/L [^{14}C]-TNT, pH 3, 150 W Xenonlampe)

Parallel zur radioaktiven Bilanzierung wurde auch die Abnahme der TNT-Konzentration in der HPLC untersucht (Abbildung 5.2). Auch hier steigt die Geschwindigkeit der TNT-Abnahme mit zunehmender H_2O_2 -Konzentration. Auffällig ist jedoch, dass auch ohne die Beteiligung von H_2O_2 die TNT-Konzentration schon stark abnahm und innerhalb der 24 h auf 24% sank, während eine Mineralisierung unter diesen Bedingungen kaum stattfand. Das Hauptprodukt der Photolyse von TNT ist das 1,3,5-Trinitrobenzol. Es entsteht durch photochemische Oxidation der Methylgruppe des TNT zur Carbonsäure und anschließende Decarboxylierung derselben. Daneben können auch Trinitrobenzaldehyd und zahlreiche andere Verbindungen entstehen [5]. Das Trinitrobenzol ist allerdings für einen weiteren oxidativen Abbau noch schwerer zugänglich als das TNT selbst.

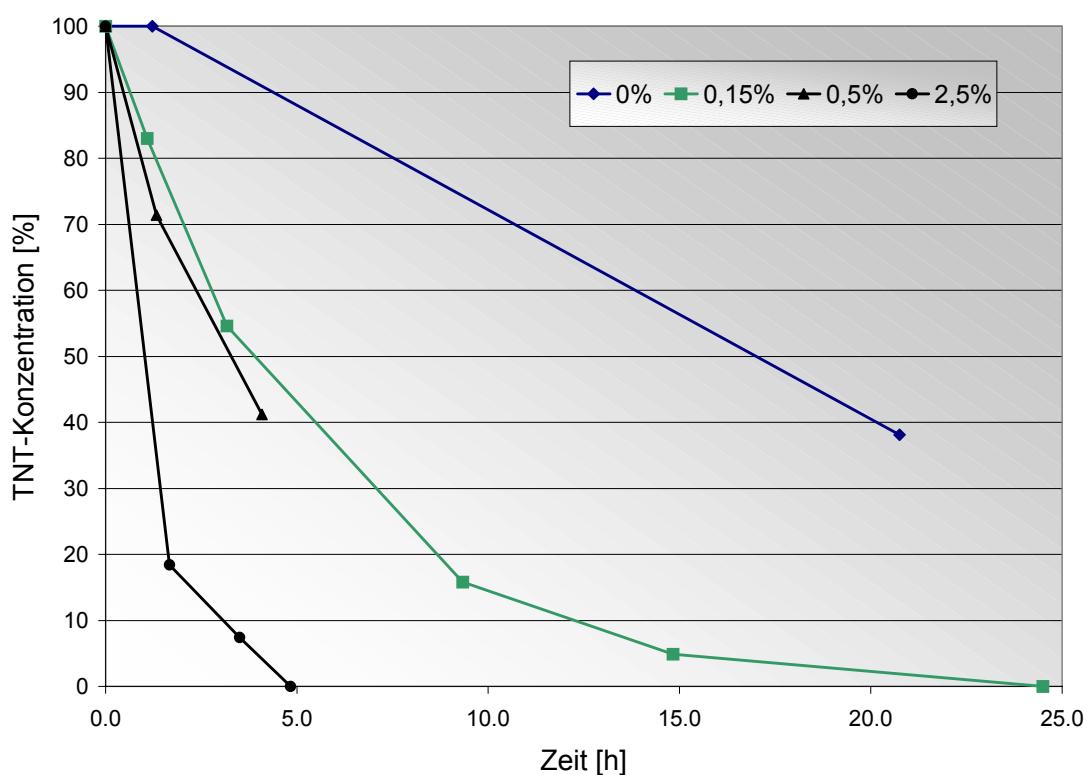


Abbildung 5.2: Abnahme der TNT-Konzentration bei verschiedenen H_2O_2 -Konzentrationen (50 mL Abbaulösung, 50 mg/L [U-ring- ^{14}C]-TNT, pH 3, 150 W Xenonlampe)

5.1.2 Mineralisierung von ^{14}C -ADNT und ^{14}C -DANT per UV- H_2O_2

Mit der optimierten Rezeptur wurden nun der Photoabbau von [U-ring- ^{14}C]-2-ADNT, [U-ring- ^{14}C]-4-ADNT, [U-ring- ^{14}C]-2,4-DANT und [U-ring- ^{14}C]-2,6-DANT untersucht. Um vergleichbare Resultate zu erhalten, wurden alle Verbindungen in der gleichen molaren Konzentration (0,22 mmol/L) wie zuvor das TNT eingesetzt. Das ergab für die ADNTs eine

Konzentration von 43,3 mg/L und für die DANTs eine Konzentration von 36,7 mg/L. Die ANT-Lösungen waren gelb gefärbt. Nach 2 h war diese Färbung verschwunden und die Ergebnisse der HPLC-Untersuchungen zeigten, dass die Konzentration der jeweiligen Verbindung schon unter 10% der Ausgangskonzentration lag (gestrichelte blaue Linie in Abbildung 5.3). Nach 3 h waren die Ausgangsverbindungen vollständig abgebaut. Im Reaktor setzte nach einigen Minuten die Bildung von Gasbläschen ein, die auf durch Mineralisierung entstehendes CO_2 zurückzuführen war.

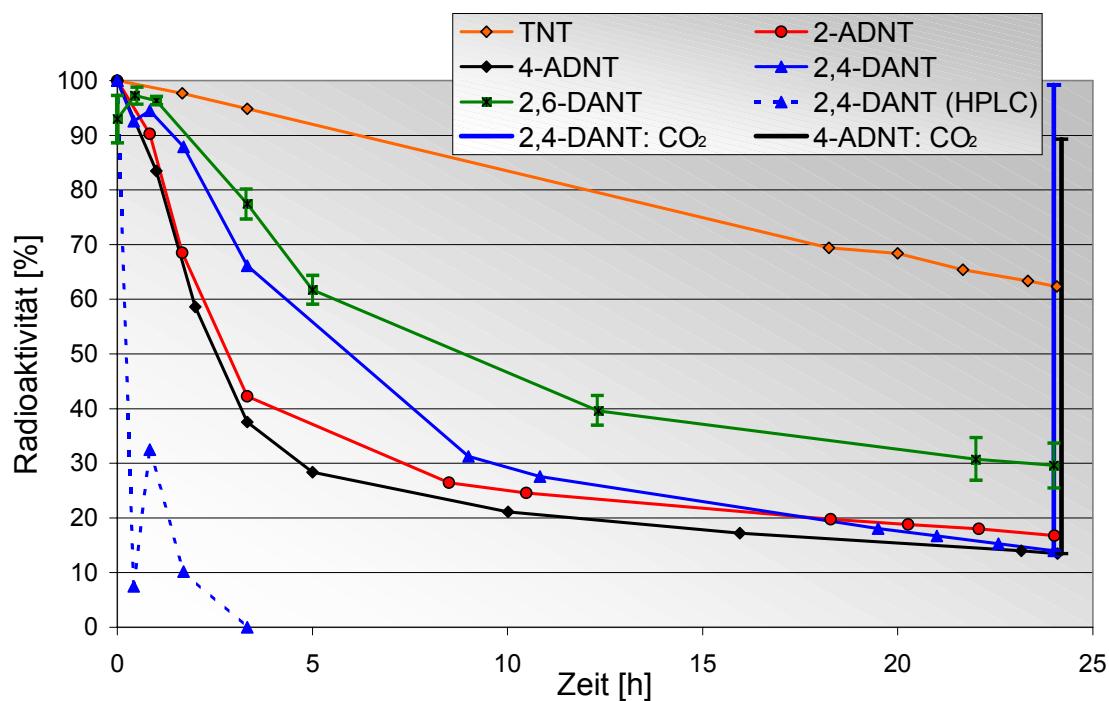
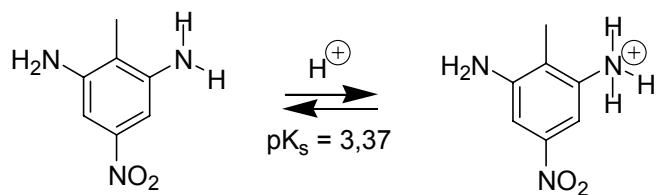


Abbildung 5.3: Radioaktivitätsabnahme der Photoabbauten mit ADNT und DANT sowie CO_2 -Bildung bei Abbau von 4-ADNT (schwarzer Balken) und 2,4-DANT (blauer Balken) (50 mL Abbaulösung, 0,22 mmol/L [U-ring- ^{14}C]-ANT, 1% H_2O_2 , pH 3, 150 W Xenonlampe)

Die Abbauten wurden jeweils zwei Mal durchgeführt und waren reproduzierbar, die jeweiligen Werte unterschieden sich nicht mehr als 3%. Die ADNT-Abbauten verliefen problemlos. Nach 24 h wurde eine Mineralisierung von über 80% erreicht und damit mehr als doppelt so viel wie beim TNT-Abbau (36%). Es waren sogar schon nach nur 4 h 60% der ursprünglichen Radioaktivität mineralisiert, anschließend nahm die Abbaugeschwindigkeit aber deutlich ab, was auch optisch am starken Nachlassen der Gasbläschenbildung erkennbar war. Der Abbau des 4-ADNT (Abbildung 5.3, schwarze Kurve) verlief geringfügig schneller als der des 2-ADNT (rote Kurve).

Schwieriger war die Interpretation der DANT-Abbauten. Am Anfang des Abbaus war insbesondere beim 2,6-DANT ein deutlicher Anstieg der Radioaktivität messbar. Um zu zeigen, dass es sich hierbei nicht um einen Messfehler handelte, wurde der Versuch noch zweimal wiederholt. Die grüne Kurve in Abbildung 5.3 zeigt die Mittelwerte der drei Messungen mit den zugehörigen Fehlerbalken. Da aber die Radioaktivität in dem geschlossenen System nicht zunehmen konnte, muss sich bei den ersten Probennahmen ein Teil der Aktivität der Messung entzogen haben und dann unter den Abbaubedingungen wieder freigesetzt worden sein. Dieser Effekt trat vermutlich wegen des pH-Wertes der Abbaulösung auf. Aufgrund des in Schema 5.1 gezeigten Gleichgewichtes liegt bei pH 3 der größere Teil des 2,6-DANT in der protonierten Form vor.



Schema 5.1: Protonierung von 2,6-DANT

Die sehr polare protonierte Form wurde bei der Messung der Radioaktivität nicht vollständig erfasst, vermutlich war sie in dem Gemisch aus wässriger Probe und organischem, unpolaren Szintillationscocktail nicht vollständig löslich. Spätere Kontrollversuche ergaben, dass eine bei pH 3 vermessene wässrige 2,6-DANT Probe nur 91% des Messwertes derselben Probe bei pH 7 zeigte. Die Zunahme der Radioaktivität im Abbau kam vermutlich dadurch zustande, dass die protonierte Aminogruppe durch den Abbau abgespalten wurde und die unpolaren Folgeprodukte wieder vollständig in der Messung erfasst wurden.

Beim 2,4-DANT war der beschriebene Effekt nicht so deutlich sichtbar, obwohl der pK_s Wert mit 3,54 noch höher liegt als beim 2,6-DANT. Grund dafür ist vermutlich, dass die protonierte Aminogruppe in *para*-Position aus sterischen Gründen noch schneller wieder abgespalten werden kann. Dementsprechend verlief der Abbau schneller und es wurde eine deutlich höhere Mineralisierung erzielt als beim 2,6-DANT (Abbildung 5.3, blaue Kurve). Betrachtet man nur die in der Abbaulösung gemessene Aktivität, war die Mineralisierung beim 2,4-DANT mit 86% genau so hoch wie beim 4-ADNT. Zieht man aber auch die entstandene CO_2 -Menge in Betracht, sieht man, dass beim 2,4-DANT 85% der Aktivität in den Waschflaschen wiedergefunden wurde (Abbildung 5.3, blauer vertikaler Balken), während es beim 4-ADNT nur 76% waren (schwarzer vertikaler Balken). Die Bilanz des 2,4-DANT-Abbaus läge damit bei 99%. Da die Bilanzen aller anderen Abbauten aber um die 90%

lagen, kann man davon ausgehen, dass auch hier die ursprüngliche Ausgangsaktivität etwa 5-10% höher lag als die gemessene. Dementsprechend wäre auch die Mineralisierungsrate höher als beim 4-ADNT, was aufgrund der höheren Elektronendichte im aromatischen Ringsystem auch zu erwarten war. Allerdings war die Abbaugeschwindigkeit beider DANTs nicht so hoch wie aufgrund des elektronenschiebenden Charakters einer zusätzlichen Aminogruppe angenommen worden war. 2,6-DANT wurde von allen ANTs am langsamsten abgebaut. Ursache hierfür ist, dass der zusätzlichen Aminogruppe durch die Protonierung der nukleophile Charakter genommen wird. Sowohl die ADNTs als auch die DANTs zeigten einen schnelleren Mineralisierungsverlauf, wenn sich eine Aminogruppe in *para*-Stellung befand.

5.2 Photo-Fenton Abbauten

5.2.1 Optimierung der Fe^{2+} -Konzentration - Mineralisierung von [U-ring- ^{14}C]-TNT

Für den Photo-Fenton Abbau wurde zunächst die Fe^{2+} -Konzentration optimiert. Abbauversuche erfolgten ebenfalls im 50 mL Maßstab bei einer [U-ring- ^{14}C]-TNT-Konzentration von 50 mg/L, einer H_2O_2 -Konzentration von 1% und pH 3 über 24 h. Die Fe^{2+} -Ionen wurden in Form vom $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ zugegeben. Ab einer Fe^{2+} -Konzentration von 20 mg/L setzte bei der Zugabe von H_2O_2 eine schwache Braunfärbung der Lösung ein, die auf eine Komplexbildung des Eisens schließen lässt. Grundsätzlich wurde zu Beginn der Abbauten die Lampe gestartet bevor dann H_2O_2 zugegeben wurde. So sollte eine vorzeitige Abreaktion des Peroxids z.B. unter TNT- oder Eisenoxidation verhindert werden, weil H_2O_2 als starkes Oxidationsmittel (Redoxpotential 1763 mV [35]) sehr reaktiv ist. Die ganze Menge des Wasserstoffperoxids (1,75 mL einer 30%igen Lösung) wurde sofort am Anfang der Reaktion vollständig zugegeben. In Anlehnung an Literaturwerte wurden verschiedene Fe^{2+} -Konzentrationen zwischen 10 mg/L und 80 mg/L eingesetzt.

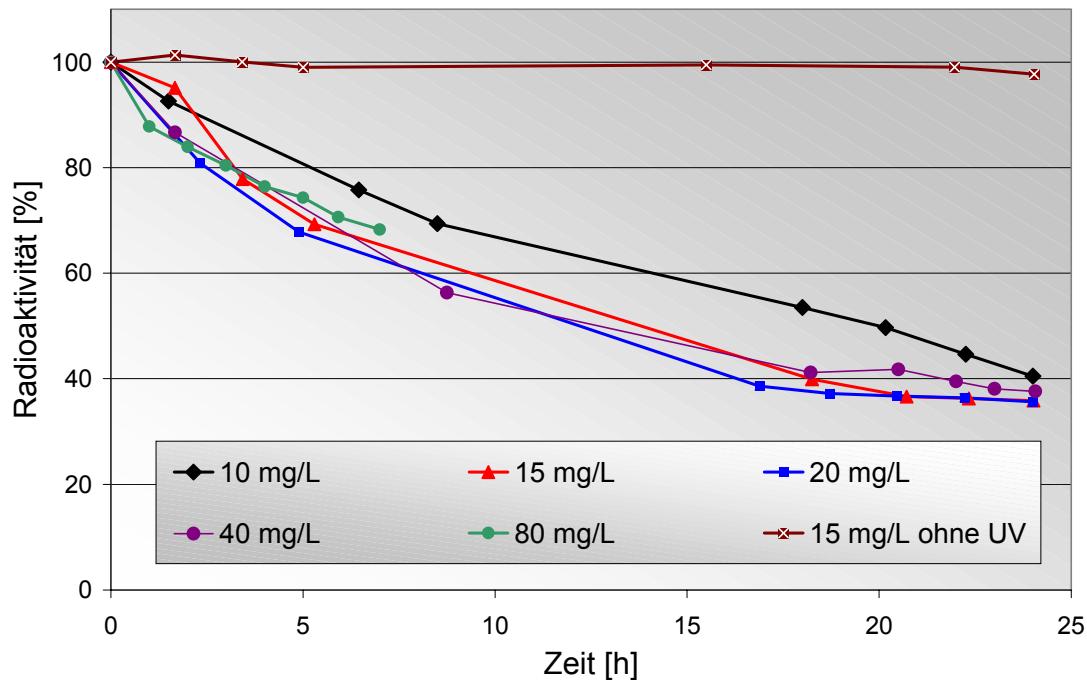


Abbildung 5.4: Mineralisierung bei verschiedenen Fe^{2+} -Konzentrationen (50 mL Abbaulösung, 50 mg/L [U-ring- ^{14}C]-TNT, 1% H_2O_2 , pH 3, 150 W Xenonlampe)

Die Ergebnisse der einzelnen Abbauten lagen sehr dicht beieinander. Bei allen Abbauten mit Fe^{2+} und UV-Licht waren nach 24 h 58–64% des TNT mineralisiert. Die besten Mineralisierungsergebnisse wurden mit Fe^{2+} -Konzentrationen zwischen 15 mg/L (Abbildung 5.4, rote Kurve) und 40 mg/L (violette Kurve) erzielt. Grund hierfür war vermutlich, dass bei höheren Fe^{2+} -Konzentrationen eine Färbung und Trübung der Abbaulösung auftrat, welches eine Verminderung der optischen Durchlässigkeit zur Folge hatte. Für die weiteren Versuche wurde deshalb eine Fe^{2+} -Konzentration von 15 mg/L verwendet. Für die optimierte Abbaurezeptur mit 1% H_2O_2 und 15 mg/L Fe^{2+} ergab sich ein $\text{H}_2\text{O}_2 : \text{Fe}^{2+} : \text{TNT}$ -Verhältnis von 1350 : 1,2 : 1.

