



universität
wien

MASTERARBEIT

„Kombination von chemischen und biologischen Methoden zum Abbau von Mineralölkohlenwasserstoffen im Boden“

verfasst von

Juliane Hörnig BSc

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 832

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Masterstudium Pflanzenwissenschaften

Betreuerin / Betreuer:

Dr. Thomas G. Reichenauer

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	8
1. Einleitung.....	11
1.1 <i>Phytoremediation und Fenton-Reaktion.....</i>	<i>11</i>
1.2 Die EPR-Spektroskopie.....	18
2. Materialien und Methoden	25
2.1 <i>Materialien.....</i>	<i>25</i>
2.1.1 Geräte.....	25
2.1.2 Probenmaterial (Bodenversuch)	25
2.1.3 Verbrauchsmaterial.....	26
2.1.4 Reagenzien und Chemikalien	26
2.2 <i>Methoden</i>	<i>28</i>
2.2.1 Versuchsübersicht (Bodenversuch).....	28
2.2.2 Herstellung der Reagenzien für Versuchsabschnitt 1	28
2.2.3 1. Versuchsabschnitt: Gefäßversuch	30
2.2.4 1. Versuchsabschnitt: Probenahme und Aufarbeitung.....	32
2.2.5 2. Versuchsabschnitt: Topfversuch.....	34
2.2.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse vom 1. und 2. Versuchsabschnitt	35
2.2.7 EPR-Messung der Fenton-Reaktion	35
3. Ergebnisse.....	39
3.1 <i>Ergebnisse des 1. und 2. Versuchsabschnittes: Abbau der Kohlenwasserstoffe im Boden</i>	<i>39</i>
3.2 <i>1. Versuchsabschnitt: Zusatzversuche mit Glucose</i>	<i>50</i>
3.3 <i>2. Versuchsabschnitt Phytoremediation: Einfluss der Behandlung auf die Pflanzenbiomasse</i>	<i>59</i>
3.4 <i>EPR-Messung der Fenton-Reaktion mit den verschiedenen Eisenverbindungen</i>	<i>63</i>
3.5 <i>Weitere EPR-Messungen zur Untersuchung der Eigenschaften der Fenton-Reaktion</i>	<i>75</i>
3.6 <i>Die Fenton-Reaktion durchgeführt mit verschiedenen Testsubstanzen</i>	<i>76</i>
3.7 <i>Photolyse-Reaktion von PBN mit Toluol und Di-tert-butylperoxid</i>	<i>79</i>
4. Diskussion	81
5. Ausblick	93
6. Zusammenfassung.....	94

7. Abstract.....	96
Anhang	99
Danksagung	101
Lebenslauf.....	103
Literaturverzeichnis.....	105

Abkürzungsverzeichnis

Aqua. bidest	zweifach destilliertes Wasser
a.u.	arbitrary units
BTEX	Benzol, Toluol, Ethylbenzol, Xylol
Cw	continuous wave
d	Tag
dB	Dezibel
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DMPO	5,5-Dimethyl-1-pyrolin-N-oxid
EDB	Ethylendibromid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	Elektroparamagnet Resonanz
ESR	Elektronspinresonanz
G	Gauß
KW	Kohlenwasserstoff
LCKW	Leichtflüchtige chlorierte Kohlenwasserstoffe
MKW	Mineralölkohlenwasserstoffe
MO	Mikroorganismen
MW	Mikrowellen
NIEHS	National Institute of Environmental Health Services
NPK	Stickstoff, Phosphor, Kalium
ns	Nanosekunde
PAH	Polyzyklische aromatische Kohlenwasser- stoffe
PBN	N-tert-butyl- α -phenylnitrone
TCE	1,1,2-Trichlorethen
TM	Trockenmasse
WHK	Wasserhaltekapazität
WHK _{max}	maximale Wasserhaltekapazität

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Kristallstruktur von Magnetit (© http://eggetsberger-info.blogspot.com)	15
Abb. 2:	Mögliche Wege des Schadstoffabbaus während der Phytoremediation ...	16
Abb. 3:	EPR-Gerät und dessen Blockdiagramm [20]	19
Abb. 4:	Schematisches Diagramm des Zeeman-Effekts mit dazugehörigen EPR-Signal (© chemwiki.ucdavis.edu)	19
Abb. 5:	Struktureller Aufbau vom DMPO-Addukt mit •OH	21
Abb. 6:	Reaktion des Spin-Trap DMPO mit OH-Radikalen	22
Abb. 7:	Struktureller Aufbau von PBN @www.benbest.com	22
Abb. 8:	Trapping eines Hydroxyl-Radikals mit Hilfe von PBN [30]	23
Abb. 9:	Hergestelltes Magnetit	29
Abb. 10:	Hergestelltes (Tee)-Nanoeisen	29
Abb. 11:	Kohlenwasserstoffgehalte der Bodenproben sB1 (sandig) und hB1 (humusartig) über die Zeit der 2 Versuchsabschnitte	39
Abb. 12:	Kohlenwasserstoffgehalte der Bodenprobe hB2 über die Zeit der 2 Versuchsabschnitte	44
Abb. 13:	Kohlenwasserstoffgehalte der Bodenprobe sB2 über die Zeit 2 Versuchsabschnitte	47
Abb. 14:	Kohlenwasserstoffgehalt der schwarzen Bodenprobe hB2 über die Zeit beider Versuchsabschnitte	50
Abb. 15:	Kohlenwasserstoffgehalt der humusartigen Bodenprobe (hB2) über die Zeit der beiden Versuchsabschnitte	52
Abb. 16:	Kohlenwasserstoffgehalt der sandigen Bodenprobe sB2 über die Zeit beider Versuchsabschnitte	55
Abb. 17:	Kohlenwasserstoffgehalt der sandigen Bodenprobe (sB2) über die Zeit der beiden Versuchsabschnitte	57
Abb. 18:	Phytoremediation beim Start (A), bei der Keimung von <i>Lolium perenne</i> (B) und beim Abschluss des Versuchs (C)	60
Abb. 19:	Trockenbiomasse der Pflanzenbestandteile	61
Abb. 20:	Intensität [a.u.] des DMPO-OH Spektrums der Fenton-Reaktion von FeSO ₄ und DMPO mit 8 µl H ₂ O ₂ im Durchflusssystem als Beispiel für die Berechnung der Reaktionskinetik	65
Abb. 21:	Berechnung des Logarithmus naturalis der Intensität mit der ermittelten Trendlinie sowie deren Formel $y = 3,0835 x + 17,656$ und dem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,835$	65
Abb. 22:	Ein typisches Spektrum eines DMPO-OH-Adduktes nach einer Fenton-Reaktion, mit dem dazugehörigen Strichdiagramm zur Veranschaulichung der Hyperfeinaufspaltung mit $a(14N) = 14,991$ G und $a(1H) = 14,808$ G	66
Abb. 23:	Intensität [a.u.] von DMPO-OH Spektren der Fenton-Reaktion mit FeSO ₄ -Reagenz und DMPO	67
Abb. 24:	Intensität [a.u.] von DMPO-OH Spektren der Fenton-Reaktion von FeSO ₄ und DMPO mit 8 µl H ₂ O ₂ im Durchflusssystem mit einer Reaktionskinetik von $v = 3,084$ a.u./h	67
Abb. 25:	Intensität von DMPO-OH Spektren der Fenton-Reaktion mit dem Reagenz FeCl ₃ und dem Spin-Trap DMPO	69
Abb. 26:	Intensität der DMPO-OH Spektren der Fenton-Reaktion mit FeCl ₃ als Fenton-Reagenz und 32 µl H ₂ O ₂ im Durchflusssystem und einer Reaktionskinetik von $v = 1,4154$ a.u./h	69

Abb. 27:	Intensität von DMPO-OH Spektren der Fenton-Reaktion mit dem Fenton-Reagenz (Tee)-Nanoeisen	71
Abb. 28:	Intensität von DMPO-OH Spektren der Fenton-Reaktion mit dem Reagenz (Tee)-Nanoeisen in Abhängigkeit von der Zeit und 32 μl H_2O_2 im Durchflusssystem einer Reaktionskinetik von $v = 7,726$ a.u./h	71
Abb. 29:	Intensität von DMPO-OH Spektren der Fenton-Reaktion mit dem Fenton-Reagenz Magnetit	73
Abb. 30:	Intensität der DMPO-OH Spektren der Fenton-Reaktion des Fenton-Reagenz Magnetit mit 2 μl H_2O_2 im Durchflusssystem	73
Abb. 31:	Intensität von DMPO-OH Spektren der Fenton-Reaktion mit dem Fenton-Reagenz (Tee)-Nanoeisen und der zweimaligen Zugabe von 8 μl H_2O_2	76
Abb. 32:	CwEPR Spektren der Reaktion der Fenton-Reagenzien mit der Testsubstanz n-Pentan sowie die Simulation von PBN-Radikal-Addukten.	77
Abb. 33:	Cw-EPR Spektren der Reaktion der Fenton-Reagenzien mit der Testsubstanz Cyclopentan sowie der Simulation von PBN-Radikal-Addukten	78
Abb. 34:	CwEPR Spektren der Reaktion der Fenton-Reagenzien mit der Testsubstanz Toluol sowie der Simulation von PBN-Radikal-Addukten	78
Abb. 35:	EPR-Spektrum von PBN gelöst in Toluol mit Di-tert-butylperoxid unter UV-Einfluss	80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Typen der Phytoremediation [18]	17
Tabelle 2: Die Werte zeigen Mittelwerte des KW-Gehaltes \pm Standardabweichungen (n = 5) der Bodenprobe sB1. Werte innerhalb einer Spalte, die von unterschiedlichen Buchstaben gefolgt werden, sind signifikant verschieden (Duncan's Test, p < 0,05).	40
Tabelle 3: Verbleibender KW-Gehaltes der einzelnen Behandlungen in Prozent zur Kontrollprobe vor Beginn der Phytoremediation. Der Wert der Kontrollprobe von 15.616 mg/kg TM wurde als 100% definiert.....	40
Tabelle 4: Die Werte zeigen Mittelwerte des KW-Gehaltes \pm Standardabweichungen (n = 5) der Bodenprobe hB1. Werte innerhalb einer Spalte, die von unterschiedlichen Buchstaben gefolgt werden, sind signifikant verschieden (Duncan's Test, p < 0,05).	41
Tabelle 5: Verbleibender KW-Gehaltes der einzelnen Behandlungen in Prozent zur Kontrollprobe vor Beginn der Phytoremediation. Der Wert der Kontrollprobe von 42.616 mg/kg TM wurde als 100% definiert.....	41
Tabelle 6: Die Werte zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 5) der humusartigen Bodenprobe hB2. Werte innerhalb einer Spalte, die von unterschiedlichen Buchstaben gefolgt werden, sind signifikant verschieden (Duncan's Test, p < 0,05)..	45
Tabelle 7: Verbleibender KW-Gehaltes der einzelnen Behandlungen in Prozent zur Kontrollprobe vor Beginn der Phytoremediation. Der Wert der Kontrollprobe von 38.390 mg/kg TM wurde als 100% definiert.....	45
Tabelle 8: Die Werte zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 5) der Bodenprobe sB2. Werte innerhalb einer Spalte, die von unterschiedlichen Buchstaben gefolgt werden, sind signifikant verschieden (Duncan's Test, p < 0,05).	48
Tabelle 9: Verbleibender KW-Gehaltes der einzelnen Behandlungen in Prozent zur Kontrollprobe vor Beginn der Phytoremediation. Der Wert der Kontrollprobe von 18.348 mg/kg TM wurde als 100% definiert.....	48
Tabelle 10: Die Werte zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 5) der Bodenprobe hB2. Werte innerhalb einer Spalte, die von unterschiedlichen Buchstaben gefolgt werden, sind signifikant verschieden (Duncan's Test, p < 0,05).	51
Tabelle 11: Verbleibender KW-Gehaltes der einzelnen Behandlungen in Prozent zur Kontrollprobe vor Beginn der Phytoremediation. Der Wert der Kontrollprobe von 38.390 mg/kg TM wurde als 100% definiert.....	51
Tabelle 12: Die Werte zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 5) der Bodenprobe hB2. Werte innerhalb einer Spalte, die von unterschiedlichen Buchstaben gefolgt werden, sind signifikant verschieden (Duncan's Test, p < 0,05)..	53
Tabelle 13: Verbleibender KW-Gehaltes der einzelnen Behandlungen in Prozent zur Kontrollprobe vor Beginn der Phytoremediation. Der Wert der Kontrollprobe von 38.390 mg/kg TM wurde als 100% definiert.....	53
Tabelle 14: Die Werte zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 5) der Bodenprobe sB2. Werte innerhalb einer Spalte, die von unterschiedlichen Buchstaben gefolgt werden, sind signifikant verschieden (Duncan's Test, p < 0,05)..	56

Tabelle 15: Verbleibender KW-Gehaltes der einzelnen Behandlungen in Prozent zur Kontrollprobe vor Beginn der Phytoremediation. Der Wert der Kontrollprobe von 18.348 mg/kg TM wurde als 100% definiert.	56
Tabelle 16: Die Werte zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichungen (n = 5) der Bodenprobe sB2. Werte innerhalb einer Spalte, die von unterschiedlichen Buchstaben gefolgt werden, sind signifikant verschieden (Duncan's Test, p < 0,05).	58
Tabelle 17: Verbleibender KW-Gehaltes der einzelnen Behandlungen in Prozent zur Kontrollprobe vor Beginn der Phytoremediation. Der Wert der Kontrollprobe von 18.348 mg/kg TM wurde als 100% definiert.	58
Tabelle 20: Tabellarische Auswertung des Quotienten aus Wurzel und Blatt der geernteten Versuchspflanzen	62
Tabelle 21: Tabellarische Übersicht über alle eingesetzten Fenton-Reagenzien und ihre zu erwartenden Reaktionen sowie die experimentell ermittelte Reaktionskinetik im Durchflusssystem in den ersten 30 Minuten.	64

1. Einleitung

1.1 *Phytoremediation und Fenton-Reaktion*

Die industrielle Entwicklung unserer Gesellschaft in den letzten 150 Jahren ist ohne die Nutzung von Mineralölprodukten nicht denkbar, denn sie wurde hauptsächlich von der Entwicklung des Verbrennungsmotors und anderen Maschinen getragen, die Kraft- und Schmierstoffe benötigen. Die Verwendung von Mineralölen bzw. deren Derivaten als Treibstoff, Kraftstoff, Heizmittel, Lösungsmittel und chemischen Grundstoff ist so umfangreich, dass fast sämtliche Lebensbereiche des Menschen direkt oder indirekt davon berührt sind. Bezüglich der Mengen, die gelagert, transportiert und umgeschlagen werden, sind die Mineralölkohlenwasserstoffe (MKW) bei weitem die bedeutendste Stoffgruppe. Beim Umgang mit diesen Chemikalien kommt es fortlaufend zu vielfältigsten Belastungen der Umwelt. Durch die Nutzung von Kraftstoffen wie Diesel und Benzin sowie die vielfach durch unsachgemäßen Umgang bedingte Kontamination von Böden mit umweltgefährdenden Komponenten wird ein globales Problem verursacht. Die hohen Konzentrationen an aliphatischen, aromatischen und polyzyklischen Kohlenwasserstoffen (PAH) sowie Schwermetallen beeinflussen die Umwelt auf verschiedenen Wegen negativ. Eine besondere Bedrohung stellt die Zerstörung der Selbstregulationskapazität der Biosphäre dar [5]. Diese Kontaminationen können im Idealfall mit Hilfe unterschiedlichster Methoden wieder entfernt werden. Eine dieser Methoden ist die Phytoremediation [6].

Phytoremediation ist die Nutzung von Pflanzen und ihrer assoziierten Mikroorganismen zur Reinigung von Boden, Wasser und Luft. Diese Technologie arbeitet mit den natürlichen Prozessen von Pflanzen und deren mikrobieller Rhizosphäre sowie mit Mikroorganismen, welche von Pflanzen gefördert werden. Mit Hilfe dieser Prozesse können Pflanzen und Mikroorganismen organische Substanzen abbauen und anorganische Stoffe verwerten [1]. Ein solcher Abbau benötigt meist mehrere Jahre und wird von vielen Faktoren wie z.B. Bioverfügbarkeit sowie Toxizität der Schadstoffe, Nährstoffangebot und Sauerstoffversorgung limitiert [2]. Die verschiedenen Methoden der Phytoremediation können für verschiedene Schadstoffklassen wie anorganische und organische Schadstoffe aber auch für kontaminierte Wasser angewendet werden. Zu den anorganischen Schadstoffen werden Stoffe wie Schwermetalle und Radionuklide, zu den organischen Substanzen zum Beispiel polyzyklische aromatische Kohlenwas-

serstoffe (PAK) und leichtflüchtige chlorierte Kohlenwasserstoffe (LCKW) gezählt [3]. All diese chemischen Verbindungen sind in vielen Bereichen des täglichen Lebens zu finden. Die wichtigste Aufgabe der Bodensanierung besteht in der Dekontamination betroffener Standorte, welche durch die Einwirkung verschiedener anthropogener Produkte sowie Abfälle belastet sind. Der stetige Anfall von Abfallstoffen aus dem industriellen und agrarischen Sektor, Siedlungsabfällen einschließlich Hausmüll sowie die Verwendung von Chemikalien für verschiedene Zwecke wie z.B. Insektizide, Pestizide, Herbizide, chemische Düngemittel und diverse umweltrelevante Produkte der chemischen Industrie belasten die Umwelt in großem Maße. Zur Remediation der mit verschiedenen Schadstoffen kontaminierten Standorte werden neue Technologien benötigt, welche zeitlich effizient und mit geringen Kosten anwendbar sind [4].

Die Kombination verschiedener Technologien zum Abbau von MKW hat sich bewährt. In dieser Arbeit wird eine chemische Vorbehandlung der Bodenproben mit nachfolgender Phytoremediation mit dem Ziel getestet, einen vollständigeren Abbau der in kontaminierten Böden vorkommenden Mineralölkohlenwasserstoffe zu ermöglichen [7]. Für die Versuche wurden zwei Bodenschichten von einem kontaminierten Standort ausgewählt. Zum einen wurde ein humusartiger Boden, zum anderen ein sandiges, direkt unter dem Oberboden befindliches Bodenmaterial verwendet. Zuerst wurden die Proben einer chemischen bzw. mikrobiellen Behandlung unterzogen. Um eine optimale Abbaurate der Kohlenwasserstoffe zu erhalten, wurden verschiedene Methoden auf ihre Fähigkeit, die C-C-Doppelbindungen in komplexen Kohlenwasserstoffgemischen zu spalten oder die C-Ketten anderweitig zu kürzen untersucht.

Für die chemischen Vorbehandlungen wurden verschiedene Substanzen zugefügt und in drei Versuchsansätzen unterteilt:

- I) Zugabe von Nährstoffen
- II) Zugabe von (Tee)-Nanoeisen und H_2O_2
- III) Zugabe von Magnetit und H_2O_2

Bei den zugegebenen Nährstoffen handelte es sich um Stickstoff-, Kalium- und Phosphatverbindungen. Die Nährstoffe sollten die im Boden natürlich vorkommenden, autotrophen Mikroorganismen stärken und dadurch die mikrobielle Abbaurate im Boden erhöhen. Die verwendeten Zusätze gelten als „Makro-Nährelemente“, welche bei der Energiegewinnung der pflanzlichen Photosynthese und als Grundstoff zum Aufbau zelleigener Verbindungen von großer Bedeutung sind. Das Element Phosphor wird innerhalb der Pflanze als Bestandteil von ATP sowie Nukleinsäuren, einigen Coenzy-

men und Phospholipiden benötigt. Das Nährelement Kalium ist als Aktivator vieler Enzyme notwendig und wichtig für die osmotische Balance wie auch für die Ionenbalance innerhalb der Pflanzenzelle. Außerdem ist Kalium für das Öffnen und Schließen der Stomata im Blatt erforderlich. Stickstoff gilt als wichtigstes Element der Aminosäuren, Proteine, Nukleotide, Nucleinsäuren, Chlorophylle und Coenzyme. Außerdem ist es in vielen Hormonen der Pflanze zu finden. Die assoziierten Bodenorganismen haben ähnliche Ansprüche an mineralische Nährstoffe wie die Höheren Pflanzen. N, P, K sind zum Überleben notwendig, wobei Phosphor wie bei Pflanzen ein Bestandteil von Nucleinsäuren, ATP und vielen Enzymen ist. Kalium ist in nahezu allen Zellen an der Regulation des Wasserhaushaltes beteiligt. Darüber hinaus hat Kalium stoffwechselregulatorische Aufgaben. Stickstoff hat wie bei den Pflanzen als Bestandteil von Proteinen eine essentielle Bedeutung.

Im zweiten Versuchsansatz wurde (Tee)-Nanoeisen hinzugegeben. Es handelte sich bei diesem Reagenz um Eisenpartikel, die die Tendenz besitzen mit Hilfe der van der Waals- und magnetischen Kräfte schnell größere Aggregate zu bilden. Um diese Bildung von großen Komplexen zu verhindern, wurden den Nanopartikeln lösliche Pflanzen-Polyphenol-Biopolymere zugesetzt. Die Polyphenole des Grünen Tees besitzen alkoholische funktionelle Gruppen, welche für eine Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) sowie als Stabilisatoren für Nanoeisen genutzt werden können [7].

Die eingesetzten Nanopartikel besaßen eine größere Reaktivität aufgrund der auf das Volumen bezogenen größeren Oberfläche.

Nach der Arbeit von Hoag et. al. [8] bestehen die weiteren Vorteile dieser Reagenzien zum Abbau von Kohlenwasserstoffen in der hohen Wasserlöslichkeit, der geringen Toxizität und ihrer Biodegradierbarkeit. Diese Eigenschaften waren für den weiteren Verlauf der Versuchsreihe von entscheidender Bedeutung, da sie keine zusätzliche Behandlung zwischen den chemischen Vorversuchen und der nachfolgenden Phytoremediation erforderlich machten.

Die (Tee)-Nanoeisenverbindungen ergeben durch Zugabe von Wasserstoffperoxid eine Fenton-ähnliche Reaktion in der Bodenprobe.

Als Fenton-ähnliche Reaktion werden solche Reaktionen zur Bildung von $\bullet\text{OH}$ -Radikalen bezeichnet, die unter Beteiligung niedervalenter Metallkomplexe, wie Cu(II)-, Ti(III)-, Cr(II)-, Co(II)-Atome stattfinden können. Laut der Arbeit von Usman et. al. (2012) [9] gilt diese Art der Reaktion als effektivste Methode zum Abbau und zur vollständigen Mineralisierung biologisch abbaubarer Kontaminanten.

Bei einer Oxidation durch eine Fenton-Reaktion handelt es sich im Allgemeinen um eine durch Eisensalze katalysierte Oxidation organischer Substrate mit Wasserstoffperoxid in saurem Milieu, wobei das dabei zum Einsatz kommende Fenton-Reagenz eine schwefelsaure Mischung aus Eisensalzen ist, welche meist FeSO_4 und H_2O_2 beinhaltet. Die Oxidation von Kohlenwasserstoffen läuft als Radikalkettenreaktion über eine Reihe von Zwischenstufen ab. Die Fenton-Reaktion im Allgemeinen ist nur eine Bildung von OH-Radikalen, alle weiteren Reaktionen gelten als Folgereaktion.

Bei der Fenton-Reaktion sollen die Kohlenwasserstoffe durch die gebildeten Hydroxyl-Radikale in einfachkettige C-C-Verbindungen gespalten werden.

In der Fenton-Reaktion werden Hydroxyl-Radikale durch die Interaktion von H_2O_2 und Eisensalzen produziert, wie in der nachfolgenden Gleichung (1) zu erkennen ist.



In der Fenton Reaktion katalysiert Fe(II) den Zerfall von Wasserstoffperoxid (Reaktion (1)), wobei Hydroxyl-Radikale ($\text{OH}\cdot$) gebildet werden, welche sehr stark oxidierend wirken [11]. Bei (Tee)-Nanoeisen bleibt das Fe(II) aufgrund der Komplexbildung der Metallverbindung in Lösung und die Nanopartikel reagieren mit H_2O_2 . Wasserstoffperoxid kann wiederum mit den gebildeten Hydroxyl-Radikalen reagieren und Wasser sowie RO_2 -Radikale bilden (Reaktion (2)). Die produzierten $\text{OH}\cdot$ -Radikale sind sehr effizient beim Abbau von Schadstoffen, welche teilweise schwer abbaubare, nicht biodegradierbare, xenobiotische Komponenten besitzen, die mit konventionellen Methoden sehr schwierig zu behandeln sind [12].

Für eine optimale Fenton-Reaktion wird ein niedriger pH-Wert von 2 bis 3 benötigt. Dagegen ist bei der Fenton-ähnlichen Reaktion ein fast neutraler pH-Wert durch Einsatz von Komplexbildnern um das Fe in Lösung zu halten, möglich. Der neutrale pH-Wert ist für die weitere Behandlung einer Bodenprobe, welche eine Nutzung von Mikroorganismen und Pflanzen vorsieht, von großer Bedeutung. Ansonsten wäre der Verlust der Fertilität des Bodens möglich.

Die Zugabe eines Fenton-Reagenz zum Substrat ist eine der am besten untersuchten und die mit am häufigsten eingesetzte Methode eines Oxidationsprozesses zur Re-

duktion von Schadstoffen wie Kohlenwasserstoffen, BTEX, chlorierten Alkanen und PAH [13].

PAH, die natürlichen Bestandteile von Erdöl und Kohle, sind bei der Remediation von kontaminiertem Boden aufgrund der Aktualität und der hohen Anzahl an vorkommenden Fällen in der Welt von besonderer Bedeutung. Die Biodegradation verläuft aufgrund der Ringstruktur der PAH und der dadurch hohen Stabilität langsamer. PAH können lang in der Umwelt überdauern und besitzen eine potentiell kanzerogene Wirkung [14].

In der dritten Versuchsreihe, der Zugabe von Magnetit, handelte es sich ebenfalls um die Erzeugung einer Fenton-ähnlichen Reaktion. Magnetit, auch bezeichnet als Tri-eisentetroxid, repräsentiert ein Mineral der Klasse Oxide, welches eine stabile Verbindung zwischen Eisen und Sauerstoff darstellt. Es ist als kubisches Kristallsystem, mit der chemischen Zusammensetzung $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Fe}^{\text{III}})_2\text{O}_4$ aufgebaut und besitzt einen Eisenanteil von bis zu 72,4%, was den starken Magnetismus der Verbindung erklärt [15].

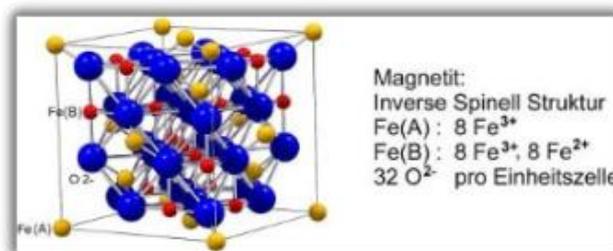


Abb. 1: Kristallstruktur von Magnetit (© <http://eggetsberger-info.blogspot.com>)

Zur Oxidationsdegradation der Mineralölkohlenwasserstoffe wurden Wasserstoffperoxid sowie Magnetit als Katalysator eingesetzt. Magnetit gilt als effektiver Katalysator für Fenton-ähnliche Oxidationen von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH) im Boden, wohingegen Fe(II)-Verbindungen alleine eine geringere Effektivität bei neutralem pH-Wert besitzen. Zusätzlich weist $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Fe}^{\text{III}})_2\text{O}_4$ eine ausgezeichnete strukturelle und katalytische Stabilität auf, welche in mehreren Oxidationszyklen genutzt werden kann [16].

Nach der chemischen oder biologischen Vorbehandlung der Bodenproben und der damit verbundenen Spaltung der Mineralölkohlenwasserstoffe, wurde im nächsten Schritt die auch als Phytoremediation bezeichnete Phytosanierung angewendet. Bei dieser Methode handelt es sich um die Sanierung eines kontaminierten Bodens mit Hilfe von Pflanzen. Die Phytoremediation wird in verschiedene Methoden unterteilt.

Eine dieser Methoden ist die Phytoextraktion, bei der Pflanzen vermehrt Schadstoffe aus dem Boden aufnehmen und in ihrer Biomasse akkumulieren. Die Schadstoffe werden sowohl in den Wurzeln als auch in oberirdischen Organen gespeichert. Nach Aufnahme der Substanzen werden die Pflanzen meist thermisch entsorgt. Die Phytoextraktion wird größtenteils bei Me-

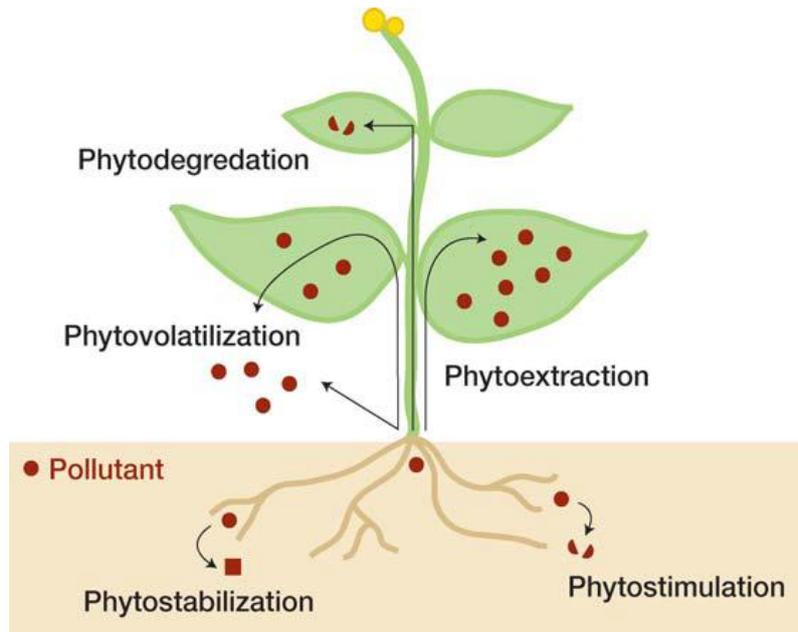


Abb. 2: Mögliche Wege des Schadstoffabbaus während der Phytoremediation [17]

tallen und anderen toxischen, anorganischen Stoffen wie Selen, Arsen und Radionukliden eingesetzt. Ein weiteres Verfahren ist die Phytodegradation, bei der die Schadstoffe nicht akkumuliert, sondern chemisch verändert werden, so dass sie ihre umweltgefährdende Relevanz verlieren. Dabei wird besonders die symbiotische Beziehung der Pflanzen zu Mikroorganismen genutzt, welche bei der Umsetzung der Schadstoffe eine entscheidende Rolle spielen. Besonders gut wirkt diese Methode bei organischen Stoffen, welche in Pflanzen gut transportiert werden können wie Herbizide, Trinitrotoluene und flüchtige organische Schadstoffe [17]. Zusätzlich existiert die Methode der Gewinnung von Metallen mit Hilfe von Pflanzen, welche unter dem Begriff Phytomining bekannt ist, sowie die Phytovolatilisation, bei der die Aufnahme der Stoffe durch die Wurzeln erfolgt, die anschließend nach dem Transport in die oberirdischen Organe an die Luft abgegeben werden. [6] Die Substanzen für diese Art des Stofftransports sind leicht flüchtige organische Komponenten wie Trichlor-ethylen und Methyl-3-butylether [17].

