Umweltwiss Schadst Forsch (2010) 22:107–115
DOI 10.1007/s12302-010-0113-x

ABFALLFORSCHUNG

Mikrobiologische Volatilisierung von anorganischem Selen aus Deponiesickerwässern bei umweltrelevanten Konzentrationen

Mirko Peitzsch · Daniel Kremer · Michael Kersten

Eingegangen: 19. September 2008 / Akzeptiert: 20. Januar 2010 / Online veröffentlicht: 10. Februar 2010
© Springer-Verlag 2010

Zusammenfassung *Hintergrund und Ziel* Mikrobiologische Alkylierungsraten sind im Hinblick auf den unter natürlichen Bedingungen stattfindenden Rückgang der Selenkonzentrationen bzw. -frachten kontaminierter Ökosysteme von Interesse.

Material und Methoden Zur Analyse der leichtflüchtigen Organoselenverbindungen im Deponiegas wie auch über die mikrobiologischen Inkubationsansätze wurde die Gasphase in Tedlar®-Beuteln gesammelt. Die Kopplung von effizienter Anreicherung (cryotrapping-cryofocusing), gaschromatografischer Trennung und einem relativ nachweisstarken elementselektiven Detektor als CT-CF-GC-ICP-MS ermöglichte eine direkte Selenspeziation in der Gasphase mit Nachweisgrenzen im Ultraspurenbereich (pg Se) sowohl im Deponiegas als auch in den Kulturansätzen.

Ergebnisse Die Inkubationsansätze mit *Alternaria alternata* als aktiv methylierender Organismus zeigten über den gesamten Konzentrationsbereich (10 µg Se-IV L^{-1} bis 10 mg Se-IV L^{-1}) eine aktive Produktion verschiedener leichtflüchtiger Organoselenverbindungen (DMSe, DMDSe, EMDSe, DEDSe) in der Größenordnung von bis zu 10 mg m^{-3} d^{-1} in der Gasphase. Bis zu 7 % der Selenkonzentration von 1 mg L^{-1} im Nährmedium wurden so binnen einer Woche verflüchtigt. Diese volatilen Selenspezies wurden auch im Deponiegas beobachtet

Diskussion Im Vergleich zu anderen Studien mit mikrobiologischen Reinkulturen sowie Isolaten aus Wässern und Böden sind die Ausbeuten an volatilen Organoselenverbindungen in den Inkubationsansätzen mit *A. alternata* und dem Deponiesickerwasser ähnlich hoch, wobei der hier untersuchte Konzentrationsbereich allerdings weit unterhalb des in der Literatur für Inkubationsansätze bisher berichteten lag.

Schlussfolgerungen Da die Alkylierung von Selen durch *A. alternata* in Mischkultur mit Deponiesickerwasser bei umweltrelevanten Konzentrationen funktioniert und die Zusammensetzungen der gebildeten Organoselenverbindungen derjenigen ähneln, die im Deponiegas gefunden werden, werden diese offensichtlich auch in der Deponie mikrobiologisch gebildet.

Empfehlungen und Perspektiven Die mikrobiologische Alkylierung toxischer, anorganischer Selenspezies zu sehr viel weniger problematischen, leichtflüchtigen Organoselenverbindungen stellt eine effiziente Methode dar, um kontaminierte Flächen auf biologischem Wege auch bei relativ niedrigen Konzentrationen zu reinigen.

Schlüsselwörter Deponiegas · Deponiesickerwasser · GC-ICP-MS · Mikrobiologische Alkylierung · Organoselenverbindungen · Speziation

M. Peitzsch · D. Kremer · M. Kersten (✉)
Institut für Geowissenschaften der Universität Mainz,
Becherweg 21, 55099 Mainz, Deutschland
E-Mail: kersten@uni-mainz.de

Microbial volatilization of inorganic selenium from landfill leachate

Abstract *Background, aim, and scope* Determination of the rates of microbial alkylation are of interest with respect to natural attenuation of harmful selenium concentrations or selenium charges in contaminated ecosystems.

Materials and methods Landfill gas and the headspace of microbial microcosm incubation vessels were sampled in Tedlar® bags. On-line hyphenation of an efficient enrichment method (cryotrapping-cryofocusing), a gaschromatographic separation technique, and the sensitive ICP-MS detection system was used for speciation of volatile organoselenium

compounds. A detection limit at the ultra trace level (pg Se) was achieved with this CT-CF-GC-ICP-MS technique.

Results Incubation of landfill leachate with *Alternata alternata* as an active methylating organism showed a production of volatile selenium compounds (DMSe, DMDSe, EMDSe, DEDSe) over the whole range of applied inorganic selenium concentrations (10 µg L^{-1} to 10 mg L^{-1}), with volatilization rates of up to 10 mg m^{-3} d^{-1}. For selenium concentrations of 1 mg L^{-1} in the nutrient broth, up to 7 % of the inorganic selenium was volatilized after one week. The same volatile selenium compounds were observed in landfill gas.

Discussion The amount of volatilized selenium was comparable to that found in other studies with microbial pure cultures as well as isolates from waters or soils, but at much lower initial concentrations used in the incubations.

Conclusions The alkylation of selenium in the enriched mixed culture from landfill leachate at environmentally relevant concentrations indicates that the organoselenium compounds of same species composition and distribution determined in landfill gas are produced by microorganisms.

Recommendations and perspectives The microbial alkylation of toxic inorganic selenium species to less toxic or non-toxic, volatile compounds is an efficient method for bioremediation of contaminated sites even at relatively low Se concentrations.

Keywords Microbial Alkylation · Bioremediation · GC-ICP-MS · Landfill gas · Landfill leachate · Organoselenium · Speciation

