

**Speziation mikrobiologisch alkylierter, leichtflüchtiger
Selenverbindungen in Abhängigkeit der geochemischen
Verfügbarkeit des Selens**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
“Doktor der Naturwissenschaften”

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

Mirko Peitzsch
geboren in Altenburg (Thür)

Mainz, 2008

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2008

The microbes certainly must obey the laws of thermodynamics, but they are utterly sophisticated lawyers that understand to use every single, constructive combination of those laws for making a good living of all or almost nothing.

Karsten Pedersen

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Spurenelement Selen	3
1.1.1 Selen im Fokus der Medizin- und Ernährungswissenschaften.....	3
1.1.2 Selen in der Umwelt.....	5
1.1.3 Geochemisches Sorptionsverhalten des Selen.....	8
1.2 Mikrobiologische Prozesse	12
1.2.1 Biomethylierung	15
1.2.2 Biomethylierung von Selen.....	16
1.3 (Spezies)-Analytik des Selen	19
1.4 Zielsetzung der Arbeit	22
2 MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Häufig verwendete Stoffe / Chemikalien.....	23
2.2 Analytik verschiedener Selenspezies	25
2.2.1 HG-AAS – Analyse gelöster, anorganischer Selenspezies	25
2.2.2 ICP-MS-Analyse gelöster Gesamtselengehalte	26
2.2.3 <i>Cryotrapping-Cryofocussing</i> -GC-ICP-MS – Analyse leichtflüchtiger Selenverbindungen	27
2.2.4 Validierung der CT-CF-GC-ICP-MS – Methode.....	30
2.2.4 Experimentelle Wiederfindungsrate der Organoselenverbindungen in unterschiedlichen Probenmatrices.....	32
2.3 Methylierungsexperimente.....	34
2.3.1 Verwendete Pilz- und Bakterienkulturen	34
2.3.2 Kulturmedien	35
2.3.3 Inkubation	38
2.3.4 Mikrobiologische Alkylierungsexperimente.....	38
2.4 Verschiedene Adsorptionsuntersuchungen.....	40
2.4.1 Bestimmung der spezifischen Oberfläche und des Ladungsnullpunktes des verwendeten Eisenoxids.....	40
2.4.2 Adsorption an Goethit.....	42
2.4.3 Modellierung.....	44

2.5	Biogeochemische Experimente zur Verfügbarkeit von Selen	45
2.5.1	Versuchsreihe mit adsorbiertem SeIV an Goethit.....	45
2.5.2	Versuchsreihe mit mineralisch gebundenem Selen (FeSe ₂).....	47
3	ERGEBNISSE	49
3.1	Etablierung/Validierung der CT-CF-GC-ICP-MS-Kopplung zur Analyse leichtflüchtiger Organometall(oid)verbindungen	49
3.1.1	Messung von Einzelstandards.....	49
3.1.2	Experimentelle Wiederfindung der Organoselenverbindungen	53
3.2	Methylierung anorganischer Selenspezies durch mikrobiologische Gemeinschaften.....	55
3.2.1	Selenmethylierung durch <i>A. alternata</i>	55
3.2.2	Selenmethylierung durch die Umweltmischkultur.....	58
3.3	Geochemische Untersuchungen zur Adsorption an Goethit	61
3.3.1	Charakterisierung des Goethits	61
3.3.2	Sorption von Aminosäuren an Goethit.....	63
3.3.3	Sorption von Se(IV) an Goethit in unterschiedlichen Systemen.....	66
3.4	Biogeochemische Untersuchungen zur Mobilisierung von Selen.....	68
3.4.1	Alkylierung von adsorptiv gebundenem bzw. frei verfügbarem, gelöstem Se(IV) durch <i>A. alternata</i>	69
3.4.2	Alkylierung von adsorptiv gebundenem und frei verfügbarem, gelöstem Se(IV) durch eine Umweltmischkultur.....	72
3.4.3	Alkylierung von mineralischem Selen (FeSe ₂) durch <i>D. gigas</i>	76
4	DISKUSSION	81
4.1	Etablierung / Validierung der CT-CF-GC-ICP-MS-Methode zur Analyse leichtflüchtiger Organoselenverbindungen	81
4.2	Geochemische Sorptionsstudien	84
4.3	Bio-(geo)-chemische Inkubationsversuche.....	86
4.3.1	Konzentrationsabhängige, mikrobiologische Alkylierung von SeIV.....	86
4.3.2	Alkylierung von SeIV in Abhängigkeit der Verfügbarkeit durch <i>A. alternata</i> und eine Umweltmischkultur	88
4.3.3	Mobilisierung von mineralisch gebundenem Selen (FeSe ₂) durch <i>Desulfovibrio gigas</i>	93
4.4	Schlussfolgerungen	98
5	ZUSAMMENFASSUNG	100
6	LITERATURVERZEICHNIS	101
7	ANHANG	113

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1 Eh-pH-Diagramm des Selen-Wasser-Systems [14]
- Abbildung 1.2 Prozesse des Selenkreislaufs in der Umwelt [12]
- Abbildung 1.3 Sorption von Se(IV) und Se(VI) in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Sorbentenkonzentration (verändert nach [36])
- Abbildung 1.4 Interaktionen von Mikroorganismen mit deren Umfeld (verändert nach [45])
- Abbildung 1.5 A - Challenger-Mechanismus zur Methylierung von Selen-Oxyanionen, B - Reduktion (1-2) und S-Adenosylmethionin-abhängige Methylierung (2-3) (mit 1 - Selenat, 2 - Selenit, 3 - Methylselenonsäure, 4 - Methylselenige Säure, 5 - Dimethylselenon, 6 - Dimethylselenige Säure, 7 - Dimethylselenid) [nach 66, 76]
- Abbildung 2.1 Schema des HG-AAS-Systems
- Abbildung 2.2 Se(IV)-Kalibrierung an der HG-AAS
- Abbildung 2.3 Se-Kalibrierung an der ICP-MS
- Abbildung 2.4 Aufbau des *Cryotrapping-Cryofocussing*-GC-ICP-MS-Systems (CT-CF-GC-ICP-MS)
- Abbildung 2.5 Kalibriergeraden zur Aminosäurequantifizierung (Gly - Glycin; Glu - Glutaminsäure, Lys - Lysin)
- Abbildung 2.6 DTA/TG-Analyse zur Quantifizierung der gebildeten Pilzbiomasse
- Abbildung 3.1 Chromatogramme der alkylierten Einzelstandards
- Abbildung 3.2 Chromatogramm der Alkyl-Selen-Standards inkl. GC-Temperaturprogramm
- Abbildung 3.3 Chromatogramm des Mischstandards (DMDS_{Se} / DEDSe)
- Abbildung 3.4 Se-Kalibrierung (CT-CF-GC-ICP-MS)
- Abbildung 3.5 Analysenfunktion zur Ermittlung der Nachweisgrenze, A: Chromatogramm der kleinsten injizierten Menge Se (1,5 pg Se als DMSe)
- Abbildung 3.6 Prozentuale Wiederfindung flüchtiger Organoselenverbindungen in unterschiedlichen Probenmatrizes

- Abbildung 3.7 Konzentrationsabhängige Alkylierung durch *A. alternata* (inkl. Standardabweichung (n = 3))
- Abbildung 3.8 Biomasse, pH-Wert und Redoxpotential (Eh) - Inkubation von *A. alternata* bei unterschiedlichen Selenitkonzentrationen im Nährmedium (inkl. Standard-abweichung, n = 3)
- Abbildung 3.11 Konzentrationsabhängige Alkylierung durch eine angereicherte Umweltmischkultur (inkl. Standardabweichung (n = 3), RT - Retentionszeit)
- Abbildung 3.12 Biomasse, pH-Wert und Redoxpotential (Eh) - Inkubation einer Umweltmischkultur bei unterschiedlichen Selenitkonzentrationen im Nährmedium (inkl. Standardabweichung (n = 3))
- Abbildung 3.13 Ermittlung des Ladungsnullpunktes in Abhängigkeit der Ionenstärke
- Abbildung 3.14 pH-abhängige Speziation der in 0,01 M NaCl gelösten Aminosäuren sowie Sorption dieser an Goethit (10 g Goethit L⁻¹), A - Glycin (0,55 g Glycin L⁻¹), B - Glutaminsäure (0,5 g Glu L⁻¹)
- Abbildung 3.15 pH-abhängige Adsorption von SeIV in 10mM NaCl-Lösung (A) und in einem mikrobiologischen Nährmedium (MEM II) (B)
- Abbildung3.16 Gegenüberstellung der analysierten Organoselenverbindungen während der Inkubation von *A. alternata* mit geochemisch gebundenem Selen (-ads Se) und frei verfügbarem Selen (-diss Se) (inkl. Standardabweichung, n = 3)
- Abbildung 3.17 Biomasse-, pH-Wert- und Redoxpotential-Entwicklung während der Inkubation von *A. alternata* mit unterschiedlich verfügbarem SeIV (inkl. Standardabweichung, n = 3)
- Abbildung 3.18 Gelöste Selengehalte während der Inkubation von *A. alternata* mit und ohne Goethit im System (inkl. Standardabweichung, n = 3)
- Abbildung 3.19 Alkylierte, leichtflüchtige Organoselenverbindungen während der Inkubation der angereicherten Umweltmischkultur mit frei verfügbarem, gelöstem SeIV (inkl. Standardabweichung, n = 3)

- Abbildung 3.20 Alkylierte, leichtflüchtige Organoselenverbindungen während der Inkubation der angereicherten Umweltmischkultur mit geochemisch gebundenem SeIV (inkl. Standardabweichung, n = 3)
- Abbildung 3.21 Biomasse-, pH-Wert- und Redoxpotential-Entwicklung während der Inkubation einer Umweltmischkultur mit adsorbiertem und frei verfügbarem SeIV (inkl. Standardabweichung, n = 3)
- Abbildung 3.22 Gelöste Selengehalte während der Inkubation einer Umweltmischkultur mit und ohne Goethit im System (inkl. Standardabweichung, n = 3)
- Abbildung 3.23 Angereicherte Alkylselenidmengen während der Inkubation von *D. gigas* im Beisein von FeSe₂ (inkl. Standardabweichung, n = 3)
- Abbildung 3.24 Biomasse-, pH-Wert- und Redoxpotential-Entwicklung während der Inkubation von *D. gigas* mit FeSe₂ (inkl. Standardabweichung, n = 3)
- Abbildung 4.1 Prozentuale Anteile verschiedener Selenspezies in unterschiedlichen Mikrokosmen (A - *A. alternata* (initial 100 % gelöstes Se); B - *A. alternata* (initial geochemisch gebundenes Se); C - Umweltmischkultur (initial 100 % gelöstes Se); D - Umweltmischkultur (initial geochemisch gebundenes Se)) (inkl. Standardabweichung, n = 3)
- Abbildung 4.2 Gelöste und alkylierte Selengehalte sowie gelöste Sulfatgehalte während der Inkubation von *D. gigas* im Beisein von 10 g FeSe₂ L⁻¹ (A - relative Anteile; B - relative Häufigkeiten) (inkl. Standardabweichung, n = 3)

Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1.1 Geographische Unterschiede in der Selenaufnahme ($\mu\text{g} / \text{d}$) bei Erwachsenen [11]
- Tabelle 1.2 Empfohlene tägliche Aufnahmemengen ($\mu\text{g} / \text{d}$) [11]
- Tabelle 1.3 Akute Toxizität verschiedener Selenverbindungen [77, 78, 79]
- Tabelle 1.4 Ausgewählte Selenverbindungen in biologischen Systemen und in der Umwelt [13, 16]
- Tabelle 2.1 Verwendete Gase
- Tabelle 2.2 Verwendete Flüssigkeiten / Lösungsmittel
- Tabelle 2.3 Verwendete Feststoffe
- Tabelle 2.4 Verwendete Organoselenverbindungen
- Tabelle 2.5 Methodische Details zur CT-CF-GC-ICP-MS-Analysentechnik
- Tabelle 2.6 Verdünnung der Alkylselenstandards
- Tabelle 2.7 Verdünnungsreihe des gasförmigen DMSe-Standards
- Tabelle 2.8 Verdünnung von DMSe und DMDS_e in Ethanol
- Tabelle 2.9 Zusammensetzung - V8-Juice-Agar-Medium (DSMZ-Medium Nr. 310)
- Tabelle 2.10 Zusammensetzung - Malzextraktmedium (MEM) (modifiziert nach [75])
- Tabelle 2.11 Zusammensetzung - Nährmedium *D. gigas* (DSMZ-Medium Nr. 63)
- Tabelle 2.12 Vitaminlösung (aus DSMZ-Medium Nr 141)
- Tabelle 2.13 Spurenelementlösung SL-10 (aus DSMZ-Medium Nr. 320)
- Tabelle 3.1 Ergebnisse der Standardidentifizierung (Retentionszeiten)
- Tabelle 3.2 Alkylierte Selenverbindungen nach Inkubation von *A. alternata* (\pm Standardabweichung (n = 3))
- Tabelle 3.3 Alkylierte Selenverbindungen nach Inkubation einer Umweltmischkultur, angereichert aus Deponiesickerwasser (\pm Standardabweichung (n = 3))
- Tabelle 3.4 Reaktionsgleichungen sowie zugehörige Dissoziationskonstanten [99] der zur Sorptionsmodellierung genutzten Selenit- und Aminosäurespezies
- Tabelle 3.5 Alkylierte Organoselenverbindungen bei der Inkubation von *A. alternata* in Abhängigkeit der Verfügbarkeit (\pm Standardabweichung (n = 3))

- Tabelle 3.6 Dominant vorkommende, alkylierte Organoselenverbindungen bei der Kultivierung der Umweltmischkultur in Abhängigkeit der Verfügbarkeit des Selens (\pm Standardabweichung (n = 3))
- Tabelle 3.7 Alkylierte Selenverbindungen während der Inkubation von *D. gigas* (\pm Standardabweichung (n = 3))
- Tabelle 3.8 Analysenwerte gelöster Selen- und Sulfatgehalte und alkyliertes Selen (\pm Standardabweichung (n = 3))

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
ads	adsorbiert
AES	Atomemissionsspektroskopie
AFS	Atomfluoreszenzspektroskopie
BSM	<i>Basic Stern Modell</i>
calc	kalkuliert, berechnet
CT-CF-GC-ICP-MS	<i>Cryotrapping-Cryofocussing-Gaschromatographie-Inductive-Coupled Plasma- Massenspektrometer</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DESe	Diethylselenid
DEDSe	Diethyldiselenid
DMSe	Dimethylselenid
DMDSe	Dimethyldiselenid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTA	Differentielle Thermoanalyse
EDL	Electrical Double Layer
EMDSe	Ethylmethyldiselenid
exp	experimentell
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GC	Gaschromatographie
HG-AAS	<i>Hydrid Generation – Atomabsorptionsspektroskopie</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
ICP-MS	<i>Inductive-Coupled Plasma- Massenspektrometer</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
MEM	Malzextraktmedium
MS	Massenspektrometer
OD	Optische Dichte
p.a.	pro analysi, zur Analyse
RT	Retentionszeit
RP	<i>reversed-phase</i>

SE	<i>size-exclusion</i>
TG	Thermogravimetrie
WHO	<i>World Health Organization</i>

1 Einleitung

Spurenelemente spielen eine wichtige Rolle für das Leben auf unserem Planeten. Dabei reicht das Spektrum von essentiellen Nutzen für einige Lebewesen bis hin zur Toxizität. Manche dieser Spurenelemente zeigen auch beide Effekte. D.h., es ist nicht ungewöhnlich, dass Spurenelemente in bestimmten Mengen lebensnotwendig sind, in höheren Dosen allerdings eine toxische Wirkung entwickeln. Unterschiedliche Einflüsse auf Lebewesen werden aber nicht nur durch die Dosis, sondern auch durch die vorliegende chemische Spezies und deren spezies-spezifischen Eigenschaften bestimmt.

Der Begriff Spezies oder Speziation wurde zuerst in der Evolutionslehre verwendet. In der Biologie werden dabei genetisch unterschiedliche Arten beschrieben. Ausgehend von diesem Konzept haben Geo- und Umweltchemiker den Begriff der Speziation übernommen, um Transformationen, die in Elementkreisläufen ständig stattfinden, zu beschreiben. Ein anschauliches Beispiel für solche Umwandlungen ist die Verwitterung von Gesteinen und die anschließende Auswaschung und Verteilung der Elemente bzw. der Elementspezies in Böden und Gewässern. Im analytischen Sinne wird der Begriff der Speziation im Zusammenhang mit der Verteilung chemischer Formen eines Elementes in bestimmten Proben oder Matrices verwendet. Die Speziationsanalyse bezeichnet das Identifizieren verschiedener chemischer Formen eines Elementes und die Messung ihrer Verteilung.

Die *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) bezeichnet chemische Verbindungen, die sich in ihrer isotopischen Zusammensetzung, ihrer Konformation, ihrer Wertigkeit bzw. ihrem Oxidationszustand und in der Natur ihrer komplex- oder kovalentgebundenen Substituenten unterscheiden, als unterschiedliche chemische Spezies [1]. Daraus ergeben sich folgende Definitionen:

Chemische Spezies: spezielle Form eines Elementes, definiert in der Isotopenzusammensetzung, der Wertigkeit bzw. dem Oxidationszustand und/oder der Komplex- bzw. Molekularstruktur

Speziations-Analyse: Identifikation und/oder Quantifizierung einer oder mehrerer individueller chemischer Spezies in einer Probe

Elementspeziation: Verteilung eines Elementes in verschiedenen chemischen Spezies in einem System

Diese Definitionen stellen den Mittelpunkt der Arbeit des interdisziplinären Graduiertenkollegs 826 der Deutschen Forschungsgemeinschaft „Spurenanalytik von Elementspezies: Methodenentwicklungen und Anwendungen“ dar, in dessen Rahmen die hier vorliegende Arbeit durchgeführt worden ist.

Zum Thema „Speziation mikrobiologisch alkylierter, leichtflüchtiger Selenverbindungen in Abhängigkeit der geochemischen Verfügbarkeit des Selens“ werden im Folgenden geochemische, mikrobiologische und chemisch-analytische Aspekte betrachtet.

1.1 Das Spurenelement Selen

Selen, benannt nach der griechischen Mondgöttin Selene, wurde 1817 von Jöns Jakob Berzelius entdeckt. Im Periodensystem der Elemente findet man Selen in der Gruppe 16 mit der Ordnungszahl 34 und dem Symbol Se. Obwohl es chemische und physikalische Eigenschaften sowohl von Metallen wie auch Nichtmetallen aufzeigt, wird es gewöhnlich zu den Nichtmetallen gezählt [2]. In der Vergangenheit wurde Selen vor allem bei der Verhüttung von Kupfersulfiderzen freigesetzt und gewonnen. Neuerdings stellen Anodenschlämme aus der elektrolytischen Kupferaufbereitung die Hauptquelle dar. Natürlich kann Selen in einigen seltenen Mineralen, wie Crookesit ($\text{Cu}_7(\text{Tl,Ag})\text{Se}_4$) oder Clausthalit (PbSe) gefunden werden. Amorphes Selen kann eine rötliche bis schwarze, in kristalliner Struktur dunkelrote Färbung zeigen, wobei die stabilste Form, das kristallin hexagonale Selen in metallischem Grau erscheint. Chemisch ist Selen in die Schwefelfamilie einzuordnen, wobei es dem Schwefel sowohl in seinen verschiedenen auftretenden Formen wie auch in dessen Verbindungen sehr ähnelt. Anwendung findet Selen in der Photovoltaik- und Halbleiterindustrie, bei der Produktion von Photozellen, als Belichtungsmesser für die Photographie und beim Bau von Solarzellen. Durch die unterschiedlichen Färbungen wird es weiterhin in der Glasindustrie zum kolorieren von Gläsern und Emaille verwendet [3].

1.1.1 Selen im Fokus der Medizin- und Ernährungswissenschaften

Im medizinischen und ernährungswissenschaftlichen Umfeld erlangte Selen ab 1973 eine große Bedeutung, als Rotruck und Koautoren [4] zeigen konnten, dass Selen Zellen gegenüber oxidativem Stress schützt [5]. Bei selenhaltigen Proteinen mit Seleno-Cystein (21. Aminosäure) im aktiven Zentrum fungiert Selen als redox-sensitives Zentrum. Ein Beispiel dafür ist Reduktion von Nukleotiden während der DNA-Synthese durch das Selenoenzym Thioredoxin-Reduktase. Es hilft, den intrazellulären Redox-Status zu kontrollieren [6]. Das bekannteste Beispiel dieser redox-sensitiven Wirkungsweise ist die Reduktion von Wasserstoffperoxid und schädlichen Lipid- und Phospholipidhydroperoxiden zu weniger toxischen Verbindungen, wie Alkohol oder Wasser, wodurch z. B. die Zellmembran stabilisiert

und die Prostacyclin-Synthese geschützt wird [7]. Weiterhin werden durch die reduktive Wirkung oxidative Schäden an Biomolekülen wie z. B. Lipiden, Proteinen und der DNA vermindert und das damit verbundene wachsende Risiko einer Erkrankung an Arteriosklerose oder Krebs verringert [7]. Mit dem Selenstatus des menschlichen Organismus werden weitere gesundheitliche Effekte in Verbindung gebracht, wie z. B. Auswirkungen auf das Immunsystem und die Testosteron-Synthese sowie die Bildung und Entwicklung von Spermatozoen. Auch eine einwandfreie Hirnfunktion ist abhängig von einem ausgeglichenen Selenstatus [8].

Primär gelangt Selen aus dem Boden in die Nahrungskette durch die Aufnahme von Pflanzen. Sowohl Über- als auch Unterversorgung werden hiermit durch die geographische Lage impliziert. Niedrige Bodenselengehalte in vulkanischen Regionen, saure Böden und die pedogene Komplexbildung des Selens, häufig mit Eisen oder Aluminium, reduzieren dabei die Aufnahme durch Pflanzen und die Anreicherung in der Nahrungskette [9]. Dieser geographische Bezug wird besonders deutlich an zwei in China regional auftretenden Krankheiten, die Keshan-Krankheit, eine endemisch auftretende Herzmuskelerkrankung und die Kashin-Beck-Krankheit, eine Arthritis. Diese Krankheiten sind erstmalig in den Regionen Keshan und Kashin mit extrem niedrigen Selenkonzentrationen in den Böden aufgetreten. Dabei gelten Selen-Konzentrationen von $< 10\text{ng Se /g}$ Getreide und $< 3\text{ng Se /g}$ Bodenwasser als Indizes zur Definition von Selenmangelböden [10]. Weltweit treten große geographische Unterschiede in den Mengen an Selen auf, welche mit der Nahrung aufgenommen werden (Tabelle 1.1). Deshalb empfehlen die *World Health Organization* (WHO) und die *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) eine tägliche Aufnahmemenge von Selen bei gesunden Erwachsenen von 25 - 34 μg (Tabelle 1.2).

Tab. 1.1: Geographische Unterschiede in der Selenaufnahme ($\mu\text{g}/\text{d}$) bei Erwachsenen [11]

Region / Land	Se-Aufnahme (Mittelwert \pm Standardabweichung oder Spannweite)
China (Keshan)	3 - 11
China (Kashin)	2,6 - 5,0
Finnland (vor / nach Düngung)	26 / 56
Großbritannien (1995)	33
Deutschland	38 - 48
USA	80 \pm 37
USA (Se-reiche Regionen)	216
China (Se-reiche Regionen)	1338

Tab. 1.2: Empfohlene tägliche Aufnahmemengen von Selen ($\mu\text{g}/\text{d}$) [11]

Altersgruppe	Empfohlene tägliche Aufnahmemenge
Kleinkinder und Kinder (0 – 9 Jahre)	6 - 21
Heranwachsende (10 -18 Jahre) ♀ / ♂	26 / 32
Erwachsene (19 - 65 Jahre) ♀ / ♂	26 / 34
Erwachsene (65 Jahre und älter) ♀ / ♂	25 / 33

1.1.2 Selen in der Umwelt

In der Natur sind keine substantiellen Vorkommen, die sich zur ökonomischen Nutzung/Gewinnung von Selen eignen würden, vorhanden. Hauptsächlich findet man Selen aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeit zum Element Schwefel in sulfidischen Erzen, wie z. B. Pyrit oder in Form von Metallseleniden [12].

Wie Schwefel kann auch Selen in vier verschiedenen Oxidationszuständen auftreten. Speziation, Konzentration und die Bildung von unterschiedlichen Verbindungsassoziationen des Selens hängen im Wesentlichen von den pH- und Redoxbedingungen, der Löslichkeit der Salze, der Verfügbarkeit und Komplexierungsfähigkeit von gelösten und festen Liganden und der biologischen

Aktivität ab. Abbildung 1.1 zeigt die auftretenden Selenspezies unter verschiedenen pH- und Redoxbedingungen.

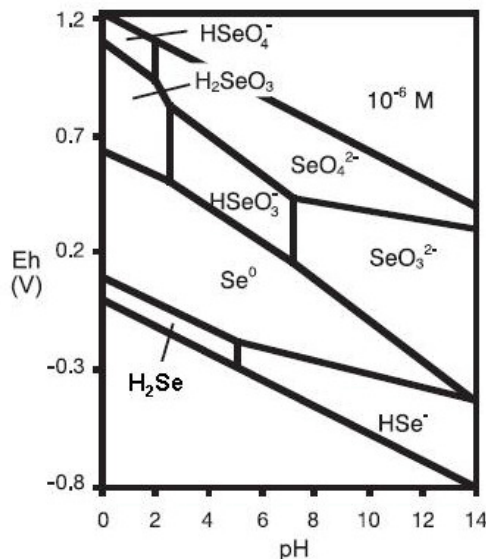


Abb. 1.1: Eh-pH-Diagramm des Selen-Wasser-Systems [14]

Selenide (Se^{2-}) sind in reduzierten, sauren Milieus als Selenwasserstoff, ein faulig-riechendes, giftiges Gas oder als Metallselenide in den bereits erwähnten sulfidischen Erzen (Fe, Cu, Pb) zu finden. Als schwache Säure in Wasser gelöst, kann Selenwasserstoff sehr leicht zu elementarem Selen oxidiert werden, wohingegen die Metallselenide schwerlöslich und relativ oxidationsresistent sind [12,13]. Mikrobiologische Prozesse, die ebenfalls zur Bildung von Seleniden führen, werden in Kapitel 1.2 besprochen.

Elementares Selen $\text{Se}(0)$, welches kristallin oder amorph vorliegen kann, findet man in reduzierenden Kompartimenten. Allerdings sind diese Formen nur sehr schwer wasserlöslich und Oxidations- sowie Reduktionsreaktionen dieser Feststoffe finden nur verlangsamt statt. In sauerstoffreichen Milieus, beispielsweise Gewässer oder gut durchlüftete Böden, findet man Selen in vier- und sechswertiger Form als Selenit (SeO_3^{2-}) und Selenat (SeO_4^{2-}). Im Vergleich zu den Seleniden und dem elementaren Selen sind Verbindungen (Salze) dieser Selenspezies sehr gut wasserlöslich, was sie zu mobilen, bioverfügbaren Komponenten im System Umwelt macht.

Verschiedenste biologische und geochemische Prozesse, deren Auftreten maßgeblich von der vorliegenden Speziation des Selens abhängt, führen zur Verteilung, Umwandlung und Anreicherung von Selen in der natürlichen Umwelt (Abbildung 1.2). Solche sind Bodenauswaschungsprozesse, Transport mit dem Grundwasser, Aufnahme und Freisetzung durch Mikroorganismen, Pflanzen und Tiere, Adsorption und Desorption sowie Reduktions- und Oxidationsreaktionen.

Die primäre Quelle stellt die Verwitterung von Gesteinen dar, wobei Kalk- und Sandsteine eher niedrigere Konzentrationen ($< 0.1 \text{ mg / kg}$) und tonhaltige Sedimentgesteine (*shales*) höhere Konzentrationen (0.6 mg / kg) enthalten [12].

Weiterhin wird Selen durch vulkanische Aktivität in die Atmosphäre emittiert. Daraus ergeben sich natürliche Gehalte an Selen in den verschiedenen Umweltkompartimenten.

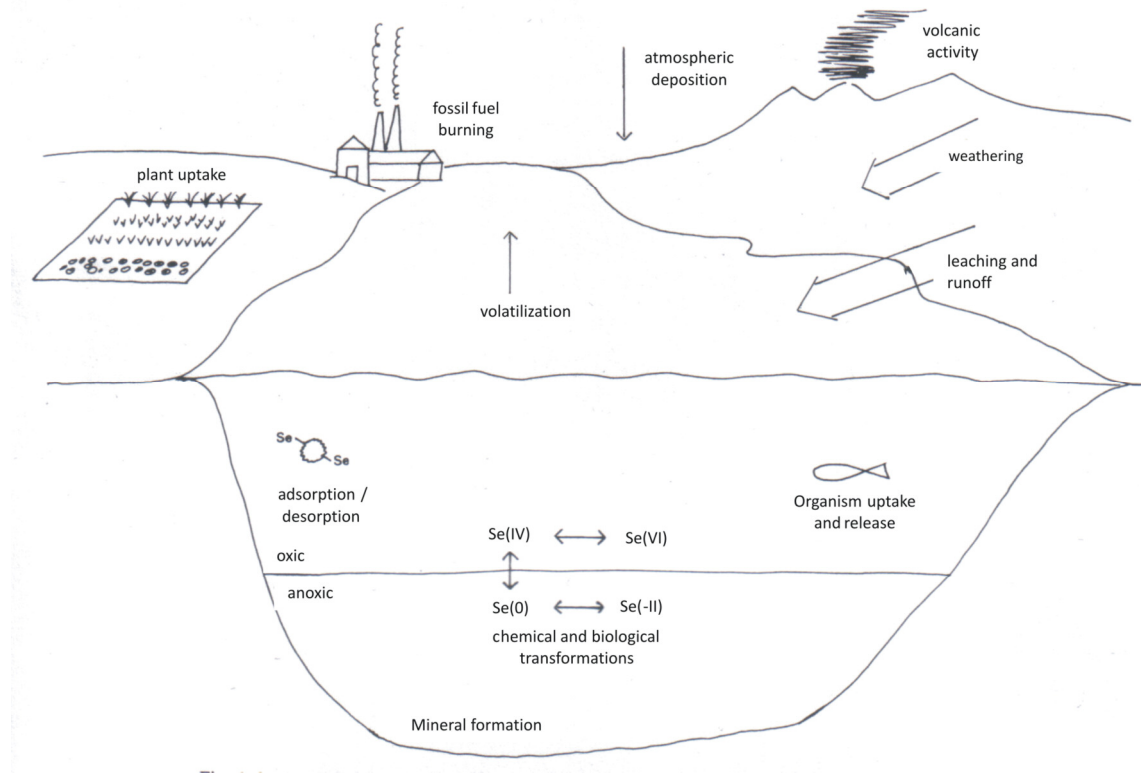


Abb. 1.2: Prozesse des Selenkreislaufs in der Umwelt [12]

In Böden schwanken die Selenkonzentrationen zwischen < 100 ng/g in Teilen von China und Finnland und 100 $\mu\text{g/g}$ in Irland und einigen US-amerikanischen Staaten. In Oberflächengewässern sind Gehalte zwischen < 1 ng/L und 10 ng/L gemessen worden, in Grundwässern Werte zwischen 0.1 und 400 $\mu\text{g/L}$. Abhängig von den geochemischen Faktoren wurden auch Konzentrationen bis zu 6 mg/L gefunden [13, 15].

Anthropogen wird Selen vielfältig in verschiedene Ökosysteme eingebracht. Neben der bereits erwähnten Verbrennung von Kohle und Öl, welche relativ hohe Selenkonzentrationen ($2 - 4,3$ $\mu\text{g/g}$) [16] enthalten, kommt es auch bei zahlreichen anderen industriellen Aktivitäten, wie der Verhüttung von Metallerzen, der Energiewirtschaft, der Müllverbrennung oder der Düngemittelnutzung in der Landwirtschaft zu erheblichen Emissionen [17].

Im Zusammenhang mit teilweise sehr hohen Konzentrationen in Gewässern und Böden und dem im Kapitel 1.1.1 beschriebenen Verhalten des Selen als essentielles Spurenelement sind verschiedene Strategien zur Immobilisierung oder auch zur Entfernung des Selen aus dem Umweltkompartiment beschrieben. Unter dem Begriff *bioremediation* wird dabei alles zusammengefasst, was durch natürliche Umwandlungsprozesse in biologischen Systemen dazu führt, ein kontaminiertes Ökosystem „zu reinigen“. Zum Einsatz kommen dabei Pflanzen [18] oder Algen [19] sowie Mikroorganismen, wie Bakterien und Pilze [20, 21]. Die Strategien reichen hierbei von der Extraktion aus den Lebensräumen (Boden, Sediment, Wasser) und der Akkumulation in der Biomasse bis hin zur Volatilisierung (Kapitel 1.2.1) und der damit verbundenen Entfernung aus dem Substrat.

Die geochemische Sorption im Zusammenhang mit der Mobilität von Spurenelementen ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen, die im folgenden Kapitel betrachtet werden.

1.1.3 Geochemisches Sorptionsverhalten des Selen

Adsorption ist definiert als „die Nettoanreicherung von Stoffen an der Grenzfläche zwischen einem Feststoff und der ihn umgebenden flüssigen Phase“ [22]. Diese Reaktion ist von enormer Wichtigkeit, da hierdurch das Schicksal und die Mobilität des Spurenelementes, des Kontaminanten oder des potentiellen Nährstoffs reguliert werden. Der Begriff Kontamination taucht dabei allerdings nicht nur in Bezug auf überhöhte Se-Konzentrationen in Gewässern und Böden auf. Auch im Zusammenhang mit atomaren Abfällen und deren Lagerung wird Selen erwähnt, da neben den stabilen Isotopen (^{74}Se , ^{76}Se , ^{77}Se , ^{78}Se , ^{80}Se , ^{82}Se) auch radioaktive Isotope, hauptsächlich ^{79}Se (Halbwertszeit 6.5×10^4 Jahre) existieren, die in atomaren Endlagern auftreten [2, 23, 24, 25]. Diese können bei der Freisetzung in die Biosphäre, z. B. durch den Transport im Grundwasser zur Erhöhung der kumulativen Dosis an Radioaktivität in der Umwelt beitragen.

Aufgrund der nichtvorhandenen oder nur sehr geringen Mobilität von anorganischen Seleniden und elementarem Selen werden in der Literatur hauptsächlich Adsorptionsphänomene für die mobilen Se(IV)- und Se(VI)-Spezies in wässrigen Systemen beschrieben. Dabei wird vor allem der Einfluss des pH-Wertes [26, 27],

der Reaktionszeit [28, 29] und des Oxidationszustandes betrachtet. Neben den physiko-chemischen Faktoren werden auch verschiedene Materialien eingesetzt, um das Sorptionsverhalten von Selen-Oxyanionen zu studieren. Verwendet wurden beispielsweise das Tonmineral Bentonit [30], der Hydroxyapatit [23] und oxidbeschichtete Sande [27, 28] sowie natürliche Böden [31, 32]. Im Fokus der Forschung steht besonders der Einfluss von Oxiden, wie Eisen-, Mangan- und Aluminiumoxide [23, 33, 34], die durch ihr häufiges Auftreten in Böden, ihre große spezifische Oberfläche (50 - 150 m²/g für Goethit und Hämatit, 300 - 400 m²/g für Ferrihydrit) sowie durch das Auftreten pH-abhängiger, variabler Ladungen (Ladungsnullpunkte: Mn-Oxide (pH 3 - pH 5), Fe- und Al-Oxide (pH 7 – pH 10) verstärkt zur Anionensorption beitragen können [35].

Abbildung 1.3 zeigt das Adsorptionsverhalten von Se(IV)- und Se(VI)-Oxyanionen in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Menge an Sorbent. Hierbei wird der starke Einfluss des pH-Wertes sichtbar, wobei mit steigendem pH-Wert die Sorption beider Spezies abnimmt. Auch der Einfluss des Oxidationszustandes wird deutlich. Se(IV) sorbiert im Vergleich zu Se(VI) über einen breiteren pH-Bereich.

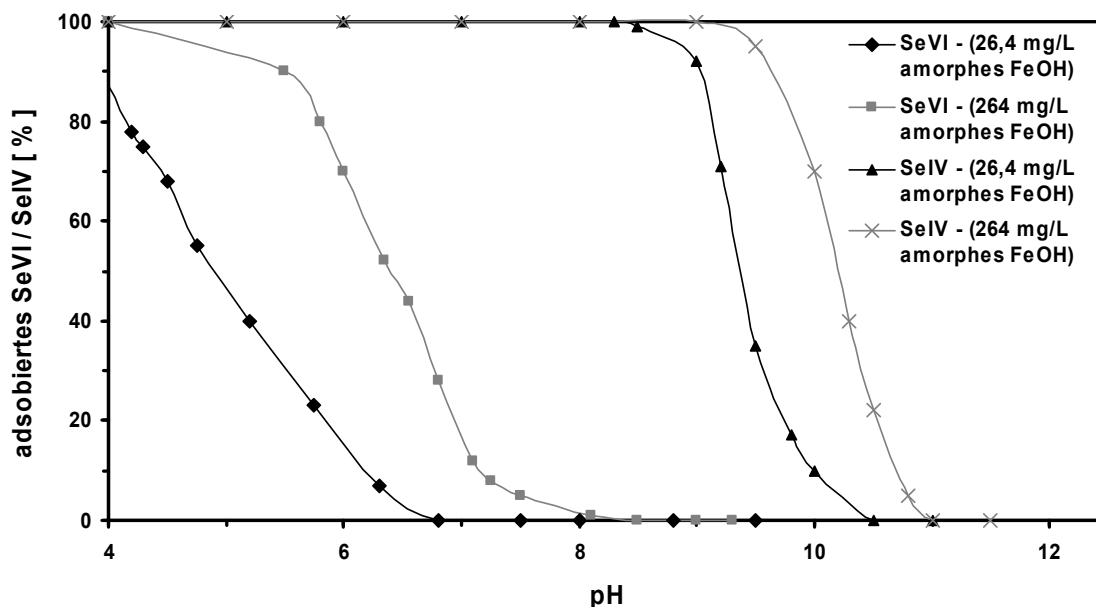


Abb. 1.3: Sorption von Se(IV) und Se(VI) in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Sorbentenkonzentration (verändert nach [36])

Erklärt wird dieses unterschiedliche Sorptionsverhalten, d.h. schwächere Sorption von Se(VI) im Vergleich zu Se(IV) mit der Ausbildung unterschiedlicher Oberflächenkomplexe. Hayes und Koautoren [37] fanden unter Verwendung der Röntgenabsorptionsspektroskopie innersphärische, bidentate Oberflächenkomplexe im Falle von Selenit und außersphärische, hydratisierte Komplexe für Selenat. Spätere Arbeiten zeigten allerdings, dass eine solche Verallgemeinerung der Oberflächenkomplexierung nicht ganz zutreffend ist [29, 38]. Vielmehr ist es so, dass Selenat bei sauren pH-Werten $< \text{pH } 6$ innersphärische, bidentate und außersphärische, monodentate Komplexe mit den Oxidoberflächen bildet. Bei pH-Werten oberhalb $\text{pH } 6$ nimmt der Anteil innersphärischer Komplexe stark ab und es werden dann nahezu ausschließlich außersphärische Komplexe gebildet [39, 40]. Gründe dafür liegen in der unterschiedlichen Molekül- bzw. Ionenstruktur und der damit verbundenen unterschiedlichen Koordination der Ionen (SeO_3^{2-} - Koordinationszahl 3; SeO_4^{2-} - Koordinationszahl 4). Die zu beobachtende stärkere Adsorption von Selenit gegenüber Selenat ist also damit begründet, dass dieses zum einen bidentat mit der Oberfläche interagiert und aufgrund der sehr kurzen Distanz zur Oberfläche zusätzlich verstärkte Interaktionen mit co-adsorbierten Protonen stattfinden [41].

Oxidationszustand, pH-Wert und die Art des Sorbenten bestimmen somit wesentlich das Sorptionsverhalten von Selen-Oxyanionen. Aber auch die Gegenwart von anderen anionischen Spezies, beispielsweise PO_4^{2-} , NO_3^{2-} , SO_4^{2-} oder organischer Substanz, wie Huminsäuren, können die Sorption an verschiedenen Oberflächen erheblich beeinflussen [42, 43]. Mit der Anwesenheit dieser um Bindungsplätze konkurrierender Anionen verringert sich die Adsorption von Se(IV) und Se(VI), wobei der Einfluss der einzelnen Anionen unterschiedlich ist. Phosphat-Ionen zeigen hierbei den größten negativen Effekt auf die Selenitsorption, gefolgt von Nitrat- und Sulfat-Ionen. Das Vorhandensein von Huminsäure im Sorptionssystem hemmt ebenfalls die Sorption und erhöht damit die Mobilität von Se(IV). Hierbei nimmt die Huminsäure zunächst Bindungsplätze auf der Oberfläche ein. Mit steigendem pH-Wert dissoziieren an der Oberflächenkomplexierung unbeteiligte funktionelle Gruppen, wie Carboxyl- und Phenylgruppen, und die zunehmende negative Ladung verhindert die Sorption von anionischen Spezies.

Die Mehrheit der bisher durchgeführten Studien beschäftigt sich mit abiotischen Einflussfaktoren, die die Mobilität von Selen und anderen Spurenelementen bestimmen. Dabei wurden die biologischen Faktoren kaum berücksichtigt. Im Folgenden werden deshalb vor allem mikrobiologische Prozesse betrachtet, welche die Freisetzung von Spurenelementen beeinflussen.

