

Metabolismus und Verhalten definierter Nonylphenolisomere in Belebtschlamm

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

Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Chemiker Markus Naabner

aus Wuppertal

Berichter: Universitätsprofessor Dr. I. Schuphan
Universitätsprofessor Dr. A. Schäffer

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Juni 2004

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Meinen Eltern
und Julia

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die das Zustandekommen dieser Arbeit ermöglicht haben.

Herrn Prof. Dr. I. Schuphan gilt mein besonderer Dank für die interessante Aufgabenstellung, sein stetiges Interesse am Fortgang der Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und zahlreiche Anregungen.

Herrn Prof. Dr. A. Schäffer danke ich für die Übernahme des Korreferates und die freundliche Unterstützung gerade zu Beginn der Arbeit.

Herrn Dr. B. Schmidt danke ich für die stete Diskussionsbereitschaft und Betreuung, besonders für die intensive Durchsicht des Manuskripts.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich bei meinem Kollegen und Freund Dr. M. Mergler für die fruchtbare Zusammenarbeit und die vielen heiteren Momente.

Allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs AGEESA danke ich für die gute Zusammenarbeit und Diskussionsbereitschaft.

Insbesondere möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts Biologie V für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Hilfestellungen bei kleineren und größeren Problemen bedanken.

Der Deutschen Forschungsgesellschaft danke ich für die Bereitstellung der Mittel zur Durchführung dieser Arbeit (GRK 546).

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Julia Abel, die mir in der letzten Phase der Fertigstellung dieser Arbeit unermüdlich geholfen hat.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Einführung und Problemstellung	1
1.2	Struktur und Eigenschaften von Nonylphenol	3
1.3	Verwendung des technischen Nonylphenols	5
1.4	Nonylphenol und Nonylphenol-enthaltende Substanzen in Kläranlagen und Umwelt	6
1.4.1	Zusammenhang von Nonylphenol und Nonylphenol-enthaltenden Substanzen	6
1.4.2	Vorkommen von NP und NP-enthaltenden Substanzen	9
1.5	Nonylphenol als hormonähnlich wirkender Stoff	10
1.6	Metabolismus von Nonylphenol	13
1.6.1	Allgemeine Aspekte des NP-Abbaus	13
1.6.2	Strukturchemische Aspekte des NP-Abbaus	14
1.6.3	Abbau von NP durch spezifische Mikroorganismen	15
1.7	Isomerenspezifische Betrachtung des technischen Nonylphenols	16
1.8	Ziele der Arbeit	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Chemikalien	19
2.2	Radiochemikalien	20
2.3	Nährmedien	20
2.4	Geräte und Apparaturen	21
2.5	Methoden	22
2.5.1	Behandlung und Charakterisierung des Belebtschlammes	22
2.5.1.1	Probenentnahme des Belebtschlammes	22
2.5.1.2	Lyophilisierung von Belebtschlamm	22
2.5.1.3	Sterilisation von Belebtschlamm	23
2.5.2	Extraktionen	23
2.5.2.1	Wasserdampfdestillation von wässrigen Lösungen	23
2.5.2.2	Wasserdampfdestillation von Belebtschlammproben	23
2.5.2.3	Soxhletextraktion	23
2.5.2.4	Bleidner-Dampfphasenextraktion	24
2.5.2.5	Flüssig-flüssig-Extraktion	24
2.5.3	Untersuchungen des Verhaltens wässriger NP-Lösungen	25
2.5.3.1	Adsorptionsuntersuchungen	25
2.5.3.2	Extraktion von 4- <i>n</i> -NP aus den Materialien der Adsorptionsuntersuchungen	25
2.5.3.3	Gasphasenuntersuchungen	25
2.5.4	Chromatographische Methoden	26

2.5.4.1	Dünnschichtchromatographie	26
2.5.4.2	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	26
2.5.4.3	Gaschromatographie	27
2.5.5	Spektroskopie	27
2.5.5.1	NMR- und IR-Spektroskopie	27
2.5.5.2	UV-Vis-Spektroskopie	28
2.5.5.3	Aufnahme von Anregungs- und Fluoreszenzspektren	28
2.5.6	Radioanalytische Methoden	28
2.5.6.1	Flüssigkeitsszintillationsdetektion	28
2.5.6.2	¹⁴ C-Bestimmung in Feststoffproben	28
2.5.6.3	¹⁴ CO ₂ -Bestimmung	29
2.5.7	Chemische Synthesen	29
2.5.7.1	Analytische Derivatisierung von Phenolen mit Dansylchlorid	29
2.5.7.2	Präparative Derivatisierung von Phenolen mit Dansylchlorid	30
2.5.7.3	Derivatisierung von Belebtschlammextrakten mit Dansylchlorid	30
2.5.7.4	Derivatisierungsreaktion mit MSTFA	31
2.5.7.5	Darstellung von [¹⁴ C(U)]-4-(3',6'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol	31
2.5.8	Abbauuntersuchungen von NP-Isomeren in Belebtschlamm	31
2.5.8.1	Versuchsaufbau	31
2.5.8.2	Aufarbeitung des Belebtschlammes nach der Wasserdampfdestillation	33
2.5.8.3	Analyse des Filtrats	33
2.5.8.4	Analyse des Feststoffes	33
2.5.8.5	Abbauuntersuchung von t-NP in Belebtschlamm	34
2.5.8.6	Aufreinigung eines NP-Metaboliten aus Belebtschlamm	34
2.5.8.7	Kultivierung von Mikroorganismen mit NP als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle	35
3	Ergebnisse und Diskussion	36
3.1	Untersuchung wässriger Lösungen von Nonylphenol und Bisphenol A	36
3.1.1	Adsorptionsuntersuchungen mit Bisphenol A	36
3.1.2	Adsorptionsuntersuchungen mit Nonylphenol	36
3.1.3	Gasphasenuntersuchungen	39
3.1.4	Diskussion	40
3.2	Analyse von NP durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und Fluoreszenzdetektion nach Derivatisierung mit Dansylchlorid	41
3.2.1	Charakterisierung der Derivatisierungsreaktion	42
3.2.2	Bestimmung der Anregungs- und Emissionsmaxima bei Fluoreszenzmessungen des Dansylderivats von 4- <i>n</i> -NP	43
3.2.3	Ergebnisse der Chromatographie	44
3.2.4	Linearität und Reproduzierbarkeit der Methode	45
3.2.5	Anwendung der Methode auf Klärschlammproben	47

3.2.6	Diskussion	48
3.3	Versuche zur Extraktion von NP aus Klärschlamm und wässrigen Proben	49
3.3.1	Flüssig-flüssig-Extraktion	49
3.3.2	Bleidner-Dampfphasenextraktion	50
3.3.3	Wasserdampfdestillation	51
3.3.3.1	Wasserdampfdestillation von Isomeren des technischen Nonylphenols	52
3.3.4	Diskussion	52
3.4	Verhalten und Metabolismus von definierten Nonylphenolisomeren in Belebtschlamm	53
3.4.1	Gasphase und Adsorption an Glas	54
3.4.2	Wasserdampfdestillation und Kinetik des NP-Abbaus	55
3.4.3	Analyse des Filtrats	57
3.4.4	Analyse der Soxhletextrakte	59
3.4.5	Analyse der Feststoffe	60
3.4.6	Mineralisierung	61
3.4.7	Bilanzierung	62
3.4.8	Sterile Ansätze	62
3.4.9	Diskussion	63
3.5	Metabolitenuntersuchungen	65
3.5.1	Produktion und Aufreinigung der Metaboliten	66
3.5.2	UV-Vis Untersuchungen	68
3.5.3	GC/MS-Untersuchungen	70
3.5.4	Diskussion	71
3.6	Synthese von [¹⁴ C(U)]-4-(3',6'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol	72
3.7	Abbauverhalten der <i>p</i> -Isomere des technischen Nonylphenol-Isomerengemisches in Belebtschlamm	74
3.7.1	Gaschromatographische Auftrennung des Isomerengemisches	74
3.7.2	Isomerenverteilung während der mikrobiellen Umsetzungen des t-NP in Belebtschlamm	75
3.7.3	Diskussion	77
4	Abschließende Diskussion	78
5	Zusammenfassung	82
6	Literaturverzeichnis	84
7	Anhang	99

Verzeichnis der Abkürzungen

4- <i>n</i> -NP	4- <i>n</i> -Nonylphenol
AOX	Adsorbierte organisch-gebundene Halogene
APEO	Alkylphenolpolyethoxylat
BPA	Bisphenol A (2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propan)
BSB	Biologischer Sauerstoffbedarf
COSY	Correlation Spectroskopie
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
d. Th.	der Theorie
DOM	Dissolved Organic Matter
EC _x	Effect Concentration (x = % der betroffenen Organismen)
KA	Kläranlage
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration
MSTFA	N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
NOEC	No observed effect concentration
NP	Nonylphenol
NPEO	Nonylphenolpolyethoxylat
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIC	Reconstructed Ion Chromatogram
RT	Raumtemperatur
S/N	Signal/Rausch-Verhältnis
TIC	Total Ion Chromatogram
TMS	Tetramethylsilan
t-NP	Technisches Nonylphenol
TOC	Total Organic Carbon
TS	Trockensubstanz

1 Einleitung

1.1 Einführung und Problemstellung

Im Zuge der starken Industrialisierung in den letzten Jahrzehnten sehen sich Menschen, Tiere und Pflanzen zunehmend Belastungen durch naturfremde Stoffe (Xenobiotika) ausgesetzt. Diese stammen vorwiegend aus Produktionen der chemischen Industrie; im Europäischen Verzeichnis existierender chemischer Substanzen sind mehr als 100000 Chemikalien aufgeführt, jedes Jahr kommen über 1000 neue Substanzen hinzu (TIMBRELL, 1989). Dabei steigt nicht nur die Anzahl, sondern auch die Gesamtmenge der weltweit produzierten Chemikalien beständig (STREIT, 1994). Zum großen Teil werden Xenobiotika als Pestizide, Kunststoffe, Arzneistoffe oder Detergenzien in die Umwelt ausgetragen, wo sie durch mögliche toxikologische Wirkungen häufig die natürlichen Stoffkreisläufe stören.

Ökochemische und ökotoxikologische Forschungen konnten dabei helfen die Umweltbelastung durch besonders schädliche Fremdstoffe wie z. B. polychlorierte Biphenyle (PCB) oder Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) zu reduzieren. Nach der weitgehenden Eindämmung dieser Probleme rückt nun die Untersuchung des Verhaltens anderer Xenobiotika in der Umwelt ins Zentrum des wissenschaftlichen und öffentlichen Interesses. So gewinnt seit Anfang der 90er Jahre die Erforschung ungewollter hormoneller Wirkungen von Umweltchemikalien zunehmend an Bedeutung. Die verminderte Fortpflanzungsfähigkeit von Alligatoren nach einem Chemieunfall mit Pestiziden (GUILLETTE & GUNDERSON, 2001) und die Vermännlichung weiblicher Vorderkiemenschnecken durch Tributylzinn (BRYAN et al., 1986) sind zwei Beispiele, welche den Zusammenhang zwischen Umweltchemikalien und Störungen des hormonellen Systems belegen.

Hormonähnlich wirkende Stoffe können sowohl anthropogenen (Xenoöstrogene) als auch natürlichen Ursprungs (Phytoöstrogene, Mycotoxine mit östrogenen Wirkung) sein. Des Weiteren wird zwischen natürlichen und synthetischen Hormonen sowie hormonell wirksamen Arzneimitteln unterschieden. Ein weit verbreitetes Xenoöstrogen ist das technische Nonylphenol (t-NP), welches als Abbauprodukt der industriell vielfältig verwendeten Nonylphenolpolyethoxylate (NPEO) vor allem in Ballungszentren mit hoher Wasserverschmutzung gefunden wird. Die Abbaupfade der NPEOs sind in groben Zügen verstanden und konvergieren mit der Bildung von t-NP (AHEL, 1994). Unter anaeroben Bedingungen ist t-NP selbst nicht abbaubar und persistiert in Sedimenten von Oberflächengewässern oder Faultürmen von Kläranlagen (GIGER et al., 1984, PETROVIC et al., 2002; YING et al., 2002). Die höchsten t-NP-Konzentrationen werden in Kläranlagen und deren unmittelbarer Umgebung gemessen. Diese Konzentrationen überschreiten oft die durch Labortests ermittelten

Werte der „No observed effect concentration“ (NOEC) bzw. der „Lowest observed effect concentration“ (LOEC), was auf ein allgemeines Gefährdungspotential des NP hinweist.

Seit der Entdeckung, dass Nonylphenol in der Lage ist, zelluläre Prozesse auszulösen, die unter natürlichen Bedingungen von Steroidhormonen gesteuert werden (SOTO et al., 1991), ist das Interesse an dieser Substanz sprunghaft angestiegen. Die östrogene Wirkung des t-NP ist dabei im Vergleich zu den natürlich vorkommenden Östrogenen gering (SONNENSCHNEIN et al., 1995; GAIDO et al., 1997). Da t-NP jedoch lipophile und akkumulierende Eigenschaften aufweist (EKELUND et al., 1990; AHEL et al., 1993), darf das Schädigungspotential für Mensch und Umwelt nicht unterschätzt werden. Die Bedenken gegenüber t-NP verstärkten sich durch eine beobachtete Erhöhung des Vitellogeninplasmaspiegels männlicher Regenbogenforellen in der Nähe von Kläranlagenabläufen, welche auf erhöhte Alkylphenolkonzentrationen zurückgeführt wurde (BLACKBURNE & WALDOCK, 1995; HARRIES et al., 1997). Des Weiteren weist t-NP eine hohe Akuttoxizität für aquatische Organismen, insbesondere Crustaceen, auf (ERNST et al., 1980; BRINGMANN & KÜHN, 1982).

In Bezug auf den Metabolismus von t-NP existieren lediglich Daten über Mineralisierungsraten und Abbaugeschwindigkeiten, wonach es als schwer abbaubar eingestuft wird. Metaboliten des NP konnten bisher nur unter Verwendung des linearen Isomers 4-*n*-NP identifiziert werden, welches allerdings im t-NP und daher auch als Kontamination in der Natur nicht vorkommt (VALLINI et al., 2001; BOKERN & HARMS, 1997). Das relevante t-NP besteht hingegen aus einer Vielzahl von Einzelisomeren, wobei *para*-alkylierte Phenole mit verzweigter Nonylseitenkette die größte Gruppe darstellen (WHEELER et al., 1997). Dabei ist zu berücksichtigen, dass unterschiedlich verzweigte Alkylketten das chemische und biochemische Verhalten von Molekülen verändern können (KRAVETZ et al., 1991; HOPPER, 1991). Die Tatsache, dass in der Fachliteratur häufig nicht zwischen dem linearen NP-Isomer und den im t-NP vorhandenen, meist stark verzweigten Isomeren unterschieden wird, weist auf eine bedeutsame Wissenslücke der NP-Forschung hin.

Ein zentrales Anliegen dieser Arbeit war daher die Klärung der Frage, ob 4-*n*-NP überhaupt eine geeignete Modellsubstanz für t-NP darstellt. Des Weiteren sollten mögliche Unterschiede aller t-NP-Isomere in Bezug auf das Abbauverhalten untersucht werden. Auf Grund des gehäufteten Auftretens von NP in Kläranlagen (EJLERTSSON et al., 1999; HESSELSON et al. 2001) wurde das Abbauverhalten definierter NP-Isomere speziell in Belebtschlamm systematisch untersucht. Zur Bearbeitung dieser Problemstellung war die Verwendung von ¹⁴C-markierten NP-Isomeren notwendig. Zudem wurde hierdurch wird das Auffinden von Metaboliten ermöglicht, welche nach Aufreinigung näher untersucht werden konnten.

1.2 Struktur und Eigenschaften von Nonylphenol

NP besitzt eine polare, phenolische Hydroxygruppe und einen stark ausgeprägten lipophilen Molekülteil. Der lipophile Charakter des Moleküls wird durch den aromatischen Ring des Phenols und eine daran gebundene aliphatische Nonylkette verursacht (Abbildung 1.1).

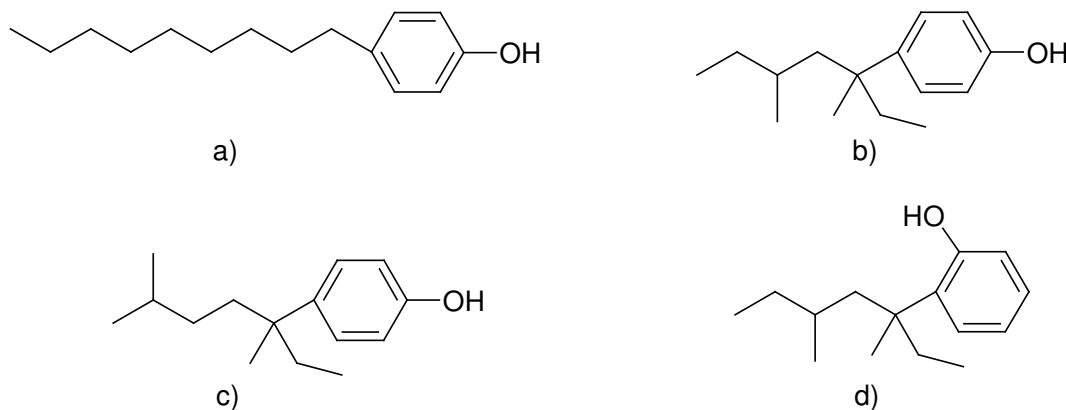


Abbildung 1.1 Chemische Strukturen: a) 4-*n*-Nonylphenol; b) 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol; c) 4-(3',6'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol; d) 2-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol

Technisches NP besteht hauptsächlich aus einer Mischung isomerer *para*-substituierter Phenole mit unterschiedlich verzweigten Nonylseitenketten (in Abhängigkeit vom Produktionsverfahren ca. 80-90%, z. B. Abbildung 1.1 b und c). Weiterer Bestandteil sind entsprechende *ortho*-substituierte Phenole (ca. 5-10%, z. B. Abbildung 1.1 d). Geringe Anteile von dialkylierten Phenolen, monosubstituierten Decylphenolen, des Phenols selbst und Wasser sind als Verunreinigungen anzusehen. Die Entstehung dieser Substanzverteilung im t-NP wird bei Betrachtung des Herstellungsprozesses deutlich.

Der erste Syntheseschritt ist die radikalische Polymerisierung von Propylen und die Abtrennung von entstandenen Trimeren bzw. Nonenen (SUNOCO, 2002). Energetisch begünstigt ist dabei die Bildung von verzweigten Strukturen, wobei theoretisch alle denkbaren Verzweigungsmuster auftreten können. Am unwahrscheinlichsten ist dabei die Bildung des linearen Propyltrimers *n*-Nonen, so dass 4-*n*-NP im technischen Produkt nicht nachweisbar ist.

Nachfolgend werden Phenol und Polypropyltrimere (Nonene) gemäß der Friedel-Crafts-Alkylierung zur Reaktion gebracht. Hierbei werden überwiegend *para*-substituierte Phenole entstehen sowie ein geringerer Anteil von *ortho*-substituierten Produkten. Nebenreaktionen der Friedel-Crafts-Alkylierung sind die Mehrfachalkylierung und die Umlagerung von intermediären Carbenium-Ionen (VOLLHARDT, 1990). Letztere bewirkt eine Erhöhung der Anzahl vorkommender

Nonylphenolisomere im technischen Produkt und führt in diesem Sinne nicht zu unerwünschten Nebenprodukten.

Bei der Erfassung von chemisch-physikalischen Daten des t-NP ist zu beachten, dass die genaue Zusammensetzung bei unterschiedlichen Herstellern variieren kann. Die hier zusammengestellten Angaben beziehen sich im Allgemeinen auf ein t-NP mit einem Gehalt von 85% an *para*-Nonylphenol, welches im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1 Chemische und physikalische Eigenschaften des t-NP

Technisches Nonylphenol	Quellenangabe
Aussehen	Blassgelbe, viskose Flüssigkeit -
Molare Masse	220,34 g/mol (C ₁₅ H ₂₄ O) -
Wasserlöslichkeit ^a	4,92 ± 0,31 [mg/l] (bei 10°C) AHEL & GIGER, 1993 6,35 ± 0,10 [mg/l] (bei 25°C)
Dampfdruck	<<10 [Pa] (bei 20°C) CEPAD Position Paper, 670 [Pa] (bei 150°C) 1999 5,32 x 10 ⁶ [Pa] (bei 199°C)
Siedepunkt	290-300 [°C] CEPAD Position Paper, 1999
Schmelzpunkt	ca. -8 [°C] BUA-Stoffbericht, 1988
Dichte	0,950 [g/cm ³] BRAUER, 1989 0,968 [g/cm ³] FALBE & REGITZ, 1991
Verteilungskoeffizient	4,48 ± 0,12 AHEL & GIGER, 1993
log K _{ow}	4,12 ± 0,10 McLEESE et al., 1981
Säurekonstante (pK _s)	10,28 (geschätzt) DÜRING et al., 2000
Flammpunkt	ca.155 [°C] BUA-Stoffbericht, 1988
Beständigkeit unter Laborbedingungen	stabil RIPPEN, 1998
Henrykonstante	11.02 [Pa m ³ mol ⁻¹] CEPAD Position Paper, 1999
Besondere Gefahren und Sicherheitsratschläge	Xn; R22, C; R34, S36-37-38 CEPAD Position Paper, 1999

^aEs existieren viele weitere Angaben in einem Bereich von 3-3000 mg/l bei 20°C (3 g/l, NP-Produktbeschreibung, Bie&Berntsen A/S).

