

Cyanid–Phytoremediation mit *Eichhornia crassipes*

–
Eine alternative Methode zur Aufbereitung cyanid- und kupferhaltiger Abwässer aus dem
Goldbergbau

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-
Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

von

Diplom-Gymnasiallehrer

Mathias Ebel

aus Arnsberg-Neheim im Sauerland

Berichter:

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Andreas Schäffer

Dr. rer. nat. habil Wolfgang Tillmanns

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Alan Slusarenko

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Februar 2007

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Andreas Schäffer möchte ich für die interessante Themenstellung, das Engagement bei den Antragstellungen und das mir entgegengebrachte Vertrauen danken.

Herrn Dr. habil. Wolfgang Tillmanns und Herrn Prof. Dr. Alan Slusarenko gilt mein Dank für die freundliche Übernahme der Begutachtung der Arbeit.

Herrn Dr. Philippe Corvini und Herrn Dr. Rong Ji möchte ich dafür danken, dass sie immer Zeit und ein offenes Ohr für fachliche Fragen und Diskussionen hatten. Herrn Dr. Andreas Höllrigl-Rosta danke ich für seine Unterstützung bei den Antragstellungen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Eberhard Stengel für die Anregungen und das sehr große Interesse für die Arbeiten in der AMOVA.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft DFG danke ich für die finanzielle Förderung des Projektes „Untersuchung der Wetland-Phytoremediation zur Cyaniddetoxifikation“.

Den Mitarbeitern der Mechanischen Werkstatt der Biologie gilt mein Dank für den Bau des Flow-Through-Systems und weiterer Geräte sowie für einfach gute Lösungen bei kniffligen Problemen und schnelle Hilfe bei dringenden Reparaturen.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Umweltforschung (Biologie V) für die angenehme Zusammenarbeit und die große Hilfsbereitschaft bei Fragen der praktischen Arbeit bedanken. Mein besonderer Dank gilt Telse Bauer, Jürgen Ebert, Magdalena Cirja, Gregor Hommes, Vassilis Kouloumpos, Martina Ross-Nickoll, Björn Scholz-Starke, Ullrike Schuller, Bernhard Theissen, Andreas Toschki und Ralph Vinken.

Besonders möchte ich mich bei Markus Lenz für sein besonderes Engagement zu Beginn meiner Arbeit bedanken. Pia Schellens danke ich für ihre Unterstützung zum Ende der Arbeit. Ganz besonders vielen Dank an meinen Mitstreiter den „Phytoremediator“ Michael Evangelou!

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung und Vertrauen während der Entstehung dieser Arbeit und vor allem während der Zeit der Antragstellung, vor Beginn der Arbeit.

Und natürlich Lydia!

Abstract

Most of the highly toxic cyanide used in industrial mining is handled without observable devastating consequences, but in informal, small-scale mining, the use is poorly regulated and the waste treatment is insufficient. Cyanide in the effluents from the latter mines could possibly be removed by constructed wetlands with water hyacinths (*Eichhornia crassipes*) because of its high biomass production, wide distribution, and tolerance to cyanide and metals.

The aim of this thesis was to evaluate the use of *E. crassipes* for the treatment of gold mining effluents containing high amounts of cyanide and copper. The phytotoxicity and the cyanide and copper removal-capacity were tested in lab-scale experiments. The cyanide degradation studies were performed applying ^{14}C -labelled potassium cyanide (K^{14}CN). The results were verified with *E. crassipes* in field scale in the hydraulically controlled treatment plant AMOVA.

Toxicity to cyanide and copper was quantified by measuring the mean relative transpiration over 96 h. At $5 \text{ mg CN or Cu L}^{-1}$, only a slight reduction in transpiration-rate was visible. The EC_{50} value was calculated by probit analysis to be 13 mg CN L^{-1} and $29.8 \text{ mg Cu L}^{-1}$. If copper and cyanide were supplied simultaneously phytotoxicity decreased. This effect was due to the detained absorption of copper in complex form. *E. crassipes* removed approximately 98% of applied copper in 24 h. Copper absorption was enhanced in solutions with lower pH (pH 5.5). The copper content in the leaves did not increase obviously, compared to the control plants, whereas the content in roots was 500-fold higher ($12 \text{ mg (g dry weight)}^{-1}$). The copper-cyanide complex was not absorbed significantly ($p > 0.05$) by the plants in 72 h.

Metabolism of K^{14}CN was measured in batch systems with leaf and root cuttings. Similar first-order removal kinetics were observed in all systems with plant tissue. Leaf cuttings converted about 10% to $^{14}\text{CO}_2$ and accumulated about 35% of the applied radioactivity in the tissues. The calculated K_M of the leaf cuttings was 12 mg CN L^{-1} , and the v_{\max} was $33 \text{ mg CN (kg fresh weight)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (non linear regression). The radioactivity in the tissues was not attributed to ^{14}C -labelled cyanide. The production of $^{14}\text{CO}_2$ was probably due to metabolism of asparagine, the metabolite of cyanide in plants described in the literature. The formation of ^{14}C -labelled asparagine and aspartic acid was verified after an extraction with ethanol and derivatisation with PITC.

The fate of K^{14}CN in entire plants was investigated using water hyacinths in hydroponic-systems, which were set in flow through systems connected to NaOH traps. The radioactivity in the traps was attributed to leaf-volatilisation. The decrease of radioactivity in these

experiments followed zero order kinetics. This probably indicated a diffusion controlled removal mechanism. After preincubation with cyanide the kinetic changed to first order. This phenomenon may point to a physiological adaptation of the plants and/or the root-associated microflora to cyanide. If copper was added simultaneously the removal of radioactivity was inhibited. Approximately 50% of the applied radioactivity of each experiment was found in the NaOH-traps. In consequence this amount of radioactivity was released by the leaves as $^{14}\text{CO}_2$ or H^{14}CN . The amount of radioactivity in root and leaf extract was similar, which showed a high root to shoot translocation.

In semi-field scale experiments in the AMOVA, *E. crassipes* showed a higher tolerance to cyanide. The cyanide-removal capacity increased over the experimental period. On contrary to the findings of the lab-scale experiments the plants were able to tolerate cyanide in concentrations of 14 mg CN L^{-1} (adding 30 L of a 470 mg CN L^{-1} solution) without visible toxicity symptoms. The system showed a maximum cyanide removal capacity of 50 g NaCN in 70 h. Additionally CuCN removal was observed short time periods of 24–48 h.

To examine if an adaption to cyanide appeared during the experimental period, plants from the AMOVA were tested in hydroponic experiments. These plants showed an 8-fold higher cyanide removal in comparison to plants from the green-house. One year later cyanide was applied in the AMOVA again, but this time without an adaption-period. The results of the previous year could not be reproduced. A slower cyanide removal was observed and about 70% of the plants died during the treatment. In consequence, an adaption to cyanide in the previous year most likely occurred und must be considered if this technique is applied in the treatment of gold mining effluents, to avoid overloading and collapsing of the treatment plant during the first applications.

The results indicate a high potential of *E. crassipes* in treating cyanide effluents from small-scale gold mining.

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Stand der Forschung	4
1.1.1 Cyanid im Goldbergbau	4
1.1.2 Toxizität und Umweltverhalten der Cyanide und Kupfer	9
1.1.3 Cyanidstoffwechsel in höheren Pflanzen	19
1.1.4 <i>Eichhornia crassipes</i> und ihr ökotechnisches Potential	22
1.2 Aufgabenstellung	28
2. Material & Methoden	30
2.1 Analytik	30
2.1.1 Kupfer	30
2.1.2 Cyanid	31
2.1.3 Radioanalytik	32
2.2 Kultivierung der Wasserhyazinthen	33
2.3 Untersuchungen in hydroponischen Testsystemen	34
2.3.1 Toxikologische Tests	35
2.3.2 Kupfer & Cyanid Absorption	36
2.4 Radioanalytische Untersuchungen	37
2.4.1 ¹⁴ CN–Bilanzierung in batch Systemen	37
2.4.2 Michaelis–Menten Parameter	39
2.4.3 Bilanzierung in flow through Systemen	40
2.4.4 Identifizierung des Metaboliten Asparagin	43
2.5 Untersuchungen im Pilotmaßstab (AMOVA)	45
2.5.1 Konstruktion & Versuchsaufbau	46
2.5.2 Applikationen und Probenahme	50
2.5.3 Hydraulische Eigenschaften	51
2.6 Statistische Methoden	53
3. Ergebnisse und Diskussion	54
3.1 Toxikologische Untersuchungen	54
3.1.1 Ergebnisse	54
3.1.1.1 Kontrollversuche	54
3.1.1.2 Cyanid	55
3.1.1.3 Kupfer	58

3.1.2	Diskussion der toxikologischen Resultate.....	60
3.1.2.1	Kontrollversuche	60
3.1.2.2	Cyanid	60
3.1.2.3	Kupfer.....	62
3.1.3	Zusammenfassung: Toxikologische Untersuchungen.....	64
3.2	Kupfer–Aufnahme aus Nährlösung.....	64
3.2.1	Ergebnisse	64
3.2.2	Diskussion der Kupfer–Aufnahme aus Nährlösung.....	69
3.2.3	Zusammenfassung: Kupfer – Aufnahme.....	71
3.3	¹⁴CN–Degradation & Absorption im Batch–Verfahren	71
3.3.1	Ergebnisse	71
3.3.2	Diskussion der ¹⁴ CN Degradation & Absorption im Batch Verfahren	75
3.3.3	Zusammenfassung: ¹⁴ CN – Degradation im Batch Verfahren	77
3.4	¹⁴CN–Bilanzierung nach Aufnahme über die Wurzeln	77
3.4.1	Ergebnisse	77
3.4.2	Diskussion der ¹⁴ CN–Bilanzierung nach Aufnahme über die Wurzeln.....	82
3.4.3	Zusammenfassung: ¹⁴ CN–Bilanzierung nach Aufnahme über die Wurzeln....	85
3.5	¹⁴CN–Metabolisierung	85
3.5.1	Ergebnisse	85
3.5.2	Diskussion der ¹⁴ CN–Metabolisierung.....	90
3.5.3	Zusammenfassung: ¹⁴ CN–Metabolisierung	91
3.6	Schadstoffaufbereitung mit <i>E. crassipes</i> im Pilotmaßstab (AMOVA)	92
3.6.1	Ergebnisse	92
3.6.1.1	Vorversuche	92
3.6.1.1.1	Versuche zur Etablierung der Versuchsbedingungen	92
3.6.1.1.2	Hydraulische Eigenschaften.....	98
3.6.1.2	Versuche mit Kreislaufführung.....	100
3.6.1.2.1	3.–6. Applikation (V.3–V.6)	100
3.6.1.2.2	Versuche mit Mehrfach–Applikation (V.7 & V.8)	105
3.6.1.3	Überprüfung der Ergebnisse im Labormaßstab	111

3.6.1.4	Überprüfung der Ergebnisse in der AMOVA	113
3.6.1.5	Aufbereitung kupferhaltiger Abwässer	115
3.6.2	Diskussion der Resultate aus der AMOVA.....	120
3.6.2.1	Vorversuche	120
3.6.2.2	Versuche mit Kreislaufführung.....	122
3.6.2.3	Überprüfung der Ergebnisse unter Labor- und Freilandbedingungen	124
3.6.2.4	Aufbereitung kupferhaltiger Abwässer	125
3.6.3	Zusammenfassung: Schadstoffaufbereitung im Pilotmaßstab (AMOVA).....	128
4.	Evaluation	132
4.1	Eignung <i>Eichhornias</i> zur Aufbereitung von Goldbergbauabwässern.....	132
4.2	Grenzen des Verfahrens und weiterer Forschungsbedarf	134
5.	Zusammenfassung	136
6.	Literatur	138
7.	Anhang	154

Abkürzungen

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ACC	1–Aminocyclopropan–1–carbonsäure
AI	Anionen–(Chromatographie)
Asp	Asparagin
Asx	Asparaginsäure
AOX	alternative Oxidase
Bq	Becquerel, 1 radioaktiver Zerfall pro Sekunde
bzw.	Beziehungsweise
c	Konzentration
c(t ₀)	Ausgangskonzentration
CAS	β–Cyanoalanin–Synthase
cps	Counts per second
CN	Cyanid
CS	Cystein–Synthase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC _x	Effektivkonzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
i.d.	In der
i	Replikat
IC	Ionenchromatographie
ICP	Induktiv–gekoppeltes Hochfrequenz–Plasma
IR	Infrarot
k.A.	Keine Angabe
K _M	Halbsättigungskonstante nach Michaelis–Menten
LSC	Liquid scintillation counting
n	Anzahl der Replikate
nb	Nicht bestimmt, bzw. nicht beprobt oder Probe nicht untersucht
NER	Nicht extrahierbarer Rückstand
NIT	Nitrilase
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NRT	Normierte relative Transpiration
OTC	Oxytetracyclin
p	Probability (Irrtumswahrscheinlichkeit)
PCP	Pentachlorphenol
PE	Polyethylen
PES	Probe–Entnahmestelle
PITC	Phenylisothiocyanat
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
R ²	Bestimmtheitsmaß, Korrelationskoeffizient
RP–HPLC	Reversed Phase HPLC
RT	Relative Transpiration
tert.	Tertiär
TS	Trockensubstanz
u.a.	Unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V.	Versuch
v _{max}	Maximale Abbaugeschwindigkeit nach Michaelis–Menten

Für Längen–, Massen–, Stoffmengen– und Zeitangaben wurden SI–Einheiten verwendet sowie Vorsilben für dezimale Vielfache und Teile der SI–Einheiten nach DIN 1301.

1. Einleitung

Die Cyanidlaugung wird im Goldbergbau als mineralogisches Verfahren zur Erzgewinnung angesehen und angewendet. Bei diesem Verfahren wird das fein gemahlene Gestein für mehrere Monate mit einer 0,1%igen Natriumcyanid-Lösung aufbereitet. Die Konzentration an freiem Cyanid in der Lauge entspricht in etwa 1000 mg L^{-1} . 90 bis ca. 200 mL dieser Lösung, oral aufgenommen, würden ausreichen, um einen erwachsenen Menschen binnen Sekunden zu töten. Beim so genannten heap leaching Prozess, im großindustriellen Goldbergbau, werden bis zu mehrere Millionen Liter dieser Cyanidlauge auf hektargroßen Flächen versprüht. Obwohl die enorme Gefährdung für Mensch und Umwelt offensichtlich ist, wird der Prozess nach wie vor nicht als chemisches, sondern mineralogisches Verfahren eingestuft und daher nicht nach den international akzeptierten Regeln und Sicherheitsvorkehrungen der chemischen Industrie gehandhabt. Damit ist es nicht nur möglich, den Laugungsprozess in offenen Anlagen zu betreiben, sondern auch die hochtoxischen und schwermetallverseuchten Abfälle auf hektargroßen Halden endzulagern. Damnbrüche dieser „tailing-Halden“ haben bislang zahlreiche verheerende Umweltkatastrophen verursacht.

Der industrielle Bergbau auf Gold verläuft in den Industrieländern mittlerweile meist ohne größere, bzw. sichtbare Zwischenfälle. Die Ursachen hierfür sind sicherlich einerseits strenge behördliche Zulassungsbeschränkungen und Kontrollen und andererseits der Einsatz moderner Techniken im Anlagenbau und der Prozesswasseraufbereitung. Demgegenüber steht der artisanale und halbtechnisierte Kleinbergbau auf Gold. Diese informellen Formen des Bergbaus finden sich vorwiegend in Dritteltstaaten Lateinamerikas. Die Gesamtbelegschaft dieser „Betriebe“ besteht i.d. Regel aus weniger als zehn oder fünfzig Goldschürfern und entzieht sich damit leicht der behördlichen Kontrolle. Es finden sich teilweise komplizierte Verflechtungen zwischen Minen, „tailing-Halden“ und Abbaumethoden. Beispielsweise wird häufig der bereits behandelte Prozessrückstand aus der Amalgamierung nochmals durch unabhängige Goldschürfer mit Cyanid gelaugt. Die Folgen sind schwerwiegend. Das hochtoxische Cyanid wird ohne Sicherheitsvorkehrungen gehandhabt und die Abwässer gelangen ohne Aufbereitung, durch direkte Drainage oder indirekt durch beschädigte Dämme in die anliegenden aquatischen Ökosysteme. Diese kostengünstige „Abfallwirtschaft“ zeigt direkte Auswirkungen auf die biologische Diversität der betroffenen Biotope. Freie Cyanide, die toxischsten Cyanid-Formen, die als Hydrogencyanid oder dissoziiertes Anion nicht gebunden sind und leicht freisetzbare Cyanide, die Erdalkali- oder Nebengruppenmetall-Cyanokomplexe, aus denen leicht Cyanid freigesetzt werden kann, stellen die größte Bedrohung dar. Beide Formen finden sich in der Umgebung der Minen in für aquatische Organismen letalen Konzentrationen.

nen. Das umweltschädliche Einzugsgebiet wird allerdings nicht ausschließlich durch das hochtoxische aber nichtpersistente Cyanid begrenzt. Aus der Gangart mobilisierte Schwermetalle, wie Cadmium, Blei, Kupfer und Quecksilber (bei der Amalgamierung), sind noch in Entfernung mehrerer Kilometer flussabwärts im Flusssediment bioverfügbar und reichern sich in den Organismen an. Die Problematik wird noch zusätzlich dadurch erschwert, dass sich die Minen meist in abgelegenen, ökologisch sensiblen Arealen außerhalb behördlichen Einflussbereichs und ohne infrastrukturelle Anbindung befinden.

Um die Lage vor Ort bedeutsam zu verbessern, bedarf es zum einen der nachdrücklichen Durchsetzung lokaler Richtlinien nach internationalen Konventionen für einen für Mensch und Umwelt nachhaltigen oder zumindest einigermaßen verträglichen Goldbergbau. Viele Entwicklungsländer haben zwar allgemeine Umweltschutzrichtlinien, aber keine besonderen Vorschriften für den Bergbau. Außerdem mangelt es an wirtschaftlichen und personellen Voraussetzungen, um die Vorschriften durchzusetzen. Geeignete Maßnahmen seitens der Industrienationen sind sicherlich durchgreifende Auslandshilfen bei den Umweltschutzverordnungen, die Verknüpfung von Umweltschutzauflagen mit der Finanzierung von Erschließungsprojekten und die Vergabe zweckgebundener Darlehen. Unabhängig davon wäre es wünschenswert, die Goldmobilisierung und Aufkonzentrierung mit Cyanid als chemischen Prozess einzustufen, um auch die in Industrienationen latent vorhandene Gefahr von Cyanidunglücken einzudämmen.

Diese Maßnahmen allein erscheinen aber angesichts der konfuse Situation in den „hot spots“ des informellen Goldbergbaus in ihrer Umsetzung utopisch. Solange die technischen, legislativen und ökonomischen Voraussetzungen für einen sicheren Minenbetrieb nach industriellem Vorbild nicht gegeben sind, bedarf es auch alternativer Strategien, die den lokalen Anforderungen und Einschränkungen Rechnung tragen.

Eine alternative und kostengünstige Form der Abwasserbehandlung ist die Prozesswasseraufbereitung in Pflanzenkläranlagen. Diese Anlagen sollten einfach zu installieren und ohne erheblichen technischen und wirtschaftlichen Aufwand zu betreiben sein. Die betreffende Forschungsrichtung wird international als „Wetland–Phytoremediation“ bzw. „Phytoremediation in constructed wetlands“ bezeichnet. Unter diesem Begriff werden alle Prozesse zusammengefasst, bei denen Wasser– oder Sumpfpflanzen den Schadstoffabbau bzw. die Schadstoff–Absorption aus Abwasser direkt oder indirekt fördern. Pflanzenkläranlagen im konventionellen Einsatz, die vornehmlich als Kleinkläranlagen in der dezentralen Abwasserreinigung genutzt werden, arbeiten effektiv als Biofilter in der Nährstoffreduktion, indem sie das Substrat und die „Chemie“ für die notwendigen mikrobiologischen Prozesse liefern. Bei der Behand-

lung von Spezialabwässern müssen die Anlagen jedoch gemäß den außerordentlichen Anforderungen der Inhaltsstoffe ausgerichtet sein. Im Goldbergbau wären das in erster Linie die hohe akute Toxizität des Cyanids und die Nichtabbaubarkeit der enthaltenen Schwermetalle. Als Schwermetall wäre besonders das Kupfer zu nennen, da es sehr häufig neben dem Gold in hohen Konzentrationen im Gestein vorkommt und vor allem für Mikroorganismen im aquatischen Milieu toxisch, also als umweltproblematisch einzustufen ist. Darüber hinaus gelten die etablierten Anforderungen an eine Schadstoffbehandlung mit Pflanzen. In erster Linie muss die Wirtschaftlichkeit des Verfahrens gewährleistet sein. Das heißt, im Vergleich zu herkömmlichen Methoden soll bei vergleichbarer Schadstoffreduktion der Einsatz von Pflanzen einen deutlichen wirtschaftlichen Vorteil bringen. Demgemäß sollten die Pflanzen schnell und günstig zu beschaffen und an die klimatischen Bedingungen angepasst sein, also im Idealfall in der Region vorkommen. Des Weiteren sollten die Pflanzen die Schadstoffe im ökotechnisch relevanten Konzentrationsbereich tolerieren, akkumulieren, abbauen oder nachweislich für die Akkumulation oder den Abbau günstige chemische und / oder mikrobiologische Rahmenbedingungen bewirken. Ferner sollten die Pflanzen eine hohe Biomasseproduktion und Reproduktionsrate aufweisen und relativ anspruchslos, leicht zu kultivieren und zu halten sein.

Die Wasserhyazinthe *Eichhornia crassipes* scheint sich aufgrund ihrer biologischen Voraussetzungen und ihres bisher erforschten ökotechnischen Potentials als geeigneter Kandidat für die Aufbereitung cyanidbelasteter Abwässer aus dem Goldbergbau zu eignen. Um der umweltchemischen und ökotoxikologischen Komplexität der Abwässer gerecht zu werden, reicht es allerdings nicht aus, nur Cyanid allein als zentralen Schadstoff zu betrachten. Insbesondere vor dem Hintergrund des starken Komplexbildungsvermögens, sollte auch ein Schwermetall mit ausgeprägter Komplexbildungstendenz in die Untersuchungen miteinbezogen werden. Das toxikologisch relevante Kupfer erfüllt diesen Anspruch.

Das zentrale Anliegen dieser Arbeit ist die Erarbeitung einer Datengrundlage für den Einsatz von *Eichhornia crassipes* in Klärteichen zur Behandlung von Goldbergbauabwässern. Als Eckpfeiler dieser Datenbasis sollen Toxizität und Verbleib der zentralen Schadstoffe Cyanid und Kupfer in Labor- und Feldversuchen untersucht werden

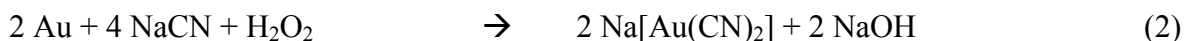
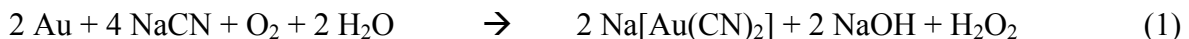
1.1 Stand der Forschung

1.1.1 Cyanid im Goldbergbau

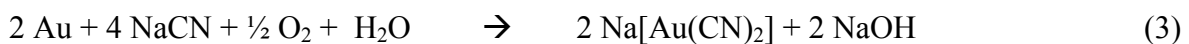
Die prozesstechnische Aufkonzentrierung von Gold mit Cyanid wurde 1887 in Schottland entwickelt und bald darauf in Südafrika etabliert. Die U.S. Bundesbehörde für Bergbau schlug 1969 das so genannte „heap leaching“ Verfahren mit Cyanid als Standardmethode zur Goldextraktion vor. Mit diesem Verfahren wurde es wirtschaftlich attraktiv, Erze mit einem Goldgehalt von mittlerweile nur 0,2–0,8 g/t abzubauen (Korte *et al.* 2000; Henny *et al.* 1994). Daraufhin etablierte die Goldindustrie den Prozess in den 70er Jahren als die dominierende Technik in der großtechnischen Goldgewinnung (Da Rosa und Leon 1997). Heute werden ca. 90% der Goldvorkommen mittels Cyanidlaugung abgebaut. Dabei werden jährlich ca. 350.000 t Natriumcyanid verbraucht (Mudder und Botz 2001).

Beim „heap leaching“ Verfahren wird das fein gemahlene Gestein mit einer ca. 0,1%igen Natriumcyanid-Lösung besprüht oder berieselt. Diese Berieselungsanlagen erreichen Größen von mehr als einem Hektar. Die höchsten Konzentrationen an freiem Cyanid werden in Lachen auf der Haldenoberfläche erreicht (ca. 1000 mg L⁻¹). Während des Leachings perkuliert die alkalische Cyanidlösung in einem Volumen von mehreren Millionen Litern in den offenen Anlagen (Eisler und Wiemeyer 2004; Eisler 2000).

Beim chemischen Prozess bilden sich, unter Anwesenheit von Sauerstoff und unter alkalischen Bedingungen, Cyanoaurate der Oxidationsstufe +2 (Korte und Coulston 1998; Gasparini 1993; Hiskey 1984):



In der Summe ergibt sich, die in den Lehrbüchern gebräuchliche Form der Gleichung:



Elementares Gold lässt sich durch Sauerstoff unter normalen Bedingungen nicht oxidieren, da die dazu aufzuwendende thermische Aktivierungsenergie höher ist als die Bildungsenergie des Oxids. Demgemäß zerfällt das Oxid eher als es sich bildet. Bei der Zugabe von Cyanid-Ionen, also im alkalischen Milieu, oxidiert das Gold auch durch Sauerstoff, und es bildet sich der thermodynamisch äußerst stabile Cyanid-Gold-Komplex Dicyanoaurat. Der Grund für die Oxidation ist, dass bei der Komplexbildung viel freie Energie „gewonnen“ wird, so dass die Oxidation auch ohne thermische Aktivierung möglich ist. Die "Freie Energie" der Komplexbildung senkt also das Redoxpotential des Goldes.

Die goldhaltige Lösung wird in einem Drainagebecken gesammelt und der Goldkomplex wird aus der Lösung durch Absorption an Ionentauschern, Aktivkohle oder durch Fällung mit Zinkstaub gewonnen:



Anschließend wird das Rohprodukt mit verdünnter Schwefelsäure gespült, um Kupfer und Zink zu entfernen. Der Rückstand wird unter Rückfluss eingeschmolzen. Die Aufreinigung erfolgt elektrolytisch (Adams *et al.* 1999; Gasparrini 1993; Hiskey 1984).

Die industriell produzierten Abwässer und festen Rückstände sind häufig in zur Biosphäre offenen Halden, so genannten „tailing ponds“, gelagert. Diese können eine Größe von 150 ha und mehr erreichen (Eisler und Wiemeyer 2004). Die Abfälle weisen bis zu 120 mg L^{-1} freies Cyanid (HCN , CN^-) und um 400 mg L^{-1} Gesamtcyanid auf. Im letzteren Anteil sind alle Metallcyanokomplexe enthalten, die bei pH 4 (leicht freisetzbare CN^-) und pH 2 (gebundenes CN^-) HCN freisetzen. Meist enthält die Gangart erhöhte Gehalte an Kupfer, das sich in Konzentrationen um 50 mg L^{-1} im Abwasser wieder findet (Gos und Ladwig 1992). Aufgrund der meist hohen Kupfergehalte, die oft einen simultanen Abbau rechtfertigen, kommt diesem Schwermetall auch bei der umweltchemischen Betrachtung und der Risikoabschätzung eine besondere Bedeutung zu.

Die cyanidhaltigen Abwässer stellen eine latente Gefährdung für die Umwelt und den Menschen dar, wenn sie nicht sicher gehandhabt werden (Eisler und Wiemeyer 2004; Eisler 2000; 1991; Henny *et al.* 1994). Es finden sich zahlreiche Beispiele für cyanidbedingte Unfälle im Goldbergbau (Tab. 1). Diese kommen meist durch Dammbrüche der tailing ponds zustande. Häufig sind diese offenen Abwasserbecken nicht dafür ausgelegt, noch zusätzlich starke Niederschläge aufzunehmen. Dies war beispielsweise auch beim Dammbruch der Goldmine Aurul bei Baia Mare in Rumänien 2000 der Fall. Der australische Minenbetreiber übernahm die ursprüngliche Dammkonstruktion, ohne sie an das humide Klima Südosteuropas anzupassen. Nach starken Schneefällen konnte der Damm dem Druck nicht mehr standhalten und brach auf einer Länge von mehreren Metern (UNEP/OCHA 2000).

Neben den Dammbrüchen besteht ständig die Gefahr, dass Cyanid und Schwermetalle durch Risse in den Dichtungsfolien der Rückhaltebecken und durch eventuell überlaufende offene Drainageteiche und Kanäle entweichen (Korte *et al.* 2000; Tarras–Wahlberg *et al.* 2000; Korte und Coulston 1998; White und Schnabel 1998; Da Rosa und Lyon 1997; Mosher und Figueroa 1996; Wilkes und Spence 1995; Greer 1993; Alberswerth *et al.* 1989; Hiskey 1984).

Hinzu kommen jährlich ca. 20.000 t HCN, die in die Atmosphäre ausgasen. Die Halbwertszeit beträgt dort ca. 267 Tage (Korte und Coulston 1998).

Tabelle 1.1: Ausgewählte Cyanid–Unglücke im Goldbergbau zwischen 1990 und 2000

<i>Jahr</i>	<i>Land</i>	<i>Vorfall</i>	<i>Referenz</i>
1990	Lettland	Dammbruch: Kontamination anliegender Gewässer	Koenig 2000
1990	South Carolina, USA	Überlaufen eines Drainage–Beckens: Ausfluss von 40 Millionen, ca. 11.000 Fische getötet	Da Rosa und Leon 1997 Greer 1993, Young 1993
1990	Kirgisistan	Dammbruch: Kontamination anliegender Gewässer	Koenig 2000
1994	Südafrika	Dammbruch: Kontamination anliegender Gewässer, 17 Menschen getötet	Garcia–Guinea und Harffy 1998
1995	Guyana	Dammbruch: Kontamination des Essequibo mehr als 3,3 Milliarden Liter tailing Material, vollständiges Fischsterben auf 80 km Fluss	Koenig 2000 Da Rosa und Leon 1997
1995	Neuseeland	Dammbruch: Kontamination anliegender Gewässer	Garcia–Guinea und Harffy 1998
1997	Nevada, USA	Dammbruch: Kontamination anliegender Gewässer durch 930.000 L tailing Material	Moran 1998
1998	South Dakota, USA	Verlust von 6–7 t tailing Material in den Whitewood Creek	Moran 1998
2000	Rumänien	Dammbruch, 300 Flusskilometer kontaminiert durch 100 t tailing Material	Korte <i>et al.</i> 2000 UNEP/OCHA 2000

Neben der passiven Abwasserbehandlung in offenen Becken durch Ausgasung, Photodegradation, chemische Oxidation und nur sekundär durch mikrobiellen Abbau existieren noch weitere Behandlungsmöglichkeiten. Eine sehr gebräuchliche Methode ist die alkalische Chlorierung, bei der Cyanogenchlorid (CNCl) gebildet wird, das zu Cyanat (OCN[–]) hydrolysiert, welches vollständig mineralisiert werden kann (Marrs und Ballantyne 1987; Simovic und Snodgrass 1985). Weitere Verfahren zur Cyanid–Zerstörung wären, UV–Bestrahlung, „acidification, volatilisation, neutralisation“, Ionenaustausch, katalytische Oxidation, Absorption an Aktivkohle, Behandlung mit Formaldehyd, Ozon oder Wasserstoffperoxid, Elektrolyse und biologischer Abbau mit cyanidabbauenden Mikroorganismen (Akcil und Mudder 2003; Adams *et al.* 1999; Dictor *et al.* 1997; Ripley *et al.* 1997; Mosher und Figueroa 1996; Gos und Ladwig 1992; Smith und Mudder 1991; Mars und Ballantyne 1987; Way 1981; Towill *et al.* 1978).

Die biologischen Verfahren werden meist im Anschluss an die chemischen eingesetzt, um auch Cyanokomplexe zu entfernen, die durch die chemischen Verfahren nicht erfasst werden. Dabei erfolgt erstens eine Oxidation der Cyanide und Cyanate durch *Pseudomonas plaucibilis* und anschließend die weitere Verstoffwechselung durch *Pseudomonas*, *Actinobacter*, *Bacillus* und *Alkaligenes* unter Beteiligung verschiedener Oxygenasen und letztendlich vollständiger mikrobiologischer Abbau durch CN-Oxygenasen, –Nitrilasen und –Hydratasen (Figuera *et al.* 1996). Wie einleitend schon angesprochen, ist die ökologische Belastung durch den artisana- len und informalen Kleinbergbau auf Gold besonders problematisch. In den betroffenen Län- dern finden sich viele der größten und wichtigsten zusammenhängenden Gebiete mit biologi- scher Artenvielfalt, die auf der Erde noch existieren (Young 1993). Beispielsweise fördern im Amazonasbecken Brasiliens tausende unabhängige Goldschürfer 120 Tonnen Gold im Jahr. Dabei setzen sie zumeist den hydraulischen Abbau ein. Bei diesem Verfahren werden gold- haltige Berghänge mit Hochdruckwasserstrahlen gesprengt. Wasser und Sedimente werden durch Schleusen geleitet, wobei die winzigen Goldmengen von der Gangart durch den Dich- tegradierten getrennt werden. Die Tonnen wertlosen Gesteins, das als Abfall entsteht, verun- reinigen dann die betroffenen Flüsse. Diese Methode hat so katastrophale Auswirkungen auf die terrestrischen und aquatischen Ökosysteme, dass es in Kalifornien schon vor mehr als 100 Jahren verboten wurde, nachdem dort während des Goldrausches enorme Schäden angerichtet wurden (Young 1993; Smith 1987). Darüber hinaus schürften Goldgräber im Amazonasbecken die Sedimente mittels Amalgamierung, wodurch jährlich schätzungsweise 100 Tonnen Quecksilber eingebracht werden, das die Fische hochgradig verseucht (Cleary 1990). Die Da- tenlage der komplizierten Verflechtungen des artisanal Kleinbergbaus ist sehr lückenhaft. Dies ist natürlich zum einen darin begründet, dass sich die informellen, dezentralisierten und nichtorganisierten Bergbauaktivitäten leicht der behördlichen und damit der wissen- schaftlichen Erfassung entziehen und zum anderen mangelt es einfach an den infrastrukturel- len und wissenschaftlichen Voraussetzungen für eine adäquate Erfassung.

Tarras–Wahlberg *et al.* (2001) gelang es, die Goldbergbau Situation im Portovelo–Zaruma Distrikt im Süden Ecuadors an der Grenze zu Peru darzustellen und die umweltchemischen und ökologischen Auswirkungen zu erfassen (vgl. Tab. 1.2).

Tabelle 1.2: Schwermetall- und Cyanidkonzentrationen im Puyango Flusssystem, Portovelo–Zaruma Distrikt, Ecuador in der Trockenzeit 1999 (verändert nach Tarras–Wahlberg 2001)

Fluss	Fraktion	Freies CN ¹	Ge- samt CN ¹	Cu	Pb	Cd	Hg
		(µg kg ⁻¹)		(mg kg ⁻¹)			(µg kg ⁻¹)
Calera	Wasser ²	5900	6300	6,8	9,2	0,024	0,25
(<1)*	Sediment ³	nb	nb	6200	3200	44	850
Amarillo	Wasser ²	9	81	0,08	0,19	0,004	0,013
(<1)*	Sediment ³	nb	nb	1500	2400	34	220
Puyango	Wasser ²	57	110	0,32	0,130	0,001	0,012
(30)*	Sediment ³	nb	nb	2500	1800	28	570
Puyango	Wasser ²	22	nb	0,17	0,84	0,001	0,008
(60)*	Sediment ³	nb	nb	2100	1400	20	660

*Distanz nach Einleitung in km; ¹kolorimetrische Bestimmung nach US–EPA Standardmethode (USEPA 1997); ²ICP nach Ansäuerung auf pH 2, ohne Filtration (gelöste und suspendierte Fraktion); ³ohne Partikel > 0,5 mm, ICP nach Mikrowellenaufschluss in HNO₃:H₂O 1:1; nb: nicht bestimmt

In diesem Distrikt basiert der Goldbergbau vollständig auf artisanalen und halbertechnischen informellen Aktivitäten, an denen zahlreiche Goldschürfer beteiligt sind. Das Gold wird dort hauptsächlich durch Amalgamierung gewonnen. Zahlreiche kleine Laugungsanlagen behandeln dann nochmals die tailings mittels Cyanidlösung. 1999 existierten dort allein 400 aktive Minen, 66 Gesteins–Mühlen und Amalgamierungsanlagen sowie 80 CN–Laugungsanlagen. Obwohl lokale Richtlinien für Bergbauaktivitäten bestehen, werden diese nicht umgesetzt. Prozessabwässer werden direkt oder indirekt in die Flüsse geleitet. Für 1999 wurde die Menge cyanidhaltiger Abwässer allein dort auf 127.000 Tonnen geschätzt (SGAB–Prodeminca 2000). Tarras–Wahlberg *et al.* (2001) konnte schlussfolgern, dass, obwohl es in dem betroffenen Gebiet keine industriellen Bergbauaktivitäten gibt, die ökologische Beeinträchtigung als sehr ernst und geographisch extensiv einzustufen ist. Mithilfe ökologischer Bestandsaufnahmen aquatischer Invertebraten und Fischen sowie umweltchemischer Bilanzierung relevanter Schadstoffe konnte eine ökologische Beeinträchtigung noch nach bis zu 160 km flussabwärts nachgewiesen werden. Ferner konnte belegt werden, dass Schwermetalle in erster Linie partikulär gebunden im Wasser oder Sediment vorliegen (vgl. Tab. 1.2). Erhöhte Schwermetallkonzentrationen (ca. 10fach) in aquatischen Insektenlarven (*Corydalidae*), im Bereich von 380 (Cu), 390 (Pb), 0,9 (Hg), und 13 (Cd) mg (kg TS)⁻¹, legten Nahe, dass die Schwermetalle im Fluss–Sediment potentiell bioverfügbar sind.

1.1.2 Toxizität und Umweltverhalten der Cyanide und Kupfer

Cyanide umfassen alle Verbindungen, die die charakteristische CN^- Gruppe enthalten. In den Umweltkompartimenten Grund- und Oberflächenwasser sowie Boden und Sediment sind die folgenden Cyanidspezies am häufigsten vorzufinden:

- Freies Cyanid: Hydrogencyanid (Blausäure) HCN und das Anion CN^-
- Einfache, bzw. leicht freisetzbare Cyanide, die bei pH 4 HCN freisetzen: Übergangsmetallkomplexe Nebengruppen 1 und 2, Alkali- & Erdalkalisalze
- Fe-Cyanokomplexe: Ferrocyanid (Hexacyanoferrat II, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$) und Ferricyanid (Hexacyanoferrat III, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$)

Unter dem Begriff Gesamtcyanid werden alle Cyanide erfasst, aus denen bei pH 2 HCN abdestilliert werden kann, also inklusive aller Cyanokomplexe. Organische Cyanid Spezies werden als Nitrile zusammengefasst. Hierunter fallen auch die natürlich vorkommenden cyanogenen Glykoside, die in Pflanzen als Fraßschutz dienen (Vetter 2000).

Freies CN wird schnell über die Atmung, durch Ingestion und in geringerem Maße über die Haut aufgenommen und im Körper verteilt. Es ist eines der am schnellsten wirksamsten Gifte überhaupt, da das neutrale HCN sehr schnell durch biologische Membranen diffundiert. Demgemäß zeigt Cyanid innerhalb von Sekunden die ersten Symptome und tötet innerhalb von Minuten (Towill *et al.* 1978). Die Toxizität kommt durch den schnellen Ligandenaustausch am prosthetisch gebundenen Eisen an der Atmungskette terminal beteiligter Cytochrom-Oxidasen zustande. Hierdurch kann der Sauerstoff nicht länger als finaler Elektronenakzeptor anbinden und die Zellatmung, also die aerobe ATP Synthese, kommt rasch zum Erliegen (Shifrin *et al.* 1996). Bemerkenswert ist das im Vergleich zu anderen Giftstoffen enge Verhältnis zwischen letaler und nichttoxischer Wirkung des Cyanids. Die für den Menschen tödliche Dosis liegt zwischen 0,5 und 4 mg kg^{-1} Körpergewicht. Die „no-effect“ Dosis wurde von der U.S. Environmental Protection Agency bei 0,06 mg/kg Körpergewicht angesiedelt (USEPA 1992). Die verschiedenen aquatischen Organismen zeigen in ihrer Empfindlichkeit gegenüber freiem CN eine breite Variation. Besonders hervorzuheben ist die hohe CN Empfindlichkeit von Fischen, für die CN bereits im ppb Bereich tödlich ist (vgl. Tab. 1.3). Bereits im Bereich von 5–7 $\mu\text{g L}^{-1}$ wirkt CN auf Reproduktion and Mobilität und letal ab 20–70 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Eisler 2000, 1991). Allein bei dem Dammbruch der Goldmine Aurul bei Baia Mare, Rumänien im Jahr 2000 wurden 200 t Fisch getötet (vgl. Tab. 1.1), was eine direkte Gefährdung des europäischen Otters *Lutra lutra* und des Seeadlers *Haliaeetus albicilla* nach sich

zog. Die ermittelten CN Konzentrationen in Fischen, die von einer Cyanid-Welle erfasst worden sind, liegen zwischen 10 und 100 $\mu\text{g CN kg}^{-1}$ Frischgewicht (Wiley 1984).

Die Toxizität der übrigen Cyanidspezies hängt von ihrem Potential ab, freies Cyanid freizusetzen und damit auch in von den chemischen Rahmenbedingungen pH, Temperatur und Redoxpotential. Beispielsweise setzen die thermodynamisch stabilen Hexacyanoferrate freies Cyanid erst bei einem $\text{pH} \leq 2$ frei und zeigen bei einer oralen Dosis von 2 g d^{-1} noch keine toxische Wirkung auf den Menschen (Shifrin *et al.* 1996.; Nielsen *et al.* 1990). Setzt man Cyanoferraten aber UV Bestrahlung aus, wie beispielsweise durch direkte Sonneneinstrahlung in klaren Oberflächengewässern, kommt es zu einer photolytischen Freisetzung von HCN, was die Toxizität massiv ansteigen lässt (Kuhn und Young 2005; Johnson *et al.* 2002; Novakowska *et al.* 1999; Meeussen *et al.* 1992; vgl. Abb.1.1). Dieses Beispiel soll unterstreichen, wie wichtig bei der Standorteinschätzung die Untersuchung der Cyanid-Formen einerseits und die physikochemischen Parameter andererseits sind.

Demgegenüber ist Kupfer ein essentielles Spurenelement. Ein erwachsener Mensch benötigt täglich ca. $0,03 \text{ mg kg}^{-1}$, Kinder bis zu $0,08 \text{ mg kg}^{-1}$ (Pschyrembel 2004). Bei einem Kupfergehalt im Trinkwasser von ca. $2,2\text{--}3,5 \text{ mg L}^{-1}$ wurden 1987 bei Säuglingen und Kleinkindern erstmals in Deutschland tödlich verlaufende Leberzirrhosen festgestellt. Das entspricht Erfahrungen aus Indien, wo bewiesen wurde, dass Kupfer die Erkrankung Indian Childhood Cirrhosis auslöst. Kupfer bindet an proteinassoziierte SH-Gruppen und oxidiert Membranlipide, was zur Bildung von freien Radikalen führt, die die DNA und Zellmembranen schädigen. Beim Menschen ist dies der Fall bei der Lebererkrankung Morbus Wilson (Otto 1993). Kupfer wirkt stark toxisch auf Pflanzen und Fische. Gelöste Kupfersalze sind ab $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ stark gewässerschädigend, wodurch insbesondere Bakterien, Algen, Krebse und Fische gefährdet sind (Lewandowski *et al.* 1997). Nach Delas (1967) werden in sandigen Böden, bei einem $\text{pH} < 6$, ab $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ toxische Symptome sichtbar, was insbesondere im Weinanbau von Bedeutung ist, wo Kupfer als Fungizid verwendet wird. Trotz der großen Umweltrelevanz von Kupfer existiert bisher noch kein Grenzwert für Trinkwasser, sondern nur ein den WHO-Empfehlungen angepasster Richtwert. Gemäß dem Konzentrations- / Spezies-Verhältnis wurde der offizielle Richtwert auf 3 mg L^{-1} festgelegt (TVO 1990). Gemäß der aktuellen Trinkwasserverordnung, wurde dieser auf einen Grenzwert von 2 mg Cu L^{-1} (bei einem pH-Wert $< 7,4$) im Versorgungsbereich (z. B. Hausinstallationen) herab gesetzt (TVO 2003). Für Böden gilt ein Grenzwert von 100 mg kg^{-1} (Klärschlammverordnung 1989).

Tabelle 1.3: Cyanid-Toxizität ausgesuchter aquatischer Organismen

<i>Art</i>	<i>Cyanid</i> $\mu\text{g L}^{-1}$	<i>Effekt</i>	<i>Referenz</i>
Algen und Pflanzen			
<i>Scenedesmus obliquus</i>	$4 \cdot 10^5$	kein Effekt (48 h)	Gurbuz <i>et al.</i> 2004
<i>Eichhornia crassipes</i>	$3 \cdot 10^5$	kein Effekt (72 h)	Low und Lee 1981
<i>Chlorella sp.</i>	$1 \cdot 10^5$	Wachstumsreduktion (48 h)	Gurbuz <i>et al.</i> 2004
<i>Arthrospira maxima</i>	$5 \cdot 10^4$	Zell-Lysis (25 h)	Gurbuz <i>et al.</i> 2004
<i>Chlorella sp.</i>	7.300	Photosynthesehemmung	EPA 1973
<i>Prototheca zopfii</i>	3000	Inhibierung der Respiration	EPA 1980
<i>Microcystis aeruginosa</i>	7.900	90% tot	EPA 1980
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	160	toxisch	Towill <i>et al.</i> 1978
Invertebraten			
<i>Daphnia magna</i>	160	LC ₅₀ (96 h)	Leduc <i>et al.</i> 1982
<i>Daphnia pulex</i>	83	LC ₅₀ (96 h)	EPA 1980
<i>Acartia clausi</i>	30	LC ₅₀ (90 h)	EPA 1980
<i>Mytilus edulis</i>	18	Wachstumsreduktion (14 d)	Thompson 1984
<i>Gammarus pulex</i>	3	LC ₅₀ (15 h)	Abel und Garner
	75	LC ₅₀ (3 h)	1986
<i>Asellus communis</i>	1,8	LC ₅₀ (11 d)	Smith <i>et al.</i> 1978
Fische			
<i>Salmo trutta</i>	90	LC ₅₀ (96 h), 18 °C	Leduc <i>et al.</i> 1982
<i>Salmo salar</i>	24	LC ₅₀ (24 h), bei 3,5 mg O ₂ L ⁻¹	Alabaster <i>et al.</i>
	73	LC ₅₀ (24 h), bei 10 mg O ₂ L ⁻¹	1983
<i>Lepomis macrochirus</i>	50	Keine Reproduktion	Smith <i>et al.</i> 1978
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	28	LC ₅₀ (96 h), 6 °C	Leduc <i>et al.</i> 1982,
	68	LC ₅₀ (96 h), 18 °C	Leduc 1984, Kovac und Leduc 1982
<i>Salvelinus fontinalis</i>	5	50%ige Schwimm-Reduktion (29 d)	Leduc 1984

Die Umweltchemie der verschiedenen Cyanide stellt sich äußerst komplex dar (Abb. 1.1) Die chemische Form der verschiedenen Cyanidspezies hängt von ihrer Quelle und den physiko-chemischen Verhältnissen in der Umgebung ab. In den Umwelt-Kompartimenten Oberflächen- und Grundwasser sowie Boden und Sediment sind die Prozesse Ausfällung / Lösung, Komplexbildung, Abbau, Sorption und Ausgasung von zentraler Bedeutung. Abbildung 1.1 zeigt exemplarisch einen Ausschnitt zentraler Reaktionsmöglichkeiten der wichtigsten Cyanide, die vor dem Hintergrund einer ökotoxikologischen und ökochemischen Risikoabschätzung von Goldbergbaustandorten bedeutsam sind.

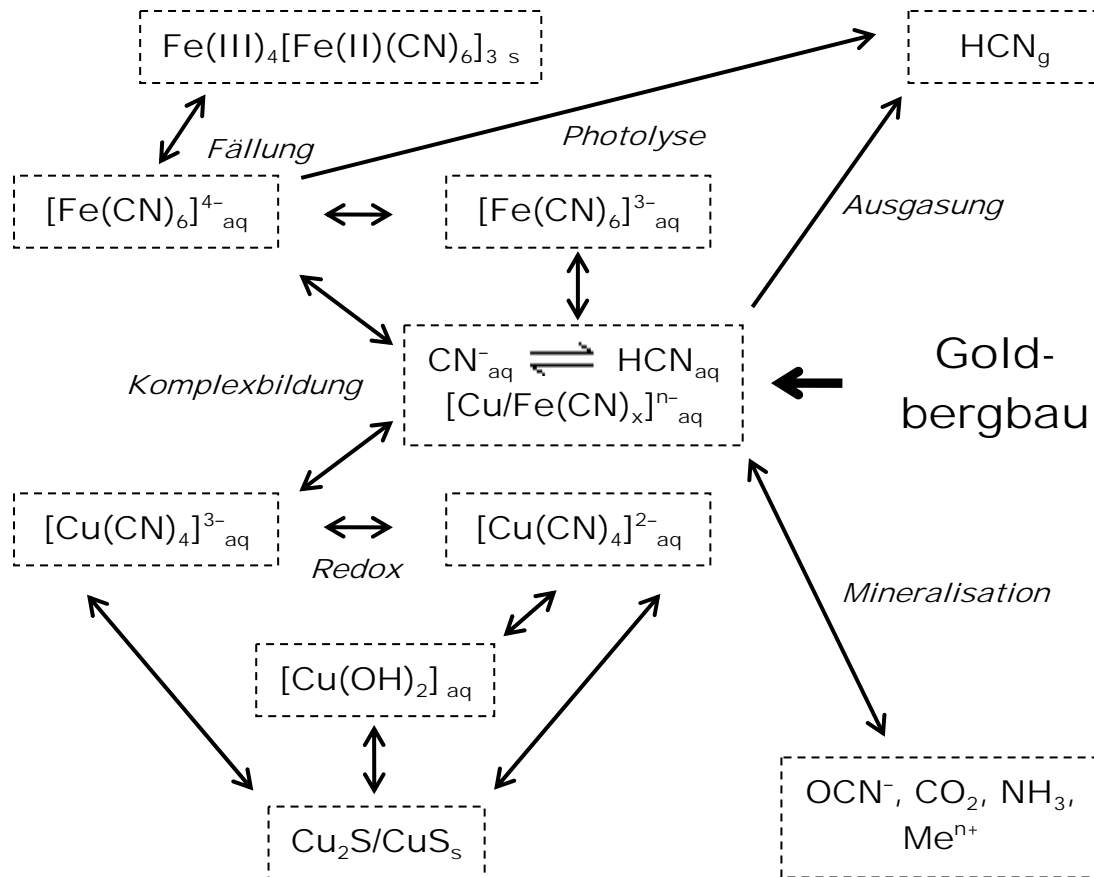


Abbildung 1.1: Umweltverhalten verschiedener Cyanide verändert nach Kjeldsen 1999

Das Vorkommen der einfachsten Cyanid-Form, das volatile HCN, welches für die extreme Toxizität verantwortlich ist, hängt zunächst von dem pH ab. Blausäure hat einen pKs von 9,3 und ist demnach eine sehr schwache Säure. Freie Cyanid-Ionen reagieren also als Lewis-Base. Demnach liegt freies CN bei der Einleitung der alkalischen Bergbau-Abwässer (pH 10–11) überwiegend als dissoziiertes Anion und nur zu 20–2% als HCN vor. Im aquatischen und physiologischen Milieu kehrt sich das Verhältnis allerdings schnell um. Im neutralen pH-Bereich liegt es vollständig als HCN vor (Abb. 1.2). Hydrogencyanid ist volatil und vollständig wasserlöslich. Die Henrykonstante beträgt $1,7 \cdot 10^{-3} \text{ mg HCN L}^{-1} \text{ Luft}$ und der Dampfdruck beträgt 84000 Pa bei 20 °C (Gmelius 1977). Damit ist bei allen umweltrelevanten pH Werten die atmosphärische Ausgasung immer ein entscheidender Verlustprozess. Auch aus der Bodenlösung reichert sich HCN an, welches durch die Poren in die Atmosphäre diffundiert. Im aquatischen Milieu können Algen allerdings bei starker Sonneneinstrahlung durch photosynthetische H_2CO_3 Assimilation den pH Wert des Wassers auf bis zu 11 ansteigen lassen. In diesem Bereich liegt dann tatsächlich zu 99% das CN^- Anion vor und selbst bei hohen Wassertemperaturen von über 30 °C ist die HCN Ausgasung kein relevanter Verlustprozess.

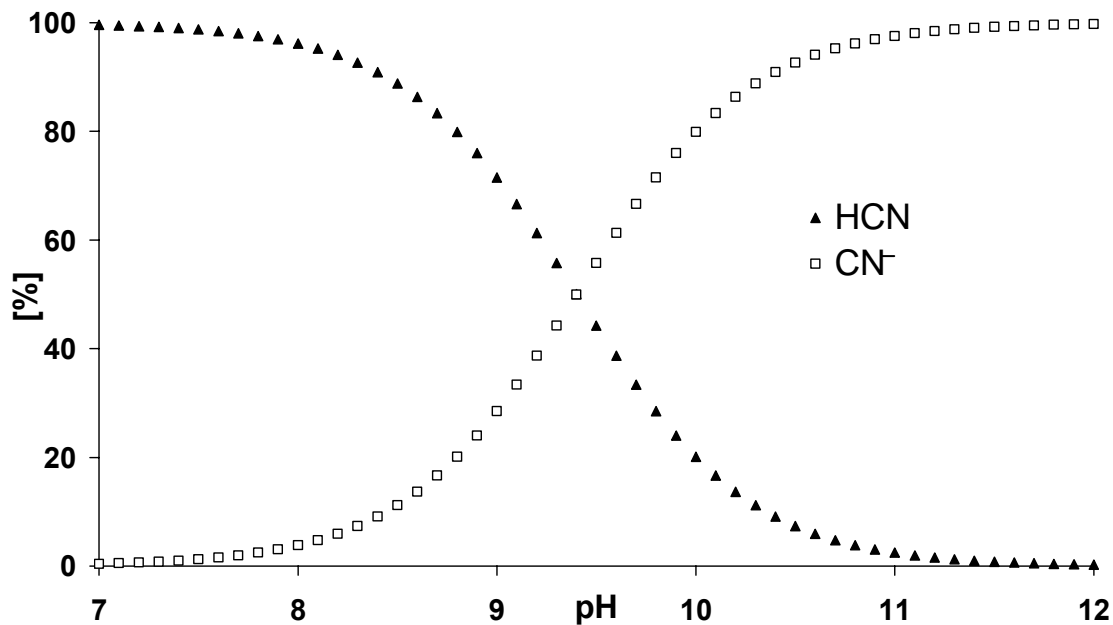


Abbildung 1.2: HCN Dissoziation als Funktion des pH

Die charakteristische chemische Eigenschaft des Cyanids ist die äußerst stark ausgeprägte Tendenz zur Komplexbildung. Cyanid bildet π -Komplexe, deren Stabilität auf mesomeren Ladungsausgleich durch back donation der beteiligten π -Elektronen beruht. Die Cyano-komplexe sind stabiler als die isoelektronischen Carbonylkomplexe oder Chelatkomplexe mit beispielsweise EDTA (vgl. Tab. 1.4). Nur das Trifluorphosphan kann durch spezifische d-Orbitalerweiterung noch stabilere π -Metallkomplexe bilden. Dementsprechend finden sich in den Goldbergbauabwässern ausschließlich Cyanokomplexe und keine freiverfügbaren Schwermetalle. Durch hohe pH Werte (>10) würden die Schwermetalle in freier Form zudem ausgefällt werden (Kjeldsen 1998). Tabelle 1.4 gibt einen Überblick der Stabilität umweltrelevanter Cyanokomplexe. Von entscheidender Bedeutung in Sedimenten und Böden sind die äußerst stabilen Cyanoferrate. Durch Komplexbildung mit dem Eisen des Bodens wird, wie eingangs erwähnt, die Toxizität freien Cyanids enorm gesenkt. Demgegenüber wird das Cyanid aber auch auf diese Weise „konserviert“. Während freies CN als nicht persistent gilt, sind die Cyanoferrate stabil und zerfallen nur sehr langsam. Die Halbwertszeit dieser Komplexe ist abhängig von pH, Redoxpotential und Temperatur (Meeussen *et al.* 1992; Lagas *et al.* 1981). In den chemischen Verhältnissen der oberen Bodenhorizonten als auch in Gewässersedimenten (aerob / anaerob, $\text{pH} > 6$) liegt die Halbwertszeit zwischen 100 und 1000 Jahren (vgl. Abb. 1.3).

Tabelle 1.4: Stabilitätskonstanten umweltrelevanter Cyano- und entsprechender äquimolarer EDTA Komplexionen

(Clysters und Adams 1976)

Cyanokomplex	$\log K_{CN}$	$\log K_{EDTA}$
$[Zn(CN)_4]^{2-}$	17	16
$[Ni(CN)_4]^{2-}$	41	14
$[Cu(CN)_4]^{2-}$	25	19
$[Cd(CN)_4]^{2-}$	18	16
$[Fe(CN)_6]^{4-}$	24	14
$[Fe(CN)_6]^{3-}$	31	25
$[Co(CN)_6]^{3-}$	64	36

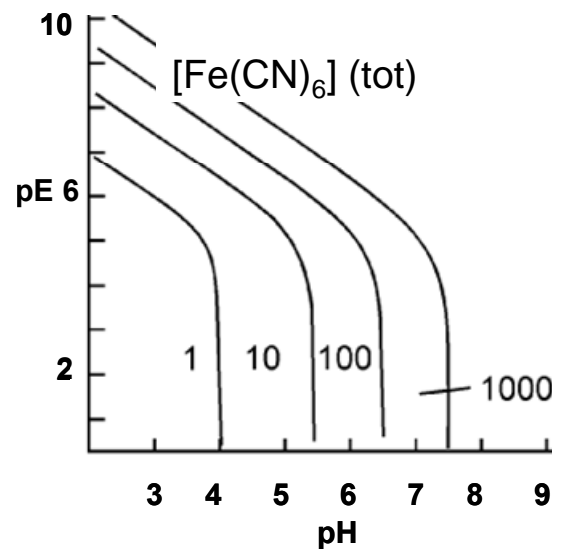
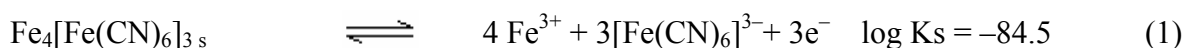


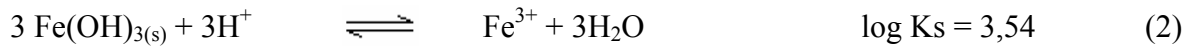
Abbildung 1.3: Berechnete Halbwertszeit der Cyanoferrat-Dekomposition als Funktion von pH und pE in Jahren bei 15 °C (verändert nach Meussen *et al.* 1992)

Nach diesen Daten ist nicht mit der Freisetzung freien Cyanids aus Metallkomplexen im Grundwasser zu rechnen. Wie aber schon angesprochen, muss unbedingt beachtet werden, dass auch die Cyanoferrate unter UV Einstrahlung HCN freisetzen (Kuhn und Young 2005; Johnson *et al.* 2002; Novakowska *et al.* 1999; Meeussen *et al.* 1992). Dementsprechend wurden die Daten aus Abbildung 3 unter Lichtausschluss gewonnen. Zudem geht unter reduzierenden und sauren Bedingungen (pH 4) Hexacyanoferrat III in das weniger stabile Hexacyanoferrat II über, welches sich bei niedrigen pH Werten zersetzt (Meeussen *et al.* 1994). Somit können die Cyanoferrate schon allein aus den erwähnten Überlegungen als latent umweltgefährdend eingestuft werden.

Aus Abbildung 1.1 geht hervor, dass eine wichtige Senke der Cyanoferrate (in erster Linie in Böden) die Ausfällung als Berlinerblau $Fe(III)_4[Fe(II)(CN)_6]_3$ ist. Damit hängt die Mobilität von Cyaniden entscheidend von der Konzentration an verfügbaren Eisen ab. Die Löslichkeit des Pigments ist stark pH und pE abhängig ($pE = 16,59 E_h$). Berlinerblau löst sich nach der folgenden Gleichung unter Oxidation des Fe(II):



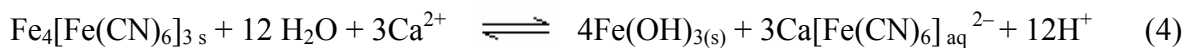
In den oberen Bodenhorizonten liegt Eisen vornehmlich oxidisch bzw. hydroxidisch vor. Letzteres löst sich nach der folgenden Gleichung:



Demnach erniedrigt sich die Fe(III) Aktivität bei steigendem pH. Dies hat zur Folge, dass nach Gleichung (1) unter alkalischen Bedingungen verstärkt Hexacyanoferrat (III) in Lösung geht (Rennert und Mansfeldt 2006; Kjeldsen 1999; Gosh *et al.* 1999). Unter oxischen oder schwach reduzierenden Bedingungen ($\text{pH} + \text{pE} = 11\text{--}18$) wird die Dissoziation des Berlinerblaus von folgender Reaktion bestimmt (Meeussen *et al.* 1994):



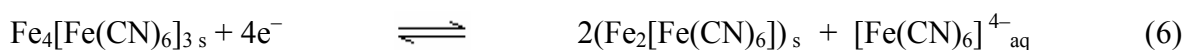
Unter reduzierenden Bedingungen bei einem $\text{pE} < 7$ kann es aber auch zu einer Freisetzung des Ferrocyanids mit Eisen in der Oxidationsstufe II kommen (Meeussen *et al.* 1994):



Bei geringem pE, ist die Löslichkeit der Eisenhydroxide hoch, da das Eisen (III) reduziert wird. Als Konsequenz daraus ist die Lösung Berlinerblaus unter diesen speziellen Bedingungen pH unabhängig, was aus Gleichung (5) hervorgeht (Meeussen *et al.* 1994):



Diese Überlegungen wurden auch experimentell durch Säulenversuche mit kontaminierten Kokerei-Böden bestätigt (Hommelgaard und Munch 1997; Meeussen *et al.* 1990). Dementsprechend fanden Meussen *et al.* (1994) in Grundwasserproben CN-kontaminierter Standorte deutlich höhere Cyanid-Konzentrationen aus Böden mit höherem pH. Unter anoxischen Bedingungen ($\text{pE} -5$ bis $+5$) bei neutralem pH findet sich in Wasserproben wenig gelöstes Cyanid, da es im Sediment als Berlinerblau immobilisiert wird (Gosh *et al.* 2004; 1999). Eine Besonderheit ist das Auftreten von Berlinerweiß, das sich unter reduzierenden Bedingungen in kontaminierten Böden und Sedimenten bilden kann (Jahn *et al.* 2006; Christensen *et al.* 2000):



Sowohl Fällung des Berlinerblaus als auch Rücklösung verlaufen in Böden meist langsam, was Meeussen *et al.* (1994) in Mobilisierungsversuchen nachweisen konnte. Die Erklärung für diesen Befund liegt wahrscheinlich darin, dass die Prozesse stark diffusionsabhängig sind. Das bedeutet, dass es zu einem Austausch durch Diffusion zwischen dem Eisenerz und der umgebenden wässrigen Lösung kommt (Kjeldsen 1999).

Aus den bisherigen Erkenntnissen kann festgehalten werden, dass die Lösung von Berlinerblau in Böden von der Pufferkapazität des Bodens, den hydraulischen Eigenschaften, dem tatsächlichen Wassertransport und von der Alkalität sowie dem Redoxpotential der Bodenlösung abhängt (Meeussen *et al.* 1995).

Ein weiterer Aspekt, der die Bioverfügbarkeit sowohl der Cyanokomplexe als auch des freien Cyanids beeinflussen kann, ist die Sorption an die organische und anorganische Matrix. Diese ist allerdings durch die negative Ladung der Komplexe oder der Ladungsneutralität des HCN stark limitiert. Zhang und Hendrix (1991) sowie Alesii und Fuller (1976) konnten dies in Säulenversuchen bestätigen. Allerdings kann die Sorption an Eisen- oder Aluminiumoxide der Tonmineralien unter sauren Bedingungen zunehmen (Bushey und Dzombak 2004; Rennert und Mansfeldt 2001). Eine Besonderheit in diesem Zusammenhang ist das unterschiedliche Sorptionsverhalten der beiden Cyanoferrate in den Oxidationsstufen III und II. Generell zeigt die reduzierte Form, das Ferrocyanid, eine höhere Sorption an Bodenbestandteile als das Ferricyanid (Rennert und Mansfeldt 2002b). Die dominante Form in Böden ist allerdings nach Gleichung (2) das Ferricyanid. Nichtsdestotrotz ist die Löslichkeit der Cyanoferrate bei geringem pH durch die Bildung des Berlinerblaus begrenzt. Allerdings wird das Langzeitverhalten der Komplexe aber durch kontinuierliche Desorption bestimmt (Rennert und Mansfeldt 2002). In einer erst kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass *G. metallireducens* und *S. alga* unter anaeroben Bedingungen Berlinerblau als Elektronenakzeptor nutzen (Jahn *et al.* 2006). Die Bakterien nehmen damit Einfluss auf Löslichkeit und Sorption.

Freies Cyanid gilt unter aeroben Bedingungen als mikrobiell leicht mineralisierbar. Die Mikroorganismen nutzen meist beide Produkte dieser enzymatischen Reaktion, Ammonium und Kohlenstoffdioxid, als N- bzw. C-Quelle. Tabelle 1.5 zeigt, dass einige dieser Reaktionen durch extrazelluläre Enzyme katalysiert werden. CN – Monooxygenasen bilden Cyanat (OCN^-), welches dann durch Cyanasen vollständig mineralisiert wird (Guilloton *et al.* 2002). Ein zweiter oxidativer Abbauweg mineralisiert Cyanid direkt via Dioxygenasen. Kunz *et al.* (2001) schlugen für diese Reaktion Pterin als Cofaktor vor. Insbesondere Pseudomonaden scheinen Blausäure auf diese Weise besonders leicht als Substrat nutzen zu können (vgl. Tab. 1.6)

Tabelle 1.5: Auswahl bedeutender enzymkatalysierter CN–Abbaureaktionen unter aeroben Bedingungen

<i>Produkt</i>	<i>Enzym</i>	<i>Referenz</i>
NH ₃ , CO ₂	Monooxygenasen, Cyanasen	Guilloton <i>et al.</i> 2002
NH ₃ , CO ₂	CN–Hydratase / Dioxygenase	Ware und Painter 1955 Figuera <i>et al.</i> 1996
HCOOH, NH ₃ , CO ₂	CN–Hydratase	Knowles 1976 Dumestre <i>et al.</i> 1997
SCN [–] , SO ₃ ^{2–}	Rhodanase	Ecke <i>et al.</i> 1993

Gegenüber freiem Cyanid sind die Cyanokomplexe resistenter gegen mikrobiologischen Abbau (Ebbs 2004). Babu *et al.* (1996) fanden einen um den Faktor 10 verlangsamten Abbau der Cyanoferrate im Vergleich zu freiem Cyanid. Neben den bekannten CN abbauenden *Pseudomonas* und *Fusarium* Stämmen, zeigte sich auch *Klebsiella* als geeignet für den Abbau der Cyanokomplexe (Kang und Kim 1993; vgl. Tab. 1.6). Allerdings werden die Studien mit dem metallkomplexierten Cyanid durch die erwähnte photolytische Freisetzung von Cyanid erschwert, da eine Differenzierung zwischen freigesetztem Cyanid und gebundenem Cyanid oftmals unter Umständen nicht vollständig erreicht wurde (Ebbs 2004; Cherryholmes 1985). Aktuellere Untersuchungen belegen zudem auch die chemische zeit-, pH- und konzentrationsunabhängige Oxidation des Ferrocyanids durch Manganerze (Rennert *et al.* 2005).

Entgegengesetzt dem aeroben Cyanid Abbau war der anaerobe Cyanidabbau bisher nur selten Gegenstand von Untersuchungen. Ein Vorteil bei der Nutzung des anaeroben Cyanid–Abbaus in Bioreaktoren, ist die Förderung von Methanogenen und die damit mögliche Biogasnutzung (Kjeldsen 1999). Die meisten Studien zeigten zunächst eine Unterdrückung der Methanproduktion, die nach einer Anpassungsphase dann wieder aufgenommen wurde (Fallon *et al.* 1990). In Batch- und Chemostat-Experimenten konnten CN-Initialkonzentrationen bis zu 300 mg L^{–1} abgebaut werden (Noel *et al.* 1991).