Tabelle 1: Typen der Phytoremediation [18]

Prozess	Funktion	Schadstoff	Pflanzen	Referenz
Phytoextraktion	Entfernen von Metallschadstoffen, welche in Pflanzen akkumulieren. Beseitigen von organischen Materialien, welche sich daraufhin in Pflanzengewebe konzentrieren.	Cd, Pb, Zn, As	<i>Viola baoshanensis</i> <i>Sedum alfredii</i> <i>Rumex crispus</i> <i>Helianthus annuus</i>	<i>Macek et al., 2000</i> <i>Prescott et al., 2002</i> <i>Zhunag et al., 2007</i>
Phytodegradation = Rhizodegradation	Pflanzen und assoziierte Mikroorganismen bauen organische Schadstoffe ab.	DDT	<i>Elodea canadensis</i> <i>Pueraria thunbergiana</i>	<i>Garrison et al., 2000</i> <i>Prescott et al. 2002</i> <i>Newman & Reynolds, 2004</i>
Rhizofiltration	Wurzeln absorbieren und adsorbieren Schadstoffe, hauptsächlich Metalle, aus Wasser.	Zn, Pb, Cd, As	<i>Brassica juncea</i> <i>Helianthus annuus</i>	<i>Dushenkov et. al, 1995</i> <i>Prescott et. al., 2002</i> <i>Verma et. al., 2006</i>
Rhizostabilisierung	Nutzung von Pflanzen zur Reduzierung der Bioverfügbarkeit von Schadstoffen in der Umwelt	Cu, Cd, Cr, Ni, Pb, Zn	<i>Anthyllis vulneraria</i> <i>Festuca arvensensis</i> <i>Koeleria vallsiana</i> <i>Armeria arenaria</i> <i>Lupinus albus</i>	<i>Prescott et. al, 2002</i> <i>Frerot et. al., 2006</i> <i>Vazquez et. al., 2006</i>
Phytovolatilisation	Nutzung von Pflanzen zum Transfer von Schadstoffen aus dem Boden in die Atmosphäre	Se, CCl ₄ , EDB, TCE	<i>Stanleya pinnata</i> <i>Zea mays</i> <i>Brassica sp.</i>	<i>Prescott et. al., 2002</i> <i>Ayotamuno & Kogbara, 2007</i>

Geeignete Pflanzen für die Phytoremediation im Allgemeinen sind solche, welche schnell wachsen, eine hohe Biomasse produzieren, konkurrenzfähig und von robuster Natur sind sowie Schadstoffe tolerieren. Außerdem ist die Eigenschaft der hohen Aufnahme rate, die Translokation und Akkumulation in erntbaren Geweben für die Phytoextraktion wichtig. Eine entscheidende Voraussetzung für die Phytodegradation sind möglichst tiefreichende, dichte Wurzelsysteme und hohe Konzentrationen von Enzymen, welche mit Schadstoffen reagieren können. Eine große Wurzelfläche ist auch für die Phytodegradation (Phytostimulation) notwendig, da diese das mikrobielle Wachstum beeinflusst [17].

1.2 Die EPR-Spektroskopie

Eine weitere Aufgabenstellung bestand darin, die bei der Fenton-Reaktion gebildeten Hydroxyl-Radikale und deren Reaktion mit den im Boden enthaltenen Kohlenwasserstoffen nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde nach einer Möglichkeit gesucht Radikale zu detektieren. Für diese Aufgabenstellung ist die EPR-Spektroskopie die geeignetste Methode.

Mit Hilfe der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie, kurz ESR oder EPR für Elektronen Paramagnetische Resonanz, wird die resonante Mikrowellenabsorption einer Probe in einem äußeren Magnetfeld gemessen. Dies macht sie zu einer hervorragenden Methode zur Untersuchung von Proben, die über ein permanentes magnetisches Moment, also ungepaarte Elektronen, verfügen [19].

Atome oder Moleküle mit ungepaarten Elektronen wie zum Beispiel Übergangsmetallkomplexe, Metalloproteine oder Radikale werden auch als paramagnetische Stoffe bezeichnet. Für die Untersuchung von Molekülen mit Hilfe des EPR-Gerätes ist es notwendig, dass die Stoffe paramagnetisch sind, da diamagnetische Moleküle, also solche Stoffe die nur gepaarte Elektronen besitzen, mit dieser Methodik nicht analysiert werden können.

Die EPR-Spektroskopie basiert auf der Absorption von Mikrowellenstrahlung durch das magnetische Moment des ungepaarten Elektrons, das im Magnetfeld nur zwei Zustände einnehmen kann (Zeeman Effekt, Abb. 4).

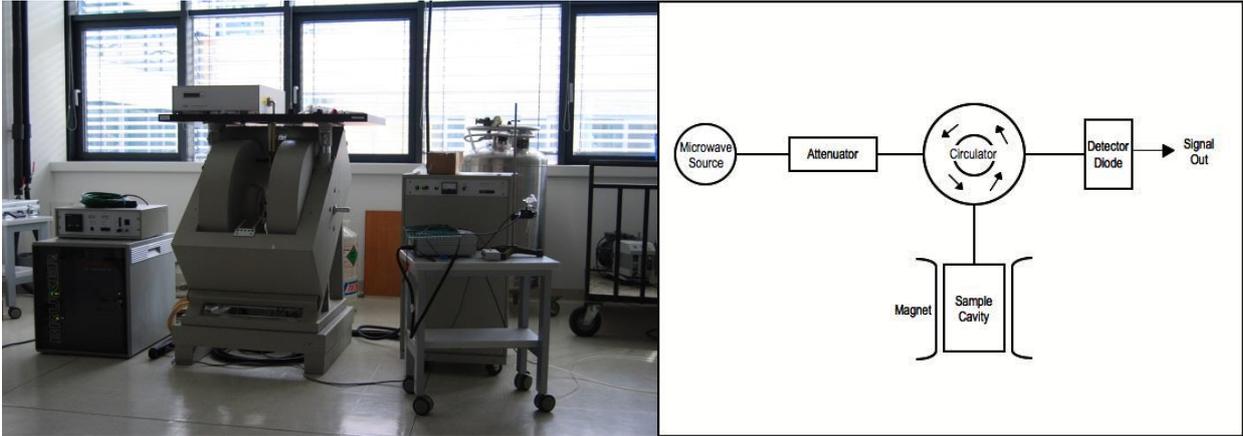


Abb. 3: EPR-Gerät und dessen Blockdiagramm [20]

Bei der Methode der EPR-Spektroskopie handelt es sich um eine Aufspaltung der Energieniveaus des Elektronenspins in einem äußeren Magnetfeld. Bei der Einwirkung des Magnetfelds haben Elektronen mit einer parallelen Ausrichtung eine höhere Energie als solche Elektronen mit antiparalleler Ausrichtung bezogen auf das Magnetfeld [21].

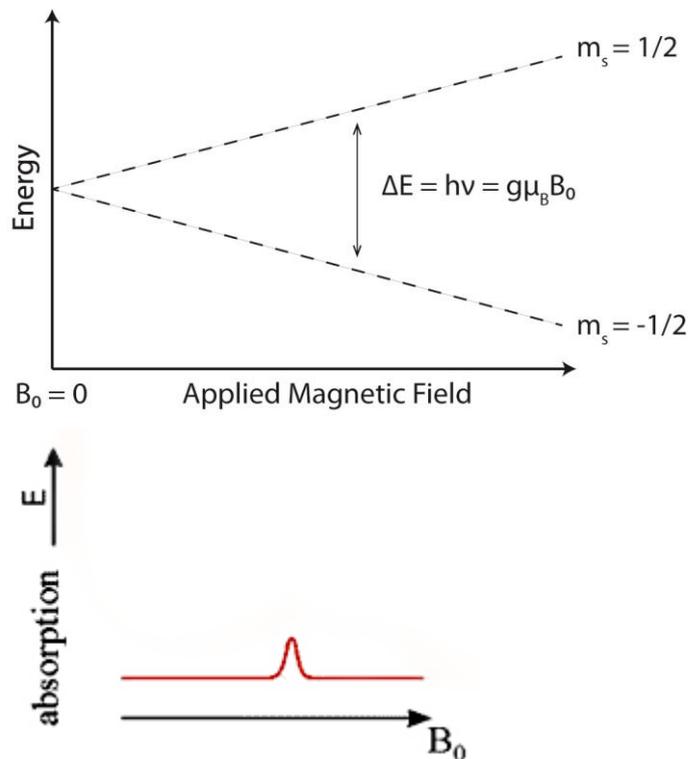


Abb. 4: Schematisches Diagramm des Zeeman-Effekts mit dazugehörigen EPR-Signal (© chemwiki.ucdavis.edu)

Befindet sich der Elektronenspin in einem statischen Magnetfeld (Abb. 4), so spalten sich die entarteten Energieniveaus auf. Bei der EPR-Messung wird der Spinübergang

zwischen Energieniveaus der gleichen Spinhauptquantenzahl durch Bestrahlung mit einer Mikrowelle, deren Energie der Aufspaltung der Niveaus entspricht, beobachtet und Absorption findet statt. In der Praxis wird die zu untersuchende Probe in einem veränderlichen Magnetfeld mit konstanter MW-Frequenz bestrahlt. Das aufgezeichnete EPR-Absorptionsspektrum erlaubt Rückschlüsse auf die chemische Umgebung der magnetischen Momente der Elektronenspins [22].

Um einen untersuchten Stoff genauer charakterisieren zu können, wird die Hyperfeinkopplung der ungepaarten Elektronen analysiert. Die EPR-Hyperfeinstruktur eines Spektrums ist eine Art Fingerabdruck der untersuchten paramagnetischen Substanz und ermöglicht die experimentelle Bestimmung der Elektronenverteilung in Molekülen sowie der räumlichen Erstreckung von Molekülorbitalen. Sie wird durch die Hyperfeinwechselwirkung des ungepaarten Elektrons mit Atomkernen mit Kernspin ungleich Null verursacht. Üblicherweise wird bei der Messung das „continuous wave“ Verfahren genutzt. Dies ist ein Verfahren bei dem es zur kontinuierlichen Variation des Magnetfeldes bei konstanter Mikrowellen-Strahlung kommt. Aus rein technischen Gründen und zur Verbesserung des Signal/Rauschverhältnisses wird das Magnetfeld moduliert und daher die erste Ableitung des Spektrums aufgezeichnet. Besonders genutzt werden die Informationen der Hyperfeinkopplung bei der Untersuchung von organischen Radikalen sowohl in Lösung als auch im Festkörper [24].

Als freie Radikale werden Atome oder Moleküle mit mindestens einem ungepaarten Elektron, die meist besonders reaktionsfreudig sind, bezeichnet. Bekannte Beispiele für freie Radikale sind Disauerstoff, Stickstoffmonoxid sowie Hydroxyl-Radikale [25].

Hydroxyl-Radikale gelten im biologischen System als die reaktivsten Spezies unter den Sauerstoff-Radikalintermediaten [26]. Die $\cdot\text{OH}$ -Radikale der Fenton-Reaktion sind von großem Interesse, da sie ein hohes Oxidationspotential und dadurch die Fähigkeit besitzen, nahezu alle Biomoleküle zu oxidieren. Die durch die Fenton-Reaktion gebildeten Radikale können mittels EPR-Spektroskopie nicht direkt detektiert werden, da sie zu kurzlebig sind (ungefähr 1 ns). Daher wurde die indirekte Technik des Spin-Trappings mit Hilfe von diamagnetischen Spin Traps wie z.B. 5,5-Dimethyl-1-pyrrolin-N-oxid (DMPO) angewandt (Abb. 4) [27].

Spin-Trapping zählt in der Chemie zu den analytischen Methoden für die Detektion und Identifikation von kurzlebigen freien Radikalen.

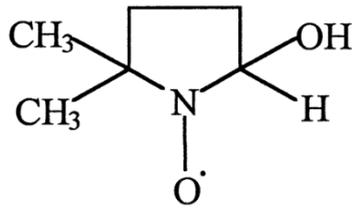


Abb. 5: Struktureller Aufbau vom DMPO-Addukt mit $\bullet\text{OH}$.

Beim Spin-Trapping kommt es zur Bindung des Radikals an einen Nitroxid- oder Nitron-basierenden Spin-Trap und zur Bildung eines paramagnetischen Spin-Adduktes, ein persistentes Radikal, welches mittels EPR-Spektroskopie detektiert werden kann (Abb. 5). Der in dieser Arbeit verwendete Spin-Trap DMPO besitzt die Fähigkeit stabile sauerstoff-zentrierte Radikal-Addukte zu bilden. DMPO hat zusätzlich die Eigenschaft inaktiv gegenüber Redoxreaktionen zu sein [28].

Alle spektroskopischen Untersuchungen wurden sowohl in einem „steady-state“-Verfahren als auch mit Hilfe einer Durchflusszelle durchgeführt. Beim „steady-state“-Verfahren wurde eine dünne 50 μl Kapillare mit dem Gemisch der benötigten Einzelkomponenten gefüllt und in das EPR-Gerät zur Messung gegeben. Beim Gebrauch der Durchflusszelle wurden die einzelnen Reaktionsbestandteile in zwei Gefäße gegeben. Die in einem Becherglas befindlichen Reagenzien reagierten nicht miteinander. Mit Hilfe einer Pumpe wurden die Flüssigkeiten der beiden Behältnisse in die Durchflusszelle gepumpt, welche sich schon im EPR-Spektrometer befand. Sofort nach dem Aufeinandertreffen der Komponenten wurde die Messung gestartet. Somit war es möglich, die Fenton-Reaktion von Beginn an zu verfolgen.

Der ideale Spin-Trap sollte reaktiv genug sein, die zu untersuchenden freien Radikale zu detektieren und zur gleichen Zeit inert gegenüber reaktiven dafür aber nicht-radikalen, diamagnetischen Spezies zu sein [29].

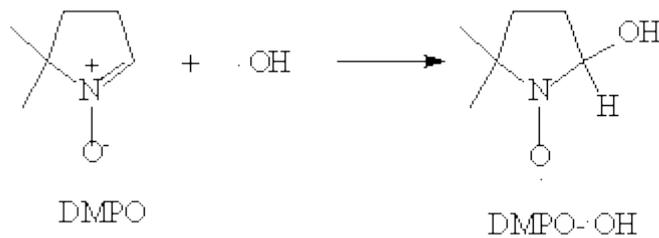


Abb. 6: Reaktion des Spin-Trap DMPO mit OH-Radikalen

Für die Untersuchung der Abbauprodukte von verschiedenen Testsubstanzen mittels OH-Radikalen wurde der Spin-Trap N-tert-butyl- α -phenylnitrone (PBN) verwendet, der speziell für kohlenstoff-zentrierte Radikale genutzt wird (Abb. 6). Um einen Einblick in die Reaktion von freien Radikalen mit möglichen Dieselbestandteilen zu erhalten und die Spaltungen von Bindungen innerhalb eines Moleküls zu detektieren, welche für den Abbau in kontaminierten Böden wünschenswert ist, wurden verschiedene charakteristische, exemplarische Bestandteile von Dieselkraftstoffen ausgewählt. Als solche Testsubstanzen wurden n-Pentan, Cyclopentan und Toluol ausgewählt.

Für die Untersuchung der Fenton-Reaktion mit den unterschiedlichen Verbindungen wurde eine spezielle Küvette, eine sogenannte Flachzelle genutzt. Bei einer Flachzelle handelt es sich um einen Quarz-Probenhalter aus planparallelen Platten im Abstand von 0,5 mm. Dadurch wird die Absorption der Mikrowellen von wässrigen Lösungen minimiert. Die Flachzelle wurde bei den Messungen mit dem Spin-Trap PBN mit Fenton-Reagenzien sowie n-Pentan, Cyclopentan und Toluol eingesetzt.

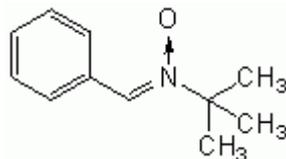


Abb. 7: Struktureller Aufbau von PBN ©www.benbest.com

Die Abbildung 6 zeigt den strukturellen Aufbau von PBN. Die kohlenstoff-zentrierten Spin-Trap-Addukte von PBN sind in polaren Lösungen nicht stabil und der Unterschied zwischen kohlenstoff- und sauerstoffzentrierten Radikalen ist gut sichtbar, einzig innerhalb der kohlenstoffzentrierten Radikale weichen die Hyperfein-Kopplungsmuster nicht ausreichend stark ab um detaillierte Strukturinformationen zu bekommen.

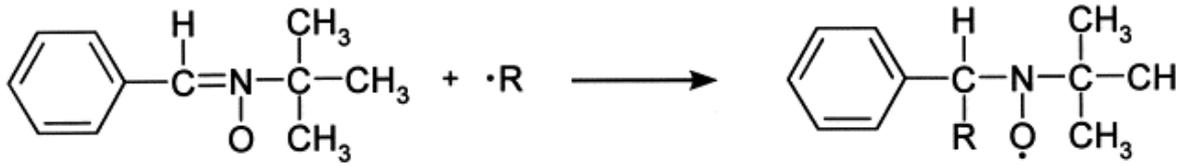


Abb. 8: Trapping eines Hydroxyl-Radikals mit Hilfe von PBN [30]

Die typische Reaktion von PBN mit einem Radikal wird in Abb. 8 gezeigt.

Die Spin-Addukte von PBN sind teilweise instabil in polaren Lösungsmitteln und dissoziieren spontan zu einem primären Degradationsprodukt, MNP/•H (t-butylhydronitroxide) [31]. Das Abbauprodukt ist bei Kontakt mit aktiven biologischen Systemen sowie in polaren Lösungen instabil. Die Zerfallsrate des Spin-Adduktes wird durch die lokale Umgebung, den Typ an freien Radikalen und den pH-Wert des Mediums beeinflusst [32].

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Horizontalschüttler	Modell Kühner	B. Braun Melsungen AG
Klimaschrank	UT 6	Heraeus Holding
IR-Spektroskop		Perkin-Elmer
Gefriertrockner	L05	LABIN GesmbH
EPR Spektrometer	EMX	Bruker
EPR- Auswertungsprogramm	WINEPR System	Bruker
pH-Meter	inoLab pH Level 2	Wissenschaftlich- Technische Werkstätten GmbH
Thermoschrank		Memmert GmbH & Co. KG
Verdünner	Mirco Lab 500 series	Hamilton Messtechnik GmbH
Heizplatte		VWR International
Pumpe		VWR International
Aqua bidest.- Anlage	Milli-Q Integral 10	EMD Millipore Corporation

2.1.2 Probenmaterial (Bodenversuch)

Für die Versuche der chemischen Vorbehandlung und der nachfolgenden biologischen Stimulation wurde Boden aus einem mit Diesel kontaminierten Bereich entnommen und in Unterboden, welcher aus sandigem Material bestand und in einen Oberboden, welcher von humoser Struktur war, unterteilt. Als Oberboden gelten die Proben mit den Abkürzung hB1 und hB2. Die Proben des Unterbodens besitzen die Bezeichnung sB1 und sB2.

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Glaswolle	
Pasteurpipette	VWR International
Quarzkapillare	Perkin-Elmer Inc.
EPR-Kapillare	Brand GmbH + Co KG
Stickstoffzelt	VWR International
Durchflusszelle	Wilmad-LabGlass

2.1.4 Reagenzien und Chemikalien

2.1.4.1 Chemikalien

2.1.4.1.1 Chemische Vorbehandlung

Chemikalie	Hersteller
Eisen(II)-sulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumnitrat	Merck KGaA, Darmstadt
Eisen(III)-nitrat	Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Calciumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid, 30%	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Calciumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumsulfat	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

2.1.4.1.2 EPR-Messung

Ascorbinsäure	Fluka (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)
Komplexon/ Titriplex III	Merck KGaA, Darmstadt
Eisen(III)-chlorid	Merck KGaA, Darmstadt

Tri-Kaliumphosphat-Trihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
5,5-Dimethyl-1-pyrolin-N-oxid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
N-tert-butyl- α -phenylnitrone	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Di-tert-butylperoxid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim

2.1.4.1.3 Bestimmung des Kohlenwasserstoffgehaltes

1,1,2-Trichloro-1,2,2-trifluoroethan	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim
Natriumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Aluminiumoxid	Fluka (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim)

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsübersicht (Bodenversuch)

Nachfolgend wurden die Versuchsbedingungen zur Übersicht stichpunktartig dargestellt. Der Versuche wurde unterteilt in:

- Abschnitt 1. : Gefäßversuch
 - 3 verschiedene Reagenzien wurden den Bodenproben zugeführt:
 1. Magnetit
 2. (Tee)-Nanoeisen
 3. NPK
 - Alle Bodenproben wurden für 3 Monate im Klimaschrank inkubiert
- Abschnitt 2.: Topfversuch
 - Alle Bodenproben wurden aus dem Klimaschrank in Töpfe überführt
 - Auf die Proben wurde die Versuchspflanze *Lolium perenne* gegeben
 - Alle Töpfe wurden für 2 Monate im Glashaus behandelt.

Zusätzlich zu den dargelegten Bodenexperimenten wurden EPR-Versuche durchgeführt.

2.2.2 Herstellung der Reagenzien für Versuchsabschnitt 1

2.2.2.1 1. Versuchsabschnitt Experiment 1: Herstellung Magnetit

Zur Herstellung von Magnetit (Abb. 9) wurden 400 ml einer 0,41 M FeSO₄-Lösung hergestellt. Die produzierte Lösung wurde im Wasserbad auf 90°C erhitzt. Nach Erwärmen wurden 200 ml einer 2,3 M KOH-Lösung sowie 200 ml einer 0,18 M KNO₃-Lösung zugegeben. Die hergestellte Lösung wurde für 1 h bei 90°C gerührt und daraufhin über Nacht bei 4°C gekühlt. Alle Arbeitsschritte wurden unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Die gekühlte Lösung wurde zur Entfernung aller noch vorhandenen Salze mit Aqua bidest. gespült und anschließend gefriergetrocknet [33].

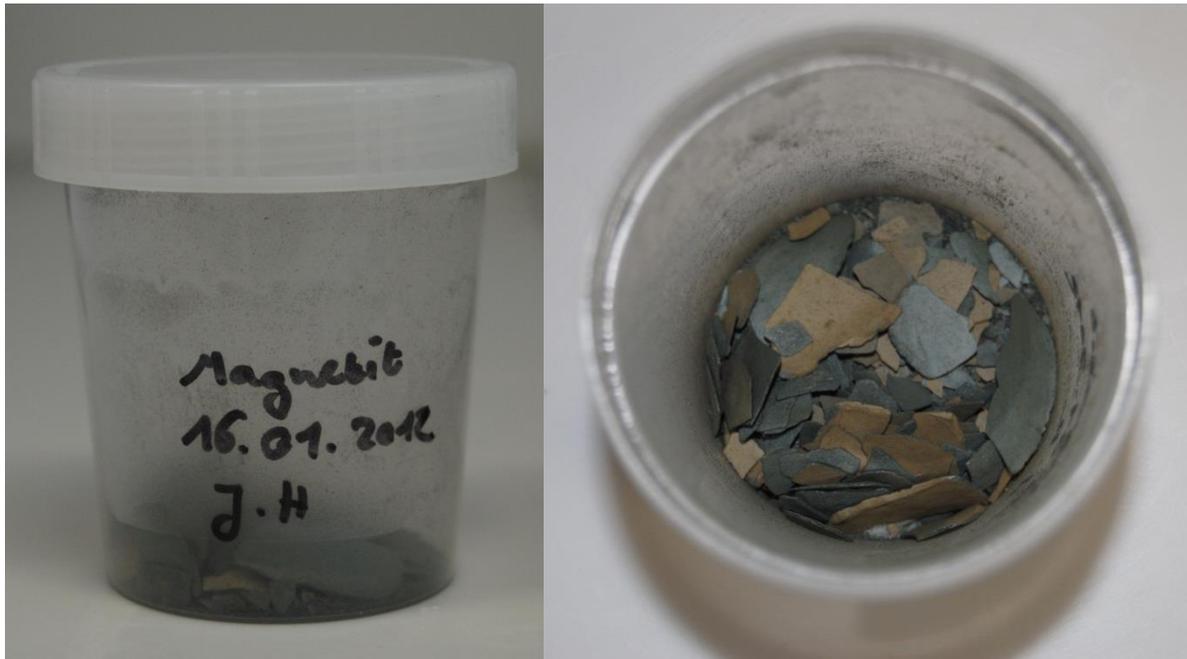


Abb. 9: Hergestelltes Magnetit

2.2.2.2 1. Versuchsabschnitt Experiment 2.: Herstellung (Tee)-Nanoeisen

Zur Herstellung von (Tee)-Nanoeisen (Abb. 10) wurden 10 ml eines Teeaufgusses mit 1 ml einer 0,1M $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ -Lösung versetzt. Für den Tee wurden 2 g Grüner Tee mit 100 ml heißem Wasser (100°C) übergossen und nach 4 min alle Feststoffe abfiltriert [34].



Abb. 10: Hergestelltes (Tee)-Nanoeisen

2.2.2.3 1. Versuchsabschnitt Experiment 3.: Zugabe Nährstoffe

Für die Zugabe von Nährstoffen in die jeweiligen Bodenproben zur Förderung des mikrobiellen Abbaus wurden die Chemikalien NH_4Cl und K_2HPO_4 in einem Gewichtsverhältnis von 1:16 miteinander gemischt. Es wurden 750 mg NH_4Cl und 100 mg K_2HPO_4 zu 200 g Bodenprobe hinzugegeben. Das molare Verhältnis betrug $\text{N} = 26,2\%$, $\text{K}_2 = 44,9\%$ und $\text{P} = 17,8\%$. Die mit NPK 2 gekennzeichneten Proben besaßen eine geringere Konzentration an mineralischem Dünger. Zu diesen Proben wurden 300 mg NH_4Cl und 40 mg K_2HPO_4 je 200 g Boden hinzugegeben.

2.2.3 1. Versuchsabschnitt: Gefäßversuch

Im 1. Versuchsabschnitt des Gesamtversuchs wurden die humusartigen und die sandigen Bodenproben mit Reagenzien zur chemischen Oxidation und zur biologischen Stimulation behandelt und in Glasgefäßen für 3 Monate im Klimaschrank inkubiert. Dabei wurden die verschiedenen Böden in einem unterschiedlich zeitlichen Rahmen untersucht. Das humusartige Bodenmaterial hB1 und der sandige Unterboden sB1 wurden über einen Zeitraum von 282 Tagen behandelt, die anderen Versuchsmaterialien über eine Zeitspanne von 155 Tagen.

2.2.3.1 1. Versuchsabschnitt: Gefäßversuche zur Biostimulation und chemischen Oxidation der humusartigen (hB2) und sandigen (sB2) Bodenproben

Für die biologische Stimulation und zur chemischen Oxidation wurden Gefäßversuche angesetzt. Vier verschiedene Varianten wurden verglichen.

Für alle Ansätze wurden jeweils 200 g der humusartigen (hB2) und sandigen Bodenprobe (sB2) (Korngröße ≤ 2 mm) in eine Glasflasche mit einem Volumen von 2 l eingewogen. Jede Variante wurde in 5-facher Wiederholung angesetzt. Zu den 5 Bodenproben wurde danach der jeweilige chemische Zusatz zu dosiert.

- I) Kontrolle: Als Kontrolle wurde der Boden unverändert in die Gefäße gegeben.
- II) Zugabe von Nährstoffen: Zur Förderung des mikrobiellen Abbaus wurden die Nährstoffe NH_4Cl und K_2HPO_4 hinzugegeben.

- III) Zugabe von (Tee)-Nanoeisen mit H_2O_2 : Für den Abbau mit Hilfe von (Tee)-Nanoeisen wurden 3,88 ml der (Tee)-Nanoeisen-Lösung mit 79 μ l H_2O_2 (30%) in den Boden gegeben und anschließend gemischt.
- IV) Zugabe von Magnetit mit H_2O_2 : Bei der Behandlung mit Magnetit wurden 40 mg der Eisenverbindung mit 3,96 ml H_2O_2 (30%) versetzt und die Probe gut durchmischt.

Um einen identischen Wassergehalt im Boden zu gewährleisten, wurden nach Bestimmung der Wasserhaltekapazität die Proben mit den errechneten Wassermengen auf 50% Wasserhaltekapazität (WHK) aufgefüllt.

Alle Gefäße wurden zur Minimierung der Verdunstung mit Glaswolle verschlossen und bei 20°C und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % für 56 Tage inkubiert. Eine Probenahme erfolgte zu Beginn der Untersuchung und anschließend alle 14 Tage.

2.2.3.2 1. Versuchsabschnitt: Behandlung der sandigen (sB1) und humusartigen (hB1) Bodenproben

Die sandigen (sB1) und humusartigen (hB1) Bodenproben wurden in einem zeitlich anderen Rahmen behandelt als die Proben mit den Kennziffern hB2 (humusartiger Oberboden) und sB2 (sandiger Unterboden). Insgesamt wurden 3 Gefäße pro Versuchsreihe eingesetzt.

Bei den Bodenproben mit der Nummer sB1 (humusartiger Boden) wurden 3 Ansätze mit Nährstoffen NH_4Cl und K_2HPO_4 durchgeführt. Außerdem wurden 3 Proben mit 3,88 ml (Tee)-Nanoeisen und 79 μ l H_2O_2 versetzt. Weiterhin wurden wiederum 3 Proben als Kontrolle im Klimaschrank bei 20°C und 95 % Luftfeuchtigkeit mitgeführt.

Die sandigen Bodenproben mit der Nummer hB1 wurden ausschließlich mit den Nährstoffen NH_4Cl und K_2HPO_4 behandelt und mit einer unbehandelten Kontrolle zusammen untersucht.

Der gesamte Abbauversuch dauerte 282 Tage. Nach 132 Tagen wurden dem Boden sB1 wiederum 750 mg NH_4Cl und 100 mg K_2HPO_4 als Nährstoffe zugegeben. Zu Beginn und nach jeweils 2 Wochen wurden Proben entnommen und auf ihren Kohlenwasserstoffgehalt untersucht.

Nach dem Ende der 282 Tage wurden die Böden zur Phytoremediation in Töpfe überführt und für 2 Monate im Glashaus kultiviert. Insgesamt dauerte dieser Versuch 338 Tage.

Nach der Beendigung des Experiments wurden die Proben bis zur Analyse des Kohlenwasserstoffgehaltes bei -20°C gelagert.

2.2.3.3 1. Versuchsabschnitt: Biologische Behandlung ohne chemische Vorversuche

Zu den bereits geschilderten Versuchen, welche eine chemische Behandlung mit verschiedenen Eisenverbindungen vor der biologischen Stimulation beinhalteten, wurden zusätzlich Experimente durchgeführt, welche ausschließlich biologisch behandelt wurden. In diesen Untersuchungen wurde in Bodenproben der Nummern hB2 (humusartiger Oberboden) und sB2 (sandiger Unterboden) *Lolium perenne* ausgesät. Den Böden wurden 750 mg NH_4Cl und 100 mg K_2HPO_4 als Nährstoffe zugesetzt. Alle Töpfe wurden mit allen weiteren Proben für 2 Monate im Glashaus kultiviert.

2.2.3.4 1. Versuchsabschnitt: Zusatzversuche mit Glucose

Aufgrund der geringen Abnahme der Mineralölkohlenwasserstoffe innerhalb des ersten Versuchsabschnittes, wurden weitere Experimente durchgeführt, welche den mikrobiellen Abbau unterstützen sollten. Zu jeweils zwei der mit NPK behandelten sandigen und humusartigen Bodenproben wurden nach einer Versuchszeit von 6 Wochen 8 g Glucose zugegeben und weiterhin wie die restlichen Proben im Klimaschrank aufbewahrt. Außerdem wurden jeweils einer Kontrollprobe von beiden Bodentypen Nährstoffe in Form von 1,3 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 0,2 g KH_2PO_4 sowie 8 g Glucose zugemischt. Auch diese Proben wurden im Klimaschrank gelagert und zusammen mit den anderen Bodenproben aufgearbeitet.

2.2.4 1. Versuchsabschnitt: Probenahme und Aufarbeitung

Beginnend mit dem Start des Gefäßversuchs und nach jeweils 2 Wochen wurden Proben zur Bestimmung des Gehalts an Kohlenwasserstoffen entnommen.