Einige Eigenschaften des NP lassen sich nicht als direkt messbare Größen charakterisieren, haben aber bei der Untersuchung dieser Substanz in wässrigen Systemen entscheidende Bedeutung. So besitzt NP eine hohe Wasserdampflichkeit, die bei einigen Extraktionsverfahren ausgenutzt wird

(s. 2.5.2). Auch muss der Begriff der Wasserlöslichkeit von NP weiter gefasst und eher vom Verhalten in wässriger Lösung gesprochen werden. Hinweise darauf erhält man durch einen Vergleich stark abweichender Werte für die Wasserlöslichkeit bei Anwendung unterschiedlicher Messverfahren. Zu beachten ist auch, dass der Lösungsvorgang in Wasser einige Tagen dauern kann. Eine zufriedenstellende physikalische Beschreibung dieser Phänomene existiert bislang nicht, die Bildung von Micellen kann allerdings für das Nonylphenolmolekül ausgeschlossen werden (BRIX et al., 2001). In der Laborpraxis müssen zudem die stark adsorptiven Eigenschaften des NP berücksichtigt werden (s. 3.1).

1.3 Verwendung des technischen Nonylphenols

Technisches NP wird als Industriechemikalie nicht direkt verwendet, sondern dient als Zwischenprodukt bei der Herstellung vieler Industriechemikalien. Allein in den USA wurden 2001 128.000 Tonnen t-NP produziert, die jährliche Wachstumsrate liegt konstant bei ca. 2%. Dabei werden ca. 80% für die Produktion von NPEOs verwendet, ca. 10% für die Produktion von TNPP und 10% für eine Vielzahl weiterer chemischer Produkte (SCHNELL, 2001). In Europa hat außerdem die Herstellung von Nonylphenol/Formaldehyd-Harzen große Bedeutung (RPA-FINAL REPORT, 2000). Die Produktion der NPEOs ist für t-NP allerdings weltweit das wichtigste Anwendungsgebiet und deren Verwendung Hauptursache für das Auftreten von NP in der Natur.

Durch die Ethoxylierung des Nonylphenolmoleküls unter Verwendung von Ethylenoxid entstehen unter alkalischen Bedingungen Polyether bzw. NPEOs (Abbildung 1.2). Technische Produkte enthalten in der Regel zwischen 1 und 100 Ethoxygruppen, wobei in Reinigungsmitteln NPEOs mit wenigen Ethoxygruppen dominieren (SCHARF et al., 1994; GÜNTHER et al., 2001).

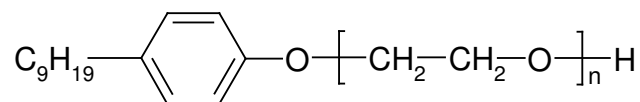


Abbildung 1.2 Allgemeine Struktur von Nonylphenolpolyethoxylaten (n = 1-100)

NPEOs werden bereits seit mehr als 40 Jahren in einer Vielzahl von technischen Prozessen und Reinigungsmitteln eingesetzt (CSERHÁTI, 1995; RUDEL et al., 1998). Sie gelten als besonders kosteneffektiv und im Vergleich zu anderen nichtionischen Tensiden als sehr leistungsstark (SCHNELL, 2001). 1995 wurden weltweit ca. 600.000 Tonnen NPEO produziert (HAGER, 1998).

Anfang der achtziger Jahre galten Alkylphenolpolyethoxylate (APEO) aus ökotoxikologischer Sicht als unbedenklich, da mit den damals üblichen Abbauversuchen (OECD, 1972; DIN-Verfahren 38 409–Teil 23) eine 90%ige Abbaubarkeit von APEOs mit 9-10 Ethylenoxidgruppen nachgewiesen werden konnte. Dieses Verfahren ist jedoch aus heutiger Sicht nicht ausreichend, da nur APEOs mit einer Kettenlänge von mehr als 5 Ethoxylenoxidgruppen erfasst werden (SCHARF et al., 1998). Erst der Nachweis von toxischen und schwer abbaubaren Metaboliten führte Ende der achtziger Jahre in einigen europäischen Ländern zu einer „freiwilligen Selbstverpflichtung der Industrie zum Verzicht auf Alkylphenolethoxylate in Haushaltswasch- und -reinigungsmitteln“, die 1992 auf industrielle Reinigungsmittel und Anwendungen erweitert wurde.

Generell lässt sich feststellen, dass APEOs überwiegend in wässriger Lösung zur Anwendung kommen und häufig ohne spezielle Abwasserreinigung über das Kanalnetz in kommunale Kläranlagen gelangen.

1.4 Nonylphenol und Nonylphenol-enthaltende Substanzen in Kläranlagen und Umwelt

1.4.1 Zusammenhang von Nonylphenol und Nonylphenol-enthaltenden Substanzen

Unter der Bezeichnung „Nonylphenol-enthaltende Substanzen“ werden, wenn nicht gesondert gekennzeichnet, NPEOs und deren Abbauprodukte zusammengefasst. Das Vorkommen bzw. die Bildung von NP in Kläranlagen ist in erster Linie auf den mikrobiellen Abbau der NPEOs zurückzuführen (BUA-STOFFBERICHT, 1988). Der Abbau der höheren Oligomere (NP_nEO , $n \geq 3$) erfolgt zunächst rasch, wobei sich NP_2EO und NP_1EO anreichern (AHEL et al., 1994a). NP_2EO und NP_1EO werden allerdings nur langsam biologisch transformiert und besitzen unter anderem aufgrund ihres lipophileren Charakters eine höhere Toxizität als die Ausgangsverbindungen. In einigen Prozessen der Abwasserbehandlung werden weiterhin die entsprechenden Carbonsäuren (NP_2EC und NP_1EC , Abbildung 1.3) gebildet. Zusammengenommen bewirkt dies bei einer konventionellen Kläranlagenkonfiguration, dass NP-enthaltende Substanzen vor allem als NP_2EO , NP_1EO , NP_2EC und NP_1EC in den Vorfluter eingeleitet werden.

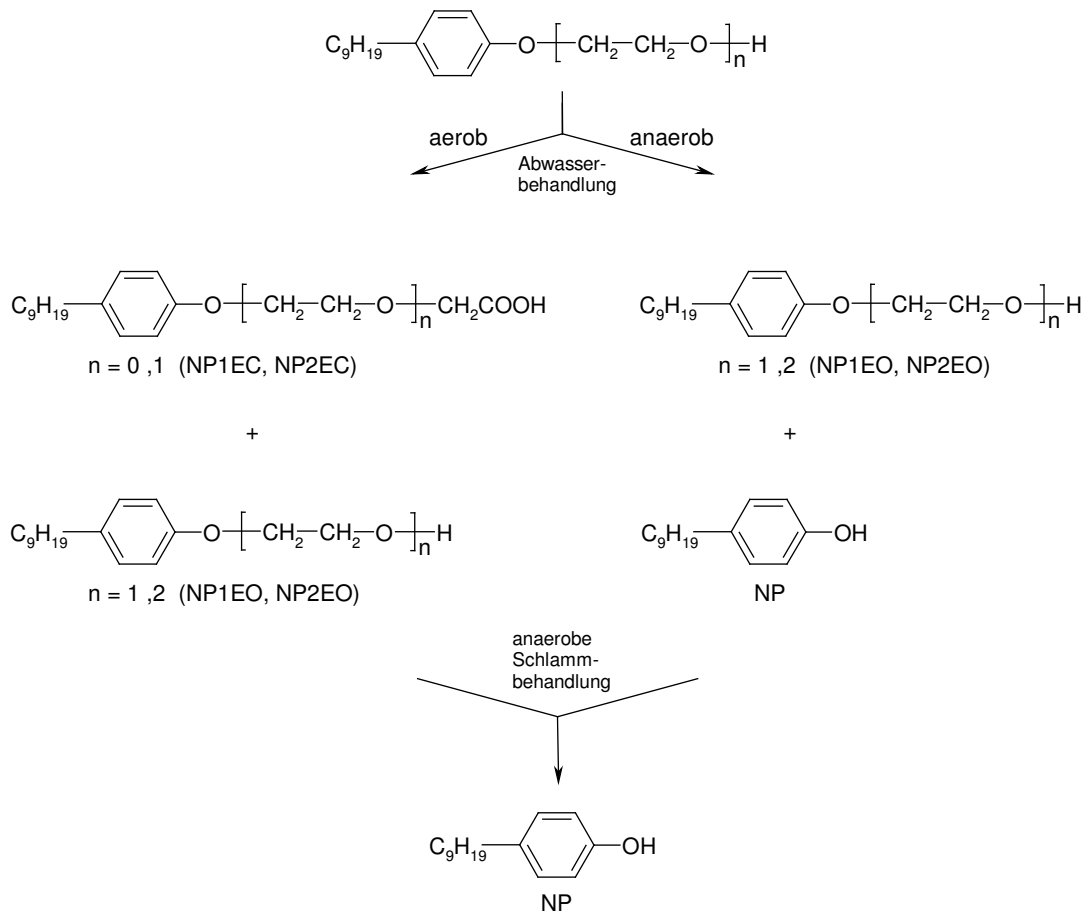


Abbildung 1.3 Aerobe und anaerobe Biotransformationen NP-enthaltender Substanzen während der Abwasserbehandlung und der anaeroben Schlammstabilisierung (RUDLING & SOLYOM, 1974; STEPHANOU & GIGER, 1982; REINHARD et al., 1982; BRÜSCHWEILER et al., 1983, GIGER et al., 1984; AHEL et al., 1987; AHEL, 1987; BALL et al., 1989; AHEL et al., 1994).

Für NP kann wegen der erhöhten Persistenz der Vorläuferverbindungen eine relativ langsame Bildungsrate angenommen werden, verbunden mit einer gleichzeitigen aeroben Abbaubarkeit. Daraus erklärt sich vermutlich der geringe Anteil des NP am gesamten Vorkommen der NP-enthaltenden Substanzen entlang des (aeroben) Wasserpfadens bei der Abwasserreinigung (Abbildung 1.4).

Die erhöhte Lipophilie der NPEO-Metaboliten NP, NP₂EO, NP₁EO, NP₂EC und NP₁EC bewirkt weiterhin eine verstärkte Adsorption an die Schlammpartikel, so dass ein großer Teil dieser Metaboliten über den Überschussschlamm die anaerobe Schlammbehandlung erreichen. Unter anaeroben Bedingungen werden nahezu alle NP-enthaltenden Stoffe mikrobiell zu NP abgebaut, welches bei Abwesenheit von Sauerstoff nicht weiter abgebaut wird (GIGER, 1984; Abbildung 1.3). Es kommt daher während der anaeroben Schlammbehandlung zu einer starken Anreicherung des NP, welches schließlich bis zu 95% der im stabilisierten Schlamm vorkommenden NP-enthaltenden Substanzen ausmacht. Diese Anreicherung entdeckt man auch in anderen belasteten anaeroben Umweltkompartimenten wie z.B. in Sedimenten von

Flüssen und Seen (PETROVIC et al., 2002; YING et al., 2002). Da der anaerob stabilisierte Klärschlamm häufig als Düngemittel auf landwirtschaftlich genutzte Flächen ausgebracht wird, könnten sich dort höhere NP-Konzentrationen als problematisch erweisen.

Festzuhalten bleibt, dass der komplexe Abbau der NPEOs nur in groben Zügen verstanden ist und das Auftreten der Metaboliten je nach Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaften und Umweltbedingungen schwanken kann.

Aufgrund des engen Zusammenhangs zwischen NP und NPEO muss eine vollständige Bilanzierung des Verhaltens von NP unter Einbeziehung der wichtigsten Vorläufermoleküle erstellt werden. Die ausschließliche Betrachtung von NP würde zu falschen Schlussfolgerungen führen, da parallel zum Abbau stets eine Bildung des NP stattfindet. Verdeutlicht wird dies bei Betrachtung der prozentualen Verteilung der NP-enthaltenden Substanzen in verschiedenen Stufen der Abwasserbehandlung (Abbildung 1.4).

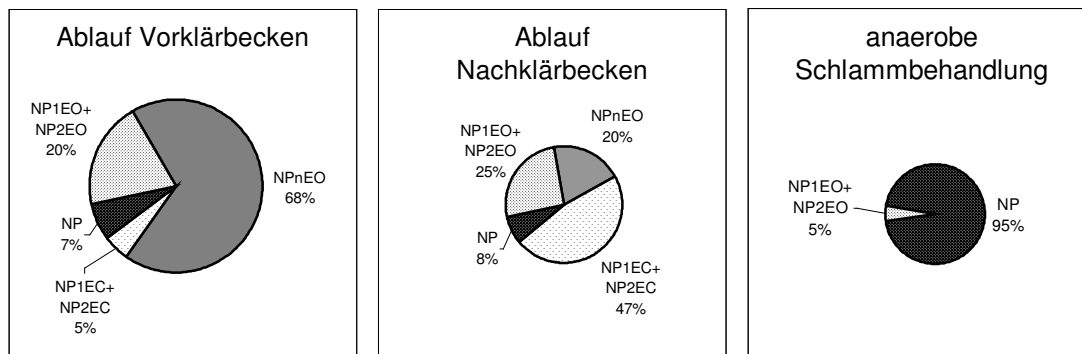


Abbildung 1.4 Durchschnittliche Verteilung NP-enthaltender Substanzen in 11 Kläranlagen des Glatt-Tals, Schweiz (berechnet auf molarer Basis); kleiner werdende Kreisflächen weisen auf den sinkenden Gesamtgehalt hin (GIGER et al., 1986; AHEL et al., 1994a).

Die in der Abbildung gezeigten Daten beruhen auf der bisher einzigen systematischen Bilanzierung NP-enthaltender Substanzen. Diese Untersuchungen erfassen selbstverständlich nicht die bis heute unbekannt Abbauprodukte des NP (GIGER et al. 1986; AHEL et al. 1994a; vgl. 1.6). Für die gesamte Abwasserbehandlung einer konventionellen Kläranlage wird abgeschätzt, dass ca. 60-65% der NP-enthaltenden Stoffe eliminiert werden (unter Berücksichtigung von: NP_nEO ($n = 1-40$), NP_2EC und NP_1EC , NP; berechnet auf molarer Basis). Aus der Kläranlage ausgetragen werden von diesen Stoffen etwa 60% in Form von NP, NP_2EO und NP_1EO . Dieser Zusammenhang wird bei der Berechnung von NP-Eliminationsleistungen in Kläranlagen nur selten berücksichtigt.

Der Nachweis von NP aus Abwässern der Papierindustrie (SCHARF et al., 1998) wie auch die Absonderung von NP aus Kunststoffprodukten (McNEAL et al., 2000) weisen auf weitere Quellen für NP in der Umwelt hin. Zur Zeit fehlen jedoch systematische Untersuchungen, die das Ausmaß dieses Austrags abschätzen.

1.4.2 Vorkommen von NP und NP-enthaltenden Substanzen

Es ist bislang nicht möglich, das Vorkommen von NP und NP-enthaltenden Chemikalien in der Umwelt vollständig zu beschreiben. Die stark variierenden Daten sind bis heute eher fragmentarisch und konzentrieren sich auf bestimmte Umweltkompartimente wie Kläranlagen oder Oberflächengewässer, welche als Vorfluter von Kläranlagen genutzt werden. Auch bezüglich der Vergleichbarkeit dieser Daten ist eine kritische Betrachtung angebracht, da keine einheitlichen Analyseverfahren angewendet werden (LEE, 1999; THIELE et al., 1997). Aus diesen Gründen wird auf eine ausführliche Sammlung von Einzeldaten verzichtet. Die meisten der in diesem Kapitel dargestellten Daten stammen aus den detaillierten Forschungsarbeiten der Gruppe um Ahel und Giger (1984-1996).

Messungen in 11 schweizer Kläranlagen ergaben folgende tabellarisch dargestellten Konzentrationsbereiche im Ablauf des Vor- und Nachklärbeckens (Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2 Vorkommen von NP und NP-enthaltenden Substanzen in den Abläufen des Vor- und Nachklärbeckens von 11 Kläranlagen des Glatt-Tals (Schweiz) (AHEL et al., 1994a).

Substanzen	Konzentrationsbereich [$\mu\text{mol}/\text{m}^3$]
Ablauf des Vorklärbeckens	
NP _n EO, n = 3-20	1310-3220
NP ₁ EO + NP ₂ EO	310-840
NP ₁ EC + NP ₂ EC	80-270
NP	110-430
Summe	2330-4050
Ablauf des Nachklärbeckens	
NP _n EO, n = 3-20	110-640
NP ₁ EO + NP ₂ EO	10-760
NP ₁ EC + NP ₂ EC	290-930
NP	10-200
Summe	660-2150

Ein Vergleich der einzelnen Konzentrationen von NPEOs mit definierter Kettenlänge im Ablauf des Vor- und Nachklärbeckens zeigt den schnellen Abbau der höheren NP_nEO-Oligomere ($n > 3$), während NP₁EO und NP₂EO angereichert werden (AHEL et al., 1994a). In anaerob stabilisierten Klärschlämmen wurden NP-Konzentrationen von 450-2500 mg/kg TS ermittelt, in Belebtschlamm 90-150 mg/kg TS (BUA-Stoffbericht, 1988; GIGER et al., 1984).

Deutliche Konzentrationsunterschiede entstehen durch zeitlich bedingte Schwankungen des Eintrags NP-enthaltender Substanzen in die Kläranlage sowie

durch variierende jahreszeitliche Abbauleistungen. So werden NPEOs im Winter wesentlich schlechter abgebaut als im Sommer (MANN & REID, 1971; AHEL et al., 2000). Der Eintrag NP-enthaltender Substanzen innerhalb einer Woche nimmt samstags und sonntags in näherungsweise Übereinstimmung mit dem DOC-Gehalt etwa auf die Hälfte ab; innerhalb des Tages ist der Eintrag außerdem in den Morgenstunden signifikant geringer als zwischen 12-16 Uhr (AHEL et al., 1994). Die Belastungen einzelner Kläranlagen durch NP und NP-enthaltende Substanzen hängen des weiteren stark von den angeschlossenen Einleitern ab und dürfen somit nicht als generelles Problem aller Kläranlagen ausgelegt werden.

Bei isolierter Betrachtung von NP-Massenströmen des Influent und Effluent wird meist eine effektive Eliminationsleistung für Kläranlagen dokumentiert. Bezieht man hingegen den anaerob stabilisierten Klärschlamm in die Massenbilanz mit ein, erhält man eine Vervielfachung der NP-Austragsmenge bezogen auf den Influent (KÖRNER et al., 2000; AHEL et al., 1994).

In unmittelbarer Nähe des Kläranlagenablaufes lässt sich nach wenigen Metern (2-10 m) eine starke Abnahme der Konzentrationen von NP, NP₁EO und NP₂EO auf etwa 5-10% feststellen, wobei die weitere Konzentrationsabnahme sehr viel langsamer verläuft und selbst nach 100 m nahezu konstant bleibt (AHEL et al., 1994b; AHEL et al., 1996). So werden in der Nähe von dicht besiedelten Gebieten in Oberflächengewässern häufig NP-Konzentrationen von > 1µg/l gemessen, während abseits von Ballungsgebieten NP meist nicht nachgewiesen werden kann (BENNIE et al., 1997; NAYLOR et al., 1992; BENNET & METCALFE, 2000). Dies kann dazu führen, dass NP auch in Trinkwasser, welches aus Ballungsgebieten stammt, gefunden wird (AHEL et al., 1996). Auch in der Luft lässt sich an einigen Orten NP nachweisen (RUDEL et al., 2001).

1.5 Nonylphenol als hormonähnlich wirkender Stoff

Hormonähnlich wirkende Stoffe können an verschiedenen Punkten der Wirkungskaskade von endogenen Hormonen Effekte auslösen. Diese Wirkungen stellen isoliert betrachtet noch keine Schädigung für einen Organismus dar, können jedoch als Vorstufe zu pathologischen Effekten interpretiert werden. Die möglichen resultierenden Schädigungen sind dabei vielfältig und werden mit Krebs, Fertilitätsstörungen, Stoffwechselstörungen, Wirkungen auf das zentrale Nervensystem oder das Immunsystem in Verbindung gebracht (SETAC, 2000; MACZKA, et al., 2000; GUILLETTE & GUNDERSON, 2001).

Im Falle des NP werden dabei meist Effekte beobachtet, die auch durch die endokrine Hormongruppe der Östrogene hervorgerufen werden. Daher wird NP auch als 'endokriner Disruptor' oder 'endokriner Modulator' bezeichnet. Aufgrund des

Wirkungsmechanismus (Ligand-Östrogenrezeptor-Interaktion) sind die hervorgerufenen Effekte häufig reversibel (WITORSCH, 2000).

Die östrogenen Eigenschaften von *para*-alkylierten phenolischen Substanzen wurden 1938 entdeckt (DODDS et al., 1938; DODDS & LAWSON, 1938), während die erste durch Östrogene verursachte Wirkung bereits 1923 beobachtet wurde (ALLEN & DOISY, 1923). 1978 wurde über die Fähigkeit *para*-alkylierter Phenole berichtet, Östradiol vom Östrogenrezeptor zu verdrängen bzw. zu ersetzen (MUELLER & KIM, 1978). Die zufällige Entdeckung, dass NP in der Lage ist den Progesteronrezeptor und eine verstärkte Zellteilung von MCF-7-Brustkrebszellen zu induzieren (SOTO et al., 1991), bewirkte ein verstärktes Interesse an dieser Substanz und dessen potentieller hormoneller Wirkung.

