

3 MATERIAL UND METHODEN

Für die Lösung der gestellten Aufgaben wurde im Zusammenhang mit den der Dissertation zugrunde liegenden zwei Forschungsprojekten " Validierung des Ammoniumoxidaions- und Bodenatmungstests als Bestandteil einer ökotoxikologischen Testbatterie zur Bewertung der ökotoxikologischen Auswirkungen von Bauprodukten auf Böden" (Testphasen I und II), die folgende Vorgehensweise gewählt:

Testphase I fand in den Jahren 2004-2005 statt. In ihr wurden jeweils zwei Testböden (Kennzeichnung in der Dissertation: *BOR -sandig, wenig Anteil an organischem Kohlenstoff* und *EBB - lehmig, hoher Anteil an organischem Kohlenstoff*) mit den Eluaten von zwei Bauprodukten (Bodeninjektionsmittel auf Acrylatbasis und Kanalrohrsanierungsmittel auf Epoxidbasis) kontaminiert und ihre Wirkung auf die Bodenmikrobiologie getestet. Gleichzeitig wurde die Wirkung auf aquatische Organismen geprüft. Im Einzelnen wurde folgende Vorgehensweise gewählt:

- A) Auswahl von Testböden aus den Referenzböden (RefeSol) durch den Forschungsbegleitkreis
- B) Bodenkundliche und chemische Charakterisierung der Testböden
- C) Herstellung und Charakterisierung von Prüfkörpern (Bauprodukteluat) am Hygieneinstitut Gelsenkirchen
- D) Vorbehandlung der Testböden mit den Eluaten
- E) Durchführung der terrestrischen ökotoxikologischen Testverfahren (nach DIN ISO 17155 und 15685) nach einer Woche Inkubationszeit an der TU Berlin. Parallel dazu: Durchführung des Leuchtbakterienlumineszenstests (nach EN DIN/ISO 11348 -2), Leuchtbakterienzellvermehrungs-Hemmtest (nach DIN 38412-37), Argentest (nach DIN 38412-L 33) und des Abbautests (nach OECD 301 E = OECD-Screening- Test) an der FhG/IME sowie Auswertung und Darstellung der Versuchsergebnisse
- F) Dreimonatige Lagerung der kontaminierten Testböden und der nichtkontaminierten Testböden (Kontrolle) zur Berücksichtigung der Alterung der Böden und potenzieller Schadstoffe
- G) Wiederholung der terrestrischen Testverfahren nach zwölfwöchiger Inkubationszeit sowie Auswertung und Darstellung der Versuchsergebnisse

Testphase II fand in den Jahren 2005-2006 statt. Es wurden die gleichen Bauprodukte erneut eluiert und an zwei weiteren Referenzböden (Kennzeichnung in der Dissertation: *HAG - sandig, geringer Anteil an organischem Kohlenstoff* und *LEU- sandig, hoher Anteil an organischem Kohlenstoff*), die sich von denen der ersten Testphase in ihren Eigenschaften unterschieden, getestet. In Testphase II wurde die nachstehende Vorgehensweise gewählt:

- A) Auswahl von Testböden aus den Referenzböden (RefeSol) durch den Forschungsbegleitkreis

- B) Bodenkundliche und chemische Charakterisierung der Testböden
- C) Herstellung und Charakterisierung von Prüfkörpern (Bauprodukteluat) am Hygieneinstitut Gelsenkirchen
- D) Vorbehandlung der Testböden mit den Eluaten
- E) Durchführung der terrestrischen Testverfahren (nach DIN ISO 17155 und 15685) nach einer Woche Inkubationszeit an der TU Berlin. Parallel dazu: Durchführung des Leuchtbakterienlumineszenztests (nach DIN EN ISO 11348 –2) und des Abbautests (nach OECD 301 E = OECD-Screening- Test) an der FhG/IME sowie Auswertung und Darstellung der Versuchsergebnisse. Der Leuchtbakterienzellvermehrungs-Hemmtest und der Algentest wurden in der zweiten Testphase nicht durchgeführt.
- F) Dreimonatige Lagerung der kontaminierten Testböden und der nichtkontaminierten Testböden (Kontrolle) zur Berücksichtigung der Alterung der Böden und potenzieller Schadstoffe
- G) Wiederholung der terrestrischen Testverfahren nach zwölfwöchiger Inkubationszeit sowie Auswertung und Darstellung der Versuchsergebnisse

Anschließend wurden die Ergebnisse beider Testphasen zusammengefasst, verglichen, wissenschaftlich bewertet und diskutiert. Dazu wurden die folgenden Schritte gewählt:

- A) Vergleich, und Diskussion der Ergebnisse im Hinblick auf die Eignung der angewandten ökotoxikologischen Methoden für die Bewertung im Rahmen von Vorsorgeanforderungen hinsichtlich der Auswirkungen von Bauprodukten auf die Schutzgüter Boden und Grundwasser
- B) Erarbeitung von Bewertungsmaßstäben und Empfehlungen für die Bewertung der Auswirkungen von Bauprodukten auf Boden und Grundwasser für die Produktgruppen Bodeninjektionsmittel und Kanalrohrsanierungsmittel
- C) Bewertung der Ergebnisse hinsichtlich der Validität der angewendeten terrestrischen Verfahren sowie der Anwendbarkeit für die Bewertung der Wirkungen von Bauprodukten auf Böden. Schlussfolgerungen und Vorschlag einer ökotoxikologischen Testbatterie zur Bewertung der Wirkungen der Bauproduktengruppe "Bodeninjektionsmittel und Kanalrohrsanierungsmittel" auf Böden

Nachfolgendes Schema stellt den Ablauf zusammengefasst dar (Abb. 13).

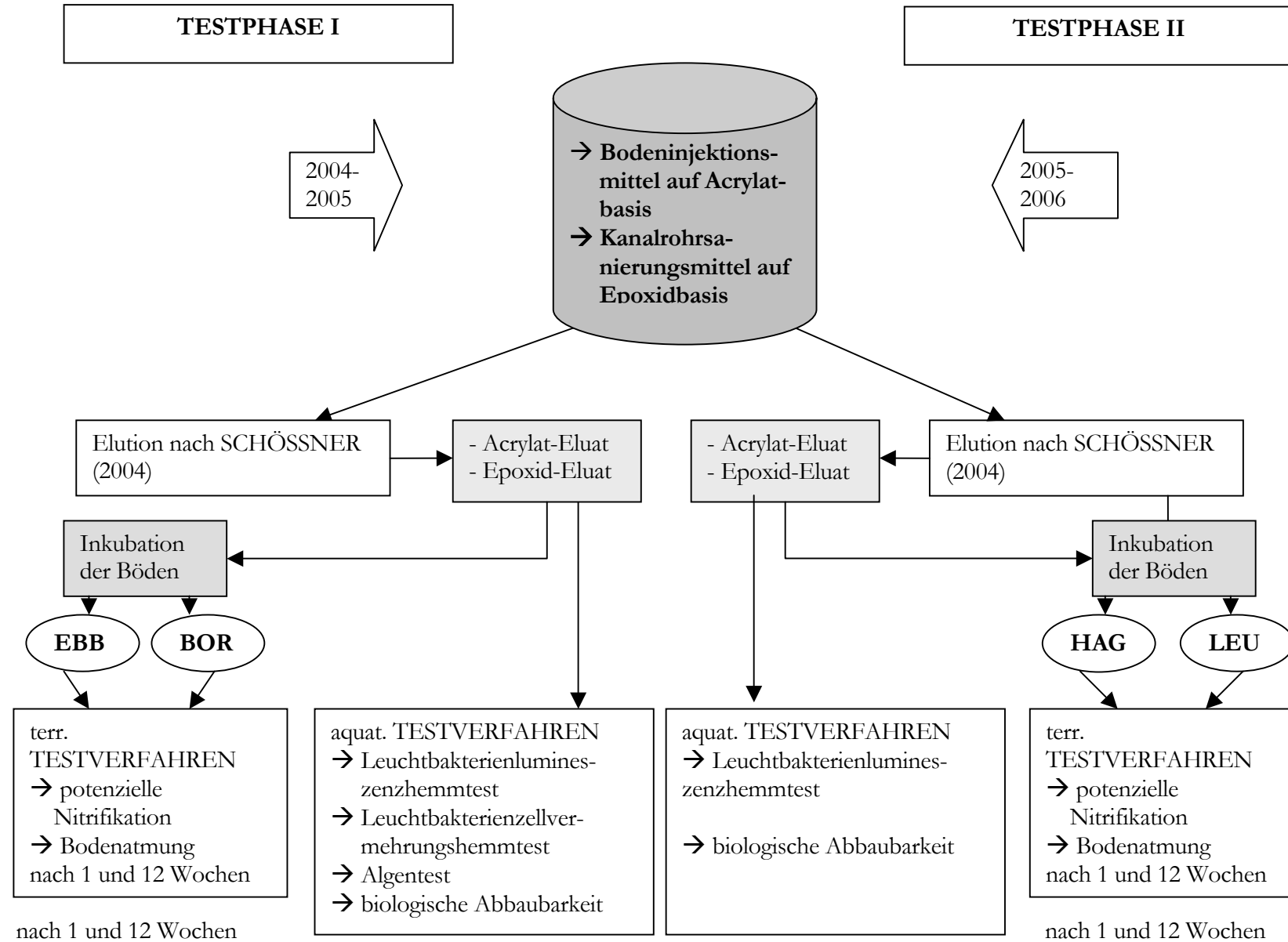


Abbildung 13: Ablauf der Untersuchungen

3.1 Herstellung und Charakterisierung von Prüfkörpern

Um die genannten biologischen Testverfahren für ihre Anwendung zur Bewertung der ökotoxikologischen Wirkungen von Bauprodukten auf Böden zu evaluieren, mussten geeignete Bauprodukte ausgewählt und bereitgestellt werden. Die Auswahl der Bauprodukte wurde in Absprache zwischen dem DIBt, der Bauchemie, die die Bauprodukte zur Verfügung stellte, und dem Hygieneinstitut Gelsenkirchen getroffen (Kapitel 1).

Aus Sicht des Boden- und Grundwasserschutzes sind die unter praxis- bzw. anwendungsnahen Bedingungen mobilisierbaren und bioverfügbaren Stoffe maßgebend. Ziel aquatischer Testsysteme wie auch der biologischen terrestrischen Testverfahren ist es daher, diesen mobilen, bioverfügbaren Anteil von Kontaminanten zu erfassen. Dazu müssen zunächst Eluate hergestellt werden (Kapitel 3.1.2). Der Vorteil dieser Verfahrensweise ist die hohe Umweltrelevanz. Der natürliche Eintrittspfad von potenziellen Schadstoffen aus Bauprodukten wird simuliert, da davon auszugehen ist, dass mögliche Schadstoffe vor allem in der Reaktions- und Aushärtungsphase aus den Bauprodukten herausgelöst und im umgebenden Boden verteilt oder in Richtung Grundwasser transportiert werden. Damit wird ein „worst case“ im Hinblick auf das Bodenporenwasser dargestellt, in dem die Kontaminanten im Boden vorliegen.

Diesem Ansatz entsprechend sind auch nach DIBt-Merkblatt "Bewertung der Auswirkungen von Bauprodukten auf Boden und Grundwasser" die chemische Zusammensetzung der Bauprodukte und die im jeweiligen Anwendungsfall durch Einwirkung von Wasser eluierbaren Inhaltsstoffe und deren mögliche Auswirkungen auf Boden und Grundwasser zu bewerten.

Da es sich in dieser Arbeit nicht um ein Zulassungsverfahren von Bauprodukten, sondern um die Evaluierung der biologischen Testverfahren handelt, wurde keine chemische Analyse und Bewertung entsprechend der Stufe 2, Schritt 2 vorgenommen.

3.1.1 Auswahl und Charakterisierung der Bauprodukte

Im Rahmen der dieser Arbeit zugrunde liegenden Forschungsprojekte "Ermittlung der Eignung des Ammoniumoxidations- und Bodenatmungstests zur Bewertung der ökotoxikologischen Auswirkungen von Bauprodukten auf Böden, Teil I und Teil II" wurden als Test-Bauprodukte ein Kanalsanierungsmittel auf Basis eines kalthärtenden Epoxidharzes und ein Bodeninjektionsmittel auf Acrylatbasis eingesetzt.

Das Bodeninjektionsmittel auf Acrylatbasis wurde auf Grund seiner Umweltrelevanz und seiner Marktbedeutung ausgewählt. Produkte auf Epoxidharzbasis haben in der Bauwirtschaft erhebliche Bedeutung (Kapitel 3.1.1.1). Bei dem ausgewählten Kanalrohrsanierungsmittel

handelt es sich um ein noch nicht am Markt erhältliches Erzeugnis, das sich erst in der Entwicklung befindet.

3.1.1.1 Physikalische und chemische Charakterisierung der relevanten Inhaltsstoffe der untersuchten Bauprodukte

a) Bodeninjektionsmittel auf Acrylatbasis

Bodeninjektionsmittel auf **Acrylatbasis** (Methacrylatharze) werden im Baugewerbe unter anderem als Bauwerksabdichtungen und Kanalsanierungsmittel eingesetzt (Stein et al., 1991).

Sie bestehen aus polymeren und monomeren Acrylaten und Methacrylaten sowie zusätzlichen Additiven. Zur räumlichen Vernetzung der polymeren Acrylate werden multifunktionelle Monomere zugegeben (Martens, 1998).

Bodeninjektionsmittel auf Acrylatbasis werden erst kurz vor Anwendung aus mehreren Komponenten angemischt. Das verwendete Produkt besteht im Wesentlichen aus dem Acrylatmonomer **2-Hydroxyethyl-methacrylat** (Komponente A 1), das mit Hilfe von Initiatoren, bestehend aus einem Polymerisationsbeschleuniger, in diesem Fall **2-Dimethyl-aminoethyl-methacrylat** (= Reduktionsmittel) (Komponente A 2) und einem Härter (Oxidationsmittel) (Komponente B) zu einem Acrylatpolymer (Abb. 14 und 15) reagiert (Deutsche Bauchemie, 2004). Der beigegefügte Härter ist **Natriumpersulfat** (Tab. 3).