Zur Messung der Trockenmasse sowie zur Bestimmung der Konzentration an Kohlenwasserstoffen wurden 20 g der jeweiligen Probe bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

2.2.4.1 1. Versuchsabschnitt: Bestimmung der Trockensubstanz des Bodens

Zur Bestimmung der Trockenmasse wurden 5 g der jeweiligen Probe im Glasgefäß bis zur Gewichtskonstanz (24 h) bei 105°C getrocknet. Danach wurde die Masse der getrockneten Probe gravimetrisch bestimmt und der Trockensubstanzgehalt berechnet.

2.2.4.2 1. Versuchsabschnitt: Bestimmung des Gehaltes an Mineralölkohlenwasserstoffen

Zur Bestimmung des Gehaltes an Kohlenwasserstoffen wurden 5 g der jeweiligen Bodenprobe mit 5 g Natriumsulfat gemischt. Die Mischung wurde mit 30 ml 1,1,2-Trichloro-1,2,2-trifluoroethan (Freon) versetzt und bei 200 U/min für 3 h auf einem Horizontalschüttler geschüttelt.

Zur Entfernung der angereicherten Substanz wurden Pasteurpipetten mit Glaswolle verschlossen und Al_2O_3 zur Filtration zugesetzt. Der Überstand der jeweiligen Probe wurde filtriert und danach am IR-Spektroskop nach der DIN ISO 17155 (H18) vermessen.

Zur Messung wurden die jeweiligen Proben 1:60 mit 1,1,2-Trichloro-1,2,2-trifluoroethan verdünnt und das IR-Spektrum im Bereich von 2500 cm^{-1} bis 3500 cm^{-1} aufgenommen. Als Referenz diente das Lösungsmittel 1,1,2-Trichloro-1,2,2-trifluoroethan.

2.2.4.3 1. Versuchsabschnitt: Bestimmung pH-Wert im Boden

Die Bestimmung des pH-Wertes im Boden wurde nach der CaCl_2 -Methode durchgeführt. Dafür wurde eine 0,01 M CaCl_2 -Lösung hergestellt und diese mit der Bodenprobe im Verhältnis 1:2,5 gemischt. Die produzierte Suspension wurde für mindestens 2 h geschüttelt und nach Absetzen der Schwebstoffe der pH-Wert des Überstandes gemessen [35].

2.2.4.4 1. Versuchsabschnitt: Bestimmung der Wasserhaltekapazität der Böden

Zur Bestimmung des WHK_{max} wurden Metallzylinder verwendet, die an einem Ende mit einem feinmaschigen Gewebe verschlossen wurden. Die Gefäße wurden gewogen und jeweils mit ca. 200 g gut durchmischem, auf 2 mm gesiebt, naturfeuchten Bo-

den gefüllt, indem immer nur kleine Mengen zugegeben wurden und jedes Mal durch leichtes Aufklopfen für eine gleichmäßige Füllung gesorgt wurde. Jede Bestimmung wurde in 3-fach Wiederholung durchgeführt. Die Gefäße wurden erneut gewogen und in eine mit destilliertem Wasser gefüllte Wanne gesetzt, wobei das Niveau des Wasserspiegels ungefähr dem der Bodenoberfläche entsprach. War der Boden bis zur Oberfläche befeuchtet, wurden die Zylinder abgedeckt und in ein vorbereitetes Sandbad mit 10 cm Schütthöhe gestellt. Nach 2 h wurden die Gefäße in 30 min-Abständen gewogen, bis 2 Wägungen nahezu übereinstimmten.

Das Sandbad bestand aus einer Wanne, die am unteren Rand eine verschließbare Ausflussöffnung besaß und mit Feinsand (Körnung: 0,1-0,7 mm) gefüllt war. Das Sandbad wurde bei geschlossener Ausflussöffnung mit Wasser vollständig gesättigt. Das überschüssige Wasser wurde durch die Öffnung abgelassen. Ein feuchtes Tuch wurde auf den Sand gelegt. Für die Auswertung der gewonnenen Werte wurde folgende Berechnung genutzt:

$$100\% \text{ WHK}_{\max} = (a+b)/c * 100 = \text{H}_2\text{O-Aufnahme} / 100 \text{ g Trockengewicht}$$

- WHK_{max} = Wasserhaltekapazität
- a = H₂O-Aufnahme pro 100 g naturfeuchtem Boden
- b = H₂O-Gehalt in 100 g naturfeuchtem Boden
- c = Trockengewicht von 100 g naturfeuchtem Boden [35]

2.2.5 2. Versuchsabschnitt: Topfversuch

Nach Abschluss der chemischen Vorbehandlung folgte die Phytoremediation (biologische Stimulation), der als 2. Versuchsabschnitt aufgeführt wurde. Dafür wurden die einzelnen Bodenproben aus den Glasgefäßen in mit Gaze ausgelegte Plastiktöpfe überführt und es wurden 0,4 g Samen von *Lolium perenne* (Deutsches Weidelgras) ausgesät.

Der Boden wurde bis zur Feldkapazität bewässert. Die Töpfe wurden auf Untersetzer gestellt und ins Glashaus transferiert (bei Wetter- sowie Tages- und Nachtzyklus-abhängigen Temperaturen, dafür gleicher Luftfeuchtigkeit für 2 Monate aufbewahrt). Die Töpfe wurden täglich kontrolliert und manuell bewässert. Zu Beginn der Untersuchung sowie nach Abschluss der Versuche nach 2 Monaten wurden Bodenproben entnommen und der MKW-Gehalt bestimmt. Von den Versuchspflanzen wurden Pflanzenlänge, sowie Sproß- und Wurzelbiomasse bestimmt.

2.2.5.1 2. Versuchsabschnitt: Bestimmung der Pflanzenbiomasse

Nach der Beendigung der Phytoremediationsphase wurden die Gräser zur Bestimmung der Blattbiomasse rund 5 mm über dem Boden abgeschnitten und in eine Papierhülle gegeben. Danach wurden mit Hilfe eines 2 mm-Siebes alle Wurzeln aus dem Boden mit Wasser ausgewaschen und nach Entfernung möglichst aller Feuchtigkeit wiederum in eine Papierhülle gegeben. Das Eigengewicht der Hüllen (Tara) wurde zuvor bestimmt und nach Hinzugabe der Proben nochmals zur Bestimmung der Frischmasse (FM) gewogen. Davor wurden 50 g jeder Bodenprobe zur Bestimmung der Kohlenwasserstoffgehalts entnommen.

Die das Pflanzenmaterial enthaltenden Papierhüllen wurden für 3 Tage bei 60°C in einen Trockenschrank gegeben. Das Gewicht der Hüllen wurde wiederum ermittelt und die Trocken- sowie die Biomasse berechnet.

2.2.6 Statistische Auswertung der Ergebnisse vom 1. und 2. Versuchsabschnitt

Zur Auswertung der ermittelten Ergebnisse aus den Versuchsabschnitten 1 und 2 wurden Signifikanztests mit dem Programm IBM SPSS Statistics 21 durchgeführt.

Die Signifikanz wurde mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA), dem Post-hoc-Test Duncans Test, mit einem Signifikanzniveau von 5 % berechnet.

2.2.7 EPR-Messung der Fenton-Reaktion

2.2.7.1 Herstellung der Messreagenzien für die Fenton-Reaktion und Messung

500 µl eines 50 mM Phosphatpuffers pH 7,0 wurden in ein Eppendorfgefäß mit 500 µl einer 10 mM DMPO-Arbeitslösung gemischt. Anschließend wurden 2,5 µl einer 25 mM EDTA-Lösung sowie die jeweilige zu untersuchende Probe FeSO₄, Magnetit, FeCl₃ oder (Tee)-Nano-eisen als 10 mM Lösung und ein definiertes Volumen einer 100 µM H₂O₂-Lösung (30%ig) hinzugegeben. Die einzelnen Eisenproben wurden nach Zugabe von 2, 8 und 32 µl 30 %iger H₂O₂-Lösung auf ihre Reaktivität mit H₂O₂ und ihre Effizienz, •OH-Radikale zu bilden untersucht. Die Endkonzentration des H₂O₂ in der Messlösung ist bei 2 µl Zugabe 0,06% mit einer Stoffmengenkonzentration von c=17,6 µmol/l, bei 8 µl Zugabe 0,24% mit c=70 µmol/l und bei 32 µl 0,93% mit c=270 µmol/l.

Zur Messung wurde das Reagenzgemisch in eine 50 µl Kapillare überführt. Zusätzlich wurden Messungen mit der gleichen Konzentration und Zusammensetzung, aber mittels Flachzelle im Durchflusssystem getestet, um den zeitlichen Verlauf mit besonderem Augenmerk auf den Anfangsbereich zu erfassen.

Dafür wurden 2 Bechergläser vorbereitet. In ein Becherglas wurde Phosphatpuffer und die jeweilige Konzentration an H₂O₂ gegeben, in das zweite Becherglas wurde der Spin-Trap DMPO sowie EDTA und die gelöste, jeweilige Eisenverbindung zugeführt. Mit Hilfe einer Pumpe wurden beide Stoffgemische durch Schläuche in die Messzelle gepumpt. Vorhergehend wurden die Schläuche sowie die Durchflusszelle mit Aqua bidest. durchspült. Die mit H₂O gefüllte Zelle wurde im Gerät nach dem maximalen Cavity Dip ausgerichtet und der Resonator auf MW-Frequenz, Phase und MW-Energie abgestimmt. Der Pumpendurchfluss betrug 0,5 bis 1,0 ml/min. Nach der Zusammenführung der beiden Reagenzien wurde die Pumpe abgeschaltet und die Schläuche abgedichtet, sodass die Probelösung nicht zurückfließen konnte.

Die Messungen wurden an einem X-Band (9 GHz) EMX-Spektrometer von Bruker durchgeführt. Gemessen wurde bei 20 mW MW Energie, Time constant von 40,96 ms, Conversation time von 40,96 ms, Modulation Amplitude von 0,5 G, Modulationsfrequenz von 100 MHz und 10 scans wurden akkumuliert bei der Nutzung der Kapillare. Beim Einsatz der Durchflusszelle wurde die Anzahl an scans auf 2 mit einer Laufzeit von jeweils 42s eingestellt.

Ausgewertet wurden alle Spektren mit den Programmen Simfonia und WinEPR der Fa. Bruker. Die Intensität der einzelnen Spektren wurde durch die Bildung des zweiten Integrals mit dem Programm WinEPR berechnet.

2.2.7.2 Herstellung der Messreagenzien für die Fenton-Reaktion mit unterschiedlichen Modell-Substanzen

Zur Untersuchung der Fenton-Reaktion mit verschiedenen Testsubstanzen wurde 10 mM vom Spin-Trap eingesetzt. Alle anderen Substanzen blieben in ihrer Konzentration mit der bereits beschriebenen Zusammensetzung der Probelösung identisch. Die zu testenden Substanzen n-Pentan, Cyclopentan und Toluol wurden in der Spin-Trap-Lösung als 10 mM-Lösung gelöst. Das Reagenzgemisch wurde in eine Flachzelle überführt und sofort im EPR-Gerät gemessen.

2.2.7.3 Reaktion von Toluol mit Di-tert-butylperoxid unter UV-Bestrahlung

Di-tert-butylperoxid wurde photolytisch mittels UV-Licht gespalten und die dabei entstandenen Radikale als Oxidationsmittel für Toluol eingesetzt. Sowohl Peroxid-Radikale als auch Toluol-Radikale sind kurzlebig und daher wurde der Spin-Trap PBN zur Detektion verwendet. Es wurden 2,24 mg des Spin-Traps in 1,25 ml Toluol gelöst. Zu 1 ml der Lösung wurden 20 µl Di-tert-butylperoxid hinzugegeben. Die Lösung wurde in eine Flachzelle überführt und diese wurde in-situ mit einer UV-Lampe in der EPR-Cavity bestrahlt.

2.2.7.4 Bestimmung der Reaktionskinetik

Zur Bestimmung der Reaktionskinetik wurden aus der Intensität des Spin-Traps und dem Fenton-Reagenz im Durchflusssystem gewonnenen Werte, der Logarithmus naturale berechnet. Für die Berechnung wurden nur die Intensitäten des Anfangsbereichs verwendet. Die errechneten Werte wurden graphisch dargestellt und daraus die Trendlinie mit dazu gehörenden Formel und Bestimmtheitsmaß ermittelt. Die gewonnene Steigerung wurde für die Ermittlung der Reaktionskinetik genutzt.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse des 1. und 2. Versuchsabschnittes: Abbau der Kohlenwasserstoffe im Boden

Während der chemischen Vorbehandlung und zu Beginn der biologischen Stimulation sowie zum Abschluss der Untersuchung wurden Bodenproben zur Bestimmung des Kohlenwasserstoffgehaltes genommen.

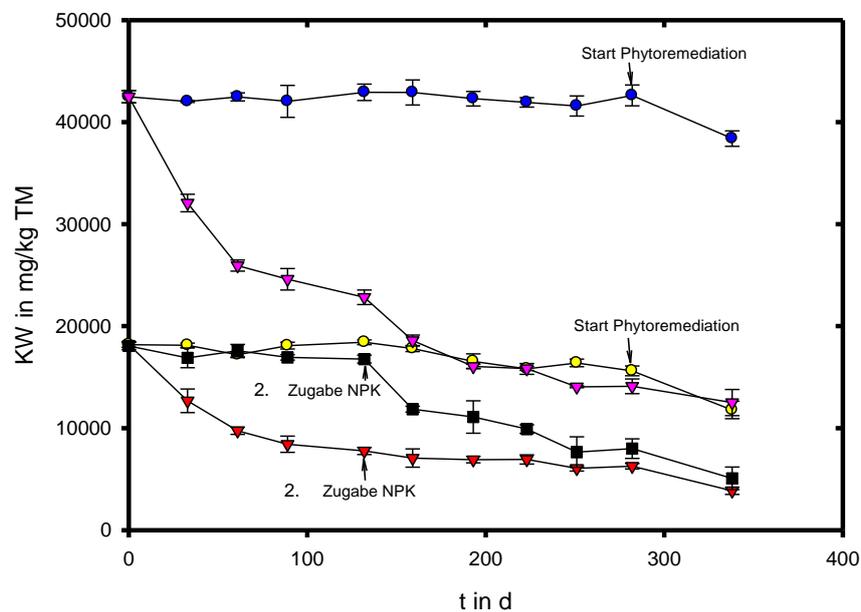


Abb. 11: Kohlenwasserstoffgehalte der Bodenproben sB1 (sandig) und hB1 (humusartig) über die Zeit der 2 Versuchsabschnitte mit sB1 Kontrolle (●), sB1 NPK (▼), sB1 (Tee)-Nanoeisen (■), hB1 Kontrolle (●), hB1 NPK (▼).

Tabelle 2: Die Werte zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 5$) der Bodenprobe SB1. Werte innerhalb einer Spalte, die von unterschiedlichen Buchstaben gefolgt werden, sind signifikant verschieden (Duncan's Test, $p < 0,05$). Die Buchstaben zeigen die Behandlungsmethoden an, zu denen die Probe signifikant unterschiedlich ist. Wenn die Buchstaben der einzelnen Methoden zu einem Zeitpunkt gleich sind, sind sie nicht signifikant unterschiedlich. Bei unterschiedlichen Buchstaben, sind die Methoden signifikant unterschiedlich.

Methode	Ausgangswert	KW in mg/kg TM											
		5. Woche	9. Woche	13. Woche	19. Woche	23. Woche	28. Woche	32. Woche	36. Woche	40. Woche	48. Woche		
Kontrolle	18.190 \pm 273 a	18.134 \pm 210 a	17.197 \pm 288 a	18.092 \pm 335 a	18.417 \pm 239 a	17.801 \pm 295 a	15.547 \pm 727 a	15.807 \pm 524 a	16.397 \pm 370 a	15.616 \pm 482 a	13.419 \pm 832 a		
NPK	18.190 \pm 273 a	12.680 \pm 1.158 b	9.741 \pm 350 b	8.423 \pm 797 b	7.765 \pm 345 c	7.066 \pm 894 c	6.915 \pm 317 c	6.935 \pm 454 c	6.055 \pm 261 b	6.275 \pm 273 b	4.112 \pm 461 b		
(Tee)- Nano Eisen	18.050 \pm 356 a	16.890 \pm 968 a	17.596 \pm 615 a	16.940 \pm 270 a	16.769 \pm 384 b	11.858 \pm 279 b	11.096 \pm 1.590 b	9.910 \pm 413 b	7.650 \pm 1.496 b	7.992 \pm 960 b	5.436 \pm 89 b		

Tabelle 3: Verbleibender KW-Gehaltes der einzelnen Behandlungen in Prozent zur Kontrollprobe vor Beginn der Phytoremediation. Der Wert der Kontrollprobe von 15.616 mg/kg TM wurde als 100% definiert.

Methode	KW in mg/kg TM Ende Phytoremediation	Verbleibender KW-Gehalt in %
Kontrolle	13.419	86 %
NPK	4.112	26 %
(Tee)-Nano Eisen	5.436	35 %

Tabelle 4: Die Werte zeigen Mittelwerte des KW-Gehaltes \pm Standardabweichungen ($n = 5$) der Bodenprobe hB1. Werte innerhalb einer Spalte, die von unterschiedlichen Buchstaben gefolgt werden, sind signifikant verschieden (Duncan's Test, $p < 0,05$). Die Buchstaben zeigen die Behandlungsmethoden an, zu denen die Probe signifikant unterschiedlich ist. Wenn die Buchstaben der einzelnen Methoden zu einem Zeitpunkt gleich sind, sind sie nicht signifikant unterschiedlich. Bei unterschiedlichen Buchstaben, sind die Methoden signifikant unterschiedlich.

Methode	KW in mg/kg TM										
	Ausgangswert	5. Woche	9. Woche	13. Woche	19. Woche	23. Woche	28. Woche	32. Woche	36. Woche	Start Phyto-remediation	Ende Phyto-remediation
Kontrolle	42.489 \pm 273 a	42.019 \pm 79 a	42.473 \pm 398 a	42.035 \pm 1.567 a	42.924 \pm 807 a	42.911 \pm 1.229 a	42.296 \pm 714 a	41.940 \pm 465 a	41.585 \pm 988 a	42.616 \pm 1.025 a	37.840 \pm 1.175 a
NPK)	42.489 \pm 273 a	32.070 \pm 862 b	25.935 \pm 540 b	24.598 \pm 1.051 b	22.831 \pm 716 b	18.591 \pm 535 b	16.056 \pm 206 b	15.838 \pm 182 b	14.051 \pm 92 b	14.103 \pm 718 b	10.943 \pm 601 b

Tabelle 5: Verbleibender KW-Gehaltes der einzelnen Behandlungen in Prozent zur Kontrollprobe vor Beginn der Phytoremediation. Der Wert der Kontrollprobe von 42.616 mg/kg TM wurde als 100% definiert.

Methode	KW in mg/kg TM	Verbleibender KW-Gehalt in %
Kontrolle	Ende Phytoremediation 37.840	89 %
NPK	10.943	26 %

In der Abb. 11 wird der Kohlenwasserstoffgehalt der sandigen Bodenproben (sB1) und der schwarzen Oberbodenproben (hB1) mit den verschiedenen chemischen Vorbehandlungen dargestellt. Bei dieser Versuchsreihe wurden den Proben mit NPK und (Tee)-Nanoeisen nach einem Versuchszeitraum von 132 Tagen ein zweites Mal Nährstoffe zugegeben. Beim humosen Oberboden (hB1) fand bei der Kontrolle keine Abnahme an Kohlenwasserstoffen statt. Die Konzentration an Kohlenwasserstoffen lag zu Beginn der Versuche bei 42.000 mg/kg TM und blieb bis zum Start der Phytodegradation bei diesem Wert. Zum Ende der Versuchsreihe betrug der Wert 38.554 mg/kg TM. Bei der schwarzen Bodenprobe (hB1), die mit Nährstoffen behandelt wurde, war eine starke Abnahme an Kohlenwasserstoffen von 42.675 mg/kg TM bei Beginn des Experiments auf 24.146 mg/kg TM nach einem Zeitraum von 100 Tagen zu ermitteln. Zum Start der Phytoremediation lag der Kohlenwasserstoffgehalt bei 14.154 mg/kg TM und sank nach dem Behandlungszeitraum von 2 Monaten auf 12.531 mg/kg TM.

Bei den sandigen Bodenproben mit der Kennziffer sB1 war ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrolle und den Versuchsansätzen mit NPK sowie (Tee)-Nanoeisen zu erkennen. Die Kontrollprobe blieb nahezu konstant bei einem Kohlenwasserstoffgehalt von 19.000 mg/kg Boden bezogen auf die Trockenmasse. In den mit Nährstoffen angereicherten Proben konnte eine kontinuierliche Abnahme des Gehalts an Kohlenwasserstoffen von 19.000 mg/kg TM zu Beginn auf 7.500 mg/kg TM nach 130 Tagen vor der erneuten Zugabe von Nährstoffen registriert werden. Nach wiederholter Beimischung von chemischen Zusatzstoffen, sank der Wert auf 5.900 mg/kg TM nach 280 Tagen, vor dem Start der Phytoremediation. Mit Hilfe der Phytoremediation konnte der Kohlenwasserstoffgehalt auf 4.000 mg/kg TM nach 338 Tagen reduziert werden.

Weiterhin konnten große Unterschiede bezogen auf die Dynamik des Kohlenwasserstoffabbaus in der sandigen Probe sB1 zwischen Boden mit Nährstoffzugabe und unter Zusatz von (Tee)-Nanoeisen festgestellt werden.

Für die Proben, welche mit (Tee)-Nanoeisen behandelt wurden, konnte zwischen Beginn des Versuchs und einem Untersuchungszeitraum von 160 Tagen keine signifikante Abnahme des Kohlenwasserstoffgehalts ermittelt werden. Erst nach Nährstoffzugabe erfolgte eine Reduktion des Kohlenwasserstoffgehalts.

Der auf der Phytoremediation basierende Schadstoffabbau besaß in diesem Versuchsansatz nur geringe Effektivität. Bei den Proben sB1 reduzierte sich der Koh-

lenwasserstoffgehalt während dieser Versuchsphase bei (Tee)-Nanoeisen und NPK von rund 7.700 mg/kg TM auf etwa 5.000 mg/kg TM sowie den Proben hB1 von etwa 14.000 mg/kg TM auf 12.500 mg/kg TM. In Tabelle 2 wurden alle Werte der Bodenprobe hB1 der Abbildung 11 mit der Standardabweichung sowie der Signifikanz zur Veranschaulichung dargestellt. Zusätzlich wurde in Tabelle 3 der verbliebene Kohlenwasserstoffgehalt der verschiedenen Behandlungsmethoden des humosen Bodentyps hB1 in Prozent ausgeführt mit dem Kohlenwasserstoffgehalt der Kontrollprobe beim Start der Phytoremediation als 100 %. Zu erkennen ist, dass die größte Abnahme wie schon vorhergehend beschrieben, mit der Zugabe an Nährstoffen erreicht wurde. Allein die Phytoremediation wurde eine Abnahme von 14% des KW-Gehaltes ermittelt. Mit der Zugabe von (Tee)-Nanoeisen wurde der KW-Gehalt um 65 % reduziert. Dies zeigt eine starke Steigerung der Abbaurate mit Hilfe einer Fe(II)-Verbindung sowie die hohe Effizienz mit Hilfe der Stimulation von Mikroorganismen. In Tabelle 4 wurde der KW-Gehalt der sandigen Bodenprobe sB1 mit den Standardabweichungen sowie der Signifikanz zu allen Probennahmen dargestellt. Außerdem wurde in Tabelle 5 der daraus berechnete verbliebene KW-Gehalt am Ende der Versuchsreihe im Bezug zu der Kontrolle zu Beginn der Phytoremediation, festgelegt als 100 %, aufgeführt. Bei der Zugabe von Nährstoffen wurde eine Abnahme des KW-Gehaltes bei der sandigen Bodenprobe sB1 um 74 % errechnet. Die Phytoremediation ohne vorhergehende chemische Behandlung oder biologische Stimulation erreichte eine KW-Gehaltsabnahme um 11 %.

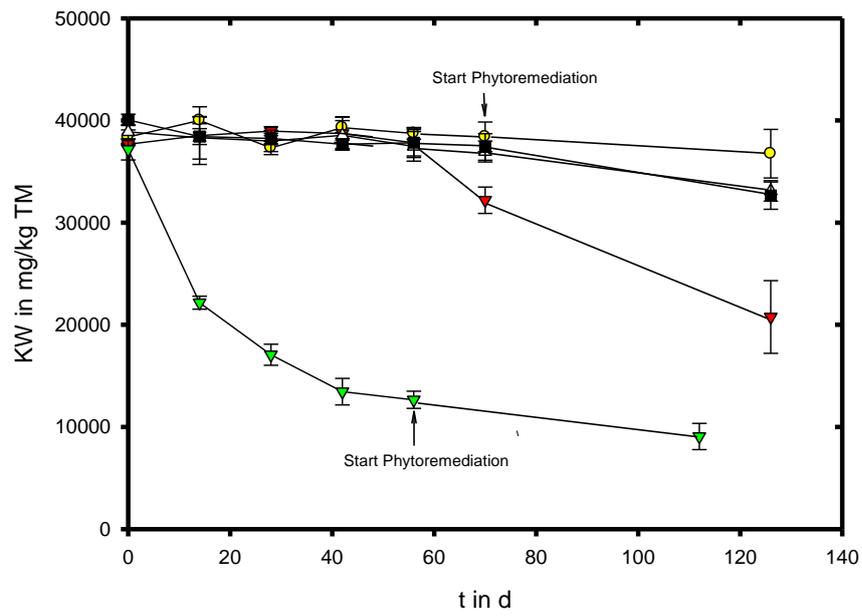


Abb. 12: Kohlenwasserstoffgehalte der Bodenprobe hB2 über die Zeit der 2 Versuchsabschnitte mit hB2 Kontrolle (●), hB2 NPK (▼), hB2 NPK 2 (▽), hB2 Magnetit (▲), hB2 (Tee)-Nanoeisen (■)

Tabelle 6: Die Werte zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 5$) der humusartigen Bodenprobe hB2. Werte innerhalb einer Spalte, die von unterschiedlichen Buchstaben gefolgt werden, sind signifikant verschieden (Duncan's Test, $p < 0,05$). Die Buchstaben zeigen die Behandlungsmethoden an, zu denen die Probe signifikant unterschiedlich ist. Wenn die Buchstaben der einzelnen Methoden zu einem Zeitpunkt gleich sind, sind sie nicht signifikant unterschiedlich. Bei unterschiedlichen Buchstaben, sind die Methoden signifikant unterschiedlich.

Methode	Ausgangswert	KW in mg/kg TM						
		2. Woche	4. Woche	6. Woche	8. Woche	Start Phytoremediation 10. Woche	Ende Phytoremediation 18. Woche	
Kontrolle	38.372 \pm 698 b	40.002 \pm 322 a	37.314 \pm 660 a	39.302 \pm 1.062 a	38.737 \pm 571 a	38.390 \pm 1.450 a	35.748 \pm 2.381 a	
NPK	37.674 \pm 119 b	38.518 \pm 2820 a	38.954 \pm 438 a	38.715 \pm 1.597 a	37.820 \pm 1.296 a	32.194 \pm 1.292 b	20.768 \pm 3.555 b	
NPK2	37.162 \pm 1.030 c	22.162 \pm 630 b	17.069 \pm 1.024 b	13.462 \pm 1.299 b		12.658 \pm 843 c	9.067 \pm 1.278 c	
Magnetit	38.885 \pm 701 b	38.301 \pm 2080 a	37.989 \pm 1.043 a	38.548 \pm 1.433 a	37.467 \pm 1.444 a	36.960 \pm 1.027 a	33.099 \pm 1.003 a	
(Tee)-Nanoeisen	40.061 \pm 551 a	38.421 \pm 777 a	38.233 \pm 518 a	37.671 \pm 405 ac	37.817 \pm 1.440 a	37.400 \pm 1.300 a	32.643 \pm 1.331 a	

Tabelle 7: Verbleibender KW-Gehaltes der einzelnen Behandlungen in Prozent zur Kontrollprobe vor Beginn der Phytoremediation. Der Wert der Kontrollprobe von 38.390 mg/kg TM wurde als 100% definiert.

Methode	KW in mg/kg TM Ende Phytoremediation	Verbleibender KW-Gehalt in %
Kontrolle	35.748	93 %
NPK	20.768	54 %
NPK 2	9.067	23 %
Magnetit	33.099	86 %
(Tee)-Nanoeisen	32.643	85 %

In Abb. 12 ist die Konzentration an Kohlenwasserstoffen in der schwarzen, humusartigen Bodenprobe hB2 über einen Zeitraum von 140 Tagen dargestellt. Nach dem Zeitraum von 80 Tagen wurden die Proben vom Klimaschrank zur Phytoremediation ins Glashaus überführt. In der Grafik wurde dieser Schritt oberhalb der Kontrollkurve mit der Beschriftung „Start Phytoremediation“ gekennzeichnet. Die Versuchsreihe NPK 2 wurde gegenüber NPK mit einer geringeren Konzentration an Nährstoffen gestartet. Dieser Versuchsansatz wurde unter gleichen Bedingungen und zeitlichem Ablauf, doch zu einem anderen Zeitpunkt durchgeführt. Mit der Kennzeichnung „Start Phytoremediation“ direkt unterhalb der Kurve von NPK 2 am 58. Tag wurde der Beginn des zweiten Abschnittes im Glashaus markiert. In den Versuchsansätzen NPK, Magnetit und (Tee)-Nanoeisen blieb die Konzentration an Kohlenwasserstoffen bis zum 60. Tag nahezu konstant. Erst mit dem Beginn der Phytoremediation konnte eine Abnahme von 37.817 mg/kg TM auf 32.643 mg/kg TM bei Beendigung des Versuchs nachgewiesen werden, wobei kein Unterschied zwischen den Proben mit (Tee)-Nanoeisen und Magnetit festgestellt werden konnte. Bei dem Boden mit Nährstoffzugabe war eine Reduzierung ab dem 40. Tag erkennbar, welche durch den Einfluss der Phytoremediation noch verstärkt wurde. Wie in Tabelle 6 dargestellt, ist ein signifikanter Rückgang von MKW ab dem Beginn der Phytoremediation bei Zugabe von Nährstoffen erkennbar. Die Tabelle 6 zeigt die ermittelten KW-Werte der Bodenprobe hB2 mit den Standardabweichungen sowie der errechneten Signifikanz. Die folgende Tabelle 7 stellt die aus den am Ende der Phytoremediation ermittelten KW-Werten im Bezug zur Kontrollprobe bei Beginn der Remediation, welche als 100 % angenommen wurde. Die Kontrollprobe blieb nahezu konstant bei 38.000 mg/kg TM, nur nach Zugabe von *Lolium perenne* wurde ein geringer Rückgang auf 36.000 mg/kg TM nachgewiesen. Daraus wurde ein verbliebener KW-Gehalt von 93 % errechnet. Die Kohlenwasserstoffgehalte der Proben mit Magnetit und (Tee)-Nanoeisen sanken auf 32.000 mg/kg TM zum Abschluss der Untersuchungen. Der KW-Gehalt ergab bei Magnetit eine Abnahme von 14 % und bei (Tee)-Nanoeisen eine Reduktion von 15 %. Im Vergleich zu reinen Phytoremediation ist dies eine Kohlenwasserstoffgehalts-Differenz von etwa 8 %. Doch konnte wie in Tabelle 6 ersichtlich, bei der Beendigung des Versuchs kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollprobe und Magnetit sowie (Tee)-Nanoeisen nachgewiesen werden. Böden mit geringerem Nährstoffgehalt enthielten am Ende eine Konzentration von 9.000 mg/kg TM, eine Abnahme des KW-Gehaltes von 77 %. Nach 126 Tagen besaßen die Proben mit

dem hohen Gehalt an anorganischem Dünger einen Kohlenwasserstoffgehalt von 20.000 mg/kg TM. Dabei wurde die Konzentration an Kohlenwasserstoffen durch den Einsatz von Pflanzen um 2.000 mg/kg TM reduziert. Es wurde eine Abnahme des Gehaltes an Kohlenwasserstoffen von 46 % errechnet, gegenüber der reinen Phyto-remediation sind dies 39 %.