Für die Beurteilung der oben genannten pathologischen Effekte wird eine Vielzahl an Parametern verwendet. Die Auswahl der Parameter richtet sich dabei u. a. nach der untersuchten Organismenart (Tabelle 1.3). Zudem wird berücksichtigt, dass Stoffe mit reversibler Wirkung bestimmte Wirkschwellen besitzen, z. B. unterhalb derer keine toxischen Wirkungen beobachtet werden (NOEC).

Auf den NP-Gehalt im Ablauf von englischen Kläranlagen wurde die Erhöhung des Vitellogeninplasmaspiegels dort gehaltener männlicher Regenbogenforellen zurückgeführt (BLACKBURNE & WALDOCK, 1995; HARRIES et al., 1996; HARRIES et al., 1997). Diese Untersuchungen wurden häufig als direkter Nachweis für das Schädigungspotenzial von NP herangezogen. Die Entwicklung und Anwendung einer biotestgestützten Fraktionierung und Analyse ergab hingegen, dass die nachgewiesenen östrogenen Effekte auf die ebenfalls vorhandenen Steroidhormone 17 β -Östradiol, Östron und 17 α -Ethinylöstradiol zurückgeführt werden könnten.

Tabelle 1.3 Ausgewählte Toxizitätsparameter von NP bei aquatischen Organismen.

Art	Parameter	Versuchsbedingungen	Quelle
Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	EC ₀ = < 1 μ g/l	22 d, Wachstum	ASHFIELD et al., 1998
Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	EC ₀ = < 30 μ g/l	22 d, ovosomatischer Index	ASHFIELD et al., 1998
Regenbogenforelle (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	LOEC = 10,3 μ g/l	90 d	KAHL et al., 1997
Jap. Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	LOEC = 17,7 μ g/l	60 d, Embryonalentwicklung, Reproduktion, u.a.	YOKOTA et al., 2001

Art	Parameter	Versuchsbedingungen	Quelle
Jap. Medaka (<i>Oryzias latipes</i>)	NOEC = 8,2 µg/l	60 d, Embryonalentwicklung, Reproduktion, u.a.	YOKOTA et al., 2001
Karpfen (<i>Cyprinus carpio</i>)	NOEC = 1-5 µg/l	70 d, hämatologische und histopathologische Parameter	SCHWAIGER et al., 2000
Flagellaten (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)	EC ₅₅ = 0,5 mg/l	1 h, Photosynthese	BUA-Stoffbericht 13, 1988

Bei Pflanzen und Säugetieren sind Bestimmungen solcher Parameter für NP kaum durchgeführt worden und können aufgrund der Versuchsbedingungen schlecht mit denen aquatischer Organismen verglichen werden. Beispielhaft sei der Kopfsalat (*Lactuca sativa*) mit einer EC₅₀ = 0,1-0,32 mg/l (16-21 d, Wachstum in Nährlösung; HULZEBOS et al., 1993) und die Ratte mit einem NOAEL = 50 mg/kg•Tag (90 d, CUNNY et al., 1997) genannt.

Die bislang einzige NP-Studie mit menschlichen Probanden beschreibt das pharmakokinetische Verhalten von NP. Nach einmaliger oraler (5 mg NP) bzw. intravenöser (1 mg NP) Dosis wurde dabei eine schnelle exponentielle Konzentrationsabnahme im Blut (Halbwertszeit: 2-3 h) der beiden Versuchspersonen gemessen (MÜLLER et al., 1998).

Eine Untersuchungsalternative stellt die Verwendung von Zellkulturen dar, z. B. kann bei Verwendung menschlicher Brustkrebszellen der Zelllinie MCF₇ die östrogene Potenz einer Probe bestimmt werden (E-screen). Diese Zelllinie reagiert auf östrogen wirksame Stoffe mit beschleunigter Zellvermehrung (SOTO et al., 1991; SOULE et al., 1973). Für NP wurde mittels dieses E-screens eine relative östrogene Potenz (genormt auf Östradiol) von **0,00003** ermittelt (SONNENSCHNEIN et al., 1995). Ebenfalls eingesetzt werden genetisch veränderte, östrogensensitive Hefezellen (rekombinante *Saccharomyces cerevisiae*). Dieses Testsystem liefert für NP einen Wert für die relative östrogene Potenz von ca. **0,0002** (GAIDO et al., 1997; TANGHE et al., 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die östrogene Wirksamkeit von NP und 17β-Östradiol im Wachstumsmedium durch die Zugabe von Huminsäuren (150mg/l) verringert wird (TANGHE et al., 1998).

Über die Nahrungsmittel wird für den Normalverbraucher in Deutschland eine NP-Aufnahme von 7,5 µg/Tag abgeschätzt (GÜNTHER et al., 2002). Setzt man diesen Wert in Relation zur Aufnahme von östrogen aktiven Arzneimitteln (z. B. Kontrazeptiva), Pflanzeninhaltsstoffen oder sogar körpereigenen Hormonen, ist eine Schädigung des östrogenen Hormonhaushaltes durch NP für den Menschen als gering einzustufen (REHBINDER et al., 1999; WEGENER, 2001). Allerdings können andere

Schädigungsmechanismen nicht ausgeschlossen werden, auch besteht die Möglichkeit der additiven Wirkung mit anderen Xenoöstrogenen.

Rechtlich gilt das durch Art. 20a GG verfassungsrechtlich verankerte Vorsorgeprinzip, welches besagt, dass der Staat schon dann zum Handeln aufgerufen ist, „[...] wenn Schadensmöglichkeiten gegeben sind, die sich nur deshalb nicht ausschließen lassen, weil nach dem derzeitigen Wissensstand bestimmte Ursachenzusammenhänge weder bejaht noch verneint werden können [...]“. In diesem Kontext sind aktuelle Bestrebungen der EU zu sehen, die Verwendung von NP und NP-enthaltenden Substanzen einzuschränken (EG-Beschränkungsrichtlinie, 2002).

1.6 Metabolismus von Nonylphenol

NP wird im Allgemeinen als ein NPEO-Metabolit beschrieben, welcher stark persistiert (Maguire, 1999). Weitergehende Untersuchungen, die das Abbauverhalten von NP beschreiben, sind bislang selten. Der Metabolismusweg ist vollständig unbekannt. Dennoch sind einige Teilaspekte des mikrobiellen Abbaus von NP untersucht worden, z. B. Abbaukinetik, Temperaturabhängigkeit, Sauerstoffabhängigkeit, Isolierung NP-abbauender Mikroorganismen. Uneinheitlich ist dabei die Verwendung der NP-Referenzsubstanz im Hinblick auf die unterschiedlichen NP-Isomere. Häufig wird das käufliche lineare NP-Isomer 4-*n*-NP als Modellsubstanz eingesetzt.

1.6.1 Allgemeine Aspekte des NP-Abbaus

Nach der OECD-Methode 301B (Sturm Test DIN EN 29439) ist die Bestimmung der aeroben Abbaubarkeit einer nicht flüchtigen, wasserlöslichen Substanz standardisiert. In diesen Experimenten wird für t-NP nach 28 Tagen eine Mineralisierung von 53 % gemessen (WILLIAMSON & VARINEAU, 1996). Weitere Untersuchungen mit diesem Testsystem ergaben für t-NP nach 35 Tagen eine Mineralisation von 48 % (STAPLES et al., 2001). Demzufolge wird NP als 'schwer abbaubar' eingestuft.

Um den Abbau von NP in der Kläranlage nachzuvollziehen, muss vor allem die Verfügbarkeit von Sauerstoff in den unterschiedlichen Stufen der Abwasserbehandlung berücksichtigt werden. Ebenfalls beeinflusst die Temperatur oder der Zustand des Klärschlammes das Abbauverhalten von NP und NP-enthaltenden Substanzen (TANGHE et al., 1998; s. 1.4.2). Unter den Bedingungen, wie sie bei der anaeroben Schlammbehandlung zu finden sind, wird NP praktisch nicht abgebaut (EJLERTSSON et al., 1999; GIGER et al., 1984). Dabei scheint das Vorhandensein von Sauerstoff oft in direktem Zusammenhang mit der Geschwindigkeit des NP-

Abbaus zu stehen (HESSELSOE et al. 2001). Andere NP-enthaltende Substanzen werden unter anaeroben Bedingungen bis zur Stufe des NP transformiert, so dass sich NP im anaerob stabilisierten Klärschlamm anreichert (s. 1.4.1). Aufgrund der Verwendung des stabilisierten Klärschlammes als Düngemittel wurde das weitere Schicksal des NP in landwirtschaftlichen Böden untersucht. Auch hier zeigte sich als wesentliches Ergebnis, dass eine gute Sauerstoffversorgung den Abbau des NP fördert und sauerstoffarme Umgebungen einen schlechten Abbau von NP zur Folge haben. NP-abbauende Bodenorganismen scheinen ubiquitär vorhanden zu sein und benötigen keine vorherige Adaption (TOPP & STARRETT, 2000; HESSELSOE et al. 2001).

Bezüglich der Temperaturabhängigkeit wird für NP in Belebtschlamm bei $28 \pm 2^\circ\text{C}$ eine gute Abbaubarkeit gemessen, welche sich bei $10-15^\circ\text{C}$ drastisch verschlechtert (TANGHE et al., 1998). Weiterhin wird im Winter bei allen NP-enthaltenden Substanzen eine langsamere Biotransformation beobachtet, so dass in der Nähe und innerhalb von Kläranlagenabläufen ca. 10-fach höhere Konzentrationen an NP₁EO als in den Sommermonaten vorkommen können. (AHEL et al., 2000).

Ebenfalls wurden Teilaspekte des metabolischen Verhaltens von NP in einigen Pflanzen und Tieren sowie im Menschen untersucht. In Pflanzen-Suspensionskulturen konnten Konjugate von 4-*n*-Nonylphenol-Metaboliten nachgewiesen werden, welche eine mono- oder dihydroxylierte Seitenkette aufwiesen (SCHMIDT et al., 2003; BOKERN et al., 1996; BOKERN & HARMS, 1997). Beim Menschen wurden nach oraler Aufnahme von ^{13}C -markiertem t-NP 10% als Ausgangssubstanz oder als einfaches Konjugat im Kot und Urin wiedergefunden (MÜLLER et al., 1998).

Aromatische Verbindungen, welche der Sonneneinstrahlung ausgesetzt sind (Luft, Oberflächengewässer), können weiterhin photolytisch über radikalische und oxidative Prozesse abgebaut werden. (PALM, 2002; FIEDLER et al., 1994). Es existieren sogar Ansätze, diese Mechanismen bei der Eliminierung von NP und NP-enthaltenden Substanzen in der Kläranlage auszunutzen (IKE et al., 2002).

1.6.2 Strukturchemische Aspekte des NP-Abbaus

Interessant ist ein Vergleich der Abbaubarkeit von NP mit derjenigen von Alkoholpolyethoxylaten (APE), welche aufgrund ihrer insgesamt besseren Abbaubarkeit als Ersatzsubstanz für NPEOs gehandelt werden (AHEL et al., 1994). Sie besitzen statt des Nonylphenolrestes einen langkettigen Alkylalkoholrest als lipophilen Molekülteil. APEs mit linearer Alkylkette werden schnell und vollständig abgebaut, während verzweigte APEs sehr viel schlechter von Organismen transformiert werden können (KRAVETZ et al., 1991). Ein ähnlicher Zusammenhang existiert auch beim Abbau von verzweigten Fettsäuren. Fettsäuren mit quarternärem

Kohlenstoffatom werden anaerob nicht abgebaut, wobei tertiäre Verzweigungen, die den β -Oxidationsmechanismus stören, den Abbau erschweren (SIN & CHUA, 2000). Es kann generell davon ausgegangen werden, dass verzweigte Alkane in Bezug auf den Abbau persistenter sind und insbesondere terminale anteo- (Abbildung 1.5) und quaternäre Verbindungen zu sterischen Hinderungen der am Abbau beteiligten Oxidasen führen (SCHAEFFER et al. 1979; BRITTON 1984).



Abbildung 1.5 Strukturbeispiele einer terminalen iso- und anteiso-Verzweigung von Alkylverbindungen.

Die Isomere des t-NP sind ebenfalls stark verzweigt und besitzen zum größten Teil quaternäre Kohlenstoffatome (vorwiegend in α -Position, Abbildung 1.1), so dass dieses Strukturmerkmal ein Grund für die erhöhte Persistenz darstellen könnte.

Der biologische Abbau eines aromatischen Rings bedingt dessen Spaltung nach vorheriger Aktivierung, welche durch Insertion von Hydroxygruppen erreicht wird. Der aktivierte Aromat muss dabei mindestens zwei Hydroxygruppen in *ortho*- oder *para*-Stellung besitzen. Enzymatisch wird die Insertion durch Di- oder im Falle phenolischer Substrate durch Monooxygenasen durchgeführt. Bei mikrobiellen Monooxygenasen handelt es sich gewöhnlich um Flavoproteine, die ein Atom des molekularen Sauerstoffs in den Phenolring einfügen (HOPPER, 1991). Die nachfolgende *ortho*- bzw. *meta*- Ringspaltung erfolgt bei den bekannten Abbauwegen wiederum unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff durch Dioxygenasen (BAYLY und BARBOR, 1984, DAGLEY, 1989). Der gewöhnliche Katabolismus von phenolischen Verbindungen benötigt also mindestens an zwei Stellen molekularen Sauerstoff, welcher unter anaeroben Bedingungen nicht zur Verfügung steht.

1.6.3 Abbau von NP durch spezifische Mikroorganismen

Die Betrachtung des Abbaus einer Substanz durch isolierte Mikroorganismen liefert oft wertvolle Hinweise auf den Metabolismus in der Natur. Bei der Isolierung NP-abbauender Mikroorganismen nutzt man die Fähigkeit bestimmter Hefe- oder Bakterienstämme, auf NP als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen zu können.

Der Hefestamm *Candida aquatextoris* metabolisiert 4-*n*-NP hauptsächlich zu *trans*-4-Hydroxy-Zimtsäure und 4-Hydroxy-Acetophenon, wobei 4-Hydroxy-Acetophenon

akkumuliert und nicht weiter abgebaut wird. Es wird vermutet, dass der Abbau der Alkylkette, wie auch bei der Regenbogenforelle, mit terminaler Hydroxylierung beginnt und anschließend über den β -Oxidationsmechanismus verläuft (VALLINI et al., 2001; THIBAUT et al., 1998; THIBAUT et al., 1999; VAN GINKEL & KROON, 1993).

Aus Belebtschlamm wurde ein *Sphingomonas* sp.-Stamm (*Sphingomonas* TTNP3) isoliert, welcher auf verzweigtem (technischem-) NP als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen konnte. *Para*-NP-Isomere wurden dabei durch diesen Stamm besser abgebaut als *ortho*-NP-Isomere (TANGHE et al., 1999). In nachfolgenden Untersuchungen des Abbaus von 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol durch *Sphingomonas* TTNP3 konnte darüber hinaus 3,5-Dimethyl-3-heptanol als Metabolit nachgewiesen werden (CORVINI et al., 2004).

Ebenfalls aus Belebtschlamm wurde der erstmalig dokumentierte Bakterienstamm *Sphingomonas cloacae* isoliert, welcher in der Lage ist t-NP abzubauen. Auch hier ist das Auftreten von Metaboliten im Nährmedium zu beobachten, welche durch massenspektroskopische Analysen unter Verwendung von Datenbanken als verzweigte Nonanole beschrieben wurden. Auffällig ist die Anzahl von 22 GC- γ -Nonanol'-Peaks, da dies nach heutigem Kenntnisstand der Anzahl der nachweisbaren *para*-NP-Isomeren des t-NP entspricht (s. 1.7). Der Datenbankvergleich gibt Hinweise darauf, dass es sich bei diesen Metaboliten um Nonanole mit unverändertem Verzweigungsmuster der Alkylkette im Vergleich zum eingesetzten t-NP-Isomerengemisch handeln könnte (FUJII et al., 2000, 2001).

1.7 Isomerenspezifische Betrachtung des technischen Nonylphenols

Die bislang beste strukturelle Analyse des t-NP gelang mittels GC/MS unter Verwendung einer speziellen Kapillarsäule mit über 400.000 Trennstufen (BHATT et al., 1992, WHEELER et al., 1997). Dabei wurde, unter Ausnutzung geringfügiger Unterschiede der Siedepunkte (MORRISON & BOYD, 1980), eine Auflösung der *para*-Isomere des t-NP in 18 Peaks erreicht. Durch Variation der GC-Temperaturprogramme und genaue Analyse (selected ion monitoring) coelulierender Peaks konnten insgesamt 22 *para*-NP Isomere unterschieden werden.

Die Detektion durch Massenspektroskopie erlaubt allerdings keine eindeutige Identifizierung der chemischen Struktur. Auch durch den Vergleich mit Massenspektren aus Datenbanken lassen sich für diese Problemstellung keine eindeutigen Ergebnisse erzielen, da die Massenspektren einiger Peaks nahezu identische Spektren aufweisen und keine Referenzspektren für alle möglichen Isomere existieren. Erst ein direkter Vergleich mit Referenzsubstanzen lässt durch Kombination von Retentionszeit und Massenspektrum relativ sichere Aussagen zu, wobei eine exakte Strukturangabe nur in Verbindung mit NMR-Spektren möglich ist.

Immerhin wurden aufgrund des massenspektrometrischen Zerfallmusters einige Strukturmerkmale der 22 Isomere identifiziert, die sich auf die Verzweigungen der α - und β -Kohlenstoffatome der Alkylkette beziehen. Die Isomere können dabei in fünf Gruppen unterteilt werden (Tabelle 1.4).

Tabelle 1.4 Fünf Isomerengruppen der para-Isomere des t-NP und deren quantitativer Anteil bezogen auf 22 separierte para-Isomerensignale (WHEELER et al., 1997).

Isomerengruppe	Anzahl unterschiedlicher Isomere	Relativer Anteil dieser Gruppe an der Gesamtheit der para-Isomere ^a
α -dimethyl	10	48,6 %
α -methyl, α -ethyl, β -primary	4	24,7 %
α -methyl, β -methyl	3	8,9 %
α -methyl	2	6,6 %
α -methyl, α -propyl	3	11,2 %
<i>Summe</i>	22	100 %

^a Die Quantifizierung erfolgte über GC-FID, da bei isomeren Verbindungen das Verhältnis von Signal zur Substanzmenge näherungsweise als konstant betrachtet werden kann (GROB, 1985).

Das Problem der Strukturaufklärung der Isomere ist also noch nicht vollständig gelöst, vor allem fehlt es an Methoden, die einzelnen Isomere in ausreichender Menge aus dem Gemisch zu isolieren. Ein vielversprechender Ansatz gelang hier durch wiederholte Fraktionierung des t-NP mittels HPLC. Durch diese HPLC-Technik ließen sich ausreichende Mengen sauberer Einzelisomere gewinnen, um NMR-Analysen durchzuführen. Allerdings konnten so lediglich sieben Isomere strukturell aufgeklärt werden (KIM et al., 2004).

Bezüglich des Abbaus unterschiedlicher Isomere scheinen nach bisherigen Erkenntnissen keine Unterschiede zu bestehen, wobei die Analytik meist nicht auf die Isomerenproblematik hin optimiert wurde (TANGHE et al., 1999; TOPP und STARETT, 2000; Fujii, 2000). Hingegen werden aufgrund berechneter Verteilungskoeffizienten unterschiedliche Biokonzentrationsfaktoren für einzelne para-Isomere vorhergesagt (GUNDERSEN, 2001). In Muscheln (*Elliptio complanata*) wurde bereits eine von t-NP abweichende Isomerenverteilung nachgewiesen (BENNET & METCALFE, 2000).

1.8 Ziele der Arbeit

Zunächst sollte eine chemische Analysemethode für NP und Bisphenol A (BPA) entwickelt werden, um diese Substanzen in wässrigen Systemen gleichzeitig quantifizieren zu können. Weiterhin sollte das adsorptive Verhalten von NP und BPA an Standardmaterialien, welche im Labor oder in Modellkläranlagen Verwendung finden, untersucht werden.

Ein weitere Anforderung war die Synthese von radioaktiv markierten Nonylphenolisomeren, welche in anschließenden Versuchen eingesetzt werden sollten. Nachfolgend sollte das Verhalten von definierten Nonylphenolisomeren in Belebtschlamm untersucht werden. Dabei war ein Vergleich des linearen Isomers 4-*n*-NP mit dem im t-NP vorkommenden, stark verzweigten Isomer 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol vorgesehen. Geplant waren hierbei bilanzierende Metabolismusexperimente, in denen das Schicksal der jeweiligen ¹⁴C-markierten Nonylphenolisomere in Belebtschlammansätzen untersucht wird. In weiterführenden Versuchen sollte nach Etablierung spezieller Analysemethoden das Abbauverhalten aller *para*-Isomere in Belebtschlamm aufgeklärt werden.