1.2 Mikrobiologische Prozesse

Mikroorganismen spielen aufgrund ihrer ubiquitären Verbreitung eine wesentliche, wenn nicht die entscheidende Rolle in den Stoffkreisläufen der Ökosysteme. Charakteristisch für diese Organismen ist die scheinbar unendliche Adaptionfähigkeit an verschiedenste Umweltbedingungen und die damit verbundene Fähigkeit zur Biosynthese sowie zum Abbau unterschiedlichster Substanzen. Beispiele dafür finden sich in der medizinischen Biotechnologie, beispielsweise bei der Produktion von Medikamenten genauso wie in der Sanierungsarbeit zum Abbau von organischen Schadstoffen oder der Gewinnung von Metallen in mikrobiologischen Erzlaugungsprozessen. Vorkommend als planktonische Einzeller, die sich passiv oder aktiv bewegend, oder als sogenannter Biofilm auf einer Oberfläche anhaftend, kontrollieren mikrobiologische Reaktionen teilweise oder vollständig die chemische Zusammensetzung vieler, sehr verschiedener Umweltkompartimente, wie Sedimente, Böden und Gewässer (Oberflächen- und Grundwässer). Die Energie zur Aufrechterhaltung der metabolischen Prozesse wird durch die Oxidation organischer und anorganischer Kohlenstoffverbindungen bereitgestellt, wobei dazu Elektronenakzeptoren benötigt werden. Bei Verfügbarkeit von reduzierbaren, externen Elektronenakzeptoren, wie beispielsweise Sauerstoff, Stickstoff (NO_3^{2-}), Schwefel (SO_4^{2-}), Eisen(III) oder Mangan(IV) spricht man von aeroben und anaeroben Atmungsprozessen. Bei sogenannten Gärungsprozessen werden Abbauprodukte der ursprünglichen Energie- bzw. Kohlenstoffquelle dafür verwendet.

Abbildung 1.4 fasst die Prozesse, welche von Mikroorganismen beeinflusst werden, zusammen. Diese Reaktionen können dabei mobilisierend als auch immobilisierend wirken, wobei dies wiederum abhängig vom Typ der Reaktion und dem Status der mikrobiellen Gemeinschaft ist.

Der Begriff Biosorption beschreibt die stoffwechselunabhängige Anlagerung und Akkumulation von Spurenelementen auf der Oberfläche von Zellen. Dabei können lebende als auch tote Zellen gleichermaßen eine Rolle spielen. Verantwortlich für die Bindung sind reaktive Gruppen, wie Carboxyl-, Hydroxyl-, Phosphat- und Aminogruppen auf der Zellwandoberfläche [44]. Bei freibeweglichen, planktonischen Mikroorganismen, die aufgrund ihrer Größe als große kolloidale Partikel betrachtet werden können, wirkt sich die Sorption mobilisierend aus, da sorbierte Substanzen

durch aktive oder passive Bewegung der Mikroorganismen transportiert werden [45]. Biofilme sind auf einer Oberfläche adherierte Zellen, welche in eine polymere, extrazelluläre Matrix eingeschlossen sind [46]. Diese wirken dagegen eher immobilisierend, da die „klebrige“, extrazelluläre Substanz und die dreidimensionale Struktur eines Biofilms die Anheftung und Akkumulation von Stoffen verschiedenster Art unterstützen.

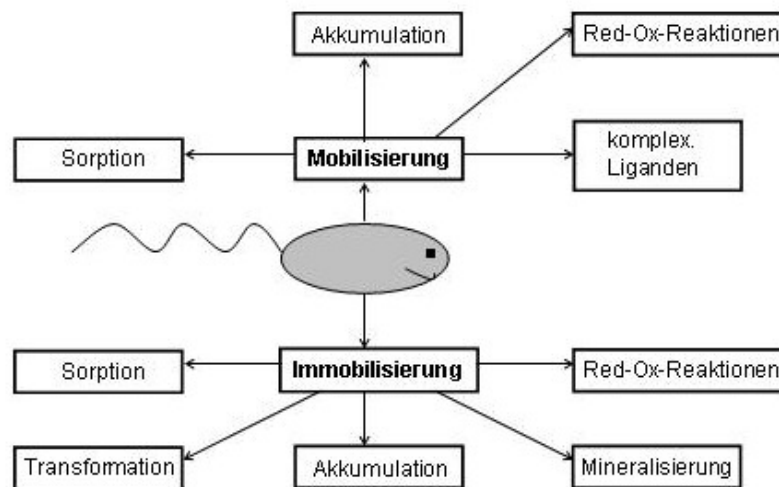


Abb. 1.4: Interaktionen von Mikroorganismen mit deren Umfeld (verändert nach [45])

Im Gegensatz zur unspezifischen, stoffwechselunabhängigen Biosorption werden Spurenelemente bei der Bioakkumulation spezifisch mit Hilfe energieabhängiger Aufnahmesysteme in die Zelle transportiert, wobei hier durchaus gezielt physiologisch wichtige Spurenelemente bevorzugt werden. Allerdings kommt es auch zur Aufnahme von nicht-essentiellen Metallen, was weitläufig als Verwechslungsreaktion angenommen wird [47]. In einigen Fällen wurden auch eine passive Aufnahme und damit eine intrazelluläre Akkumulation beobachtet, welche wahrscheinlich durch Diffusionsvorgänge angetrieben wurde.

Biomineralisierung bezeichnet die biologisch induzierte Bildung von Mineralen. Hierbei beeinflusst die Stoffwechselaktivität eines Organismus bzw. einer Organismengemeinschaft die Bedingungen in der lokalen Umwelt oder der ökologischen Nische derart, dass es zur extrazellulären Ausfällung von

Mineralphasen kommt [48]. Das wahrscheinlich älteste Beispiel hierfür ist die Bildung von Stromatolithen (CaCO_3) durch zuerst phototrophe Bakterien und später sauerstoffbildende Cyanobakterien [49]. Weitere Phänomene in diesem Zusammenhang sind die Ausbildung von Eisen(III)-oxiden zum Beispiel durch das Bakterium *Gallionella ferruginea* [45] oder die Bildung von Manganoxiden [48].

Die Biomineralisation und -transformation sind im Wesentlichen an die Redoxbedingungen im jeweils vorliegenden System geknüpft. Die Fähigkeit zur Nutzung verschiedenster Substrate als Elektronendonator, beispielsweise Fe(II) durch den chemolithotrophen Organismus *Thiobacillus ferrooxidans* [49], und der alternative Gebrauch von unterschiedlichen Elektronenakzeptoren beeinflussen entscheidend die Redoxbedingungen in unterschiedlichen Umweltkompartimenten. Diese mikrobiologisch induzierten Redoxverhältnisse beherrschen damit maßgeblich die Mobilität von Metallen, Spurenelementen und anderen Schadstoffen, wobei sie durch die Auflösung von Sorbenten, z. B. bei der Reduktion von Eisen(III) oder Mineralen freigesetzt werden. Im Gegensatz dazu können diese Substanzen durch die Bildung von Sorbenten, die Biosynthese von Mineralen bzw. durch Co-Präzipitation während der Mineralphasenbildung immobilisiert werden.

Die mikrobiologischen Transformationen zwischen den verschiedenen Selen-Spezies sind sehr vielseitig. So ist zum Beispiel die Reduktion von Selen-Oxyanionen zu elementarem Selen durch verschiedene Mikroorganismen, wie *Bacillus subtilis* [50] oder *Rhodospirillum rubrum* [51] Gegenstand zahlreicher Studien, in denen auch Bioakkumulations- und Biomineralisierungsprozesse betrachtet werden [z. B. 52, 53, 54, 55]. Verbunden mit der Reduktion von Selen-Oxyanionen sind auch Atmungsprozesse beschrieben, wobei Se(IV) und Se(VI) als alternative Elektronenakzeptoren zum Beispiel von *Thauera selenatis* [56] oder *Bacillus selenitireducens* [57] genutzt werden können. Die mikrobiologisch induzierte Oxidation von elementarem Selen zu Selenit oder Selenat in Böden kann ebenfalls in geringerem Umfang stattfinden [58]. Dowdle und Oremland [59] beobachteten die Oxidation von Selen (0) in Böden und in verschiedenen bakteriellen Kulturen (*Thiobacillus* sp., *Leptothrix* sp.), wobei sie Reaktionsraten gegenüber der dissimilatorischen Se(VI)-Reduktion fanden, die drei bis vier Größenordnungen geringer waren.

Im Zusammenhang mit der vergleichsweise geringen Toxizität von elementarem Selen und den Seleniden gegenüber den Selen-Oxyanionen, welche auf die

schlechte Wasserlöslichkeit und Bioverfügbarkeit zurückzuführen ist, sind die mikrobiologischen Transferprozesse auch Inhalt von biologischen Sanierungsstudien. Dabei spielt die Immobilisierung durch Bildung von elementarem Selen und Metallseleniden als auch die Mobilisierung durch Bildung flüchtiger Organoselenverbindungen (Kapitel 1.2.1) oder H_2Se eine wichtige Rolle [21, 60].

1.2.1 Biomethylierung

Biomethylierung ist ein enzymatisch katalysierter Prozess, bei dem Organometallverbindungen entstehen, welche durch eine chemische Bindung zwischen dem Metall und dem Kohlenstoff einer Methylgruppe charakterisiert sind. Dieses Phänomen wurde in Böden, hauptsächlich allerdings in Sedimenten von Estuaren, Häfen, Flüssen, Seen und Ozeanen beobachtet. Die Bindung von Methylgruppen an Metalle (z. B. Quecksilber) oder Halbmetalle (z. B. Selen, Tellur, Antimon) verändert die chemischen und physikalischen Eigenschaften, was wiederum direkt mit der Änderung der Toxizitätseigenschaften zusammenhängt. Mit Ausnahme von Arsen und Selen wird durch Biomethylierungsprozesse die Toxizität der Metall(oid)e teilweise stark erhöht, da die Methyl-derivate lipophiler und damit biologisch aktiver sind. Eine Vielzahl von Mikroorganismen ist in der Lage Metall(oid)e zu biomethylieren, wobei anaerobe Bakterien gegenüber aeroben und fakultativ anaeroben Bakterien sowie Pilzen und Algen die Hauptrolle einnehmen. Höhere Organismen sind mit Ausnahme der Bildung von Vitamin B_{12} , welches eine Methyl-Cobalt-Bindung enthält, nicht in der Lage, Metalle zu methylieren. Metalloide wie Arsen und Selen können sie dagegen methylieren [61, 62, 63].

Wie auch bei der Biomethylierung organischer Moleküle, wie Proteine, Polysaccharide und Fettsäuren, werden auch Metall(oid)e mittels der hierfür bekannten drei verschiedenen Methylendonoren methyliert, wobei das S-Adenosylmethionin gegenüber dem Methylcobalamin und dem N-Methyltetrahydrofolat vermehrt genutzt wird [64]. Im Falle von S-Adenosylmethionin und N-Methyltetrahydrofolat erfolgt der biochemische Transfer der Methylgruppe in Form eines Radikals ($\text{CH}_3 \bullet$) oder als Carbonium-Ion (CH_3^+). Das setzt voraus, dass das empfangende Atom/Ion ein freies Elektronenpaar zur Verfügung stellen kann. Dies wurde zuerst bei der Methylierung von Arsen und später auch bei Selen und Tellur beobachtet [65, 66]. Demgegenüber

wird bei der Verwendung von Methylcobalamin die Methylgruppe als Carb-Anion (CH_3^-) transferiert, was somit einen positiv geladenen Akzeptor erfordert. Methylcobalamin wird bei der Methylierung von Quecksilber genutzt, kann aber auch bei der Biomethylierung von Blei, Zinn, Palladium, Platin, Gold und Thallium involviert sein [64].

Es wird angenommen, dass die Biomethylierung und die damit verbundene Volatilisierung von Metall(oid)en im biogeochemischen Kreislauf dieser Elemente eine entscheidende Rolle spielt. Leichtflüchtige Methyl-derivate sind daher in verschiedenen natürlichen wie auch anthropogen beeinflussten Umwelt-kompartimenten zu finden. Beispiele hierfür sind Geothermalstätten, marine Sedimente, Böden, Abwasseraufbereitungsanlagen und Abfalldeponien [67, 68, 69, 70, 71]. Im Folgenden wird nun speziell auf die Biomethylierung von Selen eingegangen.

1.2.2 Biomethylierung von Selen

Rosenheim [72] beobachtete 1902 in England während der Durchführung eines biologischen Tests mit dem Schimmelpilz *Scopulariopsis brevicaulis* zur Bestimmung von Arsen in verschiedenen Substanzen einen „stark unangenehmen“ Geruch, der bei ausschließlicher Anwesenheit von Arsen nicht auftrat. Er nahm an, dass dies durch die Präsenz von Selen verursacht wurde, was seine folgenden Experimente mit gelöstem Selen bestätigten. Dieser Geruch konnte 1934 anhand einer Reihe nass-chemischer Analyse-Reaktionen als Dimethylselenid identifiziert werden [73]. Einige Zeit später schlugen Challenger und seine Kollegen in Leeds einen Reaktionsmechanismus vor, der bis heute anerkannt ist und Challenger-Mechanismus genannt wird [66] (Abbildung 1.5 A). Wie auch bei der Methylierung von Arsen handelt es sich hierbei um eine Wechselfolge von Reduktions- und Methylierungsreaktionen, hauptsächlich im Beisein von S-Adenosylmethionin als Methylgruppenspendor (Abbildung 1.5 B), wobei einige Autoren auch Methylcobalamin als Donor während der Biosynthese von volatilen Organoselenverbindungen erwähnen [74, 75].

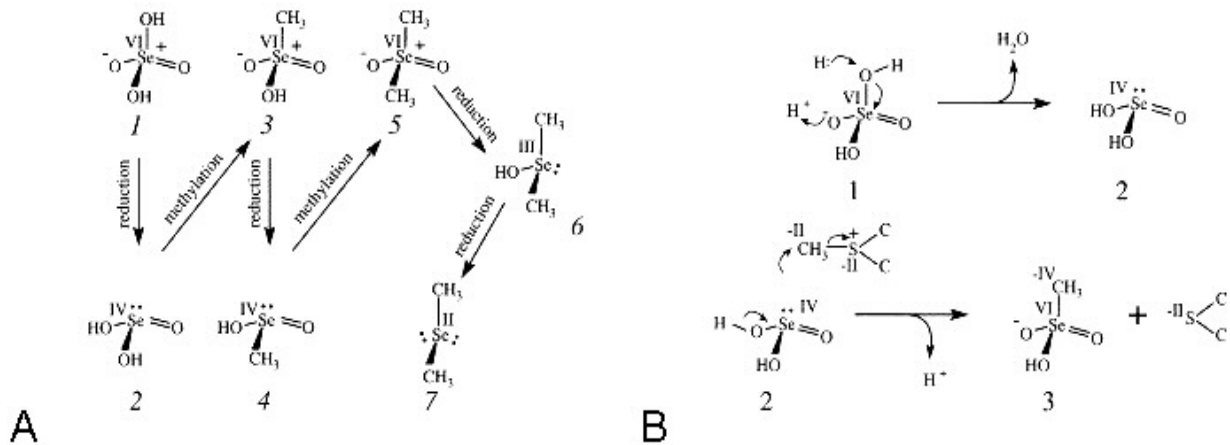


Abb. 1.5: A - Challenger-Mechanismus zur Methylierung von Selen-Oxyanionen, B - Reduktion (1-2) und S-Adenosylmethionin-abhängige Methylierung (2-3) (mit 1 - Selenat, 2 - Selenit, 3 - Methylselenonsäure, 4 - Methylselenige Säure, 5 - Dimethylselenon, 6 - Dimethylselenige Säure, 7 - Dimethylselenid) [nach 66, 76]

Pilze, Bakterien, Pflanzen und Tiere sind, wie bereits erwähnt, in der Lage Selen zu methylieren. Die damit einhergehende Volatilisierung zu Dimethylselenid (DMSe) und Dimethyldiselenid (DMDS₂) ist ein wichtiger Bestandteil des biogeochemischen Selenkreislaufs und ein wesentlicher Aspekt bei der biologischen Sanierung von Selen-kontaminierten Böden und Gewässern, da die Toxizität der methylierten Spezies vielfach geringer als die der anorganischen Oxyanionen ist (Tabelle 1.3).

Tab. 1.3: Akute Toxizität verschiedener Selenverbindungen [77, 78, 79]

Se-Spezies	Toxizitätswert	Konzentration
SeO ₄ ²⁻ (Na)	LD 50* (Ratte - orale Aufnahme)	1.6 mg kg ⁻¹
SeO ₃ ²⁻ (Na)	LD 50* (Ratte - orale Aufnahme)	7 mg kg ⁻¹
DMSe	LD 50* (Ratte - orale Aufnahme)	2100 mg kg ⁻¹

* - letale Dosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben

Daraus wird deutlich, dass die Volatilisierung/Biomethylierung von Selen-Oxyanionen ein sehr verlässlicher natürlicher Prozess ist, mit dessen Hilfe natürlich und anthropogen angereicherte Kompartimente natürlich „gereinigt“ werden können, wobei zum einen eine Detoxifikation der giftigeren Spezies stattfindet und zum zweiten eine Exhalation aus dem Umweltkompartiment erreicht wird. Auf diesem Wege gelangen jährlich ca. 6000 Tonnen Selen aus Böden und Sedimenten in die Atmosphäre [17], beeinflusst durch zahlreiche Parameter wie die Art der vorliegenden Selenspezies, die Bodenstruktur, dem Gehalt an Wasser und organischer Substanz sowie dem Vorhandensein mikrobiologischer Wachstumsfaktoren (Temperatur, Kohlenstoff-quelle, Spurenelemente) [13].

Durch biologische und physiko-chemische Reaktionen existieren zahlreiche verschiedene selenhaltige Substanzen mit unterschiedlichen Eigenschaften. Diese Eigenschaften und das große klinische wie auch umweltwissenschaftliche Interesse an Selen machen eine Vielzahl von analytischen Methoden erforderlich, die nun im Kapitel 1.3 besprochen werden.

1.3 (Spezies)-Analytik des Selens

Vergleichbar mit der Vielzahl auftretender Selenspezies (Tabelle 1.4) in verschiedensten Bereichen, zum Beispiel in der Umwelt mit unterschiedlichen Spezies in Wässern, Böden, der Atmosphäre und in der lebenden Materie oder im ernährungswissenschaftlichen Bereich ist auch die Zahl der chemisch-analytischen Methoden sehr groß. Die Erkenntnis, dass nicht nur die Dosis sondern eben auch die vorliegende Spezies wesentlich für die Wirkung eines Elementes in Hinblick auf Bioverfügbarkeit und Toxizität sind, führte in den letzten Jahren zur Entwicklung zahlreicher Methoden zur Speziesanalytik von Selen in unterschiedlichen Medien. Im Folgenden werden nun einzelne, besonders häufig genutzte analytische Methoden beschrieben, die sich bei der Analyse verschiedener Spezies bewährt haben.

Tab. 1.4: Ausgewählte Selenverbindungen in biologischen Systemen und in der Umwelt [13, 16]

Anorganische Spezies	elementares Selen (Se^0), Selenid (Se^{2-}), Selenat (SeO_4^{2-}), Selenit (SeO_3^{2-})
Einfache organische und methylierte Spezies	Dimethylselenid, Dimethyldiselenid, Trimethylselenonium-Kation, Dimethylselenon
Aminosäuren und niedermolekulare Spezies	Selenomethionin, Selenocystein, Selenocystin, Selenocholin, Selenobetain
Andere	Se-Proteine, Se-Enzyme

Se-Spezies in den Oxidationszuständen -2, +4 und +6, welche vorrangig in Wässern und Sedimenten gefunden werden, können zunächst durch die Analyse drei separater Aliquote der Probe speziiert werden. Dabei kann das vierwertige Selen direkt durch voltametrische und fluorometrische Analysenmethoden oder mittels der „Hydrid Generation“-Atomabsorptionsspektroskopie (HG-AAS) identifiziert und quantifiziert werden. Se(VI) und Se(-II) müssen vor der eigentlichen Analyse durch

den Einsatz geeigneter Reduktions- bzw. Oxidationsmittel in den vierwertigen Oxidationszustand überführt werden [15]. Dieser Aufbereitungsschritt wird durch die Kopplung von elementspezifischen Detektoren wie beispielsweise Atomabsorptions-, Atomemissions- und Atomfluoreszenzspektrometer (AAS, AES, AFS) oder elementselektiven Massenspektrometern (MS) mit sowohl gas- als auch flüssigchromatographischen oder elektrophoretischen Trennmethode eingespart und die simultane Analyse von Se(IV) und Se(VI) in einem Analysengang ermöglicht [16, 80, 81, 82]. Hierbei ist allerdings anzumerken, dass in Abhängigkeit der verwendeten analytischen Methode entsprechende Vorbereitungsschritte durchgeführt werden müssen.

Diese Verknüpfung von nachweisstarken Detektorsystemen und hocheffizienten Trenntechniken wird auch bei der Speziesanalytik selenhaltiger organischer Substanzen genutzt, um komplexe Probenmatrizes und Gemische unterschiedlicher Analyten zu analysieren.

Leichtflüchtige, alkylierte Selenspezies wie DMSe und DMDSe werden zur Analyse gaschromatographisch getrennt und anschließend einem entsprechendem Detektor (z. B. AAS, *Inductive-coupled Plasma* - Massenspektrometer (ICP-MS), MS) zugeführt, der eine Identifizierung und/oder Quantifizierung ermöglicht [83, 71, 63]. Zur Anreicherung der Analyten und ordentlichen Zuführung in den Gaschromatographen kommen verschiedene Hilfsmittel zum Einsatz. Weit verbreitet sind z. B. das Fangen in so genannten Eisfallen (*cryo-traps*) und die anschließende Thermodesorption bzw. Revolatilisierung durch Ausheizen der Eisfalle zum Transfer in das Analysensystem [63, 69, 71] oder der Einsatz von Aktivkohle oder anderen Sorbenten zur Adsorption der flüchtigen Verbindungen und die anschließende Elution mit geeigneten Lösungsmitteln [83, 84].

Gelöste, niedermolekulare, organische Moleküle wie die Aminosäuren Seleno-Methionin und Seleno-Cystein und andere Makromoleküle können ebenfalls mittels der bereits erwähnten Kopplung von unterschiedlichen Trennsystemen und entsprechenden Detektoren sehr vielfältig nachgewiesen werden. Für diese werden vorrangig *High Performance Liquid Chromatography* - Systeme (HPLC) benutzt, wobei je nach Fragestellung die Trennung der einzelnen Analyten unterschiedliche Analysebedingungen erfordert. Zur Analytik von selenhaltigen Aminosäuren kommen häufig gepackte *reversed-phase* (RP)-Trennsäulen zum Einsatz, wobei chemische Parameter, speziell die Polarität der Verbindungen, zu unterschiedlicher Retention

führen. Bei Proteinen und anderen Biomolekülen verwendet man hingegen Trennsäulen, die die Retentionszeit aufgrund der Molekülgröße (*size-exclusion-HPLC*) beeinflussen. Zur Detektion der chromatographierten Spezies werden hauptsächlich AAS und verschiedene MS-Systeme eingesetzt [16, 85, 86, 87].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Element Selen erfreut sich aufgrund seiner essentiellen Bedeutung wie auch toxischen Wirkung auf verschiedenste Lebewesen großer Beliebtheit in der aktuellen Forschung. Die Schädigung von Lebewesen durch Selenunter- oder Selenübersversorgung ist Gegenstand zahlreicher Studien, wobei regionale geo- und pedologische Verhältnisse entscheidend für das Auftreten solcher Schädigungen sind. Das geologische Ausgangsgestein, welches der Verwitterung ausgesetzt ist, wie auch das Vorhandensein von adsorptionsfähigen Materialien in Böden und Sedimenten sowie die Wasserverhältnisse und vorkommende Organismengemeinschaften steuern die Mobilität und die Bioverfügbarkeit des Selens. Allerdings wurden bisher häufig nur einzelne Parameter separat betrachtet. Beispiele hierfür sind zahlreiche Untersuchungen zur Toxizität auf verschiedene Lebensgemeinschaften, Studien zur Biomethylierung von Selen und Adsorptionsstudien von Selen-Oxyanionen an verschiedenen Sorbenten, nicht zuletzt im Zusammenhang mit dem Auftreten des radioaktiven Selenisotops ^{79}Se in atomaren Endlagern.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte versucht werden, einzelne Parameter, die verantwortlich für die Mobilität des Selens in der Umwelt sind, miteinander zu kombinieren. Dabei wurden in sogenannten künstlichen Mikrokosmossystemen adsorbierte, anorganisch-anionische bzw. mineralisch-gebundene Selenspezies verschiedenen mikrobiologischen Gemeinschaften zugänglich gemacht, wobei als Indikatoren für die Mobilisierung das Auftreten biomethylierter, leichtflüchtiger Organoselenverbindungen wie Dimethylselenid und Dimethyldiselenid genutzt wurden.

Durch diese interdisziplinäre Arbeitsweise wurde zunächst eine speziationsanalytische Methode etabliert und verifiziert. Weiterhin wurden Zusammenhänge zwischen der Art des vorliegenden Selens, der mikrobiellen Gemeinschaft und der Biomethylierung aufgezeigt. Untersuchungen zum Einfluss mikrobiologischer Populationen auf das geochemische Adsorptionsverhalten von Selen-Oxyanionen sowie auf mineralisch gebundenes, reduziertes Selen und damit die mikrobiologische Alkylierung von Selen in Abhängigkeit der geochemischen Verfügbarkeit stellen den dritten und wesentlichsten Schwerpunkt der Arbeit dar.

2 Material und Methoden

Im folgenden Kapitel werden die analytischen, mikrobiologischen und geochemischen Methoden beschrieben, wobei die speziell verwendeten Materialien direkt im Zusammenhang mit den methodischen Details genannt werden.

2.1 Häufig verwendete Stoffe / Chemikalien

Tab. 2.1: Verwendete Gase

Gas	Reinheit	Firma / Lieferant
Argon	4.6	Westfalen
Stickstoff	5.0	Westfalen
Helium (inkl. 10 Vol-ppm Xenon)	6.0 (4.8)	Air Liquide
Acetylen	technisch ($\geq 99,5 \%$)	Air Liquide

Tab. 2.2: Verwendete Flüssigkeiten / Lösungsmittel

Flüssigkeit / Lösungsmittel	Reinheit	Firma / Lieferant
Säuren:		
Salzsäure (32 % / 30 %)	pro analysi (p.a.) / SUPRAPUR [®]	Merck
Salpetersäure (65 %)	p.a.	Roth
Organische Lösungsmittel:		
Hexan	p.a.	Fisher Scientific
Oktan	p.a.	Fisher Scientific
Ethanol	EMPROVE [®]	Merck
Aceton	p.a.	Acros Organics
Isohexan	ROTISOLV [®] $\geq 98 \%$, Pestilyse [®]	Roth

Tab. 2.3: Verwendete Feststoffe

Feststoff	Reinheit	Firma / Lieferant
Natriumhydroxid-Plätzchen	p.a.	Riedel-de-Haën
Natriumhydroxid auf Träger	p.a.	Merck
Natriumselenat	wasserfrei, 99,8 % min	Alfa Aesar
Natriumselenit	wasserfrei, 99 % min	Alfa Aesar
Natriumborhydrid	p.a.	Merck
Glaswolle	silanisiert	supelco

Verdünnungen, Lösungen und Stammlösungen der einzelnen Substanzen wurden stets in säuregespülten (24h in 10 vol% HNO₃) Glaswaren mittels MilliQ-Wasser (Ultrapure Qualität, Leitfähigkeit 0,055 µS/cm) (SG Ultraclear, Barenbüttel, Deutschland) hergestellt.

Tab. 2.4: Verwendete Organoselenverbindungen

Verbindung	Reinheit	Firma / Lieferant
Dimethylselenid (DMSe)	99 %	Strem chemicals
Dimethyldiselenid (DMDS ₂)	96 %	Sigma Aldrich
Diethylselenid (DESe)	99,999 %	Sigma Aldrich
Diethyldiselenid (DED ₂)	-	Strem chemicals

Die Verdünnungen der Organoselenverbindungen zur Analyse wurden mittels Octan bzw. Ethanol unter Argon hergestellt und in säuregespülten Glaswaren bei -20 °C aufbewahrt. Die Reinsubstanzen wurden den Herstellerangaben entsprechend gelagert.

2.2 Analytik verschiedener Selenspezies

Innerhalb der durchgeführten Untersuchungen war es nötig, unterschiedliche Methoden zur Analyse von gelösten Selenspezies und leichtflüchtigen, gasförmigen Selenverbindungen einzusetzen. Dabei wurden gelöste Selenverbindungen mittels HG-AAS oder ICP-MS und leichtflüchtige Verbindungen mittels einer in der Arbeitsgruppe neu aufgebauten und etablierten Kopplung von Gaschromatographie und ICP-MS (GC-ICP-MS) analysiert.

2.2.1 HG-AAS – Analyse gelöster, anorganischer Selenspezies

Gelöstes, anorganisches Selen in Form von Se(IV) wurde mit dem HG-AAS-System der Firma Varian (Varian SpectrAA 300, *Vapor Generation Accessory* VGA 76) analysiert. Dabei wurde die Probe mit einem Fluss von 6 mL min^{-1} zunächst mit einer 10 M HCl angesäuert (Flussrate 1 mL min^{-1}) und anschließend mit einer 0.6 %igen Natriumborhydridlösung, hergestellt in 0.5 %iger Natriumhydroxidlösung, versetzt (Flussrate 1 mL min^{-1}) und in einer angeschlossenen Reaktionsschleife zur Hydridbildung gebracht (Abbildung 2.1). Ein Inertgasstrom (Argon) transportierte anschließend die gebildeten Hydride zur Analyse in das AAS-System (Selen-Hohlkathodenlampe (Heraeus England), Wellenlänge 196 nm, Spaltbreite 1nm). Zu jeder Analyse wurden frische Kalibrierstandards im Konzentrationsbereich von 0 bis $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ angesetzt, die aus einer Stammlösung mit einer Se(IV)-Konzentration von 1 g Se L^{-1} mittels 1 %ig salzsaurem MilliQ-Wasser verdünnt wurden. Abbildung 2.2 zeigt exemplarisch eine Kalibrationskurve, mit einer Nachweisgrenze von $0,2 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ und einer Bestimmungsgrenze von $0,5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

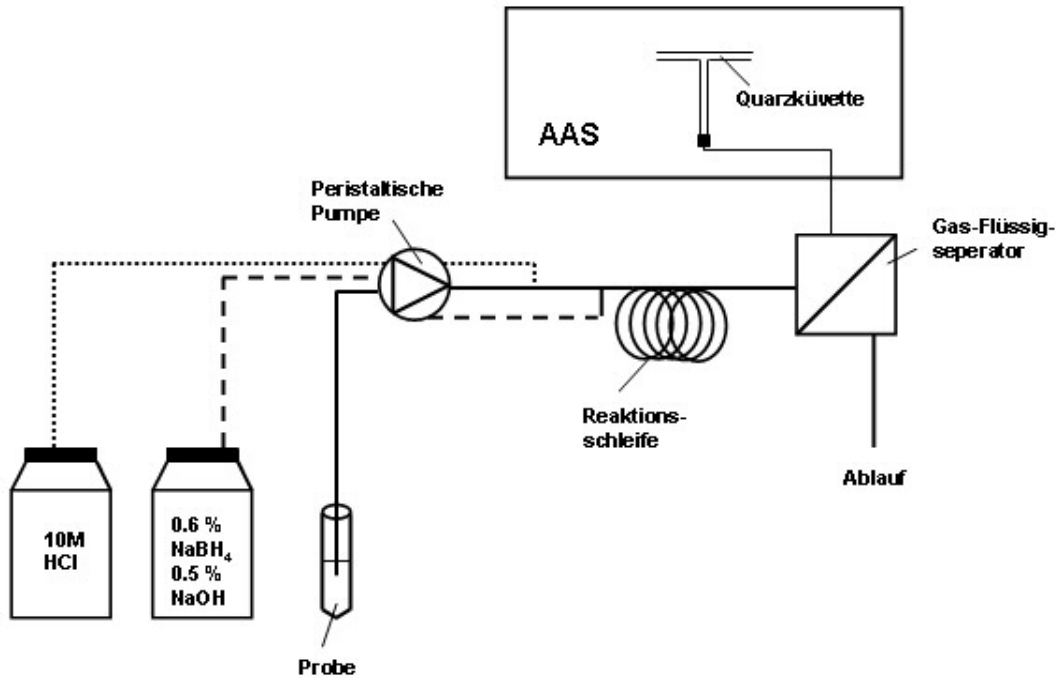
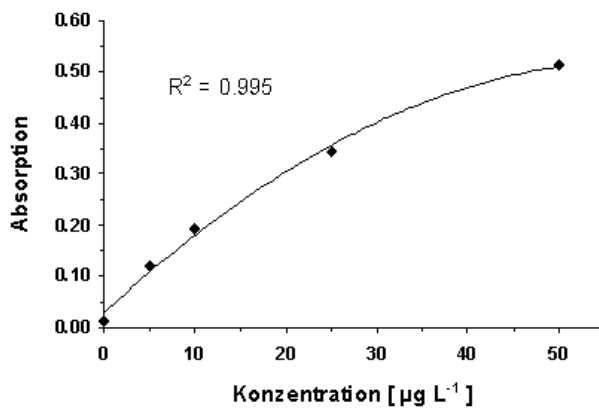


Abb. 2.1: Schema des HG-AAS-Systems



Konzentration [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Absorption	Präzision
0	0,0140	
5	0,1210	0,8 %
10	0,1931	0,8 %
25	0,3458	0,8 %
50	0,5135	0,5 %

$$\text{Nachweisgrenze} = B + 3 \cdot s_B = 0,2 \mu\text{g L}^{-1}$$

$$\text{Bestimmungsgrenze} = B + 9 \cdot s_B = 0,5 \mu\text{g L}^{-1}$$

$$B \text{ (Blindwert)} = 0,105 \mu\text{g L}^{-1} \text{ (n=10)}$$

$$s_B \text{ (Standardabweichung des Blindwertes)} = 0,037 \mu\text{g L}^{-1}$$

Abb. 2.2: Se(IV)-Kalibrierung an der HG-AAS

2.2.2 ICP-MS-Analyse gelöster Gesamtselengehalte

Die in den mikrobiologischen Inkubationsversuchen (Kapitel 2.5) angefallenen Proben wurden zur Analyse der gelösten Gesamtselengehalte mittels ICP-MS (VG PlasmaQuad 3, Plasmlab - Softwarepaket) vermessen. Dazu wurden die Proben in

säuregespülten Glaswaren entsprechend verdünnt, angesäuert (1 % HNO₃) und mit einem internen Standard (Rhodium; 5 µg L⁻¹) versehen. Die Quantifizierung erfolgte anhand frischer Kalibrierstandards im Bereich von 0 µg L⁻¹ bis 50 µg L⁻¹, welche ebenfalls angesäuert und mit internem Standard versehen waren. Hierbei wurden die Selen-Isotope ⁷⁷Se und ⁸²Se verwendet.

Abbildung 2.3 zeigt exemplarisch eine Kalibrierfunktion für die Gesamtselenmessung am ICP-MS. Hierbei wurde eine Nachweisgrenze von 0,2 µg L⁻¹ und eine Bestimmungsgrenze von 0,6 µg L⁻¹ ermittelt.

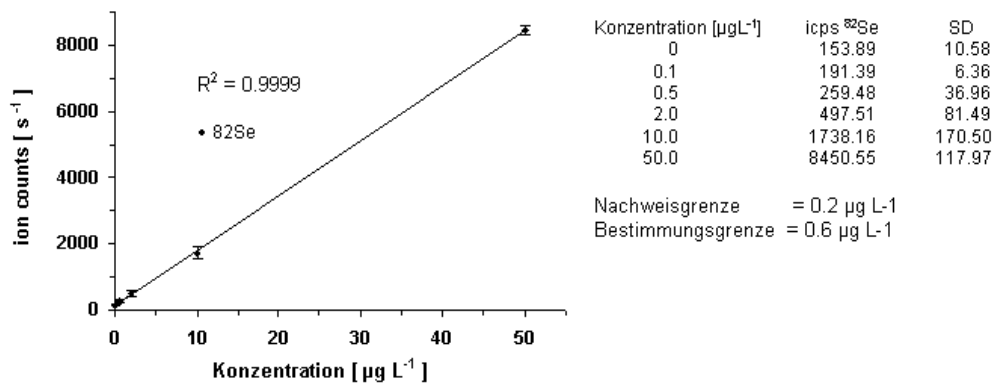


Abb. 2.3: Se-Kalibrierung an der ICP-MS

2.2.3 Cryotrapping-Cryofocussing-GC-ICP-MS – Analyse leichtflüchtiger Selenverbindungen

Zur Analyse leichtflüchtiger, mikrobiologisch alkylierter Selenverbindungen wurde in der Arbeitsgruppe ein in der Literatur [63] beschriebenes Kopplungssystem aufgebaut, welches aus einem Gaschromatographen zur Trennung der Verbindungen und dem ICP-MS als elementselektiven Detektor bestand (Abbildung 2.4, Tabelle 2.5).

Zur Einbringung der gasförmigen Probe in das Analysensystem wurde diese mit konstanter Pumprate zunächst in einer ersten Eisfalle gefangen. Diese Falle bestand aus einer beheizbaren 1,5 Meter langen Silcosteel-Kapillare (1/16“ Außendurchmesser, 1,02 mm Innendurchmesser), welche zum Fangen der Analyten

und Abtrennen störender Matrix in -140°C kaltes Isohexan getaucht wurde. Nach dem Fangen der Analyten wurden diese durch eine elektrische Widerstandsheizung und mittels eines 6-Wege-Ventils zum Umschalten der Hauptfließwege in eine zweite, in flüssigen Stickstoff (-196°C) getauchte Silcosteel-Kapillare (0,53 mm Innendurchmesser) mit einer Länge von einem Meter transferiert und erneut gefangen. Die Transferzeit betrug jeweils 3,5 Minuten. Anschließend wurde die Messung gestartet, die Analyten mittels einer Widerstandsheizung aus der Fokussierungsfalle ausgetrieben, im Gaschromatographen aufgetrennt und mittels ICP-MS elementselektiv detektiert. Tabelle 2.5 fasst die methodischen Details noch einmal kurz zusammen.

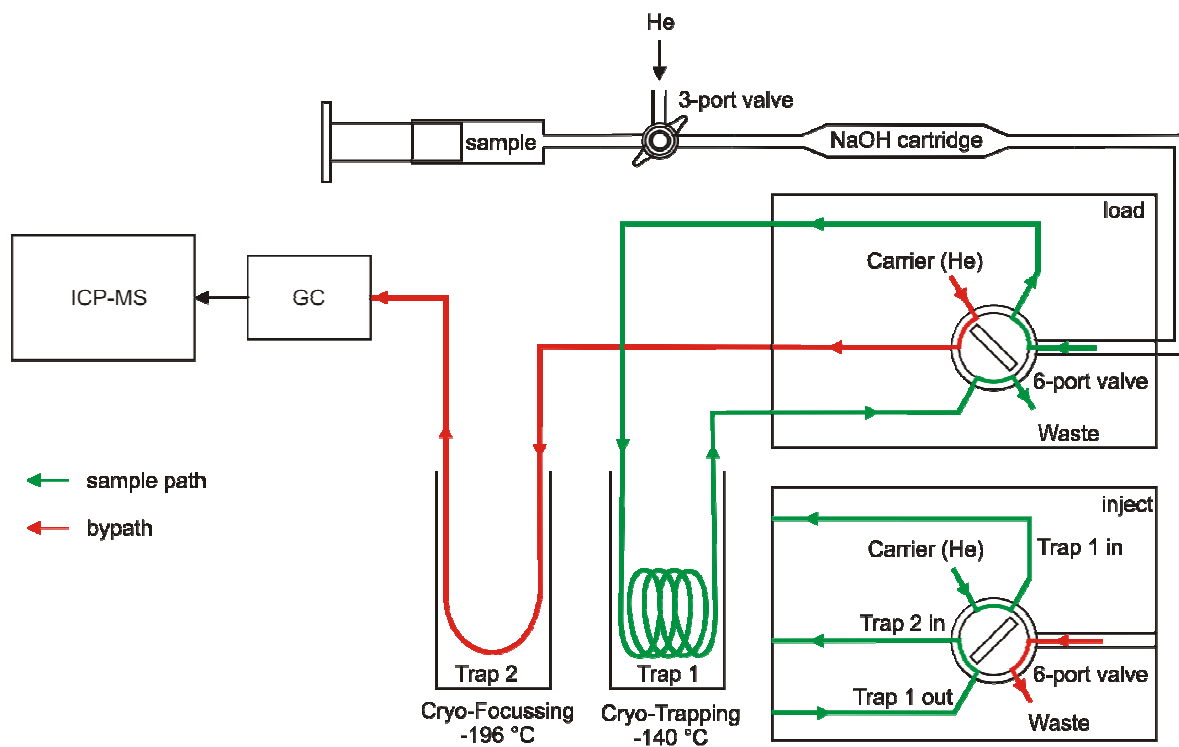


Abb. 2.4: Aufbau des *Cryotrapping-Cryofocussing-GC-ICP-MS-Systems* (CT-CF-GC-ICP-MS)

Tab. 2.5: Methodische Details zur CT-CF-GC-ICP-MS-Analysentechnik

Detail	Beschreibung / Kommentar
Cryotrapping (CT)- Trap 1	
NaOH-Kartusche	Pasteurpipette gefüllt mit NaOH auf silikatischem Träger (Merck, Darmstadt) zwischen 2 Stopfen aus silanisierter Glaswolle (Supelco, Bellefonte, USA)
Material	Silcosteel, 1/16" AD, 1.02 mm ID, Länge 1.5m (Restek, Bellefonte, USA)
Trapping-Fluss	40 mL/min mit Spritzenpumpe (vit-fit, Lambda, Zürich)
Temperatur	-140°C iso-Hexan-Eisbrei
Heizung CT	Widerstandsheizung mit Heiztrafo (EA-PS 2016-100, Elektro Automatik, Viersen) bei 4.5V, 4.8 A
Cryofocussing (CF)- Trap 2	
Transferzeit CT-CF	3,5 Minuten
Material	Silcosteel AD 0.74 mm ID 0.53 mm, Länge 1 m
Temperatur	-196°C flüssiger Stickstoff
Heizung CF	Widerstandsheizung (3,5V, 1,2A)
Gaschromatography (GC)	
Trärgas	He 6.0 mit 10 ppm (v/v) Xe, Flußrate 6 mL/min
Trennsäule	CP Sil 5 CB, 30 m x 0.32 mm x 1 µm 100% PDMS (Restek)
Temperaturprogramm	40°C für 3min, 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, 1m, Widerstandsheizung 5V, 5A
Gasflüsse	Plasma 14.9 L/min, Aux 0.9 L/min, Neb 0.85 L/min (extern)
Heizung Nebulizergas	2m Edelstahl 1/16" (Swagelok, Maintal) mit Widerstandsheizung 11V, 10A
Rf-Power	1200W
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

2.2.4 Validierung der CT-CF-GC-ICP-MS – Methode

Zur Methodvalidierung der CT-CF-GC-ICP-MS-Kopplung zur Analyse flüchtiger Organometall(oid)verbindungen wurden verschiedene Messungen durchgeführt. Zunächst wurden kommerziell bezogene Einzelstandards (Tabelle 2.4) mittels der Methode vermessen. Dazu wurden diese in Oktan bzw. Ethanol in zwei Verdünnungsschritten durch Wägung (Feinwaage LE 225D-0CE, Sartorius AG Germany) jeweils 1:1000 verdünnt (Tabelle 2.6) und anschließend mittels einer Mikroliterspritze (Hamilton) in vorbereitete 1L-Tedlar-Beutel (SKC-Probenahmebeutel aus Polyvinylfluorid-Folie, ANALYT MTC), gefüllt mit Stickstoffgas, injiziert. Das Injektionsvolumen wurde mit $5 \pm 1 \mu\text{L}$ festgelegt. Neben diesen Reinsubstanzen wurde der Mischstandard Ethylmethyldiselenid (EMDSe) aus DMDS₂ und DEDSe synthetisiert, wobei die 10^{-3} -Verdünnungen dieser Substanzen im Verhältnis 1:1 miteinander versetzt wurden [88] und nach einer Equilibrierzeit von 24 h analog den anderen Standards erneut 1:1000 verdünnt wurde.