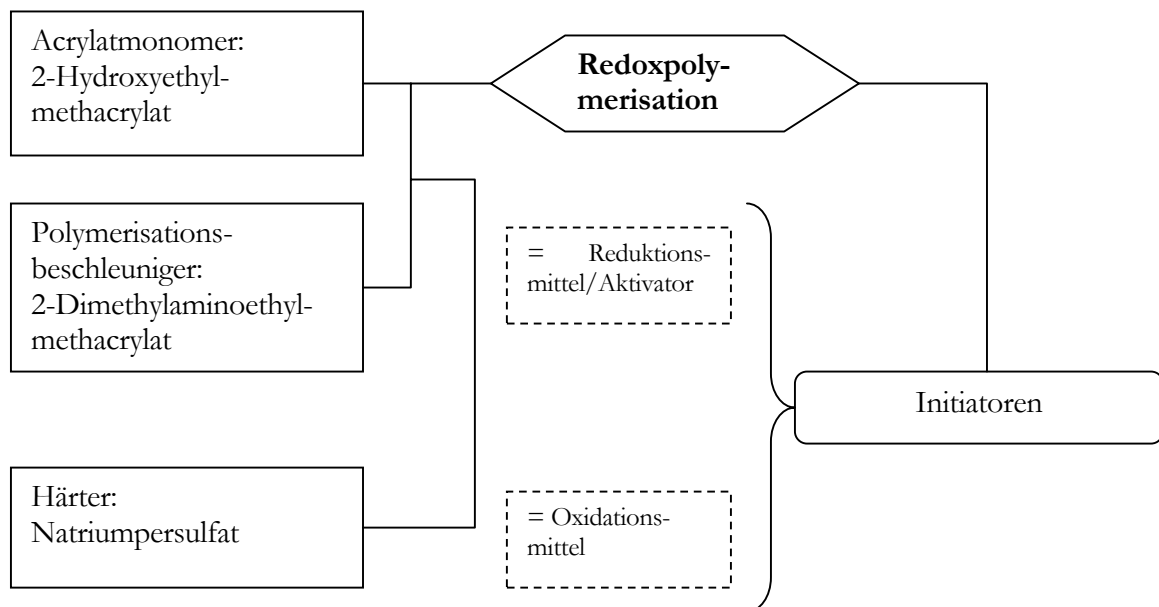


Abbildung 14: Redoxpolymerisation des untersuchten Bodeninjektionsmittels (nach Martens, 1998)

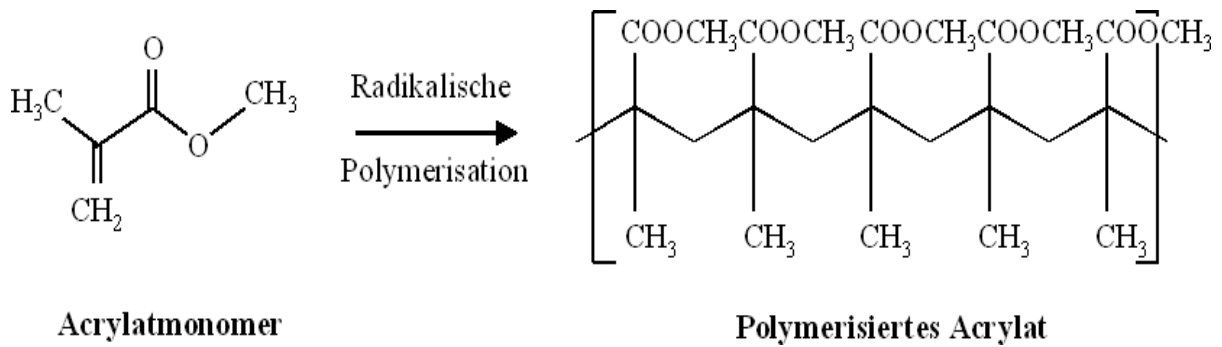


Abbildung 15: Grundreaktion von Acrylatmonomeren unter Einfluss eines Radikals zu polymerisiertem Acrylat (Wagner, 2005, nach Deutsche Bauchemie, 2004)

Acrylatmonomere stellen ungesättigte Verbindungen dar, die durch Aneinanderlagerung gesättigte Makromoleküle bilden. Die Aushärtung erfolgt durch Verknüpfung zu langen Kettenmolekülen (radikalische Redox-Polymerisation) (Deutsche Bauchemie, 2004).

Tabelle 3: Physikalisch-chemische Charakterisierung des eingesetzten Acrylat-Injektionsmittels und seiner Komponenten (Auszug aus Sicherheitsdatenblatt, 2004)

Bauprodukt Acrylat- Injektionsmittel	Komponente A 1 (Stoffgemisch), bestehend aus 2-Hydroxyethylmethacrylat + Polyethylenglycol 600 Dimethacrylat	Komponente A2, bestehend aus 2-Dimethylaminoethyl- methacrylat	Komponente B, bestehend aus Natriumpersulfat
CAS-Nr.	868-77-9 (2-Hydroxyethylmethacrylat)	2867-47-2	7775-27-1
Löslichkeit/Misch- barkeit in/mit Wasser	unlöslich	nicht bzw. wenig mischbar	gering löslich
Aggregatzustand	fest	flüssig	Pulver
Dampfdruck bei 20°C	23 hPa	13,3 haP	
Dichte	1,076 g/cm ³	0,933 g/cm ³	ca. 1,1 g/cm ³

Injektionsmittel auf Acrylatbasis penetrieren bis in den Schluffbereich hinein und haben damit ein breites Anwendungsspektrum im Baugrund von einer Korngröße von ca. 0,3 mm (Mittelsand) bis ca. 0,009 mm (Mittelschluff). Damit sind chemische Injektionsmittel auf Acrylatbasis aus Sicht der Bauwirtschaft für die Injektion in feinkörnigen Böden prädestiniert.

Die Umgebungstemperatur hat einen deutlichen Einfluss auf die Aushärtungszeit, sie steigt mit abnehmender Temperatur logarithmisch an (Martens, 1998).

Im ausgehärteten Zustand sind Injektionsmittel auf Acrylatbasis nach Angaben der Deutschen Bauchemie (2004) weitestgehend chemisch inerte Stoffe. Bereits bei Eluierungsversuchen, die im Auftrag der Deutschen Bauwirtschaft mit ausgehärteten Probekörpern vorgenommen wurden, konnte festgestellt werden, dass die Durchlässigkeit der Probekörper von der Dauer der Aushärtungszeit (oder auch Gelzeit) abhing.

In der Praxis werden Bodeninjektionsmittel im flüssigen Zustand in den abzudichtenden Baugrund, häufig sogar direkt in das Grundwasser hineingepresst. Dabei entstehen Verdünnungseffekte, die entsprechend längere Aushärtungszeiten (Gelzeiten) zur Folge haben. Es kommt auf Grund dessen vor allem in den ersten Stunden nach dem Einbringen des Injektionskörpers in den gesättigten oder ungesättigten Boden zu Stoffausträgen aller Einzelkomponenten und deren Spaltprodukten, da die Polymerisation der Acrylatmonomere behindert wird. Dies trifft vor allem auf die Randbereiche des Aushärtungskörpers zu. Daraus lässt sich ableiten, dass der Stoffaustrag auch durch die Menge und Strömungsgeschwindigkeit des Wassers gesteuert wird.

Nach dem Maximum des Stoffaustrages, d.h. mit zunehmender Aushärtung, verringert er sich erheblich und ist dann nicht mehr auf Leaching, sondern auf Diffusion von Acrylatmonomeren aus dem Injektionskörper zurückzuführen. Außerdem können Natrium-, Calcium-, Magnesium- und Sulfatverbindungen diffusionsbedingt den Injektionskörper verlassen (Martens, 1998).

b) Kanalrohrsaniierungsmittel (kalthärtendes Epoxidharz)

Epoxidharze (EP-Harze) sind reaktive Kunstharze, die in den verschiedensten Baubereichen eingesetzt werden; den kalthärtenden kommt dabei die größere Bedeutung gegenüber den heißhärtenden Epoxidharzen zu (Korrosionsschutzlacke, Bauwerkssanierungsmittel, Lacke, Klebstoffe, Vergußmassen und Industriefußböden, dickschichtige Anstriche (Deutsche Bauchemie, 2001).

Kalthärtende Epoxidharze benötigen zu ihrer Verwendung geeignete Härtungsmittel (Deutsche Bauchemie, 2001). Entsprechend ihrem Anwendungsgebiet werden ihnen Verdünnungsmittel und Formulierungsstoffe wie Füllstoffe, Pigmente, Additive und Modifizierungsmittel zugesetzt, so dass die Produkte immer aus mehreren Komponenten bestehen. Durch das Anmischen der Komponenten in einem vorgegebenen Verhältnis entsteht ein Reaktionsharz, das innerhalb einer bestimmten Zeit bei Umgebungstemperatur aushärtet. Im ausgehärteten Zustand entsteht somit ein duroplastischer Kunststoff mit einer dreidimensionalen, netzartigen Struktur, der chemisch inert, unschmelzbar und von hoher mechanischer Festigkeit und Härte ist (Deutsche Bauchemie, 2001).

Das Epoxidharz wird durch Umsetzung von **Polyphenolen** (im Baubereich meist **Bisphenol-A** (BPA)) mit **Epichlorhydrin** hergestellt (=Komponente A). Bisphenol-A ist der Trivialname für **2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)-propan**. Durch Umsetzung von BPA mit Epichlorhydrin entstehen über das Zwischenprodukt Bisphenol-A-Diglycidylether (BADGE) Epoxidharze (Abb. 16). Es handelt sich um Polyether mit Epoxygruppen in Endstellung, die durch weitere Vernetzung bzw. Härtung feste Kunststoffe ergeben.

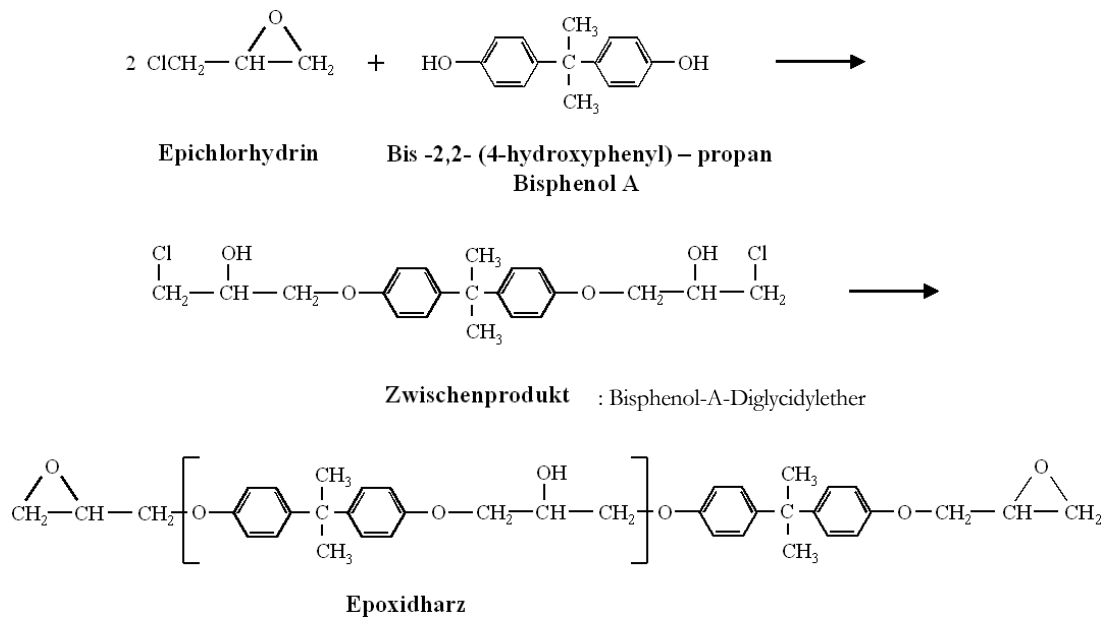


Abbildung 16: Reaktion von Epichlorhydrin mit Bisphenol-A zu einem Basis-Epoxidharz
(Wagner, 2005, aus Latscha et al., 1988)

Für die weitere Verarbeitung sind reaktive Verdüner notwendig, die wie das Epoxidharz, reaktionsfähige Epoxidgruppen enthalten, jedoch auf der Basis von Monophenolen oder aliphatischen Alkoholen aufgebaut sind (Deutsche Bauchemie, 2001). Beim untersuchten Bauprodukt handelte es sich bei dem hinzugefügten Verdüner lt. Sicherheitsdatenblatt um ein Gemisch aus **γ -Glycidoxypropyl-trimethoxysilan**, **Benzylalkohol** und **C₁₂-C₁₄-Alkylglycid-ether**.

Zur Aushärtung des EP-Harzes werden Härtungsmittel (=Komponente B) eingesetzt, welche häufig aus Polyaminen, Polyphenolen sowie Katalysatoren zusammengesetzt sind (Leisewitz und Schwarz, 1998) (Tab. 4). Beim untersuchten Bauprodukt wird als Härtungsmittel ein Gemisch aus **Triethylentetramin**, **4-tert-Butylphenol** und **Benzylalkohol** beigemischt. Durch den Zusatz von Härtern und Verdünnern lassen sich die Epoxidharze räumlich vernetzen.

Die Reaktion von BPA mit Epichlorhydrin ist heute das wichtigste Verfahren zur Herstellung von Epoxidharzen. Etwa 80 Prozent der Epoxidharze werden nach diesem preiswerten und technisch vorteilhaften Verfahren produziert (Leisewitz und Schwarz, 1998).