Tabelle 1.6: Auswahl Cyanid abbauender Mikroorganismen

<i>Spezies</i>	<i>Substrat</i>	<i>isoliert aus</i>	<i>Referenz</i>
<i>Pseudomonas putida</i>	HCN, SCN^- , OCN^- Ferri/Ferrocyanid	k.A.	Grigorjeva <i>et al.</i> 2001 Babu <i>et al.</i> 1996
<i>Pseudomonas putida</i>	$[\text{Ni(II)(CN)}_4]^{2-}$, CN^-	Boden	Silva–Avalos <i>et al.</i> 1990
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	HCN/ SCN^-	k.A.	Grigorjeva <i>et al.</i> 2001
<i>Pseudomonas spec.</i>	HCN	Klärschlamm	Kang und Kim 1993
<i>Cryptococcus humicola</i>	Tetracyanonickelat(II)	Kokerei Abwasser	Kwon <i>et al.</i> 2002
<i>Klebsiella spec.</i>	Tetracyanonickelat(II), HCN	Klärschlamm, Boden	Kang und Kim 1993 Silva–Avalos <i>et al.</i> 1990
<i>Geobacter metallireducens</i>	$\text{Fe(III)}_4[\text{Fe(II)(CN)}_6]_3$	k.A.	Jahn <i>et al.</i> 2006
<i>Shewanella alga</i>			
<i>Bacillus megaterium</i>	HCN	Boden	Castric und Strobel 1969
<i>Fusarium oxysporum</i>	Tetracyanonickelat(II)	Gaswerk Boden	Barclay <i>et al.</i> 1998a
<i>Fusarium solani</i>	Ferrocyanid		Barclay <i>et al.</i> 1998b
<i>Serratia spec.</i>	HCN	Klärschlamm	Kang und Kim 1993
<i>Escherichia coli</i>	HCN, $[\text{Cu(CN)}_n]^{(n-2)-}$ $[\text{Zn(CN)}_n]^{(n-2)-}$	Goldminenabwasser	Nauter <i>et al.</i> 1998
<i>Moraxella spec.</i>	HCN	Klärschlamm	Kang und Kim 1993

1.1.3 Cyanidstoffwechsel in höheren Pflanzen

Im Gegensatz zu Tieren besitzen Pflanzen, neben dem Cytochromkomplex der Atmungskette, eine alternative Oxidase (AOX), die nicht durch Cyanid blockiert wird (Albury *et al.* 1998; Vanlerberghe und McIntosh 1997). Diese nutzt den Ubichinol-Pool als Reduktionsmittel und umgeht damit die Komplexe III und IV, in denen durch Protonentransfer Energie konserviert wird. Die damit entstehende überschüssige Energie wird als Wärme freigesetzt. Als Funktionen der AOX werden zwei Vorschläge diskutiert: Einerseits kommt ein Mechanismus zur Reduzierung von Energieüberschüssen und somit die verminderte Bildung von reaktiven Sauerstoff in Frage (Møller 2001). Andererseits könnte sie auch dazu dienen, bei einer den ATP-Bedarf übersteigenden Respirationsrate die Energiegewinnung zu verringern (Simons und Lambers 1999; Vanlerberghe und McIntosh 1997). Demgegenüber ist die einzige gesicherte physiologische Funktion der AOX die Bildung von Wärme bei Vertretern der *Araceae*, um durch die geförderte Verdunstung von verschiedenen Aminen und Indolen Insekten anzulocken (Skubatz *et al.* 1993; Meeuse 1975). Neben der AOX als Möglichkeit einer Cyanid-Vergiftung „auszuweichen“, besitzen Pflanzen auch noch einen effektiven Weg, um Blausäure zu entgiften, das durch den eigenen Stoffwechsel synthetisiert wurde. In höheren Pflanzen wird freies Cyanid als Nebenprodukt der Ethylen-Synthese gebildet (Peiser *et al.* 1984; Abb. 1.4). Ferner wird es in einigen Arten gezielt als Fraßschutzkomponente in Form von cyanogenen Glykosiden gebildet (Vetter 2000).

Das Ethylen entsteht durch die Oxidation von 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC), welches aus Methionin über S-Adenosyl-methionin gebildet wird. Als Nebenprodukt entsteht Cyanoameisensäure, die zu Kohlenstoffdioxid und Cyanid hydrolysiert (Peiser *et al.* 1984; Yang und Hoffmann 1984; Abb. 1.4). Diese Blausäure muss durch den pflanzlichen Metabolismus effektiv abgebaut werden, um letale Konzentrationen zu vermeiden.

Das Phytohormon Ethylen findet sich in allen höheren Pflanzen. Es ist in die Steuerung einer Vielzahl von Entwicklungsprozessen, wie Keimung, Wachstum, Appikaldominanz, Blütenbildung, Laubfall, der Seneszenz von Blüten und während der Fruchtreife eingebunden. Außerdem wird die Ethylenbiosynthese durch Kälte, Trockenheit, Verletzung, Wasserstau im Wurzelraum und hormonell durch Indol-3-essigsäure induziert (Manning 1988; Yang und Hoffmann 1984).

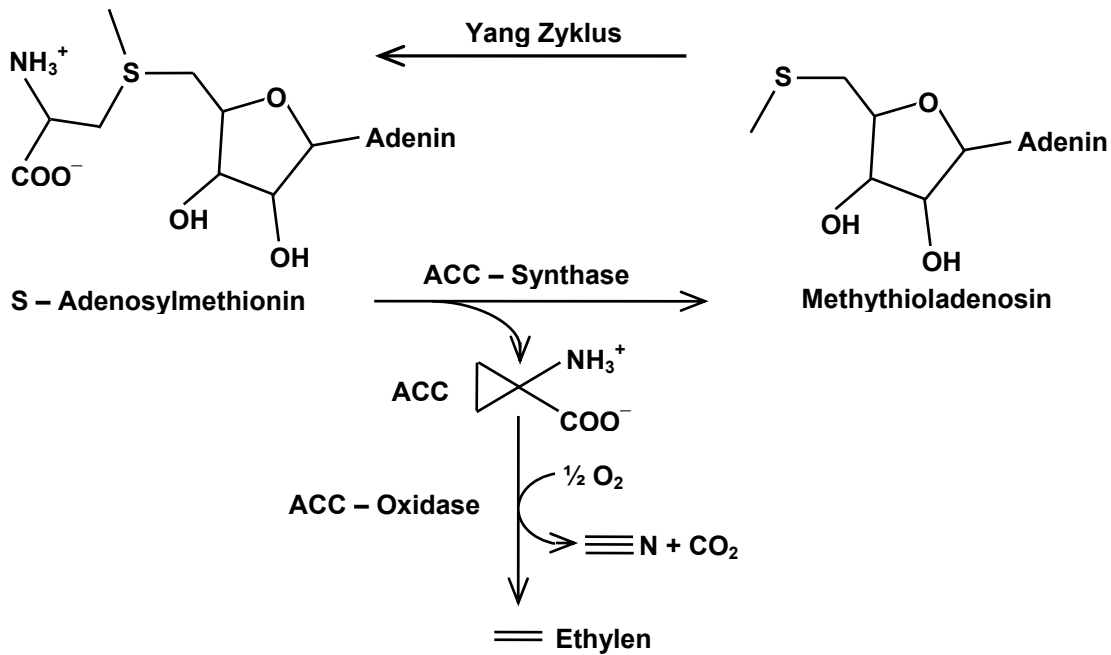


Abbildung 1.4: Ethylensynthese in höheren Pflanzen (verändert nach Volmer 2005; Mannig 1988; Yang und Hoffmann 1984)

Yip und Yang (1998) quantifizierten Ethylen in Apfelstücken. Sie ermittelten eine Ethylenproduktion von $2\text{--}8 \text{ nmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Dennoch betrug die maximale Cyanid-Konzentration nur $0,2 \text{ nmol g}^{-1}$. Das Cyanid musste also biochemisch abgebaut werden. Nach Applikation von ACC (vgl. Abb. 1.4) blieb die Cyanidkonzentration konstant, obwohl die Ethylenkonzentration anstieg. Bei Hemmung der β -Cyanoalanin-Synthase und synchroner Erhaltung der Ethylensynthese stieg die Konzentration an freiem Cyanid im Gewebe stark an. Mit diesem Experiment wurde deutlich, dass Pflanzen mit der β -Cyanoalanin-Synthase (CAS) über einen effektiven Cyanid-Abwehrmechanismus verfügen, um die Energiegewinnung aufrechtzuerhalten. Die Funktion der β -Cyanoalanin-Synthase wurde allerdings schon in den 60er Jahren näher beschrieben. Es katalysiert die Substitution der Thiolgruppe am Cystein mit HCN zu β -Cyanoalanin und Schwefelwasserstoff (Abb. 1.5; Blumenthal *et al.* 1968; Floss *et al.* 1965). Manning (1988) konnte einen semiquantitativen Zusammenhang zwischen Ethylenproduktion und Cystein-Synthase-(CS)-Aktivität in *Petunia* nachweisen. CAS gehört zur Enzymfamilie der O-Acetylserin(thiol)lyasen (Hatzfeld *et al.* 2000), deren Vertreter meist auch Cystein-Synthase-(CS)-Aktivität besitzen. Sie setzen demnach auch O-Acetylserin und Schwefelwasserstoff zu Cystein und Acetat um. Da sowohl die Michaelis-Menten Konstanten, als auch das Verhältnis von CS/CAS-Aktivitäten dieser Enzyme deutliche Unterschiede aufweisen, können sie in Cystein-Synthasen und β -Cyanoalanin-Synthasen unterteilt werden (Maruyama *et al.* 2001; Hatzfeld *et al.* 2000; Warrilow und Hawkesford 2000).

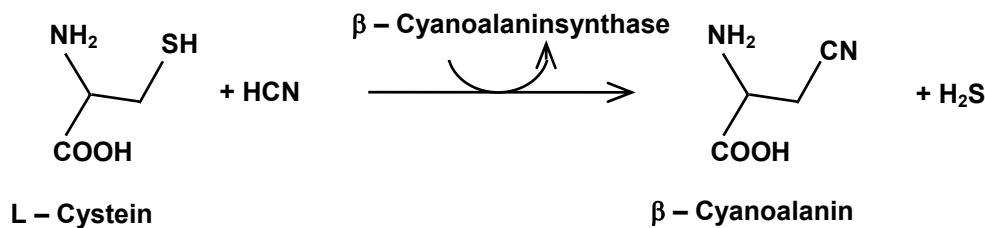


Abbildung 1.5: Bildung von β-Cyanoalanin in Pflanzen (verändert nach Volmer 2005; Man-
nig 1988)

Die CAS spezifischen Enzyme befinden sich in den Mitochondrien (Yamaguchi *et al.* 2000; Saito *et al.* 1994). Nach Hatzfeld *et al.* (2000) erfolgt eine effiziente CN–Detoxifikation ausschließlich durch die mitochondriale CAS, da diese eine hohe Affinität zum Cyanid aufweist ($K_M = 0,06 \text{ mM h}^{-1}$), wohingegen der CN–Abbau im Apoplasten oder an der Plasmamembran in allen Kompartimenten der Zelle durch Enzyme der gleichen Familie erfolgen kann.

Die anschließende Verstoffwechselung des β-Cyanoalanins wurde insbesondere an verschiedenen Arten der Gattungen *Lupinus* und *Vicia* erforscht. Aus einigen dieser Pflanzen konnte sowohl β-Cyanoalanin, als auch das abgeleitete Dipeptid γ-Glutamyl-β-cyanoalanin nachgewiesen werden (Ressler *et al.* 1969a; 1969b). In den meisten untersuchten Pflanzenspezies wurde β-Cyanoalanin außerdem anschließend zur Aminosäure Asparagin umgesetzt (Fowden und Bell 1965). Durch ^{14}C –Markierung konnte dies bereits 1963 von Blumenthal–Goldschmidt *et al.* gezeigt werden. Auch Ting und Zschoche (1970) konnten nach Applikation von ^{14}C –markiertem Cyanid in Baumwolle–Wurzeln das entsprechend ^{14}C –markierte Asparagin nachweisen. Das Intermediat β-Cyanoalanin war zu dieser Zeit noch nicht bekannt.

Das Enzym, welches β-Cyanoalanin umsetzt, wurde 1972 von Castric *et al.* als „β-Cyanoalanin Hydrolase“ beschrieben. Es konnte aus etiolierten Keimlingen von *Lupinus angustifolius* angereichert und charakterisiert werden. Das Molekulargewicht wurde durch Größenausschlusschromatographie bei 400–500 kDa angesiedelt. Das pH–Optimum lag bei 8,5 (mit einem K_M –Wert von $2,0 \text{ mM h}^{-1}$). Galoyan *et al.* (1982) konnten aus Keimlingen von *Lupinus albus* ebenfalls ein Enzym aufreinigen, das die Umsetzung von β-Cyanoalanin zu Asparagin katalysierte.

Piotrowski *et al.* (2001) fanden heraus, dass die Nitrilase NIT4 spezifisch β-Cyanoalanin umsetzt. In einer weiterführenden Studie wurde die Lokalisation der NIT4 als cytoplasmatisch beschrieben (Volmer 2005). Das Enzym fungiert sowohl als Nitrilase– als auch als Nitril–Hydratase, d.h. sie setzt β-Cyanoalanin zu Aspartat oder zu Asparagin um (Abb. 1.6).

Bei dieser Nitrilase aus *Arabidopsis thaliana* entstehen die Produkte in einem Verhältnis von 1,5:1, das allerdings bei NIT4-Homologen aus anderen Spezies variieren kann (Piotrowski *et al.* 2001). Neben der direkten Umsetzung des β -Cyanoalanins zu Aspartat besteht auch die Möglichkeit der Hydrolyse von Asparagin zu Aspartat. Diese Reaktion wird durch Asparaginasen katalysiert (Karlson 1988; Wriston 1985; Wriston und Yellin 1973). Die simultane Bildung von Amid, bzw. Säure aus einem Nitril wurde inzwischen auch für eine weitere Nitrilase aus *Arabidopsis* nachgewiesen (Osswald *et al.* 2002).

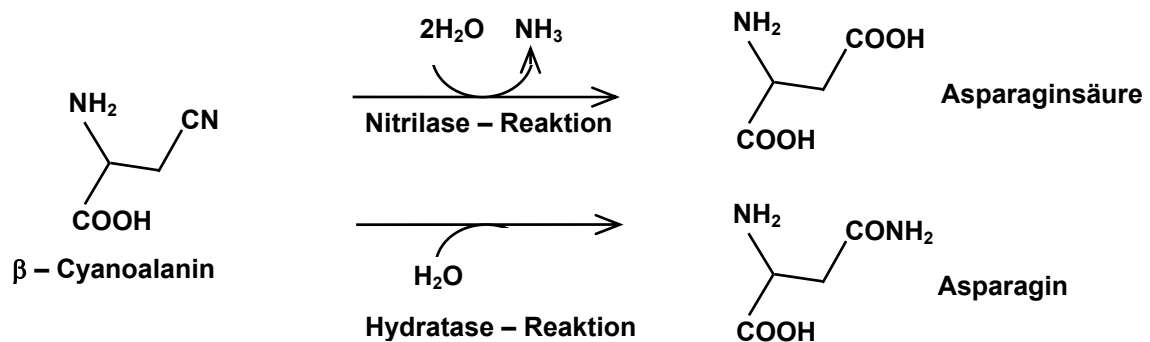


Abbildung 1.6: NIT4-katalysierte β -Cyanoalanin-Metabolisierung (verändert nach Volmer 2005)

1.1.4 *Eichhornia crassipes* und ihr ökotechnisches Potential

Die Wasserhyazinthe *Eichhornia crassipes* ist eine monokotyledone, freischwimmende Wasserpflanze aus der Familie der *Pontederiaceae*. Im seichten Uferbereich wurzeln die Pflanzen allerdings auch im Sediment. Ursprünglich war sie im Amazonasbecken Südamerikas beheimatet (Barrett und Forno 1982; Penfound und Earle 1948). Sie ist von dort durch den Menschen beginnend im 19. Jahrhundert in viele Länder mit tropischem und subtropischem Klima aller Kontinente eingeführt worden (Gopal 1987). Die Hauptursache für die erfolgreiche anthropogene Verbreitung der Wasserhyazinthe über den gesamten Erdball ist schlicht ihr attraktives Äußeres. Ihre azurblaue Blüte prädestiniert sie als Zierpflanze in Teichanlagen (Center *et al.* 1999). Wird die Wasserpflanze von Zierteichen in natürliche fließende oder stehende Gewässer eingeführt, offenbart sie allerdings rasch ihr volles invasives Potential. *E. crassipes* ist ein äußerst konkurrenzstarker Neophyt, der aquatische Systeme rasch besiedelt (Gopal 1981). Dabei vermehren sich die Wasserpflanzen vegetativ über Ausläufer. Die Mutterpflanzen bilden Stolone, an denen sich neue Tochterpflanzen bilden (Abb. 1.7). Die Verbindung der beiden Pflanzen ist dauerhaft, wenn die Pflanzen nicht mechanisch voneinander getrennt werden. Hierbei ist zu beachten, dass sowohl „Mutter–“, als auch „Tochterpflanzen“ gleichzeitig zahlreiche Ausläufer bilden. Auf diese Weise produziert *Eichhornia* ein

dichtes Netzwerk auf der Wasseroberfläche. Erst, wenn das Gewässer vollständig besiedelt ist, begünstigt intraspezifische Konkurrenz das Wachstum der einzelnen Pflanzen und somit eine geringere Besiedlungsdichte. Schließlich bedeckt *E. crassipes* die Wasseroberfläche lückenlos in mehreren Schichten bis zu 50 cm hoch (Center *et al.* 1999).

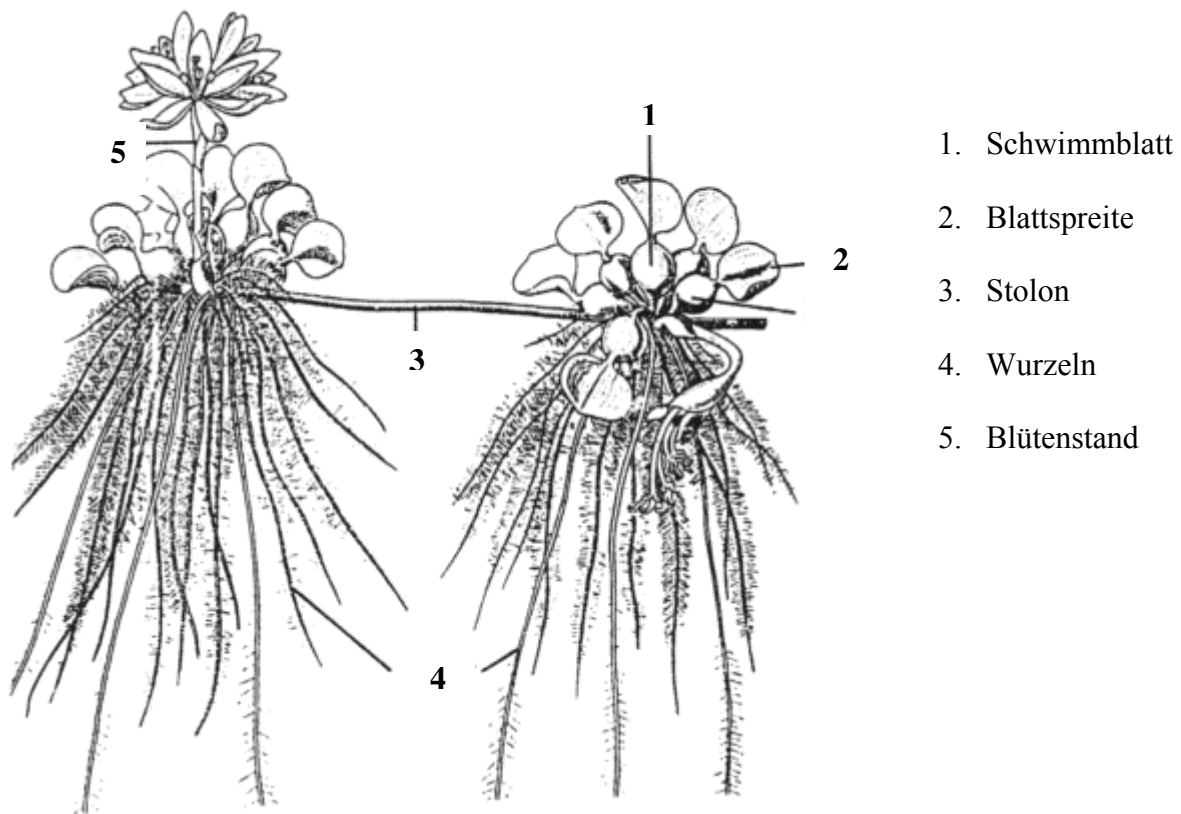


Abbildung 1.7: Vegetative Vermehrung *Eichhornias* über Stolone (verändert nach Gopal und Sharma, 1981)

Die Produktivität *Eichhornias* ist unter günstigen klimatischen Bedingungen gewaltig. Sie liegt im Bereich von 40–88 t Trockengewicht pro Jahr und Hektar (Giraldo *et al.* 2002; Reddy und Bagnall, 1981; Wolverton und McDonald 1979; Ryther *et al.* 1978; Yount und Crossman 1970). Die hohe Produktivität von *E. crassipes* verursacht zahlreiche Probleme, wenn keine natürlichen Fressfeinde vorhanden sind. *E. crassipes* verstopft Schifffahrtsrouten, verdrängt Fische und fördert die Schlickbildung durch Sauerstoffentzug und pH-Senkung durch CO₂ Abgabe über die Wurzeln (Petrucio und Esteves 2000; Julien *et al.* 1996; Schmitz *et al.* 1993). Die Pflanzen wurden häufig durch das Herbizid 2,4-D oder mechanisch bekämpft (Schardt und Schmitz 1991). Darüber hinaus hat sich auch die biologische Bekämpfung mit den natürlichen Fressfeinden *Neochetina Eichhorniae* und *N. bruchi* bewährt. Diese südamerikanischen *Curculionidae* fressen am Vegetationspol der Pflanzen, was ein schnelles Absterben zur Folge hat (Center *et al.* 1999, Center 1994).

Tabelle 1.7: Schadstoffreduktion mit *E. crassipes* im batch Versuchsaufbau

	<i>Initial– Konz. (mg L⁻¹)</i>	<i>Bedingun– gen*</i>	<i>pH</i>	<i>Inkubations– Zeit</i>	<i>Red.¹ [%]</i>	<i>Referenz</i>
Cu	7	4*	5–7	192 h	84	Soltan und Rashed
	65	1*	4	2 h	78	Low <i>et al.</i> 1994
	4	2*	5–7	8 d	80	Rai <i>et al.</i> 1993
	10	2*	6	2 d	80	Lee und Hardy 1987
	10	2*	–	–	96	Nor und Cheng 1986
Cd	5	4*	5–7	192 h	41	Soltan und Rashed
	0,8	3*	–	21 d	75	Maine <i>et al.</i> 2001
Pb	5	4*	5–7	192 h	43	Soltan und Rashed
Ni	5	4*	5–7	192 h	27	
	102	1*	4	2 h	17	Low <i>et al.</i> 1994
Co	5	4*	5–7	192 h	49	Soltan und Rashed
Cr	5	4*	5–7	192 h	21	2003
	6	1*	4	–	65	Low <i>et al.</i> 1994
As	0,4	3*	–	24 h	100	Misbahuddin und Fariduddin 2002
Ethion	1	2*	–	240 h	95	Xia und Ma 2006
Cyanid	3	3*	–	48 h	73	Granato 1993
Benzol	200	2*	–	2 d	100	Nor 1994
PO ₄	3	2*	–	24 h	99	Petrucio und Esteves 2000
NO ₃	4	2*	–	24 h	88	
NH ₄	5	2*	–	24 h	99	
P _{total}	15	5*	–	21 d	100	Jayaweera und
N _{total}	56	5*	–	21 d	100	Kasturiarachchi 2004

¹Angegeben ist die Schadstoffreduktion (Red.) in % der Ausgangskonzentration. *1 = 0,1 g Wurzelextrakt in 20 mL, 2 = 1–3 Pflanzen in 0,25–4 L, 3 = 0,1–0,6 kg Pflanzen in 7–10 L, 4 = 0,2 kg Pflanzen in 30 L, 5 = 30 Pflanzen/300 L

Infolge der bemerkenswerten Biomasseproduktion zeigt *E. crassipes* auch eine hohe Phosphat und Stickstoff Aufnahme rate. Jayaweera und Kasturiarachchi (2004) fanden in Semipilot-Studien mit 300 L Tanks eine 100%ige P und N (28 mg L⁻¹ N_{tot} und 7,7 mg L⁻¹ P_{tot}) Reduktion innerhalb von 15 Wochen. Entsprechende Ergebnisse erhielten auch Petrucio und Esteves (2000), Imaoka und Teranishi (1988) sowie Reddy und Tucker (1983) in verschie-

densten Versuchsaufbauten und Applikation unterschiedlicher P- und N-Quellen. Die Studien zeigten einvernehmlich eine direkte Korrelation zwischen Biomasseproduktion und Nährstoffkonzentration sowie Temperatur und Wachstumsdichte. Mit diesen Eigenschaften besitzen die Pflanzen die „Grundaustattung“ für den Einsatz als Nährstoffsенke in Abwasserteichen.

Zaranyika und Ndapwadza (1995) fanden in Freilandstudien für Wasserhyazinthenwurzeln vergleichsweise erhöhte Biokonzentrationsfaktoren für Cu(II), Ni(II) und Zn (II) ($2,5 \cdot 10^{-3}$; $1,6 \cdot 10^{-3}$; $6,1 \cdot 10^{-3}$) als in anderen biologischen Systemen. Soltan und Rashed (2003) führten umfangreiche Studien mit Schwermetallmischungen von Cd(II), Co(II), Cr(II), Cu(II), Mn(II), Ni(II), Zn(II) und Pb(II) in den Konzentrationen 1, 3, 5, 7, 10, 50 und 100 mg L⁻¹ durch (vgl. Tab. 1.7). Als Toxizitätsparameter notierten sie rein morphologische Symptome, wie Austrocknung der Blätter und Chlorosenbildung. Während bei einer Konzentration von 3 mg L⁻¹ noch keine Symptome sichtbar waren, zeigten sich bei 5 mg L⁻¹ nach 96 h die ersten Toxizitätserscheinungen und die Pflanzen waren nach 192 h abgestorben. Aus den gering konzentrierten Lösungen (1 und 3 mg L⁻¹) wurden die Metalle ähnlich effektiv absorbiert, ohne dass ein Trend zu erkennen gewesen wäre. Im höheren Konzentrationsbereich dagegen zeigte sich *E. crassipes* besonders wirkungsvoll in der Aufnahme der essentiellen Schwermetalle Cu, Zn und Mn. Besonders das Cu wurde generell sehr gut aufgenommen, was auch durch weitere Studien bestätigt wurde (vgl. Tab. 1.7). So *et al.* (2003) führten die erhöhte Toleranz und Aufnahmekapazität von Cu und Zn auf die mikrobiologische Aktivität an den Wurzeln *Eichhornias* zurück. Durch gezielte Behandlung mit dem Antibiotika Oxytetracyclin (OTC) und Inokulation bestimmter Cu-resistenter Bakterienstämme, isoliert aus der Rhizosphäre *Eichhornias*, konnte die Cu-Aufnahmekapazität verdoppelt werden. In einer kürzlich veröffentlichten Studie von Molisani *et al.* (2006) wurde der Quecksilber-Gehalt in Wasserhyazinthen in belasteten Fluss-Systemen Südbrasilien untersucht. Die Ergebnisse zeigten deutlich erhöhte Hg Konzentrationen in den Wurzeln. Sie ermittelten maximale Hg-Gehalte von ca. 300 ng g⁻¹ TS. Dagegen konnten Martinelli *et al.* (1988) um 1000 ng Hg g⁻¹ TS in Wasserhyazinthen in einer Region nachweisen, die massiv durch artisanalen Goldbergbau beeinträchtigt ist.

Alle bisherigen Studien zeigten, dass sich *E. crassipes* als effektiver Biofilter für Metallionen eignet. Somit haben sich die Wasserpflanzen in der alternativen Abwasserbehandlung etabliert (Trivedy 1998).

Weitgehend ungeklärt sind die Aufnahmemechanismen der verschiedenen Metalle in Abhängigkeit ihrer Spezifikation in wässriger Lösung. Eine Annahme geht davon aus, dass die Wur-

zeln *Eichhornias* als Kationentauscher fungieren, die durch Deprotonierung von Carboxylgruppen und Hydroxylgruppen die Metalle über Chelatkomplexe binden, die via Diffusion die Zellmembranen überwinden. Als direkten Hinweis hierauf wird die pH Senkung durch *Eichhornia* angesehen (Haider *et al.* 1983). Tatsächlich übersieht diese Theorie allerdings, dass die pH-Senkung durch *E. crassipes* nicht nur auf Deprotonierung von Carboxylfunktionen in den Wurzeln, sondern auch auf eine Ansäuerung durch CO₂, das über die Wurzelatmung der Pflanzen freigesetzt wird, zurückzuführen ist. Die hohe Atmungsaktivität *Eichhornias* wird auch an der extremen Sauerstoffzehrung im umgebenden Medium sichtbar (Sipaúba-Tavares *et al.* 2002; Trivedy und Pattanshetty 2002; Kaiser *et al.* 1987). Ding *et al.* (1994) untersuchten die Cd-Aufnahme bei unterschiedlichen Konzentrationen in Nährlösung und die Thiolkonzentration in den Pflanzen. Sie fanden eine vornehmliche Cd-Akkumulation in den Wurzeln und eine direkt proportionale Korrelation zwischen Cd-Aufnahme und Thiolgruppengehalt in *Eichhornia*. Kelley *et al.* (2000) konnten durch IR und NMR Spektroskopie nachweisen, dass Eu(III) in den Wurzeln der Wasserhyazinthen an Carbonsäuren gebunden vorliegt. Da die Arbeiten allerdings mit getrockneten und extrahierten Wurzelextrakten durchgeführt worden sind, lassen sie keinerlei Rückschlüsse auf das tatsächliche Vorliegen der Metallionen in vitalen Wurzelzellen zu. Ghabbour *et al.* (2004) extrahierten Huminsäuren aus Wasserhyazinthen und identifizierten diese durch Vergleich der entsprechenden NMR und IR Spektren mit bodenstämmigen Huminsäuren. Sie schlussfolgerten, dass die Huminsäuren in den Pflanzen zur Schwermetall-Bindungskapazität beitragen. Vor dem Hintergrund, dass die Struktur von Huminsäuren aber weitgehend ungeklärt und vermutlich äußerst komplex ist und in der vorliegenden Arbeit die Identifizierung der Huminsäuren auf Absorption in den Spektren durch bestimmte Funktionalitäten zurückgeführt wird, scheint die Schlussfolgerung, dass tatsächlich Huminsäuren und nicht andere Chelatbildner wie Carbonsäuren, Kohlenhydrate, Phytochelatine oder Aminosäuren in *Eichhornia* Metalle binden sehr zweifelhaft. Während die Schwermetallabsorption durch *E. crassipes* in zahlreichen Studien belegt wurde, existieren nur wenige Arbeiten, die sich mit der Degradation organischer Schadstoffe durch Wasserhyazinthen beschäftigen. Nor (1994) quantifizierte den Benzol-Abbau in Anwesenheit von Cu und Zn. Er fand, dass bei Anwesenheit der einzelnen Metalle die Benzoldegradation gehemmt wird, wohingegen Cu und Zn in Kombination zu einer erhöhten Benzoldegradation führten. Roy und Hanninen (1994) arbeiteten mit PCP und vollständigen Wasserhyazinthen. Sie konnten eine signifikante Degradation bei einer Konzentration von 0,5 mg L⁻¹ ermitteln. El Zawahry und Kamel (2004) untersuchten die Absorption von Azo- und Anthrachinon-Farbstoffen durch Extrakte von *E. crassipes*. Sie fanden eine Absorptionskinetik 1.

Ordnung und eine positive Korrelation zwischen N-Gehalt der Farbstoffe und Geschwindigkeit der Farbstoffabsorption. Xia und Ma (2006) zeigten in einer kürzlich veröffentlichten Studie die Eignung von *E. crassipes* zur Degradation des Pestizids Ethion. Sterile und unsterile Ansätze mit *Eichhornia* reduzierten die Ethionkonzentration innerhalb von 240 h um bis zu ca. 95%, während in den entsprechenden Kontrollen das Pestizid nach Versuchsende zu etwa 60–70% wieder gefunden wurde. Durch vergleichende Experimente mit sterilen und nicht sterilen Pflanzen bilanzierten sie 69% der Reduktion als Aufnahme durch die Pflanzen, wohingegen sie 12% auf mikrobiologische Aktivität zurückführten. Die Ethion-Abnahme im Gewebe der Hyazinthen führten sie auf Abbauprozesse zurück.

Granato führte bereits 1993 Untersuchungen mit Wasserhyazinthen zur Senkung freien Cyanids durch. Er verglich die Cyanid Konzentrationen in Ansätzen mit *E. crassipes* mit Kontrollansätzen ohne Pflanzen. Er arbeitete mit 3, 50, 100 und 300 mg L⁻¹ Cyanid in Lösung und bestimmte die Konzentration nach 8, 24 und 48 h. Bei keiner Konzentration konnte er nach 48 h eine signifikante Auswirkung der Pflanzen auf die Cyanid Degradation nachweisen. Die Studie zeigte allerdings wesentliche methodische Schwächen. Entscheidende physikochemische Größen wie pH, Zusammensetzung der Nährlösung, Temperatur und Luftfeuchtigkeit wurden nicht angegeben. Darüber hinaus enthält der Artikel keinerlei Angaben über den genauen Versuchsaufbau, inklusive Beschreibung der Pflanzen und möglicher Verluste an HCN über Ausgasung aus der Lösung oder mikrobieller Aktivität in den Kontrollen. Bei dem gewählten Konzentrationsbereich dürften sich spätestens nach 48 h massive Toxizitätssymptome eingestellt haben, die allerdings nicht erwähnt wurden. Low und Lee (1981) untersuchten die Phytotoxizität von CN auf *Eichhornia* und berichteten, dass sich bei einer Konzentration von 300 mg L⁻¹ freiem CN keine Symptome einstellten (vgl. Tab. 1.3). Diese Arbeit enthielt allerdings auch eklatante methodische Mängel, wie das fehlende Beschreiben der physikochemischen Rahmenparameter und des Versuchsaufbaus. Die hohen CN-Toleranzen in dieser Studie waren wahrscheinlich einfach auf viel zu kurze Inkubationszeiten zurückzuführen, womit die Resultate wertlos sind.

1.2 Aufgabenstellung

Ein Schwachpunkt aller bisherigen Studien mit *E. crassipes* ist die mangelhafte Quantifizierung der Phytotoxizität. Da die erhöhte Schadstofftoleranz als Grundvoraussetzung für die Behandlung von hochtoxischen Spezialabwässern angesehen werden muss, sollte diese für die entsprechenden Schadstoffe empirisch ermittelt werden. Keine Studie nennt allerdings eine effektive Methode, um die Toxizität mit *E. crassipes* zu quantifizieren. Insbesondere vor dem Hintergrund der meist sigmoiden Dosis–Wirkungsbeziehungen ist das Wissen um die Maximaltoleranzen und Effektivkonzentrationen für den Betrieb der Kläranlagen eine unbedingte Voraussetzung. Dies gilt insbesondere auch, da das Risiko einer erneuten Schadstofffreisetzung aus den Wurzeln als indirekte Reaktion auf eine Überdosierung der toxischen Substanzen besteht (Soltan und Rashed 2003).

Während die Cu–Aufnahme und –Akkumulation in den verschiedenen Organen *Eichhornias* relativ gut erfasst ist, wurde der Einfluss freien Cyanids auf die Cu–Aufnahme noch nicht untersucht. Darüber hinaus wurden auch die maßgeblichen Einflussgrößen, die Aufnahme und Translokation beeinflussen noch nicht identifiziert.

Weiterhin wurde noch nicht geklärt, ob *E. crassipes* freies Cyanid aufnimmt und verstoffwechselt oder im Gewebe akkumuliert. Im Falle der Metabolisierung stellt sich die Frage, ob *E. crassipes* freies Cyanid auch über die biochemische Transformation zu Asparagin und / oder Asparaginsäure entgiftet oder, ob andere relevante Metaboliten auftreten. Ferner muss geklärt werden, ob die Wasserpflanzen den Cyanid–Abbau auch auf andere Art positiv beeinflussen können. Des Weiteren existieren bisher keine Daten, die die Abbaukinetik in Anwesenheit *E. crassipes* unter reproduzierbaren Versuchsbedingungen beschreiben.

Der wesentlichste Punkt ist allerdings, dass zur Aufbereitung von kupfer– bzw. cyanidhaltigen Abwasser noch keine Erfahrungen mit *E. crassipes* im Pilotmaßstab existieren. Es wurde noch kein Versuch unternommen, die Erkenntnisse aus Laborstudien in ein geschlossenes und kontrollierbares hydraulisches System mit ökotechnisch relevanten Dimensionen, zu übertragen. Es ist noch ungeklärt, ob die Wasserpflanzen im Betrieb den wesentlichen Faktor zur Absorption bzw. Degradation der beiden Schadstoffe darstellen, wie belastbar die Anlagen sind und welche hydraulischen Voraussetzungen erfüllt werden müssen.

Die Bedingungen für den Einsatz der Wasserhyazinthen zur Klärung der Abwässer aus dem Goldbergbau lassen sich in den Kernpunkten Toxizität, Schadstoffabsorption (–abbau) und Machbarkeit, d.h. Umsetzung der Laborergebnisse im realen Maßstab, zusammenfassen. Hieraus lässt sich der Forschungsbedarf mit den folgenden Fragen formulieren, die in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden sollen:

Toxizität: Schadstofftoleranz in ökotechnisch relevanten Konzentrationen

Weder die Kupfer-, noch die Cyanid-Phytotoxizität wurde bisher für *E. crassipes* ermittelt. Bisher wurden in der Literatur nur akute Toxizitätssymptome beschrieben. Insbesondere bei geringen Konzentrationen ist noch keine Methode entwickelt worden, um die Phytotoxizität zu quantifizieren und die Effektiv-Konzentrationen ökotoxikologisch abzuleiten.

Wie hoch ist die maximale Cyanid- und Kupfer-Toleranz und mit welchen Methoden lassen sich diese quantifizieren?

Wie hoch sind die Effektiv Konzentrationen EC_{50} , EC_{20} und EC_{10} für Cyanid und Kupfer?

Absorption & Degradation: Signifikante Senkung der Schadstoffkonzentrationen

Die Aufnahme, Akkumulation und Abbau freien Cyanids durch *E. crassipes* wurde bisher noch nicht nachgewiesen. Besonders vor dem Hintergrund der weiteren Nutzung der Wasserpflanzen muss der Verbleib des toxischen Cyanids in den Pflanzen geklärt werden.

Werden die Schadstoffkonzentrationen in Anwesenheit von *E. crassipes* signifikant gesenkt? Nimmt *E. crassipes* Cyanid und Kupfer auf, kommt es zu Akkumulation oder Abbau im Gewebe und welche Metaboliten entstehen?

Welche Faktoren beeinflussen die Schadstoffaufnahme durch *E. crassipes*?

Zeigt *E. crassipes* eine höhere Cyanid-Degradation als Pflanzen mit vergleichbarem ökotechnischem Potential?

Machbarkeit: Übertragung der Labor-Ergebnisse auf den Pilotmaßstab

Der Einsatz der Wasserhyazinthen im Pilotmaßstab wurde bisher nur in der Nährstoffreduktion und für einzelne Schwermetalle etabliert. Es wurde noch nicht untersucht, ob die Behandlung mit diesen Pflanzen den rein umweltchemischen Cyanid-Verlustprozessen Ausgasung und photochemischer Abbau sowie der mikrobiellen Cyanid-Degradation überlegen ist. Ähnliches gilt für Cu und insbesondere für die Kombination der beiden Schadstoffe.

Sind die Ergebnisse aus den Laborstudien auf den halbtechnischen Maßstab übertragbar?

Welche hydraulischen Voraussetzungen müssen unter dem Gesichtspunkt einer optimalen Cyanid und Kupfer Aufbereitung erfüllt sein?

Wie belastbar ist die Anlage bzw. kann die Anlage mehrfach in kurzen Zeitintervallen beschickt werden?

2. Material & Methoden

Allgemeine Laborausstattung

Filtrationsanlage: HPLC–Eluenten Ganzglas–Vakuumfiltration 16309; Sartorius

Gefriertrocknung, Alpha A–1; Christ

Hamilton Spritzen, 25 µL, 100µL, 250 µL, 500 µL

Horizontalschüttler; Eigenbau

Kontaminationszähler LB 1210B; Berthold, München

Labor–pH–Meter mit Elektrode SE 103; Firma Knick

Laborwaage 0,01 g, Kern Kb; Kern & Sohn GmbH

Laborwaage 0,1 g, Kern Kb; Kern & Sohn GmbH

Laborwaage P 1200N; Mettler

Laborwaage SBA 31; Scaltec

Leitfähigkeitsmessgerät; WTW

Membranpumpe, MZ 2C; Vacubrand

Mikrowelle; MLS GmbH für Mikrowellen–Laborsysteme, Leutkirch im Allgäu

Pipetten; variabel von 20–200 µL, 100–1000 µL und 1000–5000µL; Eppendorf

Rotationsverdampfer; Rotavapor R–14; Vacubrand, Wertheim

Sauerstoffmessgerät; WTW

Stabmixer; Braun

Tischzentrifuge 2K 15; Sigma

Ultraschallbad Braunsonic 220; Baader

Wasserbad B–480; Büchi

Water–system Milli–Q, Millipore, Schwalbach

Zentrifuge, RC–5B Refrigerated super speed centrifuge, Rotor SLA–3000; Sorvall

2.1 Analytik

Alle analytischen Untersuchungen wurden mit Millipore Wasser durchgeführt, sofern nicht ausdrücklich anders beschrieben. Die verwendeten Chemikalien wurden analysenrein eingesetzt.

2.1.1 Kupfer

AAS–Lampe, Cu; Helmut Saur Laborbedarf

AAS, 1100B; Perkin Elmer

Cu–Standard 1000 mg L^{–1} in 0,1 N HNO₃; Merck KGaA

Filter, 589/3, 110mm, blue ribbon, quant. anal.; Schleicher & Schuell

HNO₃: 65%, Dichte 1.40; Merck KGaA

HCl: 37%, Dichte 1.19, Merck KGaA

Die Kupfer-Messungen wurden an einem Flammen-AAS der Firma Perkin Elmer durchgeführt. Vor den Messungen wurden jeweils Kalibrierreihen im linearen Konzentrationsbereich mit 0,2, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2, 1,6 und 2 mg Cu L⁻¹ Verdünnungen der 1 g L⁻¹ Standardlösung in Königswasser (0,01%ig) aufgenommen.

Messungen außerhalb der Linearität im Konzentrationsbereich über 2 mg L⁻¹ wurden entsprechend verdünnt. Verunreinigte Proben wurden vor der Bestimmung filtriert.

2.1.2 Cyanid

CN-Stammlösung 1000 mg L⁻¹ mit 1,883 g NaCN Einwaage in einem Liter 0,1 NaOH

Cyanid Küvettentest; Merck KGaA

Cyanidküvettentest Spektroquant ®; Merck KGaA

HPLC series 1100; Hewlet Packard

HPLC Säule IONPAC AS14A; Dionex

Membranfilter NL16, Celluloseacetat, 0,22 µm; Schleicher & Schuell

NaClO₄; Merck KGaA

Natriumcyanid; Flukka

NiCl₂ 1000 mg L⁻¹ AAS Standard; Merck KGaA

UV/VIS-Spektrophotometer Lambda 5; Perkin-Elmer

Freies Cyanid wurde analog ISO 6703 bzw. DIN EN ISO 14403 bestimmt und photometrisch bei 585 nm nachgewiesen. Dieser Nachweis beruht auf der Königsreaktion (Aldridge 1944). Bei dieser Reaktion reagieren freie Cyanide (CN⁻, HCN) in neutraler bis schwach saurer Lösung mit dem Chlorierungsmittel Chloramin-T. Das entstandene Chlorcyan reagiert mit Pyridin zu Glutacondialdehyd, welches bei Raumtemperatur mit 1,3-Dimethylbarbitursäure zu einem rotvioletten Polymethinfarbstoff kondensiert. Der messbare Konzentrationsbereich liegt für diese Methode bei ca. 0,01–0,5 mg CN L⁻¹. Kalibriergeraden wurden mit 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 und 0,5 mg L⁻¹ Cyanid-Standardlösungen aufgenommen.

Ferner wurde freies Cyanid auch als Nickelkomplex bestimmt. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass das UV-transparente Cyanid unmittelbar nach der Gabe von Nickel(II)chlorid zu einem Komplexanion mit UV-charakteristischen Absorptionsmaxima bei 267, 284, und 315 nm transformiert wird. Diese Methode eignet sich allerdings nicht für Umweltproben bzw. getrübbte oder eingefärbte Proben, da die UV-Absorption der Matrix die Cyanidsignale überlagern könnte. Demzufolge kann diese Methode nur nach Vorreinigung

und Aufkonzentrierung durch Destillation und Absorption in Natronlauge oder kombiniert mit einer chromatographischen Trennmethode verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit wurde das Tetracyanonickelat an der HPLC von der Matrix abgetrennt und detektiert. Für die Derivatisierung mit Nickel wurde den alkalischen Proben Nickellösung im molaren Verhältnis von mindestens 4:1 (Ni:CN) zugesetzt. Das Tetracyanonickelat konnte anschließend aus der Matrix mittels Anionenaustausch-HPLC auf einer Dionex-Säule mit tert. Buthylether-Beschichtung abgetrennt werden. Die Trennung erfolgte modifiziert nach Karmarkar (2002). Bei dieser Methode werden die anionischen Analyten mittels 250 M Natriumperchlorat-Lösung als Eluent mit hoher Ionenstärke im Gradientenverfahren von der Säule gespült. Die Methode eignet sich insbesondere für die Trennung von Cyanokomplexen. In der Originalmethode wurde mit Anionentauschersäulen hoher Hydrophobizität (QS-A2SC, QS-A1SC) gearbeitet, die in der vorliegenden Arbeit nicht zur Verfügung standen. Daher musste die Methode für eine IONPAC AS14A-Säule adaptiert werden. Diese Säule wird üblicherweise in der Ionenchromatographie für die Auftrennung von anorganischen Anionen wie Chlorid oder Phosphat verwendet. Die Trennung erfolgte bei pH 11, einer Säulentemperatur von 35 °C und einer Flussrate von 1,0 mL min⁻¹ nach folgendem Gradienten: 0 bis 100% 250 mM NaClO₄ pH 11 (B) in H₂O pH 11 (A) in 4 min, 100 bis 0% B in A in 2 min, gefolgt von 6 min 100% A. Alle Proben wurden vor der Messung membranfiltriert.

Die adaptierte Methode eignete sich sehr gut für die parallele UV- und ¹⁴C-Detektion von Cyanid als Tetracyanonickelat. Auch aus Pflanzenextrakten konnte das Cyanid so mit einer Nachweisgrenze von mindestens 0,1 mg L⁻¹ nachgewiesen werden. Ferner wurde auch versucht mit dieser Methode qualitativ Cyanocuprate aus Feldproben nachzuweisen. Dies gelang durch interne und externe Standards. Allerdings lag die Nachweisgrenze in der komplexen Probenmatrix bei 0,9–1 mg L⁻¹ Kupfer.

2.1.3 Radioanalytik

Beckman LS-5000 TD liquid scintillation counter; Beckman Coulter, Fullerton CA, USA
Biological Oxidizer, RJ, Harvey Instruments Corporation, USA; Packard
CarboMax Plus; Lumac-LSC, Groningen, Niederlanden
Cocktail Lumasafe Plus; Lumac LSC, Groningen, Niederlanden
PE LSC-Vials; 5 & 20 mL; Canberra-Packard
Na¹⁴CN, 1,88 GBq mmol⁻¹; Hartmann Analytik
NaOH Pellets GR pro analysis; Merck KGaA
Sauerstoff 5.0; Air Liquide
Stickstoff 5.0; Westphalen

Die in flüssigen Proben vorliegende Radioaktivität wurde mittels Flüssig-Szintillationszählung bestimmt. Aliquots der radioaktiven Proben wurden mit Szintillationscocktail im Volumenverhältnis von 1:5 bis 1:10 vermessen. War die Färbung der Probe durch z.B. vorliegendes Chlorophyll zu stark, wurde das Proben / Cocktail Verhältnis zugunsten des Cocktails entsprechend verändert. Dadurch konnte bei allen Proben auf eine externe Quenchkorrektur verzichtet werden. Um zu vermeiden, dass radioaktives H^{14}CN aus dem saurem Szintillationscocktail ausgaste, wurde dieser im Volumenverhältnis 1:100 mit 10%iger NaOH versetzt. Feste Rückstände wurden vollständig verbrannt und das entstandene $^{14}\text{CO}_2$ quantitativ bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Proben 3 min in einem Sauerstoffstrom von 350 mL min^{-1} bei 900°C verbrannt. Die Verbrennungsgase wurden bei 650°C über eine Katalysatorkaskade aus Platin-, Kupferoxid sowie Kupfer und Mangan in ein LSC-Vial geleitet, in dem der entsprechende Szintillationscocktail vorgelegt wurde. Eine Kontrolle fand durch die Verbrennung von definierten Radioaktivitätsstandards statt.

2.2 Kultivierung der Wasserhyazinthen

Alle in den Experimenten eingesetzten Pflanzen sind Klone von ursprünglich fünf Exemplaren. Diese wurden im Gewächshaus unter konstanten Bedingungen (16 h Tag, Lichtintensität: $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 25°C Tag / 20°C Nacht, 60% Luftfeuchtigkeit) vegetativ vermehrt. Zudem wurden die Wasserhyazinthen in den Sommermonaten auch außerhalb des Gewächshauses vermehrt. Bei der Kultivierung und in den Experimenten wurde die Hoaglandlösung nach Tabelle 2.1 verwendet. Für die Versuche wurden möglichst gleichgroße (alte) Pflanzen mit einem Frischgewicht von 15–18 g, einer Blattanzahl von 7–8 und einer Wurzellänge von 120–150 mm ausgesucht. Vor den Versuchen wurden nekrotische und chlorotische Blätter entfernt.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Hoagland Lösung

Nährsalz	Molarität ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}^*$	500
KNO_3^*	1250
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}^{**}$	1110
KH_2PO_4^*	250
H_3BO_3^*	11,5
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}^*$	2,3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}^*$	0,19
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}^*$	0,09
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}^*$	0,09
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}^*$	17,9
EDTA*	51

*Merck KGaA; **Acros Organics

2.3 Untersuchungen in hydroponischen Testsystemen

Hydroponik Gefäße, PP 850 mL; Leni Corona 11/9

Zweiteilige Deckel, PE; Eigenbau

Alle hydroponischen Versuche mit intakten Wasserhyazinthen wurden in einem vollständig steuerbaren Phytotron vorgenommen. Im Phytotron herrschten eine konstante Temperatur von 27 °C und eine Luftfeuchte von 85% bei einer konstanten Luftzirkulation. Die Dunkelphase betrug 8 h. Während dieser Perioden fiel die Temperatur auf 16 °C ab. Die Lichtstärke innerhalb der Kammer belief sich in der Höhe des Versuchsaufbaus (ca. 1,5 m) auf 20.000 lux ($320 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die Messungen wurden mit einem Miniluxmeter der Firma Optronic, Berlin vorgenommen.

Um Flüssigkeits- bzw. Gasverlust aus der Nährlösung zu vermeiden, wurden für die hydroponischen Gefäße zweiteilige Deckel mit variierender Bohrung für Pflanzenkörper unterschiedlicher Größe angefertigt (Abb. 2.1). Diese Deckel gewährleisteten eine effektive Trennung der Blätter von den Wurzeln. Am Wurzelansatz wurden die Schwimmpflanzen mit Parafilm umwickelt. An dieser Stelle wurde dann der PE Deckel zusammengesetzt. Um die Deckel mit den Pflanzen passgenau einzusetzen, mussten die Hydroponik Gefäße zunächst am Rand erwärmt werden. Die Probennahmen erfolgten während der Versuche mit Hamilton-Spritzen durch 1 mm Bohrungen. Die jeweiligen Testlösungen wurden mittels Magnetrührer (120 Upm) oder Horizontal-Schüttler (70 Upm) permanent homogenisiert.

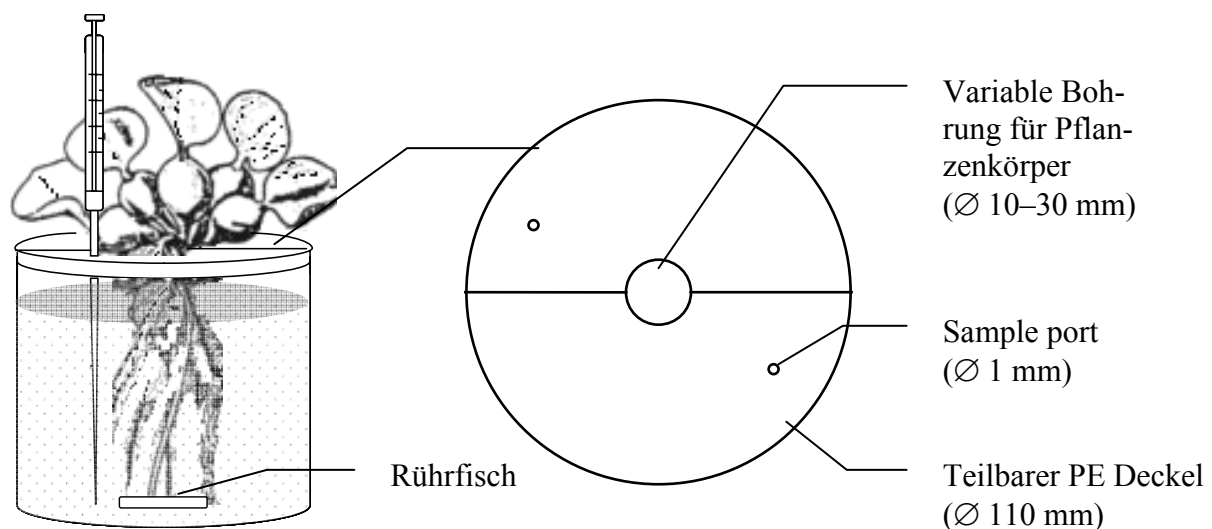


Abbildung 2.1: Hydroponik-Versuchsaufbau

2.3.1 Toxikologische Tests

Die Ökotoxizitäts-Tests wurden als Akuttests für eine kurze Exposition und hohe Testkonzentrationen konzipiert. Die Schadstoffbehandlungen und Kontrollversuche wurden in Replikaten ($n = 5$) durchgeführt. In den Tests wurden Kupfer und Cyanid im umweltrelevanten Konzentrationsbereich bis maximal 50 mg L^{-1} appliziert. Außerdem wurde untersucht, ob sich beide Schadstoffe gemeinsam synergistisch bzw. antagonistisch auswirken. Um den Einfluss des pH's auf die Toxizität zu überprüfen, wurden die Ansätze mit Schadstoff sowie die Kontrollansätze ohne Schadstoff bei verschiedenen Initial-pH Werten durchgeführt. Als Toxizitätsparameter wurde die Transpiration der Pflanzen über den Masseverlust der hydroponischen Testsysteme bestimmt. Diese Methode wurde von Trapp *et al.* (2000) für Stecklinge von Weiden entwickelt und entsprechend auf die Wasserpflanzen angepasst. Wasserhyazinthen haben als tropische Schwimmpflanzen einen hohen Wasserbedarf und eine dementsprechend hohe Transpiration. Zumal die Pflanzen Stomata sowohl an der Blattoberseite als auch an der Blattunterseite aufweisen. Damit eignet sich die Transpiration besonders gut als toxikologischer Parameter, da sich chemischer Stress schnell auf den Wasserhaushalt dieser Pflanzen auswirkt. Dies verdeutlicht sich zum einen durch einen schnellen Transpirationsabfall (innerhalb von 24 h) und Welken und Austrocknung der Blätter (innerhalb von 24–48 h), bevor andere Symptome wie Chlorosen, Nekrosen oder vermindertes Wachstum sichtbar werden ($> 48 \text{ h}$).

Grundvoraussetzung für die Bestimmung der Transpiration aus dem Masseverlust des Systems ist die Vermeidung von Evaporation aus der Nährlösung. Diese konnte durch die in Kapitel 2.3 beschriebene Trennung der Blätter von den Wurzeln in Nährlösung vermieden werden. Zu Versuchsbeginn wurden die Pflanzen für 24 h nur Hoaglandlösung ausgesetzt, um die Basistranspiration in g h^{-1} für jede Pflanze zu erhalten (Transpiration $t_0 = 100\%$). Anschließend wurde die Hoaglandlösung durch 600 mL Testlösung mit definiertem pH ersetzt, die Systeme gewogen und der Masseverlust täglich aufgezeichnet. Um Konzentrationsänderungen und Austrocknen der Wurzeln zu verhindern, wurde der Gewichtsverlust durch Wasser ersetzt. Die ermittelten absoluten Transpirationen in g h^{-1} eignen sich nicht als Toxizitätsparameter, da jede Pflanze in Abhängigkeit individueller Voraussetzungen (Blattoberfläche, Gewicht, Wurzeloberfläche, Fitness, Alter etc.) eine individuelle Transpiration aufweist. Diese Werte sind somit nicht vergleichbar. Um dieses Problem experimentell zu lösen, müssten sehr ähnliche Pflanzen mit gleichen individuellen Voraussetzungen gezüchtet werden, die dann wahrscheinlich ähnlich intensiv transpirieren würden. Diese experimentelle Anforderung ist allerdings unpraktikabel und extrem schwierig realisierbar. Nachteil dieser Methode

wäre zudem, dass nur ein sehr eingeschränktes Spektrum der natürlichen Variationsbreite der Pflanzen untersucht werden könnte. Aus diesen Gründen wurde das Problem rechnerisch gelöst. Aus der absoluten Transpiration T , dem Quotienten aus Masseverlust und Inkubationszeit, wurde nach folgender Formel die relative Transpiration RT errechnet:

$$RT = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{T_i(C, t)}{T_i(C, 0)} \times 100$$

T = abs. Transpiration (g h^{-1})
 C = Konzentration der Testsubstanz (mg L^{-1})
 i = Replikat 1,2,...n

Der RT Wert eignet sich sehr gut für toxikologische Untersuchungen, da er die natürliche Variation des betrachteten Parameters Transpiration relativiert. Die erhaltenen Werte wurden allerdings wenn möglich nicht zusätzlich mit den Kontrollansätzen normiert, um eine Verfälschung der Daten zu vermeiden und die tatsächlichen Kontrolltranspirationen realistisch darzustellen. Dementsprechend können die RT 's der Kontrollbehandlungen von 100% abweichen. Nur beim Vergleich von Versuchsreihen, deren Kontrollen deutlich voneinander abweichen und dies nicht experimentell berücksichtigt werden konnte, wurden die relativen Transpirationen zusätzlich mit den Kontrollen normiert. Diese Ergebnisse sind als normierte relative Transpiration NRT dargestellt.

Die Pflanzen wurden über 96 h inkubiert (24 h in Hoagland + 72 h unter Schadstoffexposition). Die Effektivkonzentrationen wurden nach Versuchsende aus den RT 's nach 72 h Schadstoffexposition durch lineare Regression nach Probit- und Logit-Transformation ermittelt.

Die Fitness bzw. Schädigung der Pflanzen wurde zudem photographisch nach Versuchsende dokumentiert.

2.3.2 Kupfer & Cyanid Absorption

Der Kupfer- bzw. Cyanidgehalt wurde in 6–24 h Intervallen ermittelt. Bei Cu-Applikation wurden nach Versuchsabbruch die Wurzeln gründlich mit Wasser gespült und die Pflanzen 72 h bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurden Wurzeln und Blätter getrennt und bis zur Gewichtskonstanz bei 55 °C getrocknet. Für den Aufschluss des Pflanzenmaterials wurden die Proben mit dem Stabmixer gründlich homogenisiert und ca. 0,5 g TS für den Mikrowellen-Aufschluss in 12 mL H_2O_2 / HNO_3 / H_2O im Volumenverhältnis 4:3:5 überführt und anschließend 17 min bei 200 °C durch Mikrowellenaufschluss vollständig gelöst.

Bei der Untersuchung der Cyanid-Degradation durch *Eichhornia* ohne ^{14}C -Applikation wurden 5 und 10 mg L^{-1} Cyanid appliziert. In diesem Versuchsaufbau wurde zudem der Einfluss des Licht / Dunkelrhythmus untersucht, in dem die Pflanzen zu verschiedenen Zeiten im Phy-

totron inkubiert wurden. Außerdem wurde der Einfluss des Cyanids als alleinige Stickstoffquelle ermittelt. In diesen Experimenten wurde allerdings nicht der Cyanidgehalt in Wurzeln und Blättern oder die Ausgasung von HCN aus den Blättern *Eichhornias* bilanziert. Diese Fragen wurden in den entsprechenden radioanalytischen Untersuchungen geklärt.

2.4 Radioanalytische Untersuchungen

2.4.1 ^{14}CN -Bilanzierung in batch Systemen

100 mL Weithals-Schraubdeckelgläser; VWR

BaCl_2 ; Merck KGaA

HQI-Quecksilberdampfampe, $85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; Philips

K_2CO_3 ; Merck KGaA

RAMONA 2000; Festkörperszintillator; silanisiertes Glas; Raytest

Ziel dieser Experimente war eine erste Einschätzung der Cyanidaufnahme- und Abbaukapazität durch Pflanzen mit radioanalytischen Methoden. Hierfür wurde ein möglichst elementarer Versuchsaufbau angestrebt, der mit sehr einfachen Mitteln schnell die die Cyanid-Degradation durch Pflanzen quantitativ darstellt. Eine geeignete Methodik wurde erstmals von Larsen *et al.* (2004) und Yu *et al.* (2004) vorgestellt. In diesen Arbeiten wurden Blattstücke unterschiedlicher Pflanzenarten mit Cyanidlösung inkubiert und die Abnahme der Cyanidkonzentration in den Lösungen photometrisch bestimmt. Durch diese Arbeiten eröffnete sich ein wertvolles Werkzeug, um die Cyanid-Degradationsleistung einzelner Pflanzenarten sehr schnell vergleichen zu können.

In der vorliegenden Arbeit konnte der ursprüngliche Versuchsaufbau durch die Radioanalytik minimalisiert werden. Zudem wurden mit der Radioanalytik Ungenauigkeiten durch den reinen photometrischen Cyanid-Nachweis vermieden. Darüber hinaus konnte in diesem Versuchsaufbau leicht $^{14}\text{CO}_2$ als Produkt der vollständigen Mineralisierung des ^{14}C -Cyanids nachgewiesen werden. Damit gestattet dieser modifizierte Versuchsaufbau erste Schlussfolgerungen der Cyanidaufnahme und Akkumulation durch Blatt- und Wurzelstücke *Eichhornias* einerseits und andererseits die Identifizierung von $^{14}\text{CO}_2$.

Zu diesem Zweck wurden die Experimente in geschlossenen 100 mL Gläsern mit Natronlauge-Gasfallen in jeweils drei Parallelen durchgeführt. In den Fallen konnte zudem gasförmiges H^{14}CN bilanziert werden. In entsprechender Weise wurden Kontrollversuche ohne Blattstücke durchgeführt, um Ausgasung, Hydrolyse, mikrobiologischen Abbau, Photolyse und fehlerhaftes handling zu quantifizieren.

Die Blätter der Wasserpflanzen wurden zunächst mit Wasser und anschließend mit Isopropanol gewaschen. Die Wurzeln wurden, um die Mikroflora zu erhalten, nur mit Wasser gewaschen. Die Blätter wurden in etwa 10–15 mm² große, Wurzeln in etwa 5 mm lange Stücke geschnitten und jeweils 0,5 g mit 15 mL autoklavierter Hoaglandlösung eingesetzt. Die Ansätze mit Wurzeln wurden ausschließlich in braunen Gläsern durchgeführt, während in Kontroll- und Blattansätzen der Einfluss der Bestrahlung durch transparente und gefärbte Gläser untersucht wurde. Zur Nährlösung wurden 0,33–0,5 MBq K¹⁴CN sowie 10 mg CN L⁻¹ appliziert und auf pH 8,5 mit 10%iger NaOH eingestellt. Die Gasfallen wurden mit 3 mL 0,1 N NaOH beschickt. Die Ansätze wurden bei 25 °C für 48 h inkubiert. Während der Inkubation wurden Aliquots der Lösungen entnommen und per LSC vermessen. Das Gewebe wurde nach Versuchsende in flüssigen Stickstoff gründlich homogenisiert, in 50 mL 2,5 N NaOH für 1 h im Ultraschallbad aufgeschlossen und schließlich für 24 h auf dem Horizontalschüttler extrahiert. Bei dieser Extraktionsmethode wurden alle komplexierten und leicht verfügbaren Cyanide freigesetzt (Bushey *et al.* 2004). Nach Filtration des Extraktes wurden Aliquots per LSC vermessen, der Rückstand gefriergetrocknet und am Oxidizer verbrannt. Die Gesamtradioaktivität in den Natronlaugefallen wurde durch LSC bestimmt. Um die Radioaktivität in den Natronlaugefallen genauer zu differenzieren, wurde eine Bariumchlorid-Fällung in jeweils zwei Parallelen vorgenommen. Hierfür wurde nach Zugabe von 10%iger K₂CO₃-Lösung das Karbonat aus der Lösung mit gesättigter Bariumchloridlösung vollständig ausgefällt. Der Rückstand wurde bei 13.000 Upm abzentrifugiert und dreimal mit 0,1 N NaOH gründlich resuspendiert und gewaschen. Das ausgefällte Karbonat wurde dann in Szintillationscocktail resuspendiert und die Radioaktivität per Flüssigszintillationszählung bestimmt. Diese Fraktion entsprach ausschließlich dem aus der Nährlösung ausgegastem ¹⁴CO₂. Die ausgegaste Blausäure H¹⁴CN blieb im Überstand zurück und konnte von dort quantifiziert werden. Als weitere Trennmethode für ¹⁴C-markiertes Cyanid bzw. Karbonat wurden die Proben zusätzlich noch mit NiCl₂-Lösung im molaren Verhältnis 1:4 (Cyanid:Nickel) versetzt und an der HPLC vermessen. Wie oben beschrieben konnte das Tetracyanonickelat durch seine signifikante UV-Absorption eindeutig detektiert werden. Zusätzlich wurden die entsprechenden Radio-signale von ¹⁴CO₃²⁻, O¹⁴CN⁻ und [Ni(CN)₄]²⁻ über einen Radiodetektor mit einem Festkörperszintillator auf silanisierter Glasbasis detektiert.

2.4.2 Michaelis–Menten Parameter

Kanülen 5 cm, Ø 0,5 mm; VWR

Schraubgläser 20 mL; neoLab ®

SUBA SEAL Septen; Sigma

Um die gewonnenen Erkenntnisse aus den Versuchen mit batch Systemen zu präzisieren, sollten in diesem experimentellen Stadium die Cyanidaufnahme durch Bestimmung der Michaelis–Menten Parameter genauer quantifiziert werden. Letztendlich dienen die maximale Abbaugeschwindigkeit v_{\max} sowie die Halbsättigungskonstante des Enzym–Substrat–Komplexes K_M dem direktem Vergleich mit entsprechenden Literaturdaten anderer Pflanzen. Die Literaturwerte wurden mit unterschiedlicher aber dennoch vergleichbarer experimenteller Methodik gewonnen. Entsprechende Arbeiten wurden von Larsen *et al.* (2005, 2004) oder Yu *et al.* (2005b, 2005c) mit photometrischer Detektion des Cyanids durchgeführt.

Für die nähere enzymkinetische Charakterisierung der ^{14}C –Cyanid Degradation im batch Verfahren musste die Ausgasung von H^{14}CN während der Inkubation vermieden werden. Somit konnte eine Verfälschung der abgeleiteten Michaelis–Menten Parameter durch Verlust von Radioaktivität in die Gasphase ausgeschlossen werden. Zu diesem Zweck wurde der im Kapitel 2.4.1 beschriebene Versuchsaufbau modifiziert. Es wurden 0,5 g Blattmaterial wie oben beschrieben behandelt und mit 20 mL autoklavierter Applikationslösung in Gläsern mit 20 mL Gesamtvolumen eingesetzt und mit SUBA SEAL Septen verschlossen, so dass nur ein minimales Restvolumen über der Lösung zurück blieb. Je nach Pflanzenspezies wurden bis zu maximal 16 mg L^{-1} Cyanid sowie 0,03–0,05 MBq ^{14}C –Cyanid eingesetzt. Wenn das restliche Gasvolumen bei jeder Probennahme ersetzt werden würde, errechnet sich der Verlust an HCN über die Gasphase nach folgender Gleichung:

$$\%(\text{Verlust}) = K_H * V_{\text{Luft}} * (V_{\text{Lösung}})^{-1} * 100$$

Hierbei ist $\%(\text{Verlust})$ der Anteil des HCN–Verlustes in die Gasphase in % des Cyanid–Gesamtgehaltes in der Lösung, K_H die Henry Konstante ($V_{\text{Wasser}} V_{\text{Luft}}^{-1}$), V_{Luft} Volumen der Luft und $V_{\text{Lösung}}$ das Volumen der cyanidhaltigen Lösung. Die Henry Konstante beträgt für HCN $1,7 * 10^{-3} V_{\text{Lösung}} V_{\text{Luft}}^{-1}$ (Kroschwitz *et al.* 1993). Bei einem Restvolumen von 1 mL über der Lösung betrüge demnach der Verlust an die Gasphase in diesem Versuchsaufbau weniger als 0,01%, wenn die Inkubationsgefäße bei der Probennahme geöffnet werden würden. Tatsächlich wurden die Probennahmen aber durch die gasdichten Septen mit entsprechenden Kanülen vorgenommen, sodass der Verlust an Radioaktivität durch Ausgasung vernachlässigbar

sein dürfte. Die Ableitung der Michaelis–Menten Parameter erfolgte per linearer und nichtlinearer Regression nach der Michaelis–Menten Beziehung (1):

$$v_C = \frac{v_{\max} \times C}{K_M + C} \quad (1)$$

$$v_C = \frac{(c_0 - c_t) \times V_w}{m_p \times t} \quad (2)$$

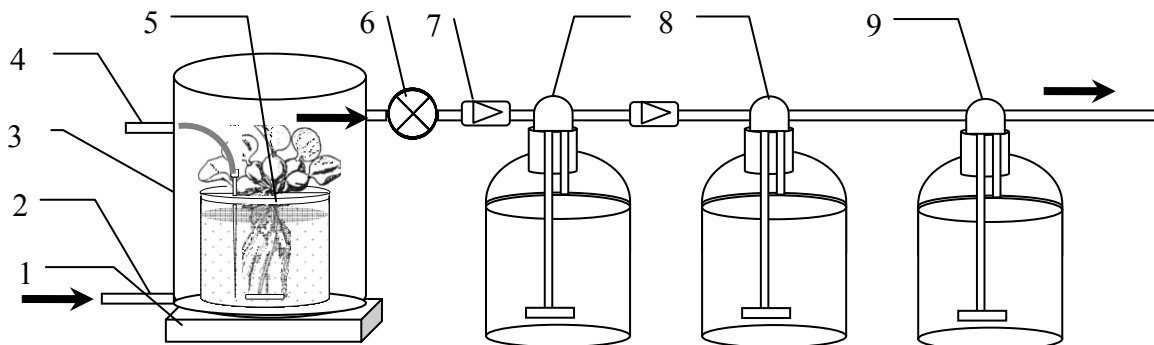
Hierin ist v die Verlustgeschwindigkeit des Substrates der Konzentration C , v_{\max} entsprechend die Maximalgeschwindigkeit und K_M die Halbsättigungskonstante. Die Abbaugeschwindigkeiten v_C für die Substratkonzentration C wurden nach Gleichung (2) berechnet, worin c , die Konzentration zum Zeitpunkt 0 bzw. t in mg L^{-1} , V_w das Volumen der Nährlösung (0,02 L), m_p die eingesetzte Pflanzenmasse (5×10^{-4} kg) und t die Zeit in h bedeuten.