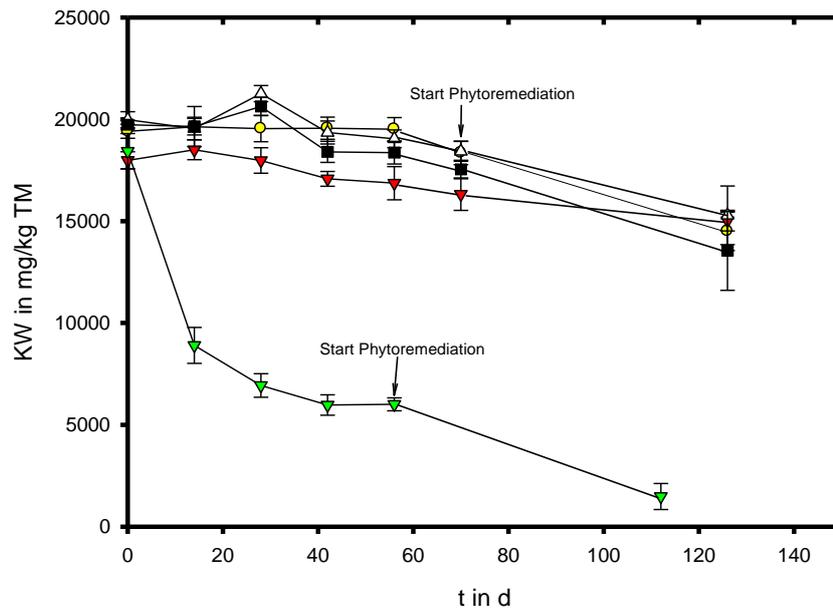


Abb. 13: Kohlenwasserstoffgehalte der Bodenprobe sB2 über die Zeit 2 Versuchsabschnitte mit sB2 Kontrolle (—○—), sB2 NPK (—▼—), sB2 NPK 2(—▼—), sB2 Magnetit (—▲—), sB2 (Tee)-Nanoeisen (—■—).

Tabelle 8: Die Werte zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 5$) der Bodenprobe sB2. Werte innerhalb einer Spalte, die von unterschiedlichen Buchstaben gefolgt werden, sind signifikant verschieden (Duncan's Test, $p < 0,05$). Die Buchstaben zeigen die Behandlungsmethoden an, zu denen die Probe signifikant unterschiedlich ist. Wenn die Buchstaben der einzelnen Methoden zu einem Zeitpunkt gleich sind, sind sie nicht signifikant unterschiedlich. Bei unterschiedlichen Buchstaben, sind die Methoden signifikant unterschiedlich.

Methode	Ausgangswert	KW in mg/kg TM						Start Phytoremediation 10. Woche	Ende Phytoremediation 18. Woche
		2. Woche	4. Woche	6. Woche	8. Woche	10. Woche	18. Woche		
Kontrolle	19.407 \pm 341 a	19.636 \pm 404 a	19.543 \pm 643 b	19.561 \pm 544 a	19.512 \pm 578 a	18.348 \pm 580 a	14.502 \pm 944 a		
NPK	17.986 \pm 421 c	18.503 \pm 487 a	17.977 \pm 623 c	17.076 \pm 365 c	16.865 \pm 815 b	16.322 \pm 798 b	15.024 \pm 509 a		
NPK2	18.434 \pm 865 bc	8.900 \pm 880 b	6.932 \pm 581 d	5.970 \pm 501 d		6.007 \pm 721 c	1.482 \pm 641 b		
Magnetit	19.981 \pm 394 ac	19.552 \pm 551 a	21.265 \pm 394 a	19.352 \pm 564 a	19.044 \pm 433 a	18.426 \pm 487 ab	15.289 \pm 1.440 a		
(Tea)-Nano Eisen	19.736 \pm 217 a	19.645 \pm 986 a	20.630 \pm 441 ab	18.401 \pm 520 b	18.361 \pm 554 a	17.537 \pm 454 a	13.542 \pm 1.940 a		

Tabelle 9: Verbleibender KW-Gehaltes der einzelnen Behandlungen in Prozent zur Kontrollprobe vor Beginn der Phytoremediation. Der Wert der Kontrollprobe von 18.348 mg/kg TM wurde als 100% definiert.

Methode	KW in mg/kg TM Ende Phytoremediation	Verbleibender KW-Gehalt in %
Kontrolle	14.502	79 %
NPK	15.024	81 %
NPK 2	1.482	8 %
Magnetit	15.289	83 %
(Tea)-Nano Eisen	13.542	74 %

Die Abnahme an Kohlenwasserstoffen des sandigen Bodens sB2 wird in der Abb. 13 dargestellt. Die Kontrollprobe blieb in ihrer Konzentration an Kohlenwasserstoffen bis zu Beginn der Phytoremediation konstant bei 20.000 mg/kg TM. Auch die Proben, welche (Tee)-Nanoeisen und Magnetit enthielten, zeigten bis zum Beginn der Phytoremediation keine signifikante Abnahme an Kohlenwasserstoffen (siehe Tabelle 8). Die Tabelle 8 zeigt alle gemessenen KW-Gehalte mit Standardabweichung und Signifikanz. In Tabelle 9 wurden die Endkonzentrationen der einzelnen Behandlungsmethoden mit der Kontrollprobe zu Beginn der Phytoremediation verglichen. Der KW-Wert der Kontrollprobe wurde als 100 % festgelegt. Die Versuche mit der Kennzeichnung NPK und NPK 2 unterschieden sich in ihrer Konzentration an zugegebenen Nährstoffen und wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Die mit NPK behandelte Probe wies schon zu Beginn einen leichten Rückgang in der Konzentration an Mineralölkohlenwasserstoffen auf. Der Gehalt reduzierte sich von rund 17.000 mg/kg TM auf 16.000 mg/kg TM zu Beginn der Phytoremediation.

Bei den Bodenproben mit der geringeren Konzentration an Nährstoffen war auch schon wenige Wochen nach Versuchsbeginn ein deutlicher Rückgang auf 10.000 mg/kg TM an Kohlenwasserstoffen zu verzeichnen. Zum Anfang der Remediation betrug der Wert ca. 6.000 mg/kg TM und sank innerhalb der 2 Monate in denen die Rhizodegradation durchgeführt wurde auf 1.400 mg/kg TM. Dies war eine KW-Gehaltsabnahme von 92 %. Alle anderen Proben typen blieben einheitlich bei einem Gehalt von etwa 14.500 mg/kg TM nach Beendigung der Versuche. Die Kontrollprobe besaß einen KW-Gehalt am Ende des Versuchs von 79 %. Bei der Bodenprobe, die mit Magnetit behandelt wurde, konnte eine Abnahme von 17 % ermittelt werden. Im Vergleich zur Kontrollprobe und somit zur reinen Phytoremediation wurde eine erhöhte, aber keine signifikante Abnahme des KW-Gehaltes mit Hilfe von Magnetit errechnet. Auch bei Zugabe von (Tee)-Nanoeisen wurde, eine der Kontrolle ähnliche, nicht signifikante Abnahme von 74 % errechnet. Zur Kontrolle ist dies eine Differenz von 5 %.

3.2. 1. Versuchsabschnitt: Zusatzversuche mit Glucose

Da innerhalb des 1. Versuchsabschnittes bei den Proben mit NPK keine Abnahme von Mineralölkohlenwasserstoffen zu verzeichnen war, wurden zusätzliche Versuche zur Förderung des mikrobiellen Klimas in den Bodenproben durchgeführt. Um eine höhere Konzentration und eine Stärkung der Mikroorganismen im Boden zu erreichen, wurden zwei der Proben, welche bereits Nährstoffe enthielten, Glucose zugemischt. Weiterhin wurden einer Kontrollprobe beider Bodentypen (sandig und humusartig) Nährstoffe und Glucose hinzugegeben.

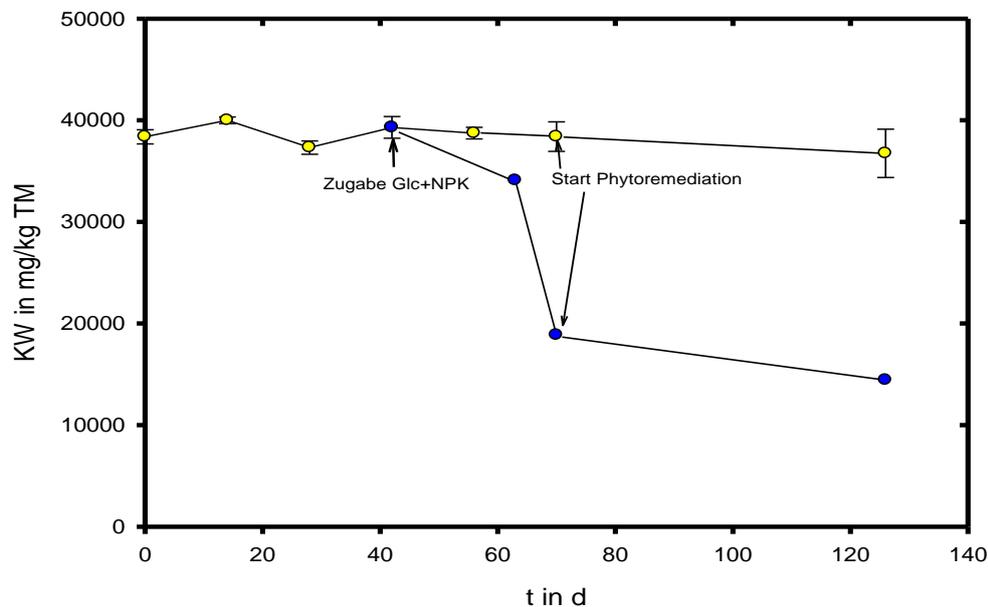


Abb. 14: Kohlenwasserstoffgehalt der schwarzen Bodenprobe hB2 über die Zeit beider Versuchsabschnitte mit hB2 Kontrolle (—●—), hB2 Kontrolle+NPK+Glc (—●—). Da es sich bei Kontroll+NPK+Glc um eine einzelne Probe handelt, konnten keine Standardabweichungen ab dem Beginn der Zugabe von Glc+NPK ermittelt werden.

Tabelle 10: Die Werte zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 5$) der Bodenprobe hB2. Werte innerhalb einer Spalte, die von unterschiedlichen Buchstaben gefolgt werden, sind signifikant verschieden (Duncan's Test, $p < 0,05$). Die Buchstaben zeigen die Behandlungsmethoden an, zu denen die Probe signifikant unterschiedlich ist. Wenn die Buchstaben der einzelnen Methoden zu einem Zeitpunkt gleich sind, sind sie nicht signifikant unterschiedlich. Bei unterschiedlichen Buchstaben, sind die Methoden signifikant unterschiedlich.

Behandlung	Ausgangswert	KW in mg/kg TM					
		2. Woche	4. Woche	6. Woche	8. Woche	Start Phyto-remediation	Ende Phyto-remediation
Kontrolle	38.372 \pm 698 a	40.002 \pm 322 a	37.314 \pm 660 a	39.302 \pm 1.062 a	38.737 \pm 571 a	38.390 \pm 1.450 a	35.748 \pm 2.381 a
Kontrolle +NPK+Glc	38.372 \pm 698 a	40.002 \pm 322 a	37.314 \pm 660 a	39.302 \pm 1.062 a	34.082 b	18.863 b	14.429 b

Tabelle 11: Verbleibender KW-Gehaltes der einzelnen Behandlungen in Prozent zur Kontrollprobe vor Beginn der Phyto-remediation. Der Wert der Kontrollprobe von 38.390 mg/kg TM wurde als 100% definiert.

Methode	KW in mg/kg TM	Verbleibender KW-Gehalt in %
Kontrolle	35.748	93 %
NPK	14.429	38 %

In Abb. 14 wird der hochsignifikante Unterschied zwischen der Kontrollprobe des humusartigen Bodentyps (hB2) und derselben Kontrolle nach Zugabe von Nährstoffen und Glukose sichtbar. Nach Zugabe der Zusatzstoffe am 42. Versuchstag war eine Abnahme des Kohlenwasserstoffgehaltes von 2000 mg/kg TM innerhalb von 21 Tagen erkennbar sowie eine weitere hochsignifikante Reduktion nach weiteren 7 Tagen auf einen Wert von 18862 mg/kg TM (siehe Tabelle 10). In Tabelle 11 ist der verbliebene KW-Gehalt der Proben dargestellt. Daraus ist zu erkennen, dass nach Zugabe der Nährstoffe der KW-Gehalt auf 38 % des Ausgangswertes gesunken ist. Die reine Phytoremediation ohne Vorbehandlung erzielte eine Abnahme an Kohlenwasserstoffen von 7 %.

Durch die Phytoremediation konnte keine signifikante Steigerung der Remediationsgeschwindigkeit erreicht werden.

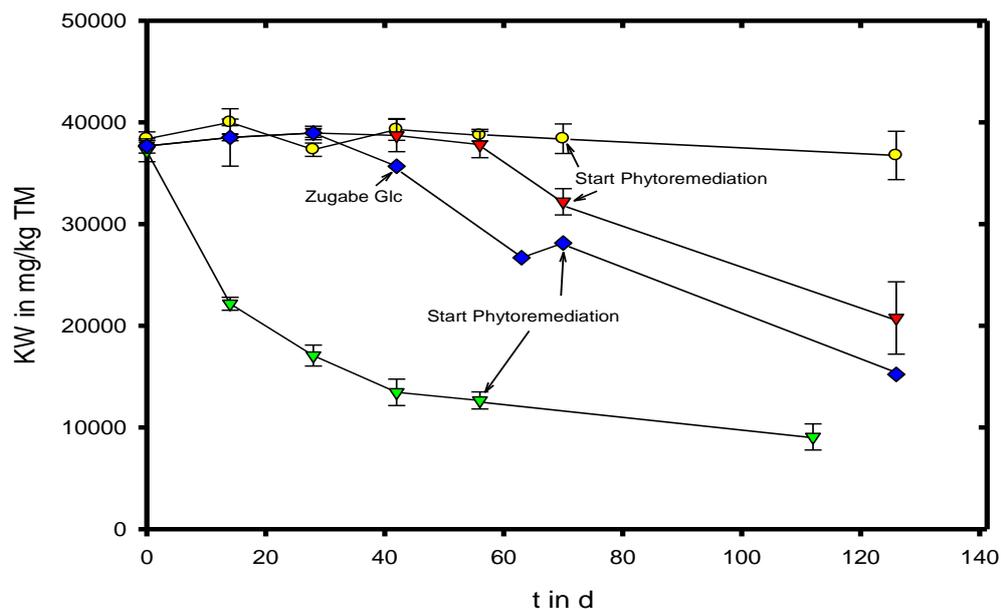


Abb. 15: Kohlenwasserstoffgehalt der humusartigen Bodenprobe (hB2) über die Zeit der beiden Versuchsabschnitte mit hB2 Kontrolle (●), hB2 NPK (▼), hB2 NPK 2 (▼) und hB2 NPK+Glc (▼). Da es sich bei NPK+Glc um eine einzelne Probe handelt, konnten keine Standardabweichungen ab dem Beginn der Zugabe Glc ermittelt werden.

Tabelle 12: Die Werte zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 5$) der Bodenprobe hB2. Werte innerhalb einer Spalte, die von unterschiedlichen Buchstaben gefolgt werden, sind signifikant verschieden (Duncan's Test, $p < 0,05$). Die Buchstaben zeigen die Behandlungsmethoden an, zu denen die Probe signifikant unterschiedlich ist. Wenn die Buchstaben der einzelnen Methoden zu einem Zeitpunkt gleich sind, sind sie nicht signifikant unterschiedlich. Bei unterschiedlichen Buchstaben, sind die Methoden signifikant unterschiedlich.

Methode	Ausgangswert	KW in mg/kg TM						Start Phytoremediation 10. Woche	Ende Phytoremediation 18. Woche
		2. Woche	4. Woche	6. Woche	8. Woche				
Kontrolle	38.372 \pm 698 a	40.002 \pm 322 a	37.314 \pm 660 a	39.302 \pm 1.062 a	38.737 \pm 571 a	38.390 \pm 1.450 a	35.748 \pm 2.381 a		
NPK	37.674 \pm 119 a	38.518 \pm 2820 a	38.954 \pm 438 a	38.715 \pm 1.597 a	37.820 \pm 1.296 a	32.194 \pm 1.292 b	20.768 \pm 3.555 b		
NPK 2	37.162 \pm 1.030 b	22.162 \pm 630 b	17.069 \pm 1.024 b	13.462 \pm 1.299 b		12.658 \pm 843 d	9.067 \pm 1.278 d		
NPK + Glic	38.372 \pm 698 a	40.002 \pm 322 a	37.314 \pm 660 a	39.302 \pm 1.062 a	34.082 b	18.863 c	14.429 c		

Tabelle 13: Verbleibender KW-Gehaltes der einzelnen Behandlungen in Prozent zur Kontrollprobe vor Beginn der Phytoremediation. Der Wert der Kontrollprobe von 38.390 mg/kg TM wurde als 100% definiert.

Methode	KW in mg/kg TM Ende Phytoremediation	Verbleibender KW-Gehalt in %
Kontrolle	35.748	93 %
NPK	20.768	54 %
NPK 2	9.067	23 %
NPK + Glic	14.429	38 %

In Abb. 15 wird ein Vergleich zwischen den verschiedenen Varianten der Nährstoffzugabe sowie die Wirkung von Glukose beim humusartigen Bodentyp (hB2) auf die KW-Konzentration dargestellt. Zusätzlich wurden alle ermittelten Werte mit Standardabweichung und Signifikanz in Tabelle 12 dargestellt. In Tabelle 13 wurden die verbliebenen KW-Gehalte in Prozent errechnet. Als 100 % wurde der Wert der Kontrollprobe zu Beginn der Phytoremediation verwendet. Zu erkennen ist, dass die Bodenprobe mit geringerer Nährstoffkonzentration die signifikant höchste Abnahme an Kohlenwasserstoffen von 28.224 mg/kg TM bis zum Ende des Versuchs aufwies. In Prozent betrug dies eine Abnahme von 77 %. Einen gesteigerten Abbau von Mineralölkohlenwasserstoffen zeigte auch die Probe, welcher nach einem Zeitraum von 40 Tagen Glukose zugeführt wurde. Die Anfangskonzentration an Kohlenwasserstoffen von 37.524 mg/kg TM wurde auf 15.481 mg/kg TM nach einem Zeitraum von 140 Tagen reduziert. Laut Tabelle 13 war eine Abnahme an Kohlenwasserstoffen von 62 % ermittelt wurden. Eine signifikant geringere Abnahme mit 54 % gegenüber den bereits erwähnten Versuchen zeigte die Probe NPK mit der erhöhten Konzentration an Nährstoffen. Bei der Kontrollprobe war keine signifikante Änderung der Konzentration an Kohlenwasserstoffen nachweisbar. Nach Beendigung des Versuchs wurde ein verbliebener KW-Gehalt von 93 % errechnet.

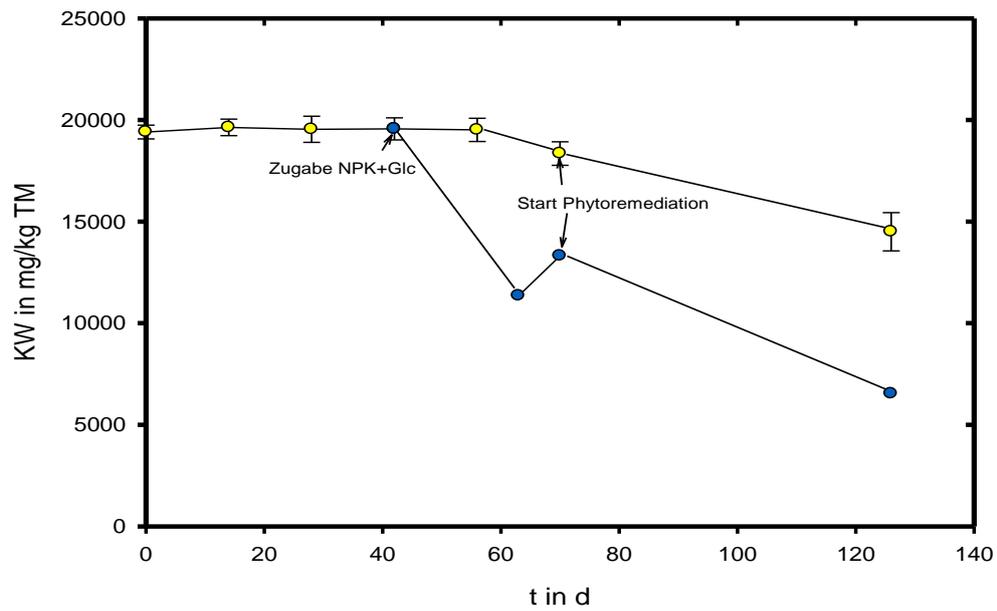


Abb. 16: Kohlenwasserstoffgehalt der sandigen Bodenprobe sB2 über die Zeit beider Versuchsabschnitte mit sB2 Kontrolle (●), sB2 Kontrolle+NPK+Glc (●). Da es sich bei Kontrolle+NPK+Glc um eine einzelne Probe handelt, konnten keine Standardabweichungen ab dem Beginn der Zugabe von Glc+NPK ermittelt werden.

Tabelle 14: Die Werte zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 5$) der Bodenprobe sB2. Werte innerhalb einer Spalte, die von unterschiedlichen Buchstaben gefolgt werden, sind signifikant verschieden (Duncan's Test, $p < 0,05$). Die Buchstaben zeigen die Behandlungsmethoden an, zu denen die Probe signifikant unterschiedlich ist. Wenn die Buchstaben der einzelnen Methoden zu einem Zeitpunkt gleich sind, sind sie nicht signifikant unterschiedlich. Bei unterschiedlichen Buchstaben, sind die Methoden signifikant unterschiedlich.

Behandlung	KW in mg/kg TM						
	Ausgangswert	2. Woche	4. Woche	6. Woche	8. Woche	Start Phytoremediation 10. Woche	Ende Phytoremediation 18. Woche
Kontrolle	19.407 \pm 341 a	19.636 \pm 404 a	19.543 \pm 643 a	19.561 \pm 544 a	19.512 \pm 578 a	18.348 \pm 580 a	14.502 \pm 944 a
Kontrolle + NPK + Glic	19.407 \pm 341 a	19.636 \pm 404 a	19.543 \pm 643 a	19.561 \pm 544 a	11.348 b	18.313 b	6.530 b

Tabelle 15: Verbleibender KW-Gehaltes der einzelnen Behandlungen in Prozent zur Kontrollprobe vor Beginn der Phytoremediation. Der Wert der Kontrollprobe von 18.348 mg/kg TM wurde als 100% definiert.

Methode	KW in mg/kg TM Ende Phytoremediation	Verbleibender KW-Gehalt in %
Kontrolle	14.502	79 %
NPK	6.530	36 %

In Abbildung 16 wird der Versuch dargestellt, einen Abbau von Mineralölkohlenwasserstoffen in der sandigen Bodenprobe sB2 nach der Zugabe von Nährstoffen in Form von Mineralien sowie Glukose zu erreichen. In Tabelle 14 wurden alle KW-Gehalte mit Standardabweichung und Signifikanz dargestellt. Tabelle 15 zeigt alle verbliebenen KW-Werte in Prozent nach Beendigung des Versuchs an. Es ist zu erkennen, dass eine signifikante Reduktion sofort nach Zugabe der Zusatzstoffe erfolgte. Innerhalb der ersten 20 Tage wurde der Gehalt an Kohlenwasserstoffen vom Anfangswert 19.383 mg/kg TM auf 11.445 mg/kg TM reduziert. Nach Beendigung des Versuchs wurde eine weitere Reduktion des Kohlenwasserstoffgehalts auf 6.668 mg/kg TM gemessen. Es wurde eine Abnahme an Kohlenwasserstoffen von 64 % ermittelt. Durch die Phytoremediation mit den Zusatzstoffen konnte eine gesteigerte Abnahme an Kohlenwasserstoffen erzielt werden von 18.313 mg/kg TM zu Beginn auf 6.530 mg/kg TM nach Beendigung. Dies ist eine Steigerung gegenüber der reinen Phytoremediation ohne Zugabe von Zusatzstoffen von 43 %.

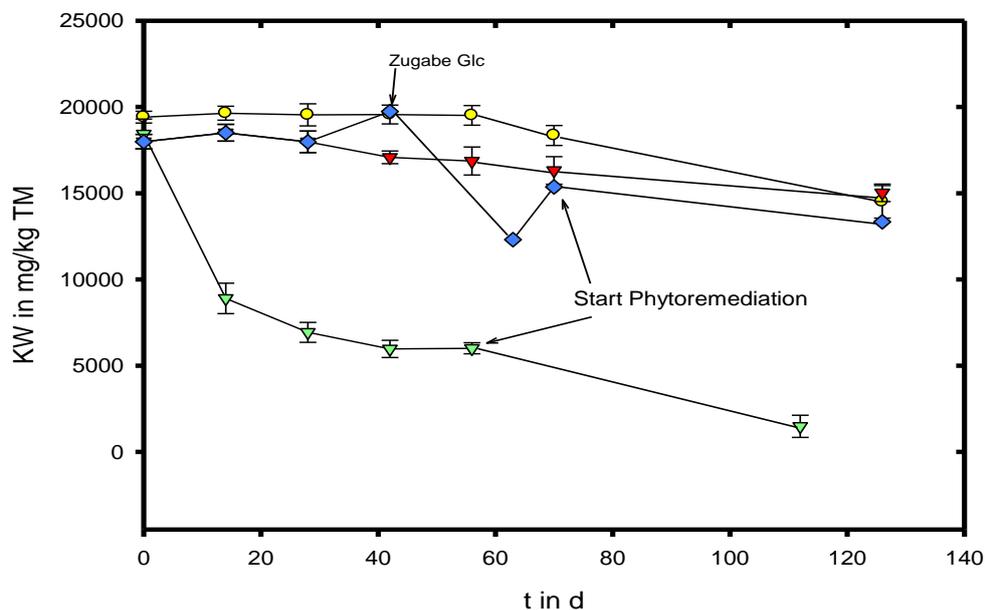


Abb. 17: Kohlenwasserstoffgehalt der sandigen Bodenprobe (sB2) über die Zeit der beiden Versuchsabschnitte mit sB2 Kontrolle (—●—), sB2 NPK (—▼—), sB2 NPK 2 (—▽—) und sB2 NPK+Glc (—◆—). Da es sich bei NPK+Glc um eine einzelne Probe handelt, konnten keine Standardabweichungen ab dem Beginn der Zugabe Glc ermittelt werden.

Tabelle 16: Die Werte zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichungen ($n = 5$) der Bodenprobe SB2. Werte innerhalb einer Spalte, die von unterschiedlichen Buchstaben gefolgt werden, sind signifikant verschieden (Duncan's Test, $p < 0,05$). Die Buchstaben zeigen die Behandlungsmethoden an, zu denen die Probe signifikant unterschiedlich ist. Wenn die Buchstaben der einzelnen Methoden zu einem Zeitpunkt gleich sind, sind sie nicht signifikant unterschiedlich. Bei unterschiedlichen Buchstaben, sind die Methoden signifikant unterschiedlich.

Behandlung	Ausgangswert	KW in mg/kg TM					
		2. Woche	4. Woche	6. Woche	8. Woche	Start Phytoremediation 10. Woche	Ende Phytoremediation 18. Woche
Kontrolle	19.407 \pm 341 a	19.636 \pm 404 a	19.543 \pm 643 a	19.561 \pm 544 a	19.512 \pm 578 a	18.348 \pm 580 a	14.502 \pm 944 a
NPK	17.986 \pm 421 c	18.503 \pm 487 a	17.977 \pm 623 b	17.076 \pm 365 b	16.865 \pm 815 b	16.322 \pm 798 b	15.024 \pm 509 a
NPK2	18.434 \pm 865 bc	8.900 \pm 880 b	6.932 \pm 581 c	5.970 \pm 501 c		6.007 \pm 721 c	1.482 \pm 641 c
Kontrolle + NPK+ Glc	19.407 \pm 341 a	19.636 \pm 404 a	19.543 \pm 643 a	19.561 \pm 544 a	11.348 c	18.313 a	6.530 b

Tabelle 17: Verbleibender KW-Gehaltes der einzelnen Behandlungen in Prozent zur Kontrollprobe vor Beginn der Phytoremediation. Der Wert der Kontrollprobe von 18.348 mg/kg TM wurde als 100% definiert.

Methode	KW in mg/kg TM Ende Phytoremediation	Verbleibender KW-Gehalt in %
Kontrolle	14.502	79 %
NPK	15.024	81 %
NPK 2	1.482	8 %
Kontrolle + NPK + Glc	6.530	36 %

In Abbildung 17 sind die KW-Konzentrationen von verschiedenen Abbauversuchen mit der sandigen Bodenprobe sB2 dargestellt. Verglichen wurden die Wirkungen unterschiedlicher Konzentrationen an Nährstoffen sowie die zusätzliche Gabe von Glukose auf den KW-Gehalt (siehe Tabelle 16 und 17). Die höchste Konzentration an Nährstoffen besaß die Probe mit der Bezeichnung NPK. Eine geringere Nährstoffkonzentration hatte die Probe NPK 2. Bei dem Versuch NPK+Glc wurde nach einem Versuchszeitraum von 42 Tagen zu der bereits untergemischten hohen Konzentration an Nährstoffen zusätzlich noch Glucose zur Förderung des Mikroorganismenwachstums hinzugegeben. Aus Abbildung 16 kann entnommen werden, dass der Einsatz der geringeren Konzentration an Nährstoffen die signifikant höchste Abnahme an Kohlenwasserstoffen mit 92 % innerhalb des Versuchszeitraums bewirkt hat. Bei zusätzlicher Zugabe von Glucose wurde ein verbliebener KW-Gehalt von 36 % errechnet. Die Kontrolle besaß nach Beendigung der Phytoremediation noch einen Kohlenwasserstoffgehalt von 79 %.

3.3 2. Versuchsabschnitt Phytoremediation: Einfluss der Behandlung auf die Pflanzenbiomasse

Nach der abgeschlossenen Vorbehandlung der Bodenproben in einem Zeitraum von insgesamt 3 Monaten, folgte Phytoremediation mit *Lolium perenne* und den natürlich assoziierten Mikroorganismen. Die Phytoremediation wurde über 2 Monate durchgeführt.



Abb. 18: Phytoremediation beim Start (A), bei der Keimung von *Lolium perenne* (B) und beim Abschluss des Versuchs (C)

In Abb. 18 sind die Auswirkungen der Phytoremediation auf die einzelnen Stadien der Biomasseproduktion erkennbar. Abbildung 18 A zeigt den Beginn des Versuchs. In Abb. 18 B sind die bereits gekeimten *Lolium perenne*-Samen zu sehen und in der Abb. 18 C werden die Topfversuche nach 2 Monaten und somit beim Abschluss der Versuchszeit gezeigt.