1 Problemstellung

In allen Abfallszenarios, bei denen eine hohe mikrobiologische Aktivität auftritt (Klärschlammfermentierung, Deponierung gemischter Siedlungsabfälle, Kompostierung) werden erhebliche Emissionen metall(oid)organischer Verbindungen beobachtet, die eine mehr oder weniger hohe toxische Relevanz aufweisen (Diaz-Bone et al. 2004). Metalloide wie das hier untersuchte Selen treten in unterschiedlichen Oxidationszuständen auf (Se-VI, Se-IV, Se-0, Se-I, Se-II). Bei der Bewertung der Toxizität von Metalloiden spielt die chemische Bindungsform, d. h. das Vorliegen in einer bestimmten Wertigkeit bzw. eines bestimmten Oxidationszustandes und der damit einhergehenden komplex- und kovalent-gebundenen Substituenten eine wesentliche Rolle (Uden 2005). Durch biologische Aktivität entstandene organische Selenverbindungen standen gegenüber Zinn- und Antimonverbindungen daher aufgrund ihrer verminderten Toxizität bisher nicht im Vordergrund des Interesses. Im Falle des Selens ist die Toxizität der anorganischen Selenit- und Selenatspezies gegenüber den methylierten Selenid(Se^{2-})-Bindungsformen um drei Größenordnungen erhöht. Hinzu kommt, dass alle alkylierten Selenverbindungen volatilen Charakter haben (VOSe-Bildung) und somit die Methylierung anorganischer Selenspezies nicht nur zur Detoxifizierung sondern auch zur Exhalation aus anthropogen kontaminierten Systemen (in dem Fall einer Siedlungsabfalldeponie) oder folglich auch aus natürlichen selenangereicherten Umweltkompartimenten wie zum Beispiel Böden und Sedimenten führt. Die Exhalation des Spaltproduktes ^{79}Se in Endlagern ist ein äußerst heikles Forschungsthema (Peitzsch et al. 2010). Ansonsten kann die mikrobiologische Alkylierung aber eher als natürlicher Entgiftungsprozess (natural attenuation) bewertet werden, mit einer atmosphärischen Emission von weltweit geschätzten 100 kg pro Jahr alleine durch DMSe-Freisetzung aus kontaminierten Siedlungsabfalldeponien (Feldmann 2003). Neben der Entwicklung von Verfahren zur natürlichen *in situ phytoremediation* kontaminierter Böden mithilfe genetisch modifizierter Selenhyperakkumulatoren hoher Biomasseproduktion (Ellis und Salt 2003) gehen die neueren Forschungsbemühungen auch in Richtung der Identifizierung effizienter Mikroorganismenpopulationen und deren optimaler Wachstumsbedingungen zur VOSe-Bildung, gerade auch im Hinblick auf den unter möglichst naturnahen Bedingungen stattfindenden Abbau der Konzentrationen bzw. Frachten in kontaminierten terrestrischen und aquatischen Ökosystemen. Grundlage all dieser Forschungsbemühungen muss aber eine etablierte *state-of-the-art* VOSe-Speziationsanalytik sein, über deren Resultate hier berichtet wird.

2 Material und Methoden

2.1 Siedlungsabfalldeponie

Die Zentraldeponie des Deponiezweckverbandes „Eiterköpfe“ liegt nordwestlich von Koblenz und ist seit den 1980er-Jahren mit einer Kapazität von rd. 12 Mio. m^3 zur Ablagerung von Hausmüll, Sperrmüll, Klärschlämmen und Gewerbeabfällen abgedichtet und kontrollierbar ausgebaut worden. In letzterem Sinne verfügt die Zentraldeponie über Anlagen zur Erfassung, Abführung und Aufbereitung von Sickerwasser und Deponiegas auf höchstem technischem Niveau. Das Sickerwasser wird in einem befahrbaren Stollensystem gefasst und einer Sickerwasserreinigungsanlage zugeführt. Das im Deponiekörper durch biologische Abbauvorgänge entstehende Deponiegas wird mithilfe von Gasbrunnen gefasst und der energetischen Verwertung zugeführt. Organometalloide sind zwar thermodynamisch meist instabil, aber kinetisch stabil und bei besonders sorgfältigen Probenahmen analysierbar. Die hier verwendete Methode der Probenahme mittels Tedlar®-Beuteln (Probenahmebeutel aus Polyvinylfluorid-Folie, SKC ANALYT MTC) stellt kein Problem hinsichtlich der Stabilität dieser Verbindun-

gen dar, wenn die Analytik innerhalb von 48 h erfolgt (Haas und Feldmann 2000). Der Vorteil dieser etablierten Methode ist zudem die kontaminationsfreie Beprobung direkt am Gasbrunnen mittels eines Unterdruckbehälters.

2.2 Mikroorganismen und Kulturmedien

Der phytopathogene Pilz *Alternaria alternata*, von Thompson-Eagle et al. (1989) als selenresistenter und aktiv methylierender Mikroorganismus erstmals beschrieben, wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen bezogen (DSMZ-Nr. 1102, Braunschweig) und als Modellorganismus für die Experimente mit anorganischem Selenit verwendet. Zum Vergleich mit der Alkylierungsaktivität der Reinkultur von *A. alternata* wurde weiterhin auch Sickerwasser der Hausmülldeponie „Eiterköpfe“ bei Koblenz als Inokulum einer mikrobiologischen „Umweltmischkultur“ verwendet.

Die Inkubation von *A. alternata* und die Anreicherung der Umweltmischkultur erfolgten in 20 mL eines synthetischen Nährmediums (1 g L^{-1} Malzextrakt, 1 g L^{-1} Glucose, 0,1 g L^{-1} Pepton; Merck) bei 30 °C für 7 Tage in mittels Butylstopfen luftdicht verschlossenen Inkubationsgefäßen (100 mL). Weiterhin wurden in dem verwendeten Nährmedium unterschiedliche Selenkonzentrationen (10 µg L^{-1}, 100 µg L^{-1}, 1 mg L^{-1}, 10 mg L^{-1}) in Form von Selenit (Na_2SeO_3, Alfa Aesar) eingestellt, um die konzentrationsabhängige Alkylierungsleistung zu beobachten. Zur Ermittlung abiotischer