2.4.3 Bilanzierung in flow through Systemen

1 L Braunglasschliff-Flaschen; Schott
2,5 L PS Inkubationsröhre; Eigenbau
400 mL Weckgläser
8-strahliger PE Ringverteiler; Eigenbau
BAS Reader 1000 Version 2.8; Raytest
Bioimager BAS-1000, Fujifilm Photo Film Co. Ltd.; Raytest
Expositionskassetten, BAS Kassette 2040; Raytest
Gaseinleiter mit Fritte Ø 20 mm; Schott
Kleindurchflussmessgerät; Bailey, Fischer & Porter
PCBAS 2.09f; Raytest
PE 3-Wege-Ventil; Burkle LaboPlast ®
Pharmamed ® Schlauch, Ø 4,8 mm; Kleinfeld
Photosensitive Platten; 20x40 cm; Typ BAS-MS; Fuji, Raytest
PP-Rückschlag-Ventil Ø 8–10 mm; Kartel
PVC Schläuche mit und ohne Gewebe, Ø 8–10 mm; Labomedic

In diesem experimentellen Stadium sollte der Verbleib des Cyanids in intakten Wasserhyazinthen nach Aufnahme über die Wurzeln aufgeklärt werden. Ein wichtiger Bestandteil dieser Untersuchungen war die Frage, ob die Radioaktivität aus den Blättern der Wasserpflanzen wieder freigesetzt wird. Insbesondere vor dem Hintergrund einer späteren Nutzung der Pflanzen nach dem Klärprozess musste ermittelt werden, ob und wie viel verfügbares Cyanid in welchen Kompartimenten der Pflanze angereichert wird.

Zu diesem Zweck sollte zunächst geklärt werden, ob nach Inkubation mit H^{14}CN in *E. crassipes* generell Radioaktivität nachzuweisen und wie diese verteilt ist. Hierfür wurden Wasserhyazinthen für 6 Tage mit 100 mL Cyanidlösung (20 mg L^{-1}) und 8,3 kBq ^{14}C -Cyanid in



Im nächsten Versuchsstadium wurden die hydroponischen Testsysteme nach Kapitel 3.2 in Flow-through – Systemen mit Cyanid und ^{14}C –Cyanid inkubiert (Abb. 2.2/2.3). Bei der Versuchsdurchführung wurden zunächst die Systeme wie in Abbildung 2.2 dargestellt vollständig aufgebaut und der Gasdurchfluss etabliert. Erst nachdem die Inkubationsröhren verschlossen waren, wurde das ^{14}C –markierte Cyanid durch den sample port appliziert, um einen Radioaktivitätsverlust durch Ausgasung aus den Blättern oder der Nährlösung möglichst zu vermeiden.

Bei der radioanalytischen Untersuchung der Cyanid-Aufnahme, wurde zudem ein Ansatz mit Wasserhyazinthen durchgeführt, die zuvor mehrfach mit Cyanid inkubiert wurden. Diese Vorinkubation wurde im Gewächshaus durchgeführt. Zur Nährlösung der Pflanzen wurde ca. alle 48–72 h über 21 Tage so viel Natriumcyanid zugesetzt, dass sich eine Cyanidkonzentration um 5 mg L^{-1} einstellte. Weiterhin wurde in den Flow-through Systemen auch der Einfluss des Kupfers auf die Aufnahme und Umsetzung von ^{14}C -Cyanid untersucht. An dieser Stelle sei angemerkt, dass der Verbleib des Kupfers und des ^{14}C -Cyanids nicht in einem Versuchsaufbau ermittelt werden konnte, da es bei der Kupferanalytik (FAAS, Mikrowellenaufschluss) zur unkontrollierten Freisetzung von Radioaktivität hätte kommen können. In diesen Untersuchungen wurde auch geprüft wie sich eine pH Senkung auf die Degradation von ^{14}C -

Cyanid auswirkt. Ferner wurden Ansätze mit Wurzeln *Eichhornias* durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurden die Pflanzen vor Applikation an der Deckelkante abgeschnitten, sodass nur die Wurzel in der Nährlösung verblieb.



Abbildung 2.3: Flow-through-Versuchsaufbau

Als Kontrollen wurden Ansätze mit ^{14}C -Cyanid und Natriumcyanid in hydroponischen Gefäßen ohne *E. crassipes* durchgeführt. Die Bohrung für die Wasserpflanzen wurde in diesen Ansätzen geschlossen, sodass die Radioaktivität in den Fällen der Kontrollen nur durch Undichtigkeiten des hydroponischen Systems freigesetzt werden konnte.

Die Inkubation erfolgte in transparenten, gasdichten Inkubationsröhren unter den gleichen Rahmenbedingungen im Phytotron wie in Abschnitt 2.3 beschrieben. Es wurden jeweils bis zu sechs Systeme parallel betrieben. Um Kondensation an den Wänden und Reinkorporation flüchtiger radioaktiver Metaboliten aus den Blättern zu vermeiden, musste mindestens ein Gaswechsel der Systeme pro Minute gewährleistet sein. Dieser entsprach einer Saugleistung von $6 \times 2,5 \text{ L min}^{-1}$. Dieser Sog wurde mit einer Vakuum-Membranpumpe über einen achtstrahligen Verteiler hergestellt. Es wurden allerdings nur jeweils sechs Systeme parallel betrieben. Die übrige Saugleitung blieb aus Sicherheitsgründen unverschlossen, sodass eine Vakuumbildung im Gesamtsystem ausgeschlossen werden konnte. Um einen identischen Luftstrom in den Systemen zu gewährleisten, konnte der Gasdurchlass an der jeweiligen Inkubationsröhre über ein 3-Wege-Ventil manipuliert werden (Abb. 2.2/2.3). Die Messung der

Flussrate erfolgte am Luftestrom mit einem Kleindurchflussmessgerät. Die Inkubationsröhren waren so konstruiert, dass der Luftstrom von der Basis zum Kopf der Röhren verlief, um Totvolumina möglichst zu vermeiden. Der Luftstrom wurde anschließend durch zweimal 500 mL 1 N NaOH geleitet, um aus den Blättern freigesetztes ^{14}C -markiertes Kohlenstoffdioxid bzw. Blausäure zu fixieren. Die Flaschen wurden spätestens nach 4 Tagen ausgewechselt. Zur Sicherheit wurde die Abluft der Membranpumpe noch zusätzlich durch ein 50 L Fass mit ca. 30 L 1N NaOH geleitet. Während der Dunkelphase wurde der Fluss für jeweils 4 Stunden unterbrochen, um eine Überhitzung der Membranpumpe zu vermeiden. Die Fixierung in Natronlaugewaschflaschen erlaubte keine chemische Differenzierung der ausgegasteten Radioaktivität, da das Cyanid in der Lösung durch den permanenten Sauerstoffeintrag in den Waschflaschen zu Cyanat und Kohlenstoffdioxid aufoxidiert wurde. Die Radioaktivität in den Flaschen lag also ausschließlich als Kohlenstoffdioxid vor.

Nach Versuchsende wurde das Restvolumen der Nährlösung bestimmt und das Pflanzenmaterial wie in 2.4.1 beschrieben aufgearbeitet bzw. auf radioaktives Cyanid hin untersucht.

2.4.4 Identifizierung des Metaboliten Asparagin

Acetonitril gradient grade; Promochem

Ammoniumacetat; Merck KGaA

Asparagin; Merck KGaA

Asparaginsäure; Merck KGaA

Dialyseschlauch, regenerierte Zellulose, 1000 Da; Roth

Eisessig; Merck KGaA

Ethanol; Riedel-de-Haën

Methanol gradient grade; Promochem

Nucleosil 100–5C18, 250x4 mm; mit Vorsäule 20 mm × 4 mm, CS–Chromatographie

Phenylisothiocyanat (PITC); Merck KGaA

Rundkolben 10 mL; Schott

Stickstoff; 3.0 Westfalen AG

Tetraethylenamin (TEA); Merck KGaA

Die in den batch–Versuchen verwendete Extraktionsmethode mit Natronlauge gestattete nur die Identifizierung von Cyanid im Extrakt. Es konnten aber keine Aussagen zur Spezifaktion der Restradioaktivität in den Geweben gemacht werden. Daher wurden die Pflanzen in einem eigenen Versuchsansatz auf den in der Literatur beschriebenen Metaboliten Asparagin sowie auf Asparaginsäure hin untersucht. Für den Nachweis der Aminosäuren wurden wiederum Blattstücke *Eichhornias* verwendet. Allerdings wurde hier 1 g Blattmaterial in 10 mL modifizierter Hoaglandlösung ohne Stickstoffquelle und Eisen verwendet, um die Stickstoffaufnahme

me zu fördern bzw. die Cyanidkomplexierung vollkommen auszuschließen. Die Blattstücke wurden in der Nährlösung für 24 h unter Dauerlicht bei 28 °C mit ca. 2 MBq $K^{14}CN$ und 2 mg L^{-1} Cyanid inkubiert. Hierbei wurde die Lösung permanent mit 120 Upm gerührt. Auch in diesem Versuch wurde eine Verflüchtigung von Radioaktivität vermieden. Nach Versuchsende wurden die Blattstücke mit Wasser gewaschen, trocken getupft und zügig in flüssigen Stickstoff überführt und dort gründlich homogenisiert. Die Extraktion der freien Aminosäuren erfolgte mit 25 mL 70%igen Ethanol (Rozan *et al.* 2001, Rozan *et al.* 2000). Nachdem die Proben über Nacht im Kühlschrank bei 6 °C gelagert wurden, konnten sie bei 5.200 g (20.000 Upm) abzentrifugiert werden. Die Extraktion wurde noch zweimal mit 5 mL Ethanol wiederholt, die Überstände vereinigt und am Rotationsverdampfer auf ca. 7 mL eingengt. Der unlösliche Rückstand wurde gefriergetrocknet und am Oxidizer vollständig verbrannt. Vom Pflanzenextrakt wurden letztendlich 200 μL Aliquots unter Stickstoffstrom getrocknet und die Aminosäuren im Rückstand mit Phenylisothiocyanat (PITC) derivatisiert. Bei dieser Methode addieren die Isothiocyanatgruppen die Aminofunktion in α -Position unter Bildung der entsprechenden N-substituierten Thioharnstoffe (Abb. 2.4).

Für die Derivatisierung wurde der Rückstand in 80 μL Methanol, Wasser, TEA im Verhältnis 2:2:1 (v/v) gelöst und unter Stickstoffstrom vollständig getrocknet. Dieser Rückstand wurde anschließend in 120 μL Methanol, Wasser, TEA, PITC im Verhältnis 7:1:1:1 gelöst und ca. 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Das überschüssige PITC wurde darauf unter Stickstoffstrom entfernt und der feste Rückstand schließlich in 1 mL Ammoniumacetat (pH 6) gelöst, wobei überschüssiges PITC als amorpher Niederschlag ausfällt. Vor der Messung an der HPLC wurden die Proben membranfiltriert.

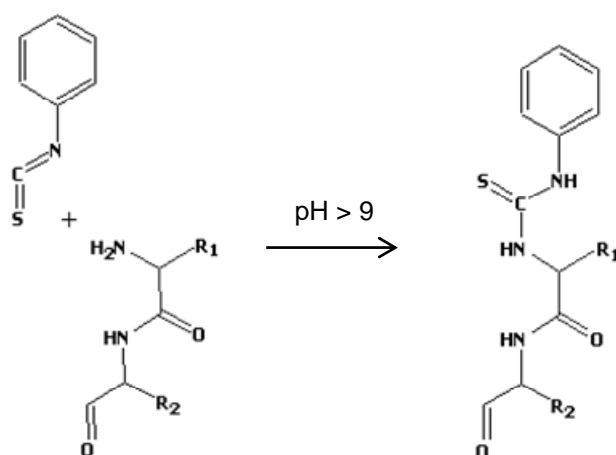


Abbildung 2.4: Derivatisierung der Aminosäuren mit PITC

Bei der erläuterten Extraktion mit Ethanol wurden allerdings nicht die gebundenen Aminosäuren bzw. die Polypeptide und Proteine miteinbezogen. In einem weiteren Versuchsansatz

sollten daher zudem auch die bereits in Form von Peptiden inkorporierten Aminosäuren untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde eine homogenisierte Gewebesuspension *Eichhornias* unter den obigen Bedingungen für 48 h inkubiert. Anschließend wurde diese Suspension für 6 h destilliert und die freiwerdende Radioaktivität in 1 N NaOH absorbiert. Während der Destillation wurde der Salzsäuregehalt schrittweise auf 6 mol L⁻¹ erhöht. Anschließend wurde eine saure Hydrolyse vorgenommen, um alle Aminosäuren in Lösung zu bringen. Diese erfolgte in der Mikrowelle für 20 min. bei 160 °C unter Stickstoffatmosphäre. Nach Abkühlung des Aufschlusses über Nacht, wurde überschüssige Salzsäure am Rotationsverdampfer abgedampft. Der Salzgehalt des Hydrolysats wurde dann nach Neutralisation mit NaOH-Pellets durch Dialyse gegen Wasser reduziert.

Der Nachweis der derivatisierten Aminosäuren an der HPLC erfolgte mit einer modifizierten Methode nach Vasantis und Molnár-Perl (1999) sowie Khan *et al.* (1994) auf einer RP-C18 Säule. Als Eluenten wurden A: 0,1 M NH₄CH₃COO und Acetonitril, eingestellt auf pH 6,5, im Verhältnis 3:1 (v/v) und B: Acetonitril, Methanol, Wasser im Verhältnis 46:10:44 (v/v) in 0,1 M NH₄CH₃COO bei pH 6,5 eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte nach folgendem Gradienten bei 45 °C und einer Flussrate von 0,8 mL min⁻¹: 0 bis 27% B in 20 min, 27 bis 0% B in 30 min. Für den Nachweis der Aminosäuren wurden interne und externe Standards von Asparagin und Aspartat verwendet.

2.5 Untersuchungen im Pilotmaßstab (AMOVA)

Die Aquatische Modell Vegetations-Anlage AMOVA wurde von Eberhard Stengel als halb-technischer Helophytenfilter oder Pfropfenstromreaktor konzipiert und Anfang der 80iger Jahre im Forschungszentrum Jülich aufgebaut (Stengel, 1993b, 1993a, 1991, 1985). Die Anlage wurde ab 1981 im Forschungszentrum Jülich errichtet, sukzessive mit Vegetation bestückt und stetig erweitert. In den Becken wurden Versuche mit *Phragmites australis*, *Typha latifolia*, *Schoenoplectus lacustris* und *Iris pseudacorus* durchgeführt. Ein Becken diente dabei immer als unbepflanzte Kieskontrollbahn. 1987 wurden zwei Becken mit Monokulturen von *Phragmites* bepflanzt. Eines dieser Becken existiert bis heute und dürfte damit der älteste für die Forschung nutzbare Schilfgürtel in einer hydraulisch vollkontrollierbaren Versuchsanlage sein. Bis 1995 wurde ausschließlich der Stoffhaushalt der Helophytenfilter untersucht. Schwerpunkt bildeten die Nitrat- und Phosphatreduktion aus Trinkwasser. In diesem Zusammenhang wurde von 1983 bis 1990 ein Verfahren zur biologischen Denitrifikation von Trinkwasser entwickelt, welches unter der Bezeichnung DENIPLANT patentiert wurde

(Schultz–Hock und Obermann 1987). Bis 2002 wurden in der AMOVA noch Versuche zum Gashaushalt der Helophyten und zur Arsenabsorption aus Trinkwasser durchgeführt.

2.5.1 Konstruktion & Versuchsaufbau

Die ursprünglich 5 Systeme der AMOVA waren 8 m lang und durch eine Längswand bis 0,5 m vor dem Ablauf geteilt. Am Ablauf waren zusätzliche Wände eingelassen, die von einem Sammelrohr durchbrochen waren und durch die das Wasser ablaufen konnte. Damit war jedes System in jeweils zwei Bahnen mit 6,5 m Länge und 0,4 m Tiefe unterteilt (Abb. 2.5). Diese Kanäle bzw. Becken waren mit Dachdeckerfolie ausgekleidet und vollständig mit gewaschenem Rollkies (\varnothing 2–8 mm) gefüllt. Nur am Beckenboden befand sich eine etwa 15 cm mächtige Schicht mit gröberem Rollkies (\varnothing 50–80 mm). Jede Bahn war zum Abfluss um ca. 5 cm geneigt (Abb. 2.5). In der vorliegenden Arbeit wurde eines dieser Systeme den besonderen Ansprüchen gemäß umgebaut und genutzt.

Die Speisung der Becken mit Trink- und Abwasser wurde von einem Versorgungskeller aus vorgenommen. Von hier wurden die Becken permanent durch Sera®-Pumpen mit Trinkwasser gespeist bzw. der Wasserkörper umgewälzt (Abb. 2.6). Die Einspeisung des Wassers am Einlauf der Bahnen erfolgte unterhalb des Wasserspiegels im Kies. Die Schadstoffeinspeisung wurde durch Dosierpumpen der Firma ProMinent (Typ Prominent® gamma G4b) vorgenommen, die mit variabler Förderleistung betrieben werden konnten. Hierbei erfolgte die Applikation in den Wasserstrom unmittelbar nach den Sera®-Pumpen, sodass gegen den aufgebauten Druck eingespeist wurde (Abb. 2.5) Die maximale Förderleistung der Dosierpumpen betrug 1 L h^{-1} bei 16 bar Gegendruck.

Die AMOVA war ursprünglich als bewachsener Vertikal- bzw. Helophytenfilter konstruiert. Während der Untersuchungen wurden die Filter über Monate mit einem konstanten Trinkwasserstrom beschickt und am Ablauf auf Schadstoffreduktion hin untersucht. Für Teichverfahren ist diese Wasserführung in diesem halbtechnischen Maßstab hingegen wenig sinnvoll. Zum einen bietet der Wasserkörper keinen hydraulischen Widerstand, sodass die Verweildauer des Wassers und damit die Retentionszeiten der Schadstoffe zu kurz ausfallen. Somit wären im vorliegenden System mit einer effektiven Filteroberfläche von weniger als 5 m^2 relevante Schadstoffkonzentrationen im mg L^{-1} Bereich nicht vollständig reduzierbar. Bei Abgleich durch entsprechende geringe Flussraten wäre hingegen mit schlechter Durchmischung des Wasserkörpers und unerwünschter Konzentrationsspitzen zu rechnen. Zum anderen würde durch die Hebewirkung des Wasserkörpers keine konstante Füllhöhe gewährleistet sein bzw.

die Becken unter Umständen trocken laufen. In der vorliegenden Arbeit wurde daher erstmals eine Kreislaufführung des Wassers in der AMOVA angestrebt und etabliert (vgl. Abb. 2.5a).

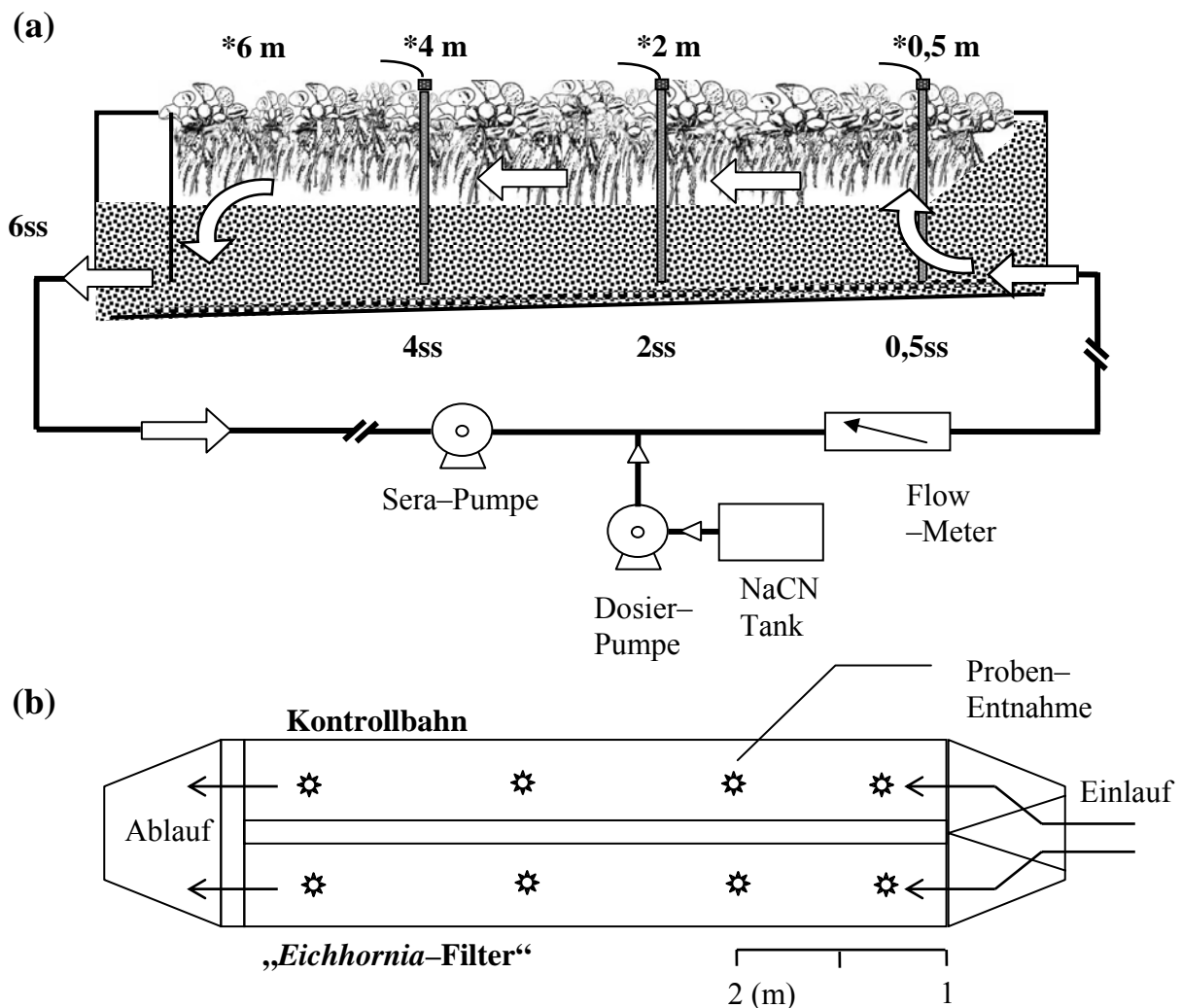


Abbildung 2.5: Schematischer Aufbau der AMOVA, (a) Längsschnitt bzw. Kreislaufführung durch den *Eichhornia* Filter; *0,5 – 6 m: Probe-Entnahmestellen an der Wasseroberfläche, ss (= sub surface): Entsprechende Probe-Entnahmestellen im Kieskörper; Die Blockpfeile stellen den Strömungsverlauf des Wassers dar, (b) Aufsicht (maßstabsgetreu): Kontrollbahn: Kieskörper mit offener Wasseroberfläche; Im Längsschnitt (a) ist die Neigung der Bahn angedeutet.

Während des Versuchszeitraumes wurden die Pflanzen zu verschiedenen Zeitpunkten mit Nährsalzen gedüngt (Tab. 2.2). Bei den Nährsalzgaben wurden die Mikronährsalze vor Gabe entsprechend verdünnt. Die Makronährsalze wurden als Feststoff direkt ins Becken gegeben. Im Gegensatz zu anderen Wasserpflanzen erleidet *Eichhornia* bei dieser drastischen Düngergabe keinen osmotischen Schock. Um eine Algenblüte im Kontrollbecken zu vermeiden, wurden dort keine Nährsalze verabreicht.



Abbildung 2.6: Versorgungskeller der AMOVA 2005; links: Rückansicht, Sera-Pumpen; rechts: Frontansicht, Flow-Meter und Zuleitungen der Applikations-Lösungen

Die verwendeten Bahnen waren 2004 seit 2 Jahren nicht in Betrieb und mit Schilf überwachsen. Aus diesem Grund mussten sie daher vollständig ausgehoben und erneut mit Kies befüllt werden. Am 27. Mai 2005 wurde eine Bahn mit *Eichhornia crassipes* bepflanzt. Hierfür wurde das Kiesbett mit einer 0,3 m hohen Trinkwassersäule überstaut und mit 120 der Wasserpflanzen mit einem mittlerem Gewicht von ca. 16 g auf der Wasseroberfläche bestückt. *Eichhornia* bedeckte damit zu diesem Zeitpunkt weniger als 1/5 der Gesamtoberfläche. Nach ca. 40 Tagen war die Wasseroberfläche im Juli vollständig mit *E. crassipes* bedeckt (Abb. 2.7). Die zweite Bahn im System diente als unbepflanzte Kontrolle mit offener Wasseroberfläche.

Wie schon in der Einleitung erwähnt stellt *Eichhornia* nach Ausbildung der Dominanzstruktur das Wachstum ein (vgl. Kap. 1.1.4). Vielmehr führt intraspezifische Konkurrenz zur Größen- und Gewichtszunahme der Pflanzen. Damit fand während des gesamten Versuchszeitraums eine Zunahme der Biomasse im System statt. Da dieser Biomassezuwachs nicht exakt ermittelt werden konnte ohne massiv in die dichte Pflanzendecke einzugreifen, wurde der Zuwachs „minimal-invasiv“ durch Fotodokumentation festgehalten. Ferner wurde außerdem die Fitness der Hyazinthendecke an jedem Versuchstag durch Nahaufnahmen der 4 Beckenabschnitte dokumentiert. Die Gesamt-Oberfläche einer Bahn betrug jeweils 4,2 m².

An jeder der vier Probe-Entnahmestellen in der Bahn (vgl. Abb. 2.5a) wurden nach Abschluss der Studien ca. 1 kg Wasserhyazinthen entnommen, gewogen, Blätter und Wurzeln voneinander getrennt und bis zur Gewichtskonstanz bei 55 °C getrocknet. Anschließend wurden Blätter und Wurzeln der Pflanzen einer Probe-Entnahmestelle voneinander getrennt, gründlich mit einem Stabmixer homogenisiert und mit den beschriebenen Methoden der Kupfergehalt ermittelt.



Abbildung 2.7: AMOVA 2005; links: 16.06.2005, 20 Tage nach Ausbringung; rechts: 14.07.2005, 48 Tage nach Ausbringung der Wasserhyazinthen (Blickrichtung vom Ablauf); Die jeweils linke Bahn ist die unbewachsene Kies-Kontrolle. Zum Ende der Vegetationsperiode 2005 wurden gegen Anfang Oktober die Versuche eingestellt. Zu diesem Zeitpunkt waren die nächtlichen Temperaturen schon deutlich zu gering für die tropischen Pflanzen, sodass diese bereits teilweise chlorotisch wurden.

Tabelle 2.2: Nährsalzgabe im *Eichhornia* Becken 2005

Nährsalz	Datum / Einwaage (g)				
	16.06.05	20.06.05	12.07.05	25.07.05	<u>Summe</u>
MgSO ₄ ·7H ₂ O	98	98	50	400	646
KNO ₃	71	20	35	140	256
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	154	–	30	160	344
KH ₂ PO ₄	21	10	15	80	126
H ₃ BO ₃	–	0,6	–	–	–
MnCl ₂ ·4H ₂ O	–	0,4	–	–	–
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	–	0,05	–	–	–
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	–	0,02	–	–	–
CuSO ₄ ·5H ₂ O	–	0,02	–	–	–
FeCl ₃ ·6H ₂ O	7	2	2	7	18
EDTA	25	7	7	25	64

Für die Bestimmung der Gesamtbiomasse im System wurden alle restlichen Wasserhyazinthen entnommen und nach dem Abtropfen das Frischgewicht ermittelt. Im Mai 2006 wurden erneut Wasserhyazinthen im Becken ausgesetzt. Aufgrund geringer Temperaturen im Mai und

Juni und anschließender Algenblüte, welche zu erhöhten pH im Becken führte, verzögerte sich allerdings das Wachstum der Pflanzen, sodass das Becken erst gegen Ende Juli nach einer Periode mit überdurchschnittlich hohen Temperaturen mit den Schwimmpflanzen überwachsen war.

2.5.2 Applikationen und Proben-Entnahme

Insgesamt wurden in der AMOVA 2005 im Zeitraum vom 14. Juli bis zum 3. Oktober 9 Versuche mit 12 Applikationen durchgeführt. 2006 wurde lediglich einmal am 12. September Natriumcyanid appliziert. Das Natriumcyanid wurde hierfür vor der Applikation in 30 L Trinkwasser gelöst. Aus Sicherheitsgründen wurde die Cyanid-Applikationslösung immer auf pH 11 eingestellt, um eine Ausgasung von HCN zu vermeiden. Beim Lösen des Natriumcyanids wurde zusätzlich immer unter Atemschutz gearbeitet. Diese Sicherheitsvorkehrungen waren bei der Arbeit mit dem hochtoxischen Cyanid unerlässlich! Beispielsweise wurde bei der letzten Cyanidgabe 2005 26,5 g NaCN appliziert. Diese Menge reicht aus um mehr als 50 Erwachsene mit einem durchschnittlichem Körpergewicht von 80 kg binnen Sekunden zu töten!

Der hohe pH-Wert der Lösung simulierte überdies die gleichfalls alkalischen Bergbauabwässer (pH 10–11). Die Applikationen wurden meist über einen Zeitraum von ca. 18 h über Nacht bei einer definierten Flussrate vorgenommen. Die variablen Versuchsparameter der Applikationen werden im Kapitel Ergebnisse & Diskussion erläutert. Im zeitlichen Verlauf der Experimente wurde die Cyanid-Belastung des Systems stetig durch höhere Cyanid-Einwaagen und kürzere Zeitintervalle zwischen den Applikationen erhöht. Am Ende des Versuchszeitraumes wurden noch zweimal Cyanid und Kupfer gemeinsam appliziert, um auch im halbtechnischen Maßstab die Kupferabsorption unter Cyanid-Einfluss zu untersuchen. Am 6.10.2005 wurden die Pflanzen entnommen und gewogen. Das Frischgewicht betrug zu diesem Zeitpunkt 68,3 kg.

Die Becken wurden über die gesamte Länge bei 0,5, 2, 4 und 6 m nach dem Einlauf beprobt (Abb. 2.5b). Bei der Beprobung wurde jeweils an den markierten Probe-Entnahmepunkten in Wurzelbereich *Eichhornias* 50 mL Probe genommen. Im Kontrollbecken erfolgte die Proben-Entnahme entsprechend. Zusätzlich wurde das Wasser im Kieskörper beprobt. Hierfür waren an 3 Probe-Entnahmestellen 0,6 m lange PE Rohre in das Becken eingelassen, aus denen entsprechende Probevolumina abgesaugt werden konnten. Ferner wurde jeweils am Ablauf an einem zweiten Abflussventil eine Probe genommen. Für die Cyanidanalytik wurde der pH der Proben mit 1 N NaOH auf pH 11 reguliert und die Proben bis zum photometrischen Nachweis

maximal 18 h bei 6 °C aufbewahrt. Der Cyanidgehalt der Proben blieb unter den genannten Bedingungen mehrere Tage konstant. Bei den Probe-Entnahmen wurde zudem die Wassertemperatur, der Wasserstand und der pH in den Becken notiert. Zusätzlich wurden in den Becken regelmäßig die Leitfähigkeit und der Sauerstoffgehalt bestimmt. Die Wetterdaten Niederschlag, Sonneneinstrahlung, Windgeschwindigkeit, Temperatur und Luftfeuchtigkeit wurden von der meteorologischen Station des Forschungszentrum Jülich bezogen.

2.5.3 Hydraulische Eigenschaften

Multimeter mit Leitfähigkeitselektrode und integrierter Datenspeicher; WTW
NaCl; Merck KGaA

Die Hydrologie einer Pflanzenkläranlage beeinflusst im starken Maße ihr ökotechnisches Potential. Während es in bewachsenen Bodenfiltern jedoch zu Verstopfungen und preferential flow im bewachsenen Bodensubstrat kommen kann, sind diese Phänomene im Teichverfahren zu vernachlässigen. Aufgrund der Wasserführung des Systems, die im Wesentlichen über die freie Wassersäule stattfindet, wurde daher nicht die hydraulische Leitfähigkeit, sondern die Verweildauer des Wassers als maßgebliche hydrologische Kenngröße bestimmt.

Die Verweildauer des Wassers wird experimentell über Zugabe von Markierungsstoffen (Tracer) ermittelt (Beyer 1964). Der Tracer muss bestimmte Mindestanforderungen erfüllen (Pauly 1989):

- Keine Beeinflussung der Dichte oder der Viskosität des Wasserkörpers
- Vernachlässigbare Konzentration in der Matrix
- Chemische, biologische und physikalische Stabilität
- Gute quantitative analytische Erfassbarkeit mit geringer Nachweisgrenze
- Gute Wasserlöslichkeit oder Dispergierbarkeit

Unter den gebräuchlicheren Tracern werden oftmals Fluoreszenzfarbstoffe wie Uranin eingesetzt, die sich aufgrund geringer adsorptiver Eigenschaften und geringer Nachweisgrenzen ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$ für Uranin) besonders eignen (Stengel 1993a, Schultz-Hock 1994). Tatsächlich neigen diese Farbstoffe dennoch zur Adsorption und können in systemeigene Reaktionen miteinbezogen sein. Insbesondere Uranin unterliegt der photolytischen Zersetzung bei UV-Einstrahlung und scheidet damit als Tracer für offene Wasserflächen aus (Rogers 1958, Davis *et al.* 1980). Dementsprechend wurde Uranin in vorangegangenen Arbeiten mit nur mäßigem Erfolg in der AMOVA eingesetzt. Goedeking (1994) erzielte in der AMOVA nur eine Wiederfindungsrate von weniger als 50%. In der gleichen Arbeit wurde darauf erfolgreich Kaliumchlorid als Tracer verwendet.

Bei Markierungsversuchen kann der Tracer entweder als Stufenmarkierung oder als Impulsmarkierung eingesetzt werden. Bei der Stufenmarkierung wird der Tracer im Zulauf auf eine bestimmte Konzentration eingestellt bis diese auch im Auslauf erreicht ist. In der vorliegenden Arbeit wurde das Impulsverfahren mit kontinuierlicher Einspeisung verwendet, bei dem der Tracer als Impuls über einen bestimmten Zeitraum appliziert und im Ablauf kontrolliert wird. Die mittlere Verweildauer des Wassers wird durch den Zeitpunkt bestimmt, an dem 50% des zugegebenen Tracers im Ablauf auftreten (Brehm und Meyering 1983, Beyer 1969). Da die Versuche im Kreislauf bei konstantem Volumen und Schüttung durchgeführt wurden, konnte die Verweildauer des Wassers als Quotient aus effektivem Volumen, also das tatsächlich durchströmten Volumen und der Flussrate ermittelt werden. Das Volumen wurde hierbei aus der Kochsalzkonzentration nach Versuchsende ermittelt. Die aufgezeichneten Leitfähigkeitskurven bei verschiedenen Flussraten dienten der empirischen Bestätigung und Veranschaulichung der berechneten Verweildauer des Wasserkörpers. In den anschließenden Versuchen zur Schadstoffreduktion wurden die Pegelstände festgehalten und in die Volumina umgerechnet. Die momentanen Volumina der Becken waren durch Niederschlag, Applikation, Evatranspiration und Evaporation unterschiedlichen Schwankungen unterlegen. Aus diesem Grund war es nicht möglich die Volumina in beiden Becken gleich bzw. konstant zu halten. Aus diesem Grund wurden die Volumina durch Bestimmung des Pegelstandes bei jeder Proben-Entnahme erfasst. Bei den ersten Versuchen zur Etablierung der Versuchsbedingungen (V.1–V.3) wurde das Volumen der Becken manipuliert. Volumendifferenzen der Becken wurden daher bei der Berechnung der Cyanidgehalte nicht berücksichtigt. Bei den nachfolgenden Applikationen jedoch, die der Untersuchung der Abbauleistung unter optimalen Bedingungen galten, wurden die Differenzen der Volumina in die Cyanid bzw. Kupferkonzentrationen des Kontrollbeckens eingerechnet, bzw. die Konzentration des Kontrollbeckens auf das Volumen des *Eichhornia*-Beckens umgerechnet. Somit war ein direkter Vergleich der Schadstoffkonzentrationen möglich.

Bei den Tracerversuchen wurde die Salzfracht unter den gleichen Bedingungen wie die Schadstoffe appliziert. Jeweils 300 g NaCl wurden in 30 L Trinkwasser gelöst und über einen Zeitraum von 15 h mit einer Förderleistung von 2 L h^{-1} appliziert. Während der Applikation und darüber hinaus wurde im relevanten Zeitraum die Leitfähigkeit der Systeme 15 Minuten-Intervall festgehalten bis diese sich nicht mehr veränderte. Die Leitfähigkeit wurde anschließend über eine Kalibrierreihe in die Kochsalzkonzentration umgerechnet.

2.6 Statistische Methoden

Die Anzahl der Replikate in allen Experimenten betrug mindestens 3, die jeweilige Anzahl ist den Diagrammen zu entnehmen. Jede chemische Bestimmung wurde in mindestens 2 Replikaten durchgeführt. Der Unterschied zwischen spezifischen Mittelwerten wurde durch einen beidseitigen T-Test festgestellt (signifikant bei $p < 0,05$). Die Effektivkonzentrationen wurden mit ToxRat Professional Version 2.09 (ToxRat Solutions) berechnet. Die Michaelis-Menten Parameter sowie alle linearen und nichtlinearen Regressionen wurden mit SigmaPlot (Windows Version 8.0) ermittelt. Ansonsten wurden alle Berechnungen mit Microsoft Excel (Microsoft-Office 2003) durchgeführt.

3. Ergebnisse und Diskussion

In Folgendem werden die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsaspekte zunächst im Einzelnen vorgestellt und anschließend diskutiert und zusammengefasst.

3.1 Toxikologische Untersuchungen

Als Resultat der toxikologischen Untersuchungen werden nachstehend die Ergebnisse der Transpirationsbestimmungen unter Schadstoffexposition bzw. der Kontrollversuche ohne Schadstoff dargestellt. Die Transpirationen sind wie im vorangegangenen Kapitel erläutert als relative Transpirationen RT in % der Ausgangstranspiration abgebildet. Der Ausgangswert (100%) bezog sich daher immer auf die Transpiration ohne Schadstoffexposition, die für jede Pflanze einzeln vor Schadstoffapplikation ermittelt wurde.

3.1.1 Ergebnisse

3.1.1.1 Kontrollversuche

Sowohl die Spezifikation des Cyanids als auch die des Kupfers zeigen in wässriger Lösung eine hohe pH-Abhängigkeit. In Folge kommt es zu Protonierungen, Dissoziationen, Fällungs- oder Komplexbildungsreaktionen. Damit war zu erwarten, dass sich pH-Differenzen direkt oder indirekt auch auf die Phytotoxizität hätten auswirken können. Um dies zu berücksichtigen, wurden die Kontrollversuche bei unterschiedlichen Ausgangs-pH-Werten durchgeführt. Der untersuchte pH-Bereich ohne Schadstoffapplikation wurde entsprechend den Behandlungen mit Kupfer bzw. Cyanid gewählt. In Abbildung 3.1 sind die Ergebnisse aus den Kontrollversuchen ohne Schadstoffe mit *E. crassipes* dargestellt. Bei der pH 6,5-Behandlung wurde zudem in einem Ansatz untersucht, ob eine Hoaglandlösung ohne Eisen sich negativ auf die Transpiration auswirkt. Die Ergebnisse sind als relative Transpiration RT in Abhängigkeit der Zeit dargestellt (Abb. 3.1).

Während und nach dem Versuchszeitraum von 72 h war bei keinen Pflanzen der Kontrollversuche eine morphologische Schädigung sichtbar. In allen Ansätzen betrug der pH der Lösung nach 72 h 6,5 bis 6,8. Weder bei den schwachsauren (pH 6,1) noch bei den schwachalkalischen (pH 8,5) Versuchsansätzen war eine signifikante Abnahme der relativen Transpiration über 72 h sichtbar. Nach 72 h zeigten die Pflanzen bei pH 6,1–6,5 sogar eine Erhöhung um 5–11%. Diese Erhöhung kann auf das Wachstum der Pflanzen und die damit verbundene Vergrößerung der Blattoberfläche während des Versuchszeitraums zurückgeführt werden. Beispielsweise bildeten die Pflanzen des Ansatzes pH 6,5 im Versuchszeitraum ca. jeweils ein neues Blatt mit einer mittleren Oberfläche von 8–10 cm². Tendenziell zeichnet sich ein pH-

Optimum im Bereich von pH 6,1–6,5 ab. Diese Tendenz war nicht signifikant ($p > 0,05$). Die Transpiration des Ansatzes pH 5,5 nach 72 h unterscheidet sich hingegen signifikant von den übrigen Behandlungen ($p \leq 0,03$). Hier war eine deutliche Reduktion der Transpiration um ca. 17% sichtbar. Zudem war die Transpiration im Ansatz ohne Eisen signifikant erniedrigt ($p = 0,03$).

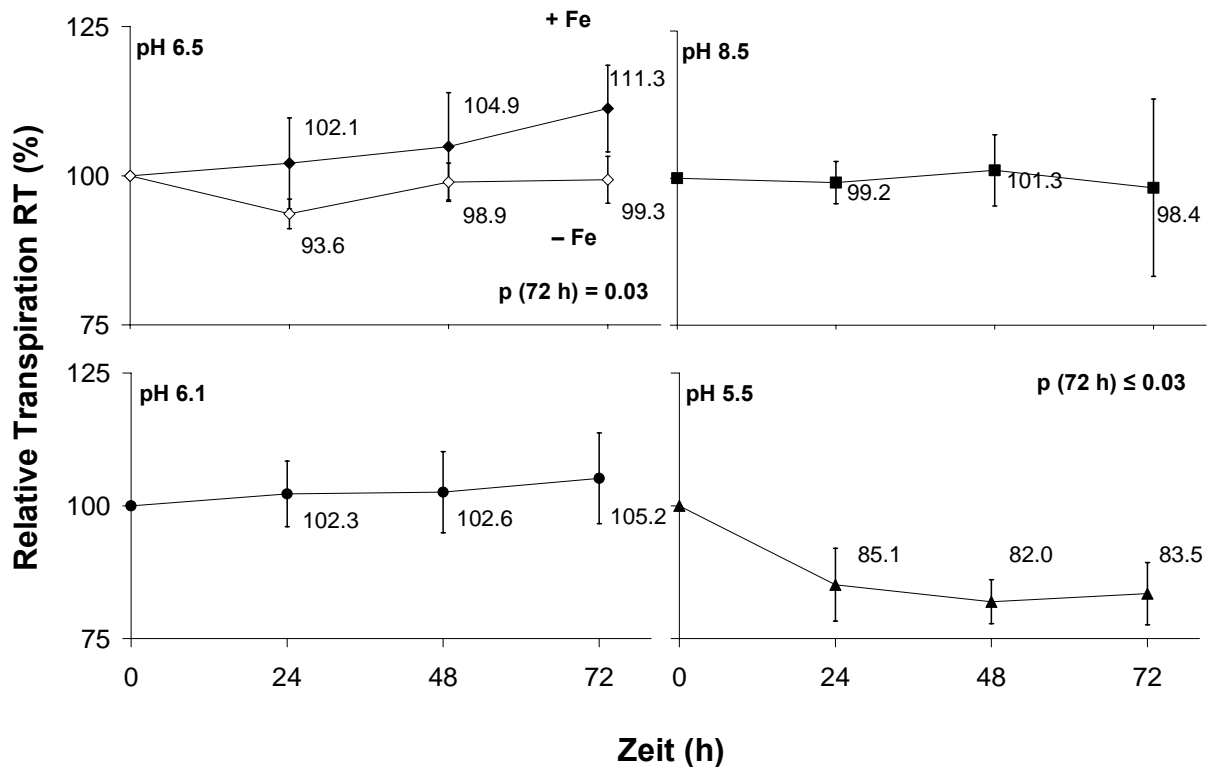


Abbildung 3.1: Relative Transpiration RT der Wasserhyazinthe *E. crassipes* in Hoaglandlösung unter verschiedenen pH-Bedingungen nach 0–72 h; Der Wert t_0 bezieht sich auf die relative Ausgangs-Transpiration (=100%) der Pflanzen bei neutralem pH. Die Irrtumswahrscheinlichkeiten p beziehen sich auf die Signifikanz der betreffenden Resultate nach 72 h. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von $n = 5$.

3.1.1.2 Cyanid

In Abbildung 3.2 sind die relativen Transpirationen der Wasserhyazinthen bei verschiedenen Cyanidkonzentrationen dargestellt. Der Initial-pH der Lösung betrug pH 8,5. Die relativen Transpirationen nach 72 h unterschieden sich in jeder Behandlung signifikant von der Kontrolle ohne Cyanid ($p < 0,01$). Höhere Cyanid-Konzentrationen führten zu geringeren Transpirationen. Bei der geringsten Konzentration (5 mg CN L^{-1}) war die Transpiration nur geringfügig reduziert und die Pflanzen überlebten den Versuch ohne erkennbare morphologische Schädigungen. Bei den höheren Konzentrationen entwickelten die Pflanzen Chlorosen und die Blätter welkten teilweise nach 48 h. In der 10 mg CN L^{-1} Behandlung überlebten alle Pflanzen, verloren aber teilweise bis zu 75% der Blätter (Welken / Austrocknen). Alle Pflanzen der

50 mg CN L⁻¹ Behandlung und 60% der Pflanzen in der 20 mg CN L⁻¹ Behandlung waren nach 72 h Exposition abgestorben. Das Welken und Absterben führte auch zu einem zusätzlichen Gewichtsverlust der Systeme, der die Transpirationswerte hätte verfälschen können. Unter den gegebenen Versuchsbedingungen hielt sich dieser Effekt aber noch in Grenzen, da zum einen die Blätter aufgrund der sehr hohen Luftfeuchtigkeit im Phytotron (80%) nur langsam und über den Versuchszeitraum nicht vollständig austrockneten.

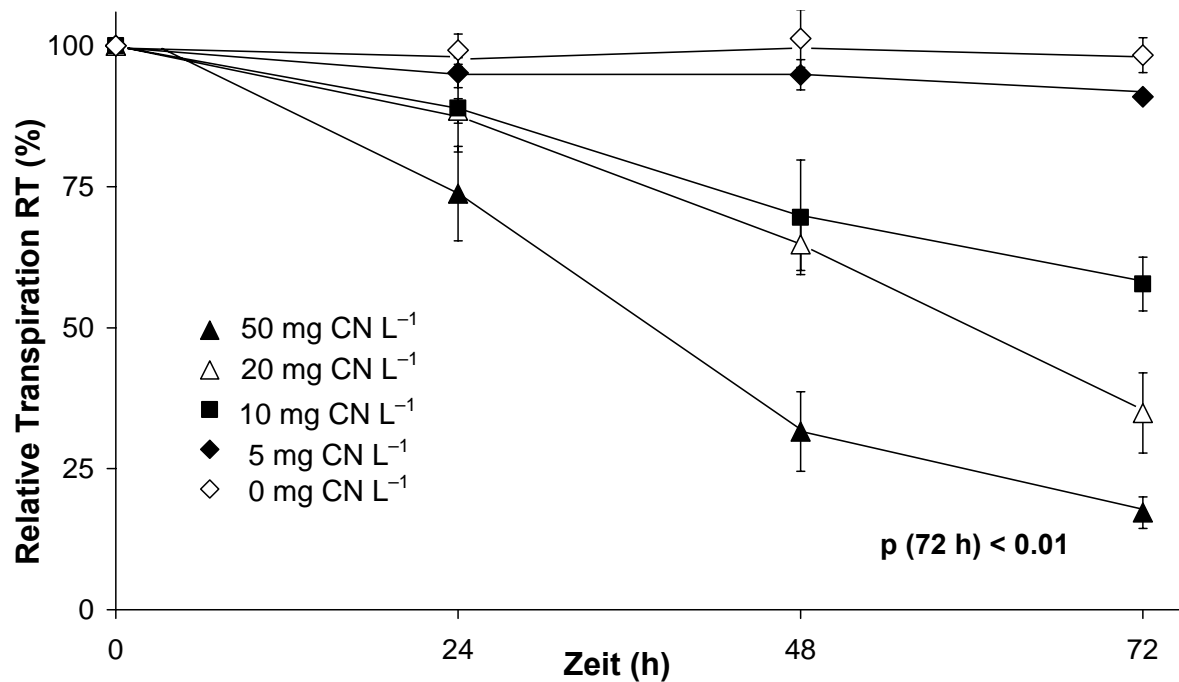


Abbildung 3.2: Relative Transpiration RT der Wasserhyazinthe *E. crassipes* in Hoaglandlösung bei verschiedenen Cyanid – Konzentrationen nach 0–72 h bei pH 8,5; Die Irrtumswahrscheinlichkeiten p beziehen sich auf den Vergleich mit der relativen Transpiration ohne Cyanid bei pH 8,5 nach 72 h. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von $n = 5$.

Um auch in diesen Ansätzen die mögliche Auswirkung des pH-Wertes experimentell mit einzubeziehen, wurden auch einige Ansätze bei pH 6,5 durchgeführt. Die Ergebnisse werden den Resultaten aus der Inkubation bei pH 8,5 nach 72 h in Abbildung 3.3 gegenübergestellt. Um den Einfluss des pH's auf die Wasserhyazinthen zu berücksichtigen, wurden die relativen Transpirationen mit den jeweiligen Kontrollen normiert. Die Resultate sind demnach als normierte relative Transpirationen abgebildet. Zudem ist in Abbildung 3.3 die Transpiration unter Eisenmangel als zusätzlichen Stressfaktor dargestellt. Bei 5 mg CN L⁻¹ zeigten die Pflanzen bei pH 6,5 eine signifikant ($p = 0,05$) höhere Transpiration als bei pH 8,5. Dieser Befund bestätigte die Tendenz aus den Kontrollversuchen und somit das beschriebene pH – Optimum zwischen pH 6 und 7. Bei den höheren Konzentrationen 10 und 20 mg L⁻¹ kehrte sich das Verhältnis um. Die Pflanzen zeigten signifikant ($p \leq 0,01$) erniedrigte Transpirationen bei

pH 6,5. Wenn kein Eisen in der Nährlösung war, zeigte sich zudem eine deutlich reduzierte Transpiration bei pH 6,5.

Die EC_x –Berechnungen wurden mit der relativen Transpiration der Wasserhyazinthen nach 72 h Exposition (= Endpunkt) aus der Inkubation bei pH 8,5 durchgeführt (Tabelle 3.1). Beide Regressionsmodelle lieferten signifikante Kurvenanpassungen ($p < 0,04$).

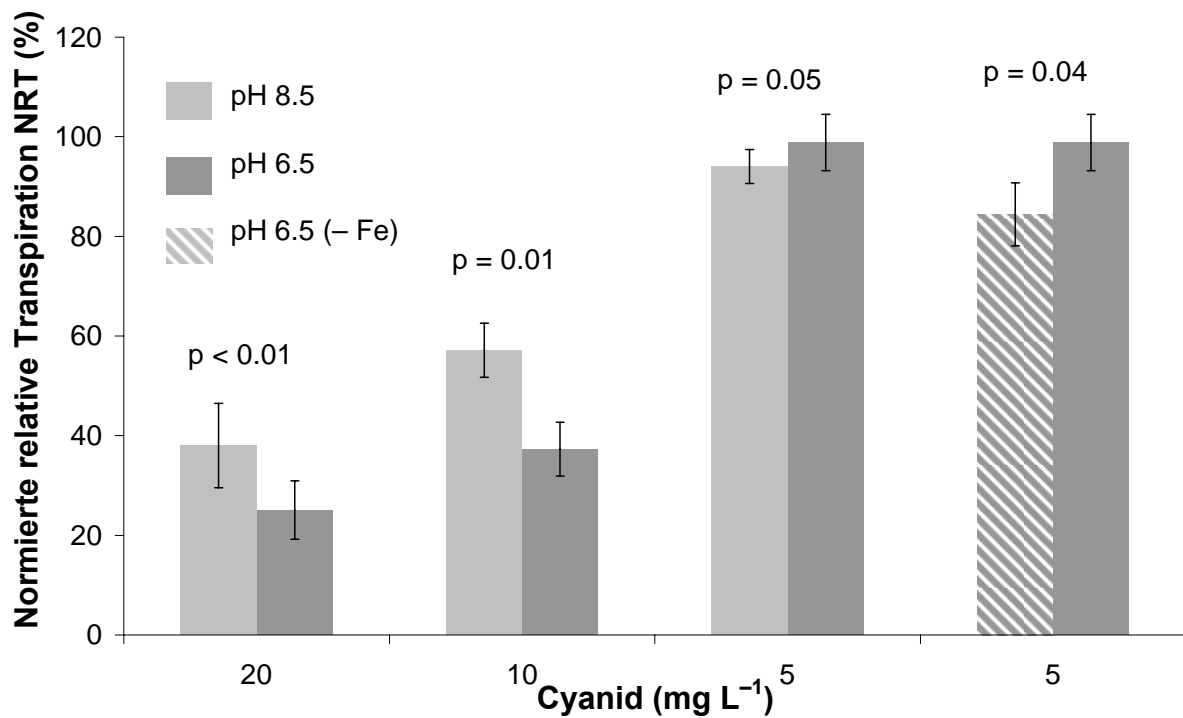


Abbildung 3.3: Mit den Kontrollansätzen normierte relative Transpirationen der Wasserhyazinthen (in % der Ausgangstranspiration / % Kontrolltranspiration nach 72 h) in Hoaglandlösung bei verschiedenen Cyanid-Konzentrationen und Initial-pH; Die Irrtumswahrscheinlichkeiten p beziehen sich auf den Vergleich der normierten relativen Transpirationen bei gleicher Cyanidkonzentration aber unterschiedlichem pH. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von $n = 5$.

Tabelle 3.1: EC_x -Werte (mg CN L⁻¹) für *E. crassipes* in hydroponischer Lösung

Methode	EC_{50} (mg CN L ⁻¹)	EC_{20} (mg CN L ⁻¹)	EC_{10} (mg CN L ⁻¹)	p	R^2
Probit Lineare Regression	13,0	4,7	2,7	0,034	93,2
2 Parameter logistische lineare Regression	12,8	4,6	2,6	0,037	92,8

Berechnet aus der relativen Transpiration nach 72 h Cyanidexposition (vgl. Abb. 3.2). Bei den Toxizitätsbestimmungen wurden die Pflanzen einmalig Cyanid exponiert. Adaptionsprozesse konnten somit ausgeschlossen werden.

3.1.1.3 Kupfer

Die Kupfertoxizität wurde pH-abhängig bei pH 5,5 und pH 6,1 untersucht. Bei pH 6,1 lösen sich maximal 20 mg L^{-1} Kupfer in der Hoaglandlösung. Oberhalb dieser Konzentration kommt es zur Ausfällung von Kupfer als Kupfer(II)hydroxid und Kupfer(II)phosphat. Demzufolge konnte bei pH 6,1 die Transpiration bei 50 mg Cu L^{-1} nicht bestimmt werden. Die signifikant hemmende Wirkung bei pH 5,5, die in den Kontrollversuchen ermittelt worden ist, wurde in diesen Versuchen experimentell berücksichtigt. Daher wurden die Pflanzen in der pH 5,5 Behandlung vor der Kupferapplikation auch bereits bei pH 5,5 vorinkubiert, womit eine Normierung der relativen Transpirationen mit den Kontrollansätzen umgangen werden konnte. Außerdem wurde die Auswirkung der gemeinsamen Applikation von Cyanid und Kupfer untersucht. Wenn zusätzlich freies Cyanid in der Lösung zugegen ist, löst sich das Kupfer aufgrund der Komplexbildung pH-unabhängig. Demgemäß konnte in diesen Ansätzen neben pH 6,1 auch pH 8,5 untersucht werden, was die alkalischen Bergbauabwässer besser repräsentierte (Abb. 3.4). Die EC_x -Werte für Kupfer wurden aus der relativen Transpiration der Wasserhyazinthen nach 72 h Exposition errechnet (Tab. 3.2).

Kupfer erniedrigte die Transpiration der Wasserhyazinthen. Höhere Konzentrationen zeigten generell eine stärkere Reduktion der Transpiration. Lediglich in den Ansätzen mit pH 6,1 zeigten die Pflanzen der 20 mg Cu L^{-1} Applikation eine höhere relative Transpiration RT. Bei pH 6,1 wurden im Vergleich tendenziell (mit Ausnahme der 10 mg Cu L^{-1} Behandlung) höhere RT's sichtbar. Ab einer Konzentration von 10 mg Cu L^{-1} zeigten die Pflanzen in beiden pH-Behandlungen deutliche morphologische Symptome. Bei dieser Konzentration verloren die Pflanzen in der pH 6,1 Behandlung bis zu 40% der Blätter (Welken / Austrocknung). Wenn 5 mg Cu L^{-1} appliziert wurde, waren nur bei pH 5,5 ein einzelnes und nicht vollständiges Austrocknen der Blätter zu beobachten. Bei den Konzentrationen 20 und 50 mg Cu L^{-1} waren bei pH 5,5 nahezu alle Blätter ausgetrocknet. Bei pH 6,1 verloren die Pflanzen in der 20 mg Cu L^{-1} Applikation ca. 40–50% der Blätter. Die Ergebnisse der EC_x -Bestimmungen finden sich in Tabelle 3.2. Beide Regressionen lieferten sehr ähnliche und signifikante Resultate.

Bei pH 6,1 führte das zusätzlich applizierte Cyanid sowohl bei 5 mg Cu L^{-1} als auch bei 10 mg Cu L^{-1} zu signifikant erniedrigten relativen Transpirationen ($p < 0,05$). Die Pflanzen in der höher konzentrierten Lösung büßten ca. 90% der Blätter ein, während die mit 5 mg Cu L^{-1} und 5 mg CN L^{-1} inkubierten Pflanzen ausnahmslos überlebten und ca. 20% der Blätter verloren. Diese toxische Wirkung war nicht bei pH 8,5 zu beobachten. Im Vergleich zur Behandlung bei pH 6,1 zeigten die Pflanzen nur geringfügig reduzierte (5 mg Cu L^{-1}) oder erhöhte

Werte (10 mg Cu L^{-1}). In diesen Behandlungen überlebten alle Pflanzen mit nur minimal sichtbaren Schädigungen.

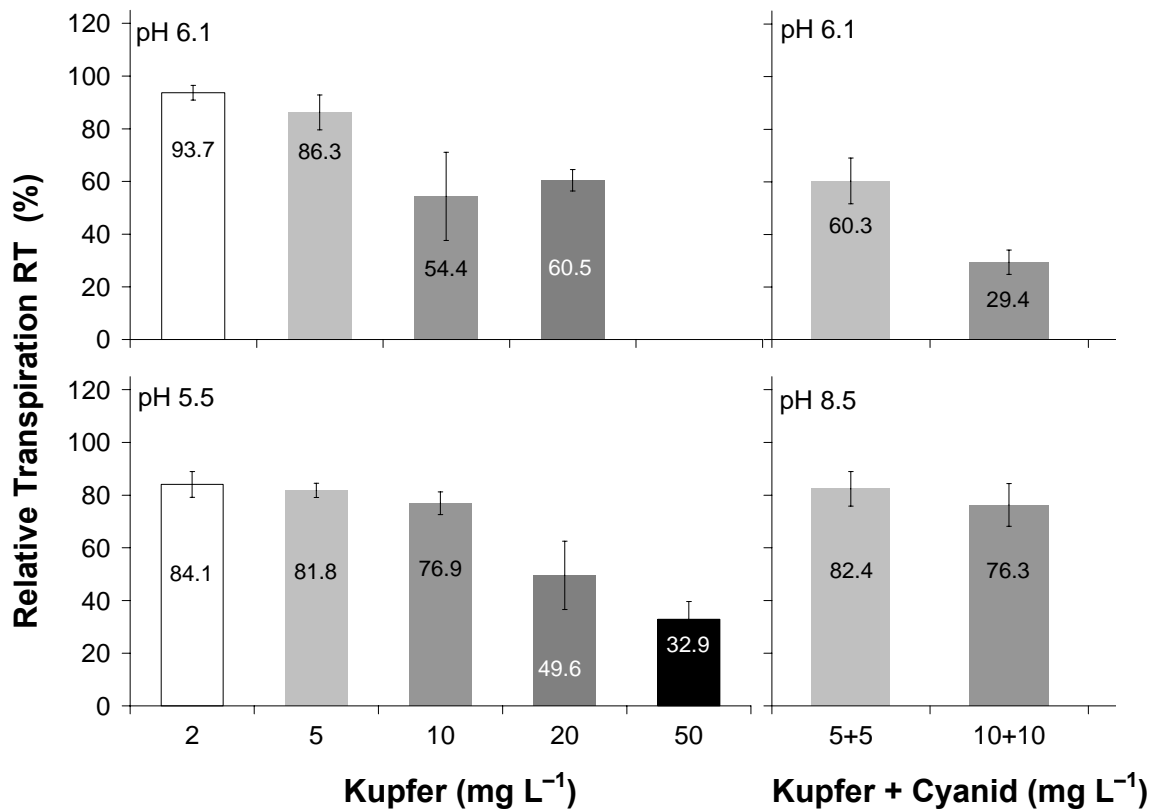


Abbildung 3.4: Relative Transpirationen der Wasserhyazinthen in Hoaglandlösung nach 72 h bei verschiedenen Kupfer-Konzentrationen bzw. Kupfer- und Cyanidkonzentrationen und unterschiedlichem Initial-pH; Bei pH 6,1 konnten 50 mg Cu L^{-1} nicht mehr gelöst werden. Dementsprechend konnten bei pH 6,1 die relativen Transpirationen nur bis maximal 20 mg Cu L^{-1} bestimmt werden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von $n = 5$.

Tabelle 3.2: EC_x -Werte (mg Cu L^{-1}) für *E. crassipes* in hydroponischer Lösung

Methode	EC_{50} (mg Cu L^{-1})	EC_{20} (mg Cu L^{-1})	EC_{10} (mg Cu L^{-1})	p	R^2
Probit Lineare Regression	29,8	13,1	8,5	0,007	93,8
2 Parameter logistische lineare Regression	29,8	13,1	8,1	0,01	92,0

Berechnet aus relativer Transpiration nach 72 h Kupferexposition bei pH 5,5 (vgl. Abb. 3.4). Die Pflanyen wurden nur einmalig mit Kupfer behandelt. Adaptionprozesse konnten somit ausgeschlossen werden.

3.1.2 Diskussion der toxikologischen Resultate

3.1.2.1 Kontrollversuche

Die Kontrollversuche wurden bei unterschiedlichen pH-Bedingungen zu Versuchsbeginn durchgeführt. Das pH-Optimum lag bei ca. pH 6–7. Bei pH 5,5 war ein hemmender Effekt zu beobachten. Wenn Eisen in der Nährlösung fehlte, kam es auch zu einer signifikanten Senkung der relativen Transpiration.

Die Auswirkungen unterschiedlicher pH-Werte auf *E. crassipes* sind gut untersucht. Parija (1934) beobachtete optimales Wachstum bei einem pH zwischen 6 bis 8. In saurerem oder alkalischerem Milieu neigten die Pflanzen dazu, den pH der Lösung entsprechend einzuregeln. Berg (1961) ermittelte in experimentellen Studien hochtoxische Effekte bei pH 4,0 und optimales Wachstum zwischen pH 5–7. Balasooriya *et al.* (1983) erfassten entsprechend ein Wachstumsoptimum zwischen pH 6–7 und 26–35 °C. El-Gendy *et al.* (2004) beobachteten optimales Wachstum zwischen pH 5,8–6,0. Sie führten das Wachstumsoptimum im schwach-sauren Bereich auf eine bessere Verfügbarkeit der Nährsalze zurück, die bei höheren pH-Werten als schwerlösliche Salze gefällt werden (z.B. FePO_4) oder ausgasen (NH_3) könnten. In der gleichen Studie wurde auch die Effizienz der Stickstoffreduktion aus der Nährlösung mit Ammonium und Nitrat untersucht. Sie fanden hier ein Optimum bei pH 6,9.

Die in den eigenen Experimenten ermittelten erhöhten Transpirationen im Bereich pH 6,1–6,5 sowie die Reduktion der Transpiration bei pH 5,5 stimmen demnach mit den beschriebenen Präferenzbereich aus der Literatur überein. Die Transpiration kann aber im Vergleich zum Wachstum als der empfindlichere Parameter angesehen werden, da sich hemmende Effekte deutlicher und vor allem in kürzeren Zeiträumen abzeichnen. Die leicht erniedrigte Transpiration durch das Fehlen von Eisen in der Nährlösung in einem so kurzen Zeitraum wird nicht in der Literatur für Wasserhyazinthen beschrieben. Bei längerem Eisenmangel fehlt das Metall als Cofaktor beim Chlorophyllaufbau, so dass der Mangel nach ca. 2 Wochen durch Chlorosen deutlich wird (Gopal und Sharma 1981).

3.1.2.2 Cyanid

Die Phytotoxizität der Blausäure wurde bei pH 6,5 und pH 8,5 untersucht. Tendenziell reagierten die Wasserhyazinthen auf die Cyanidgabe bei dem geringeren pH-Wert empfindlicher. Ferner zeigte sich auch eine erhöhte Toxizität, wenn in der Nährlösung Eisen fehlte.

Die höhere Toxizität bei geringeren pH Werten (Abb. 3.3) erscheint plausibel, wenn man die Spezifikation des freien Cyanids in die Überlegungen einbezieht. Während bei pH 6,5 noch 100% der Blausäure als ladungsneutrales HCN vorliegen, finden sich bei pH 8,5 bereits

13,4% Cyanid-Ionen in Form negativer Ladungsträger. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass undissoziiertes HCN von den Pflanzen besser aufgenommen wird und sich somit toxischer auswirken könnte. Die Phytotoxizität von Cyanid unter unterschiedlichen pH-Bedingungen wurde bisher nicht untersucht und ist daher nicht durch die Literatur belegt.

Die deutlich geringere Transpiration der Wasserhyazinthen in der eisenfreien Lösung könnte auf zwei Phänomene zurückzuführen gewesen sein. Einerseits hätte der Eisenmangel zu einem zusätzlichen Stress für die Pflanze führen können. Diese Hypothese wurde durch die Kontrollversuche bestätigt. Zum anderen könnte das Eisen selbst auch die Cyanid-Toxizität senken: Die Konzentration an Eisen in der Lösung betrug $17,9 \mu\text{mol L}^{-1}$. Die Cyanidkonzentration betrug in einer Lösung mit 5 mg L^{-1} $192 \mu\text{mol L}^{-1}$. Damit ergab sich ein molares Verhältnis von ca. 1:11. Falls sich über den Versuchszeitraum das EDTA-komplexierte Eisen mit dem freien Cyanid vollständig zu dem weit weniger toxischen Hexacyanoferrat umgesetzt hätte, hätten somit nur noch ca. 45% des Cyanids als freies Cyanid in der Lösung vorgelegen. Damit wäre auch eine geringere Toxizität zu vermuten. Auch der Einfluss einer Eisenquelle auf die Cyanid-Phytotoxizität wurde bisher nicht erforscht. Die einschlägigen Untersuchungen auf dem Gebiet arbeiteten ausnahmslos mit eisenhaltiger Hoaglandlösung.

In der Literatur finden sich einige Arbeiten, die gleichfalls die Cyanid-Phytotoxizität mit dem Parameter Transpiration untersucht haben. Allerdings wurde in allen Studien mit Weiden gearbeitet. Dies hat zwei Ursachen: Zum einen wurden die Bäume tatsächlich auf mit Cyanoferaten belasteten Flächen festgestellt, was die Vermutung einer erhöhten Toleranz nahe legt (Trapp *et al.* 2001b) und zum anderen eignen sich Stecklinge von Weiden sehr gut für die experimentelle Transpirationsbestimmung per Masseverlust, da die Stecklinge sich ausgezeichnet in Erlenmeyerkolben verkorken lassen.

Trapp *et al.* (2001a) untersuchten die Transpiration von Korbweiden *Salix viminalis* unter Cyanidbelastung. Sie berechneten aus der Transpirationen einen EC_{10} von $0,8 \text{ mg CN L}^{-1}$ sowie einen EC_{50} von $4,5 \text{ mg CN L}^{-1}$. In weiteren Untersuchungen mit Korbweiden fanden Larsen *et al.* (2004) bei 2 mg CN L^{-1} eine 50%ige Erniedrigung der mit der Kontrolle normierten relativen Transpiration nach 72 h und eine 100%ige Mortalität bei 8 mg CN L^{-1} . In einer aufbauenden Studie wurde die Nährlösung durch Sand ersetzt, was eine drastische Erhöhung der Toleranz der Weiden gegenüber freiem Cyanid zur Folge hatte. Die Bäume zeigten keine Reduktion der Transpiration bis 10 mg CN L^{-1} und eine 50%ige Reduktion bei einer Konzentration von 20 mg CN L^{-1} (Larsen *et al.* 2005). Die Trauerweide *Salix babylonica* reagierte ähnlich (Yu *et al.* 2005a). Cyanid – Konzentrationen unterhalb von 1 mg L^{-1} zeigten keinen deutlichen Effekt, während bei $3,7 \text{ mg CN L}^{-1}$ die normierte relative Transpiration leicht abnahm.

Die berechneten EC_{50} -Werte lagen bei $8,2 \text{ mg CN L}^{-1}$ (nicht-lineare Regression) und $11,5 \text{ mg CN L}^{-1}$ (lineare Regression) und sind somit nur geringfügig geringer als die Werte für *Eichhornia*.

3.1.2.3 Kupfer

Die Phytotoxizität des Kupfers wurde unter verschiedenen pH-Bedingungen und mit zusätzlich appliziertem Cyanid untersucht. Tendenziell deutete sich eine Erhöhung der Kupfer-Toxizität bei geringerem pH der Nährlösung an. Wenn zeitgleich Cyanid appliziert wurde, kam es nicht zu einer Erhöhung, sondern zu einer Senkung der Toxizität. Die Schadstoffe zeigten also keine additive, sondern antagonistische Wirkung.

Die höhere Toxizität bei pH 5,5 kann wahrscheinlich nicht allein auf den pH zurückgeführt werden, da dieser bei der Ermittlung der Bezugstranspiration berücksichtigt wurde. Eine mögliche weitere Erklärung wäre, dass die Pflanzen bei erniedrigtem pH mehr verfügbares Kupfer aufnehmen. Diese Hypothese wird durch Abbildung 3.5 gestützt.