Tabelle 5.1: Rezepturen für Photo-Fenton Abbauten bei pH 3

| | TNT-Konzentration [mg/L] | H_2O_2 [%] | Fe^{2+} [mg/L] | Verhältnis TNT : H_2O_2 : Fe^{2+} | Mineralisierung [%] |
|---------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------|--|---------------------|
| diese Arbeit | 50 | 1 | 15 | 1 : 1350 : 1,2 | 64 |
| Shea [98] | 70 | 1 | 80 | 1 : 970 : 4,6 | 70 |
| Dillert [37] | 22,7 | 0,07 | 5,5 | 1 : 200 : 1 | n.b. |

Die Rezeptur von Dillert kommt mit deutlicher weniger Chemikalieneinsatz aus, hier wurde jedoch nur der Abbau von TNT verfolgt, nicht aber die Mineralisierung. Unsere Ergebnisse

stimmen recht gut mit den Arbeiten von Shea und Comfort überein. In der hier ermittelten optimierten Rezeptur wurde mehr H_2O_2 verwandt, dafür setzt Shea mehr Fe^{2+} ein. Die Mineralisierung ist bei beiden etwa gleich. Shea und Comfort haben die Mineralisierung allerdings nur über die Abnahme der Radioaktivität im Reaktor gemessen und keine Gesamtbilanzierung des Abbaus unter Berücksichtigung des entstandenen $^{14}\text{CO}_2$ vollzogen [99,98].

5.2.2 Mineralisierung von ^{14}C -ADNT und ^{14}C -DANT per Photo-Fenton

Sämtliche Randbedingungen waren dieselben wie bei der Mineralisierung von ^{14}C -ADNT und ^{14}C -DANT per UV- H_2O_2 (Kap. 5.1.2), es wurden lediglich zusätzlich 15 mg/L Fe^{2+} zugegeben. Aufgrund des Eisens waren die ANT-Lösungen gelborange, jedoch war bereits nach 15 min Abbau völlige Entfärbung eingetreten und in der HPLC (Abbildung 5.5, gestrichelte blaue Linie) war kein Edukt mehr nachweisbar. Damit war der Photo-Fenton Abbau deutlich schneller als der Abbau mit UV- H_2O_2 , in dem für den Abbau der Ausgangsverbindungen über 2 h benötigt wurden. Die Luftbläschenbildung war sehr stark und ließ auf eine sehr schnelle Mineralisierung schließen.

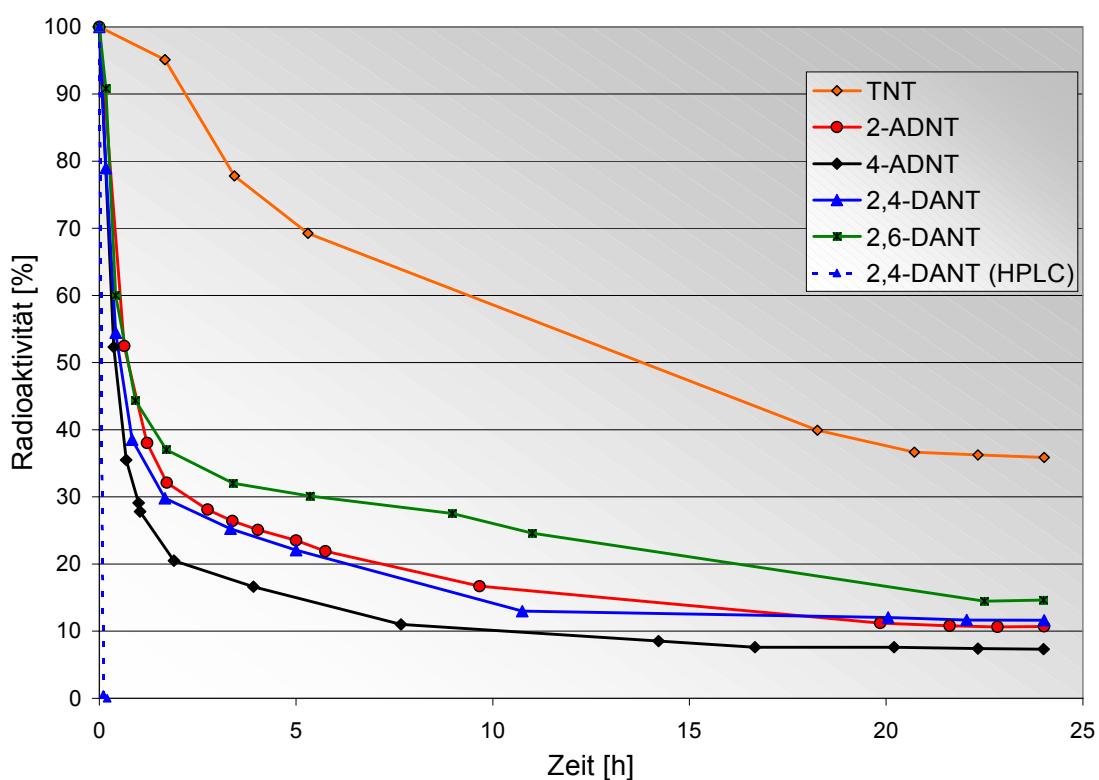


Abbildung 5.5: Radioaktivitätsabnahme der Photo-Fenton Abbauten mit ADNT und DANT (50 mL Abbaulösung, 0,22 mmol/L [U-ring- ^{14}C]-ANT, 1% H_2O_2 , 15 mg/L Fe^{2+} , pH 3, 150 W Xenonlampe)

In der Tat verlief auch die Mineralisierung im Photo-Fenton Abbau schneller als im UV-H₂O₂ Abbau. Je schneller der Abbau der Ausgangssubstanz war, umso schneller war auch die Mineralisierung. Das zeigt, dass der aufwendigste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die gesamte Mineralisierung der erste Angriff des Hydroxylradikals auf den Nitroaromaten ist. Das erklärt auch die bei der Mineralisierung des TNT (Abbildung 5.5, orange Linie) auftretende Lag-Phase. Die Mineralisierung verzögert sich, weil das TNT noch nicht vollständig abgebaut ist, während bei den ANTs, die schon nach 10 min abgebaut sind, gleich eine heftige Mineralisierung einsetzt, die durch starke Gasblasenbildung auch sofort sichtbar wird. Das 4-ADNT (schwarze Linie) war schneller und weitgehender (92,7%) mineralisiert als das 2-ADNT (rote Linie, 89,3%). Der größte Teil der Mineralisierung fand mit etwas 80% schon in den ersten 5 h des Abbaus statt. Die DANTs wurden wieder langsamer abgebaut als erwartet, was auch hier an der in Kap. 5.1.2 beschriebenen teilweisen Protonierung einer Aminogruppe bei pH 3 liegt. Die höhere Elektronendichte am Ring, die durch die zwei Aminogruppen entsteht und den Aromaten zu einem besseren Akzeptor für das Hydroxylradikal machen würde, wird durch die Protonierung wieder reduziert. Aufgrund der hohen Geschwindigkeit des Abbaus findet aber keine “scheinbare” zwischenzeitliche Zunahme der Radioaktivität statt, da die protonierte Aminogruppe sehr schnell wieder abgespalten wird. Das 2,4-DANT (Abbildung 5.5, blaue Linie) wird ähnlich schnell wie das 2-ADNT abgebaut, am Ende war aber mit 88,4% die Mineralisierung nicht ganz so hoch. Allerdings liegen dieser Unterschiede im Bereich des Messfehlers von 3%. Am schlechtesten wird, wie auch im UV-H₂O₂ Abbau, das 2,6-DANT (grüne Linie) mit einer Mineralisierung von 85,4% nach 24 h abgebaut.

5.2.3 Dunkel-Fenton Abbau

Es wurde mit 50 mg/L [U-ring-¹⁴C]-TNT, 1% H₂O₂ und 15 mg/L Fe²⁺ auch ein Dunkel-Fenton Abbau ohne UV-Licht durchgeführt. Unter diesen Bedingungen fand keine Mineralisierung statt (Abbildung 5.4, dunkelrote Linie), obwohl das TNT abgebaut wurde. Shea und Comfort finden ähnliche Ergebnisse und führen die fehlende Mineralisierung auf die Schwierigkeit des reinen Fenton-Systems zurück, den letzten Oxidationsschritt der Mineralisierung von der Oxalsäure zum CO₂ zu katalysieren [98]. Im Gegensatz dazu konnte Dillert überhaupt keinen Abbau des TNT feststellen [37]. Für weitere Abbauten wurde daher nicht mehr auf das Dunkel-Fenton System zurückgegriffen.

5.3 Vergleich zweier UV-Lichtquellen

Die bisherigen Versuche wurden mit einem 150 W Xenon-Hochstdruckstrahler ausgeführt. Diese Strahler liefern oberhalb von 300 nm eine nahezu kontinuierliche, tageslichtähnliche Strahlung, unterhalb von 300 nm haben sie aber nur eine schwache Intensität [100], was für die homolytische Spaltung von H_2O_2 bei 254 nm eher ungünstig ist. Der Vorteil dieser Lichtquelle ist aber, dass ihre Strahlung fokussierbar ist und so der kleine 50 mL Quarzglasreaktor von außen bestrahlt werden konnte. Dadurch entstand in den vergleichenden Abbauversuchen deutlich weniger radioaktiver Abfall. Um den Einfluss der Lichtquelle zu untersuchen, wurden Versuche mit einem 150 W Quecksilber-Hochdruckstrahler durchgeführt. Solch ein Strahler liefert eine spektrale Verteilung der Lichtleistung mit Hg-Emissionslinien bei 254 nm, 313 nm, 366 nm, 405 nm, 436 nm, 546 nm und 577 nm. Bei 254 nm ist die Intensität also deutlich höher als bei der Xe-Lampe. Der Nachteil dieser Strahler ist allerdings, dass sie relativ große Abmessungen besitzen und nicht fokussierbar sind, außerdem ist eine permanente Kühlung erforderlich [100]. Der Hg-Strahler wurde als Tauchlampe in einer 500 mL Apparatur eingesetzt. Das Abbauvolumen (und damit auch das Abfallvolumen) wurde also verzehnfacht, die Konzentrationen blieben aber gleich.

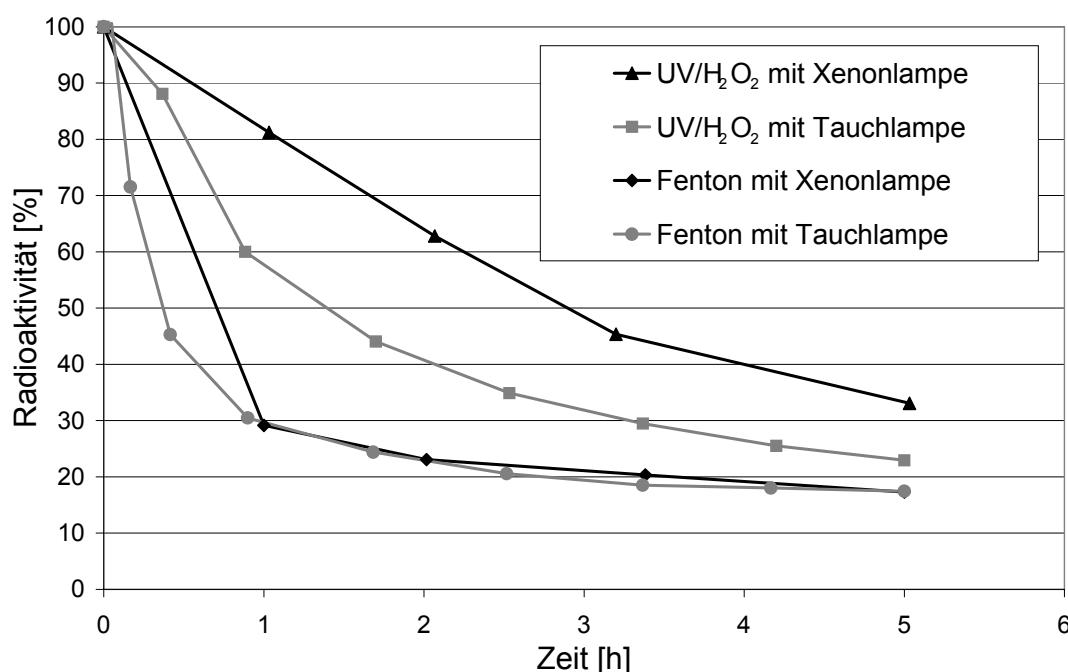


Abbildung 5.6: Abbauten von 4-ADNT mit verschiedenen Lampen (0,22 mmol/L [U-ring-¹⁴C]-4-ADNT, 1% H_2O_2 , pH 3)

Bei der Mineralisierung von 4-ADNT unter ansonsten gleichen Bedingungen zeigte sich, dass die unterschiedliche Lichtquelle auf den Verlauf des Photo-Fenton Abbaus keinen Einfluss hatte, während sie beim Abbau mit UV- H_2O_2 eine entscheidende Rolle spielte (Abbildung 5.6). Der rein auf der Photolyse von H_2O_2 bei 254 nm basierende Abbau verlief mit der Tauchlampe als UV-Lichtquelle (graue Kurve mit Quadraten) deutlich schneller als bei Bestrahlung von außen mit der Xenonlampe (schwarze Kurve mit Dreiecken). Mit der Xenonlampe waren nach 5 h nur 66% des 4-ADNT mineralisiert, mit der Tauchlampe waren es schon 77%. Das lag daran, dass beim photolytischen Abbau mit H_2O_2 die Bildung der reaktiven OH-Radikale direkt von der homolytischen Spaltung des H_2O_2 (Gl. 1.1) durch das UV-Licht abhängt. Die Tauchlampe hatte zwar die selbe Leistung wie die Xenonlampe, sie strahlte aber einen höheren Anteil ihrer Energie im relevanten UV-Bereich bei 254 nm ab und konnte effektiver arbeiten, weil sie direkt in die Abbaulösung eintauchte. Beim Photo-Fenton Abbau werden die Hydroxylradikale primär durch Reaktion von Fe^{2+} mit H_2O_2 (Gl. 1.2) generiert und das UV-Licht dient zur Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) (Gl. 1.5), wozu ein größerer Wellenlängenbereich genutzt werden kann, der zudem von der Komplexierung des Eisens abhängt. Die Reduktion hat außerdem keinen direkten Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit. Mit beiden Lampen wurden nach 5 h 83% mineralisiert.

5.4 Variation der H_2O_2 -Zugabe

Bei den Mineralisierungsversuchen mit den verschiedenen ANTs wurde das gesamte Volumen der H_2O_2 -Lösung sofort am Anfang der Reaktion zugegeben, um vergleichbare Bedingungen zu haben. Eine kontinuierliche Zugabe des kleinen Volumens (1,75 mL) über 24 h war technisch nicht möglich. Es liegt aber nahe, dass eine sofortige Zugabe der ganzen H_2O_2 -Menge für den Abbauverlauf ungünstiger ist, da das H_2O_2 bei der hohen Anfangskonzentration nach Gl. 5.1 und Gl. 5.2 mit sich selbst abreagiert und am Ende des Abbaus verhältnismäßig dann zu wenig H_2O_2 für einen effektiven Abbau vorliegt. Da eine kontinuierliche Zugabe nicht möglich war, wurden in einem Photo-Fenton Abbau von 4-ADNT stundenweise 0,2 mL H_2O_2 zugegeben, um den Einfluss des Zugabemodus zu untersuchen.

Das Ergebnis des Abbaus bestätigt die theoretischen Überlegungen (Abbildung 5.7). Bei portionsweiser Zugabe von H_2O_2 kommt es zu einer schnelleren Mineralisierung. In einem technischen Verfahren sollte H_2O_2 also möglichst kontinuierlich zugegeben werden, um Energie- und Chemikalienaufwand zu minimieren.