Für die einzelnen Standards und die jeweiligen Verdünnungen wurden separate Mikroliterspritzen verwendet, welche vor und nach Gebrauch zunächst mit Aceton und anschließend mit Hexan und dem Lösungsmittel gespült wurden.

Nach einer Equilibrierzeit von 1 h im Gasprobenbeutel wurden Aliquote der gasförmigen Probe mittels einer gasdichten Glasspritze (Fortuna[®] Optima[®] 100mL, Poulten & Graf GmbH) und einer Spritzenpumpe mit konstanter Flussrate von 40 mL min^{-1} in das Messsystem eingebracht und analysiert.

Nach der Ermittlung der Retentionszeiten für die einzelnen Rein- und Mischsubstanzen wurde am Beispiel von DMS₂ eine Kalibrierfunktion und die experimentelle Nachweisgrenze für alkyliertes Selen ermittelt, indem die gasförmige Probe sequenziell in weiteren Gasprobebeuteln verdünnt (Tabelle 2.7) und jeweils unterschiedliche Volumina (20, 50, 100 mL) dieser Verdünnungen vermessen wurden.

Tab. 2.6: Verdünnung der Alkylselenstandards

Name (chem. Formel)	molare Masse [g mol ⁻¹]	Masse des Lösungsmittels [g]	zugegebene Masse des Standards [mg]	Anteil des Selen [%]	<u>Selen</u> -Konzentration [Se mL ⁻¹]
1. Verdünnung (10⁻³)					
DMSe ((CH ₃) ₂ Se)	109,0	3,602 (Oktan)	9,0	72,5	2,575 mg
DESe ((C ₂ H ₅) ₂ Se)	137,1	3,698 (Oktan)	7,0	57,6	1,552 mg
DMDSe ((CH ₃) ₂ Se ₂)	187,0	3,662 (Oktan)	13,0	84,0	4,244 mg
DEDSe ((C ₂ H ₅) ₂ Se ₂)	216,0	3,595 (Oktan)	10,0	73,1	2,894 mg
2. Verdünnung (10⁻⁶)					
DMSe		3,562	5,0		1,787 µg
DESe		3,692	4,3		0,889 µg
DMDSe		3,576 (Ethanol)	4,7		3,107 µg
DEDSe		3,680 (Ethanol)	5,1		2,211 µg

Tab. 2.7: Verdünnungsreihe des gasförmigen DMSe-Standards

Verdünnungsschritt	Matrix-Volumen (Stickstoffgas) [L]	Injektionsvolumen [L]	<u>Selen</u> -Konzentration (als DMSe) [ng L ⁻¹]
1	1,0		15,366*
10 ⁻¹	0,9	0,1 (aus 10 ⁰)	1,537
10 ⁻²	0,9	0,1 (aus 10 ⁻¹)	0,154
10 ⁻³	0,9	0,1 (aus 10 ⁻²)	0,015

* - 8,6 µL aus DMSe 10⁻⁶ (Tab. 2.6)

Gleichzeitig konnte anhand dieser Prozedur die Linearität der Methode analysiert werden.

Zur Auswertung der Messungen wurden die Peaks der Chromatogramme mittels der Software (Microcal OriginPro 7.0) integriert und die Peakflächen als Maß für die Menge an Selen genutzt.

2.2.4 Experimentelle Wiederfindungsrate der Organoselenverbindungen in unterschiedlichen Probenmatrices

Zur Validierung der Probenahmestrategie und zur Ermittlung der Wiederfindungsrate in Bezug zur Probenahme der Organoselenverbindungen wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Hierzu wurden in unterschiedliche, sterile Probenmatrices (20 mL H₂O, 20 mL Nährmedium MEM (Tabelle 2.10), 20 mL Nährmedium MEM + 0,2 g Goethit (Feststoffkonzentration 10 g L⁻¹)) jeweils einzeln 10 µL DMSe oder 100 µL DMDS₂ der 10⁻⁶-Verdünnung (Tabelle 2.8), welche vorher in Ethanol verdünnt wurden, eingebracht und 24 h im Dunkeln bei 30°C equilibriert. Als Versuchsgefäße wurden analog zu den mikrobiologischen Inkubationsversuchen (Kapitel 2.3.5, Kapitel 2.5) 100 mL-Injektionsflaschen (OCHS GmbH) verwendet, welche mit Butylstopfen verschlossen wurden. Vor Zugabe der Organoselenverbindungen wurde die Gasphase mit N₂ gespült.

Nach der Gleichgewichtseinstellung wurden die Gasphasen zur Bestimmung der leichtflüchtigen Selenverbindungen mittels Stickstoffgas aus den geschlossenen Probengefäßen durch geeignete Kanülen ausgetrieben und in 1 L-Tedlar-Beuteln gefangen. Dabei wurde die Gasphase des Inkubationsgefäßes mit dem 10-fachen Volumen (800 mL gesamt) gespült. Zum Austreiben der Gasphase wurde ein PC-gesteuerter Massendurchflussmesser (smart controller GSC, Vögtlin instruments) verwendet, die Flussrate betrug 0,2 L min⁻¹.

Tab. 2.8: Verdünnung von DMSe und DMDS_e in Ethanol

Name (chem. Formel)	molare Masse [g mol ⁻¹]	Masse des Lösungsmittels [g]	zugegebene Masse des Standards [mg]	Anteil des Selen [%]	<u>Selen</u> -Konzentration Se [mL ⁻¹]
1. Verdünnung (10⁻³)					
DMSe	109,0	4,505	9,0	72,5	1,142 mg
DMDS _e	187,0	4,575	8,0	84,0	1,160 mg
2. Verdünnung (10⁻⁶)					
DMSe		4,571	7,0		1,749 µg
DMDS _e		4,129	0,8		0,225 µg

2.3 Methylierungsexperimente

2.3.1 Verwendete Pilz- und Bakterienkulturen

Zur Durchführung der Methylierungsexperimente wurden verschiedene Pilz- und Bakterienkulturen genutzt. Zunächst wurde mit dem Pilz *Alternaria alternata* (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ-Nr. 1102) gearbeitet, der von der DSMZ bezogen wurde.

Dieser phytophagene Pilz, der unter den Ascomyceten zur Familie der Pleosporaceae gehört, wächst saprophytär auf verrottendem, organischem Material und im Boden und ist weltweit verbreitet [89]. Thompson-Eagle und Koautoren isolierten *A. alternata* 1989 [75] aus einem Oberflächenwasser im Kesterson Reservoir (Kalifornien) und beschrieben diesen als selenresistenten und aktiv methylierenden Organismus. Aufgrund der einfachen Handhabbarkeit und der Einordnung in die Risikogruppe 1 [90] wurde *A. alternata* als Modellorganismus ausgewählt und verwendet.

Als weiteres Inokulum in den Methylierungsexperimenten wurde Deponie-sickerwasser der Deponie Eiterköpfe in Koblenz verwendet. Durch die Inkubation in einem synthetischen Nährmedium erfolgte die Anreicherung einer Umweltmischkultur.

Weiterhin wurde das aus der Literatur bekannte sulfatreduzierende Bakterium *Desulfovibrio gigas* (DSMZ-Nr.: 496) von der DSMZ bezogen und mit diesem Alkylierungsexperimente unter Verwendung eines künstlich hergestellten Eisenselenidminerals (FeSe_2) durchgeführt.

2.3.2 Kulturmedien

Das verwendete Wasser zur Herstellung verdünnter Säuren und Laugen, sowie das Wasser zum Herstellen der Medien und Lösungen war stets MilliQ-Wasser mit einer elektrischen Leitfähigkeit von $0,055 \mu\text{S cm}^{-2}$.

Die Einstellung der erforderlichen pH-Werte erfolgte entweder vor dem Autoklavieren (1,2 bar, 121°C , 15 min) mit verdünnter Salzsäure bzw. Natriumlauge oder im Nachhinein mittels sterilfiltrierter, verdünnter Säuren und Laugen.

Die Stammhaltung von *A. alternata* erfolgte auf V8-Juice-Agar (Tabelle 2.9), indem die sterilen Agarplatten mit dem Pilzisolat angeimpft und bei 30°C inkubiert wurden. Nach erfolgtem Wachstum sind die Agar-Platten für 4 Wochen bei 4°C gelagert und anschließend in gleicher Weise erneuert wurden. Für die Inkubationsversuche wurde ein von Thompson-Eagle und Koautoren [75] vorgeschlagenes, modifiziertes Malzextraktmedium verwendet (Tabelle 2.10), das in den Studien mit der Umweltmischkultur ebenfalls Anwendung fand. Eine Stammhaltung im mikrobiologischen Sinne war in Verbindung mit dem Inokulum Deponiesickerwasser nicht möglich, da die Anreicherung der Mischkultur entsprechend den experimentellen Bedingungen erfolgte.

Zur Stammhaltung von *D. gigas* wurde das Nährmedium 63 der DSMZ verwendet (Tabelle 2.11), das vor der Zugabe des Inokulums mittels Natrium-Dithionit (Fluka) reduziert wurde und so ein anaerobes Milieu für das Wachstum des sulfat-reduzierenden Bakteriums eingestellt. In den eigentlichen Inkubationsuntersuchungen wurde das in Tabelle 2.11 dargestellte Nährmedium modifiziert, indem der verwendete Hefeextrakt durch 10 mL einer Vitaminlösung (Tabelle 2.12) und 2 mL einer Spurenelementlösung (Tabelle 2.13) ersetzt wurde.

Tab. 2.9: Zusammensetzung - V8-Juice-Agar (DSMZ-Medium Nr. 310)

Bestandteil (Hersteller/Anbieter)	Menge [L ⁻¹]
V8-Juice (Zentrifugationsüberstand eines handelsüblichen Gemüsesaftes der Marke albi)	200 mL
CaCO ₃ (Merck)	3 g
Agar (Hartge Ingredients)	15 g

pH = 7,2

Tab. 2.10: Zusammensetzung - Malzextraktmedium (MEM) (modifiziert nach [75])

Bestandteil (Hersteller/Anbieter)	Menge [L ⁻¹]
Malzextrakt (Merck)	1,0 g
Glucose (Merck)	1,0 g
Pepton aus Sojabohnen (Merck)	0,1 g

Der pH-Wert wurde in Abhängigkeit der Fragestellung variiert.

Tab. 2.11: Zusammensetzung - Nährmedium *D. gigas* (DSMZ-Medium Nr. 63)

Bestandteil (Hersteller/Anbieter)	Menge [L ⁻¹]
K ₂ HPO ₄ (Roth)	0,5 g
NH ₄ Cl (Merck)	1,0 g
Na ₂ SO ₄ (Roth)	1,0 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O (Merck)	0,1 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O (Roth)	2,0 g
DL-Natrium-Lactat (Sigma Aldrich)	2,0 mL
Hefeextrakt (Hartge-Marcor, Hackensack))	1,0 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O (Merck)	0,5 g
Natriumthioglycolat (Merck)	0,1 g
Ascorbinsäure (Merck)	0,1 g

pH = 8

Tab. 2.12: Vitaminlösung (aus DSMZ-Medium Nr 141)

Bestandteil (Hersteller/Anbieter)	Menge [L ⁻¹]
Biotin (Fluka)	2,0 mg
Folsäure (Sigma Aldrich)	2,0 mg
Pyridoxin (Roth)	10,0 mg
Thiamin (Sigma Aldrich)	5,0 mg
Riboflavin (Merck)	5,0 mg
Nikotinsäure (Fluka)	5,0 mg
D-Ca-Pantothenat (Merck)	5,0 mg
Vitamin B12 (Sigma Aldrich)	0,1 mg
p-Aminobenzoessäure (Sigma Aldrich)	5,0 mg
Liponsäure (Sigma Aldrich)	5,0 mg

Tab. 2.13: Spurenelementlösung SL-10 (aus DSMZ-Medium Nr. 320)

Bestandteil (Hersteller/Anbieter)	Menge [L ⁻¹]
HCl (25 %) 7,7 M (Merck)	10,0 mL
FeCl ₂ x 4 H ₂ O (Merck)	1,5 g
ZnCl ₂ (Riede-de Häen)	0,07 g
MnCl ₂ x 4 H ₂ O (Merck)	0,1 g
H ₃ BO ₃ (Roth)	0,06 g
CoCl ₂ x 6 H ₂ O (Merck)	0,19 g
CuCl ₂ x 2 H ₂ O (Merck)	0,02 g
NiCl ₂ x 6 H ₂ O (Fluka)	0,024 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O (Merck)	0,036 g

2.3.3 Inkubation

Die Inkubation der verschiedenen Rein- und Mischkulturen erfolgte bei 30°C, schüttelnd (Rotationsschüttler, 100 rpm) und zur Verhinderung einer möglichen photochemischen Alkylierung im Dunkeln [91]. Die Inkubationszeit wurde je nach Fragestellung variiert.

Die Inkubationsansätze von *D. gigas* wurden stehend, sonst wie oben beschrieben kultiviert.

2.3.4 Mikrobiologische Alkylierungsexperimente

Vor den biogeochemischen Versuchen zur Mobilisierung von geochemisch gebundenem Selen wurden zunächst Inkubationsversuche mit den unterschiedlichen mikrobiologischen Systemen (*A. alternata*, Deponiesickerwasser) durchgeführt. Dazu wurde das Nährmedium MEM (Kapitel 2.3.3) mit unterschiedlichen Mengen Selenit versetzt und damit Se(IV)-Konzentrationen zwischen 0 $\mu\text{g L}^{-1}$ und 10 mg L^{-1} (0; 10; 100 $\mu\text{g L}^{-1}$; 1; 10 mg L^{-1}) eingestellt. Dies erfolgte durch Zugabe von Aliquoten einer sterilfiltrierten Se(IV)-Stammlösung (1 g Se L^{-1}).

Als Inokulum diente im Falle von *A. alternata* eine 72 h inkubierte, homogenisierte Vorkultur. Als Inokulum der Umweltmischkultur wurde frisches Deponiesickerwasser der Deponie Eiterköpfe in Koblenz verwendet, welches vor Versuchsbeginn vor Ort in 250 mL-Glasflaschen (Schott) gesammelt wurde. Die Größe des Inokulum wurde mit 1 % (Volumen/Volumen) festgelegt.

Die Inkubation erfolgte in 100 mL-Injektionsflaschen (Glasgerätebau Ochs), welche mit 20 mL Se(IV)-angereichertem Nährmedium und 0,2 mL Inokulum befüllt wurden und anschließend mittels Butylstopfen (Glasgerätebau Ochs) gasdicht verschlossen wurden. Nach 7-tägiger Inkubation im Dunkeln bei 30°C wurden zur Bestimmung der leichtflüchtigen Selenverbindungen die Gasphasen wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben, beprobt und der Analyse zugeführt.

Zusätzlich zur Analyse der flüchtigen Alkylselenverbindungen mittels CT-CF-GC-ICP-MS (siehe Kapitel 2.2.3) wurden pH-Werte (pH-Elektrode SenTix Mic, WTW) und Redoxpotentiale (Eh-Elektrode Platin-Einstabmesskette Pt 5900A, Schott) gemessen (pH/Eh-Meter CG840, Schott). Die Kalibrierung der pH-Elektrode erfolgte durch eine

Dreipunktkalibrierung mittels kommerziell erhältlicher Pufferlösungen (pH 4, 7, 10) (CertiPur, Merck), im Falle der Redoxelektrode wurde das Potential mit zwei kommerziell erhältlichen Redox-Puffer-Lösungen (Redox-Kalibrierlösung L4619 235 mV Pt-Ag/AgCl, L4660 645 mV Pt-Ag/AgCl, Schott) verglichen. Die Menge an gebildeter Biomasse wurde im Falle der bakteriellen Kulturen durch photometrische Messung der optischen Dichte bei 600 nm ($OD_{600\text{ nm}}$) (Specord[®] 50, Analytik Jena) bestimmt. Die Pilzbiomasse wurde gravimetrisch bestimmt, indem diese nach Filtration bei 105 °C getrocknet und anschließend bei eingestellter Gewichtskonstanz ausgewogen wurde.

2.4 Verschiedene Adsorptionsuntersuchungen

Aufgrund der ubiquitären Verbreitung von Eisenoxiden in der Umwelt und ihrer optimalen Adsorptionseigenschaften gegenüber Anionen in einem weiten pH-Bereich [23, 25, 26, 29, 36, 37] wurde das Eisenoxid Goethit ($\alpha\text{-FeO(OH)}$) zum Aufbau künstlicher Mikrokosmen ausgewählt, um den mikrobiologischen Einfluss auf die Sorptionsstabilität von Selen-Oxyanionen zu untersuchen. Dazu wurde der verwendete Goethit zunächst charakterisiert und anschließend das Adsorptionsverhalten unter verschiedenen Bedingungen analysiert.

2.4.1 Bestimmung der spezifischen Oberfläche und des Ladungsnulldpunktes des verwendeten Eisenoxids

Zur Durchführung der Adsorptionsexperimente wurde ein Goethit (Fluka) verwendet, der vor den eigentlichen Sorptionsstudien zunächst in Hinblick auf seine spezifische Oberfläche und seinen Ladungsnulldpunkt untersucht wurde.

Die Oberfläche des verwendeten Goethits wurde mit der BET-Methode nach Brunauer, Emmett und Teller [92] mithilfe eines Gassorptionsanalysators (NOVA 1200, Version 3.00, Quantachrome Corporation) ermittelt. Dabei wurde unter bestimmten Temperatur- und Druckbedingungen mittels eines inerten Messgases (Stickstoff 5.0) die Menge an adsorbierten Gasmolekülen an der Oberfläche ermittelt und daraus die spezifische Oberfläche des Minerals berechnet.

Der Ladungsnulldpunkt, d.h. der Ladungsnulldpunkt der Nettoprotonenladung für den verwendeten Goethit wurde mittels potentiometrischer Titration ermittelt. Diese erfolgte bei Raumtemperatur (20°C) in Plastikzentrifugenröhrchen (50mL, BLUE MAX™) unter einer Argonatmosphäre. Die verwendete Goethitkonzentration betrug 20 g L^{-1} ($0,5 \text{ g } 25 \text{ mL}^{-1}$). Die Titration erfolgte bei drei verschiedenen Ionenstärken ($0,01$, $0,05$ und $0,1 \text{ mol L}^{-1}$), welche mittels NaNO_3 (Merck) eingestellt wurden. Vor der eigentlichen Titration wurde den einzelnen Suspensionen $0,5 \text{ mL}$ einer $0,1 \text{ M}$ HNO_3 zugegeben. Zur Gleichgewichtseinstellung wurden nun die Proben 24 h geschüttelt. Danach wurde der pH-Wert der Proben gemessen (Inolab Level 2P pH-Meter (WTW), kombinierte pH/Temperaturelektrode (SenTix81)). Die Kalibrierung der pH-Elektrode erfolgte durch eine 3-Punkt-Kalibrierung mittels kommerzieller pH-

Puffer-Lösungen (CertiPur, Merck). Die Titration wurde im Batch-Modus durchgeführt, wobei definierte Mengen einer 0,1 bzw. 0,02 M NaOH-Lösung (hergestellt aus 0,1M Stammlösung, Titrisol, Merck) in die Suspensionen pipettiert wurden. Bei einem pH-Drift kleiner 0,002 pH-Einheiten innerhalb von 10 Minuten wurde der entsprechende pH-Wert aufgenommen, wobei minimal 15 Minuten zwischen den einzelnen Titrationsschritten lagen. Die Titrationsdaten wurden anschließend zur Berechnung der Oberflächenladung (σ in Ladung C m⁻²) mittels Gleichung (1) als Funktion des pH-Wertes ($-\log [H^+]$) verwendet.

$$\sigma = \frac{F}{SC} (C_A - C_B + [OH^-] - [H^+]) \quad (1)$$

C_A, C_B - Konzentrationen hinzugefügter Säure (A) und Base (B)

S - spezifische Oberfläche (10 m² g⁻¹)

C - Konzentration des Goethits (20 g L⁻¹)

F - Faraday-Konstante (96485 C mol⁻¹)

$[OH^-], [H^+]$ - Hydroxid- bzw. Protonenkonzentration

Die Protonenkonzentration wurde mittels Gleichung (2) aus den gemessenen pH-Werten ermittelt, wobei hier die Ionenstärke-abhängigen Aktivitätskoeffizienten ($\log \gamma = -0,05; -0,09; -0,11$ für 0,01; 0,05; 0,1 M NaNO₃) beachtet werden mussten.

$$pH = -\log a_{H^+} = -\log \gamma H^+ \quad (2)$$

2.4.2 Adsorption an Goethit

Zur Bestimmung der Sorptionseigenschaften des verwendeten Goethits wurde zunächst die Adsorption von Selenit in einer wässrigen Lösung untersucht. Hierfür wurde eine Goethit-Suspension hergestellt, welche $2 \text{ g Goethit L}^{-1}$, 1 mg SeIV L^{-1} ($0,012 \text{ mM SeO}_3^{2-}$) und $0,01 \text{ M Natriumchlorid}$ enthielt. Unter ständigem Rühren wurden jeweils 20 mL dieser Suspension in 50 mL Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (BLUE MAX™) pipetiert und unterschiedliche pH-Werte zwischen $\text{pH} = 3$ und $\text{pH} = 10$ (Details zur pH-Messung siehe Kapitel 2.3.5) mittels verdünnter Salpetersäure bzw. Natriumhydroxidlösung eingestellt. Zur Gleichgewichtseinstellung wurde 48 h im Überkopfschüttler (GFL 3040) equilibriert. Im Anschluss wurden die einzelnen Proben zentrifugiert (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0; 4000 rpm , 30 min^{-1}), der Überstand dekantiert und filtriert ($0,45 \text{ }\mu\text{m}$ Porenweite, Zelluloseacetat-Membranfilter, Whatman® Schleicher & Schuell). Zur Bestimmung der adsorbierten Menge an SeO_3^{2-} wurden die Überstände mittels HG-AAS (Kapitel 2.2.1) gemessen und aus der Differenz von Start- und Gleichgewichtskonzentration berechnet.

In einem zweiten Schritt wurde die Sorption von Selenit an Goethit in dem verwendeten mikrobiologischen Nährmedium (MEM, Tabelle 2.10) untersucht. Zur Vermeidung von mikrobiologischem Wachstum während des Sorptionsstudiums wurde der Goethit zuvor sterilisiert. Dazu wurden 200 mg Goethit (10 g L^{-1}) in 50 mL -Glaszentrifugenröhrchen (Duranglas mit Schraubverschluss und Teflon-Septum, Glasgerätebau Ochs) eingewogen und anschließend autoklaviert. Im Nachhinein wurden 20 mL der vorbereiteten, sterilen MEM-Lösung (Tabelle 2.10) (pH-Werte zwischen 3 und 8 , Selenitkonzentration $1,26 \text{ }\mu\text{M}$) zugegeben, die Gefäße verschlossen und die Suspensionen für 48 h bei Raumtemperatur auf dem Überkopfschüttler geschüttelt. Nach dem anschließenden Zentrifugieren der Proben wurde der Überstand dekantiert und filtriert. Im Anschluss wurden die filtrierten Überstände mittels HG-AAS auf die Menge an gelöstem Selenit analysiert und wie oben die sorbierten Mengen von Selenit an Goethit berechnet.

Zum Vergleich der Selenitorsorption an Goethit in den unterschiedlichen Matrices und zur Ermittlung eventueller Störungen der Sorption durch die im mikrobiologischen Nährmedium gelösten organischen Komponenten wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Neben den verschiedenen gelösten Zuckern beinhaltete das Nährmedium auch einen großen Anteil an gelösten Proteinen und Aminosäuren [93],

die durch ihre pH-abhängige Ladung einen Einfluss auf die Anionensorption haben können. Aufgrund dessen wurde anhand drei verschiedener, einzeln vorliegender Aminosäuren (Glutaminsäure, Glycin, Lysin; Merck) die Sorption dieser an Goethit untersucht. Hierfür wurden Suspensionen hergestellt, welche $10 \text{ g Goethit L}^{-1}$, $0,5 \text{ g Aminosäure L}^{-1}$ und $0,01 \text{ mM NaCl}$ enthielten. Diese wurden unter ständigem Rühren für 2 h equilibriert und im Anschluss in 50mL-Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (BLUE MAX™) aliquotiert (20 mL). Nach der Aliquotierung wurden mittels verdünnter Salpetersäure bzw. Natriumhydroxidlösung unterschiedliche pH-Werte zwischen $\text{pH} = 2$ und $\text{pH} = 10$ eingestellt und die Ansätze für 48 h auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Nach der Gleichgewichtseinstellung wurden die einzelnen Proben zentrifugiert, der Überstand dekantiert und filtriert. Zur Ermittlung der sorbierten Mengen an Aminosäuren wurden die Überstände auf die verbliebene, gelöste Restmenge der Aminosäuren untersucht und aus der Differenz zur gelösten Startkonzentration die sorbierte Menge berechnet. Die Quantifizierung der Aminosäuren erfolgte mittels der Ninhydrinfärbung, wobei es unter Hitzeeinwirkung und bei Anwesenheit freier Aminosäuren bzw. Aminogruppen zu einer Purpurrot- bis Blaufärbung (Ruhemanns Violett) der Probensubstanz kommt. Diese kann photometrisch quantifiziert werden. Dafür wurden 1 mL der Probe mit 1 mL Ninhydrinlösung ($0,158 \text{ g Ninhydrin (Roth)}$), $100 \text{ mL Isopropanol (Roth)}$, $3 \text{ mL Eisessig (Merck)}$) versetzt und für 20 min bei 100°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Extinktionen der Lösungen bei einer Wellenlänge von 575 nm gegen eine aminosäurefreie Lösung gemessen (Specord® 50, Analytik Jena) [modifiziert nach 94, 95]. Die Quantifizierung erfolgte für jede verwendete Aminosäure über eine Dreipunktkalibrierung ($0,1 \text{ g L}^{-1}$, $0,25 \text{ g L}^{-1}$, $0,5 \text{ g L}^{-1}$) mit Dreifachmessung der einzelnen Standards (Abbildung 2.5).

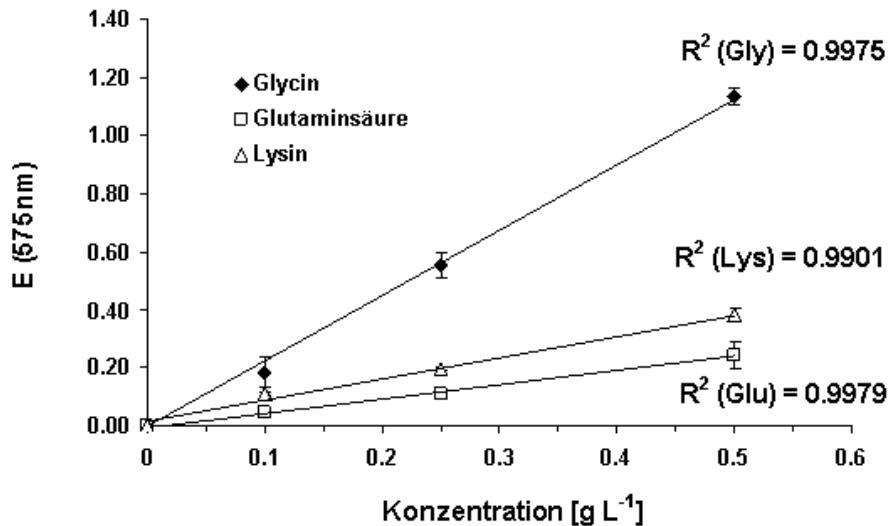


Abb. 2.5: Kalibriergeraden zur Aminosäurequantifizierung (Gly - Glycin; Glu - Glutaminsäure, Lys - Lysin)

2.4.3 Modellierung

Zur Beschreibung der Festphase/Flüssigphase - Zwischenschicht wurde das Basic Stern Modell (BSM) verwendet. Zur Berechnung der Modellparameter wurde das Softwarepaket GRFIT [96] genutzt, mit dessen Hilfe Konzentrationen, thermodynamische Gleichgewichtskonstanten und die Anzahl möglicher Bindungsplätze an Oberflächen in homogenen und heterogenen Systemen auf der Basis eines elektrischen Doppelschichtmodells (*electrical double layer* - EDL) bestimmt werden können. Unter Verwendung der aus der potentiometrischen Titration erhaltenen Daten zur Bestimmung des Ladungsnullpunktes (Kapitel 2.4.1) wurden mittels GRFIT die Konzentrationen von aktiven Bindungsplätzen und die EDL-Kapazität gefittet. Diese Werte wurden weiter verwendet, um die entsprechenden Gleichgewichtskonstanten der Oberflächenkomplexierung von Selenit bzw. der Aminosäuren mit dem verwendeten Goethit zu berechnen. Die Modellierungsarbeiten wurden mit Hilfe von Dr. N. Vlasova (Institute of Surface Chemistry, National Academy of Science of Ukraine, Kiev, Ukraine) durchgeführt.

2.5 Biogeochemische Experimente zur Verfügbarkeit von Selen

Zur Verfügbarkeit und Mobilisierung von adsorptiv gebundenem Selen wurden mittels verschiedener mikrobiologischer Rein- und Mischkulturen biogeochemische Inkubationsversuche durchgeführt. Als Indikator für die Mobilisierung des gebundenen Selens wurden leichtflüchtige, alkylierte Selenverbindungen genutzt.

2.5.1 Versuchsreihe mit adsorbiertem SelV an Goethit

Der Aufbau der Mikrokosmen erfolgte zunächst durch Einwiegen von unbehandeltem Goethit (Kapitel 2.4) in 100mL-Injektionsflaschen ($m_{\text{Goethit}} = 200 \text{ mg}$, entspricht $10 \text{ g Goethit L}^{-1}$), welche im Nachhinein zur Vermeidung von mikrobiologischem Wachstum autoklaviert wurden. Nach diesem Sterilisationsschritt wurden 20 mL MEM (Tabelle 2.11, Kapitel 2.3.3) zugegeben, welches mit $100 \mu\text{g Selen L}^{-1}$ in Form von Selenit angereichert war, und die Inkubationsgefäße mittels Butylstopfen verschlossen. Der pH-Wert des Mediums wurde mittels $0,1 \text{ M HNO}_3$ auf $\text{pH} = 6$ eingestellt.

Zum Einstellen des geochemischen Gleichgewichts, d.h. zur Etablierung des Sorptionsgleichgewichtes wurden die Ansätze anschließend für 48 h, bei 30°C , im Dunkeln auf einem Rotationsschüttler bei 100 rpm equilibriert.

Nach dem Sorptionsschritt wurden den experimentellen Ansätzen verschiedene Inokula (jeweils *A. alternata* oder Deponiesickerwasser) aerob zugesetzt und wieder mittels Butylstopfen verschlossen. Zusätzlich wurden Parallelansätze als Kontrolle ohne Goethit in gleicher Weise inkubiert, die das Selenit somit vollständig gelöst enthielten.

Im Anschluss an die Inokulation wurden die Kulturansätze weiter inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten (1 - 30 Tage) wurden jeweils drei inokulierte Ansätze und 1 steriler Ansatz, der als Hintergrundwert diente, der Analyse zugeführt. Dazu wurden zunächst die Gasphasen beprobt und anschließend der pH-Wert und das Redoxpotential wie in Kapitel 2.3.5 gemessen. Die Biomassebestimmung erfolgte für die bakteriellen Kulturen durch Auszählung der Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe $0,02 \text{ mm}$, Fläche Kleinquadrat $0,0025 \text{ mm}^2$, Superior Marienfeld Laboratory Glassware), die Pilzbiomasse wurde für die Ansätze ohne

Goethit gravimetrisch bestimmt. Im Falle der Goethit-haltigen Probenansätze wurde die Biomassebestimmung mittels differentieller Thermogravimetrie (DTG) bestimmt. Dazu wurden die Proben nach Messung des pH-Wertes und des Redoxpotentials in 50mL Zentrifugenröhrchen umgefüllt und 30 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend filtriert (0,45 µm) und bis zur weiteren Verwendung bei -18 °C gelagert. Das Zentrifugat wurde bei 105 °C getrocknet. Nach der Trocknung wurde das homogenisierte Probenmaterial (Goethit + Biomasse) in geeignete Probenhalter (Al₂O₃-Tiegel) eingewogen und mittels Thermoanalyse (Simultaneous Thermal Analyzer STA 429, Netzsch Thermische Analyse) vermessen. Als Referenzsubstanz diente Korund, wobei als Messmodus die differentielle Thermoanalyse und Thermogravimetrie (DTA/TG) mit einem Temperaturbereich von 40°C bis 1200°C (Temperaturprogramm 10°C min⁻¹) gewählt wurde. Durch den Thermogramm-Vergleich von reinem Goethit in sterilem Nährmedium und dem eigentlichen Probenmaterial (Goethit + Biomasse) wurde ein zusätzlicher, bzw. stark erhöhter exothermer Peak (bei 280 °C) im Falle des Probenmaterials festgestellt, der auf die Verbrennung der Biomasse zurückzuführen war (Abbildung 2.6, siehe DTA-Goethit und DTA-Goethit + Biomasse). Zur Quantifizierung der Biomasse wurde das Thermogramm (DTA) mathematisch mittels spezifischer Software (*Proteus Analysis*, Netzsch) abgeleitet. Anschließend wurde mit den berechneten Wendepunkten des beobachteten zusätzlichen Peaks im Thermogravimetrogramm (TG) die Gewichtsänderung und damit die Menge an Biomasse berechnet.

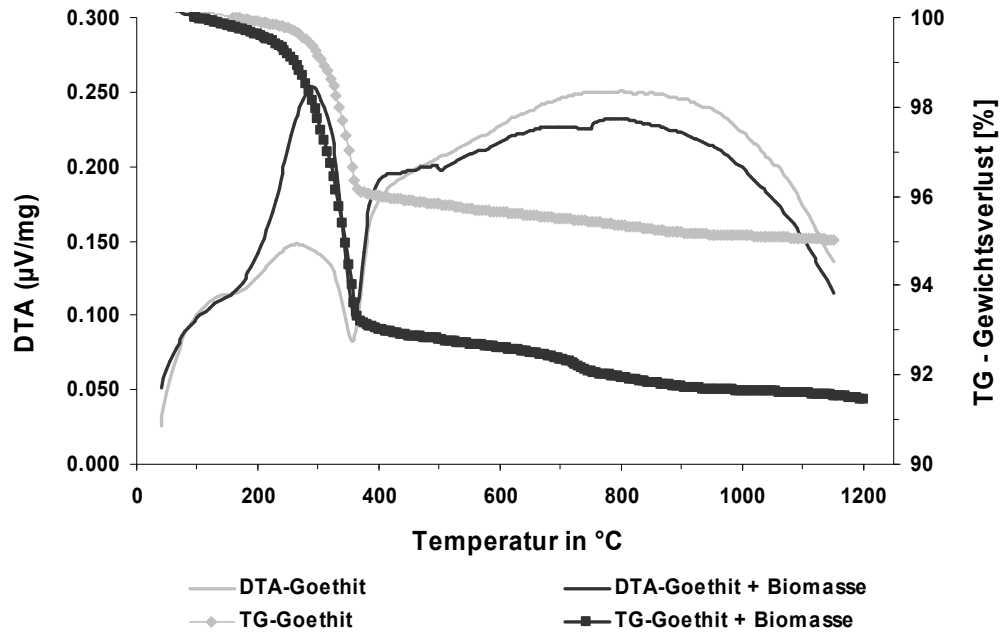


Abb. 2.6: DTA/TG-Analyse zur Quantifizierung der gebildeten Pilzbiomasse

Zur Analyse der gesamt gelösten Selenkonzentration wurden die Inkubationsansätze nach der Gasphasenbeprobung, der Bestimmung der Biomasse (außer bei der Bestimmung der Biomasse mittels differentieller Thermogravimetrie, siehe oben) und Messung von pH-Wert und Redoxpotential in 15 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und 30 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert sowie filtriert (0,45 µm) und bis zur Analyse mittels ICP-MS (Kapitel 2.2.2) bei -18°C gelagert.

2.5.2 Versuchsreihe mit mineralisch gebundenem Selen (FeSe_2)

Zur Untersuchung der biologischen Verfügbarkeit bzw. der Mobilisierbarkeit von mineralisch gebundenem Selen wurde das reduzierte Eisenselenid-Mineral Ferroselit (FeSe_2) in der Arbeitsgruppe synthetisiert [97] und charakterisiert. Im Anschluss an die Synthese wurde das Mineral unter einer Argon-Atmosphäre getrocknet, homogenisiert und bis zur weiteren Verwendung in einem Exikator gelagert.

Zur Untersuchung der Mobilisierbarkeit des mineralisch gebundenen Selens wurde das Mineral in einer Argon-Atmosphäre in 100 mL-Kulturflaschen eingewogen, mit dem vorbereiteten Nährmedium (modifiziertes DSMZ-Medium Nr. 63, Kapitel 2.3.2)

versetzt und anschließend mittels Butylstopfen gasdicht verschlossen. Hierbei wurde eine Feststoffkonzentration von 10 g L^{-1} eingestellt. Zur Inokulation wurde eine 72 h inkubierte Vorkultur von *D. gigas* benutzt, wobei die Größe des Inokulums mit 2 % (v/v) festgelegt wurde. Zur Kontrolle wurden Parallelansätze mitgeführt, welche kein mineralisches Selen in Form des FeSe_2 enthielten.

Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (2, 4, 6, 10, 17, 24, 31 Tage) wurden jeweils 3 FeSe_2 -angereicherte Kulturen und eine Kontrollkultur auf das Vorhandensein leichtflüchtiger, alkylierter Selenverbindungen mittels CT-CF-GC-ICP-MS untersucht. Weiterhin wurden der pH-Wert und das Redoxpotential direkt in den Kulturansätzen bestimmt. Die Quantifizierung der Biomasse erfolgte durch Zellzählung nichtadsorbierter Zellen mittels eines Fluoreszenzmikroskopes, wobei die Zellen, bzw die DNA der Zellen vorher mit einem Fluoreszenzfarbstoff, 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) angefärbt wurden. Für die Bestimmung der Gehalte an gelöstem Selen mittels ICP-MS und Sulfat wurden Aliquote der Proben filtriert und bis zur Analyse bei -18°C gelagert. Zur Quantifizierung der Sulfatgehalte wurde die Anionenchromatographie (Metrohm 761 Compact IC, Trennsäule Metrosep[®] A Supp 4 (250 x 4 mm), Elutionsmittel $1,8 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3$ und $1,7 \text{ mM NaHCO}_3$ (1 mL min^{-1}), Leitfähigkeitsdetektion mit chemischer Suppression) genutzt, wobei das flüssige Probenmaterial vorher von organischen Bestandteilen befreit werden musste. Hierfür wurden Einweg-Chromatographie-Säulen (SEP-PAK[®] C18, Waters) verwendet, welche den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung/Validierung der CT-CF-GC-ICP-MS-Kopplung zur Analyse leichtflüchtiger Organometall(oid)verbindungen

3.1.1 Messung von Einzelstandards

Zur Etablierung und Validierung der *cryotrapping-cryofocussing-gaschromatography*-ICP-MS-Kopplung zur Analytik der leichtflüchtigen, alkylierten Selenverbindungen wurden gasförmige Einzelstandards (Kapitel 2.2.4) verwendet. Diese wurden mittels einer gasdichten Glasspritze und einer *trap*-Geschwindigkeit von 40 mL min^{-1} in die gezeigte Trap I (Abbildung 2.4) injiziert und anschließend für 3,5 Minuten in die Fokussierungsfalle (Trap II) überführt. Nach Ablauf des Fokussierungsschrittes wurden das Temperaturprogramm des Gaschromatographen und die Messung des ICP-MS gestartet und die chromatographisch getrennten Verbindungen detektiert. Abbildung 3.1 zeigt die Chromatogramme der Einzelstandards.