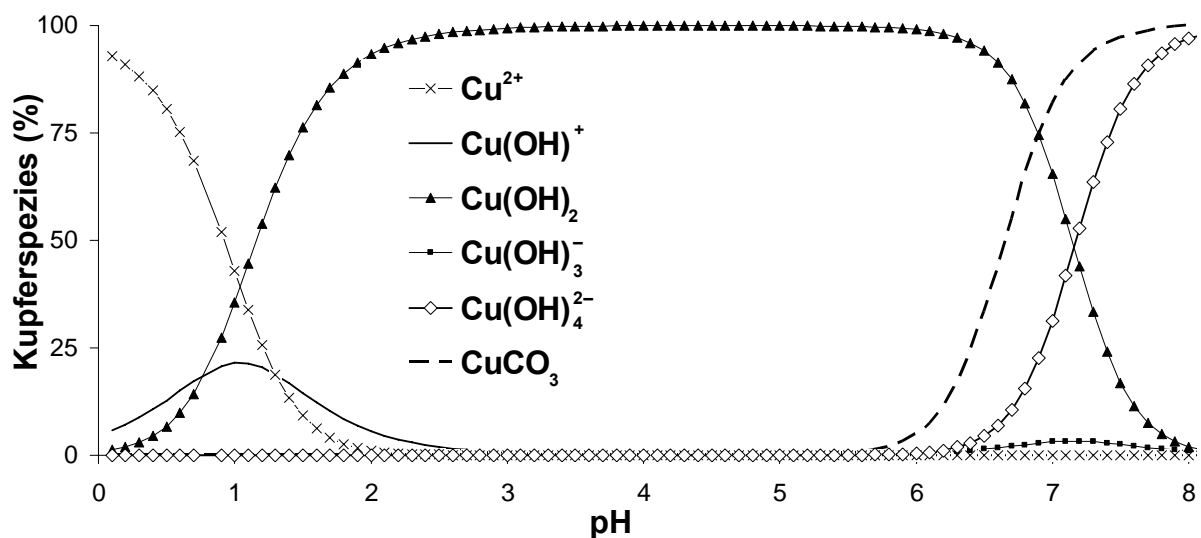


Abbildung 3.5: Berechneter Anteil der Kupfer(II)spezies in Lösung als Funktion des pH. Die thermodynamische Datenbasis wurde Ball und Ordstrom (1991), Courpron (1967) und Schweingruber (1981) entnommen.

Die dominante Kupfer-Spezies zwischen pH 3 und 6 ist der ladungsneutrale Hydroxokomplex (Abb.3.5). Ab pH 6 dominieren die anionischen Komplexe. Fällungsreaktionen können bei dieser Betrachtung aufgrund der Konzentrationsabhängigkeit vernachlässigt werden. Zusätzlich wurde exemplarisch das Kupferkarbonat als gelöstes Salz in karbonatgesättigter Lösung dargestellt. Wie die Abbildung verdeutlicht, dominieren ab pH 6–6,5 Kupferspezies, die sich aufgrund der Ladung und/oder des Radius (Hydrathülle) stark vom Dihydroxokupfer unterscheiden. Aufgrund dessen könnte die Cu-Aufnahme in den Wurzel-Apoplasten *E.*

crassipes gehemmt sein. Gleiches gilt für die Übertragung in den Symplasten der Wurzeln. Beide Phänomene würden sich in einer geringeren Toxizität äußern. Die gleiche These würde auch die geringere Toxizität der zeitgleichen Cyanid- und Kupfer-Applikation erklären. Bei pH 6,1 liegt das Cyanid ausschließlich als undissoziierte Blausäure vor. Als Konsequenz bildet sich der Cyanokomplex nicht direkt aus dem Anion. Bei pH 8,5 dagegen steht das Cyanidion zur Komplexbildung zur Verfügung. Die dominante Spezies ist also aller Wahrscheinlichkeit nach gleichfalls eine Kupferspezies, die sich in Radius und Ladung deutlich differenziert und somit schlechter über die Wurzeln aufgenommen werden könnte. Wenn dem so ist, sollte dies durch die Kupferbestimmungen in Lösung und Gewebe bestätigt werden. Ein ähnlicher Befund wurde auch in ökotoxikologischen Studien mit *Lemna minor* und Applikation von Kupfer in Kombination mit dem Herbizid Diuron erzielt (Teisseire *et al.* 1999). Beide Substanzen wirkten sich additiv aus. Bei bestimmten Konzentrationsverhältnissen aber zeigte sich ein leichter Antagonismus, der vielleicht gleichfalls auf eine gehemmte Aufnahme durch Komplexbildung hindeutet.

Während in der Literatur einige Arbeiten zur Kupferabsorption aus Nährlösung mit *E. crassipes* zu finden sind, dokumentiert keine Arbeit ausreichend die Toxizität. In der Mehrheit der Untersuchungen wird diese vollkommen außer Acht gelassen. Soltan und Rashed (2003) berichten von Blattschädigungen *Eichhornias* in Folge von Schwermetallexposition. Sie konnten bis zu einer Konzentration von 5 mg Cu L⁻¹ keine Symptome nach 72 h feststellen, während die Pflanzen bei 10 und 50 mg Cu L⁻¹ nahezu vollständig eingingen. Satykala und Kaiser (1993) untersuchten die Reaktion der Chloroplast-Enzyme Superoxid-Dismutase und Glutathion-Reduktase *Eichhornias* auf Kupfer und Chrom. Sie stellten eine Inhibition beider Enzyme durch Kupfer fest und folgerten eine mögliche Toxizität durch einen Überschuss an freien Sauerstoffradikalen.

Heale und Ormrod (1982) stellten sichtbare Toxizitätssymptome mit Weiden bei 4 und 20 mg Cu L⁻¹ fest. Symeonidis *et al.* (1985) fanden bereits bei 64 µg Cu L⁻¹ eine 50–60%ige Hemmung des Wurzelwachstums bei *Agrostis capillaris*. *Chrysanthemum morifolium* zeigte unter Kupferapplikation eine 13%ige Reduktion des Trockengewichts der Blätter und eine 45%ige Reduktion bei den Wurzeln. Die maximale Kupferkonzentration der Trockensubstanz betrug 57 µg Cu kg⁻¹. Auch die Wurzeln von *Lolium perenne* zeigten eine ausgeprägte Reaktion auf Kupfer. Nur 20 µg L⁻¹ Kupfer in der Nährlösung führten zu einer Hemmung des Wurzelwachstums um 50% (Wong 1982). *Brassica pekinensis* zeigte auch bereits bei Kupferkonzentrationen unter 1 µg L⁻¹ deutliche Wachstumshemmungen sowie eine Hemmung des N-Stoffwechsels (Xiong und Geng 2006).

3.1.3 Zusammenfassung: Toxikologische Untersuchungen

Die Ergebnisse der Kontrollansätze zeigten keinen negativen Einfluss des Versuchsaufbaus auf die Transpiration und die Fitness der Pflanzen. Bei einem pH von 5,5 sollte aber bei der Bewertung der toxikologischen Ergebnisse eine erniedrigte Transpiration der Pflanzen, die auf den pH und nicht auf die Schadstoffe zurückzuführen ist, berücksichtigt werden. *E. crassipes* reguliert den pH des umgebenen Mediums zum Wachstumsoptimum. Bei der Klärung alkalischer Abwässer wäre demnach unter der Voraussetzung, dass die Pflanzen nicht nachhaltig geschädigt werden, damit zu rechnen, dass der pH sich nach einem gewissen Zeitraum bei pH 6–7 einpendelt. Unter diesen Bedingungen sollten die Wasserpflanzen eine gute bis optimale Fitness zeigen.

Eichhornia tolerierte ökotechnisch relevante Cyanid- und Kupfer- Konzentrationen bis zu mindestens 5 mg L⁻¹ ohne Schäden und somit mehr freies Cyanid als alle bisher getesteten Pflanzenarten. *Eichhornia* zeigte auch eine höhere Kupfer-Toleranz als andere Pflanzen, die in hydroponischen Versuchsaufbauten getestet worden sind. Bei einem Einsatz *Eichhornias* in Kläranlagen zur Aufbereitung cyanidhaltiger Abwässer sollten diese also Konzentrationsspitzen von bis zu maximal 10 mg CN L⁻¹ über einen Zeitraum von 72 h tolerieren ohne abzusterven. Nach den Ergebnissen wirken sich leicht alkalische Abwässer mit Blausäure und / oder Kupfer weniger toxisch aus, als schwach saure. Dies wäre eine optimale Voraussetzung für den Einsatz in Pflanzenkläranlagen zur Klärung der alkalischen Goldbergbauabwässer. Die Wasserpflanzen wurden einmalig mit den Schadstoffen behandelt. Adaptionsprozesse konnten somit ausgeschlossen werden. Die EC₅₀ Konzentrationen betrugen 13 mg CN L⁻¹ und 30 mg Cu L⁻¹ (Probit Analyse).

3.2 Kupfer-Aufnahme aus Nährlösung

3.2.1 Ergebnisse

In Abbildung 3.6 sind die Resultate der Kupfergehaltsbestimmungen aus den Hydroponik-Toxizitätstests über 72 h dargestellt. In Tabelle 3.3 sind die Kupfergehalte nach 72 h aufgeführt. Wie im vorangegangenen Kapitel erläutert, wurde die Kupferabsorption durch Wasserhyazinthen bei pH 5,5 und 6,1 untersucht. Darüber hinaus wurde auch der Einfluss des Cyanids auf die Kupferabsorption bei pH 6,1 und 8,5 ermittelt sowie in Langzeitinkubation bei pH 5,2 und pH 7,2 (Abb. 3.7).

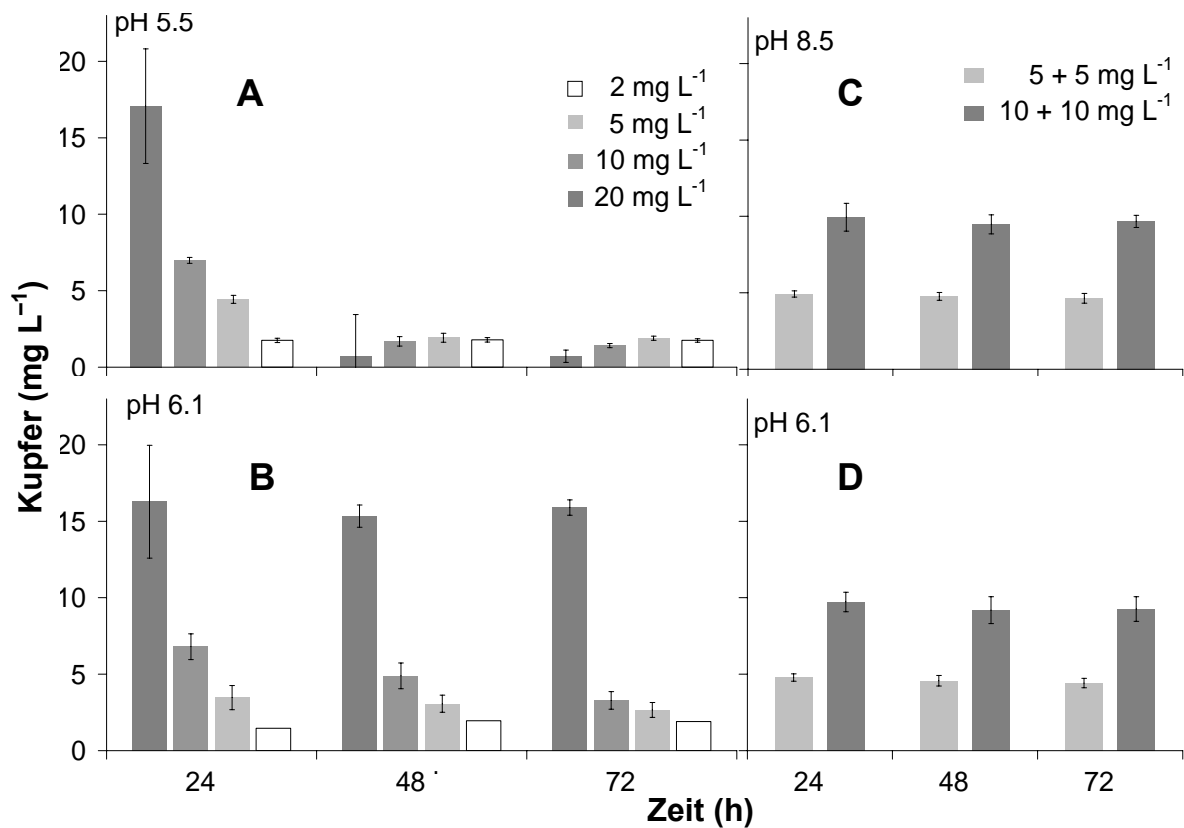


Abbildung 3.6: Reduktion der Kupferkonzentration in Nährlösung aus hydroponischen Versuchen über 72 h Inkubation; bei 2–20 mg L⁻¹ Initialkonzentration und variierendem pH (A–B) sowie zusätzlicher Applikation von 5 und 10 mg CN L⁻¹ (C–D). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von n = 5.

Die Kupfergehalte nahmen über den Versuchszeitraum ab. Bei dem Ansatz pH 5,5 wurden die Gehalte über 48 h deutlich reduziert, anschließend kam es zur Stagnation. Hierbei waren mit steigenden Initialkonzentrationen höhere Abnahmen zu beobachten. Beispielsweise betrug die mittlere Kupferkonzentration im 20 mg L⁻¹ Ansatz nach 72 h 0,7 mg Cu L⁻¹. Damit ergab sich eine Abnahme von 96,5%. Bei den restlichen Initialkonzentrationen betrugen die Endkonzentrationen 1,4–1,9 mg L⁻¹. Bei der 2 mg L⁻¹ Initialkonzentration betrug die Senkung des Kupfergehaltes demnach nur 12,5% (0,25 mg Cu L⁻¹). In der Inkubation bei pH 6,1 ergab sich ein anderes Bild. Die Kupferkonzentrationen fielen höher aus, eine Stagnation nach 48 h war nur bei den Ansätzen mit 20 und 2 mg L⁻¹ Initialkonzentration sichtbar. Hier wurde eine Reduktion um 20,5% (4,1 mg L⁻¹) und 5% (0,1 mg L⁻¹) ermittelt. Unter Cyanid-Einfluss war keine Abnahme der Kupferkonzentration innerhalb von 72 h feststellbar. Weder bei pH 6,1 noch bei pH 8,5 nahm der Kupfergehalt in der Lösung signifikant ab ($p > 0,05$). Hingegen war bei längerer Inkubationsdauer über 232 h eine deutliche Senkung der Kupfergehalte in Nährlösung zu beobachten (Abb. 3.7). Während der ersten 64 h Inkubation konnte keine oder nur eine geringfügige Kupferabnahme beobachten werden, was die Resultate aus Abbildung 3.6 bestä-

tigen. Anschließend nahmen die Gehalte jedoch stetig ab (Abb. 3.7). Die Kupfergehalte wurden bei pH 7,2 um ca. 30%, bei pH 5,2 um ca. 50% nach 232 h Inkubation reduziert. Die Gehalte der unterschiedlichen pH-Behandlungen unterschieden sich nach Versuchabbruch (232 h) signifikant voneinander ($p < 0,01$).

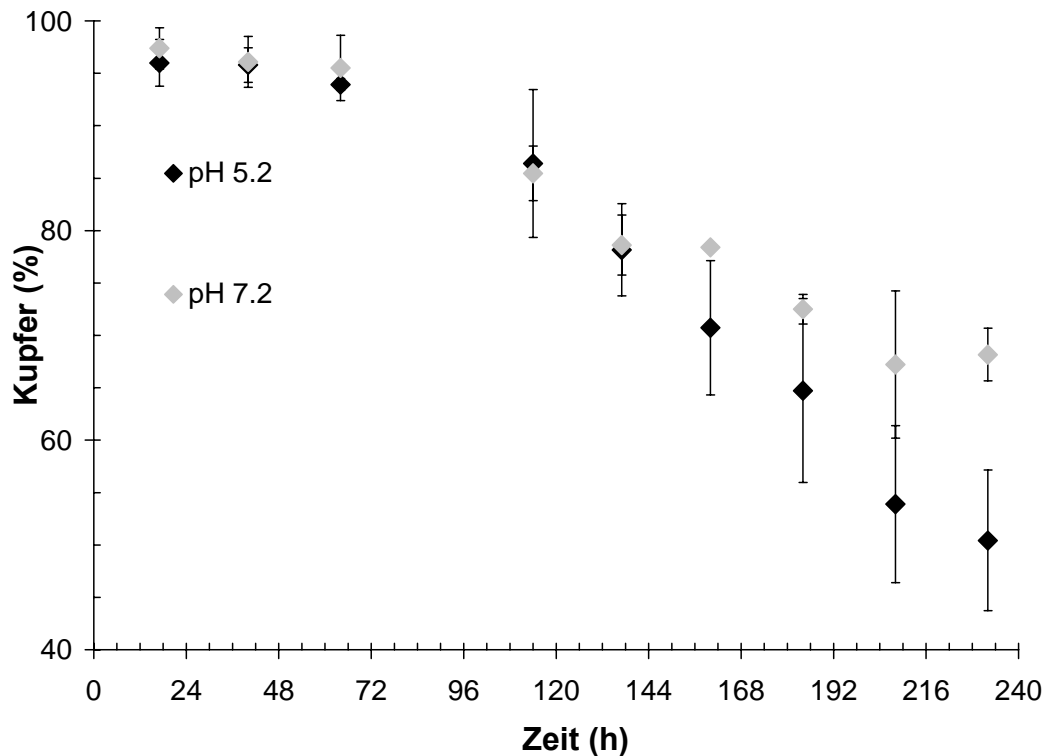


Abbildung 3.7: Kupfergehalt in % der Ausgangskonzentration in Nährlösung aus hydroponischen Versuchen über 232 h Inkubation; Applikation: 5 mg L⁻¹ Kupfer und 5 mg L⁻¹ Cyanid. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von n = 5.

In Abbildung 3.8 sind die mittleren Kupfergehalte der Blätter in mg (g TS)⁻¹ nach den Inkubationen bei den unterschiedlichen Kupferkonzentrationen dargestellt. Die Markierung bei 0,02 (g TS)⁻¹ bezieht sich auf die mittlere Kupferkonzentration der Blätter *Eichhornias* ohne Kupfergabe (Kontrolle). Nur die Inkubation mit 5 mg Cu L⁻¹ bei pH 5,5 führte zu signifikant erhöhten Kupfergehalten in den Blättern ($p < 0,05$). Aus den höher konzentrierten Lösungen wurde vergleichsweise weniger Kupfer in die Blätter transportiert. Auch in der Inkubation mit Cyanid führte 5 mg Cu L⁻¹ in der Nährlösung zu höheren Cu-Gehalten in den Blättern als 10 mg Cu L⁻¹. Die Kupfergehalte der Blätter nach der Inkubation bei pH 6,1 schienen sich zufällig im Bereich des natürlichen Kupfergehaltes zu verteilen und lieferten somit keine signifikanten Resultate ($p > 0,05$).

In den Wurzeln *Eichhornias* fanden sich deutlich höhere Kupfergehalte. In allen Ansätzen akkumulierten die Pflanzen signifikant ($p < 0,01$) mehr Kupfer als die Kontrollpflanzen. Die

Gehalte lagen zwischen 1 und 12 mg (g TS)⁻¹ (Abb. 3.9). Die Kontrollpflanzen dagegen akkumulierten nur ca. 0,03 mg (g TS)⁻¹. Somit lag der Anreicherungsfaktor zwischen 30 und 400. Tendenziell akkumulierten die Pflanzen mehr Kupfer mit steigender Kupferkonzentration in der Nährlösung. Die einzige Ausnahme bildete die Inkubation bei 20 mg L⁻¹ und pH 6,1. Wie in den Blättern war auch in den Wurzeln unter Cyanid-Einfluss wesentlich weniger Kupfer akkumuliert. Die Gehalte bewegten sich zwischen 0,5 und 2,25 mg (g TS)⁻¹.

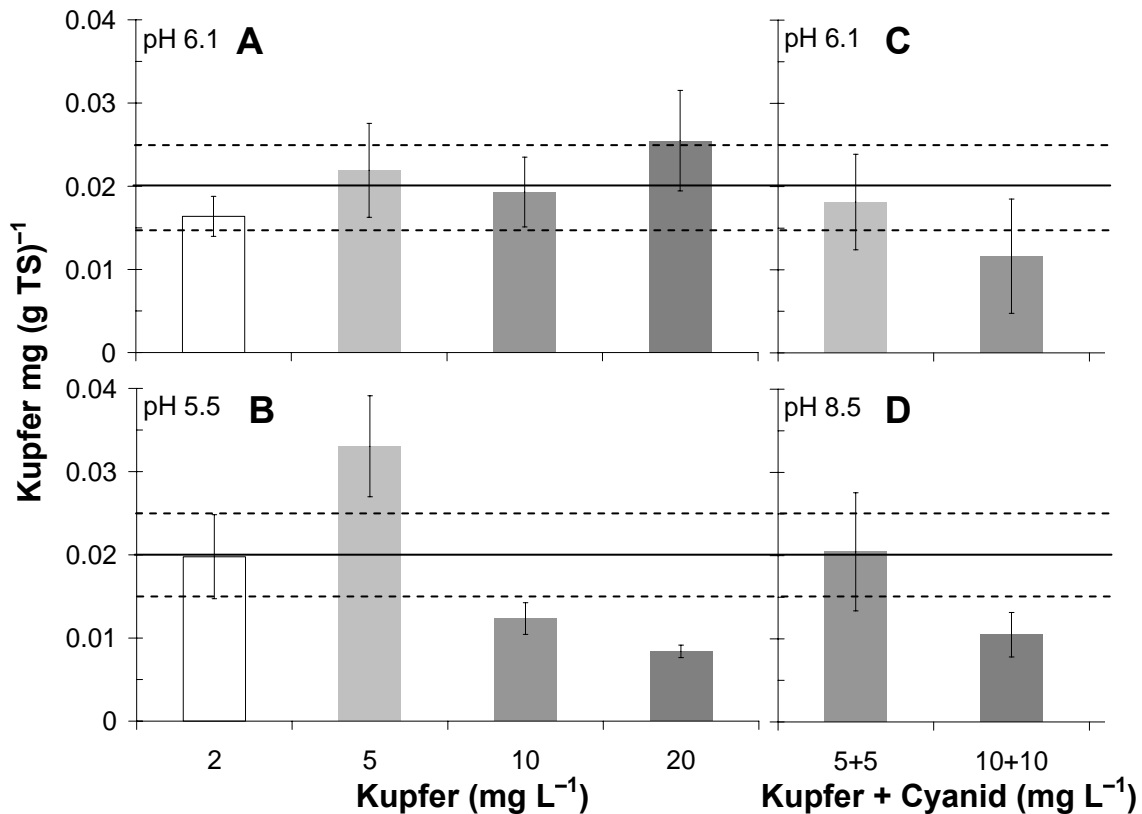


Abbildung 3.8: Kupfergehalte der Blätter *Eichhornias* nach 72-stündiger Inkubation in hydroponischen Systemen bei verschiedenen Kupfer-Initialkonzentrationen, pH (A–B) und Cyanidkonzentrationen (C–D); Die durchgehende Markierung bei 0,02 mg (g TS)⁻¹ bezieht sich auf die mittlere Kupfermenge in Kontrollpflanzen, die nicht mit Kupfer inkubiert worden sind. Die durchbrochenen Linien kennzeichnen die Standardabweichung dieser Kontrollbestimmung. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von n = 5.

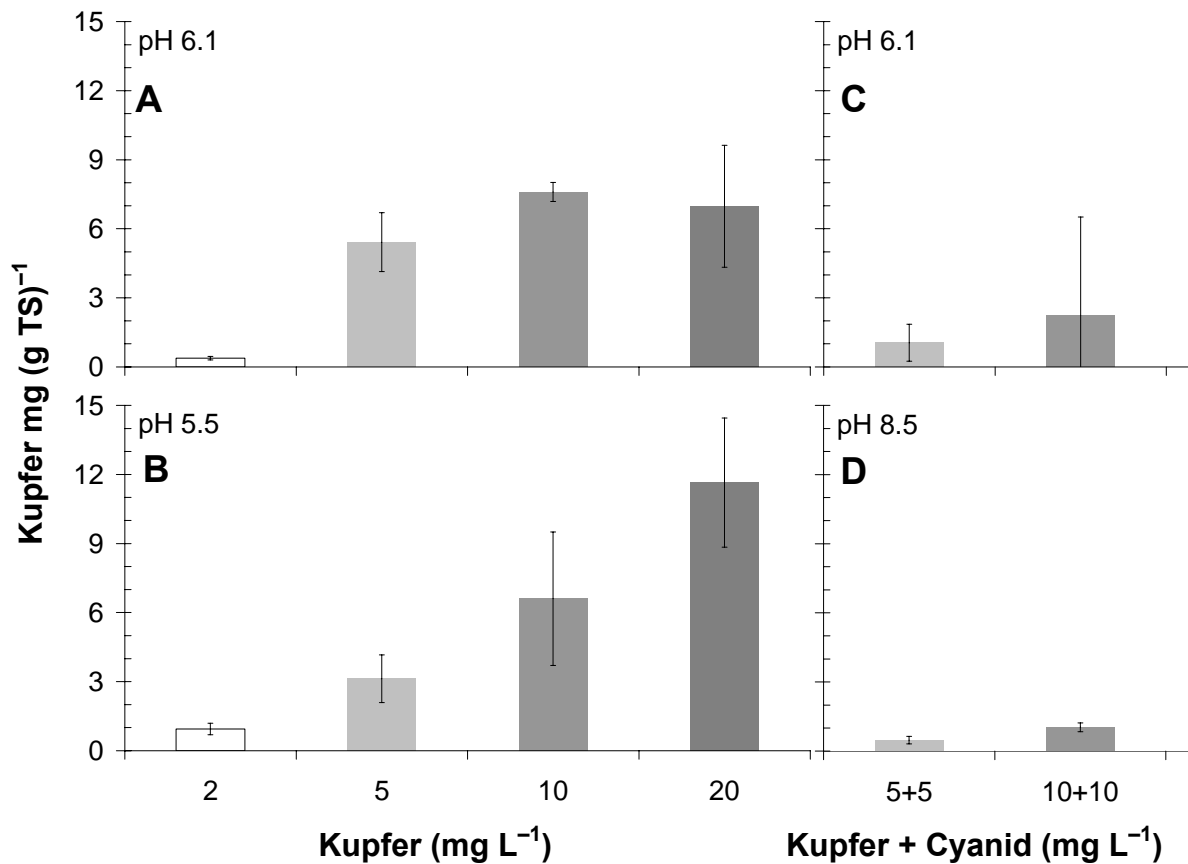


Abbildung 3.9: Kupfergehalte der Wurzeln *Eichhornias* nach 72-stündiger Inkubation in hydroponischen Systemen bei verschiedenen Kupfer-Initialkonzentrationen, pH (A–B) und Cyanidkonzentrationen (C–D); Der mittlere Kupfergehalt der Wurzeln der Kontrollpflanzen lag bei $0,03 \text{ mg (g TS)}^{-1}$. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von $n = 5$.

Tabelle 3.3: Kupfergehalte in Nährlösung nach 72 h Inkubation mit *E. crassipes*

Behandlung	Kupfer (mg L^{-1})			
	$t_0: 20 \text{ mg L}^{-1}$	$t_0: 10 \text{ mg L}^{-1}$	$t_0: 5 \text{ mg L}^{-1}$	$t_0: 2 \text{ mg L}^{-1}$
<i>pH 5,5</i>	0,7 $\pm 0,3$	1,4 $\pm 0,3$	1,9 $\pm 0,1$	1,7 $\pm 0,1$
<i>pH 6,1</i>	15,9 $\pm 0,3$	3,3 $\pm 0,6$	2,7 $\pm 0,5$	1,9 $\pm 0,1$
<i>pH 6,1</i> +5 mg CN L^{-1}	–	–	4,4 $\pm 0,3$	–
<i>pH 6,1</i> +10 mg CN L^{-1}	–	9,3 $\pm 0,8$	–	–
<i>pH 8,5</i> +5 mg CN L^{-1}	–	–	4,6 $\pm 0,3$	–
<i>pH 8,5</i> +10 mg CN L^{-1}	–	9,7 $\pm 0,4$	–	–

Die Kupfergehalte beziehen sich auf die mittleren Konzentrationen der Nährlösungen nach 72 h Inkubation in hydroponischen Testsystemen mit *E. crassipes*. Die t_0 Werte beziehen sich auf die applizierten Initial-Konzentrationen. Der Standardfehler zeigt die Standardabweichung von $n = 5$.

3.2.2 Diskussion der Kupfer–Aufnahme aus Nährlösung

Eichhornia absorbierte Kupfer aus der Nährlösung und akkumulierte dies größtenteils in den Wurzeln. Die Absorption wurde durch pH–Werte über 5,5 sowie durch Cyanid als starken Komplexbildner gehemmt. Bei Langzeitinkubation wurde das Kupfer aus dem Cyanokomplex aufgenommen. Insbesondere ein saurer pH der Nährlösung schien sich förderlich auf die Metall–Absorption auszuwirken.

Die Resultate der Kupfertoxizität bei verschiedenen pH–Bedingungen und Cyanid–Konzentrationen legten die Vermutung nahe, dass Kupferspezies mit erhöhtem Radius und Ladung schlechter aus der Nährlösung aufgenommen wurden. Die Ergebnisse der Kupferbestimmungen aus Nährlösung stützten diese Hypothese. Tatsächlich wurde bei pH 6,1 sowie unter Cyanid–Einfluss weniger Kupfer absorbiert. Am deutlichsten war dies bei einer Initialkonzentration von 20 mg L^{-1} Kupfer sowie in den Cyanid–Behandlungen sichtbar. Der Kupfercyano–Komplex schien aber nicht über einen längeren Zeitraum stabil zu sein. Insbesondere bei einem sauren pH, der die Zersetzung des Komplexes fördert, nahm die Kupferkonzentration in Nährlösung signifikant ($p < 0,01$) ab (Abb. 3.7). Die geringere Cyanid / Kupfer–Toxizität bei pH 8,5 im Vergleich zu pH 6,1 lässt sich nicht durch die Kupferabsorption erklären. Die Gehalte in Nährlösung und Gewebe unterschieden sich nicht signifikant ($p > 0,05$). Vermutlich wird bei pH 8,5 effektiv weniger Cyanid aufgenommen, da hier 13,4% dissoziiert vorliegen, welches aufgrund der negativen Ladung vermutlich schlechter über den Apoplasten der Wurzel aufgenommen wird.

Die Kupferaufnahme durch *Eichhornia* wurde in einigen Studien unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Granato (1993) untersuchte den Kupfergehalt in Containern mit Wasserhyazinthen unter gleichzeitiger Cyanid–Applikation. Er konnte keine Abnahme der Kupferkonzentration nach 48 h feststellen. Yahya *et al.* (1986) fanden gehemmte Aufnahmeraten, wenn starke Komplexbildner (EDTA, Huminsäuren) gleichzeitig appliziert wurden. Schwächere Komplexbildner wie Zitronensäure oder Aminosäuren zeigten eine geringere Hemmung der Kupferabsorption. *E. crassipes* akkumulierte in dieser Studie maximal bis zu $2,4 \text{ mg (g TS)}^{-1}$, bei einer applizierten Kupferkonzentration von bis zu 2 mg L^{-1} . Sie fanden darüber hinaus, dass ab pH 6 die Kupferaufnahme um ca. 40% sinkt und ermittelten ein Optimum bei pH 5,5. Dies wurde auch von Lee und Hardy (1987) beobachtet. In der gleichen Studie wurde auch festgestellt, dass Komplexbildner die Kupferaufnahme hemmen. Außerdem fanden sie eine schnelle Aufnahmephase innerhalb von 48 h Stunden mit anschließender Stagnation. Auch Rai *et al.* (1993) fanden eine höhere Kupferaufnahme bei pH 4–5 und zudem einen hemmenden Effekt, wenn gleichzeitig Zink in der Lösung zugegen war. Sie führten

die Beobachtungen und den Mechanismus der Metallabsorption generell auf einen Kationenaustausch mit negativen Zellwandbestandteilen des Wurzel–Apoplasten zurück. Low *et al.* (1994) nutzten getrocknete Wurzeln *Eichhornias*, um Kupfer aus Lösung zu absorbieren. Sie erzielten eine maximale Absorption von $20,9 \text{ mg (g TS)}^{-1}$. Sie fanden auch eine maximale Absorption um pH 5 und eine Hemmung durch starke Komplexbildner. Auch in dieser Studie wurde die Sorption ausschließlich auf einen apoplastischen Kationenaustausch zurückgeführt. Kelley *et al.* (2000) stützen diese Vorstellung durch IR und NMR Spektren von Wurzelextrakten *Eichhornias*, die mit Eu(III) inkubiert waren. Sie stellten fest, dass das Schwermetall intrazellulär durch Carboxylfunktionen gebunden wurde. Allerdings bleibt fragwürdig, wie aussagekräftig Studien mit gefriergetrockneten Extrakten sein können und wie weit sie Aufnahmemechanismen lebendiger Wurzelzellen aufdecken können. Ein ähnlicher Ansatz wurde von Ghabbour *et al.* (2004) verfolgt. Sie versuchten gleichfalls durch NMR und IR Spektren, die Metallbindung in den Wurzeln *E. crassipes* aufzudecken. Sie schlussfolgerten aufgrund des Vergleiches mit Referenzspektren, dass Huminsäuren in *Eichhornia* die Metalle binden. Obwohl die Methodik dieser Studie einwandfrei war, so ist die Schlussfolgerung zweifelhaft, da die IR – und NMR – Spektren nur auf Funktionalitäten zurückgeführt wurden. Die Aussage, dass sich in Huminsäuren ähnliche Verhältnisse von Carboxylgruppen, Carboxylgruppen usw. finden ließen, gestattete nicht die Schlussfolgerung, dass in den Wurzeln *Eichhornias* tatsächlich Huminsäuren vorlagen, zumal deren Struktur bis heute nicht geklärt ist. So *et al.* (2003) verfolgten einen anderen Ansatz. Sie isolierten kupferresistente Bakterien aus der Rhizosphäre der Wasserhyazinthen und führten Versuche mit gezielter Inokulation und Antibiotika – Behandlungen durch. Sie konnten durch die Bakterien eine bis zu 1,9–fache Steigerung der Kupferabsorption aus Nährlösung erzielen. Tatsächlich wiesen sie auch nach, dass durch die Bakterien die Wurzelzellen selbst gleichfalls mehr Kupfer aufnahmen. Diese Studie zeigte, dass die Vorstellung der Metallabsorption durch *E. crassipes* als simpler Kationenaustausch wohl eine zu starke Vereinfachung eines vielleicht viel komplexeren Phänomens sein könnte. Die Vorstellung des Kationen – Austauschs setzt im Übrigen voraus, dass tatsächlich Kationen vorliegen. Abbildung 3.5 zeigt hingegen, dass im Falle von Kupfer beim Absorptionsmaximum der Wasserpflanzen um pH 5 zu 100% eine neutrale Spezies vorliegt. Dies gilt außerdem auch für zahlreiche weitere Metalle wie das essentielle Eisen oder Zink. Vor diesem Hintergrund wäre eine plausiblere Vorstellung, dass ungeladene Metallkomplexe ungehinderter den Apoplasten und den Symplasten durchqueren könnten.

3.2.3 Zusammenfassung: Kupfer – Aufnahme

Die Untersuchungen zur Kupferabsorption verdeutlichten das durch zahlreiche Studien beschriebene hohe Schwermetall – Akkumulationspotential *Eichhornias*. Die gleichzeitige Applikation von Blausäure führte zu einer Hemmung der Kupferabsorption. Dies könnte sich bei der Klärung von Abwässern aus dem Goldbergbau als Problem erweisen. Langzeitinkubationen führten aber dennoch zu einer Absorption des Kupfers aus dem Cyanokomplex. Die Aufnahme des Kupfers wurde zudem durch einen geringen pH gefördert. Somit könnte sich der pH des Abwassers im Klärsystem als geeignete Stellgröße erweisen, um die Absorption des Kupfers in Komplexform bzw. die Freisetzung des Kupfers aus dem Komplex zu beschleunigen.

3.3 ^{14}C -Degradation & Absorption im Batch-Verfahren

3.3.1 Ergebnisse

Ziel der Inkubation von Blättern und Wurzeln *Eichhornias* in Batch-Systemen war in erster Linie die Beantwortung der Frage, ob ^{14}C -Cyanid durch Gewebe *Eichhornias* aufgenommen und dort akkumuliert oder umgesetzt wird. Weiterhin sind in diesem Kapitel die Ergebnisse der experimentellen Bestimmung der Michaelis-Menten Parameter dargestellt. Diese Versuche wurden auch mit anderen ökotechnisch relevanten Pflanzenspezies durchgeführt, um den Vergleich der Cyanid-Abbauleistung zu ermöglichen.

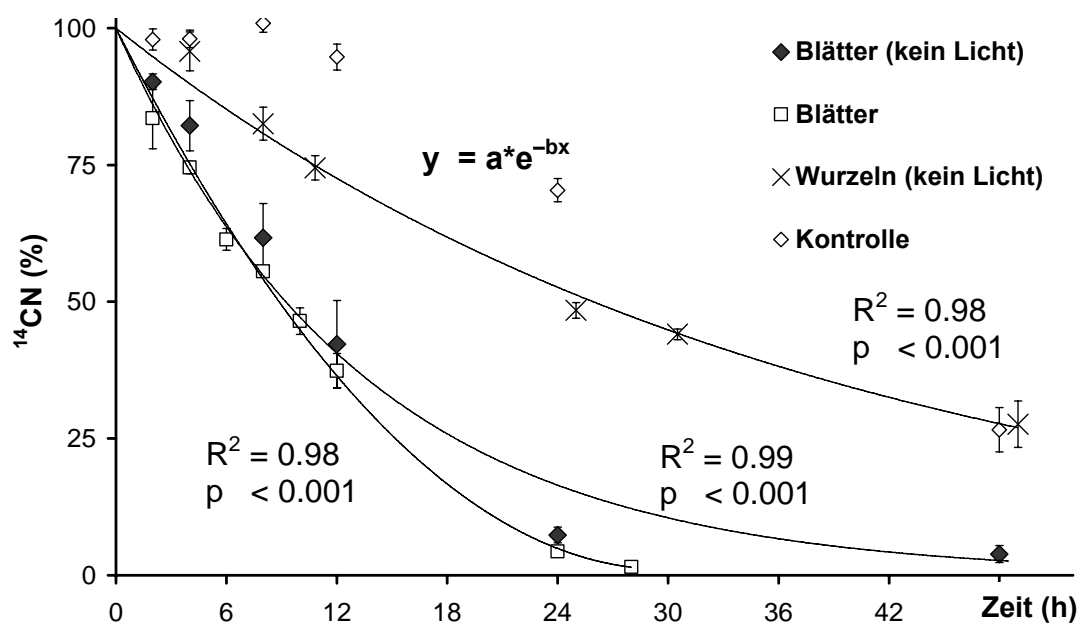


Abbildung 3.10: Abbau-Kinetik ^{14}C markierten Cyanids im Batch-Verfahren mit *E. crassipes* und Kontrollansätze ohne Gewebematerial. Die Werte beziehen sich auf den prozentualen Anteil der applizierten Radioaktivität. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von $n = 3$.

Die Absorption der applizierten Radioaktivität durch Blattstücke wurde mit einer Lichtquelle und unter Lichtausschluss durchgeführt (Abb. 3.10). Bei beiden Ansätzen wurden ähnliche Abbaukinetiken 1. Ordnung ermittelt und der Gehalt an ^{14}C -Cyanid war innerhalb von 24 h um 90% reduziert. Die Resultate der Regressionen für die jeweilige Abbaukinetik sind in Abbildung 3.10 angegeben. Die geringfügig geringere Konzentration in der Behandlung mit Licht nach Versuchsende war auf eine höhere Anzahl an Proben-Entnahmen zurückzuführen. Der ^{14}C -Cyanid-Gehalt in den Kontrollansätzen ohne Pflanzenmaterial belief sich nach 48 h auf 27% (Abb. 3.10). Diese Abnahme war auf Ausgasung von H^{14}CN zurückzuführen, welches in den Fällen fixiert wurde. Die Wiederfindung in den Kontrollen betrug ca. 100% und nur 0,15% wurde zu $^{14}\text{CO}_2$ konvertiert (Tab. 3.4). In den Ansätzen mit Blattstücken wurden 35–40% der applizierten Radioaktivität im NaOH-Extrakt gefunden und 6–10% wurden zu $^{14}\text{CO}_2$ (Tab. 3.4) umgewandelt.

Table 3.4: ^{14}C -Bilanz der ^{14}CN Degradation in batch Tests mit *E. crassipes*

<i>Kompartiment</i>	<i>Extrakt</i> (%)*	<i>Falle:</i> $^{14}\text{CO}_2$ (%)*	<i>Falle:</i> H^{14}CN (%)*	<i>NER</i> (%)*	<i>Rest</i> (%)*	<i>Proben</i> (%)*	<i>Summe</i> (%)*
<i>Blätter</i>	35,5 ± 2,2	10,5 ± 1,7	15,4 ± 5,3	3,8 ± 0,6	1,5 ± 0,3	24,8 ± 3,4	91,5 ± 1,3
<i>Blätter</i> (kein Licht)	37,0 ± 6,5	6,4 ± 1,2	25,1 ± 2,4	1,3 ± 0,2	3,9 ± 1,6	16,0 ± 0,9	89,7 ± 4,8
<i>Wurzeln</i> (kein Licht)	11,9 ± 0,8	24,9 ± 2,4	26,9 ± 5,5	1,1 ± 0,5	27,6 ± 4,2	2,5 ± 0,1	97,9 ± 1,8
<i>Kontrolle</i> (kein Gewebe)	–	0,1 ± 0,03	59,9 ± 2,6	–	26,6 ± 4,1	20,7 ± 0,4	107,4 ± 4,8

*Die Werte beziehen sich auf den prozentualen Anteil der applizierten Radioaktivität. Die gasförmigen ^{14}C -Spezies ($^{14}\text{CO}_2$, H^{14}CN) wurden mit Gasfallen bilanziert. Der Extrakt bezieht sich auf die Radioaktivität im NaOH-Extrakt nach Aufschluss durch Mörsern in flüssigem Stickstoff und Ultraschall. NER: Der Nicht Extrahierbare Rückstand wurde vollständig verbrannt und das $^{14}\text{CO}_2$ per Flüssigzintillationszählung bestimmt. Der Standardfehler zeigt die Standardabweichung von $n = 3$.

Im Extrakt konnte kein UV oder ^{14}C -Signal des Cyanids detektiert werden (Abb. 3.11). Das ^{14}C – Signal im Extrakt eluierte wie Carbonat nach 2 Minuten. Aufgrund der UV – Absorption dieses Signals im sichtbaren Bereich ($> 400 \text{ nm}$) war dieses Signal aber wahrscheinlich nicht Carbonat zuzuordnen. Die Chromatogramme ließen den Schluss zu, dass der Cyanid – Anteil in den Extrakten mindestens unter 3,3% war. In den Fällen der *Eichhornia*-Ansätze war neben H^{14}CN auch $^{14}\text{CO}_2$ detektierbar (Abb. 3.11). Nur ein sehr geringer Anteil war nicht extrahierbar und wurde durch Verbrennung quantifiziert (Tab. 3.4). Die Wurzeln wurden aus-

schließlich im Dunkeln inkubiert, um die natürlichen Verhältnisse zu simulieren. Die Abnahme der Radioaktivität mit Wurzeln verlief langsamer als mit Blättern (Abb. 3.10). Nach 24 h waren noch 48% und nach 49 h 28% der Radioaktivität in Lösung. In der Bilanz unterschieden sich die beiden Ansätze sehr deutlich. In den Wurzeln wurde deutlich weniger Radioaktivität gefunden als mineralisiert wurde. Dementsprechend wurden um 12% nach Versuchsende im Extrakt gefunden und bis zu 25% war zu $^{14}\text{CO}_2$ mineralisiert (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.5: Michaelis–Menten Parameter der Cyanid–Degradation mit Blattstücken

		<i>E. crassipes</i>	<i>P. australis</i>	<i>T. latifolia</i>
Nichtlineare Regression	v_{\max}	33,6	6,5	6,8
	(mg CN kg h ⁻¹)	± 3,8	± 0,6	± 2,8
	p	< 0,01	< 0,01	0,08
	K_M	11,8	4,4	4,6
	(mg CN L ⁻¹)	± 1,3	± 0,7	± 3,6
	p	< 0,01	< 0,01	0,29
	R ²	99,8	99,6	94,0
Lineweaver–Burk	v_{\max}	35,5	5,5	9,8
	(mg CN kg h ⁻¹)	± 4,3	± 0,5	± 3,1
	p	< 0,001	< 0,01	0,051
	K_M	12,0	3,2	8,5
	(mg CN L ⁻¹)	± 1,8	± 0,3	± 4,4
	p	< 0,01	< 0,01	0,051
	R ²	99,7	99,5	99,3

Für die aus der Cyanid–Degradation im Batch–Verfahren berechneten Koeffizienten v_{\max} und K_M sind jeweils Standardfehler von n = 3 und Irrtumswahrscheinlichkeiten p (aus T–Test) angegeben. Der Regressionskoeffizient R² bezieht sich auf das lineare bzw. nichtlineare Regressionsverfahren.

Die Bestimmung der Michaelis–Menten Parameter wurde auch mit Blattstücken *Typha latifolia* und *Phragmites australis* durchgeführt. Die Wiederfindung der Kontrollen lag bei 100,1 ± 4,3% (2 mg CN L⁻¹) und 99,1 ± 2,1% (16 mg CN L⁻¹). Aufgrund dieser hohen Wiederfindungsrate ergab sich kein Hinweis auf nicht erfasste Verlustprozesse. Die zu Versuchsbeginn auf pH 8,5 eingestellte Hoaglandlösung lag zu Versuchsende bei pH 6,8–7,2. Die Michaelis–Menten Parameter v_{\max} und K_M wurden zum Zeitpunkt der besten Kurvenregression ermittelt (3, 4 h). Die lineare und nichtlineare Regression ist exemplarisch für *E. crassipes* in Abbildung 3.12 dargestellt. Die Michaelis–Menten Parameter v_{\max} und K_M lagen für *E. crassipes* ca. um den Faktor 3–5 höher als bei den Helophyten *T. latifolia* und *P. australis* (Tab. 3.5). Beide Regressionsmethoden führten bei *Eichhornia* und *Phragmites* zu ähnlichen und signifikanten (p < 0,05) Resultaten, während die Ergebnisse für *T. latifolia* nicht signifikant (p > 0,05) aus-

fielen. Dementsprechend waren auch die Standardfehler höher und die Michaelis–Menten Parameter der unterschiedlichen Regressionsmethoden bei *Typha* führten zu deutlich unterschiedlichen Resultaten. Bei den Helophyten war ein auffälliges geringes Verhältnis der Michaelis–Menten Parameter zwischen ca. 1,1 und 1,7 zu beobachten (Tab. 3.5).

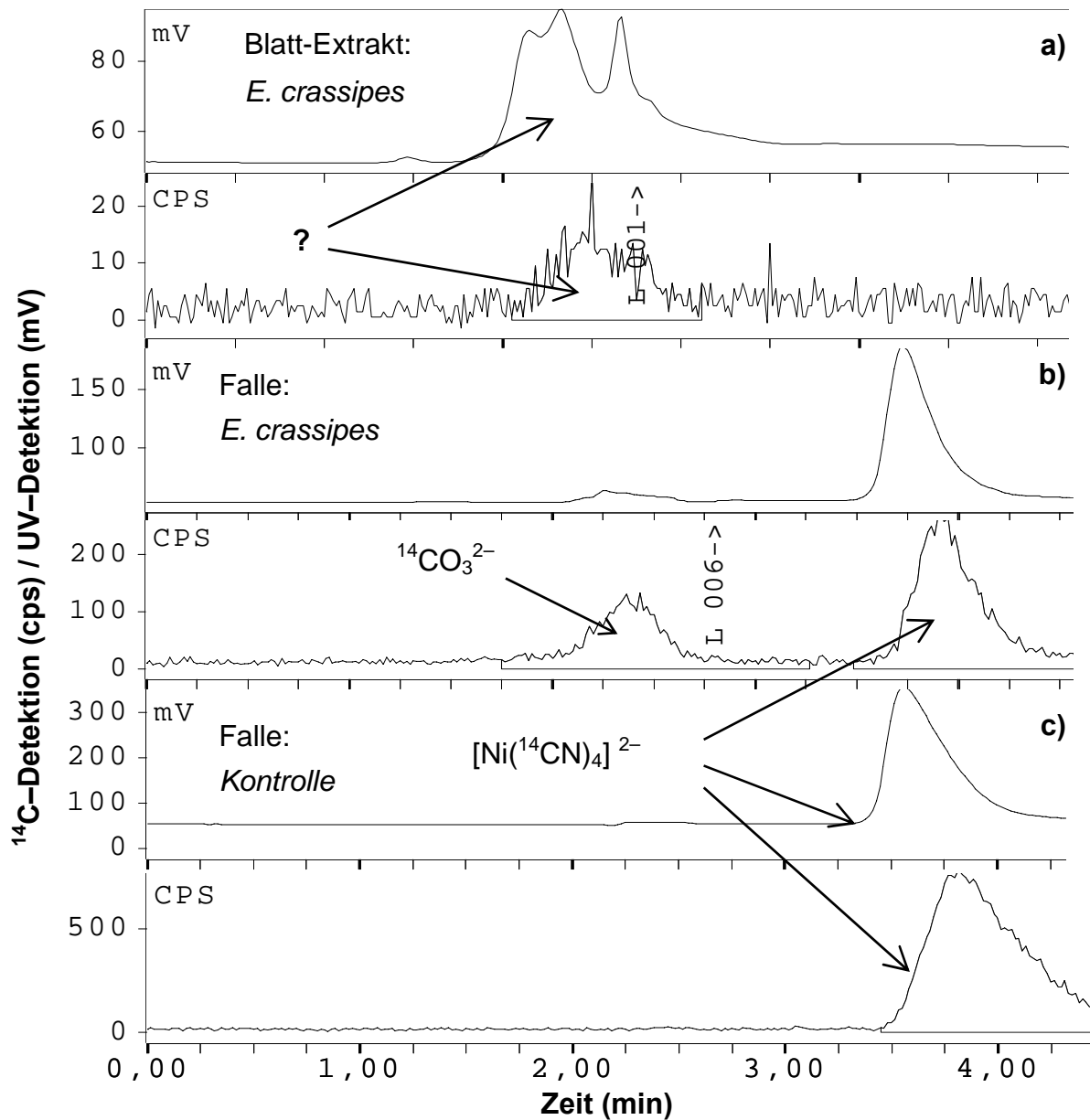


Abbildung 3.11: (AI)-HPLC-UV/ ^{14}C -Chromatogramme aus batch Versuchen mit *E. crassipes*; a) Cyanid-Signal aus der Falle des Kontrollansatzes ohne Pflanzen; b) Nichtzugeordnete Radioaktivität aus den Blatt-Extrakten *Eichhornias* (Signale konnten nicht eindeutig Carbonat zugeordnet werden); c) $^{14}\text{CO}_3^{2-}$ /Cyanid Signal aus der Falle mit *E. crassipes*; Die Cyanid-Signale konnten durch spezifische UV-Absorption bei 267, 284, und 315 nm eindeutig identifiziert werden. Das obere Chromatogramm der Teile a)–c) zeigt jeweils die UV-Detektion in mV, das untere die ^{14}C -Detektion in cps (counts per second) der Festkörperzintillationszählung. Die Trennung wurde auf einer Dionex 14A Anionentauschersäule (AI) durchgeführt (vgl. Kap. 2.1.2).

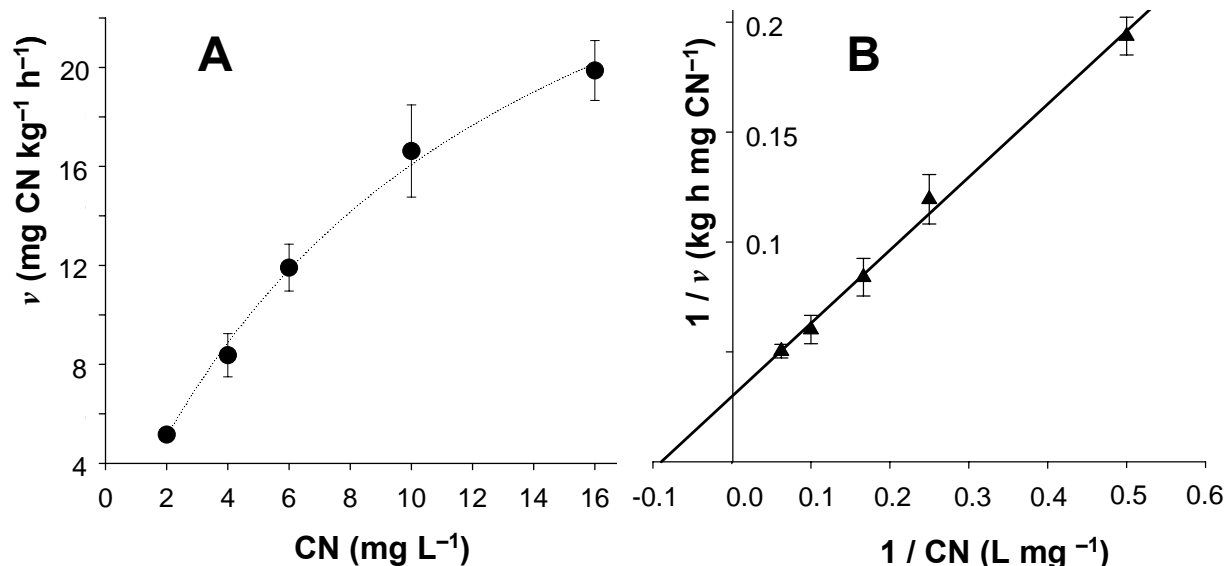


Abbildung 3.12: Ermittlung der Michaelis–Menten Parameter. A: Nichtlineare Regression; B: Lineweaver–Burk Plot (lineare Regression); v : konzentrationsabhängige Abbaugeschwindigkeit. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von $n = 3$. (Methodik: siehe Kap. 2.4.2)

3.3.2 Diskussion der ^{14}CN Degradation & Absorption im Batch Verfahren

Bei der Diskussion der Cyanid–Degradation (auch der Literaturwerte) ist die theoretische Natur von v_{\max} und K_M zu beachten. Die Berechnungen erfassen keine toxischen Effekte. Alle Experimente konnten demnach nur im nicht–hemmenden Konzentrationsbereich durchgeführt werden. Bei *Eichhornia* waren daher Konzentrationen bis 16 mg L^{-1} (vgl. Abb. 3.12), bei den anderen Pflanzen nur bis 6 mg L^{-1} möglich. Über diesen Konzentrationen hinaus war ein drastischer Einbruch der Abbaukinetik zu beobachten.

Tendenziell führte die Berechnung der Parameter per linearer Regression mit Ausnahme von *P. australis* zu höheren Werten (Tab. 3.5). Dieser Trend wird auch von Yu *et al.* 2005c sowie von Larsen *et al.* 2004 bestätigt. Nach beiden Studien liefert die nichtlineare Regression generell verlässlichere Resultate, da sich die Michaelis–Menten Kinetik asymptotisch v_{\max} nähert (Abb. 3.12). Bei der linearen bzw. doppeltreziproken Auswertung führen daher relativ geringe Fehler von v zu einer hohen Variation von $1/v$ und $1/K_M$ und damit zu einem großen Fehler bei beiden Parametern. Generell ist also die nichtlineare Regression verlässlicher. Wenn allerdings beide Regressionen sehr ähnliche Parameter liefern, ist das ein Indiz für eine hohe Varianzhomogenität der Rohdaten.

Die höheren Werte der Maximalgeschwindigkeit v_{\max} für *Eichhornia* im Vergleich zu den getesteten Helophyten unterstreicht die besondere Eignung dieser Pflanze hinsichtlich des Cyanid–Abbaus. Dies zeigt sich auch durch den breiteren Konzentrations–Toleranzbereich von bis zu 16 mg L^{-1} . Das auffällig geringe Verhältnis von v_{\max} und K_M bei allen Pflanzen

könnte ein Hinweis auf die Hemmung der enzymatischen Aktivität sein. Beispielsweise führt gemischte Hemmung durch die Bildung von Enzym–Substrat– und Inhibitor–Komplexen zur Senkung von v_{\max} und Steigerung von K_M (vgl. Taiz und Zeiger 2000). Dementsprechend wäre es denkbar, dass sich die toxische Wirkung des Cyanids auf die gesamte Zellphysiologie der Pflanzen auch in der Hemmung der β –Cyanoalanin–Synthase auswirkt.

Die Cyanid–Degradationsraten fielen ähnlich aus wie andere Werte aus der Literatur, die mit sehr ähnlicher Methodik gewonnen wurden. Larsen *et al.* (2004) erzielten die höchste Degradationsrate aus Nährlösung mit *Salix viminalis* \times *schwerinii*. Die Blattstücke reduzierten den Cyanidgehalt innerhalb von 18 h auf 10% der Ausgangskonzentration. Die berechneten v_{\max} und K_M lagen bei 10 mg CN kg^{−1} h^{−1} und 1 mg CN L^{−1}. Die gleiche Gruppe erhielt in einer folgenden Arbeit ähnliche Ergebnisse mit *S. viminalis* (Larsen *et al.* 2005). Die höhere Abbauleistung wurde auch hier nicht mit Wurzel–, sondern mit Blattstücken erzielt. Mit 2 g Blattmaterial beobachteten sie nach 20 h eine 50%ige, nach mehr als 50 h eine 100%ige Senkung bei einer Ausgangskonzentration von 2 mg CN L^{−1}. Sie kalkulierten v_{\max} mit 6,9 mg CN kg^{−1} h^{−1} und K_M mit 0,6 mg CN L^{−1}. Yu *et al.* (2005c) untersuchten die Cyanidabsorption mit Blattstücken von 12 Pflanzenspezies (*Sambucus*, *Salix*, *Prunus*, *Nymphaea* u.a.) in einem Konzentrationsspektrum von ca. 1–7 mg CN L^{−1}. Sie berechneten mittels nichtlinearer Regression maximale Abbaukapazitäten v_{\max} von 6,7–22 mg CN kg^{−1} h^{−1} und K_M –Werte zwischen 0,9–3,1 mg CN L^{−1}. Die höchste Abbauleistung wurde mit *Sambucus chinensis* erzielt. Auch in dieser Studie wurden teilweise auffällig geringe Verhältnisse von v_{\max} und K_M ermittelt, die aber von den Autoren nicht diskutiert wurden.

Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei der Radioaktivität im Pflanzenextrakt *Eichhornias* nicht um ¹⁴C–Cyanid handelte, muss eine Metabolisierung des Cyanids in den Pflanzen stattgefunden haben. Die Entwicklung von ¹⁴CO₂ in den Ansätzen mit Pflanzen ist nicht zwangsläufig ein Hinweis auf eine oxidative Cyanid–Mineralisierung, die typisch für Mikroorganismen wäre (Guilloton *et al.* 2002; Figuira *et al.* 1996). Eine andere Erklärung wäre eine enzymatische Abspaltung von ¹⁴CO₂ aus Asparaginsäure zu 3–Aminopropionamid (Karlson 1988; Wriston 1985; Wriston und Yellin 1973) bzw. die direkte Umsetzung des β –Cyanoalanins zu Aspartat (vgl. Abb. 1.6; Volmer 2005; Piotrowski *et al.* 2001). Somit könnte auch das ¹⁴CO₂ als Hinweis auf die bekannte Detoxifizierung zu Asparagin bzw. Aspartat (Maruyama *et al.* 2001; Hatzfeld *et al.* 2000; Manning 1988) gewertet werden. Obwohl die Blätter mit Isopropylalkohol gewaschen worden sind, konnten unter diesen Bedingungen mikrobielle Degradationsprozesse bzw. die direkte Mineralisierung des Cyanids nicht vollkommen ausgeschlossen

werden. Nur durch Untersuchungen mit sterilen Zellkulturen könnte dieser Anspruch erfüllt werden.

Die Abbauprobversuche mit Wurzeln wurden unter nicht-sterilen Verhältnissen durchgeführt, um die rhizosphären-assoziierte Mikroflora zu erhalten. Die Mikroflora der Wurzeln *E. crassipes* wurde mehrfach in der Literatur hinsichtlich des positiven Einflusses auf Nährstoff- und Schadstoffreduktion erwähnt (So *et al.* 2003; Sipaúba-Taveres *et al.* 2002). Aus diesem Grund war zu erwarten, dass die Wurzeln *Eichhornias* mehr Cyanid in kürzeren Zeiträumen entfernen. Tatsächlich war das nicht der Fall. Die Blätter erwiesen sich als deutlich effektiver. Die Beobachtungen können auch von Larsen *et al.* (2005) mit *Salix* bestätigt werden. Allerdings wies die hohe $^{14}\text{CO}_2$ Produktion in den eigenen Ansätzen auf eine bakterielle Mineralisierung des ^{14}C -Cyanid hin.

3.3.3 Zusammenfassung: ^{14}CN – Degradation im Batch Verfahren

Die Resultate zeigten eindeutig, dass Gewebe von *E. crassipes* freies Cyanid aufnimmt und umsetzt. Der Vergleich der maximalen Abbaugeschwindigkeiten v_{max} demonstrierte zudem, dass *E. crassipes* deutlich mehr Cyanid umsetzen kann als andere Pflanzen. Somit bewies *Eichhornia* die grundsätzliche physiologische Eignung für den Einsatz zur Cyanid-Degradation. Die Inkubation mit Wurzelstücken wies aufgrund der Entwicklung von erheblichen Mengen ^{14}C -markierten Kohlenstoffdioxids auf eine mikrobiologische Umsatzleistung hin. Auch in den Ansätzen mit Blättern wurde $^{14}\text{CO}_2$ festgestellt. Im Vergleich setzten die Blätter aber deutlich mehr Cyanid um, was den Schluss nahe legt, dass im Klärbetrieb tatsächlich die ganzen Pflanzen und nicht nur die wurzelassoziierte Mikroflora das Cyanid abbauen, vorausgesetzt die Pflanzen nehmen das Cyanid über die Wurzeln auf und transportieren es im Xylem zu den Blättern.

3.4 ^{14}CN -Bilanzierung nach Aufnahme über die Wurzeln

3.4.1 Ergebnisse

Während der Vorversuch nur der Visualisierung der Aufnahme und Verteilung der Radioaktivität in *E. crassipes* diente, sollte in der Inkubation in Flow-through-Systemen die Abbaukinetik sowie der Verbleib der Radioaktivität quantitativ erfasst werden. Im letzteren Versuchsansatz war die Konzentration an freiem Cyanid (5 mg L^{-1}) so gewählt, dass hemmende Effekte durch Toxizität ausgeschlossen werden konnten. *E. crassipes* war im hydroponischen Versuchsaufbau eingeschlossen, sodass eine Ausgasung von flüchtiger Radioaktivität aus der Nährlösung weitestgehend vermieden werden konnte. Ziel dieser Versuche war die Bilanzie-

rung der aus den Blättern freigesetzten gasförmigen Radioaktivität, der Radioaktivität in Wurzeln und Blättern sowie der Darstellung der Abbaukinetik von ^{14}C -Cyanid durch intakte Wasserhyazinthen. Darüber hinaus wurde untersucht, ob sich die Abbaukinetik unterscheidet, wenn die Pflanzen vor Versuchsbeginn mit Cyanid inkubiert wurden. In einem weiteren Ansatz wurde zudem der Einfluss des Kupfers auf die ^{14}C -Cyanid-Degradation überprüft.

Nach Inkubation mit H^{14}CN war die Radioaktivität in *E. crassipes* in Blättern und Wurzeln gleichmäßig verteilt (Abb. 3.14). Die Werte in Abbildung 3.14. zeigen die absolute Radioaktivität in den betreffenden Blatt- bzw. Wurzelarealen, die durch Inkubation mit definierten ^{14}C -Standards ermittelt wurden. Die Intensität der Schwärzung ist direkt proportional zur inkorporierten Radioaktivität. Die Bereiche höherer Radioaktivität (Abb. 3.14) korrelierten mit Blattschäden, die durch die Entwicklung über den Photoplaten verursacht wurden. In diesen Bereichen kam es zu Flüssigkeits- Ansammlungen. In den Wurzeln war weit weniger Radioaktivität sichtbar. Färbungen neben den Blättern bzw. Wurzeln sind auf Flüssigkeitsaustritte zurückzuführen.

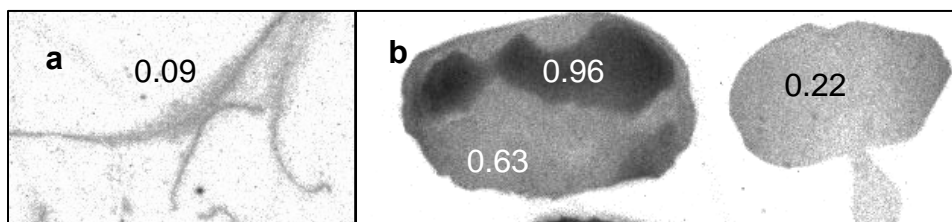


Abbildung 3.13: Bioimager-Darstellung der Radioaktivität in Wurzeln (a) und Blättern (b) *Eichhornias* nach Inkubation mit 8,3 kBq ^{14}C -Cyanid für 6 Tage.

Über den Inkubationszeitraum war eine Abnahme der Radioaktivität in den Flow-through-Systemen zu beobachten (Abb. 3.14). Während der neuntägigen Inkubation blieb die Radioaktivität in den Kontrollansätzen ohne *Eichhornia* annähernd konstant. Im Gegensatz zur Degradation des ^{14}C -CN im Batch-Verfahren, verlief die Abnahme der Radioaktivität in Nährlösung mit ganzen Wasserhyazinthen linear, also nach 0. Ordnung. Indes war die Streuung in diesen Ansätzen so hoch, dass keine signifikante Regression der Mittelwerte durchgeführt werden konnte (Abb. 3.14). Die einzelnen Ansätze, auf denen die gemittelten Werte in Abbildung 3.14 beruhen, unterschieden sich allerdings nur in der Abbaurate und nicht in der linearen Kinetik, was in Abbildung 3.14 durch die punktierten linearen Regressionen der Einzelansätze verdeutlicht ist. Aus der ^{14}C -Degradation der Einzelansätze wurde also deutlich, dass die Kinetik tatsächlich linear verlief.

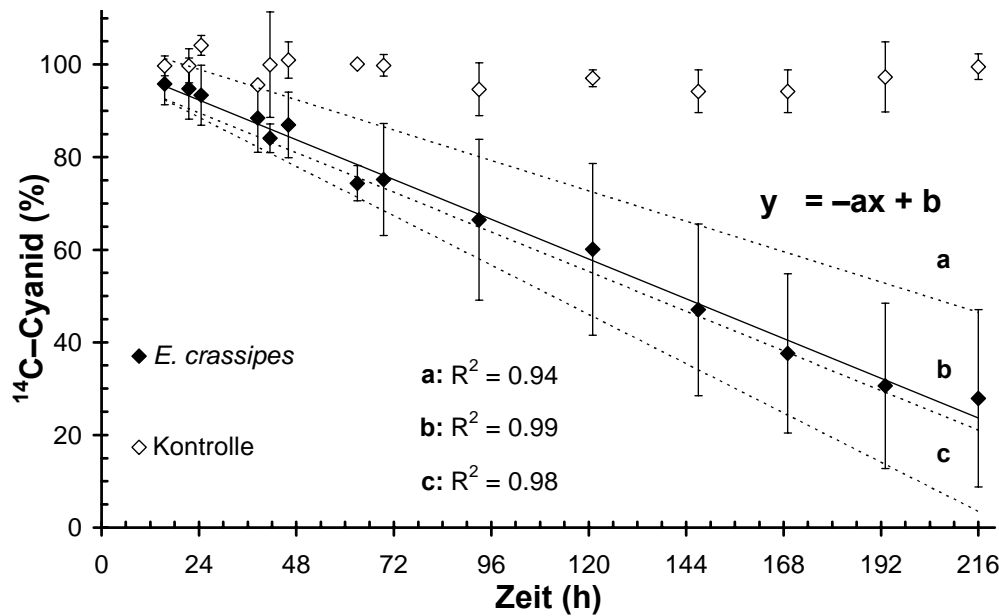


Abbildung 3.14: Verlust-Kinetik ^{14}C markierten Cyanids im Flow-through-Verfahren mit *E. crassipes* und Kontrollansätze ohne Pflanzen in prozentualen Anteil der applizierten Radioaktivität. Applikation: 0,7 MBq ^{14}CN , 5 mg L^{-1} Cyanid in 600 mL; Die punktierten Linien zeigen die lineare Regression der Replikate a–c. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von $n = 3$.

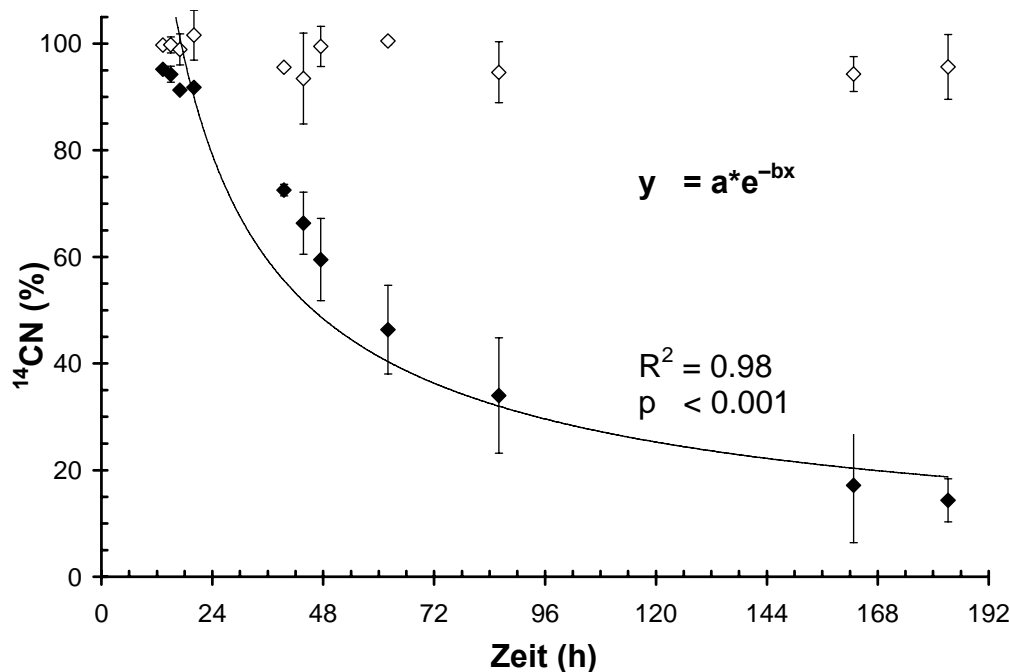


Abbildung 3.15: Verlust-Kinetik ^{14}C -markierten Cyanids im Flow-through-Verfahren mit *E. crassipes* und Kontrollen ohne Pflanzen. Applikation: 0,7 MBq ^{14}CN , 5 mg L^{-1} Cyanid in 600 mL; Die Werte beziehen sich auf den prozentualen Anteil der applizierten Radioaktivität; Die Irrtumswahrscheinlichkeit p zeigt die Signifikanz der Regressionsanalyse. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von $n = 3$.