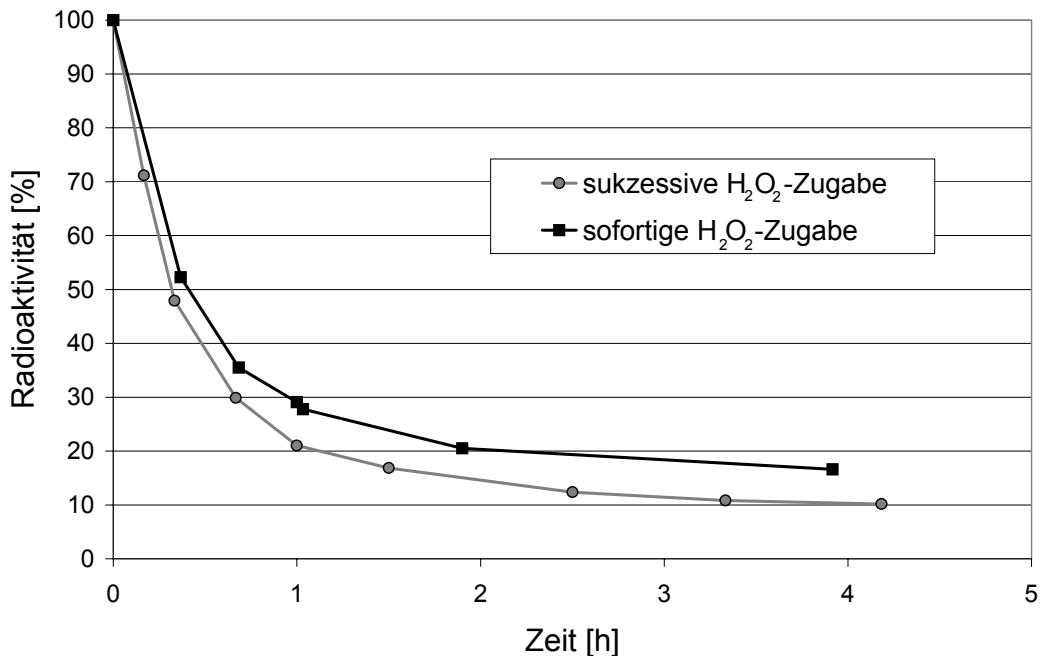


Abbildung 5.7: Photo-Fenton Abbau von 4-ADNT bei unterschiedlicher H₂O₂-Zugabe (0,22 mmol/L [U-ring-¹⁴C]-4-ADNT, 1% H₂O₂, 15 mg/L Fe²⁺, pH 3)

5.5 Vergleich der Abbauversuche

In allen vergleichbaren Versuchen war der Abbau mit dem Photo-Fenton System schneller als derjenige mit UV und Wasserstoffperoxid und zwar sowohl beim Abbau der Ausgangsverbindungen als auch bei der vollständigen Mineralisierung zu CO₂. Bei einem Fenton-Abbau ohne Lichteinwirkung fand hingegen unter den selben Bedingungen überhaupt keine Mineralisierung von TNT statt. Die in diesem Abschnitt ermittelte Reihenfolge in der Abbau- und Mineralisierungsgeschwindigkeit ist also folgende: UV-H₂O₂-Fe²⁺ (Photo-Fenton) > UV-H₂O₂ > H₂O₂-Fe²⁺ (Fenton). Auch andere Autoren [37,98,36] haben diese Reihenfolge für den Abbau von TNT und anderen Aromaten ermittelt, in dieser Arbeit wurde aber zum ersten Mal auch die Mineralisierungsgeschwindigkeit untersucht und eine vollständige Bilanz der Abbauten durch den Nachweis des entstandenen CO₂ vorgelegt.

Das Hydroxylradikal greift den aromatischen Ring hauptsächlich durch elektrophile Addition (Gl. 1.7) an. Mit steigender Zahl der Nitrogruppen wird dieser Angriff erschwert, da diese dem Ringsystem Elektronendichte entziehen. Demzufolge sollte die Reihenfolge der Abbaugeschwindigkeit der Substrate beim Abbau durch Hydroxylradikale DANT > ADNT >> TNT sein. Die Mineralisierungsgeschwindigkeit der DANTS war allerdings nicht so hoch wie erwartet, da bei dem vorliegenden pH Wert von 3 die Protonierung einer Aminogruppe

erfolgt (Schema 5.1) und das Ringsystem so wieder elektronenärmer und für eine elektrophile Addition weniger empfänglich wird. Auch Schmidt und Butte fanden in kinetischen Untersuchungen des Fenton Abbaus der vier ANTs, dass sich am Anfang die ADNTs schneller abbauten, am Ende aber die DANTs schneller abgebaut waren, ohne dies allerdings begründen zu können [101]. Eindeutiger war die Regioselektivität des Abbaus. Die jeweiligen Regioisomere mit einer *para*-Aminogruppe wurden schneller mineralisiert, d. h. die Mineralisierung von 4-ADNT war schneller als die von 2-ADNT und die Mineralisierung von 2,4-DANT war schneller 2,6-DANT. Die Begründung hierfür ist, dass die elektrophile Addition bevorzugt an der elektronenreichsten Stelle des Ringsystems, also der Aminogruppe, erfolgt. Befindet sich diese Aminogruppe in *para*-Stellung, ist sie sterisch weniger gehindert und kann besser vom Hydroxylradikal attackiert werden. Wiederum konnten andere Autoren diesen Effekt zwar für den Abbau der Ausgangssubstanzen, den ANTs, zeigen [101], in dieser Arbeit wurde aber zum ersten Mal die Mineralisierungsgeschwindigkeit der vier ADNTs und DANTs verglichen und der Abbau vollständig bilanziert. Im UV-H₂O₂ Abbau stieg die Mineralisierungsgeschwindigkeit in der Reihenfolge:

TNT << 2,6-DANT < 2-ADNT < 4-ADNT = 2,4-DANT

Beim Photo-Fenton Abbau stieg die Mineralisierungsgeschwindigkeit in der Reihenfolge:

TNT << 2,6-DANT < 2-ADNT = 2,4-DANT < 4-ADNT

Für das angestrebte kombinierte Abbauverfahren ist der entscheidene Gesichtspunkt, dass alle vier ANTs sehr viel schneller mineralisiert werden als das TNT. Eine vorherige Reduktion des TNT zu den ANTs sollte die Effektivität einer photochemischen Mineralisierung von TNT-Abwässern also deutlich verbessern.

6 Ergebnisse der kombinierten Abbauten

In den kombinierten Abbauexperimenten wurden nun unter Zuhilfenahme der Ergebnisse aus den biologischen und chemischen Abbauten verschiedene Verfahrenskombinationen getestet.

6.1 Ergebnisse verschiedener Verfahrenskombinationen

6.1.1 Variation der biologischen Stufe

Zuerst erfolgten zwei kombinierte Abbauten mit einer gleichbleibenden photochemischen Behandlung durch UV- H_2O_2 als zweiter Verfahrensstufe, in denen einmal eine aerobe (K1) und einmal eine anaerobe (K2) biologische Behandlung vorgeschaltet war. Die biologische Behandlung erfolgte jeweils im 1 L Maßstab mit den optimierten Rezepturen (Kap. 4). Nachdem sich nach der 24stündigen biologischen Abbaustufe der Belebtschlamm abgesetzt hatte, wurden dem Überstand 50 mL entnommen und in die Photoapparatur überführt. Trotz des Absetzens zeigte die Lösung eine leichte Trübung, die von suspendiertem organischen Material herrührte. Die Abbaulösung wurde dann auf pH 3 eingestellt und nach dem Start der Xenonlampe mit H_2O_2 versetzt.

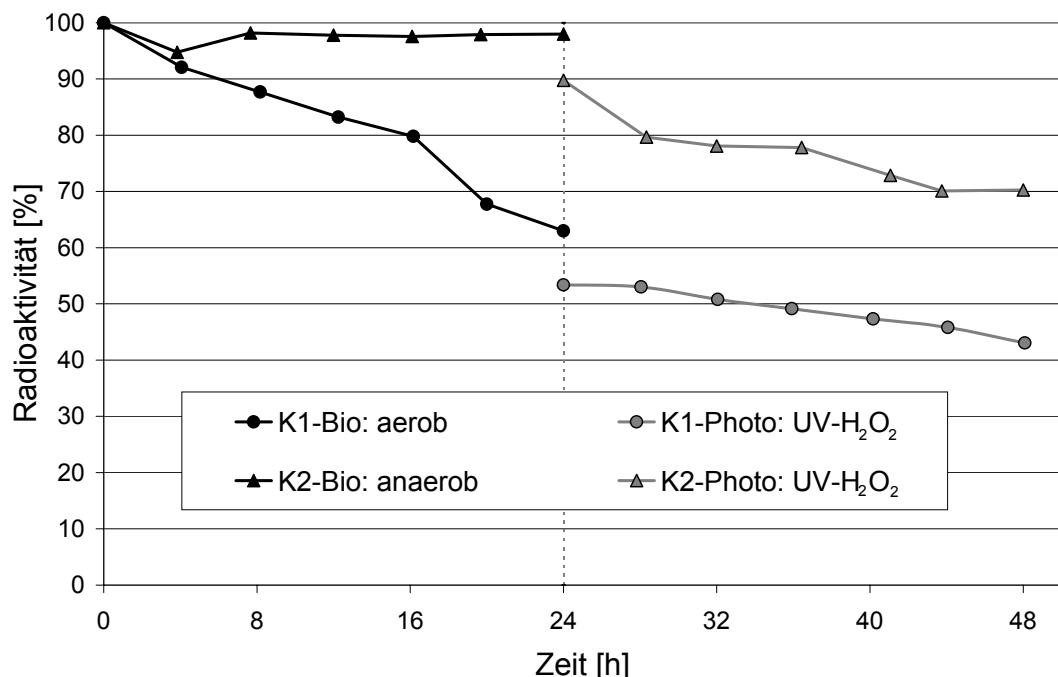


Abbildung 6.1: Radioaktivitätsverlauf der kombinierten Abbauten K1 und K2 (Bio: 20 mg/L [U-ring-

^{14}C]-TNT, 1,88 g/L Schlamm, 200 mg Saccharose, Nährstofflösung, pH 7; K1: 5 L Luft/h,

K2: 5 L N_2 /h; Photo: 1% H_2O_2 , pH 3, 150 W Xenonlampe)

Abbildung 6.1 zeigt den Verlauf der beiden kombinierten Abbauten. Die biologischen Stufen (schwarze Linien) zeigten den erwarteten Verlauf, bei aerober Behandlung ging etwa ein Drittel der Radioaktivität durch Adsorption am Schlamm verloren. Davon ist nach den Ergebnissen der Extraktionen (Kap. 4.2.4) ein guter Teil (ca. 40%) bereits fest an den Schlamm gebunden, weil der Sauerstoff die reaktiven OH-ADNTs für Reaktionen mit nukleophilen Bestandteilen der Belebtschlammatrix aktiviert. Im Gegensatz dazu fand beim anaeroben Abbau keine nennenswerte Adsorption (2%) statt, was wiederum die Resultate der biologischen Abbauten bestätigt (Kap. 4.3.2). Nach beiden biologischen Stufen gingen beim Transfer zur Photoapparatur ca. 9% der Radioaktivität verloren. Die Mineralisierung lief in beiden Photoabbauten (Abbildung 6.1, graue Linien) deutlich langsamer als mit den Reinsubstanzen (Kap. 5.1.2), was vermutlich auf die Trübung der Abbaulösung zurückgeführt werden kann. Durch die gelösten Schlammteilchen wurde ein Teil des Photonenflusses der Lampe absorbiert. Tabelle 6.1 und Abbildung 6.2 fassen noch einmal die Bilanzen der beiden kombinierten Abbauten zusammen.

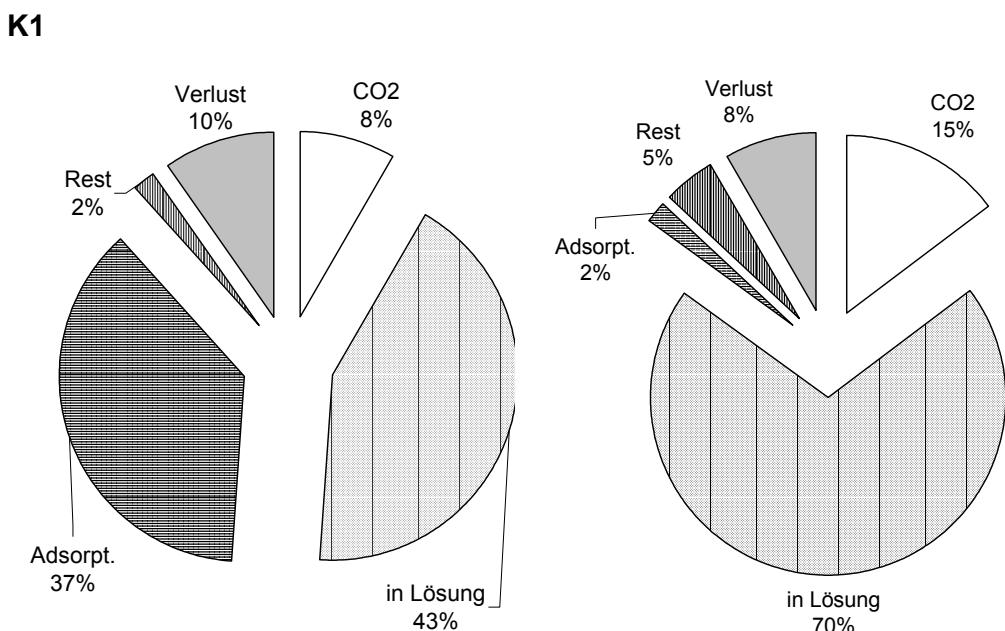


Abbildung 6.2: Bilanzen der kombinierten Abbauten K1 und K2

Im Vergleich der beiden Photoabbauten schaffte der Abbau nach anaeroben Vorbehandlung zwar in summa eine fast doppelt so hohe Mineralisierung (14,6% bei K2 gegenüber 8,2% bei K1), vergleicht man aber die Bilanzen der Photoabbauten allein, zeigt sich, dass der Unterschied in der Mineralisierung nur geringfügig war (16,2% gegenüber 15,4%). Die

höhere Gesamtmineralisierung entstand also fast ausschließlich durch die größere in den Photoabbau transferierte Radioaktivitätsmenge, umgekehrt verhinderte die Adsorption im aeroben Abbau also eine höhere Gesamtmineralisierung.

Tabelle 6.1: Radioaktive Bilanz der kombinierten Abbauten K1 und K2

| | Bio t = 0 h [%] | Bio t = 24 h [%] | Photo t = 24 h [%] | Photo t = 48 h [%] | CO ₂ t = 48 h [%] | Gesamt- bilanz [%] |
|------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---|--------------------------|
| K1 gesamt | 100 | 63,0 | 53,4 | 43,0 | 8,2 | 88,2 |
| K1-Photo | --- | --- | 100 | 80,5 | 15,4 | 95,9 |
| K2 gesamt | 100 | 98,0 | 89,8 | 70,3 | 14,6 | 86,9 |
| K2-Photo | --- | --- | 100 | 78,3 | 16,2 | 94,5 |

Auch die Ergebnisse der HPLC-Messungen bestätigten dies (Abbildung 6.3). Bei K2 mit anaerober Vorstufe war die Beladung der Photoabbaulösung mit Nitroaromaten wesentlich höher (ca. 18 mg/L), weil in der biologischen Vorbehandlung keine Verluste durch Adsorption aufgetreten waren. Durch die aerobe Vorstufe von K1 wird ein großer Teil der ANTs durch Adsorption in der biologischen Stufe zurückgehalten, sodass die ANT-Konzentration im Photoabbau wesentlich geringer ist (ca. 6 mg/L). Der Abbau der Nitroaromaten verlief bei K2 schneller, sodass bei beiden Varianten nach 16 h die ADNTs fast vollständig abgebaut waren. Auffällig war, dass der Abbau von 2,4-DANT in K2 deutlich schneller verlief und trotz höherer Ausgangskonzentration schon nach 12 h unterhalb der Nachweisgrenze lag. Wie schon im Photoabbau stieg die Konzentration von 2,4-DANT zwischenzeitlich wieder an, was an der bereits beschriebenen Protonierung liegen könnte.

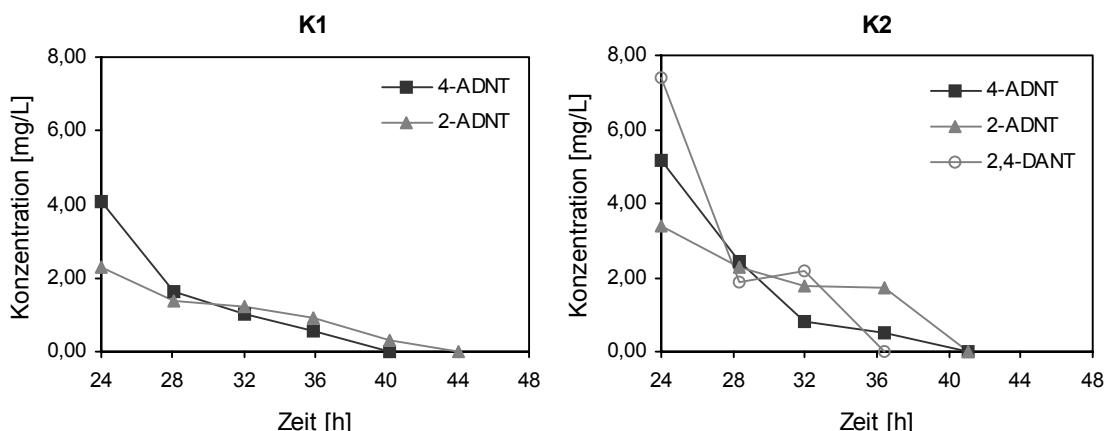


Abbildung 6.3: Konzentrationsverlauf während der Photoabbauten K1 und K2 (HPLC)

6.1.2 Variation der photochemischen Stufe - Filtration

In den nächsten beiden kombinierten Abbauprozessen wurde eine anaerobe biologische Stufe einmal mit UV- H_2O_2 und einmal mit Photo-Fenton chemisch nachbehandelt. Um die Trübung der Lösung in der Photoabbaustufe zu vermindern, wurden die Überstände aus der biologischen Stufe bei der Überführung in den Photoreaktor über einen Spritzenfilter filtriert.