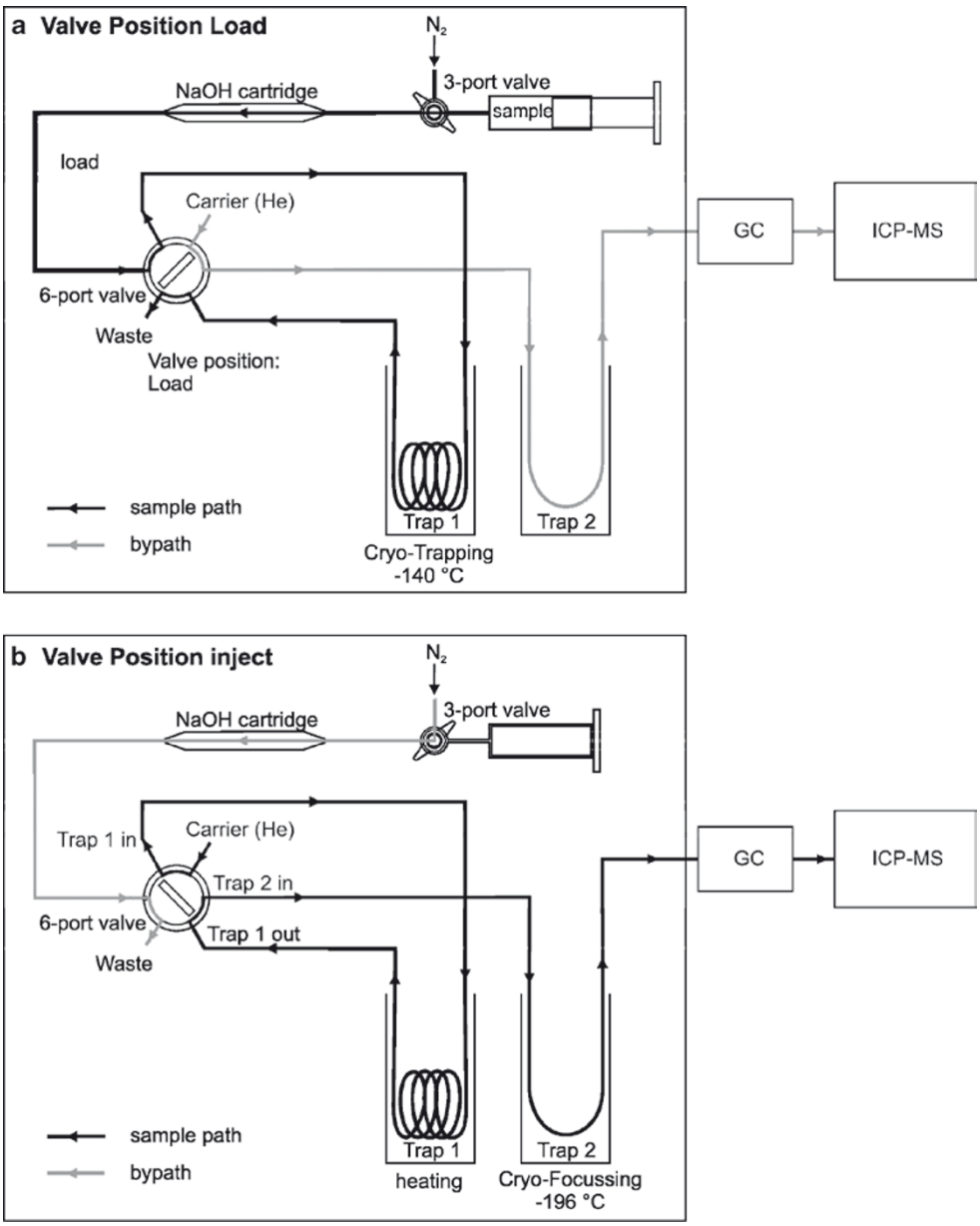

Abb. 1 CT-CF-GC-ICP-MS-Kopplung zur Analyse leichtflüchtiger Organometall(oid)verbindungen

Einflüsse wurden parallel Inkubationsansätze ohne Inokulum auf die gleiche Weise untersucht. Um den Einfluss des Nährmediums zu bestimmen bzw. es als Quelle gelösten Selens auszuschließen, sind weitere Inkubationsansätze ohne Zugabe von Selenit untersucht worden. Alle Untersuchungen sind in dreifacher Ausfertigung durchgeführt wurden.

Nach der Inkubation der unterschiedlichen mikrobiologischen Gemeinschaften wurden mittels Minielektroden pH-Werte (SenTix Mic, WTW) und Redoxpotenzial (Platin-Einstabmesskette Pt-5900A, Schott) gemessen. Die Menge an gebildeter Biomasse wurde im Falle der bakteriellen Kulturen durch fotometrische Messung der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt (Photometer Specord® 50, Analytik Jena). Die Pilzbiomasse wurde gravimetrisch bestimmt, indem diese nach Filtration bei 105 °C getrocknet und nach eingestellter Gewichtskonstanz ausgewogen wurden.

2.3 Analytik

Zur Analyse der volatilen Organoselenverbindungen (VOSe) wurde die Gasphase der Inkubationsansätze mittels hochreinen Stickstoffgases ausgetrieben und in 1 L-Tedlar®-Beuteln gesammelt. Dabei wurde mit dem 10-fachen Volumen der Gasphase des Inkubationsgefäßes gespült. Zum Austreiben wurde ein PC-gesteuerter Massendurchflussmesser (Smart Controller GSC, Vögtlin Instruments, Schweiz) verwendet, die Flussrate betrug 0,2 L min^{-1}.

Zur Messung der VOSe in den gasförmigen Proben wurde eine mehrstufige Anreicherung/Separation mittels *cryotrapping-cryofocussing*-Gaschromatografie online mit der elementselektiven ICP-MS Detektion (CT-CF-GC-ICP-MS, Abb. 1, Tabelle 1) gekoppelt. Diese aufwendige analytische Technik hat sich gerade für die Speziation von Spurenelementen in komplexen Gasmatrices bewährt (Kremer et al. 2005). Die Gasproben wurden mittels einer gasdichten Spritze (Fortuna-Optima® 100 mL, Poulten & Graf) und konstanter Volumenflussrate von 40 mL min^{-1} (Spritzenpumpe Vit-Fit, Lambda, Schweiz) in das Messsystem eingebracht. Hierbei wurde zunächst das Probenmaterial gefangen (CT) und im weiteren Verlauf fokussiert (CF), um einen gemeinsamen Startpunkt der Analyten für die Reproduzierbarkeit der gaschromatografischen Trennung zu gewährleisten.

Die Identifizierung der VOSe-Verbindungen erfolgte durch den Vergleich der Retentionszeiten der Standardsubstanzen Dimethylselenid (DMSe, Strem Chemicals), Dimethyldiselenid (DMDSe, Sigma Aldrich), Diethylselenid (DESe, Sigma Aldrich) und Diethyldiselenid (DEDSe, Strem Chemicals) mit den analysierten Proben. Die Stabilität und Wiederfindungsraten dieser Standards wurden von uns vorher ermittelt (Haas und Feldmann 2000; Peitzsch et al. 2010). Weiterhin wurde das Ethylmethyldiselenid (EMDSe) nach Meija et al. (2003) synthetisiert und dessen Retentionszeit ermittelt. Die Quantifizierung erfolgte über