In Abbildung 3.15 ist die ^{14}C -Cyanid Degradation mit Wasserhyazinthen dargestellt, die vor Versuchsbeginn über 21 Tage mehrfach mit Natriumcyanid vorinkubiert wurden. Auch in

diesem Experiment blieb die Radioaktivität in den Kontrollen ohne Pflanzen annähernd konstant. In den ersten 20 h war nur eine geringfügige Abnahme der Radioaktivität in den Ansätzen mit *E. crassipes* sichtbar. In den folgenden 7 Tagen verlief die Abnahme der Radioaktivität exponentiell und damit nach einer Kinetik 1. Ordnung. Die Restgehalte an Radioaktivität bzw. die Gehalte nach 183 h unterschieden sich nicht signifikant ($p > 0,05$) von den Gehalten der Ansätze mit Wasserhyazinthen, die nicht mit Cyanid vorinkubiert wurden. Bei beiden Ansätzen wurden nach Versuchsabbruch in Wurzeln, Blättern und Gasfallen ähnliche Gehalte an Radioaktivität festgestellt, die sich nicht signifikant ($p > 0,05$) voneinander unterschieden (Tab. 3.6). In keiner dieser Fraktionen konnte Cyanid festgestellt werden. In den Fällen lag die Radioaktivität als $^{14}\text{CO}_2$ vor. Die Restradioaktivität in Blättern und Wurzeln konnte nicht zugeordnet werden.

Die Wiederfindungsrate der Kontrollansätze lag bei mehr als 100%. Die Radioaktivität verblieb größtenteils in der Nährlösung, nur ein Bruchteil wurde tatsächlich in den Fallen gefunden. Bei den Ansätzen mit Pflanzen wurden um 50% der Radioaktivität in den Gasfallen festgestellt. Damit war in den Fällen mit *Eichhornia* signifikant ($p < 0,01$) mehr Radioaktivität als in den Kontrollansätzen vorhanden. Nach Versuchsende wurde in den Blättern ca. gleich viel Radioaktivität wie in der Inkubation ohne Kupfer gefunden. In den Wurzeln dagegen wurde ca. nur ein fünftel der Radioaktivität ermittelt. Bei den Ansätzen jedoch, in denen nur Wurzeln eingesetzt wurden, lag der Anteil der Radioaktivität bei ca. 4% und somit im gleichen Bereich wie bei den Ansätzen mit ganzen Pflanzen ohne zusätzliche Kupferapplikation (Tab. 3.6).

Die Senkung von ^{14}C -Cyanid unter Kupfereinfluss verlief ähnlich wie in den Ansätzen ohne Kupfer (Abb. 3.16). Nach 139 h wurde der pH der Lösung von ca. pH 7,5 auf pH 5,5 reduziert. Der anschließende Kurvenverlauf unterschied sich nicht deutlich. Die Abbaukinetik konnte nicht eindeutig zugeordnet werden. Sowohl die lineare, als auch die exponentielle Regression lieferten signifikante Resultate ($p < 0,001$; $R^2 \geq 0,96$). Wenn nur Wurzeln *Eichhornias* anwesend waren, zeigte sich ein anderer Verlauf in der Abnahme der Radioaktivität (Abb. 3.16). Die Kinetik verlief sigmoid, das heißt nach ca. 72 h Stagnation (bzw. nur minimaler Abnahme) folgte eine 72stündige rasche Abnahme auf ca. 50% gefolgt von erneuter Stagnation bis Versuchsende. Es verblieb schließlich nach Versuchsende ca. 25% mehr Restradioaktivität in Lösung (Abb. 3.16).

Table 3.6: ^{14}C -Bilanz der ^{14}CN Inkubation in Flow-through-Systemen mit *E. crassipes*

Ansatz	Extrakt „Wurzeln“ (%)*	Extrakt „Blätter“ (%)*	Fallen ^{14}C (%)*	NER (%)*	Rest (%)*	Proben (%)*	Summe (%)*
Cyanid (5 mg L ⁻¹)	5,7 ± 0,4	6,4 ± 1,0	45,3 ± 16,0	0,81 ± 0,3	27,9 ± 19,1	0,95 ± 0,1	85,6 ± 4,3
Cyanid II** (5 mg L ⁻¹)	4,8 ± 0,2	7,18 ± 1,0	46,9 ± 5,8	5,4 ± 2,5	14,3 ± 13,2	1,3 ± 0,1	80,0 ± 4,9
Kupfer/Cyanid (5+5 mg L ⁻¹)	0,9 ± 0,2	4,4 ± 1,0	56,0 ± 16,3	5,2 ± 1,1	13,3 ± 10,0	2,2 ± 0,1	87,4 ± 5,7
nur Wurzeln (5+5 mg L ⁻¹)	4,4 ± 0,8	—	47,0 ± 11,5	0,1 ± 0,05	36,0 ± 10,9	2,4 ± 0,1	89,9 ± 3,6
Kontrolle (5 mg L ⁻¹)	—	—	6,1 ± 2,8	—	99,5 ± 2,7	0,95 ± 0,13	106,9 ± 5,7

*Die Werte beziehen sich auf den prozentualen Anteil der applizierten Radioaktivität.

**Versuch mit vorinkubierten Pflanzen (vgl. Abb. 3.14) Die gasförmigen ^{14}C -Spezies ($^{14}\text{CO}_2$, H^{14}CN) wurden aus NaOH-Fallen (0,1 N) bilanziert. Der Extrakt bezieht sich auf die Radioaktivität im 2,5 N NaOH Extrakt nach Aufschluss durch Mörsern in flüssigem Stickstoff und Ultraschall; NER: Nicht Extrahierbare Rückstände wurden vollständig verbrannt und das $^{14}\text{CO}_2$ per Flüssigzintillationszählung bestimmt; Rest: Restradioaktivität in Lösung bei Versuchsende; Der Standardfehler zeigt die Standardabweichung von n = 3.

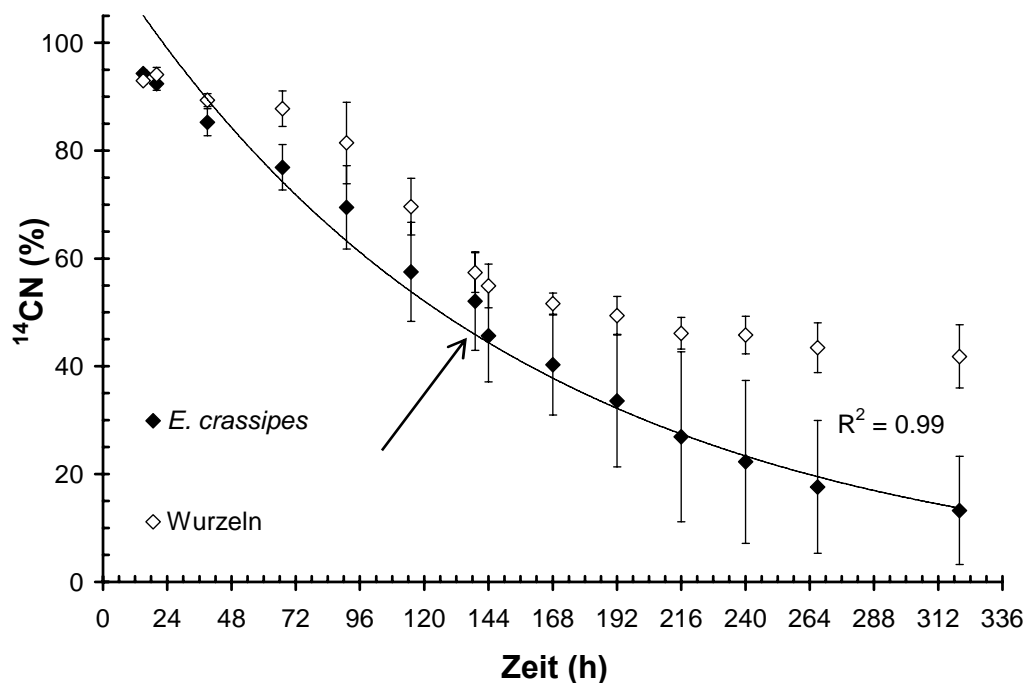


Abbildung 3.16: Verlust-Kinetik ^{14}C -markierten Cyanids mit *E. crassipes* und Kontrollen ohne Pflanzen im Flow-through-Verfahren in % applizierter Radioaktivität. Während des Versuches wurde nach 139 h der pH von ca. 7,5–8 auf pH 5,5 eingestellt (Pfeil). Applikation: 0,35 MBq ^{14}CN , 5 mg L⁻¹ Cyanid / 5 mg L⁻¹ Kupfer; Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von n = 3.

3.4.2 Diskussion der ^{14}CN -Bilanzierung nach Aufnahme über die Wurzeln

Die Bioimager-Aufnahmen (Abb. 3.14) zeigten deutlich, dass *E. crassipes* die Radioaktivität aufnimmt und in allen Pflanzenteilen gleich verteilt. Bei der Verteilung der Radioaktivität in den Blättern konnte nicht erkannt werden, dass sich die Radioaktivität schwerpunktmäßig entlang der Leitgefäße verteilt. Dies ist wahrscheinlich auf die hohe Permeabilität der Zellbestandteile für Blausäure zurückzuführen. Die geringere Radioaktivität in den Wurzeln ist wahrscheinlich auf Verluste durch das Spülen zurückzuführen, da bei diesem Ansatz die Wurzeln nicht unmittelbar eingefroren und in Natronlauge überführt wurden. Dementsprechend fielen die Gehalte der Extrakte in Tabelle 3.6 höher aus.

Die Schwankungen der Radioaktivität in den Kontrollansätzen (Abb. 3.14/15) waren möglicherweise nicht auf Messungenauigkeiten, sondern auf tatsächlich unterschiedliche Gehalte an Radioaktivität in der Nährlösung zu den unterschiedlichen Zeitpunkten zurückzuführen. Diese könnte durch temperaturabhängige Ausgasung und Rücklösung von H^{14}CN während der Licht und Dunkelphasen im Phytotron zustande kommen.

Der lineare Verlauf der Abnahme der Radioaktivität mit nicht vorinkubierten Wasserhyazinthen lieferte keinen Hinweis auf einen biologischen Abbauprozess. Im Gegenteil, die Verlustkinetik nach 0. Ordnung, also den stetigen Verlust von Radioaktivität mit konstanter Rate, deutete eher an, dass es sich um einen passiven Diffusionsprozess durch die Zellmembran ohne Proteinvermittlung handelte, der typisch für HCN ist. Dieser kann durch folgende Beziehung nach Darnell *et al.* (1986) und LeFevre (1961) beschrieben werden:

$$\frac{dn}{dt} = P \times A \times \left(\frac{dC}{dx} \right)$$

Hierin ist n die Stoffmenge an Molekülen im Innern der Zelle in mol, t die Zeit in s, P die substanzabhängige Permeabilitätskonstante, A die Oberfläche der Zellmembran und x die Breite der Membran in cm. Wenn P und A konstant sind, ist dn / dt eine simple lineare Funktion von dC / dx . Durch die Vorinkubation änderte sich die Abbau- bzw. Verlustkinetik jedoch nach anfänglicher Stagnation zur 1. Ordnung, was auf eine aktive biologische Aufnahme hindeutete. Legt man die berechnete maximale Abbaugeschwindigkeit mit Blättern *Eichhornias* von $33,56 \text{ mg CN kg h}^{-1}$ zugrunde, so könnten die Pflanzen mit einem mittleren Frischgewicht des Blattmaterials von 10 g das gesamte Cyanid (5 mg L^{-1}) in der Lösung (600 mL) innerhalb von 15 h vollständig absorbieren. Tatsächlich fiel der Cyanidgehalt nach mehr als 150 h unter 20% . Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Absorption von Cyanid durch *Eichhornia* durch die Aufnahme von HCN über die Wurzeln in die Blätter limitiert ist. Ob der Cyanid-Abbau mit Wasserhyazinthen hauptsächlich mikrobiologisch an den Wurzeln oder im

Pflanzengewebe stattfand, konnte aus der Kinetik nicht abgeleitet werden. Allerdings lieferte die Bilanz einen Hinweis. In beiden Ansätzen wurde in Wurzeln und Blättern annähernd gleich viel Radioaktivität ermittelt. Dies zeigte eindeutig, dass die Radioaktivität nicht in den Wurzeln akkumuliert. Vielmehr deutete sich sogar an, dass die Radioaktivität mit ca. der gleichen Geschwindigkeit aufgenommen und in der Pflanze verteilt wird. Diese Vermutung wurde auch durch die Inkubation mit Kupfer und ^{14}C -Cyanid gestützt. Bereits in den Versuchen zur Kupferabsorption wurde gezeigt, dass Kupfer mit Cyanid in Lösung nur sehr begrenzt aufgenommen wird. Nun wurde deutlich, dass in diesen Ansätzen mit Kupfer in den Wurzeln auch wesentlich weniger Radioaktivität als in den Blättern zu finden war. Bei den Ansätzen, in denen nur Wurzeln inkubiert waren, war dies indes nicht der Fall. Damit deutete sich an, dass die Aufnahme der Radioaktivität in die Wurzeln aus der Lösung unter Kupfereinfluss gehemmt war, die aufgenommene Radioaktivität in der Pflanze aber anschließend rasch verteilt wird. Dies könnte darauf hinweisen, dass kein $[\text{Cu}(^{14}\text{CN})_n]^{-(n-2)}$ aufgenommen wird, sondern ^{14}C -Cyanid oder $^{14}\text{CO}_2$, welche aus dem Kupferkomplex freigesetzt wurden. In diesem Fall würde wenig Radioaktivität aufgenommen, da die Zersetzung des Cyanocuprats Geschwindigkeit limitierender Prozess vorausginge. Die aufgenommene Radioaktivität wäre hingegen in der Pflanze sehr mobil und würde schnell in die Blätter verteilt werden.

Die Radioaktivität wurde in hohem Maße aus den Blättern freigesetzt. Ein Verlust der Radioaktivität aus Undichtigkeiten der hydroponischen Systeme als Hauptursache für die hohen Gehalte an Radioaktivität in den Fallen kann sicher ausgeschlossen werden, da hierbei auch in den Fallen der Kontrollansätze wesentlich mehr Radioaktivität hätte festgestellt werden müssen. Da die Radioaktivität in den Pflanzen nicht als Cyanid identifiziert werden konnte, ist völlig offen, in welcher Form die Radioaktivität aufgenommen und in den Pflanzen transportiert wurde. Folgende Möglichkeiten existieren:

1. Cyanid wird von der wurzelassoziierten Mikroflora zu Kohlenstoffdioxid mineralisiert, welches durch die Pflanzen aufgenommen, über das Xylem in der Pflanze verteilt und aus den Blättern freigesetzt wird.
2. Cyanid wird als HCN von den Pflanzen aufgenommen, als HCN weitergeleitet, in den Blättern oder bereits in den Wurzeln zu Asparagin umgesetzt, welches Kohlenstoffdioxid abspaltet, das aus den Blättern ausgast.
3. Cyanid wird als HCN von den Pflanzen aufgenommen über das Xylem verteilt und aus den Stomata unverändert freigesetzt.

Die Versuche mit Blattstücken haben gezeigt, dass HCN in Gegenwart von Wurzeln *Eichhornias* in hohem Maße vollständig mineralisiert wird. In einer Studie von Ultsch und Anthony (1973) wurde die Aufnahme von $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ aus Nährlösung durch *E. crassipes* untersucht. Sie konnten nachweisen, dass tatsächlich 10% des Gesamt-Kohlenstoffgehaltes der Pflanzen aus der Lösung aufgenommen und über den Calvinzyklus fixiert wurden. Diese Tatsachen, dass $^{14}\text{CO}_2$ entsteht und aufgenommen werden kann, sprechen für den Punkt 1. Allerdings konnte in den Ansätzen mit Blattstücken *Eichhornias* gleichfalls radioaktives Kohlenstoffdioxid festgestellt werden, das aus der Abspaltung von Asparaginsäure stammen könnte. Dies könnte für die zweite Möglichkeit sprechen. Für Punkt 3 gaben die Versuche keinen Hinweis. Allerdings fielen die Gehalte der Radioaktivität im Gewebe so gering aus, dass freies Cyanid sich im Extrakt schon unterhalb der Nachweisgrenze der HPLC-Methode ($0,1 \text{ mg CN L}^{-1}$) bewegen könnte. Somit kann auch dieser Prozess nicht ausgeschlossen werden. Dementsprechend konnten Trapp *et al.* (2001b) mit Weiden die Ausgasung von HCN über die Blätter nachweisen. Sie schlussfolgerten allerdings, dass es sich im Vergleich zur Umsetzung in den Blättern um einen nebensächlichen Verlustprozess handelt.

Ebbs *et al.* (2003) führten Untersuchungen zur Aufnahme, Transport und Metabolismus von ^{15}N -Cyanid und ^{15}N -markiertem Ferrocyanid mit *Salix eriocephala* in hydroponischen Systemen über einen Zeitraum von 20 Tagen durch. Innerhalb der ersten 10 Tage verlief die Absorption freien Cyanids linear, anschließend nahm der Gehalt nur noch allmählich ab. Nach 10 Tagen verblieben noch ca. 40% des Cyanids in Lösung, nach 20 Tagen noch ca. 6%. Somit verlief die Degradation sehr ähnlich wie in der eigenen Studie mit nicht vorinkubierten Wasserhyazinthen. Auch in der Studie von Ebbs *et al.* (2003) konnte gezeigt werden, dass das applizierte Cyanid metabolisiert wird. Sie fanden aber in den Wurzeln eine um ca. den Faktor 10 höhere ^{15}N -Anreicherung als in den Blättern und Stängeln. Die Gasphase wurde in der Studie nicht bilanziert. Die geringe Wiederfindungsrate von nur ca. 60% könnte allerdings ein Hinweis darauf sein, dass tatsächlich Ausgasung aus den Blättern stattgefunden hat. Ferrocyanid wurde ca. um den Faktor 10 geringer im Gewebe angereichert. Diese Beobachtung stimmt demnach mit den eigenen Untersuchungen mit Kupfercyanid überein. Samiotakis und Ebbs (2004) reproduzierten diese Studie mit *Hordeum vulgare*, *Avena sativa* und *Sorghum bicolor*. Sie applizierten allerdings nur ^{15}N -markiertes Ferrocyanid und konnten nur bei *S. bicolor* eine ähnliche ^{15}N -Anreicherung in Wurzeln und Blättern nachweisen. Die anderen Pflanzen akkumulierten in den Wurzeln ca. doppelt so viel ^{15}N . In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde ermittelt, dass Weiden mehr Ferrocyanid aus der Lösung aufnehmen, wenn keine andere Stickstoffquelle vorhanden ist (Larsen und Trapp 2006).

3.4.3 Zusammenfassung: ^{14}CN –Bilanzierung nach Aufnahme über die Wurzeln

Die Resultate haben verdeutlicht, dass in Anwesenheit von *E. crassipes* freies Cyanid erheblich absorbiert wird. Allerdings fiel die Absorptionsgeschwindigkeit wesentlich geringer aus als durch die berechnete maximale Abbaugeschwindigkeit v_{\max} impliziert. Die Abbaugeschwindigkeiten fielen aber ähnlich aus wie in anderen Arbeiten für andere Pflanzen beschrieben. Eine Vorinkubation der Pflanzen mit Cyanid führte zu einer veränderten Verlust-Kinetik, was auf einen Adaptionsprozess seitens der Pflanzen und / oder der Mikroflora an den Wurzeln hinwies. In Blättern und Wurzeln waren ähnliche absolute Gehalte an Radioaktivität (ca. 5%) angereichert. Wenn Kupfer in der Lösung anwesend war, wurde hingegen in den Wurzeln ca. 90% weniger Radioaktivität festgestellt. Der Hauptanteil der applizierten Radioaktivität wurde über die Blätter ausgegast. Die Versuche lassen aber nicht den Schluss zu, ob es sich dabei um H^{14}CN oder $^{14}\text{CO}_2$ handelte, da die Blausäure in den Natronlauge-Fallen zu Kohlenstoffdioxid mineralisiert wurde (vgl. Kap. 2.4.3). Wenn jedoch das $^{14}\text{CO}_2$ bzw. ein Teil des produzierten $^{14}\text{CO}_2$ aus dem pflanzlichen Stoffwechsel stammen sollte, muss dies aus der Decarboxylierung von Asparaginsäure, dem unmittelbaren Oxidationsprodukt des in der Literatur beschriebenen Metaboliten Asparagin, stammen. Wenn dies der Fall sein sollte, muss in den Blättern *Eichhornias* erhebliche Mengen radioaktiver Asparaginsäure nachzuweisen sein.

3.5 ^{14}CN –Metabolisierung

3.5.1 Ergebnisse

Bei der Identifizierung der ^{14}CN –Metaboliten wurde gezielt in den Blättern *Eichhornias* nach Asparagin und der unmittelbar verwandten Aminosäure Asparaginsäure gesucht, da diese die einzigen bekannten Metaboliten des Cyanids in Pflanzen sind. Das Grundprinzip der Aminosäureidentifizierung beruht auf der Derivatisierung mit Phenylisothiocyanat PITC. Die Aminosäuren können anschließend mittels RP–HPLC aufgetrennt werden. Die eindeutige Zuordnung der radioaktiven Signale erfolgt dann mittels Standards von Asparagin und Asparaginsäure. Da es sich bei den zu erwartenden Metaboliten um Aminosäuren handelte, war zu vermuten, dass diese relativ schnell zu Polypeptiden bzw. Proteinen umgesetzt werden. Aus diesem Grund wurde zunächst ein experimenteller Ansatz verfolgt, der auch die inkorporierten Aminosäuren einschließt. Dies setzt eine Totalhydrolyse bei hohen Temperaturen mit Salzsäure voraus. Da bei der Ansäuerung und der Erhitzung die Gefahr der Verflüchtigung von Radioaktivität in Form von Blausäure und Kohlenstoffdioxid besteht, wurde zunächst die radioaktive Blattsuspension destilliert und die flüchtige Radioaktivität in Natronlauge fixiert.

Nach einer 6stündigen Destillation konnte keine Anreicherung der Radioaktivität in der Natronlaugegefalle mehr beobachtet werden (Abb. 3.17). Daher erfolgte anschließend die saure Hydrolyse in gasdichten Hochdruckgefäßen.

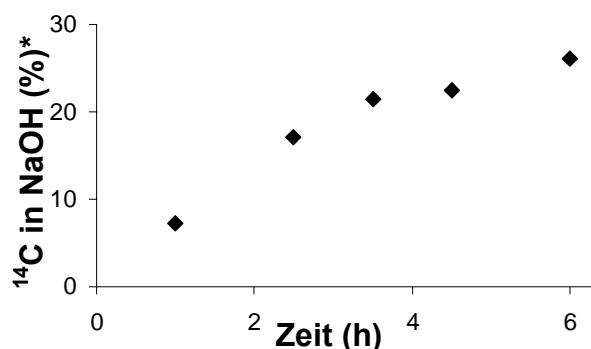


Abbildung 3.17: Destillation des Blattmaterials bei Raumtemperatur in 6N HCl nach Inkubation mit 2 MBq K¹⁴CN und 2 mg L⁻¹ Cyanid. *% der applizierten Radioaktivität

In der Tabelle 3.7 ist die Bilanz dieses Ansatzes aufgeführt. Die Dialyse in der Tabelle war der letzte Aufreinigungsschritt. Vor der Dialyse waren nur noch ca. 22% der applizierten Radiaktivität im Hydrolysat. Dies bedeutete, dass zu diesem Zeitpunkt bereits ca. 52% der applizierten Radioaktivität verloren gegangen waren. Nach der Dialyse waren nur noch 1,7% der applizierten Radioaktivität für die weitere Analytik verfügbar.

Damit war keine Derivatisierung möglich. Aus diesem Grund wurde der Ansatz verworfen und ein weiterer Ansatz mit weit weniger drastischen Bedingungen ohne Hydrolyse unternommen. Dieser erfasste allerdings nur die freien Aminosäuren. Bei diesem Ansatz wurden im Extrakt ausreichende Ausbeuten an Radioaktivität und auch eine wesentlich höhere Gesamtbilanz erzielt (Tab. 3.7). Der höchste Gehalt wurde im Extrakt festgestellt.

Die HPLC Auftrennung gewährleistete eine zuverlässige Identifizierung der N-substituierten Thioharnstoffderivate von Asparagin und Asparaginsäure. Die verwandten Aminosäurederivate eluierten mit sehr kurzen Retentionszeiten. Das Derivat der Asparaginsäure eluierte nach 162 s, gefolgt von dem Derivat des Asparagins nach 199 s (Abb. 3.18). Die UV-Absorptionsmaxima lagen bei 218 nm und 246 nm (Asparaginsäure) und 218 nm und 248 nm (Asparagin). Nach der Derivatisierung und Aufreinigung befanden sich noch 83% der Radioaktivität in der Lösung. Dementsprechend wurden nur 17% der Radioaktivität nicht durch die Derivatisierung umgesetzt. Im Chromatogramm des Proben-Extraktes wurden zwei radioaktive Signale durch die Flüssigzintillationszählung sichtbar, die im Flächenverhältnis von 1:1,2 eluierten (Abb. 3.19b). Diese Signale wurden auch durch die UV-Detektion bei 216 nm und 248 nm aufgelöst (Abb. 3.19a).

Table 3.7: ^{14}C -Bilanz: ^{14}CN Degradation in Flow-through – Systemen mit *E. crassipes*

<i>Fraktion</i>	<i>Ansatz Gesamtprotein</i>	<i>Ansatz Freie Aminosäuren</i>
<i>Extrakt (%)</i> ^{*1}	–	61,3
<i>NaOH Falle (%)</i> ^{*1 *2}	26,1	–
<i>Vor Dialyse (%)</i> ^{*1 *2}	21,7	–
<i>Nach Dialyse (%)</i> ^{*1 *2}	1,7	–
<i>NER (%)</i> ^{*1}	nb	19,15
<i>Proben (%)</i> ^{*1}	3,8	1,44
<i>Rest (%)</i> ^{*1}	–	17,4
<i>(%)</i> ^{*1} <i>Summe</i>	51,6	99,26

^{*1} in % der applizierten Radioaktivität. ^{*2}Ansatz Gesamtprotein; Die gasförmigen ^{14}C -Spezies ($^{14}\text{CO}_2$, H^{14}CN) wurden aus NaOH-Fallen bilanziert; Extrakt: Radioaktivität im 70%igen Ethanol-Extrakt nach Aufschluss durch Mörsern in flüssigem Stickstoff und Ultraschall; NER: Nicht Extrahierbare Rückstände wurden vollständig verbrannt und das $^{14}\text{CO}_2$ per Flüssigzintillationszählung bestimmt; Rest: Restradioaktivität in Lösung bei Versuchsende; nb: nicht bestimmt

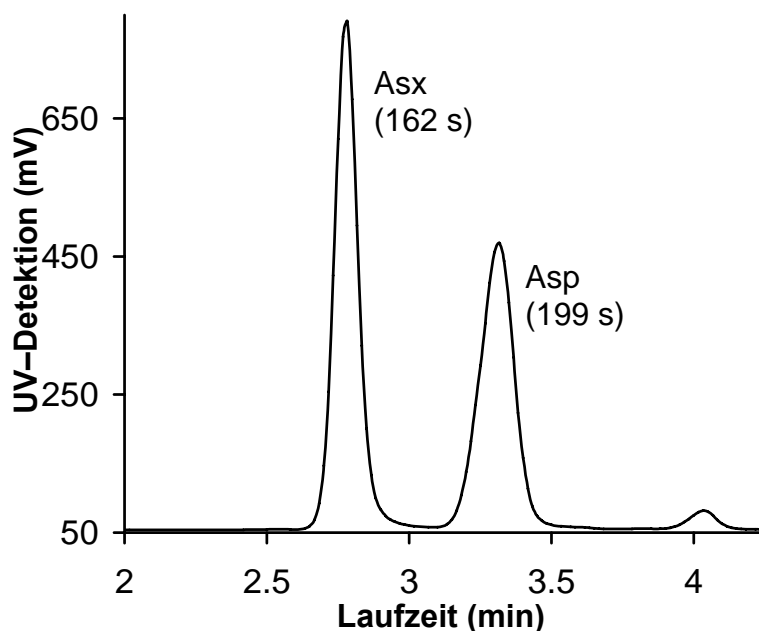


Abbildung 3.18: RP-HPLC UV Chromatogramm Asparaginsäure (Asx) Asparagin (Asp) Standard; Einspritzvolumen: 5 μL (entspricht $3,4 \cdot 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ Asparagin bzw. $2,4 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ Asparaginsäure); der Peak nach 4 min ist auf eine Verunreinigung zurückzuführen. Zur Methode: siehe Kap. 2.4.4

Das erste Signal eluierte nach 162 s, das zweite nach 199 s. Im UV-Chromatogramm waren zudem noch einige schwächere Signale weiterer Aminosäurederivate sichtbar, die aber nicht gekoppelt mit entsprechenden Radiosignalen eluierten. Für die Zuordnung der radioaktiven Signale wurden die Proben mit internen Standards der N-substituierten Thioharnstoffderivate

von Asparagin bzw. Asparaginsäure untersucht. Die UV-Chromatogramm dieser Elutionen sind in Abbildung 3.20 dargestellt. Das Asparaginsäurederivat eluierte zeitgleich mit dem 1. Probensignal nach 162 s.

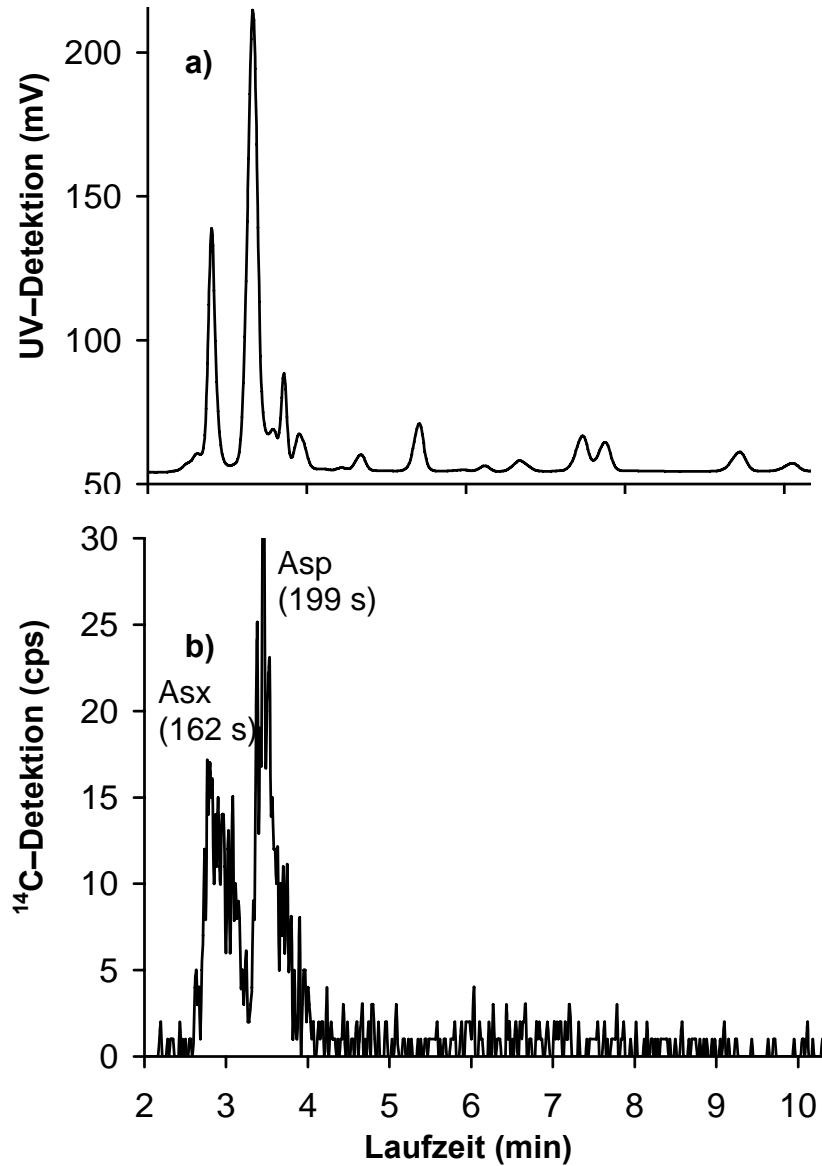


Abbildung 3.19: RP-HPLC UV (a) und radioaktiv (b) Chromatogramm des derivatisierten Pflanzenextraktes; Einspritzvolumen: 5 μL (= 102,3 Bq)

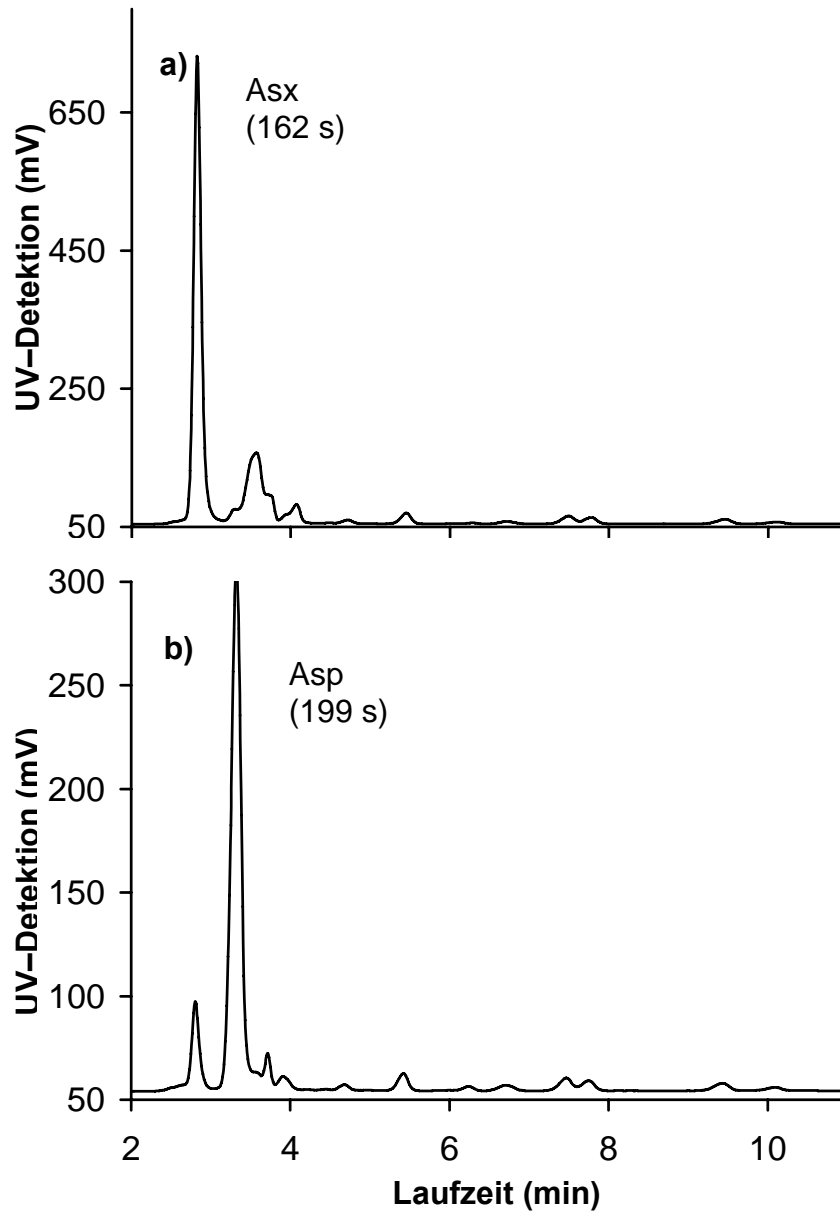


Abbildung 3.20: RP-HPLC UV Chromatogramm des Pflanzenextraktes mit internen Standards von a) Asparaginsäure (Asx) und b) Asparagin (Asp); Einspritzvolumen: 5 μL (entspricht $3,4 \cdot 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ Asparagin bzw. $2,4 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ Asparaginsäure)

3.5.2 Diskussion der ^{14}C -Metabolisierung

Die ethanolische Extraktion und anschließende nähere Untersuchung der Restradioaktivität des Blattextraktes hat zweifelsfrei gezeigt, dass applizierte Blausäure durch *Eichhornia* zu Asparagin umgesetzt wird. Ferner konnte auch die verwandte Asparaginsäure mit ^{14}C -Markierung nachgewiesen werden. Beide Aminosäuren lagen frei im Gewebe vor. Bei der sauren Totalhydrolyse gingen um 50% der applizierten Radioaktivität verloren.

Der Verlust der Radioaktivität bei der Hydrolyse im ersten Versuchsansatz kann nur über die Gasphase stattgefunden haben. Da vor der Hydrolyse die flüchtige Radioaktivität aus der Pflanzensuspension entfernt worden ist (Abb. 3.17), kann der Verlust weder durch überschüssiges H^{14}CN , noch durch jegliche andere, leicht flüchtige Substanzen wie $^{14}\text{CO}_2$ erklärt werden, die sich nach der Inkubation in der Suspension befanden. Die einzige plausible Erklärung ist, dass sich während der Hydrolyse eine neue gasförmige Substanz mit ^{14}C -Markierung gebildet hat. Da hierbei die Blausäure ausscheidet, handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um $^{14}\text{CO}_2$. Nach der Totalhydrolyse bei 160 °C in 6 N HCl ist keine Differenzierung mehr zwischen Asparagin und Asparaginsäure mehr möglich. Im Hydrolysat kann lediglich nur noch Asparaginsäure gefunden werden, da unter diesen drastischen Bedingungen das Asparagin vollständig zu der korrespondierenden Säure hydrolysiert (Rozan *et al.* 2001; Ozols, 1990). Die Asparaginsäure wiederum decarboxyliert unter thermischer Einwirkung (Granvogl *et al.* 2004). Letztendlich war also der hohe Verlust an Radioaktivität an die Gasphase ein Hinweis darauf, dass das applizierte ^{14}C -Cyanid in der Pflanze zu Asparagin umgesetzt wurde, die zu Asparaginsäure hydrolysierte, welche $^{14}\text{CO}_2$ abspaltete oder, dass das β -Cyanoalanin direkt zu Aspartat umgesetzt wurde (Piotrowski *et al.* 2001). Diese Hypothese erklärt aber nicht hinreichend das beträchtliche Ausmaß des Verlustes. In Polypeptiden eingebundenes ^{14}C -markiertes Asparagin bzw. Asparaginsäure wäre nicht in dem Maße hydrolysiert und decarboxyliert, da zunächst die Aminosäuren durch die Hydrolyse hätten freigesetzt werden müssen. Die einzige Erklärung ist, dass die ^{14}C -markierten Aminosäuren zum größten Teil frei und nicht in Polypeptiden eingebunden vorlagen.

Diese Hypothese wird von Ting und Zschoche (1970) gestützt. Sie inkorporierten Baumwollwurzeln mit K^{14}CN und konnten anschließend radioaktives Asparagin und Asparaginsäure nachweisen. Sie fanden ferner heraus, dass diese Aminosäuren in der Pflanze akkumulieren und nicht dem metabolischen Pool zur Verfügung stehen.

Tatsächlich wurde dieser Befund durch die Extraktion der freien Aminosäuren bestätigt. Durch die Derivatisierung konnten nur 17% der Radioaktivität nicht umgesetzt werden. Im Umkehrschluss betrug der Anteil der freien Aminosäuren mit ^{14}C -Markierung im Extrakt also

mindestens 83% der Radioaktivität im Pflanzenextrakt. Die internen Standards eluierten zeitgleich mit den Probensignalen. Somit handelte es sich bei der Radioaktivität des Pflanzenextraktes zweifelsfrei um Asparagin und Asparaginsäure. Der Anteil an Asparagin war nur minimal höher als der an Asparaginsäure. In *E. crassipes* muss also entweder ein erheblicher Teil des β -Cyanoalanins direkt zu Asparaginsäure oder das freie Asparagin schnell zu Asparaginsäure hydrolysiert zu werden. Ting und Zschoche (1970) erhielten ein ähnliches Resultat. Nur nach einstündiger Inkubation von Baumwollwurzeln mit Na^{14}CN konnten sie radioaktives β -Cyanoalanin (38,5%), Asparagin (41,8%) und Asparaginsäure (7,3%) nachweisen. Bedenkt man die bedeutend längere Inkubationszeit von 24 h im eigenen Experiment, erscheint es plausibel, dass nur noch radioaktives Asparagin und Asparaginsäure im nahezu äquimolaren Verhältnis nachgewiesen wurde. Auffällig im UV-Chromatogramm des Probenextraktes war, dass die nicht zugeordneten Aminosäure-Signale sehr viel geringer ausfielen als die von Asparagin und Asparaginsäure. Dieses Ergebnis wird von Ghabbour *et al.* (2004) bestätigt. Auch in deren Arbeit waren Asparagin und Asparaginsäure die Aminosäuren mit der höchsten Abundanz in *Eichhornia*.

3.5.3 Zusammenfassung: ^{14}CN -Metabolisierung

Die ethanolische Extraktion des Blattmaterials *Eichhornias* und die anschließende Detektion der Thioharnstoffderivate belegten zweifelsfrei, dass freies Cyanid im hohen Maße in den Blättern *Eichhornias* zu Asparagin und Asparaginsäure umgesetzt wurde. Beide Aminosäuren wurden nach 24 h Inkubation zu mindestens 83% nicht in Form von Peptiden inkorporiert. Mit den Ergebnissen der vorangegangenen Versuche konnte ausgeschlossen werden, dass aufgenommenes Cyanid in den Blättern *Eichhornias* akkumuliert. Somit können bei dem Betrieb einer Kläranlage mit *E. crassipes* toxische Langzeiteffekte ausgeschlossen werden. Ferner erscheint aufgrund der schnellen Umsetzung zu Asparagin und Aspartat die Aufnahme, die Passage durch das Xylem und letztendlich die Ausgasung von HCN über die Stomata (vgl. Kapitel 3.7) als unwahrscheinlich.

3.6 Schadstoffaufbereitung mit *E. crassipes* im Pilotmaßstab (AMOVA)

3.6.1 Ergebnisse

Die bisherigen Ergebnisse sollten im Anschluss an die experimentellen Studien im Labor im halbertechnischen Maßstab reproduziert werden. Bei den Versuchen in der AMOVA sollte vorrangig die Frage geklärt werden, ob freies Cyanid als primärer wassergefährdender Schadstoff durch *E. crassipes* tatsächlich im ökotechnisch relevanten Zeiträumen (und Konzentrationen) vollständig abgebaut werden kann. Hiermit ergab sich der Anspruch eines vollständigen Klärprozesses auf Konzentrationen unterhalb von $30 \mu\text{g CN L}^{-1}$ von Abwässern mit $50\text{--}300 \text{ mg CN L}^{-1}$ in maximal sieben Tagen. Diese Zeitspanne ergibt sich aus der im Kleinbergbaubetrieb gebräuchlichen minimalen bzw. sinnvollen Perkulationszeit der Cyanidlösung im Laugungsprozess.

Darüber hinaus sollte die Senkung einer Kupferbelastung unter Cyanid-Einfluss untersucht werden. Dieser Teil der Untersuchungen war aufgrund des zeitlich begrenzten Versuchszeitraums in den Sommermonaten von sekundärem Interesse.

3.6.1.1 Vorversuche

Zu Beginn der Arbeiten in der AMOVA waren elementare Systemeigenschaften noch völlig ungeklärt. Ziel war es, einen optimalen Schadstoffabbau bei minimaler Schädigung der Pflanzendecke zu gewährleisten. Es musste geklärt werden, wieviel Cyanid in welchem Zeitraum und in welchem Volumen appliziert werden konnte, ohne die Pflanzen zu gefährden.

3.6.1.1.1 Versuche zur Etablierung der Versuchsbedingungen

Die erste Applikationsmenge war mit $7,5 \text{ g NaCN}$ so gewählt, dass sich im Gesamtsystem (ca. 1000 L) eine maximale Konzentration von ca. 4 mg L^{-1} Cyanid einstellen sollte. Bei dieser Konzentration hätte unter der Prämisse einer optimalen Mischung keine Schädigung der Pflanzen bemerkbar sein dürfen. In diesem Versuch war noch keine Kreislaufführung etabliert. Überschüssiges Wasser konnte dementsprechend über einen Überlauf abgeführt werden. Während der Applikation wurde eine Flussrate von $11,5 \text{ L h}^{-1}$ eingestellt. Das Applikationsvolumen betrug 6 L . Bei einer Leistung der Dosierpumpen von 2 L h^{-1} wurde 10 h nach Applikationsstart ein Konzentrationsmaximum von ca. 24 mg L^{-1} Cyanid an der ersten Probe-Entnahmestelle nach $0,5 \text{ m}$ sichtbar (Abb. 3.21). Ab diesem Zeitpunkt wurden die Pumpen abgestellt, sodass die Schadstoffwelle sich nur noch passiv im Becken verteilen konnte. Während der nächsten 120 h war die Schadstoff-Front allerdings nur bis zum zweiten Probe-Entnahmepunkt, d.h. bis zu 2 m (von $6,5 \text{ m}$) nach Einlauf sowie im Kies der ersten

Probe-Entnahmestelle (0,5 m) messbar (Abb. 3.21). Als Folge wurde auf dem ersten Meter des Beckens eine über fünfmal höhere Konzentration festgestellt als für das gesamte Becken im Mittel berechnet. Nach 24 Stunden zeigte sich aber bereits ein sehr deutlicher Rückgang der Cyanidkonzentration um ca. 80%. Allerdings war auch noch nach fünf Tagen freies Cyanid in einer Konzentration von ca. 1 mg L^{-1} nachweisbar. Die *Eichhornia*-Decke zeigte innerhalb des Bereiches der ersten Probe-Entnahmestelle (nach 0,5 m) sehr deutliche Schäden, die nach 48 h durch Welken einzelner Blätter sichtbar wurden. Letztendlich waren nach 120 Stunden ca. 80% der Pflanzen im ersten Beckenmeter abgestorben. Nach ca. 1,5 m nach Einlauf waren noch ca. 50% der Pflanzen chlorotisch (vgl. Abb. A1/A2).

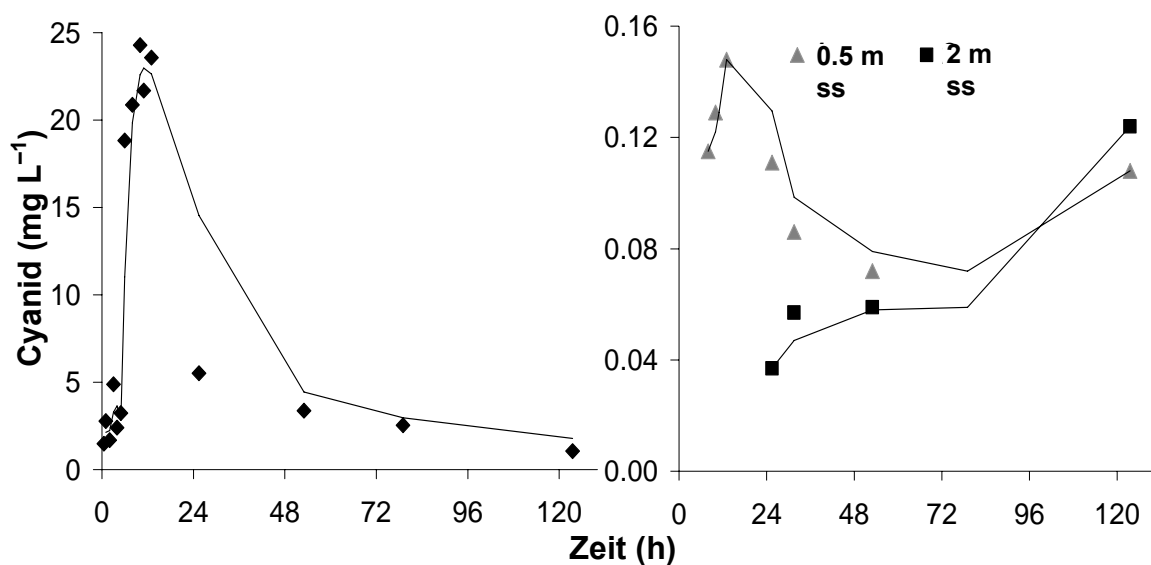


Abbildung 3.21: Erste Cyanid-Applikation in der AMOVA vom 14.–19.07.05 (Versuch 1); Links: Cyanidgehalt an der ersten Probe-Entnahmestelle (0,5 m); Rechts: Cyanidgehalt im Kies der ersten Probe-Entnahmestelle (0,5ss) sowie an der 2. Probe-Entnahmestelle (2 m); Applikation: 7,5 g NaCN in 6 L; Flussrate $11,5 \text{ L h}^{-1}$ (während der Applikation) dann 0 L h^{-1} (Nach Konzentrationsspitze)

Zur Optimierung des Klärprozesses wurde im nächsten Versuch das Applikationsvolumen und damit auch die Applikationszeit erhöht. Ferner sollte der Schadstoffstrom durch das Becken beschleunigt werden. Hierfür erfolgten ein gezielter Abfluss von der Wasseroberfläche am Becken-Ende sowie eine Erhöhung der Flussrate. Im nächsten Schritt wurde die Kreislaufführung etabliert. Bei diesem Versuch, der im Zeitraum vom 26. –30. Juli 2005 stattfand, wurden 4,5 g Natriumcyanid in 30 L über einen Zeitraum von 15 h appliziert. Bei dieser Cyanid-Einwaage hätte die theoretische Gesamtkonzentration im Becken ca. $2,4 \text{ mg L}^{-1}$ betragen sollen. Während dieser Applikation wurde nach 6, 8, 11, 13 und 15 h nach Applikationsstart an den vier Probe-Entnahmestellen (0,5–6 m) im *Eichhornia*- und im Kontrollbecken ohne Pflanzen der Cyanidgehalt bestimmt. Außerdem wurde auch der Kieskörper unterhalb der

Wasseroberfläche am Beckenboden (ss: sub surface) beprobt. Während der Applikation war weder die Kreislaufführung etabliert, noch der Beckenauslauf geöffnet, sodass kein Abwasser entweichen konnte.

Im Becken mit *Eichhornia* war während der ersten 15 h an jeder Probe-Entnahmestelle freies Cyanid nachweisbar (Tab. 3.8). Ferner war ein Konzentrationsgradient vom Ein- bis zum Auslauf erkennbar. So betrug der Cyanidgehalt am Becken-Ende jeweils nur etwa ein fünfzigstel der Konzentration des Einstrombereichs (Tab. 3.8). Die Cyanidkonzentrationen im Kontrollbecken unterschieden sich deutlich. Während nach 8 h noch ein Konzentrations-Gradient erkennbar war, stellte sich nach 11 h eine einheitliche Konzentration von ca. 0,25 mg L⁻¹ im Oberflächenwasser ein (Tab. 3.8). Nach 15 h erhöhte sich die Cyanidkonzentration auf ca. 0,55 mg L⁻¹. Im folgenden Versuchszeitraum wurde der Klärprozess durch Variation des Flusses gezielt manipuliert. Die Resultate sind in Abbildung 3.22 und 3.23 dargestellt.

Tabelle 3.8: AMOVA – Cyanid – Aufbereitung: Versuch 2: (erster Versuchstag)

Zeit nach Applikation:		Zeit nach Applikation				
Becken		6 h	8 h	11 h	13 h	15 h
PES (m)		Cyanid (mg L ⁻¹)				
<i>Eichhornia</i>	0,5	0,52	0,36	0,38	1,82	0,54
	0,5ss	0,06	0,03	0,02	0,02	0,03
	2	0,35	0,12	0,01	0,07	0,26
	2ss	0,05	0,04	0,02	0,04	nb
	4	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02
	4ss	0,02	0,02	0,01	0,01	nb
	6	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02
	6ss	0,03	0,02	0,02	nb	0,01
Kontrolle	0,5	0,23	0,34	0,24	0,33	0,49
	0,5ss	0,09	0,38	nb	0,35	0,68
	2	0,18	0,50	0,27	0,42	0,48
	2ss	n.b.	nb	nb	0,00	nb
	4	0,03	0,27	0,23	0,63	0,52
	4ss	nb	0,22	nb	0,00	nb
	6	0,00	0,03	0,25	0,53	0,67
	6ss	nb	nb	nb	0,30	0,64

nb: nicht bestimmt; PES: Probe-Entnahmestellen nach 0,5, 2, 4 und 6 m; ss (subsurface): Proben-Entnahme im Kies am Beckengrund

Bei unveränderten Versuchsbedingungen kam es aufgrund der Neigung der Bahn im Becken mit *E. crassipes* nach 33 h zu einer Konzentrationsspitze von 3 mg L⁻¹ im Kies am Bahn-Ende (6ss). Diese erhöhte sich innerhalb der nächsten fünf Stunden um 2 mg L⁻¹ (Abb. 3.22).

Nach 38 h erfolgte ein Abfluss des Abwassers am Becken-Ende. Infolge des Sogs kam es wahrscheinlich erstmals zu deutlichen Cyanidkonzentrationen in der Mitte (Probe-Entnahmestelle nach 2 und 4 m) und am Ende der Bahn (Probe-Entnahmestelle nach 6 m). Am nächsten Versuchstag nach 56 h war eine deutliche Reduktion der Cyanidgehalte festzustellen. Lediglich am Einlauf und im Kies am Ende der Bahn betrug der Cyanidgehalt noch 0,7 bzw. 2,7 mg L⁻¹. Bis zu diesem Zeitpunkt waren die Cyanidkonzentrationen im Kies in der Bahnmitte (Probe-Entnahmestelle 2ss und 4ss) geringer oder gleich 30 µg L⁻¹. In der Kontrollbahn wurden nach 33 bis 56 h erneut einheitlichere Cyanidgehalte im Oberflächenwasser festgestellt (Abb. 3.22). Auch im Kontrollbecken wurden im Kies am Bahnende (6ss) höhere Cyanidkonzentrationen gemessen. Im Gegensatz zur *Eichhornia*-Bahn kam es aber im Kontrollbecken zu den höchsten Konzentrationen (um 5 mg L⁻¹) im Kies der ersten Probe-Entnahmestelle. Nach 56 h wurde die Flussrate von 12,5 auf 25 L h⁻¹ erhöht und erstmals die Kreislaufführung etabliert, um die hohen Cyanidgehalte am Auslauf zu reduzieren. Die weiteren Resultate sind in Abbildung 3.23 dargestellt.

Tabelle 3.9: pH im *Eichhornia*-Becken während und nach der 2. Applikation (V.2)

	pH										
Zeit:	6 h	8 h	11 h	13 h	15 h	33 h	38 h	56 h	59 h	81.5 h	112 h
PES											
(m)											
0,5	9,6	9,6	9,7	9,7	9,7	7,6	7,6	7,4	7,3	6,9	6,8
0,5ss	6,7	6,6	nb	6,5	6,5	6,4	6,5	6,5	6,5	6,6	6,8
2	7,0	6,9	6,9	7,0	7,5	7,4	7,1	7,0	6,9	6,9	6,8
2ss	6,6	6,4	nb	6,4	nb	6,5	6,5	7,4	6,5	6,6	6,8
4	6,7	6,6	6,6	6,6	6,5	6,5	6,9	6,5	6,4	6,5	6,8
4ss	6,5	6,2	nb	6,2	nb	7,4	6,3	6,3	6,3	6,6	6,8
6	6,8	6,6	6,6	6,6	6,6	6,6	6,7	6,5	6,4	6,8	6,8
6ss	6,2	6,1	nb	6,2	6,2	6,5	7,2	6,8	6,8	6,9	6,7

Die Werte wurden in etwa 15 cm Tiefe im Wurzelbereich bestimmt. Alkalische pH Werte > pH 9 sind hervorgehoben; Zeit: Stunden nach Applikationsstart; nb: nicht bestimmt; PES: Probe – Entnahmestelle; ss (sub surface): Probe-Entnahmestelle im Kies am Beckengrund

Nach 3 h Kreislaufführung deutete sich im *Eichhornia* Becken bereits eine gleichmäßigere Schadstoffverteilung an (Abb. 3.23; 59 h). Die Cyanidkonzentrationen am Ende der Bahnen nahm etwas ab, während die Gehalte ansonsten leicht zunahmen (Abb. 3.23, 59 h). Dieser Trend wurde nach weiteren 23 h noch deutlicher, wobei nun zudem ein Cyanidgradient deutlich wurde und sich die Cyanidkonzentration insgesamt reduzierte. Nach 112 h war der Cyanidgehalt an allen Probe-Entnahmestellen um 0,5 mg L⁻¹ gefallen. 128 h nach der Applika-

tion war die höchste Cyanidkonzentration im *Eichhornia*-Becken $20 \mu\text{g L}^{-1}$. Die Pflanzen überlebten die Behandlung ohne sichtbare Schädigungen. Im Kontrollbecken kam es in dem gleichem Zeitraum zu einer fast identischen Klärleistung. Nur im Kies nach 0,5 m (0,5ss) blieb eine Restkonzentration von $600 \mu\text{g L}^{-1}$.

Im Gegensatz zur *Eichhornia*-Behandlung war in der Kontrollbahn kein Schadstoffgradient sichtbar und es kam nie zu deutlich höheren Cyanidkonzentrationen im Auslaufbereich (Abb. 3.23). Die gemessenen pH-Werte im *Eichhornia*- und Kontrollbecken vermittelten ein typisches Bild für alle im Folgenden diskutierten Versuche. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.9 und 3.10 dargestellt. Im *Eichhornia*-Becken erhöhte sich der pH durch die alkalische Cyanidlösung während der ersten 15 h ausschließlich im Einstrombereich. Anschließend stellte sich wieder ein schwach saurer pH ein (Tab. 3.9). Im Kontrollbecken hingegen wurden im gesamten Becken deutlich alkalischere pH Werte festgestellt, die auch während des Versuchszeitraums nicht mehr abfielen (Tab. 3.10).

Tabelle 3.10: pH im Kontroll- Becken während und nach der 2. Applikation (V.2)

	pH										
Zeit: PES (m)	6 h	8 h	11 h	13 h	15 h	33 h	38 h	56 h	59 h	81.5 h	112 h
0,5s	9,3	9,4	9,5	9,6	9,8	9,0	8,9	8,4	8,3	8,5	9,0
0,5ss	7,9	7,8	nb	7,8	7,8	7,7	7,9	7,7	7,8	7,7	7,7
2s	9,1	9,3	9,2	9,3	9,4	9,1	9,0	8,4	8,4	8,6	9,3
2ss	nb	7,6	nb	7,6	nb	7,4	7,5	7,6	7,8	7,6	7,5
4s	8,8	9,1	9,3	9,3	9,4	9,2	9,0	8,3	8,4	8,6	9,3
4ss	nb	7,6	nb	7,4	nb	6,2	7,5	7,5	7,4	7,6	7,5
6s	8,6	8,8	9,3	9,3	9,3	9,1	9,0	8,4	8,3	8,6	9,3
6ss	nb	8,5	nb	8,6	8,5	8,8	8,6	8,2	8,2	8,3	8,9

Die Werte wurden in etwa 15 cm Tiefe bestimmt. Alkalische pH Werte > pH 9 sind hervorgehoben; Zeit: Stunden nach Applikationsstart; PES: Probe-Entnahmestelle; nb: nicht bestimmt; ss (sub surface): Probe-Entnahmestelle im Kies am Beckengrund

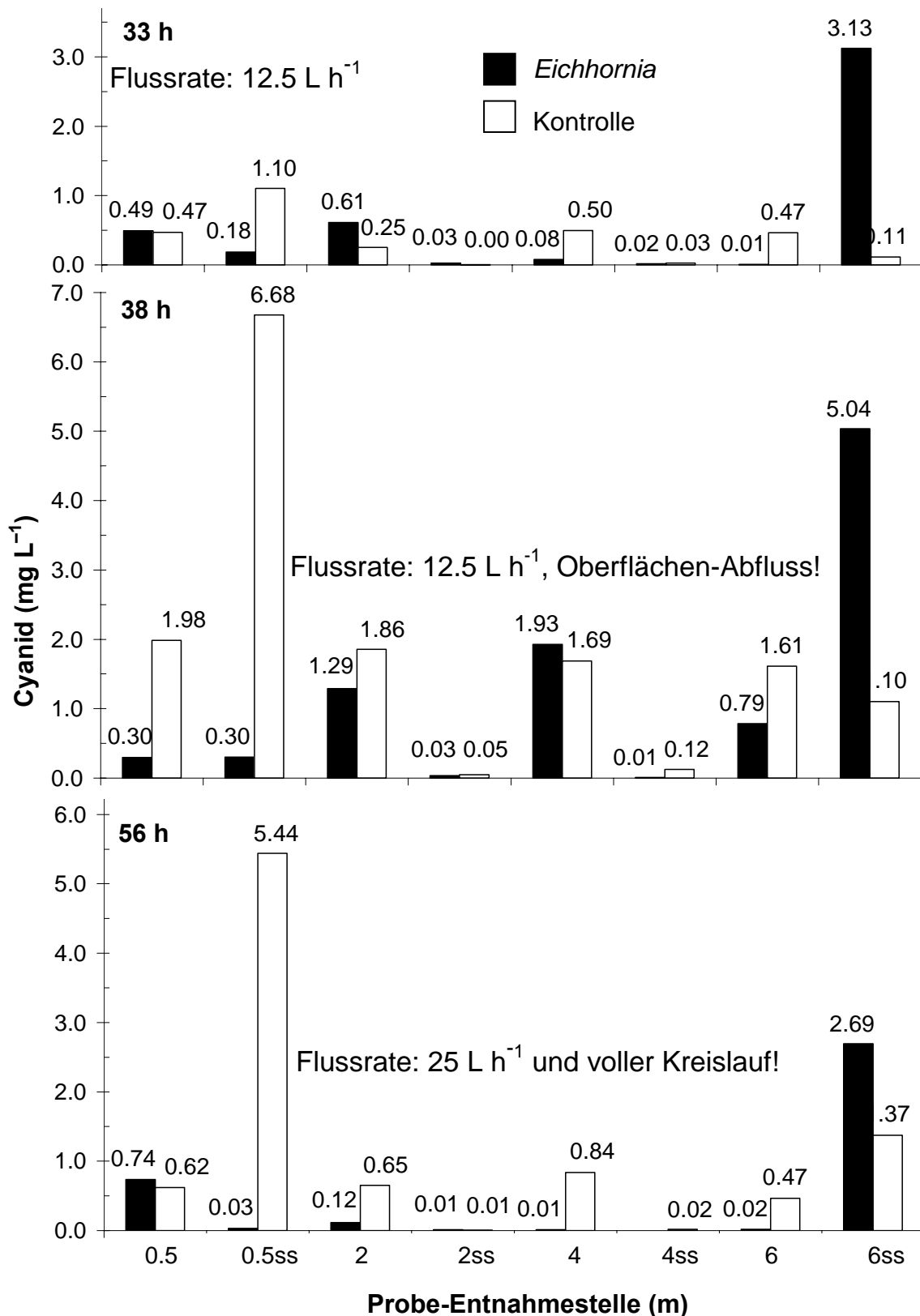


Abbildung 3.22: AMOVA V.2: Cyanidgehalte im *Eichhornia*- und Kontrollbecken 33–56 h nach Applikation; Als Anmerkungen in den Diagrammen sind die variablen Versuchsbedingungen Flussrate, Oberflächen-Abfluss und Kreislauf; ss (subsurface): Proben-Entnahme im Kies am Beckengrund

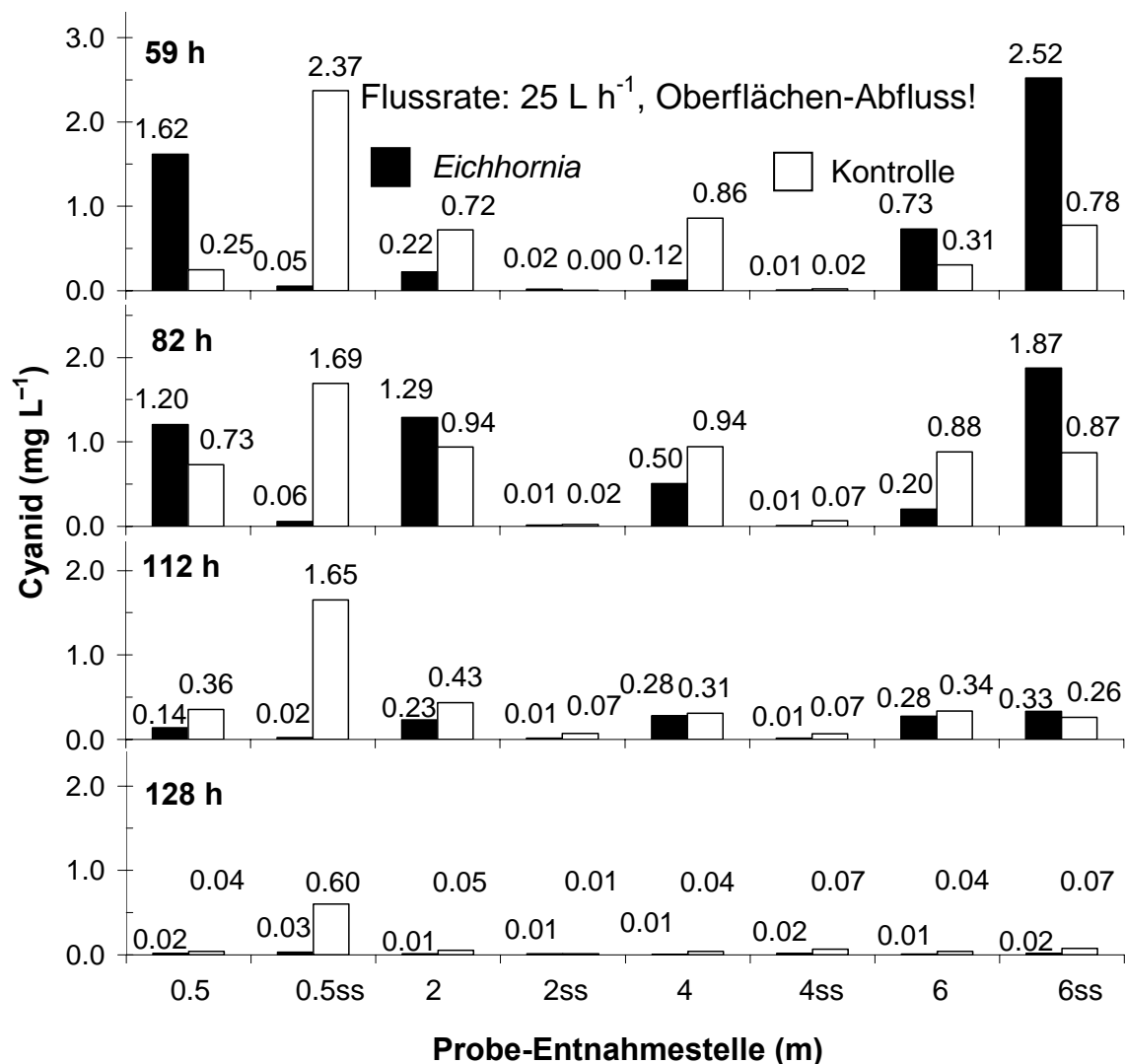


Abbildung 3.23: AMOVA V.2: Cyanidgehalte im *Eichhornia*- und Kontrollbecken 59–128 h nach Applikation; Als Anmerkungen in den Diagrammen sind die variablen Versuchsbedingungen Flussrate, Oberflächen-Abfluss und Kreislauf angegeben; ss (subsurface): Proben-Entnahme im Kies am Beckengrund

3.6.1.1.2 Hydraulische Eigenschaften

Nachdem in den vorangegangenen Versuchen die hydraulischen Rahmparameter (Kreislauf, Durchflussrate: 36 L h⁻¹) festgelegt wurden, sollte zunächst der Schadstoffstrom durch die Bahnen simuliert werden, um die hydraulischen Eigenschaften der Becken zu erfassen. Zu diesem Zweck wurde ein Tracerversuch mit Kochsalz durchgeführt (Abb. 3.24).

Die Leitfähigkeit wurde im Abflussrohr der Bahnen über einen Zeitraum von 26 h aufgezeichnet (Abb. 3.24). In der *Eichhornia*-Bahn wurde nach ca. 18 h ein Anstieg der Leitfähigkeit registriert. Anschließend nahm die Leitfähigkeit in den nächsten 3 h wieder ab und stieg dann wieder auf ein konstantes Endniveau an. Für diesen Versuch wurde aus der Endleitfähigkeit das Gesamtvolumen mit 890 L berechnet. Mit einer Durchflussrate von 36 L h⁻¹ ergab

sich somit eine Verweildauer des Wassers von 24,7 h. Näherungsweise wurde auch der Zeitpunkt berechnet an dem 50% des Tracers den Messpunkt passierten. Dieser lag bei 19,3 h.