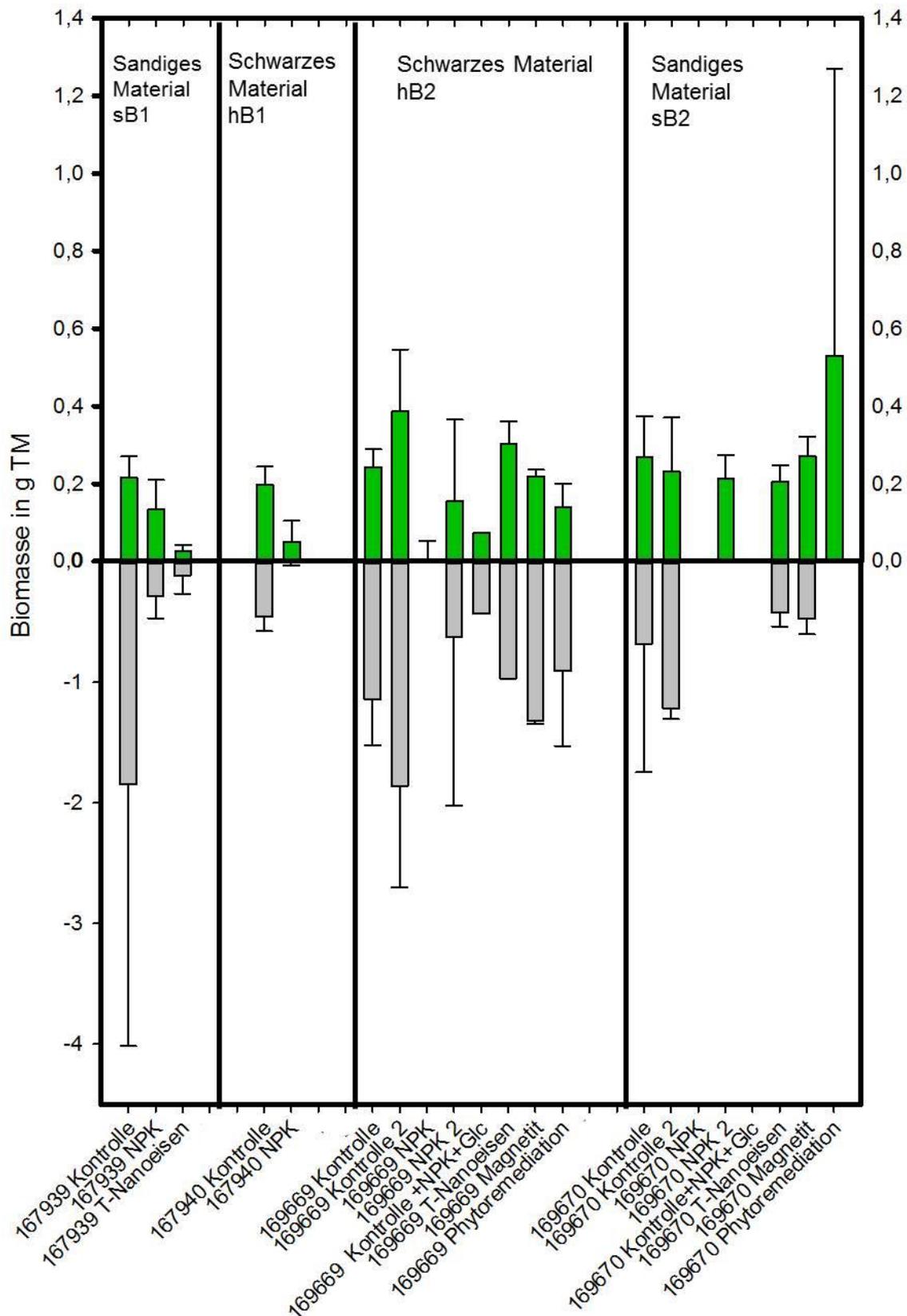


Abb. 19: Trockenbiomasse der Pflanzenbestandteile Blatt (■) und Wurzel (■) von *Lolium perenne* nach 2-monatiger Wachstumsperiode und Abschluss des Versuchsabschnitts 2

Tabelle 18: Tabellarische Auswertung des Quotienten aus Wurzel und Blatt der geernteten Versuchspflanzen

Methode	Quotient Wurzel/Blatt
Kontrolle (sandig) sB1	8,6
NPK (sandig) sB1	2,1
Nanoeisen (sandig) sB1	4,4
Kontrolle (schwarz) hB1	2,3
NPK (schwarz) hB1	0,3
Kontrolle (schwarz) hB2	4,7
Kontrolle 2 (schwarz) hB2	4,8
NPK (schwarz) hB2	0,0
NPK 2 (schwarz) hB2	4,0
Kontrolle+NPK+Glc (schwarz) hB2	5,8
Nanoeisen (schwarz) hB2	3,2
Magnetit (schwarz) hB2	6,0
Phytoremediation (schwarz) hB2	6,5
Kontrolle (sandig) sB2	2,5
Kontrolle 2 (sandig) 169671	5,3
NPK (sandig) sB2	0,0
NPK 2 (sandig) sB2	0,0
Kontrolle+NPK+Glc (sandig) sB2	0,0
Nanoeisen (sandig) sB2	2,1
Magnetit (sandig) sB2	1,7
Phytoremediation (sandig) sB2	0,0

Nach dieser Zeitspanne von 2 Monaten wurden die Pflanzen, welche jeweils in den schwarzen, humusartigen (hB1, hB2) und den sandigen Bodenproben (sB1, sB2) gewachsen waren, geerntet und ihre Biomasse bestimmt. Bei der Probe mit der Bezeichnung „Kontrolle + NPK + Glc“ wurde nach einem Zeitraum von 42 Tagen Nährstoffe sowie Glucose hinzugegeben. Die Zugabe der Reagenzien bewirkte keine signifikant erhöhte Trockenmasse.

Die Kontrollproben zeigten in jedem Experiment die höchste Gesamtbiomasse (Spross + Wurzel) (Abb.19 und Tabelle 19). Den höchsten Gesamtwert erreichte die humusartige Bodenprobe hB2 Kontrolle 2 mit einem Gewicht von 2,248 g TM aller Pflanzen im Topf.

Eine hochsignifikant niedrigere Biomasse laut Post-Hoc-Test mit $p < 0,05$ besaßen die Pflanzen, deren Boden vorhergehend mit Magnetit oder (Tee)-Nanoeisen behandelt wurden. Diese lag bei etwa 1,5 g TM Pflanzenmasse pro Topf. Es konnte festgestellt werden, dass zwischen Pflanzen die im Boden mit Magnetit und denen die in

(Tee)-Nanoeisen behandelten Boden wuchsen kein signifikanter Unterschied in der Biomasse bestand. Davon ausgenommen ist die mit (Tee)-Nanoeisen behandelte sandige Bodenprobe sB1, welche einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle in Bezug auf Blattbiomasse und Wurzelbiomasse zeigte. Trotz geringer Biomasse der Pflanzen, welchen eine zu hohe Konzentration an Nährstoffen zugegeben wurde, gab es keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollprobe. Die Versuchspflanzen der schwarzen, humusartigen Bodenproben mit den Nummern hB1 NPK 2, 167669 NPK 2 und der sandigen Probe sB2 NPK 2 bildeten keine signifikant größere Blattmasse gegenüber der Kontrollprobe.

Das Verhältnis zwischen Blatt- und Wurzelmasse schwankte stark zwischen dem höchsten Wert von 8,6 bei der Kontrollprobe des sandigen Bodens sB1 und dem geringsten auswertbaren Ergebnis von 0,3 bei einer Probe des schwarzen Bodens hB1, welche mit Nährstoffen behandelt wurde. Grundsätzlich wurde mehr Wurzel- als Blattmasse gebildet. Nur bei der sandigen Bodenprobe sB2 (Phytoremediation) konnte kein Wurzelbereich, sondern nur Blattmasse nachgewiesen werden. Eine Erklärung für dieses Ergebnis könnte der Verlust der Wurzeln beim Ernten und Auswaschen der Proben sein.

Die höchste Wurzelbiomasse erreichte die humusartige Bodenprobe hB2 Kontrolle 2 mit einer Masse von 1,9 g TM Wurzeln im Topf. Alle anderen Pflanzen besaßen eine Wurzelbiomasse zwischen 0,4 g und 1,1 g TM pro Behältnis.

3.4 *EPR-Messung der Fenton-Reaktion mit den verschiedenen Eisenverbindungen*

Zur Untersuchung des Reaktionsverlaufes einer Fenton-Reaktion wurde die EPR-Spektroskopie angewandt. Durch den Einsatz des Spin-Traps DMPO wurden die Reagenzien FeSO_4 , FeCl_3 , (Tee)-Nanoeisen und Magnetit auf ihre Fähigkeit getestet, Hydroxyl-Radikale zu bilden.

Zusätzlich wurden, um Informationen über den Beginn der Fenton-Reaktion (wenige Sekunden nach dem Reaktionsstart) mit den zu testenden Eisenverbindungen zu bekommen, Messungen mit einer Durchflusszelle durchgeführt. Mit diesem Verfahren war es möglich, den zeitlichen Verlauf der Reaktion besonders in den ersten Minuten

der Messungen sowie den Gehalt an gebildeten freien Radikalen in Abhängigkeit von der Reaktionszeit zu bestimmen.

Tabelle 19: Tabellarische Übersicht über alle eingesetzten Fenton-Reagenzien und ihre zu erwartenden Reaktionen sowie die experimentell ermittelte Reaktionskinetik im Durchflusssystem in den ersten 30 Minuten.

Fenton-Reagenz	Fenton-Reaktion	Reaktionsordnung	Reaktionskinetik im Durchflusssystem
FeSO ₄	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}\cdot + \text{OH}^-$	Anfangsbereich: Reaktion 1. Ordnung	$v = 3,084 \text{ a.u./h}$
FeCl ₃	Keine Reaktion	Keine Reaktion erwartet	$v = 1,4154 \text{ a.u./h}$
Magnetit Fe ²⁺ (Fe ³⁺) ₂ O ₄	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}\cdot + \text{OH}^-$	Anfangsbereich: Reaktion 1. Ordnung	Keine Angaben
(Tee)-Nanoeisen	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}\cdot + \text{OH}^-$	Anfangsbereich: Reaktion 1. Ordnung	$v = 7,726 \text{ a.u./h}$

In der Tabelle 20 wurden die zu erwartenden Reaktionsverläufe sowie die jeweilige zugehörige Reaktionsordnung der einzelnen eingesetzten Fenton-Reagenzien zu Reaktionsbeginn dargestellt. Zu erkennen ist, dass die größte Intensitätssteigerung innerhalb des gemessenen Zeitraums bei (Tee)-Nanoeisen mit einem Wert von $v = 7,726 \text{ a.u./h}$ erreicht wurde, gefolgt von der Eisen(II)-Verbindung mit $v = 3,084 \text{ a.u./h}$. Aufgrund des nicht ermittelten Anfangsbereichs des Reaktionsverlaufs konnte bei Magnetit keine Reaktionskinetik berechnet werden. Für FeCl₃, eine dreiwertige Eisenverbindung, wurde keine Fenton-Reaktion erwartet, da kein Eisenatom enthalten ist, welches oxidiert werden kann. Dennoch wurde eine Fenton-Reaktion nachgewiesen, und eine Intensitätssteigerung mit $v = 1,4154 \text{ a.u./h}$ ermittelt. Ein möglicher Grund für dieses Ergebnis wären Verunreinigungen mit Eisen(II)-Verbindungen in der Probe.

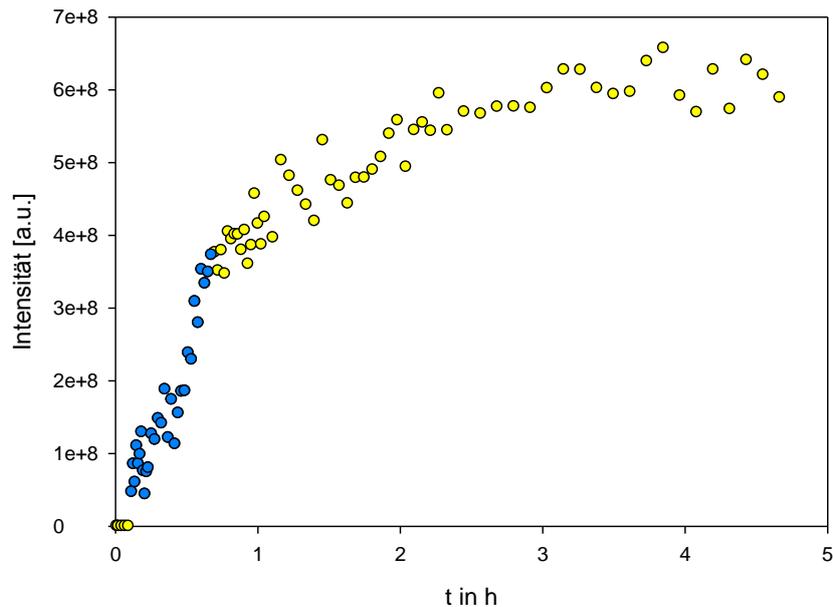


Abb. 20: Intensität [a.u.] des DMPO-OH Spektrums der Fenton-Reaktion von FeSO_4 und DMPO mit $8 \mu\text{l H}_2\text{O}_2$ im Durchflusssystem als Beispiel für die Berechnung der Reaktionskinetik. Die blau markierten Werte wurden zur Berechnung herangezogen.

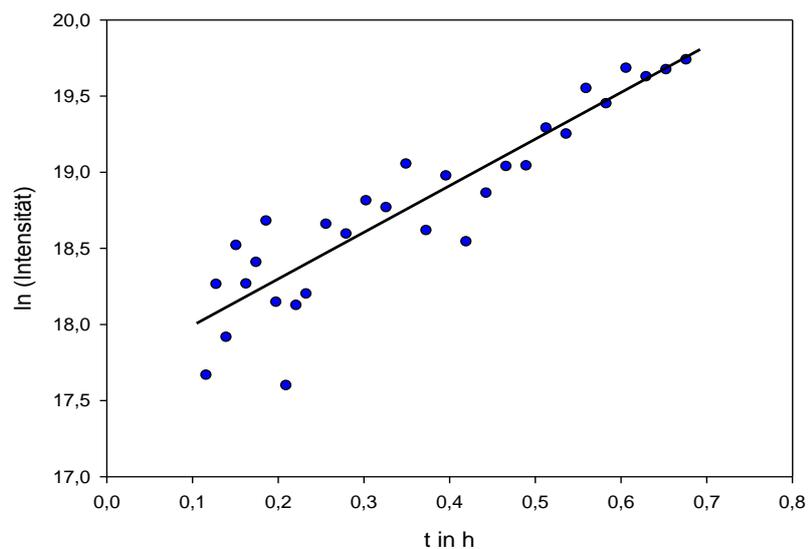


Abb. 21: Berechnung des Logarithmus naturalis der Intensität mit der ermittelten Trendlinie sowie deren Formel $y = 3,0835 x + 17,656$ und dem Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,835$

In Abb. 20 wird die für die Berechnung der Reaktionskinetik verwendete Intensität [a.u.] des DMPO-OH Spektrums mit den blau markierten Werten dargestellt. Interessant ist dabei die Steigerung im Anfangsbereich eines Reaktionsverlaufs. In weiterer Folge stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Bildung und Zerfall des Radikaladdukts ein und danach die Bildungsrate wieder abnimmt. Bei allen Reaktionen handelt es sich um eine Reaktion 1. Ordnung. Abb. 21 zeigt die Trendlinie, die durch die In-

tensitätspunkte gelegt wurde mit der dazugehörigen Steigerung, welche für die Ermittlung der Reaktionskinetik verwendet wurde.

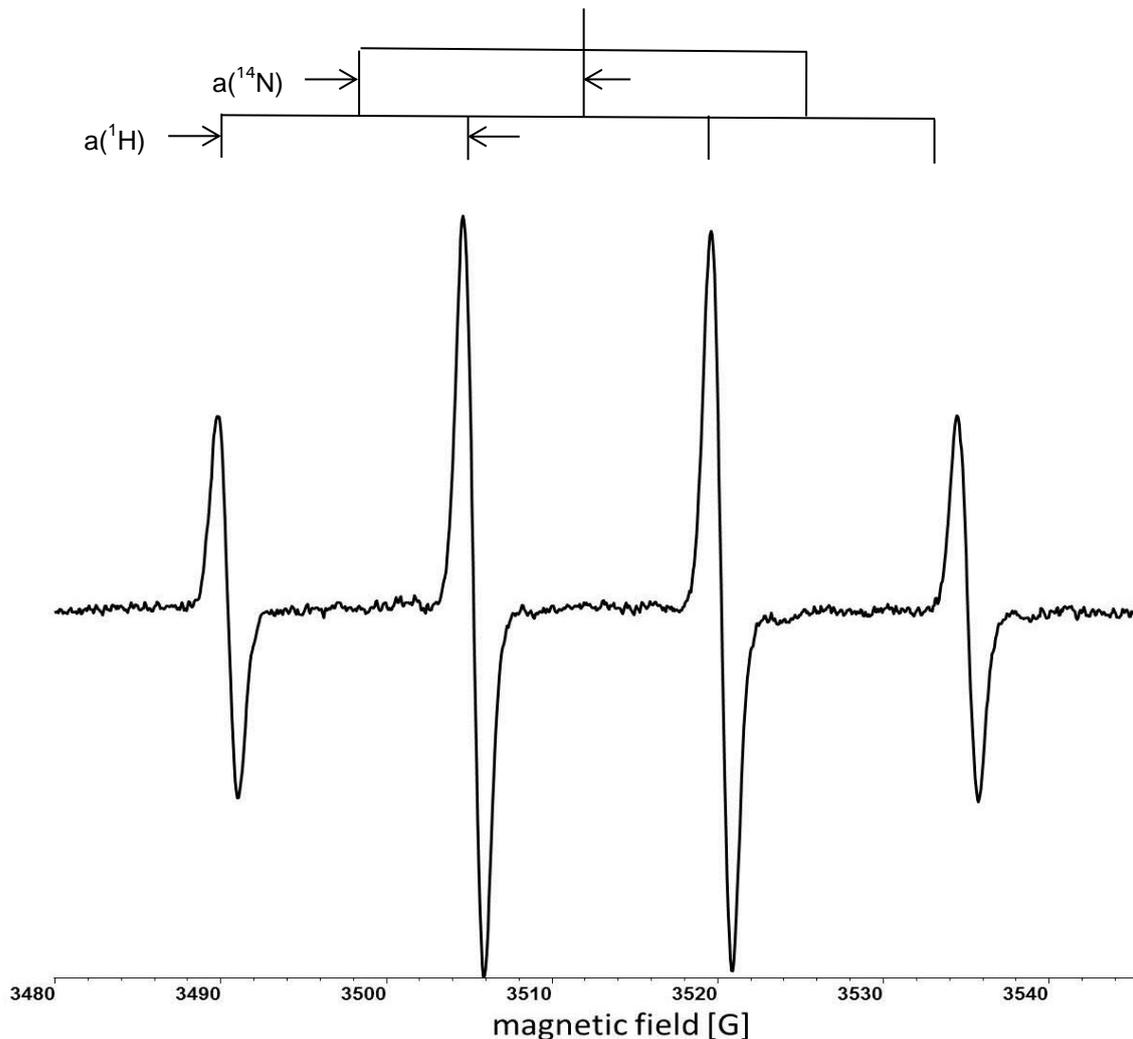


Abb. 22: Ein typisches Spektrum eines DMPO-OH-Adduktes nach einer Fenton-Reaktion, mit dem dazugehörigen Strichdiagramm zur Veranschaulichung der Hyperfeinaufspaltung mit $a(^{14}\text{N}) = 14,991 \text{ G}$ und $a(^1\text{H}) = 14,808 \text{ G}$.

In Abb. 22 wird ein typisches Spektrum einer Fenton-Reaktion mit dem Spin-Trap DMPO und das dazu gehörige Strich-Diagramm der Hyperfeinaufspaltung dieser Reaktion dargestellt. Solche Spektren wurden mit dem Programm WinEPR ausgewertet und mittels Simulation mit WinSimfonia bestätigt. Die Hyperfeinkopplung der Addukte wird mit den Bezeichnungen $a(^{14}\text{N})$ für das Element Stickstoff und $a(^1\text{H})$ für Wasserstoff gekennzeichnet. Mit beiden Werten ist es möglich, die gebildeten Addukte mit Hilfe der in der Literatur (unter anderem in der Internetdatenbank NIEHS) gesammelten Referenzwerte einer Radikalgruppe zuzuordnen. Zur Untersuchung des Intensitätsverlaufs besonders zu Beginn der Reaktion wurde die Durchflusszelle verwendet.

Der Vorteil besteht darin, dass die Messung kurz nach dem Zeitpunkt des Zusammenführens der Reagenzien beginnt. Nachdem H_2O_2 nicht limitierend vorliegen sollte, wurde grundsätzlich eine hohe Konzentration von $32 \mu\text{l}$ eingesetzt.

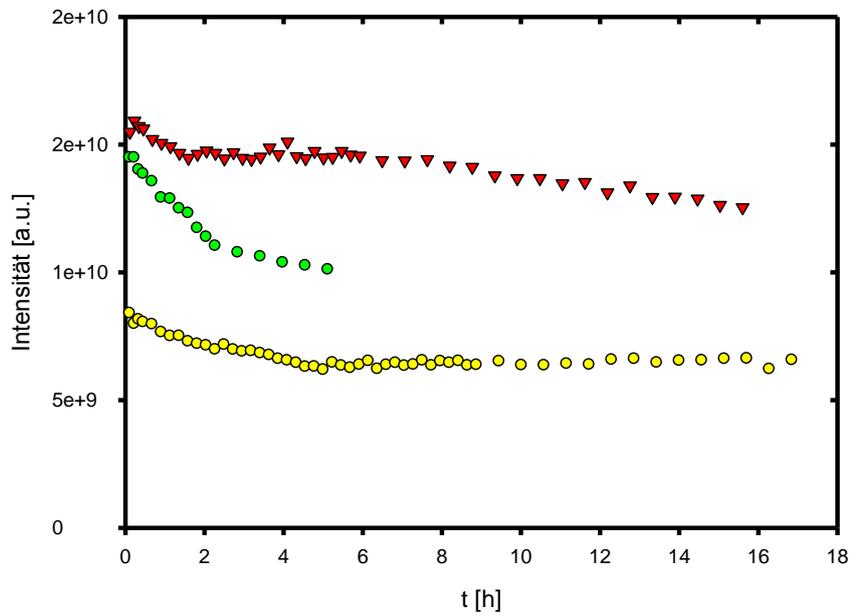


Abb. 23: Intensität [a.u.] von DMPO-OH Spektren der Fenton-Reaktion mit FeSO_4 -Reagenz und DMPO mit $2 \mu\text{l}$ H_2O_2 pro Testansatz (●), $8 \mu\text{l}$ H_2O_2 pro Testansatz (●), $32 \mu\text{l}$ H_2O_2 pro Testansatz (▼) im „steady-state“

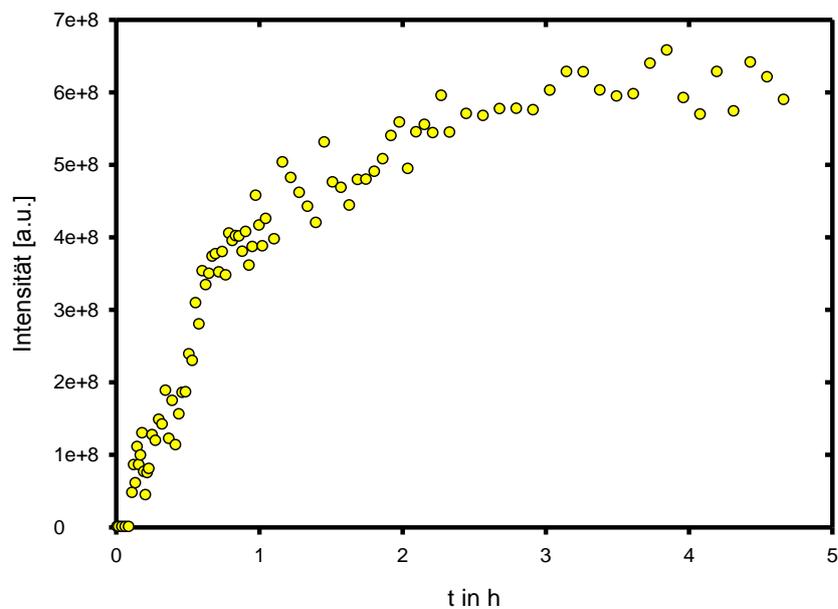


Abb. 24: Intensität [a.u.] von DMPO-OH Spektren der Fenton-Reaktion von FeSO_4 und DMPO mit $8 \mu\text{l}$ H_2O_2 im Durchflusssystem mit einer Reaktionskinetik von $v = 3,084 \text{ a.u./h}$

Aus dem Intensitätsverlauf der DMPO-OH Adduktbildung von FeSO_4 mit verschiedenen Konzentrationen von H_2O_2 ist zu erkennen, dass die geringste Bildungsrate bei einer H_2O_2 -Zugabe von 2 μl je Testansatz stattfindet. Die Intensität blieb während der Messung ohne eine anfängliche Steigung in den ersten Minuten über 20 h relativ konstant bei etwa $0,9 \cdot 10^{10}$. Es war keine Abnahme der Intensität messbar. Bei diesem Versuchsansatz war weder das FeSO_4 noch das H_2O_2 verbraucht und die Reaktion konnte kontinuierlich fortgesetzt werden.

Beim steady-state Versuch konnte die Bildungsrate am Beginn der Reaktion nicht gemessen werden, da sich zum Zeitpunkt der Messung bereits ein Gleichgewicht eingestellt hat. Für die ersten entscheidenden Minuten wurde deshalb die Methode des Durchflusssystems gewählt. Bei einem H_2O_2 -Gehalt von 2 μl pro Testansatz war in steady-state Versuch zum Beispiel schon zu Beginn der Reaktion eine Intensitätsminderung von anfänglich $1,7 \cdot 10^{10}$ auf $1,2 \cdot 10^{10}$ nach 2 h zu verzeichnen. Dies zeigt, dass die Bildung von freien Radikalen schon vor dem Start der Messung beendet war und sich die Reaktion schon im Bereich des Gleichgewichts befindet.

In Abb. 24 wurde Fenton-Reaktion von FeSO_4 und DMPO mit 8 μl H_2O_2 im Durchflusssystem dargestellt. Zu erkennen ist die Reaktionskinetik mit $v = 3,084$ a.u./h im Anfangsverlauf der Fenton-Reaktion mit dem fast linearen Anstieg der Reaktionsintensität und einer Reaktion 1. Ordnung bei verwendeten FeSO_4 mit Durchflusssystem gut erkennbar. Nach etwa 2 h war die Kurve am Beginn einer Plateauphase, wobei die Intensität bis zum Ende der Messung einen Wert von $6,5 \cdot 10^8$ beibehielt. Der initiale Verlauf der Reaktion zeigt die Bildung des DMPO-OH Adduktes. Danach stellte sich ein steady-state Zustand ein, in welchem sich Bildung und Abbau von DMPO-OH Addukten im Gleichgewicht befinden.

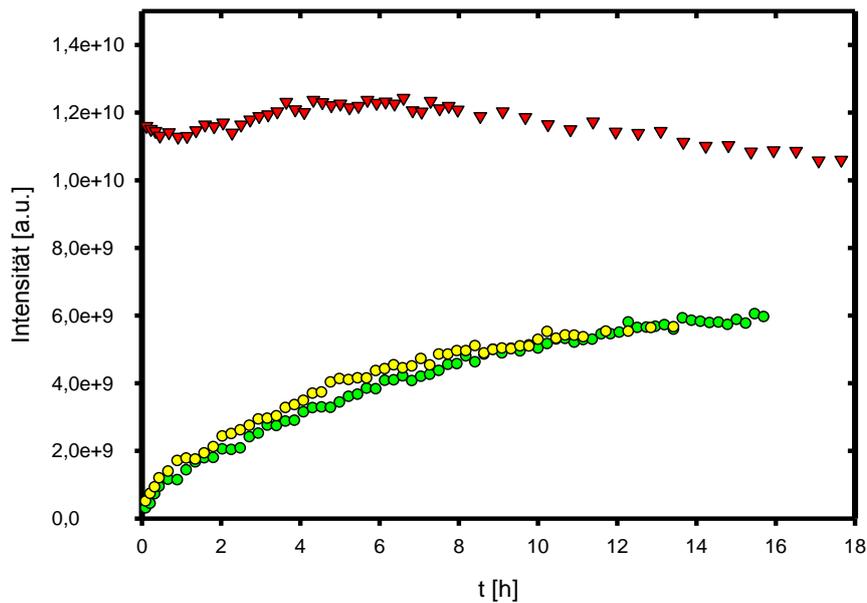


Abb. 25: Intensität von DMPO-OH Spektren der Fenton-Reaktion mit dem Reagenz FeCl_3 und dem Spin-Trap DMPO mit $2 \mu\text{l H}_2\text{O}_2$ pro Testansatz (●), $8 \mu\text{l H}_2\text{O}_2$ pro Testansatz (●), $32 \mu\text{l H}_2\text{O}_2$ pro Testansatz (▼)

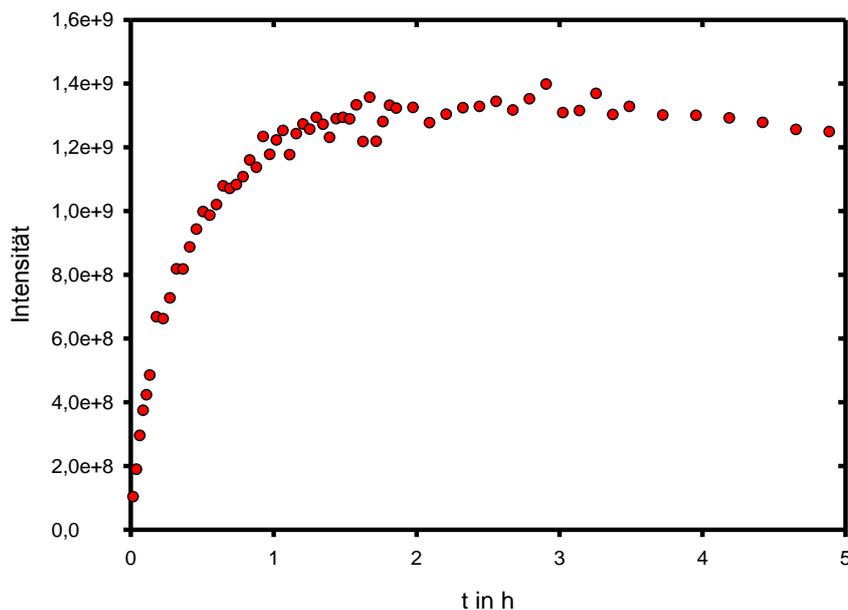


Abb. 26: Intensität der DMPO-OH Spektren der Fenton-Reaktion mit FeCl_3 als Fenton-Reagenz und $32 \mu\text{l H}_2\text{O}_2$ im Durchflusssystem und einer Reaktionskinetik von $v = 1,4154 \text{ a.u./h}$

Bei der Zugabe von $2 \mu\text{l}$ und $8 \mu\text{l H}_2\text{O}_2$ wurde die Intensität der Fenton-Reaktion mit dem Reagenz FeCl_3 wie in Abb. 25 ersichtlich nur geringfügig beeinflusst. Die höchste Intensität erreichte die Reaktion vom Fenton-Reagenz FeCl_3 mit $32 \mu\text{l H}_2\text{O}_2$ je Testansatz nach 5 h mit einem Wert von $1,23e^{10}$. Die Reaktionen mit $2 \mu\text{l H}_2\text{O}_2$ und $8 \mu\text{l H}_2\text{O}_2$ je Testansatz erlangten nach 15,4 h ein Intensitätsmaximum von $6e^9$ bzw. nach 18 h mit einem Ergebnis von $6,1e^9$. Es ist erkennbar, dass die unterschiedlichen

Konzentrationen von 2 μl und 8 μl an Wasserstoffperoxid (30%) keine großen Unterschiede in der Intensität und der Kinetik der Reaktion bewirkten. Beide Zugaben von H_2O_2 (32 μl) ergaben einen Anstieg v zwischen 0,2 und 0,3 a.u./h innerhalb der ersten 5 h der Reaktion. Bei einer höheren Zugabe von H_2O_2 stieg die Intensität der Fenton-Reaktion geringfügig nach 5 h auf einen Wert von $1,23\text{e}^{10}$. Grundsätzlich ist zu erkennen, dass der Anstieg am Anfang der Reaktion nicht detektiert wurde und erst ab dem Gleichgewichtszustand der Reaktion und einer konstanten Intensität des DMPO-OH Addukts gemessen wurde, die nur langsam abnimmt. Es war ein signifikanter Zusammenhang zwischen Kinetik und Konzentration an H_2O_2 erkennbar. Die höchste Reaktionskinetik wurde bei einer Zugabe von 32 μl H_2O_2 , die niedrigste Kinetik mit geringer Differenz zu 8 μl H_2O_2 bei 2 μl gemessen. Daraus kann geschlossen werden, dass eine optimale Zugabe von Wasserstoffperoxid bei etwa 32 μl liegt um eine maximale Bildungsrate an OH-Radikalen zu erhalten.