Tabelle 4: Physikalisch-chemische Charakterisierung des eingesetzten Epoxidharzes und seiner Komponenten (Sicherheitsdatenblatt, 2004 und Leisewitz und Schwartz, 1998)

Bauprodukt Epoxidharz- Kanalrohrsaniierungs- mittel	Komponente A (Stoffgemisch) bestehend aus: Bisphenol-A- Epichlorhydrinharz, γ - Glycidoxypropyl- trimethoxysilan, Benzylalkohol C ₁₂ -C ₁₄ -Alkylglycidether	Komponente B (Stoffgemisch) bestehend aus: Triethylentetramin, 4-tert-Butylphenol und Benzylalkohol
CAS-Nr.	25068-38-6 (Bisphenol-A- Epichlorhydrinharz) 11-51-6 (Benzylalkohol) 68609-97-2 (C ₁₂ -C ₁₄ - Alkylglycidether)	112-24-3 (Triethylentetramin)
Löslichkeit/Mischbarkeit in/mit Wasser	nicht bzw. wenig mischbar	nicht bzw. wenig mischbar (mischbar- Triethylentetramin)
Aggregatzustand, Farbe, Geruch	pastös, gelb, charakteristisch	pastös, rot, charakteristisch
Flammpunkt	> 250 °C	> 150 °C
Dichte	1,75 g/cm ³	1,77 g/cm ³
KOC	293 - 1524 (für Bisphenol-A)	
Dampfdruck	4,1x 10 ⁻⁹ - 5,3x 10 ⁻⁸ Pa (für Bisphenol-A)	

Über das langfristige Verhalten von Epoxidharzen in Böden existiert relativ wenig Wissen. Bekannt ist, dass BPA aus Deponien wahrscheinlich partikelgebunden ins Sickerwasser freigesetzt werden kann (Leisewitz und Schwartz, 1998). Größenordnung und Bedeutung dieser Emissionen sind jedoch noch nicht bekannt. Der Adsorptionskoeffizient von 293-1524 lässt auf eine deutliche Neigung zur Adsorption an Boden, Sedimente und organisches Material zumindest von freigesetztem Bisphenol-A schließen, so dass die Mobilität eher gering sein dürfte. In der Wasserphase reichert sich Bisphenol-A partikelgebunden an.

Epoxidharze zur Kanalrohrsaniierung werden an der Rohrrinnenseite angewendet, d.h. in flüssigem Zustand in beschädigte Kanalrohre eingebracht. Es ist nicht auszuschließen, dass es durch Risse zu Kontaminationen des Bodens und des Grundwassers kommt, solange sich das Epoxidharz noch im nicht ausgehärteten Zustand befindet.

Zur diffusen Freisetzung des ins Polymer eingebundenen **Bisphenol-A** aus Epoxidharzen gibt es bislang, anders als bei weiteren Bisphenol-A-Produkten, die z.B. in der Zahnmedizin oder als Innenbeschichtungen von Konservendosen Verwendung finden, keine Angaben. Nach Herstellerangaben sind Migrationen von Bisphenol-A aus ausgehärteten Epoxidharzen bei einer Nachweisgrenze von 50 ppb nicht zu beobachten (Leisewitz und Schwartz, 1999). Allerdings vermuten LEISEWITZ und SCHWARTZ (1999) in ihrem Bericht, dass die realen Bisphenol-A-Emissionen aus Produktion und Produkten (1995 < 17 t/Jahr) bislang unterschätzt wurden. Für Extraktion bzw. Leaching spielt der Gehalt an Restmonomeren eine wesentliche Rolle sowie die

unter bestimmten Bedingungen mögliche hydrolytische Zersetzung des Kunststoffes. Der Restmonomeren-Gehalt hängt davon ab, wie weit die Ausgangsprodukte ausreagiert sind. Der zweite Bestandteil der Komponente A, das Epichlorhydrin ist auf Grund seiner endständigen Cl-Atome nicht abbaubar.

3.1.1.2 Toxikologische und ökotoxikologische Charakterisierung der relevanten Inhaltsstoffe der untersuchten Bauprodukte

Die in diesem Kapitel und in den Tabellen 5 und 6 zusammengestellten Literaturdaten zur Toxikologie und Ökotoxikologie der relevanten Inhaltsstoffe dieser Bauprodukte sind auf Grund einer Recherche in den Datensammlungen des Umweltbundesamtes, anhand der Sicherheitsdatenblätter der untersuchten Bauprodukte sowie durch die Auswertung nationaler wie internationaler Publikationen sowie relevanter Veröffentlichungen im Internet zusammengestellt worden. Dabei wurde festgestellt, dass bislang nur wenige ökotoxikologische Testergebnisse, die sich direkt auf die entsprechenden Bauprodukte und ihre Komponenten beziehen, vorliegen.

a) Bodeninjektionsmittel auf Acrylatbasis:

Acrylat-Polymer-Injektionsmittel wurden auf Grund der hohen Toxizität (vor allem neurotoxische Wirkungen) ihrer Vorgänger, der **Acrylamid**-Bodeninjektionsmittel, entwickelt. **Acrylamide** stehen im Verdacht, cancerogen, mutagen und reproduktionstoxisch zu wirken.

CLARKE untersuchte 1982 eines der neuen Produkte auf **Acrylatbasis** und stellte eine orale Säugetiertoxizität (LD_{50}) von 1/1000-stel im Vergleich zur Toxizität von Acrylamid-Injektionsmitteln fest (Martens, 1998).

Die ökologisch bedenkliche Phase ist die Zeit des Reaktions- und Aushärtungsprozesses, somit die Zeit, in der wie in Kapitel 3.1.1.1 beschrieben, der größte Stoffanteil ausgetragen wird. Umströmungsuntersuchungen von MARTENS (1998) zeigten, dass das noch nicht ausreagierte Injektionsmittel Acrylatmonomere und Aktivatorreste in den Boden und das Grundwasser abgibt. Diese wirken stark CSB-erhöhend. Bei den Untersuchungen unter Strömungsbedingungen von MARTENS (1998) wurden nach 2 Stunden Elutionszeit CSB-Spitzenwerte von 8000 mg O₂/l bei einer 5 l -Injektion gemessen, damit wurden die Werte der Trinkwasserverordnung (TVO) von 5 mg O₂/l bei weitem überschritten. Nach 22 Stunden gingen die Werte unter die Nachweisgrenze zurück.

Die einzelnen Komponenten können auf Wasserorganismen schädlich wirken. Vor allem die beigefügten Beschleuniger sind Grund dieser Beeinflussung (Deutsche Bauchemie, 2004).

Ebenso wurden in Untersuchungen von STEIN et al. (1991) verschiedene Injektionsmittel auf Acrylatbasis hinsichtlich ihrer Auslaugungstendenz in der Aushärtungsphase getestet. Einzelne Injektionsmittel zeigten dabei Aktivitätshemmungen im Leuchtbakterientest und einen verzögerten biologischen Abbau.

Hinsichtlich der Humantoxizität ist auf die Anwendung von 2-Hydroxyethylmethacrylat als Restaurationsmittel in der Zahnmedizin hinzuweisen. In einer Dissertation aus dem Jahr 2004 von EMMLER wird auf die zytotoxische Wirkung von 2-Hydroxyethylmethacrylat bei Anwendung im Mundbereich hingewiesen.

Tabelle 5: Toxikologische und ökotoxikologische Wirkungen und Einstufungen von Bodeninjektionsmitteln auf Acrylatbasis (Deutsche Bauchemie 2001; Emmler, 2004; Sicherheitsdatenblatt 2004, Dict. of Substances, 1995)

Bauprodukt	Komponente A 1	Komponente A2,	Komponente B,
Acrylat-Injektionsmittel	(Stoffgemisch), bestehend aus 2-Hydroxyethylmethacrylat + Polyethylenglycol 600 Dimethacrylat	bestehend aus 2- Dimethylaminoethylmethacrylat	bestehend aus Natriumpersulfat
Human-toxikologie	reizt Augen, Haut und Schleimhäute (Atmungsorgane), es wurden zytotoxische Effekte bei Anwendung im Mundbereich (Zahnmedizin) gefunden	gesundheitsschädlich beim Berühren und Verschlucken, reizt Augen und Haut	gesundheitsschädlich beim Verschlucken, reizend
Öko-toxikologie		LD 50 (Ratte, oral): 1751 mg/kg 7900 mg/kg LD 50 (Ratte, inhalativ): 0,62 mg/l	
Stoffeinstufungen	Wassergefährdungsklasse (WGK) 1 (schwach wassergefährdend) nach VwVwS	Wassergefährdungsklasse (WGK) 1 (schwach wassergefährdend) Selbsteinstufung	Wassergefährdungsklasse (WGK) 1 (schwach wassergefährdend) Selbsteinstufung
R-Sätze	Xi; R 36/37/38 (Dimethacrylat) Xi; R 36/38-43 (2-Hydroxyethylmethacrylat) + ungefährl. Beimengungen	Xn; R 21/22- 36/38- 43	Xn; O; R 8-22-42/43 + ungefährl. Beimengungen

b) Kanalrohrsaniierungsmittel (kalthärtendes Epoxidharz)

Die physiologischen Wirkungen und ggf. Beeinträchtigungen von Organismen beruhen vor allem auf der Reaktionsfähigkeit der Epoxidharze und anderer Komponenten, vor allem der Härter.

Flüssige EP-Harze und Härter können auf Wasserorganismen giftig wirken. Beide Komponenten und die ihnen zugrunde liegenden Bestandteile werden daher in die Wassergefährdungs-

klassen (WGK) 2, bei größeren Lagermengen auch in WGK 3 (Tab. 4) eingestuft. Ausgehärtete EP-Harze oder Härter werden in die WGK 1 eingestuft oder als nicht wassergefährdende Stoffe behandelt (Deutsche Bauchemie, 2001).

Bisphenol-A (BPA) ist der kritischste Bestandteil der Komponente A des Epoxidharzes. Hinsichtlich der Humantoxizität ist zu bemerken, dass Epoxidharze mit einem BPA-Anteil auch in der Zahnmedizin als Restaurationsmaterial (z.B. bei Fissuren) eingesetzt werden. Es wurde festgestellt, dass BPA aus den zahnmedizinischen Füllmaterialien u. a. durch enzymatische Reaktionen in relevanten Größenordnungen migriert (Leisewitz und Schwarz, 1998; Emmeler, 2004). In beiden Studien wurde abgeleitet, dass zahnmedizinische Materialien auf BPA-Basis Quelle zytotoxischer und xenoöstrogener Humanexposition sein können.

In der Literatur finden sich kaum Testergebnisse (LC50- bzw. EC50-Werte), die Hinweise auf eine Toxizität von BPA für Mikroorganismen geben (Effektkonzentrationen zwischen 35 und 320 mg/l). Auf akute Wirkungen weisen hingegen die gefundenen Werte für Algen, Crustaceen und Fische hin, die schon bei deutlich niedrigeren Konzentrationen in der Größenordnung von 1 - 10 mg BPA/l toxische Effekte zeigten. Dabei waren Algen sensibler als Crustaceen und Fische. Ausgehend von den üblichen Bewertungskriterien einschließlich der EPA-Kriterien für die Bewertung von Tests auf akute Toxizität muss BPA für diese Organismen als toxisch ("moderately toxic" in der EPA-Terminologie) bezeichnet werden. BPA wird biologisch abgebaut (Halbwertszeit ≤ 4 Tage). Der abiotische Abbau im Wasser wird als unbedeutend betrachtet (Leisewitz und Schwarz, 1998).

Tabelle 6: Toxikologische und ökotoxikologische Wirkungen und Einstufungen der Inhaltsstoffe des Kanalrohrsaniierungsmittels auf Epoxid-Basis (Deutsche Bauchemie 2001; Emmmler 2004; EU 2002; BUA 1997, MC-Bauchemie-Sicherheitsdatenblatt 2004, Leisewitz und Schwarz 1998, Dict. of Substances, 1995)

Bauprodukt Epoxidharz- Kanalrohr- sanierungs- mittel	Komponente A (Stoffgemisch) bestehend aus: Bisphenol-A-Epichlorhydrinharz MG<700 γ -Glycidoxypropyl-trimethoxysilan, Benzylalkohol C ₁₂ -C ₁₄ -Alkylglycidether	Komponente B (Stoffgemisch) bestehend aus: Aliphatischem Polyamin, Triethylentetramin, 4-tert-Butylphenol und Benzylalkohol
Human- toxikologie	reizend für Haut, Augen und Schleimhäute; es wurden zytotoxische und endokrine Effekte bei Anwendung im Mundbereich (Zahnmedizin) gefunden (BPA)	starke ätzende Wirkung auf Haut und Schleimhäute
Öko- toxikologie	giftig für Fische, Algen und andere Wasserorganismen, längerfristige Gewässerschädigung möglich LD ₅₀ (Ratte, oral): > 2000 mg/kg LD ₅₀ (can, dermal): > 2000 mg/kg (Bisphenol-A-Epichlorhydrin-Harz) EC ₅₀ /LC ₅₀ (Mikroorganismen): 35-320 mg/l (BPA), EC ₅₀ (Pseudomonas fluorescens): 54,5 mg/l (BPA), EC ₅₀ /LC ₅₀ (Alge): 1 μ g/l, EC ₅₀ (Selenastrum capricornutum): 2,5 mg/l (Bisphenol-A), EC ₅₀ (Daphnia magna): 10 mg/l (BPA), keine Nitrifikationshemmung bis 50 mg/l (BPA), BPA biologisch abbaubar (57% TOC in 24 Stunden bei einer Initialkonzentration von 57 mg/l) endokrine Wirkung (BPA)	giftig für Fische und andere Wasser- organismen, längerfristige Gewässer- schädigung möglich LD ₅₀ (Ratte, oral): 2,5 g/kg ⁻¹ LD ₅₀ (Maus, oral): 1,6 g/kg ⁻¹ LD ₅₀ (Kaninchen, oral): 5,5 g/kg ⁻¹ LD ₅₀ (Kaninchen, dermal): 805 mg/kg ⁻¹
Stoffein- stufungen	Wassergefährdungsklasse (WGK) 2 (Selbsteinstufung) Trinkwasserverordnung (2001): Epichlorhydrin 0,0001 mg/l (Der Grenzwert bezieht sich auf die Restmonomerkonzentration im Wasser, berechnet auf Grund der maximalen Freisetzung nach den Spezifikationen des entsprechenden Polymers und der angewandten Polymerdosis)	Wassergefährdungsklasse (WGK) 2 (Selbsteinstufung)
R-Sätze	Xi; N; R 36/38-43-51/53 (BPA- Epichlorhydrinharz), Xi; R 36/38 (γ - Glycidoxypropyl-trimethoxysilan), Xn; R 20/22 (Benzylalkohol), Xi; N; R 36/38-43- 51/53	C; R 21/22-34 (Aliphatisches Polyamin), C; R 21-34-43-51/53 (Triethylen- tetramin), Xi; R 36/37/38(4-tert- Butylphenol) Xn; R 20/22 (Benzylalkohol)

3.1.2 Herstellung und Charakterisierung der Eluate

Um die mobilisierbaren und bioverfügbaren Anteile von Stoffen im Boden zu ermitteln und eine mögliche Beeinträchtigung der Lebensraumfunktion und der Filter- und Pufferfunktion von Böden im Hinblick auf den Pfad Boden-Grundwasser praxisnah abbilden sowie die Konzentrationen am Ort der Einhaltung der Geringfügigkeitsschwellen realitätsnah erfassen und bewerten zu können, werden Elutionsverfahren angewendet.