Schließlich sollten durch Isolierung und Strukturuntersuchung eines Nonylphenolmetaboliten erste Informationen über den mikrobiellen Abbauweg des Nonylphenols gewonnen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

3,5-Dimethyl-3-heptanol, threo und erythro	ABCR, Karlsruhe
3,6-Dimethyl-3-heptanol	ABCR, Karlsruhe
4-Hydroxyacetophenon	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
4-Methylbrenzcatechin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
4- <i>n</i> -Nonylphenol PESTANAL [®]	Riedel-deHaën, Seelze
4-Nonylphenol, techn.	FLUKA, Deisenhofen
4- <i>tert</i> -Butylbrenzcatechin	FLUKA, Deisenhofen
5-(Dimethylamino)-naphtalin-1-sulfonylchlorid (Dansylchlorid)	Merck Eurolab, Darmstadt
Bisphenol A (2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propan)	PROMOCHEM, Wesel
Szintillationscocktails : Carbomax [®] LumaSafe LumaSafe Plus	Packard Bioscience, Dreieich LUMAC LSC, Groningen (Niederlande) LUMAC LSC, Groningen (Niederlande)
Lösungsmittel	Technische Produkte, 1 x destilliert
Lösungsmittel für die HPLC: Methanol Acetonitril ROTISOLV [®]	ROTH Chemie GmbH, Karlsruhe ROTH Chemie GmbH, Karlsruhe
N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA)	FLUKA, Deisenhofen
Natronkalk, Körnchen ohne Indikator	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natronkalk, Plätzchen mit Indikator	Merck Eurolab, Darmstadt
Silikonentschäumer	Roth Chemie GmbH, Karlsruhe
Deuteriochloroform	WILMAD-LABGLASS, Buena (USA)
Tetramethylsilan	WILMAD-LABGLASS, Buena (USA)
Phenol	Merck Eurolab, Darmstadt
Bortrifluorid in Diethylether	Merck Eurolab, Darmstadt

2.2 Radiochemikalien

[¹⁴ C(U)]-4-(3',6'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol Reinheitsgrad >99%, Spezifische Aktivität 0,2986 GBq/mmol	synthetisiert nach VINKEN et al., 2002
[¹⁴ C(U)]-4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol Reinheitsgrad >98%, Spezifische Aktivität 0,2986 GBq/mmol	synthetisiert nach VINKEN et al., 2002
[¹⁴ C(U)]-4- <i>n</i> -Nonylphenol Reinheitsgrad >98%; Spezifische Aktivität 1,0804 GBq/mmol	Hartmann Analytic, Braunschweig
[¹⁴ C(U)]-Bisphenol A Reinheitsgrad >99%; Spezifische Aktivität 1,0804 GBq/mmol	Hartmann Analytic, Braunschweig
[¹⁴ C(U)]-Phenol Reinheitsgrad >95%; Spezifische Aktivität 2,701 GBq/mmol	Moravek Biochemicals, Inc., Brea (USA)
Oxidizer-Standardlösung (SPEC-CHEC™)	Packard, Böblingen

2.3 Nährmedien

NB-Medium (Standard Nährbouillon)	25 g/l , Merck Eurolab, Darmstadt																		
MM-Minimalmedium:	<table> <tr> <td>K₂HPO₄</td> <td>1,6 g/l</td> </tr> <tr> <td>KH₂PO₄</td> <td>0,4 g/l</td> </tr> <tr> <td>KNO₃</td> <td>1 g/l</td> </tr> <tr> <td>MgSO₄·H₂O</td> <td>0,2 g/l</td> </tr> <tr> <td>CaCl₂·H₂O</td> <td>0,1 g/l</td> </tr> <tr> <td>NaCl</td> <td>0,1 g/l</td> </tr> <tr> <td>FeCl₃·H₂O</td> <td>0,01 g/l</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Spurenelementlösung 1 ml/l (PFENNIG & LIPPERT, 1966)</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Vitaminlösung 0,1 ml/l (KIRK et al., 1978)</td> </tr> </table>	K ₂ HPO ₄	1,6 g/l	KH ₂ PO ₄	0,4 g/l	KNO ₃	1 g/l	MgSO ₄ ·H ₂ O	0,2 g/l	CaCl ₂ ·H ₂ O	0,1 g/l	NaCl	0,1 g/l	FeCl ₃ ·H ₂ O	0,01 g/l	Spurenelementlösung 1 ml/l (PFENNIG & LIPPERT, 1966)		Vitaminlösung 0,1 ml/l (KIRK et al., 1978)	
K ₂ HPO ₄	1,6 g/l																		
KH ₂ PO ₄	0,4 g/l																		
KNO ₃	1 g/l																		
MgSO ₄ ·H ₂ O	0,2 g/l																		
CaCl ₂ ·H ₂ O	0,1 g/l																		
NaCl	0,1 g/l																		
FeCl ₃ ·H ₂ O	0,01 g/l																		
Spurenelementlösung 1 ml/l (PFENNIG & LIPPERT, 1966)																			
Vitaminlösung 0,1 ml/l (KIRK et al., 1978)																			

2.4 Geräte und Apparaturen

Wasserdampfdestillationsapparatur	nach: Sturm
Bleidner-Extraktionsapparatur	nach: Bleidner et al., 1954; DFG, 1989
DC-Auftragsmaschine	LINOMAT IV, CAMAG, Berlin
Fluoreszenzlampe	254 nm und 366 nm, CAMAG, Berlin
Gefriertrocknungsanlage	CHRIST, ALPHA 1-2, B. Braun Biotech International, Melsungen
DC-Scanner	Flexible Format Multisample Counter, Tracemaster 40, BERTHOLD, Wildbad
Liquid Scintillation Counter	LS-5000.TD, BECKMAN, München
Verbrennungsautomat	Biological Oxidizer OX 500, R. J. Harvey Instrument Corporation/Zinsser
HPLC System 1: Pumpensystem HPLC-Säule UV-VIS-Detektor Radiodetektor Software	System Gold Programmable Solvent Module 126, BECKMAN CC 250/4 NUCLEOSIL 100-5 C18 HD, Macherey&Nagel, Düren System Gold Diode Array Detector 168 Module (Durchflusszelle 11 µl, 10 mm), BECKMAN 171 Radioisotope Detector, BECKMAN Gold Chromatography Data System, Vers.1.6, BECKMAN
HPLC System 2: Pumpensystem HPLC-Säule Fluoreszenzdetektor	System Gold Programmable Solvent Module 126, BECKMAN ET 250/4 Nucleosil 100-5 C ₁₈ -Säule, Macherey&Nagel, Düren Shimadzu RF-551 Spectrofluorometric Detector, Duisburg
GC System 1: Gaschromatograph und Detektor GC-Kapillarsäule Software	6890 Series Hewlett Packard GC System FID Rfx-1 PONA, F.S.-Kapillare (ID = 0,25 mm; 100 m; 0,50 µm dF), RESTEK Hewlett Packard GC ChemStation

GC System 2: Gaschromatograph	5890 Series II Hewlett Packard Gas Chromatograph
GC-Kapillarsäule	FS-SE-54-0.5 (ID = 0,25 mm ; 25 m ; 0,46 µm dF), CS Chromatographie Service, Langerwehe
Detektor	5971A Hewlett Packard Mass Selective Detector
Software	Hewlett Packard ChemStation B.02.05
Fluoreszenzphotometer	Jasco FP-750 Spectrofluorometer, A016960557
Photometer	Spectrophotometer DU [®] 640, BECKMAN

2.5 Methoden

2.5.1 *Behandlung und Charakterisierung des Belebtschlammes*

2.5.1.1 Probenentnahme des Belebtschlammes

In unmittelbarer Nähe der Belüftungsanlagen eines Belebungsbeckens der Kläranlage Soers (Aachen) wurde jeweils 1 l Belebtschlamm entnommen. Die starke Belüftung des Belebungsbeckens gewährleistete dabei die Homogenität der Proben. Der Belebtschlamm wurde rasch in den Versuchen eingesetzt, so dass zwischen Entnahme aus dem Belebungsbecken und Versuchsbeginn nicht mehr als 30-60 min lagen. Aufgrund der relativ kurzen Transportzeiten wurde auf eine zusätzliche Stabilisierung verzichtet.

2.5.1.2 Lyophilisierung von Belebtschlamm

100 ml Belebtschlamm wurden in einen 1 l-Rundkolben gegeben und in einem Bad aus flüssigem Stickstoff abgekühlt, bis sich ein fester Eisklumpen bildete. Der Kolben wurde anschließend für 24 h lyophilisiert (-25°C und 0,5 mbar).

2.5.1.3 Sterilisation von Belebtschlamm

100-200 ml Belebtschlamm wurden in einem 1 l-Glasbehälter bei 120°C für 20 min autoklaviert. Nach Abkühlung des Belebtschlammes auf RT wurde dieser über Nacht stehen gelassen, um lebensfähige Keime auskeimen zu lassen. Der gesamte Vorgang wurde wiederholt, und der Behälter nach dem Abkühlen auf RT festverschlossen im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.5.2 Extraktionen

2.5.2.1 Wasserdampfdestillation von wässrigen Lösungen

250 ml Versuchslösung wurden in einen 500 ml-Rundkolben gegeben. Bei radioaktiven ¹⁴C-NP-Proben wurden direkt 2 x 1 ml der Versuchslösung im LSC vermessen. Der Kolben wurde unter die Wasserdampfdestillationsapparatur (nach Sturm) gehängt, 10 ml Wasser und ca. 5 ml Cyclohexan wurden in die Apparatur gegeben, bis der Überlauf vollständig mit Wasser gefüllt war, anschließend wurde die Extraktion gestartet. Nach 5 h wurde die Extraktion beendet und der Kondensationsraum mit Wasser und Cyclohexan nachgespült. Über den Ablauf wurden beide Phasen in einen 20 ml-Messzylinder überführt und die Apparatur wurde erneut mit Wasser und Cyclohexan gespült. Die Spüllösungen wurden ebenfalls in den Messzylinder gegeben, die wässrige Phase wurde verworfen. Schließlich wurde das Volumen der organischen Phase bestimmt und der Extrakt für die weiteren Analysen aufgearbeitet.

2.5.2.2 Wasserdampfdestillation von Belebtschlammproben

50 ml Belebtschlamm, 200 ml Wasser und 1 Tropfen Silikonentschäumer wurden in einen 500 ml-Rundkolben gegeben, mit Trichloressigsäure wurde ein pH von 1-2 eingestellt (Indikatorpapier). Die weitere Durchführung der Extraktion entsprach derjenigen wässriger Proben (s. 2.5.2.1).

2.5.2.3 Soxhletextraktion

In einen 100 ml-Rundkolben wurden 80 ml Methanol vorgelegt und unter eine 30 ml-Soxhlet-Extraktionsapparatur gehängt. Die Feststoffprobe wurde im Mörser zu einem feinen Pulver zerrieben und quantitativ in eine Soxhlethülse gegeben. Die Extraktion wurde solange laufen gelassen, bis das Lösungsmittel im Extraktionsraum vollständig

farblos war, mindestens aber 4 h. Nach Abbruch der Extraktion wurde das in der Soxhletapparatur verbliebene Lösungsmittel in den Kolben gegeben. Der Extrakt wurde auf ein definiertes Volumen eingeeengt und für nachfolgende Analysen aufgearbeitet.

2.5.2.4 Bleidner-Dampfphasenextraktion

Es wurden folgende wässrige Lösungen angesetzt:

- 1) 200 ml wässrige [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-4-*n*-NP-Standardlösung (1000 dpm/ml)
- 2) 200 ml wässrige [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-4-*n*-NP-Standardlösung (1000 dpm/ml) + 20 g NaCl + Einstellung des pH-Wertes auf 1-2 mittels verd. HCl
- 3) [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-BPA-Standardlösung (1000 dpm/ml)

Jeweils eine dieser Lösungen und 200 ml Isooktan wurden in einen 500 ml-Rundkolben gegeben. Der Kolben mit der wässrigen Lösung wurde am tieferen Arm, der Kolben mit Isooktan am höheren Arm der Bleidnerapparatur befestigt, welche zusätzlich mit einem Intensivkühler versehen wurde. Die beiden Phasen wurden gleichzeitig zum Sieden gebracht. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde die Extraktion unterbrochen, aus beiden Kolben je ein 1 ml-Aliquot entnommen und im LSC vermessen. Nach 5 h wurde die Extraktion beendet, Kühler und Dampfphasenmischraum wurden mit Isooktan und Wasser gespült, und erneut wurde von jeder Phase 1 ml-Aliquot im LSC vermessen.

2.5.2.5 Flüssig-flüssig-Extraktion

Zur Untersuchung von flüssig-flüssig-Extraktionen von NP aus wässriger Lösung wurden drei unterschiedliche wässrige Lösungen von [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-4-*n*-NP angesetzt:

- 1) 30 ml Wasser + [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-4-*n*-NP (30.000 dpm)
- 2) 30 ml Wasser + [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-4-*n*-NP (30.000 dpm) + 3 g NaCl
- 3) 30 ml Wasser + [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-4-*n*-NP (30.000 dpm) + Einstellung des pH-Wertes auf 1 mittels verd. HCl

Nach Überführen der Lösungen in einen 100 ml-Scheidetrichter wurde 1 ml entnommen und im LSC vermessen. Anschließend wurden je 30 ml Petrolether in die Scheidetrichter gegeben und diese zwei Minuten intensiv geschüttelt. Nach der Phasentrennung wurde das Wasser vollständig abgelassen. Der verbleibende Petrolether wurde separat aufgefangen und von beiden Phasen je 1 ml im LSC vermessen. In demselben Scheidetrichter wurde die Wasserphase erneut zweimal dieser Prozedur unterzogen.

2.5.3 Untersuchungen des Verhaltens wässriger NP-Lösungen

2.5.3.1 Adsorptionsuntersuchungen

2,5 g VITON[®], Teflon[®] oder Silikon-Kautschuk bzw. 0,5 g PVDF wurden in gleich große Teile zerschnitten und in 250 ml-Schott-Duran-Glas-Flaschen gegeben. Die Stahlplättchen (ca. 10 g, 2 cm x 2 cm x 1 mm) wurden direkt in den Versuchen eingesetzt, bei Adsorptionsuntersuchungen an Glas wurde kein zusätzliches Glas in die Versuchsflasche gegeben. Von der Versuchslösung wurde unmittelbar vor der Zugabe von 75 ml wässriger [¹⁴C(U)]-4-*n*-NP, bzw. [¹⁴C(U)]-BPA-Lösung jeweils 1 ml im LSC vermessen. Bei Verwendung von BPA wurde eine Konzentration von 3,8 ng/ml, bei NP wurden Konzentrationen zwischen 3,4 ng/ml - 3,4 mg/ml sowie eine übersättigte Lösung eingesetzt. Alle Versuchslösungen enthielten vergleichbare Mengen an ¹⁴C-markierter Substanz von ca. 1000 dpm/ml; die erforderlichen NP-Endkonzentrationen wurden mit nicht radioaktiv markiertem 4-*n*-NP bzw. BPA eingestellt. Die Versuchsansätze wurden in der Regel sieben Tage auf einem Schüttler (60 upm/min) im Dunkeln inkubiert, wobei ein 1 ml-Aliquot der Versuchslösung nach 2h, 1d und 7d im LSC vermessen wurde. Bei einigen Versuchsanordnungen wurde das Material nachfolgend extrahiert (s. 2.5.3.2).

2.5.3.2 Extraktion von 4-*n*-NP aus den Materialien der Adsorptionsuntersuchungen

Nach der letzten Probenentnahme (s. 2.5.3.1) der wässrigen Lösung wurde die Inkubation beendet, und die Materialien wurden mit Hilfe eines Faltenfilters von der wässrigen Lösung getrennt und abtropfen gelassen. Anschließend wurde das Material in einem Erlenmeyerkolben mit 25 ml Petrolether 16 h auf einem Rotationsschüttler (120 upm) extrahiert. Im Abstand von 2-3 h wurde 1 ml des Extraktionsmittels im LSC vermessen.

2.5.3.3 Gasphasenuntersuchungen

500 ml-Erlenmeyerkolben wurden mit 100 ml wässriger [¹⁴C(U)]-4-*n*-NP-Lösung (8,5 µg/l, 2500 dpm/ml) gefüllt. Verschluss wurden die Erlenmeyerkolben mit zellstoffumwickelten Polyurethanstopfen, welche zusätzlich von oben mit Aluminiumfolie bedeckt wurden. Diese Ansätze wurden drei Tage auf einem Rotationsschüttler (60 upm) bei 28°C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde 1 ml der wässrigen Lösung im LSC vermessen. Die Glasflaschen wurden mit ca. 30 ml Petrolether gespült, wovon 1 ml im LSC ausgemessen wurde. Die Polyurethanstopfen wurden in Würfel von ca. 1 cm Kantenlänge zerschnitten, in einen

500 ml-Erlenmeyerkolben gegeben und mit 100 ml Petrolether auf dem Rotationsschüttler 16 h extrahiert. Abschließend wurde die Radioaktivität in 1 ml der Extraktionslösung quantifiziert.

2.5.4 Chromatographische Methoden

2.5.4.1 Dünnschichtchromatographie

Die Probenlösungen (10-500 μ l) wurden mit Hilfe eines DC-Probenautomaten aufgetragen. Bei analytischen DC wurden 1 cm breite Banden auf DC-Platten (SIL G-25 UV₂₅₄, 0,25 mm Kieselgelschicht) aufgetragen. Im Falle präparativer DC (SIL G-25 UV₂₅₄, 1 mm Kieselgelschicht) und stark radioaktiver Substanzen wurde zum Auftragen eine Pasteurpipette mit ausgezogener Spitze verwendet, und die Probe tropfenweise auf eine ca. 17 cm breite Bande verteilt. Nicht radioaktive Proben wurden unter einer UV-Lampe (254 nm oder 366 nm) analysiert, radioaktive Proben mit Hilfe eines Radio-DC-Scanners ausgewertet.

2.5.4.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Als Eluenten für die HPLC wurden ausschließlich hochreine Lösungsmittel verwendet, welche vor der Verwendung filtriert (0,2 μ m) und entgast wurden. Die Proben wurden vor der Analyse mittels Spritzenvorsatzfilter filtriert (45 μ m).

Elutionsprogramm I (UV- und Radiodetektion):

Es wurde das HPLC-System I verwendet (s. 2.4). Die mobile Phase bestand aus Methanol (Eluent A) und Wasser (Eluent B), welche gemäß eines definierten Gradientenprogramms bei einem konstanten Fluss von 1 ml/min gemischt wurden: A : B (35:65, v/v) für 5 min, linearer Gradient von A : B (35:65, v/v) auf A : B (100:0, v/v) in 30 min, A : B (100: 0, v/v) für 5 min, linearer Gradient auf das Startverhältnis von A : B (35:65, v/v) in 5 min, A : B (35:65, v/v) für 5 min. Die Proben wurden in Methanol gelöst. Die Chromatographie wurde bei einer Säulentemperatur von 20°C durchgeführt, das Probenvolumen betrug bei allen Messungen 100 μ l. Die Detektion erfolgte mittels eines Radioisotopendetektors und eines Dioden-Array-Detektors.

Elutionsprogramm II (Fluoreszenzdetektion):

Es wurde das HPLC-System II verwendet (s. 2.4). Die mobile Phase bestand aus Wasser (Eluent A) und Acetonitril (Eluent B), welche gemäß eines definierten

Gradientenprogramms bei einem konstanten Fluss von 1 ml/min gemischt wurden: A : B (50:50, v/v) für 5 min, linearer Gradient von A : B (50:50, v/v) auf A : B (0:100, v/v) in 15 min, A : B (0:100, v/v) für 10 min, linearer Gradient auf das Startverhältnis von A : B (50:50, v/v) in 5 min, A : B (50:50, v/v) für 5 min. Die Proben wurden in Acetonitril gelöst. Die Chromatographie wurde bei RT durchgeführt, das Probenvolumen betrug bei allen Messungen 100 μ l. Detektiert wurde unter folgenden Fluoreszenzbedingungen: $\lambda_{\text{ex}}=354$ nm und $\lambda_{\text{em}}=545$ nm.

2.5.4.3 Gaschromatographie

Die gaschromatographischen Analysen wurden auf zwei verschiedenen Systemen durchgeführt (s. 2.4). Ein direkter Vergleich der Auftrennung von t-NP auf beiden Systemen ist in Abbildung 3.23 gegeben.

Messbedingungen I (GC/FID):

Es wurde das GC-System I verwendet (s. 2.4). Von den zu untersuchenden Proben wurde ein Volumen von 1 μ l im Splitmodus (50:1) injiziert. Als Trägergas wurde Stickstoff verwendet, die Temperatur des Injektors und Detektors betrug 285°C. Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet: von 100°C auf 200°C (5°C/min), isothermisch bei 200°C für 55 min, von 200°C auf 280°C (20°C/min), bei 280°C für 5 min.

Messbedingungen II (GC/MS):

Es wurde das GC-System II verwendet (s. 2.4). Von den zu untersuchenden Proben wurde ein Volumen von 1 μ l im Splitlessmodus injiziert. Als Trägergas wurde Helium verwendet, die Temperatur des Injektors betrug 250°C, und die des Transferheaters betrug 280°C. Es wurde folgendes Temperaturprogramm verwendet: 50°C für 5 min, von 50°C auf 280°C (10°C/min), 280°C für 5 min.

2.5.5 Spektroskopie

2.5.5.1 NMR- und IR-Spektroskopie

Die Aufnahmen von NMR- und IR-Spektren wurden vom Institut für organische Chemie der RWTH-Aachen durchgeführt. Für die Aufnahme der IR-Spektren wurden 2-3 mg der Reinsubstanz eingesetzt. Die Aufnahme von NMR-Spektren erfolgte mit

50-80 mg Reinsubstanz in Wilmad 507pp NMR-Röhrchen. Die NMR-Proben wurden in CDCl_3 gelöst und mit TMS versetzt.