Tabelle 1 Methodische Details zur Eigenentwicklung der CT-CF-GC-ICP-MS-Kopplung

Detail	Beschreibung/Kommentar
Cryotrapping (CT-Trap 1)	
NaOH-Kartusche	Pasteurpipette gefüllt mit NaOH auf silikatischem Träger (Merck) zwischen 2 Stopfen aus silanisierter Glaswolle (Supelco)
Material	Silcosteel, 1/16“ AD, 1,02 mm ID, Länge 1,5 m (Restek)
Trapping-Fluss	40 mL/min mit Spritzenpumpe (vita-fit, Lambda)
Temperatur	–140 °C iso-Hexan-Eisbrei
Heizung CT	Widerstandsheizung mit Heiztrafo (EA-PS 2016-100, Elektro Automatik) bei 4,5 V, 4,8 A
Cryofocussing (CF-Trap 2)	
Transferzeit CT-CF	3,5 min
Material	Silcosteel AD 0,74 mm ID 0,53 mm, Länge 1 m
Temperatur	–196 °C flüssiger Stickstoff
Heizung CF	Widerstandsheizung (3,5 V, 1,2 A)
Gaschromatography (GC) (Shimadzu GC-14A)	
Trägergas	He 6,0 mit 10 ppm (v/v) Xe, Flußrate 6 mL/min
Trennsäule	CP Sil 5 CB, 30 m × 0.32 mm × 1 µm 100 % PDMS (Restek)
Temperaturprogramm	40 °C für 3 min, 20 °C/min bis 220 °C, 1 min bei 220 °C
ICP-MS (VG PlasmaQuad 3)	
Transferline GC-ICP-MS	Restek Silcosteel, 1/16“ AD, 1 m, Widerstandsheizung 5 V, 5 A
Gasflüsse	Plasma 14,9 L/min, Aux 0,9 L/min, Neb 0,85 L/min (extern)
Heizung Nebulizergas	2 m Edelstahl 1/16“ (Swagelok) mit Widerstandsheizung 11 V, 10 A
Rf-Power	1200 W
Gemessene Isotope	^{13}C, ^{33}S, ^{75}As, ^{77}Se, ^{82}Se, ^{124}Xe
Dwell time	^{13}C, ^{33}S, ^{124}Xe je 5 ms, alle anderen Isotope 20 ms

eine externe Kalibrierfunktion, wobei durch die Detektion mittels ICP-MS ausschließlich das Selen als Bezugsgröße gemessen wurde. Dadurch genügte es, die Kalibrierfunktion mittels DMSe aufzunehmen und auf die anderen VOSe anzuwenden. Zur Auswertung der Messungen wurden die Peaks der Chromatogramme mittels des Softwarepakets OriginPro 7.0 (Microcal) integriert und die Peakflächen zur Quantifizierung des Selens genutzt.

Es sollte noch darauf hingewiesen werden, dass die VOSe Spezies mehr oder weniger wasserlöslich sind. Der Henry-Koeffizient für DMSe beträgt 0,058, sodass bei Gleichgewicht die DMSe-Konzentration in Wasser immerhin 17-fach höher ist als die Konzentration in der Gasphase im geschlossenen System (Karlson et al. 1994). Mit einem fünffachen Volumenverhältnis zwischen Headspace und Kulturmedium muss damit das max. 3,4-fache des in der Gasphase gemessenen VOSe noch in der Wasserphase gelöst vorhanden gewesen sein. Dies entspricht auch den Ergebnissen eines Wiederfindungsexperimentes, bei dem 17,4 ng DMSe im Kulturmedium gelöst wurden (aber ohne Inokulum), von dem aber nur 35 ± 7 % im Headspace nach 24 h wiedergefunden wurden (Peitzsch 2008).

3 Analyseergebnisse

Das Vorkommen sowie die Menge leichtflüchtiger Organometall(oid)e inklusive alkylierter Selenverbindungen im Deponiegas der Zentraldeponie „Eiterköpfe“ schwankte sowohl in Abhängigkeit des Beprobungszeitraumes als auch des beprobten Gasbrunnens. Die Analyse einer im März 2008 entnommenen Gasprobe zeigte als dominante Spezies das Dimethylselenid. An weiteren VOSe wurden DESe, DMDSe, EMDSe und DEDSe beobachtet, allerdings in um eine Größenordnung niedrigeren Konzentrationen (Abb. 2).

Nach 7-tägiger Inkubation der Reinkultur von *A. alternata* wurden über den gesamten zugegebenen Se-(IV) Konzentrationsbereich vier VOSe-Spezies gefunden: DMSe, DMDSe, EMDSe und DEDSe (Abb. 3). VOSe-Spezies waren sogar, wenn auch im Ultraspurenbereich gerade noch nachweisbar, auch in den Ansätzen ohne Zugabe von Se-IV zu beobachten. Dieser Hintergrundwert ergab sich aus der Zusammensetzung des kommerziellen Nährmediums, welches in Spuren gelöstes Selen enthielt. In Abhängigkeit der zugegebenen Menge an Selenit (Se-IV) konnte hauptsächlich eine Zunahme von DMSe über mehrere Größenordnungen beobachtet werden, die bei einer Selenitkonzentration von 1 mg L^{-1} eine maximale Freisetzung von 1,4 µg volatiles Selen erreichte (Abb. 4a). Bei der Hochrechnung auf relevante Volumina würde sich hier unter gleichen Reaktionsbedingungen eine Volatilisierungsrate von 9,8 mg Se pro Kubikmeter Wasser und Tag ergeben. Die Bildung von EMDSe konnte in Abhängigkeit von der gelösten Menge Se-IV mit einem leichten Anstieg bis zu einem Maximum von 8,6 ng VOSe pro Woche und Inkubationslösung von 20 mL beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde bei der Bildung von DMDSe keine verstärkte Produktion mit zunehmender Se-Konzentration beobachtet. Allerdings lagen die Anteile des DMDSe am gesamten VOSe in den niedrigen Konzentrationsbereichen (10 µg L^{-1} Se-IV) bei ca.

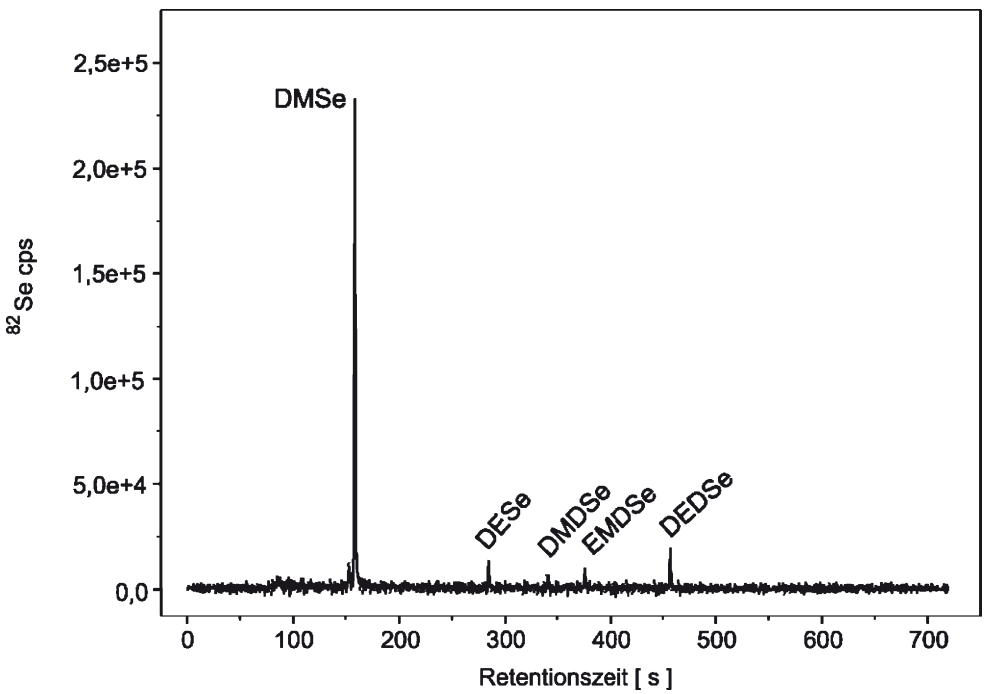

Abb. 2 Chromatogramm der leichtflüchtigen Organoselenverbindungen in Deponiegasproben