In der Literatur existiert eine große Anzahl von Elutionsverfahren, die für verschiedene Anforderungen und Fragestellungen entwickelt wurden (Wagner, 2005). Sie können in Schüttelverfahren, Säulenverfahren und Standtests (Bodensättigungsextrakt) unterschieden werden.

Die meisten Elutionsverfahren werden bisher für die Untersuchung von wasserlöslichen Anteilen in festen Abfällen (z.B. S 4-Eluat-Untersuchung) und die Sickerwasserprognose im Rahmen der Gefährdungsabschätzung nach § 4 Abs. 3 BBodSchV angewandt. Die Sickerwasserprognose nach BBodSchV bewertet, inwieweit Schadstoffkonzentrationen im Sickerwasser im Bereich des Übergangs von der ungesättigten zur gesättigten Bodenzone (Ort der Beurteilung) die Prüfwerte der BBodSchV im Pfad Boden-Grundwasser überschreiten.

Zur Ermittlung der eluierbaren Inhaltsstoffe von Bauprodukten sind Methoden anzuwenden, welche die Verhältnisse baulicher Anlagen in Boden und Grundwasser möglichst realitätsnah abbilden.

Für die ökologische Bewertung von Bauprodukten wurde im Auftrag des DIBt das Elutionsverfahren nach SCHÖSSNER (2004), welches am Hygieneinstitut des Ruhrgebietes in Gelsenkirchen entwickelt worden ist, modifiziert und optimiert. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine Säulenelution mit inverser Fließrichtung, die als Standardprüfmethode für Bodeninjektions- und Kanalrohrsanierungsmittel eingesetzt werden kann (Wagner, 2005). Das Verfahren ist im DIBt-Merkblatt „Bewertung der Auswirkungen von Bauprodukten auf Boden und Grundwasser“ neben Schütteltests, weiteren Säulentests und Trogverfahren aufgeführt (DIBt, 2005).

Bauprodukte, die nach dem Einbringen komponentenweise oder als Gemisch direkt mit dem Boden bzw. mit dem Grundwasser in Kontakt kommen, bevor sie zu einem festen Produkt aushärten, sind sowohl in der Aushärtungsphase als auch als ausgehärtetes Bauprodukt zu untersuchen und zu bewerten. Ebenso sind mögliche Mobilisierungseffekte zu berücksichtigen (DIBt, 2005).

Wahl und Durchführung des Elutionsverfahrens hat somit einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität der Ergebnisse der ökotoxikologischen Testverfahren.

In den dieser Arbeit zugrunde liegenden Forschungsvorhaben wurden vom Hygieneinstitut Gelsenkirchen die Eluate aus den in Kapitel 3.1.1 genannten Bauprodukten mittels inverser Säulenelution nach SCHÖSSNER hergestellt. Das Verfahren ist als Standardtestmethode im DIBt-Merkblatt (2005) aufgeführt.

Bei der Säuleneelution mit umgekehrter Fließrichtung wird die Sandsäule von unten nach oben mit Wasser durchflossen. Über eine Injektionseinrichtung wird in der Regel 1 Liter des zu untersuchenden Bauproduktes auf halber Höhe in die Säule injiziert oder das außerhalb der Säule per Hand angemischte Bauprodukt manuell in die Säule eingesetzt. Der Volumenstrom beim Durchfluss des Wassers beträgt 4 l/h, das durchströmende Wasser wird fraktionsweise am oberen Säulenauslauf aufgefangen (Prüfwasser). Diese wässrigen Lösungen sind die Eluate des Säulenversuchs. Die Versuchsanordnung ist in Abbildung 17 vereinfacht dargestellt.

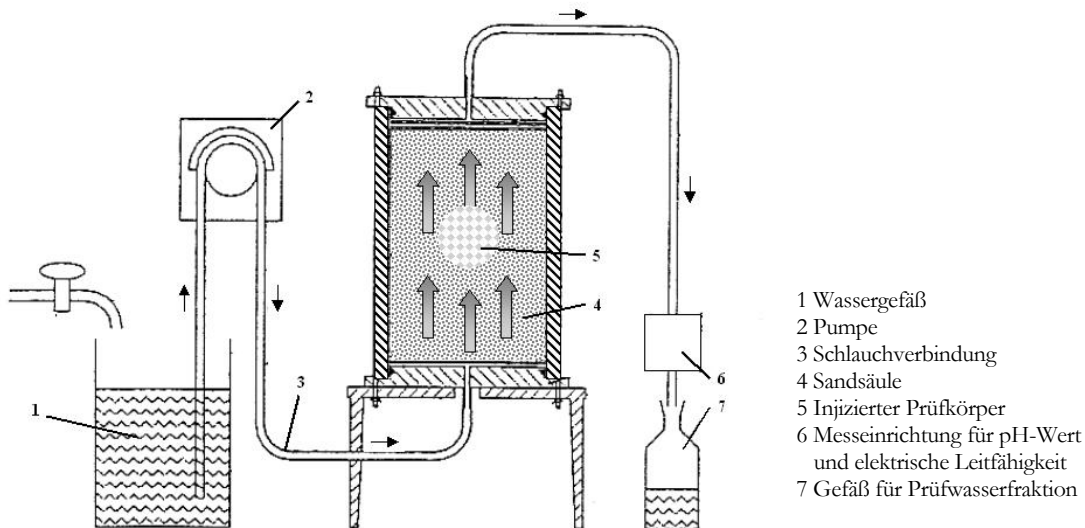


Abbildung 17: Vereinfachte Darstellung des Säuleneelutionsverfahrens mit inverser Fließrichtung (aus Wagner, 2005, nach Schössner, 2005).

Bei den hier durchgeführten Säulenversuchen wurde in die Sandsäule jeweils 1 kg des von Hand angemischten Prüfproduktes in eine vorbereitete Hohlform gegeben. Nach der jeweiligen Aushärtungszeit (Epoxidharz ca. 6:25 h, Injektionsmittel auf Acrylatbasis ca. 25 min) wurde mit der Durchströmung der Säule begonnen. Eine Pumpe förderte Trinkwasser ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) über eine Schlauchverbindung durch eine Sandsäule, die mit Feinsand (0,05mm) gefüllt war. Die Durchflussrate des Wassers betrug $4 (\pm 0,2)$ Liter pro Stunde. Die Entnahme der Eluate erfolgte jeweils aus der Maximal- und Abklingphase der TOC-Gehalte. Die Maximalphase ist hierbei die Phase des höchsten TOC-Gehaltes im Elutionsverlauf, in der der größte Anteil gelöster organischer Kohlenstoffverbindungen aus dem Bauprodukt herausgelöst wird. Die Abklingphase ist diejenige Phase der Elution, in der der TOC-Gehalt deutlich abnimmt. Es werden Mischproben aus den jeweiligen Phasen entnommen. Die Entnahmemengen orientieren sich an den Eluatmengen, die für die Testverfahren benötigt werden. Eine kritische Diskussion zum Elutionsverfahren erfolgt in Kapitel 5.5.

Die Eluatherstellung wurde in einer zweiten Testphase mit den gleichen Bauprodukten wiederholt.

Durch das Hygieneinstitut Gelsenkirchen wurden die Prüfwässer hinsichtlich des Verlaufes der Parameter TOC (Abb. 18 und 19), Geruch, Färbung, Trübung und Neigung zur Schaumbildung alle 30 Minuten analysiert.

Die Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit und der pH-Werte erfolgte nur in der zweiten Testphase durch das Hygieneinstitut Gelsenkirchen. Der TOC-Gehalt in den Eluaten der Maximal- und Abklingphasen wurde ebenfalls nur in der zweiten Testphase bestimmt. In der ersten Testphase wurde nur der Verlauf der TOC-Gehalte ermittelt. Die einzelnen Untersuchungsergebnisse sind im Anhang 1 beigefügt. Zusätzlich wurden in der TU Berlin die elektrische Leitfähigkeit sowie im Fraunhofer-Institut in Schmallenberg (FhG) pH-Wert und DOC der Eluate ermittelt (Zusammenfassung der Werte in Tab. 7 und 8).

Die Eluate der Bauprodukte wurden in braunen, in Styropor eingeschlossenen 1-Liter Flaschen von Gelsenkirchen nach Berlin transportiert.

Tabelle 7: Charakterisierung der Eluate der ersten Testphase

Eluat der 1. Testphase	pH (FhG-Messung)	Elektr. Leitfähigkeit 25°C [mS/m] (TU-Messung)	DOC (mg/l) (FhG-Messung)
Acrylat Maximalphase ¹⁾	7,90	116,8	745
Acrylat Abklingphase	8,30	42,5	13,8
Epoxid Maximalphase ²⁾	8,30	39,2	9,8
Epoxid Abklingphase	8,20	41,3	2,4

¹⁾ leichter Niederschlag vorhanden, Schaumbildung, organischer Geruch

²⁾ leichter Niederschlag vorhanden, schwache Schaumbildung

Tabelle 8: Charakterisierung der Eluate der zweiten Testphase

Eluate der 2. Testphase	pH (Hyg.- Inst.)	Elektr. Leit- fähigkeit 25°C [mS/m]	TOC (mg/l)	DOC (mg/l) (FhG/IME)
Acrylat Maximalphase ¹⁾	7,7	82,5	290	272
Acrylat Abklingphase	8,0	43,1	1,6	-
Epoxid Maximalphase ²⁾	8,3	44,4	12	10,0
Epoxid Abklingphase	8,0	42,3	0,9	-

¹⁾ Schaumbildung, starker organischer Geruch

²⁾ organischer Geruch

In den folgenden Abbildungen 18 und 19 ist der Verlauf des TOC der beiden Bauprodukte-Prüfwässer aus der ersten und zweiten Testphase aufgeführt.

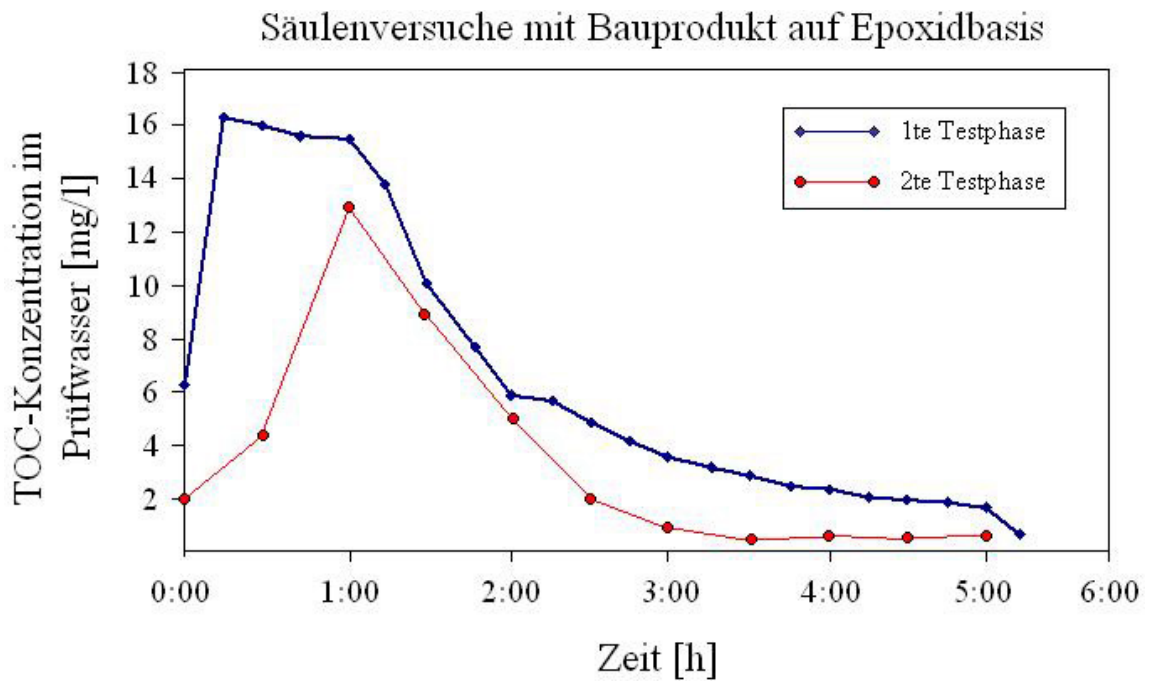


Abbildung 18: TOC-Verlauf im Eluat des Bauproduktes auf Epoxidharzbasis (aus Wagner, 2005)