2.5.5.2 UV-Vis-Spektroskopie

Die Aufnahme der UV-Vis-Spektren erfolgte einerseits ohne spezielle Vorbereitung über die Messzelle des HPLC-UV-Detektors (s. 2.5.4.2), andererseits mit einem UV-VIS-Einstrahlphotometer (Spectrophotometer DU[®] 640, BECKMAN). Im Falle des zweiten Messverfahrens wurden die Proben in 600 μl Methanol gelöst (ca. 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und in 0,5 ml-Quarzküvetten vermessen (Wellenlängenbereich von 200-600 nm).

2.5.5.3 Aufnahme von Anregungs- und Fluoreszenzspektren

Von der zu analysierenden Substanz (BPA oder t-NP) wurde in Acetonitril eine 1 mg/ml-Stammlösung angefertigt. Ausgehend davon wurden Verdünnungen mit Konzentrationen von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hergestellt. Gemessen wurden Anregungsspektren im Wellenlängenbereich von 250-780 nm mit festgelegten Emissionswellenlängen zwischen 200-400 nm bzw. Fluoreszenzspektren im Wellenlängenbereich von 380-780 nm mit Anregungswellenlängen zwischen 400-600 nm (Bandbreite des Anregungs- und Emissionsmonochromators 5 nm) bei einer Scangeschwindigkeit von 250 nm/min (Spectrofluorometer Jasco FP-750).

2.5.6 Radioanalytische Methoden

2.5.6.1 Flüssigkeitsszintillationsdetektion

Ein definiertes Volumen der zu messenden Lösung wurde in ein LSC-Vial gegeben und mit einem geeigneten Szintillationscocktail aufgefüllt:

LumaSafe Standardcocktail.

LumaSafe Plus Bei Lösungen mit hohem Salzgehalt oder hohem pH-Wert.

Gasförmiges $^{14}\text{CO}_2$ wurde mittels Carbomax[®] absorbiert und nach mindestens einstündiger Lagerung im Dunkeln im LSC vermessen.

2.5.6.2 ^{14}C -Bestimmung in Feststoffproben

Die Proben wurden für die Verbrennung im Oxidizer in geeignete Aliquote zerlegt. Jedes Aliquot wurde in einem festverschlossenen LSC-Vial bei 4°C bis zur weiteren

Analyse gelagert. Vor jeder Messreihe wurde eine Eichung des Gerätes (Bestimmung eines Korrekturfaktors) bzw. eine Überprüfung der Dichtigkeit vorgenommen.

Die Verbrennung wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Eingangstemperatur 900°C, Katalysatortemperatur 680°C, N₂- und O₂-Fluss 350 ml/min, Verbrennungsdauer 4 min. Entstandene Verbrennungsgase wurden durch den CO₂-absorbierenden Szintillationscocktail Carbomax[®] geleitet.

2.5.6.3 ¹⁴CO₂-Bestimmung

In Abbauversuchen entstehendes ¹⁴CO₂ wurde in geeigneten Versuchsanordnungen quantitativ durch Natronkalk (Plätzchen mit Indikator) absorbiert. Nach Beendigung des Versuches wurde der nun radioaktive Natronkalk in einen 250 ml-Rundkolben gegeben. Der Rundkolben wurde unter einen 250 ml-Tropftrichter mit Gasausgleich gehängt, welcher mit einem zusätzlichen Gasanschluss versehen war. Unter die Apparatur wurde ein Rührer gestellt, der Tropftrichter mit ca. 150 ml 25%iger Salzsäure befüllt und die Apparatur während der gesamten Versuchsdauer von oben mit einem leichten Stickstoffstrom versehen. Über den zusätzlichen Gasanschluss wurde der Stickstoff nachfolgend durch eine Wendelapparatur geleitet, so dass entstehendes CO₂ in die Wendelapparatur gespült wurde. Drei Kammern der Wendelapparatur wurden mit Carbomax[®] befüllt.

Durch die Salzsäure wurde das im Natronkalk gebundene CO₂ freigesetzt und im Carbomax[®] der Wendelapparatur gebunden. Bei zu starker Wärmeentwicklung wurde der Kolben mit Eiswasser gekühlt. Die Reaktion war abgeschlossen, wenn sich der Natronkalk vollständig aufgelöst hatte und die Lösung durch den Indikator eine orange Färbung annahm. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Luftraum ca. 5 min mit Stickstoff gespült. Die nun radioaktiven Carbomax[®]-Lösungen jeweils einer Kammer der Wendelapparatur wurden in ein LSC-Vial laufen gelassen und vermessen.

2.5.7 Chemische Synthesen

2.5.7.1 Analytische Derivatisierung von Phenolen mit Dansylchlorid

Ca. 5 mg des jeweiligen Phenols wurden mit Aceton auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt. Diese Stammlösung wurde verdünnt, bis acetonische Lösungen mit Konzentrationen zwischen 1 ng/ml-1 mg/ml erhalten wurden. 2 ml der Verdünnungen wurden in Reagenzgläser mit Schliff überführt, anschließend jeweils 5 Tropfen einer 0,5 M wässrigen Na₂CO₃-Lösung und 20 mg Dansylchlorid hinzugegeben. Dansylchlorid musste dabei mindestens im zehnfachen Überschuss

bezogen auf die Gesamtmenge der Phenole hinzugegeben werden. Die Reagenzgläser wurden fest verschlossen 16 h im Dunkeln bei RT gelagert, bis die Reaktion abgeschlossen war.

Das Aceton wurde unter einem leichten Stickstoffstrom vollständig abgeblasen. Zurück blieb u.a. eine kleine Menge Wasser, welche nicht eingedampft werden musste. Es wurden etwa 1,5 ml Toluol hinzugegeben, so dass sich aufgrund der Wasserreste zwei Phasen ausbildeten; die oben befindliche Toluolphase wurde abgehoben und in einen 25 ml-Spitzkolben gegeben. Anschließend wurde das Toluol am Rotationsverdampfer entfernt. Zurück blieb ein gelbliches Öl, welches in 2 ml Acetonitril gelöst wurde. Für die HPLC-Analyse wurde diese Lösung filtriert (0,45 µm).

2.5.7.2 Präparative Derivatisierung von Phenolen mit Dansylchlorid

100 mg des Phenols wurden in einem Spitzkolben vorgelegt und in 5 ml Aceton gelöst. Nach der Zugabe von 1 g Dansylchlorid und 100 µl einer wässrigen 0,5 M Na₂CO₃-Lösung wurde die Reaktion 16 h im Dunkeln bei RT laufen gelassen. Anschließend wurde das Aceton abgeblasen, 40 ml Toluol zugegeben und kräftig geschüttelt. Die organische Phase wurde abgehoben und am Rotationsverdampfer eingedampft.

Der Rückstand wurde in 1 ml Acetonitril aufgenommen, über eine präparative DC (Toluol:Methanol 1:1, v/v) aufgetrennt, und das entstandene Dansylderivat unter UV-Licht (366 nm) analysiert. Das Reaktionsprodukt wurde separiert und mit 30 ml Chloroform vom Kieselgel eluiert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt, so dass das Dansylderivat als gelbes Öl zurückblieb.

2.5.7.3 Derivatisierung von Belebtschlammextrakten mit Dansylchlorid

100 ml Belebtschlamm wurden zunächst lyophilisiert, und anschließend jeweils 10 µl einer BPA- und 10 µl einer 4-n-NP-Stammlösung (1 mg/ml, in Methanol) auf den trockenen Belebtschlamm getropft. Parallel wurden Ansätze ohne Dotierung ausgeführt. Nach Verflüchtigung des Lösungsmittels wurde der Belebtschlamm einer Soxhlet-Extraktion mit Hexan als Lösungsmittel unterzogen (s. 2.5.2.3). Das Hexan aus der Soxhlet-Extraktion wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingedampft, und der Rückstand in 2 ml Aceton aufgenommen. Nachfolgend wurde die Derivatisierung dieser Lösung mit Dansylchlorid wie beschrieben durchgeführt (s. 2.5.7.1).

2.5.7.4 Derivatisierungsreaktion mit MSTFA

Vorhandenes Lösungsmittel wurde unter einem schwachen Stickstoffstrom abgeblasen. Der Rückstand wurde in einem 1 ml-GC-Vial mit 100 µl MSTFA überschichtet, das Vial verschlossen, und anschließend für 30 min bei 60°C im Trockenschrank erhitzt. Nach Abschluss der Reaktion wurde die Reaktionsmischung in den GC (Messbedingungen II) injiziert.

2.5.7.5 Darstellung von [¹⁴C(U)]-4-(3',6'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol

Die Reaktion wurde nach Vinken et al. (2002) durchgeführt. In einer trockenen Apparatur, bestehend aus einem 25 ml-Zweihalsrundkolben mit aufgesetztem Rückflusskühler und Trockenrohr (KOH), wurden 350 µl einer [¹⁴C(U)]-Phenollösung (92,6 MBq/ml in Petrolether = 32,4 MBq, spezifische Aktivität 2,7 GBq/mmol), 270 µl einer Lösung von nicht-markiertem Phenol (33 mg/ml in Petrolether, wasserfrei) und 300 µl einer 3,6-Dimethyl-3-heptanol-Lösung (50 mg/ml in Petrolether, wasserfrei) vorgelegt. Anschließend wurden 60 µl einer BF₃-Ether-Komplex-Lösung zugegeben und die Wandungen des Rundkolbens zweimal mit ca. 0,3 ml Petrolether (wasserfrei) abgespült. Der Reaktionsansatz wurde unter leichtem Rühren 50 min auf 50°C erwärmt, danach die Reaktion durch Zugabe von 3 ml Wasser unter starkem Rühren beendet und der Kühler mit ca. 2 ml Petrolether gespült. Die organische Phase wurde 10x mit Wasser im Reaktionskolben gewaschen, das Wasser abgenommen und verworfen. Die verbleibende organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer auf ca. 1-2 ml eingeeengt. Die chromatographische Auftrennung des Rohprodukts wurde mittels einer präparativen DC (Toluol : Methanol 9:1, v/v) durchgeführt. Alle entstandenen radioaktiven Reaktionsprodukte wurden mit jeweils 45 ml Methanol eluiert und die Extrakte am Rotationsverdampfer auf ca. 2 ml eingeeengt. Je ein Aliquot wurde 1:1000 verdünnt und der Reinigungserfolg über Radio-DC und Radio-HPLC kontrolliert. Im Falle der schwach heißen (ca. 2 x 10⁶ dpm) und der kalten Kontrollsynthesen wird das [¹⁴C(U)]-Phenol teilweise oder ganz durch nicht markiertes Phenol ersetzt.

2.5.8 Abbauuntersuchungen von NP-Isomeren in Belebtschlamm

2.5.8.1 Versuchsaufbau

Die Apparatur wurde wie in Abbildung 2.1 dargestellt aufgebaut. Die einzelnen Schichten im Glasrohr wurden dabei so gepackt, dass ein guter Luftaustausch gewährleistet war. In die 500 ml-Glasflasche wurden 100 ml frisch entnommener

Belebtschlamm gefüllt und unter ständigem Schwenken 50 µl einer Stammlösung eines NP-Isomers (1 mg/ml, in Methanol = 50 µg) tropfenweise hinzugegeben. Anschließend wurden 40 µl der Stammlösung (4×10^7 dpm/ml, in Methanol = $1,6 \times 10^6$ dpm = 19,4 µg) eines entsprechenden radioaktiv markierten NP-Isomers gleichermaßen hinzugegeben. Es wurden bei jeder Versuchsreihe zweimal 40 µl der radioaktiven Stammlösung in ein LSC-Vial gegeben und vermessen (100%-Wert). Parallel wurden Ansätze mit sterilisiertem Belebtschlamm hergestellt (s. 2.5.1.3). Die Ansätze wurden auf einem Rotationsschüttler (60 upm) bei 28°C im Dunkeln inkubiert. Jeweils ein Ansatz wurde nach 30 min (0 d), 1 d, 3 d, 7 d und 28 d, die Ansätze mit sterilisiertem Belebtschlamm wurden ebenfalls nach 28 d, aufgearbeitet.

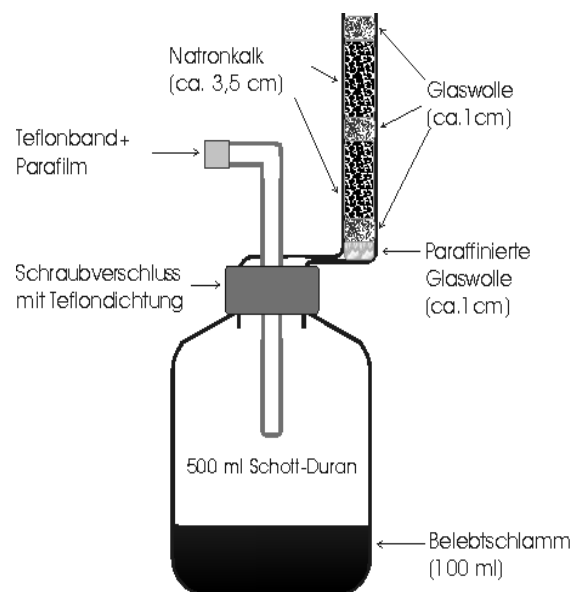


Abbildung 2.1 Versuchsaufbau der Abbauxperimente definierter NP-Isomere mit Belebtschlamm

Für die Aufarbeitung wurde der Belebtschlamm in einen 500 ml-Rundkolben gegossen und die Glasflasche mehrmals mit insgesamt 150 ml Wasser durchgespült; das Spülwasser wurde ebenfalls in den Rundkolben gegeben. Die Belebtschlammfraktion wurde einer Wasserdampfdestillation unterzogen (s. 2.5.2.2) und nachfolgend weiter aufgearbeitet (s. 2.5.8.2).

Die Flasche wurde anschließend mit etwa 10 ml Aceton nachgespült und 2 x 1 ml davon im LSC vermessen. Beide Natronkalkschichten wurden in einen 100 ml-Rundkolben überführt und wie beschrieben analysiert (s. 2.5.6.3). Bei einigen Aufarbeitungen wurden die beiden Natronkalkschichten getrennt voneinander untersucht.

Die paraffinierte Glaswolle wurde in ein Becherglas mit ca. 15 ml Hexan gegeben und mit einem Glasstab verrieben, bis sich das Paraffinöl vollständig aufgelöst hat. 2 x 1 ml dieser Lösung wurden im LSC vermessen.

Von allen entstehenden Fraktionen wurde, wenn möglich, eine DC-Analyse durchgeführt. Die Extrakte gleicher Fraktionen und unterschiedlicher Aufarbeitungszeitpunkte sowie ein Standard des jeweils eingesetzten Isomers wurden cochromatographiert. Es wurden bei jeder Bande ca. 6000 dpm aufgetragen.

2.5.8.2 Aufarbeitung des Belebtschlammes nach der Wasserdampfdestillation

Nach der Abtrennung des NP durch die Wasserdampfdestillationsextraktion wurde der Belebtschlamm filtriert, das Filtrat und der Filterkuchen wurden anschließend weiteraufgearbeitet (s. 2.5.8.3 u. 2.5.8.4). Von der wässrigen Phase wurden 2 x 1 ml im LSC vermessen.

2.5.8.3 Analyse des Filtrats

Das Filtrat (s. 2.5.8.2) wurde dreimal mit 50 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetatphasen wurden abgehoben, vereinigt und am Rotationsverdampfer auf ca. 3 ml eingeeengt. Nachdem der Extrakt auf 5 ml aufgefüllt wurde, wurden 50 µl davon im LSC vermessen. Von der extrahierten Wasserphase wurde die Radioaktivität in 1 ml mit Hilfe des LSC bestimmt.

Die DC-Analyse der Ethylacetatextrakte erfolgte durch zwei aufeinanderfolgende Läufe:

1. Diethylether : Hexan : Essigsäure 50 : 50 :1 v/v/v
2. Diethylether : Hexan : Essigsäure 80 : 20 :1 v/v/v

Von der verbleibenden Wasserphase wurde zunächst das gesamte Wasser am Rotationsverdampfer eingedampft. Letzte Wasserreste wurden durch dreimalige Zugabe von 2-3 ml Methanol und nachfolgendes Eindampfen des Lösungsmittels entfernt. Anschließend wurde der Rückstand mit 3 ml Methanol aufgenommen, wobei Feststoffe verblieben. Das Lösungsmittel mit den Feststoffen wurde quantitativ in einen 5 ml-Messkolben überführt und mit Methanol auf 5 ml aufgefüllt. Vom Überstand wurde die Radioaktivität bestimmt und mittels Radio-DC analysiert (Methanol : Ethylacetat : Essigsäure 50 : 50 : 1 v/v/v).

2.5.8.4 Analyse des Feststoffes

Der getrocknete Feststoff (Filterkuchen, s. 2.5.8.2) wurde in eine Soxhlethülse gegeben, wie beschrieben extrahiert (s. 2.5.2.3) und die entstehende methanolische Lösung am Rotationsverdampfer auf ca. 2-3 ml reduziert. Der Extrakt wurde auf ein Gesamtvolumen von 5 ml eingestellt, nachfolgend seine Radioaktivität in 50 µl bestimmt.

Während der Aufkonzentration im Rotationsverdampfer fiel bei einigen Ansätzen ein Feststoff aus, welcher auch bei nachfolgender Verdünnung nicht mehr in Lösung gebracht werden konnte. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden in diesen Fällen 50 µl des Überstandes vermessen, welcher sich im Messzylinder nach Absetzen des Feststoffes bildete.

Die DC-Analyse dieser Extrakte (s. 2.5.4.1) erfolgte durch zwei aufeinanderfolgende Läufe:

1. Diethylether : Hexan : Essigsäure 50 : 50 : 1 v/v/v
2. Diethylether : Hexan : Essigsäure 80 : 20 : 1 v/v/v

Der extrahierte Feststoff wurde an der Luft trocknen gelassen und sein ^{14}C -Gehalt durch Verbrennung im Oxidizer quantitativ bestimmt (s. 2.5.6.2).

2.5.8.5 Abbauuntersuchung von t-NP in Belebtschlamm

Acht Ansätze mit je 50 ml Belebtschlamm wurden in 250 ml-Erlenmeyerkolben mit Schraubverschluss gegeben und mit Alufolie so verschlossen, dass eine gute Luftzufuhr gewährleistet war. Von einer ethanolischen 5 mg/ml t-NP-Stammlösung wurden 100 µl appliziert, so dass in jedem Ansatz 500 µg t-NP enthalten waren. Zur Kontrolle wurden vier Ansätze mit 1 ml einer 50 g/l NaN_3 -Stammlösung sterilisiert. Die Ansätze wurden auf einem Rotationsschüttler (90 upm) bei 28°C inkubiert. Nach 0 h, 24 h, 48 h und 96 h wurde je ein steriler und ein unsteriler Ansatz komplett einer Wasserdampfdestillation unterzogen (s. 2.5.2.2) und der Extrakt über GC/FID analysiert (Messbedingungen I).

2.5.8.6 Aufreinigung eines NP-Metaboliten aus Belebtschlamm

750 ml Belebtschlamm wurden in einem 5 l-Glasgefäß mit Schraubverschluss vorgelegt und 50 µl einer [^{14}C (U)]-4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol-Lösung ($4,06 \times 10^5$ dpm/µl) sowie 393 µl einer 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol-Lösung (5 mg/ml) hinzugefügt (insgesamt applizierte Menge: 2,215 mg). Ein mit Natronkalk gefülltes Glasrohr mit Schraubverschluss und Teflondichtung wurde auf die Flasche geschraubt. Der Ansatz wird 24 h bei 28°C auf einem Rotationsschüttler (30 upm) inkubiert.

Der Belebtschlamm wurde filtriert und das Filtrat fünfmal mit ca. 75 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde abgehoben, über Na_2SO_4 getrocknet und anschließend filtriert. Das Lösungsmittel des Filtrats wurde am Rotationsverdampfer auf ca. 1 ml eingengt und das Filtrat nachfolgend über präparative DC durch drei aufeinander folgende Läufe (Hexan:Ether:Essigsäure: 50:50:1) chromatographiert. Der Bereich des separierten Hauptpeaks (nach drei DC-Läufen R_f 0,61-0,75) wurde abgekratzt und das Kieselgel zweimal in 15 ml Methanol eluiert. Das Lösungsmittel

wurde abgehoben, filtriert und die vereinigten organischen Phasen wurden am Rotationsverdampfer auf ca. 1 ml eingengt. Dieser so gereinigte Extrakt wurde ein zweites Mal wie beschrieben mittels präparativer DC aufgereinigt.

Der Extrakt (ca. 1 ml) wurde durch einen Spritzenvorsatzfilter (0,45 μm) filtriert und der Filter mit ca. 0,5 ml Methanol nachgespült. Das Filtrat wurde unter einem schwachen Stickstoffstrom bis auf ca. 0,5 ml eingengt. In Portionen von 100 μl wurde der Extrakt in die HPLC (Elutionsprogramm I) injiziert. Das Eluat des Hauptpeaks wurde anschließend innerhalb eines Zeitfensters von ca. 3 min aufgefangen und am Rotationsverdampfer bis auf ca. 1 ml eingengt. Das restliche Lösungsmittel wurde unter einem Stickstoffstrom bis zur Trockene entfernt und der Rückstand in 0,5 ml Methanol aufgenommen.