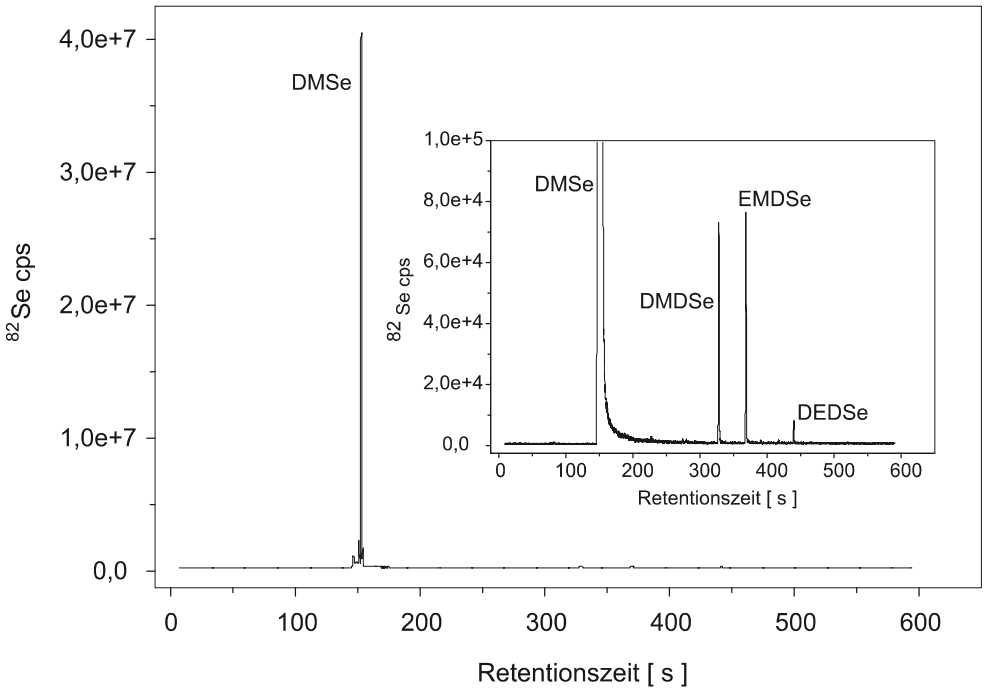

Abb. 3 Typisches Chromatogramm der leichtflüchtigen Organoselenverbindungen nach der Inkubation von *A. alternata* (1 mg/L Se-IV)

65 %. Mit Zunahme der Konzentration an gelöstem Selenit (Se-IV) im Nährmedium wurde der Anteil des DMSe am gesamten VOSe zwischen 97,9–99,9 % ermittelt. Im Falle von DEDSe konnte kein deutlicher Einfluss der Mikrobiologie festgestellt werden, d. h. die dargestellten Werte unterschieden sich kaum von denen der abiotischen Kontrolle (Peitzsch 2008). Die volatilisierte Menge nach 7 Tagen stieg von 2,6 % bei der Inkubation von 10 µg L^{-1} Se-IV bis auf 6,9 % bei der Inkubation von 1 mg L^{-1} Se-IV an, und nahm bei der nächsthöheren Konzentration von 10 mg L^{-1} Se-IV wiederum auf 0,3 % ab. Die Volatilisierungsrate entspricht allerdings nicht der Alkylierungsrate, da das DMSe-Gas wasserlöslich ist. Wie im Methodenteil ausgeführt, ist die gesamte alkylierte Menge in unseren Experimenten mit dem gelösten Anteil noch um den Faktor 3,4 höher.

Die parallel zu den VOSe bestimmten Gehalte der Biomasse sowie der pH-Werte und Redoxpotenziale als Wachstumsfaktoren zeigen (Abb. 5a), dass *A. alternata* über einen großen Konzentrationsbereich von gelöstem Selenit im Nährmedium nicht nachteilig beeinflusst wird. Bei Betrachtung der Menge an gebildeter Biomasse wird jedoch deutlich, dass bei der höchsten Konzentration von 10 mg L^{-1} Selenit gegenüber der nächstgeringeren Konzentration von 1 mg L^{-1} eine deutliche Abnahme der Biomasseproduktion zu verzeichnen ist.

Parallel zur Inkubation von A. alternata wurde eine Umweltmischkultur, angereichert aus Deponiesickerwasser, auf die gleiche Weise inkubiert und auf eine mögliche Alkylierung des anorganischen Selenits untersucht. Neben den dominanten alkylierten Selenverbindungen DMSe (1,0–96,3 %), DMDSe (96,5–3,5 %) und EMDSe (0,1–12,8 %), welche im gesamten Konzentrationsbereich des eingesetzten Selenits zu finden waren, wurden zwei weitere, nicht näher definierte VOSe-Spezies bei Retentionszeiten (RT) von 410 s und 422 s beobachtet (RT 410 s, RT 422 s; Abb. 4b). Vor allem RT 410 s konnte im höheren Konzentrationsbereich (0.1–10 mg L^{-1} Se-IV) bis zu 5,8 % des VOSe nachgewiesen werden. Die Identifizierung dieser VOSe-Spezies über eine Abschätzung des Dampfdruckes wie von Feldmann et al. (1994) empfohlen führte nicht weiter (Peitzsch 2008). Eine eindeutige Identifizierung wäre daher nur auf molekularer Ebene mit einem aufwendigen Tandem-MS-System möglich gewesen, das uns binnen der Verfallszeit der Spezies nicht zur Verfügung stand. Im Gegensatz zu den Inkubationsversuchen mit *A. alternata* konnte im Konzentrationsbereich bis 10 µg L^{-1} Se-IV auch eine aktive, biologisch bedingte Produktion von DEDSe (8,8 % des volatilen Selens) gegenüber den abiotisch inkubierten Versuchsansätzen beobachtet werden (Peitzsch 2008). Innerhalb dieser Versuchsreihe ist im Gegensatz zu den Experimenten mit *A. alternata* die vermehrte Bildung von DMSe und DMDSe sowie EMDSe mit steigender Selenitkonzentration im Nährmedium zu beobachten, wobei das Maximum der VOSe-Bildung mit 560 ng Selen wiederum bei Einsatz von 1 mg L^{-1} Selenit zu finden ist. Bei entsprechender Hochrechnung entspricht das einer Volatilisierungsrate von 3,9 mg VOSe pro Kubikmeter Sickerwasser und Tag. Der volatilisierte Anteil lag nach 7 Tagen Inkubation zwischen 0,2 % (10 µg L^{-1} Se-IV) und 2,8 % (1 mg L^{-1} Se-IV), fiel bei der höchsten Selenitkonzentration von 10 mg L^{-1} aber wieder auf unter 1 % ab.