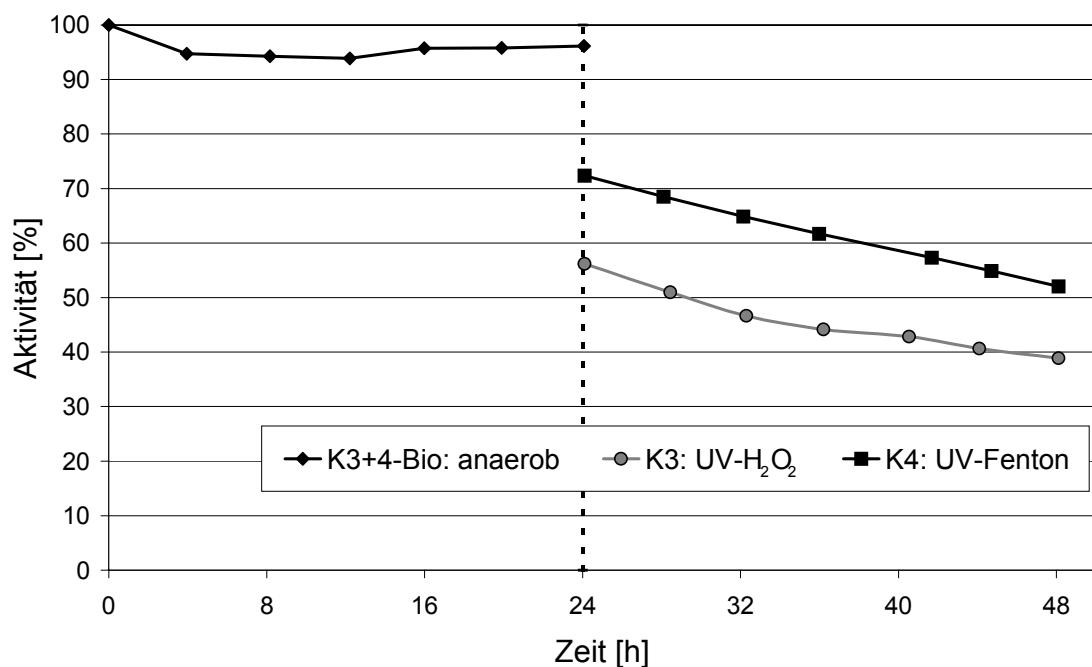


Abbildung 6.4: Radioaktivitätsverlauf der kombinierten Abbauten K3 und K4 (Bio: 20 mg/L [U-ring- ^{14}C]-TNT, 1,88 g/L Schlamm, 200 mg Saccharose, Nährstofflösung, pH 7; 0,2 L Luft/h, Photo: 1% H_2O_2 , pH 3, 150 W Xenonlampe, K4: zusätzlich 15 mg/L Fe^{2+})

Der anaerobe biologische Abbau (Abbildung 6.4, linker Teil) verlief wie erwartet, es wurde nur ein geringer Prozentsatz (4%) der Radioaktivität am Schlamm adsorbiert. Allerdings ging bei der anschließenden Filtration ein großer Teil der Radioaktivität verloren, wobei die Menge des Verlustes auch noch stark schwankte. Beim Transfer zum UV- H_2O_2 Abbau gingen 40% der eingesetzten Radioaktivität verloren, während beim Transfer zum UV-Fenton Abbau nur 24% im Spritzenfilter zurückgehalten wurden. Die Mineralisierung der verbliebenen radioaktiven Aromaten war dafür höher als in den vorherigen Versuchen. Im Abbau mit UV- H_2O_2 entstanden zwar bezogen auf den Gesamtabbau nur 17% CO_2 , alleine über den Photoabbau bilanziert machte dies aber 30% der Gesamtaktivität aus (Tabelle 6.2). Das war fast doppelt so viel wie in den vorigen Abbauprozessen ohne Filtration (16%). Der UV-Fenton

Abbau verlief hingegen weniger erfolgreich. Bei Zugabe des Eisens zur Abbaulösung bildete sich ein dunkler Niederschlag der die gesamte Lösung schwarz färbte. Dementsprechend verlief auch der Abbau schlechter, es wurden nur 22% der Radioaktivität durch die Photobehandlung mineralisiert. Der Niederschlag erwies sich als FePO₄, das sich aus dem Phosphatpuffer des biologischen Abbaus (ca. 10 g/L Na₂HPO₄ und ca. 7 g/L NaH₂PO₄) und dem Fenton-Reagenz gebildet hatte. Der Niederschlag absorbierte einen großen Teil des Photonenflusses der Lampe und verhinderte so einen effektiveren Abbau, der nach den Ergebnissen aus den Photo-Fenton Versuchen (Kap. 5.2.2) zu erwarten gewesen wäre.

Tabelle 6.2: Radioaktive Bilanz der kombinierten Abbauten K3 und K4

| | Bio t = 0 h [%] | Bio t = 24 h [%] | Photo t = 24 h [%] | Photo t = 48 h [%] | CO₂ t = 48 h [%] | Gesamt- bilanz [%] |
|------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--|--|---|----------------------------------|
| K3 gesamt | 100 | 96,1 | 56,2 | 38,9 | 17,2 | 60,0 |
| K3-Photo | --- | --- | 100 | 69,2 | 30,6 | 99,8 |
| K4 gesamt | 100 | 96,1 | 72,4 | 52,0 | 16,2 | 72,1 |
| K4-Photo | --- | --- | 100 | 71,8 | 22,4 | 94,2 |

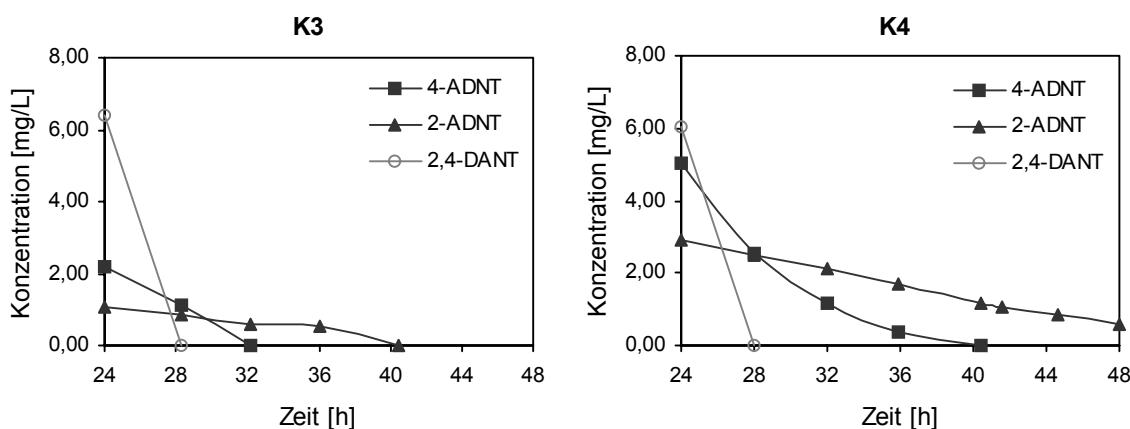


Abbildung 6.5: Konzentrationsverlauf während der Photoabbauten K3 und K4 (HPLC)

Auch die Ergebnisse der HPLC zeigen, dass unter diesen UV-Fenton Bedingungen (K4) die ANTs wesentlich schlechter abgebaut wurden als mit UV-H₂O₂ (K3). Die Abbaugeschwindigkeit der ANTs untereinander nahm in der Reihenfolge 2,4-DANT > 4-ADNT > 2-ADNT ab. Zwar hatte durch den Einsatz des Spritzenfilters die Photoabbauleistung zugenommen, die Adsorptionsverluste am Filter beim Transfer in den Bioabbau waren aber sehr hoch, sodass diese Filtrationstechnik nicht weiter eingesetzt wurde.

6.1.3 Weitere Optimierung der kombinierten Abbauten

Zur weiteren Optimierung wurden für die nächsten kombinierten Abbau mehrere Veränderungen vorgenommen. Um eine Trübung der Lösung durch ausfallendes Eisenphosphat zu verhindern, wurde in der biologischen Abbaustufe auf den Puffer verzichtet und die eigene Pufferwirkung des biologischen Systems genutzt. Zugleich wurde die Abbaulösung zu Beginn des Photoabbaus nicht auf pH 3 sauergestellt. Zur Verbesserung der Effektivität des H_2O_2 -Verbrauchs erfolgte die Zugabe nicht vollständig zum Start der Reaktion sondern portionsweise mit etwa 0,2 mL/h. Auf ein Filtrieren der Lösung beim Transfer wurde wieder verzichtet, um nicht zuviel abzubauendes Material zu verlieren.

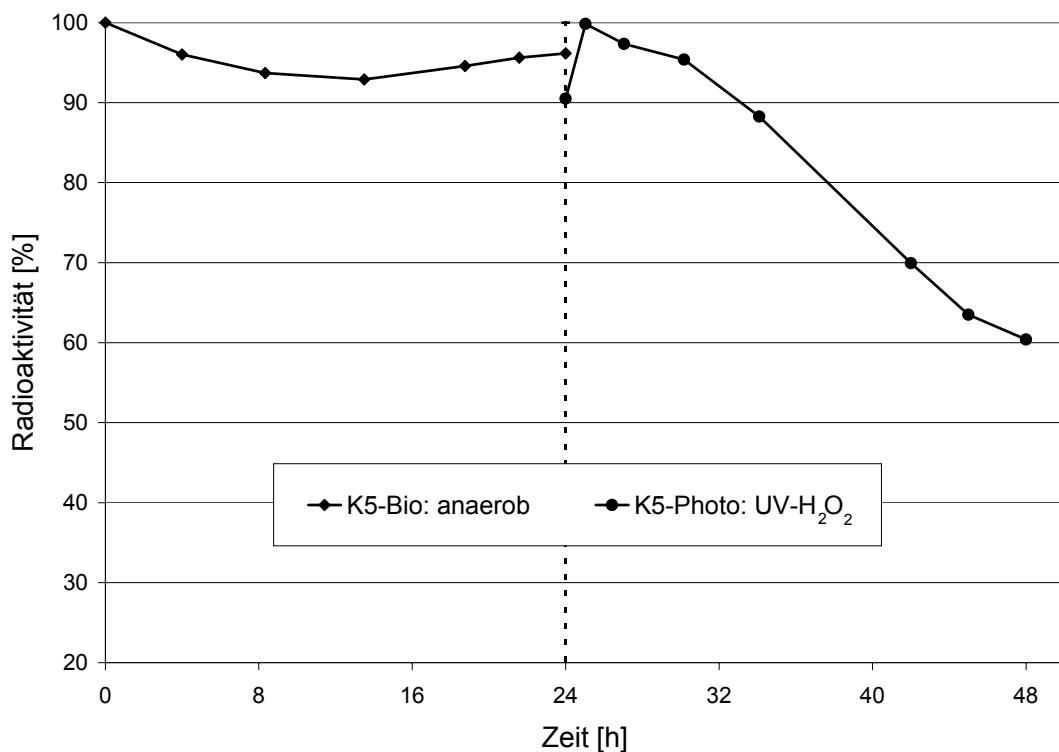


Abbildung 6.6: Radioaktivitätsverlauf des kombinierten Abbaus K5 (Bio: 25 mg/L [U-ring- ^{14}C]-TNT, 1,88 g/L Schlamm, 200 mg Saccharose, Nährstofflösung, kein Puffer; 0,2 L Luft/h, Photo: 1% H_2O_2 , 150 W Xenonlampe)

Auch ohne Puffer blieb der pH-Wert von 7,1 während des Bioabbaus stabil. Während der Behandlung mit UV- H_2O_2 sank der pH-Wert von 7,1 auf einen Endwert von 2,6. Der anaerobe biologische Abbau (Abbildung 6.6, linke Kurve) verlief wie erwartet, es fand kaum eine Adsorption statt (4%) und das TNT wurde zu 2,4-DANT, 4-ADNT und 2-ADNT umgesetzt (Abbildung 6.8, K5). Obwohl die Lösung im Photoabbau wieder eine leicht grünliche Trübung besaß, weil auf die Filtration verzichtet wurde, wurde mit den neuen

Abbaubedingungen ein deutlich besseres Mineralisierungsergebnis von 34% erzielt (siehe auch Tabelle 6.3). Auch der höhere Anfangs-pH-Wert sollte eher einen bremsenden Einfluss auf die Abbaugeschwindigkeit gehabt haben [37]. Die höhere Mineralisierung ist also der portionsweisen Zugabe des H₂O₂ (siehe Kap. 5.4) und vor allem der nicht mehr vorhandenen Phosphatbelastung in der Abbaulösung zu verdanken. Ob die Phosphationen durch Konkurrenzreaktionen mit dem Hydroxylradikal oder durch Erhöhung der optischen Dichte im UV-Bereich die Mineralisierungsreaktionen gebremst haben, wurde im nachhinein nicht mehr untersucht. Ungewöhnlich am Verlauf des Photoabbaus (Abbildung 6.6, rechte Kurve) war, dass am Anfang ein Anstieg der Radioaktivität zu beobachten war. Dieser Anstieg war diesmal nicht mit einer Protonierung der DANTs zu erklären, weil beim hier vorliegenden pH 7 das Gleichgewicht völlig auf der Seite des freien Amins liegt. Vermutlich wurde ein Teil der ANTs unter den sauerstoffreichen Abbaubedingungen (der Photoabbau wurde mit 5 L Luft/h begast) zunächst an mitgeschlepptem Biomaterial adsorbiert und dann unter den Abbaubedingungen wieder freigesetzt.

Im kombinierten Abbau K6 wurde der selben anaeroben biologischen Behandlung ein UV-Fenton Abbau nachgeschaltet. Hierbei fand aber überhaupt keine Mineralisierung statt, weil die Reaktionsgeschwindigkeit des Fenton Abbaus wesentlich stärker vom pH-Wert abhängig ist und nur im Sauren abläuft [36]. Während der Reaktionszeit war weder ein Sinken des pH-Wertes von 7 noch eine Abbaureaktion zu beobachten, weshalb auch die Ergebnisse dieses Abbaus nicht im einzelnen aufgeführt sind. Immerhin waren wie erwartet diesmal bei Zugabe des Eisens keine zusätzlichen Trübungen oder Niederschläge in der Lösung zu beobachten. Für die Trübung der Abbaulösungen hatten sehr leichte kleine Teile des Belebtschlammes gesorgt, die sich nach der biologischen Behandlung nicht am Boden absetzten. Da anzunehmen ist, dass diese erst während des Abbaus durch Zerkleinerung von Belebtschlammflocken mit dem Magnetrührer entstanden waren, wurde der Kolben beim nächsten kombinierten Abbau geschüttelt und nicht gerührt. Tatsächlich hatte nach dieser Art des Mischens der Überstand nach dem Absetzen eine gelbliche Farbe, die auf die entstandenen ANTs zurückzuführen war. Das Ergebnis des biologischen Abbaus (Abbildung 6.7, K7+8 Bio) war jedoch überraschend.

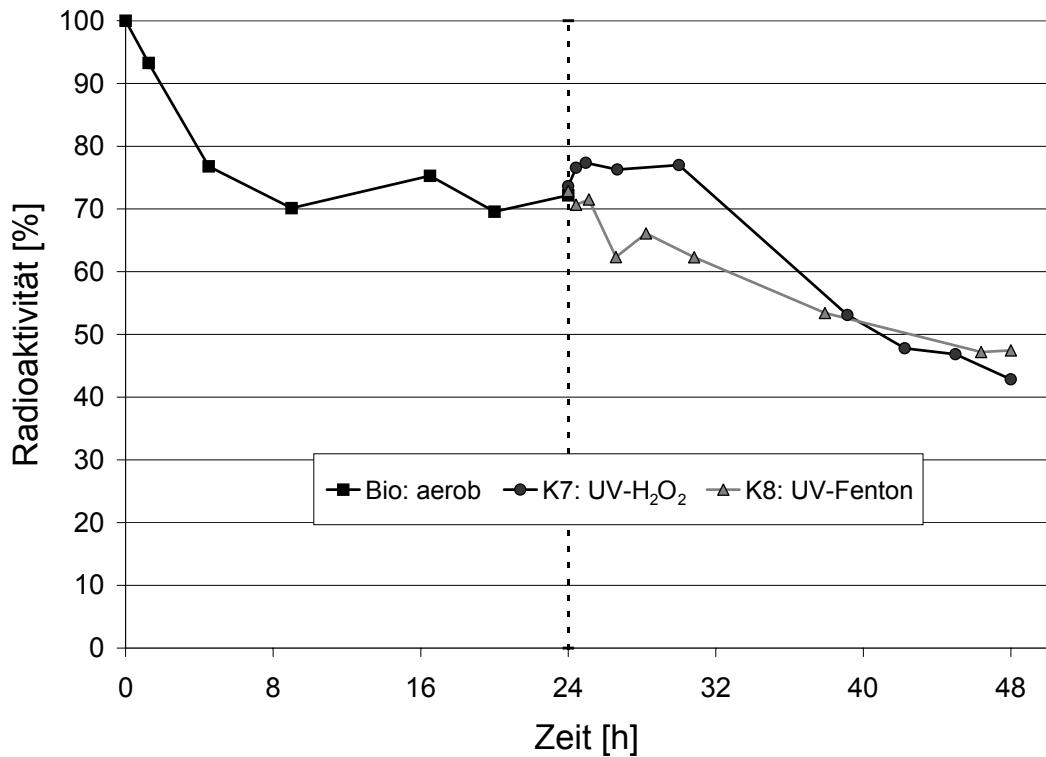


Abbildung 6.7: Radioaktivitätsverlauf der kombinierten Abbauten K7 und K8 (Bio: 25 mg/L [U-ring-¹⁴C]-TNT, 1,88 g/L Schlamm, 200 mg Saccharose, Nährstofflösung, kein Puffer; 0,2 L Luft/h, geschüttelt; Photo: 1% H₂O₂, 150 W Xenonlampe, K8: zusätzlich pH 3, 15 mg/L Fe²⁺)

Obwohl, wie bei den anaeroben Abbauten üblich, nur mit einem Volumenstrom von 0,2 L Luft/h belüftet worden war, zeigte der Abbau die charakteristischen Resultate eines Abbaus unter aeroben Bedingungen. Das Redoxpotential stellte sich auf einen aeroben Wert von 260 mV ein (der Gesamtverlauf ist in Abbildung 4.3, S. 40, gezeigt), der Verlauf der Radioaktivität zeigt eine signifikante Adsorption am Schlamm von ca. 30%. Das Abbaurergebnis in der HPLC ist dem anaeroben biologischen Abbau aus K5 gegenübergestellt (Abbildung 6.8). Der Verlauf der Radioaktivitätskurve wird hier bestätigt, ein Teil der ANTs wird beim aeroben Abbau am Schlamm adsorbiert, wie schon ausführlich in Kap. 4.2 beschrieben wurde. Außerdem verläuft die Reduktion nicht so weit und es entsteht weniger 2,4-DANT. Beim Vorgang des Schüttelns sind die aeroben Bedingungen vermutlich deswegen entstanden, weil durch das Schütteln eine große, ständig wechselnde Oberfläche mit der Umgebungsluft in Kontakt kommt und so deutlich mehr Sauerstoff aufgenommen werden kann, als beim langsamen Rühren und einer fast unbeweglichen Oberfläche der Lösung.