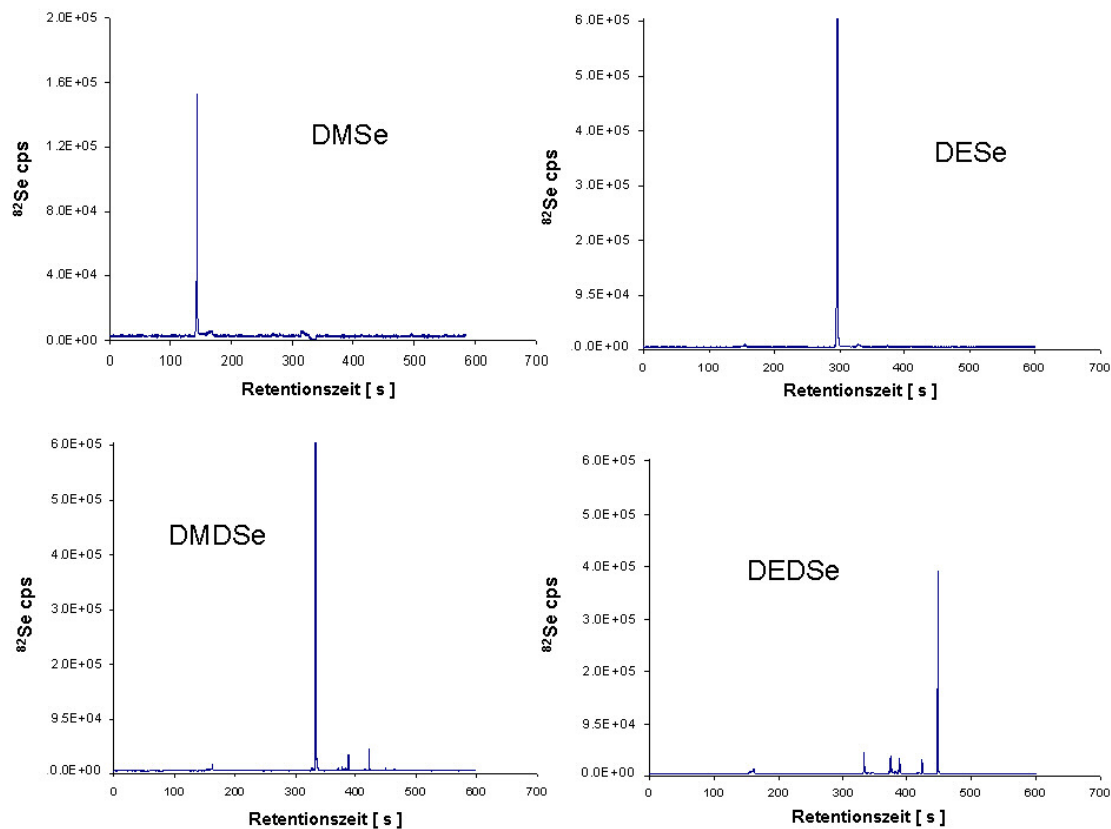


Abb. 3.1: Chromatogramme der alkylierten Einzelstandards

Im Falle der Einzelstandardmessungen von DMDS_e und DEDS_e sind im Chromatogramm weitere Peaks zu sehen, was auf Verunreinigungen der Reinsubstanzen bzw. nichtdefinierte Gasphasenreaktionen hindeutet. Abbildung 3.2 fasst die Einzelstandardmessungen zusammen, woraus ersichtlich wird, dass es sich bei den zusätzlichen Peaks (DEDS_e-Chromatogramm) zum einen um DMSe (Retentionszeit 150 s) und um DMDS_e (Retentionszeit 330 s) handelt. Nichtidentifizierte Verbindungen sind bei den Retentionzeiten 380 s, 390 s und 420 s zu finden.

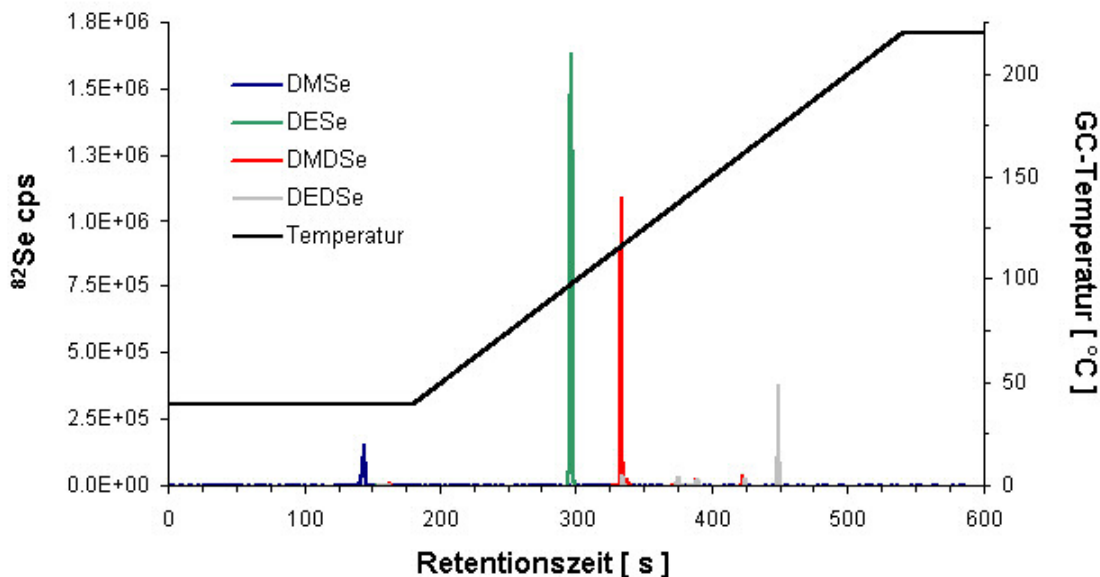


Abb. 3.2: Chromatogramm der Alkyl-Selen-Standards inkl. GC-Temperaturprogramm

Für die Identifizierung einer weiteren Alkylselenid-Spezies wurde ein Mischstandard aus DMDS_e und DEDS_e hergestellt, indem die Lösungen (10^{-3} -Verdünnung, Tab. 2.6) der beiden Einzelstandards im Verhältnis 1:1 gemischt wurden und nach einer Equilibrierzeit nochmals 1:1000 verdünnt wurden. Analog den anderen Verbindungen wurde ein Aliquot in einen Gasprobenbeutel injiziert und anschließend die gasförmige Probe in das System eingebracht. Abbildung 3.3 zeigt das Chromatogramm des Mischstandards, wobei wie erwartet ein DMDS_e- und ein DEDS_e-Peak zu sehen sind. Weiterhin sind analog Abbildung 3.2 bei den Retentionszeiten von 380 s und 390 s zwei weitere Peaks zu sehen, wobei es sich

wahrscheinlich bei dem größeren der beiden mit der Retentionszeit 380 s um Ethylmethyldiselenid handelt. Tabelle 3.1 fasst die Chromatographie-spezifischen Daten zusammen.

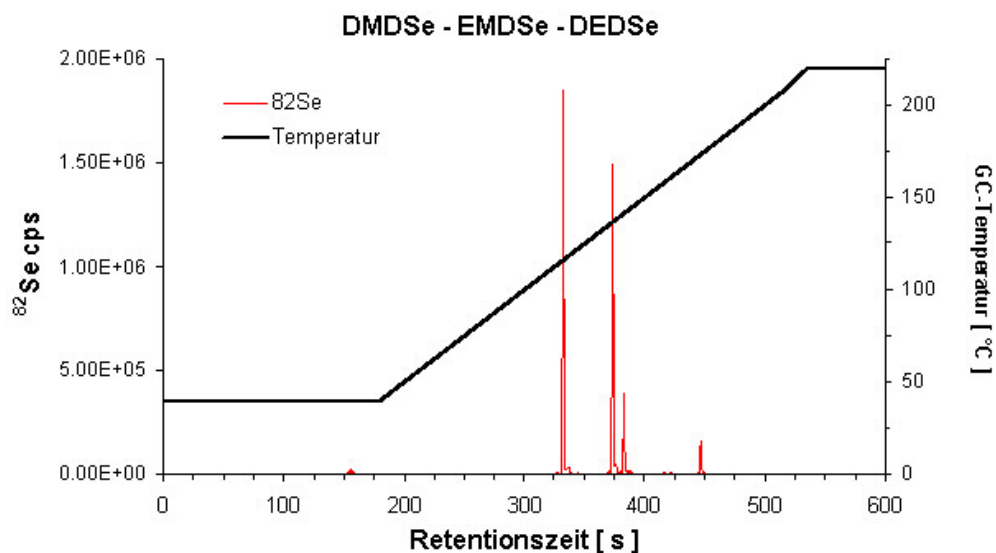


Abb. 3.3: Chromatogramm des Mischstandards (DMDSe / DEDSe)

Tab. 3.1: Ergebnisse der Standardidentifizierung (Retentionszeiten)

Verbindung	Retentionszeit Mittelwert (n = 3) [s]	Standardab- weichung (n = 3) [s]	Konfidenz ($\alpha = 0,05$; n = 3)
DMSe	151,3	2,89	151,3 \pm 3,27
DESe	300,0	2,65	300,0 \pm 2,99
DMDSe	327,7	3,06	327,7 \pm 3,46
EMDSe	378,7	2,08	378,7 \pm 2,36
DEDSe	450,7	2,52	450,7 \pm 2,85

Neben der Identifizierung einzelner alkylierter Selenverbindungen anhand der Retentionszeit wurden weiterhin eine Kalibrierfunktion und damit die Linearität der Methode sowie eine experimentelle Nachweisgrenze ermittelt. Als Modellverbindung wurde hierfür DMSe verwendet. Abbildung 3.4 a zeigt die Kalibrierfunktion, welche über mindestens 3 Größenordnungen (Abb. 3.4 b) linear ist.

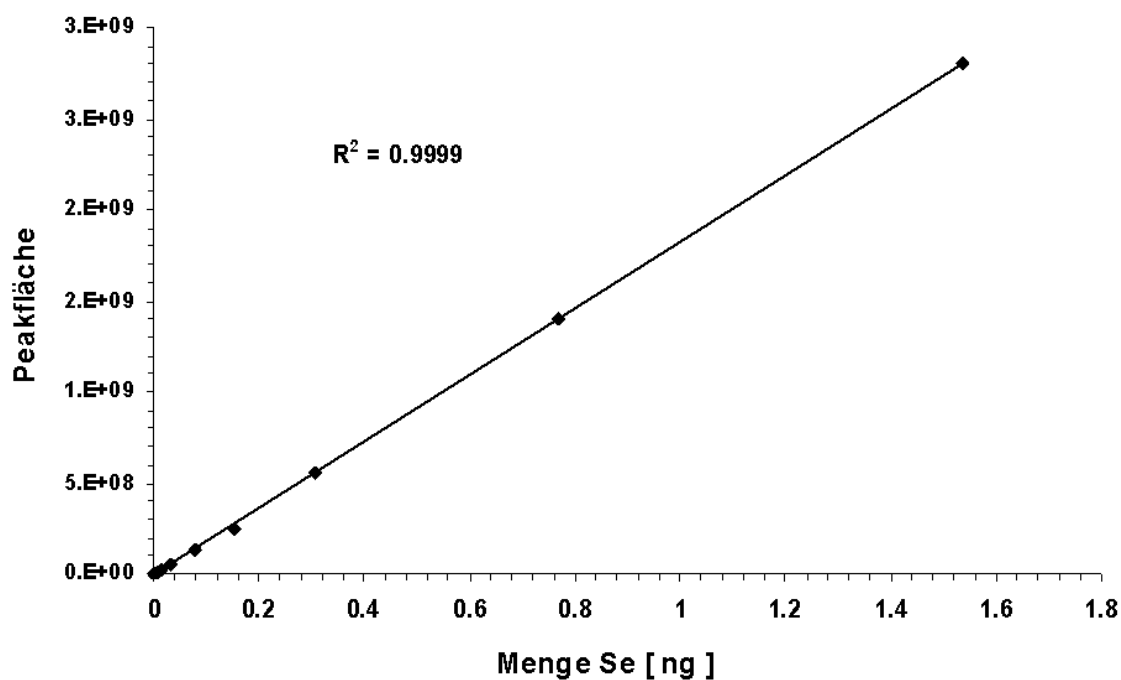


Abb. 3.4 a: Lineare Darstellung der Selen-Kalibrierung (CT-CF-GC-ICP-MS)

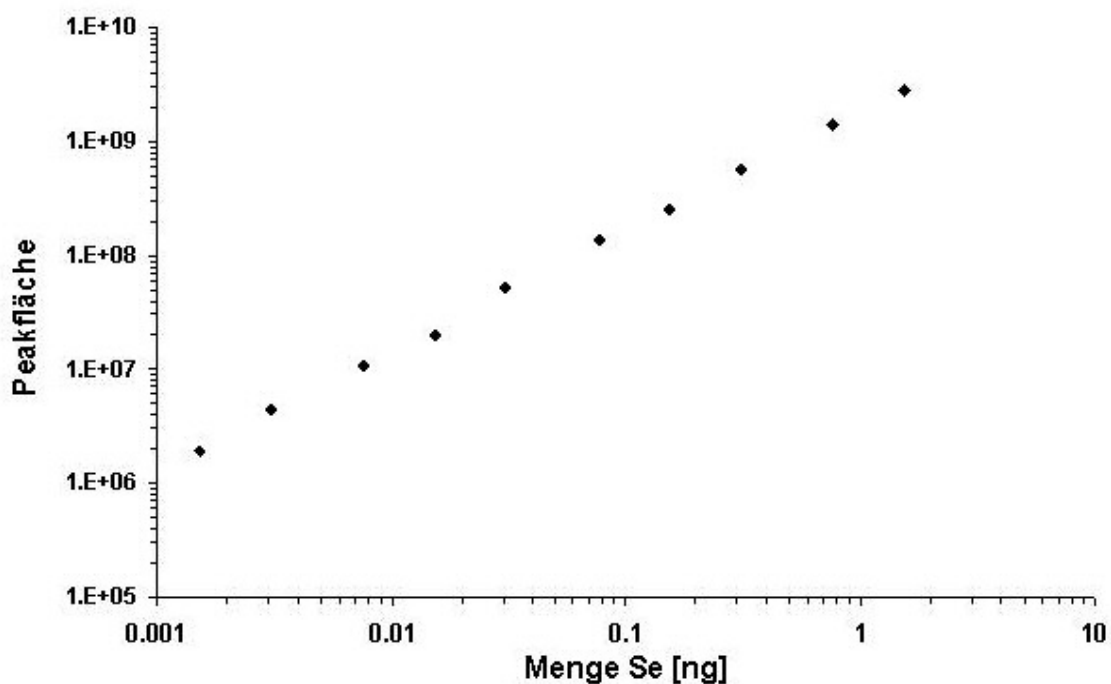


Abb. 3.4 b: Logarithmische Darstellung der Se-Kalibrierung (CT-CF-GC-ICP-MS)

Abbildung 3.5 stellt die experimentelle Ermittlung der Nachweisgrenze dar, wobei hierfür jeweils 100 mL Probenvolumen der verschiedenen DMSe-Gasstandards (Tabelle 2.7) in das Analysensystem eingebracht wurden. Aus der Analysenfunktion lässt sich eine Nachweisgrenze von 1 pg Se absolut ableiten ($c = 0,01 \text{ ng L}^{-1}$).

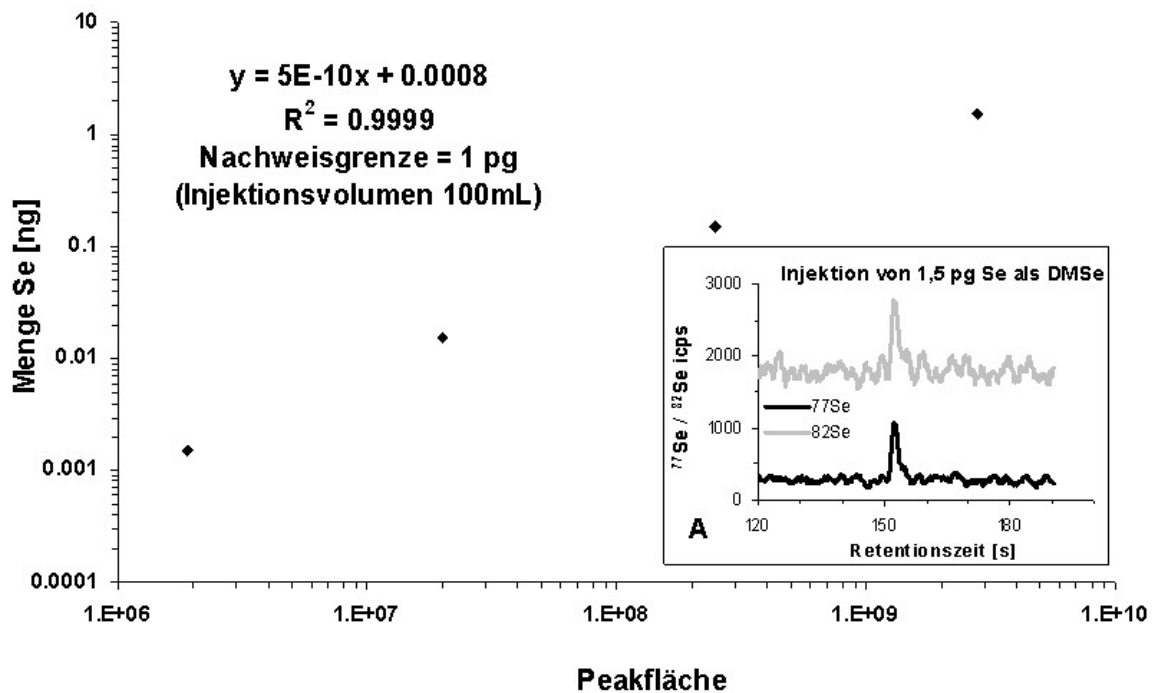


Abb. 3.5: Analysenfunktion zur Ermittlung der Nachweisgrenze, A: Chromatogramm der kleinsten injizierten Menge Se (1,5 pg Se als DMSe)

3.1.2 Experimentelle Wiederfindung der Organoselenverbindungen

Um den Einfluss der Probenahme-prozedur auf die gemessenen im Vergleich zu den tatsächlichen Gehalten leichtflüchtiger Alkylselenide zu ermitteln, wurden die Wiederfindungsraten unterschiedlicher Verbindungen (DMSe, DMDS_e) in verschiedenen Probenmatrizes bestimmt. Hierfür wurde den Matrizes Wasser, Malzextraktmedium und Malzextraktmedium + Goethit ($10 \text{ g Goethit L}^{-1}$) eine bekannte Menge an Selen in Form von DMSe (17,4 ng) oder DMDS_e (23,5 ng) direkt in die vorliegende Matrix zugegeben, und die verschlossenen Inkubationsgefäße 24 h bei 30 °C im Dunkeln equilibriert. Nach der Gleichgewichtseinstellung wurde die Gasphase beprobt, wobei das 10-fache Volumen der Gasphase im Inkubationsgefäß als Austauschvolumen benutzt wurde. Hierbei wurden für das DMSe matrixabhängig

zwischen 28 % und 42 % des eingesetzten DMSe wiedergefunden. Für das DMDS_e wurden ebenfalls matrixabhängig zwischen 5,8 % und 12,6 % der zugegebenen Menge wiedergefunden.

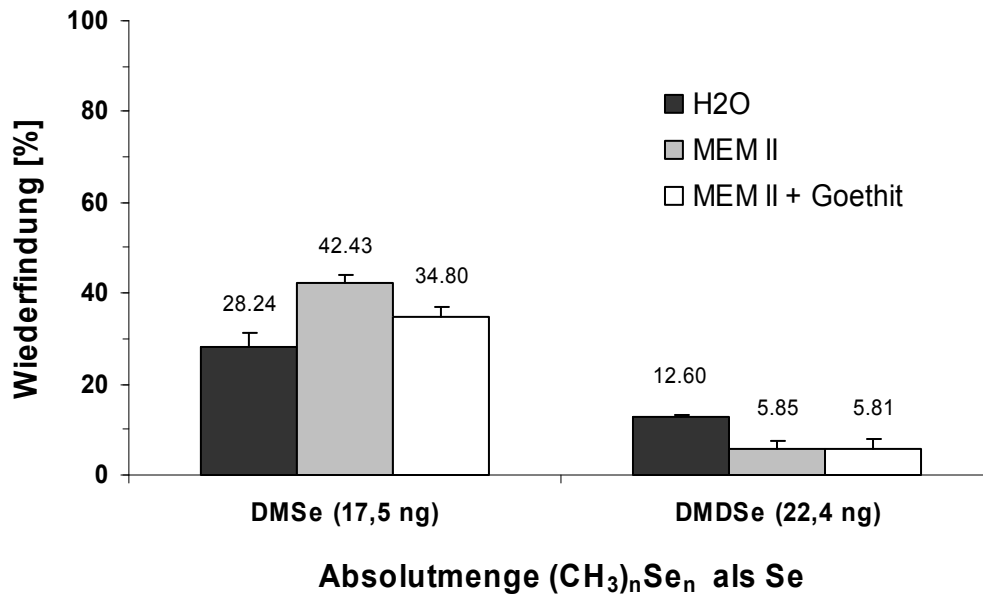


Abb. 3.6: Prozentuale Wiederfindung flüchtiger Organoselenverbindungen in unterschiedlichen Probenmatrices

Diese Untersuchungen zeigten, dass in Abhängigkeit der verwendeten Matrix sowie der verwendeten Organoselenverbindung unterschiedliche Analytausbeuten zu erwarten sind. Die folgenden dargestellten Ergebnisse sind tatsächlich gemessene Daten.

3.2 Methylierung anorganischer Selenspezies durch mikrobiologische Gemeinschaften

Zur weiteren Etablierung der analytischen Methode und zur Findung geeigneter mikrobiologischer Modellsysteme wurden unterschiedliche mikrobiologische Gemeinschaften auf ihr Methylierungs- bzw. Alkylierungspotenzial hin untersucht. Dazu wurde eine Reinkultur des Pilzes *A. alternata* und Deponiesickerwasser als Umweltmischkultur in einem Nährmedium (Kapitel 2.3.2) mit unterschiedlichen Mengen anorganischen Selens (SeIV) inkubiert. Nach 7-tägiger Inkubation bei 30°C unter Lichtausschluss wurde die Gasphase beprobt und der Analyse mittels CT-CF-GC-ICP-MS zugeführt. Weiterhin wurde die gebildete Biomasse durch OD_{600 nm}-Messung bzw. für die Pilzinkubation gravimetrisch bestimmt. Des Weiteren wurde der pH-Wert sowie das Redoxpotential gemessen.

3.2.1 Selenmethylierung durch *A. alternata*

Nach 7-tägiger Inkubation einer Reinkultur von *A. alternata* wurden die beprobten Gasphasen mittels CT-CF-GC-ICP-MS gemessen und über den gesamten Konzentrationsbereich die 4 leichtflüchtigen Organoselenverbindungen DMSe, DMDSe, EMDSe und DEDSe analysiert. In Abhängigkeit der zugegebenen Menge Se(IV) konnte hauptsächlich eine Zunahme von DMSe beobachtet werden, die bei einer Konzentration von 1 mg Se(IV) L⁻¹ ihr Maximum erreichte (Abbildung 3.7, Tabelle 3.2). Die Bildung von EMDSe konnte in Abhängigkeit von der gelösten Menge Se(IV) mit einem leichten Anstieg beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde bei der Bildung von DMDSe eine verstärkte Produktion im niedrigen Konzentrationsbereich beobachtet. Im Falle von DEDSe konnte kein deutlicher Einfluss der Mikrobiologie festgestellt werden, d.h. die gemessenen Werte unterschieden sich kaum von denen der abiotischen Inkubation (Tabelle 3.2).

Beim Vergleich der Wachstumsparameter Biomasse, pH-Wert und Redoxpotential wird deutlich, dass *A. alternata* über einen großen Konzentrationsbereich von gelöstem Selenit im Nährmedium nicht nachteilig beeinflusst wird. Sowohl der pH-Wert als auch das Redoxpotential sind in allen Inkubationsansätzen sehr ähnlich. Bei

Betrachtung der Menge an gebildeter Biomasse wird deutlich, dass bei einer Konzentration von $10 \text{ mg Se(IV) L}^{-1}$ gegenüber der nächst geringeren Konzentration eine deutliche Abnahme der Biomasseproduktion zu verzeichnen ist (Abbildung 3.8).

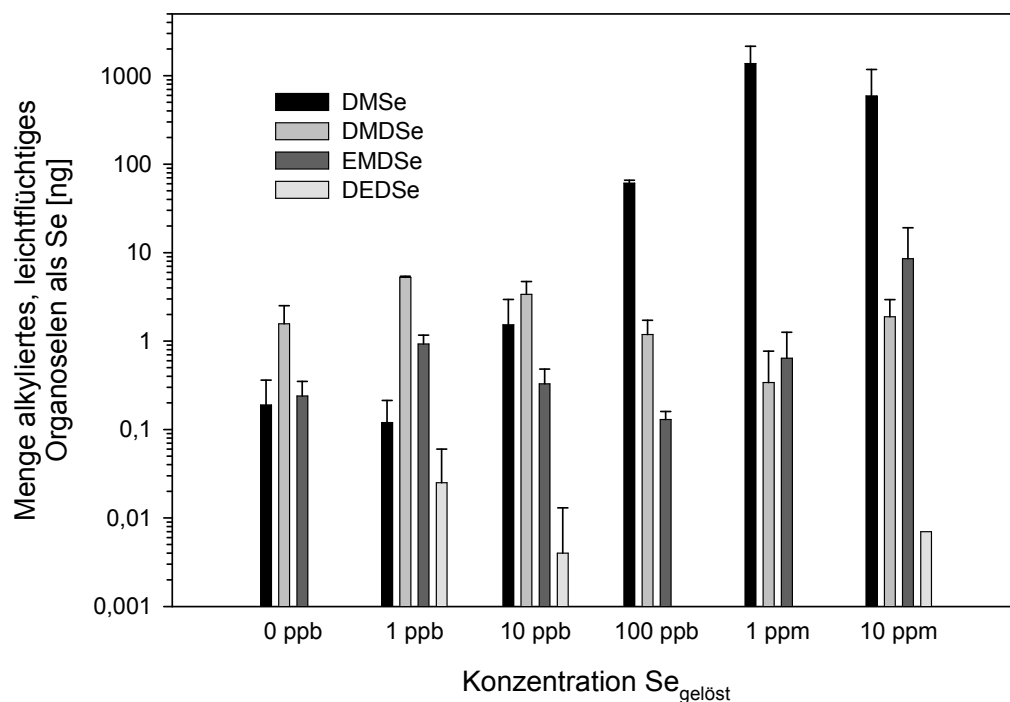


Abb. 3.7: Konzentrationsabhängige Alkylierung durch *A. alternata* (inkl. Standardabweichung, $n = 3$)

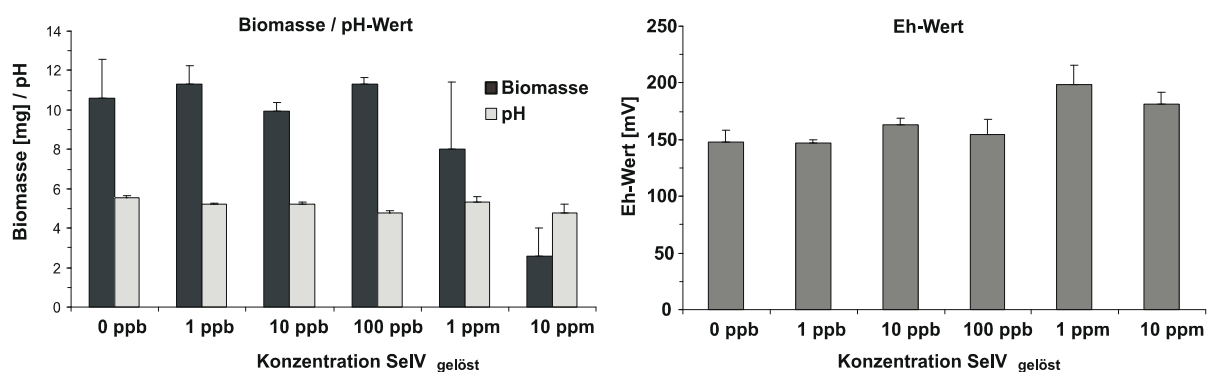


Abb. 3.8: Biomasse, pH-Wert und Redoxpotential (Eh) - Inkubation von *A. alternata* bei unterschiedlichen Selenitkonzentrationen im Nährmedium (inkl. Standardabweichung, $n = 3$)

Tab. 3.2: Alkylierte Selenverbindungen nach Inkubation von *A. alternata* (\pm Standardabweichung (n = 3))

Name	DMSe [ng Se]	DMDSe [ng Se]	EMDSe [ng Se]	DEDSe [ng Se]	Summe (CH ₃) _n Se _n [ng Se]
0 ppb - BG*	0,028	0,324	0,039	0,032	0,423
0 ppb	0,219 \pm 0,171	1,898 \pm 0,938	0,282 \pm 0,111	0,032 \pm 0,004	2,432 \pm 1,204
1 ppb - BG*	0,032	0,174	0,022	0,027	0,255
1 ppb	0,150 \pm 0,093	5,409 \pm 0,161	0,956 \pm 0,236	0,052 \pm 0,035	6,567 \pm 0,331
10 ppb - BG*	0,038	0,717	0,108	0,045	0,907
10 ppb	1,564 \pm 1,428	4,100 \pm 1,349	0,434 \pm 0,154	0,049 \pm 0,009	6,146 \pm 2,654
100 ppb - BG*	0,032	0,546	0,089	0,039	0,706
100 ppb	61,15 \pm 4,840	1,732 \pm 0,533	0,222 \pm 0,034	0,037 \pm 0,008	63,14 \pm 5,379
1 ppm - BG*	0,069	0,816	0,091	0,040	1,017
1 ppm	1370 \pm 782,3	1,154 \pm 0,428	0,734 \pm 0,617	0,018 \pm 0,003	1371 \pm 782,1
10 ppm - BG*	0,222	0,593	0,017	0,008	0,840
10 ppm	591,7 \pm 585,3	1,944 \pm 1,051	8,586 \pm 10,51	0,015	602,2 \pm 585,0

BG* - Hintergrund, abiotische Methylierung

3.2.2 Selenmethylierung durch die Umweltmischkultur

Nach der Kultivierung der Umweltmischkultur, angereichert aus Deponiesickerwasser wurden die Gasproben mittels CT-CF-GC-ICP-MS analysiert. Dabei konnten große Mengen von alkyliertem Selen gemessen werden (Abbildung 3.11, Tabelle 3.3).

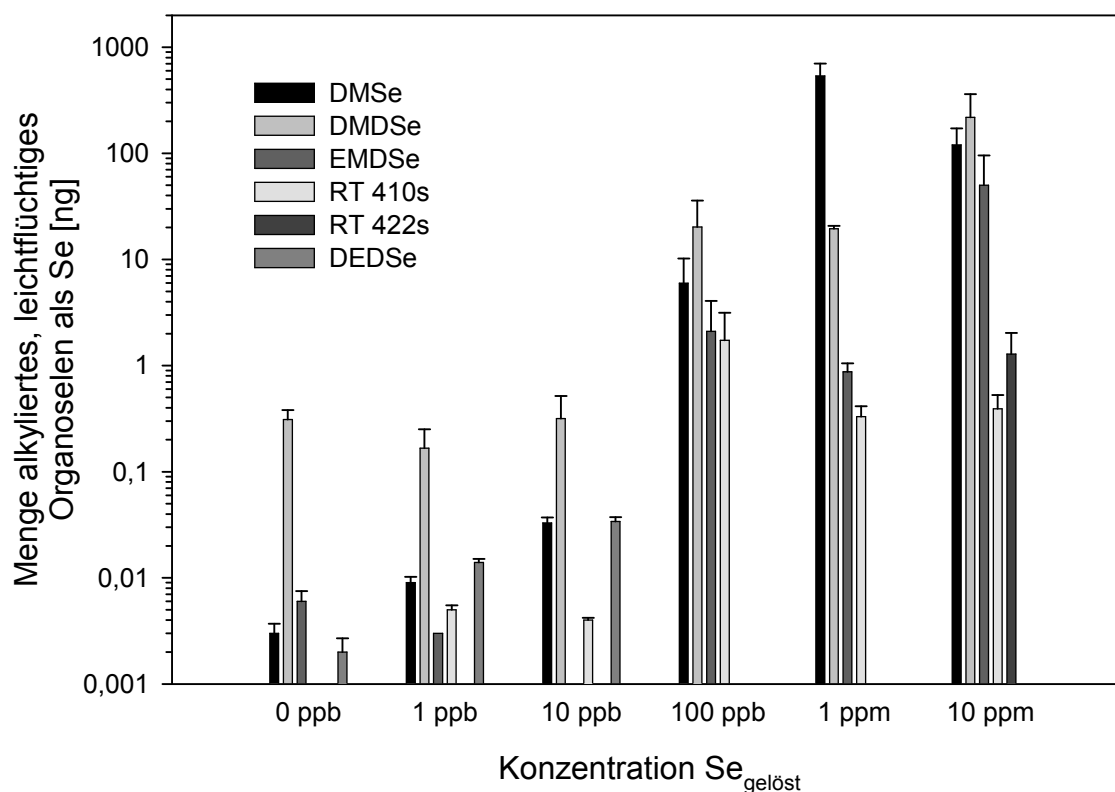


Abb. 3.11: Konzentrationsabhängige Alkylierung durch eine angereicherte Umweltmischkultur (inkl. Standardabweichung ($n = 3$), RT - Retentionszeit)

Neben den dominanten alkylierten Selenverbindungen DMSe, DMDSe und EMDSe, welche im gesamten Konzentrationsbereich zu finden waren, wurden zwei weitere, nicht näher definierte, leichtflüchtige, selenhaltige Spezies bei Retentionszeiten von 410s und 422s (RT 410s, RT 422s) beobachtet. Vor allem RT 410s konnte im höheren Konzentrationsbereich (100 ppb - 10 ppm) verstärkt nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Inkubationsversuchen mit *A. alternata* konnte im

Konzentrationsbereich von 0 ppb - 10 ppb auch eine aktive biologisch-bedingte Produktion von DEDSe gegenüber den abiotisch inkubierten Versuchsansätzen (BG, Tabelle 3.3) beobachtet werden.

Tab. 3.3: Alkylierte Selenverbindungen nach Inkubation einer Umweltmischkultur, angereichert aus Deponiesickerwasser (\pm Standardabweichung (n = 3))

Name	DMSe [ng Se]	DMDSe [ng Se]	EMDSe [ng Se]	DEDSe [ng Se]	Summe (CH ₃) _n Se _n [ng Se]
0 ppb - BG*	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
0 ppb	0,003 \pm 0,001	0,311 \pm 0,070	0,006 \pm 0,001	0,002 \pm 0,001	0,319 \pm 0,070
1 ppb - BG*	0,001	0,018	n.n.	0,028	0,047
1 ppb	0,011 \pm 0,001	0,185 \pm 0,084	0,003	0,042 \pm 0,001	0,244 \pm 0,085
10 ppb - BG*	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
10 ppb	0,033 \pm 0,004	0,317 \pm 0,200	n.n.	0,034 \pm 0,003	0,387 \pm 0,191
100 ppb - BG*	0,008	0,171	n.n.	n.n.	0,179
100 ppb	5,982 \pm 4,233	20,35 \pm 15,77	2,105 \pm 1,963	n.n.	30,16 \pm 23,31
1 ppm - BG*	0,007	0,053	n.n.	0,010	0,070
1 ppm	537,2 \pm 165,5	19,53 \pm 1,217	0,873 \pm 0,178	n.n.	557,9 \pm 165,6
10 ppm - BG*	0,004	0,039	n.n.	0,009	0,052
10 ppm	120,1 \pm 51,17	218,3 \pm 143,3	50,07 \pm 45,67	n.n.	388,8 \pm 146,4

BG* - Hintergrund, abiotische Methylierung

Weiterhin wurde untersucht, wie sich unterschiedliche Selenkonzentrationen im Nährmedium auf das Wachstum der Umweltmischkultur auswirken. Es konnte beobachtet werden, dass unterschiedliche Selenkonzentrationen im Nährmedium sich nicht nachteilig auf das Wachstum der angereicherten Mischkultur auswirken. Die Ursache dafür könnte sein, dass sich die Zusammensetzung der Mischkultur zwischen den einzelnen Konzentrationsbereichen unterscheidet. Wahrscheinlich werden aufgrund der unterschiedlichen Konzentrationen von gelöstem Selen im Nährmedium verschiedene Mikroorganismen stimuliert und angereichert. Allerdings sind sowohl die Menge der gebildeten Biomasse als auch die Entwicklung des pH-Wertes über den gesamten Konzentrationsbereich vergleichbar. Beim Redoxpotential ist ein Abwärtstrend mit zunehmender Konzentration von gelöstem Se(IV) im Nährmedium zu beobachten (Abbildung 3.12).

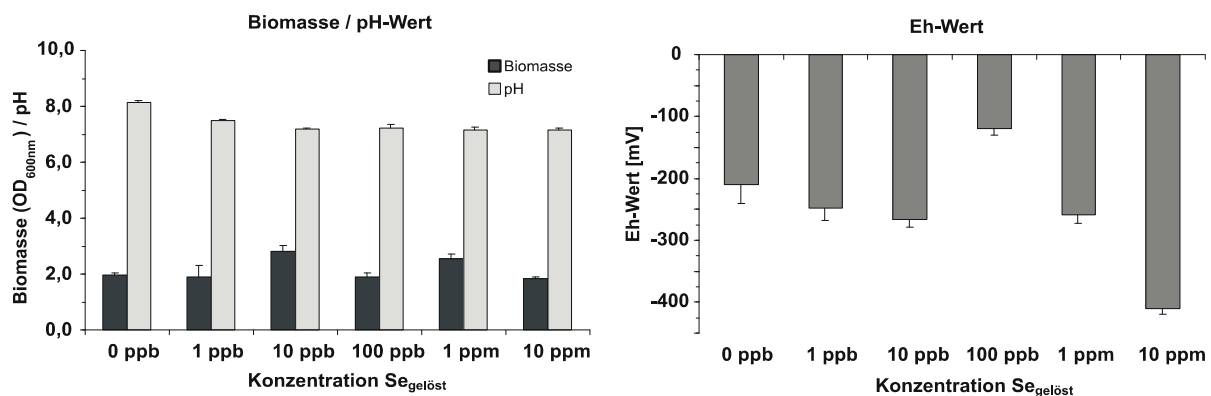


Abb. 3.12: Biomasse, pH-Wert und Redoxpotential (Eh) - Inkubation einer Umweltmischkultur bei unterschiedlichen Selenitkonzentrationen im Nährmedium (inkl. Standardabweichung (n = 3))

3.3 Geochemische Untersuchungen zur Adsorption an Goethit

3.3.1 Charakterisierung des Goethits

Vor den eigentlichen Sorptionsstudien wurde zunächst die spezifische Oberfläche des verwendeten Goethits nach der BET-Methode ermittelt. Hierfür wurde nach dreimaliger Messung ein Mittelwert von $10,1 \pm 0,6 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ berechnet (Konfidenzberechnung: $\alpha = 0,05$; Standardabweichung 0,5; $n = 3$).

Zur weiteren Charakterisierung wurde mittels potentiometrischer Titration der Ladungsnullpunkt des Goethits ermittelt. Die Titrationskurven für die verschiedenen Ionenstärken zeigen einen gemeinsamen Schnittpunkt, welcher mit einer Oberflächenladung von $\pm 0 \text{ C m}^{-2}$ bei $\text{pH} = 8,8$ einhergeht (Abbildung 3.13).

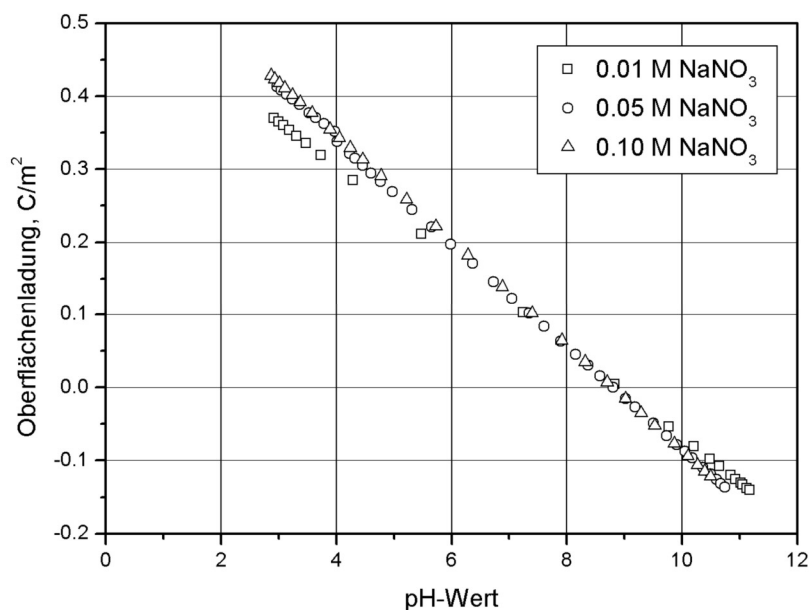


Abb. 3.13: Ermittlung des Ladungsnullpunktes in Abhängigkeit der Ionenstärke

Aus den Titrationsdaten wurden im Anschluss die für die Modellierung nötige Dichte der Oberflächenplätze sowie die Sternschichtkapazität wie folgt ermittelt.

Die im klassischen 2-pK Modell [98] angenommenen Protonierungs- und Deprotonierungsreaktionen von amphoterischen $\equiv\text{FeOH}$ -Gruppen, resultieren in positiv ($\equiv\text{FeOH}_2^+$) und negativ ($\equiv\text{FeO}^-$) geladenen Oberflächengruppen. Beide sind

dabei dem gleichen elektrostatischen Potential ψ_0 ausgesetzt. Die entsprechenden Reaktionskonstanten (Gleichung 4 & 6) ergeben sich aus den Reaktionen 3 und 5.



$$K_{S1} = \left\{ \frac{[\text{FeOH}_2^+]}{[\text{FeOH}][\text{H}^+]} \right\} \cdot \exp(\psi_0 F / RT) \quad (4)$$



$$K_{S2} = \left\{ \frac{[\text{FeO}^-][\text{H}^+]}{[\text{FeOH}]} \right\} \cdot \exp(-\psi_0 F / RT) \quad (6)$$

K_{S1}, K_{S2}	- Gleichgewichtskonstanten
$[\text{FeOH}_2^+], [\text{FeOH}],$ $[\text{FeO}^-]$	- Konzentrationen der einzelnen Oberflächen (mol L ⁻¹)
F	- Faraday-Konstante (96485 C mol ⁻¹)
R	- universelle Gaskonstante (8,314 J K ⁻¹ mol ⁻¹)
T	- Temperatur (K)
ψ_0	- elektrostatisches Potential (V)

In das Modell wurden weitere Reaktionen sogenannter Gegenionen (Gleichung 7 & 9) eingebettet, welche die Bindung gegensätzlich geladener Ionen an den verschiedenen Oberflächen beschreiben:



$$K_A = \left\{ \frac{[\text{FeOH}_2^+ \text{A}^-]}{[\text{FeOH}_2^+][\text{A}^-]} \right\} \cdot \exp(-\psi_\beta F / RT) \quad (8)$$



$$K_C = \left\{ \frac{[\text{FeO}^- \text{C}^+]}{[\text{FeO}^-][\text{C}^+]} \right\} \cdot \exp(\psi_\beta F / RT) \quad (10)$$

A^-, C^+	- Anionen, Kationen
K_A, K_C	- Gleichgewichtskonstanten
ψ_β	- Gegenion-abhängiges elektrostatisches Potential (V)

Aus diesen Annahmen ergeben sich zwei unterschiedliche elektrostatische Potentiale (ψ_0, ψ_β) und damit auch zwei unterschiedliche Oberflächenladungsdichten (σ_0, σ_β) (in $\text{mol}_c \text{L}^{-1}$) in der 0-Schicht und der β -Schicht (Gleichung 11 & 12):

$$\sigma_0 = (F / SC) \{ [\text{FeOH}_2^+] + [\text{FeOH}_2^+ A^-] - [\text{FeO}^-] - [\text{FeO}^- \text{C}^+] \} \quad (11)$$

$$\sigma_\beta = (F / SC) \{ [\text{FeO}^- \text{C}^+] - [\text{FeOH}_2^+ A^-] \} \quad (12)$$

Als Protonierungs- bzw. Dissoziationskonstanten (Gleichung 3 & 5) wurden $\log K_{S1} = 8,8$ und $\log K_{S2} = -8,8$ aus der Bestimmung des Ladungsnullpunktes verwendet. Als Bindungskonstanten der Gegenionen (Gleichung 8 & 10) wurden $\log K_A = \log K_C = 1,0$ angenommen.