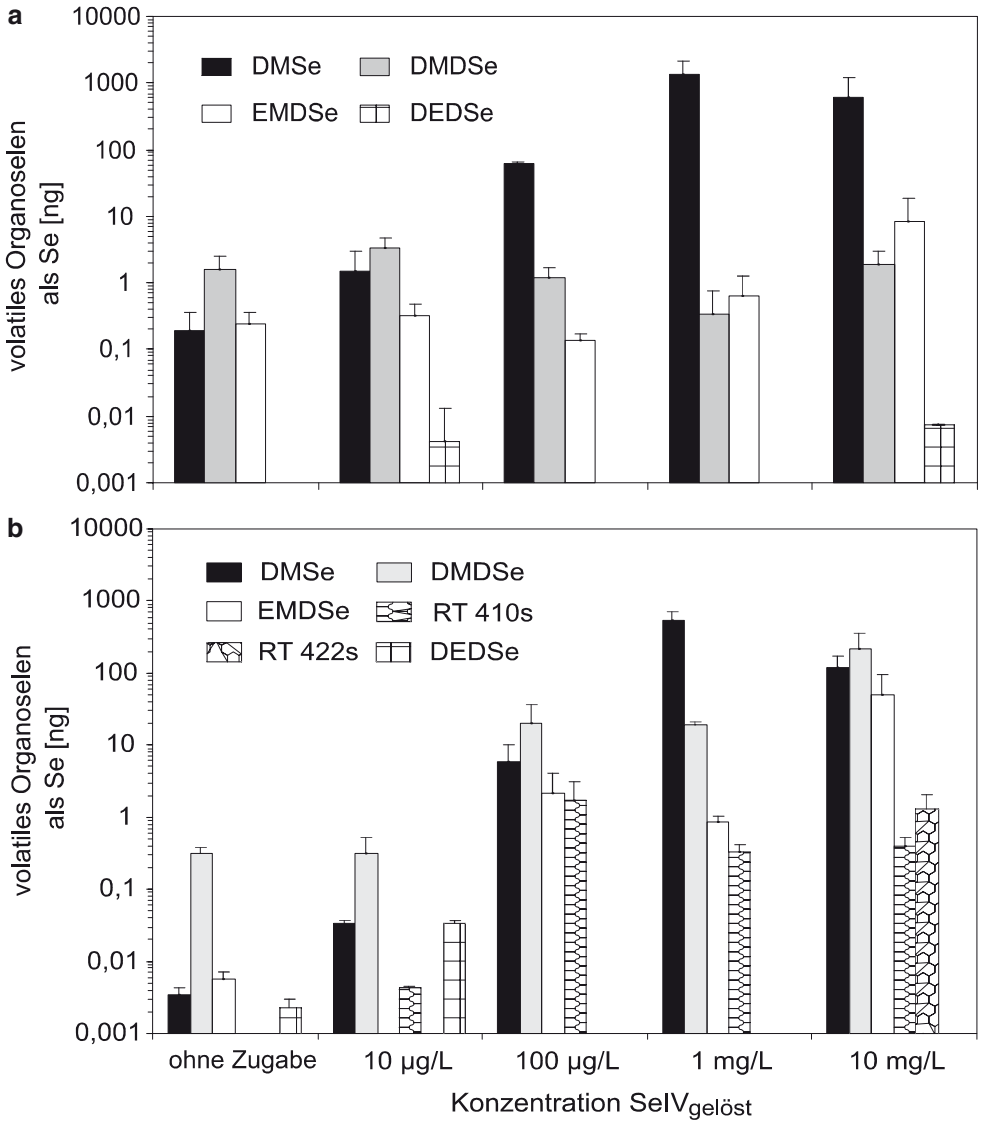

Abb. 4 Konzentrationsabhängige Alkylierung von Se-IV. **a** Inkubation von *A. alternata*, **b** Inkubation der Umweltmischkultur (Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung, $n = 3$)

Weiterhin wurde der Einfluss unterschiedlicher Selenkonzentrationen auf das Wachstum der Umweltmischkultur untersucht. Die hierbei verwendete Methode der optischen Dichte war nicht durch die Bildung von elementarem Selen gestört, das ansonsten die Kulturen intensiv rot gefärbt hätte. Es konnte beobachtet werden, dass unterschiedliche Selenitkonzentrationen im Nährmedium sich nicht nachteilig auf das Wachstum der angereicherten Mischkultur auswirken. Eine Ursache dafür könnte sein, dass sich die Zusammensetzung der Mischkultur mit zunehmender Se-Konzentration ändert. Zwar ist die Menge der gebildeten Biomasse wie auch die Entwicklung des pH-Wertes über den gesamten Konzentrationsbereich vergleichbar, aber das Redoxpotenzial zeigt einen Abwärtstrend mit zunehmender Konzentration von gelöstem Selenit im Nährmedium (Abb. 5b). Dies könnte als ein Indiz für eine Änderung der Mikroorganismenpopulation in der Mischkultur geltend gemacht werden. Allerdings kann zur Verifikation dieser Hypothese nur eine PCR-Sequenzierung mit der DGGE-Methode (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) weiterhelfen, die uns nicht zur Verfügung stand.