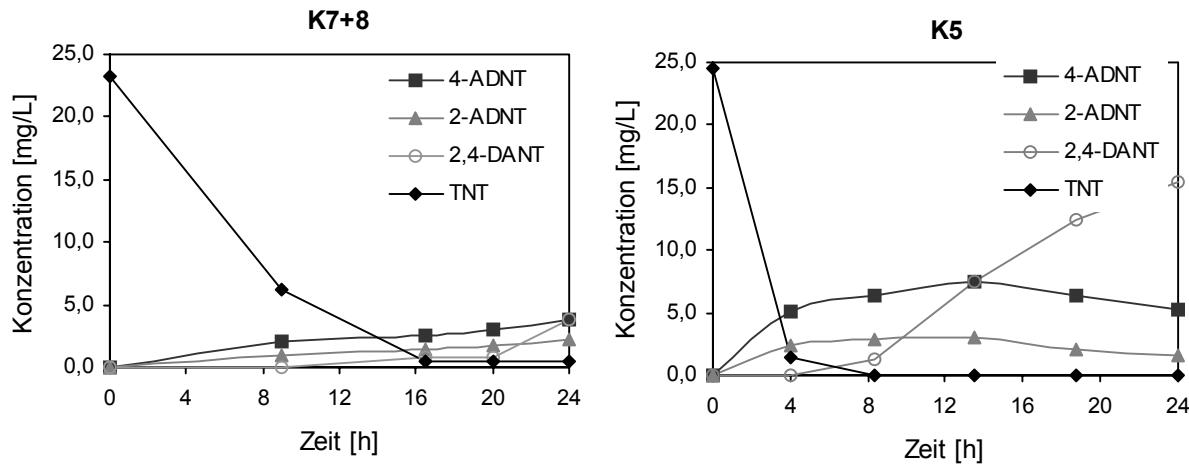


Abbildung 6.8: Konzentrationsverlauf während der Bioabbauten K5 und K7+8 (HPLC)

Trotz des aeroben Verlaufs in der biologischen Stufe wurden mit den kombinierten Abbauten K7 und K8 die besten Mineralisierungsergebnisse erzielt (Tabelle 6.3). Dabei war der UV- H_2O_2 Abbau noch wirkungsvoller als der UV-Fenton Abbau, obwohl für den Fenton Abbau die Abbaulösung vorher auf einen pH-Wert von 3 gebracht wurde. Der höhere pH-Wert von 7,4 am Anfang des UV- H_2O_2 Abbaus schien die Mineralisierung zuerst zu hemmen, in den ersten 6 h fand keine Abnahme der Radioaktivität statt (siehe Abbildung 6.7). Nach dieser Lag-Phase setzte dann aber ein sehr schneller Abbau ein. Parallel dazu wurde in den ersten 6 h des Abbaus ein Redoxpotential von 300 mV gemessen, am nächsten Messpunkt nach 15 h lag es dann bei 480 mV und am Ende der Reaktion bei 500 mV. Der pH-Wert lag am Ende bei 2,4. Da pH-Wert und Redoxpotential miteinander verknüpft sind und bei sinkendem pH-Wert das Redoxpotential steigt, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden ob die einsetzende Mineralisierung mehr von der höheren H^+ -Ionenkonzentration oder vom höheren Oxidationspotential verursacht wurde oder ob umgekehrt beide Größen vom Abbauverlauf abhängen. Beim UV-Fenton Abbau setzte der Abbau sofort ein, der pH-Wert sank von 3 auf 2,4 und das Redoxpotential stieg von 400 mV auf 490 mV. Im UV-Fenton Abbau kam es trotzdem nur zu einer Mineralisierung von 31%, während im UV- H_2O_2 Abbau 33% CO_2 gefunden wurden, obwohl aufgrund der Ergebnisse der Photoabbauten (Kap. 5.5) der Photo-Fenton Abbau deutlich schneller sein müsste.

Unter den Bedingungen von K7 kam es am Anfang des Photoabbaus (Abbildung 6.7) wieder zu dem oben für K5 beschriebenen Anstieg der gemessenen Radioaktivität, es scheinen also wieder an biologischem Material adsorbierte ANTs durch die Abbaubedingungen freigesetzt worden zu sein. Das dies bei K8 nicht der Fall ist kann eventuell darauf zurückgeführt

werden, dass diese Lösung vor dem Photoabbau eine Standzeit von zwei Tagen hatte, in der sich das biologische Material absetzen konnte.

Tabelle 6.3: Radioaktive Bilanz der kombinierten Abbauten K5, K7 und K8

| | Bio t = 0 h [%] | Bio t = 24 h [%] | Photo t = 24 h [%] | Photo t = 48 h [%] | CO₂ t = 48 h [%] | Gesamt- bilanz [%] |
|------------------|-------------------------------------|--------------------------------------|--|--|---|----------------------------------|
| K5 gesamt | 100 | 96,2 | 90,5 | 60,4 | 30,0 | 94,2 |
| K5-Photo | --- | --- | 100 | 66,7 | 33,0 | 99,7 |
| K7 gesamt | 100 | 72,2 | 73,6 | 42,8 | 25,4 | 94,6 |
| K7-Photo | --- | --- | 100 | 58,3 | 34,6 | 92,9 |
| K8 gesamt | 100 | 72,2 | 72,8 | 47,4 | 23,0 | 97,6 |
| K8-Photo | --- | --- | 100 | 65,1 | 31,6 | 97,6 |

6.2 Vergleich und Diskussion der kombinierten Abbauergebnisse

Die reinen biologischen Abbauten mit Belebtschlamm sind bereits in Kap. 4.4 ausführlich verglichen und diskutiert worden. Während die aeroben Abbauten als Hauptprodukt die ADNTs liefern, reduzieren die anaeroben Abbauten das TNT weiter bis zum Hauptprodukt 2,4-DANT. Daher war im direkten Vergleich die Mineralisierung nach anaeroben Vorbehandlung etwas höher. Tabelle 6.4 fasst die Ergebnisse der kombinierten Abbauten noch einmal mit allen Bedingungen zusammen.

Tabelle 6.4: Zusammenfassung der Abbaubedingungen und Ergebnisse

| | Bio | Photo | Puffer | Filter | nicht mehr im Reaktor [% Photoabbau] | ¹⁴ CO₂ [% Photo] |
|-----------|------------|--------------------------------------|---------------|----------------|--|--|
| K1 | aerob | H ₂ O ₂ , pH 3 | + | - | 19,5 | 15,4 |
| K2 | anaerob | H ₂ O ₂ , pH 3 | + | - | 21,7 | 16,2 |
| K3 | anaerob | H ₂ O ₂ , pH 3 | + | + | 30,8 | 30,6 |
| K4 | anaerob | Fenton, pH 3 | + | + | 28,2 | 22,4 |
| K5 | anaerob | H ₂ O ₂ , pH 7 | + | - | 39,6 | 33,0 |
| K6 | anaerob | Fenton, pH 7 | - | - | 0 | 0 |
| K7 | aerob | H ₂ O ₂ , pH 7 | - | - ^a | 41,7 | 34,6 |
| K8 | aerob | Fenton, pH 3 | - | - ^a | 34,9 | 31,5 |

a) schütteln

Der tatsächlich durch $^{14}CO_2$ -Bildung nachgewiesenen Mineralisierung wird in Tabelle 6.4 der nach dem Photoabbau nicht mehr im Reaktor befindliche Anteil der Radioaktivität gegenübergestellt, der in der Literatur oft fälschlicherweise als Mineralisierung bezeichnet wird. In der folgenden Abbildung 6.9 werden die Gesamtbilanzen der kombinierten Abbauten noch einmal zusammengefasst, die Bedingungen kann man Tabelle 6.4 entnehmen.

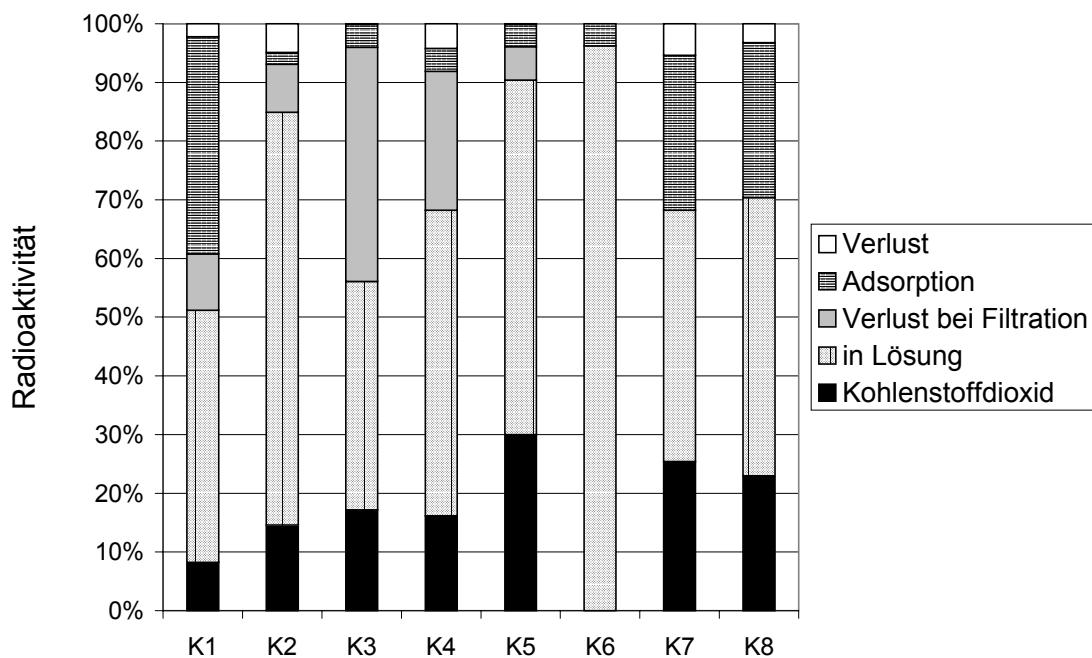


Abbildung 6.9: Zusammenfassung der Ergebnisse in den kombinierten Abbauten

Im photochemischen Teil erreichte der UV- H_2O_2 Abbau eine größere Mineralisierung als der UV-Fenton Abbau, obwohl das Photo-Fenton Verfahren in den reinen Photoexperimenten ohne biologische Vorbehandlung deutlich schneller war. Allerdings scheiterte ein effektiverer Photo-Fenton Abbau in den ersten Experimenten an den Randbedingungen. Im ersten Versuch behinderte der Phosphatpuffer den Abbau (K4), im zweiten verhinderte der pH-Wert von 7 eine Mineralisierung (K6). Die starke Abhängigkeit vom pH-Wert ist für die praktische Anwendung des Photo-Fenton Abbaus ein Nachteil gegenüber dem photolytischen Abbau mit H_2O_2 . Beim letzten Fenton Abbau (K8) muss man berücksichtigen, dass die Abbaulösung zwischen biologischer und chemischer Stufe eine Standzeit von zwei Tagen hatte. In diesem Abbau war die Mineralisierung aber schon ähnlich gut wie beim parallel durchgeführten UV- H_2O_2 Abbau. Trotzdem hat der kombinierte Photo-Fenton Abbau noch ein großes Optimierungspotential.

Die Mineralisierung im UV-H₂O₂ Abbau konnte im Laufe der kombinierten Versuche verdoppelt werden (K1: 15%, K7: 35%), obwohl die letzten Versuche bei pH 7 gestartet wurden. Abbildung 6.10 zeigt den Vergleich der UV-H₂O₂ Photoabbaustufe aus K7 mit den Photoabbauten der Reinsubstanzen TNT und 4-ADNT. Mit dem kombinierten Abbau konnte eine größere Mineralisierung erzielt werden als im reinen Photoabbau von TNT, was die Vorteile des kombinierten Abbaus unterstreicht. Obwohl der Hauptbestandteil der Abbaulösung in K7 nach der aeroben biologischen Behandlung das 4-ADNT war, konnte im anschließenden Photoabbau allerdings nicht das Mineralisierungsergebnis des Photoabbaus mit reinem 4-ADNT erzielt werden.

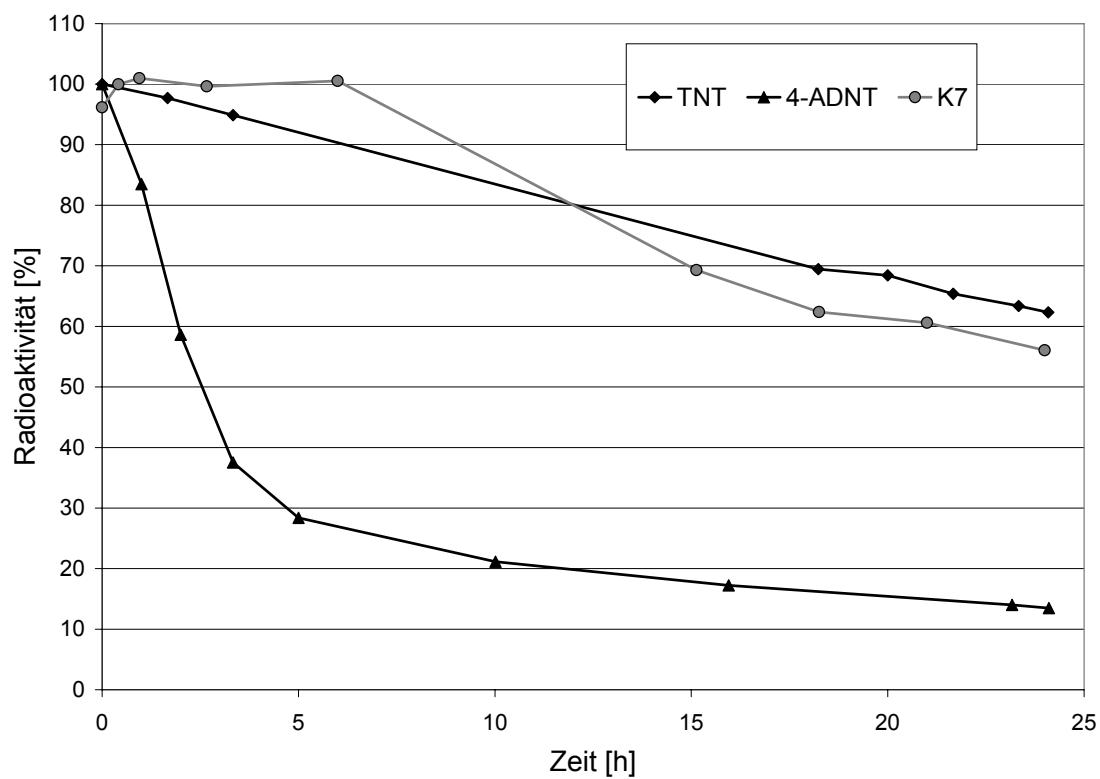


Abbildung 6.10: Vergleich der UV-H₂O₂ Abbauten von TNT, 4-ADNT und des Photoabbaus aus dem kombinierten Abbau K7

Grund hierfür waren vermutlich Fremdstoffe aus dem biologischen Abbau, die den Photoabbau behindern. Bei diesen Fremdstoffen handelte es sich um Zellmaterial, das durch den Magnetrührer zerkleinert wurde, um unverbrauchtes Cosubstrat und um organische Substanzen aus dem Metabolismus des Belebtschlamm. Die organischen Fremdstoffe lagen gelöst vor, die Zellbestandteile waren suspendiert und verursachten eine sichtbare Trübung der Lösung. Eine Beeinträchtigung des Abbaus der ANTs ist so auf mehreren Wegen möglich:

- Durch Absorption des UV-Lichts sowohl durch die gelösten als auch durch die suspendierten Fremdstoffe.
- Durch Konkurrenzreaktionen in denen die gelösten organischen Substanzen ebenfalls durch die erzeugten Hydroxylradikale oxidiert und mineralisiert werden. So war in den kombinierten Photoabbauten schon am Anfang eine heftige Bildung von Luftbläschen zu beobachten, die auf eine Mineralisierung hindeuteten, obwohl keine Mineralisierung von radioaktiv markiertem Substanzen gemessen werden konnte.
- Durch Adsorption an gelöste oder suspendierte Schlammbestandteile können die ANTs dem weiteren Abbau entzogen werden.
- Durch Komplexierung des Eisens im Fenton Abbau mit einigen organischen Substanzen wie z. B. Säuren. Allerdings kann die Komplexbildung die Lichtabsorption des Eisens auch erhöhen und somit den Abbau verbessern [37].