Mithilfe dieser Annahmen und GRFIT wurden die Bindungsplatzdichte der Oberfläche des Goethits ($0,178 \text{ mmol g}^{-1}$) und die Kapazität der Sternschicht ($1,3 \text{ F m}^{-2}$) gefittet, welche dann für die Modellierung der Sorption von Selenit bzw. der Aminosäuren an der Goethitoberfläche verwendet wurden.

3.3.2 Sorption von Aminosäuren an Goethit

Da die Sorptionsexperimente in einem mikrobiologischen Nährmedium durchgeführt wurden und nicht wie üblich in einer wässrigen Elektrolytlösung, wurden parallele Sorptionsstudien mit einzeln vorliegenden Aminosäuren (Glutaminsäure, Glycin, Lysin) durchgeführt.

Dabei wurden im Falle des Lysins keine messbaren Unterschiede im Lysingehalt der Gleichgewichtslösung und der ursprünglich zur Verfügung gestellten Lösung beobachtet, was den Schluss zulässt, dass Lysin nicht in entsprechenden Mengen im vorliegenden pH-Bereich (2 - 10) an der Goethitoberfläche sorbiert wird. Für die beiden anderen Aminosäuren Glutaminsäure und Glycin konnte die pH-abhängige Sorption an Goethit in unterschiedlichen Ausmaßen gezeigt werden (Abbildung 3.14 - ads (exp)). Zusätzlich zur pH-abhängigen Sorption der Aminosäuren sind in Abbildung 3.14 auch die pH-abhängigen Säure-Base-Eigenschaften der Aminosäuren in wässrigen Lösungen dargestellt. Diese sind zur Beschreibung möglicher Zusammensetzungen von gebildeten Oberflächenkomplexen nötig. Die entsprechenden Dissoziationskonstanten der Aminosäuren sowie der vorliegenden Selenespezies sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tab. 3.4: Reaktionsgleichungen sowie zugehörige Dissoziationskonstanten [99] der zur Sorptionsmodellierung genutzten Selenit- und Aminosäurespezies

Reaktionsgleichungen	pK
Selenige Säure	
$\text{H}_2\text{SeO}_3 \leftrightarrow \text{HSeO}_3^- + \text{H}^+$	2,62
$\text{HSeO}_3^- \leftrightarrow \text{SeO}_3^{2-} + \text{H}^+$	8,32
Glycin	
$\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COOH} \leftrightarrow \text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^- + \text{H}^+$	2,35
$\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{COO}^- \leftrightarrow \text{H}_2\text{NCH}_2\text{COO}^- + \text{H}^+$	9,78
Glutaminsäure	
$\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}(\text{COOH})\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} \leftrightarrow \text{H}_3\text{N}^+\text{CH}(\text{COO}^-)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} + \text{H}^+$	2,23
$\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}(\text{COO}^-)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} \leftrightarrow \text{H}_3\text{N}^+\text{CH}(\text{COO}^-)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + \text{H}^+$	4,42
$\text{H}_3\text{N}^+\text{CH}(\text{COO}^-)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- \leftrightarrow \text{H}_2\text{NCH}(\text{COO}^-)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^- + \text{H}^+$	9,95

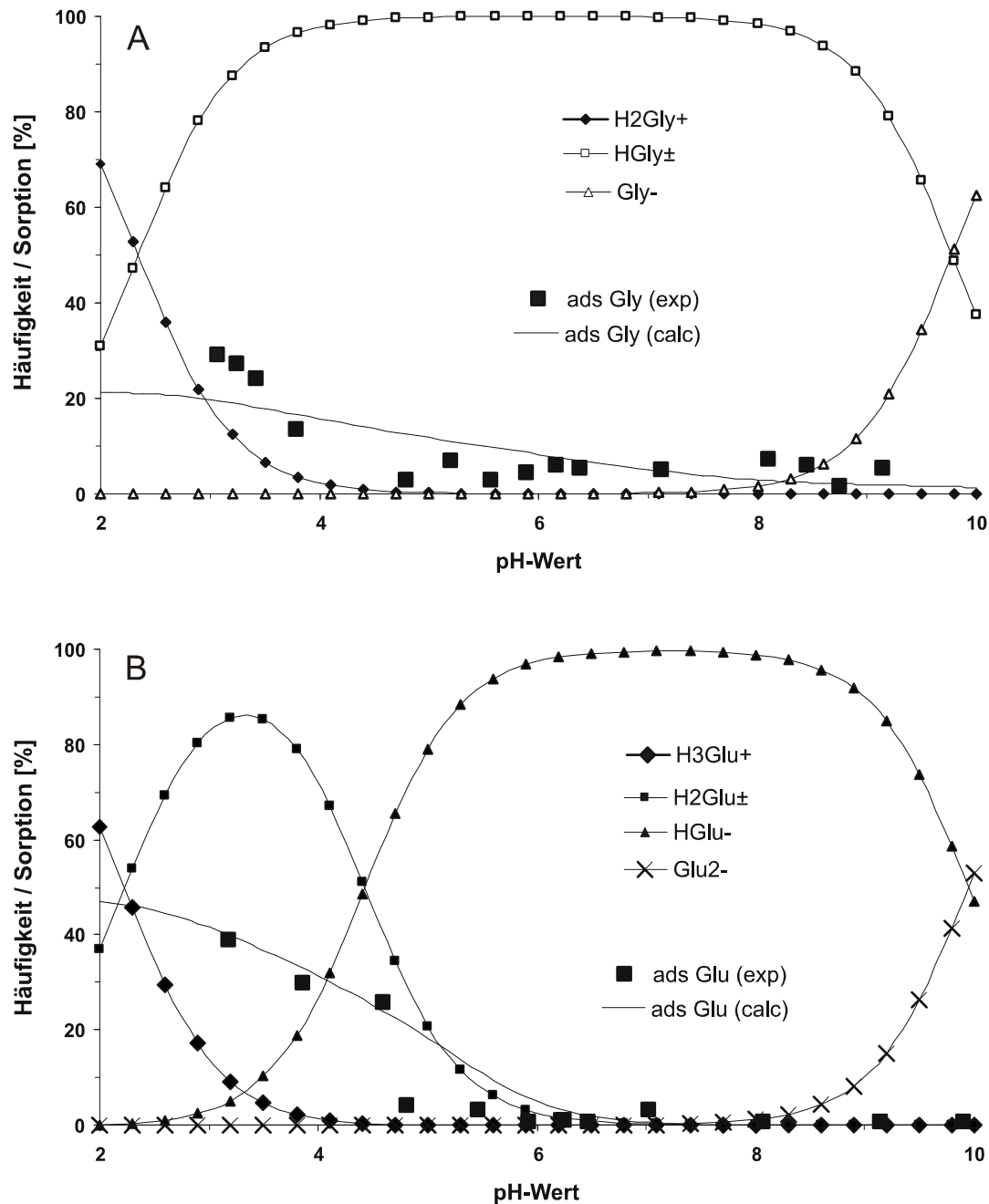
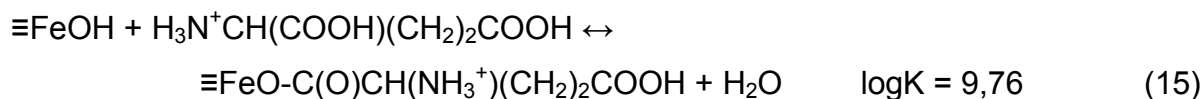
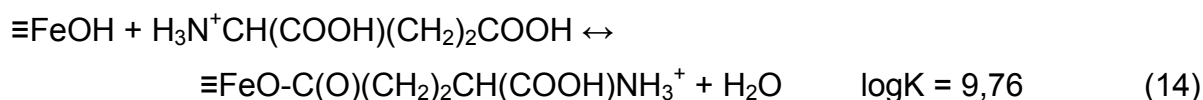


Abb. 3.14: pH-abhängige Speziation der in 0,01 M NaCl gelösten Aminosäuren sowie Sorption dieser an Goethit (10 g Goethit L⁻¹), A - Glycin (0,55 g Glycin L⁻¹), B - Glutaminsäure (0,5 g Glu L⁻¹) (Modellierung Dr. N. Vlasova, Kiev)

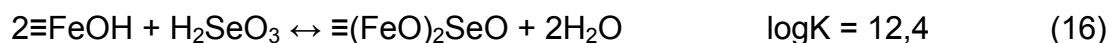
Wie aus der Speziation der gelösten Aminosäuren in Abbildung 3.14 ersichtlich ist, können Glycin und Glutaminsäure in Abhängigkeit vom pH-Wert als Kation (H₂Gly⁺, H₃Glu⁺), als Zwitterion (HGly[±], H₂Glu[±]) oder als Anion (Gly⁻, HGlu⁻) bzw. im Falle der Glutaminsäure sogar als Dianion (Glu²⁻) vorliegen. Die bestmögliche Übereinstimmung der berechneten Adsorptionskurven in Abbildung 3.14 (ads (calc))

mit den experimentellen Daten (ads (exp)) wurde bei der Modellierung von Oberflächenkomplexen zwischen Hydroxyl-Gruppen des Goethits und vollständig protonierten Aminosäuren erreicht (Glycin Gleichung 13, Glutaminsäure Gleichung 14 & 15).



3.3.3 Sorption von Se(IV) an Goethit in unterschiedlichen Systemen

Die Sorption von Selenit an Goethit wurde zunächst in einer 10 mM NaCl durchgeführt. Aus der Differenz der initial zugegebenen Konzentration und der Gleichgewichtskonzentration wurde die sorbierte Menge berechnet. Wie Abbildung 3.15 zeigt, wurden über einen weiten pH-Bereich (pH 3 - 7) hohe Sorptionsmengen zwischen 90 - 95 % beobachtet. Bei Annäherung des pH-Wertes an den Ladungsnullpunkt des Goethits wurde eine starke Abnahme der sorbierten SeIV-Mengen beobachtet. Mit den ermittelten Sorptionsdaten (Abbildung 3.15 A - ads SeIV (exp)) konnten die Gleichgewichtskonstanten der Sorptionsreaktionen gefittet werden. Die beste Übereinstimmung der experimentellen und der modellierten Daten wurde unter Annahme der Bildung eines bidentaten, innersphärischen Komplexes (Gleichung 16) erhalten.



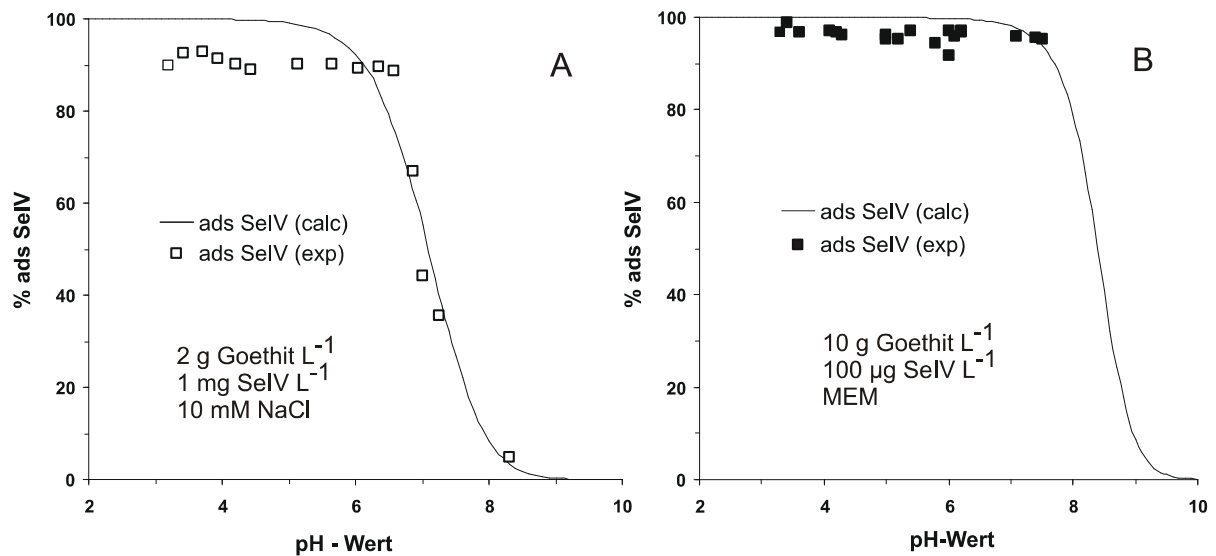


Abb. 3.15: pH-abhängige Adsorption von SeIV in 10mM NaCl-Lösung (A) und in einem mikrobiologischen Nährmedium (MEM) (B) (Modellierung Dr. N. Vlasova, Kiew)

Abbildung 3.15 B zeigt die sorbierten Mengen SeIV in dem für die mikrobiologischen Untersuchungen verwendeten proteinhaltigen Nährmedium. Die Einwaage an Goethit (10 g L⁻¹) sowie SeIV (100 µg L⁻¹) entsprechen den in den mikrobiologischen Inkubationsversuchen verwendeten Bedingungen. Auch hier konnte ein vergleichbares, pH-abhängiges Sorptionsverhalten wie in der NaCl-Lösung beobachtet werden (ads SeIV (exp)). Die Modellierung der Adsorption (Abbildung 3.15 B (ads SeIV (calc))) im Nährmedium erfolgte auf die gleiche Weise wie in Abbildung 3.15 A unter Einbeziehung von Gleichung 16 sowie in Gegenwart von Glutaminsäure (Gleichung 14 & 15). Hierbei wurde eine Reaktionskonstante $\log K = 12,6$ ermittelt, welche sehr gut mit der in Gleichung 16 ermittelten ($\log K = 12,4$) übereinstimmt.

3.4 Biogeochemische Untersuchungen zur Mobilisierung von Selen

Zur Untersuchung der biologischen Verfügbarkeit bzw. Mobilisierbarkeit von adsorptiv gebundenem Selenit wurden Inkubationsversuche durchgeführt. Dabei wurde in parallelen Versuchsansätzen das Alkylierungsvermögen der eingesetzten mikrobiologischen Kulturen verglichen. Zum einen enthielt das Nährmedium frei verfügbares Selenit und zum anderen wurde das im Nährmedium gelöste SeIV zunächst an Goethit adsorbiert. Hierzu wurde vor der eigentlichen mikrobiologischen Inkubation, d.h. vor der Inokulation, das Selenit dem Nährmedium zugesetzt und eine Konzentration von $100 \mu\text{g L}^{-1}$ eingestellt. Im Anschluss wurde dieses mit in Kulturflaschen eingewogenem, sterilisiertem Goethit zusammen gebracht und damit eine Feststoffkonzentration von 10g L^{-1} eingestellt. Nach der Einstellung des Sorptionsgleichgewichtes wurden die unterschiedlichen mikrobiologischen Inokula auf die einzelnen Ansätze verteilt. Nach erfolgter Inkubation wurden die Gasphasen beprobt und diese zur Analyse der leichtflüchtigen, alkylierten Organoselenverbindungen mittels der CT-CF-GC-ICP-MS verwendet. Weiterhin wurden der pH-Wert, das Redoxpotential und die sich gebildete Biomasse bestimmt, um eventuell auftretende Unterschiede im Alkylierungsverhalten aufgrund von unterschiedlichen Wachstumsparametern auszuschließen. Zur Analyse der gelösten Gesamt-selengehalte in den Versuchsansätzen wurden die einzelnen Proben zentrifugiert, filtriert und mittels ICP-MS gemessen.

Außerdem wurde als weiteres System zur Untersuchung der Mobilisierbarkeit von Selen ein reduziertes Eisenselenid-Mineral (FeSe_2) verwendet. Dieses wurde mit dem sulfatreduzierenden Bakterium *D. gigas* inkubiert und die Volatilisierung des Selens beobachtet.

3.4.1 Alkylierung von adsorptiv gebundenem bzw. frei verfügbarem, gelöstem Se(IV) durch *A. alternata*

Vergleicht man die Entstehung von Organoselenverbindungen bei der Inkubation von *A. alternata* mit adsorptiv gebundenem und gelöstem Selenit (Tabelle 3.5, Abbildung 3.16) wird deutlich, dass in beiden Inkubationsreihen die Gehalte an DMSe gegenüber DMDSe jeweils um ca. drei Größenordnungen höher lagen. Außerdem konnte beobachtet werden, dass im Falle der Inkubation mit frei verfügbarem Selenit die Gesamtmengen an Alkylseleniden gegenüber den Ansätzen mit geochemisch gebundenem Selenit erhöht waren. Diese Erhöhung verringerte sich im Laufe der Inkubationszeit, so dass am Ende des Untersuchungszeitraums nur noch ein Anreicherungsfaktor von 2 beobachtet werden konnte. Weitere Unterschiede in der Art der gebildeten Alkylselenidspezies zeigten sich zwischen den beiden Ansätzen. Im Falle des frei verfügbaren Selenits im Nährmedium konnte DMDSe erst nach einer Inkubationszeit von 13 Tagen in der Gasphase analysiert werden, wohingegen im Parallelansatz mit gebundenem Selen dies bereits zu Beginn der Inkubation nachgewiesen werden konnte.

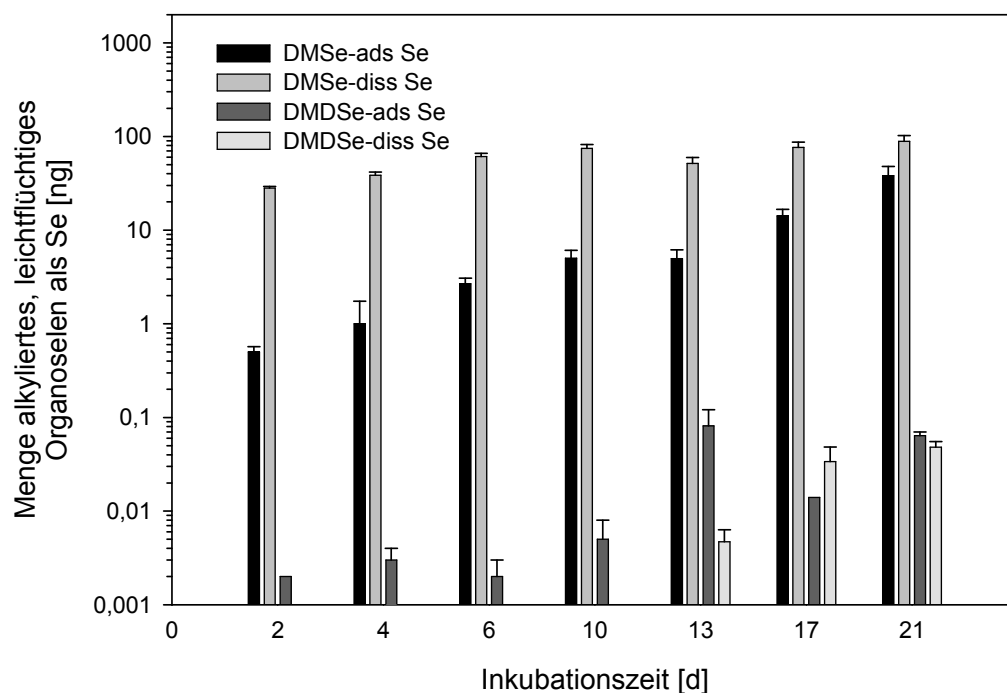


Abb.3.16: Gegenüberstellung der analysierten Organoselenverbindungen während der Inkubation von *A. alternata* mit adsorptiv gebundenem Selen (-ads Se) und frei verfügbarem Selen (-diss Se) (inkl. Standardabweichung, n = 3)

Tab. 3.5: Alkylierte Organoselenverbindungen bei der Inkubation von *A. alternata* in Abhängigkeit der Verfügbarkeit (\pm Standardabweichung ($n = 3$))

Zeit [d]	Alkyliertes, leichtflüchtiges Organoselen als Se (frei verfügbares Selen)			Alkyliertes, leichtflüchtiges Organoselen als Se (adsorptiv gebundenes Selen)		
	DMSe [ng]	DMDSe [ng]	Summe* (CH ₃) _n Se _n [ng]	DMSe [ng]	DMDSe [ng]	Summe* (CH ₃) _n Se _n [ng]
2	28,13 \pm 1,09	n.n.	28,13 \pm 1,09	0,501 \pm 0,072	0,002 \pm 0,001	0,503 \pm 0,072
4	38,56 \pm 3,09	n.n.	38,56 \pm 3,09	1,003 \pm 0,738	0,003 \pm 0,001	1,006 \pm 0,739
6	61,15 \pm 4,84	n.n.	61,15 \pm 4,84	2,668 \pm 0,413	0,002 \pm 0,001	2,670 \pm 0,412
10	74,58 \pm 7,30	n.n.	74,58 \pm 7,30	5,005 \pm 1,090	0,005 \pm 0,003	5,010 \pm 1,087
13	51,48 \pm 8,18	0,005 \pm 0,002	51,48 \pm 8,18	4,948 \pm 1,225	0,081 \pm 0,040	5,029 \pm 1,192
17	76,42 \pm 10,61	0,034 \pm 0,014	76,45 \pm 10,61	14,20 \pm 2,523	0,014	14,21 \pm 2,521
21	88,73 \pm 13,29	0,048 \pm 0,007	88,78 \pm 13,29	38,05 \pm 9,867	0,064 \pm 0,006	38,12 \pm 9,864

* - Summe aller aufgetretenen Alkylselenide

Unterschiede, wie sie in den alkylierten Selenmengen zwischen den verschiedenen Inkubationsreihen gemessen wurden, konnten parallel auch in den erhobenen Daten zur Biomasse-, pH-Wert- und Redoxentwicklung (Abbildung 3.17) beobachtet werden. Die Menge an gebildeter Biomasse wurde innerhalb der Reihe mit adsorbiertem Selen jeweils um ca. 1/3 geringer analysiert (8 mg gegenüber 12 mg). Ein Grund für diese Unterschiede könnte in der Anwendung unterschiedlicher Methoden zur Biomassebestimmung liegen. Ähnliche Verhältnisse konnten auch für das Redoxpotential beobachtet werden. Beim pH-Wert hingegen wurden in der Reihe mit gelöstem Selen stets um 0,5 – 1,5 pH-Einheiten höhere Werte gemessen.

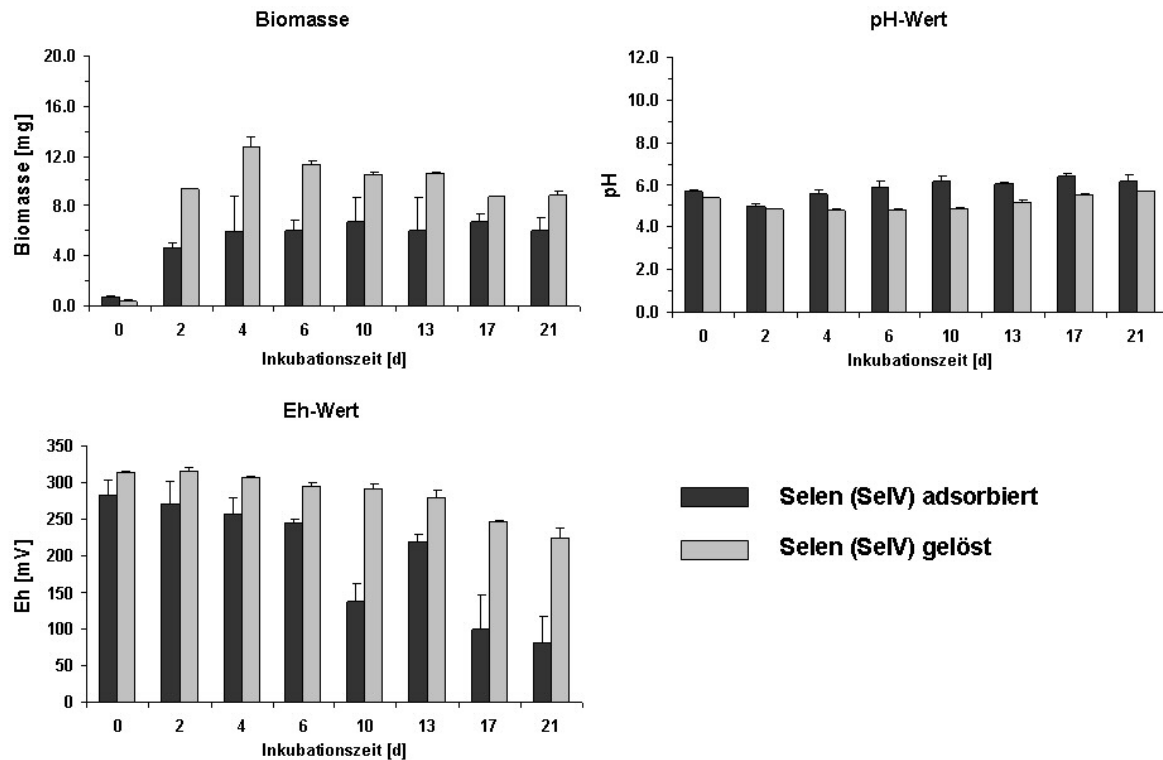


Abb. 3.17: Biomasse-, pH-Wert- und Redoxpotential-Entwicklung während der Inkubation von *A. alternata* mit unterschiedlich verfügbarem SeIV (inkl. Standardabweichung, n = 3)

Im Anschluss an die Inkubationsversuche wurden die gelösten Mengen an Selen mittels ICP-MS analysiert. In der Reihe mit adsorptiv gebundenem SeIV wurde ein Anteil von 5 - 10 % der Gesamtselenkonzentration ($100 \mu\text{g Se L}^{-1}$) als gelöstes Selen gefunden (Abbildung 3.18), wobei diese an den Inkubationstagen 6 und 10 am größten waren (12,9 % bzw. 12,7 %) sowie die größten Abweichungen (11,5 % bzw. 10,8 %) aufwiesen. Im Falle der Inkubationsreihe mit freiverfügbarem, gelösten SeIV wurden zu Beginn der Untersuchung nur ca. 20 % der initial zugegebenen Se-Menge wiedergefunden (Abbildung 3.18, Inkubationszeit 2 d), was den Schluss zulässt, dass der Pilz *A. alternata* das gelöste SeIV in die Biomasse eingebaut hat. Diese Aufnahme des gelösten Selens durch die Biomasse konnte in einem weiteren Experiment gezeigt werden, in dem die gebildete Biomasse auf ihren Selengehalt analysiert wurde. Es konnten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit (2 - 10 Tage) $54,6 \pm 2,6 \%$ bis $83,4 \pm 8,7 \%$ des eingesetzten Selens in der Biomasse wiedergefunden werden. Im Laufe der Untersuchung stiegen die gelösten

Selengehalte in der Goethit-freien Inkubationsreihe wieder allmählich an und erreichten nach 21 Tagen ca. 40 % der Ausgangskonzentration.

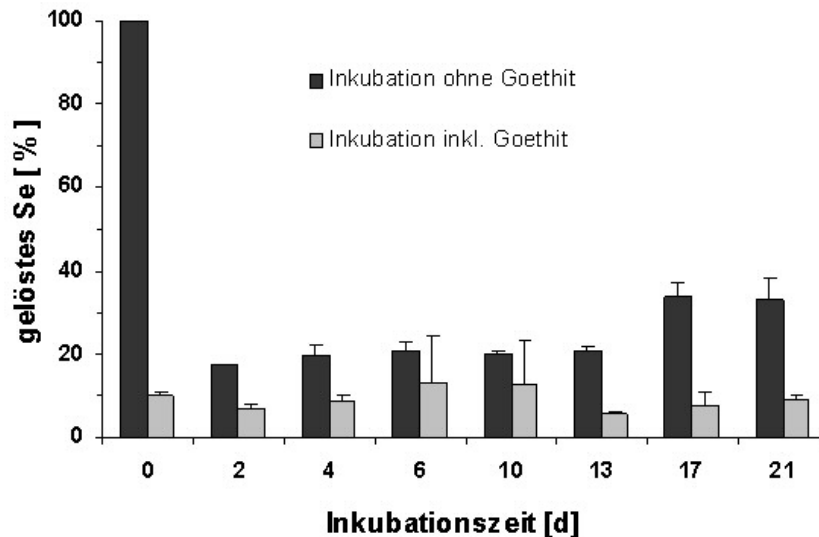


Abb. 3.18: Gelöste Selengehalte während der Inkubation von *A. alternata* mit und ohne Goethit im System (inkl. Standardabweichung, n = 3)

3.4.2 Alkylierung von adsorptiv gebundenem und frei verfügbarem, gelöstem Se(IV) durch eine Umweltmischkultur

Während der Inkubation der Umweltmischprobe wurden vor allem innerhalb der ersten 10 Tage keine wesentlichen Unterschiede in der Speziation der detektierten Verbindungen, hauptsächlich DMSe, DMDSe und EMDSe, und in der Gesamtmenge der Alkylselenide beobachtet (Tabelle 3.6, Abbildungen 3.19 & 3.20). Nach 10 Tagen wiederum veränderten sich die Speziationsmuster dahingehend, dass im Falle der Inkubation mit frei verfügbarem Se(IV) (Abbildung 3.19) eine verstärkte Zunahme von DMSe zu beobachten war, wobei andere Spezies in etwa gleichen Mengen wie zuvor (DMDSe) bzw. gar nicht mehr auftraten (EMDSe, RT 426s). Diese verstärkte Zunahme von DMSe und das Ausbleiben anderer Spezies konnte bei der Inkubation mit adsorptiv gebundenem Se(IV) nicht beobachtet werden (Abbildung 3.20).

Tab. 3.6: Dominant vorkommende, alkylierte Organoselenverbindungen bei der Kultivierung der Umweltmischkultur in Abhängigkeit der Verfügbarkeit des Selen (\pm Standardabweichung ($n = 3$))

Zeit [d]	Alkyliertes, leichtflüchtiges Organoselen als Se (Inkubation mit frei verfügbarem Selen)			Alkyliertes, leichtflüchtiges Organoselen als Se (Inkubation mit gebundenem Selen)		
	DMS _e [ng]	DMDSe [ng]	Summe* (CH ₃) _n Se _n [ng]	DMS _e [ng]	DMDSe [ng]	Summe* (CH ₃) _n Se _n [ng]
2	0,012 ± 0,044	0,671 ± 0,728	0,785 ± 0,833	0,025 ± 0,052	1,296 ± 1,186	1,989 ± 1,908
4	0,819 ± 1,329	0,709 ± 1,028	2,006 ± 3,009	0,014 ± 0,022	0,609 ± 0,502	0,713 ± 0,568
6	0,315 ± 0,435	0,165 ± 0,060	0,531 ± 0,501	0,218 ± 0,363	0,428 ± 0,460	0,840 ± 0,948
10	0,810 ± 0,740	0,036 ± 0,012	0,847 ± 0,751	0,210 ± 0,268	0,083 ± 0,082	0,280 ± 0,332
14	13,34 ± 8,432	0,229 ± 0,114	13,60 ± 8,307	2,661 ± 3,216	0,349 ± 0,488	3,065 ± 3,772
21	22,95 ± 18,31	0,160 ± 0,038	23,11 ± 18,33	0,360 ± 0,094	0,748 ± 0,399	1,198 ± 0,523

* - Summe aller aufgetretenen Alkylselenide

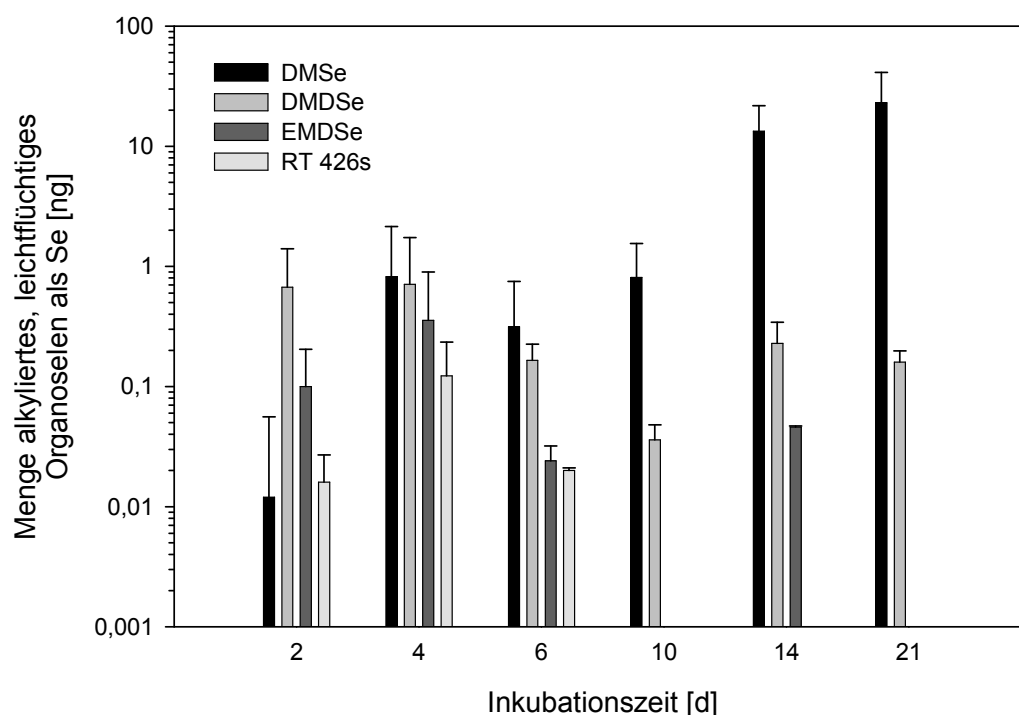


Abb. 3.19: Alkylierte, leichtflüchtige Organoselenverbindungen während der Inkubation der angereicherten Umweltmischkultur mit frei verfügbarem, gelöstem SelV (inkl. Standardabweichung, $n = 3$)

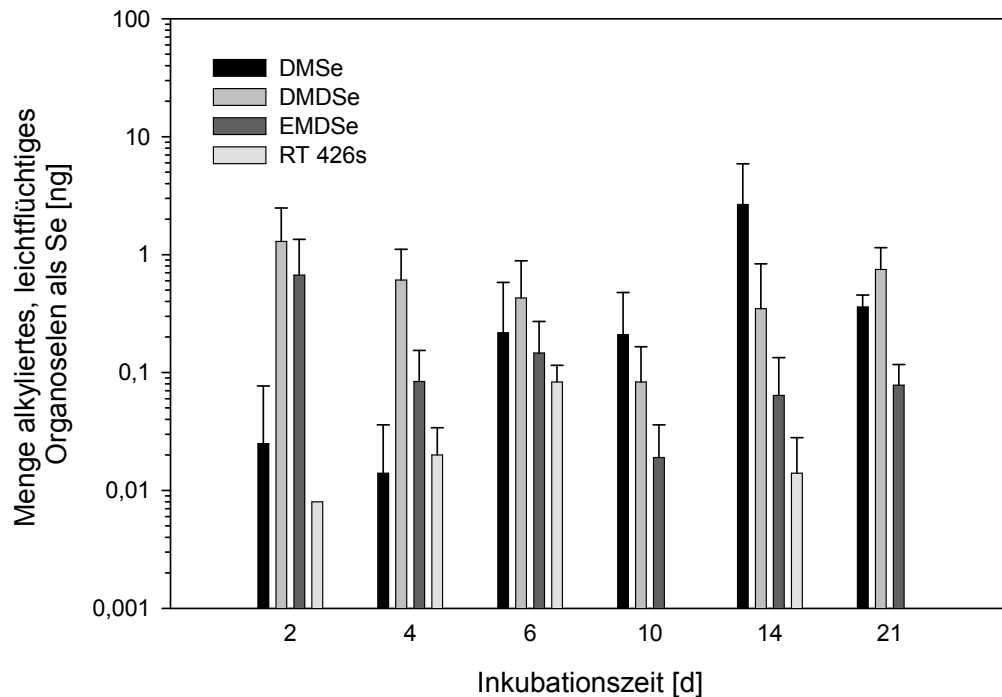


Abb. 3.20: Alkylierte, leichtflüchtige Organoselenverbindungen während der Inkubation der angereicherten Umweltmischkultur mit geochemisch gebundenem SelV (inkl. Standardabweichung, $n = 3$)

Auffällig in beiden Inkubationsreihen sind die großen Schwankungen zwischen den einzelnen Parallelansätzen pro Messtag, welche zur Mittelwertbildung herangezogen wurden (Tabelle 3.6). Verantwortlich hierfür ist wahrscheinlich die zu erwartende Heterogenität der angereicherten Umweltmischprobe.

Die Entwicklung der Wachstumsparameter pH-Wert und Redoxpotential beider Inkubationsreihen verliefen sehr ähnlich (Abbildung 3.21). Der pH-Wert lag in beiden Reihen über die gesamte Inkubationszeit zwischen 6,0 und 6,5. Das Redoxpotential hingegen nahm zunächst stark um ca. 300 mV innerhalb der ersten 48 h ab. Das erreichte Plateau von ca. -150 mV blieb im weiteren Verlauf annähernd konstant. Für die gebildete Biomasse, welche in Form der Zellzahl pro Milliliter in Abbildung 3.21 dargestellt ist, wurde zunächst ein starker Anstieg beobachtet. In der Inkubationsreihe mit adsorbiertem Selen blieben die Zellzahlen ab dem 6. Tag konstant, in der Untersuchungsreihe mit frei verfügbarem Selen wurde eine Abnahme der Zellzahl ab dem 6. Inkubationstag beobachtet.

Im Gegensatz zu den großen Abweichungen innerhalb der Menge an gebildeten Alkylseleniden wurden innerhalb der Wachstumsparameter pH-Wert und

Redoxpotential als auch der gebildeten Biomasse wesentlich geringere prozentuale Abweichungen beobachtet.

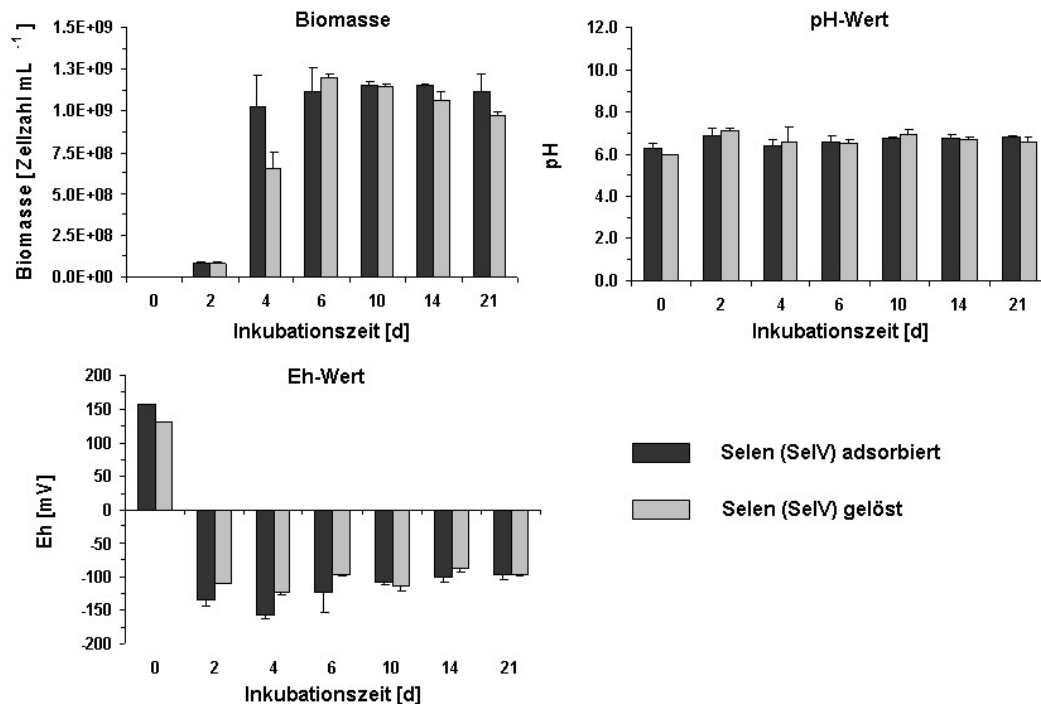


Abb. 3.21: Biomasse-, pH-Wert- und Redoxpotential-Entwicklung während der Inkubation einer Umweltmischkultur mit adsorbiertem und frei verfügbarem SeIV (inkl. Standardabweichung, n = 3)

Die Analyse der gelösten Selen-Gehalte in den Inkubationsansätzen zeigte im Falle der Inkubation mit frei verfügbarem SeIV ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) zunächst eine starke Abnahme an gelöstem Selen im Nährmedium, der sich nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen nicht mehr wesentlich änderte (Abbildung 3.22). Allerdings wurden zwischen den Proben der einzelnen Messtage große Abweichungen beobachtet, die vor allem nach 14 Tagen Inkubationszeit (relative Standardabweichung 97 %) und 21 Tagen Inkubationszeit (relative Standardabweichung 65 %) besonders deutlich waren.

Innerhalb der Inkubationsreihe mit geochemisch gebundenem SeIV ($100 \mu\text{g L}^{-1}$, $10 \text{ g Goethit L}^{-1}$) wurden nur geringe Gehalte von ca. 10 % an gelöstem Selen analysiert (Abbildung 3.22), die im Verlaufe der Inkubation bis auf 15 - 25 % anstiegen.