2.5.8.7 Kultivierung von Mikroorganismen mit NP als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle

In einem 100 ml-Erlenmeyerkolben wurden 10 ml NB-Medium mit 100 μl Belebtschlamm angeimpft und bei 28°C auf einem Rotationsschüttler (120 upm) für 24 h inkubiert. 50 μl dieser Kultur dienten als Inokulum für folgende Ansätze in sterilen 100 ml-Erlenmeyerkolben:

- 2 x 10 ml MM-Minimalmedium
- 2 x 10 ml MM-Minimalmedium + 0,25 g 4-*n*-NP
- 2 x 10 ml MM-Minimalmedium + 0,25 g *t*-NP

Nach 7 Tagen Inkubation auf einem Rotationsschüttler (120 upm) bei 28°C dienten 50 μl der entstandenen Kulturlösung als Inokulum für jeweils gleiche Ansätze, welche erneut 7 Tage bei 28°C auf einem Rotationsschüttler (120 upm) inkubiert wurden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Untersuchung wässriger Lösungen von Nonylphenol und Bisphenol A

3.1.1 Adsorptionsuntersuchungen mit Bisphenol A

Als zu testende Adsorbentien wurden Glas, PVDF-Membran, TEFLON[®], VITON[®], Silikon-Kautschuk und Stahl ausgewählt. Alle Versuche wurden in geschlossenen Glasgefäßen durchgeführt, so dass die Adsorption an Glas berücksichtigt werden musste. BPA gehört wie NP zu den phenolischen Verbindungen; beide Xenooestrogene sollten bezüglich ihres Adsorptionsverhaltens verglichen werden.

Bestimmt wurden die prozentualen Mengen des in Lösung verbleibenden BPA nach sieben Tagen Inkubationszeit (s. 2.5.3.1); eine tabellarische Zusammenfassung bietet Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1 Prozentuale Anteile des in wässriger Lösung verbleibenden BPA (Mittelwerte von drei Parallelen) bei einer Ausgangskonzentration von 3,8 ng/ml (1000 dpm/ml).

[%]	nach 2 h	nach 24 h	Nach 1 Woche
Glas ^a	100	99	99
TEFLON [®]	101	100	97
VITON [®]	100	96	92
Silikon-Kautschuk	97	97	96
PVDF	91	89	89

^a Es wurde kein weiteres Glas in die Versuchsflasche gegeben.

Eine Adsorption des BPA fand nur in geringem Umfang statt; BPA verblieb im Falle von Glas, TEFLON[®] und Silikon-Kautschuk nahezu vollständig in wässriger Lösung. Lediglich bei PVDF und VITON[®] war ein Konzentrationsabfall von ca. 10 % zu messen, wobei die Adsorption an PVDF im Wesentlichen in den ersten zwei Stunden stattfand.

3.1.2 Adsorptionsuntersuchungen mit Nonylphenol

Die Versuchsbedingungen entsprachen denen der Adsorptionsuntersuchungen mit BPA. Der direkte Vergleich des in Lösung verbleibenden NP mit BPA zeigte eine

starke Adsorption des NP. Bei den verschiedenen Materialien waren deutliche Unterschiede zu beobachten (Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2 Prozentuale Anteile des in wässriger Lösung verbleibenden 4-*n*-NP (Mittelwerte von drei Parallelen) bei einer Ausgangskonzentration von 3,4 ng/ml (1000 dpm/ml).

[%]	nach 2 h	nach 24 h	nach 1 Woche
Glas ^a	87	72	58
TEFLON [®]	71	49	36
VITON [®]	56	14	11
Silikon-Kautschuk	16	7	5
PVDF	33	21	43

^a Es wurde kein weiteres Glas in die Versuchsflasche gegeben.

Die 4-*n*-NP-Konzentration der wässrigen Lösungen nahm bereits nach zwei Stunden in allen Versuchsansätzen stark ab, die Ausgangskonzentration (3,4 ng/ml bzw. 3,4 mg/ml) besaß dabei keinen Einfluss auf die relative Konzentrationsabnahme. Silikon-Kautschuk adsorbierte bei gleichzeitiger Quellung des Materials NP nahezu vollständig, bereits nach zwei Stunden ließen sich weniger als 20% des NP in der wässrigen Phase wiederfinden.

Auch bei Verwendung von TEFLON[®] war im Vergleich zum Glasbehälter ein verstärkter Konzentrationsabfall nachzuweisen, welcher allerdings von allen verwendeten Materialien am geringsten ausfiel. Die Messwerte der parallelen PVDF-Ansätze streuten in einem weiten Bereich ($\pm 65\%$ bezogen auf den Mittelwert), tendenziell erhöhten sich jedoch die NP-Konzentrationen gegen Ende der Versuchsdauer in allen Parallelen dieser Versuchsreihe.

Zudem wurde versucht, die Oberflächen der verwendeten Glasflaschen mit nicht radioaktiv markiertem 4-*n*-NP abzusättigen (sieben Tage Inkubation eines Versuchsansatzes mit übersättigter 4-*n*-NP-Lösung) und in der Folge durch weitere Zugabe von [¹⁴C(U)]-4-*n*-NP eine mögliche Konzentrationsabnahme zu bestimmen. Es zeigte sich dabei nach einer Woche eine Abnahme der Radioaktivität um ca. 50%, dieser Wert blieb auch nach drei weiteren Tagen annähernd konstant.

In weiteren Versuchsreihen wurden die Materialien mit Petrolether extrahiert (s. 2.5.3.2), um zu überprüfen, ob die Konzentrationsabnahme des NP ausschließlich auf Adsorptionsvorgänge zurückzuführen war. Kontrollen der Extraktionsausbeuten ergaben, dass nach 16 h keine weitere Substanz extrahiert wurde und die Extraktion beendet werden konnte. Die Bilanzierung ergab einen zum Teil hohen Fehlbetrag des NP (Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3 Bilanzierung der Adsorptionsuntersuchungen einschließlich Extraktion der Materialien nach einer Versuchsdauer von 7 Tagen.

[%]	Verbleib in wässriger Lösung	extrahiert mit Petrolether	Bilanz
Glas	53	9	62
TEFLON®	38	26	64
VITON®	9	31	40
Silikon-Kautschuk	5	91	96

Beim Silikonkautschuk ließ sich nach der schnellen und fast vollständigen Konzentrationsabnahme des NP nahezu die gesamte Substanz in der Petroletherfraktion wiederfinden. Dieses Ergebnis lässt zunächst auf reine Adsorptionsvorgänge schließen. Demgegenüber wurden bei ausschließlicher Verwendung der Glasflasche bis zu 40% des NP nicht wiedergefunden. Bei der Verwendung von wässrigen NP-Lösungen im mg/l-Bereich konnte an den nicht mit Wasser benetzten Stellen der Glasflaschen die Bildung von 'Fettfilmen' beobachtet werden, die jedoch nach Spülen mit Petrolether verschwanden und insofern in die Bilanz mit eingingen. Zur weiteren Untersuchung der nicht wiedergefundenen Substanz wurde daher die Gasphase in die Bilanzierung miteinbezogen (s. 3.1.3).

Weiterhin wurde der zeitliche Verlauf der Konzentrationsabnahme in Glasflaschen näher untersucht. In einer Versuchsreihe erfolgte die Probenentnahme über einen längeren Zeitraum (500 h, Abbildung 3.1), in einer zweiten Versuchsreihe über einen kurzen Zeitraum (3,5 h, 30-minütige Abstände; Abbildung 3.2).

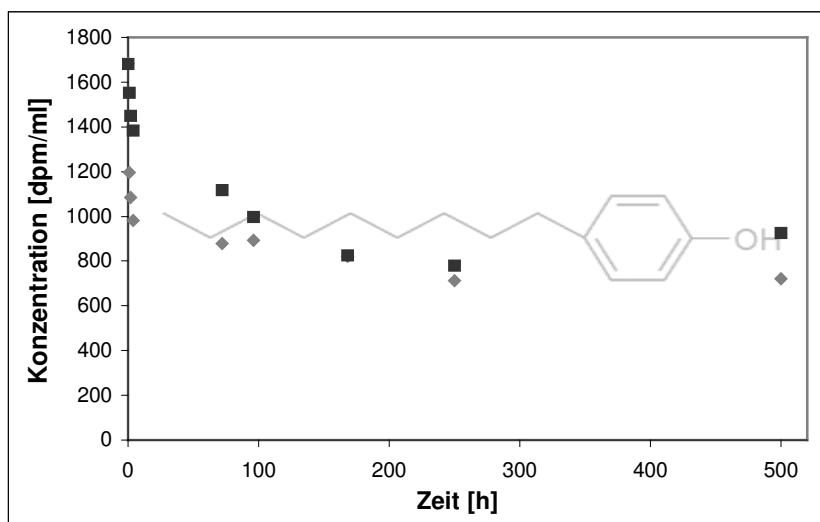


Abbildung 3.1 Verlauf der NP-Konzentrationsabnahme in geschlossenen Glasbehältern über einen Zeitraum von 500 h. Beide Ansätze hatten die gleiche NP-Ausgangskonzentration von 5,7 µg/l (1682 dpm/ml).

Es ist ein exponentieller Abfall der Konzentration zu erkennen, welcher sich jedoch besonders in den ersten 100 Stunden zwischen den parallelen Ansätzen deutlich unterscheidet. Diese Abweichungen könnten möglicherweise mit unterschiedlichen Zuständen der Glasoberflächen erklärt werden. Allerdings erreichen alle Ansätze nach etwa 10 Tagen einen Gleichgewichtswert von ca. 50%.

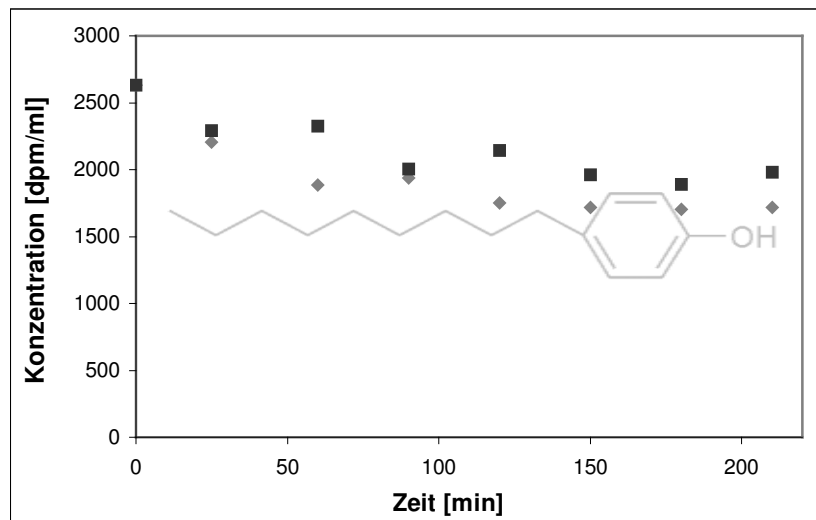


Abbildung 3.2 Verlauf der NP-Konzentrationsabnahme in geschlossenen Glasbehältern über einen Zeitraum von 210 min. Beide Ansätze hatten die gleiche 4-*n*-NP-Ausgangskonzentration von 9,0 µg/l (2633 dpm/ml).

Schon nach wenigen Minuten nahm die Konzentration der wässrigen 4-*n*-NP-Lösung um einige Prozentpunkte ab (nach 30 min Abnahme um 16,5 %). Die Konzentrationsabnahme war dabei annähernd exponentiell.

3.1.3 Gasphasenuntersuchungen

Da in den Adsorptionsuntersuchungen bei Verwendung der Glasflaschen bis zu 40% des eingesetzten NP nicht wiedergefunden werden konnte, wurden Gasphasenuntersuchungen durchgeführt, in denen Polyurethan als Adsorbens in der Gasphase eingesetzt wurde (s. 2.5.3.3).

Hierzu wurden die Glasgefäße mittels zellstoffumwickelten Polyurethanstopfen verschlossen. Die Zellstoffumhüllung war notwendig um zu verhindern, dass kleine Polyurethanstückchen in die Lösung gelangen, welche das 4-*n*-NP nahezu vollständig hätten adsorbieren können. Die Bilanzierung der in den Gasphasenuntersuchungen gefundenen [¹⁴C(U)]-4-*n*-NP-Mengen ergab in der wässrigen Phase **70%**, an den Glaswandungen **10%** und bei der Extraktion der Polyurethanstopfen **15%**

(Mittelwerte aus drei Parallelen) nach drei Tagen Versuchsdauer. Die gesamte Wiederfindungsrate betrug durchschnittlich **94%**.

Adsorptionsvorgänge am Glas sind nach diesen Ergebnissen nur teilweise für die NP-Konzentrationsabnahme der wässrigen Lösung verantwortlich. Ein erheblicher Anteil entweicht über die Gasphase aus der Lösung.

3.1.4 Diskussion

Die Gasphasenuntersuchungen belegen, dass sich die NP-Konzentrationsabnahme in wässrigen Lösungen aus Verdampfung bzw. Wasserdampfflüchtigkeit und Adsorption zusammensetzt. Die jeweilige Gewichtung dieser beiden Vorgänge hängt stark vom angebotenen Adsorbens ab. So zeigen die Versuchsansätze mit Silikon-Kautschuk, dass bei einer schnellen Adsorption des NP Verdampfung kaum auftritt und das NP am Silikon-Kautschuk gebunden bleibt.

Dieser Zusammenhang sollte auch für Klärschlamm gelten. Die Gesamtoberfläche der Schlammmatrix von Klärschlamm übersteigt die Gesamtoberfläche der verwendeten Materialien vermutlich um Größenordnungen; weiterhin besitzt Klärschlamm in Bezug auf NP große Adsorptionskoeffizienten (AHEL et al., 1994a), so dass NP sehr schnell und nahezu vollständig von der Schlammmatrix adsorbiert wird (GIGER et al., 1984). Micellen kann NP aufgrund seines hydrophoben Molekülteils im Verhältnis zum hydrophilen Teil nicht ausbilden (ISRAELACHVILI, 1992).

TEFLON[®] gilt allgemein als Material, welches kaum adsorbiert, obwohl auch TEFLON[®] substanzspezifische Adsorption (z.B. bei Alkyl-*p*-hydroxybenzoaten) aufweisen kann (LOH & VOLPE, 1996). In den hier dargestellten Versuchen zeigt TEFLON[®] im Vergleich zu Glas einen verstärkten Konzentrationsabfall, welcher jedoch im Vergleich zu VITON[®] deutlich geringer ausfiel. VITON[®] besitzt im Vergleich zu TEFLON[®] aliphatischeren Charakter, so dass sich bei VITON[®] Van der Waals-Wechselwirkungen (attraktive Dispersionswechselwirkungen) mit NP verstärkt ausbilden sollten (Abbildung 3.3). Dies gilt umso mehr für die Oberfläche von Silikon-Kautschuk, da dort überwiegend aliphatische CH₃-Gruppen angeordnet sind. BPA besitzt hingegen keinen ausgeprägten hoch-lipophilen Molekülteil und kann infolgedessen über diesen Mechanismus nicht an die Materialien binden.

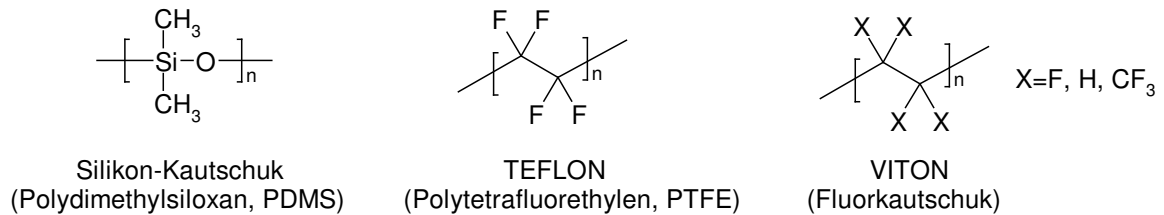


Abbildung 3.3 Chemische Struktur der in den Adsorptionsversuchen eingesetzten Polymere.

Die Konzentrationsabnahme des [¹⁴C(U)]-4-*n*-NP in den Ansätzen, welche zuvor mit übersättigter nicht radioaktiv markierter NP-Lösung inkubiert wurden, zeigt reversible Adsorptionsvorgänge auf. Diese sind für die durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen hervorgerufene Physisorption charakteristisch (ATKINS, 1996). Chemisorption kann aufgrund der molekularen Strukturen aller verwendeten Materialien und der laut Produktbeschreibung hohen Chemikalienresistenz ausgeschlossen werden.

Ein ungelöstes Problem bei der Untersuchung wässriger NP-Lösungen ist die Unterscheidung zwischen der hier angenommenen Adsorption an Materialien und einfachen Grenzflächenphänomenen. So lässt sich NP aufgrund seiner molekularen Struktur und sehr schlechten Wasserlöslichkeit als fettähnliche Substanz betrachten, welche sich allgemein an Grenzflächen (z. B. zwischen Wasser und Luft) anreichert. Dennoch lässt sich festhalten, dass Adsorption wohl einen wesentlichen Beitrag zur Konzentrationsabnahme von NP-Lösungen leistete, da bei der Extraktion der eingesetzten Materialien stets ein erheblicher Anteil des NP wiedergefunden werden konnte.

Diese Ergebnisse helfen bei der Planung komplexer Versuchsaufbauten bzw. der Konstruktion von Modellkläranlagen, welche mit NP-Lösungen betrieben werden sollen. Die Konzentrationsbestimmung wässriger NP-Lösungen sollte stets unmittelbar nach dem Umfüllen in einen neuen Behälter erfolgen.

3.2 Analyse von NP durch Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und Fluoreszenzdetektion nach Derivatisierung mit Dansylchlorid

Es wurde eine Analysemethode zur sensitiven Quantifizierung von t-NP, 4-*n*-NP und BPA aus wässrigen Proben entwickelt. Die drei Zielsubstanzen sollten dabei gleichzeitig in einer Probe analysierbar sein. In Bezug auf BPA ist die Anwendung und Entwicklung der Methode an anderer Stelle detailliert beschrieben (MERGLER, 2003; NAASSNER et al., 2002).

3.2.1 Charakterisierung der Derivatisierungsreaktion

Der erste Schritt zur Validierung der Methode war die Charakterisierung der Derivatisierungsreaktion (Abbildung 3.4). Dies betraf vor allem die strukturelle Überprüfung des Reaktionsprodukts sowie die Kontrolle der Vollständigkeit der Reaktion. Zu diesem Zweck wurde die Derivatisierung auch in präparativem Maßstab durchgeführt (s. 2.5.7.2), um eine ausreichende Menge Dansyl-(4-*n*-NP) für die Aufnahme von ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren zu erhalten. Des Weiteren wurden IR- und MS-Spektren vom Reaktionsprodukt angefertigt (s. 2.5.5.1). Für *t*-NP konnten aufgrund der Isomerenvielfalt keine eindeutig auswertbaren Spektren des Reaktionsproduktes gewonnen werden.

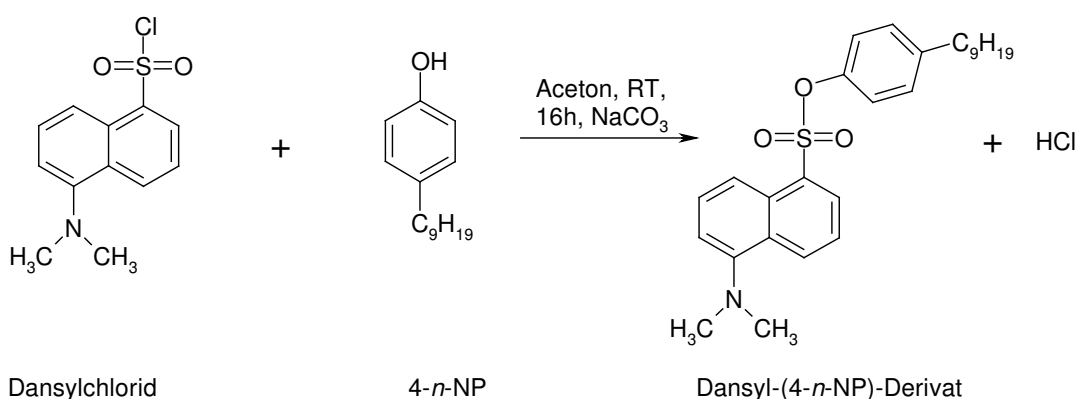


Abbildung 3.4 Reaktionsschema der Derivatisierung von 4-*n*-NP mit Dansylchlorid

Das RIC (Reconstructed Ion Chromatogramm) des Dansylderivats bei Direktverdampfung zeigte, aufgrund thermischer Zersetzung, keine definierten Peaks, so dass die erhaltenen Massenspektren nicht eindeutig einer reinen Substanz zugeordnet werden konnten. Der erste breite Peak des RIC bei 0,24 min zeigt im Massenspektrum einen Basispeak bei m/z 221.17, welcher auf einen abgespaltenen NP-Molekülteil hinweist, während das Massenspektrum des zweiten, intensiveren RIC-Peaks bei 0,49 min einen Basispeak bei m/z 454.22 besitzt, der das Mutterion des intakten Dansyl-4-*n*-NP repräsentiert (s. Anhang). Gaschromatographisch war die thermische Zersetzung ebenfalls zu beobachten, da der Peak des ursprünglichen Dansyl-4-*n*-NP im TIC (Total Ion Chromatogramm), welches über das Molekülion m/z 454.30 identifiziert werden kann, breit und relativ klein im Gegensatz zu dem stark ausgeprägten und scharfen 4-*n*-NP Peak war (s. Anhang).