In den kombinierten Abbauten wurde im Laufe der Optimierung versucht den Fremdstoffeintrag durch Weglassen des Phosphatpuffers und Filtration zu vermindern. Diese Maßnahmen wirkten sich positiv auf das Abbauergebnis aus.

Bei der Bewertung der Praxistauglichkeit des gesamten Abbauverfahrens muss aber auch bedacht werden, dass die Photoabbauten mit den Reinsubstanzen unter idealen Bedingungen durchgeführt wurden. In den real vorkommenden TNT-belasteten Abwässern findet man aber per se die Fremdstoffe, die im Labor durch das kombinierte Abbauverfahren in den Photoabbau eingebracht werden in noch größerer Anzahl. So erwiesen sich z. B. nitroaromatenbelastete Abwässer aus einer biologischen Bodenbehandlung im UV-Spektrum als optisch völlig dicht. Als Modellsubstanz für gelöste organische Stoffe (dissolved natural organic matter (NOM)) in einem natürlichen Gewässer wurde die Huminsäure ausführlich untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Flavin- und Huminsäuren die Reaktion von OH-Radikalen mit Aromaten inhibieren [102]. In anderen Untersuchungen wurde bei der Reaktion von Huminsäure in einem Photo-Fenton Prozess die Abnahme des Kohlenstoffgehalts (TOC) in der Lösung beobachtet, was auf eine Mineralisierung der Huminsäure hindeutete [103]. Außerdem wurde eine Adsorption von TNT und den ANTs an Huminsäure gefunden, wodurch sie sich einem Abbau zunächst entziehen können [104].

Diese Befunde zeigen, dass für die Mineralisierung von TNT aus einem Abwasser deutlich mehr H_2O_2 und Lichtenergie aufgewendet werden müssen als in unserem Laborexperiment mit reinem TNT. Es spricht daher für die Effizienz des kombinierten biologisch-chemischen Verfahrens, dass eine höhere Mineralisierung von TNT erreicht werden konnte als im direkten Photoabbau von TNT. Um die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens noch besser belegen

zu können, müssten als nächster Schritt vergleichende Mineralisierungsversuche mit einem TNT-belasteten Abwasser eines Altlastenstandortes erfolgen.

Der in dieser Arbeit bilanzierte biologisch-chemische Abbau ist das erste kombinierte Mineralisierungsverfahren, in dem die biologische Stufe vor dem chemischen Abbau eingesetzt wird. In allen anderen bisher publizierten kombinierten Methoden wurde eine photochemische Behandlung vorgeschaltet, um dann mit einem biologischen System eine Mineralisierung zu erhalten. Kearney et al. erzielten nach einer UV-O₃ Vorbehandlung mit Bakterien (*Pseudomonas putida*) eine 25%ige Mineralisierung [105]. Hess et al. fanden nach einer sechsstündigen photokatalytischen UV-Bestrahlung von 100 mg/L TNT in einer TiO₂-Suspension zunächst die Reduktionsprodukte OH-ADNT, ADNT und DANT. In einem anschließenden aeroben Abbau mit einem Pilz (*Phanerochaete chrysosporium*) wurden nach 20 Tagen bis zu 20% ¹⁴CO₂ freigesetzt [8]. Durch Bestrahlung von bakterienhaltigem Flusswasser mit Tageslicht konnten Hwang et al. innerhalb von drei Tagen mit 14 µg/L TNT zwar 70% Mineralisierung erzielen, bei einer TNT Konzentration von 10 mg/L konnten aber nur noch 3,7% mineralisiert werden [55]. Diese Daten unterstreichen die konzeptionellen und faktischen Vorteile des in dieser Arbeit beschriebene Vorgehens, die Ergebnisse sind aber auch insofern interessant, als die Ergebnisse unserer photochemischen Abbauten zeigten, dass die Mineralisierung nur bis zu einer gewissen Substrat-Konzentration schnell und effektiv verliefen. Es wäre daher eine sinnvolle dreistufige Verfahrensvariante denkbar, in der nach der photochemischen Mineralisierung nochmals ein biologische Behandlung erfolgt.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Mit einer im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelten Methode wurden zunächst die radioaktiv markierten TNT-Transformationsprodukte [¹⁴C]-U-Ring-2-ADNT, [¹⁴C]-U-Ring-4-ADNT, [¹⁴C]-U-Ring-2,4-DANT und [¹⁴C]-U-Ring-2,6-DANT in einem einzigen Syntheseschritt hergestellt. Dies gelang durch Reduktion von [¹⁴C]-TNT mit Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) bei 32 °C innerhalb von fünf Tagen. Die Trennung der vier Substanzen erfolgte per präparativer Dünnschichtchromatographie, die Gesamtausbeute der Reaktion betrug 52%. Generell wurde die Reduktion in *para*-Position bevorzugt, es entstanden 25% 4-ADNT gegenüber 6% 2-ADNT, und 19% 2,4-DANT gegenüber 2% 2,6-DANT. Bei entsprechender Steuerung der Regioselektivität wäre auch die vollständige Reduktion vom TNT zum 2,4-DANT als alleinigem Endprodukt möglich, was bei dem geringen Preis der Hefe eine interessante Alternative für die Entsorgung von TNT aus Delaborierungsmaßnahmen (Kap. 1.5.1) wäre.

Die radioaktiven ANTs wurden dann verschiedenen photochemischen Abbauverfahren zur Mineralisierung unterworfen. Vorher waren beim Abbau von TNT die Reaktionsbedingungen optimiert worden. Im photolytischen Abbau wurde H₂O₂ in einer Konzentration von 1% mit dem UV-Licht einer Xenon-Lampe eingesetzt (UV-H₂O₂), beim Photo-Fenton Abbau kam Eisen(II) in einer Konzentration von 15 mg/L dazu. Erstmalig wurde die Mineralisierung dieser Verbindungen sowohl anhand der Abnahme der Radioaktivität im Reaktor als auch durch Analyse des insgesamt entstandenen ¹⁴CO₂ verfolgt und bilanziert. Beim UV-H₂O₂ Abbau nahm die Mineralisierungsgeschwindigkeit in der Reihenfolge TNT << 2,6-DANT < 2-ADNT < 4-ADNT ≈ 2,4-DANT zu, beim Photo-Fenton Abbau in der Reihenfolge TNT << 2,6-DANT < 2-ADNT ≈ 2,4-DANT < 4-ADNT. Eine Aminogruppe in *para*-Stellung begünstigte also die Mineralisierung. Es konnte herausgearbeitet werden, dass ein erwarteter schnellerer Abbau der DANTs durch die Protonierung einer Aminogruppe gebremst wird. Im Vergleich der Abbauten untereinander war der Photo-Fenton Abbau schneller als der UV-H₂O₂ Abbau, bei einem Fenton Abbau ohne UV-Licht kam es bei der Reaktion mit TNT zu keiner Mineralisierung.

Das hier gefundene Ergebnis der schnelleren Mineralisierung der ANTs und der damit verbundene geringere Energieaufwand gegenüber einer direkten Mineralisierung von TNT war die Grundlage für das Konzept eines kombinierten Abbaus. In einer biologischen Stufe wurde dabei TNT zunächst zu den ANTs reduziert, um diese dann anschließend mit deutlich weniger Energie- und Chemikalienaufwand zu mineralisieren.

Als biologische Stufe wurde ein cometabolisches Reduktionsverfahren mit Belebtschlamm aus einer Kläranlage verwendet. Als optimale Rezeptur erwies sich dafür ein Verhältnis von Belebtschlamm : Cosubstrat (Saccharose) : TNT von 100 : 10 : 1. Bei aeroben Abbaubedingungen, die durch starke Belüftung erreicht wurden, erfolgte eine Reduktion des TNT bis zu den ADNTs innerhalb von 24 h, allerdings wurde dabei ein Teil der Nitroaromaten (30–35%) vom Schlamm adsorbiert. Durch Bilanzierung der Radioaktivität in einem solchen Abbau konnte nachgewiesen werden, dass etwas die Hälfte der adsorbierten ANTs irreversibel an den Schlamm gebunden waren, während der Rest durch Zentrifugation und Extraktion wieder in Lösung gebracht werden konnte. Hier wäre in Zukunft noch die Frage zu klären, ob und wann bei einer kontinuierlichen Beschickung des Schlamms mit TNT bzw. dessen Transformationsprodukten eine Sättigung und damit ein Nachlassen der Adsorption eintritt. Bei der anaeroben Verfahrensvariante wurde das TNT bis zum Hauptprodukt 2,4-DANT reduziert, eine Adsorption am Schlamm fand hier nicht statt.

Schließlich wurden mehrere kombinierte Abbaustufen durchgeführt, in denen verschiedenen biologischen Vorbehandlungen eine Mineralisierung mit UV-H₂O₂ oder Photo-Fenton nachgeschaltet war. Erstmals konnte für solche Verfahren mit Hilfe der Radioaktivität eine komplett Bilanzierung vorgelegt werden. Durch Optimierung der Reaktionsbedingungen und des Produkttransfers zwischen biologischer und chemischer Stufe konnte die ¹⁴CO₂-Bildung verdoppelt werden, sodass schließlich mit UV-H₂O₂ sowohl nach aeroben als auch anaeroben biologischen Stufe eine ca. 40%ige Mineralisierung des TNT erreicht werden konnte. Mit Photo-Fenton gelang eine Mineralisierung bis zu 35%. Die Mineralisierung wurde zwar durch das Einbringen von gelöstem organischen Material aus den biologischen Abbauten verlangsamt, man findet jedoch in einem TNT-belasteten Abwasser ohnehin eine höhere Belastung an gelösten organischen Stoffen, die den Photoabbau erschweren. Die Ergebnisse zeigen, dass trotz dieser Erschwernisse in einem kombinierten Abbau eine höhere Mineralisierung erzielt werden konnte als durch direkte photochemische Oxidation des TNT. Insgesamt konnte durch diese Arbeit die Überlegenheit des entwickelten biologisch-chemischen Abbaus sowohl gegenüber einer rein photochemischen Behandlung als auch gegenüber anderen bisher bekannten kombinierten Verfahrensweisen in grundlegenden Laborexperimenten aufgezeigt werden. Der Mineralisierungsprozess konnte lückenlos verfolgt und bilanziert werden. In Zukunft können hierauf aufbauend in einem größeren Maßstab verfahrenstechnische Optimierungen am Abbau von TNT-belasteten Standortabwässern vorgenommen werden, um so ein großtechnisch anwendungsfähiges, rentables Abbauverfahren zur Mineralisierung von TNT in Abwässern zu erreichen.

8 Experimenteller Teil

8.1 Allgemeines

8.1.1 Instrumentelle Analytik: Verwendete Geräte

| | |
|------------------------------------|---|
| NMR-Spektrometer: | Bruker ARX 200 (200 MHz) |
| Gaschromatograph: | Hewlett Packard 5890 Series II 25 m Kapillarsäule FID-Detektor |
| HPLC: | Merck Hitachi L-5000 intelligent pump Merck Hitachi AS-2000A Autosampler YMC-Pack Explosive (250 x 4.6 mm) Säule Nucleosil 120-5 C18 Säule Merck Hitachi Photo Diode-Array-Detektor |
| β-Counter: | Packard Tri Carb A4530 |
| Massenspektrometer: | Fison MD 800 (GC-MS) |
| Photoapparatur: | Müller Elektronik-Optik Xenonlampenversorgung Typ SVX1450 Müller Elektronik-Optik Lampengehäuse Typ LAX Osram XBO 150 W Xenonlampe |
| Probenanreicherung: | JT-Baker, Bakerbond spe TM , Octadecyl (C18) |
| Redoxelektrode: | Schott Pt 5900A |

Mein besonderer Dank für die Durchführung von analytischen Untersuchungen gilt Herrn Jonk (Universität Paderborn, Massenspektrometrie), Prof. W. Heyser und I. Dobner (Universität Bremen, Autoradiographie), Herrn V. Linnemann (Kernforschungszentrum Jülich, Verbrennungsproben des Klärschlammes) sowie dem Laborteam der GKA Paderborn-Sande für die Bestimmung der Trockenmasse des Belebtschlammes

8.1.2 Verwendete Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden aus dem Fachhandel bezogen (Sigma-Aldrich, Merck).

Zur Absorption von $^{14}CO_2$ wurde Carbosorb E (Methoxypropylamin) der Firma Packard eingesetzt.

Für die Szintillations-Spektroskopie wässriger Proben wurde der Szintillations-Cocktail Rotiszint eco plus für wässrige und organische Proben der Firma Roth verwendet

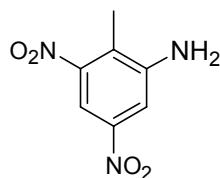
Für die Szintillations-Spektroskopie der Carbosorb-Proben wurde der Szintillations-Cocktail Permafluor E+ der Firma Packard verwendet.

8.2 Synthesen

8.2.1 Synthese von 2-ADNT und 4-ADNT

Die Synthese von 2-ADNT erfolgte gemäß Literaturvorschrift [57]. Zu in Schwefelsäure (104%; 17 mL) gelöster 2,4-Dinitro-*ortho*-toluolsäure (2,26 g; 10 mmol) wurde portionsweise Natriumazid (0,75 g; 12 mmol) gegeben. Die Lösung wurde für 1 h bei 0 °C gehalten und dann für 3,5 h auf 50 °C erwärmt. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung auf Eis (150 mL) geschüttet, der ausfallende gelbe Feststoff wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

2-Amino-4,6-dinitrotoluol (2-ADNT)



Ausbeute: 91.9% (1.8 g, 9.2 mmol)

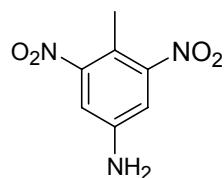
Lit. [57]: 95%

R_f (Toluol/MeOH = 9/1; EE/Hexan = 1/1) = 0.60

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 2.18 (s, 3H, CH₃), 6.02 (s, 2H, NH₂), 7.72 (s, 2H, Ar-H).-

4-ADNT wurde nach der obigen Vorschrift aus 3,5-Dinitro-*para*-toluolsäure (2,26 g; 10 mmol) hergestellt und fiel als oranger Feststoff aus.

4-Amino-2,6-dinitrotoluol (4-ADNT)



Ausbeute: 82.2% (1.6 g, 8.1 mmol)

Lit. [57]: 95%

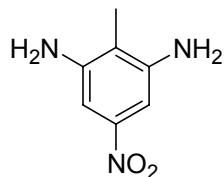
R_f (Toluol/MeOH = 9/1; EE/Hexan = 1/1) = 0.66

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO- d_6): δ [ppm] = 2.23 (s, 3H, CH_3), 4.70 (s, 2H, NH_2), 7.31 (s, 2H, Ar-H).-

8.2.2 Synthese von 2,6-DANT und 6-Amino-4-nitro-2-N-acetyltoluol

2-ADNT (3,56 g; 18,2 mmol) wurde in siedendem Eisessig (40 mL; Sdp.: 110 °C) gelöst. Dann wurde die Heizquelle entfernt und Eisenpulver (3,20 g; 57,4 mmol; 150 μm Korngröße) zugegeben. Durch die schnelle Zugabe des Eisens verlief die exotherme Reaktion sehr heftig unter starkem Aufkochen und sofortiger Schwärzung der ursprünglich orange-braunen Lösung. Nach Abklingen der Reaktion (5 min) wurde die Lösung noch 30 min unter Rückfluss gekocht, dann auf Eiswasser gegeben und 3 mal mit Ethylacetat extrahiert (100 mL). Säulenchromatographische Aufreinigung an Kieselgel ergab zwei Hauptprodukte: 2,6-DANT und 6-Amino-4-nitro-2-N-acetyltoluol:

2,6-Diamino-4-nitrotoluol (2,6-DANT)



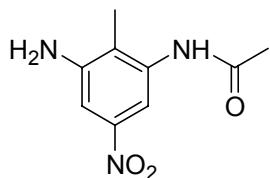
Ausbeute: 9.6% (293 mg, 1.75 mmol)

R_f (EE) = 0.56

R_f (Toluol/MeOH = 9/1; EE/Hexan = 1/1) = 0.39

¹H-NMR (200 MHz,): δ [ppm] = 2.00 (s, 3H, CH₃), 5.17 (s, 4H, NH₂), 6.96 (s, 2H, Ar-H).-

6-Amino-4-nitro-2-N-acetyltoluol



Ausbeute: 16.6% (632 mg, 3.03 mmol)

R_f (EE) = 0.19

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 2.00 (s, 3H, CH₃ (NAc)), 2.08 (s, 3H, CH₃ (Ar)), 5.61 (s, 2H, NH₂), 7.34 (s, 1H, Ar-H), 7.50 (s, 1H, Ar-H), 9.52 (s, 1H, NH).-

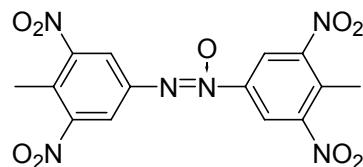
¹³C-NMR (50 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 13.44 (CH₃ (Ar)), 24.13 (CH₃ (NAc)), 105.05 (CH, C-3), 108.30 (CH, C-5), 123.85 (C, C-1), 138.07 (C, C-NAc), 146.54 (C, C-NH₂), 149.18 (C, C-NO₂), 169.51 (C=O).-

MS m/z: 209 (M⁺), 192, 167, 152, 137, 121, 43, 28.-

8.2.3 Synthese von 2,2',6,6'-Tetranitro-4,4'-azoxytoluol (TN-4,4'-AzT)

Die Synthese von TN-4,4'-AzT erfolgte gemäß Literaturvorschrift [61]. Zu einer Lösung von 4-ADNT (0,75 g; 3,8 mmol) in Dichlormethan (75 mL) wurde *meta*-Chlorperbenzoësäure (MCPBA; 1,5 g; 8,7 mmol) gegeben. Die Lösung wurde 16 h bei Raumtemperatur gerührt, danach wurde die entstandene Benzoësäure abfiltriert. Zur Beseitigung der restlichen MCPBA wurde die Lösung mit Natriumhydrogencarbonatlösung (5%) extrahiert, anschließend wurde das Dichlormethan eingedampft. Der resultierende Feststoff wird aus Benzol umkristallisiert und getrocknet.