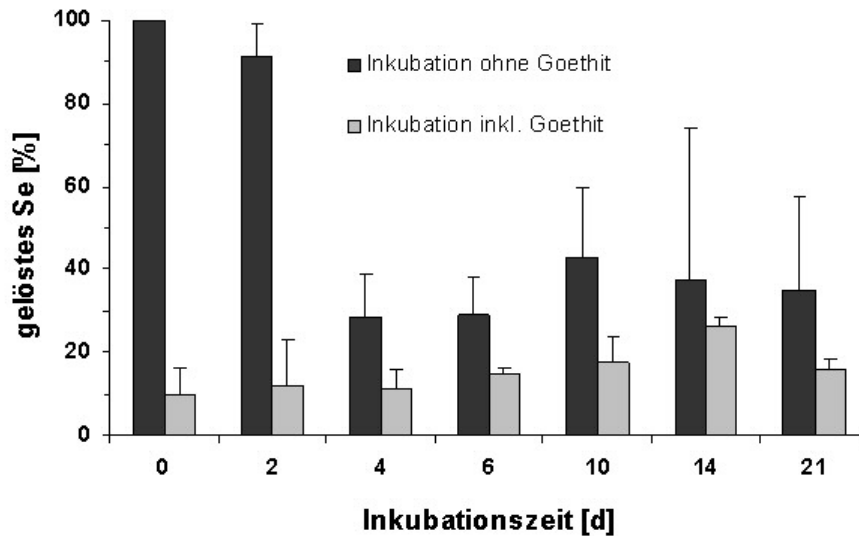


Abb. 3.22: Gelöste Selengehalte während der Inkubation einer Umweltmischkultur mit und ohne Goethit im System (inkl. Standardabweichung, n = 3)

3.4.3 Alkylierung von mineralischem Selen (FeSe_2) durch *D. gigas*

Während der FeSe_2 -Inkubation mit *D. gigas* wurden zu unterschiedlichen Inkubationszeiten die Gasphasen beprobt und die Menge an alkylierten, leichtflüchtigen Selenverbindungen analysiert. Hierzu wurden jeweils 3 Kulturen mit FeSe_2 untersucht. Zur Kontrolle (K) wurde jeweils 1 Kultur ohne FeSe_2 pro Messtag mitgeführt, um den Hintergrundwert zu ermitteln, der sich durch das eingesetzte Nährmedium ergibt (Tabelle 3.7). Aus Tabelle 3.8 wird deutlich, dass auch in den Kontrollansätzen ohne FeSe_2 , also im Kultivierungsmedium teilweise große Mengen alkylierter Selenverbindungen gefunden wurden.

Tab. 3.7: Alkylierte Selenverbindungen während der Inkubation von *D. gigas* (\pm Standardabweichung (n = 3))

Zeit	DMSe	RT 180s	RT 220s	RT 270s	DESe	Summe*
[d]	[ng]	[ng]	[ng]	[ng]	[ng]	(CH ₃) _n Se _n [ng]
2 - K	0,256	0,512	n.n.	n.n.	n.n.	0,768
2 - FeSe ₂	1,262 \pm 0,051	3,999 \pm 2,108	0,224 \pm 0,034	0,201 \pm 0,032	n.n.	5,759 \pm 2,102
4 - K	0,558	1,358	n.n.	0,026	n.n.	1,966
4 - FeSe ₂	1,091 \pm 0,064	1,629 \pm 1,501	0,207 \pm 0,023	0,137 \pm 0,120	n.n.	3,171 \pm 1,516
7 - K	0,754	0,562	0,008	0,011	n.n.	1,351
7 - FeSe ₂	0,982 \pm 0,049	0,344 \pm 0,002	0,168 \pm 0,017	0,132 \pm 0,018	0,051 \pm 0,005	1,678 \pm 0,087
10 - K	0,392	1,154	n.n.	n.n.	n.n.	1,546
10 - FeSe ₂	1,403 \pm 0,313	0,542 \pm 0,254	0,246 \pm 0,032	0,191 \pm 0,037	0,078 \pm 0,015	2,460 \pm 0,288
17 - K	0,295	0,761	n.n.	n.n.	n.n.	1,056
17 - FeSe ₂	3,106 \pm 0,631	0,422 \pm 0,155	0,372 \pm 0,119	0,253 \pm 0,038	0,098 \pm 0,023	4,251 \pm 0,536
24 - K	0,238	0,823	0,023	0,033	n.n.	1,247
24 - FeSe ₂	2,365 \pm 0,297	0,344 \pm 0,204	0,415 \pm 0,162	0,244 \pm 0,085	0,089 \pm 0,022	3,483 \pm 0,501
31 - K	0,728	0,827	n.n.	n.n.	n.n.	1,655
31 - FeSe ₂	4,487 \pm 2,373	0,827 \pm 0,390	0,497 \pm 0,047	0,340 \pm 0,065	0,125 \pm 0,020	6,377 \pm 2,602

* - Summe aller aufgetretenen Alkylselenide

Abbildung 3.23 zeigt die gegenüber der Inkubation ohne FeSe₂ angereicherten Alkylselenide in der Gasphase. Trotz der teilweise großen Hintergrundwerte (Tabelle 3.7), hervorgerufen durch eine Selenkontamination des Nährmediums, konnten angereicherte flüchtige Organoselenverbindungen beobachtet werden, wobei sowohl die Mengen der einzelnen Verbindungen als auch das Spektrum der Spezies sich mit der Inkubationszeit veränderten. Bezogen auf die Gesamtmenge der Organoselenverbindungen wurden innerhalb der ersten 7 Tage eine Abnahme (4,9 ng - 0,3 ng) und während der weiteren Kultivierung wieder eine Zunahme (0,3 ng - 4,7 ng) der flüchtigen Selenverbindungen beobachtet. Zu Beginn der Inkubation wurden 4 verschiedene Spezies analysiert, wobei es sich um DMSe und drei weitere Verbindungen mit den Retentionszeiten 180 s, 220 s und 270 s handelte. Die genannten Änderungen allerdings lassen sich hauptsächlich durch die Abnahme des gebildeten DMSe und der Verbindung RT 180 s bis hin zum Ausbleiben dieser sowie die anschließende vermehrte Freisetzung von DMSe erklären. Zusätzlich zur verstärkten Bildung von DMSe ab dem 7. Inkubationstag konnte als weitere

organische Selenpezies Diethylselenid (DESe) bestimmt werden. Der mengenmäßige Unterschied zwischen dem gebildeten DMSe und den weiteren Verbindungen (RT 220 s, RT 270 s, DESe) lag bei ca. einer Größenordnung.

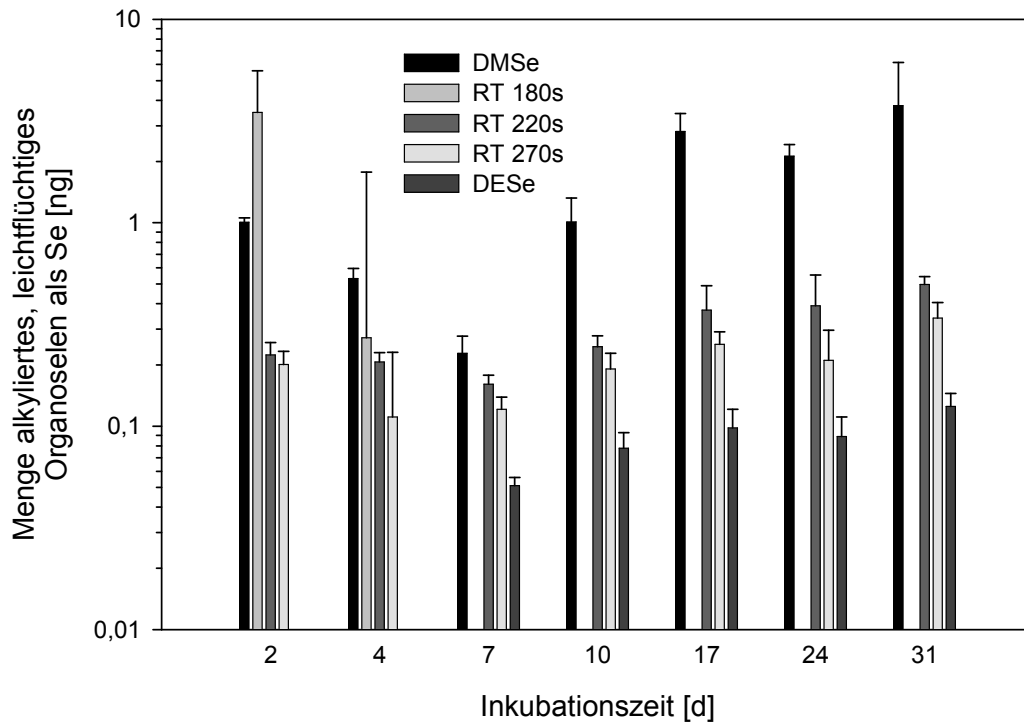


Abb. 3.23: Angereicherte Alkylselenide während der Inkubation von *D. gigas* im Beisein von FeSe_2 (inkl. Standardabweichung, $n = 3$)

Die Bestimmung der gebildeten Biomasse innerhalb der FeSe_2 -Inkubation zeigte über den gesamten Inkubationszeitraum mit ca. 4×10^7 Zellen mL^{-1} eine relativ konstante Zellzahl. Gleichmaßen bleiben auch der pH-Wert ($\text{pH} = 8$) und das Redoxpotential ($-150 \text{ mV} \geq \text{Eh} \geq -200 \text{ mV}$) (Abbildung 3.24) relativ konstant. Innerhalb der Kontrollreihe wurden niedrigere Zellzahlen ($2 - 3 \times 10^7$ Zellen mL^{-1}), wie auch leicht niedrigere pH-Werte ($\text{pH} = 6,5 - \text{pH} = 7,8$) gemessen, welche wahrscheinlich auch für die geringere Biomassebildung verantwortlich waren. Für das Redoxpotential wurden vergleichbare Werte gegenüber der FeSe_2 -Inkubation beobachtet.

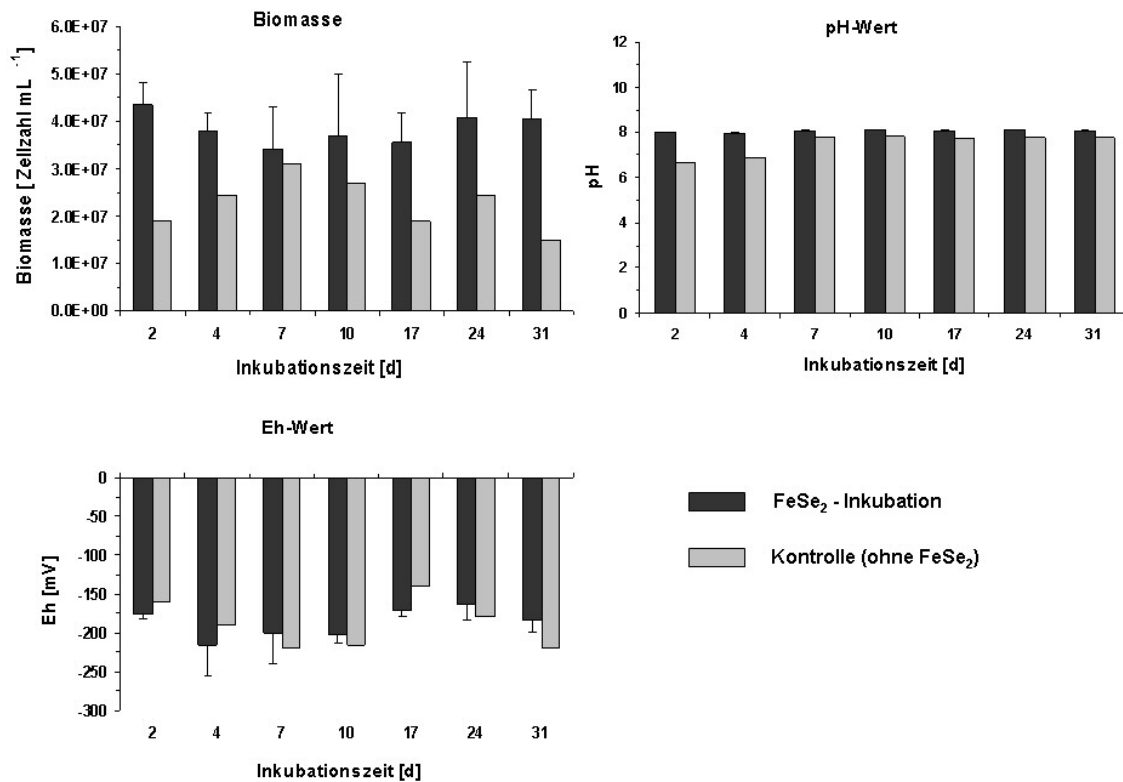


Abb. 3.24: Biomasse-, pH-Wert- und Redoxpotential-Entwicklung während der Inkubation von *D. gigas* mit FeSe₂ (inkl. Standardabweichung, n = 3)

Parallel zur Analyse der leichtflüchtigen Organoselenverbindungen wurden der Gehalt an gelöstem Selen und an Sulfat in den einzelnen Ansätzen bestimmt. Hierbei wurde zu Beginn zunächst eine Abnahme des Selengehaltes bis zum 7. Inkubationstag beobachtet. Danach erfolgte im weiteren Verlauf der Kultivierung wieder eine Zunahme, wobei zum Ende des Inkubationszeitraumes ein Maximum an gelöstem Selen beobachtet wurde (Tabelle 3.8). Der Sulfatgehalt nahm erwartungsgemäß durch die Aktivität des sulfatreduzierenden Bakteriums *D. gigas* mit zunehmender Inkubationszeit ab.

Tab. 3.8: Analysenwerte gelöster Selen- und Sulfatgehalte und alkyliertes Selen (\pm Standardabweichung (n = 3))

Zeit [d]	Selen _{gelöst} [mg L ⁻¹]	Selen _{alkyliert} [ng]	Sulfat _{gelöst} [g L ⁻¹]
0	n.b.	n.b.	1,641 *
2	1,322 \pm 0,343	4,992 \pm 2,102	1,216 \pm 0,003
4	1,108 \pm 0,087	1,206 \pm 1,516	1,132 \pm 0,010
7	1,036 \pm 0,114	0,561 \pm 0,087	1,165 \pm 0,033
10	1,192 \pm 0,145	1,526 \pm 0,288	0,880 \pm 0,080
17	1,349 \pm 0,177	3,534 \pm 0,536	0,926 \pm 0,105
24	1,299 \pm 0,110	2,839 \pm 0,501	0,949 \pm 0,018
31	1,556 \pm 0,335	4,722 \pm 2,602	0,896 \pm 0,027

* - berechnet aus der Zusammensetzung des Nährmediums

4 Diskussion

4.1 Etablierung / Validierung der CT-CF-GC-ICP-MS-Methode zur Analyse leichtflüchtiger Organoselenverbindungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Kopplung zweier in der analytischen Chemie weitverbreiteten Methoden verwendet. Hierbei handelte es sich zum einen um die Gaschromatographie, welche ursprünglich zur Analyse leichtflüchtiger bzw. unzersetzter verdampfbarer Substanzen verwendet wird, und die multielement-spezifische ICP-Massenspektrometrie zur Elementanalyse. Durch diese Verknüpfung war es möglich, leichtflüchtige Organoselenverbindungen im Ultraspurenbereich nachzuweisen. Als Probeneinlasssystem zur Messung gasförmiger Proben wurde eine *cryotrapping-cryofocussing*-Kombination verwendet, wobei im Vergleich zu anderweitig verwendeten *on-column* Fokussierungen [63, 100, 101], hier die Fokussierungsfalle nicht durch die Trennsäule (Innendurchmesser 0,32 mm) gestellt wurde, sondern durch eine Kapillare mit etwas größerem Innendurchmesser (0,53 mm). Der Grund hierfür war die Minimierung des auftretenden Strömungsdruckes, der bei Verwendung der *on-column*-Fokussierung durch den geringeren Innendurchmesser der Kapillare größer ist und damit eventuell zu einem Verlust von Analyten führt. Der durch die Fokussierung erreichte einheitliche Startpunkt aller Analyten war im Zusammenhang mit der Identifizierung der einzelnen Verbindungen nötig, da diese anhand der unterschiedlichen Retentionszeiten erfolgte. Für diese Identifizierungsstudien wurden kommerziell erhältliche leichtflüchtige Organoselenverbindungen in geeigneten Gasprobenahmebeuteln [100] zur Analyse vorbereitet und vermessen. Dabei konnten die 5 verschiedenen selenhaltigen Verbindungen Dimethylselenid, Diethylselenid, Dimethyldiselenid, Ethylmethyldiselenid und Diethyldiselenid identifiziert werden. Die relativen Standardabweichungen für die ermittelten Retentionszeiten lagen bei 1,9 % für das leichtflüchtige DMSe bis hin zu 0,5 % für die schwerer flüchtigen Verbindungen EMDS_e und DEDSe.

Nach der Bestimmung der Retentionszeiten und der damit verbundenen Möglichkeit der Identifizierung der einzelnen im Chromatogramm zu erwartenden Verbindungen wurde anhand des DMSe, die am häufigsten auftretende Organoselenverbindung

[u. a. 75, 67, 64, 62, 60] eine Methodvalidierung durchgeführt. Die Validierung einer analytischen Methode unterliegt in Abhängigkeit des Arbeitsumfeldes verschiedenen Richtlinien bzw. Regelungen, wobei die Validierungsarbeiten grundsätzlich in dem Umfang ausgeführt werden müssen, der notwendig ist, um die Eignung einer Methode für die jeweilige analytische Fragestellung zu zeigen [102]. Die vom Umweltbundesamt herausgegebene Leitlinie zur Methodvalidierung [103] schlägt dabei vor allem bei der Bestimmung der Präzision eine Reihe von Wiederholmessungen (bestenfalls mehr als 20, jedoch nicht weniger als 10) vor, die aufgrund des großen Zeitaufwandes pro Einzelmessung (ca. 25 min) hier auf 3 Messungen reduziert wurde. Hierbei wurde für die Präzision der Methode eine relative Standardabweichung von 1,13 % bestimmt. Vergleichswerte aus der Literatur ($n = 3$) reichen von 1,1 % - 4,9 % [104], 3,4 % [63] bis 9 % [105]. Durch eine Verdünnungsreihe des DMSe-Standards wurde eine Kalibrierfunktion ermittelt, die über mehr als 3 Größenordnungen linear war ($R^2 = 0,9999$). Vergleichbare Linearitäten und lineare Arbeitsbereiche wurden auch in den oben erwähnten Arbeiten von Kremer und Koautoren [63], Amouroux und Koautoren [104] sowie Pécheyran und Koautoren [105] beschrieben. Die Nachweisgrenze der Methode wurde hingegen der sonst üblichen Praxis in der Chromatographie, in der das zwei- bis fünffache Signal-Rauschen als Nachweisgrenze benutzt wird, aus den Messergebnissen der Verdünnungsreihe und der sich ergebenden Kalibriergeraden experimentell ermittelt. Dabei wurde die Messung der verdünnten Gasstandards solange fortgesetzt wurde, bis kein deutlich erkennbarer Peak mehr im Chromatogramm sichtbar war. Mittels dieser Prozedur wurde eine Nachweisgrenze von 1 pg Selen bestimmt. Andere Autoren zeigten ähnliche Ergebnisse mit einer Reichweite von 0,79 pg Se [104], 2,5 pg Se [105] bis 10 pg Se [63].

Im Rahmen der Validierungsarbeiten wurden neben den oben genannten Kennzahlen auch die Probenahmestrategie und die sich daraus ergebenden Zusammenhänge zwischen gemessener Menge an leichtflüchtigen Organoselenverbindungen und den tatsächlich im System vorhandenen Gehalten ermittelt. Die mittels des angewendeten *Purge & Trap*-Verfahrens ermittelten Ergebnisse zeigten in Abhängigkeit der verwendeten Probenmatrix sowie von der jeweils vorliegenden Verbindung Unterschiede in den Wiederfindungsraten. Für das eingesetzte DMSe wurden 28 % in Wasser, 42 % im Nährmedium und 34 % im Goethit-haltigen Nährmedium wiedergefunden. Diese sind damit erwartungsgemäß

nicht vergleichbar mit der von Karlson und Koautoren [106] bestimmten Henrykonstante von 0,058 (5,8 %), da im vorliegenden Fall nicht nur eine Gleichgewichtskonzentration in der Gasphase bestimmt wurde sondern mit einem kontinuierlichen Gasstrom die leichtflüchtige Verbindung oberhalb der wässrigen Phase ausgeblasen und somit das Gleichgewicht stetig gestört wurde. Eine ähnliche Probenahmeprozedur wurde von Bañuelos und Koautoren [107] verwendet, wobei dort die leichtflüchtigen Verbindungen nicht in einem Gasbeutel gefangen, sondern durch eine alkalische Peroxidfalle geleitet wurden, was zur Oxidation der flüchtigen Verbindungen führte. Die im Anschluss erfolgten Messungen des anorganischen Selenits zeigten Wiederfindungsraten von 94 - 96 %. D.h. ein vollständiges Austreiben des leichtflüchtigen Selens ist grundsätzlich möglich. Einflüsse des Probenbeutelmaterials auf die Wiederfindung in Hinblick stattfindender Sorptionsprozesse im Beutellinneren sind auszuschließen. Haas und Feldmann [100] zeigten anhand verschiedener leichtflüchtiger Organometall(oid)verbindungen (As, Sn, Sb) die Eignung dieser Probenahmebeutel zum Sammeln von gasförmigen Proben. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Matrices beruhen wahrscheinlich auf der unterschiedlichen Löslichkeit von DMSe (Löslichkeit in Wasser $0,0244 \text{ g g}^{-1}$ bei 25°C [106]) und stattfindenden Sorptionsprozessen in der goethithaltigen Matrix [108]. Für die geringere Wiederfindung von DMDSe (12 % in Wasser, 6 % in den anderen Matrices) ist der sehr viel geringere Dampfdruck ($0,38 \text{ kPa}$ gegenüber $32,03 \text{ kPa}$ für DMSe bei 25°C [106]) verantwortlich. Außerdem zeigten einige Autoren in verschiedenen Bodenmatrices [109, 110, 111], dass einmal gebildetes DMDSe sehr viel schneller wieder aus der Gasphase verschwindet als vergleichbare Mengen an DMSe, was wiederum durch den geringeren Dampfdruck und die beschleunigte Adsorption am Bodenmaterial erklärt wird.

4.2 Geochemische Sorptionsstudien

Im Rahmen der geochemischen Sorptionsstudien wurde in verschiedenen Systemen die Sorption von Selenit und unterschiedlichen Aminosäuren an Goethit untersucht. Mittels des Softwarepaketes GRFIT wurden die experimentell erhaltenen Daten mit entsprechenden Komplexbildungsreaktionen verglichen und modelliert.

Zuvor wurde der verwendete Goethit durch die Bestimmung seiner spezifischen Oberfläche ($10,1 \pm 0,6 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) und der Analyse des Ladungsnullpunktes ($\text{pH} = 8,8$) charakterisiert. Die mittels BET-Analyse gemessene spezifische Oberfläche des hier verwendeten, kommerziell bezogenen Goethits ist im Vergleich zu zahlreich erhältlichen Literaturdaten relativ gering. Die dort verwendeten Goethitminerale wiesen spezifische Oberflächen zwischen 63 und $600 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ auf [36, 39, 40, 41]. Hierbei ist allerdings anzumerken, dass diese meist vor Ort im Labor synthetisiert wurden. Autoren, die kommerzielle Goethite verwendeten, bestimmten die spezifischen Oberflächen der Minerale zwischen 20 und $66 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ [38, 43]. Der Ladungsnullpunkt ist etwas geringer als der von Sverjensky [112] theoretisch vorhergesagte ($\text{pH} = 9,4$), liegt aber im Rahmen experimentell ermittelter Daten [113].

In den biogeochemischen Inkubationsexperimenten wurde Selenit, adsorbiert an Goethit, verschiedenen mikrobiologischen Gemeinschaften zugeführt und die mikrobiologische Mobilisierungsfähigkeit untersucht. Für diese Experimente wurde ein Nährmedium verwendet, welches neben verschiedenen Zuckern auch gelöste Proteine enthielt. Um den Einfluss dieser auf die Sorption des Selenits zu charakterisieren, wurden verschiedene Aminosäuren, die durch ihre pH-abhängige Ladung (Abbildung 3.14) zur Oberflächenkomplexierung beitragen und somit evtl. mit dem zugegebenen Selenit um die Bindungsplätze konkurrieren können, untersucht. Aminosäuren lassen sich in neutrale Aminosäuren mit einer Amino- und einer Carboxylgruppe (Glycin), Aminosäuren mit einer zusätzlichen Carboxylgruppe (Glutaminsäure, Aspartinsäure) und Aminosäuren mit einer zusätzlichen basischen Aminogruppe (Lysin, Arginin) einteilen [114]. In der vorliegenden Arbeit wurde die Sorption einzelner Vertreter dieser Gruppen (Lysin, Glutaminsäure, Glycin) untersucht, wobei im Falle des Lysins keine nennenswerte Adsorption beobachtet werden konnte. Für Glycin und die Glutaminsäure konnte eine verstärkte Adsorption an Goethit im sauren pH-Bereich ($\text{pH} = 2 - \text{pH} = 4,5$) gezeigt werden, wobei die beste

Übereinstimmung der modellierten Adsorptionskurven mit den experimentellen Daten erreicht wurde, wenn die Bildung innersphärischer, monodentater Komplexe zwischen Hydroxylgruppen des Goethits und vollständig protonierten Aminosäuren im Oberflächenkomplexierungsmodell angenommen wurde (Kapitel 3.3.2, Gleichungen 13 - 15). Die Bildung spezifischer innersphärischer Oberflächenkomplexe mit Goethit wurde von Norén und Koautoren [115] auch für andere α -Aminosäuren bestätigt. Weiterhin zeigten diese Autoren, dass die Anzahl und die Positionen der Carboxyl- bzw. Aminogruppen komplexerer Aminosäuren einen wesentlichen Einfluss auf die Sorption haben und konnten so auch unspezifische außersphärische Wechselwirkungen beobachten.

Die experimentellen Daten zur Sorption von Selenit an Goethit sowohl in 10 mM NaCl-Lösung als auch im verwendeten Nährmedium zeigten sehr ähnliche Ergebnisse mit annähernd 100 % Sorption im sauren pH-Bereich und einem steilen Abfall der Sorption bei Annäherung an den Ladungsnullpunkt bei $\text{pH} = 8,8$. Unter Verwendung von GRFIT [96] wurden diese Daten zur Ermittlung der Reaktionskonstanten der Sorptionsreaktionen gefittet. Hierbei wurde die beste Übereinstimmung experimenteller und theoretischer Daten erreicht, wenn im Oberflächenkomplexierungsmodell die Bildung bidentater, innersphärischer Komplexe angenommen wurde (Kapitel 3.3.3, Gleichung 16). Die Dominanz dieser Form der Komplexierung wurde u. a. auch von Hayes und Koautoren [37] und Rietra und Koautoren [41] beschrieben. In Abhängigkeit des verwendeten Modells kann jedoch auch die Existenz möglicher weiterer Oberflächenkomplexe, wie z. B. monodentate und tridentate, innersphärische Komplexe angenommen werden [23, 116]. Durch das Fitting der experimentellen Daten konnten Reaktionskonstanten ermittelt werden, die für die beiden verwendeten Lösungen (10 mM NaCl - $\log K = 12,4$; Nährmedium - $\log K = 12,6$) sehr ähnlich waren, wobei im Falle des Nährmediums die Sorption des Selenits in gleicher Weise gefittet wurde wie zuvor in der Elektrolytlösung. Zusätzlich wurde hier allerdings die oben diskutierte Glutaminsäure in das Modell eingebettet, um den Einfluss von Aminosäuren auf die Sorption von Selenit zu betrachten. Der Vergleich der Reaktionskonstanten zeigt, dass die Anwesenheit von Glutaminsäure keinen entscheidenden Einfluss auf die Oberflächenkomplexierung von Selenit an Goethit hat. Durch die Übereinstimmung der experimentellen mit den im Modell erhaltenen Daten konnte somit die Adsorption des Selenits wie auch der Aminosäuren am Goethit nachgewiesen werden.

4.3 Bio-(geo)-chemische Inkubationsversuche

4.3.1 Konzentrationsabhängige, mikrobiologische Alkylierung von SeIV

Um die mikrobiologisch induzierte Mobilisierung adsorptiv bzw. mineralisch gebundener Selenspezies besser verstehen zu können, wurde die Alkylierungsaktivität einer Reinkultur von *A. alternata* und einer angereicherten Umweltmischkultur zunächst in Abhängigkeit der verfügbaren Menge an SeIV untersucht.

Bei der Inkubation von *A. alternata*, der von Thompson-Eagle und Koautoren [75] aus einer Wasserprobe des Kesterson Reservoirs (Kalifornien) isoliert und als aktiv methylierender Organismus identifiziert wurde, zeigte dabei über den gesamten Konzentrationsbereich ($0 \mu\text{g L}^{-1}$ - 10mg L^{-1}) eine aktive Produktion verschiedener leichtflüchtiger Selenverbindungen (DMSe, DMDS_e, EMDS_e, DEDS_e). Hierbei war vor allem für das DMSe eine verstärkte Zunahme zu beobachten, wobei die absoluten Mengen des gebildeten DMSe teilweise bis zu 3 Größenordnungen höher waren und sich bei einer vorliegenden Konzentration von SeIV im Nährmedium von 1mg L^{-1} im unteren μg -Bereich bewegten. Gegenüber der verstärkten Zunahme von DMSe ist die mehr oder weniger konstante Freisetzung der anderen volatilen Verbindungen auffällig, wobei im unteren Konzentrationsbereich des gelösten SeIV im Nährmedium sogar eine andere Organoselenspezies, das DMDS_e dominiert. Aufgrund der hier verwendeten Analysetechnik (CT-CF-GC-ICP-MS) mit der sehr geringen Nachweisgrenze von 1pg Se absolut, konnten neben dem sehr dominanten DMSe auch andere leichtflüchtige Substanzen nachgewiesen werden, was Thompson-Eagle und Koautoren [75] wahrscheinlich aufgrund der verwendeten Analysenmethode (GC-Flammenionisationsdetektor, GC-MS) nicht gelang, da die übrigen Inkubationsparameter ähnlich gewählt waren. Die von diesen Autoren beschriebene Resistenz von *A. alternata* gegenüber Se-Konzentration bis zu 100mg L^{-1} konnte in den hier aufgeführten Experimenten nur teilweise bestätigt werden. Als Indiz für die verminderte Resistenz können die Bildung der Biomasse sowie die Bildung des DMSe genutzt werden, welche bei einer SeIV-Konzentration von 10mg L^{-1} im Vergleich zu 1mg L^{-1} um ca. 75 % bzw. 50 % reduziert waren.

Zum Vergleich der Alkylierungskapazität der Pilzreinkultur von *A. alternata* mit einer Umweltmischkultur wurde Sickerwasser einer Hausmülldeponie als Inokulum

verwendet und die konzentrationsabhängige Alkylierung von anorganischem Selen der angereicherten Kultur analysiert. Hierbei wurde mit Zunahme der SeIV-Konzentration im Nährmedium eine Zunahme der leichtflüchtigen Selenverbindungen beobachtet, die ähnlich der Reinkultur von *A. alternata* bei höheren Konzentrationen von 1 mg L^{-1} bzw. 10 mg L^{-1} SeIV ein Maximum für den gewählten Untersuchungsbereich aufzeigte. Weiterhin ist auffällig, dass im Gegensatz zur Inkubation von *A. alternata* auch die Bildung von DMDSe und EMDSe mit steigender Konzentration von SeIV im Nährmedium ansteigt. Zusätzlich zu den bereits genannten Selenespezies wurde vor allem ab einer Konzentration von $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ SeIV auch eine vermehrte Bildung zweier weiterer nichtidentifizierter, leichtflüchtiger Selenverbindungen beobachtet. Bei quantitativer Betrachtung der beiden mikrobiologischen Inkubationsreihen wird deutlich, dass die mikrobiologische Bildung volatiler Organoselenverbindungen im unteren Konzentrationsbereich vergleichbar ist. Dagegen ist im oberen Konzentrationsbereich (ab $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) die Produktion der Pilzreinkultur etwa eine Größenordnung höher.

Im Vergleich zu anderen in der Literatur zu findenden Studien [117, 118, 119, 120] mit mikrobiologischen Reinkulturen, Isolaten aus Wässern und Böden sowie Umweltmischproben zeigt sich, dass die Ausbeuten an volatilen Organoselenverbindungen ähnlich sind. So zeigten Rael und Frankenberger [117], dass eine bakterielle Reinkultur von *Aeromonas veronii* in Abhängigkeit 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. Allerdings kann ein Einfluss der Selenkonzentration ($10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ - $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) auf die Volatilisierungsausbeute, wie er in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, nicht eindeutig festgestellt werden, da die oben genannten Versuchsparameter gleichzeitig geändert wurden. Dungan und Frankenberger [118] 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 Selen-Zugaben von 79 mg L^{-1} führten dabei zu einer verminderten Produktion leichtflüchtiger Selenverbindungen ($< 0,5 \%$ volatiles Se). Bei Selen-Zugaben wie sie auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden ($7,9 \text{ mg L}^{-1}$, $0,79 \text{ mg L}^{-1}$), wurden nach gleicher Inkubationszeit ähnliche Anteile von $1,5 \%$ und 3% flüchtige

Organoselenverbindungen gemessen. Nach der Inkubation von *A. alternata* und der Umweltmischkultur konnten hier 5 % und 2,5 % volatiles Selen bei einer Selenkonzentration von 1 mg L^{-1} im Nährmedium analysiert werden. Im Gegensatz zu der bei Dungan und Frankenberger [118] beschriebenen verminderten Produktion leichtflüchtiger Selenverbindungen mit steigender Selenkonzentration im Nährmedium, wie sie ansatzweise auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, konnte in anderen Arbeiten mit einer salztoleranten Alge *Chlorella* sp. (Selenkonzentrationen von $0,79 \text{ mg L}^{-1}$ und 100 mg L^{-1}) [119] bzw. einem *Corynebakterium* sp. (Selenkonzentrationen von 5 mg L^{-1} und 50 mg L^{-1}) [120] eine bis zu 10-fach höhere Produktion an volatilen Selenverbindungen bei erhöhter Selenzugabe beobachtet werden. Diese Daten zeigen, dass biologische Systeme unterschiedlich auf das Vorhandensein verschiedener Selengehalte reagieren. Mögliche Gründe hierfür sind z. B. unterschiedliche Toleranzen gegenüber einer erhöhten Selenkonzentration und damit die fehlende Notwendigkeit zur Detoxifizierung des Lebensraumes bzw. die verminderte Fähigkeit zur Methylierung bei höheren Konzentrationen. Auch kann die Verfügbarkeit geeigneter Methylendonoren, wie z. B. S-Adenosylmethionin oder Methylcobalamin eine Ursache für die gezeigten Unterschiede sein [75].

4.3.2 Alkylierung von SeIV in Abhängigkeit der Verfügbarkeit durch *A. alternata* und eine Umweltmischkultur

Die Alkylierung von SeIV wurde in unterschiedlichen mikrobiologischen Systemen im Laborexperiment untersucht. Hierbei wurden der Einfluss von mikrobiellen Reinkulturen und Umweltmischkulturen, sowie die Art der Verfügbarkeit des SeIV untersucht. Als mikrobiologische Gemeinschaften wurden die in Kapitel 4.3.1 bereits diskutierte Kultur von *A. alternata* sowie eine angereicherte Kultur aus Deponiesickerwasser verwendet. Die Verfügbarkeit des SeIV wurde durch den Einsatz eines Eisen(hydr-)oxidminerals (Goethit) bestimmt. Diese sind in oxischen Milieus von Böden als auch Sedimenten in großer Menge vorhanden [121]. Die pH-abhängigen Sorptionseigenschaften dieser Minerale sind mitverantwortlich für die Mobilität bzw. die biologische Verfügbarkeit verschiedener Anionen (Kapitel 4.2).

Um den Einfluss von Sorbenten auf die Selen-Verfügbarkeit und die mikrobiologisch induzierte Mobilisierung anorganischer Selenspezies zu verdeutlichen, wurden parallel identische Inkubationsansätze mitgeführt, die keinen Goethit enthielten und somit das gesamte zugegebene Selenit frei verfügbar im System vorlag.

Bei der Betrachtung der in Kapitel 3.4.1 und Kapitel 3.4.2 dargestellten Ergebnisse wird zunächst deutlich, dass die Gesamtmengen leichtflüchtiger Organoselenverbindungen in den Inkubationsreihen von *A. alternata* und der Umweltmischkultur jeweils in den Systemen mit bzw. ohne Goethit vergleichbare Werte zeigen. Beim Vergleich der Messdaten für die Inkubation der beiden mikrobiologischen Systeme in Bezug auf das Vorhandensein des Sorbenten fällt auf, dass in Anwesenheit des Goethits die Alkylierung bzw. die gemessenen Mengen alkylierter Verbindungen etwa eine Größenordnung geringer ist. Auch sind die Muster der gebildeten Alkylselenide unterschiedlich, d.h. während der Inkubation von *A. alternata* wurde vorrangig DMSe (88 ng Se) gefunden und in sehr viel geringeren Mengen DMDS₂Se (0,048 ng Se). Im Falle der Umweltmischkultur wurden zu Beginn sehr viel größere Mengen DMDS₂Se (0,671 ng Se) gegenüber DMSe (0,012 ng Se) analysiert, wobei diese Beobachtung sich im Laufe der Inkubationszeit umkehrte und wiederum größere Mengen DMSe (22 ng Se) als DMDS₂Se (0,16 ng Se) gefunden wurden. Zusätzlich zu diesen beiden dominanten Organoselenspezies wurden zwei weitere leichtflüchtige, selenhaltige Verbindungen detektiert. Eine der beiden konnte mit einer Retentionszeit von 380 s als Ethylmethylselenid identifiziert werden. Arbeiten, die unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt wurden, wie z. B. die von Meyer und Koautoren [122], zeigten vergleichbare Absolutmengen an leichtflüchtigen Organoselenverbindungen. Diese Autoren untersuchten sowohl eine Bodenprobe in einem Bodenextraktmedium, als auch eine isolierte Reinkultur von *Clostridium glycolicum* aus dieser Bodenprobe und konnten DMSe (4,75 ng / 19,75 ng Se) und DMDS₂Se (1,58 ng / 23,7 ng Se) nachweisen. Zusätzlich zu diesen beiden dominanten Spezies wurden ebenfalls andere Verbindungen, wie Monomethylselenid und gemischte Selen-Schwefel-Spezies sowie weitere nichtidentifizierte Spezies nachgewiesen.

Im Folgenden werden nun prozentuale Anteile der methylierten, leichtflüchtigen Selenspezies am gelösten bzw. am Gesamtselen, das im System vorhanden ist, betrachtet, welche kurz als Alkylierungsraten bezeichnet werden, wobei der Bezug auf eine Zeiteinheit nur dahingehend gegeben ist, dass analysierte Mengen alkylierten Selens zu einer bestimmten Inkubationszeit angegeben werden.

Abbildung 4.1 zeigt diese Alkylierungsraten für die unterschiedlichen mikrobiologischen Systeme sowie die verschieden aufgebauten Mikrokosmen. Zusätzlich zu den prozentualen Anteilen der alkylierten Verbindungen sind die Anteile des gelösten Selen dargestellt, die auch in den Inkubationsreihen mit freiverfügbarem Selen teilweise unter 20 % des ursprünglich zugegebenen Selen betragen, was durch eine Assimilation durch die gebildete Biomasse erklärt werden kann.