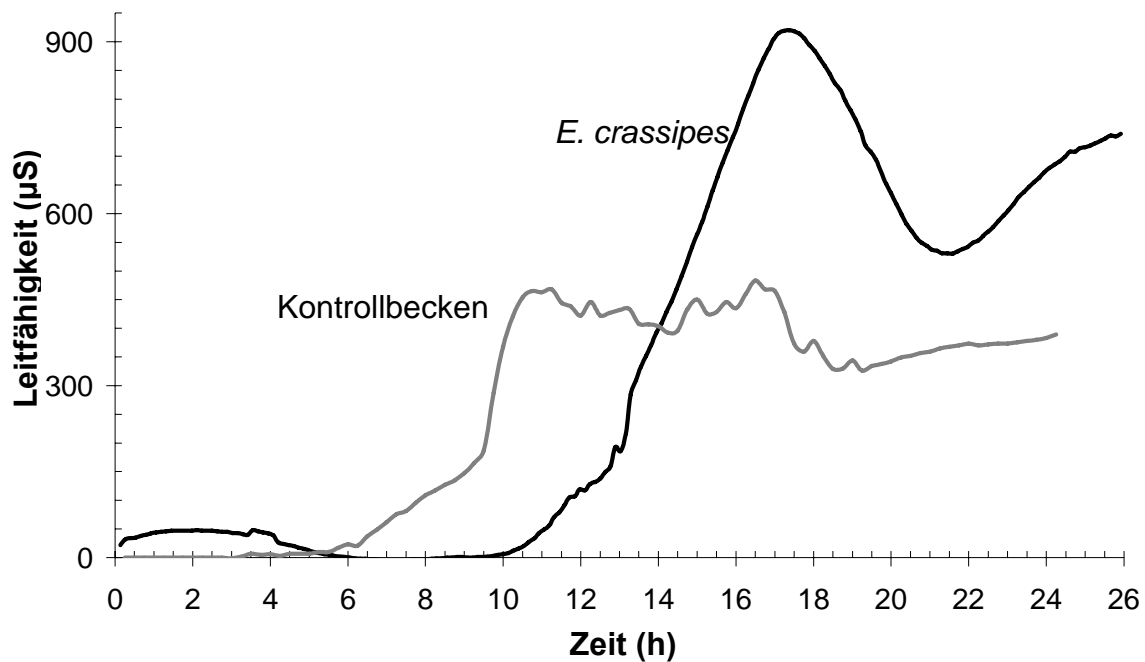


Abbildung 3.24: Leitfähigkeit im Abflussrohr nach Applikation des Tracers Kochsalz zur Simulation des Schadstoffstroms im Becken mit *Eichhornia* und im Kontrollbecken; Applikation: 300 g Kochsalz in 30 L mit 2 L h^{-1} ; Durchflussrate: 36 L h^{-1} ; Die Leitfähigkeiten der Becken vor Versuchsbeginn wurden jeweils subtrahiert.

Im Kontrollbecken wurde die maximale Leitfähigkeit bereits ca. 6 h früher aufgezeichnet (Abb. 3.24). Es folgte eine Plateauphase von 6 h. Anschließend fiel die Leitfähigkeit in den nächsten 3 h ab und stieg dann wieder auf ein konstantes Endniveau an. Es wurde ein Volumen von 1119 L und eine Verweildauer des Wassers von 31,1 h berechnet. Nach 20,4 h waren 50% des Tracers detektiert.

3.6.1.2 Versuche mit Kreislaufführung

In Tabelle 3.11 sind alle Versuche in der AMOVA aus dem Jahr 2005 aufgelistet. Die Versuche V.1 und V.2 wurden bereits im Kapitel 3.6.1 beschrieben.

Tabelle 3.11: Versuche in der AMOVA 2005

Versuch / Datum	Einwaage		Theoretische Konzentration ³		Flussrate (L h ⁻¹)
	NaCN	CuCl ₂	Cyanid	Kupfer	
	(g)	(g)	(mg CN L ⁻¹)	(mg Cu L ⁻¹)	
V.1: 14.07.05	7,5	–	4	–	11,5
V.2: 26.07.05	4,5	–	2,4	–	12,5–25
V.3: 09.08.05	5	–	2,7	–	36
V.4: 15.08.05	7	–	3,8	–	36
V.5: 22.08.05	8,5	–	4,5	–	36
V.6: 29.08.05	11	–	5,9	–	36
V.7: 05.09.05	15	–	7,4	–	36
V.7: 07.09.05	18	–	9	–	36
V.8: 12.09.05	20,4	–	10,5	–	36
V.8: 13.09.05	26,5	–	14,3	–	36
V.9: 19.09.05	–	3,9 ²	–	4,4 ⁴	36
V.9: 19.09.05	5,7 ²	3,9 ²	3	4,4 ⁴	36
V.9: 21.09.05	11,6 ¹	8 ¹	7	4,9 ⁴	36
Summe	140,7	15,8			

¹zusammen appliziert (= in einer Lösung), ²zeitgleich/parallel appliziert, ³bei dem momentanen Beckenvolumen zu erwartende Konzentration an Kupfer bzw. Cyanid nach Applikation, ⁴inklusive Hintergrundkonzentration

3.6.1.2.1 3.–6. Applikation (V.3–V.6)

Der folgende Versuch in der AMOVA wurde erstmalig von Beginn an im Kreislaufverfahren bei hoher Flussrate (36 L h⁻¹) durchgeführt. Die Applikationsmenge wurde nur vorsichtig um 0,5 g auf 5 g NaCN erhöht. Aus den Tracerversuchen ging hervor, dass die Schadstoff-Front im Abfluss nicht vor 10 h (Kontrollbecken) bzw. 17 h (*E. crassipes*) zu erwarten war. Dementsprechend erfolgte die erste Proben-Entnahme 8 h nach Applikationsstart (Abb. 3.25).

Entsprechend den Leitfähigkeitsbestimmungen war die Cyanidfracht in der *Eichhornia*-Bahn nach 8 h nur bis zur dritten Probe-Entnahmestelle nach 4 m als Gradient nachweisbar (Abb. 3.25, 8 h). Die Cyanidgehalte in den Becken entsprachen der aus der Applikationsmenge zu erwartenden Konzentration. In der Kontrolle konnte schon 8 h nach Applikationsstart das Cy-

anid im Auslauf nachgewiesen werden. Nach 13 h zeigte sich ein Konzentrationsgradient zum Auslauf (Abb. 3.25).

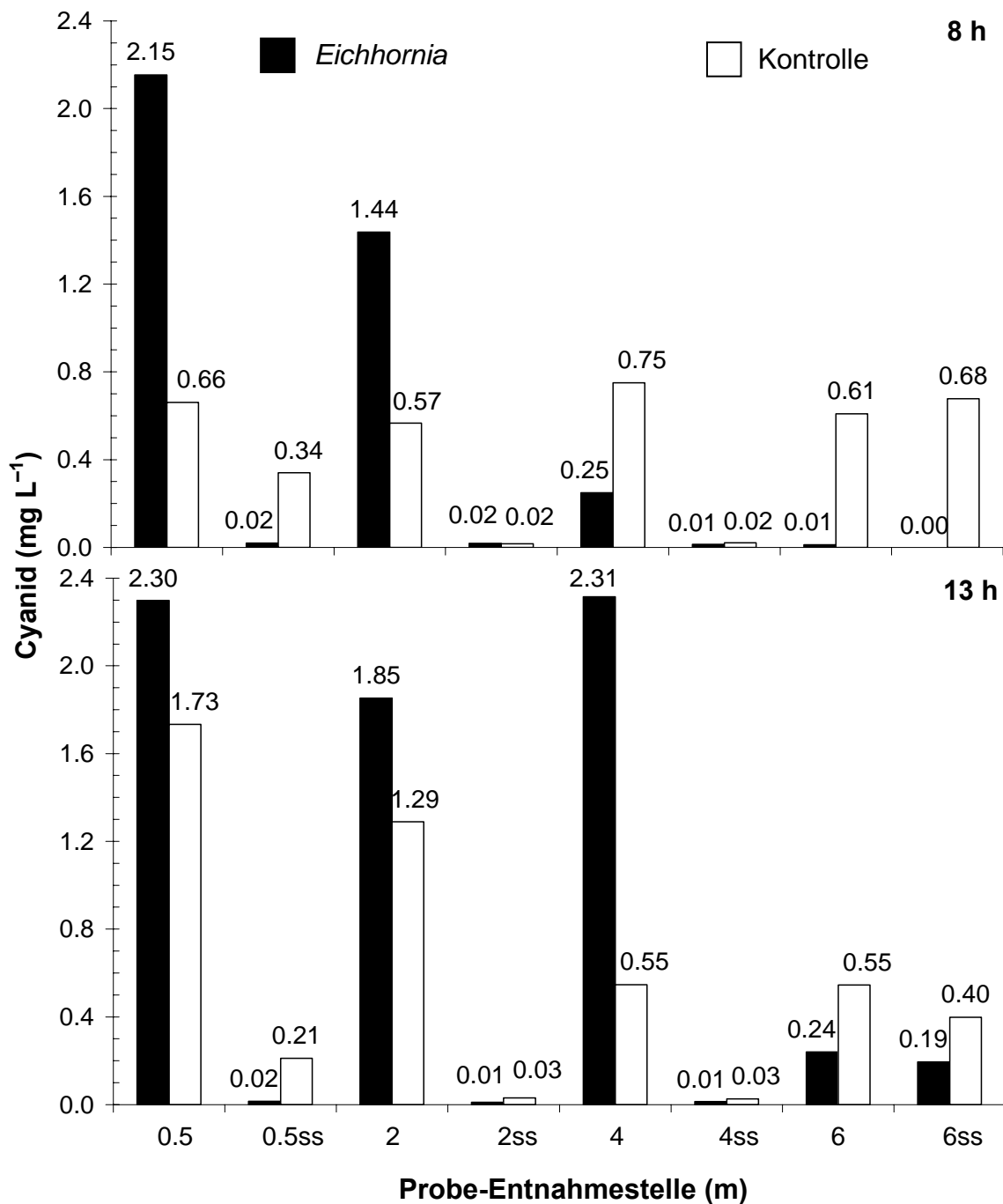


Abbildung 3.25: AMOVA V.3: Cyanidgehalte im *Eichhornia*- und Kontrollbecken 8 und 13 h nach Applikation; ss (subsurface): Proben-Entnahme im Kies am Beckengrund; Applikation nach Tabelle 3.11

34 h nach Applikationsstart stellte sich sowohl im *Eichhornia*-, als auch im Kontrollbecken eine einheitliche Cyanidkonzentration ein. Die Konzentrationen im Kies in der Mitte der Bahnen nach 2 m und 4 m betrugen im Kontrollbecken nur maximal 4%, im *Eichhornia*-Becken

weniger als 1% der maximalen Konzentration im freien Wasserkörper. Am nächsten Tag war eine leichte Senkung der Cyanidkonzentration um ca. 15% in der *Eichhornia*-Bahn zu verzeichnen, während die Konzentration in der Kontrollbahn im Zuge des Volumenverlustes durch Evaporation um ca. 24% zunahm (Abb. 3.26).

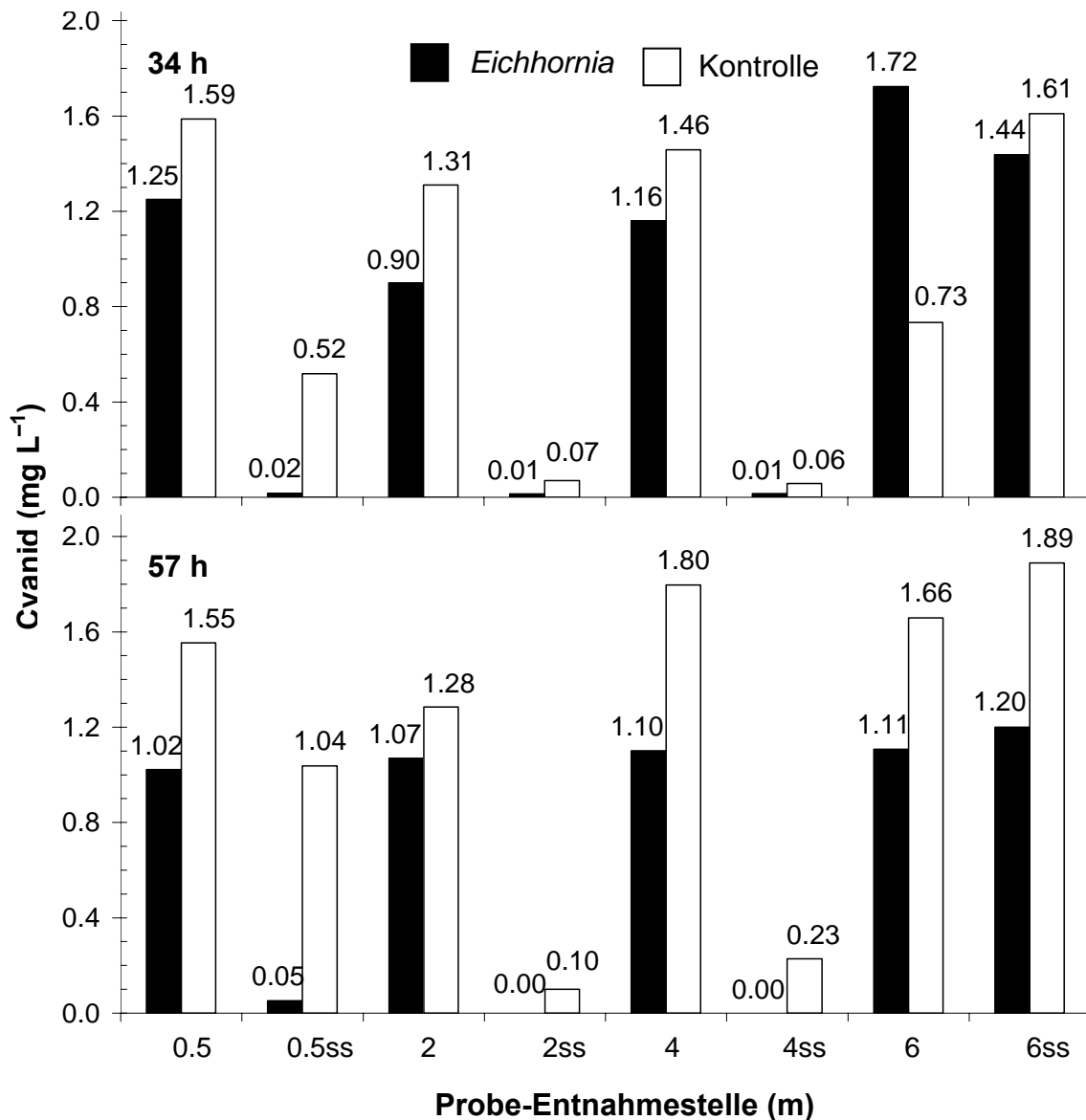


Abbildung 3.26: AMOVA V.3: Cyanidgehalte im *Eichhornia*- und Kontrollbecken 34 und 57 h nach Applikation; ss (subsurface): Proben-Entnahme im Kies am Beckengrund; Applikation nach Tabelle 3.11

86 h nach Applikation war im Becken mit *E. crassipes* noch 9% der maximalen Ausgangskonzentration nachweisbar. 30 h später konnte nur noch im Kies an der Probe-Entnahmestelle 0,5ss 40 µg CN L⁻¹ ermittelt werden (Abb. 3.27). Im Kontrollbecken hingegen fanden sich nach 106 h noch 72% der maximalen Ausgangskonzentration. Im Kies nach 0,5 m (0,5ss) war der Cyanidgehalt ca. 57% höher als in der freien Wassersäule über dem Kies.

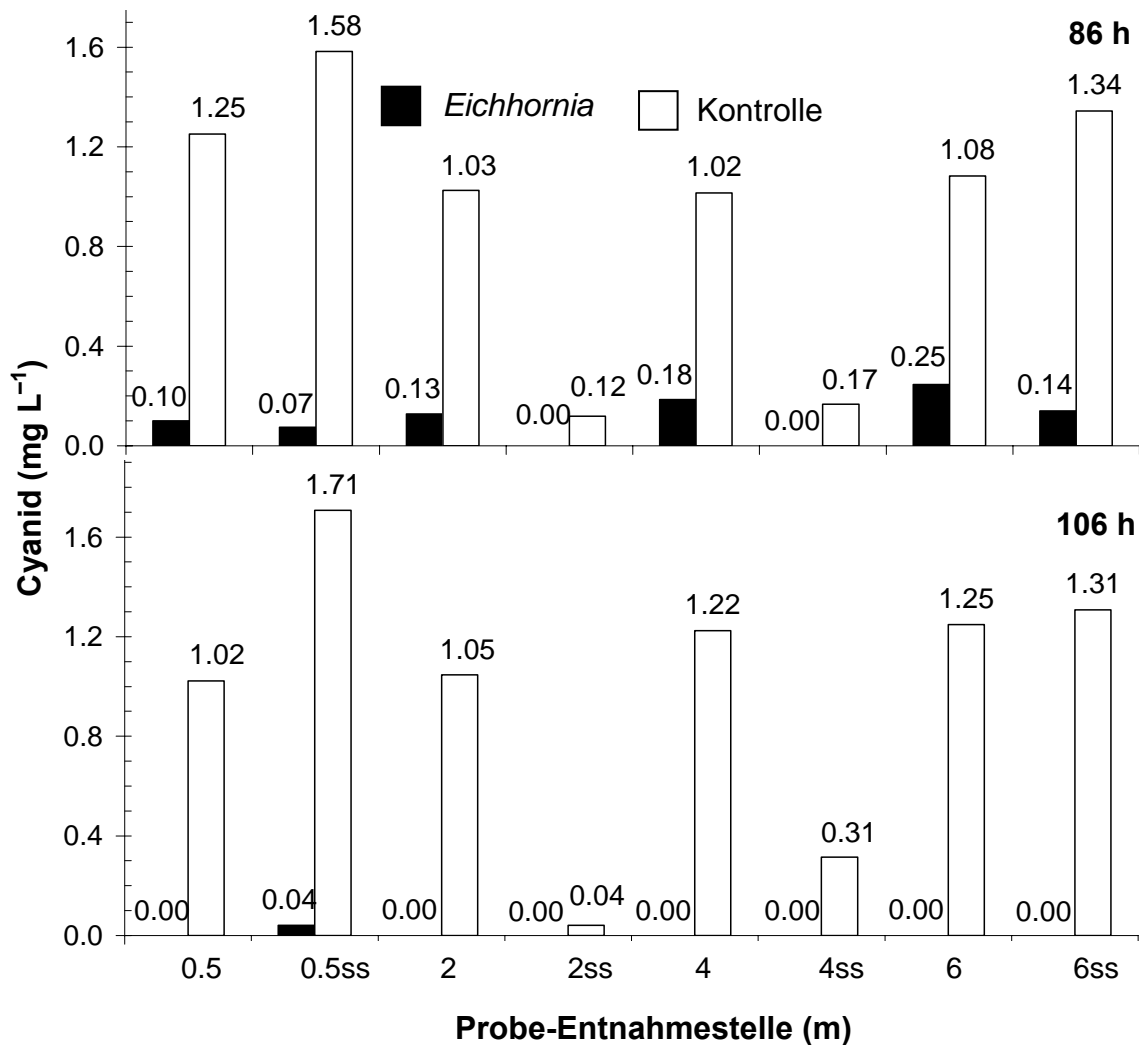


Abbildung 3.27: AMOVA V.3: Cyanidgehalte im *Eichhornia*- und Kontrollbecken 86 und 106 h nach Applikation; ss (subsurface): Proben-Entnahme im Kies am Beckengrund; Applikation nach Tabelle 3.11

Die im Folgenden beschriebenen drei Versuche wurden im Zeitraum von 21 Tagen vorgenommen. Bei jedem Versuch wurde einmalig Natriumcyanid appliziert. Die Einwaage wurde schrittweise von 7 auf 8,5 und 11 g erhöht (vgl. Tab. 3.11). Bei diesen und den folgenden Versuchen wurde nicht mehr im Kies in der Bahnmitte nach 2 m und 4 m (2ss, 4ss) beprobt, da die Cyanidkonzentrationen dort vernachlässigbar gering ausfielen. Die ermittelten Cyanidkonzentrationen der Versuche 4–6 sind in Tabelle 3.12 zusammengefasst. Wie im Kapitel 2.5.3 näher erläutert, sind nachfolgend die Cyanidkonzentrationen des Kontrollbeckens auf das Volumen zum Probe-Entnahme Zeitpunkt der *Eichhornia*-Bahn umgerechnet. Somit sind die Konzentrationen zwischen Kontrolle und *Eichhornia*-Behandlung der Versuche 4–10 direkt vergleichbar.

Obwohl jeweils mehr Natriumcyanid appliziert wurde, war in keinem Fall am dritten Tag der *Eichhornia*-Behandlung im Wasserkörper noch Cyanid nachweisbar (Tab. 3.12). Nur in nach

0,5 m im Kies (0,5ss) verblieb ein geringer Restgehalt. Die Pflanzen überstanden auch die höheren Cyanidkonzentrationen ohne sichtbare Schäden.

Tabelle 3.12: Cyanid–Degradation in der AMOVA Versuche 4–6: 15.–31.8.2005

Versuch:		V.4: 15.–17.8.2005		V.5: 22.–24.8.2005		V.6: 29.–31.08.2005	
Becken:		<i>Eichhornia</i> Kontrolle		<i>Eichhornia</i> Kontrolle		<i>Eichhornia</i> Kontrolle	
		Cyanid (mg L ⁻¹)		Cyanid (mg L ⁻¹)		Cyanid (mg L ⁻¹)	
		PES (m)					
1.	0,5	3,43	3,38	2,54	3,55	5,31	3,70
	0,5ss	0,03	1,25	0,17	1,41	0,02	2,09
	2	4,07	3,17	3,22	4,06	6,33	4,52
	4	4,01	2,76	3,64	2,93	4,86	4,93
	6	3,51	2,39	3,09	3,98	4,65	5,08
	6ss	4,25	2,99	1,47	3,29	0,26	4,88
2.	0,5	0,09*	2,19*	0,00* ¹	2,51* ¹	nb* ²	4,53* ²
	0,5ss	0,02*	0,57*	0,11* ¹	1,31* ¹	0,05* ²	2,03* ²
	2	0,09*	1,94*	0,00* ¹	3,28* ¹	0,08* ²	5,20* ²
	4	0,19*	2,03*	0,00* ¹	2,59* ¹	0,04* ²	4,18* ²
	6	0,57*	1,83*	0,00* ¹	3,03* ¹	0,04* ²	5,48* ²
	6ss	0,21*	1,68*	0,00* ¹	3,31* ¹	nb* ²	4,36* ²
3.	0,5	0,00	1,73	0,00	3,46	0,00	2,56
	0,5ss	0,06	1,23	0,09	2,67	0,06	2,28
	2	0,00	1,51	0,00	2,67	0,00	nb
	4	0,00	1,60	0,00	3,25	0,00	1,71
	6	0,00	1,62	0,00	3,59	0,00	2,99
	6ss	0,00	1,47	0,00	3,49	0,00	3,30

*34 h nach Applikation; ¹36 h nach Applikation; ²30 h nach Applikation; Die Konzentrationen der Kontrollbahn wurden auf das Volumen der *Eichhornia*–Bahn umgerechnet. PES: Probe–Entnahmestelle; ss (sub surface): Probe–Entnahme im Kies am Beckengrund

Beim 5. Versuch konnte bereits am zweiten Versuchstag die vollständige Abwasserklärung nachgewiesen werden. Hierbei mussten aber unterschiedliche Proben–Entnahmezeitpunkte berücksichtigt werden. So fand die Proben–Entnahme am zweiten Versuchstag des 5. Versuchs 2 h später als bei V.4 und 6 h später als bei V.6 statt (Tab. 3.12). Aus diesem Grund war bei V.5 ein fortgeschrittener Abbau zu erwarten. Dennoch wurde insbesondere beim Vergleich des vierten mit dem sechsten Versuch eine erhebliche Steigerung der Abbauleistung deutlich. Dementsprechend lagen die Cyanidkonzentrationen von V.6 am zweiten Versuchstag deutlich unter denen von V.4, obwohl die Probe früher genommen und 4 g (64%) mehr NaCN appliziert wurde. Sowohl Wassertemperatur (18–28 °C), als auch pH (≈ 7) und Einstrahlung ($600\text{--}700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) fielen in allen Versuchen sehr ähnlich aus. Bei V.4 wurde vereinzelt eine Lufttemperatur von 29 °C erreicht, während bei V.6 die Lufttemperatur nur

maximal 22 °C betrug. Generell konnten während der gesamten Versuchsperiode 2005 keine Korrelation der klimatischen Parameter mit Abbauprozessen in der AMOVA ermittelt werden. Zur Wassertemperatur sei angemerkt, dass diese im Becken mit *E. crassipes* durch die sehr effektive Abschirmung der Wasseroberfläche annähernd konstant war. In allen Experimenten zur Klärung cyanidhaltiger Abwässer bewegte sich die Temperatur zwischen 18,5 und 20,8 °C. Das Kontrollbecken hingegen heizte sich bei starker Sonneneinstrahlung teilweise bis auf 29 °C auf, es kühlte aber niemals unter 18,5 °C ab.

3.6.1.2.2 Versuche mit Mehrfach–Applikation (V.7 & V.8)

Nachdem in den vorangegangenen Versuchen die Abbauleistung der Aufbereitung cyanidhaltiger Abwässer mit *E. crassipes* demonstriert und reproduziert wurde, sollte in den weiteren Versuchen die Belastbarkeit des Systems näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden nicht nur weiterhin sukzessive höhere Einwaagen an Natriumcyanid appliziert, sondern auch die Zeiträume zwischen den Applikationen verkürzt (vgl. Tab. 3.11).

Zunächst sollte im siebten Versuch eine zweite Applikation erfolgen, sobald die erste Cyanidfracht vollständig abgebaut wurde. Es wurden zunächst 15 g dann 18 g Natriumcyanid appliziert. Die theoretische Gesamtcyanidkonzentration der ersten Applikation betrug ca. 7,4 mg L⁻¹. Nach 19,5 h stellte sich eine Maximalkonzentration von annähernd 5–6 mg L⁻¹ in den Becken ein. In der *Eichhornia*–Bahn war ein Konzentrationsgradient zu beobachten (Abb. 3.28). Nach 40,5 h nahm die Cyanidkonzentration im Kontrollbecken nur unwesentlich ab, während zu diesem Zeitpunkt schon ca. 96% des Cyanids in der *Eichhornia*–Bahn nicht mehr detektierbar waren. 65 h nach Applikation war das Cyanid im Kontrollbecken bis auf einen minimalen Rest bei 0,5ss vollständig abgebaut. Im Kontrollbecken wurde der Cyanidgehalt im gleichen Zeitraum um ca. 14% reduziert. Die zweite Applikation erfolgte nach weiteren 48 h. Die theoretische Gesamtcyanidkonzentration der zweiten Applikation betrug ca. 9 mg L⁻¹. Demgegenüber wurde eine tatsächliche maximale Cyanidkonzentration in der *Eichhornia*–Behandlung nach 67 h von 6,7 mg L⁻¹ ermittelt (Abb. 3.29). Zu diesem Zeitpunkt wurde erneut ein Konzentrationsgradient im Becken sichtbar. Nach weiteren 4 h nahm die mittlere Cyanidkonzentration um 43% ab (Abb. 3.29, 71 h).

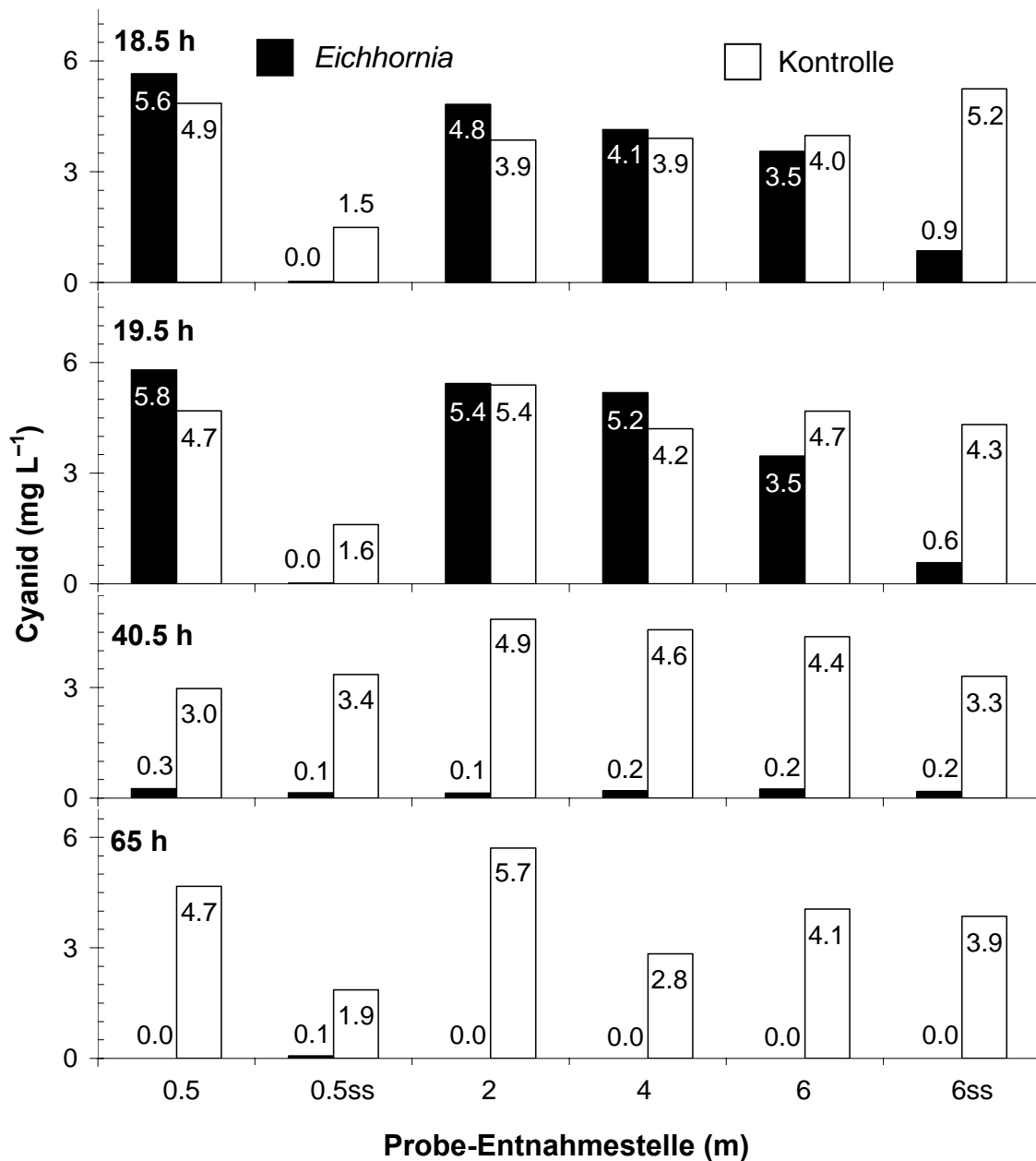


Abbildung 3.28: AMOVA V.7: Cyanidgehalte im *Eichhornia*- und Kontrollbecken 18,5–65 h nach 1. Applikation; ss (subsurface): Proben-Entnahme im Kies am Beckengrund; Die Cyanidkonzentrationen des Kontrollbeckens wurden auf das Volumen der *Eichhornia*-Bahn umgerechnet; Applikation nach Tabelle 3.11

Nach weiteren 20 h waren die Cyanidkonzentrationen im Becken unter $100 \mu\text{g L}^{-1}$ gesunken (Abb. 3.29; 91 h). Auch nach diesem Versuch waren keine Symptome wie Chlorosen oder welkende Blätter an den Pflanzen sichtbar. In der Kontrollbahn betrug die Abnahme der Cyanidkonzentration während der ersten 65 h nur maximal 9% (Abb. 3.28). Infolgedessen kam es während der zweiten Applikation zu einer maximalen Cyanidkonzentration von $12,4 \text{ mg L}^{-1}$ (Abb. 3.29). Diese Konzentration entspricht in etwa der theoretischen Gesamtcyanidkonzentration. Während der nächsten 24 h konnte eine Reduktion dieser Spitzenkonzentration um mehr als 50% ermittelt werden.

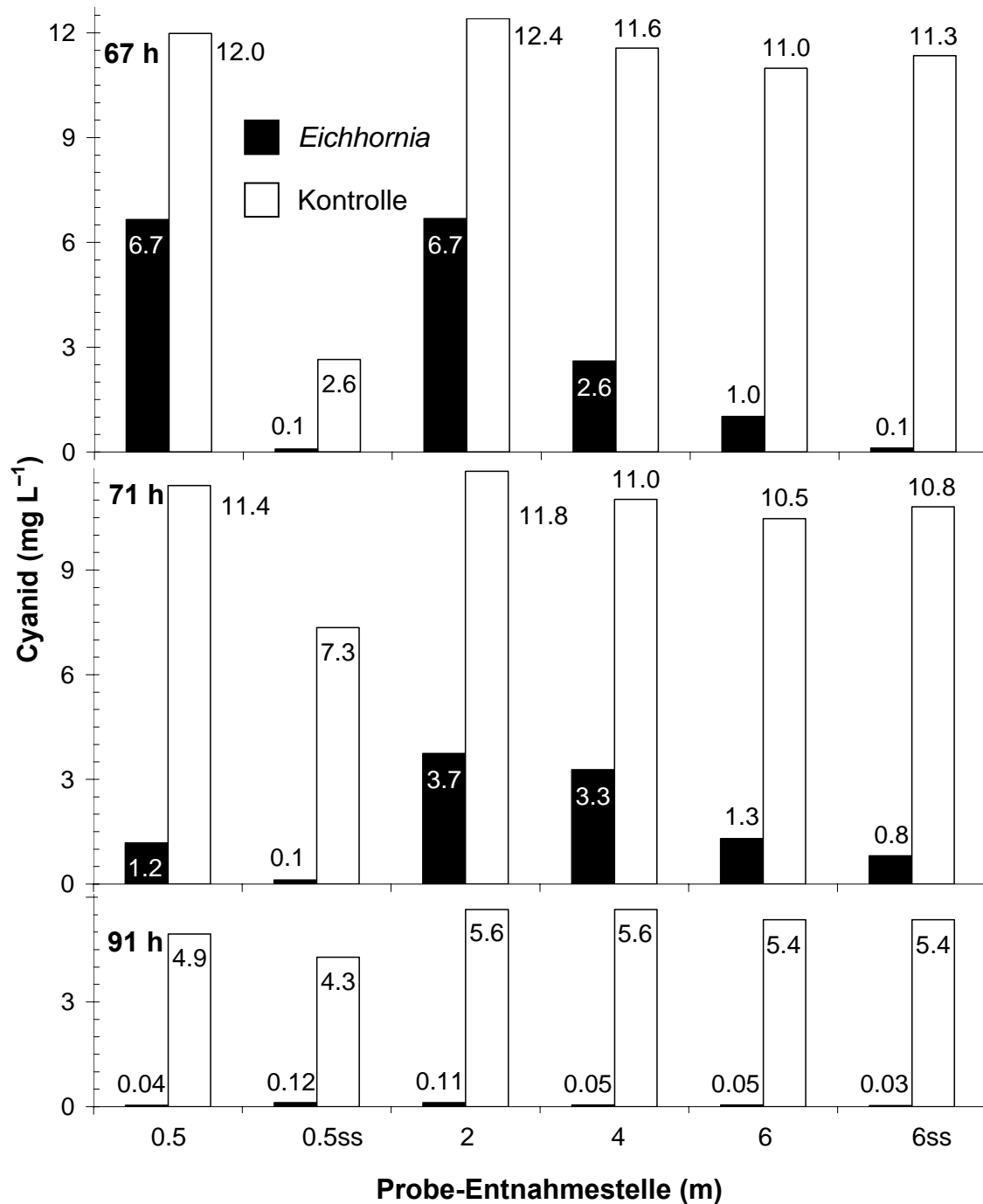


Abbildung 3.29: AMOVA V.7: Cyanidgehalte im *Eichhornia*- und Kontrollbecken (67–91 h); 1–4: Probe-Entnahmestelle nach 0,7, 2, 4 und 6 m; ss (subsurface): Proben-Entnahme im Kies am Beckengrund; Die Cyanidkonzentrationen des Kontrollbeckens wurden auf das Volumen der *Eichhornia*-Bahn umgerechnet. Applikation nach Tabelle 3.11

Im folgenden Versuch wurden in der ersten Applikation 20,4 g, in der zweiten 26,5 g NaCN eingesetzt. Zudem wurde der Zeitraum zwischen den Applikationen von 48 auf 24 h verkürzt. Darüber hinaus wurde in diesem Versuch auch der Einfluss des pH auf den Cyanidverlust im Kontrollbecken untersucht. Zu diesem Zweck wurde der pH vor und während des Versuchs auf neutrale Werte zwischen pH 6,8 und pH 7,2 gesenkt.

In der ersten Applikation betrug die theoretische Gesamtkonzentration ca. $10,5 \text{ mg L}^{-1}$. Diese Cyanidkonzentrationen wurden in der *Eichhornia*-Bahn annähernd nach 20 und 23 h ermittelt (Abb. 3.30). Allerdings zeigte sich erneut ein deutliches Konzentrationsgefälle. Im Kontrollbecken kam es zu Maximalkonzentrationen um 13 mg L^{-1} . Dagegen wurde vor der Applikation aus dem vorangegangenen Versuch ein mittlerer Rest-Cyanidgehalt von $2,7 \text{ mg L}^{-1}$ festgestellt. Abzüglich dieses Restgehaltes lag die Cyanidkonzentration im Bereich der theoretischen Maximalkonzentration. Nach 41,5 h wurde die zweite Cyanid-Applikation durch erneut ansteigende Konzentrationen in den Becken sichtbar (Abb. 3.30). Nach 44 h wurde die theoretische Maximalkonzentration von $14,3 \text{ mg L}^{-1}$ in beiden Bahnen annähernd erreicht (Abb. 3.31). 24 h später wurden im *Eichhornia*-Becken (bis auf das Totvolumen bei 0,5ss) maximal $60 \text{ } \mu\text{g CN L}^{-1}$ nachgewiesen. Im Kontrollbecken nahm im gleichen Zeitraum der Cyanidgehalt nicht ab. Zu beiden Zeitpunkten betrug die mittlere Konzentration $11,1 \text{ mg CN L}^{-1}$. Innerhalb der nächsten 24 h senkte sich der Cyanidgehalt im Kontrollbecken um ca. 77%. Zu diesem Zeitpunkt war in der *Eichhornia*-Behandlung nur im Kies nach 0,5 m ein Rest-Cyanidgehalt nachzuweisen (Abb. 3.31). Auch diesen Versuch überlebten die Wasserhyazinthen ohne erkennbare Schäden.

Tabelle 3.10: pH und Anteil volatiles HCN im Kontrollbecken während V.8

Zeit:	-2 h	20 h	23 h	41,5 h	44 h	68 h
PES (m)						
1	6,7 (99%)	8,5 (86%)	6,8 (99%)	9,05 (64%)	7,2 (99%)	7,8 (97%)
0,5ss	nb	7,9 (96%)	7,9 (96%)	7,8 (96%)	7,9 (96%)	7,7 (98%)
2	6,8 (99%)	8,5 (86%)	7,1 (99%)	9,00 (67%)	7,2 (99%)	7,9 (97%)
4	6,8 (99%)	8,6 (83%)	7,4 (98%)	9,05 (64%)	7,1 (99%)	7,8 (97%)
6	6,7 (99%)	8,6 (83%)	7,3 (99%)	9,07 (63%)	7,1 (99%)	7,9 (96%)
6ss	nb	8,2 (92%)	7,6 (98%)	8,5 (86%)	7,7 (98%)	7,8 (97%)

Die Werte wurden in etwa 0,15 m Tiefe bestimmt. Alkalische pH Werte > pH 9 sind hervorgehoben; Zeit: Stunden nach Applikationsstart; PES: Probe-Entnahmestelle; ss (subsurface): Proben-Entnahme im Kies am Beckengrund; nb: nicht bestimmt

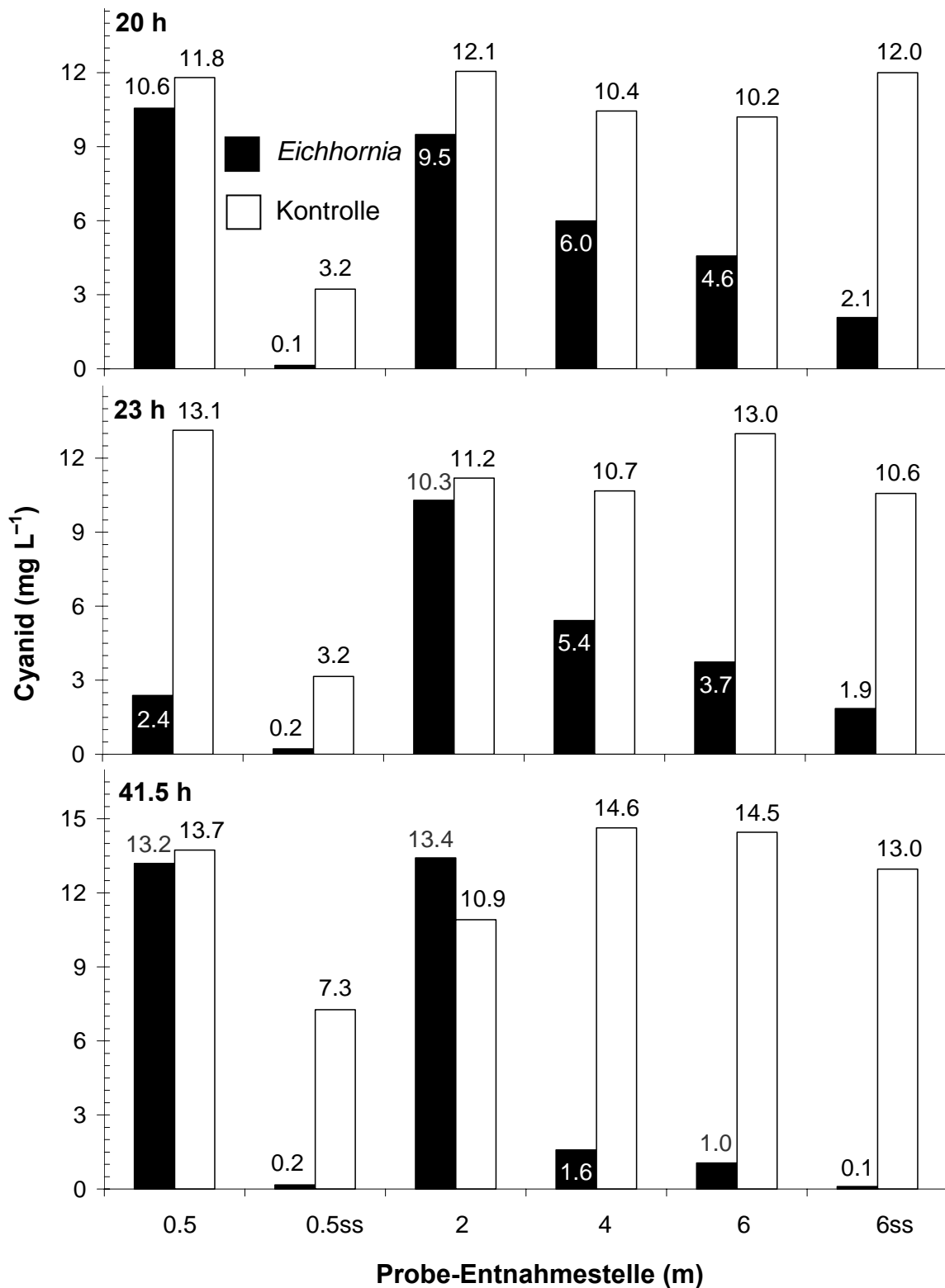


Abbildung 3.30: AMOVA V.8: Cyanidgehalte im *Eichhornia*- und Kontrollbecken 20–41,5 h nach 1. Applikation; ss (subsurface): Proben-Entnahme im Kies am Beckengrund; Die Cyanidkonzentrationen des Kontrollbeckens wurden auf das Volumen der *Eichhornia*-Bahn umgerechnet. Applikation nach Tabelle 3.11

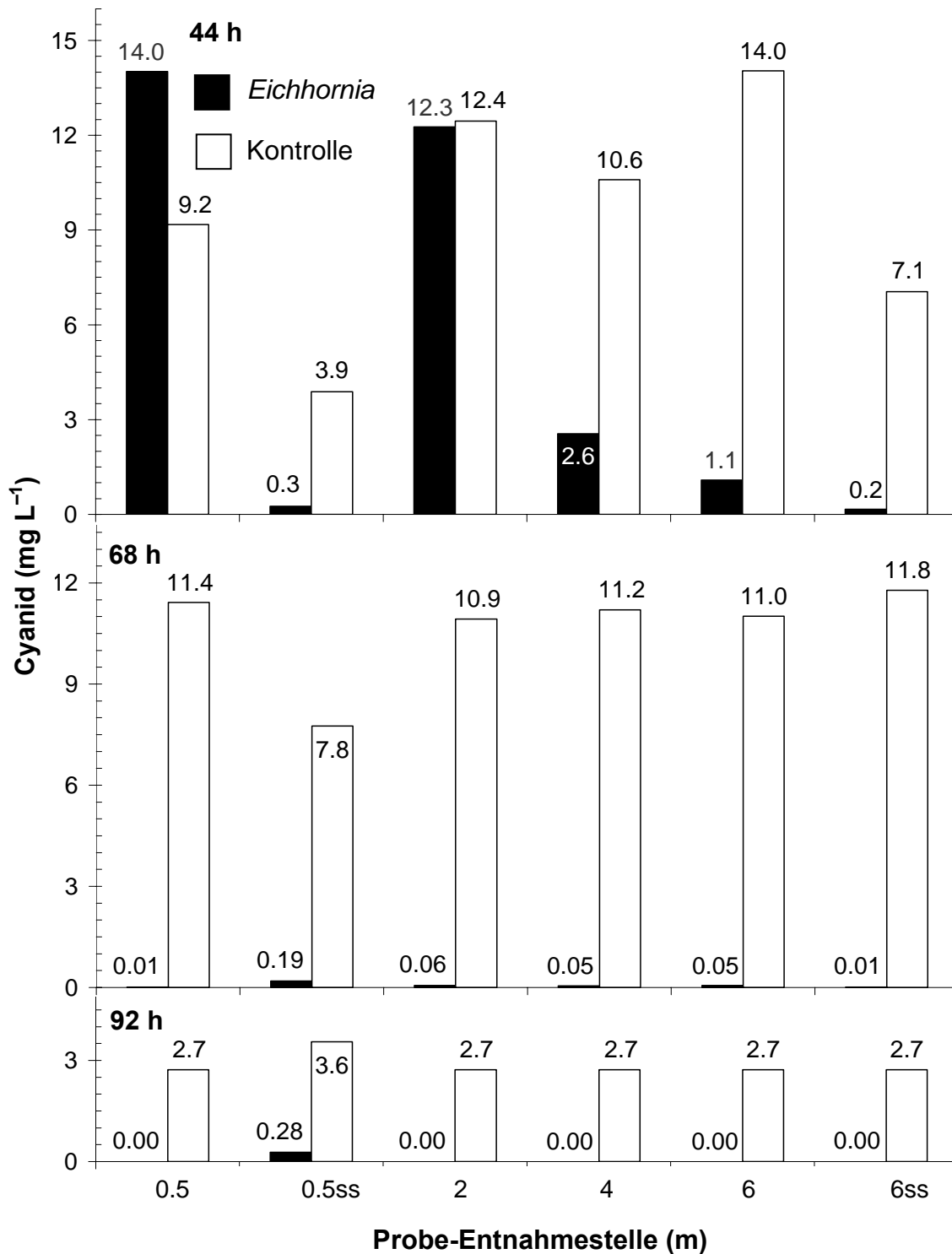


Abbildung 3.31: AMOVA V.8: Cyanidgehalte im *Eichhornia*- und Kontrollbecken 44–92 h nach 2. Applikation; ss (subsurface): Proben-Entnahme im Kies am Beckengrund; Die Cyanidkonzentrationen des Kontrollbeckens wurden auf das Volumen der *Eichhornia*-Bahn umgerechnet. Applikation nach Tabelle 3.11

Die Ansäuerung des Kontrollbeckens stieg der pH nur noch vereinzelt über pH 9 (Tab. 3.10). Nach der zweiten Applikation (41,5 h) blieb der pH aber im neutralen bis leicht alkalischen Bereich. Der Anteil an volatilem HCN betrug während des Versuchs mindestens 63% (pH 9,07; Tab. 3.10). Der pH im *Eichhornia*-Becken lag während des Versuchszeitraums von pH 7,2–8,2. Damit betrug der Anteil an HCN mindestens 92%.

3.6.1.3 Überprüfung der Ergebnisse im Labormaßstab

Während des gesamten Versuchszeitraums in der AMOVA, schien sich die Abbauleistung des Systems stetig zu beschleunigen. Dieses Phänomen könnte auf einen Biomassezuwachs zurückzuführen gewesen sein. Um dies zu überprüfen, wurden einzelne Pflanzen der AMOVA entnommen und unter verschiedenen Bedingungen mit Cyanid im hydroponischen Versuchsaufbau im Phytotron inkubiert. Im Gegensatz zu den in den bisherigen Laborversuchen untersuchten Exemplaren von *E. crassipes*, waren die Pflanzen aus der AMOVA am Ende der Vegetationsperiode erheblich größer. Während das Frischgewicht der Pflanzen aus dem Gewächshaus 15–18 g aufwies, wogen die kleinsten Pflanzen aus der AMOVA, deren Wurzeln den Wasserkörper erreichten, ca. 25–30 g. Die Wurzellänge der Gewächshaus- und Freilandpflanzen war hingegen mit 90–130 mm identisch. Aufgrund der maximal ca. doppelten Biomasse der Freilandpflanzen war im Vergleich zu den bisherigen Ergebnissen aus den Laborstudien eine Verringerung der Abbauleistung um 50% zu erwarten. Demnach sollte nach etwa 100 h eine Cyanidlösung von 5 mg L⁻¹ in 600 mL vollständig abgebaut sein.

Um dem Licht–Dunkel–Rhythmus im Phytotron (16 h Licht bei 27 °C von 6:15 Uhr bis 22:15 Uhr, 8 h Dunkelheit bei 16 °C) Rechnung zu tragen, wurden die Versuchsansätze mit Wasserhyazinthen zu verschiedenen Startzeiten im Phytotron inkubiert. Im Versuchsansatz p1 wurden die Wasserhyazinthen mit einer Inkubationsperiode von 3 h Licht, 8 h Dunkelheit und 16 h Licht inkubiert. Beim Versuchsansatz p2 wurden die Pflanzen zunächst bei 11,5 h Licht, 8 h Dunkelheit und schließlich 16 h Licht inkubiert. In diesem Versuchsansatz wurde zudem untersucht, ob sich die Abbauleistung verändert, wenn Cyanid als einzige N-Quelle in der Lösung verfügbar war. Ferner wurde als Kontrolle der Cyanidgehalt in hydroponischen Gefäßen ohne *Eichhornia* untersucht.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.33 dargestellt. Um die Übersicht zu verbessern, wurde der Cyanidgehalt der Kontrolle ohne *E. crassipes* auf der zweiten Y-Achse in % angegeben. Die Dunkelperioden der Ansätze p1 und p2 sind schematisch im Hintergrund des Diagramms abgebildet.

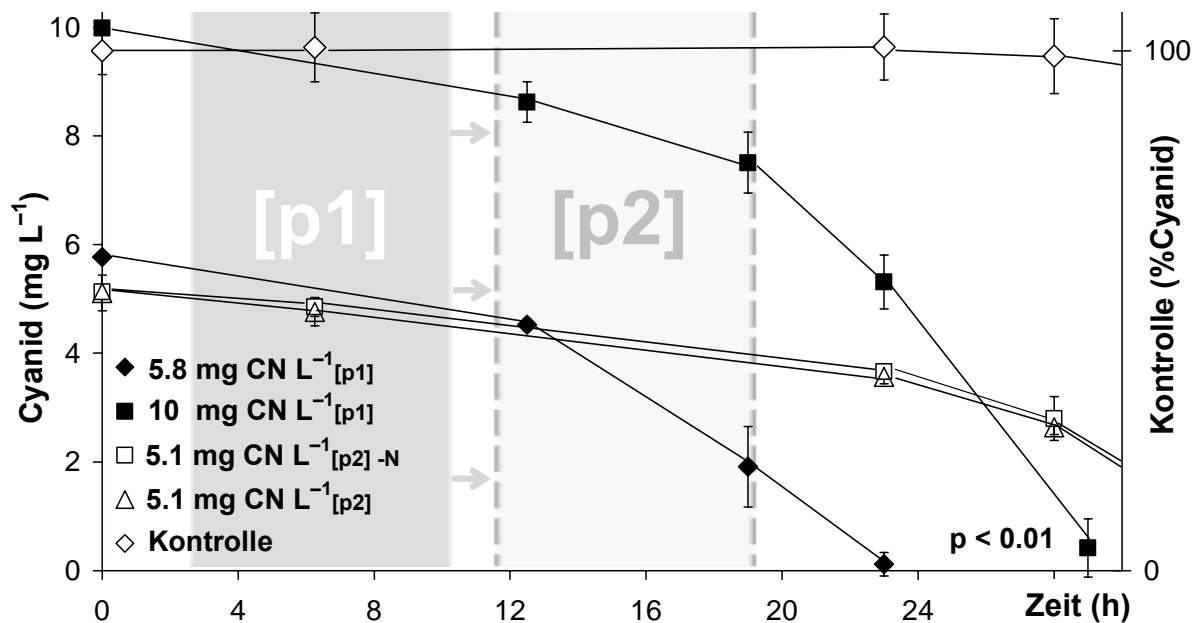


Abbildung 3.33: Inkubation von Wasserhyazinthen aus der AMOVA in hydroponischen Systemen im Phytotron mit Natriumcyanid; schwarze Symbole: p1 mit 3 h Licht, 8 h Dunkelheit, 16 h Licht; transparente / weiße Symbole: p2 mit 11,5 h Licht, 8 h Dunkelheit, 16 h Licht; Die Irrtumswahrscheinlichkeit p zeigt die Signifikanz der Ergebnisse im Vergleich zur Kontrolle; Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von $n = 3$.

E. crassipes reduzierte die Cyanidgehalte unterhalb der Nachweisgrenze. Dieser Abbau war signifikant ($p < 0,01$). Die Cyanidkonzentration im Kontrollansatz blieb konstant. Während des Versuchszeitraums erniedrigte sich der pH in der Behandlung mit *Eichhornia* von pH 8,5 zu pH 5,9–6,6. Im Versuchsansatz p1 mit einer kurzen initialen Lichtperiode (Abb. 3.33, schwarze Symbole; p1: 3 h Licht, 8 h Dunkelheit, 16 h Licht) veränderten sich während der ersten 12,5 h die applizierte Cyanidkonzentrationen von 5,8 and 10 mg L⁻¹ nur unwesentlich. Die Senkung des Cyanidgehaltes betrug nur ca. 1 mg L⁻¹. Es kam also zu einer deutlichen lag-Phase. Während der nächsten 12 h konnte eine schnelle und vollständige Cyanid-Degradation im Ansatz mit 5,8 mg CN L⁻¹ bzw. 16 h im Ansatz mit 10 mg CN L⁻¹ beobachtet werden. Um festzustellen, ob diese lag-Phase von der Dunkelperiode im Phytotron mit einer 11 °C geringeren Temperatur abhing, wurde der Ansatz p2 mit einer längeren initialen Lichtperiode von 11,5 h durchgeführt. In diesem Ansatz wurde eine Konzentration von 5,1 mg CN L⁻¹ appliziert (Abb. 3.33, weiße Symbole; p2: 11,5 h Licht, 8 h Dunkelheit, 16 h Licht). Es stellte sich heraus, dass der Cyanidgehalt in den ersten 23 h nur um maximal 1,6 CN L⁻¹ reduziert wurde. In den nächsten 5 h wurden dann weitere 1,6 CN L⁻¹ abgebaut. Der vollständige Abbau erfolgte während der nächsten 19 h. Die lag-Phase verlängerte sich also um 10 h. Es konnte kein Einfluss auf die Degradation ermittelt werden, wenn Cyanid die ein-

zige Stickstoffquelle in der Lösung war. Der Unterschied zwischen den Behandlungen mit und ohne zusätzliche Stickstoffquelle war nicht signifikant ($p = 0,32$).

3.6.1.4 Überprüfung der Ergebnisse in der AMOVA

Um aufzudecken, ob bei den Klärprozessen in der AMOVA Adaptionsprozesse eine Rolle spielten, wurde ein im Folgejahr ein klärendes Experiment in der AMOVA durchgeführt. Hierfür sollte eine vergleichbare NaCN–Einwaage (28,3 g) nochmals unter optimalen Rahmenbedingungen (Witterung, Biomasse, Fitness) appliziert werden. Diesmal sollte in den Wochen vor der Applikation aber keine geringeren NaCN–Einwaagen verabreicht werden. Somit konnten Adaptionsprozesse an Blausäure sicher ausgeschlossen werden. Wenn Adaption beim Cyanid–Abbau keine Rolle spielte, sollten die Ergebnisse aus dem Vorjahr reproduzierbar sein. Es wäre in diesem Fall also zu erwarten gewesen, dass die Pflanzen den Versuch vollkommen unbeschadet überstehen und das Cyanid nach 48 h nicht mehr nachweisbar ist. Da in diesem Versuch nicht mehr die Demonstration bzw. Steigerung der Abbauleistung untersucht werden sollte, erfolgte keine Applikation im Kontrollbecken.

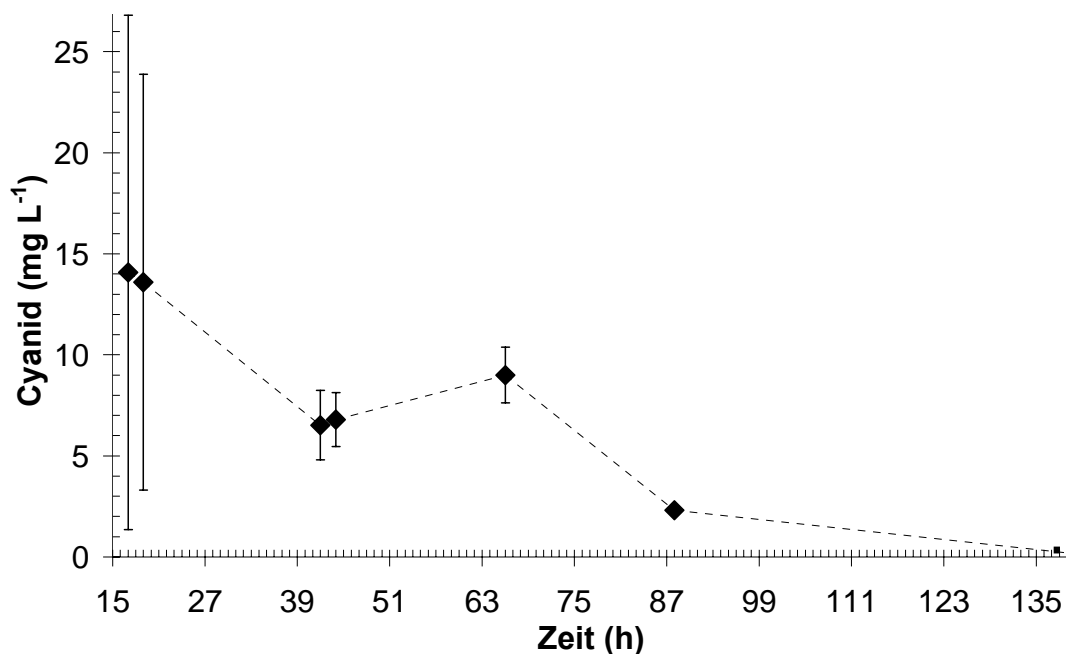


Abbildung 3.34: AMOVA V.10 (2006): mittlere Cyanidgehalte im *Eichhornia*–Becken 17–141 h nach Applikation; Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von $n = 5$; Applikation: 28,3 g NaCN

Die Applikation wurde vom 11.9. bis zum 12.9.2006 vorgenommen. Während des Versuches herrschten optimale Witterungsvoraussetzungen: die Wassertemperatur betrug im Versuchszeitraum 19,8–22,6 °C. Es wurde an den ersten sechs Versuchstagen eine maximale Lufttemperatur von 27–30 °C aufgezeichnet. Am letzten Tag betrug die Temperatur maximal 22 °C.

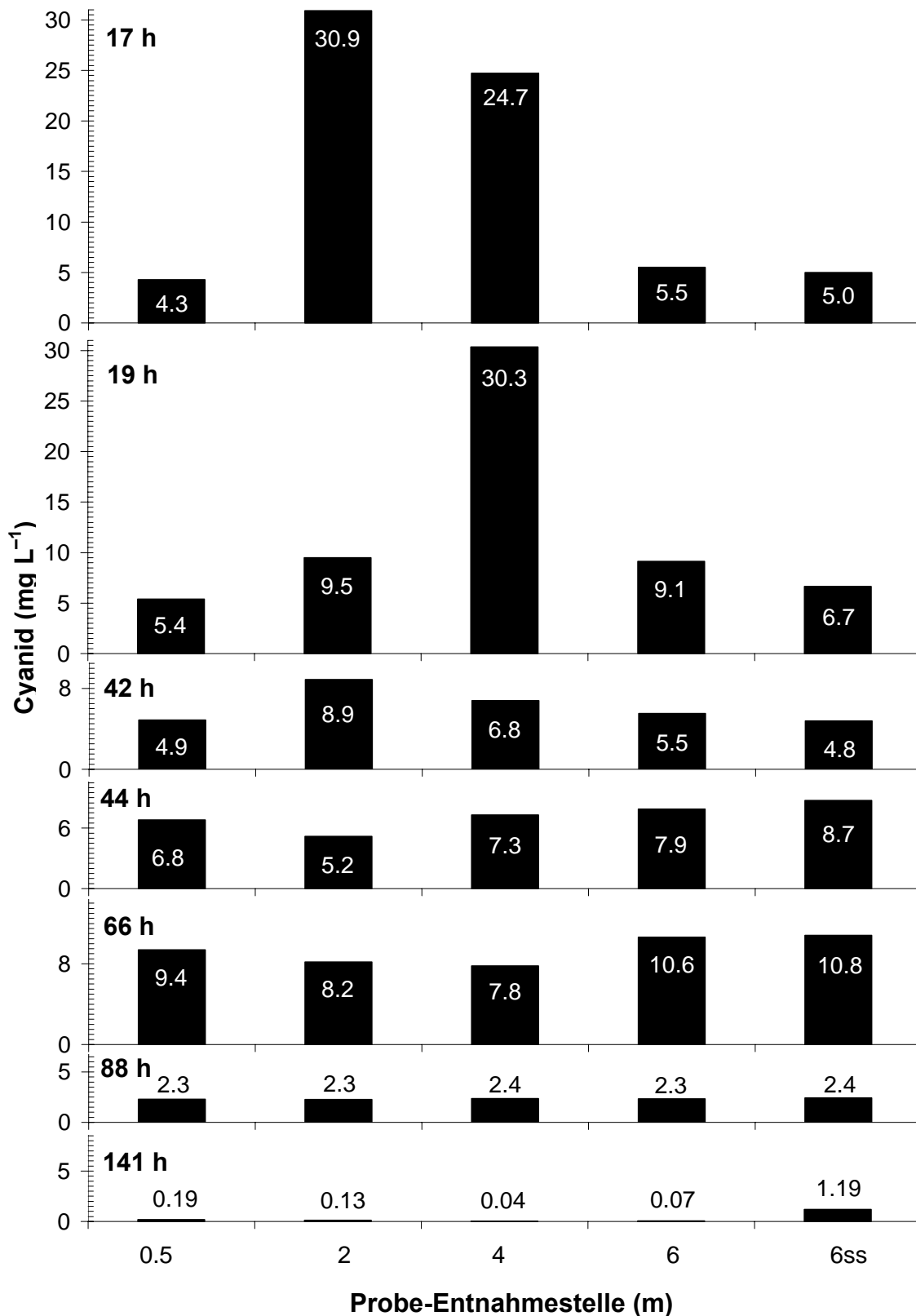


Abbildung 3.35: AMOVA V.10 (2006): Cyanidgehalte im *Eichhornia*-Becken 17–141 h nach Applikation; ss (sub surface): Probe-Entnahme im Kies am Beckengrund; Applikation: 28,3 g NaCN

17 h nach der Applikation waren hohe Cyanidkonzentrationen von 4–31 mg L⁻¹ nachweisbar (Abb. 3.35). Nach 19 h war deutlich zu erkennen, dass sich die Schadstoff-Front weiter durch

das Becken bewegte, das Cyanid sich aber gleichzeitig gleichmäßiger verteilte, da an allen Probe-Entnahmestellen die Cyanidkonzentration deutlich stieg, aber die Maximalkonzentration nur noch an einer Stelle nachzuweisen war. Die theoretische maximale Gesamtkonzentration für diese Applikation wurde mit ca. 18 mg L^{-1} berechnet. Tatsächlich betrug nach 17 h die mittlere Konzentration im Becken um 14 mg L^{-1} . Am nächsten Tag nach 42–44 h zeigte sich ein Rückgang des Cyanidgehaltes um ca. 50% (Abb. 3.35). Nach 66 h nahm hingegen die Cyanidkonzentration im Becken wieder um ca. 32% zu (Abb. 3.34). Gleichzeitig verringerte sich das Volumen im Becken in Folge hoher Lufttemperaturen um ca. 6%. Am nächsten Tag war eine deutliche Senkung um ca. 75% zu erkennen (Abb. 3.34/3.35; 88 h). Nach weiteren zwei Tagen war das Cyanid fast vollständig abgebaut.

Während des Versuches war eine intensive Schädigung der Pflanzendecke zu beobachten. Am zweiten Versuchstag wurden erste Toxizitätssymptome wie chlorotische und vereinzelt ausgetrocknete Blätter sichtbar. Nach Versuchsende waren ca. 50–70% der Pflanzen abgestorben (Abb. A3/A4/A5). Die überlebenden Pflanzen waren alle zu mindestens 50% chlorotisch. Ferner verloren viele Wasserhyazinthen ihre Wurzeln, bildeten aber bereits wenige Tage nach Versuchsabbruch neue Wurzeltriebe.

3.6.1.5 Aufbereitung kupferhaltiger Abwässer

Der Versuch zur Aufbereitung kupferhaltiger Abwässer fand vom 20.9. – 3.10.2005 statt. Die Wassertemperatur im *Eichhornia*-Becken war mit 15°C um ca. 5°C geringer als bei den Versuchen zum Cyanidabbau. Die witterungsabhängigen Versuchsbedingungen waren also für die tropischen Schwimmpflanzen nicht mehr ideal. Dennoch zeigten die tropischen Wasserpflanzen im September noch keinerlei auffällige Finesseinbußen wie etwa Chlorosen oder Nekrosen. Erst im Oktober waren erste Schäden sichtbar. Die Pflanzen wurden am 6.10.2005 aus dem Becken entfernt.

Vor der Kupferapplikation wurde das Wasser im Kontrollbecken ersetzt, um restliches Cyanid zu entfernen. Während des Versuchs wurden die Proben an der AAS auf Kupfer sowie an der HPLC auf Cyanocuprat hin untersucht. Im *Eichhornia*-Becken wurde vor Versuchsbeginn eine hohe Hintergrundkonzentration an Kupfer von $0,65 \text{ mg L}^{-1}$ ermittelt. Um die Werte mit der Kontrollbahn zu vergleichen, wurde neben der Volumendifferenz außerdem diese Konzentrationsdifferenz zwischen *Eichhornia*- und Kontrollbahn in die Kupferkonzentrationen der Kontrollwerte eingerechnet. Aufgrund des begrenzten Zeitfensters konnten die Laborstudien zur Kupferabsorption nicht mehr umfangreich in der AMOVA reproduziert werden. Aus diesem Grund wurde unmittelbar getrennt eine saure Kupferlösung und eine alkalische Kupfer/Cyanid Lösung im molaren Verhältnis 1:4 appliziert. Anschließend erfolgte eine zweite

Applikation mit identischer Kupfer–Einwaage aber doppelter Cyanid–Einwaage. Somit wurde bei der zweiten Applikation die gesamte Kupfermenge in einer alkalischen Cyanidlösung im molaren Verhältnis 1:4 appliziert (s.u.).

Bei der ersten Applikation wurde zunächst nur die Hälfte der Kupfereinwaage (3,9 g Kupfer(II)chlorid in 15 L) in einer sauren Lösung (pH 5,5) zudosiert. Mit einer zeitlichen Versetzung von 5 h wurde auch die zweite Lösung mit der anderen Hälfte der Kupfer–Einwaage und NaCN (3,9 g Kupfer(II)chlorid und 5,7 g Natriumchlorid gelöst in 10 L) in einer alkalischen Lösung (pH 10) zudosiert. In der zweiten Lösung betrug das molare Verhältnis von Cyanid zu Kupfer 4:1. Dies entsprach dem Verhältnis des thermodynamisch bevorzugt gebildeten Tetracyanocuprats $[\text{Cu}(\text{CN})_4]^{2-}$. Die Pumpenleistung und Applikationsvolumina waren so gewählt, dass beide Lösungen nach 15 h vollständig appliziert waren. Nach 48 h wurde dann nochmals die gleiche Einwaage Kupfer mit der doppelten Einwaage an Cyanid appliziert. Bei dieser Applikation wurden beide Schadstoffe zusammen (8 g CuCl_2 und 11,6 g NaCN in 30 L) in einer alkalischen Lösung (pH 10) innerhalb von 15 h zudosiert (vgl. Tab. 3.11). In dieser Applikation war das molare Verhältnis von Cyanid zu Kupfer 4:1 und damit günstig für die Bildung des Tetracyanocuprats. Hintergrund dieser Vorgehensweise war folgende Hypothese: Ohne Cyanid appliziertes Kupfer sollte zügig durch die Pflanzen aufgenommen, während Cyanocuprate nur langsam absorbiert werden sollten. Die zentrale Frage war, ob sich die Applikationen hinsichtlich des Zeitraums der vollständigen Kupferaufbereitung unterschieden und Kupfer schwerabsorbierbar zurückblieb.

15,5–18 h nach Beginn der ersten Applikation stellte sich eine Konzentrationsspitze von 4–6 mg L^{-1} im ersten Drittel des *Eichhornia*–Beckens ein (Abb. 3.36). Im Kontrollbecken hingegen stellte sich bereits nach 15,5 h eine homogene Konzentration von ca. 2,5 mg L^{-1} ein. 38,5 h nach der Applikation betrug die mittlere Kupferkonzentration in der *Eichhornia*–Behandlung ca. 2 mg L^{-1} . Berechnet aus der theoretischen Maximalkonzentration von ca. 4 mg L^{-1} , wurden demnach durch die Wasserhyazinthen 52% und in der Kontrolle 43% des Kupfers aus dem Abwasser entfernt. Am nächsten Versuchstag, 19 h nach der zweiten Applikation war die höchste Kupferkonzentration bereits in der Bahnmitte (*Eichhornia*–Behandlung) nachweisbar (Abb. 3.37). Nach 41 h war in beiden Becken eine homogene Verteilung erzielt und ein Abfall der Kupferkonzentration um etwa 10–25% feststellbar. Innerhalb der nächsten 32,5 h senkten die Wasserpflanzen den Kupfergehalt um ca. 60%, während im gleichen Zeitraum der Kupfergehalt der Kontrolle um nur etwa 25% abfiel. Bis zum Versuchsende blieb die Kupferkonzentration in der *Eichhornia*–Behandlung annähernd konstant, während sie in der Kontrolle stetig sank (Abb. 3.37).