Das Dansyl-4-*n*-NP-Molekül besitzt aufgrund seiner Komplexität vielfältige Valenz- und Deformationsschwingungen, entsprechend komplex gestaltete sich das aufgenommene IR-Spektrum (Infrarotspektrum). Eine eindeutige Zuweisung der Peaks zu einem Schwingungstyp war daher nicht möglich. Allerdings ließen sich alle zu erwartenden Schwingungstypen im IR-Spektrum bereichsweise wiederfinden, z. B. die starke $-\text{SO}_2$ -Valenzschwingung organischer Sulfonylverbindungen zwischen 1145-

1200 cm⁻¹ oder die CH₃-Valenzschwingung gesättigter Kohlenwasserstoffreste zwischen 2870-2960 cm⁻¹ (s. Anhang).

Eindeutig identifiziert werden konnte das vorhergesagte Dansyl-4-*n*-NP-Derivat über die aufgenommenen ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektren. Jedes Signal ließ sich einer chemischen Gruppe des Dansyl-4-*n*-NP-Moleküls zuweisen. Zudem wurden zweidimensionale COSY-Spektren, die korrespondierende Kopplungen darstellen können, mit in die Strukturanalyse einbezogen (s. Anhang). Es folgt eine Auflistung der zugeordneten NMR-Signale des Dansyl-4-*n*-NP:

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 0.94 [t, 3H, J=7 Hz, H-C (9')], 1.23 [s, 12H, H-C (3', 4', 5', 6', 7', 8')], 1.50 [t, 2H, J=7 Hz, C-H (2')], 2.49 [t, 2H, J=8 Hz, C-H (1')], 2.92 [s, 6H, -N(CH₃)₂], 6.77 [d, 2H, J=8 Hz, Ar-H (1,5)], 6.96 [d, 2H, J=8 Hz, Ar-H (2,4)], 7.25 [d, 1H, J=7 Hz, Ar-H (7'')], 7.44 [t, 1H, J=8 Hz, Ar-H (3'')], 7.67 [t, 1H, J=8 Hz, Ar-H (8'')], 8.07 [d, 1H, J=7 Hz, Ar-H (2'' oder 4'')], 8.49 [d, 1H, J=8 Hz, Ar-H (2'' oder 4'')], 8.60 [d, 1H, J=8 Hz, Ar-H (9'')]. **¹³C NMR** (100 MHz, CDCl₃): 14.3 (C-9'), 22.9 (C-8'), 29.4-32.1 (C-2', C-3', C-4', C-5', C-6', C-7'), 45.7 (-N(CH₃)₂), 76.8-77.5 (CDCl₃), 115.7 (C-7''), 121.8 (C-2, C-6), 123.1 (C-3''), 129.0 (C-8''), 129.4 (C-3, C-5), 130.2 (C-5'' or C-10''), 131.3 (C-2'' or C-4''), 131.8 (C-2'' or C-4''), 141.9 (C-1''), 147.4 (C-6'').

Die NMR-Spektren sind im Anhang abgebildet.

Zur Bestimmung der Reaktionsausbeute (analytische Derivatisierung) wurde das aufgereinigte Dansyl-NP des präparativen Ansatzes ausgewogen, verdünnt und analysiert (s. 2.5.4.2, Elutionsprogramm II). Die Reaktionsausbeute ergab sich durch Vergleich der gemessenen Peakfläche mit der theoretischen Peakfläche aus den Kalibrierungen (s. 3.2.4). Es wurden für alle Derivatisierungen Ausbeuten > 98% gefunden.

3.2.2 Bestimmung der Anregungs- und Emissionsmaxima bei Fluoreszenzmessungen des Dansylderivats von 4-*n*-NP

Aufgrund des Strahlungsmechanismus bei der Fluoreszenz unterscheiden sich die Wellenlängen der Anregungs- und Emissionsstrahlung. Des weiteren werden die Fluoreszenzeigenschaften durch Einflüsse wie z. B. das verwendete Lösungsmittel verändert, welche die Lage der elektronischen Zustände beeinflussen.

Alle Fluoreszenzmessungen zur Bestimmung der optimalen Anregungs- und Emissionsmaxima wurden in Acetonitril durchgeführt, da dieses Lösungsmittel als Eluent bei der HPLC-Analytik verwendet wurde. Mögliche Einflüsse durch einen geringen Wasseranteil während der Elution konnten vernachlässigt werden, da das

Lösungsmittelverhältnis zum Zeitpunkt der Detektion bei 100% Acetonitril lag (s. 2.5.4.2; VALEUR, 2001).

Die Optimierung der Anregungs- und Emissionswellenlänge gelang durch die Aufnahme mehrerer Extinktionsspektren bei festgelegter Emissionswellenlänge und, umgekehrt, mehrerer Emissionsspektren bei festgelegter Extinktionswellenlänge. Auftretende Maxima wurden dabei jeweils als Grundlage für die Festlegung verbesserter Anregungs- oder Emissionswellenlängen verwendet, bis mit $\lambda_{\text{ex}}=354 \text{ nm}$ und $\lambda_{\text{em}}=545 \text{ nm}$ ein optimales Wellenlängenpaar in Bezug auf die Analyse von NP und BPA gefunden wurde (Abbildung 3.5).

Wäre NP die einzige Zielsubstanz dieser Analyseverfahren, könnte die nach dem Emissionsspektrum empfindlichere Emissionswellenlänge $\lambda_{\text{em}}=450 \text{ nm}$ (Abbildung 3.5 b) verwendet und somit die Detektion weiter optimiert werden (Faktor 1,5). Unterschiede in den Anregungs- oder Emissionsspektren zwischen 4-*n*-NP und t-NP konnten darüber hinaus nicht festgestellt werden.

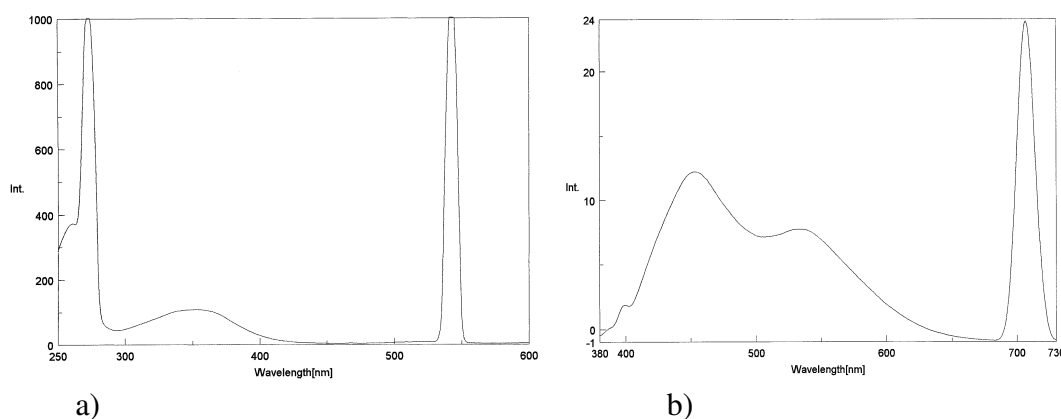


Abbildung 3.5 a) Anregungsspektrum einer Lösung von Dansyl-4-*n*-NP in Acetonitril (1 $\mu\text{g/ml}$) bei einer Emissionswellenlänge von 545 nm; b) Emissionsspektrum einer Lösung von Dansyl-4-*n*-NP in Acetonitril (1 $\mu\text{g/ml}$) bei einer Anregungswellenlänge von 354 nm.

3.2.3 Ergebnisse der Chromatographie

Ein typisches HPLC-Chromatogramm für dansylierte Standards von t-NP, 4-*n*-NP und BPA zeigt Abbildung 3.6. Die Derivate der Verbindungen 4-*n*-NP und BPA erzeugten scharfe Peaks mit einer Breite von ca. 0,5 min. Das Dansylderivat des t-NP hingegen eluierte bedingt durch Schultern über einen Zeitraum von 1,7 min. Der Grund hierfür ist in der komplexen Zusammensetzung des t-NP zu sehen (s. 1.7), wobei alle darin vorkommenden Komponenten (*p*-Alkylphenole, *o*-Alkylphenole, Decylphenole) Phenolgruppen besitzen, welche mit Dansylchlorid reagieren. Für die NP-Derivate wurden folgende Retentionszeiten gemessen: Dansyl-t-NP, 25,5 min; Dansyl-4-*n*-NP,

26,9 min. Es wurde eine vollständige Trennung der dansylierten Zielsubstanzen erreicht (Abbildung 3.6).

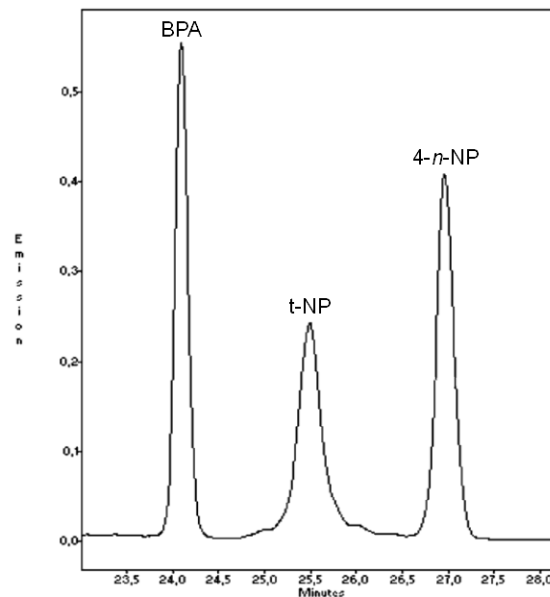


Abbildung 3.6 HPLC-Chromatogramm der Dansylderivate des BPA, t-NP und 4-n-NP.

Zur Ermittlung der Detektionsgrenzen wurden für alle untersuchten Substanzen die Konzentrationen bei der Derivatisierung soweit vermindert, dass gerade noch ein Signal erkennbar war. Das Kriterium für die Detektionsgrenze war ein Signal/Rausch-Verhältnis (S/N) von mindestens drei. Für 4-n-NP und t-NP ergab sich dadurch eine Detektionsgrenze von **0,5 ng** (4-n-NP, S/N 4,5; t-NP, S/N 3,6). Die exakte Quantifizierung von NP war in einem Bereich von 0,5–10 ng möglich, oberhalb einer Menge von 10 ng war das Verhältnis von Aufgabemenge zur gemessenen Peakfläche nicht mehr konstant.

3.2.4 Linearität und Reproduzierbarkeit der Methode

Da NP quantitativ mit Dansylchlorid reagiert (s. 3.2.1), besteht in bestimmten Konzentrationsbereichen ein proportionales Verhältnis von gemessener Fluoreszenz und der Menge des NP in der Probe. Für die Zahl der absorbierten Quanten gilt das Lambert-Beer'sche Gesetz. Daher werden alle Mengenangaben dieser Methode auf die theoretische Aufgabemenge der underivatisierten Phenole bezogen, was sich bei der Anwendung als zweckmäßiger erweist. Eine solche Darstellungsweise hat zudem den Vorteil, dass sie unabhängig vom Probenvolumen gilt. Bei der Validierung wurde stets ein Probenvolumen von 100 µl vermessen.

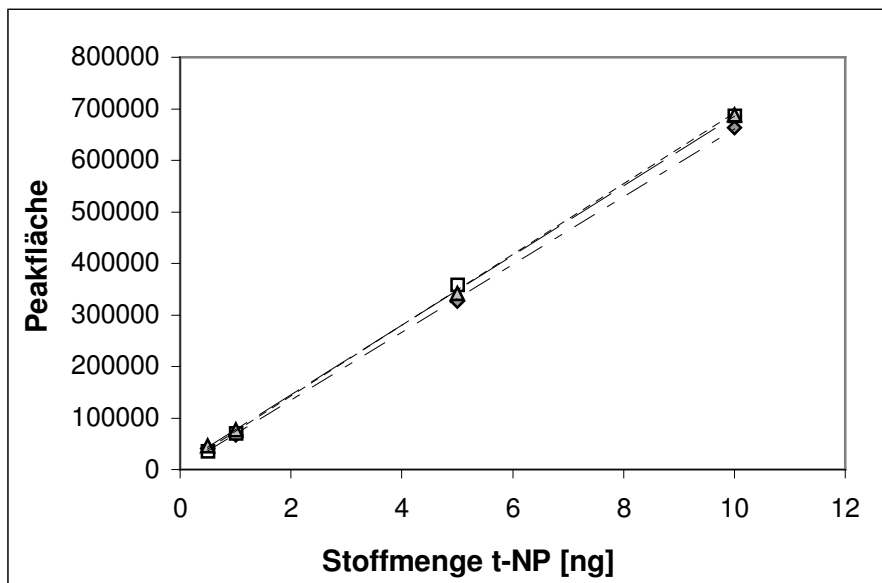


Abbildung 3.7 Drei separat erstellte Eichgeraden des Dansylderivates von t-NP angegeben als t-NP-Äquivalente.

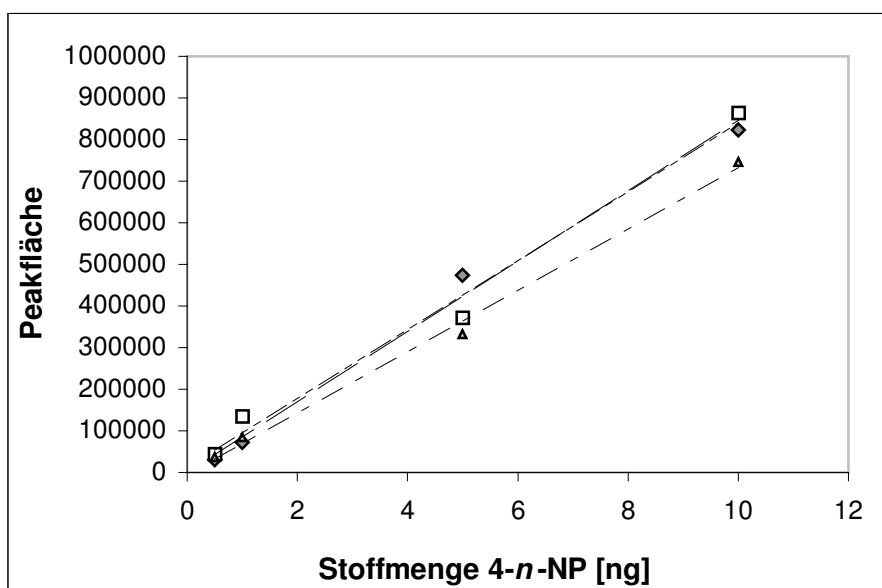


Abbildung 3.8 Drei separat erstellte Eichgeraden des Dansylderivates von 4-n-NP angegeben als 4-n-NP-Äquivalente.

Für die Kalibrierungen wurden Standards (0,5 ng; 1 ng; 5 ng; 10 ng; s. 3.2.3) wie beschrieben derivatisiert (s. 2.5.7.1). Im Falle des t-NP konnten aufgrund starker Schwankungen der ermittelten Peakflächen, die beim 4-n-NP nicht auftraten, keine direkten Kalibrierungen vorgenommen werden. Dieses Problem wurde eingehend untersucht und konnte schließlich durch Einsatz von 4-n-NP als interner Standard gelöst werden, welches in konstanter Menge (10 ng) vor der Derivatisierung zugesetzt wurde. Eine Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der strukturell sehr

ähnlichen Substanzen 4-*n*-NP und t-NP konnte allerdings nicht gefunden werden. Der interne Standard 4-*n*-NP unterlag dabei in Anwesenheit von t-NP exakt den gleichen Schwankungen, so dass letztlich auch für t-NP genaue Kalibrierungen durchgeführt werden konnten (Abbildung 3.7 u. Abbildung 3.8).

Eine lineare Korrelation zwischen Peakfläche und Substanzäquivalenten der Standards war für t-NP und 4-*n*-NP zwischen 0,5 und 10 ng gegeben, wobei Dansylderivate der Standards zwischen 0,1 ng-100 ng vermessen wurden. Für jede Substanz wurden drei individuelle Eichgeraden an verschiedenen Tagen erstellt und alle Arbeitsschritte unabhängig voneinander durchgeführt (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4 Eigenschaften der Eichgeraden von t-NP und 4-*n*-NP. x=Probenaufgabemenge angegeben als nicht-derivatisierte Substanz [ng]; y=Peakfläche.

Substanz	Versuchsreihe	Geradengleichung	Korrelationskoeffizient
4- <i>n</i> -NP	1	$y=84\ 505x+1242$	0,9919
	2	$y=73\ 631x-3845$	0,9955
	3	$y=82\ 924x+11\ 670$	0,9894
t-NP	1	$y=68\ 644x+53\ 159$	0,9995
	2	$y=67\ 655x+9146$	0,9998
	3	$y=65\ 794x+5186$	1,0000

Die Kalibrierung von 4-*n*-NP ergab einen Korrelationskoeffizienten > 0,989. Für das t-NP unter Verwendung des internen Standards ergab sich ein Korrelationskoeffizient > 0,999.

3.2.5 Anwendung der Methode auf Klärschlammproben

Die Anwendbarkeit der Methode auf reale Umweltproben wurde durch Analyse dotierter Belebtschlammproben überprüft. Belebtschlamm enthält eine sehr große Anzahl organischer Inhaltsstoffe, daher sollten vor allem mögliche Interferenzen mit den zu messenden Signalen überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden Belebtschlammproben mit BPA und 4-*n*-NP dotiert (s. 2.5.7.3); auf die Dotierung mit t-NP wurde verzichtet, da eine Kontamination des Belebtschlammes mit t-NP zu erwarten war.

Es wurde mit der Soxhletextraktion von lyophilisiertem Belebtschlamm eine Standardmethode zur Extraktion von Klärschlämmen ausgewählt (GANGL et al., 2001; s. 2.5.2.3). Die Dansylierung der Extrakte erfolgte analog zu den Standardlösungen (s. 2.5.7.1). Die Chromatogramme der dotierten

Belebtschlammproben wurden mit parallel dazu behandelten nicht dotierten Belebtschlammproben verglichen (Abbildung 3.9).

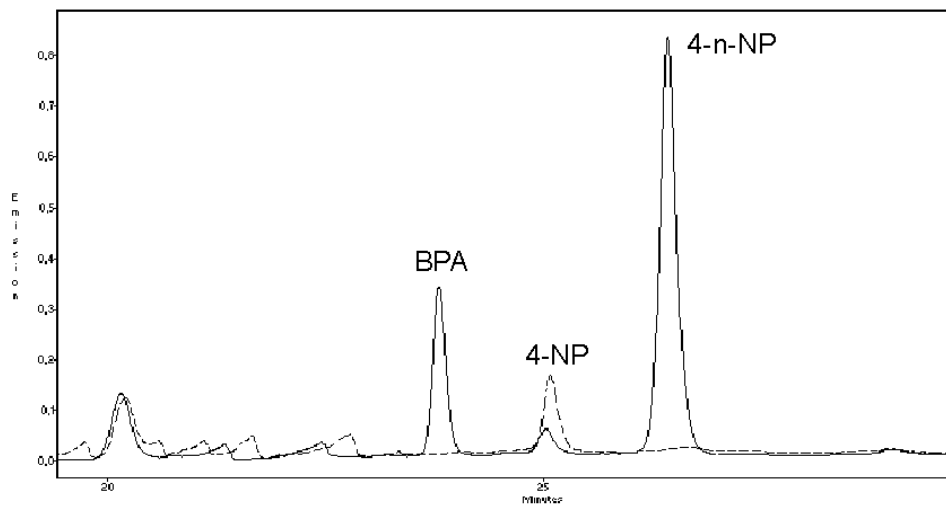


Abbildung 3.9 Vergleich der HPLC-Chromatogramme eines dansylierten dotierten Belebtschlammextrakts (durchgezogene Linie; je 10 µg BPA und 4-n-NP) und eines nicht dotierten Belebtschlammextrakts (unterbrochene Linie).

Die nicht dotierte Belebtschlammprobe zeigt keinen Peak für 4-*n*-NP oder BPA. Bei der Analyse der dotierten Proben konnten die dansylierten Zielsubstanzen gut von anderen fluoreszierenden, möglicherweise ebenfalls dansylierten Inhaltsstoffen getrennt werden. Wie erwartet, wurde *t*-NP im verwendeten Belebtschlamm gefunden.

3.2.6 Diskussion

Die Herstellung von chemischen Derivaten gehört zu den Standardmethoden bei der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie und wird vor allem dazu verwendet, die Detektierbarkeit zu verbessern. Sowohl NP als auch BPA besitzen als Funktionalität eine phenolische Hydroxygruppe; daher wurde als Fluorophor Dansylchlorid (5-(Dimethylamino)-naphtalin-1-sulfonylchlorid) ausgewählt, welches mit primären und sekundären Aminen und Phenolen zu fluoreszierenden Substanzen reagiert (REGIS, 1992; LAWRENCE, 1979; CASSIDY et al., 1974).

Prinzipiell ist es auch möglich, Phenole bzw. Aromaten über ihre natürliche Fluoreszenz zu detektieren. So wird das Wellenlängenpaar $\lambda_{ex}=275$ nm und $\lambda_{em}=300$ nm häufig zur Bestimmung von NP, NPEOs, BPA und weiteren Phenolen verwendet (TSUDA et al., 2000; AHEL et al., 1993; OLMO et al., 2000). Hinderlich ist jedoch, dass viele aromatische Verbindungen mit Anregungswellenlängen um 280 nm ebenfalls bei 300 nm fluoreszieren. Die allgemeine Anwendbarkeit eines

solchen Wellenlängenpaares kann daher bei komplexen Stoffgemischen, wie z. B. Klärschlämmen, dazu führen, dass viele Begleitstoffe im Chromatogramm sichtbar werden und mit den Zielsubstanzen interferieren. Die Derivatisierung mit Dansylchlorid reduziert das Problem der Interferenz. Zum einen reagiert nur ein Teil der Inhaltsstoffe der Probe mit Dansylchlorid, zum anderen wurde für die derivatisierten Zielsubstanzen 4-*n*-NP, t-NP und BPA ein spezifisches Fluoreszenzwellenlängenpaar ermittelt.