Der Anfangsbereich der Fenton-Reaktion von FeCl_3 mit 32 μl H_2O_2 in Abb. 26 zeigt die sofortige Bildung von freien Radikalen und den exponentiellen Anstieg bis zu einem Maximalwert von $1,395\text{e}^9$ nach zirka 3 h. Nach einer kurzen Plateauphase ist ein Abfall nach 3,5 h im Kurvenverlauf sichtbar, was auf einen Rückgang der Bildung an OH•-Radikalen zurückzuführen ist. Der Maximalwert bei der Messung von FeCl_3 mit 32 μl H_2O_2 von Abb. 26 lag bei $1,23\text{e}^9$. Der nahezu lineare Verlauf der Kurve in der Anfangsphase besaß einen Anstieg von $v = 1,42$ a.u./h bis zur Plateauphase. Laut Prinzip der Fenton-Reaktion sollte eine Reaktion zwischen einer Eisen(III)-Verbindung und H_2O_2 keine OH-Radikale bilden, da Eisen nur als Eisen(III) vorliegt und somit keine Oxidationsreaktion stattfinden kann. Um jegliche äußeren Faktoren, welche zu einer Reduktion von Eisen führen könnten, zu reduzieren, wurde ein weiterer Versuch unter Stickstoff-Atmosphäre durchgeführt. Das Ergebnis war ein identischer Anstieg der Intensität wie in Abb. 26. Daher ist anzunehmen, dass in der Eisenprobe Verunreinigungen enthalten waren, welche eine Fenton-Reaktion ermöglichen.

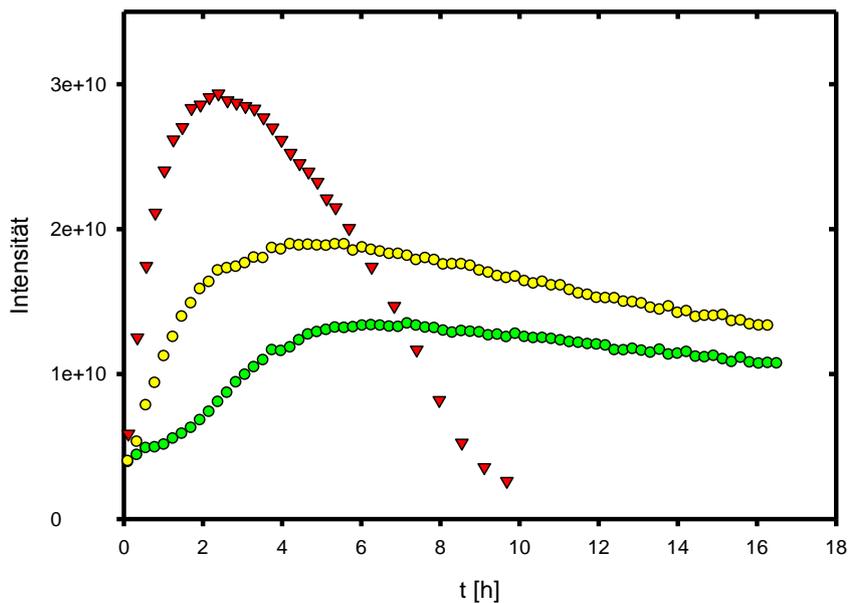


Abb. 27: Intensität von DMPO-OH Spektren der Fenton-Reaktion mit dem Fenton-Reagenz (Tee)-Nanoeisen mit 2 µl H₂O₂ pro Testansatz (●), 8 µl H₂O₂ pro Testansatz (●), 32 µl H₂O₂ pro Testansatz (▼)

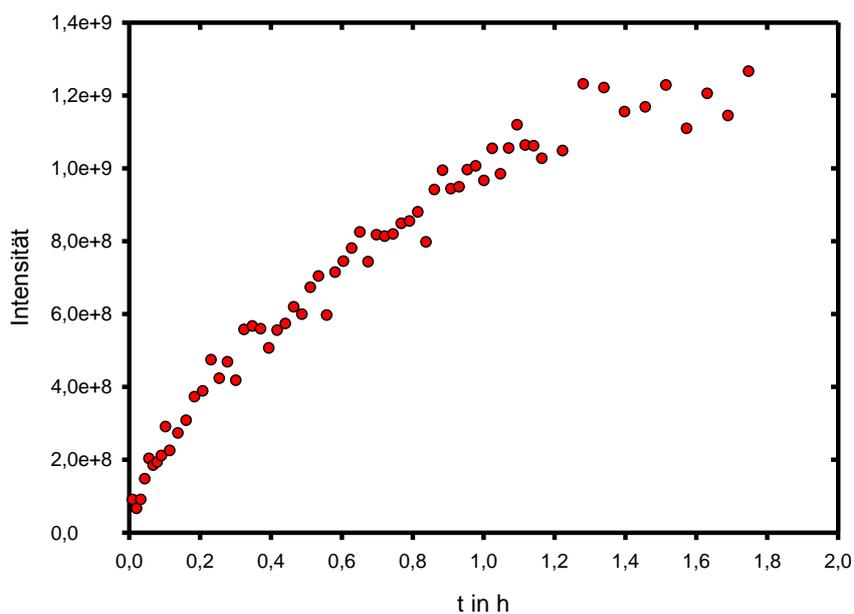


Abb. 28: Intensität von DMPO-OH Spektren der Fenton-Reaktion mit dem Reagenz (Tee)-Nanoeisen in Abhängigkeit von der Zeit und 32 µl H₂O₂ im Durchflusssystem einer Reaktionskinetik von $v = 7,726$ a.u./h

Gegenüber den schon vorgestellten Fenton-Reaktionen mit FeSO₄ und FeCl₃ ist in Abb. 27 ein deutlicher zeitlicher Verlauf der Bildung an freien Radikalen bei Einsatz von (Tee)-Nanoeisen zu erkennen. Die Abhängigkeit der Reaktion von der Konzentration an Wasserstoffperoxid entsprach den vorgehenden Messungen. Die höchste Intensität wurde durch die Reaktion mit 32 µl H₂O₂ pro Testansatz nach erreicht. Die

maximale Intensität bei der Zugabe von 8 μl H_2O_2 je Testansatz wurde nach 5h mit einem Wert von $1,7\text{e}^{10}$ erreicht. Die Messung mit einer Zugabe von 2 μl Wasserstoffperoxid je Versuchsansatz zeigte eine niedrigere Intensitätsrate mit einer Differenz von $4,0\text{e}^9$ und mit einem Höchstwert von $1,3\text{e}^{10}$. Beide Messungen, die erste Messung sowie die Wiederholungsmessung, mit einer Konzentration von 8 μl Wasserstoffperoxid ergaben eine fast idente Intensitätsrate über die Zeit. Doch die höchste Rate in sehr kurzer Reaktionszeit wurde mit einer H_2O_2 -Zugabe von 32 μl erzielt. Der Maximalwert von $2,934\text{e}^{10}$ wurde im ersten Test nach 2,5 h erreicht. Die Wiederholung erbrachte eine maximale Intensität von $1,8\text{e}^{10}$ nach knapp 2 h.

Weiterhin ist zu erkennen, dass bei dieser Konzentration an Wasserstoffperoxid die Zahl der an DMPO gebunden OH-Radikale schon nach 4 h drastisch zurückgeht. Dieser Verlauf der Kurve ist bei den beiden anderen Reaktionen mit 2 μl sowie 8 μl H_2O_2 je Versuchsansatz nicht erkennbar. Dabei beginnt die Intensität nach 7 h stetig, aber langsam abzunehmen. Da das enthaltene zweifache Eisen während der Fenton-Reaktion verbraucht wird und aufgrund des eingesetzten Spin-Traps keine Reduktion der gebildeten Eisen(III)-Verbindung stattfindet, sinkt die Reaktionsrate im zeitlichen Verlauf.

Die Kurve in Abb. 28 verläuft im Anfangsbereich fast geradlinig bis zu Beginn einer Plateauphase nach etwa 1,2 h mit einem Anstieg von $v = 7,726$ a.u./h und einem erreichten Maximalwert von $1,2\text{e}^9$. Insgesamt ist die Bildungsrate an freien Radikalen bei der Fenton-Reaktion mit (Tee)-Nanoeisen im Vergleich zu FeCl_3 geringer, aber dafür im Durchflusssystem höher als die Reaktion mit FeSO_4 . Eine Erklärung dafür wäre, dass aufgrund der Teebestandteile in der Probe, welche als Reduktionsmittel fungieren, die bei der Fenton-Reaktion entstandenen Eisen(III)-Atome wieder in zweiwertigen Eisen reduziert werden und es somit keinen Mangel an Eisen-Katalysatoren gibt bis das H_2O_2 vollständig aufgebraucht ist.

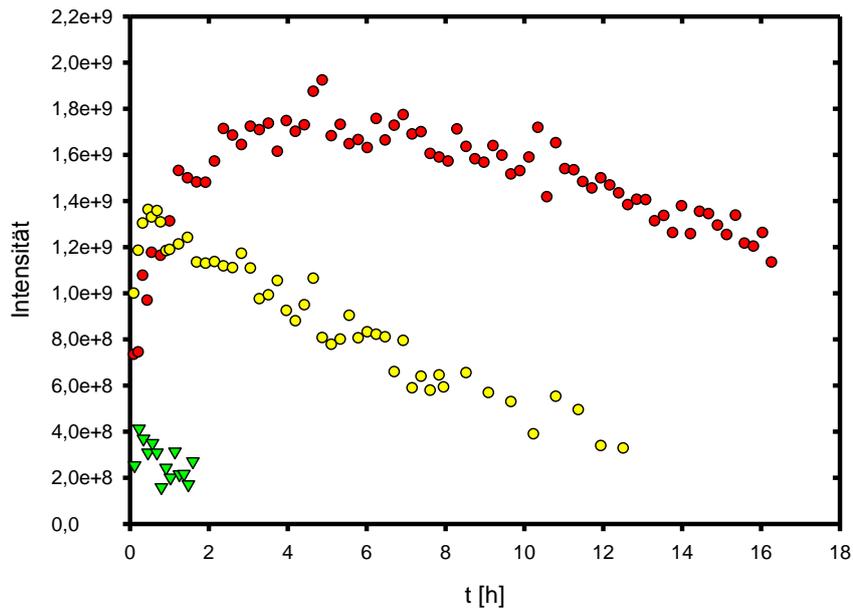


Abb. 29: Intensität von DMPO-OH Spektren der Fenton-Reaktion mit dem Fenton-Reagenz Magnetit mit 2 µl H₂O₂ pro Testansatz (●), 8 µl H₂O₂ pro Testansatz (●), 32 µl H₂O₂ pro Testansatz (▼)

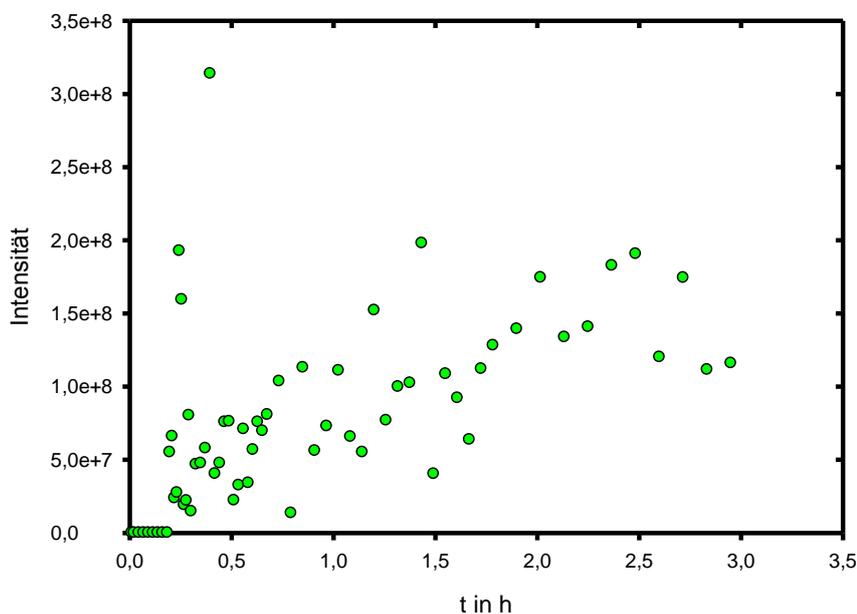


Abb. 30: Intensität der DMPO-OH Spektren der Fenton-Reaktion des Fenton-Reagenz Magnetit mit 2 µl H₂O₂ im Durchflusssystem

In Abb. 29 ist zu erkennen, dass die Reaktion von Magnetit mit H₂O₂ in Abhängigkeit von der Konzentration mit geringerer Intensität gegenüber den schon gezeigten Fenton-Reaktionen verläuft. Die höchste Intensität wurde in der Messung mit einer Zugabe von 2 µl Wasserstoffperoxid erzielt. Die Wiederholung erbrachte ein identisches Resultat. Die Abnahme erfolgt bei beiden nach einer Reaktionszeit von etwa 6 h. Der

Maximalwert lag bei $1,8e^9$ nach 4,5 h. Eine mittlere Intensitätsrate erreichte die Fenton-Reaktion mit einer Konzentration an Wasserstoffperoxid von 8 μl je Versuchsansatz. Der höchste Wert von $1,34e^9$ wurde hierbei nach 0,5 h erlangt. Der Verlauf der Graphen zeigt eine deutliche Abnahme in der Intensität schon nach etwa 45min.

Die wiederholte Messung der Fenton-Reaktion von Magnetit mit 32 μl H_2O_2 je Testansatz ergab eine solch geringe Intensität, dass eine Auswertung der Spektren aufgrund des Hintergrundrauschens schwierig war. Die höchste Intensität wurde nach 20 min mit einem Wert von $4,3e^8$ erreicht. Eine mögliche Erklärung für die geringe Intensität bei 32 μl H_2O_2 ist der zeitliche Verlauf der Reaktion. Aufgrund der hohen Zugabe an Wasserstoffperoxid wurde möglicherweise die maximale Intensität innerhalb der ersten Minuten der Reaktion erreicht bevor die Probe in das EPR-Gerät überführt wurde. Gemessen wurde daher die wieder abfallende Kurve nach dem Intensitätspeak. Bei der Zugabe von 8 μl H_2O_2 ist das Maximum in den ersten zwei Stunden erkennbar und bei 2 μl wurde der höchste Wert nach etwa 3,5 Stunden erreicht. Somit kann gesagt werden, dass der Reaktionsverlauf von der Konzentration an zugegeben Wasserstoffperoxid abhängig ist.

Aufgrund der geringen Intensität der Fenton-Reaktion unter Einsatz von Magnetit und 32 μl H_2O_2 je Versuchsansatz war eine Auswertung der gesammelten Spektren schwierig. Der Verlauf des Graphen ist von einer starken Streuung der einzelnen Messpunkte gekennzeichnet, welche sich bei der Wiederholung des Versuchs erneut dargelegt hat. Aufgrund des geschätzten Verlaufs der Fenton-Reaktion von Magnetit mit 32 μl H_2O_2 war eine Messung ab Beginn der Reaktion notwendig, sodass auch das zu erwartende Reaktionsmaximum innerhalb der ersten Minuten detektiert werden konnte. Für diesen Versuch war der Einsatz der Durchflusszelle notwendig.

In Abb. 30 ist der Verlauf der Fenton-Reaktion von Magnetit mit 2 μl H_2O_2 im Versuchsansatz dargestellt. Es ist erkennbar, dass zu Beginn der Reaktion, in den ersten 20 min der Messung, keine nachweisbare Konzentration an freien Radikalen gebildet wurde. Erst nach Ablauf dieser Zeit wurde eine Intensität von geringer Stärke detektiert. Der Verlauf der Kurve zeigt eine große Streuung. Der Maximalwert von $3,1e^8$, welcher nach einer Zeitspanne von 40min ermittelt wurde, kann nur als Ausreißer innerhalb des Kurvenverlaufs bewertet werden. Grundsätzlich ist ein ansteigender Verlauf bis zu einer Messzeit von 2 h zu erkennen. Danach kam es zu einer Plateauphase, welche bis zum Ende des Versuchs anhielt. Der erwartete Intensitätspeak wurde nicht ermittelt, doch ist zu erkennen, dass der wesentliche Teil des Reak-

tionsverlaufs innerhalb der ersten Stunde erreicht wurde. Ein möglicher Grund für dieses Ergebnis ist die Art der Probenaufbereitung. Magnetit ist in Wasser nicht löslich, daher wurde eine Suspension hergestellt. Im Durchflusssystem wurden die jeweiligen Komponenten in Bechergläsern aufbewahrt und daraus mit Hilfe einer Pumpe in die Messzelle überführt. Bei dieser Methode ist eine genaue Dosierung von Magnetit sehr schwierig, und es ist daher höchst wahrscheinlich, dass bei jeder Messung unterschiedliche Konzentrationen des Fenton-Reagenz an der Messung beteiligt waren, so dass verschiedene Intensitäten der Reaktion erreicht wurden.

3.5 Weitere EPR-Messungen zur Untersuchung der Eigenschaften der Fenton-Reaktion

Um weitere Einblicke in die Charakteristik der Fenton-Reaktion zu erhalten, wurde die Reaktion der Radikalbildung nach zweimaliger Zugabe von H_2O_2 in der Kapillare im EPR-Gerät verfolgt. Bei diesem Versuch wurde zusätzlich ein Teil des Ansatzes mit dem Stoffgemisch während der Zeit der Messung aufbehalten. Dadurch fand die Reaktion sowohl in der Messkapillare als auch im Eppendorftube statt. Nach Abnahme der Intensität wurde wiederholt die gleiche Menge an Wasserstoffperoxid in dieses Eppendorf-Gefäß gegeben und in eine neue Kapillare überführt. Die neue Kapillare wurde gegen die bereits untersuchte ausgetauscht, und der weitere Verlauf der Reaktion nach erneuter Zugabe von H_2O_2 untersucht. Die wiederholte Zugabe von H_2O_2 diente dazu, die Reaktion neu zu initialisieren und einen erneuten Anstieg der Kurve zu erreichen.

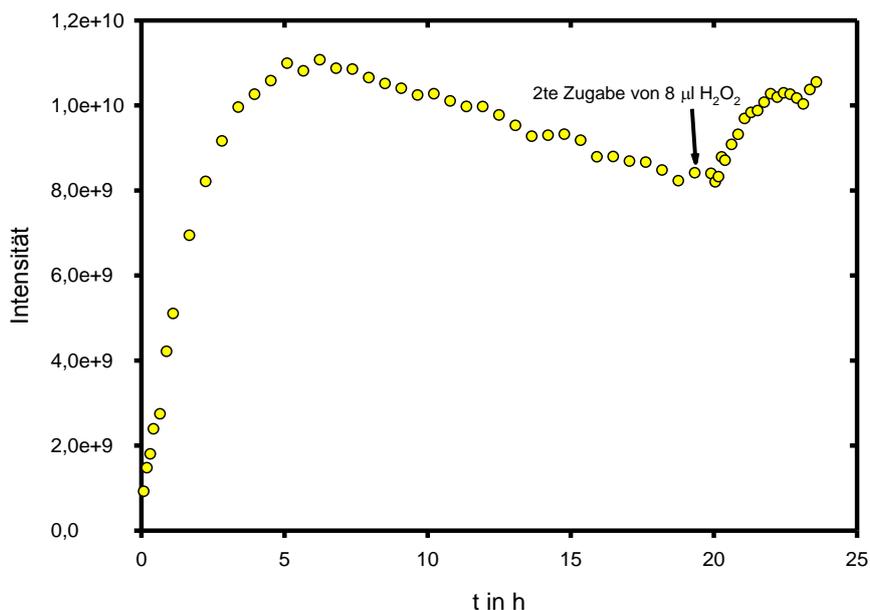


Abb. 31: Intensität von DMPO-OH Spektren der Fenton-Reaktion mit dem Fenton-Reagenz (Tee)-Nanoeisen und der zweimaligen Zugabe von 8 µl H₂O₂

Um diese Eigenschaft der Fenton-Reaktion zu untersuchen, wurde (Tee)-Nanoeisen mit 8 µl versetzt. In Abb. 31 ist der Verlauf der Reaktion dargestellt. Die Reaktion hat innerhalb der ersten 5 h eine Reaktionskinetik von $v = 1,561$ a.u./h. Nach etwa 5 h Messzeit erreicht die Reaktion ihr Intensitätsmaximum von $1,1e^{10}$ und sinkt nach einem kurzen Plateaubereich kontinuierlich bis zu einem Wert von $8,2e^9$ nach 19 h. Nach dieser Zeitspanne wurden dem Reaktionsgemisch im aufbewahrten Eppendorfgefäß wiederum 8 µl H₂O₂ zugeführt, die Messreagenz in eine Kapillare gefüllt und in das EPR-Gerät überführt. Wie der Abb. 31 zu entnehmen ist, stieg die Intensität sofort wieder mit einem Anstiegswert von $v = 0,104$ a.u./h an und erreichte ihre höchste Intensität nach weiteren 6 h. Somit kann gesagt werden, dass H₂O₂ bei dieser Reaktion der limitierende Faktor ist und durch erneute Zugabe von Wasserstoffperoxid weitere OH-Radikale gebildet werden können.

3.6 Die Fenton-Reaktion durchgeführt mit verschiedenen Testsubstanzen

Nachdem die Reagenzien FeSO₄, Magnetit, FeCl₃ und (Tee)-Nanoeisen auf ihre Anwendbarkeit als Fenton-Reagenz getestet wurden, wurden die von den Verbindungen gebildeten OH-Radikale auf die Fähigkeit untersucht, Bestandteile von Diesel-

kraftstoffen zu spalten. Als Beispiel-Verbindungen wurde n-Pentan als einfaches Alkan, Cyclopentan als Cycloalkan und Toluol als Aromat ausgewählt. Die genannten Stoffe gelten als typische Bestandteile von Erdölprodukten.

Das Ziel dieser Messungen war es, die Bildung von Radikalen der einzelnen Testsubstanzen nach Reaktion mit OH-Radikalen nachzuweisen.

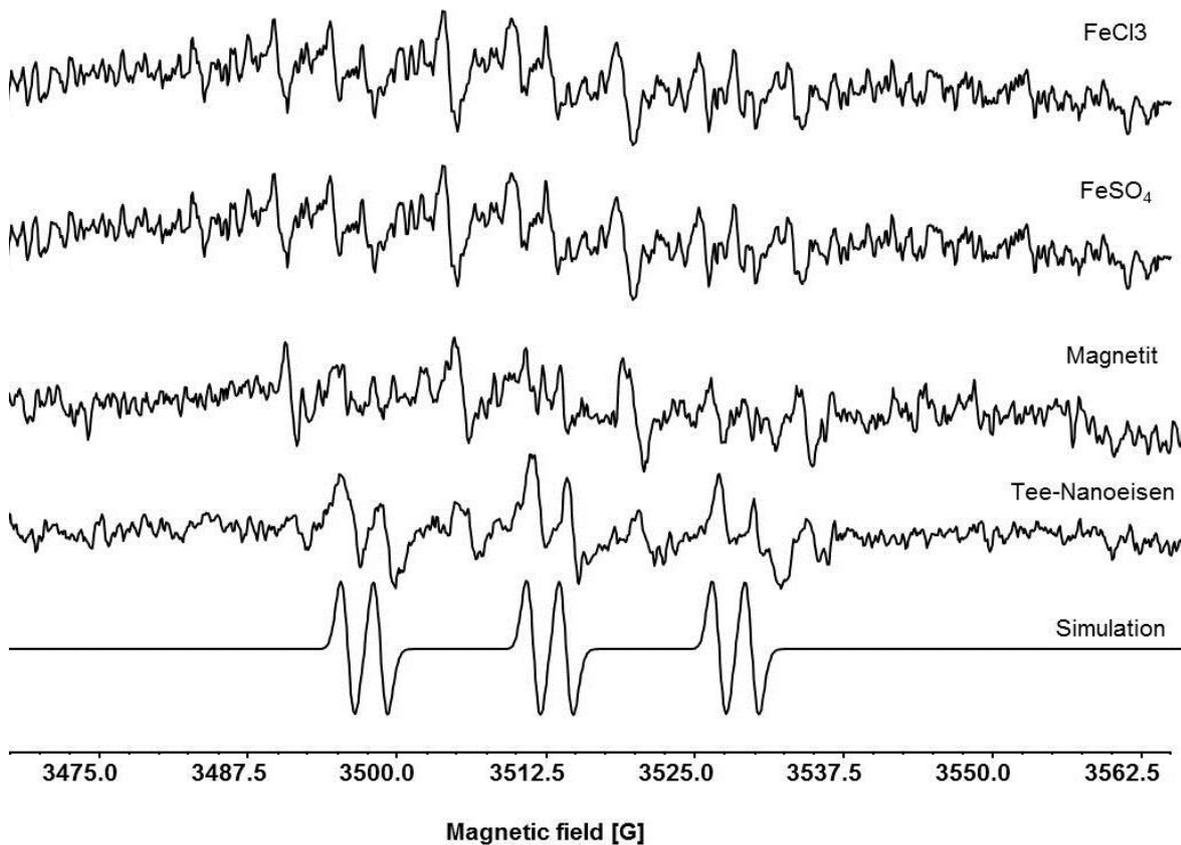


Abb. 32: CwEPR Spektren der Reaktion der Fenton-Reagenzien mit der Testsubstanz n-Pentan sowie die Simulation von PBN-Radikal-Addukten.

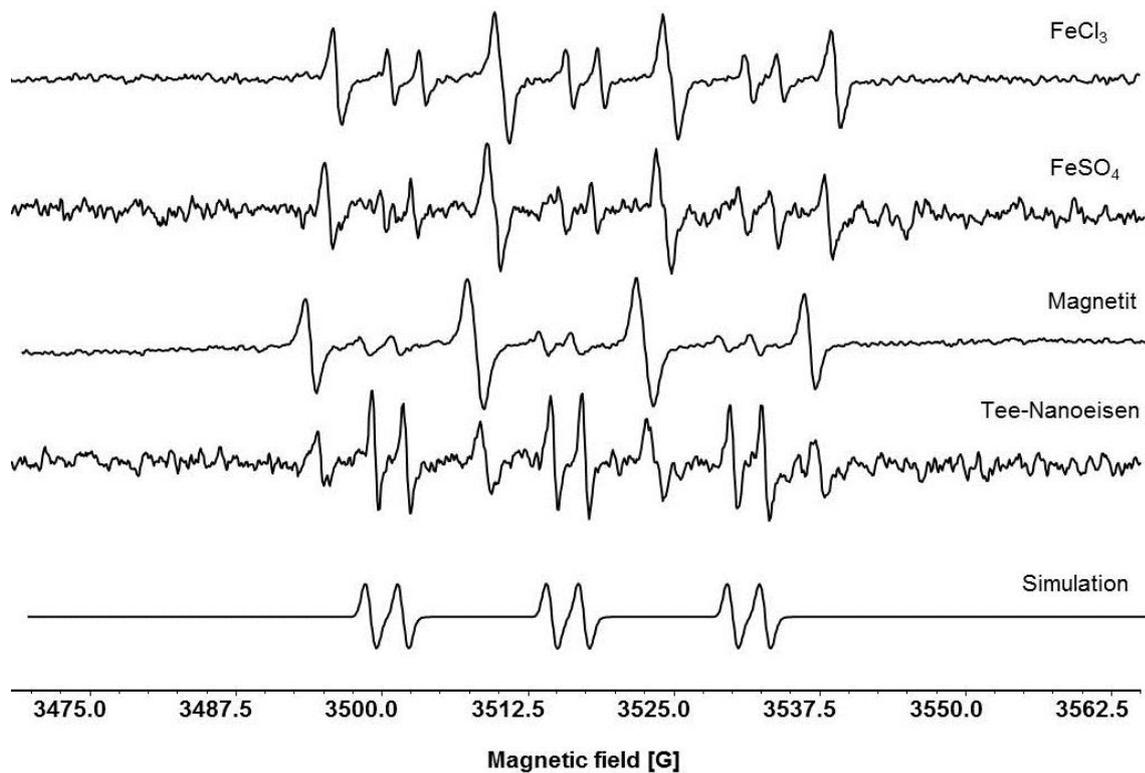


Abb. 33: Cw-EPR Spektren der Reaktion der Fenton-Reagenzien mit der Testsubstanz Cyclopentan sowie der Simulation von PBN-Radikal-Addukten

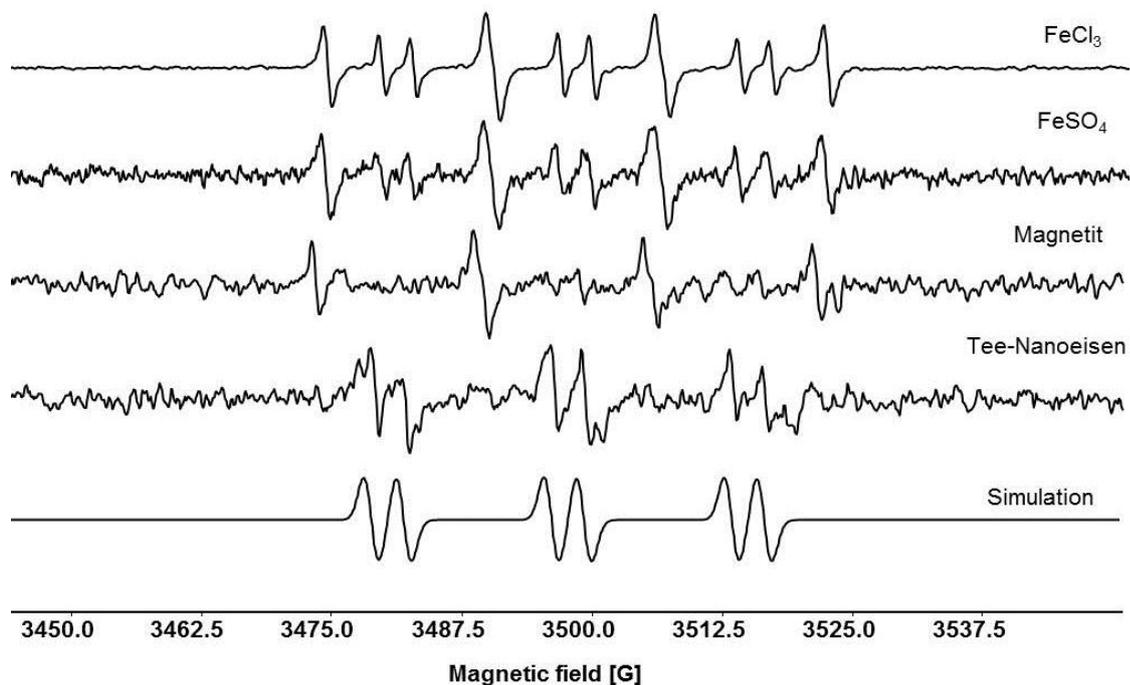


Abb. 34: CwEPR Spektren der Reaktion der Fenton-Reagenzien mit der Testsubstanz Toluol sowie der Simulation von PBN-Radikal-Addukten

In den Abbildungen 32 bis 34 wurden die Reaktionen der einzelnen Fenton-Reagenzien mit den Testsubstanzen n-Pentan, Cyclopentan sowie Toluol dargestellt.

In Abb. 32 wurden die Spektren der Fenton-Reaktion der Reagenzien mit n-Pentan abgebildet. Im unteren Teil der Grafik wurde die mit dem Programm Simfonia angefertigte Simulation vom Spin-Trap-Addukt PBN-OH gezeigt. Zu erkennen in dieser Simulation sind 6 Peaks, die durch die Kopplung von ungepaarten Elektronen mit ^{14}N und ^1H des Spin-Trap entstehen und charakteristisch für Hydroxylradikal-Addukte von PBN sind [36].