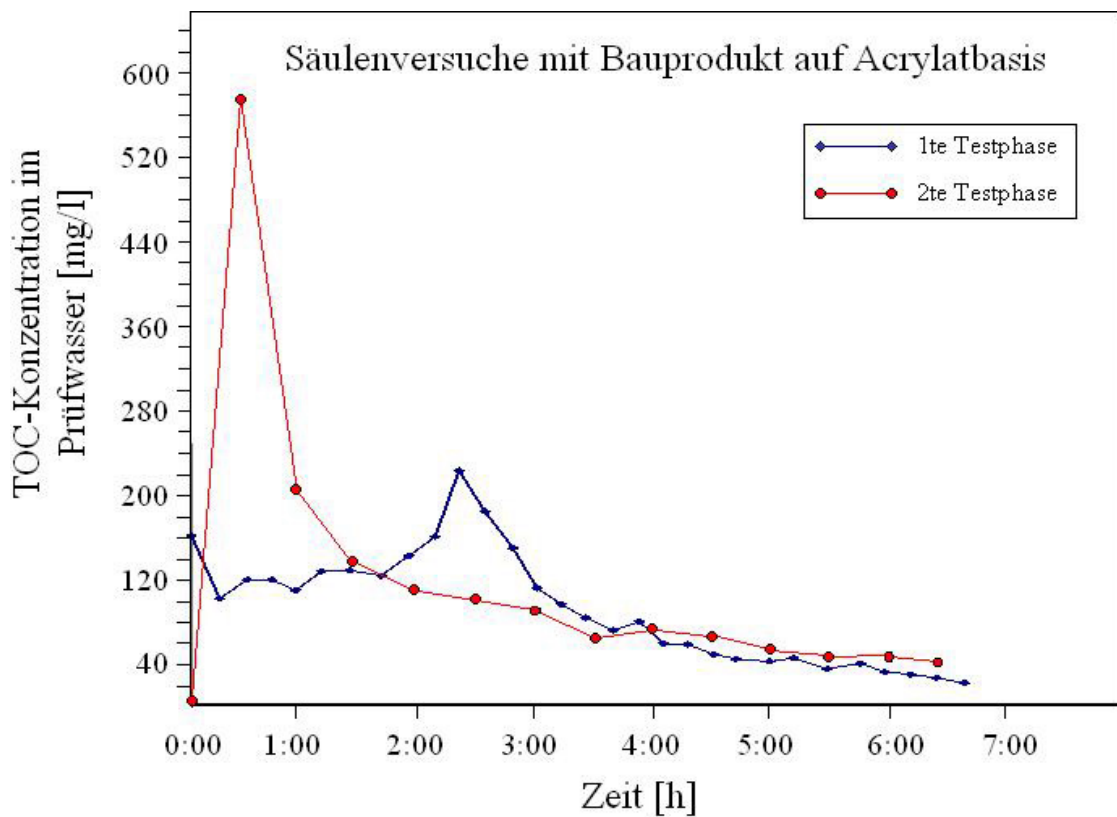


Abbildung 19: TOC-Verlauf im Eluat des Bauproduktes auf Acrylatbasis (aus Wagner 2005)

Beim Vergleich der DOC- bzw. TOC-Gehalte und elektrischen Leitfähigkeiten (Tab.9) aus der ersten und zweiten Testphase trat ein beachtlicher Unterschied zwischen dem Eluat aus der **Acrylat-Maximalphase** des ersten Teiles und dem der zweiten Testphase auf. Die Ergebnisse der zweiten Testphase sind grau unterlegt.

Tabelle 9: Beschreibung der Eluate aus den Maximalphasen -Vergleich der Ergebnisse aus beiden Testphasen

Eluat	Elektr. Leitfähigkeit 25°C [mS/m] 1. Testphase	Elektr. Leitfähigkeit 25°C [mS/m] 2. Testphase	DOC (mg/l) 1. Testphase	DOC (mg/l) 2. Testphase
Acrylat Maximalphase	116,8	83,5	745	272
Epoxid Maximalphase	39,2	44,4	9,8	10,0

Der DOC-Gehalt aus der zweiten Testphase ist mit 272 mg/l um fast zwei Drittel geringer als der DOC-Gehalt aus der ersten Testphase.

Ursache für die hohe Abweichung könnte ein Unterschied in der Formung der Injektionskörper (unterschiedlich große äußere (aktive) Fläche) gewesen sein. Bei einer größeren Oberfläche kann es tendenziell zu höheren Stoffausträgen kommen (Martens, 1998). Eine weitere Ursache könnte in einer unzureichenden Anmischung der einzelnen Komponenten und der daraus resultierenden inhomogenen Aushärtungsreaktion der Bauprodukte liegen (Schössner und Kunz, 2005). Denkbar wären als Ursache auch Verdünnungseffekte auf Grund unterschiedlicher Entnahmemengen. Die einfachste Erklärung für die enorme Differenz in den DOC-Gehalten wären unterschiedliche Aushärtungszeiten der Bauprodukte vor Beginn der Durchströmung. Die Aushärtungszeiten wurden von den beteiligten Institutionen (Firmenvertreter und Hygieneinstitut Gelsenkirchen) nicht genau festgelegt und protokolliert.

Hierdurch zeigt sich, welche erhebliche Bedeutung der Qualitätssicherung bei der Elution der Bauprodukte zukommt. Eine geringe Abweichung und damit eine gute Reproduzierbarkeit der Säulenversuche bei gleichen Bedingungen (Produktvor- und -zubereitung, Injektionsmenge, Säulenfüllung, Durchflussrate, Aushärtungszeiten, Entnahmemengen und Temperatur) ist eine wesentliche Voraussetzung zur qualifizierten Beurteilung und Bewertung der biologischen Wirkungen von Bauprodukten (Kap. 5.5).

3.2 Auswahl und Charakterisierung der Testböden

Die Eignung der terrestrischen Testverfahren für eine ökotoxikologische Testbatterie zur Bewertung der Auswirkungen von Bauprodukten auf Böden wurde an vier Böden geprüft. Die Testböden wurden aus der Liste des deutschen Referenzbodensystems (RefeSol) ausgewählt (grau markiert in Tab. 10).

Tabelle 10 : Spannweiten wichtiger Bodeneigenschaften der Referenzböden aus der RefeSol-Referenzbodenliste in % (nach Bussian et al., 2005)

Bodennummer	Sand	Schluff	Ton	Corg	pH
01-A	70-77	20-25	0-7	0.7-1.3	5.0-5.7
07-A	72-77	15-20	5-10	1.0-1.5	5.0-6.0
04-A	80-86	10-15	0-7	2.2-2.8	5.0-5.7
08-A	66-72	18-24	7-12	1.0-1.5	5.0-6.0
02-A	0-10	80-85	12-17	1.0-1.5	6.5-7.0
09-A	60-65	27-33	5-10	0.7-1.5	5.5-6.5
05-G	12-17	58-63	22-27	3.0-5.0	5.0-6.0
10-A	0-10	70-75	18-23	1.5-2.5	>7.0
03-G	18-25	47-54	20-25	5.0-8.0	5.0-6.0
11-G	40-45	40-45	13-18	2.0-3.5	5.0-6.0
06-A	5-10	53-58	33-38	2.0-3.0	>7.0
12-G	30-35	45-50	17-22	3.0-5.0	5.0-6.0

Es handelt sich um Böden, deren stoffliche Belastung unterhalb der Vorsorgewerte der Bundes-Bodenschutz- und Altlastenverordnung liegt und die deshalb als unbelastet gelten.

Die Referenzböden wurden bereits in vorangegangenen Forschungsprojekten der FU, der FhG-IME und der Ökotoxikologie GmbH Flörsheim (ECT) eingesetzt. Ihre grundsätzliche Eignung als Testböden für terrestrische Testverfahren wurde in diesen Forschungsprojekten und in Ringversuchen nachgewiesen.

Die für die Untersuchungen verwendeten Bodenproben wurden von der FhG-IME bereitgestellt.

Die Vorauswahl aus den in Tabelle 10 enthaltenen Referenzböden wurde auf Grund der Anforderung, dass ein "worst case-Szenario" repräsentiert werden sollte, getroffen. Dennoch sollten Unterschiede hinsichtlich der mikrobiellen Reaktion auf die Kontamination mit den Bauprodukteluateln erkennbar werden und die Böden sollten sich hinsichtlich des Tongehalts und des Gehaltes an organischem Kohlenstoff unterscheiden.

Die Auswahl fiel auf drei Böden mit der Hauptbodenart Sand und einen lehmigen Boden. Die ausgewählten Kategorien sind in Tabelle 10 grau unterlegt.

Die Testböden wurden nach der Probenahme und nach dem Versand an die TU Berlin jeweils bei 4°C eingelagert. Anschließend wurden sie hinsichtlich

- TOC (Bestimmung im IR-Photometer) ,
- Korngrößenverteilung nach DIN ISO 11277 (2002),
- Wassergehalt in % bezogen auf Trockenmasse nach DIN ISO 11465 (1996),
- maximaler Wasserhaltekapazität nach ISO/DIS 11267-2, Annex C (1993),
- pH-Wert nach DIN ISO 10390 (1997)

untersucht und beschrieben.

TOC

Die Bestimmung des organischen Kohlenstoffes der Proben BOR und EBB (Tab. 11) erfolgte über die Ermittlung des Gesamtkohlenstoffes und des anorganischen Kohlenstoffes im *C-Mat 500* der Firma Ströhlein. Bei diesem Verfahren zur Bestimmung des Gesamtkohlenstoffes wird das Probenmaterial bei 900 °C in einem Sauerstoffstrom verbrannt. Anschließend wird das gebildete Kohlenstoffdioxid im Infrarotphotometer (IR-Photometer) gemessen. Anorganischer Kohlenstoff, der durch Zugabe von Phosphorsäure unter Erwärmung zu Kohlenstoffdioxid umgesetzt wird, wird ebenfalls im Infrarotphotometer gemessen. Der organische Kohlenstoff errechnet sich aus der Differenz des Gesamtkohlenstoffes zum anorganischen Kohlenstoff (Wagner, 2005). Die Kalibrierung des Messgerätes erfolgt durch die Bestimmung eines Kalibrierungsfaktors mittels der Verbrennung von Calciumcarbonat.

Die Proben HAG und LEU wurden an der FhG-IME auf C_{org} (DIN ISO 10694 (1996)) untersucht.

Korngrößenverteilung

Die Bestimmung der Korngrößenverteilung erfolgte in Anlehnung an DIN ISO 11277 (2002). Die Bodenproben wurden im luftgetrockneten Zustand auf ≤ 2 mm gesiebt. Dem Material ≤ 2 mm wurde anschließend Wasserstoffperoxid zum Entfernen der organischen Substanz zugegeben. Danach wurden mit Hilfe des Verfahrens der Nasssiebung/Trockensiebung und der Pipettanalyse die einzelnen Kornfraktionen ermittelt (Wagner, 2005) (Tab. 11).

Wassergehalt

Der Wassergehalt der feldfrischen (Proben BOR und EBB) und luftgetrockneten Bodenproben (Proben HAG und LEU) wurde nach DIN ISO 11465 (1996) durch Trocknung der Proben im Trockenschrank bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz bestimmt (Tab.11).

Maximale Wasserhaltekapazität

Die Maximale Wasserhaltekapazität wurde in Anlehnung an ISO 11267, Annex C (2001), ermittelt. Bei dieser Methode werden die Böden in einem Wasserbad wassergesättigt und anschließend auf ein wassergesättigtes Sandbad gesetzt. Wasser, das nicht durch Kapillarkräfte im Boden gehalten wird, fließt über das Sandbad ab. Mit mehrmaligem Messen des Gewichtes der Bodenproben wird überprüft, ob der Boden die Gewichtskonstanz erreicht hat. Nach Erreichen der Gewichtskonstanz werden die Proben gewogen und mindestens 24 Stunden bei 105 °C getrocknet (Wagner, 2005) (Tab. 11).

pH-Wert

Der pH-Wert der Böden (Tab. 11) wurde nach DIN ISO 10390 (1993) gemessen. Mit Hilfe einer Glaselektrode (Schott Geräte GmbH: Titrator TR 156) erfolgte die Messung in einer Suspension aus Boden (luftgetrocknet) und einer Calciumchloridlösung mit einer Stoffmengenkonzentration von 0,01 mol/l (ph-CaCl₂) im Volumenverhältnis von 1:5 (Wagner, 2005).

Zum Vergleich sind nachfolgend alle vier Testböden in Tabelle 11 charakterisiert.

Tabelle 11: Charakterisierung der verwendeten Testböden

Herkunft Boden	RefeSol – Kategorie	Beschreibung	Probennummer	Bezeichnung d. Böden	Korngrößenfraktion (Mittelwert aus zwei Parallel- Messungen)			Wasser- gehalt in % bezogen auf Trocken- masse	Maximale Wasser- halte- kapazität (WHK _{max}) in %	pH- Wert	TOC - C _{org} - Gehalt in %
					Sand in %	Schluff in %	Ton in %				
Hagen	01 A	Braunerde unter Acker, Boden der Jungmoränenlandschaft, Sl2, sauer, schwach humos	01	HAG	70	23	7	8,34	26,4	5,5	0,97
Leuchtrup	04 A	Gley-Podsol unter Acker, Boden der breiten Flusstäler und Niederungen, Su2, sauer, stark humos	04	LEU	82	15	3	12,66	34,6	5,1	2,84
Borstel	01 A	Braunerde unter Acker, Boden der Jungmoränenlandschaft, Sl2, sauer, schwach humos	S	BOR	67	27	6	10,2	27,1	5,07	1,19
Ebbinghof	03 G	Braunerde unter Wiese /Weide Boden der Mittelgebirge, Lu, sauer, stark humos	L	EBB	23	53	24	28,95	64,0	5,43	2,63

3.3 Vorbehandlung der Testböden

Die Vorbereitungsarbeiten und die Durchführung der terrestrischen Verfahren erfolgten an der TU Berlin, Institut für Ökologie, Landschaftsbau, Abfallbelastung der Landschaft.