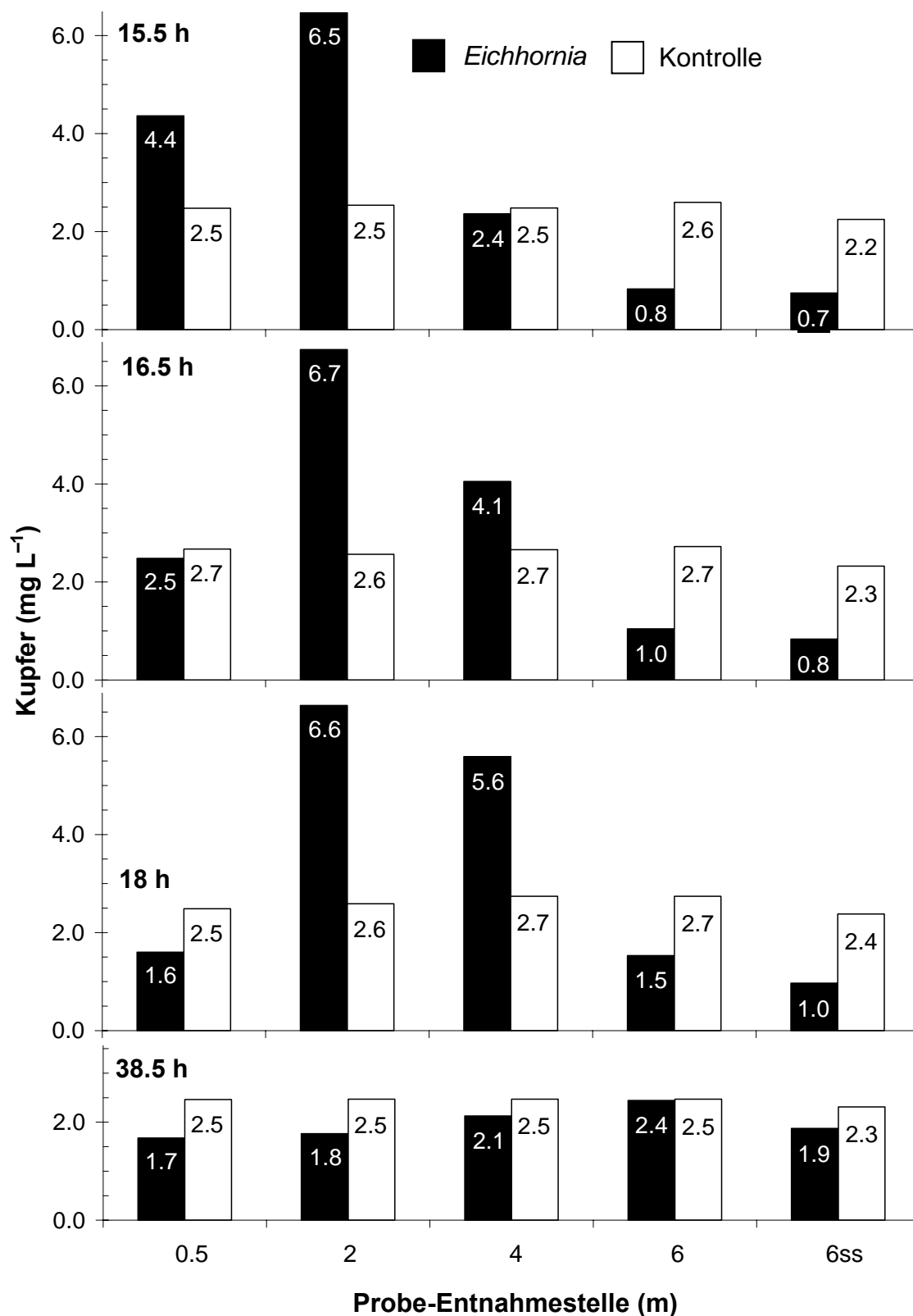


Abbildung 3.36: AMOVA V.9: Kupfergehalte im *Eichhornia*- und Kontrollbecken 15,5–38,5 h nach 1. Applikation; ss (subsurface): Probe-Entnahme im Kies am Beckengrund; Die Kupfer-Konzentrationen des Kontroll-Beckens wurden auf das momentane Volumen und die Hintergrundkonzentration der *Eichhornia*-Bahn umgerechnet. Applikation: siehe Tabelle 3.11

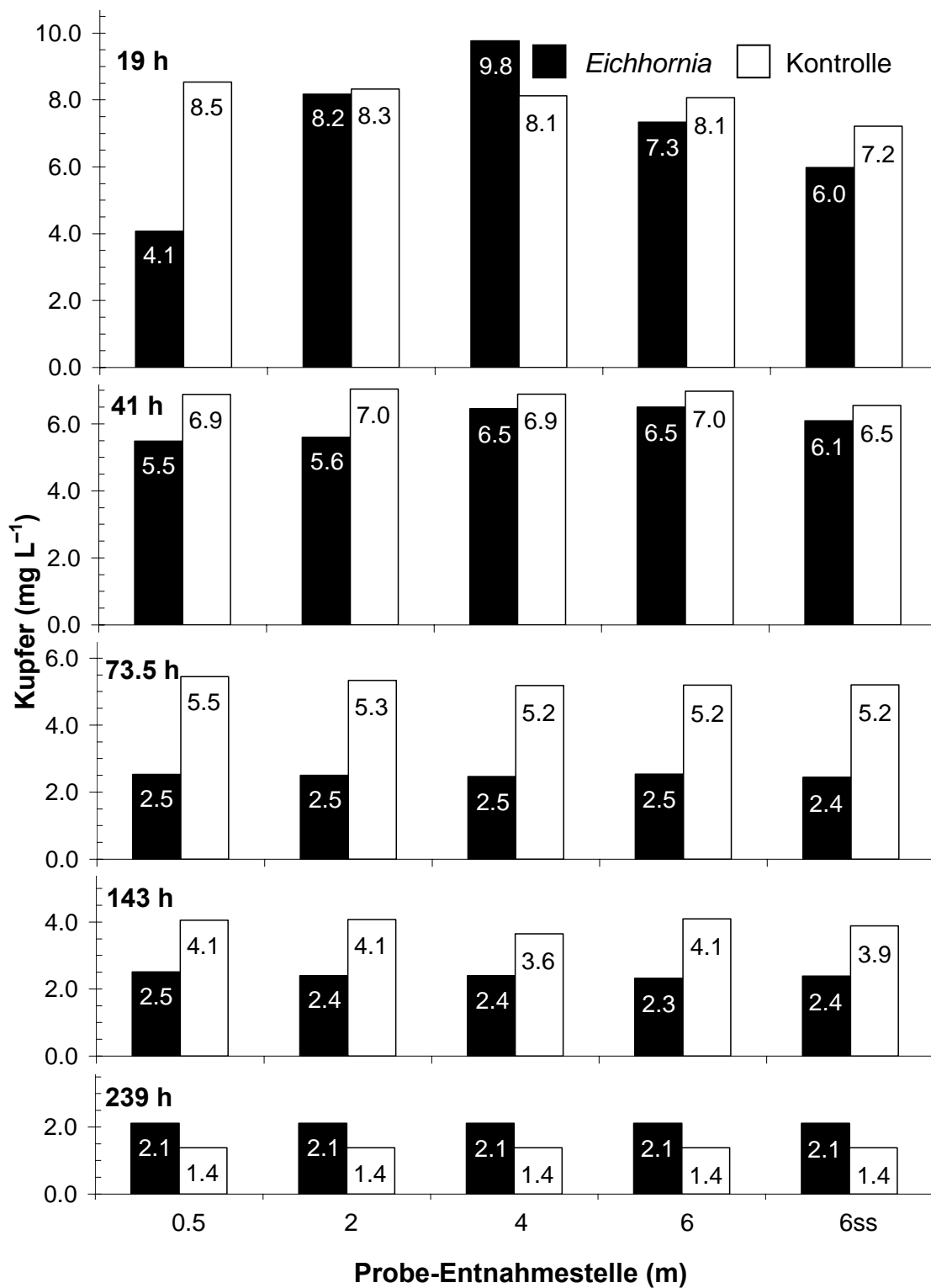


Abbildung 3.37: AMOVA V.9: Kupfergehalte im *Eichhornia*- und Kontrollbecken 19–239 h nach 2. Applikation; 1–4: Probe-Entnahmestelle nach 0,7, 2, 4 und 6 m; ss (subsurface): Probe-Entnahme im Kies am Beckengrund; Die Kupfer-Konzentrationen des Kontroll-Beckens wurden auf das momentane Volumen und die Hintergrundkonzentration der *Eichhornia*-Bahn umgerechnet. Applikation: siehe Tabelle 3.11

Das Cyanocuprat konnte durch die HPLC-Messungen im *Eichhornia*-Becken jeweils während bzw. nach der Applikation nachgewiesen werden. Der Nachweis gelang nur zu den Zeitpunkten der Belastungsspitzen. Nach der ersten Applikation, als die Kupferkonzentration im Becken annähernd 7 mg L^{-1} betrug, war der Komplex nur mit einer sehr geringen Signalstärke nachweisbar. Nach der zweiten Applikation betrug die Signalstärke ein Vielfaches (Abb. A6/A7).

Die Kupfergehalte in den Blättern fielen im Vergleich zu den Laborversuchen bemerkenswert hoch aus (Abb. 3.38). Sie übertrafen den Kupfergehalt der Kontrollpflanzen ohne Kupfergabe ($0,02 \text{ mg Cu g TS}^{-1}$) um ca. den Faktor 5. Hingegen waren die Kupfergehalte der Wurzeln vergleichsweise gering. Der Gehalt übertraf zwar bei weitem den der Kontrollpflanzen ($0,03 \text{ mg Cu g TS}^{-1}$), in den Laborversuchen konnte aber nach Inkubation mit Kupfer eine in etwa 5–6 fache höhere Anreicherung erzielt werden (vgl. Abb. 3.9). Der Kupfergehalt der Blätter war auf der gesamten Strecke relativ homogen um $0,1 \text{ mg g TS}^{-1}$. Diese Gehalts-Konstanz galt mit einer Ausnahme auch für den Kupfergehalt der Wurzeln. Nur am Ende der Bahn war der Kupfergehalt der Wurzeln signifikant ($p < 0,01$) um ca. 30% erniedrigt.

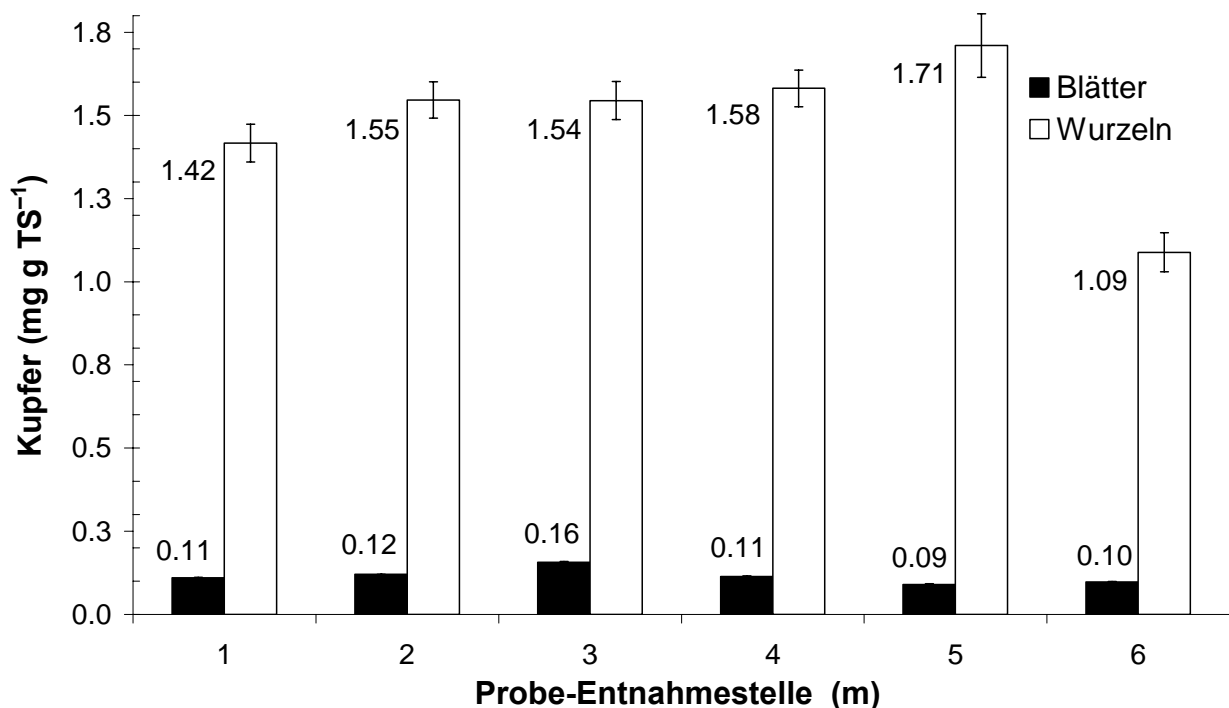


Abbildung 3.38: AMOVA V.9: Kupfergehalte in Blättern und Wurzeln nach Versuchsende an Probe-Entnahmestellen nach 1–6 m; TS = Trockensubstanz; Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von $n = 3$.

3.6.2 Diskussion der Resultate aus der AMOVA

3.6.2.1 Vorversuche

Nach der ersten Cyanid–Applikation in der AMOVA wurde der Schadstoff unzureichend im System verteilt. Infolgedessen verursachte eine Konzentrationsspitze von ca. 25 mg CN L⁻¹ eine enorme Schädigung der Pflanzendecke im Einstrombereich. Dennoch war die Cyanid–Abbauleistung um ca. 80% in 24 h bemerkenswert. Eine Erklärung hierfür wäre vielleicht ein mikrobiologischer Co–Metabolismus des Cyanids in Folge der Freisetzung von Zell–Lysaten, die im Zuge von Verrotungsprozessen der absterbenden Pflanzenbiomasse freigesetzt wurden. Die erste Applikation unterstrich die Bedeutung der vollständigen hydraulischen Kontrolle bei der Aufbereitung hochtoxischer Cyanid–Abwässer. Es konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden:

1. Bei einer optimalen Mischung bzw. schnellen Schadstoffleitung im System dürften unerwünschte Konzentrationsspitzen nicht auftreten. Dies wäre die Voraussetzung, um die gesamte Biomasse im System am Schadstoffabbau zu beteiligen, aber gleichzeitig die maximale Expositionszeit so kurz wie möglich zu halten.
2. Um diese Anforderungen zu erfüllen, musste zunächst das Applikationsvolumen und damit auch die Applikationszeit erhöht werden.
3. Ferner musste auch der Schadstoffstrom durch das Becken beschleunigt werden. Dies konnte durch gezielten Abfluss am Ende der Bahn von der Wasseroberfläche oder durch Erhöhung der Flussrate erzielt werden.
4. Bei einer zu hohen Flussrate bestand allerdings die Gefahr einer zu geringen Verweildauer des Abwassers und damit einer unvollständigen Klärung. Dieses Problem konnte nur durch die Etablierung einer Kreislaufführung gelöst werden.

Die Kreislaufführung simulierte den Klärprozess in einem mehrfach größeren (abhängig von den Klärzyklen) Becken bei relativ hoher Flussrate. Die angesprochenen Punkte wurden darüber hinaus beim nächsten Versuch in der AMOVA durch ein höheres Applikationsvolumen und längeren Applikationszeitraum realisiert.

Nach der zweiten Applikation wurde die Cyanid–Fracht gleichmäßiger und schneller im System verteilt. Es stellte sich jedoch heraus, dass nur durch die Etablierung der Kreislaufführung der Schadstoff optimal im Becken verteilt wurde. Im Gegensatz zum Kontrollbecken war in der *Eichhornia*–Bahn ein Konzentrationsgradient sichtbar. Durch die Wasserhyazinthen schien der Cyanid–Abbau nicht merklich gefördert zu werden. Sowohl im Becken mit den

Wasserpflanzen, als auch in der Kontrolle war das Cyanid nach 128 h fast vollständig abgebaut.

Der Konzentrationsgradient im *Eichhornia*-Becken war wahrscheinlich auf biologischen Abbau zurückzuführen, da es im Kontrollbecken zu keinem Gradienten kam. Das *Eichhornia*-Becken zeigte eine enorme Pufferkapazität, die auch durch einige Untersuchungen bestätigt wurde (Granato 1993; Gopal und Sharma 1981). Während der Applikation kam es aufgrund der alkalischen Cyanidlösung zu erhöhten pH-Werten, die aber in relativ kurzen Zeiträumen wieder ins Optimum der Wasserpflanzen von ca. pH 6,8 gesenkt wurden. Das Kontrollbecken hingegen zeigte keine vergleichbare Pufferkapazität. Dementsprechend war das Wasser des Kontrollbeckens im gesamten Versuchszeitraum 2005 alkalisch im Bereich von pH 9. Nur beim achten Versuch wurde der pH gezielt reduziert.

Im Auslaufbereich des *Eichhornia*-Beckens kam es aufgrund der Neigung der Bahn zu einer Stauung des Abwassers, was sich in erhöhten Cyanid-Konzentrationen an der Probenentnahmestelle im Kies nach 6 m (6ss) bemerkbar machte. Diese hohen Cyanidkonzentrationen im Totvolumen des Kieskörpers mussten vermieden werden, da das Cyanid dort nicht für die Pflanzen verfügbar war. Nur die Kreislaufführung und damit die direkte Ableitung des Abwassers aus dem Kies und die damit verbundene Neueinspeisung führte zu einer Senkung der Cyanidkonzentration. Die Cyanid-Aufbereitung durch Wasserhyazinthen konnte bis zu diesem Zeitpunkt nicht überzeugen, da im Kontrollbecken eine fast ebenso schnelle Cyanid-Degradation festgestellt wurde.

Um die hydraulischen Eigenschaften der Bahnen eindeutig zu erfassen, wurde die Leitfähigkeit nach Applikation des Tracers NaCl für 26 h permanent aufgezeichnet. Bei beiden Bahnen lag die experimentell ermittelte Verweildauer des Wassers unter der berechneten. In der Kontrollbahn aber fiel die Differenz zwischen experimentell ermittelter und berechneter Verweildauer wesentlich höher aus. Dies ist in einer besseren hydraulischen Leitfähigkeit der Kontrollbahn begründet. Während die dichte Pflanzendecke einen hydraulischen Widerstand bot und den Wasserkörper vor einer Durchmischung durch Wind vollständig abschirmte, war dies im Kontrollbecken nicht der Fall. Die Folge war eine schnellere Verteilung und Durchmischung.

Um die Cyanid-Degradation zu fördern, wurden in Konsequenz alle folgenden Versuche mit Kreislaufführung bei erhöhter Durchflussrate (36 L h^{-1}) durchgeführt.

3.6.2.2 Versuche mit Kreislaufführung

In allen Versuchen mit Kreislaufführung des Abwassers konnte eine vollständige Klärung erzielt werden. Zunächst erfolgten die Cyanid–Applikationen wöchentlich. Hierbei wurde die Cyanid–Einwaage stetig von 5 g auf 11 g NaCN gesteigert (vgl. Tab. 3.11), um vorsichtig die Belastungsgrenzen des Systems zu erforschen. Durch keine Applikation wurden die Wasserpflanzen sichtbar geschädigt. Im dritten Versuch bestätigte sich, dass eine Kreislaufführung bei hoher Durchflussrate die Schadstoffverteilung im System optimiert. In diesem Versuch wurde erstmals ein vollständiger Abbau der Cyanidbelastung erzielt. Das Restcyanid im Kieskörper nach 0,5 m (0,5ss) war auf ein Totvolumen zurückzuführen. Da an den anderen Probe–Entnahmepunkten im Kies nach 2 m und 4 m (2ss, 4ss) des *Eichhornia*–Beckens keine oder nur vernachlässigbar geringe Cyanidkonzentrationen von maximal $20 \mu\text{g L}^{-1}$ nachgewiesen werden konnten, wurde dort in den anschließenden Versuchen nicht mehr beprobt. In den folgenden drei Versuchen wurde sukzessive mehr Cyanid appliziert (5–11 g NaCN). Dennoch wurde der hochtoxische Schadstoff innerhalb von 48–72 h vollständig abgebaut. Diese verbesserte Abbauleistung konnte nicht auf klimatische bzw. abiotische Parameter zurückgeführt werden, sondern könnte daher auf mikrobiologische Adaption der Rhizosphäre zurückzuführen gewesen sein. Auch eine physiologische Adaption der Pflanzen selbst konnte nicht ausgeschlossen werden. Ferner könnte auch eine Vergrößerung der Biomasse eine erhebliche Rolle gespielt haben.

Aus diesen Versuchen konnte die Schlussfolgerung gezogen werden, dass der Abbau freien Cyanids im Freiland durch die Anwesenheit von *E. crassipes* erheblich gefördert wird. Im Vergleich zur Kontrolle wurde eine um ca. 50% gesteigerte und vollständige Klärung in 48–72 h erzielt.

In den folgenden Versuchen wurde nicht nur die Cyanideinwaage weiter gesteigert, sondern auch mehrfach NaCN in kürzeren Zeitintervallen appliziert. Zunächst wurden 15 g und 18 g NaCN innerhalb von 48 h, dann 20,4 g und 26,5 g innerhalb von 24 h appliziert. Auch nach diesen mehrfachen Cyanid–Applikationen konnten keine Leistungseinbußen der *Eichhornia*–Behandlung festgestellt werden. Im Gegenteil, der Cyanid–Abbau in Gegenwart der Wasserpflanzen verlief mit jeder Applikation schneller aber dennoch nach jeder Applikation vollständig. Obwohl mit jeder Applikation der Cyanidgehalt gesteigert und die Zeitintervalle zwischen den Applikationen verkürzt wurden, konnten keinerlei Schäden an den Pflanzen festgestellt werden. Dies bedeutete, dass während des Versuchszeitraums keine Pflanze im Gesamtsystem unmittelbar nach der Cyanid–Applikation Blätter einbüßte oder Chlorosen aufwies, obwohl die Pflanzen hochtoxischen Konzentrationen ausgesetzt waren (Ausnahme: V.1). In

der AMOVA wurden also die experimentellen Resultate der Laborversuche zur Toxizität und zum Cyanidabbau übertroffen. Unter Freilandbedingungen wurde das Cyanid schneller abgebaut wobei die Wasserpflanzen eine höhere Toleranz zeigten. Das in dieser Hinsicht deutlichste Ergebnis wurde in der letzten Applikation erzielt. Hier wurde die Cyanidfracht in ca. 24 h fast vollständig abgebaut. Dies bedeutete, dass durch *Eichhornia* in diesem kurzen Zeitraum 30 L einer Cyanidlösung mit ca. 470 mg L^{-1} freiem Cyanid vollständig aufbereitet werden konnte. Diese erhebliche Menge Blausäure hätte ausgereicht, um 250.000 L Wasser mit $56 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ zu belasten, eine für die meisten Fischarten letale Konzentration (Eisler 2000, 1991). Es wurde auch untersucht, ob die Abnahme der Cyanidkonzentration lediglich auf pH-abhängige Verflüchtigung beruhte. Tatsächlich zeigte sich, nachdem das Kontrollbecken angesäuert wurde und keine alkalische Cyanidlösung mehr nachströmte (68–92 h), eine erhebliche Reduzierung der Schadstoff-Fracht im Kontrollbecken. Es erschien plausibel, dass dieser Verlust auf Ausgasung von HCN zurückzuführen war, da durch die Ansäuerung nach der zweiten Applikation auch im Kontrollbecken fast ausschließlich volatiles HCN vorlag. Durch diesen Versuch konnte aber auch demonstriert werden, dass der erhebliche Cyanidverlust in der *Eichhornia*-Bahn nicht allein auf Ausgasung von HCN zurückzuführen sein konnte. Obwohl bei der letzten Applikation nach 44 h der Anteil an HCN im Kontrollbecken höher war, reduzierte sich der Cyanidgehalt jedoch in den nächsten 24 h nur unmerklich. Die Ausgasung als dominanter Verlustprozess erschien im *Eichhornia*-Becken bei näherer Betrachtung ohnehin nicht plausibel. Die Ausgasung hängt von dem HCN-Anteil, der Temperatur und von dem Volumen über der Lösung ab. Durch die dichte Pflanzendecke war aber die Wasseroberfläche der *Eichhornia*-Bahn zu jedem Zeitpunkt vor Sonneneinstrahlung und Wind vollkommen abgeschirmt. Darüber hinaus ließ die mehrschichtige, etwa 200 mm starke Pflanzendecke auf der Wasseroberfläche keine bemerkenswerten freien Volumina zu.

Es wurden bisher noch keine vergleichbaren Arbeiten anderer Arbeitsgruppen im halbtechnischen Maßstab mit *E. crassipes* veröffentlicht. Granato (1993) führte Versuche zur Aufbereitung cyanidhaltiger Abwässer in 50 L Tanks durch, die mit einer Rate von $6,3 \text{ L h}^{-1}$ mit insgesamt 5 L Cyanidlösung beschickt wurden. Er applizierte 3, 50, 100 und 300 mg CN L^{-1} . Innerhalb von 48 h konnte er eine maximale Klärleistung von 57% bei 50 mg CN L^{-1} feststellen. Gleichzeitig fiel der Cyanidgehalt im Kontrollansatz um 11% stärker ab. Insgesamt konnte er nicht nachweisen, dass *E. crassipes* den Cyanid-Abbau beschleunigt. Seidel (1971) beschickte eine mit *Schoenoplectus lacustris* bepflanzte Anlage mit cyanidhaltigen Abwässern und erzielte im Sommer einen 100%igen Reinigungsgrad. In dem Artikel fehlen darüber hinaus weitere Ergebnisse und jegliche Angaben zur Durchführung des Versuchs.

3.6.2.3 Überprüfung der Ergebnisse unter Labor- und Freilandbedingungen

Das Phänomen der Steigerung der Cyanid–Abbauleistung in der AMOVA sollte unter Laborbedingungen und durch erneute Applikation in der AMOVA im Folgejahr überprüft werden. Hintergrund war die Annahme, dass Adaptionsprozesse an den natürlichen Giftstoff Blausäure beim Klärprozess eine Rolle gespielt haben könnten. Aus diesem Grund wurden einzelne Pflanzen aus der AMOVA entnommen und unter verschiedenen Bedingungen mit Cyanid im hydroponischen Versuchsaufbau im Phytotron inkubiert. Tatsächlich zeigten die Pflanzen eine erhöhte Abbauleistung. Zudem wurde in der Abnahme der Cyanidkonzentration eine lag–Phase festgestellt. Nach erneuter Cyanid–Applikation in der AMOVA -ohne Adaptionsphase- konnten die Ergebnisse aus dem Vorjahr nicht reproduziert werden. Es kam während der Applikation zu enormen Konzentrationsspitzen und im weiteren Verlauf zu einer sehr langsamen Senkung der Cyanidkonzentration, die bis zur fast vollständigen Klärung ca. 141 h in Anspruch nahm. Ferner überlebten nur 30–50% der Pflanzen diese Applikation. Ayade (1998) konnte auch durch Adaption die Toleranz und Klärleistung steigern. Sie konnte die Klärleistung (kommunales Abwasser) und die Toleranz der Pflanzen erhöhen, in dem sie die Wasserpflanzen mit einem Bakterien-Konsortium inokulierte und anschließend mit verschiedenen Verdünnungsstufen an das Abwasser adaptierte. Das Konsortium war aus *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella ozonae*, *Klebsiella edwardsiella* und *Bacillus subtilis* zusammengesetzt. Die adaptierten Wasserhyazinthen erzielten eine Reinigungsleistung von 93% des unverdünnten Abwassers, während unadaptierte Pflanzen in der gleichen Lösung nicht überleben konnten.

Die Wasserpflanzen aus der AMOVA (2005) entfernten das Cyanid aus der Nährlösung in Laborversuchen in einem Bruchteil des zu erwartenden Zeitraums (vgl. Abb. 3.14/3.15). Der vollständige Abbau mit *E. crassipes* erfolgte unter optimalen Bedingungen in nur 23 h und nicht in den zu erwartenden 100 h. Es erschien daher unwahrscheinlich, dass diese hohe Abbauleistung allein auf das höhere Frischgewicht zurückzuführen war. Die beobachtete lag–Phase wurde wahrscheinlich durch die geringere Temperatur in der Dunkelphase verlängert, wenn wie im Ansatz p2 sich die Dunkelphase direkt an die ca. zwölfstündige lag–Phase anschloss. Es schien unwahrscheinlich, dass dieses Phänomen auf den Lichteinfluss zurückzuführen war, da dann auch in den batch–Versuchen mit Blattstücken ohne Lichtquelle (vgl. Abb. 3.10) ein Effekt oder eine Tendenz bemerkbar gewesen wäre. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse von Yu *et al.* (2005b) gestützt, die eine substantielle Temperatur–Abhängigkeit des Cyanid–Abbaus mit Weiden ermittelten. Eine weitere Erklärung wäre die lichtabhängige Ausgasung von HCN aus den Blättern. Entsprechende Befunde wurden mit

Salix alba ermittelt (Trapp *et al.* 2001b). Dieser Vorgang kann hingegen nicht die verlängerte lag-Phase bei längerer anfänglicher Lichtperiode (p1) erklären. Darüber hinaus wird diese These auch nicht durch die radioanalytischen Abbaustudien gestützt, in denen in *E. crassipes* kein Cyanid, sondern ^{14}C -markiertes Asparagin detektiert werden konnte (vgl. Abb. 3.11/3.19, Abb. A8/A9). Als plausibelste Erklärung bleibt die Adaption an Blausäure. Diese könnte durch eine physiologische Anpassung der Pflanzen an Cyanid oder der Mikroflora an den Wurzeln *Eichhornias* erklärt werden. Sowohl Adaptionsprozesse als auch eine lag-Phase wurden hinsichtlich der Cyanid-Degradation mit Pflanzen bisher noch nicht beschrieben. Die Ergebnisse von Ayade (1998) aus Studien mit kommunalem Abwasser legen eine mikrobiologische Erklärung des Phänomens nahe (s.o.). Allerdings handelt es sich bei der Blausäure um eine Substanz, die im pflanzlichen Stoffwechsel produziert und metabolisiert wird. Aus diesem Grund kann eine Adaption des pflanzlichen Metabolismus an Cyanid nicht ausgeschlossen werden.

3.6.2.4 Aufbereitung kupferhaltiger Abwässer

In den Laborversuchen stellte sich heraus, dass, wenn Blausäure zugegen ist, die Kupferaufnahme durch die Pflanzen fast vollständig blockiert wird (vgl. Abb. 3.7). Bei der Applikation kupfer- und cyanidhaltiger Abwässer in der AMOVA sollte dieser Befund überprüft werden. Aufgrund der klimatischen Verhältnisse konnte jedoch in dem engem Zeitfenster am Ende der Vegetationsperiode nicht mehr erschöpfend die Klärung von rein kupferhaltigen Abwässern untersucht werden. Bereits während des Versuches hätten die nächtlichen Lufttemperaturen deutlich unter 10°C fallen können, was ein rasches Absterben der tropischen Pflanzen zur Folge gehabt hätte. Die Applikationen wurden somit so gewählt, dass bereits mit der ersten Gabe von Kupfer nicht nur die rasche Absorption freiverfügbaren Kupfers, sondern auch die Hemmung der Wurzel-Absorption durch Cyanid demonstriert werden konnte. Aus diesem Grund wurden innerhalb von 48 h zwei Applikationen mit gleichen Einwaagen an Kupfer aber unterschiedlichen Einwaagen an Cyanid vorgenommen. Um den Einfluss des Cyanids als starken Komplexbildner zu ermitteln, wurde in der ersten Applikation getrennt (in zwei Lösungen!) frei verfügbares Kupfer in einer sauren Lösung und vollständig als Cyanokomplex gebundenes Kupfer in einer alkalischen Lösung appliziert. Anschließend wurde die Kupferkonzentration in den Becken ermittelt. Wenn die Wurzel-Absorption des Tetracyanocuprat-Komplexes auch im Pilotmaßstab gehemmt gewesen wäre, hätte diese Fraktion als nicht bioverfügbar im Becken verbleiben müssen. Dementsprechend hätten nach dieser Applikation von 3,9 g Kupferchlorid mit 5,7 g NaCN (molares Verhältnis 1:4) nach 24 h ca. $2,45 \text{ mg L}^{-1}$

Kupfer im *Eichhornia*-Becken nachweisbar sein müssen. Dieser Fall traf ein. Die Konzentration belief sich tatsächlich auf ca. 2 mg Cu L^{-1} und befand sich somit im Erwartungsbereich (vgl. Abb. 3.36). Auch die Kupferkonzentrationen des Kontrollbeckens stimmten mit dieser Erwartung auch noch nach 143 h überein (vgl. Abb. 3.36).

Nach dieser ersten Applikation von leicht (Applikation von Kupferchlorid in saurer Lösung) und schwerverfügbaren Kupfer (Applikation von Kupferchlorid mit Natriumcyanid im molaren Verhältnis 1:4 in alkalischer Lösung) schien sich die Annahme zu bestätigen, dass ein Restkupfergehalt als Cyanokomplex im Becken zurück bleibt.

Die zweite Applikation unterschied sich nicht in der Gesamteinwaage des Kupfers (vgl. Tab. 3.11). Hierbei wurde aber die Einwaage an Cyanid verdoppelt und mit dem Kupfer gemeinsam in einer alkalischen Lösung appliziert. Das molare Verhältnis für die Komplexbildung betrug somit auch 4:1 und war damit günstig für die Bildung des thermodynamisch stabilen Tetracyanocuprats. Die Hypothese hierbei war, dass die Wurzel-Absorption des Kupfers aufgrund der vollständigen Komplexbildung blockiert ist. Nach dieser Applikation wäre also zu erwarten gewesen, dass sich zunächst eine höhere Konzentration von ca. $6\text{--}8 \text{ mg Cu L}^{-1}$ im Becken einstellt und anschließend über einen längeren Zeitraum eine langsame Reduktion der Rest-Kupferkonzentration zu beobachten gewesen wäre. Tatsächlich traf dieser Fall nicht ein. Im *Eichhornia*-Becken stellte sich rasch erneut eine konstante Restkonzentration ein. Wieder betrug diese Restkonzentration ca. 2 mg Cu L^{-1} (vgl. Abb. 3.37).

Nach der zweiten Applikation von cyanid- und kupferhaltigem Abwasser konnte demnach kein hemmender Einfluss des Cyanids auf die Kupferabsorption durch *Eichhornia* beobachtet werden.

Dieser asymptotische Verlauf der Konzentrationssenkung (auf 2 mg Cu L^{-1}) nach beiden Applikationen sprach nicht dafür, dass dieses verbleibende Kupfer durch Cyanid komplexiert war. Die Ergebnisse deuteten vielmehr darauf hin, dass es sich hierbei um einen schwer bioverfügbaren Anteil handelte, der absorbiert an gelöster organischer Substanz oder komplexiert durch organische Säuren oder Amine vorlag. Hierfür würde auch die ohnehin hohe Hintergrundkonzentration von $0,65 \text{ mg Cu L}^{-1}$ vor Versuchsbeginn sprechen. Darüber hinaus war das Wasser im *Eichhornia*-Becken deutlich braun gefärbt und mit zahlreichen Feinwurzeln der Pflanzen durchsetzt. Die These einer asymptotischen Kupferabnahme würde für einen schnellen Abbau des Cyanokomplexes sprechen. Diese Vermutung wird durch die HPLC-Messungen gestützt. Nur unmittelbar nach den Applikationen war Cyanocuprat detektierbar (vgl. Abb. A6/A7). Einschränkend muss aber hier erwähnt werden, dass die HPLC-Methode für die Detektierung von Tetracyanonickelat aus matrixarmen Proben entwickelt wurde. Von

daher könnten schwache Signale des Cyanocuprats in der Matrix nicht sichtbar gewesen sein. Ferner ist durch die Methode nur Tetracyanocuprat einwandfrei zu identifizieren. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass sich in der heterogenen Probenmatrix auch noch mehrkernige Cyanokomplexe oder Mischformen mit Hydroxiden, Aminen oder organischen Säuren gebildet hatten. Die HPLC-Messungen belegten aber einwandfrei, dass in der zweiten Applikation der Anteil des cyanidkomplexierten Kupfers erwartungsgemäß wesentlich höher gewesen sein muss als in der ersten Applikation. Dementsprechend wurde die Kupferkonzentration nach der zweiten Applikation tatsächlich schneller reduziert. Die Abnahme der Kupferkonzentration nach der zweiten Applikation verlief auch wesentlich schneller als durch die Laborstudien impliziert.

Die Tatsache, dass der Kupfergehalt im Kontrollbecken generell abnahm, ist nicht überraschend. Während des Versuchs wurden im Kontrollbecken pH-Spitzen von bis zu pH 9 beobachtet, wobei der pH sich meist über pH 8 bewegte. Die Fällung als Kupfer(II)hydroxid dürfte demnach der dominante Verlustprozess gewesen sein. Daneben kam es wahrscheinlich auch zur Adsorption an organischer Substanz und mikrobiologischer Absorption. Im *Eichhornia*-Becken blieb der pH im Übrigen konstant bei pH 7–7,4. Lediglich 19 h nach Applikation 2 wurde punktuell pH 8 festgestellt.

Die vergleichsweise hohen Kupfergehalte der Blätter und geringen Gehalte der Wurzeln können als Hinweis auf eine stete Kupferabsorption und Translokation in der Pflanze über einen längeren Zeitraum gewertet werden. Damit könnte sich ein hohes Akkumulationspotential der Pflanzen andeuten. Insbesondere auch unter dem Aspekt der ständigen Wurzelerneuerung könnten in der Anlage über einen längeren Zeitraum erhebliche Mengen Kupfer in Form von toter Biomasse immobilisiert werden.

Falls tatsächlich das Restkupfer komplexiert oder adsorbiert an organischer Substanz vorlag, würde dies bedeuten, dass Cyanokomplexe des Kupfers in einer Pflanzenkläranlage mit *E. crassipes*, die an Cyanid adaptiert ist, nicht schwer abbaubar bzw. absorbierbar sind. Falls diese Hypothese zutrifft, waren die Cyanokomplexe ca. 40 h nach der ersten Applikation und ca. 72 h nach der zweiten Applikation vollständig abgebaut bzw. absorbiert. Das im System verbleibende Kupfer könnte leicht und kostengünstig durch einen Filter entfernt werden. Als geeigneter Filter für Schwermetalle (z.B. Pb, Cd, Cu, Zn, Ur, Hg) und andere Makroschadstoffe (z.B. As, Phenol, PNP) eignet sich gleichfalls aus der Wasserhyazinthe gewonnenes Material. In zahlreichen aktuellen Studien konnte die hohe Filterleistung von Wurzelpräparaten *Eichhornias* demonstriert werden (Al Rmalli *et al.* 2005; Shawky *et al.* 2005; Rashwan und Girgis 2004; Kadirvelu *et al.* 2004; Shekinah *et al.* 2002). Eine Pflanzenkläranlage mit

E. crassipes würde demnach die benötigten Filtermaterialien kostenneutral als „Nebenprodukt“ produzieren.

Granato (1993) untersuchte in 50 L Systemen mit kontinuierlicher Beschickung von Kupfer ($1,6\text{--}2,6\text{ mg L}^{-1}$), Cyanid ($9\text{--}19\text{ mg L}^{-1}$) und Zink ($1,6\text{ mg L}^{-1}$) die Schadstoffklärung innerhalb von 8 Tagen. Während Cyanid und Zink zu ca. 50% entfernt wurden, verblieb das Kupfer zu 100% in der Lösung. Die unterschiedliche Aufnahme von Zink und Kupfer war wahrscheinlich auf die unterschiedliche Komplexbildungstendenz zurückzuführen. Die Schlussfolgerung dieser Studie war, dass sich *Eichhornia* ausschließlich für die Behandlung cyanidhaltiger Abwässer und nicht für die Aufbereitung kupferhaltiger Abwässer eignet. Diese These steht im Widerspruch zu den eigenen Ergebnissen. Das in der Studie benutzte System unterschied sich in fünf wichtigen Kriterien von dem eigenen:

1. Versuchszeitraum (14 d / 72 d),
2. Gesamtgröße des Systems (50 L / ca. 1000 L),
3. Komplexität (Plastiktanks / Becken mit Kies etc.),
4. Hydraulische Kontrolle (geringe / vollständige)
5. Lage (Labor / Freiland).

In diesen Unterschieden ist demnach die wesentlich bessere Abbauleistung begründet. Die Hypothese hierzu wäre, dass die Klärleistung durch eine lange Adaptionsphase an Cyanid unter optimalen klimatischen Bedingungen (Fitness der Pflanzen) begünstigt wird. Das Cyanid im Metallkomplex wäre also durch die Mikroflora bioverfügbar und als Stickstoffquelle nutzbar. Diese Adaption zeigt sich wahrscheinlich eher mit steigender Komplexität des Systems, da mit der strukturellen Komplexität auch die (mikro-)biologische Ansteigen dürfte.

3.6.3 Zusammenfassung: Schadstoffaufbereitung im Pilotmaßstab (AMOVA)

Vorversuche

Die ersten Versuche zur Aufbereitung cyanidhaltiger Abwässer verliefen erfolglos. Die Schadstoff-Front wurde nur unzureichend im System verteilt, es kam zu Totvolumina und unerwünschten Konzentrationsspitzen, die zu einer Schädigung der Pflanzendecke führten. Ferner verlief die Aufbereitung der cyanidhaltigen Abwässer nicht schneller als in der Kontrollbahn. Aus diesen Gründen mussten zunächst die optimalen hydraulischen Versuchsbedingungen in der AMOVA etabliert werden. Es stellte sich heraus, dass eine optimale Durchmischung des Gesamtsystems (ca. 1 m^3 Wasser) mit einer Kreislaufführung bei einer Flussrate von 36 L h^{-1} erreicht werden konnte. Zu diesen Bedingungen wurde ein Tracerversuch mit Kochsalz durchgeführt. Die permanente Messung des Tracers im Ablauf zeigte eine geringere

Verweildauer des Wassers in der Kontrollbahn, die auf einen geringeren hydraulischen Widerstand sowie auf eine bessere Durchmischung der offenen Wasseroberfläche durch die direkte Exposition zur Atmosphäre zurückzuführen war. Das *Eichhornia*-Becken hingegen war durch die dichte Pflanzendecke vollständig abgeschirmt.

Applikationen unter optimierten Versuchsbedingungen

In den folgenden Applikationen wurde die Cyanid-Einwaage stetig erhöht. Während dieser Versuche erhöhte sich die Klärleistung des Systems. Die Wasserpflanzen zeigten währenddessen keine Symptome, die auf eine verminderte Fitness oder auf Toxizität schließen ließen. Um die Belastung des Systems noch nachdrücklicher zu steigern, wurde in den nächsten Applikationen nicht nur die Cyanid-Einwaage weiter erhöht, sondern auch der Zeitraum zwischen den Applikationen von sieben Tagen auf zunächst 48 h und dann 24 h verkürzt. Auch unter diesen drastischen Versuchsbedingungen zeigten die Pflanzen keinerlei Symptome, obwohl sie einer Cyanidkonzentration von bis zu 14 mg L^{-1} ausgesetzt waren. Tatsächlich zeigte sich in diesem Versuch auch die effektivste Klärleistung. Die Cyanidkonzentration verringerte sich in nur 24 h von 14 auf ca. $0,05 \text{ mg L}^{-1}$. Dies entspricht einer effektiven Aufbereitung von mehr als 99,6% in 24 h bei einem Abwasser mit einem Cyanidgehalt von 470 mg L^{-1} , das 3% des System-Gesamtolumens (ca. 1000 L) ausmachte. Das Abtropfgewicht der Pflanzen betrug zu Versuchsende 68,3 kg. Die realen Abwässer aus dem Goldbergbau enthalten maximal ca. 120 mg L^{-1} freies Cyanid (Eisler und Wiemeyer 2004). Damit wurde diese Höchstkonzentration in der letzten Cyanid-Applikation 2005 bereits um den Faktor 4 überschritten. Hingegen konnte in den 10 Cyanid-Applikationen in der AMOVA im Versuchszeitraum 2005 die Obergrenze des tatsächlichen maximalen Cyanid-Abbaupotentials der Wasserpflanzen nicht ermittelt werden. Der enge Zeitrahmen erlaubte keine weiteren Applikationen. In weiterführenden Experimenten unter günstigeren klimatischen Bedingungen könnte die tatsächliche Reinigungsleistung vermutlich noch weiter gesteigert werden.

Überprüfung der Abbauleistung im Labor- und Feldmaßstab

Auch in überprüfenden Laborexperimenten zeigten die Wasserpflanzen aus der AMOVA eine höhere Abbauleistung. Diese Abbauleistung konnte nicht plausibel mit dem höheren Frischgewicht der Pflanzen erklärt werden. Ferner zeigte sich in der Abnahme der Cyanidkonzentration eine deutliche lag-Phase von ca. 12 h, die in den bisherigen Laborstudien nicht beobachtet wurde. Diese lag-Phase wurde wahrscheinlich durch die geringere Temperatur in der Dunkelphase um weitere 12 h verlängert. Die höhere Cyanid-Abbaurate und die lag-Phase veranschaulichten, dass sich die Pflanzen aus der AMOVA von den „Gewächshauspflanzen“

deutlich unterschieden. Auch das Phänomen, dass es nach erneuter Cyanid–Applikation in der AMOVA im Folgejahr zu einem „Massensterben“ der Wasserhyazinthen und zu einer enorm geschwächten Abbauleistung kam, bewies sehr deutlich, dass sich dieses „Klärsystem“ mit *E. crassipes* von dem im Vorjahr eindeutig unterschied. Als Ursachen konnten ungünstigere Witterungsverhältnisse und geringere Gesamtbiomasse ausgeschlossen werden. Da auch keine Anzeichen ersichtlich waren, die den Schluss zuließen, dass die „Freilandpflanzen 2006“ eine geringere Fitness aufwiesen, unterschieden sich die Pflanzen bzw. das „biologische System *E. crassipes* 2005“ anscheinend in einer anderen Eigenschaft. Wahrscheinlich kam es zu einer Adaption an den natürlichen Giftstoff Blausäure. Diese Adaption könnte mikrobiologischer oder physiologischer Natur gewesen sein. Dies könnte bedeuten, dass sich die Gemeinschaft der Mikroorganismen an den Wurzeln *Eichhornias* auf Cyanid als Stickstoffquelle eingestellt hatte. Die physiologische Anpassung könnte mit einer höheren metabolischen Umsatzrate des Cyanids in *E. crassipes* erklärt werden. Beide Hypothesen erscheinen einleuchtend.

Aufbereitung kupfer- und cyanidhaltiger Abwässer

Die Applikationen cyanid- und kupferhaltiger Lösungen in der AMOVA haben gezeigt, dass entgegen der Resultate der Laborstudien kupferhaltiges Abwasser mit einer Spitzenkonzentration im System von ca. 8 mg Cu L^{-1} in Gegenwart von freiem Cyanid in einer Pflanzenkläranlage mit *E. crassipes* in relativ kurzen Zeiträumen von 24–48 h aufbereitbar ist. Nach den vorgenommenen Kupfer / Cyanid – Applikationen konnte demnach aufgrund der Komplexierung mit Cyanid keine schwer bioverfügbare Kupferfraktion beobachtet werden, obwohl das Tetracyanocuprat im System nachgewiesen werden konnte. Die Kupfergehalte in den Blättern fielen mit ca. $0,1 \text{ mg Cu g TS}^{-1}$ im Vergleich zu den Laborversuchen (um $0,02 \text{ mg Cu g TS}^{-1}$) bemerkenswert hoch aus. Hingegen waren die Kupfergehalte der Wurzeln mit ca. $1,5 \text{ mg Cu g TS}^{-1}$ im Vergleich zu den Laborexperimenten (ca. $1\text{--}10 \text{ mg Cu g TS}^{-1}$) gering.

Der Versuchszeitraum im Jahr 2005 reichte indes nicht mehr aus, um die Kupferaufbereitung in der AMOVA genauer zu untersuchen. In Anbetracht der bisherigen Erkenntnisse zur Phytotoxizität und Kupferabsorption aus den Laborversuchen und entsprechender Arbeiten anderer Arbeitsgruppen kann dennoch die vorläufige Schlussfolgerung gezogen werden, dass sich die Wasserpflanzen für die Aufbereitung kupferhaltiger Abwässer eignen. Die Kupferimmobilisierung im Gesamtsystem sollte sich auch über längere Zeiträume als nicht problematisch darstellen, da die Schwermetalle nicht nur in der vitalen Biomasse zurückgehalten werden. Vielmehr ist zu erwarten, dass sich über einen längeren Zeitraum die Schwermetalle in erster Linie in der toten Biomasse anreichern. Diese Biomasse sedimentiert und verrottet anschlie-

ßend unter anaeroben Bedingungen. Letztendlich wäre also zu erwarten, dass sich die Schwermetalle und insbesondere das Kupfer in Form von schwerlöslichen Sulfiden im Faulschlamm anreichern, was im Übrigen der Schwermetallimmobilisierung in einem herkömmlichen bewachsenen Bodenfilter bzw. einer Röhrichtkläranlage entsprechen würde.

4. Evaluation

4.1 Eignung *Eichhornias* zur Aufbereitung von Goldbergbauabwässern

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Eignung *E. crassipes* zur Behandlung cyanid- und kupferhaltiger Abwässer zu bewerten. Hierfür wurden drei Forschungsfelder identifiziert:

1. Phytotoxizität
2. Schadstoff –Aufnahme, –Absorption und –Verbleib
3. Umsetzung im (halb)technischen Maßstab

E. crassipes zeigte sich in Laborstudien toleranter gegenüber Kupfer und Cyanid als alle anderen in der Literatur beschriebenen Pflanzen, die unter ähnlichen Voraussetzungen getestet wurden. Die berechneten EC_{50} von 13 mg L^{-1} für Cyanid und $29,8 \text{ mg L}^{-1}$ für Kupfer (Probit-Analyse) veranschaulichten deutlich, dass die Pflanzen sich unter dem Gesichtspunkt Toxizität für die Klärung von Abwässern mit Schadstoff-Frachten von $50\text{--}500 \text{ mg L}^{-1}$ bei realistischer Verdünnung bzw. optimalen hydraulischen Voraussetzungen eignen. Im halbtechnischen Maßstab zeigten die Pflanzen auch bei toxischen Konzentrationen keinerlei Symptome oder eine verringerte Abbauleistung, was auf eine Adaption des Gesamtsystems an das hochtoxische Cyanid hindeutete. Diese Ergebnisse demonstrierten zweifelsfrei eine sehr hohe Eignung der Wasserpflanzen hinsichtlich des Kriteriums Schadstoff-Toleranz.

E. crassipes absorbierte unter günstigen Bedingungen (keine toxische Konzentration bis ca. 5 mg L^{-1} , Initial- pH 5,5) ca. 80% des applizierten Kupfers in nur 24 h und reicherte es in den Wurzeln an (ca. $3\text{--}15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ TS}^{-1}$), ohne geschädigt zu werden. Diese hohe Absorptionsleistung wurde auch in anderen Arbeiten mehrfach auch für weitere Schwermetalle bestätigt. Die maximale Abbaugeschwindigkeit v_{\max} für Cyanid mit Blattstücken *Eichhornias* lag bei $33,5 \text{ mg CN kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und fiel damit wesentlich höher aus als bei anderen bisher getesteten Pflanzenspezies. Diese hohe Abbauleistung konnte zunächst nicht mit ganzen Pflanzen nach Aufnahme über die Wurzeln reproduziert werden. Der Verlust der Radioaktivität folgte einer Kinetik 0. Ordnung, was auf einen diffusionsgesteuerten Prozess hindeutete. Um zu überprüfen, ob sich die Pflanzen oder die Mikroflora an Cyanid adaptierten, wurde der Versuch mit zuvor regelmäßig mit Cyanid inkubierten Wasserhyazinthen wiederholt. Hierdurch reduzierte sich zwar die Abbaugeschwindigkeit nur unwesentlich, der Kurvenverlauf wurde aber exponentiell. Das Cyanid wurde also nach einer Kinetik 1. Ordnung dem System entzogen, was auf einen Abbauprozess bzw. aktive biologische Aufnahme hindeutete. Mit diesem Ergebnis war also zu erwarten, dass durch eine Adaption an Cyanid die Abbauleistung gesteigert werden könnte. Nach Versuchsende wurde in allen radioanalytischen Experimenten festgestellt, dass die Restradioaktivität in *Eichhornia* nicht mehr ^{14}C -Cyanid entsprach. In Versuchen mit

Blatt- und Wurzelstücken konnte ferner die Entwicklung von $^{14}\text{CO}_2$ nachgewiesen werden. Weiterführende Untersuchungen der Restradioaktivität in den Blättern belegten den pflanzlichen Cyanidmetabolismus in *Eichhornia* zu Asparagin bzw. Aspartat als Endprodukte.

Letztendlich konnte also bewiesen werden, dass in Anwesenheit von *E. crassipes* das Cyanid in hohem Maße abgebaut und zu nicht toxischen oder umweltgefährdenden Produkten transformiert wird. Eine Akkumulation des Cyanids in *Eichhornia* wurde nicht beobachtet. Diese Ergebnisse implizierten, dass die Wasserhyazinthen sich für eine zeitlich unbegrenzte Klärung cyanidhaltiger Abwässer eignen könnten, da das toxische Cyanid vollständig aus dem Gesamtsystem entfernt werden dürfte. Somit sollten keine negativen Langzeiteffekte durch Akkumulation toxischer Blausäure in den Pflanzen zu erwarten sein. Selbst bei einer Kollabierung des Systems in Folge einer Schadstoff-Überfrachtung käme es somit nicht zu einer erneuten Cyanid-Freisetzung aus der pflanzlichen Biomasse.

In den Untersuchungen in der AMOVA im halbertechnischen Maßstab wurden die Ergebnisse aus den Laborstudien übertroffen. Es konnte eine gesteigerte Abbaurate und höhere Toleranz ermittelt werden, als durch die Laborergebnisse ableitbar. Es wurde eine (bisher) maximale Cyanidabbauleistung von 26,5 g NaCN in ca. 24 h bei einer maximalen Cyanidkonzentration im Becken von ca. 14 mg CN L^{-1} erzielt. Dies kam einer Schadstoff-Einspeisung von ca. 470 mg CN L^{-1} in 30 L gleich. Das eingespeiste Volumen entsprach hierbei 3% des momentanen Gesamtvolumens des Systems. Das Frischgewicht der Pflanzen entsprach zu diesem Zeitpunkt ca. 68,3 kg. Auch die Absorption von Kupfer mit Cyanid war enorm. Nach maximal 72 h war das Kupfer (maximale Konzentration im Becken ca. 8 mg Cu L^{-1}) bis auf eine Restkonzentration (2 mg Cu L^{-1}) vollständig dem Abwasser entzogen. Unter optimalen hydraulischen Voraussetzungen zeigten die Pflanzen im Becken auch bei den höchsten Schadstoffkonzentrationen um 14 mg CN L^{-1} während des gesamten Versuchszeitraums keinerlei Symptome wie eingeschränktes Wachstum, Nekrosen, Chlorosen oder welkende Blätter.

Vor dem Hintergrund der erarbeiteten Resultate kann die Eignung der Wasserhyazinthe *Eichhornia crassipes* für die Klärung cyanid- und kupferhaltiger Abwässer aus dem Goldbergbau vollends bestätigt werden.

Gegenüber anderen Pflanzenkläranlagen wie etwa einen mit Schilf bewachsenen Bodenfilter hat die Aufbereitung in Klärteichen mit Wasserhyazinthen auch weitere entscheidende Vorteile. Während die Schwermetall-Klärleistung in Bodenfiltern auf sulfidische Immobilisierung unter anoxischen Bedingungen im Sediment (Martin *et al.* 2003) oder Adsorption an oxidische Mangan- und Eisenerze zurückzuführen ist (Peeverly *et al.* 1995), ist in einer mit Flusskies befüllten Teichanlage mit *E. crassipes* die Aufnahme und Absorption durch die Pflanzen

zunächst der dominante Prozess zur Metallimmobilisierung. Damit kann prinzipiell das akkumulierte Schwermetall mit den Pflanzen jederzeit aus dem System entfernt und getrennt entsorgt werden. Wenn dies nicht geschieht, dürften sich zudem durch die Sedimentation von Detritus nach einiger Zeit auch die Metalle im Klärschlamm anreichern. Ein weiterer Vorteil von *E. crassipes* ist ihre Regenerationsfähigkeit. Falls das System in Folge einer zu hohen Belastung kollabieren sollte, können die toten Pflanzen einfach entfernt werden. Der Klärprozess kann wieder aufgenommen werden, sobald sich die Pflanzendecke erneut geschlossen hat. In den Tropen dürfte dies nach einigen Wochen der Fall sein (Gopal und Sharma 1981). Ein Schilfgürtel hingegen benötigt bis zur Reife Jahre (Wissing und Hofmann 2002).

4.2 Grenzen des Verfahrens und weiterer Forschungsbedarf

Der Versuchszeitraum 2005 war allein aufgrund der klimatischen Voraussetzungen stark limitiert. Daher konnte, obwohl die Witterungsverhältnisse optimal waren, das System nicht bis zu seiner Belastungsgrenze untersucht werden. Ferner können unter den gegebenen klimatischen Bedingungen auch keine Tests im kontinuierlichen Betrieb vorgenommen werden. Die Vegetationsperiode fällt schlicht zu kurz für eine Wachstumsphase, eine Adaptionsphase und Langzeittests mit kontinuierlicher Einspeisung aus. Diese Untersuchungen sollten im technischen Maßstab in der tropischen Klimazone, wo die Pflanzen ganzjährig wachsen, durchgeführt werden. In diesen Studien sollte dann auch mit realem Abwasser, das weitere Schwermetalle enthält, gearbeitet werden.

Bei (und vor) der Applikation von Kupfer stellte sich eine Restkonzentration ein. Aufgrund eines hohen Gehaltes an gelöster organischer Substanz im Wasser, müssen wahrscheinlich Restkonzentrationen partikulär bzw. kolloidal gebundener Schwermetalle in Kauf genommen werden. Obwohl diese restlichen Schwermetalle wahrscheinlich nicht bioverfügbar sind, sollten Filtereinheiten aus Wurzelmaterial *Eichhornias* nachgeschaltet werden, welche zudem die mikrobiologische Aktivität fördern.

Sowohl die Laborstudien zum Cyanidabbau, als auch die entsprechenden Experimente in der AMOVA wiesen deutlich auf einen Adaptionsprozess hin. In weiterführenden Untersuchungen sollte zunächst ermittelt werden, ob sich in erster Linie die Mikroorganismen oder die Pflanzen selbst an das Cyanid adaptieren. Letztere Möglichkeit kann nur einwandfrei durch Versuche mit steril aufgezogenen Pflanzen geklärt werden. Auch die Applikation von NaC^{15}N dürfte keine eindeutige Differenzierung zwischen pflanzlichem und bakteriellern Umsatz zulassen, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass $^{15}\text{NH}_4^+$ als Produkt der bakteriellen Mineralisierung durch die Pflanzen aufgenommen wird. Ferner dürfte die molekularbiologische

Untersuchung der Bakterienflora an den Wurzeln wahrscheinlich keine Veränderung in der Struktur der mikrobiologischen Gemeinschaft unter Cyanid-Einfluss zulassen, da die Fähigkeit zur Cyanid-Metabolisierung unter den Mikroorganismen keine Spezialanpassung darstellt, sondern vielmehr weit verbreitet ist. Interessanter hingegen wäre die Untersuchung der wurzelassoziierten Lebensgemeinschaft unter dem ständigen Einfluss eines „Multikomponenten-Abwassers“ mit Cyanid, Kupfer und anderen Schwermetallen. Unter diesen Bedingungen könnten sich speziell adaptierte Lebensgemeinschaften isolieren lassen, die sich eventuell auch für weiterführende biotechnologische Anwendungen eignen.

Obwohl die Eignung *Eichhornias* einwandfrei erwiesen wurde, sollten zudem dennoch weitere Pflanzen wie das Schilf *Phragmites australis* im halbtechnischen Maßstab untersucht werden. Wenn sich in bewachsenen Bodenfiltern mit hoher mikrobiologischer Aktivität keine vergleichbare Cyanidabbauleistung zeigt, wäre das ein sicheres Indiz, dass in der Teichanlage mit *E. crassipes* die Abbauleistung im Wesentlichen auf die Wasserpflanzen selbst zurückzuführen ist. Dies wäre physiologisch plausibel, da die Wasserhyazinthe durch ihr enormes Wachstum einen hohen Anteil meristematischen Gewebes aufweist. Diese meristematische Aktivität geht mit einer höheren Ethylenproduktion einher (Taiz und Zeiger 2000), die auch mit einer höheren β -Cyanoalaninsynthase-Aktivität verbunden ist. Physiologische und molekularbiologische Untersuchungen, die auch physiologische Adaptionsmechanismen aufdecken könnten, wurden mit *E. crassipes* allerdings bislang noch nicht durchgeführt. Hier besteht also weiterführender Forschungsbedarf.

Die zusätzliche Nutzung von Pflanzenkläranlagen mit Schilf hätte zudem zwei Vorteile. Erstens kann die Wasserhyazinthe im gemäßigten Klima mit Jahreszeiten nicht oder nur eingeschränkt eingesetzt werden. Zweitens ist das hochinvasive Potential der Wasserhyazinten eine potentielle ökologische Bedrohung für aquatische Ökosysteme in tropischen Klimaten, in denen die Pflanzen nicht vorkommen. Vor diesem Hintergrund sollte dort die Pflanze nur unter kontrollierten Bedingungen in abgetrennten Becken eingesetzt werden. In Anbetracht aber der dramatischen Schädigung bis zur totalen Zerstörung der Ökosysteme durch den Goldbergbau, sollte jedoch der Einsatz der Wasserhyazinten als kostengünstige Alternative unbedingt befürwortet werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wasserhyazinthe *Eichhornia crassipes* hinsichtlich ihrer Eignung zum Einsatz in Klärteichen zur Aufbereitung cyanid- und kupferbelasteter Abwässer aus dem Goldbergbau untersucht. Die ökotoxikologische Bewertung beider Schadstoffe war aufgrund der hohen aquatischen Toxizität ein wesentlicher Aspekt. Die Transpirationsbestimmung in hydroponischen Systemen stellte sich hierfür als adäquate Methode heraus. Diese Studien zur Kupferabsorption und zum Cyanidabbau wurden in verschiedenen Versuchsanordnungen im Labormaßstab durchgeführt. Der Verbleib des Cyanids wurde in erster Linie mit radioanalytischen Methoden untersucht. Mit der Applikation ^{14}C -markierten Cyanids war es möglich, den Verbleib des Cyanids im „System“ *E. crassipes* zu bilanzieren und die Abbauprodukte zu identifizieren. Die Resultate aus den Laborstudien wurden im halbertechnischen Maßstab überprüft. Diese Untersuchungen wurden in der Aquatischen-Modell-Vegetations-Anlage des Forschungszentrum Jülich vorgenommen.

E. crassipes erwies sich als tolerant gegenüber den Schadstoffen. Für Cyanid wurde ein EC_{50} von 13 mg L^{-1} und für Kupfer ein EC_{50} von 30 mg L^{-1} (Probit-Analyse) ermittelt. Es stellte sich heraus, dass bei gleichzeitiger Applikation beider Schadstoffe eine geringere toxische Reaktion festgestellt wurde. Dieser antagonistische Effekt war in der erschwerten Aufnahme des Cyanokomplexes begründet: Während *Eichhornia* insbesondere aus sauren Lösungen den Kupfergehalt in 24 h bis zu 98% reduzierte, war bei gleichzeitiger Anwesenheit von Cyanid keine signifikante Abnahme der Kupferkonzentration im gleichen Zeitraum festzustellen. Nach dem Expositionszeitraum von 72 h konnte keine deutliche Erhöhung des Kupferanteils in den Blättern der Pflanzen erzielt werden. In den Wurzeln konnte allerdings eine bis zu 500 fache Anreicherung beobachtet werden ($12 \text{ mg (g TS)}^{-1}$).

Ein wesentlicher Anteil der radioanalytischen Untersuchungen zur Cyanidaufnahme und zum Verbleib wurde in Modellsystemen mit Blatt- und Wurzelstücken vorgenommen. In diesen Experimenten konnte eine Verlust-Kinetik der applizierten Radioaktivität 1. Ordnung beobachtet werden. In den Blättern und Wurzeln konnte anschließend kein Cyanid mehr ermittelt werden, was auf eine Metabolisierung im Gewebe hindeutete. Die Entstehung radioaktiven Kohlenstoffdioxids in den Ansätzen mit Blättern wurde als Hinweis auf die Produktion der bekannten pflanzlichen Cyanidmetaboliten Asparagin bzw. Aspartat gewertet, das spontan Kohlenstoffdioxid abspaltet. Durch ethanolische Extraktion und Derivatisierung mit Phenylisothiocyanat konnte an der HPLC nachgewiesen werden, dass es sich bei ca. 80% der Radioaktivität in den Blättern nach 24stündiger Inkubation um freies Asparagin und Asparaginsäure im etwa äquimolaren Verhältnis handelte. Um die Cyanidabbauleistung mit anderen Pflanzen

vergleichen zu können, wurden die Michaelis–Menten Parameter bestimmt. Die maximale Abbaugeschwindigkeit v_{\max} lag bei $33,5 \text{ mg CN kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ und die Halbsättigungskonstante des Enzym–Substrat–Komplexes K_M bei $11,8 \text{ mg CN L}^{-1}$ (nichtlineare Regression). Der ermittelte Wert für v_{\max} ist die bisher höchste beschriebene Cyanidabbauleistung einer Pflanze. Um den Aufnahmeweg über die Wurzeln und damit den Verbleib des Cyanids in intakten Pflanzen zu untersuchen, wurden die Pflanzen mit ^{14}C –markiertem Cyanid in Durchfluss–Systemen inkubiert. Hierbei war durch den Versuchsaufbau eine Ausgasung von Radioaktivität aus der Nährlösung ausgeschlossen. Es wurde eine Verlust–Kinetik 0. Ordnung ermittelt, was auf einen diffusionsgesteuerten Prozess hindeutete. Nach Vorinkubation der Pflanzen mit Cyanid wurde hingegen eine Kinetik 1. Ordnung ermittelt. Dies wurde als ein Hinweis auf eine Adaption des „Systems *E. crassipes*“ an Cyanid gewertet. Wenn gleichzeitig Kupfer appliziert wurde, verlangsamte sich wiederum die Abnahme der Cyanidkonzentration. Nach Versuchsende fanden sich etwa 50% der applizierten Radioaktivität in den Natronlauge–Fallen, was auf eine enorme Ausgasung aus den Blättern hindeutete. In Blättern und Wurzeln wurden in etwa gleiche Anteile Radioaktivität ermittelt, was auf eine stetige Translokation der Radioaktivität von den Wurzeln in die Blätter hindeutete.

In den Versuchen im Feldmaßstab in der AMOVA wurde eine höhere Toleranz und beschleunigte Abbauleistung ermittelt. Nachdem die Versuchsbedingungen etabliert waren, zeigten die Pflanzen selbst bei Cyanidkonzentrationen von ca. 14 mg CN L^{-1} keinerlei Symptome, die auf eine toxische Reaktion hingewiesen hätten. Es wurde eine maximale Klärleistung durch *E. crassipes* von $50 \text{ g Natriumcyanid}$ in ca. 70 h erzielt, wobei die maximale Konzentration der Applikationslösung 470 mg CN L^{-1} betrug. Dies entsprach einer auf die Biomasse bezogenen Abbauleistung von $9 \text{ mg CN kg}^{-1}\text{h}^{-1}$. Auch die Klärleistung kupferhaltigen Abwassers bei Anwesenheit von Cyanid verlief innerhalb von $24\text{--}48 \text{ h}$. Um die Adaption des Gesamtsystems im Versuchszeitraum an Blausäure zu überprüfen, wurden die Resultate im Labor und ein Jahr später in der AMOVA überprüft. Pflanzen aus der AMOVA, die wiederholt mit Cyanid in Kontakt standen, zeigten auch in Laborversuchen eine enorme Steigerung der Cyanidabbauleistung. Sie verminderten den Cyanidgehalt der Lösung mit ca. achtfacher Geschwindigkeit als die Pflanzen aus dem Gewächshaus. Als im Folgejahr in der AMOVA erneut Cyanid ohne Adaptionsphase appliziert wurde, konnte die enorme Abbauleistung vom Vorjahr nicht wiederholt werden. Es stellten sich höhere Konzentrationen ein, die nur langsam reduziert wurden. Außerdem starben bis zu 70% der Pflanzen im System ab. Es kann demnach als sicher angesehen werden, dass Adaptionsprozesse der Mikroflora oder der Pflanzen selbst eine bedeutende Rolle bei der Klärung cyanidhaltiger Abwässer durch *E. crassipes* spielen.