Die 4 restlichen Peaks im Spektrum sind dem Abbauprodukt von PBN zuzuschreiben, welches bei der Reaktion von PBN mit den Hydroxyl-Radikalen entsteht. Bei dem gebildeten Sextett wurden die Parameter $a(^{14}\text{N}) = 15,544 \text{ G}$ und $a(^1\text{H}) = 2,734 \text{ G}$ ermittelt.

In Abb. 33 wird die Reaktion der einzelnen Fenton-Reagenzien mit der Testsubstanz Cyclopentan sowie die mit dem Programm Simfonia erstellte Simulation der Reaktion im unteren Teil der Grafik dargestellt.

Aus der Auswertung der einzelnen Spektren ist zu erkennen, dass eine höhere Intensität der Fenton-Reaktion mit Cyclopentan gegenüber den anderen Testsubstanzen ermittelt wurde. Daraus kann abgeleitet werden, dass Cyclopentan weniger effektiv mit OH-Radikalen reagiert als n-Pentan oder Toluol. Die ermittelten Parameter der Spin-Trap-Addukte liegen mit $a(^{14}\text{N}) = 15,337 \text{ G}$ und $a(^1\text{H}) = 2,637 \text{ G}$ im gleichen Bereich wie die anderen Testsubstanzen und sind ebenfalls dem PBN-OH-Addukt zuzuordnen [36].

Ein besonders starkes Signal des Abbauprodukts von PBN liefert wiederum (Tee)-Nanoeisen.

In Abb. 34 wurde der gleich Verlauf der Spektren der einzelnen Testsubstanzen mit Toluol ermittelt wie bei den vorhergehenden Messungen.

3.7 Photolyse-Reaktion von PBN mit Toluol und Di-tert-butylperoxid

Zur grundsätzlichen Untersuchung der Fähigkeit der Radikalbildung, wurde das photosensitive Di-tert-butylperoxid mit UV-Licht behandelt. Die dabei entstehenden Di-tert-butylradikale sollten mit der Testsubstanz Toluol reagieren und wiederum Toluol-Abbauprodukte bilden, welche an den Spin-Trap PBN binden. Die Lösung wurde im EPR-Spektrometer unter Einsatz einer UV-Lampe untersucht.

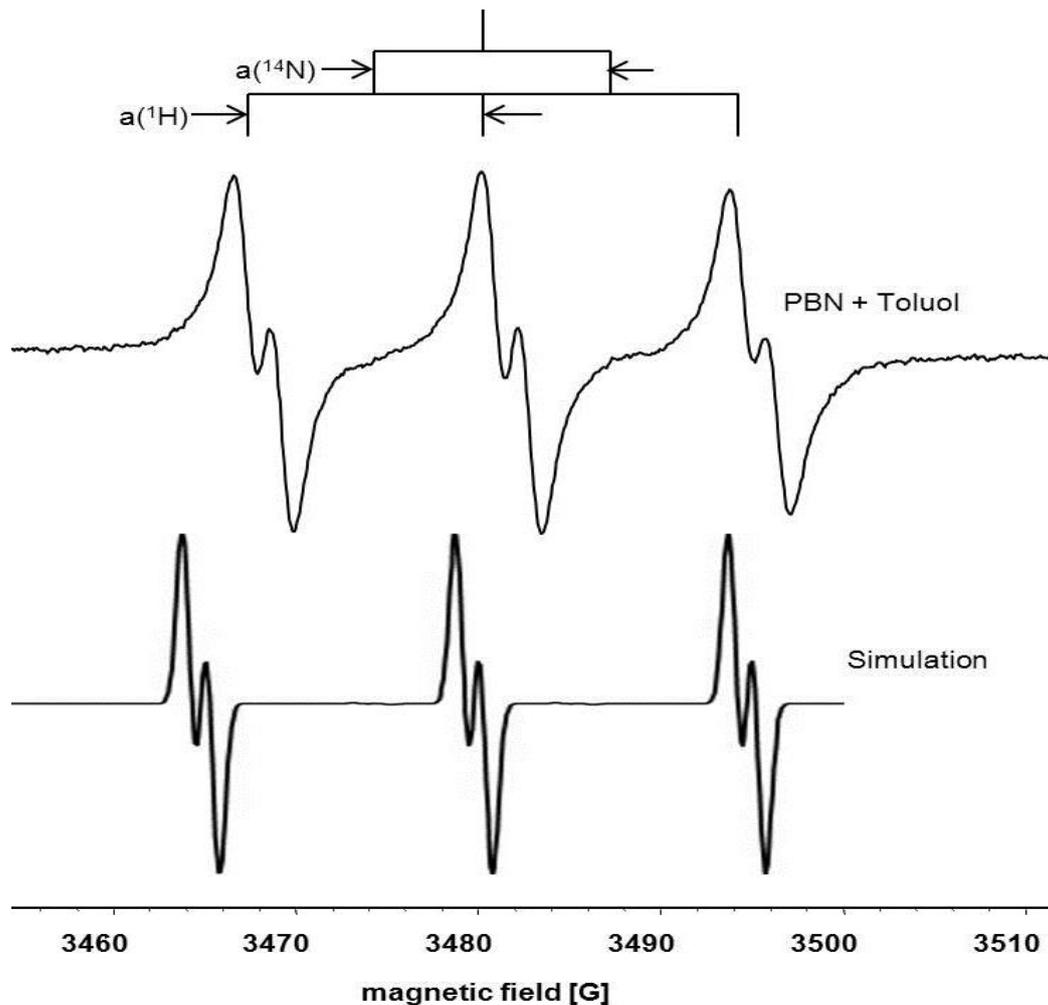


Abb. 35: EPR-Spektrum von PBN gelöst in Toluol mit Di-tert-butylperoxid unter UV-Einfluss

In Abb. 35 wird das EPR-Spektrum des Spin-Trap PBN gelöst in Toluol mit der UV-sensitiven Substanz Di-tert-butylperoxid gezeigt. Bei Bestrahlung der Lösung mit UV-Licht zerfällt die O-O-Bindung des Peroxids. Die gebildeten RO•-Radikale sollen daraufhin mit dem Toluol reagieren und dieses wiederum spalten. Im in Abb. 38 gezeigten Spektrum ist das PBN-Addukt mit dem photolytischen Produkt von Di-tert-butylperoxid zu erkennen, doch sind keine Oxidationsprodukte von Toluol sichtbar. Dabei betragen die Hyperfeinkopplungen $a(^1\text{H}) = 1,974 \text{ G}$ und $a(^{14}\text{N}) = 13,75 \text{ G}$, welche den Photolyse-Produkt von Toluol zugeordnet werden kann [36].

4. Diskussion

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob der Abbau von MKW im Boden mit Hilfe der Phytoremediation durch eine sequentielle Kombination eines chemischen oder rein mikrobiellen Abbaus mit Phytoremediation (Rhizodegradation) verbessert werden kann. Es wurden ein sandiger sowie ein humoser Bodentyp verwendet. Für die chemische Vorbehandlung der Bodenproben wurden die Reaktion von verschiedenen Eisenverbindungen mit Wasserstoffperoxid und die dabei entstehenden Radikale getestet. Durch die initiierte Fenton-Reaktion sollten die in den Mineralölkohlenwasserstoffen vorkommenden, langkettigen Verbindungen gespalten und somit für die nachfolgende Phytoremediation bioverfügbarer gemacht werden. Um die Auswirkungen der Zugabe von FeSO_4 , FeCl_3 , Magnetit und (Tee)-Nanoeisen zu untersuchen, wurde die Konzentration an Kohlenwasserstoffen im Boden über eine Zeitspanne von 80 Tagen untersucht. Um die Wirkung der Zusatzstoffe auf die Phytoremediation bewerten zu können, wurde eine Kontrolle über den gesamten Zeitraum mitgeführt, welche unter identischen Bedingungen inkubiert wurde wie die Testansätze.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Zugabe der Fenton-Reagenzien und Wasserstoffperoxid während der 80-tägigen Versuchszeit gegenüber der Kontrollprobe geringe Unterschiede ergab. Bis zum Beginn der Phytoremediation wurden bei der Zugabe von Fenton-Reagenzien keine Unterschiede festgestellt. Die Kontrollen besaßen bis zum Beginn der Phytoremediation eine konstante Konzentration an Kohlenwasserstoffen ähnlich den chemisch behandelten Versuchsansätzen. Es war zu erkennen, dass kein Abbau ohne Zugabe von Reagenzien in dem Versuchszeitraum stattfand. Zusätzlich zur chemischen Vorbehandlung erfolgte eine biologische Stimulation. Bei diesem Versuch wurde den Proben Nährelemente zugeführt. Dies sollte die natürlich im Boden vorkommenden Mikroorganismen aktivieren und dadurch den Abbau beschleunigen. In der Versuchsreihe wurden zwei verschiedene Konzentrationen an Nährstoffen eingesetzt. Bei den Nährelementen handelte es sich um die Elemente Stickstoff, Phosphor und Kalium. Bei der höheren Nährstoffkonzentration war während des ersten Abschnitts nur eine geringe Abnahme an Kohlenwasserstoffen zu verzeichnen. Hingegen war die Konzentrationsabnahme der Kohlenwasserstoffe bei der geringeren Zugabe von Makroelementen schon zu Beginn des Versuchs nach-

zuweisen. Die hohe Konzentration war somit für den mikrobiellen Abbau ungünstig. Eine mögliche Erklärung ist, dass sich die Mikroorganismen aufgrund des osmotischen Drucks der Zuschlagstoffe nicht entwickelten und es somit auch zu keinem Abbau an Mineralölkohlenwasserstoffen kam. Bei der geringeren, physiologischen Stoffkonzentration sank der Gehalt an Kohlenwasserstoffen schon in den ersten Versuchstagen signifikant. Dies lässt auf eine gute Entwicklung der Mikroorganismen schließen. Auch das Verhalten der Abbaurate bei Zugabe von NPKs bei beiden unterschiedlichen Bodenproben, dem sandigen sowie dem humosen Typ, war in ihrem zeitlichen Verlauf identisch. Der einzige Unterschied bestand in der anfänglichen Konzentration an Kohlenwasserstoffen. Im zeitlichen Verlauf der Reduktion des Kohlenwasserstoffgehalts war hingegen kein Unterschied erkennbar. Ein signifikanter Unterschied in der Abnahme der Kohlenwasserstoffkonzentration ergab sich im Versuchszeitraum zwischen der Zugabe von Nährstoffen und der Beimischung von Fenton-Reagenzien. Durch die Zugabe der Fenton-Reagenzien Magnetit und (Tee)-Nanoeisen nach Beendigung der Phytoremediation wurde eine Abnahme an KWs von rund 15 % ermittelt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollprobe bzw. zwischen den einzelnen Fenton-Reagenzien nachgewiesen werden. Die reine Phytoremediation ermöglichte einen Abbau der Kohlenwasserstoffen von durchschnittlich 7 %. Trotz keines hochsignifikanten Unterschieds konnte eine verbesserte Abbaurate im Vergleich zur Phytoremediation von etwa 7 % errechnet werden. Im Vergleich der Fenton-Reagenzien Magnetit und (Tee)-Nanoeisen untereinander war eine geringfügig bessere Abnahme der KWs mit Hilfe von (Tee)-Nanoeisen ersichtlich. Der verbliebene KW-Gehalt bei der Zugabe von (Tee)-Nanoeisen war um 5 % im Durchschnitt niedriger als bei Magnetit. In der Arbeit von C. Valderrama et al. (2009) [37] war es möglich, mit Hilfe von Fenton-Reagenzien in Kombination mit einer biologischen Behandlung 75% der PAH innerhalb von 8 Wochen zu oxidieren. Eine Erklärung für die geringe Abnahme des Kohlenwasserstoffgehaltes in der vorliegenden Arbeit wäre das kurze Reaktionsvermögen der Zusatzstoffe im Boden und die Reaktion mit anderen Substanzen, welche zusätzlich im Testmedium vorkommen. Da Boden ein komplexes Medium ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Konkurrenzreaktionen stattfinden oder dass die gebildeten OH-Radikale mit anderen Stoffen reagieren. Nach der Arbeit von Venny et al. (2012) [38] wurden mit Hilfe der modifizierten Fenton-Reaktion 79% aller vorhandenen PAK

innerhalb von 8 Wochen im Testboden oxidiert, welcher in einer Säule unter optimalen Bedingungen inkubiert wurde.

Die Biomasseproduktion während der zweimonatigen Versuchszeit im Glashaus zeigte größtenteils eine typische Pflanzenentwicklung mit einem relativ hohen Wurzelanteil und einem etwas niedrigeren Blattanteil. Ungewöhnlich bei diesem Versuch waren die Ergebnisse der Pflanzenproben mit der Kennzeichnung sB2 NPK 2 und sB2 Phytoremediation, beiden angesät im sandigen Bodenmaterial. Bei diesen Proben wurde zwar eine Blattbiomasse, aber kein Wurzelanteil nachgewiesen. Ein Grund für dieses Ergebnis könnte das Ernteverfahren selbst sein. Bei der Entnahme des Pflanzenmaterials wurde das Gras zwischen Wurzelbereich und Blattansatz getrennt und separat geerntet. Daher ist anzunehmen, dass bei der Ernte aufgrund der geringen Wurzelmasse Probenmaterial verloren ging und somit die dargestellte Grafik einen durch die Probenahme erzeugten Fehleranteil besitzt.

Bei den Proben vom sandigen sowie schwarzen Bodenmaterial mit den Kennziffern hB2 NPK, sB2 NPK keimten die ausgesäten Pflanzen nicht. Der Grund für dieses Ergebnis war die sehr hohe Konzentration an zugegebenen Nährstoffen, welche für die Pflanzen toxisch war. Auch bei der niedrigeren Konzentration war die gebildete Biomasse relativ gering. Gegenüber der Kontrollprobe war die Gesamtbiomasse der Proben NPK 2 im Verhältnis 1:2,9 geringer. Beide zugegebenen Nährstoffkonzentrationen waren für die eingesetzte Pflanzenart zu hoch, sodass das Wachstum gehemmt wurde. Nach der Arbeit von Li et al. [39] (2010) sind für Gräser passende Düngerszusammensetzungen solche mit 0,3 g N /kg Boden, 0,2 g K₂O /kg Boden und 0,15 g P₂O₅ /kg Boden.

Mit Hilfe der Referenzdaten ist es möglich, von einer Stickstoffüberdüngung zu sprechen, sowohl beim ersten als auch beim darauf folgenden Versuch. Die Konzentration an Stickstoff ist für verschiedene Mikroorganismen kein Problem, doch bei Gräsern kann diese Überdüngung zu schwerwiegenden Schädigungen führen. Ein Überschuss an Stickstoff führt zu übermäßigem Längenwachstum, weichem Gewebe und „Vergeilung“. Die Blätter werden weich und färben sich in Richtung blaugrün um. Bei den im Topf gehaltenen Pflanzen begannen die älteren Blätter abzusterben und abzufallen. Übermäßige Stickstoffgaben führen zu weichen, schwammigen Zellen, die damit anfällig für Frost, Schädlingsbefall sowie Bakterien- und Pilzkrankungen werden. Grund dafür ist ein Überschuss von löslichen freien Aminosäuren und ein ver-

minderter Gehalt an Ligninen, Phytoalexinen und Biophenolen, die der Schädlingsabwehr dienen und vor Hitzeschäden schützen. Somit führt Stickstoffüberdüngung zu sogenannten Verbrennungen im Blattbereich [40].

Bei allen anderen Versuchen wurde eine relativ große Gesamtbiomasse ermittelt.

In der Arbeit von Tang et al. [41] (2010), welche eine Phytoremediation mit *Lolium perenne* auf einem mit Benzin belasteten Boden beschreibt, wurde über eine ähnlich hohe Gesamtbiomasse von etwa 2,5 g TM je Topf innerhalb von 162 Tagen berichtet. Ein Unterschied bestand in der eingesetzten Menge an Saatgut. Bei dem in der Veröffentlichung beschriebenen Versuch wurden 5 g Samen in ein größeres Behältnis eingesetzt. In dem in dieser Arbeit beschriebenen Experiment wurden nur 0,4 g Samen zu Beginn verwendet. Innerhalb der dreimonatigen Versuchszeit wurde bei den einzelnen Kontrollen eine Trockenbiomasse von etwa 2 g pro Behältnis gebildet. Der Kohlenwasserstoffgehalt sank während der Phytoremediation sowohl bei der Kontrollprobe als auch bei den Versuchen, welche mit Magnetit und (Tee)-Nanoeisen behandelt wurden. Es war festzustellen, dass diese Proben keine hochsignifikante Abnahme an KW erzielten, doch konnte trotzdem eine Reduktion der Kohlenwasserstoffen von etwa 7 % gegenüber der Kontrollprobe wie bereits beschrieben ermittelt werden. Die Minderung des Kohlenwasserstoffgehalts in den Bodenproben mit den Eisenverbindungen war im Vergleich zu den Kontrollproben höher. Somit förderte die Zugabe von Magnetit oder (Tee)-Nanoeisen den Abbau in beiden Bodentypen nachweisbar. Die Reduktion des Kohlenwasserstoffgehaltes fand nur in geringem Ausmaß statt, sodass dies die Abbaurate nur wenig beeinflusste, doch konnte die Phytoremediation im Vergleich zu Kontrollprobe ohne Zusatz von Reagenzien in der Abbaurate von Kohlenwasserstoffen gesteigert werden. Um eine verbesserte Abnahme zu erreichen, sollten die eingesetzten Fenton-Reagenzien vor Oxidation geschützt werden, sodass es zu einer nennenswerten Radikalbildung kam oder es wäre eine wiederholte Zugabe von H_2O_2 notwendig gewesen wie es bei den EPR-Untersuchungen nachgewiesen wurde. Zumindest waren die Verläufe der Graphen unabhängig vom Standort der Probenahme sowie vom Gehalt an Kohlenwasserstoffen und des Bodentyps sehr ähnlich. Es gab nach statistischer Auswertung trotzdem keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollprobe. Usman et al. [42] (2013) stellten in ihrer Arbeit Ergebnisse dar, die mit Hilfe von Magnetit im Durchflusssystem einen Kohlenwasserstoffabbau von 60 – 70% in einem mit Öl kontaminierten Boden dokumentierten. Ein nennenswerter Unterschied zu dem in dieser Arbeit durchgeführten

Versuch ist das angewandte Batch-Verfahren, welches einen großen Unterschied zu den simulierten Feldversuchsbedingungen darstellt.

Der Test mit der erhöhten Konzentration an Nährstoffen zeigte nach einer Versuchszeit von 70 Tagen in beiden Bodentypen eine beginnende Abnahme an Kohlenwasserstoffen vor dem Start der Phytoremediation. Dies lässt darauf schließen, dass verschiedene Mikroorganismen im Boden aktiv waren. Es müssen solche Organismen dort existiert haben, welche auch hohe Konzentrationen an Nährelementen vertrugen und diese für ihren Erhalt verwendeten. Diese MO nutzten die eingebrachten Substanzen, doch bauten sie möglicherweise kaum Kohlenwasserstoffe ab. Die Änderung des Verlaufs des Graphen kann daher dadurch resultieren, dass bestimmte Mikroorganismen im Boden die Nährstoffe verbrauchten und dadurch die Nährstoffkonzentration in der Probe sank. Diese Abnahme ermöglichte den Kohlenwasserstoff abbauenden Arten sich zu entwickeln und zu vermehren, sodass der Gehalt an Kohlenwasserstoff-basierenden Stoffen erst nach einer gewissen Zeitspanne abzunehmen begann. Da die Nährstoffe im Boden nicht ermittelt wurden, die beschriebene Erklärung nur als These. Es ist möglich, dass auch andere Faktoren eine große Rolle spielen. Die höchste Abnahme des KW-Gehaltes war beim Versuch mit der niedrigeren Konzentration an Nährstoffen ermittelt worden, sowohl im Vorversuch als auch bei der nachfolgenden Phytoremediation. Bei keinem weiteren Versuchstyp wurde eine solche Reduktion erzielt. Sowohl beim humosen Bodentyp mit der Kennziffer hB2 als auch bei der sandigen Erde sB2 sank der KW-Gehalt um den Wert 36.000 mg/kg TM beim ersten Typ und beim zweiten um den Wert 11.000 mg/kg TM. Bis zum Beginn der Phytoremediation war die Konzentration der KW um 50% reduziert worden und wurde bis zum Ende des Versuchs noch einmal um einen Kohlenwasserstoffgehalt von 10.000 mg/kg TM gesenkt. Somit kann gesagt werden, dass die Versuchsreihe mit der geringeren Konzentration an Nährstoffen den erfolgreichsten Abbauprozess von bis zu 92 % beinhaltete. Ein ähnliches Ergebnis wurde in der Arbeit von White et al. [43] (2006) beschrieben. In dieser Arbeit wurden verschiedene Pflanzenarten mit Zusatz von Nährstoffen in einer Zusammensetzung von NPK von 13:13:13 auf mit PAH kontaminierten Boden mit einer Startkonzentration von 9,175 mg/kg Boden getestet. Die Versuchsdauer bei diesem Test betrug 1,5 Jahre und wurde ebenfalls als Topfversuch durchgeführt.

Aufgrund der geringen Kohlenwasserstoffabnahme innerhalb der ersten Versuchswochen, teilweise durch die zu hohe Konzentration an Nährstoffen bei den Proben

mit der Bezeichnung NPK, wurden weitere Versuche mit einer zusätzlichen Zugabe von Glucose zur Stimulation der Mikroorganismen nach einer Versuchszeit von 42 Tagen durchgeführt. Daraufhin wurde eine signifikant rasche Abnahme der Kohlenwasserstoffkonzentration in den ersten 20 Tagen in beiden Bodentypen nachgewiesen. Durch die Zufuhr von Kohlenhydraten resultierte eine rasche und effektive Abnahme von bis zu 64 % des KW-Gehaltes. Nur in der Probe mit der geringeren Nährstoffzugabe wurde eine bessere KW-Reduzierung erreicht. In der Arbeit von Thomas und Dabrowski [44] (2011) wurden ähnliche Versuche mit Mikroorganismen bei einem mit PAH kontaminiertem Boden durchgeführt. Die Glucosekonzentration betrug 0,25 g/l bzw. 0,45 g/l bei einer Versuchsdauer von 3 Wochen. Die Einführung einer zusätzlichen Kohlenstoff- und Energiequelle ermöglicht den Mikroorganismen trotz hoher Konzentration an weiteren Nährstoffen, die im Boden enthaltenen Kohlenwasserstoffe abzubauen.

Um die Fenton-Reaktion im Boden besser zu verstehen, wurden EPR-Versuche mit den verschiedenen Eisenverbindungen zum Nachweis der dabei produzierten Hydroxyl-Radikale durchgeführt. Zuerst wurde die Intensität der Fenton-Reaktion der Fenton-Reagenzien FeSO_4 , FeCl_3 , (Tee)-Nanoeisen sowie Magnetit in Abhängigkeit von der Zeit und unterschiedlicher H_2O_2 -Konzentration gemessen. Für diesen Versuch wurde der Spin-Trap DMPO eingesetzt. Alle Spektren, welche bei dieser Reaktion gemessen wurden, besaßen eine vergleichbare Aufspaltung, die typisch für das DMPO-OH-Addukt ist [45]. Die einzelnen, in kurzen Abständen gemessenen Spektren wurden auf ihre Intensität untersucht und graphisch ausgewertet. Bei allen Fenton-Reaktionen mit den unterschiedlichen Reagenzien war zu erkennen, dass die Intensität abhängig von der H_2O_2 -Konzentration war. Je höher die Zugabe an Wasserstoffperoxid war, desto höher war auch die Intensität der Spektren. Außerdem war die Stabilität des Adduktes bei der „steady-state“-Reaktion im Verlauf der Zeit sichtbar. Daraus kann geschlossen werden, dass die Bildung von DMPO-OH-Addukten über einen langen Reaktionszeitraum trotz Zerfall der gebildeten Addukte relativ hoch ist und somit die Intensität der Spektren relativ konstant bleibt. Bei den untersuchten Fenton-Reagenzien mit DMPO als Spin-Trap im „steady-state“-Verfahren war die Intensität nach einer Reaktionszeit von fast 20 h nur im geringen Maße zurückgegangen. Laut der Arbeit von Y. Mizuta et. al. [46] wird angenommen, dass die Fenton-Reaktion und die Effizienz der Bildung von DMPO-OH abhängig ist

von der Konzentration an Fe^{2+} . Wenn die Konzentration an Fe^{2+} 2,5 μM übersteigt, wird der Verbrauch von DMPO-OH zeitabhängig. Das bedeutet, dass es bei Reduktion von Fe^{2+} mit einem Wasserstoffperoxid zu einer Abnahme des DMPO-OH-Ertrags im zeitlichen Verlauf kommt. Von besonderem Interesse war der anfängliche Verlauf der Fenton-Reaktion, welcher die Bildung von Hydroxyl-Radikalen zeigt. Dafür wurde eine Durchflusszelle verwendet. Mit diesem Versuchsaufbau war es möglich, die einzelnen Reagenzien direkt vor der Messung und Eintritt in die Zelle aufeinander treffen zu lassen und die Reaktionen in den ersten Minuten verfolgt werden. Bei der Fenton-Reaktion mit FeSO_4 in der Durchflusszelle war der exponentielle Anstieg innerhalb der ersten Stunde mit einer Reaktionskinetik von $v = 3,084$ a.u./h bei 8 μl H_2O_2 im Durchflusssystem und einer Reaktion 1. Ordnung gut erkennbar. Außerdem war zu sehen, dass erst nach einigen Minuten eine nachweisbare Signalintensität erzeugt wurde. Diese Verzögerung ist auf die geringere Effizienz der Durchmischung in der Durchflusszelle zurückzuführen. Es konnte aufgrund des Verlaufs der Reaktion keine Reaktionskinetik ermittelt werden, da aus dem Kurvenverlauf ersichtlich ist, dass die Bildung von OH-Radikalen schon abgeschlossen war vor Beginn der Messung. Die geringste Intensität besaß die Reaktion mit 2 μl Wasserstoffperoxid und die höchste wurde wie bei allen anderen Fenton-Reagenzien bei 32 μl H_2O_2 ermittelt. Bei den erfassten Werten wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Konzentration an zugegebenen H_2O_2 und der Reaktionskinetik klar erkennbar. Auch bei allen weiteren eingesetzten Fenton-Reagenzien war ein Einfluss der Konzentration an Wasserstoffperoxid auf die Reaktionskinetik nachweisbar. Grundsätzlich kann gesagt werden, dass je höher die zugegebene Konzentration an H_2O_2 war umso höher war auch bei allen Fenton-Reagenzien die Intensität der Reaktion.

Bei dem Fenton-Reagenz FeCl_3 war ein ähnlicher Reaktionsverlauf wie bei FeSO_4 erkennbar. Die Reaktion war abhängig von der Konzentration an Wasserstoffperoxid. Eigentlich sollte bei einer reinen Eisen(III)-Probe keine Fenton-Reaktion nachweisbar sein, da es keine Möglichkeit der Oxidation von Fe^{2+} gäbe. Laut der Arbeit von Guttridge et. al. [47] ist es nicht möglich, dass H_2O_2 Eisenverbindungen reduziert und dabei Hydroxyl-Radikale bildet. Eine andere Erklärung für diesen Verlauf ist möglicherweise die eingesetzte Substanz selbst. Nach den Angaben der Herstellerfirma enthält FeCl_3 einen maximalen Reinheitsgrad von $\geq 98\%$. Da somit kein 100%iges Fe^{3+} enthalten war, ist eine Reaktion mit den in der Probe enthaltenen Verunreinigungen möglich.

Gegenüber den ersten beiden Reagenzien welche, wie bereits erwähnt, relativ ähnlich reagiert haben, ist bei (Tee)-Nanoeisen ein anderer Verlauf der Signalintensität über die Zeit zu erkennen. Die Intensität der Spektren steigt auch hier mit der zunehmenden Konzentration an Wasserstoffperoxid an. Bei der Zugabe von 32 µl H₂O₂ war die Intensität der Spektren erwartungsgemäß am höchsten, doch war außerdem zu erkennen, dass das Intensitätsmaximum in Abhängigkeit von der Zeit nach etwa 4h schnell abnimmt. Die Reaktionskinetiken von (Tee)-Nanoeisen mit unterschiedlicher Konzentration an H₂O₂ war gegenüber allen anderen Fenton-Reagenzien insgesamt am höchsten. Dies lässt auf einen schnellen Verbrauch der einzelnen Fenton-Reagenzien schließen. Ein Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Reaktionskinetik war wiederum nachweisbar. Eine Erklärung für die hohe Intensität von (Tee)-Nanoeisen ist stark antioxidative Wirkung und die Möglichkeit dadurch Fe³⁺ zu „zerovalenten“ Eisen zu reduzieren [48].

Bei der Fenton-Reaktion von Magnetit in Abhängigkeit zur H₂O₂-Konzentration pro Testansatz wurde nur eine geringe Intensität der DMPO-OH Spektren nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung für diesen Verlauf der Reaktion, wäre vielleicht der hydrophobe Charakter von Magnetit oder aber die relativ hohe Kinetik, wodurch die Reaktion rascher als bei den anderen Eisenverbindungen von statten geht. Nach den Ergebnissen von Kapitel 3.4 Abbildung 32 war zu erkennen, dass das Reaktionsmaximum bei einer Zugabe von 32 µl H₂O₂ innerhalb der ersten Stunde nach Beginn der Reaktion zu finden ist und die Intensität danach signifikant kleiner wurde. Somit wurde in kurzer Zeit H₂O₂ verbraucht. Bei geringerer Zugabe von Wasserstoffperoxid war das Reaktionsmaximum zeitlich nach hinten verschoben und die Kinetik daher nicht so rasch.

Nach der Produktion von Magnetit wurde die magnetische Eigenschaft mit einem einfachen Test nachgewiesen, doch wurde das Verhältnis von Eisen(II)- und Eisen(III)-Verbindungen nicht ermittelt. Da sich die Präparation als schwierig erwies und keine Tests zur molekularen Zusammensetzung durchgeführt wurden, ist es nicht erbracht, dass es sich bei dem hergestellten Produkt um eine Fe(II) Fe(III)-Verbindung handelt. Bei der Präparation des Stoffes wurde unter Ausschluss von Sauerstoff gearbeitet, doch wäre es möglich, dass die Eisenverbindung durch ungewünschte Zufuhr von Luftsauerstoff oxidiert wurde, sodass nur ein geringer Anteil an Eisen(II) vorhanden wäre. Die erste hergestellte Charge Magnetit wurde bei 4°C unter Normalatmosphäre aufbewahrt. Die zweite Herstellung von Fe^{II}(Fe^{III})₂O₄ wurde

unter Stickstoffatmosphäre portioniert und unter diesen Bedingungen gelagert, um mögliche Oxidationsreaktionen zu verhindern. Außerdem existieren bis jetzt keine veröffentlichten Arbeiten zur Stabilität von Magnetit, sodass das Verhalten des Stoffes auf lange Sicht nicht bekannt ist.

Nach der Arbeit von B. Zhang et.al. [49] kann H_2O_2 Magnetit aktivieren und eine Phenol-Abbaurate von 85% innerhalb von 3 h erzielen. Die Arbeit von Matta et al. [50] zeigte eine Abnahme von 62% von 2,4,6-Trinitrotoluol durch Magnetit mit EDTA, H_2O_2 und CMCD (Carboxymethyl-Cyclodextrin).

In der Arbeit von S. Wan et.al. [51] wurde sowohl die Fähigkeit von Magnetit nachgewiesen, die Fenton-Reaktion zu initialisieren als auch einen erfolgreichen Abbau von organischen Verbindungen zu ermöglichen. Daher sollte eine Reduzierung von Mineralölkohlenwasserstoffen unter Einsatz von Magnetit möglich sein. Doch ist das Probenmaterial Boden von vielen Faktoren und vielen Inhaltsstoffen beeinflusst, sodass oft nicht alle Auswirkungen auf die Reagenzien bekannt sind.