2,2',6,6'-Tetranitro-4,4'-azoxytoluol (TN-4,4'-AzT)



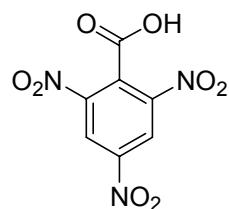
Ausbeute: 73.1% (0.61 g, 9.2 mmol)

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 2.51 (s, 3H, CH₃), 2.52 (s, 3H, CH₃), 8.98 (s, 2H, Ar-H), 9.15 (s, 2H, Ar-H).-

8.2.4 Synthese von 2,4,6-Trinitrobenzoësäure

Die Synthese von 2,4,6-Trinitrobenzoësäure erfolgte gemäß Literaturvorschrift [62]. Zu einer Lösung von TNT (9,0 g; 40 mmol) in konzentrierter Schwefelsäure (98%; 90 mL), die bei einer Temperatur von 45 – 55 °C gehalten wurde, wurde vorsichtig Kaliumdichromat (13,5 g; 45 mmol) gegeben. Die Lösung wurde 2 h gerührt und danach langsam auf Eis (250 mL) gegeben. Der ausfallende beige Feststoff wurde abfiltriert und mit kaltem Wasser chromatfrei gewaschen. Den Feststoff wurde in 35 °C warmes Wasser (50 mL) aufgenommen. Bis zum Entstehen einer beständigen roten Färbung wurde NaOH (15%; w/v) zugetropft. Nach 5 min Rühren wurde die rote Farbe durch Zugabe einiger Tropfen Essigsäure (37%; w/v) wieder entfernt und das nicht umgesetzte TNT abfiltriert. Die Trinitrobenzoësäure blieb in Lösung und wurde durch einen Überschuss von Schwefelsäure (50%; w/v) ausgefällt. Die farblosen Kristalle wurden abfiltriert, mit kaltem Wasser säurefrei gewaschen und getrocknet.

2,4,6-Trinitrobenzoësäure



Ausbeute: 19.2% (1.97 g, 9.2 mmol)

Lit. [62]: 14%

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 9.15 (s, 2H, Ar-H).-

8.2.5 Radioaktive Synthese von [U-ring-¹⁴C]-2-ADNT, [U-ring-¹⁴C]-4-ADNT, [U-ring-¹⁴C]-2,4-ADNT und [U-ring-¹⁴C]-2,6-DANT

Bäckerhefe (6 g; RuF Lebensmittelwerk, Charge “JAN 01 9303”) wurde in Leitungswasser suspendiert und bei 32 °C vorsichtig gerührt. Zum Start der Reaktion wurde in heißem Ethanol (1,6 mL) gelöstes [U-ring-¹⁴C]-TNT (114 mg; 0,5 mmol) zugegeben. Der Reaktionsverlauf wurde in der HPLC kontrolliert. Am vierten Tag wurden weitere Hefe (1,5 g) zugegeben. Nach fünf Tagen wurde die Reaktion gestoppt. Extraktion mit Dichlormethan (250 mL) ergab 119 mg Rohprodukt. Das Rohprodukt wurde auf zwei präparativen Dünnschichtplatten (Macherey-Nagel, SIL G-200) durch konsekutiven Einsatz von Toluol/MeOH (9/1) und Hexan/Ethylacetat (1/1) Lösemittelgemischen getrennt (R_f-Werte in Tabelle 3.1) und per Autoradiographie detektiert. Die Produkte wurden mit Ethylacetat vom Kieselgel getrennt, die Reinheit der jeweiligen Produkte wurde in der HPLC bestimmt (Tabelle 3.4). Die analytischen Daten der einzelnen Substanzen können den “kalten” Synthesen entnommen werden.

8.3 Biologische Abbauten

8.3.1 Allgemeine Arbeitsvorschrift (AAV) zum biologischen Abbau

Für den biologischen Abbau wurde frischer Belebtschlamm der GKA Paderborn-Sande verwendet. Die Trockenmasse, die vom analytischen Labor des Klärwerks bestimmt wurde, ermöglichte das Arbeiten mit reproduzierbaren Mengen von 1,88 g an Mikroorganismen pro Ansatz. Ein dem entsprechendes Volumen wurde dazu aus der Bakterienmasse entnommen, abfiltriert (Faltenfilter; Macherey-Nagel) und zweimal mit je 100 mL isotonischer NaCl-Lösung (9 g/L) gewaschen. Den Rückstand wurde mit 200 mL Phosphatpuffer in einen 1-L-Dreihalskolben überführt. Zu dieser Suspension gab man 52 mL Basismedium (Kap. 4.2.2), 200 mg kristalline Saccharose sowie 523 mL destilliertes Wasser. Zuletzt wurde der Dreihalskolben mit 225 mL wässriger TNT-Stammlösung (100,3 mg/L) aufgefüllt und für

24 h unter Belüftung bei einem Volumenstrom von 41 L Luft/h mit einer Aquarienpumpe (Fa. Elite) gerührt.

Die Probennahme erfolgte alle 4 h, wobei jeweils 5 mL an Reaktionslösung durch einen Spritzenfilter (Rotilabo[®], 0,45 µm, Material PVDF; Fa. Roth) entnommen wurden. Die Anreicherung um einen Faktor 4 von 4 mL Reaktionsgemisch erfolgte wie unter Kap. 8.3.7 beschrieben mittels Festphasenextraktion.

8.3.2 Biologischer Abbau mit variierenden TNT-Konzentrationen

Die Versuchsdurchführung erfolgte nach der im Kap. 8.3.1 beschriebenen AAV.

Änderungen: Der Abbau wurde mit 450 mL und 225 mL TNT-Stammlösung (100,6 mg/L) durchgeführt.

8.3.3 Biologischer Abbau mit variierenden Saccharosemengen

Die Versuchsdurchführung verlief entsprechend der im Kap. 8.3.1 beschriebenen AAV.

Änderungen: der Abbau wurde mit 26 mg, 130 mg, 200 mg und ohne Saccharose durchgeführt.

8.3.4 Biologischer Abbau mit variierenden Volumenströmen und Gasen

Die Versuchsdurchführung erfolgte gemäß der im Kap. 8.3.1 beschriebenen AAV.

Änderungen: Der Volumenstrom der Aquarienpumpe wurde auf 41 L/h, 5 L/h und 0,2 L/h eingestellt, ebenso wurde ein Abbau unter den selben Bedingungen mit einem Volumenstrom von 5 L N₂/h durchgeführt. Die Probennahme geschah wie im Kapitel 8.3.7 beschrieben alle 4 h. Das Redoxpotential der vier biologischen Abbaulösungen wurde über 24 h gemessen.

8.3.5 Allgemeine Arbeitsvorschrift der biologischen Stufe im kombinierten biologisch-chemischen Abbau

Der biologische Abbau wurde entsprechend der im Kap. 8.3.1 beschriebenen AAV durchgeführt, allerdings mit den Unterschieden, dass die Reaktorlösung mit einem Volumenstrom von 0,2 L Luft/h belüftet und im kombinierten Abbau außerdem eine isotopenmarkierte TNT-Stammlösung zugegeben wurde. Somit bestand das Reaktionsgemisch u.a. aus 225 mL wässriger TNT-Stammlösung (100,4 mg/L) und 50 mL wässriger ¹⁴C-markierter TNT-Stammlösung (12 mg/L). Zur Sicherung der Apparatur wurden zwei mit je 50 mL Carbo-Sorb[®] gefüllte Waschflaschen zusätzlich mit einer Aktivkohlepatrone verbunden.

Im 4-Stundentakt wurden 5,5 mL des Reaktorinhalts mit einem Spritzenfilter (Rotilabo[®], 0,45 µm, Material PVDF; Fa. Roth) entnommen. Davon wurden 4 mL wie im Kapitel 8.3.7 beschrieben für die HPLC-Messung vorbereitet und zweimal je 0,5 mL mit 2 mL Rotiszint[®] eco plus (Fa. Roth) im β-Counter vermessen.

Nach 24 Stunden wurden ebenso zweimal 0,5 mL aus jeder Waschflasche pipettiert und mit je 2 mL Permafluor[®] E+ (Fa. Packard) vermischt.

8.3.6 Biologischer Abbau mit variierenden Volumenströmen und Gasen

Die Versuchsdurchführung erfolgte gemäß der im Kap. 8.3.5 beschriebenen AAV.

Änderungen: Der Volumenstrom der Aquarienpumpe wurde auf 5 L/h und 0,2 L/h eingestellt, ebenso wird ein Abbau unter denselben Bedingungen mit einem Volumenstrom von 5 L N₂/h durchgeführt.

8.3.7 Biologischer Abbau mit Schütteln als Mischtechnik

Die Versuchsdurchführung erfolgte gemäß der im Kap. 8.3.5 beschriebenen AAV.

Änderungen: Statt des sonst üblichen langsamen Rührens mit einem Magnetrührstab wurde der Kolben langsam geschüttelt.

8.3.8 Festphasenextraktion

Zur Konditionierung der 6 mL Bakerbond-Kartusche (Bakerbond speTM, Octadecyl (C18); Fa. JT-Baker) werden entsprechend der Applikationsvorschrift 4 mL Methanol in HPLC-Qualität und 4 mL Wasser mit einer Spritze über die Extraktionssäule gegeben. Es ist darauf zu achten, dass der Fluss kleiner als 5 mL/min ist und die Säule nicht trocken läuft. Dem biologischen Abbau entnimmt man 5 mL Probelösung durch einen Spritzenfilter (Rotilabo[®], 0,45 µm, Material PVDF; Roth) und gibt 4 mL auf die Extraktionssäule. Bevor die Kartusche für circa 15-20 min an der Luft trocknet, wird sie mit 1 mL Wasser gewaschen. Mit Methanol in HPLC-Qualität wird ein Volumen von 1 mL der zurückgehaltenen Substanzen in einen Messkolben eluiert und unmittelbar danach in der HPLC vermessen. Wenn dies nicht möglich ist, lagert man die Probengläschen vorübergehend bei 4 °C im Kühlschrank.

8.4 Allgemeine Arbeitsvorschrift zur Extraktion des Belebtschlammes

Nach Beendigung des Bioabbaus wurden 660 mL der Reaktionslösung für 30 min bei 12000 UPM und 4 °C zentrifugiert (Modell J-21B Zentrifuge, Beckman[®]) Die Überstandslösung wurde abdekantiert und nach der im Kapitel 8.3.7 beschriebenen AAV für die HPLC

vorbereitet. Das Pellet wurde über Nacht im Trockenschrank bei 60 °C gelagert und am nächsten Tag nach dem Abkühlen gewogen und gemörser.

Daraufhin wurde das Pulver mit 60 mL Methanol für 30 min im Ultraschallbad behandelt und danach erneut nach denselben Bedingungen wie oben angeführt zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand vom Bodensatz getrennt und mit einem Spritzenfilter direkt eine Probe für die HPLC-Messung gezogen. Der feste Rückstand wurde getrocknet, gewogen und mit 4 mL 5 M HCl-Lösung für 30 min in ein Ultraschallbad gegeben. Nach Ablauf der Zeit gab man 36 mL destilliertes Wasser zu der Suspension und es erfolgte dieselbe Behandlung und Aufarbeitung wie zuvor. Die Überstandslösung wurde gemäß der im Kapitel 8.3.8 beschriebenen Vorschrift für die HPLC-Messung vorbereitet mit der Änderung, dass die Extraktionssäule statt mit 1 mL mit 5 mL destilliertem Wasser gewaschen wurde.

8.4.1 Extraktion des Belebtschlammes aus einem Ansatz mit [U-Ring-¹⁴C]-TNT

Die Versuchsdurchführung erfolgte gemäß der AAV zur Extraktion des Belebtschlammes (Kap. 8.4).

Änderungen: Die Extraktionen wurden zuerst mit Wasser und dann mit den Lösemitteln Methanol und Dichlormethan durchgeführt. Der Schlamm wurde am Ende nochmals getrocknet und im Kernforschungszentrum Jülich von V. Linnemann verascht und vermessen.

8.5 Photochemische Abbauten

8.5.1 AAV zum photochemischen Abbau mit UV-H₂O₂

Das zum Erreichen der jeweils gewünschten Endkonzentration benötigte Volumen der Stammlösung des abzubauenden Nitroaromaten wurde mit destilliertem Wasser auf 48,25 mL aufgefüllt. Bei Versuchen mit TNT geschah dies mit 25 mL der Stammlösung (100 mg/L) und 23,25 mL Wasser um eine Konzentration von 50 mg/L (0,22 mmol) zu erreichen. Die Lösung wurde mit wenigen Tropfen verdünnter Schwefelsäure (0,5 M) auf pH 3 gebracht. Nach Start der UV-Lampe wurden 1,75 mL H₂O₂ (30%) zugegeben.

8.5.2 Abbau mit ADNTs und DANTs

Die Durchführung erfolgte nach der AAV zum Photoabbau mit UV-H₂O₂ (Kap. 8.5.1).

Statt TNT wurden jeweils 0,22 mmol/L der ANTs verwendet.

8.5.3 AAV zum Photo-Fenton Abbau

Die Durchführung erfolgte nach der AAV zum Photoabbau mit UV-H₂O₂ (Kap. 8.5.1)

Änderung: 7,5 mL Wasser wurden durch 7,5 mL FeSO₄·7H₂O ersetzt.

8.5.4 Abbau mit verschiedenen Lichtquellen

Die Durchführung erfolgte nach der AAV zum Photoabbau (Kap. 8.5.1)

Änderung: Neben der Xenonlampe wurde auch eine Hg-Tauchlampe (Heraeus 150 W) verwendet, hierbei wurde ein 500 mL Ansatz gewählt, die Konzentrationen entsprachen denjenigen im üblichen 50 mL Ansatz

8.5.5 Abbauexperiment zur Dunkel-Fenton-Reaktion

Die Versuchsdurchführung erfolgt entsprechend der im Kap. 8.5.3 beschriebenen AAV.

Änderungen: Der Abbau erfolgte ohne UV-Lichtquelle.

8.5.6 Photochemische Stufe im kombinierten Abbau

Die Versuchsdurchführung erfolgt entsprechend der im Kap. 8.5.1 beschriebenen AAV.

Änderungen: Der radioaktive Überstand der biologischen Stufe wird mit Spritzenfilter (Rotilabo®, 0,45 µm, Material PVDF; Fa. Roth) in den Rundkolben überführt. Nur zu Beginn der Photoreaktion werden 1,75 mL der 30%igen Wasserstoffperoxidlösung (nicht stabilisiert, Fluka) zugegeben.

9 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|---------------------------------------|
| λ | Zerfallskonstante |
| 2,4-DNT | 2,4-Dinitrotoluol |
| 2,6-DNT | 2,6-Dinitrotoluol |
| 2-ADNT | 2-Amino-4,6-dinitrotoluol |
| 4-ADNT | 4-Amino-2,6-dinitrotoluol |
| 4-OH-ADNT | 4-Hydroxyaminodinitrotoluol |
| A | Aktivität |
| AAV | Allgemeine Arbeitsvorschrift |
| Ac | Acetyl |
| ADNT | Aminodinitrotoluol |
| ANT | Aminonitrotoluole |
| AOP | Advanced Oxidation Processes |
| Ausb. | Ausbeute |
| Bq | Bequerel |
| Ci | Curie |
| Da | Dalton |
| DAD | Dioden-Array-Detektor |
| DANT | Diaminomononitrotoluol |
| DNT | Dinitrotoluol |
| dpm | desintegrations per minute |
| E | gemessenes Potential |
| E'_h | Standardpotential der SWE bei pH 7 |
| E_{Bez} | Potential der Bezugselektrode |
| EC_{20} | Effective Concentration ₂₀ |
| EC_{50} | Effective Concentration ₅₀ |
| EE | Ethylessigester |
| E_h | Standardpotential der SWE |
| EPA | Environmental Protection Agency |
| GC | Gaschromatographie |
| GKA | Großkläranlage |
| HPLC | Hochleistungsflüssigchromatographie |
| Mark. | Markierung |

| | |
|-------------|---------------------------------------|
| MCPBA | <i>meta</i> -Chlorperbenzoësäure |
| MeV | Megaelektronenvolt |
| MK | Meisenheimer Komplex |
| NOEL | No Observed Effect Level |
| NOM | natural organic matter |
| OH-ADNT | Hydroxylaminodinitrotoluol |
| SWE | Standardwasserstoffelektrode |
| TAT | Triaminonitrotoluol |
| TN-4,4'-AzT | 2,2',6,6'-Tetranitro-4,4'-azoxytoluol |
| TNT | 2,4,6-Trinitrotoluol |
| TOC | total organic carbon |
| TRD | tolerable resorbierter Dosis |
| U | uniform |
| U-Ring | uniform markierter Ring |
| UV-Licht | Ultraviolettes Licht |

10 Referenzen

- [1] J. Thieme, *Bericht in Bestandsaufnahme von Rüstungsaltlastenverdachtsstandorten in der Bundesrepublik Deutschland* (Ed.: Umweltbundesamt), 2. Aufl., Bd. 1, UBA-Texte 25/96, Berlin **1996**.
- [2] Deutscher Bundestag **1990**.
- [3] Der Rat von Sachverständigen für Umweltfragen, *Altlasten II. Sondergutachten Februar 1995* (Hrsg.: Der Rat von Sachverständigen für Umweltfragen), Metzler-Poeschel, Stuttgart **1995**.
- [4] J. Köhler, R. Meyer, *Explosivstoffe*, 7. Aufl., VCH, Weinheim **1991**.
- [5] D. Martinetz, G. Rippen, *Handbuch Umweltchemikalien* (Hrsg.: G. Rippen), 3. Aufl., Bd. 2, Kap. 2.6, ecomed Verlag, Landsberg/Lech **1990**.
- [6] *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds* (Hrsg.: J. Spain), Plenum Press, New York **1995**.
- [7] T. Urbanski, *Chemistry and Technology of Explosives*, 1. Aufl., Bd. 1, Pergamon Press, Oxford **1964**.
- [8] Th. A. Lewis, R. L. Crawford, S. Katamneni, J. H. Wells, R. J. Watts Th. F. Hess, *Wat. Res.* **1998**, 32(5), 1481-1491.
- [9] M. Scheringer, *Persistenz und Reichweite von Umweltchemikalien*, Wiley-VCH, Weinheim **1999**.
- [10] J. Preuß, R. Haas, *Geographische Rundschau* **1987**, 39, 578-584.
- [11] D. Martinetz, *Vom Giftpfeil zum Chemiewaffenverbot - Zur Geschichte der chemischen Kampfmittel*, Harri Deutsch, Thun, Frankfurt a.M. **1995**.
- [12] A. Kayed, *Ergebnisse und Erfahrungen bei der Gefährdungsabschätzung für die Rüstungsaltlasten des ehemaligen Sprengstoffwerkes "Tanne" bei Clausthal-Zellerfeld in Expertengespräch Rüstungsaltlasten* (Hrsg.: Der Niedersächsische Umweltminister), Hannover **1989**, 249-259.