6. Literatur

- Abel, P.D., Garner, S.M., 1986. Comparison of median survival times and median lethal exposure times for *Gammarus pulex* exposed to cadmium permethrin and cyanide. *Water Res.* 20, 579–582.
- Adams, M.D., Johns, M.W., Dew, D.W., 1999. Recovery of gold from ores and environmental aspects. In: *Progress in chemistry, biochemistry and technology*. Wiley, New York, 66–104.
- Akcil, A., Mudder, T., 2003. Microbial destruction of cyanide wastes in gold mining: Process review. *Biotechnol. Letters* 25, 445–450.
- Al Rmalli, S.W., Harrington, C.F., Ayub, M., Haris, P.I., 2005. A biomaterial based approach for arsenic removal from water. *Environ. Monit.* 7, 279–282.
- Alabaster, J.S., Shurben, D.G., Mallett, M.J., 1983. The acute lethal toxicity of mixtures of cyanide and ammonia to smolts of salmon. *Salmo salar* at low concentrations of dissolved oxygen. *Fish Biol.* 22, 215–222.
- Alberswerth, D., Carlson, C., Horning, J., Elderkin, S., Mattox, S., 1989. Poisoned profits: Cyanide heap leaching mining and its impacts on the environment. National Wildlife Federation, Vienna, VA.
- Albury, M.S., Affourtit, C., Moore, A.L., 1998. A highly conserved glutamate residue (Glu-270) is essential for plant alternative oxidase activity. *Biol. Chem.* 273, 30301–30305.
- Aldridge, W.N., 1944. A new method for the estimation of micro quantities of cyanide and thiocyanate. *Analyst* 69, 262–265.
- Alsii, B.A., Fuller, W.H., 1976. The mobility of three cyanide forms in soils. In: W.H. Fuller (ed.), *Residual management by land disposal*. Proceedings of the hazardous waste research. Symposium, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, 213.
- Ayade, B.B., 1998. Development of toxicity tolerant water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) for effective treatment of raw sewage. *Acta Biotechnol* 18, 43–50.
- Babu, G.R.V., Vijaya, O.K., Ross, V.L., Wolfram, J.H., Chapatwala, 1996. Cell-free extract(s) of *Pseudomonas putida* catalyzes the conversion of cyanides, cyanates, thiocyanates, formamide, and cyanide-containing mine waters into ammonia. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 273–277.
- Balasoorya, I., Paulraj, P.J., Abeygunewardena, S.I., Nanayakkara, C., 1983. The biology of water hyacinth: Physico chemical properties of the water supporting *Eichhornia crassipes*. *Proc. of int. Conf. of water hyacinth*. Nairobi. Thyagarajan G. (ed.), UNEP, 318–333.

- Ball, W.J., Nordstrom, D.K., 1991. User's manual for WATEQ4F, with revised thermodynamic data base and test cases for calculating speciation of major, trace, and redox elements in natural waters., Menlo Park / California, U.S. Geological Survey, –189.
- Barclay, M., Hart, A., Knowles, C.J., Meeussen, J.C.L., Tett, V.A., 1998a. Biodegradation of metal cyanides by mixed and pure cultures of fungi. *Enz. Microb. Techn.* 22, 223–231.
- Barclay, M., Tett, V.A., Knowles, C.J., 1998b. Metabolism and enzymology of cyanide/metallo cyanide biodegradation by *Fusarium solani* under neutral and acidic conditions. *Enz. Microb. Tech.* 23, 321–330.
- Barrett, S.C.H., Forno, I.W., 1982. Style morphe distribution in new world populations of *Eichhornia crassipes*. *Aquatic bot.* 13, 299–306.
- Berg, A., 1961. Role ecologique des eaux de la cuvette Congolaise sur le Croissance de la jacinthe d'eau (*Eichhornia crassipes*). *Acad. Royale d'Sci. d'Outre Mer. Cl. Sci. Nat. et Med. Mem. Nouv., Ser. XII, fasc. 3*, 1–119.
- Beyer, W., 1964. Die Erfassung von Grundwasserfließvorgängen mittels Farbstoffen in Verbindung mit Pumpversuchen. *Angew. Geol.* 10, 295–301.
- Beyer, W., 1969. Zur Bestimmung des entwässerbaren Porenanteils der Grundwasserleiter. *Wasserwirtschaft–Wassertechnik* 19, 57–60.
- Blumenthal, S., Hendrickson, H.R., Abrol, Y.P., Conn, E.E., 1968. Cyanide metabolism in higher plants. III: The biosynthesis of β -Cyanoalanin. *Biol. Chem.* 243, 5302–5307.
- Blumenthal–Goldschmidt, S., Butler, G.W., Conn, E.E., 1963. Incorporation of hydrocyanic acid labeled with carbon–14 into asparagine in seedlings. *Nature* 197, 718–719.
- Brehm, J., Meyering, F., 1983. *Fließgewässerkunde*, Biologische Arbeitsbücher 36. Quelle & Meyer.
- Bushey, J.T., Dzombak, D.A., 2004. Ferrocyanide adsorption on aluminium oxides. *Colloid Interface*, 272, 46–51.
- Bushey, J.T., Ebbs, S.D., Dzombak, D.A., 2004. Plant tissue extraction of complexed and free cyanide. *Water Air Soil Poll.* 157, 281–293.
- Castric, P.A., Farnden, K.J., Conn, E.E., 1972. Cyanide metabolism in higher plants. V. The formation of asparagine from β -cyanoalanine. *Arch. Biochem. Biophys.* 152, 62–69.
- Castric, P.A., Strobel, G.A., 1969. Cyanide metabolism by *Bacillus megaterium*. *Biol. Chem.* 244, 4089–4094.
- Center, T.D., 1994. Biological control of weeds: Waterhyacinth and water lettuce. In: Rosen, D., Bennet, F.D., Capinera, J.L. (eds.), *Pest management in the subtropics: Biological control a Florida perspective*. Intercep Publishing Company, Andover, UK, 481–452.

- Center, T.D., Dray, F.A., Jubinsky, G.P., Grodowitz, M.J., 1999. Biological control of water hyacinth under conditions of maintenance management: Can herbicides and insects be integrated? *Environ. Management* 23, 241–256.
- Cherryholmes, K.L., Cornils, W.J., McDonald, D.B., Splinter, R.C., 1985. Biological degradation of iron cyanides in natural aquatic system. In: Cardwell, R.D., Purdyand, R., Bahner, R.C. (eds.). *Aquatic toxicology and hazard assessment*, 7th Symposium ASTM STP 854, American Society for Testing Materials, Philadelphia, PA, 502.
- Christensen, T.H., Bjerg, P.L., Banwart, S.A., Jakobsen, Heron, G., Albrechtsen, H.J., 2000. Characterization of redox conditions in groundwater contaminant plumes. *Plant Contam. Hydrol.* 45, 165–241.
- Cleary, D., 1990. *Anatomy of the Amazon gold rush*, Iowa City, University of Iowa press.
- Clysters, H., Adams, F., 1976. Potentiometric determination with the silver sulfide membrane electrode. *Analitica Chimica Acta* 83, 27–38.
- Courpron, C., 1967. Détermination des constantes de stabilité des complexes organo métalliques des sols.— *Ann. Agron.* 18, 623–638.
- Da Rosa, C.D., Lyon, J.S. (eds.), 1997. *Golden dreams poisoned streams*. Mineral Policy Center, Washington, DC.
- Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D., 1986. *Molecular cell biology*. Scientific American Books, Inc., New York.
- Davis, S.M., Thompson, G.M., Bentley, H.W., Stiles, G., 1980. Groundwater tracers— a short review. *Groundwater* 18, 144–158.
- Dictor, M.C., Battaglia–Brunet, F., Morin, D., Bories, A., Clarens, M., 1997. Biological treatment of gold ore cyanidation wastewater in fixed bed reactors. *Environ. Pollut.* 97, 287–294.
- Ding, X., Jiang, J., Wang, Y., Wang, W., Ru, B., 1994. Bioconcentration of cadmium in water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in relation to thiol group content. *Environ. Pol.* 84 93–96.
- Dumestre, A., Chone, T., Portal, J.M., Gerard, M., Berthelin, J., 1997. Cyanide degradation under alkaline conditions by a strain of *Fusarium solani* isolated from contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2729.
- Ebbs, S., 2004. Biological degradation of cyanide compounds. *Curr. Opin. Biotechnol.* 15, 231–236.
- Ebbs, S., Bushey, J., Poston, S., Kosma, D., Samiotakis, M., Dzombak, D., 2003. Transport and metabolism of free cyanide and iron cyanide complexes by willow. *Plant Cell Environ.* 26, 1467–1478.

- Ecke, H., Bergman, A., Lagerkvist, A., 1993. Behandling av cyanidhaltigt avfall på upplagförstudie, FoUni90, Stiftelsen Reforsk, Malmö, Sweden.
- Eisler, R., 1991. Cyanide hazards to fish, wildlife and invertebrates: A synoptic review. Biolog. Rep. 85, U.S. Fish and wildlife service, Washington, DC.
- Eisler, R., 2000. Cyanide. In: Handbooks of chemical risk assessment: Health hazards to humans, plants, and animals. 2, Lewis, Boca Raton, FL, 903–959.
- Eisler, R., Wiemeyer, S.N., 2004. Cyanide hazards to plants and animals from gold mining and related water issues. Environ. Contam. Toxicol. 183, 21–54.
- El Zawahry, M.M., Kamel, M.M., 2004. Removal of azo and anthraquinone dyes from aqueous Solutions by *Eichhornia Crassipes*. Water Res. 38, 2967–2972.
- El-Gendy, A.S., Biswas, N., Bewtra, J.K., 2004. Growth of water hyacinth in municipal landfill leachate with different pH. Environ. Technol. 25, 833–840.
- EPA, 1973. Water quality criteria 1972. U.S. Environ. Prot. Agency Rep. R3–73–033, 594.
- EPA, 1980. Ambient water quality criteria for cyanides. Environ. Prot. Agency Rep. 440/5–80–037.
- Fallon, R.D., Cooper, D.A., Speece, R., Henson, M., 1991. Anaerobic biodegradation of cyanide under methanogenic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 57, 1656–1662.
- Figuera, M.M., Ciminelli, V.S.T., De Andrade, M.C., Linardi, V.R., 1996. Cyanide degradation by an *Echerichia coli* strain. Can. Microbiol. 42, 519–523.
- Floss, H.G., Hadwiger, L., Conn, E.E., 1965. Enzymatic formation of beta-cyanoalanine from cyanide. Nature 208, 1207–1208.
- Fowden, L., Bell, E.A., 1965. Cyanide metabolism by seedlings. Nature 206, 110–113.
- Galoyan, S. M., Tolosa, É. A., Goryachenkova, E. V., 1982. Role of cyanoalanine hydratase in asparagine synthesis in white lupine. Biokhimiya 47, 1949–1953.
- García-Guinea, J., Harff, M., 1998. Bolivian mining pollution: Past, present and future. Ambio 27, 251–253.
- Gasparrini, C., 1993. Gold and other precious metals. From ore to market. Springer, Berlin.
- Ghabbour, E.A., Davies, G., Lam, Y.Y., Vozzella, M.E., 2004. Metal binding by humic acids isolated from water hyacinth plants (*Eichhornia crassipes* [Mart.] Solm-Laubach: Pontedericeae) in the Nile Delta, Egypt. Environ. Poll. 131, 445–451.
- Giraldo, E., Garzón, A., 2002. The potential for water hyacinth to improve the quality of Bogotá river water in the Muña reservoir: comparison with the performance of waste stabilization ponds. Water Sci. Technol. 45, 103–110.
- Goedeking, A., 1994. Phosphatretenion in Helophytenfiltern – Ein Weg zur Oligotrophierung von Oberflächengewässern. Univ. Diss., Essen.

- Gopal, B., Sharma, K.P., 1981. Water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) most troublesome weed of the world. Hindasia Publications, New Delhi, India.
- Gopal, B., 1987. Water hyacinth. Elsevier, New York, 471.
- Gos, S., Ladwig, F., 1992. Process optimization for the detoxification of cyanide with per-oxygen compounds. Randol Gold Forum, 405–409.
- Gosh, R.S., Dzombak, D.A., Luthy, R.G., 1999. Equilibrium precipitation and dissolution of iron cyanide solids in water. Env. Eng. Sci. 16, 293–311.
- Gosh, R.S., Nakles, D.V., Murarka, I.P., Neuhauser, E.F., 2004. Cyanide speciation in soil and groundwater at manufactured gas plant (MGP) sites. Environ. Eng. Sci. 21, 752–767.
- Granato, M., 1993. Cyanide degradation by water hyacinths *Eichhornia crassipes*. Biotechnol. Let. 15, 1085–1090.
- Granvogl, M., Jezussek, M., Koehler, P., Schieberle, P., 2004. Quantification of 3-aminopropionamide in potatoes a minor but potent precursor in acrylamide formation. Agric. Food Chem., 52, 4751–4757.
- Greer, J., 1993. The price of gold: Environmental costs of the new gold rush. Ecologist 23, 91–96.
- Grigorjeva, N. V., Kondratjeva, T. F., Savari, E. E., Sedelnikova, G. V., Karavaiko, G. I., 2001. Biotechnological neutralization of cyanides and thiocyanates in cyanidation tails of gold ores and concentrates. Process Metallurgy 11, 381–389.
- Guilloton, M., Espie, G.S., Anderson, P.M., 2002. What is the role of cyanase in plants? Rev. Plant. Biochem. Technol. 1, 57–79.
- Gurbuz, F., Ciftci, H., Akcil, A., Gul, Karahan, A.G., 2004. Microbial detoxification of cyanide solutions: a new biotechnological approach using algae. Hydrometallurgy 72, 167–176.
- Haider, S.Z., Malik, K.M., Rahman, M.M., Ali, M.A., 1983. Pollution control by water hyacinth. Thyjagarajan, G. (Ed.), Proceedings of the international conference on Water hyacinth, Hyderabad, India, 627–634.
- Hatzfeld, Y., Maruyama, A., Schmidt, A., Noji, M., Ishizawa, K., Saito, K., 2000. β -Cyanoalanine synthase is a mitochondrial cysteine synthase-like protein in spinach and *Arabidopsis*. Plant Physiol. 123, 1163–1171.
- Heale, E.L., Ormrod, D.P., 1982. Copper toxicity and accumulation by willow trees. Can. Bot. 60, 2674.
- Henny, C.J., Hallock, R.J., Hill, E.F., 1994. Cyanide and migratory birds at gold mines in Nevada., USA. Ecotoxicology 3, 45–58.

- Hiskey, J.B. (ed.), 1984. Au & Ag heap and dump leaching practice. Proceedings, Meeting of the society of mining engineers, Salt Lake City, UT, Guinn, Hoboken.
- Imaoka, T., Teranishi, S., 1988. Rates of nutrient uptake and growth of the water hyacinth *Eichhornia crassipes*. Wat. Res. 22, 943–951.
- ISO 6703–1, 1984. Water quality Determination of cyanide Part 1: Determination of total cyanide.
- Jahn, M.K., Haderlein, S.B., Meckenstock, R.U., 2006. Reduction of prussian blue by the two iron-reducing microorganisms *Geobacter metallireducens* and *Shewanella alga*. Environ. Microbiol. 8, 362–367.
- Jayaweera, M.W., Kasturiarachchi, J.C., 2004. Removal of nitrogen from industrial wastewaters by phytoremediation using water hyacinth. Water Sci. Technol. 50, 217–225.
- Johnson, C.A., Leinz, R.W., Grimes, D.J., Rye, R.O., 2002. Photochemical changes in cyanide speciation in drainage from a precious metal ore heap. Environ. Sci. Technol. 36, 840–845.
- Julien, M.H., Harley, K.L.S., Wright, A.D., Cilliers, C., Morris, M., Center, T., Cofrancesco, A., 1996. International cooperation and linkages in the management of water hyacinth with emphasis on biological control. 273–282, Moranand, V.C., Hoffman, J.H. (eds.), Proceedings of the IX International Symposium on Biological Control of Weeds, Stellenbosch. University of Capetown, Capetown, South Africa.
- Kadirvelu, K., Kanmani, P., Senthilkumar, P., Subburam, V., 2004. Separation of mercury (II) from aqueous solution by adsorption onto an activated carbon prepared from *Eichhornia crassipes*. Adsorp. Sci. Technol. 22, 207–222.
- Kaiser, J., Madhavendra, S.S., Jamil, M.Z., Rao, P.V.R., 1987. Studies on water hyacinth as a biological filter for treating contaminants from agricultural wastes and industrial effluents. Environ. Sci. Health 22, 103–112.
- Kang, S.M., Kim, D.J., 1993. Degradation of cyanide by a bacterial mixture composed of new types of cyanide-degrading bacteria. Biotechnology Letters, 15, 201–206.
- Karlson, P., 1988. Lehrbuch der Biochemie. Thieme, Stuttgart, 163–165.
- Karmarkar, S.V., 2002. Anion-exchange chromatography of metal cyanide complexes with gradient separation and direct UV detection. Chromatogr. A. 956, 229–235.
- Kelley, C., Curtis, A.J., Uno, J.K., Berman, C.L., 2000. Spectroscopic studies of the interaction of Eu(III) with the roots of water hyacinth. Water Air Soil Pol. 119, 171–176.

- Khan, J.K., Kuo, Y.H., Kebede, N., Lambein, F., 1994. Determination of non-protein amino acids and toxins in *Lathyrus* by HPLC with precolumn phenyl isothiocyanate derivatisation. *Chromatograph. A*, 687, 113–119.
- Kjeldsen, P., 1999. Behaviour of Cyanides in soil and groundwater: A review. *Water Air Soil Poll.* 115, 279–307.
- Knowles, C.J., 1976. Microorganisms and cyanide. *Bacteriol. Rev.* 40, 652.
- Koenig, R., 2000. Wildlife deaths are a grim wake-up call in Eastern Europe. *Science* 287, 1737–1738.
- Korte, F., Coulston, F., 1998. Some considerations on the impact of the ecological chemical principles in practice with emphasises on gold mining and cyanide. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41, 119–129.
- Korte, F., Spiteller, M., Coulston, F. 2000. The cyanide leaching gold recovery process is a nonsustainable technology with unacceptable impacts on ecosystems and humans: the disaster in Romania. *Ecotox. Environ. Safet.* 46, 241–245.
- Kovacs, T.G., Leduc, G., 1982. Acute toxicity to cyanide to rainbow trout acclimated at different temperatures. *Can. Fish Aquat. Sci.* 39, 1426–142.
- Kroschwitz, J.I., Howe-Grant, M., Kirk, R.E., Othmer, D.F., 1993. *Encyclopedia of chemical technology 7: Composite materials to detergency*. John Wiley & Sons, New York, USA.
- Kuhn, D.D. und Young, T.C. 2005. Photolytic degradation of hexacyanoferrate (II) in aqueous media: The determination of the degradation kinetics. *Chemosphere* 60, 1222–1230.
- Kunz, D.A., Chen, J.L., Pan, G., 2001. Evidence that bacterial cyanide oxygenase is a pterin dependent hydroxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64, 4452–4459.
- Kwon, H.K., Woo, S. H., Park, J.M., 2002. Degradation of tetracyanonickelate (II) by *Cryptococcus humicola* MCN2. *Microbiol. Lett.* 214, 211–216.
- Lagas, P., Loch, J.P.G., Harmsen, K., 1982. The behavior of cyanide in a landfill and the soil beneath. In: *Effects of waste disposal on groundwater and surface water, Proceedings of the Exter Symposium, IAHS Publ. 139*, IAHS Press, Washington, D.C., 169.
- Larsen, M., Trapp, S., Pirandello, A., 2004. Removal of cyanide by woody plants. *Chemosphere* 54, 325–333.
- Larsen, M., Ucisik, A., Trapp, S., 2005. Uptake, metabolism, accumulation and toxicity of cyanide in willow trees. *Environ. Sci. Technol.* 39, 2135–2142.
- Larsen, M., Trapp, S., 2006. Uptake of iron cyanide into willow trees. *Environ. Sci. Technol.* 40, 1956–1961.

- Leduc, G., Pierce, R.C., McCracken, I.R., 1982. The effects of cyanides on aquatic organism with emphasis upon freshwater fishes. Natl. Res. Counc. Canada Publ. NRCC 19426, 139.
- Leduc, G., 1984. Cyanides in water: toxicological significance. In: Weber, L.J., (ed.) Aquatic toxicology, 2 Raven Press, New York.
- Lee, T.A., Hardy, J.K., 1987. Copper uptake by the water hyacinth. Environ. Sci. Health A 22, 141–160.
- LeFevre, P.G., 1961. Sugar transport in the red blood cell: structure–activity relationships in substrates antagonists. Pharmacol. Rev. 13, 39–70.
- Low, K.S., Lee, C.K., 1981. Cyanide uptake by water hyacinths *Eichhornia crassipes*. Per-tanika 42, 122–128.
- Low, K.S., Lee, C.K., Tai, C.H., 1994. Biosorption of copper by water hyacinth roots. Envi-ron. Sci. Health 29, 171–188.
- Maine, M.A., Duarte, M.V., Sune, N.L., 2001. Cadmium uptake by floating macrophytes. Wat. Res. 35, 2629–2634.
- Manning, K., 1988. Detoxification of cyanide by plants and hormone action. In: Ciba Founda-tion, Cyanide compounds in biology, John Wiley & Sons, Chichester, UK., 92–110.
- Marrs, T.C., Ballantyne, B., 1987. Clinical and experimental toxicology of cyanides: An overview. In: Ballantyne, B., Marrs, T.C. (eds.). Clinical and experimental toxicology of cyanides. Wright, Bristol, UK, 473–495.
- Martin, A.J., Jambor, J.L., Pedersen, T.F., Crusius, J., 2003. Post–depositional behaviour of Cu in a metal–mining polishing pond (East Lake, Canada). Environ Sci Technol. 37, 4925–4933.
- Martinelli, L.A., Ferreira, J. R., Forsberg, B.R., Vitoria, R.L., 1988. Mercury contamination on Amazon: a gold rush consequence. Ambio 17, 252–254.
- Maruyama, A., Saito, K., Ishizawa, K., 2001. Beta–cyanoalanine synthase and cysteine syn-thase from potato: molecular cloning, biochemical characterization, and spatial and hormonal regulation. Plant Mol. Biol. 46, 749–760.
- Meeuse, B.J.D., 1975. Thermogenic respiration in aroids. Annu. Rev. Plant Physiol. 26, 117–126.
- Meeussen, J.C.L., Keizer, M.G., Van Reimsdijk, W.H., DeHaan, V., 1990. The solubility of iron–cyanide in soils. In: Arendt, F., Hinsenveld, M., van den Brink, W. J (eds.), Con-taminated soil 90, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL, 367.

- Meeussen, J.C.L., Keizer, M.G., DeHaan, V., 1992. Chemical Stability and Decomposition rate of iron cyanide complexes in soil solutions. *Environ. Sci. Technol.* 26, 511–516.
- Meeussen, J.C.L., Keizer, M.G., Van Reimsdijk, W.H., DeHaan, F.M., 1994. Solubility of cyanide in contaminated soils. *J. Environ. Qual.* 23, 785–792.
- Meeussen, J.C.L., Van Riemsdijk, W.H., Van der Zee, S.E.A.T.M., 1995. Transport of complexed cyanides in soil. *Geoderma* 67, 73–85.
- Misbahuddin, M.I.R., Fariduddin, A.T.M., 2002. Water hyacinth removes arsenic from arsenic-contaminated drinking water. *Arch. Environ. Health* 57, 516–518.
- Molisani, M.M., Rocha, R., Machado, W., Barreto, R.C., Lacerda, L.D., 2006. Mercury contents in aquatic macrophytes from two reservoirs in the Paraíba do Sul: Guandú river systems, se Brazil. *Braz. Biol.* 66, 101–107.
- Møller, I. M., 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 561–591.
- Mosher, J.B., Figueroa, L., 1996. Biological oxidation of cyanide: A viable treatment option for the mineral processing industry. *Miner Eng.* 9, 573–581.
- Mudder, T., Botz, M., 2001. A guide to cyanide. *Min. Env. Man.* 9, 8.
- Nauter, G.C.C., Figueira, M.M., Linardi, V.R., 1998. Degradation of cyano-metal complexes and nitriles by an *Escherichia coli* strain. *Revista de Microbiologia* 29, 12–16.
- Nielsen, P., Dresow, B., Fischer, R., Heinrich, H.C., 1990. Bioavailability of iron and cyanide from oral potassium ferric hexacyanoferrate(II) in humans. *Arch. Toxicol.* 64, 420–422.
- Noel, D.N., Fuerstenau, M.C., Hendrix, J.L., 1991. Degradation of cyanide utilizing facultative anaerobic bacteria. In: Smith, R.W., Misra, M. (eds.), *Mineral bioprocessing*, The Mineral, Metals and Materials Society, 355–366.
- Nor, Y.M., Cheng, H.H., 1986. Chemical speciation and bioavailability of copper: Uptake and accumulation by *Eichhornia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 5, 941–947.
- Nor, Y.M., 1994. Phenol removal by *Eichhornia crassipes* in the presence of trace metals. *Wat. Res.* 28, 1161–66.
- Nowakowska, M., Burke, N.A., Guillet, J.E., 1999. Photocatalytic oxidation of cyanide in aqueous solutions of poly(sodium styrenesulfonate-co-2-vinylnaphthalene). *Chemosphere* 39, 2249–58.
- Osswald, S., Wajant, H., Effenberger, F., 2002. Characterization and synthetic applications of recombinant AtNIT1. *Europ. J. Biochem.* 269, 680–687.
- Otto, M., 1993. Chronische Kupferintoxikationen durch Trinkwasser: Eine Analyse der Toxikologie und Physiologie mit Bestimmung des Grenzwertes für chronische Kupferintoxi-

- kationen unter Berücksichtigung von speziellen Risikogruppen. VWB – Verlag für Wissenschaft und Bildung, Berlin.
- Ozols, J., 1990. Amino acid analysis. *Methods Enzymol.* 182, 587.
- Parija, P., 1934. Physiological investigations on water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in Orissa with notes of some other aquatic weeds. *Indian J. Agric. Sci.* 4, 399–429.
- Pauly, U., 1989. Vergleich unterschiedlicher Markierungsstoffe bei der Ermittlung der Verweildauer in Wurzelraumkläranlagen. *Wasser Boden* 11, 687–690.
- Peiser, G.D., Wang, T.T., Hoffman, N.E., Yang, S.F., Liu, H.W., Walsh, C.T., 1984. Formation of cyanide from carbon 1 of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid during its conversion to ethylene. *Biochemistry* 81, 3059–3063.
- Penfound, W.T., Earle, T.T., 1948. The biology of water hyacinth. *Ecological Monographs* 18, 447–472.
- Petrucio, M.M., Esteves, F.A., 2000. Uptake rates of nitrogen and phosphorus in the water by *Eichhornia crassipes* and *Salvinia auriculata*. *Rev. Brazil Biol.* 60, 229–236.
- Peverly, J.H., Surface, J.M., Wang, T., 1995. Growth and trace metal absorption by *Phragmites australis* in wetlands constructed for landfill leachate treatment. *Ecol. Eng.* 5, 21–35.
- Piotrowski, M., Schönfelder, S., Weiler, E.W., 2001. The *Arabidopsis thaliana* isogene NIT4 and its orthologs in tobacco encode beta-cyano-L-alanine hydratase/nitrilase. *J. Biol. Chem.* 276, 2616–2621.
- Pschyrembel, klinisches Wörterbuch, CD ROM, 2004. de Gruyter, Berlin–New York.
- Rai, S., Hasan, S.H., Joshi, V.C., Narayana Swami, M.S., Rupainwar, D.C., 1993. Removal of copper(II) from simulated water by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Ind. Environ. Health* 35, 178–184.
- Rashwan, W.E., Girgis, B.S., 2004. Adsorption capacities of activated carbons derived from rice straw and water hyacinth in the removal of organic pollutants from water. *Adsorp Sci. Technol.* 22, 181–194.
- Reddy, K.R., Bagnall, L.O., 1981. Biomass production of aquatic plants used in agricultural drainage water treatment. *Int. Gas Res. Conf. Proc. Govt. Inst.*, Rockville, MD, 668–681.
- Reddy, K.R., Tucker, J.C., 1983. Productivity and nutrient uptake of water hyacinth, *Eichhornia crassipes* I. effect of nitrogen source. *Econ. Bot.* 37, 237–247.
- Rennert, T., Mansfeldt, T., 2001. Sorption of iron–cyanide complexes on goethite. *Europ. Soil Sci.* 52, 121–128.

- Rennert, T., Mansfeldt, T., 2002. Sorption and transport of iron–cyanide complexes in uncontaminated soil– investigated in column experiments. *Soil Sci.* 167, 504–512.
- Rennert, T., Mansfeldt, T., 2002b Sorption and desorption of iron–cyanide complexes in deposited blast furnace sludge. *Water Res.* 36, 4877–83.
- Rennert, T., Pohlmeier, A., Mansfeldt, T., 2005. Oxidation of ferrocyanide by birnessite. *Environ. Sci. Technol.* 39, 821–825.
- Rennert T, Mansfeldt, T., 2006. Release of trace metals, sulfate and complexed cyanide from soils contaminated with gas–purifier wastes: a microcosm study. *Environ Pollut.* 139, 86–94.
- Ressler, C., Giza, Y.H., Nigam, S.N., 1969b. Beta–cyanoalanine, product of cyanide fixation and intermediate in asparagine biosynthesis in certain species of *Lathyrus* and *Vicia*. *Am. Chem. Soc.* 91, 2766–2775.
- Ressler, C., Nigam, S.N., Giza, Y.H., 1969a. Toxic principle in vetch. Isolation and identification of gamma–L– glutamyl–L–beta–cyanoalanine from common vetch seeds. Distribution in some legumes. *J. Am. Chem. Soc.* 91, 2758–2765.
- Ripley, E.A., Redmann, R.E., Crowder, A.A., 1997. Environmental effects of mining. St. Lucie Press, Delray Beach, FL.
- Rogers, A.S., 1958. Physical behaviour and geological control of radon in mountain streams. *U.S. Geol. Sur. Bull.* 1052, 1232–45.
- Roy, S., Hanninen, O., 1994. Pentachlorophenol: Uptake / elimination kinetics and metabolism in an aquatic plant, *Eichhornia crassipes*. *Environ. Toxicol. Chem.* 13, 763–773.
- Rozan, P., Kuo, Y.H., Lambein, F., 2000. Free Amino acids present in commercially available seedlings sold for human consumption. A potential hazard for consumers. *Agric. Food Chem.* 48, 716–723.
- Rozan, P., Kuo, Y.H., Lambein, F., 2001. Amino acids in seeds and seedlings of the genus *Lens*. *Phytochemistry* 58, 281–289.
- Ryther, J.H., Williams, L.D., Hanisak, M.D., Stenberg, R.W., De Busk, T.A., 1978. Biomass production by some marine and freshwater plants. Shuster, W.W. (ed.), *Proc. Second fuels from biomass symp.*, Rensselaer Polytechnic Inst., Troy, NY 2, 978–989.
- Saito, K., Tatsuguchi, K., Takagi, Y., Murakoshi, I., 1994. Isolation and characterization of cDNA that encodes a putative mitochondrion–localizing isoform of cysteine synthase (O–acetylserine(thiol)–lyase) from *Spinacia oleracea*. *Biol. Chem.* 269, 28187–28192.
- Samiotakis, M., Ebbs, S.D., 2004. Possible evidence for the transport of an iron cyanide complex by plants. *Environ. Poll.* 127, 169–173.

- Satykala, G., Kaiser, J., 1993. Response of chloroplast-enzymes of *Eichhornia crassipes* to Cu and Cr. Ind. Bot. Cont. 10, 69–74.
- Schardt, J.D., Schmitz, D.C., 1991. 1990 Florida aquatic plant survey. Technical report 91–CGA. Florida Department of Natural Resources, Tallahassee, Florida, 89.
- Schmitz, D.C., Schardt, J.D., Leslie, A.J., Dray, F.A., Osborne, J.A, Nelson, B.V., 1993. The ecological impact and management history of three invasive alien aquatic plant species in Florida. In: McKnight, B.N. (ed.), Biological pollution. The control and impact of invasive exotic species. Indiana Academy of Science, Indianapolis, Indiana, 173–194.
- Schultz–Hock, R., Obermann, P., 1987. Offenlegungsschrift DE 360592 A1, Deutsches Patentamt: Vorrichtung zur Nitratabreicherung bei der Trinkwasseraufbereitung. Patentrechte Stadtwerke Viersen. Deutsches Gebrauchsmuster G8604996.
- Schultz–Hock, R., 1994. Schilf und Stroh als organische Kohlenstoffquelle für die biologische Denitrifizierung von Trinkwasser (Deniplant). Univ. Diss., Essen.
- Schweingruber, M., 1981. Assessment of Solubility and Speciation of U, Pu, Np, and Th. In: Natural groundwaters: Theory, thermodynamic data, and primary applications.– EIR Report No 449, Nagra Technical Report NTB–81–13, 114, Wuerenlingen/Switzerland.
- SGAB–Prodeminca, 2000. Plan maestro ambiente para el distrito minero Portovelo–Zaruma y la cuenca del río Puyango. Prodeminca, Ministerio de Energía y Minas, Quito, 83.
- Shawky, S., Geleel, M.A., Aly, A., 2005. Sorption of uranium by non-living water hyacinth roots. Radioanal. Nucl. Chem. 265, 81–84.
- Shekinah, P., Kadirvelu, K., Kanmani, P., Senthilkumar, P., Subburam, V., 2002. Adsorption of lead(II) from aqueous solution by activated carbon prepared from *Eichhornia*. Chem. Technol. Biotechnol. 77, 458–464.
- Shifrin, N.S., Beck, B.D., Gauthier, T.D., Chapnick, S.D., Goodman, G., 1996. Chemistry, toxicology, and human health risk of cyanide compounds in soils at former manufactured gas plant sites. Regul. Toxicol. Pharmacol. 23, 106–116.
- Silva–Avalos, J., Richmond, M. G., Nagappan, O., Kunz, D.A., 1990. Degradation of the metal–cyano complex tetracyanonickelate(II) by cyanide–utilizing bacterial isolates. Appl. Environ. Microbiol. 56, 3664–3670.
- Simons, B. H., Lambers, H., 1999. The alternative oxidase – is it a respiratory pathway allowing a plant to cope with stress? In: Plant responses to environmental stresses from phytohormone genome reorganization. Lerener, H.R., (eds.) Marcel Decker Inc., 265–268.
- Simovic, L., Snodgrass, W.J., 1985. Natural removal of cyanides in gold milling effluents–evaluation of removal kinetics. Water Pollut. Res. Can 20, 120–135.

- Sipaúba-Tavares, L.H., Fávero, E.G.P., Braga, F.M.S., 2002. Utilization of macrophyte biofilter in effluent from aquaculture: I. Floating plant. *Braz. J. Biol.*, 62, 713–723.
- Skubatz, H., Tang, W., Meeuse, B.J.D., 1993. Oscillatory heat-production in the male cones of cycads. *J. Exp. Bot.* 44, 489–492.
- Smith, A.D., 1987. *Mining America. The industry and the environment 1800–1980*, Lawrence, University Press of Kansas.
- Smith, A., Mudder, T., 1991. *The chemistry and treatment of cyanide wastes*. Mining Journal Books, London.
- Smith, L.L., Broderius, S.J., Oseid, D.M., Kimball, G.L., Koenst, W.M., 1978. Acute toxicity of hydrogen cyanide to freshwater fishes. *Arch. Environ. Contam. Toxikol.* 7, 325–337.
- So, L.M., Chu, L.M., Wong, P.K., 2003. Microbial enhancement of Cu^{2+} removal capacity of *Eichhornia crassipes* (Mart.). *Chemosphere* 52, 1499–1503.
- Soltan, M.E., Rashed, M.N., 2003. Laboratory study on the survival of water hyacinth under several conditions of heavy metal concentrations. *Adv. Environ. Res.* 7, 321–334.
- Stengel, E., 1985. Perspektiven der Nitrateliminierung in künstlichen Feuchtbiotopen. In: *Symposium Grundlagen und Praxis naturnaher Klärverfahren– 10 Jahre Othfresen*. Lehrstuhl für Ökochemie der Gesamthochschule Kassel, FB 20 Landwirtschaft.
- Stengel, E., 1991. Wasserreinigung mit Hilfe höherer grüner Pflanzen. DENIPLANT – Dank an Käthe Seidel (1907–1990). In: *DENIPLANT – ein naturnahes Wasseraufbereitungsverfahren*. R. Schindler (Hrsg.). *Berichte aus der ökologischen Forschung* 5, Forschungszentrum Jülich GmbH, 129–142.
- Stengel, E., 1993a. Species specific aeration of water by different vegetation types in constructed wetlands. In: *Constructed wetlands for water quality improvement*, G.A. Moshiri (ed.), CRC Press Inc., 427–434.
- Stengel, E., 1993b. *Interner wissenschaftlicher Ergebnisbericht 1993*. Jülich GmbH, 439–440.
- Symeonidis, L., Mc Neilly, T., Bradshaw, A.D., 1985. Heavy metal toxicity by different plant species. *New Phytol.* 101, 309.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2000. *Physiologie der Pflanzen*. Spektrum, Akademischer Verlag, Gustav Fischer, Heidelberg – Berlin.
- Tarras-Wahlberg, N.H., Flachier, A., Lane, S.N., Sangfors, O., 2001. Environmental impacts and metal exposure of aquatic ecosystems in rivers contaminated by small scale gold mining: the Puyango River basin, southern Ecuador. *Sci. Total Environ.* 278, 239–261.
- Teisseire, H., Couderchet, M., Vernet, G., 1999. Toxicity of diuron alone or in combination with folpet or copper on duckweed (*Lemna minor*). *Environ. Pollut.* 106, 39–45.

- Thompson, R.S., 1984. Measurement of the inhibition of amino acid uptake. A toxicity test using mussels (*Mytilus edulis*). In: Persoone, G., Jaspers, E., Claus, C. (eds.) Ecotoxicological testing for the marine environment. Proc. Int Symp. Ecotoxicol. Test. Mar. Environ., Ghent, Belgium.
- Ting, I.P., Zschoche, W.C., 1970. Asparagine biosynthesis by cotton roots – carbon dioxide fixation and cyanide incorporation. *Plant Physiol.* 45, 429–434.
- Towill, E.L., Drury, J.S., Whitfield, B.L., Lewis, E.B., Galyan, E.L., Hammons, A.S., 1978. Reviews of the environmental effects of pollutants: V. Cyanide. 600/1–78–027. USEPA, Washington, DC.
- Trapp, S., Koch, I., Christiansen, H., 2001a. Aufnahme von Cyanid in Pflanzen – Risiko oder Chance für die Phytoremediation. *UWSF* 13, 20–28.
- Trapp, S., Koch, I., Christiansen, H., 2001b. Experimente zum Verbleib von Cyanid nach Aufnahme in Pflanzen. *UWSF* 13, 29–237.
- Trapp, S., Zambrano, K.C., Kusk, K.O., Karlson, U., 2000. A phytotoxicity test using transpiration of willows. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 154–160.
- Trivedy, R.K., 1998. Water hyacinth based systems for waste treatment. In: Trivedy, R.K. (Ed.), *Advances in wastewater treatment technologies 1*, Global Science, Aligarh, 463–486.
- Trivedy, R.K., Pattanshetty, S.M., 2002. Treatment of dairy waste by using water hyacinth. *Water Sci. Technol.* 45, 329–334.
- Ultsch, G.R., Anthony, D.S., 1973. Role of aquatic exchange of carbon dioxide in the ecology of the water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). *Florida Sci.* 36, 16–22.
- UNEP/OCHA, 2000. Assessment mission–cyanide spill at Baia Mare. Report, United Nations Environment program/Office for the Co–ordination of Humanitarian Affairs, UNEP Regional Office Europe, Geneva, Switzerland.
http://www.reliefweb.int/ocha_ol/programs/response/unep/rombaiamare.html
- USEPA, 1992. Drinking Water Criteria Document for Cyanide. Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, OH.
- USEPA, 1997. Methods and guidance for analysis of water. CD–ROM version 1.0. EPA821–C–97–001.
- Vanlerberghe, G.C., McIntosh, L., 1997. Alternative oxidase: From gene to function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 703–734.
- Vasantis, A., Molnár–Perl, I., 1999. Temperature, eluent flow–rate and column effects on the retention and quantification properties of phenylthiocarbamyl derivatives of amino acids in reversed–phase HPLC. *Chromatograph. A*, 832, 109–123.

- Vetter, J., 2000. Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon* 38, 11–36.
- Volmer, J.J., 2005. Die Rolle von Nitrilase 4 im Cyanidstoffwechsel von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Univ. Diss., Bochum.
- Ware, G.C., Painter, H.A., 1955. Bacterial utilization of cyanide. *Nature* 175, 900.
- Warrilow, A.G.S., Hawkesford, M.J., 2000. Cysteine synthase (O-acetylserine (thiol) lyase) substrate specificities classify the mitochondrial isoform as a cyanoalanine synthase. *Exp. Bot.* 51, 985–993.
- Way, J.L., 1981. Pharmacologic aspects of cyanide and its antagonism. In: Vennesland, B., Conn, E.E., Knowles, C.J., Westley, J., Wissing, F. (eds.). *Cyanide in biology*. Academic Press, New York, 29–40.
- White, D.M., Schnabel, W., 1998. Treatment of cyanide waste in batch biofilm reactor. *Water Res.* 32, 254–257.
- Wiley, R.W., 1984. A review for sodium cyanide for use in sampling stream fishes. *North Am. Fish Manag.* 4, 249–256.
- Wilkes, B.D., Spence, J.M.B., 1995. Assessing the toxicity of surface waters downstream from a gold mine using a battery of bioassays. In: Westlake, G.F., Parrot, J.L., Niimi, A.J., (eds.) *Proceedings of the 21st annual aquatic toxicity workshop*. Sarnia, Ontario. Can. Rep. Fish Aquat. Sci. 2050, 38–44.
- Wissing, F., Hofmann, K., 2002. *Wasserreinigung mit Pflanzen*. Ulmer, Eugen, 220.
- Wolverton, B.C., McDonald, R.C. 1979. Water hyacinth productivity and harvesting study. *Econ. Bot* 33, 1–10.
- Wong, M.H., 1982. Metal cotolerance to copper, lead, and zinc in *Festuca rubra*. *Environ. Res.* 29, 42–47.
- Wriston, J.C., Jr., Yellin, T.O., 1973. L-Asparaginase: A review. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 39, 185–248.
- Wriston, J.C., 1985. Asparaginase. *Methods Enzymol.* 113, 608–618.
- Xia, H., Ma, X., 2006. Phytoremediation of ethion by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) from water. *Bioresour. Technol.* 97, 1050–1054.
- Xiong, Z.T., Geng, C.L.B., 2006. Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brassica pekinensis* Rupr. *Ecotoxicology Environ. Safety*, online first.
- Yamaguchi, Y., Nakamura, T., Kusano, T., Sano, H., 2000. Three *Arabidopsis* genes encoding proteins with differential activities for cysteine synthase and beta-cyanoalanine synthase. *Plant Cell Physiol.* 41, 465–476.
- Yang, S. F., Hoffman, N. E., 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35, 155–189.

- Yip, W.K., Yang, S.F., 1998. Ethylene biosynthesis in relation to cyanide metabolism. Bot. Bull. Acad. Sci. 39, 1–7.
- Young, J.E., 1993. Umweltproblem Bergbau: Strategien gegen die Ausbeutung der Erde. Wochenschau-Verlag, Schwalbach, Germany.
- Yount, J.L., Crossman, R., 1970. Eutrophication control by plant harvesting. J. Water Poll. Cont. Fed. 42, 173–183.
- Yu, X., Trapp, S., Zhou, P., Wang, C., Zhou, X., 2004. Metabolism of cyanide by chinese vegetation. Chemosphere 56, 121–126.
- Yu, X., Trapp, S., Zhou, P., 2005a. Phytotoxicity of cyanide to weeping willow trees. Environ. Sci. Pollut. Res. Int. 12, 109–13.
- Yu, X., Trapp, S., Zhou, P., Hu, S., 2005b. The effect of temperature on the rate of cyanide metabolism of two woody plants. Chemosphere 59, 1099–104.
- Yu, X., Zhou, P., Zhou, X., Liu, Y., 2005c. Cyanide Removal by Chinese Vegetation – Quantification of the Michaelis–Menten Kinetics. Environ. Sci. Polut. Res. 36, 1–6.
- Zaranyika, M.F., Ndapwadza, T., 1995. Uptake of Ni, Zn, Fe, Co, Cr, Pb, Cu and Cd by water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in Mukuvisi and Manyamerivers, Zimbabwe. Env. Sci. Health 30, 157–169.
- Zhang, J., Hendrix, J.L., 1991. Attenuation of Cyanide in Soils. In: Gaskell, D.R. (ed.), EDP Congress Proc. Symp. Annual Meeting, 677.

7. Anhang



Abbildung A1: *E. crassipes* am Becken-Eingang der AMOVA nach der ersten Applikation (V.1) am 18.07.2005. Der Pfeil markiert die Strecke, in der die Pflanzen deutlich geschädigt waren.



Abbildung A2: *E. crassipes* am Becken-Eingang der AMOVA nach der ersten Applikation (V.1) am 18.07.2005. Aufsicht.



Abbildung A3: *E. crassipes* in der AMOVA am 11.09.2006 vor Applikation von NaCN.



Abbildung A4: *E. crassipes* in der AMOVA am 15.09.2006 96 h nach Applikation von 28,3 g NaCN. Alle in dem Photo hellen Blätter waren deutlich chlorotisch. Die dunklen Bereiche waren vollständig abgestorben.

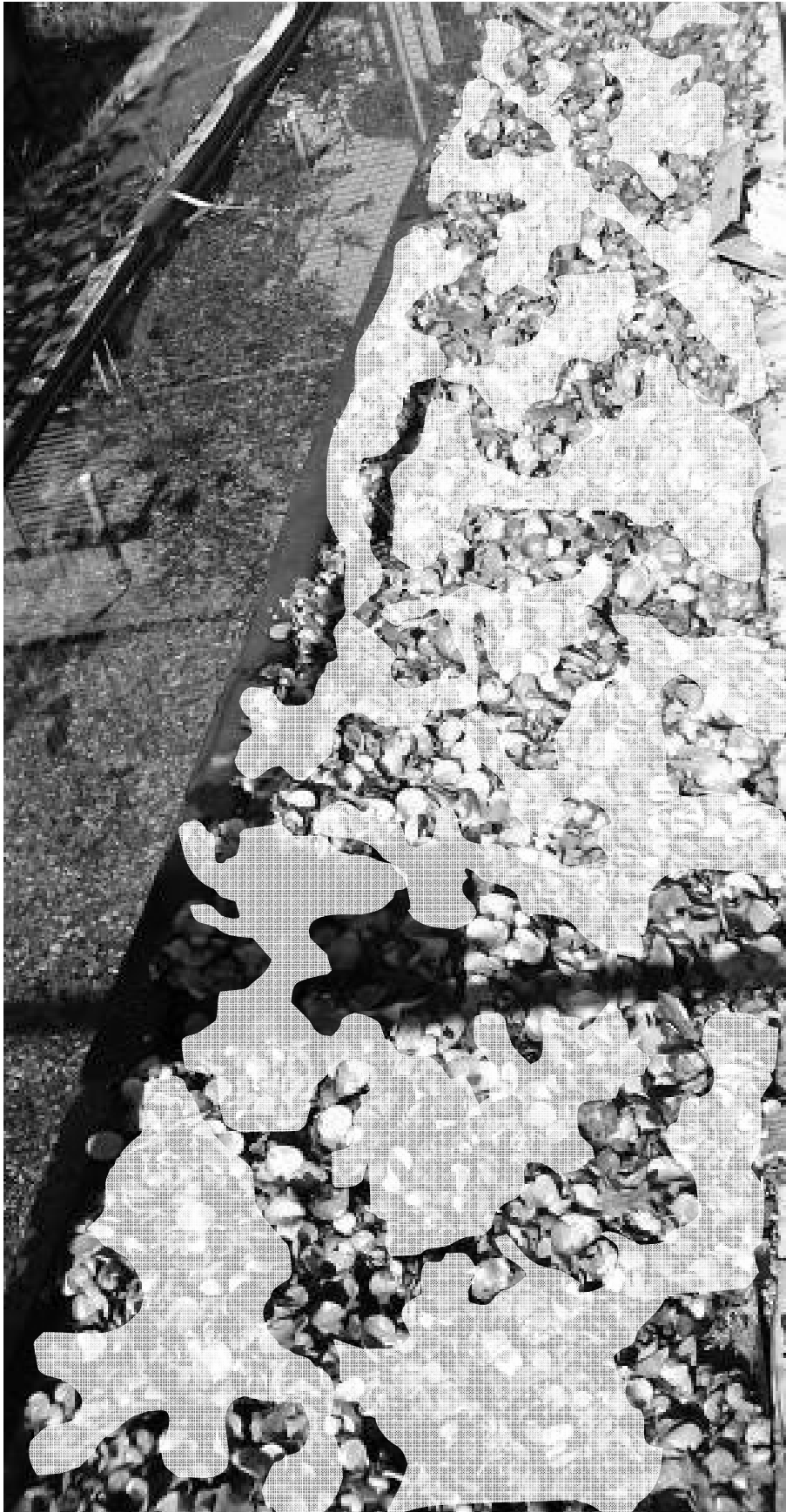


Abbildung A5: *E. crassipes* in der AMOVA am 15.09.2006 nach Applikation von 28,3 g NaCN. Die abgestorbenen Bereiche sind hell hervorgehoben.

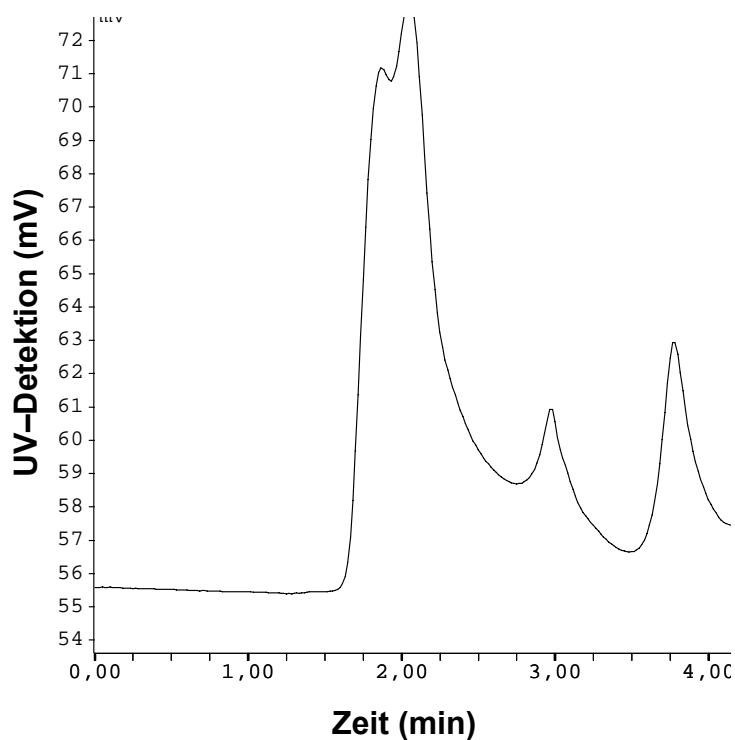


Abbildung A6: AI-HPLC-UV- Chromatogramme aus der AMOVA 16,5 h nach erster Kupfer-Applikation (vgl. Abb. 3.36; Das Cyanocuprat eluierte nach 3,8 min (vgl. Abb. A7) Einspritzvolumen: 100 μ L

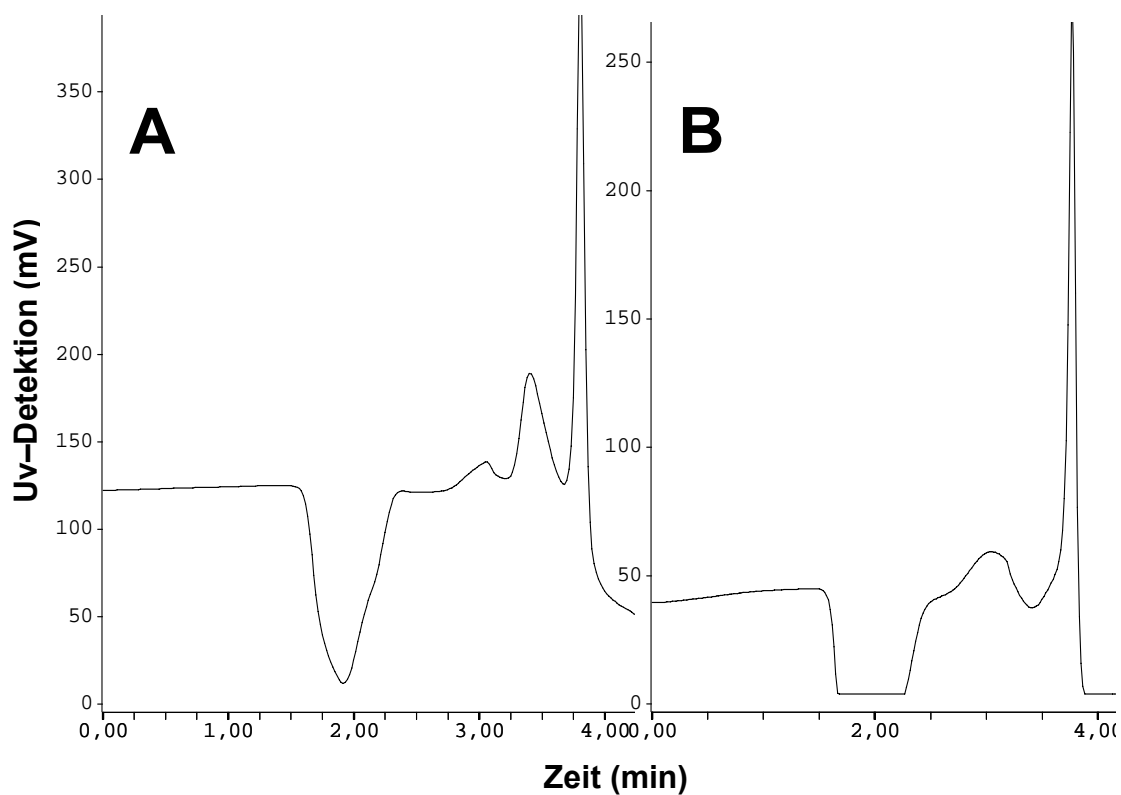


Abbildung A7: AI-HPLC-UV- Chromatogramme aus der AMOVA 19 h nach zweiter Kupfer-Applikation (vgl. Abb. 3.37; a) Kupfer-Cyanid-Signal aus Originalprobe; b) Kupfer-Cyanid-Signal aus Originalprobe mit internem 20 mg CN L⁻¹CuCN-Standard, 1:1 Verdünnung. Einspritzvolumen: 100 μ L

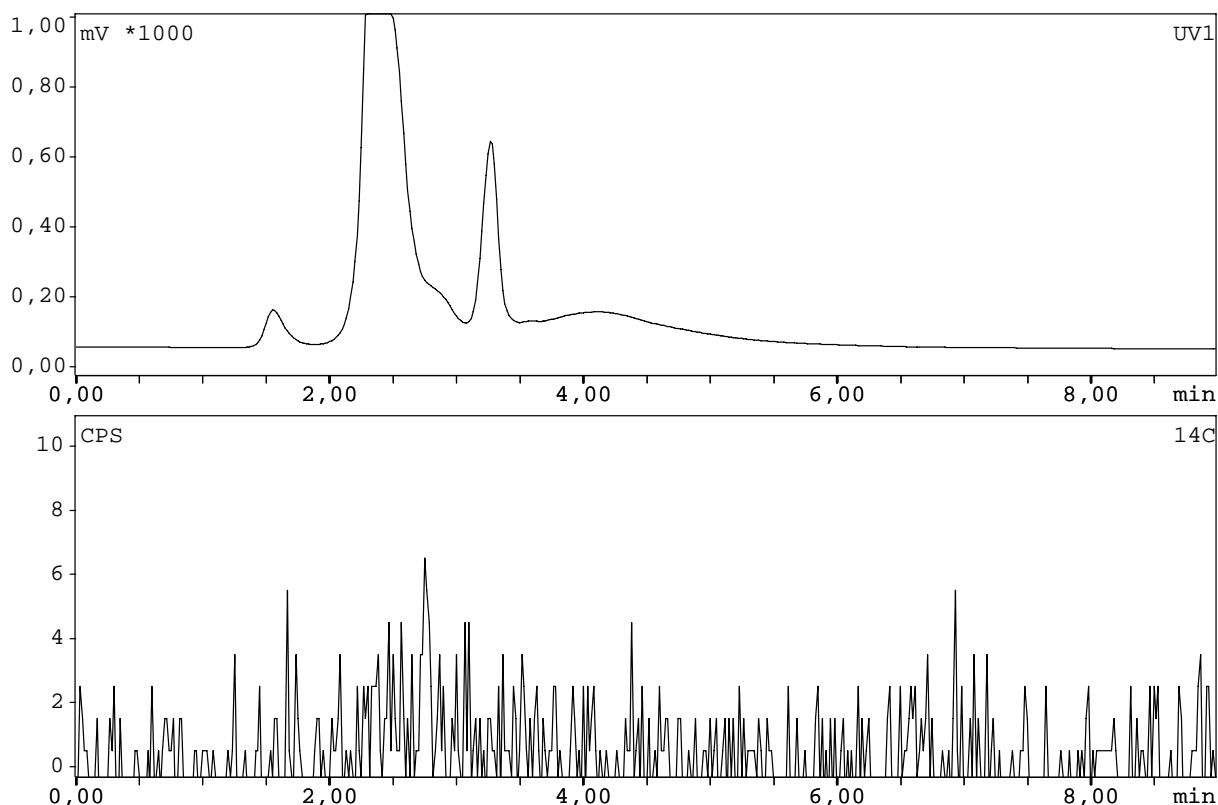


Abbildung A8: AI-HPLC-UV/ ^{14}C - Chromatogramme des Blattextraktes aus Inkubation von *E. crassipes* im Flow-through System; Einspritzvolumen: 100 μL (≈ 70 Bq); Es konnten keine Cyanid-Signale durch spezifische UV-Absorption bei 267, 284, und 315 nm oder Radiodetektion nach 4 min detektiert werden. in. Das obere Chromatogramm der Teile zeigt die UV-Detektion in mV, das untere die ^{14}C -Detektion in cps (counts per second) der Festkörperzintillationszählung.

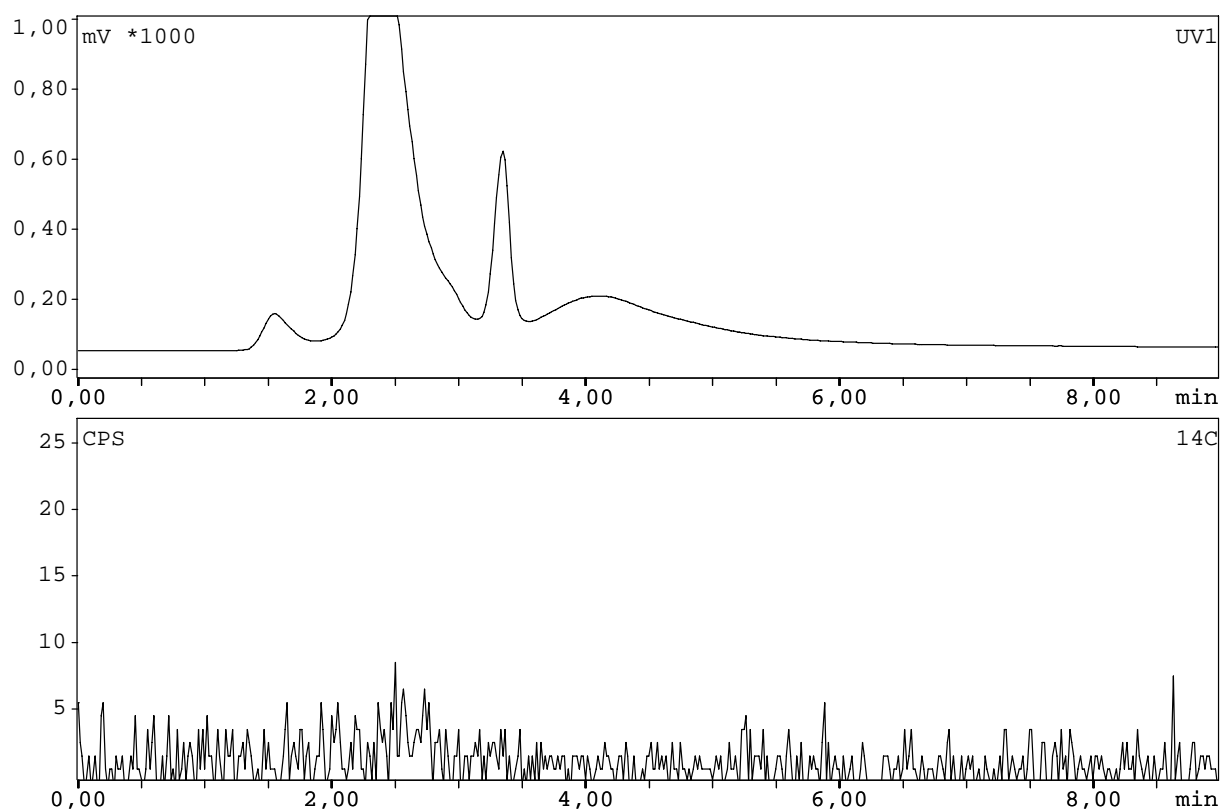


Abbildung A9: AI-HPLC-UV/¹⁴C- Chromatogramme des Wurzelextraktes aus Inkubation von *E. crassipes* im Flow-through System; Einspritzvolumen: 100 µL (≈70 Bq); Es konnten keine Cyanid-Signale durch spezifische UV-Absorption bei 267, 284, und 315 nm oder Radiodetektion nach 4 min detektiert werden. in. Das obere Chromatogramm der Teile zeigt die UV-Detektion in mV, das untere die ¹⁴C-Detektion in cps (counts per second) der Festkörperzintillationszählung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Mathias Ebel
Geburtstag	6. Mai 1976
Geburtsort	Arnsberg–Neheim
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch

Allgemeine Hochschulreife

1996	Graf Gottfried Gymnasium Arnsberg
------	-----------------------------------

Zivildienst

1996 – 1997	Häusliche Krankenpflege „Apo–Care“, Neheim–Hüsten
-------------	---

Studium der Biologie, Chemie und Erziehungswissenschaften an der RWTH Aachen

1997 – 2002	Grundstudium und Hauptstudium
03.2001 – 01.2002	Examensarbeit am Institut für Biologie V – Lehr– und Forschungsgebiet Umweltanalytik, Arbeitsgruppe terrestrische Ökologie. Thema: Klassifizierung und Charakterisierung der Oribatiden– und Gamasinenzönosen von Ackerrandstreifen in Abhängigkeit verschiedener Bodentypen und Bodenparameter
11.2002	1. Staatsexamen für Sek. I /II, Abschluss: Diplom–Gymnasiallehrer

Praktische Erfahrungen

1997 – 2007	Studentenbetreuung an der RWTH Aachen: Zoologische Bestimmungsübungen Anatomisch / morphologische Übungen Leitung von zoologisch / ökologischen Exkursionen Block-Praktikum: Ökotoxikologie und Ökochemie: Konzipierung und Leitung des Versuchsteils: „Schwermetalle und Makroschadstoffe in der Umwelt“ Seminar Umweltchemie, Ökologie und Ökotoxikologie Betreuung von zwei Diplomarbeiten, einem Forschungspraktikum und einer fachdidaktischen Staatsexamensarbeit
04.2001 – 06.2002	Betreuung von geistig Behinderten im Caritas Wohnheim für geistig Behinderte in Würselen
03.2002 – 05.2002	Studentische Hilfskraft am Lehrstuhl für Ökologie & Ökotoxikologie: Durchführung von limnologischen Kartierungen von Kleingewässern
05.2002 – 07.2002	Mitarbeit am UBA–Projekt: “The arthropods of grassy field margins (off crop) and the consequences for impact assessment of pesticides on terrestrial ecosystems”
05.2002 – 10.2002	Mitarbeit am BMBF–Projekt: Sicherheitsforschung und Monitoringmethoden zum Anbau von Bt–Mais: Teilprojekt: Effekte des Anbaus

	von Bt-Mais auf die epigäische und die Krautschichtfauna verschiedener trophischer Bezüge
03.2002 – 11.2003	Mittelakquisition für das Projekt Cyanid Phytoremediation in Zusammenarbeit mit Prof. Andreas Schäffer: DFG Antrag im Rahmen der dritten Bewilligungsphase des SFB 525: Stoffströme metallischer Rohstoffe Projektantrag beim japanischen Forschungsinstitut RITE (Research Institute of Innovative Technology for the Earth) Kooperationsinitiative mit der Firma Cyplus, Degussa Gruppe
2003	Einzelantrag im Normalverfahren bei der DFG, gefördert seit: 04.2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Umweltforschung der RWTH Aachen: Labortätigkeit, IT-Verwaltung
2004	Mitarbeit bei Projektinitiative mit der Industrie: Abbau von endokrin wirksamen Mikroschadstoffen im Tropfkörperverfahren
2006	Zusammenarbeit mit der Ingenieurgesellschaft Mull und Partner: Vegetationskundliche Aufnahme und Bewertung sowie umweltchemische Beratung bei der Begutachtung einer mit Cyanoferraten belasteten Altlast zur Entwicklung eines Monitoring-Programms und Ableitung von Sanierungsmaßnahmen

Promotion am Institut für Biologie V – Lehrstuhl für Umweltbiologie und –chemodynamik

seit 11.2003	im Rahmen des DFG Projektes 257264: „Untersuchung der Wetland-Phytoremediation zur Cyaniddetoxifikation.“ Kooperationen mit anderen Instituten und Forschungseinrichtungen;
bis 02.2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Umweltwissenschaften, Biologie 5 der RWTH Aachen
ab 01.02.2007	Referendar für das Lehramt an Gymnasien des Studienseminars Aachen

Veröffentlichungen

Zeitschriftenartikel:

- Evangelou, M.W.H., Kutschinski-Klöss, S., Ebel, M., Schaeffer, A. (2007). Potential of *Borago officinalis*, *Sinapis alba* L. and *Phacelia boratus* for phytoextraction of Cd and Pb from soil. *Water Air Soil Pollut.* (accepted)
- Evangelou, M.W.H., Bauer, U., Ebel, M., Schaeffer, A. (2007). The influence of EDDS and EDTA on the uptake of heavy metals of Cd and Cu from soil with tobacco *Nicotiana tabacum*. *Chemosphere* (in press)
- Ebel, M., Evangelou, M.W.H., Schaeffer, A. (2007). Cyanide phytoremediation by water hyacinths (*Eichhornia crassipes*). *Chemosphere* 66, 816-823
- Evangelou, M.W.H., Ebel, M., Schaeffer, A. (2006). Evaluation of the effect of small organic acids on phytoextraction of Cu and Pb from soil with tobacco *Nicotiana tabacum*. *Chemosphere* 63, 996–1004

Proceedings:

- Ebel, M., Evangelou, M.W.H., Schaeffer, A. (2006). Cyanide phytoremediation with water hyacinths (*Eichhornia crassipes*). 4. International Conference "Interfaces Against Pollution", June 4–7, 2006, Granada
- Evangelou, M.W.H., Ebel, M., Schaeffer, A. (2006). Chelate-assisted phytoextraction of Cu and Pb with the aid of organic acids: toxicity, enhanced uptake and biodegradation. 4. International Conference "Interfaces Against Pollution", June 4–7, 2006, Granada
- Ebel, M., Evangelou, M.W.H., Schaeffer, A. (2005). Treating of copper and cyanide effluents with water hyacinths, *Eichhornia crassipes* – an alternative for purifying cyanide leachates from gold mining. e-proceedings, Third European Bioremediation Conference, 4–7 July, Chania, Greece.
- Evangelou, M.W.H., Ebel, M., Schaeffer, A. (2005). Evaluation of the use of natural chelating agents (humic acids, organic acids, cyclodextrins) in Cd, Cu and Pb chelate assisted phytoextraction. e-proceedings, Third European Bioremediation Conference, 4–7 July, Chania, Greece.

Konferenzbeiträge:

- Ebel, M., Evangelou, M.W.H., Schaeffer, A. (2006). Cyanide phytoremediation with water hyacinths (*Eichhornia crassipes*). 4. International Conference "Interfaces Against Pollution", June 4–7, 2006, Granada
- Evangelou, M.W.H., Ebel, M., Schaeffer, A. (2006). Chelate–assisted phytoextraction of Cu and Pb with the aid of organic acids: toxicity, enhanced uptake and biodegradation. 4. International Conference "Interfaces Against Pollution", June 4–7, 2006, Granada
- Ebel, M., Evangelou, M.W.H., Schaeffer, A. (2005). Treating of copper and cyanide effluents with water hyacinths, *Eichhornia crassipes* – an alternative for purifying cyanide leachates from gold mining. Third European Bioremediation Conference, 4–7 July, Chania, Greece.
- Evangelou, M.W.H., Ebel, M., Schaeffer, A. (2005). Evaluation of the use of natural chelating agents (humic acids, organic acid, cyclodextrins) in Cd, Cu and Pb chelate assisted phytoextraction. Third European Bioremediation Conference, 4–7 July, Chania, Greece.
- Schaeffer, A., Ebel, M., Evangelou, M.W.H., Markus Lenz (2005), Cyanide and heavy metal phytoremediation in artificial wetlands. SETAC 22–26 May, Lille, France
- Ebel, M., Lenz, M., Evangelou, M.W.H., Schaeffer, A. (2004). Wetland Phytoremediation: An alternative method for the treatment of highly toxic gold mining effluents Bioforum, 7. November 2004, Liège (Lüttich), Belgien
- Evangelou, M.W.H., Ebel, M., Schaeffer, A. (2004). Use of natural low molecular weight organic acids in Cu chelate–assisted phytoextraction. Bioforum, 7. November 2004, Liège (Lüttich), Belgien
- Ebel, M., Evangelou, M.W.H., Schaeffer, A. (2004). Copper toxicity and elimination by *Eichhornia crassipes*. SETAC, 6–8 Oktober 2004, Aachen
- Ebel, M., Lenz, M., Evangelou, M.W.H., Schaeffer, A. (2004). Copper mobilization in sediments by chelating agents. SETAC Aachen, 6–8 Oktober 2004
- Evangelou, M.W.H., Ebel, M., Schaeffer, A. (2004). Biochelators: Evaluation of their use in chelate–assisted phytoextraction. SETAC Aachen, 6–8 Oktober 2004
- Lenz, M., Ebel, M., Schaeffer, A. (2004). Aspects of environmental fate of cyanides in Sediment. SETAC, 6–8 Oktober 2004, Aachen
- Evangelou, M.W.H., Ebel, M., Schaeffer, A. (2004). Natural chelators: Behaviour in soil and use for chelate–assisted phytoextraction. Eurosoil, September 4–12 2004, Freiburg

- Ebel, M., Evangelou, M.W.H., Schaeffer, A. (2004). Cu-Phytoremediation in der Aquatik und Terrestrik. Symposium "Biologische Bodensanierung", 1–2 September 2004, Oldenburg
- Ebel, M., Evangelou, M.W.H., Schaeffer, A. (2004). Wetland phytoremediation: Effects of natural and strong chelating agents on heavy metals accumulation and phytotoxicity in water hyacinths (*Eichhornia crassipes*). Third International Conference "Interfaces Against Pollution, 24–27 Mai 2004, Jülich