4 Diskussion

Die Inkubation des aktiv methylierenden Mikroorganismus *A. alternata* zeigte über den gesamten Selenitkonzentrationsbereich (10 µg L^{-1}–10 mg L^{-1} Se-IV) eine aktive Produktion verschiedener VOSe (DMSe, DMDSe, EMDSe, DEDSe) (Abb. 4a), erstmals auch im umweltrelevanten Konzentrationsbereich unterhalb von 1 mg L^{-1}. Die absoluten Mengen des im Headspace gefundenen DMSe lagen um bis zu drei Größenordnungen höher als die der übrigen VOSe-Spezies, bei einer vorliegenden Konzentration von Se-IV im Nähr-

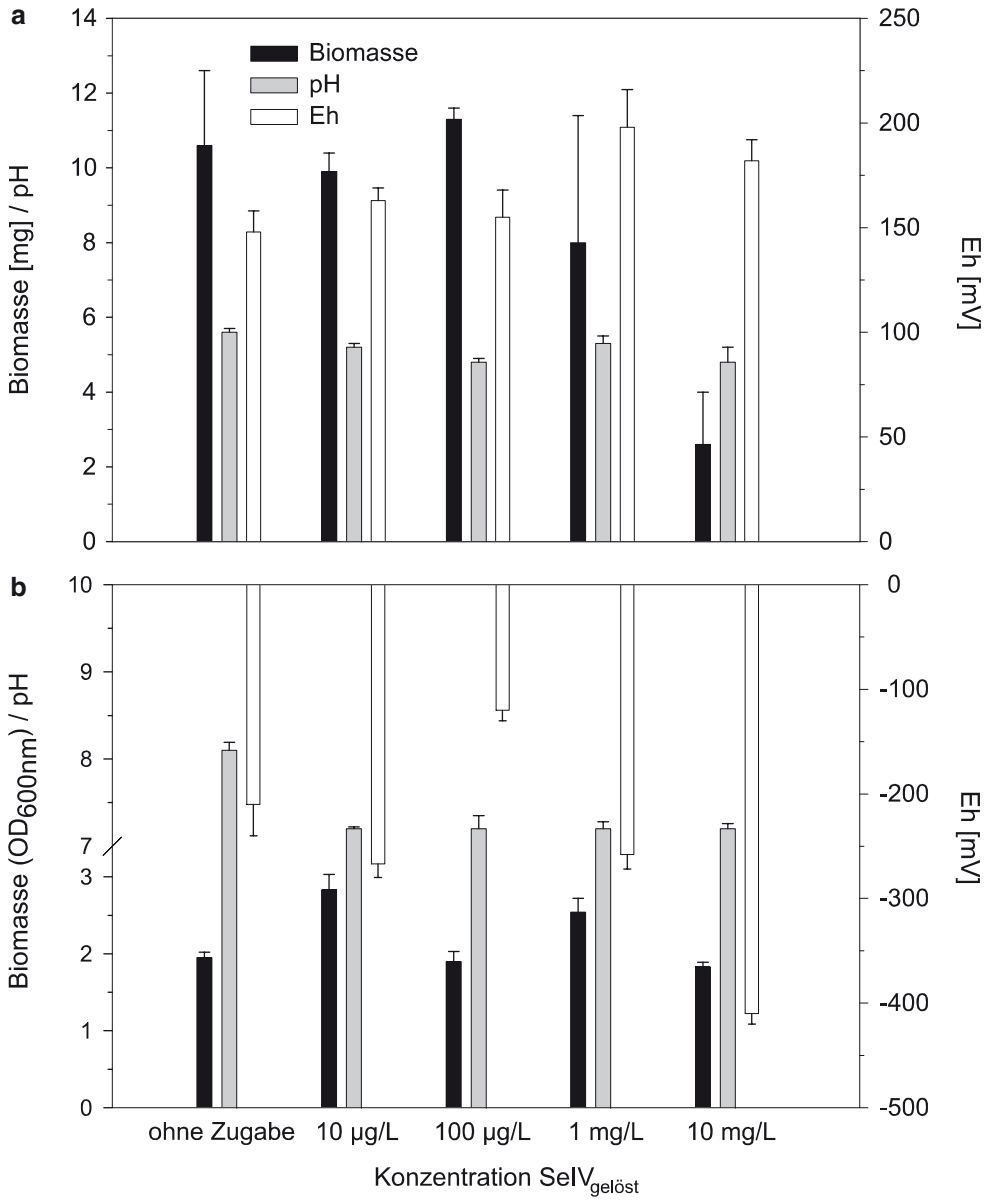

Abb. 5 Biomasse, pH- und Eh-Wert. **a** Inkubation von *A. alternata*, **b** Inkubation der Umweltmischkultur (Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung, $n = 3$)

medium von 1 mg L^{-1} immerhin im unteren µg-Bereich. Zum Vergleich der Pilzreinkultur von *A. alternata* mit einer Umweltmischkultur wurde Sickerwasser einer Hausmülldeponie als Inokulum verwendet und die konzentrationsabhängigen Alkylierungsraten von anorganischem Selen der so angereicherten Kultur analysiert. Hierbei wurde mit Zunahme der Selenitkonzentration im Nährmedium eine Zunahme der VOSe beobachtet, die ähnlich der Reinkultur von *A. alternata* bei höheren Konzentrationen von 1 mg L^{-1} bzw. 10 mg L^{-1} Se-IV ein Maximum für den gewählten Untersuchungsbereich aufzeigten. Weiterhin ist auffällig, dass im Gegensatz zur Inkubation von *A. alternata* auch die Bildung von DMDSe und EMDSe mit steigender Konzentration von Se-IV im Nährmedium ansteigt (Abb. 4b). Zusätzlich zu den bereits genannten Selenspezies wurde vor allem ab einer Konzentration von 100 µg L^{-1} Se-IV auch eine vermehrte Bildung zweier weiterer, nicht über die Retentionszeit identifizierbarer VOSe beobachtet. Bei quantitativer Betrachtung der beiden mikrobiologischen Inkubationsreihen wird deutlich, dass die mikrobiologische Bildung volatiler Organoselenverbindungen im unteren Konzentrationsbereich mit der des eingesetzten anorganischen Selenits vergleichbar ist. Dagegen ist im oberen Konzentrationsbereich (ab 100 µg L^{-1} Se-IV) die Produktionsrate von VOSe bei der Pilzreinkultur um etwa eine Größenordnung höher.