Ein weiterer wichtiger Regulator der Fenton-Reaktion ist H_2O_2 . H_2O_2 ist ein wichtiger Faktor für die Ausführbarkeit der Fenton-Reaktion zur Boden- und Grundwasserremediation [52]. Dabei ist H_2O_2 in Fenton-ähnlichen Reaktionen stabiler als in Fenton-Reaktionen. Zusätzlich wird die Lebensdauer von Wasserstoffperoxid durch den pH-Wert der Lösung beeinflusst. Untersucht wurden diese Eigenschaften mit Magnetit und Phenanthren in Sand.

Weiterhin beeinflusst eine hohe Eisenkonzentration in der Lösung die effektive Produktion von Hydroxyl-Radikalen und die Degradation von organischen Kontaminanten.

Um die Wirkung von H_2O_2 auf die Fenton-Reaktion zu untersuchen, wurde, (Tee)-Nanoeisen mit DMPO und 8 μl H_2O_2 gemessen. Beim Absinken der Reaktionsintensität wurde noch einmal 8 μl H_2O_2 zugeführt. Die wiederholte Zugabe von Wasserstoffperoxid führte zu einem erneuten Anstieg der Signalintensität. Daraus ist zu schließen, dass H_2O_2 ein wichtiger limitierender Faktor dieses Fenton-Systems ist. Das Molaritätsverhältnis von Fenton-Reagenz zu 8 μl H_2O_2 war 143:1. Bei Abnahme der Konzentration von H_2O_2 wird somit auch die Bildung von Hydroxyl-Radikalen zurückgehen bis das Wasserstoffperoxid aufgebraucht ist, und somit die Reaktion nicht mehr stattfinden kann.

Des Weiteren wurde die Fähigkeit der Fentonsysteme unter Einsatz der einzelnen Eisenverbindungen untersucht, Testsubstanzen zu spalten. Als Testsubstanzen wur-

den die Verbindungen Alkan, Cyclopentan als Cycloalkan und Toluol als Aromat gewählt, die in Mineralölen typisch sind. Der für die Detektion eingesetzte Spin-Trap PBN wurde aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften direkt in den Testsubstanzen gelöst. Bei der Reaktion gebildete PBN-Addukte entsprechen jenen mit Hydroxyl-Radikalen [53].

Die Simulation der Fenton-Reaktion mit PBN als Spin-Trap zeigte nur 6 Peaks wohingegen die gemessenen Spektren 10 Maxima aufwiesen. Die zusätzlichen 4 Peaks sind Abbauprodukte des Spin-Traps, welche im Verlauf der Reaktion in der Intensität nachließen. Im Verlauf der Zeit wurde PBN oxidiert und bildete mit sich selbst ein Addukt, welches mit dem EPR-Messgerät detektiert werden konnte. Dieses Addukt beeinflusste die eigentliche Reaktion aber nicht.

Bei der Reaktion der Testsubstanz Cyclopentan wurden die Parameter der Hyperfeinkopplung bei $a(^{14}\text{N}) = 15,337 \text{ G}$ und $a(^1\text{H}) = 2,637 \text{ G}$ ermittelt. Das gebildete Addukt war wiederum der Spin-Trap mit den produzierten Hydroxyl-Radikalen. Die Differenz der Hyperfeinkopplungswerte lassen sich durch die unterschiedliche Polarität des Lösungsmittels erklären. Aus diesem Grund kam es zu Abweichungen der Hyperfeinkopplungswerte.

Alle Fenton-Reagenzien reagierten sehr ähnlich. Es gab nur Unterschiede in der Intensität sowohl der OH•-Addukte als auch des oxidierten PBN. Dies deutet auf unterschiedliche OH-Radikalkonzentration hin, die einerseits vom Fenton-Reagenz abhängig ist, andererseits auf die unterschiedliche Reaktion von OH mit den eingesetzten KWs hindeutet. Bei Magnetit war die Intensität der Hydroxyl-Radikale im Vergleich zum Abbauprodukt relativ gering, bei (Tee)-Nanoeisen hingegen waren die Peaks der Abbauprodukte geringer als die der OH•-Addukte. Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse ist die OH-Radikalbildungsrate. Je mehr Radikale gebildet werden, umso höher wird die Konzentration an Abbauprodukten.

Bei der Reaktion der verschiedenen Eisenverbindungen mit der Testsubstanz Toluol, welche als Beispiel für die Gruppe der Aromaten gewählt wurde, konnten keine nachweisbaren Unterschiede in den detektierten Spektren gegenüber den Messungen unter Verwendung von n-Pentan und Cyclopentan nachgewiesen werden. Die ermittelten Hyperfeinkopplungsparameter lagen bei $a(^{14}\text{N}) = 15,24 \text{ G}$ und $a(^1\text{H}) = 2,704 \text{ G}$. Die geringe Abweichung zu den Werten der beiden anderen Testsubstanzen lässt sich wiederum durch die Polarität des Lösungsmittels erklären. Zumindest wurden die gleichen Addukte detektiert wie mit den Testsubstanzen n-Pentan und

Cyclopentan. Es konnten trotz der unterschiedlichen Verbindungen keine wesentlichen Unterschiede nachgewiesen werden.

Nachdem die erwarteten C-zentrierten Radikale nicht detektiert werden konnten, wurde ein weiterer alternativer Versuch zur Oxidation von Toluol durchgeführt. Durch Photolyse-Reaktion wurde ein UV-empfindliches Peroxid gespalten und dadurch sollte Toluol oxidiert werden. Als photosensitive Substanz wurde Di-tert-butylperoxid verwendet. Durch die Einwirkung von UV-Strahlung zerfällt die O-O-Bindung im Di-tert-butylperoxid und RO•-Radikale sollten das in der Lösung befindliche Toluol oxidieren. Das erhaltene Spektrum zeigte das PBN-RO Addukt, aber keine weiteren Radikalbildungen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Radikalbildung der Lösung keine Auswirkung auf die Testsubstanzen hatte. Somit konnte auch nicht mit RO-Radikalen Toluol-Radikale nachgewiesen werden. Die Reaktion der OH-Radikale mittels Fenton-Systemen mit eingesetzten Testsubstanzen führte zu keinen detektierbaren Radikalen der Testsubstanzen.

Insgesamt kann gesagt werden, dass bei Abschluss der Arbeit die Fenton-Reaktion eine der gewünschten Reaktionen erzielt und somit ein nachweisbarer sowie verbesserter Abbau von Mineralölkohlenwasserstoffen stattgefunden hat. Der höchste Abbau war mit der Zugabe von Nährstoffen und somit mit Hilfe der autochthonen Mikroorganismenflora möglich. Die Phytoremediation war allein mit einer Reduktion um durchschnittlich 7 bis 10 % nicht sehr erfolgreich. Doch in Kombination mit der vorhergehenden mikrobiellen Behandlung der Bodenproben wurde eine maximale Reduktion von Kohlenwasserstoffverbindungen erzielt. Die eingesetzten Eisen-Verbindungen führten zu einer gesteigerten Abbauleistung. Zwar war die erhöhte Leistung von 14 bis 16 % nicht hervorragend, doch konnte eine Verbesserung der Phytoremediation mit vorhergehender Zugabe eines Fenton-Reagenz nachgewiesen werden. Mit Hilfe der EPR-Spektroskopie konnte die Bildung von OH-Radikalen detektiert werden. Doch konnte Veränderung der Testsubstanzen mit Hilfe der bei der Fenton-Reaktion gebildeten Radikale festgestellt werden.

Somit kann zusammenfassend gesagt werden, dass eine Kombination von chemischer Vorbehandlung mit einer nachfolgenden Phytoremediation einen gesteigerten Abbau von KW ermöglichte.

5. Ausblick

Die Arbeit zur Entwicklung eines Abbauprozesses, welches chemische Abbauprozesse mit biologischen verbindet, ist mit Abschluss dieser Arbeit noch nicht vollendet. Die für die Abnahme an Mineralölkohlenwasserstoffen eigentlich eingesetzte Fenton-Reaktion zeigte in dieser Versuchsreihe zwar eine gesteigerte Abnahme an KW, doch sind die Differenzen beim KW-Gehalt gegenüber der reinen Phytoremediation noch relativ gering. Es ist daher notwendig, diese Reaktion in einem einfacheren System weiter zu untersuchen. Da sich Boden als sehr komplexes Probenmaterial erwiesen hat, wären Versuche mit Grundwasser oder Abwasser wahrscheinlich erfolgsversprechender. Außerdem scheint es notwendig, die einzusetzenden Reagenzien, und dabei besonders Magnetit, in deren Herstellung zu optimieren und die Verbindungen bezüglich ihrer Bestandteile zu analysieren. Bei dem Fenton-Reagenz Magnetit war die Zusammensetzung von Fe(II) und Fe(III) nicht geklärt. Auch die Komplexbildung von (Tee)-Nanoeisen ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht ausreichend untersucht.

Bei der Zugabe von Nährstoffen zur Förderung des mikrobiellen Abbaus sollte eine für Mikroorganismen und Pflanzen optimierte Konzentration gefunden werden, so dass beide Organismen unter geeigneten Bedingungen wachsen können.

Bei der Messung der Radikal-Bildung mit Hilfe der EPR-Spektroskopie wurden bis jetzt keine positiven Nachweise der Bildung von freien Radikalen von Mineralölkohlenwasserstoffen mit Hilfe der bei der Fenton-Reaktion produzierten Hydroxyl-Radikale ermittelt. Möglicherweise basiert die Spaltung von Kohlenwasserstoffen nicht auf einer Radikalbildungsreaktion. Um dies eindeutig zu klären, müssten weitere EPR-Messungen durchgeführt werden.

6. Zusammenfassung

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit bestand darin, eine neue Methode zum Abbau von Mineralölkohlenwasserstoffe im Boden zu entwickeln, welche chemische mit biologischen Abbautechniken verbindet und somit die Phytoremediation fördert.

Als chemische Vorbehandlung wurde die Fenton-Reaktion mit dem Einsatz verschiedener Eisenverbindungen genutzt. Als Fenton-Reagenz wurden die Verbindungen FeSO_4 , FeCl_3 , (Tee)-Nanoeisen und Magnetit verwendet. Diese Stoffe wurden in die Bodenproben mit Wasserstoffperoxid gegeben und für eine Versuchszeit von 3 Monaten im Klimaschrank unter kontrollierten Umweltbedingungen inkubiert. Mit Hilfe der Fenton-Reaktion sollten die C-C-Bindungen der im Boden befindlichen langkettigen Mineralölkohlenwasserstoffe gespalten werden, sodass kurzkettige Verbindungen entstehen, die für die nachfolgenden biologischen Abbauprozesse leichter bioverfügbar sind. Zusätzlich zu den chemischen Vorversuchen wurden auch biologische Tests durchgeführt. Dabei wurden dem Versuchsboden Nährstoffe in Form von Stickstoff, Kalium und Phosphor (NPK) zugeführt, um die im Boden natürlich vorkommenden Mikroorganismen zu stärken und somit den Abbauprozess zu fördern. Die mit NPK behandelten Bodenproben wurden wie die anderen Proben für 3 Monaten im Klimaschrank inkubiert und regelmäßig beprobt, um den KW-Gehalt zu bestimmen.

Nach der 3-monatigen Inkubationsphase wurde der Boden in Töpfe und in ein Glashaushaus überführt und Pflanzensamen der Art *Lolium perenne* darauf gesät. Bei diesem Versuchsansatz handelte es sich um Rhizodegradation, eine Form der Phytoremediation, bei der die restlichen Mineralölkohlenwasserstoffe im Boden mit Hilfe von Mikroorganismen im Wurzelraum der Pflanzen weiter abgebaut werden sollten. Die Behandlung der Rhizodegradation dauerte 2 Monate.

Die bei diesem Versuch gewonnenen Ergebnisse zeigten, dass die Fenton-Reaktion mit diesem Versuchsaufbau keinen direkten Abbau von Mineralölkohlenwasserstoffen im Boden bewirkte. Die stärkste Abnahme an Kontaminanten wurde durch Nährstoffzugabe, die zur Aktivierung der Bodenmikroorganismen führte, erreicht. Außerdem wurde bei der Zugabe von Glukose eine signifikante Abnahme an MKW ermittelt. Mit der Phytoremediation allein wurde ein geringer Anteil des KW-Gehalt reduziert.

Nach Zugabe der Fenton-Reagenzien wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollprobe und den mit Fenton-Reagenzien behandelten Proben nachgewiesen. Bei Ermittlung der Biomasse der Versuchspflanzen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Experimenten nachgewiesen. Die höchste Trockenmasse erreichten jeweils die Kontrollproben der einzelnen Versuchsreihen. Insgesamt kann gesagt werden, dass eine Abnahme an MKW durch die biologische Stimulation der Mikroorganismen mit Hilfe von Nährstoffen erzielt wurde kombiniert mit der nachfolgenden Rhizodegradation. Die Zugabe von Fenton-Reagenzien bewirkte die erhoffte Abnahme, doch war diese im Vergleich zur Zugabe von NPKs noch relativ niedrig.

Parallel zu den Abbauversuchen wurden Versuche mit der EPR-Spektroskopie durchgeführt, um den Verlauf der Fenton-Reaktion und die Bildung von Hydroxyl-Radikalen zu untersuchen. Dabei wurde die Abhängigkeit der Reaktion und der einzelnen Reagenzien von der Konzentration an Wasserstoffperoxid sowie die Stabilität der Hydroxyl-Radikale in Relation zur Untersuchungszeit und den verschiedenen Umwelteinflüssen nachgewiesen. Bei der einzelnen Fenton-Reaktionen war H_2O_2 der limitierende Faktor. Nach einer weiteren Zugabe von Wasserstoffperoxid konnte ein erneuter Anstieg von OH-Radikalen detektiert werden. Außerdem wurde die Fenton-Reaktion mit diversen Testsubstanzen untersucht. Als Testsubstanz dienten n-Pentan als Alkan, Cyclopentan als Cycloalkan und Toluol als Aromat. Alle eingesetzten Substanzen gehören zu den typischen Bestandteilen von Mineralölen. Die EPR-Spektren zeigten keine Spaltung der Testsubstanzen durch die gebildeten Hydroxyl-Radikale.

Abschließend kann gesagt werden, dass die Kombination einer chemischen Vorbehandlung mit einem darauf folgenden biologischen Abbau einen guten Ansatz darstellt, doch weitere Experimente notwendig sind, um einen optimalen Abbau von Mineralölkohlenwasserstoffen zu erreichen.

7. Abstract

The goal of this work was to investigate the degrade petroleum hydrocarbons (PHC) of mineral-oil in soil using a combination of chemical and biological degradation techniques.

As chemical pretreatment, the Fenton reaction with differing iron compounds was applied. As Fenton reagents FeSO_4 , FeCl_3 , (tea)-nanoiron and magnetite were used. These materials, in combination with hydrogen peroxide, were added to soil samples. The resulting mixture was incubated for 3 months in a climatic chamber under controlled conditions, and PHC content in the soil was measured in regular intervals.

It was anticipated, that the Fenton reaction would split the carbon bonds of the mineral oils long-chained hydrocarbons into smaller molecules, which are easier to degrade with biological mechanisms. In addition to the chemical pretreatment biological tests were executed.

To boost the autochthonous soil microorganisms, the soil samples were supplemented with a fertilizer (nitrogen, potassium and phosphate). This method accelerated the degradation of hydrocarbons. The fertilizer-enriched samples were incubated in a climatic chamber for 3 months.

After the pretreatment, the soil samples were filled into pots and transferred to a greenhouse. Seeds of *Lolium perenne* were planted on the top of the soil, to investigate phytoremediation of the remaining hydrocarbons after different pretreatments. Petroleum hydrocarbons content was determined after 2 months.

In our experiment Fenton reaction did not lead to a significant degradation of hydrocarbons in the soil. The highest reduction of hydrocarbons was achieved with the addition of nutrients. Furthermore, the method of phytoremediation showed good results in reduction of hydrocarbons, but there were no differences between samples with Fenton reagents and control samples.

In addition to the degradation experiments, tests using EPR spectroscopy were performed to analyze the process of the Fenton reaction and the formation of hydroxyl radicals. The dependence of the reaction on the concentration of hydrogen peroxide

as well as the stability of hydroxyl-radicals in relation to reaction time and different environmental influences was proven.

Furthermore, the Fenton reaction with various kinds of test substances was analyzed. The substances were n-pentane as a type of alkane, cyclopentane as a kind of cycloalkane and toluene as aromatic compound. All these substances are typical components of mineral oils. The EPR spectra did not show any kind of splitting of these test-substances with the help of the produced hydroxyl radicals.

Probe	KW in mg/kg TM Ausgangswert	KW in mg/kg TM 2. Woche	KW in mg/kg TM 4. Woche	KW in mg/kg TM 6. Woche	KW in mg/kg TM 8. Woche	KW in mg/kg TM Start Phytoremediation 10. Woche	KW in mg/kg TM Ende Phytoremediation 18. Woche
169669 Kontrolle	38372	40002	37314	39302	38737	38390	36748
169669 NPK	37674	38518	38954	38715	37820	32194	20768
169669 Magnetit	38885	38301	37989	38548	37467	36960	33099
169669 Tee- Nanoisen	40061	38421	38233	37671	37817	37400	32643
169670 Kontrolle	19407	19636	19543	19561	19512	18348	14502
169670 NPK	17986	18503	17977	17076	16865	16322	15024
169670 Magnetit	19981	19552	21265	19352	19044	18426	15289
169670 Tee- Nanoisen	19736	19645	20630	18401	18361	17537	13542

Tabelle 10: Tabellarische Auswertung der Abbauprobungen hB2 und sB2

Probe	KW in mg/kg TM Ausgangswert	KW in mg/kg TM 2. Woche	KW in mg/kg TM 4. Woche	KW in mg/kg TM 6. Woche	KW in mg/kg TM 8. Woche	KW in mg/kg TM Start Phytoremediation 10. Woche	KW in mg/kg TM Ende Phytoremediation 18. Woche
169669 Kontrolle	38372	40002	37314	39302	38737	38390	36748
169669 NPK	37674	38518	38954	38715	37820	32194	20768
169669 Magnetit	38885	38301	37989	38548	37467	36960	33099
169669 Tee- Nanoisen	40061	38421	38233	37671	37817	37400	32643
169670 Kontrolle	19407	19636	19543	19561	19512	18348	14502
169670 NPK	17986	18503	17977	17076	16865	16322	15024
169670 Magnetit	19981	19552	21265	19352	19044	18426	15289
169670 Tee- Nanoisen	19736	19645	20630	18401	18361	17537	13542

Tabelle 11: Tabellarische Auswertung der Abbauprobungen sB1 und hB1

Anhang

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei all denen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Masterarbeit so kräftig unterstützt haben.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen beiden Betreuern, Herr Dr. Thomas Reichenauer und Frau Dr. Katharina Pirker für die tatkräftige Unterstützung bei der Erstellung meiner Arbeit. Vielen Dank für die hilfreichen Anregungen und die Engelsgeduld. Außerdem möchte mich bei allen Mitarbeitern des AIT in Tulln bedanken, besonders bei Herrn Christian Mayer, der mir bei vielen Problemen zur Seite stand und Frau Martha Klampfer, welche sich hingebungsvoll um meine Pflanzen gekümmert hat.

Zudem möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Studium überhaupt erst ermöglicht und mich nicht nur finanziell, sondern auch moralisch immer unterstützt und mir den Rücken gestärkt haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Schulbildung

1991-1995	19. Grundschule Dessau
1995-2004	Fürst-Franz-Gymnasium Dessau
	Abschluss: Abitur

Beruflicher Werdegang

2004	Praktikum an der Fachhochschule Köthen
2004	Beginn Studium an der Fachhochschule Jena
2005	Praktikum bei der GMBU e.V.
2008	Praktikum sowie Diplomarbeit in der RIEMSER Arzneimittel AG
	Diplomthema: „Nachweis von Nukleinsäuren in Lysaten humaner Blutzellen“
2008	Abbruch Studium Pharma-Biotechnologie
2008	Wechsel vom Diplom-Studium Pharma-Biotechnologie zum Bachelor-Studiengang Biotechnologie an der Fachhochschule Jena
2010	Erfolgreicher Abschluss des Studiums
	Beginn Studium an der Universität Wien
	Studienfach: Pflanzenwissenschaften
2013	Voraussichtlicher Abschluss des Studiums

Literaturverzeichnis

- [1] E. Pilon-Smits
"Phytoremediation"
Annual Review of Plant Biology, Vol.56, 2005, pp. 15-39
- [2] B. Jung, B.E Sleep, D.M. O'Carroll
"Stabilization of nanoscale zerovalent iron [nZVI] with green tea"
Abstracts of Papers American Chemical Society, Vol. 240, 2010, pp. 256-ENVR
- [3] B. Bianco, P. Macolino, S. Quattranni
"Effect of Fenton process on biological treatment of industrial waste water"
Journal of Biotechnology, Vol. 150, 2010, Suppl. 1, p. 58
- [4] A.A. Juwarkar, S.K. Singh, A. Mudhoo,
"A comprehensive overview of elements in bioremediation"
Review of Environmental Scientific Biotechnology, Vol. 9, 2010, pp. 215-288
- [5] R. Sen, S. Chakrabarti
"Biotechnology-applications to environmental remediation in resource exploitation"
Current Science, Vol. 97, 2009, pp. 768-775
- [6] G.-D. Wang, X.-Y. Chen
"Detoxification of soil phenolic pollutants by plant secretory enzyme"
Methods in Biotechnology, Vol. 23, 2007, pp. 49-57,
- [7] M. Okrusch, S. Matthes
"Mineralogie, Eine Einführung in die spezielle Mineralogie, Petrologie und Lagerstättenkunde"
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Auflage 7, 2005, pp. 51-52
- [8] G.E. Hoag, J.B. Collins, J.L. Holcomb, J.R. Hoag, M.N. Nadagouda, R.S. Varma
"Degradation of bromothymol blue by "greener" nano-scale zero-valent iron synthesized using tea polyphenols"
Journal of Materials Chemistry, Vol. 19, 2009, pp. 8671-8677
- [9] M. Usman, P. Faure, C. Ruby, K. Hanna
"Application of magnetite-activated persulfate oxidation for the degradation of PAH in contaminated soils"
Chemosphere, Vol. 1, 2012, p. 157
- [10] United Nations Environment Programme
"Phytotechnologies: A technical approach in environmental management"
Freshwater Management 7
- [11] G. Schwedt
"Taschenatlas der Lebensmittelchemie"
Wiley-VCH, Weinheim, 2005, Auflage 2
- [12] P. Westerhoff, G. Aiken, G. Amy
"Relationships between the structure of natural organic matter and its reactivity towards molecular ozone and hydroxyl radicals"
Water Research, Vol. 33, 1999, pp. 2265-2276
- [13] M.C. Pereira, L.C.A. Oliveira, E. Murad
"Iron oxide catalysts: Fenton and Fenton-like reactions – a review"
Clay Minerals, Vol.47, 2012, pp. 285-302

- [14] F. Laurent, A. Cébron, C. Schwartz, C. Leyval
 "Oxidation of a PAH polluted soil using modified fenton reaction in unsaturated conditions"
 Chemosphere, Vol. 86, 2012, pp. 659-664
- [15] A.L. Juhasz, R. Naidu
 "Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons. A review of the microbial degradation of benzo[α]pyrene"
 International Biodeterioration & Biodegradation, Vol. 45, 2000, pp. 57-88
- [16] N. Dulova, M. Trapido, A. Dulov
 "Catalytic degradation of picric acid by heterogeneous Fenton-based processes"
 Environmental Technology, Vol. 32, 2011, pp. 439-446
- [17] E. Pilon-Smith
 "Phytoremediation"
 Annual Reviews of Plant Biology, 2005, Vol. 56, p. 15-39
- [18] S. Chatterjee, P. Chattopadhyay, S. Roy, S. K. Sen
 "Bioremediation: a tool for cleaning polluted environments"
 Journal of Applied Biosciences, 2008, Vol. 11, p. 594-601
- [19] P. Atkins
 "Physical Chemistry"
 Oxford University Press, Oxford, 1986, Auflage 1
- [20] E.L. Que, G. Palmer,
 "Physical Methods in Bioinorganic Chemistry: Spectroscopy and Magnetism"
 University Science Books, 2000, p. 241
- [21] S. Büttgenbach
 "Hyperfine structure in 4d- and 5d-shell atoms"
 Springer Verlag, Berlin, 1982
- [22] M. Drescher
 "Elektronenresonanz-Spektroskopie"
 Chemie in unserer Zeit 46, Nr. 3, 2012, pp. 150-157
- [23] L. Armstrong
 "Theory of the hyperfine structure of free atoms"
 Wiley-Interscience, New Jersey, 1971, p. 2
- [24] J.A. Weil, J.E. Wertz
 "Electron Paramagnetic Resonance"
 Wiley-Interscience, New Jersey, 1994, p. 38
- [25] S. Hauptmann
 "Organische Chemie"
 VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, 2. Auflage, 1985, p. 281
- [26] L. Packer, A.N. Glazer
 "Oxygen radicals in biological systems, Part B Oxygen Radicals and Antioxidants"
 Methods in Enzymology, Vol. 186, 1990, New York Academic Press, p. 127
- [27] R.V. Lloyd, P.M. Hanna, R.P. Mason
 "The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction"
 Free Radical Biology & Medicine, Vol. 22, No. 5, 1997, pp. 885-888
- [28] K. Makino, T. Hagiwara, A. Murakami
 "A mini review: Fundamental aspects of spin trapping with DMPO"
 International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine, Vol. 37, No. 5/6, 1991, pp. 657-665

- [29] S.S. Eaton., G.R. Eaton, L.J. Berliner
 "Measurement of distance between electron spins using pulsed EPR"
 Biological Magnetic Resonance, Vol. 24, 2004, pp. 223-236
- [30] B. Bittner, K. Mäder, C. Kroll, H.-H. Borchert, T. Kissel
 "Tetracycline-HCl-loaded poly(DL-Lactide-co-glycolide) microspheres prepared by spray drying technique: influence of γ -irradiation on radical formation and polymer degradation"
 Journal of Controlled Release, Vol. 59, Issue 1, 1999, pp. 23-32
- [31] E.G. Janzen, Y. Kotake, R.D. Hinton
 "Stabilities of hydroxyl radical spin adducts of PBN-type spin traps"
 Free Radical Biology and Medicine, Vol. 12, 1992, pp. 169-173
- [32] B.C. Gilbert, N.M. Atherton, M.J. Davies
 "Electron Spin Resonance"
 The Royal Society of Chemistry, Vol. 14, Cambridge, 1994, p. 283
- [33] H. Khalil, T. Kone, C. Ruby
 "Fenton-like oxidation and mineralization of phenol using synthetic Fe(II)-Fe(III) green rust"
 Environmental Sciences and Pollution Research, Vol. 17, 2010, pp. 124-134
- [34] M.N. Nadagouda, A.B. Castle, R.C. Murdock, S.M. Hussain, R.S. Varma
 "In vitro biocompatibility of nanoscale zerovalent iron particles (NZVI) synthesized using tea polyphenols"
 Green Chemistry, Vol. 12, 2010, pp. 114-122
- [35] DIN Deutsches Institut für Normung
 "Bestimmung der Abundanz und Aktivität der Bodenmikroflora mit Hilfe von Atmungskurven"
 DIN Deutsches Institut für Normung e.V., DIN ISO 17155, 2003, pp. 2-16
- [36] G.R. Buettner
 "Spin trapping: ESR parameters of spin adducts"
 Free Radical Biology and Medicine, Vol.3, 1987, pp. 259-303
- [37] C. Valderrama, R. Alessandri, J.L. Cortina, X. Gamisans, T. Tuhkanen
 "Oxidation by Fenton's reagent combined with biological treatment applied to a creosote-contaminated soil"
 Journal of Hazardous Materials, Vol. 166, 2009, pp. 594-602
- [38] Venny, S. Gan, H. Kiat Ng
 "Modified Fenton oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soils and the potential of bioremediation as post-treatment"
 Science of the Total Environment, Vol. 419, 2012, pp. 240-249
- [39] W. Li, J. Lu, F. Chen, X. Li
 "Effect of NPK Application on Yield, Nutrients and Water Utilization under Sudangrass and Ryegrass Rotation Regime"
 Agricultural Sciences in China, Vol.: 9(7), 2010, pp. 1026-1034
- [40] NK. Fageria
 "Use of Nutrients in Crop Plants"
 CRC Press – Taylor and Francis Group, 2009
- [41] J. Tang, R. Wang, X. Niu, Q. Zhou
 "Enhancement of soil petroleum remediation by using a combination of ryegrass (*Lolium perenne*) and different microorganisms"
 Soil and Tillage Research, Vol. 110, Issue 1, 2010, pp. 87-93

- [42] M. Usmann, P. Faure, C. Lorgeoux, C. Ruby, K. Hanna
 "Treatment of hydrocarbon contamination under flow through conditions by using magnetite catalyzed chemical oxidation"
 Environmental Science and Pollution Research; Vol. 20, Issue 1, 2013, pp. 22-30
- [43] P.M. White, D.C: Wolf, G.L. Thoma, C. M: Reynolds
 "Phytoremediation of Alkylated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in a Crude Oil-Contaminated Soil"
 Water, Air and Soil Pollution, Vol. 169, 2006, pp. 207-220
- [44] J. C. Thomas, R. T. Dabkowski
 "Glucose and plant exudate enhanced enumeration of bacteria capable of degrading polycyclic aromatic hydrocarbons"
 Canadian Journal of Microbiology, Vol. 57, Issue 12, 2011, pp. 1067-1072
- [45] D.C. Borg, K. M. Schaich, A. Forman
 "Autoxidative cytotoxicity: Is there metal independent formation of hydroxyl radicals? Are there "Crypto-hydroxyl" radicals"
 Oxygen Radicals in Chemistry and Biology. 1984, pp. 123-129
- [46] Y. Mizuta, T. Masunizu, M. Kohno, A. Mori, L. Packer
 "Kinetic analysis of the Fenton reaction by ESR-Spin trapping"
 Biochemistry and Molecular Biology International, Vol. 43, No. 5, 1997, pp. 1107-1120
- [47] J.M.C. Gutteridge, L. Maidt, L. Poyer
 "Superoxide dismutase and Fenton chemistry"
 Biochemical Journal, Vol. 269, 1990, pp. 169-174
- [48] S. Machado, S. L. Pinto, J. P. Grosso, H. P. A. Nouws, J. T. Albergaria, C. Delerue-Matos
 "Green production of zero-valent iron nanoparticles using tree leaf extracts"
 Science of the Total Environment, Vol. 445-446, 2013, pp. 1-8
- [49] B. Zhang, J. Zhuang, L.Z. Gao, Y. Zhang, N. Gu, J. Feng, D.L. Yang, J.D. Zhu, X.Y. Yan
 "Decomposing phenol by the hidden talent of ferromagnetic nanoparticles"
 Chemosphere, Vol. 73(9), 2008, pp. 1524-1528
- [50] R. Matta, K. Hanna, T. Kone, S. Chiron
 "Oxidation of 2,4,6-Trinitrotoluene in the presence of different iron-bearing minerals at neutral pH"
 Chemical Engineering Journal, Vol. 144, 2008, pp. 453-458
- [51] S. Wan, J. Huang, H. Yan, K. Liu
 "Size-controlled preparation of magnetite nanoparticles in the presence of graft copolymers"
 Journal of Materials Chemistry, Vol. 16, 2006, pp. 298-303
- [52] S. Jung, W.T. Lim, J. Park, Y. Kim
 "Effect of pH on Fenton and Fenton-like oxidation"
 Environmental Technology, Vol. 30(2), 2009. pp. 183-190(8)
- [53] G.R. Buettner
 "Spin Trapping: ESR Parameters of Spin Adducts"
 Free Radical Biology & Medicine, Vol.3, 1987, pp. 259-303