Die Böden wurden nach Probenahme bei 4 °C gelagert und vor Untersuchungsbeginn auf ca. 40 % der maximalen Wasserhaltekapazität (WHK_{max}) getrocknet. Bei Wassergehalten > 40 % der maximalen Wasserhaltekapazität ist eine Siebung kaum durchzuführen. Um Schädigungen der Bodenmikroflora zu verhindern, erfolgte die Trocknung schonend bei Zimmertemperatur, wobei der Boden periodisch gewendet wurde.

Die weitere Lagerung bis zur Inkubation der Böden mit den Eluaten erfolgte bei 4 °C im Dunkeln.

Nach Eingang der Eluate wurden die Bodenproben (je 500 g TM- Äquivalent Boden) in inerten Gefäßen mit 333,5 g Eluat versetzt (667 ml/kg TM), so dass eine Suspension entstand, die verrührt wurde.

Die Menge des zugesetzten Eluats wurde in einem Vorläufervorhaben im Jahr 2000 der FhG-IME für das DIBt abgeleitet (Hund-Rinke, 2002). Gleichzeitig wurde ein Kontrollansatz mit der gleichen Menge deionisiertem Wassers angesetzt. Das Belegen der Böden mit den Eluaten erfolgte entsprechend den Erkenntnissen der FhG/IME.

Die Inkubationszeit betrug entsprechend der Testvorschriften (DIN 38414-4) 24 h. Während der Inkubationszeit wurde mehrfach manuell gerührt.

Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden Boden und Überstand durch Dekantieren getrennt. Dabei gab es nahezu keinen Bodenverlust (Tabelle, Anhang 2).

Vor Untersuchungsbeginn wurde der Wassergehalt mit Aqua dest. auf ca. 50 % der WHK_{max} eingestellt. Durch periodisches Wenden wurde gewährleistet, dass es nicht zum lokalen Austrocknen und damit zur Schädigung der Mikroorganismen kam.

Vor Beginn der Untersuchungen wurden die Böden nochmals auf ≤ 2 mm gesiebt, um vor allem bei dem lehmigen Boden ein Verklumpen zu vermeiden und wieder die normale Bodenstruktur zu erhalten.

Insgesamt wurden die Böden schonend behandelt, da Bodenbakterien, insbesondere die Nitrifikanten, sehr empfindlich auf Milieuveränderungen reagieren.

Die nichtkontaminierten Testböden für die Kontrolle und die mit Eluat inkubierten Testböden wurden in Weckgläsern bei 20 °C im Dunkeln auch während der drei Monate Inkubationszeit zwischen der ersten und zweiten Testphase gelagert, wobei die Sauerstoffzufuhr gewährleistet und Verdunstungsverluste durch wiegen und Zugabe von Aqua dest. ausgeglichen wurden.

3.4 Biologische Testverfahren zur Beurteilung der Wirkungen von Bauprodukten auf Böden

Das im Merkblatt des DIBt enthaltene Konzept zur Bewertung der Auswirkungen von Bauprodukten auf Boden und Grundwasser sieht in Stufe 2, Schritt 3 die Ermittlung und Bewertung der biologischen Parameter vor, zu denen bisher nur sehr wenige Untersuchungsergebnisse für Bauprodukte vorliegen. Ein vorangegangenes Forschungsvorhaben der FhG/IME ergab für einen Regenwurmtest (nach DIN ISO 11268-2) und einen Pflanzentest (Hemmung des Pflanzenwachstums nach DIN ISO 11269-2) nur eine geringe Sensitivität bei der ökotoxikologischen Bewertung der Wirkungen von Bauprodukten auf Böden (Giese et al., 2005). Außerdem sind der Regenwurmtest und Pflanzentest mit einem hohen zeitlichen und finanziellen Aufwand verbunden. Im Rahmen der Diskussionen im Vorfeld der Forschungsprojekte wurde angeregt, anstelle dieser sehr aufwändigen Tests den Ammoniumoxidationstest (nach DIN ISO 15685) mit der bodeneigenen Mikroflora durchzuführen. Dieser Test hat sich bei zahlreichen Untersuchungen als sehr empfindlich im Hinblick auf Schadstoffe herausgestellt. In der Praxis des Bodenschutzes wird neben dem Ammoniumoxidationstest in der Regel parallel die mikrobielle Atmung (nach DIN ISO 17155) bestimmt. Während der Ammoniumoxidationstest die Reaktion der vergleichsweise kleinen Gruppe der Nitrifikanten im Boden wiedergibt, liefert die Atmungsmessung Informationen über die generelle mikrobielle Aktivität, da über diesen Parameter die aerobe und fakultativ anaerobe, heterotrophe Mikroflora erfasst wird (Giese et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurden beide Verfahren systematisch für ihre Eignung im Rahmen der Bewertung der Wirkungen von Bauprodukten auf Böden erprobt.

Neben der Durchführung der genannten terrestrischen Testverfahren wurden auch ausgewählte aquatische Testverfahren einbezogen. Als aquatische Testverfahren sind in der überarbeiteten Version des DIBt- Merkblattes (Stand Januar 2005) die Durchführung des Leuchtbakterien-Lumineszenz-Hemmtests (DIN ISO 11348-2)/ Leuchtbakterienwachstumstests (DIN 38412-37), des Algentests (DIN 38412-33), des Daphnientests (DIN 38412-30), des Fischtests/Fischeitest (DIN 38412-31) sowie des umu- bzw. Ames-Tests (DIN 38415-3) erforderlich. Ferner ist Durchführung eines Abbautests nach OECD, Guideline 301 vorgeschrieben.

3.4.1 Potenzielle Nitrifikation (Ammoniumoxidationstest nach DIN ISO 15685)

Das Testverfahren wird zur Bewertung der potenziellen Aktivität von nitrifizierenden Bakterien für Böden und Bodenmaterialien angewendet. Die Böden sind schonend zu behandeln, da die Nitrifikanten sehr sensibel auf Umweltveränderungen reagieren.

Der Test wurde mit den vier nichtkontaminierten Testböden zur Kontrolle und den mit den Eluaten kontaminierten Böden mit jeweils vier Parallelen durchgeführt.

Messprinzip:

Die potenzielle Nitrifikation, d.h. die NO_2^- -Bildung (Reaktionsgleichung in Kap. 2.1.2.1), wurde in den Laboren der TU Berlin vorbereitet und gemessen.

Zur Vorbereitung wurden die Bodenproben mit einer ausreichenden Menge des Prüfmediums gemischt, um eine Suspension zu erhalten. Im Falle der Untersuchung der Wirkungen der genannten Bauprodukte wurde die Bodensuspension mit Aqua dest. (für die nichtkontaminierten Testböden als Kontrolle) und den gewonnenen Eluaten hergestellt (Kap. 3.1.2).

Gemäß DIN ISO 15685 werden die autotrophen ammoniumoxidierenden Bakterien in der auf einen pH-Wert von 7,2 gepufferten Bodensuspension Ammoniumsulfat ausgesetzt.

Die zweite Stufe der Nitrifikation (Nitritoxidation) durch *Nitrobacter* wird durch Zugabe von Natriumchlorat gehemmt. Die dadurch entstehende Anreicherung von Nitrit wird nach einer Dauer von 2 und 6 Stunden gemessen und daraus die potenzielle Aktivität der ammoniumoxidierenden Bakterien ermittelt. Da diese eine lange Generationszeit (≥ 10 h) besitzen, wird mit dieser Methode nur die potenzielle Aktivität der Population, nicht deren Wachstum erfasst (DIN ISO 15685).

Versuchsdurchführung

- a) Geräte:
- Magnetrührer mit Heizplatte ($\sim 80^\circ\text{C}$)
 - pH-Meter
 - Handrührgerät
 - Inkubationsschüttler mit horizontal kreisenden Bewegungen (~ 175 U/min, 25°C temperiert)
 - Reagenzglasschüttler
 - Spektralphotometer
 - übliche Laborgeräte
- b) Chemikalien:
- Lösung A: 2,643 g Diammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40 mmol/l) + 7,983g Natriumchlorat NaClO_3 (150 mmol/l) mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen
 - Lösung B: 1. Lösung: 2,721 g Kaliumdihydrogenphosphat KH_2PO_4 (0,1 M) mit Aqua dest. auf 200 ml auffüllen,
2. Lösung: 8,709 g Dikaliumhydrogenphosphat K_2HPO_4 (0,1 M) mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen, Lösung 2 wird mit Lösung 1 auf pH 7,2 eingestellt.
 - Lösung C: 75 ml Lösung A + 20 ml Lösung B mit Aqua dest. auf 2 l auffüllen.
 - Lösung D: 298,2 g Kaliumchlorid KCl (4 mol) durch Erwärmen lösen und nach Abkühlung mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen.

- Lösung E: 10,16 g Ammoniumchlorid NH_4Cl (0,19 mol) in ca. 900 ml Aqua dest. lösen, mit Ammoniumhydroxid NH_4OH auf pH 8,5 einstellen, mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen.
- Lösung F: Färbelösung 2,5 g Sulfanilamid in 100 ml Aqua dest. anlösen (nicht erwärmen), mit 25 ml konz. Phosphorsäure vollständig lösen, 0,125 g N-(1-Naphthyl)-ethylendiamindihydrochlorid zugeben und mit Aqua dest. auf 200 ml auffüllen.
- Natriumnitrit-Stammlösung: 4,9257 g NaNO_2 mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen ($1000 \mu\text{g NO}_2^- \cdot \text{N ml}^{-1}$).
- Natriumnitrit-Gebrauchslösung: 1 ml Stammlösung mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen ($10 \mu\text{g NO}_2^- \cdot \text{N} \cdot \text{ml}^{-1}$) (nach TU Berlin, 2001).

c) Durchführung und Auswertung:

Nach der Vorbereitung der Testböden (Kapitel 3.3) wurden 25 g Trockenmasse äquivalent des feuchten Bodens in 250 ml-Polyethylen-Flaschen jeweils in 4 Parallelen eingewogen und jeweils mit 100 ml der Lösung C abzüglich des in der Probe enthaltenen Wassers (25 g TM Boden + 100 ml Gesamtflüssigkeitsvolumen) versetzt. Mit der Lösung C wird Natriumchlorat zugeführt. Dadurch wird die Oxidation des Nitrits zu Nitrat verhindert und es kommt zur Anreicherung von Nitrit.

Das Volumen des zugegebenen Mediums wurde durch Subtraktion des Wasservolumens der Bodenproben vom gewünschten Gesamtwasservolumen ermittelt. Die Suspensionen wurden kurz mit der Hand geschüttelt und dann aufrecht stehend auf einem Horizontalschüttler bei 175 U/min und 25 °C inkubiert.

Nach 2 und 6 Stunden Inkubationsdauer wurden die Suspensionen mit einer Eppendorf-Pipette mit abgeschnittener Spitze, um die Bodenteilchen mit aufzunehmen, beprobt (je 10 ml). Die Flaschen wurden dabei unmittelbar vor den Probenahmen nochmals geschüttelt, um sicherzustellen, dass das Verhältnis zwischen Boden und Lösung auch während der Probenahme konstant war. Die für die Beprobung bereitgestellten 25 ml-Flaschen wurden vorher mit je 10 ml der Kaliumchlorid-Lösung (Lösung D) befüllt, um die Ammoniumoxidation zu beenden. Die 25 ml-Flaschen wurden kurz geschüttelt, die Suspensionen über Faltenfilter in Reagenzgläser abfiltriert. Das Filtrat wurde anschließend bei 4 °C gelagert und innerhalb von 24 Stunden analysiert (nach TU Berlin, 2001).

Die Ammoniumoxidation wird mit den in Lösung C enthaltenen Prüfchemikalien bestimmt. Als Referenzproben sind Kontrollproben ohne Zusatz der in Lösung C enthaltenen Prüfchemikalien mitzuführen. Zu diesem Zweck wurde entsprechend der DIN-Vorschrift eine Eichgerade mit 6 verschiedenen Konzentrationen angelegt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Eichreihe für den Ammoniumoxidationstest (TU Berlin, 2001)

μg Gebrauchslösung in 50 ml-Messkolben	NO_2^- -N-Konz. in der Eichlösung [$\mu\text{g}/\text{ml}$]
0	0
50	0,01
100	0,02
500	0,1
1000	0,2
2000	0,4
4000	0,8

Die Analyse erfolgte am nächsten Tag nach KANDELER (1993). Es wurden jeweils 5 ml des Filtrates (sowie der Eichlösung) in Reagenzgläser pipettiert. Dazu wurden 3 ml der Lösung E (NH_4Cl -Puffer) und 2 ml der Färbelösung F gegeben und anschließend geschüttelt.

Nach 15 Minuten wurde die Absorption am Photometer bei 530 nm erfasst (Anhang A 3).

Als Maß für die potenzielle Nitrifikation wird die von einem Gramm Boden abgegebene Menge an NO_2^- -N in $\mu\text{g N g TM}^{-1} \text{h}^{-1}$ angegeben. Die Berechnung der potenziellen Nitrifikation erfolgen nach folgenden Formeln:

$$c_{2h} [\mu\text{g NO}_2^- \text{-N/g/2h}] = \frac{c_{2h} [\mu\text{gNO}_2^- \text{-N/ml}] \cdot 2 \cdot 100 [\text{ml}]}{25 [\text{g}]} \quad [4]$$

$$c_{6h} [\mu\text{g NO}_2^- \text{-N/g/6h}] = \frac{c_{6h} [\mu\text{gNO}_2^- \text{-N/ml}] \cdot 2 \cdot 100 [\text{ml}]}{25 [\text{g}]} \quad [5]$$

$$c_{h^{-1}} [\mu\text{g NO}_2^- \text{-N} \cdot \text{g TM}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] = \frac{c_{6h} [\mu\text{g NO}_2^- \text{-N/g/6h}] - c_{2h} [\mu\text{g NO}_2^- \text{-N/g/2h}]}{4 [\text{h}]} \quad [6]$$

c_{6h} : Nitritkonzentration in $\mu\text{g NO}_2^- \text{-N/ml}$ nach 6- stündiger Inkubation

2: Verdünnungsfaktor, der durch die Zugabe der Lösungen D und F entsteht (10 ml Probe + 10 ml KCl)

100: Volumen der Substratlösung [ml] (incl. des in der Probe enthaltenen Wassers)

25: Bodeneinwaage (Trockenmasse) [g]

4: Zeitdifferenz zwischen der ersten und der zweiten Probenahme (aus TU Berlin, 2001).