Im Vergleich zu den Deponiegasproben sowie anderen Studien mit Isolaten aus Wässern und Böden sowie Umweltmischproben zeigt sich, dass die VOSe-Ausbeuten ähnlich sind. So zeigten Rael und Frankenberger (1996), dass eine bakterielle Reinkultur von *Aeromonas veronii* in Ab-

hängigkeit von der Selenkonzentration, dem pH-Wert und der Salinität unterschiedliche Mengen DMSe und DMDSe produziert. Während der Inkubation mit *A. veronii* wurden Absolutmengen von 100–500 ng Selen als flüchtige Verbindungen nachgewiesen. Dungan und Frankenberger (2000) untersuchten die Einflüsse der oben genannten Umweltfaktoren auf die Selen-Volatilisierung durch *Enterobacter cloacae* SLD1a-1 und konnten, bezogen auf die verfügbare Selenkonzentration im Nährmedium, ebenfalls eine Abhängigkeit feststellen. Höhere Selenitzugaben von 80 mg L^{-1} führten dabei zu einer verminderten Produktion leichtflüchtiger Selenverbindungen (< 0,5 % volatiles Se). Bei Selenzugaben wie in dieser Arbeit verwendet (7,9 mg L^{-1} und 0,79 mg L^{-1}) wurden nach gleicher Inkubationszeit ähnliche Anteile von 1,5 % und 3 % VOSe gemessen. Nach der Inkubation von *A. alternata* und der Umweltmischkultur konnten hier bis zu 7 % bzw. 3 % VOSe bei einer Konzentration von 1 mg L^{-1} Se-IV im Nährmedium analysiert werden. Im Gegensatz zu der bei Dungan und Frankenberger (2000) beschriebenen verminderten Produktion leichtflüchtiger Selenverbindungen mit steigender Se-Konzentration im Nährmedium konnte in anderen Arbeiten mit einer salztoleranten Alge *Chlorella* sp. (Se-Konzentrationen von 0,79 mg L^{-1} und 100 mg L^{-1}; Fan et al. 1997) bzw. einem *Corynebakterium* sp. (Se-Konzentrationen von 5 mg L^{-1} und 50 mg L^{-1}; Doran und Alexander 1977) eine bis zu 10-fach höhere VOSe-Produktionsrate infolge erhöhter anorganischer Selenzugabe beobachtet werden.

Die bei Thompson-Eagle et al. (1989) beschriebene Resistenz von *A. alternata* gegenüber Se-Konzentrationen von 100 mg L^{-1} konnte in den hier aufgeführten Experimenten nur teilweise bestätigt werden. Als Indiz für die geringere Resistenz von *A. alternata* unter den gegebenen Bedingungen können die Bildung der Biomasse sowie die Bildung des DMSe genutzt werden, welche bei einer Selenitkonzentration von 10 mg L^{-1} im Vergleich zu 1 mg L^{-1} um ca. 75 % bzw. 50 % reduziert waren.

5 Schlussfolgerungen

Die mikrobiologische Alkylierung anorganischer Selenspezies wurde in verschiedenen mikrobiologischen Gemeinschaften untersucht. Die Verknüpfung von effizienter gaschromatografischer Trennung und dem nachweisstarken, elementselektiven Detektor ermöglichte dabei Nachweisgrenzen im Ultraspurenbereich (1 pg Se), mit einer Linearität über mehrere Größenordnungen. Weltweit erstmals konnten damit Alkylierungsraten bei umweltrelevanten Se-Konzentrationen im Kulturmedium quantifiziert werden. Die Alkylierung von Selen durch eine Reinkultur von *A. alternata* als auch durch eine Anreicherungskultur aus Deponiesickerwasser funktioniert in der Tat uneingeschränkt auch bei einer Selenitkonzentration von nur 10 µg L^{-1}, wobei die Zusammensetzung der verschiedenen gebildeten VOSe derjenigen ähnelt, die auch direkt im Deponiegas gefunden wurde. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die mikrobiologische Alkylierung toxischer, anorganischer Selenspezies wie Selenit (Se-IV) als *Natural-attenuation*-Ansatz bis hinunter zu Konzentrationen des aktuellen Geringfügigkeitsschwellenwertes der LAWA zur Beurteilung von lokal begrenzten Grundwasserverunreinigungen (7 µg L^{-1} Se) funktioniert.

Literatur

Doran JW, Alexander M (1977) Microbial transformations of selenium. Appl Environ Microbiol 33:31–37

Diaz-Bone RA, Menzel B, Barrenstein A, Hirner AV (2004) Methylated metal(loid) species in biological waste treatment. In: Hirner AV, Emons H (eds) Organometal and organometalloid species in the environment: analysis, distribution, processes and toxicological evaluation. Springer, Berlin Heidelberg, pp 97–112

Dungan RS, Frankenberger Jr WT (2000) Factors affecting the volatilization of dimethyl selenide by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1. Soil Biol Biochem 32:1353–1358

Ellis DR, Salt DE (2003) Plants, selenium and human health. Curr Opin Plant Biol 6:273–279

Fan TW-M, Lane AN, Higashi RM (1997) Selenium biotransformations by a euryhaline microalga isolated from a saline evaporation pond. Environ Sci Technol 31:569–576

Feldmann J (2003) Other organometallic compounds in the environment. In: Craig PJ (ed), Organometallic compounds in the environment. John Wiley & Sons, New York, pp 354–389

Feldmann J, Grümping R, Hirner AV (1994) Determination of volatile metal and metalloid compounds in gases from domestic waste deposits with GC/ICPMS. Fresenius J Anal Chem 350:228–234

Haas K, Feldmann J (2000) Sampling of trace volatile metal(loid) compounds in ambient air using polymer bags: a convenient method. Anal Chem *72*:4205–4211

Karlson U, Frankenberger WT, Spencer WF (1994) Physicochemical properties of dimethyl selenide and dimethyl diselenide. J Chem Eng Data 39:608–610

Kremer D, Ilgen G, Feldmann J (2005) GC-ICP-MS determination of dimethyldelenide in human breath after ingestion of ^{77}Se-enriched selenite: monitoring of in-vivo methylation of selenium. Anal Bioanal Chem 383:509–515

Meija J, Bryson JM, Vonderheide AP, Montes-Bayon M, Caruso JA (2003) Studies of selenium-containing volatiles in roasted coffee. J Agric Food Chem 51:5116–5122

Peitzsch M (2008) Speziation mikrobiologisch alkylierter, leichtflüchtiger Selenverbindungen in Abhängigkeit der geochemischen Verfügbarkeit des Selens. Dissertation, Universität Mainz, 127 S

Peitzsch M, Kremer D, Kersten M (2010) Microfungal alkylation and volatilization of selenium adsorbed by goethite. Environ Sci Technol 44:129–135

Rael RM, Frankenberger Jr WT (1996) Influence of pH, salinity, and selenium on the growth of *Aeromonas veronii* in evaporation agricultural drainage water. Water Res 30:422–430

Thompson-Eagle ET, Frankenberger Jr WT, Karlson U (1989) Volatilization of selenium by *Alternaria alternata*. Appl Environ Microbiol 55:1406–1413

Uden PC (2005) Speciation of selenium. In: Cornelis R, Crews H, Caruso J, Heumann KG (eds), Handbook of elemental speciation II: Species in the environment, food, medicine & occupational health. John Wiley & Sons, New York, pp 346–365