- [13] H. Schäfer, *Ableitung von Sanierungsrichtwerten für Böden mit spezifischen Belastungen aus der TNT Produktion in Verfahren zur Sanierung von Rüstungssaltlasten* (Hrsg.: K. J. Thomé-Kozmiensky), EF-Verlag für Energie- und Umwelttechnik, Berlin **1992**.
- [14] M. Nahen, R. Bahnemann, R. Dillert, G. Fels, *J. of Photochem. Photobiol. A* **1997**, *110*, 191-199.
- [15] K.S. Ro, A. Venugopal, D.D. Adrian, *J. Chem. Eng. Data* **1996**, *41*, 758-761.
- [16] J. M. Phelan, J. L. Barnett, *J. Chem. Eng. Data* **2001**, *46*, 375-376.
- [17] A. Look, *Wasser & Boden* **2001**, *53*, 45-51.
- [18] T. W. Sheremata, S. Thiboutot, G. Ampleman, L. Paquet, A. Halasz, J. Hawari, *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 4002-4008.
- [19] J. Yinon, *Toxicity and Metabolism of Explosives*, CRC Press, Boca Raton **1990**.
- [20] G. Koss, A. Lommel, I. Ollrogge, I. Tesseraux, R. Haas, A. D. Kappos, *Bundesgesundheitsblatt* **1989**, *12*, 527-536.
- [21] K. Schneider, M. Hassauer, F. Kalberlah, *Zeitung für Umweltchemie und Ökotoxikologie* **1994**, *6*(6), 333-340.
- [22] D. Bruns-Nagel, S. Scheffer, B. Casper, H. Garn, O. Drzyzga, E. von Löw, D. Gemsa, *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 2566-2570.
- [23] R. E. Klausmeier, J. L. Osmon, D. R. Walls, *Dev. Ind. Microbiol.* **1974**, *15*, 309-317.
- [24] H. Lenke, P. Fischer, H.-J. Knackmuss C. Vorbeck, *J. Bacteriol.* **1994**, *176* (3), 932-934.
- [25] C. Vorbeck, H. Lenke, P. Fischer, J. C., Knackmuss, H.-J. Spain, *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 246-252.
- [26] P.-G Rieger, Knackmuss, H.-J. , *Biodegradation of TNT and Related Nitroaromatic Compounds in Biodegradation of Explosives* (Hrsg.: J.C. Spain), Kap. 1, Plenum Press, New York **1995**, 1-18.
- [27] C. Wang, K. Yesland, A. Richardson, R. Bhadra, G. Bennett, F. Rudolph J. B. Hughes, *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 494-500.

- [28] D. Bruns-Nagel, O. Drzyzga, K. Steinbach, T. C. Schmidt, E. von Löw, T. Gorontzy, K.-H. Blotevogel, D. Gemsa, *Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32, 1676-1679.
- [29] K. Scheibner, M. Hofrichter, A. Herre, J. Michels, W. Fritsche, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, 47, 452-457.
- [30] J. Hawari, S. Beaudet, A. Halasz, S. Thiboutot, G. Ampleman, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2000**, 54, 605-618.
- [31] K. Scheibner, M. Hofrichter, *J. Basic Microbiol.* **1998**, 38, 51-59.
- [32] M. Hofrichter, K. Scheibner, I. Schneegaß, W. Fritsche, *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, 64, 399-404.
- [33] A. Eilers, E. Rüngeling, U. M. Stündl, G. Gottschalk, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, 53, 75-80.
- [34] G. Czapski, *Reaction of OH in Methods in Enzymology*, Bd. 105, Kap. 24, Academic Press **1984**, 209-215.
- [35] J. O. Edwards, R. Curci, *Fenton Type Activation and Chemistry of Hydroxyl Radical in Catalytic Oxidations with Hydrogen Peroxide as Oxidant* (Hrsg.: G. Strukul), Kap. 4, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht **1992**, 97-151.
- [36] O. Legrini, E. Oliveros, A. M. Braun, *Chem. Rev.* **1993**, 93, 671-698.
- [37] R. Dillert, U. Siebers, A. Renwrantz, D. Bahnemann, *Oxidation von Nitro- und Aminoaromaten mit Wasserstoffperoxid in Verbundvorhaben Biologische Sanierung von Rüstungsaltlasten, Tagungsband zum 3. Statusseminar am 26. und 27. 02. in Berlin* (Hrsg.: Umweltbundesamt), Kap. G, BMBF, Bonn **1997**.
- [38] Ch. Walling, *Accounts Chem. Res.* **1975**, 8, 125-131.
- [39] R. T. Medary, *Anal. Chim. Acta* **1992**, 258, 341-346.
- [40] L. A. Kaplan, A. R. Siedle, *J. Org. Chem.* **1971**, 36(7), 937-939.
- [41] T. Severin, R. Schmitz, *Chem. Ber.* **1962**, 95, 1417-1419.
- [42] C. F. Bernasconi, *J. Org. Chem.* **1971**, 36, 1671-1679.
- [43] E. Buncel, A. R. Norris, K. E. Russell, R. Tucker, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, 94, 1646-1649.

- [44] T. Track, *Überblick über Erfahrungen mit Sanierungstechnologien für Rüstungsaltlasten in Verbundvorhaben Biologische Sanierung von Rüstungsaltlasten, Tagungsband zum 4. Statusseminar* (Hrsg.: Umweltbundesamt), BMBF, Bonn, **1999**.
- [45] P. Wanninger, *Chem. Unserer Zeit* **1995**, 29, 135-140.
- [46] S. R. Eturi, S. Iyer, *Synth. Commun.* **1999**, 29, 2431-2434.
- [47] A. L. Rusanov, V.A. Tartakovskiy, S. A. Shevelev, M. D. Dutov, I. A. Vatsadse, O. V. Serushkina, L. G. Komarova, M. P., Bulycheva, E. G. Prigozhina, L. B. Elshina, *Polymer* **2000**, 41, 5021-5037.
- [48] V. N. Leibzon, A. P. Churilina, M. Y. Leonova, L. V. Mikhal'chenko, A. K. Shakhnes, *Russian Journal of Electrochemistry* **2000**, 36, 190-193.
- [49] M. Emmrich, *Environ. Sci. Technol.* **1999**, 33, 3802-3805.
- [50] M. Emmrich, *Environ. Sci. Technol.* **2001**, 35, 874-877.
- [51] U. Walter, D. Fischer, D. Warrelmann, W. Heyser, G.A. Henke, *TerraTech* **1998**, 3, 42-45.
- [52] W. Kördel, K. Hund-Rinke, *Remobilisierung gebundener TNT-Metabolite nach biologischer Sanierung von Rüstungsaltlasten*, Vortrag auf der GDCh-Jahrestagung, Würzburg **2001**.
- [53] T. C. Schmidt, K. Steinbach, E. von Löw, G. Stork, *Chemosphere* **1998**, 37, 1079-1090.
- [54] <http://www.sandia.gov/explosive/projects/pinkwater.htm> **2001**.
- [55] H.-M. Hwang, L. F. Slaughter, S. M., Cui H. Cook, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2000**, 65, 228-235.
- [56] M. Kröger, G. Fels, *J. Labelled. Cpd. Radiopharm.* **2000**, 43, 217-227.
- [57] V. L. Zbarskii, M. A. Sonis, E. Y. Orlova, *Zhurnal Prikladnoi Khimii* **1971**, 44, 2578-2579.
- [58] Autorenkollektiv, *Organikum*, 17. Aufl., VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin **1988**.
- [59] M. E. Sitzmann, *J. Chem. Eng. Data* **1976**, 21, 242-243.

- [60] D. S. Wulfman, C. F. Cooper, *Synthesis* **1978**, 924-925.
- [61] M. Sitzmann, *J. Chem. Eng. Data* **1974**, 19(2), 179-181.
- [62] T. C. Schmidt, K. Steinbach, U. Buetehorn, K. Heck, U. Volkwein, G. Stork, *Chemosphere* **1999**, 38, 3119-3130.
- [63] T.G. Cooper, *Biochemische Arbeitsmethoden*, Walter de Gruyter, Berlin **1981**.
- [64] A. T. Nielsen, R. A. Henry, W. P. Norris, R. L. Atkins, D. W. Moore, A. H. Lepie, C. L. Coon, R. J. Spanggord, D. V. H. Son, *J. Org. Chem* **1979**, 44, 2499-2504.
- [65] A. Klapproth, *Diplomarbeit*, Universität-GH Paderborn **1996**.
- [66] J. Michels, G. Gottschalk, *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, 60(1), 187-194.
- [67] B. Van Aken, L. M. Godefroid, C. M. Peres, H. Naveau, S. N. Agathos, *J. Biotechnol.* **1999**, 68, 159-169.
- [68] L. Poppe, L. Novák, *Selective Biocatalysis*, VCH, Weinheim **1992**.
- [69] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry*, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin **1995**.
- [70] D. Seebach, M. A. Sutter, R. H. Weber, M. Züger, *Org. Synth.* **1984**, 63, 1-9.
- [71] A. Wells, *Reduction of Aromatic Nitro Compounds in Preparative Biotransformations* (Hrsg.: S. M. Roberts), 1. Aufl., Kap. 2.8, Wiley & Sons **1994**.
- [72] M. Takeshita, S. Yoshida, *Heterocycles* **1990**, 30, 871-874.
- [73] C. L. Davey, L. W. Powell, N.J. Turner, A. Wells, *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 7867-7870.
- [74] J. A. Blackie, N. J. Turner, A. Wells, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3043-3046.
- [75] E. Santaniello, *Recent Advances on Bioreductions Mediated by Baker's Yeast and Other Microorganisms in Enzymes in Action* (Hrsg.: B. Zwanenburg, M. Mikolajczyk, P. Kielbasinski), Kap. 5, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht **2000**, 95-116.
- [76] D. J. Glover, J. C. Hoffsommer, D. A. Kubose, *Anal. Chim. Acta* **1977**, 88, 381-384.

- [77] N. J. Turner, *Functional Group Transformation Mediated by Whole Cells and Strategies for the Efficient Synthesis of Optically Pure Chiral Intermediates in Enzymes in Action* (Hrsg.: B. Zwanenburg, M. Mikolajczyk, P. Kielbasinski), Kap. 4, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht **2000**, 71-94.
- [78] G. Rheinheimer, *Mikrobiologie der Gewässer*, 5. ed., Gustav Fischer Verlag, Jena/Stuttgart **1991**.
- [79] L. Habeck-Tropfke, H. Habeck-Tropfke, *Abwasserbiologie*, 2. Aufl., Werner Verlag **1992**.
- [80] P. Lorenz, P. Lorenz, *Einführung in die biologisch-mikroskopische Belebtschlammanalyse*, Quelle & Meyer Verlag, Wiesbaden **1995**.
- [81] E. Schleßelmann, *Diplomarbeit*, Universität Braunschweig **1996**.
- [82] M. E. Schumacher, *Diplomarbeit*, Universität Paderborn **2001**.
- [83] H. Bühler, R. Baumann, *Redoxmessung: Grundlagen und Probleme*, Ingold Messtechnik AG, Urdorf **1982**.
- [84] G. Daun, H. Lenke, H.-J. Knackmuß, M. Reuß, *Chem. Eng. Technol.* **1999**, 21, 308-313.
- [85] B. Böhncke, W. Bischofsberger, C. F. Seyfried, *Anaerobtechnik - Handbuch der anaeroben Behandlung von Abwasser und Schlamm*, Springer Verlag, Berlin **1993**.
- [86] D. F. Carpenter, N. G. McCormick, J. H., Kaplan, A. M. Cornell, *Appl. Environ. Microbiol.* **1978**, 35, 949-954.
- [87] R. G. Riefler, B. F. Smets, *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34, 3900-3906.
- [88] T. B., Heijman, C. G. Hofstetter, S. B. Haderlein, Ch. Holliger, R. P. Schwarzenbach, *Environ. Sci. Technol.* **1999**, 33, 1479-1487.
- [89] A. Esteve-Nunez, Ramos J. L., *Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32, 3802-3808.
- [90] O. Drzyzga, D. Bruns-Nagel, T. Gorontzy, K. Blotevogel, E. von Löw, *Chemosphere* **1999**, 38, 2081-2095.
- [91] K. H. Leung, M. Yao, R. Stearns, S.-H. Lee Chiu, *Chem. Biol. Interactions* **1995**, 97, 37-51.

- [92] T.A. Lewis, M.M. Ederer, R.L. Crawford, D.L. Crawford, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, 18, 89-96.
- [93] M. D. Corbett, B. R. Corbett, *Bioorganic Chemistry of the Arylhydroxylamine and Nitrosoarene Functional Groups in Biodegradation of Nitroaromatic Compounds* (Hrsg.: J. C. Spain), Kap. 10, Plenum Press, New York **1995**, 151-182.
- [94] M. S. Elovitz, E. J. Weber, *Environ. Sci. Technol.* **1999**, 33, 2617-2625.
- [95] H.-J. Knackmuss, G. Daun, H. Lenke, M. Reuss, *Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32, 1956-1963.
- [96] C. Achtnich, H. Lenke, U. Klaus, M. Spiteller, H.-J. Knackmuss, *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34, 3698-3704.
- [97] R. J. Spanggord, D. Yao, Th Mill, *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34, 450-454.
- [98] Z. M. Li, S. D. Comfort, P. J. Shea, *J. Environ. Qual.* **1997**, 26, 480-487.
- [99] Z. M. Li, P. J. Shea, S. D. Comfort, *Chemosphere* **1998**, 36, 1849-1865.
- [100] H. G. O. Becker, *Einführung in die Photochemie*, 3. Aufl., Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin **1991**.
- [101] A. Schmidt, W. Butte, *Chemosphere* **1999**, 38, 1293-1298.
- [102] M. E. Lindsey, M. A. Tarr, *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34, 444-449.
- [103] M. Fukushima, K. Tatsumi, S. Nagao, *Environ. Sci. Technol.* **2001**, 35, 3683-3690.
- [104] K. A. Marx, J. Walker, D. L. Kaplan A. Z. Li, *Environ. Sci. Technol.* **1997**, 31, 584-589.
- [105] P. C. Kearney, Q. Zeng, J. M. Ruth, *Chemosphere* **1983**, 12, 1583-1597.

Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Promotionsarbeit:

- M. Kröger, G. Fels, Microbiotic Synthesis of ^{14}C -ringlabelled Aminodinitrotoluenes (ADNT) and Diaminonitrotoluenes (DANT) *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, **2002**, zur Veröffentlichung angenommen
- D. Newcombe, A. Paszczynski, W. Gajewska, M. Kröger, G. Fels, R. Crawford, Production of small molecular weight catalysts and the mechanism of trinitrotoluene degradation by several *Gloeophyllum* species, *Enzyme and Microbial Technology*, 30, **2002**, 506-517
- M. Kröger, G. Fels, Reduktion von 2,4,6-Trinitrotoluol (TNT) mit Hefe (*Saccharomyces cervisiae*), Vortrag und Posterbeitrag, GDCh-JCF Frühjahrs-symposium, **2001**, Leipzig
- M. Kröger, G. Fels, Reduction of [ring- ^{14}C]-TNT by Baker's Yeast (*Saccharomyces cervisiae*), Vortrag, International Isotope Society - Central European Division - 9th Conference, **2001**, Bad Soden
- M. Kröger, G. Fels, Synthesis and Mineralization of [U-Ring- ^{14}C]-TNT, Posterbeitrag, NATO Advanced Study Institute: Enzymes in Heteroatom Chemistry – Green Solutions or Chemical Problems, **1999**, Berg en Dal bei Nimwegen, Niederlande
- H. Risse, M. Kröger, V. Linnemann, G. Fels, Chemical Composition, Distribution and Balance of TNT Degradation by a Sewage Sludge, Posterbeitrag, 7th International Symposium on the Synthesis and Applications of Isotopes and Isotopically Labelled Compounds, **2000**, Dresden