3.4.2 Bodenatmung nach DIN ISO 17155

Die Endprodukte der Veratmung organischer Substanzen im Boden sind CO₂ und Wasser (Kapitel 2.1.2.2). Mit Hilfe der analytischen Bestimmung des Stoffwechselproduktes CO₂ oder des O₂-Verbrauchs (hier der CO₂-Abgabe) nach DIN ISO 17155 können die metabolischen Aktivitäten von Mikroorganismen in Bodenproben bestimmt werden.

Dazu wurden die Böden auf den optimalen Wassergehalt eingestellt und vorinkubiert (Kapitel 3.3), damit die durch die Behandlung möglicherweise verfügbaren Kohlenstoffquellen vor Beginn der Messung veratmet werden und die Bakterienpopulation sich zu Beginn der Messung im Ruhezustand befindet. Der Test wurde mit den vier nicht kontaminierten Kontrollböden als auch mit den mit den Eluaten kontaminierten Böden in jeweils vier Parallelen durchgeführt.

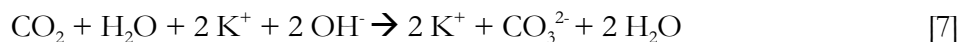
Die Messung wurde nach dreimonatiger Inkubationszeit, während der die Testböden unter kontrolliert gleichbleibenden Bedingungen gelagert wurden, wiederholt.

Messprinzip:

Die Messungen wurden in der Respiationsanlage der TU Berlin, in der eine kontinuierliche Messung der CO₂-Abgabe möglich ist, durchgeführt (Abb.22)

Das Kohlendioxid aus der Bodenatmung wird dabei durch die Änderung der elektrischen Leitfähigkeit einer Kaliumhydroxidlösung erfasst. Da die Leitfähigkeit temperaturabhängig ist, muss die CO₂-Bildung temperaturkonstant erfolgen. Dafür wird in der Anlage der TU Berlin ein bei 20°C konstant temperiertes Wasserbad, in dem die Messzellen eingesetzt sind, verwendet.

Das aus den Bodenproben abgegebene CO₂ wird durch Kaliumhydroxid (KOH) absorbiert. Diese Reaktion ist ein elektrochemischer Vorgang, bei dem durch Aufnahme des CO₂ eine Änderung der Wechselstromleitfähigkeit erfolgt (Kolditz, 1993). In der KOH-Lösung sind die frei beweglichen K⁺- und OH⁻-Ionen Träger der Elementarladung. Bei Absorption von Kohlenstoff reagiert dieser in einem ersten Schritt mit Wasser zu Karbonat und die bei dieser Reaktion frei werdenden Hydroniumionen in einem zweiten Schritt weiter mit den Hydroxidionen aus der Kaliumhydroxidlösung zu undissoziiertem Wasser:



Die bei der beschriebenen Reaktion entstandenen CO₃²⁻- sowie die K⁺- Ionen sind Träger der elektrischen Ladung.

Aus Abbildung 20 geht hervor, dass die Leitfähigkeit der Kaliumhydroxidlösung konstant abnimmt, je mehr CO₂ absorbiert wird.

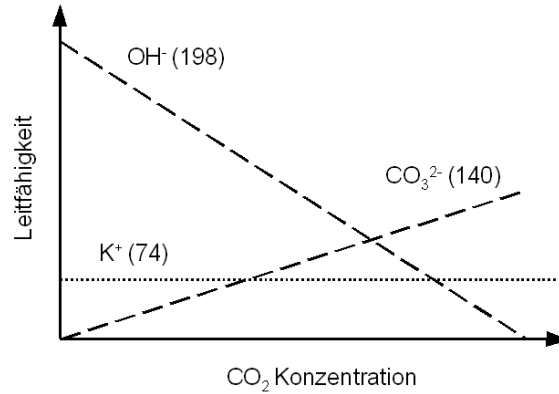


Abbildung 20: Leitfähigkeitsverlauf bei der Absorption von CO₂ in KOH-Lösung. In Klammern: Äquivalente Ionenleitfähigkeiten bei verdünnten Lösungen bei 25 °C (aus Wagner, 2005)

Als Maß für die CO₂-Bildung wird das Leitfähigkeitsverhältnis zwischen dem Start der Messung und dem jeweiligen Messzeitpunkt verwendet:

$$\text{Leitfähigkeitsverhältnis} = \frac{\text{Leitfähigkeit zum Zeitpunkt } t}{\text{Leitfähigkeit zum Startzeitpunkt } t_0} \quad [8]$$

Das Leitfähigkeitsverhältnis ist zum Zeitpunkt $t_0 = 1$. Mit zunehmendem CO₂-Gehalt und abnehmender Leitfähigkeit sinkt dieses Verhältnis. Bis zu einem Leitfähigkeitsverhältnis von 0,5 verläuft die CO₂-Absorption linear (Abb. 21). Danach tritt eine Sättigung der KOH-Lösung ein und die CO₂-Absorption verlangsamt sich. Bei Erreichen eines Leitfähigkeitsverhältnisses von 0,5 muss die Messung unterbrochen und die KOH-Lösung gegen frische Lauge ausgetauscht werden (Wagner, 2005).

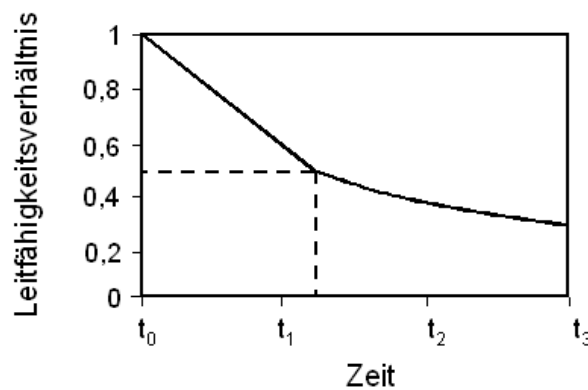


Abbildung 21 : Abnahme des Leitfähigkeitsverhältnisses bei Absorption von CO₂ durch KOH (aus Wagner 2005)

Aus dem Leitfähigkeitsverhältnis lässt sich der CO₂-Gehalt der KOH-Lösung nach folgender Formel berechnen:

Umrechnung der Leitfähigkeitsverhältnisse in mg CO₂:

$$\text{CO}_2 \text{ (mg)} = \frac{1 - \text{Leitfähigkeitsverhältnis Probe}}{\text{Leitfähigkeitsverhältnis Blindwert}} \times \text{KOH-Molarität [mol/l]} \times \text{KOH-Volumen [ml]} \times 39,76^*$$

* experimentell ermittelter Umrechnungsfaktor nach CHAPMAN (1971)

[9]

Da die elektrische Leitfähigkeit temperaturabhängig ist, muss eine konstante Temperatur eingehalten werden.

Versuchsdurchführung:

a) Geräte: - CO₂-Messgerät (Abb.22)

- Laborwaage (Auflösung 0,01 g)
- Analysenwaage (Auflösung 0,0001 g)
- übliche Laborgefäße

b) Chemikalien: - Kaliumhydroxidlösung (0,6 mol/l)

- Substratgemisch: 80 g C₆H₁₂O₆ (Glukose, wasserfrei)
- 13 g (NH₄)₂SO₄
- 2 g KH₂PO₄



Abbildung 22: Anlage zur CO₂-Messung

c) Durchführung und Auswertung

Die Messzellen des CO₂-Messgerätes wurden mit je 0,15 ml frischem KOH befüllt und über das Wochenende im Wasserbad bei 20 °C temperiert.

Die Messung wurde am darauf folgenden Arbeitstag zunächst leer gestartet, um den ersten Messwert zu erfassen, mit dem alle nachfolgenden Messwerte ins Verhältnis gesetzt wurden.

Die Testböden wurden 4-fach in 150 ml Bechergläsern eingewogen. Die Bodeneinwaage richtete sich nach dem Gehalt an organischer Substanz. Bei Böden mit einem C_{org}-Gehalt < 2,5 % (Humus < 5 %) wurden von der feuchten vorinkubierten Probe (Kapitel 3.3) je 20 g TM entsprechende Mengen eingewogen. Bei höherem Humusgehalt wurden jeweils 1 g organische Substanz entsprechende Mengen eingewogen.

Die Leermessung wurde kurz unterbrochen, um die mit den Bodenproben befüllten Bechergläser nach dem Zufallsprinzip in die Messzellen einzusetzen. Zwischen den Messzellen mit den Bodenproben wurden Blindproben (nur Messzellen mit KOH-Lösung) verteilt, um etwaige Einflüsse auf die Messung, wie z.B. Temperaturschwankungen erfassen zu können. Dann wurde über 48 Stunden die Basalatmung der Testböden (inkubierte und nichtinkubierte Testböden) gemessen.

Die **Basalatmung (R_B)** ist die gemessene CO₂-Bildung einer Bodenprobe ohne den Zusatz von Nährstoffen. Diese Messung ergibt konstante und niedrige Atmungsraten.

Nach 48 Stunden wurden den Bodenproben eine leicht verwertbare Kohlenstoffquelle und Nährstoffe (Glucose + (NH₄)₂SO₄ + KH₂PO₄) zugegeben. Zunächst trat durch die Zugabe von Nährstoffen eine regelmäßig und kurzfristig erhöhte Atmung ein, die aus der Verwertung des zugegebenen Substrates resultierte. Dies ist die **substratinduzierte Atmung (R_S)**. Nach einer Anlaufphase (**lag-Phase**) werden die zugegebenen Nährstoffe und Kohlenstoffquellen in ein exponentielles Wachstum umgesetzt.

Die Messung wurde solange fortgesetzt, bis der aus der Veratmung des zugesetzten Substrates resultierende Wachstumspeak am 6. Tag nach Beginn der Messung erreicht war.

Aus den regelmäßig - alle halbe Stunde - gemessenen Werten der CO₂-Entwicklung bei 20 °C bis zum Ende des Wachstumspeaks konnten außer der Basal- und der substratinduzierten Atmung weitere verschiedene mikrobielle Parameter wie der respiratorische Atmungsquotient, die lag-Phase, die maximale Wachstumsgeschwindigkeit, die Zeit von der Substratzugabe bis zum Peakmaximum und die kumulative CO₂-Bildung mit Hilfe des Auswertungsprogrammes SNOOP-PLOT berechnet werden.

Der **respiratorische Atmungsaktivierungsquotient (Q_R)** bezeichnet den Quotienten zwischen Basal- und substratinduzierter Atmung. Die **Lag-Phase** (Anlaufphase) (**t_{lag}**) ist die Zeitspanne von der Substratzugabe bis zum Beginn des exponentiellen Wachstums (bei

unbelasteten Böden meist ≤ 20 h). Die **maximale Wachstumsgeschwindigkeit** (μ) entspricht der Steigerung der Atmungsraten während der exponentiellen Phase.

Bei halblogarithmischer Darstellung der Kurve ist die exponentielle Phase durch einen geraden Verlauf gekennzeichnet. Die **Zeit von der Substratzugabe bis zum Peakmaximum** (t_{peakmax}) (höchste Atmungsrate) liegt bei unbelasteten Böden bei ≤ 50 h. Die **kumulative CO_2 -Abgabe** (C_R) zeigt die Menge des abgegebenen CO_2 vom Zeitpunkt der Substratzugabe bis zum Erreichen des Peakmaximums in der Kontrolle an. Dabei wird die Fläche unter der Kurve von der Substratzugabe bis zum Zeitpunkt des Peakmaximums berechnet (nach Wilke et al., 2000). Anhand der Form der Atmungskurven können nach WILKE et al. (2000) noch zusätzliche Informationen über das ökotoxische Potenzial eine Bodens abgeleitet werden. So weist z.B. das Fehlen eines exponentiellen Wachstums oder doppelte Wachstumsspeaks auf Störungen der mikrobiellen Gemeinschaft hin (Kapitel 4).

Die Atmungsraten werden über die Zeit aufgetragen. Aus den Atmungskurven lassen sich die oben genannten Parameter mathematisch ermitteln.

In der nachfolgenden Abbildung 23 ist die Atmungskurve eines unbelasteten Bodens (halblogarithmische Darstellung) beispielhaft dargestellt.