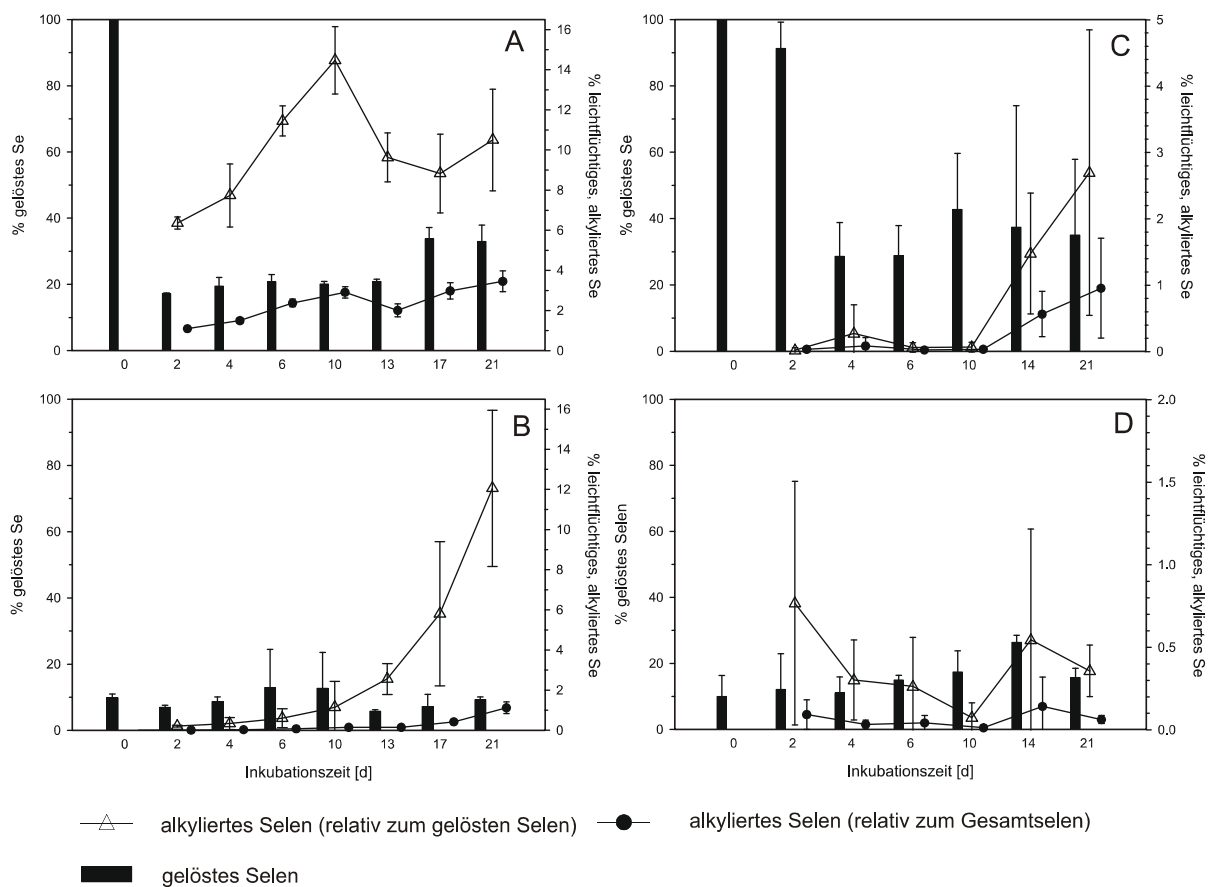


Abb. 4.1: Prozentuale Anteile verschiedener Selenpezies in unterschiedlichen mikrobiologischen Systemen (A - *A. alternata* (initial 100 % gelöstes Se); B - *A. alternata* (initial geochemisch gebundenes Se); C - Umweltmischkultur (initial 100 % gelöstes Se); D - Umweltmischkultur (initial geochemisch gebundenes Se)) (inkl. \pm /+ Standard-abweichung, n = 3)

Bei Betrachtung der Anteile des alkylierten Selen bezogen auf das im System gelöste Selen sind in beiden Inkubationsreihen von *A. alternata* nach einer

Inkubationszeit von 21 Tagen in etwa gleiche Anteile (ca. 10 %) alkyliert in der Gasphase vorgefunden worden (Abbildung 4.1 A & B), wobei sich der Verlauf der Alkylierungsaktivität zwischen den beiden Systemen unterschied. Im Falle der Inkubation mit frei verfügbarem, gelöstem SeIV war der Anteil des alkylierten Selen vom gelösten Selen von Beginn an mit ca. 7 % relativ hoch und stieg nur allmählich mit der Zeit bis auf 12 % an. Im Falle des adsorptiv gebundenen SeIV wurden zunächst nur sehr geringe Anteile von 0,2 % - 1 % an alkylierten Selenverbindungen im System beobachtet, die allerdings nach einer Inkubationszeit von 2 Wochen sehr stark bis auf 12 % angestiegen sind. Aus dem Verlauf der Alkylierungsrate der Inkubationsreihe mit freiverfügbarem Selen konnte eine aktive, mikrobiologische Produktion leichtflüchtiger Organoselenverbindungen bis zum Inkubationstag 10 beobachtet werden. Die sich anschließende Abnahme ist durch eine verminderte biologische Aktivität und die damit verbundene Rücklösung der flüchtigen Verbindungen in der wässrigen Phase begründet. Der erhöhte Anteil an gelöstem Selen ist wahrscheinlich durch das Absterben der normalerweise obligat aeroben Pilzkultur und der damit verbundenen Auflösung der Zellen zu erklären. Hierdurch erfolgte die Freisetzung organisch gebundener Selenspezies, wie z. B. Seleno-Methionin, die in weiteren chemischen Reaktionen zur Bildung leichtflüchtiger Selenverbindungen führten. Einen solchen Mechanismus beschreiben Cooke und Bruland [123], wobei anorganische Selenspezies zunächst durch die Biomasse assimiliert und reduziert werden und es im Anschluss durch Hydrolyse des methylierten Seleno-Methionins (Se-Methyl-Selenomethionin) zur Freisetzung von DMSe kommt. Ebenfalls wurden in den Gasphasen der mitgeführten biomassefreien Inkubationsansätze DMSe und DMDSe gefunden, was somit diese Theorie der abiotischen Methylierung bestätigt. Ähnliches wird für die Methylierung von Quecksilber in der Literatur beschrieben [124, 125, 126], wobei hier zum einen enzymhaltige, zellfreie Extrakte zur Bildung von Methylquecksilber führten als auch der alleinige Einsatz von Methylcobalamin, als hauptsächlicher Methyl donor bei der Quecksilbermethylierung. In gleicher Weise sind die höheren Alkylierungsraten während der Inkubation mit adsorptiv gebundenem Selen ab einer Inkubationszeit von 10 Tagen zu erklären, da auch hier erhöhte Gehalte an gelöstem Selen dem Anstieg vorausgingen (Abbildung 4.1 B).

Beim Vergleich der alkylierten Anteile in den Inkubationsreihen von *A. alternata* mit gelöstem bzw. gebundenem Selen bezogen auf das Gesamtselen, ist die

Alkylierungsrate im Falle des geochemisch gebundenen Selens um ca. 50 % von 2,5 - 3,5 % auf 1,25 % nach 21 Tagen Inkubationszeit reduziert. Verantwortlich hierfür ist die Anwesenheit des Goethits, der nicht nur als Sorbent für anorganische Selenspezies dient, sondern auch eine Senke für die alkylierten Selenverbindungen darstellen kann. Hinweise dazu sind, wie in Kapitel 4.1 bereits angedeutet, in der Literatur zu finden, wobei dort die Sorption von DMSe und DMDS_e in Böden in Abhängigkeit verschiedener Einflussparameter wie Bodenzusammensetzung, Temperatur und Feuchtigkeit beschrieben wird [108, 109, 110]. An dieser Stelle ist allerdings anzumerken, dass in den genannten Arbeiten unsterile Bodenproben zur Untersuchung genutzt wurden, und hierbei wahrscheinlich auch die Mineralisierung der zugegebenen Alkylselenide gegenüber der Sorption eine entscheidende Rolle spielt. So haben z. B. Guo und Koautoren [127] die temperaturabhängige Sorption von DMSe in sterilen Böden sowie den Abbau von DMSe in unsterilen Bodenproben untersucht und festgestellt, dass eine messbare Abnahme des DMSe-Gehaltes in der Gasphase durch Sorption in sterilen Bodenproben nur bei 4°C stattfindet (Verteilungskoeffizient $K_d = 0,038 - 0,091 \text{ mL g}^{-1}$) und eine stärkere Sorption nur bei noch geringeren Temperaturen möglich ist. Demgegenüber konnten diese Autoren [127] und andere [128] zeigen, dass bei Abwesenheit organischer Substanz, DMSe als Kohlenstoffquelle genutzt und somit mikrobiologisch mineralisiert wurde, was somit zur Abnahme in der Gasphase führte.

Die Alkylierungsraten der angereicherten Umweltmischkultur zeigten im Vergleich zu *A. alternata* stark verminderte Werte. Im Falle des frei verfügbaren Selens (Abbildung 4.1 C) wurden nach 21 Tagen Inkubationszeit ca. 3 % des gelösten Selens und ca. 1 % des insgesamt im System enthaltenen Selens als alkylierte Verbindungen in der Gasphase nachgewiesen. In der Inkubationsreihe mit adsorptiv gebundenem Selen waren die Alkylierungsraten nochmals reduziert, ca. 0,4 % und $\leq 0,1$ % für gelöstes bzw. Gesamtselen (Abbildung 4.1 D). Wie während der Inkubation von *A. alternata* mit frei verfügbarem Selen wurde auch hier zu Beginn eine starke Abnahme des gelösten Selens beobachtet, was wiederum eine entsprechende Assimilation in die Biomasse zeigt. Mit dem Anstieg der gelösten Selengehalte ab dem Inkubationstag 10 evtl. durch die oben bereits diskutierte Zellyse von toten Zellen wurde eine drastische Zunahme der alkylierten Selenverbindungen in der Gasphase beobachtet. Diese kann durch die stattfindende abiotische Methylierung von freigesetzten, gelösten organischen Selenverbindungen erklärt werden. Da es sich hier um eine

angereicherte Umweltmischkultur handelt, hat sich wahrscheinlich die Zusammensetzung der mikrobiologischen Gemeinschaft im Laufe der Inkubationszeit verändert. Somit ist es ebenfalls möglich, dass alkylierungsaktivere Mikroorganismen in den Vordergrund traten und deren Aktivität ebenfalls zu einem Anstieg der Alkylierungsrate führte. Die Veränderung der mikrobiologischen Gemeinschaft ist wahrscheinlich auch der Grund für den andersartigen, abnehmenden Trend der Gehalte an alkylierten Verbindungen während der Inkubation mit geochemisch gebundenem Selen. Der in diesem System enthaltene Goethit könnte beispielsweise bei der Etablierung Fe(III)-reduzierender Bakterien wie *Geobacter* oder *Shewanella*-Arten [129], ein zusätzlicher Selektionsfaktor sein und zur Anreicherung dieser führen. Beide Arten, die häufig aus Fe(III)/Fe(II)-reichen Sedimenten und Aquiferen isoliert wurden, sind außerdem in der Lage C₁- und C₂-Verbindungen als Kohlenstoffquelle zu verwenden [130]. Sie könnten somit die Alkylselenide als C-Quelle nutzen und damit einhergehend zur Abreicherung dieser in der Gasphase führen.

4.3.3 Mobilisierung von mineralisch gebundenem Selen (FeSe₂) durch *Desulfovibrio gigas*

Unter Bedingungen, wie sie in geologischen Formationen zur Endlagerung beispielsweise radioaktiver Abfälle anzutreffen sind, kann Selen als Selenid (Se²⁻), elementares Selen (Se⁰) und als Selenit (SeO₃²⁻) vorliegen [131]. In diesem Zusammenhang untersuchten Bruggeman und Koautoren [132] das Verhalten von SeO₃²⁻ in verschiedenen anoxischen Systemen, die neben Pyrit (FeS₂) auch gelöste und ungelöste organische Substanz enthielten. In diesen Untersuchungen wurde zunächst die Adsorption der gelösten Selenitfraktion an der Pyritoberfläche beobachtet. Im Nachhinein wurde die Reduktion des SeO₃²⁻ unter Bildung einer kristallinen Se⁰-Festphase festgestellt, die trotz der aufgrund thermodynamischer Berechnungen zu erwartenden Bildung von FeSe₂ als hauptsächliche Selensenke angenommen wurde. Andere Autoren konnten durch weitergehende Messungen zeigen, dass das Selen in den Oxidationszuständen Se²⁻ und Se¹⁻ an der Oberfläche des Pyrits gebunden ist und somit die Bildung von Achavalit (FeSe) und Ferroselit (FeSe₂) stattfindet [133]. Weiterhin konnten diese Autoren die mit der Reduktion der

Selenspezies einhergehende Oxidation des Sulfids der Pyritoberfläche beobachten, was zur Bildung verschiedener oxidierter Schwefelspezies, wie z. B. Sulfat und Polysulfaten führte. Aufgrund dieser Untersuchungen und der damit verbundenen Annahme, dass die Migration gelöster Selenspezies in Anwesenheit von pyritischem Material weitestgehend unterbunden wird, wurde ein Laborexperiment zur Untersuchung der Mobilität von mineralisch gebundenem Selen in Anwesenheit einer mikrobiologischen Gemeinschaft aufgebaut und durchgeführt. Hierbei wurde das sulfatreduzierende Bakterium *D. gigas* in einem anaeroben System im Beisein von FeSe_2 inkubiert und die Bildung flüchtiger, alkylierter Selenverbindungen beobachtet. Während dieser Untersuchung konnten in Abhängigkeit der Inkubationszeit angereicherte volatile Selenverbindungen (DMSe, DESe, 3 unbekannte Verbindungen) im unteren Nanogrammbereich analysiert werden. Vergleichbare Werte von 1,1 ng DMSe und 10,3 ng DMDSel beobachteten Michalke und Koautoren [134] nach einer einwöchigen Inkubation von *D. gigas*, wobei in der vorliegenden Arbeit DMSe als dominante Verbindung gegenüber den anderen auftrat und die Bildung von DMDSel nur teilweise beobachtet wurde. Bei der Betrachtung der Anteile alkylierter und gelöster Selengehalte über die Inkubationszeit (Abbildung 4.2) wird deutlich, dass die Alkylierungsraten über den gesamten Versuchzeitraum mit 0,01 - 0,04 % alkyliertes Selen relativ zum gelösten Selen und $2 \cdot 10^{-6}$ - $7 \cdot 10^{-6}$ relativ zum Gesamtselen (Abbildung 4.2 A) im Vergleich zu den beobachteten Werten bei der Inkubation von *A. alternata* und der Umweltmischkultur um mehrere Größenordnungen geringer sind. Der Vergleich der Alkylierungsrate bezogen auf das gelöste Selen mit der bei Michalke und Koautoren [134] gefundenen zeigt jedoch, dass ein negativer Einfluss der FeSe_2 -Matrix auf die mikrobiologische Aktivität ausgeschlossen werden kann, da diese Autoren mit sehr ähnlichen Konzentrationen an gelöstem Selen (0,1 mM) gearbeitet haben und vergleichbare Mengen an Organoselenverbindungen gefunden haben. Dies wurde auch bei der Bestimmung der Biomassekonzentrationen bestätigt, die über den gesamten Untersuchungszeitraum mindestens gleichgroß denen in den Kontrollansätzen waren. Weiterhin wurde beobachtet, dass zu Beginn der Untersuchung größere Mengen alkylierter, leichtflüchtiger Verbindungen in der Gasphase zu finden waren, die innerhalb der ersten Woche stetig abnahmen und am 7. Inkubationstag ein Minimum erreichten. Einen ähnlichen Verlauf zeigten auch die gelösten Selengehalte. In der folgenden Zeit wurde dann einhergehend mit dem Anstieg der

gelösten Selenverbindungen auch eine Zunahme der flüchtigen, alkylierten Selenverbindungen in der Gasphase beobachtet, die im weiteren Versuchszeitraum wieder das Niveau wie zu Beginn der Inkubation erreichten. Zur Verdeutlichung zeigt Abbildung 4.2 B die relativen Häufigkeiten des gelösten Selen und Sulfats sowie des alkylierten, leichtflüchtigen Selen. Hierbei ist der Anteil des gelösten Selen nach 31 Tagen Inkubationszeit um ca. 20 % höher als zu Beginn der Inkubation, was somit den Maximalwert für den Untersuchungszeitraum darstellt.

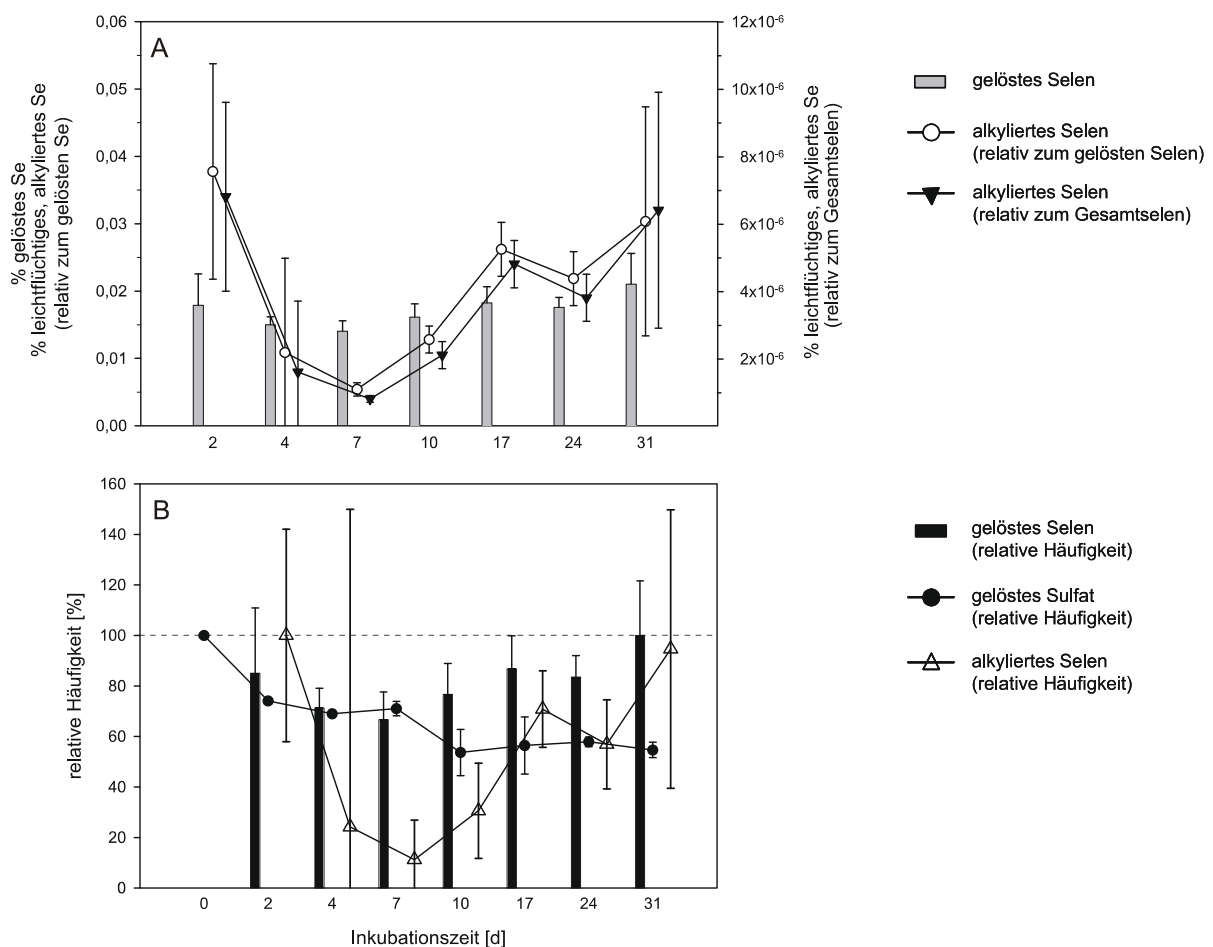


Abb. 4.2: Gelöste und alkylierte Selengehalte sowie gelöste Sulfatgehalte während der Inkubation von *D. gigas* im Beisein von $10 \text{ g FeSe}_2 \text{ L}^{-1}$ (A - relative Anteile; B - relative Häufigkeiten) (inkl. Standardabweichung, $n = 3$)

Die im Vorfeld durchgeführten Untersuchungen zur Selen-Alkylierung in Abhängigkeit der Konzentration bei *A. alternata* und der Umweltmischkultur sowie die dort gezeigten Zusammenhänge können auch für *D. gigas* angenommen werden. Höhere

Gehalte an gelöstem Selen führen zu höheren Gehalten an alkyliertem Selen. Hierbei stellt sich allerdings die Frage, wie der Verlauf der gelösten Selenmengen zu erklären ist. Aufgrund fehlender Messungen zur Speziation der gelösten Selenverbindungen als auch der selenhaltigen Festphase, wie dies von anderen Autoren [133] beispielsweise mittels Röntgen-induzierter Photoelektronenspektroskopie (XPS) bzw. Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS) durchgeführt wurde, können an dieser Stelle nur Annahmen gemacht werden, die in entsprechenden weiterführenden Arbeiten abgesichert werden müssen. Möglicherweise können die zu Beginn beobachteten erhöhten Gehalte an gelöstem Selen durch fehlende bzw. suboptimale Bedingungen für die Stabilität von FeSe_2 erklärt werden. Dabei könnte durch die Zugabe des verwendeten Mediums eine Freisetzung von Selen aus der Festphase durch entsprechende Lösungsreaktionen und/oder Oxidationsreaktionen erfolgt sein. Die sich anschließende Einstellung eines optimalen Milieus für die Stabilität des FeSe_2 durch das mikrobiologische Inokulum führt dann zur Verringerung der gelösten Selengehalte durch Sorption und Reduktion des Selens an der Oberfläche des Minerals, wie sie oben bereits diskutiert wurden. Eine weitere Möglichkeit, welche die Verringerung der gelösten Selengehalte erklären kann, ist eine Assimilation des Selens durch die sich bildende Biomasse. Der Anstieg gelöster Selengehalte, der nach der abrupten Abnahme des gelösten Sulfatgehaltes zwischen Inkubationstag 7 und 10 (Abbildung 4.2 B) aufgrund der Stoffwechselaktivität der sulfatreduzierenden Bakterien beobachtet wurde, kann in Umkehrung der oben beschriebenen Reaktionen zur Festsetzung (Sorption und anschließende Reduktion) gelöster Selenspezies an der Pyritoberfläche erklärt werden. D. h. der Reduktion des gelösten Sulfates folgt im Gegenzug die Oxidation des mineralisch gebundenen Selenids und damit die Anreicherung von gelöstem Selen in der wässrigen Phase. Diese Rücklösung führt dann zu einer besseren Bioverfügbarkeit und somit zur verstärkten Bildung leichtflüchtiger Selenverbindungen.

Grundsätzlich ist anzumerken, dass die Lebensbedingungen in geologischen Formationen zur Endlagerung radioaktiver Abfälle, in deren Zusammenhang diese reduzierten Eisenminerale als Migrationsbarriere für Radionuklide diskutiert werden, alles andere als lebensfreundlich sind. Selbst Mikroorganismen scheint es nicht möglich zu sein, sich an die vorherrschenden wasserarmen, oligotrophen, reduzierenden Umweltbedingungen anpassen zu können [135]. Zusätzlich zu diesen

chemischen Parametern wurde gezeigt, dass in den verwendeten Puffermaterialien die geringe Porosität eine Filterwirkung gegenüber Bakterien aufweist und somit keine Bewegung von Bakterien hin zu potentiellen Nährstoffen möglich ist [136]. Trotz dieser Umstände gelang es Wissenschaftlern zwei neue Arten, *Desulfovibrio aespoeensis* [137] und *Methanobacterium subterraneum* [138] aus einer solchen Formation in Schweden zu isolieren und somit das intrinsische Vorkommen bakterieller Populationen zu zeigen. Verglichen mit den Lebensbedingungen die intrinsische als auch durch Wasserzufuhr hinzukommende Mikroorganismen in solchen Endlagerformationen vorfinden, waren die Versuchsbedingungen in dem hier diskutierten Experiment optimal. Sowohl eine entsprechende Kohlenstoffquelle, als auch ein Elektronenakzeptor in ausreichender Menge sowie der Wassergehalt und damit das Vorliegen von FeSe_2 in Suspension führten zum Überleben von *D. gigas* und damit folglich zur Alkylierung des Selens. Welche Rolle dieser Prozess in-situ tatsächlich spielt ist unter den entsprechenden Bedingungen zu prüfen.

4.4 Schlussfolgerungen

Hauptsächliches Ziel der Arbeit war es, den Einfluss mikrobiologischer Gemeinschaften auf die Mobilität unterschiedlich bioverfügbarer Selenspezies in der Umwelt zu charakterisieren. In Bezug zur Mobilität sind in der Literatur verschiedene Einflussfaktoren, wie Oxidationszustand, pH-Wert und Redoxpotential aufgezeigt. Diese chemischen Parameter beeinflussen die Löslichkeit des Selens in Wasser und damit einhergehend die Bioverfügbarkeit sowie die Mobilisierbarkeit. Letztere ist wesentlicher Bestandteil zahlreicher Studien, die zeigen, dass verschiedene Adsorptionsmechanismen sowohl in oxischen als auch in anoxischen Milieus die Verteilung unterschiedlicher Selenspezies zwischen Oberflächen und Lösungen kontrollieren. Eine besondere Stellung nehmen dabei Eisenoxide durch Bildung von Oberflächenkomplexen mit gelösten Selenspezies und reduzierte Eisenminerale durch die Inkorporation von Selen in das Mineral ein. Problematisch ist die Tatsache, dass ein Großteil dieser Studien unter abiotischen Bedingungen, d. h. ohne das Vorhandensein von Lebewesen durchgeführt wird, die ihrerseits einen erheblichen Einfluss auf das Milieu (pH, Eh) und damit auf die Löslichkeit, die Verfügbarkeit und die Mobilisierbarkeit verschiedener Selenspezies in der entsprechenden Umwelt haben.

Um den Einfluss von mikrobiologischen Gemeinschaften näher zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit eine Reinkultur von *A. alternata* und eine bakterielle Umweltmischkultur eingesetzt. Dabei wurden vor allem die Auswirkungen auf die Mobilität adsorbierter Selenitspezies untersucht und festgestellt, dass in Abhängigkeit des verwendeten Inokulums eine erhebliche Alkylierung und damit eine Mobilisierung des Selens stattfanden. In einem offenen System würde diese Verflüchtigung gleichgewichtsbedingt zu einer fortgesetzten Desorption von Selenit und anschließender Alkylierung führen und somit zur Freisetzung des initial sorbierten Selenits. Wie die vorausgegangenen Untersuchungen gezeigt haben, werden auch bei höheren Selen-Konzentrationen entsprechende Mengen alkyliert. Eine Abschwächung der Freisetzung flüchtiger Selenverbindungen aufgrund eventueller toxischer Effekte auf die Mikroflora ist nicht zu erwarten, da in natürlicher Umwelt eine entsprechende Anpassung der Mikroflora stattfinden würde.

In einem weiteren System wurde eine sulfatreduzierende Reinkultur von *D. gigas* verwendet, mit deren Hilfe die Stabilität des reduzierten Eisenselenidminerals

Ferroselit im Beisein mikrobiologischer Aktivität überprüft werden sollte. Diese durch Selen-Inkorporation gebildeten Eisenselenidminerale bzw. die vorausgehenden Eisensulfidminerale werden beispielsweise als geologische Barrieren z. B. in Endlagerstätten für radioaktive Abfälle diskutiert. Mithilfe des hier verwendeten Laborsystems konnte gezeigt werden, dass die angenommenen Reaktionen zur Festlegung gelöster Selenspezies durch mikrobiologische Aktivität sulfatreduzierender Bakterien umgekehrt werden können. Die durch die Reduktion des Sulfats sowie die einhergehende Oxidation des Selenids beobachtete, sich anschließende Rücklösung des Selens führt dann im weiteren Verlauf zur verstärkten Bildung leichtflüchtiger Selenverbindungen und somit zur Freisetzung des Selens in die Umwelt.

Diese beobachteten Phänomene zur Mobilisierung an Eisenoxide adsorbierter bzw. in reduzierten Eisenseleniden gebundener Selenspezies müssen in weiterführenden Arbeiten verifiziert werden. Hierbei sollte besonders der Wassergehalt und die Verfügbarkeit organischer Kohlenstoffquellen variiert werden, um tatsächliche Verhältnisse wie sie in Böden, Sedimenten und geologischen Formationen vorherrschen, einzustellen. Ein weiterer wesentlicher Punkt, der betrachtet werden sollte, ist die Speziation sowohl gelöster Spezies als auch der in bzw. an der Festphase gebundenen Spezies. In diesem Zusammenhang sollten auch weitere Untersuchungen zum Sorptionsverhalten von Organoselenverbindungen durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

Selen kann in verschiedenen Oxidationszuständen (+6, +4, ± 0 , -2) in unterschiedlichen Umweltkompartimenten auftreten. Verbundenen damit sind verschiedene Eigenschaften, wie z. B. die Wasserlöslichkeit, die in direktem Zusammenhang mit der Migrationsfähigkeit sowie der Bioverfügbarkeit steht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Verfügbarkeit anorganischer Selenpezies und damit die Mobilisierbarkeit dieser in verschiedenen Laborexperimenten untersucht. Hierbei wurde an Goethit adsorbiertes Selenit sowohl mit einer Reinkultur des aktiv methylierenden Pilzes *Alternaria alternata* als auch mit einer angereicherten Umweltmischkultur inkubiert und die mikrobiologische Zugänglichkeit anhand der Bildung leichtflüchtiger, alkylierter Selenmetabolite wie z. B. Dimethylselenid und Dimethyldiselenid beobachtet. Zur Analyse dieser wurde eine *cryotrapping-cryofocussing*-GC-ICP-MS-Kopplung etabliert. Die Anteile der methylierten Selenverbindungen stiegen bei Verwendung von *A. alternata* mit der Inkubationszeit auf 10 % des gelösten Selen und 1 % des Gesamtseleens an. Dieser Trend konnte während der Inkubation der Umweltmischkultur nicht beobachtet werden. Hier lagen die Anteile über den gesamten Untersuchungszeitraum bei ca. 0,5 % des gelösten bzw. 0,1 % des Gesamtseleens, inklusive eines leichten Abwärtstrends, welcher wahrscheinlich durch die Nutzung der Alkylselenide als Kohlenstoffquelle hervorgerufen wurde. Weiterhin wurde das reduzierte Eisenselenidmineral Ferroselit eingesetzt, um dessen Stabilität gegenüber der Aktivität des sulfatreduzierenden Bakteriums *Desulfovibrio gigas* zu untersuchen. Mit zunehmender Inkubationszeit und damit verbundener, zunehmender Reduktion des im Nährmedium vorhandenen Sulfates konnte ein Anstieg leichtflüchtiger Organoselenverbindungen in der Gasphase der Kulturansätze festgestellt werden, die im unteren Nanogrammbereich lagen. Einhergehend damit wurde auch die Zunahme der Gehalte an gelöstem Selen und somit die biologisch bedingte Rücklösung aus der Mineral- in die Wasserphase beobachtet.

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Mikroorganismen einen deutlichen Einfluss auf die Stabilität von Oberflächenkomplexen des Selenits als auch von mineralischen Selenidspezies hat.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Templeton, D.M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielson, L.-G., Muntau, H., Van Leeuwen, H.P., Lobinski, R. (2000) Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches, *Pure Appl Chem.*, Vol 72 (No 8), pp 1453-1470
- [2] Plant, J.A., Kinniburgh, D.G., Smedley, P.L., Fordyce, F.M., Klinck, B.A. (2005) Arsenic and Selenium, in Holland, H.D. and Turekian, K.K., *Treatise on Geochemistry, Environmental Geochemistry*, Vol. 9, pp 17-66
- [3] Lide, D.R. (Editor-in-Chief) (2007) *CRC Handbook of chemistry and physics*, 88th edition, CRC Press
- [4] Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., Hoekstra, W.G. (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase, *Science*, Vol. 179, pp 588-590
- [5] Sunde, R.A. (1997) Selenium. In: O'Dell, B.L., Sunde, R.A. (eds), *Handbook of nutritionally essential mineral elements*. New York: Marcel Dekker Inc, pp 493-556
- [6] Allan, C.B., Lacourciere, G.M., Stadtman, T.C. (1999) Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium, *Ann Rev Nutr*, Vol. 19, pp 1-16
- [7] Néve J. (1996) Selenium as a risk factor for cardiovascular diseases, *J Cardiovasc Risk*, Vol. 3, pp 42-47
- [8] Rayman, M.P. (2000) The importance of selenium to human health, *Lancet*, Vol. 356, pp 233-241
- [9] Reilly, C. (1996) *Selenium in food and health*, London: Blackie Academic and Professional
- [10] Johnson, C.C., Ge, X., Green, K.A., Liu, X. (1996) Studies of selenium distribution in soil, grain, drinking water and human hair samples from the Keshan Disease belt of Zhangjiakou district, Henei Province, China. Technical Report WC/96/52, Nottingham, UK, Overseas Geology Series, British Geological Survey
- [11] FAO / WHO (2001) *Human vitamin and mineral requirements*, Report of a joint FAO/WHO expert consultation, Bangkok, Thailand

- [12] McNeal, J.M., Balistrieri, L.S. (1989) Geochemistry and occurrence of selenium: An overview, in: Jacobs, L.W. (Ed.), Selenium in agriculture and the environment, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, pp 1-13
- [13] Uden, P.C. (2005) Speciation of selenium, in Cornelis, R., Crews, H., Caruso, J., Heumann, K.G., Handbook of elemental speciation II: Species in the environment, food, medicine & occupational health, John Wiley & sons, Ltd
- [14] Johnson, T.M. (2004) A review of mass-dependent fractionation of selenium isotopes and implications for other heavy stable isotopes, Chem Geology, Vol 204, pp 201-214
- [15] Pyrzynska, K. (2002) Determination of selenium in environmental samples, Microchim acta, Vol. 140, pp55-62
- [16] D'Ulivo, A. (1997) Determination of selenium and tellurium in environmental samples; Analyst, Vol. 122, pp 117R-144R
- [17] Nriagu, J.O., Pacyna, J.M. (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals, Nature, Vol. 333, pp 134-139
- [18] Banuelos, G.S., Zambruski, S., Mackey, B. (2000) Phytoextraction of selenium from soils irrigated with selenium-laden effluent, Plant and Soil, Vol. 224, pp 251-258
- [19] Fan, T.W.-M., Higashi, R.M., Lane, A.N. (1998) Biotransformations of selenium oxyanion by filamentous cyanophyte-dominated mat cultured from agricultural drainage waters, Environ. Sci. Technol., Vol. 32, pp 3185-3193
- [20] Losi, M.E., Frankenberger, W.T. (1997) Bioremediation of selenium in soil and water, Soil Science, Vol. 162 (10), pp 692-702
- [21] Frankenberger, W.T., Arshad, M. (2001) Bioremediation of selenium-contaminated sediments and water, BioFactors, Vol. 14, pp 241-254
- [22] Sposito, G. (1998) Bodenchemie, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart
- [23] Duc, M., Lefevre, G., Fedoroff, M., Jeanjean, J., Rouchaud, J.C., Monteil-Rivera, F., Dumonceau, J., Milonjic, S. (2003) Sorption of selenium anionic species on apatites and iron oxides from aqueous solutions, J Environ Radio, Vol. 70, pp 61-72
- [24] Wang, X., Liu, X. (2005) Sorption and desorption of radioselenium on calcareous soil and its solid components studied by batch and column experiments, Appl Radiat Isotopes, Vol. 62, pp 1-9

- [25] Martínez, M., Giménez, J., de Pablo, J., Rovira, M., Duro, L. (2006) Sorption of selenium(IV) and selenium(VI) onto magnetite, *Appl Surface Science*, Vol. 252, pp 3767-3773
- [26] Ticknor, K.V., McMurry, J. (1996) A study of selenium and tin sorption on granite and goethite, *Radiochim Acta*, Vol. 73 (3), pp149-156
- [27] Kuan, W.H., Lo, S.L., Wang, M.K., Lin, C.F. (1998) Removal of Se(IV) and Se(VI) from water by aluminum-oxide-coated sands, *Water Res*, Vol. 32 (3), pp 915-923
- [28] Lo, S.L., Chen, T.Y. (1997) Adsorption of Se(IV) and Se(VI) on an iron-coated sand from water, *Chemosphere*, Vol. 35 (5), pp 919-930
- [29] Su, C.M., Suarez, D.L. (2000) Selenate and selenite sorption on iron oxides: An infrared and electrophoretic study, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, Vol. 64, pp 101-111.
- [30] Boulton, K.A., Cowper, M.M., Heath, T.G., Sato, H., Shibutani, T., Yuti, M. (1998) Towards an understanding of the sorption of U(VI) and Se(IV) on sodium bentonite, *J Contam Hydrol*, Vol. 35, pp 141-150
- [31] Dhillon, K.S., Dhillon, S.K. (1999) Adsorption-Desorption reactions of selenium in some soils of India, *Geoderma*, Vol. 93, pp 19-31
- [32] Goh, K.-H., Lim, T.-T. (2004) Geochemistry of inorganic arsenic and selenium in a tropical soil: effect of reaction time, pH, and competitive anions on arsenic and selenium adsorption, *Chemosphere*, Vol. 55, pp 849-859
- [33] Saeki, K., Matsumoto, S., Tatsukawa, R. (1995) Selenite adsorption by manganese oxides, *Soil Science*, Vol. 160 (4), pp 265-272
- [34] Schulthess, C.P., Hu, Z. (2001) Impact of chloride anions on proton and selenium adsorption by an aluminium oxide, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, Vol. 65, pp 710-718
- [35] Schachtschabel, P., Blume, H.-P., Brümmer, G., Hartge, K.H., Schwertmann, U. (1998) Scheffer/Schachtschabel: Lehrbuch der Bodenkunde, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 14. Auflage
- [36] Balistrieri, L.S., Chao, T.T. (1990) Adsorption of selenium by amorphous iron oxyhydroxide and manganese dioxide, *Geochim Cosmochim Acta*, Vol. 54, pp 739-751
- [37] Hayes, K.F., Lawrence Roe, A., Brown Jr., G.E., Hodgson, K.O., Leckie, J.O., Parks, G.A. (1987) In situ x-ray absorption study of surface complexes: selenium oxyanions on α -FeOOH, *Science*, Vol. 238 (4828), pp 783-786

- [38] Manceau, A., Charlet, L. (1994), The mechanism of selenate adsorption on goethite and hydrous ferric oxide, *J Colloid Interface Sci*, Vol. 168, pp 87-93
- [39] Wijnja, H., Schulthess, C.P. (2000) Vibrational spectroscopy study of selenate and sulphate adsorption mechanisms on Fe und Al (hydr)oxide surfaces, *J Colloid Interface Sci*, Vol. 229, pp 286-297
- [40] Peak, D., Sparks, D.L. (2002) Mechanisms of selenate adsorption on iron oxides and hydroxides, *Environ Sci Technol*, Vol. 36, pp 1460-1466
- [41] Rietra, R.P.J.J., Hiemstra, T., van Riemsdijk, W.H. (1999) The relationship between molecular structure and ion adsorption on variable charge minerals, *Geochim Cosmochim Acta*, Vol. 63 (19/20), pp 3009-3015
- [42] Dhillon, S.K., Dhillon, K.S. (2000) Selenium adsorption in soils as influenced by different anions, *J Plant Nutr Soil Sci*, Vol. 163, pp 577-582
- [43] Masset, S., Monteil-Rivera, F., Dupont, L., Dumonceau, J., Aplincourt, M. (2000) Influence of humic acid on sorption of Co(II), Sr(II), and Se(IV) on goethite, *Agronomie*, Vol. 20, pp 525-535
- [44] Lloyd, J.R., Macaskie, L.E. (2002) Biochemical basis of microbe-radionuclide interactions, in: Keith-Roach, M.J., Livens, F.R. (Edts) *Interactions of microorganisms with radionuclides*, Elsevier, Amsterdam, pp 313-342
- [45] Pedersen, K. (2005) Microorganisms and their influence on radionuclide migration in igneous rock, *J Nucl Radiochem Sci*, Vol. 6 (1), pp 11-15
- [46] Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. (1999) Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections, *Science*, Vol. 284, pp 1318-1322
- [47] Ledin, M. (2000) Accumulation of metals by microorganisms – processes and importance for soil systems, *Earth Sci Rev*, Vol. 51, pp 1-31
- [48] Hamilton, W.A. (2003) Microbially influenced corrosion as a model system for the study of metal microbe interactions: A unifying electron transfer hypothesis, *Biofouling*, Vol. 19(1), pp 65-76
- [49] Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. (2001) *Brock – Mikrobiologie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg - Berlin
- [50] Garbisu, C., Carlson, D., Adamkiewicz, M., Yee, B.C., Wong, J.H., Resto, E., Leighton, T., Buchanan, B.B. (1999) Morphological and biochemical responses of *Bacillus subtilis* to selenite stress, *BioFactors*, Vol. 10, pp 311-319

- [51] Kessi, J., Ramuz, M., Wehrl, E., Spycher, M., Bachofen, R. (1999) Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*, *Appl Environ Microbiol*, Vol. 65 (11), pp 4734-4740
- [52] Gerrard, T.L., Telford, J.N., Williams, H.H. (1974) Detection of selenium deposits in *Escherichia coli* by electron microscopy, *J Bacteriol*, Vol. 119 (3), pp 1057-1060
- [53] Silverberg, B.A., Wong, P.T.S., Chau, Y.K. (1976) Localisation of selenium in bacterial cells using TEM and energy dispersive x-ray analysis, *Arch Microbiol*, Vol. 107, pp 1-6
- [54] Tomei, F.A., Barton, L.L., Lemanski, C.L., Zocco, T.G., Fink, N.H., Sillerud, L.O. (1995) Transformation of selenate and selenite to elemental selenium by *Desulfovibrio desulfuricans*, *J Ind Microbiol*, Vol. 14, pp 329-336
- [55] Losi, M.E., Frankenberger Jr., W.T. (1997) Reduction of selenium oxyanions by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1: Isolation and growth of bacterium and its expulsion of selenium particles, *Appl Environ Microbiol*, Vol. 63 (8), pp 3079-3084
- [56] Schröder, I., Rech, S., Krafft, T., Macy, J.M. (1997) Purification and characterization of the selenate reductase from *Thauera selenatis*, *J Biol Chem*, Vol. 272 (38), pp 23765-23768
- [57] Switzer Blum, J., Burns Bindi, A., Buzzelli, J., Stolz, J.F. Oremland, R.S. (1998) *Bacillus arsenicoselenatis*, sp. nov., and *Bacillus selenitireducens*, sp. nov.: two haloalkaliphiles from Mono Lake, California that respire oxyanions of selenium and arsenic, *Arch Microbiol*, Vol. 171, pp 19-30
- [58] Losi, M.E., Frankenberger Jr., W.T. (1998) Microbial oxidation and solubilization of precipitated elemental selenium in soil, *J Environ Qual*, Vol. 27 (4), pp 836-843
- [59] Dowdle, P.R., Oremland, R.S. (1998) Microbial oxidation of elemental selenium in soil slurries and bacterial cultures, *Environ Sci Technol*, Vol. 32, pp 3749-3755
- [60] Losi, M.E., Frankenberger Jr., W.T. (1997) Bioremediation of selenium in soil and water, *Soil Science*, Vol. 162 (10), pp 692-702
- [61] Craig, P.J., Jenkins, R.O. (2004) Organometallic compounds in the environment: An overview, in: Hirner, A.V., Emons, H. (Ed), *Organic metal and metalloid species in the environment*, Springer Verlag Berlin Heidelberg

- [62] Thayer, J.S. (2002) Biological methylation of less-studied elements, *Appl Organometal Chem*, Vol. 16, pp 677-691
- [63] Kremer, D., Ilgen, G. Feldmann, J. (2005) GC-ICP-MS determination of dimethyldelenide in human breath after ingestion of ⁷⁷Se-enriched selenite: monitoring of in-vivo methylation of selenium, *Annal Bioanal Chem*, Vol. 383, pp 509-515
- [64] Fatoki, O.S. (1997) Biomethylation in the natural environment: A review, *S Afr J Sci*, Vol. 93, pp 366-370
- [65] Challenger, F., Higginbottom, C., Ellis, L. (1933) The formation of organometalloidal compounds by microorganisms. Part 1: Trimethylarsine, *J Chem Soc (resumed)*, Vol. 32, pp 95-101
- [66] Challenger, F. (1945) Biological methylation, *Chem Rev*, Vol. 36 (3), pp 315-361
- [67] Hirner, A.V., Feldmann, J., Krupp, E., Grümping, R., Goguel, R., Cullen, W.R. (1998) Metal(liod)organic compounds in geothermal gases and waters, *Org Geochem*, Vol. 29 (5-7), pp 1765-1778
- [68] Hirner, A.V., Pestke, F.M., Busche, U., Eckelhoff, A. (1998) Testing contaminant mobility in soils and waste materials, *J Geochem Explor*, Vol. 64, pp 127-132
- [69] Hirner, A.V., Grüter, U.M., Kresimon, J. (2000) Metal(lod)organic compounds in contaminated soils, *Fresenius J Anal Chem*, Vol. 368, pp 263-267
- [70] Feldmann, J., Grümping, R, Hirner, A.V. (1994) Determination of volatile metal and metalloid compounds in gases from domestic waste deposits with GC/ICP-MS, *Fresenius J Anal Chem*, Vol. 350, pp 228-234
- [71] Feldmann, J., Hirner, A.V. (1995) Occurrence of volatile metal and metalloid species in landfill and sewage gases, *Intern J Environ Anal Chem*, Vol. 60, pp 339-359
- [72] Rosenheim, O. (1902) The decomposition of compounds of selenium and tellurium by moulds and its influence on the biological test for arsenic, *Proc Chem Soc*, Vol. 18 (253), pp 138-139
- [73] Challenger, F., North, H.E. (1934) The formation of organometalloidal compounds by microorganisms. Part II: Dimethyl selenide, *J Chem Soc (Resumed)*, pp 68-71
- [74] McBride, B.C., Wolfe, R.S. (1971) Biosynthesis of dimethylarsine by *Methanobacterium*, *Biochemistry*, Vol. 10 (23), pp 4312-4317