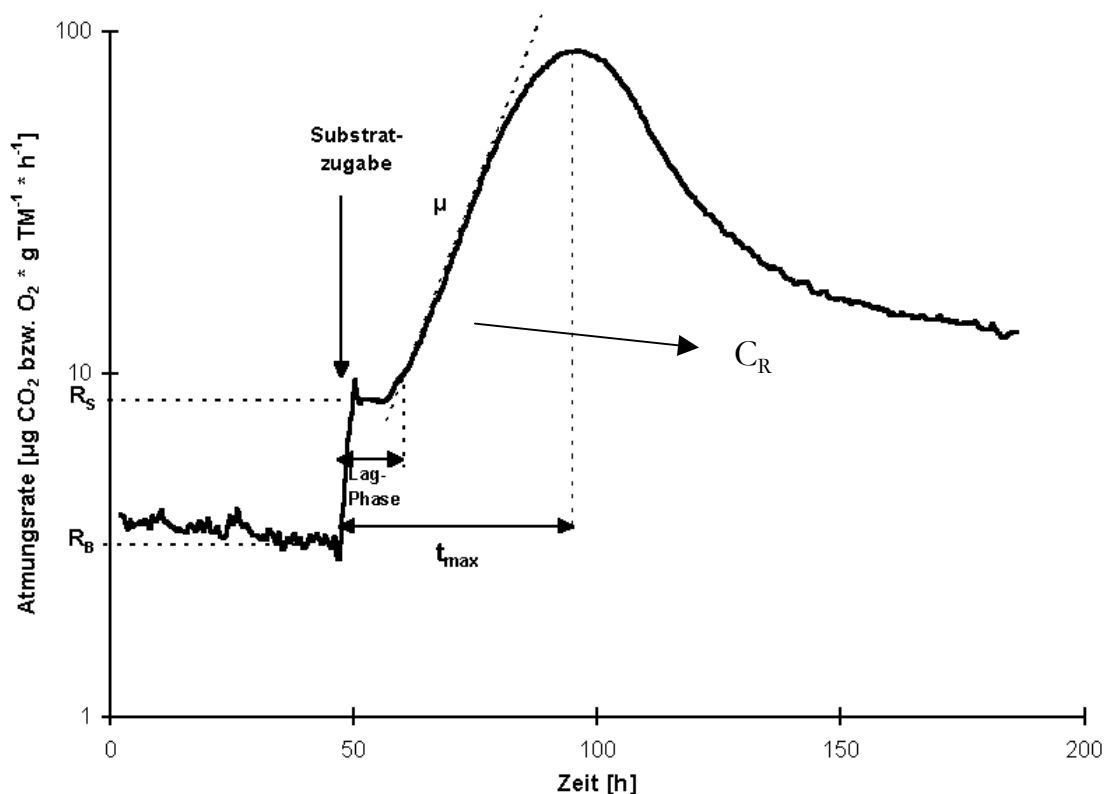


Abbildung 23: Respirationsskurve eines unbelasteten Bodens (aus WILKE et al., 2000)

3.4.3 Aquatische Testverfahren

Die aquatischen Testverfahren wurden in der FhG/IME Schmalleberg durchgeführt.

Über aquatische ökotoxikologische Verfahren wird u. a. nachgewiesen, ob in einem Boden ein über den Wasserpfad austragbares ökotoxisches Potenzial vorhanden ist. Daher müssen für die Anwendung von aquatischen Testsystemen Bodeneluate hergestellt werden.

Die biologischen Testverfahren für das aquatische Milieu wurden anhand der unterschiedlichen Ernährungsstufen ausgewählt. Es sollte immer eine Testbatterie getestet werden, da unbekannt ist, welcher Organismus sensitiv reagiert. Um die Sensitivität der Organismen exakt nachzuweisen, werden für aquatische Testsysteme einschließlich der In-vitro-Verfahren definierte Nährmedien (Inokulum) gewählt, die auf den Testorganismus abgestimmt sind und in denen der Stoff, dessen Wirkung zu bewerten ist, gelöst wird. Durch Verdünnungsreihen mit dem Nährmedium werden Konzentrationsreihen hergestellt. Die einzelnen Ansätze unterscheiden sich dabei nur in der Konzentration der Testsubstanz. Der Testorganismus wird den einzelnen Ansätzen exponiert und nach einer festgelegten Inkubationszeit werden die Reaktionen des Testorganismus im Vergleich zum Ansatz mit der Kontrolle, d.h. dem nicht kontaminierten Medium detektiert. Zur Bewertung werden diejenigen Verdünnungsstufen (G-Stufen) festgelegt, deren Überschreiten auf ein ökotoxikologisches Potenzial hinweist. Die statistische Auswertung erfolgt anhand von EC_{50} -Werten (Hund-Rinke et al., 2002).

Die aquatischen Testverfahren wurden nur vergleichend durchgeführt, sie stehen in dieser Arbeit nicht unmittelbar im Zentrum des Interesses. Daher wird auf den Ablauf der Versuche an dieser Stelle nicht ausführlich eingegangen.

3.4.3.1 Leuchtbakterien-Lumineszenz-Hemmtest (nach DIN EN ISO 11348-2)/

Leuchtbakterien- Zellwachstums-Hemmtest nach DIN 38412-37

Das marine Leuchtbakterium *Vibrio fischeri* gehört zu den Gram-negativen, fakultativ anaeroben und durch Geißeln beweglichen Bakterien. Es gilt als Modellorganismus für die Biolumineszenz. Die Biolumineszenz wird bei *Vibrio fischeri* durch die mit Luciferase katalysierte Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin, eine Intermediärverbindung, die bei Rückkehr in den Grundzustand das Licht emittiert, hervorgerufen (Hörsch, 2004, Schlegel, 1992).

Der Leuchtbakterienlumineszenztest ist ein statischer Kurzzeittest (Batchtest), der zur Untersuchung von Abwasser und wässrigen Lösungen von Prüfsubstanzen, wie z.B. wässrigen Bodeneluat, dient. Bei einer Störung des Stoffwechsels (z.B. durch die Einwirkung von Chemikalien) ist die bakterielle Leuchtintensität vermindert.

Versuchsdurchführung und Auswertung:

Bei dem Test wurden verschiedene Verdünnungen des Bodeneluats mit der Leuchtbakteriensuspension zusammengebracht. Die für eine unter 20%ige Hemmung notwendige Verdünnungsstufe des Originaleluats wurde ermittelt. Testkriterium ist die Leuchtintensitätsabnahme gegenüber einem Kontrollansatz nach einer Kontaktzeit von 30 min (Hund-Rinke et al., 2002).

Der Test wurde mit flüssig getrockneten Bakterien (*Vibrio fischeri*) durchgeführt. Die Eluate wurden, falls erforderlich, vor der Testung auf einen pH $7 \pm 0,2$ mit HCl eingestellt.

Folgende Verdünnungsstufen (G-Werte) wurden untersucht:

G = 1 (80 % Eluat)

G = 2 (50 % Eluat)

G = 3 (33,3 % Eluat)

G = 4 (25 % Eluat)

G = 6 (16,7 % Eluat)

G = 8 (12,5 % Eluat)

G = 12 (8,3 % Eluat)

G = 16 (6,25 % Eluat)

Das Eluat des Bauprodukts soll die maximal zulässige Hemmung der Lichtemission von weniger als 20 % bis zur Verdünnungsstufe 8 ($GL \leq 8$) erreichen.

Falls die Verdünnungsstufe $GL > 8$ ist, wird in Zweifelsfällen der **Leuchtbakterien-Zellvermehrungs-Hemmtest** zusätzlich durchgeführt. Dazu wird die Hemmung der Zellvermehrung von flüssig getrockneten Bakterien (*Vibrio fischeri*) in verschiedenen Verdünnungen im Vergleich mit einem Kontrollansatz ermittelt. Die Eluate wurde, vor der Testung auf einen pH $7 \pm 0,2$ mit HCl eingestellt. Folgende Verdünnungsstufen (G-Werte) wurden untersucht:

G = 2 (50 % Eluat)

G = 3 (33,3 % Eluat)

G = 4 (25 % Eluat)

G = 6 (16,7 % Eluat)

G = 8 (12,5 % Eluat)

G = 16 (6,25 % Eluat)

Wenn die für eine 20%ige Hemmung notwendige Verdünnungsstufe GL_w für das Wachstum ≤ 2 beträgt, gilt der Test insgesamt als bestanden (DIBt-Merkblatt, Entwurf Januar 2005).

Aus den Versuchsdaten wurden nicht nur die G-Stufen, sondern auch die Dosis-Wirkungsbeziehungen über eine Regressionsanalyse nach log-Probit-Transformation der Wertepaare berechnet. Daraus wurde die 50%ige Effektkonzentration auf die Leuchtintensität (EC_{50}) bzw. in der ersten Testphase auch der Zellvermehrung bestimmt.

3.4.3.2 Algentest nach DIN 38412-33

In der zweiten Testphase wurde der Algentest auf Beschluss des Projektbeirates nicht mehr durchgeführt, da eine Eignung des Testes für die ökotoxikologische Testbatterie zur Untersuchung von Bauprodukt-Eluaten bereits in der ersten Testphase und in den vorangegangenen Untersuchungen der FhG in Schmallenberg bestätigt wurde.

Der Testorganismus, die Grünalge *Desmodesmus subspicatus* (früher *Scenedesmus*) CHODAT ist in Süß- und Brackwasser weit verbreitet und stellt einen Vertreter der zur Photosynthese befähigten Organismen in der Testbatterie dar (Hund, 1994).

An wässrigen Bodeneluat wird die Hemmung des Wachstums von *Desmodesmus subspicatus* in einem statischen Test (Batch-Test) erfasst. Hierbei wird die Chlorophyllmenge durch die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz einer Algensuspension bestimmt. Die auftretenden Hemmungen der Photosyntheseleistung unterbrechen die Lichtemission der Zellen der Grünalge (Gerhardt und Putzger, 1992). Die Algenfluoreszenz wird über ein Fluorimeter erfasst (DIN 38412-33, 1991). Ermittelt wird die Algenbiomasse je Volumeneinheit. Als Maß gilt die in-vivo bei Licht mit einer Wellenlänge von 685 nm gemessene Chlorophyll-Fluoreszenz nach Anregung mit Licht im Wellenlängenbereich von 400 - 500 nm (Hund-Rinke, 2002).

In verschiedenen Verdünnungen wird so die Hemmung der Zellvermehrung der Grünalge im Vergleich mit einem Kontrollansatz ermittelt und zur Beurteilung der chronischen Toxizität von Stoffen im wässrigen Medium herangezogen.

Versuchsdurchführung und Auswertung:

Die Eluate wurden vor dem Test auf einen pH $7 \pm 0,2$ mit HCl eingestellt. Folgende Verdünnungsstufen (G-Werte) wurden untersucht:

G = 1 (80 % Eluat)

G = 2 (50 % Eluat)

G = 3 (33, 3 % Eluat)

G = 4 (25 % Eluat)

G = 6 (16, 7 % Eluat)

G = 8 (12, 5 % Eluat)

G = 16 (6,25 % Eluat)

Acrylat max.. zusätzlich: G = 32 (3,13 % Eluat)

Gemäß DIN wird eine Hemmung der Zellvermehrung der Grünalge von 20 % und mehr als toxische Wirkung eingestuft. Die für eine unter 20%ige Hemmung der Zellvermehrung notwendige Verdünnungsstufe (G_A) wird eingestellt.

Bei diesem Test soll das Eluat des Bauprodukts die maximal zulässige Hemmung von weniger als 20 % bis zur Verdünnungsstufe 4 ($G_A = 4$) oder bereits bei geringeren Verdünnungen erreicht haben (DIBt, 2005).

3.4.4 Abbautest (OECD 301 E/OECD-Screening-Test)

Organische Substanzen können auf vielfältige Art und Weise biologisch abgebaut oder verwertet werden. Auf den biologischen Abbau haben Faktoren wie Nährstoff- und Sauerstoffversorgung, pH-Wert und Temperatur Einfluss. Daneben spielen insbesondere Vorgänge zwischen den einzelnen Vertretern der Mikroorganismen, wie Cometalismus, Kommensalismus, Synergismus sowie die Art und Zusammensetzung der organischen Substanzen eine wichtige Rolle (Hörsch, 2004).

Im Falle der Nitrifikation wurde z.B. beobachtet, dass diese einen cometabolischen Abbau refraktärer Stoffe bewirkt oder Cosubstrate für heterotrophe Mikroorganismen liefern kann, woraus eine Verbesserung des Gesamtabbaus resultiert (Hoersch, 2004).

Der Abbau von Substanzen kann über den Chemischen Sauerstoffbedarf, der über einen Zeitraum von 5 Tagen (CSB 5) gemessen wird, erfasst werden. Möglich ist auch die direkte Messung des CSB, TOC- bzw. DOC-Abbaus. Der Test wird dabei solange fortgeführt, bis eine Plateauphase erreicht wird, im Normalfall aber nicht länger als 28 Tage.

Mit diesen statischen Abbaueversuchen können Abbau oder Eliminierung (z.B. durch Adsorption an Mikroorganismen) toxischer Substanzen untersucht werden, wenn Abbautests mit ökotoxikologischen Untersuchungen wie Daphnientest oder Leuchtbakterientest verknüpft sind (Hörsch, 2004).

Versuchsdurchführung:

Die Testsubstanz, bzw. in diesem Fall das Bauprodukteluat, wird als einzige Kohlenstoffquelle einem Mineralmedium zugesetzt. Als Inokulum dient Kläranlagenauslauf. Der Abbau wird über die Verringerung von gelöstem Kohlenstoff verfolgt. Gemäß Vorschrift soll die Kohlenstoffkonzentration im Testansatz zum Zeitpunkt 0 zwischen 10 und 40 mg/l betragen.

Auf Grund der DOC-Gehalte in den Eluaten und den zur Verfügung stehenden Eluatmengen von insgesamt einem Liter für alle Tests wurde als Testvolumen 500 ml (Guideline: 1 l) gewählt.

Folgende Ansätze wurden untersucht:

Inokulum-Blindwert (Mineralmedium + Inokulum):	2 Parallelen
Referenz-Ansatz (Na-Benzoesäure + Mineralmedium + Inokulum):	2 Parallelen
Testansatz 1 (Acrylat max. + Mineralmedium + Inokulum):	2 Parallelen
Toxizitätskontrolle (Acrylat max. + Na-Benzoesäure + Mineralmedium + Inokulum):	1 Ansatz
Testansatz 2 (Acrylat nach 7 d + Mineralmedium + Inokulum):	1 Ansatz
Testansatz 3 (Epoxid max. + Mineralmedium + Inokulum):	1 Ansatz

Das Eluat Epoxid nach 7 d konnte auf Grund seines niedrigen DOC-Gehaltes (2,4 mg/l) in der ersten Testphase nicht untersucht werden.

Der Abbau wird über die Messung des DOC-Gehaltes verfolgt. Die Messungen wurden an folgenden Tagen durchgeführt: 0 (Testansatz), 3, 7, 17, 21 und 28. Für die Bestimmung wurden jeweils 10 ml entnommen und an einem TOC-Analysator 5050A von *Shimadzu* analysiert.