- [75] Thompson-Eagle, E.T., Frankenberger Jr., W.T., Karlson, U. (1989) Volatilization of selenium by *Alternaria alternata*, Appl Environ Microbiol, Vol. 55 (6), pp 1406-1413
- [76] Chasteen, T.G., Bentley, R. (2003) Biomethylation of selenium and tellurium: microorganisms and plants, Chem Rev, Vol. 103 (1), pp 1-25
- [77] Sicherheitsdatenblatt "Sodium selenate" (26.08.2004) Alfa Aesar, Johnson Metthey GmbH & Co.KG
- [78] Sicherheitsdatenblatt „Sodium Selenite“ (14.09.2004) Alfa Aesar, Johnson Metthey GmbH & Co.KG
- [79] Sicherheitsdatenblatt „Dimethyl selenide“ (10.02.2005) Sigma Aldrich
- [80] Guerin, T., Astruc, A., Astruc, M. (1999) Speciation of arsenic and selenium compounds by HPLC hyphenated to specific detectors: a review of the main separation techniques, Talanta, Vol. 50, pp 1-24
- [81] Mester, Z., Fodor, P. (1999) Selenium speciation with on-column preconcentration high-performance liquid chromatography – atomic fluorescence spectrometry using ultrasonic nebulization technique, Anal Chim Acta, Vol. 386, pp 89-97
- [82] Bendahl, L., Gammelgaard, B., Jons, O., Farver, O., Hansen, S.H. (2001) Interfacing capillary electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometry by direct injection nebulisation for selenium speciation, J Anal At Spectrom, Vol. 16 (1), 38-42
- [83] Chau, Y.K., Wong, P.T.S., Goulden, P.D. (1975) Gas chromatography-Atomic absorption method for the determination of dimethyl selenide and dimethyl diselenide, Anal Chem, Vol. 47 (13), pp 2279-2281
- [84] Karlson, U., Frankenberger Jr, W.T. (1988) Determination of gaseous selenium-75 evolved from soil, Soil Sci Soc Am J, Vol. 52, pp 678-681
- [85] Uden, P.C. (2002) Modern trends in the speciation of selenium by hyphenated techniques, Anal Bioanal Chem, Vol. 373, pp 422-431
- [86] Lobinski, R., Edmonds, J.S., Suzuki, K.T., Uden, P.C. (2000) Species-selective determination of selenium compounds in biological materials, Pure Appl Chem, Vol. 72 (3), pp 447-461
- [87] B'Hymer, C., Caruso, J.A. (2006) Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry, J Chromatogr A, Vol. 1114 (1), pp 1-20

- [88] Meija, J., Bryson, J.M., Vonderheide, A.P., Montes-Bayon, M., Caruso, J.A. (2003) Studies of selenium-containing volatiles in roasted coffee, *J Agric Food Chem*, Vol. 51, pp 5116-5122
- [89] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebenssicherheit (2007) Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von *Alternaria alternata* und der Varietät *A. alternata* pathovar *malus* gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV, AZ. 6790-05-03-39
- [90] Ausschuss für biologische Arbeitsstoffe (2002) TRBA 460 - Einstufung von Pilzen in Risikogruppen, BArbBl. 10, 78
- [91] Guo, X., Sturgeon, R.E., Mester, Z., Gardner, G.J. (2003) Photochemical alkylation of inorganic selenium in the presence of low molecular weight organic acids, *Environ Sci Technol*, Vol. 37, pp 5645-5650
- [92] Brunauer, S., Emmett, P.H., Teller, E. (1938) Adsorption of gases in multimolecular layers, *J. A. Chem. Soc.*, Vol. 60, pp 309-319
- [93] Flückiger-Isler, R., Mörikofer:Zwez, S., Kahn, J.-M., Walter, P. (1994) Dietary components of malt extract such as maltodextrins, proteins and inorganic salts have distinct effects on glucose uptake and glycogen concentrations in rats, *J Nutr*, Vol. 124, pp 1647-1653
- [94] Krebs, K.G., Heuser, D., Wimmer, H. (1967) Z. Sprühreagentien, in Stahl, E. (Hrsg) (1967) *Dünnschichtchromatographie – Ein Laboratoriumshandbuch*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 2. neu überarbeitete Auflage
- [95] Häntzsch, S., Prescher, K.E. (1965) Zur photometrischen Bestimmung primärer Amine mit Ninhydrin, *Fresenius J Anal Chem*, Vol. 213 (6), pp 408-411
- [96] Ludiwg, C. (1992) GRFIT, a program for solving speciation problems, equation on equilibrium constants, concentrations, and other physical parameters, Internal Report of the University of Berne
- [97] Liu, A., Chen, X., Zhang, Z., Jiang, Y., Shi, C. (2006) Selective synthesis and magnetic properties of FeSe₂ and FeTe₂ nanocrystallites obtained through a hydrothermal co-reduction route, *Solid State Communications*, Vol. 138, pp 538-541
- [98] Davis, J.A., Kent, D.B. (1990) Surface complexation modeling in aqueous geochemistry, *Rev Mineral*, Vol. 23, pp 177-260
- [99] Martell, A.E., Smith, R.M. (1976) *Critical stability constants*, Vol. 1-4, Plenum Press, New York

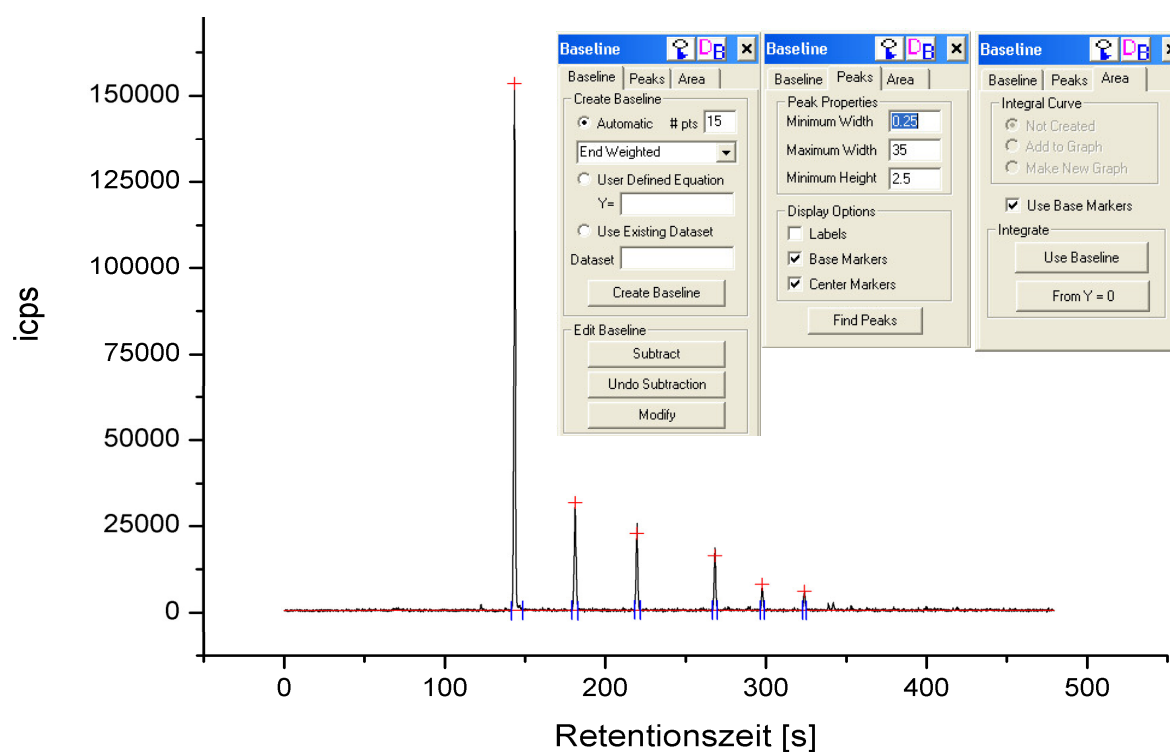
- [100] Haas, K., Feldmann, J. (2000) Sampling of trace volatile metal(loid) compounds in ambient air using polymer bags: A convenient method, *Anal Chem*, Vol. 72 (17), pp 4205-4211
- [101] Feldmann, J., Naëls, L., Haas, K. (2001) Cryotrapping of Co₂-rich atmospheres for the analysis of volatile metal compounds using capillary GC-ICP-MS, *J Anal Spectrom*, Vol. 16, pp 1040-1043
- [102] Kromidas, S. (1999) *Validierung in der Analytik*, Wiley-VCH Weinheim
- [103] Umweltbundesamt für Mensch und Umwelt (2005) *Leitlinie zur Methodenentwicklung*, Texte 01/05, ISSN 0722-186X
- [104] Amouroux, D., Tessier, E., Pécheyrans, C., Donard, O.F.X. (1998) Sampling and probing volatile metal(loid) species in natural waters by in-situ purge and cryogenic trapping followed by gas chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry (P-CT-GC-ICP-MS), *Anal Chim Acta*, Vol. 377, pp 241-254
- [105] Pécheyrans, C., Quétel, C.R., Lecuyer, F.M.M., Donard, O.F.X. (1998) Simultaneous determination of volatile metal (Pb, Hg, Sn, In, Ga) and nonmetal species (Se, P, As) in different atmospheres by cryofocussing and detection by ICPMS, *Anal Chem*, Vol. 70, pp 2639-2645
- [106] Karlson, U., Frankenberger Jr, W.T., Spencer, W.F. (1994) Physicochemical properties of dimethyl selenide and dimethyl diselenide, *J Chem Eng Data*, Vol. 39, pp 608-610
- [107] Banuelos, G.S., Lin, Z.-Q., Arroyo, I., Terry, N. (2005) Selenium volatilization in vegetated agricultural drainage sediment from the San Luis Drain, Central California, *Chemosphere*, Vol. 60, pp 1203-1213
- [108] Zieve, R., Peterson, P.J. (1985) Sorption of dimethyl selenide by soils, *Soil Biol Biochem*, Vol. 17 (1), pp 105-107
- [109] Martens D.A., Suarez, D.L. (1997) Mineralization of selenium-containing amino acids in two California soils, *Soil Sci Soc Am J*, Vol. 61 (6), pp 1685-1694
- [110] Martens, D.A., Suarez, D.L. (1999) Transformations of volatile methylated selenium in soil, *Soil Biol Biochem*, Vol. 31, pp 1355-1361
- [111] Zhang, Y., Frankenberger Jr, W.T. (2002) Fate of dimethyl diselenide in soil, *J Environ Qual*, Vol. 31, pp 1124-1128

- [112] Sverjensky, D.A. (1994) Zero-point-of-charge prediction from crystal chemistry and salvation theory, *Geochim Cosmochim Acta*, Vol. 58 (14), pp 3123-3129
- [113] Kosmulski, M. (2001) *Chemical properties of material surfaces*, Dekker Verlag, New York
- [114] Stryer, L. (1996) *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, 4.Auflage
- [115] Norén, K., Loring, J.S., Persson, P. (2008) Adsorption of alpha amino acids at the water/goethite interface, *J Coll Int Sci*, Vol. 319, pp 416-428
- [116] Hiemstra, T., Rietra, R.P.J.J., van Riemsdijk, W.H. (2007) Surface complexation of selenite on goethite: MO/DFT geometry and charge distribution, *Croat Chem Acta*, Vol. 80 (3-4), pp 313-324
- [117] Rael, R.M., Frankenberger Jr., W.T. (1996) Influence of pH, salinity, and selenium on the growth of *Aeromonas veronii* in evaporation agricultural drainage water, *Wat Res*, Vol. 30 (2), pp 422-430
- [118] Dungan, R.S., Frankenberger Jr., W.T. (2000) Factors affecting the volatilization of dimethyl selenide by *Enterobacter cloacae* SLD1a-1, *Soil Biol Biochem*, Vol. 32, pp 1353-1358
- [119] Fan, T.W.-M., Lane, A.N., Higashi, R.M. (1997) Selenium biotransformations by a euryhaline microalga isolated from a saline evaporation pond, *Environ Sci Technol*, Vol. 31 (2), pp 569-576
- [120] Doran, J.W., Alexander, M. (1977) Microbial transformations of selenium, *Appl Environ Microbiol*, Vol. 33 (1), pp 31-37
- [121] Cornell, R.M., Schwertmann, U. (2003) *The iron oxides*, Wiley-VCH Weinheim, 2nd edition
- [122] Meyer, J., Schmidt, A., Michalke, K., Hensel, R. (2007) Volatilisation of metals and metalloids by the microbial population of an alluvial soil, *Syst Appl Microbiol*, Vol. 30, pp 229-238
- [123] Cooke, T.D., Bruland, K.W. (1987) Aquatic chemistry of selenium: evidence of biomethylation, *Environ Sci Technol*, Vol. 21 (12), pp 1214-1219
- [124] Imura, N., Sukegawa, E., Pan, S.-K., Nagao, K., Kim, J.-Y., Kwan, T., Ukita, T. (1971) Chemical methylation of inorganic mercury with methylcobalamin, a vitamin B12 analog, *Science*, Vol. 172 (3989), pp 1248-1249
- [125] Filipelli, M., Baldi, F. (1993) Alkylation of ionic mercury to methylmercury and dimethylmercury by methylcobalamin: simultaneous determination by purge-and-trap GC in line with FTIR, *Appl Organometal Chem*, Vol. 7, pp 487-493

- [126] Choi, S.-C., Bartha, R. (1993) Cobalamin-mediated mercury methylation by *Desulfovibrio desulfuricans* LS, Appl Environ Microbiol, Vol. 59 (1), pp 290-295
- [127] Guo, L., Frankenberger Jr., W.T., Jury, W.A. (1999) Adsorption and degradation of dimethyl selenide in soil, Environ Sci Technol, Vol. 33 (17), pp 2934-2938
- [128] Dungan, R.S., Yates, S.R., Frankenberger Jr., W.T. (2002) Volatilization and degradation of soil-applied dimethylselenide, J Environ Qual, Vol. 31, pp 2045-2050
- [129] Lovley, D.R. (1997) Microbial Fe(III) reduction in subsurface environments, FEMS Microbiol Rev, Vol. 20, pp 305-313
- [130] Lovley D.R. (1993) Dissimilatory metal reduction, Annu Rev Microbiol, Vol. 47, pp 263-290
- [131] Séby, F., Potin-Gautier, M., Giffaut, E., Donard, O.F.X. (1998) Assessing the speciation and the biochemical processes affecting the mobility of selenium from a geological repository of radioactive wastes to the biosphere, Analusis, Vol. 26, pp 193-198
- [132] Bruggeman, C., Maes, A., Vancluyse, J., Vandemussele, P. (2005) Selenite reduction in Boom clay: effect of FeS₂, clay materials and dissolved organic matter, Environ Pollut, Vol. 137, pp 209-221
- [133] Naveau, A., Monteil-Rivera, F., Guillon, E., Dumonceau, J. (2007) Interactions of aqueous selenium (-II) and (IV) with metallic sulphide surfaces, Environ Sci Technol, Vol. 41, pp 5376-5382
- [134] Michalke, K., Wickenheiser, E.B., Mehring, M., Hirner, A.V., Hensel, R. (2000) Production of volatile derivatives of metal(loid)s by microflora involved in anaerobic digestion of sewage sludge, Appl Environ Microbiol, Vol. 66 (7), pp 2791-2796
- [135] Pedersen, K. (1999) Subterranean microorganisms and radioactive waste disposal in Sweden, Eng Geol, Vol. 52, pp 163-176
- [136] Fukunaga, S., Jintoku, T., Iwata, Y., Nakayama, M., Tsuji, T., Sakaya, N., Mogi, K., Ito, M. (2005) Investigation of microorganisms in bentonite deposits, Geomicrobiol J, Vol. 22, pp 361-370
- [137] Motamedi, M., Pedersen, K. (1998) *Desulfovibrio aespoeensis* sp. nov., a mesophilic sulphate-reducing bacterium from deep groundwater at Äspö hard rock laboratory, Sweden, Int J Syst Bacteriol, Vol. 48, pp 311-315

- [138] Kotelnikova, S., Macario, A.J.L., Pedersen, K. (1998) *Methanobacterium subterraneum* sp. nov., a new alkaliphilic, eurythermic and halotolerant methanogen isolated from deep granitic groundwater, Int J Syst Bacteriol, Vol. 48, pp 357-367

7 Anhang



A1: beispielhafte Peakintegration (^{82}Se) mittels Microcal OriginPro 7.0 zur Quantifizierung chromatographisch getrennter Organoselenverbindungen

A2: Ergebnisse der Peakintegration aus A1, Verwendung der „Area“ zur Quantifizierung durch Vergleich mit Peakfläche eines Standards

Peak	Area	Center [ms]	Height	HalfWidth [ms]
Peak 1	1.73924E8	143519	152908.6	1100
Peak 2	4.06818E7	181251	31318.3	1340
Peak 3	3.08582E7	219999	25050.9	1338
Peak 4	2.15019E7	268407	18034.0	1199
Peak 5	7.81461E6	297769	7520.5	1200
Peak 6	6.11266E6	324105	6566.8	1100

A3: Messdaten zur konzentrationsabhängigen Alkylierung von SeIV durch *A. alternata*

Probe (gelöstes Se)	Biomasse [mg]	pH	Eh [mV]	Eh- Kalibrierung soll/haben	DMS_e als Se [ng]
0ppb - bl		7,09	215	645/615	0,028
0ppb - 1	10,6	5,28	170	235/245	0,024
0ppb - 2	12,6	5,26	160		0,289
0ppb - 3	8,6	5,15	160		0,345
1ppb - bl		6,83	225	645/615	0,032
1ppb - 1	12,1	5,67	160	235/245	0,256
1ppb - 2	10,3	5,57	140		0,111
1ppb - 3	11,5	5,42	145		0,083
10ppb - bl		6,73	210	645/615	0,038
10ppb - 1	9,4	5,18	150	235/245	3,004
10ppb - 2	10,2	5,28	145		0,149
10ppb - 3	10,2	5,2	145		1,538
100ppb - bl		6,88	240	645/645	0,032
100ppb - 1	11,4	4,69	160	235/225	66,359
100ppb - 2	11,6	4,72	140		60,303
100ppb - 3	11	4,88	165		56,791
1ppm - bl		6,95	230	645/615	0,069
1ppm - 1	4,8	5,06	215	235/240	2271,176
1ppm - 2	7,6	5,54	200		866,219
1ppm - 3	11,6	5,42	180		972,349
10ppm - bl		7,09	210	645/615	0,222
10ppm - 1	1,3	5,27	170	235/240	522,236
10ppm - 2	2,4	4,51	190		44,230
10ppm - 3	4,1	4,59	185		1208,605

A3: Fortsetzung

Probe (gelöstes Se)	DMDSe als Se [ng]	EMDSe als Se [ng]	DEDSe als Se [ng]	Volatiles Se [ng]
0ppb - bl	0,324	0,039	0,032	0,423
0ppb - 1	0,856	0,160	0,034	1,074
0ppb - 2	2,673	0,376	0,034	3,372
0ppb - 3	2,166	0,312	0,028	2,850
1ppb - bl	0,174	0,022	0,027	0,255
1ppb - 1	5,513	0,776	0,012	6,557
1ppb - 2	5,491	1,223	0,078	6,903
1ppb - 3	5,224	0,869	0,064	6,241
10ppb - bl	0,717	0,108	0,045	0,907
10ppb - 1	5,539	0,606	0,057	9,207
10ppb - 2	3,896	0,383	0,050	4,479
10ppb - 3	2,864	0,311	0,039	4,753
100ppb - bl	0,546	0,089	0,039	0,706
100ppb - 1	2,345	0,257	0,037	68,998
100ppb - 2	1,473	0,189	0,045	62,010
100ppb - 3	1,379	0,221	0,029	58,420
1ppm - bl	0,816	0,091	0,040	1,017
1ppm - 1	1,363	0,288	0,015	2272,841
1ppm - 2	1,436	1,438	0,018	869,111
1ppm - 3	0,662	0,476	0,020	973,507
10ppm - bl	0,593	0,017	0,008	0,840
10ppm - 1	3,153	20,701	n.n.	546,090
10ppm - 2	1,243	1,833	n.n.	47,306
10ppm - 3	1,437	3,226	0,015	1213,283

A4: Messdaten zur konzentrationsabhängigen Alkylierung durch eine Umweltmischkultur angereichert aus Deponiesickerwasser

Probe (gelöstes Se)	Biomasse OD_{600nm}	pH	Eh [mV]	Eh- Kalibrierung soll/haben	DMSe als Se [ng]	DMDSe als Se [ng]
0ppb - bl		7,19	215	645/615	n.b.	n.b.
0ppb - 1	1,88	8,13	-180	235/245	0,003	0,391
0ppb - 2	1,74	8,20	-240		0,004	0,265
0ppb - 3	2,20	8,03	-210		0,004	0,276
1ppb - bl		7,16	210	645/615	0,001	0,018
1ppb - 1	1,42	7,54	-225	235/245	0,011	0,091
1ppb - 2	2,08	7,45	-260		0,011	0,253
1ppb - 3	2,20	7,50	-260		0,009	0,210
10ppb - bl		7,13	215	645/615	n.b.	n.b.
10ppb - 1	2,64	7,22	-265	235/245	0,033	0,245
10ppb - 2	3,03	7,18	-255		0,037	0,162
10ppb - 3	2,81	7,20	-280		0,029	0,543
100ppb - bl		7,17	240	645/645	0,008	0,171
100ppb - 1	1,74	7,09	-120	235/225	8,981	33,468
100ppb - 2	1,98	7,38	-110		1,139	2,845
100ppb - 3	1,96	7,19	-130		7,824	24,722
1ppm - bl		7,19	215	645/615	0,007	0,053
1ppm - 1	2,42	7,12	-250	235/240	683,196	18,622
1ppm - 2	2,75	7,11	-250		357,451	19,047
1ppm - 3	2,46	7,26	-275		571,009	20,910
10ppm - bl		7,23	210	645/615	0,004	0,039
10ppm - 1	1,83	7,22	-410	235/240	178,012	60,249
10ppm - 2	1,77	7,13	-400		101,551	339,830
10ppm - 3	1,88	7,11	-420		80,878	254,748

A4: Fortsetzung

Probe (gelöstes Se)	EMDSe als Se [ng]	DEDSe als Se [ng]	RT 410s als Se [ng]	RT 422s als Se [ng]	Volatiles Se [ng]
0ppb - bl	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
0ppb - 1	0,007	n.n.	n.n.	n.n.	0,400
0ppb - 2	0,005	0,002	n.n.	n.n.	0,275
0ppb - 3	n.n.	0,003	n.n.	n.n.	0,283
1ppb - bl	n.n.	0,028	n.n.	n.n.	0,047
1ppb - 1	n.n.	0,041	0,006	n.n.	0,149
1ppb - 2	n.n.	0,041	0,006	n.n.	0,312
1ppb - 3	0,003	0,043	0,005	n.n.	0,270
10ppb - bl	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
10ppb - 1	n.n.	0,037	0,004	n.n.	0,319
10ppb - 2	n.n.	0,036	0,004	n.n.	0,239
10ppb - 3	n.n.	0,031	n.n.	n.n.	0,603
100ppb - bl	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,179
100ppb - 1	3,935	n.n.	2,678	n.n.	49,063
100ppb - 2	0,031	n.n.	0,104	n.n.	4,120
100ppb - 3	2,348	n.n.	2,403	n.n.	37,298
1ppm - bl	n.n.	0,010	n.n.	n.n.	0,070
1ppm - 1	0,771	n.n.	0,407	n.n.	702,996
1ppm - 2	0,769	n.n.	0,245	n.n.	377,513
1ppm - 3	1,079	n.n.	0,342	n.n.	593,341
10ppm - bl	n.b.	0,009	n.n.	n.n.	0,052
10ppm - 1	0,177	n.n.	0,296	1,459	238,734
10ppm - 2	89,796	n.n.	n.n.	1,931	531,176
10ppm - 3	60,232	n.n.	0,489	0,457	396,347

A5: Messdaten zur Alkylierung von freiverfügbarem SeIV durch *A. alternata*

Probe	Zeit [d]	Biomasse [mg]	pH	Eh [mV]	Eh- Kalibrierung soll/haben
0-1	0	0,5	5,40	310	645/645
0-2		0,4	5,40	315	235/230
0-3		0,4	5,40	315	
1 blank	2		5,66	280	645/645
2		n.b.	4,85	310	235/225
3		9,3	4,82	315	
4		9,3	4,83	320	
5 blank	4		5,57	270	645/645
6		13,3	4,80	305	235/230
7		11,9	4,82	310	
8		13,2	4,83	305	
9 blank	6		5,59	240	645/645
10		11,4	4,69	290	235/225
11		11,6	4,72	295	
12		11	4,88	300	
13 blank	10		5,59	255	645/640
14		10,3	4,93	285	235/230
15		10,7	4,75	290	
16		10,6	4,78	300	
17 blank	13		5,61	270	645/635
18		10,7	4,98	290	235/235
19		10,7	5,12	280	
20		10,5	5,25	270	
21 blank	17		n.b.	n.b.	645/640
22		8,7	5,46	250	235/230
23		8,7	5,53	245	
24		8,8	5,52	245	
25 blank	21		5,68	225	645/640
26		8,9	5,63	235	235/235
27		9,1	5,67	230	
28		8,4	5,65	210	

A5: Fortsetzung

Probe	Se _{gelöst} [µg L ⁻¹]	DMS _e als Se [ng]	DMDSe als Se [ng]	Volatiles Se [ng]
0-1	128,2	n.b.	n.b.	
0-2	n.b.	n.b.	n.b.	
0-3	n.b.	n.b.	n.b.	
1 blank	128,2	0,004	n.n.	0,004
2	21,9	28,867	n.n.	28,867
3	22,3	26,884	n.n.	26,884
4	22,1	28,653	n.n.	28,653
5 blank	128,2	0,029	n.n.	0,029
6	22,7	40,062	n.n.	40,062
7	28,9	35,006	n.n.	35,006
8	23,2	40,600	n.n.	40,600
9 blank	128,2	0,032	n.n.	0,032
10	29,7	66,359	n.n.	66,359
11	24,4	60,303	n.n.	60,303
12	25,9	56,791	n.n.	56,791
13 blank	128,2	0,017	n.n.	0,017
14	26,7	67,621	n.n.	67,621
15	25,8	82,172	n.n.	82,172
16	24,8	73,937	n.n.	73,937
17 blank	128,2	0,005	n.n.	0,005
18	25,8	42,396	0,004	42,399
19	26,9	53,772	n.n.	53,772
20	27,5	58,259	0,006	58,265
21 blank	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
22	47,8	64,261	0,050	64,311
23	39,1	81,154	0,029	81,183
24	42,9	83,830	0,022	83,853
25 blank	128,2	0,005	n.n.	0,005
26	37,6	83,071	0,041	83,112
27	39,9	103,911	0,055	103,966
28	49,4	79,215	0,048	79,263

A6: Messdaten zur Alkylierung von adsorptiv gebundem SeIV durch *A. alternata*

Probe	Zeit [d]	Biomasse [mg]	pH	Eh [mV]	Eh- Kalibrierung soll/haben
MEM			3,87	300	
0-1	0	n.b.	5,68	260	645/640
0-2	(nach 48 h Sorptions)	n.b.	5,66	275	235/235
0-3		0,82	5,61	300	
0-4		0,66	5,74	300	
1 blank		2		5,16	300
2		4,30	4,94	300	235/230
3		4,48	4,90	240	
4		5,08	5,07	275	
5 blank	4		5,71	250	645/635
6		6,68	5,47	270	235/235
7		2,82	5,79	230	
8		8,30	5,47	270	
9 blank	6		6,02	240	645/640
10		5,10	6,19	240	235/235
11		6,32	5,66	245	
12		6,58	5,73	250	
13 blank	10		5,49	260	645/645
14		7,34	6,09	160	235/225
15		4,50	6,05	140	
16		8,30	6,39	110	
17 blank	13		5,40	250	645/640
18		6,72	6,10	220	235/230
19		3,12	5,94	210	
20		8,22	6,00	230	
21 blank	17		6,29	250	645/640
22		6,74	6,58	50	235/230
23		6,10	6,24	110	
24		7,28	6,31	140	
25 blank	21		6,05	250	645/640
26		6,76	6,06	110	235/230
27		6,46	6,45	40	
28		4,90	5,99	90	

A6: Fortsetzung

Probe	Se _{gelöst} [µg L ⁻¹]	DMS _e als Se [ng]	DMD _e als Se [ng]	Volatiles Se [ng]
MEM	170,3			
0-1	16,9	n.b.	n.b.	
0-2	14,9	n.b.	n.b.	
0-3	16,3	n.b.	n.b.	
0-4	19,2	n.b.	n.b.	
1 blank	13,1	0,011	n.n.	0,011
2	11,5	0,581	0,0014	0,583
3	10,9	0,480	0,0014	0,481
4	13,0	0,443	0,0021	0,445
5 blank	13,2	0,006	0,0005	0,006
6	13,6	0,744	0,0038	0,748
7	17,5	0,430	0,0018	0,431
8	13,1	1,836	0,0044	1,841
9 blank	26,7	0,026	0,0016	0,028
10	44,6	3,114	0,0020	3,116
11	11,1	2,298	0,0037	2,302
12	10,3	2,592	0,0047	2,597
13 blank	16,9	0,013	n.n.	0,013
14	10,2	6,258	n.n.	6,258
15	42,8	4,279	0,0033	4,282
16	12,1	4,478	0,0069	4,485
17 blank	8,9	0,029	0,0355	0,064
18	10,8	3,575	0,1598	3,735
19	9,5	5,929	0,1101	6,039
20	9,2	5,338	0,0804	5,419
21 blank	16,0	0,002	n.n.	0,002
22	19,4	12,119	n.n.	12,119
23	8,3	17,004	n.n.	17,004
24	8,9	13,464	0,0137	13,478
25 blank	12,2	0,019	0,0243	0,043
26	15,0	34,274	0,0834	34,357
27	15,0	49,252	0,0860	49,338
28	17,4	30,635	0,0954	30,730

A7: Messdaten zur Alkylierung von freiverfügbarem SeIV durch eine Umweltmischkultur angereichert aus Deponiesickerwasser

Probe	Zeit	Biomasse	pH	Eh	Eh- Kalibrierung	Se _{gelöst}
	[d]	[Zellen mL ⁻¹]		[mV]	soll/haben	[µg L ⁻¹]
MEM			6,00	130		121,8
1blank	2		6,20	115	235 / 225	118,0
2		8,71E+07	7,06	-110	645 / 645	100,0
3		8,92E+07	7,17	-110		117,0
4		7,46E+07	7,22	-110		116,4
5blank	4		6,89	130	235 / 230	120,5
6		5,63E+08	7,02	-120	645 / 645	24,4
7		7,73E+08	5,80	-125		48,7
8		6,00E+08	6,97	-125		31,5
9blank	6		6,42	130	235 / 230	120,5
10		1,19E+09	6,76	-100	645 / 640	22,6
11		1,19E+09	6,43	-95		39,6
12		1,22E+09	6,43	-95		43,2
13blank	10		6,37	120	235 / 235	121,1
14		1,14E+09	7,15	-105	645 / 640	71,6
15		1,17E+09	6,73	-115		30,6
16		1,14E+09	6,99	-120		54,0
17blank	14		6,41	125	235 / 230	120,6
18		1,08E+09	6,86	-95	645 / 640	96,9
19		1,10E+09	6,62	-85		23,2
20		1,01E+09	6,68	-85		16,7
21blank	21		6,38	120	235 / 230	121,6
22		1,00E+09	6,76	-100	645 / 635	73,7
23		9,60E+08	6,70	-95		20,1
24		9,58E+08	6,41	-95		34,0

A7: Fortsetzung

Probe	DMS _e als Se [ng]	DMDSe als Se [ng]	EMDSe als Se [ng]	DEDSe als Se [ng]	RT 426s als Se [ng]	Volatiles Se [ng]
MEM						
1blank	0,052	0,086	0,020	0,014	n.n.	0,173
2	0,022	0,352	0,086	0,009	n.n.	0,469
3	0,060	1,598	0,238	n.n.	0,023	1,919
4	0,110	0,321	0,039	0,007	0,008	0,485
5blank	0,026	0,054	0,028	n.n.	0,020	0,128
6	2,378	1,949	1,009	n.n.	0,271	5,608
7	0,031	0,203	0,098	n.n.	0,091	0,423
8	0,123	0,136	0,043	n.n.	0,068	0,370
9blank	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	
10	0,817	0,229	0,033	0,008	0,021	1,108
11	0,067	0,157	0,021	0,007	0,020	0,271
12	0,060	0,109	0,019	0,005	0,020	0,213
13blank	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	
14	0,244	0,029	n.n.	n.n.	n.n.	0,273
15	0,540	0,030	n.n.	n.n.	n.n.	0,570
16	1,648	0,050	n.n.	n.n.	n.n.	1,698
17blank	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	
18	21,848	0,098	n.n.	n.n.	n.n.	21,946
19	13,175	0,291	0,045	n.n.	n.n.	13,511
20	4,987	0,299	0,047	n.n.	n.n.	5,333
21blank	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	
22	41,824	0,196	n.n.	n.n.	n.n.	42,020
23	5,253	0,165	n.n.	n.n.	n.n.	5,417
24	21,768	0,121	n.n.	n.n.	n.n.	21,888

A8: Messdaten zur Alkylierung von adsorptiv gebundenem SeIV durch eine Umweltmischkultur angereichert aus Deponiesickerwasser

Probe	Zeit [d]	Biomasse [Zellen mL ⁻¹]	pH	Eh [mV]	Eh-	Se _{gelöst} [µg L ⁻¹]
					Kalibrierung soll/haben	
MEM			5,50	115		106,6
0-1	0		6,35	160	235 / 230	4,0
0-2	(nach 48 h Sorption)		6,61	155	645 / 640	20,0
0-3			6,03	150		7,9
0-4			6,13	160		10,7
1blank	2		6,14	165	235 / 225	3,8
2		7,29E+07	7,27	-145	645 / 645	7,5
3		8,79E+07	6,76	-130		5,1
4		8,40E+07	6,67	-130		26,2
5blank	4		6,10	170	235 / 230	5,3
6		8,69E+08	6,66	-160	645 / 645	7,8
7		9,74E+08	6,48	-160		17,6
8		1,23E+09	6,17	-150		9,9
9blank	6		6,40	170	235 / 230	9,1
10		1,04E+09	6,34	-150	645 / 640	17,4
11		1,28E+09	6,61	-130		14,4
12		1,03E+09	6,86	-90		16,0
13blank	10		6,61	150	235 / 235	8,2
14		1,14E+09	6,74	-105	645 / 640	13,0
15		1,15E+09	6,77	-110		26,2
16		1,18E+09	6,83	-110		16,4
17blank	14		6,41	150	235 / 230	n.b.
18		1,16E+09	6,84	-110	645 / 640	25,9
19		1,14E+09	6,92	-100		27,7
20		1,15E+09	6,63	-95		30,5
21blank	21		6,47	140	235 / 230	n.b.
22		1,17E+09	6,89	-90	645 / 635	16,8
23		1,18E+09	6,79	-105		19,7
24		9,96E+08	6,79	-95		13,7

A8: Fortsetzung

Probe	DMS _e als Se [ng]	DMDSe als Se [ng]	EMDSe als Se [ng]	DEDSe als Se [ng]	RT 426s als Se [ng]	Volatiles Se [ng]
1blank	0,020	0,028	n.n.	0,018	n.n.	0,066
2	0,014	0,132	0,026	0,012	n.n.	0,184
3	0,105	2,503	1,373	0,017	n.n.	3,998
4	0,016	1,335	0,612	0,010	0,008	1,981
5blank	0,028	0,047	n.n.	0,023	n.n.	0,099
6	0,067	0,286	0,011	0,010	0,009	0,382
7	0,034	1,228	0,149	0,009	0,036	1,456
8	0,025	0,456	0,093	0,007	0,017	0,597
9blank	0,083	0,105	n.n.	0,017	n.n.	0,205
10	0,021	0,014	0,001	0,011	n.n.	0,048
11	0,172	0,693	0,219	0,009	0,061	1,155
12	0,711	0,891	0,216	0,009	0,106	1,933
13blank	0,032	0,037	n.n.	0,048	n.n.	0,117
14	0,029	0,152	0,013	0,027	n.n.	0,221
15	0,544	0,181	0,038	0,017	n.n.	0,780
16	0,155	0,027	0,005	0,003	n.n.	0,190
17blank	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
18	0,868	0,017	n.n.	0,006	n.n.	0,890
19	6,373	0,910	0,113	n.n.	0,024	7,420
20	0,742	0,121	0,014	0,003	0,004	0,884
21blank	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	
22	0,466	1,181	0,123	0,017	n.n.	1,786
23	0,329	0,396	0,050	0,010	n.n.	0,786
24	0,285	0,667	0,061	0,008	n.n.	1,021

A9: Messdaten zur Alkylierung von mineralisch gebundenem Selen (FeSe₂) durch *D. gigas*

Probe	Zeit	Biomasse	pH	Eh	Se _{gelöst}	SO ₄ ²⁻	RT 125s als Se	DMS _e als Se
	[d]	[Zellen mL ⁻¹]		[mV]	[mg L ⁻¹]	[mg L ⁻¹]	[ng]	[ng]
K1	2	1,89E+07	6,68	-160	0,281	1735	n.n.	0,256
1		3,91E+07	7,99	-180	1,717	1218	n.n.	1,203
2		4,32E+07	8,02	-180	1,144	1214	n.n.	1,290
3		4,86E+07	8,04	-170	1,106	n.b.	n.n.	1,294
K2	4	2,43E+07	6,88	-190	0,033	1607	n.n.	0,558
4		4,18E+07	8,02	-245	1,010	1139	n.n.	1,129
5		3,78E+07	8,01	-230	1,178	1125	n.n.	1,017
6		3,37E+07	7,92	-170	1,136	n.b.	n.n.	1,126
K3	7	3,10E+07	7,74	-220	0,317	1495	n.n.	0,754
7		4,45E+07	8,10	-245	0,913	1142	n.n.	0,998
8		2,83E+07	8,09	-185	1,138	1188	n.n.	1,022
9		2,97E+07	8,05	-170	1,058	n.b.	n.n.	0,927
K4	10	2,70E+07	7,81	-215	0,285	1372	n.n.	0,392
10		2,56E+07	8,09	-205	1,041	937	n.n.	1,184
11		5,13E+07	8,11	-190	1,330	823	n.n.	1,762
12		3,37E+07	8,10	-210	1,208	n.b.	n.n.	1,264
K5	17	1,89E+07	7,70	-140	0,008	1399	n.n.	0,295
13		3,78E+07	8,09	-180	1,528	999	n.n.	3,670
14		2,83E+07	8,06	-160	1,346	851	n.n.	3,223
15		4,05E+07	8,00	-170	1,173	n.b.	n.n.	2,424
K6	24	2,43E+07	7,75	-180	0,905	1443	0,105	0,238
16		5,13E+07	8,11	-160	1,188	962	0,024	2,269
17		2,83E+07	8,09	-185	1,298	936	0,019	2,128
18		4,32E+07	8,13	-145	1,409	n.b.	n.n.	2,698
K7	31	1,48E+07	7,78	-220	0,090	1484	n.n.	0,728
19		4,72E+07	8,07	-195	1,921	877	n.n.	7,226
20		3,91E+07	8,06	-190	1,264	915	n.n.	3,052
21		3,51E+07	8,10	-165	1,482	n.b.	n.n.	3,182

A9: Fortsetzung

Probe	RT 180s als Se [ng]	RT 220s als Se [ng]	RT 270s als Se [ng]	DESe als Se [ng]	RT 315s als Se [ng]	DMDSe als Se [ng]	Volatiles Se [ng]
K1	0,512	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	
1	4,289	0,186	0,165	n.n.	0,055	n.n.	0,406
2	5,947	0,253	0,220	n.n.	0,079	n.n.	0,552
3	1,762	0,233	0,220	n.n.	0,083	n.n.	0,536
K2	1,358	n.n.	0,026	n.n.	n.n.	0,023	0,050
4	0,956	0,188	0,009	n.n.	0,063	0,034	0,294
5	0,583	0,232	0,246	n.n.	0,091	0,045	0,615
6	3,349	0,200	0,156	n.n.	0,062	0,026	0,444
K3	0,562	0,008	0,011	n.n.	n.n.	0,016	0,035
7	0,341	0,168	0,130	0,053	n.n.	0,014	0,364
8	0,346	0,185	0,152	0,055	n.n.	0,011	0,403
9	0,345	0,152	0,116	0,045	n.n.	0,012	0,325
K4	1,154	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,000
10	0,818	0,210	0,177	0,072	n.n.	n.n.	0,459
11	0,491	0,265	0,164	0,066	n.n.	n.n.	0,495
12	0,316	0,265	0,233	0,095	n.n.	n.n.	0,592
K5	0,761	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,000
13	0,471	0,306	0,284	0,124	n.n.	n.n.	0,714
14	0,249	0,300	0,211	0,080	n.n.	n.n.	0,591
15	0,547	0,509	0,265	0,090	n.n.	n.n.	0,864
K6	0,823	0,023	0,033	n.n.	n.n.	0,019	0,080
16	0,573	0,348	0,229	0,080	n.n.	n.n.	0,677
17	0,271	0,296	0,167	0,073	n.n.	n.n.	0,557
18	0,186	0,600	0,335	0,115	n.n.	n.n.	1,089
K7	0,827	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,101	0,101
19	1,264	0,443	0,266	0,105	n.n.	0,078	0,892
20	0,701	0,527	0,364	0,125	n.n.	0,095	1,111
21	0,516	0,521	0,389	0,145	n.n.	0,132	1,187