Für 4-*n*-NP und t-NP wurden Detektionsgrenzen von 0,5 ng (4-*n*-NP: S/N 4,5; t-NP: S/N 3,6) in Bezug auf die Menge des jeweiligen Phenols auf der Säule erreicht. Diese könnten bei Analyse einer einzelnen Substanz durch Verwendung eines geeigneten Wellenlängenpaares weiter optimiert werden (für NP $\lambda_{\text{ex}}=354$ nm und $\lambda_{\text{em}}=450$ nm). Bei der Detektion über die natürliche Fluoreszenz ($\lambda_{\text{ex}}=275$ nm, $\lambda_{\text{em}}=300$ nm) wurden Detektionsgrenzen von 1 ng (10ng/ml) für t-NP (S/N 3) erreicht (TSUDA et al., 2000). In der gleichen Studie wurde ein linearer Zusammenhang zwischen Detektorsignal und Aufgabemenge von 5-200 ng ermittelt.

Bei reiner NP-Analytik sind GC-MS-Analysemethoden in Kombination mit einer Wasserdampfdestillation als Extraktionsmethode vorzuziehen. Hierdurch werden ausreichend saubere Extrakte erhalten, welche über GC-MS mit hoher Empfindlichkeit direkt analysiert werden können (Detektionsgrenze 5 pg; BOLZ et al., 2000; s. 3.7). Eine simultane Extraktion von BPA und NP bedingt hingegen eine unspezifischere Extraktionsmethode, so dass insbesondere bei Klärschlammproben die Extrakte vor der Analyse meist aufgereinigt werden müssen (LEE, 1999; MEESTERS & SCHROEDER, 2002). Eine zusätzliche Aufreinigung war in der hier vorgestellten Methode nach Soxhletextraktion nicht notwendig.

3.3 Versuche zur Extraktion von NP aus Klärschlamm und wässrigen Proben

3.3.1 Flüssig-flüssig-Extraktion

Aus wässrigen [¹⁴C(U)]-4-*n*-NP Standardlösungen wurden Extraktionen mit Hilfe von Petrolether als organischem Lösungsmittel durchgeführt (s. 2.5.2.5). Da bei der flüssig-flüssig-Extraktion eine große Menge des organischen Lösungsmittels notwendig war, wurde anstelle von Hexan Petrolether verwendet. Des Weiteren wurde überprüft, ob die Zugabe von Natriumchlorid oder die Senkung des pH-Wertes die Extraktion verbessert. Aufgrund des Verteilungskoeffizienten von NP ($\log K_{\text{OW}}=4,48$) sollten sich theoretisch bereits nach einem Extraktionsschritt mehr als 99% des gesamten NP in der organischen Phase befinden.

Extrahiert wurden in zwei aufeinander folgenden Extraktionsschritten drei verschiedene wässrige [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-4-*n*-NP-Standardlösungen, nach zwei Extraktionsschritten befand sich erwartungsgemäß nahezu das gesamte NP in der organischen Phase (Mittelwerte aus drei Parallelen):

- Reine wässrige Standardlösung: 97 % Extraktionsausbeute
- Zugabe von NaCl [100 g/l]: 99 % Extraktionsausbeute
- Einstellung des pH-Wertes auf 1-2 mit verd. HCl: 99 % Extraktionsausbeute

Durch die Zugabe von NaCl oder die Senkung des pH-Wertes wurde die Extraktion geringfügig verbessert, die Werte lagen jedoch innerhalb der Schwankungsbreite. Insgesamt war eine gute Anwendbarkeit dieser Extraktionsmethode für saubere wässrige Proben (z.B. Trinkwasser) möglich.

3.3.2 Bleidner-Dampfphasenextraktion

Durch den Einsatz der Bleidner-Apparatur wird eine Wasserdampfdestillation mit kontinuierlicher Extraktion des Destillats aus wässrigen Proben ermöglicht. Diese Methode hat sich bereits bei der Extraktion von ebenfalls wasserdampfflüchtigen PCB bewährt (SCHUPHAN, et al. 1990).

Extrahiert wurden wässrige [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-4-*n*-NP Standardlösungen mit Isooktan, welches aufgrund seiner Eigenschaften (unpolar, Siedepunkt 99°C) am besten für diese Extraktionsmethode geeignet ist (s. 2.5.2.4). Zudem wurde versucht durch Zugabe von NaCl und Absenkung des pH-Wertes die Extraktion zu optimieren. Nach ca. 3 h zeigte sich keine weitere Erhöhung der Extraktionsausbeute, so dass die Extraktion nach 4 h beendet wurde. Ebenfalls wurde die Eignung dieser Extraktionsmethode für wässrige BPA-Lösungen untersucht (Abbildung 3.10).

Die allgemein schlechte Extraktionsausbeute aus wässrigen NP-Standardlösungen von durchschnittlich **67%** konnte durch Senkung des pH-Wertes und Zugabe von NaCl auf ca. **85%** verbessert werden. Es ist im Vergleich mit anderen Extraktionsmethoden jedoch zu beachten, dass Extrakte matrixbelasteter Proben nach der Bleidner-Dampfphasenextraktion keine weitere Aufreinigung benötigen.

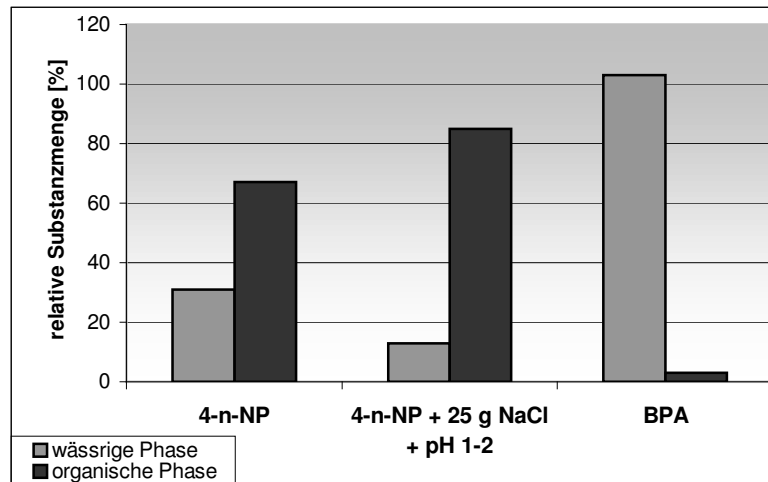


Abbildung 3.10 Ergebnisse der Bleidner-Dampfphasenextraktion nach der Extraktion einer [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-4-*n*-NP-Standardlösung, einer [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-4-*n*-NP-Standardlösung bei Zugabe von NaCl und Einstellung des pH-Wertes auf 1-2 und einer [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-BPA-Standardlösung.

3.3.3 Wasserdampfdestillation

Untersucht wurden sowohl [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-4-*n*-NP-Standardlösungen als auch Standardlösungen des *t*-NP (s. 2.5.2.1). Die radioaktiven Ansätze dienten zur Kontrolle der allgemeinen Extraktionsausbeute, während bei der Extraktion des *t*-NP die Extraktionsausbeuten im Hinblick auf die einzelnen Isomere betrachtet wurden (s. 3.3.3.1). Wie auch bei der Bleidner-Dampfphasenextraktion wurde das Prinzip der Wasserdampflichkeit von NP ausgenutzt. Die Kombination aus Wasserdampfdestillation und kontinuierlicher flüssig-flüssig-Extraktion des Destillats mit Cyclohexan ergab saubere Extrakte, welche keine weitere Aufreinigung benötigten. Zunächst wurden die Extraktionsausbeuten unter Verwendung von [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-4-*n*-NP-Standardlösungen und radioanalytischen Methoden bestimmt. Die Extraktion von Standardlösungen unterschiedlicher Konzentration (100 ng/l – 15 µg/l) hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Extraktionsausbeute von **98,9±0,6%**. In der wässrigen Phase verblieben **1,2±0,1%** des eingesetzten NP. Die Kontrolle der Extrakte durch Radio-DC- und Radio-HPLC-Analyse ergab, dass im Extrakt ausschließlich [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-4-*n*-NP enthalten war.

Auf Grund der hohen Extraktionsausbeuten bei guter Reproduzierbarkeit wurde in einem nächsten Schritt die Anwendbarkeit auf Belebtschlammproben untersucht. Extrahiert wurden verdünnte Belebtschlammproben (1 : 2,5), welche mit [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-4-*n*-NP dotiert wurden (s. 2.5.2.2). Ein Problem bei der Wasserdampfdestillation von Belebtschlamm war die starke Schaumbildung während des Kochens, welche einen mehrstündigen Betrieb der Apparaturen erschwerte. Dieses Problem konnte durch die Verwendung eines Silikonentschäumers behoben werden,

welcher die Extraktionsausbeute nicht beeinflusste. Ebenfalls notwendig war die Absenkung des pH-Wertes auf 1-2 durch Chloressigsäure. Ein pH-Wert von 3-4, eingestellt mit *ortho*-Phosphorsäure, erbrachte deutlich schlechtere Extraktionsausbeuten. Unter den genannten Extraktionsbedingungen und einer Extraktionsdauer von 5 h konnten Ausbeuten von **94±4%** erzielt werden. Die doppelte Extraktionsdauer von 10 h ergab keine messbare Verbesserung der Extraktionsausbeute.

Die entstandenen Cyclohexan-Extrakte waren klar und farblos, nach Verdampfung des Lösungsmittels waren Rückstände nicht zu erkennen. Eine Kontrolle der Extrakte mit Hilfe der Radio-DC und -HPLC ergab saubere Extrakte, welche als radioaktiv markierte Substanz ausschließlich [¹⁴C(U)]-4-*n*-NP enthielt. Die gaschromatographische Analyse von Extrakten aus nicht-dotierten Belebtschlammproben ergab dagegen eine Vielzahl von ebenfalls extrahierten Stoffen.

3.3.3.1 Wasserdampfdestillation von Isomeren des technischen Nonylphenols

Im Rahmen der Untersuchung einzelner NP-Isomere war es notwendig, das Extraktionsverhalten der Isomere des t-NP bei der Wasserdampfdestillationsextraktion zu vergleichen. Es wurde zunächst eine Stammlösung, welche 4-*n*-NP und t-NP beinhaltete, hergestellt und mittels GC analysiert. Aus dieser Stammlösung wurden wässrige Standardlösungen erzeugt, extrahiert (s. 2.5.2.1) und die Extrakte ebenfalls mittels GC analysiert. Die Integration der Peakflächen (Messbedingungen II) ergab nur geringe Unterschiede bei der Extraktion einzelner Isomere bzw. Isomerengruppen. Die absoluten Extraktionsausbeuten der einzelnen Isomere oder Isomerengruppen variierten zwischen **100-104%** (Mittelwerte aus drei Parallelen), lediglich das 4-*n*-NP zeigte eine relativ schlechtere Extraktionsausbeute von durchschnittlich **90 %**. Der Fehler gemäß der einfachen Standardabweichung war für alle Isomere <3 %. Die geringe Extraktionsausbeute des 4-*n*-NP wurde nur bei gleichzeitiger Extraktion des t-NP gemessen, die Extraktion einer reinen 4-*n*-NP-Standardlösung erzielte Ausbeuten von 98,9±0,6% (s. 3.3.3).

3.3.4 Diskussion

Bislang wurde eine Vielzahl von Extraktionstechniken für NP aus wässrigen Proben beschrieben. Bei Extraktion von Klärschlammproben wurde häufig die Wasserdampfdestillation (z. B. nach Sturm), Festphasenextraktion (Adsorbens: XAD, Aktivkohle, Oktadecylsilan) oder Soxhletextraktion nach Lyophilisierung angewendet (LEE, 1999; GIGER et al., 1981; MARCOMINI et al., 1991). Lediglich die Wasserdampfdestillation ergab dabei saubere Extrakte, welche keine weitere Aufreinigung benötigten.

Die Bleidner-Dampfphasenextraktion funktioniert nach demselben Prinzip wie die Wasserdampfdestillation. Die hohe und reproduzierbare Extraktionsausbeute lässt auf eine grundsätzliche Anwendbarkeit der Bleidner-Dampfphasenextraktion schließen, erreicht aber nicht die sehr guten Ausbeuten der Wasserdampfdestillation. Für BPA sind beide Extraktionsmethoden aufgrund der fehlenden Wasserdampflichkeit nicht geeignet. Der direkte Vergleich der Wasserdampfdestillation mit der flüssig-flüssig-Extraktion zeigte, dass für matrixfreie wässrige Proben das einfache und schnelle Ausschütteln mit Petrolether am besten geeignet ist.

Sowohl bei der Bleidner-Dampfphasenextraktion als auch bei der flüssig-flüssig-Extraktion konnte durch die Zugabe von NaCl und Senkung des pH-Wertes die Extraktionsausbeute erhöht werden. Dies kann auf eine verminderte Dissoziation des NP-Moleküls (pK_S 10,28) und den Effekt des Aussalzens zurückgeführt werden.

GIGER et al. (1984) haben mit Hilfe der Wasserdampfdestillation für NP aus Faulschlamm eine Extraktionsausbeute von 93-105 % erreicht. Weitere gute NP-Extraktionsmethoden für Klärschlämme sind die superkritische Flüssigkeitsextraktion mit flüssigem CO_2 (SFE; LEE und PEART, 1995) oder die beschleunigte Lösungsmittelextraktion (ASE; MEESTERS & SCHROEDER, 2002), welche für NP Ausbeuten von 93 ± 5 % und 90-107 % (aus Belebtschlamm) erzielt.

Die Extraktionsausbeuten im Hinblick auf die Einzelisomere bzw. Isomerengruppen des t-NP zeigten kaum Unterschiede, so dass die Wasserdampfdestillation für t-NP-Abbaustudien geeignet ist (s. 3.7.2). Die niedrige Extraktionsausbeute des 4-n-NP wurde nur bei gleichzeitiger Extraktion des t-NP beobachtet und sollte gemäß den vorausgegangenen Extraktionsuntersuchungen deutlich höher liegen. Dieser Unterschied muss insbesondere bei der Verwendung von 4-n-NP als internem Standard berücksichtigt werden. Ein weiteres ungewöhnliches Verhalten in Zusammenhang mit t-NP und 4-n-NP trat bereits bei der Dansylierung von Standards auf (s. 3.2.4).

3.4 Verhalten und Metabolismus von definierten Nonylphenolisomeren in Belebtschlamm

In diesen Untersuchungen wurde das Verhalten der beiden NP-Isomere 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol und 4-n-NP in Belebtschlamm verglichen. Durch GC-MS-Analyse des 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenols konnte dieses Isomer als Bestandteil des t-NP nachgewiesen werden, während das lineare Isomer 4-n-NP, welches häufig als Modellsubstanz für t-NP verwendet wird, im t-NP nicht vorkommt. Mit jedem Isomer wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt (Abbildung 3.11). Zudem wurden einige Daten aus Vorversuchen ausgewertet, um für bestimmte Datenpunkte eine Fehlerrechnung zu ermöglichen.

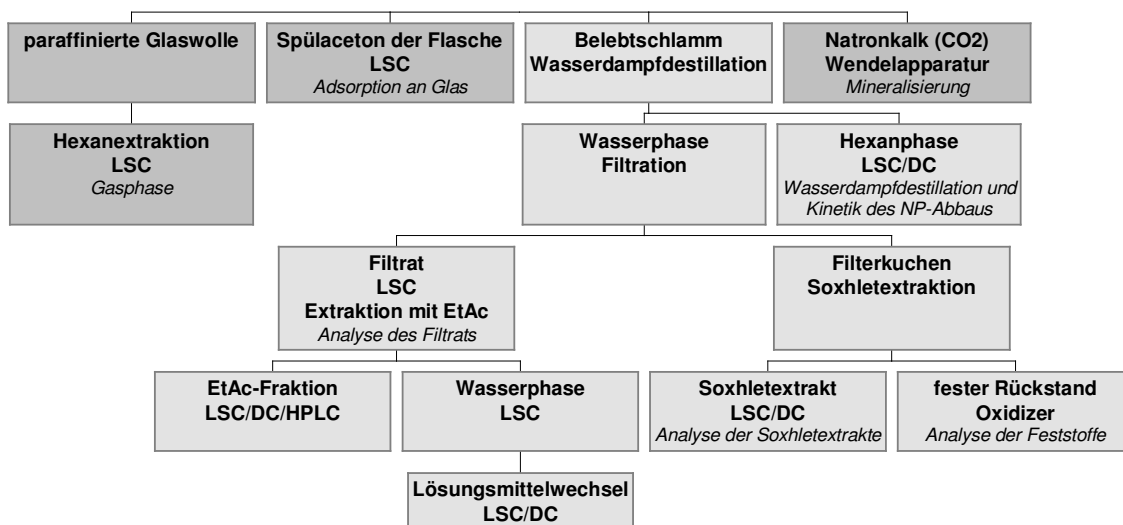


Abbildung 3.11 Schema der Aufarbeitung der Abbauersuche definierter NP-Isomere in Belebtschlamm (vgl. Abbildung 2.1). Kursive Beschriftungen weisen auf die entsprechenden Kapitelbezeichnungen hin (s.u.).

Die bei der Aufarbeitung entstandenen Extrakte, welche sich zur chromatographischen Analyse eignen, wurden über Radio-DC eingehender analysiert (s. 2.5.4.1). Hierbei wurde unter anderem geprüft, ob es möglich war, einzelne Metaboliten zu isolieren, welche auf ihre chemische Struktur hin untersucht werden konnten.

Im folgenden werden die Metaboliten nach ihrem Verhalten während der Aufarbeitung bzw. ihrer Polarität zusammengefasst. Grundlage für die Einstufung der Polarität ist die empirische Beobachtung, dass eine Substanz von einem chemisch nahe stehenden Lösungsmittel gut gelöst wird. Die Polarität der Lösungsmittel kann mit Hilfe der häufig verwendeten $E_T(30)$ -Skala verglichen werden (REICHARDT & SCHÄFER, 1995; REICHARDT, 1994). Für die verwendeten Lösungsmittel gelten folgende $E_T(30)$ -Werte: Wasser 63,1 kcal/mol; Methanol 55,4 kcal/mol; Ethylacetat 38,1 kcal/mol; Cyclohexan 30,9 kcal/mol. Als Maß für die Menge der Metaboliten in den jeweiligen Fraktionen diente die dort bestimmte Radioaktivitätsmenge.

3.4.1 Gasphase und Adsorption an Glas

Die paraffinierte Glaswolle bietet eine gute Adsorptionsfläche für verdunstete lipophile Stoffe. Hierzu zählt vor allem das eingesetzte NP selbst, da es einerseits mit einem $\log K_{OW}$ von 4,48 stark lipophile Eigenschaften besitzt, andererseits durch die hohe Wasserdampflichkeit leicht in die Gasphase übergehen kann (s. 3.1.3). Durch das Spülen der Versuchsflasche mit Aceton wurde die mögliche Adsorption von NP an

Glas berücksichtigt. Weiterhin war denkbar, dass Abbauprodukte an das Glas adsorbieren konnten oder in die Gasphase übergangen.

In allen aufgearbeiteten Ansätzen war die wiedergefundene Radioaktivität bei der paraffinierten Glaswolle in Bezug auf die applizierte Menge mit **0,1-0,3%** sehr gering (s. 2.5.8). Weiterhin ließen sich keine zeitabhängigen Trends in dieser Fraktion erkennen. Nach DC-Analyse befand sich in den Extrakten der paraffinierten Glaswolle überwiegend (> 85 %) das eingesetzte NP-Isomer. Es ist insgesamt davon auszugehen, dass die Verdunstung von NP in Belebtschlamm, im Gegensatz zu wässrigen Lösungen (s. 3.1.3), kaum eine Rolle spielt.

Die Radioaktivitätsbestimmung der Acetonfraktion, mit dem die Glasoberfläche der Versuchsflasche gespült wurde, ergab durchgängig geringe Radioaktivitätsmengen von ca. **0,1%** der applizierten Menge. Nach DC-Analyse befanden sich in dieser Fraktion mehrere radioaktive Substanzen, darunter das eingesetzte NP-Isomer mit stark schwankenden Anteilen. Dabei wurden Reste des Belebtschlammes durch das Aceton abgelöst, die vermutlich einen wesentlichen Beitrag zu dieser Fraktion leisteten. Insgesamt besaß die Adsorption an Glas bei diesen Experimenten einen vernachlässigbaren Einfluss auf die Gesamtbilanz (s. 3.1.2).

3.4.2 Wasserdampfdestillation und Kinetik des NP-Abbaus

Unter der Kinetik des NP-Abbaus wird die Geschwindigkeit des Konzentrationsabfalls der eingesetzten NP-Isomere in Belebtschlamm verstanden. Die Grundlage für die Konzentrationsbestimmung stellte die Wasserdampfdestillationsextraktion mit anschließender Quantifizierung durch radioanalytische Methoden dar (s. 2.5.2.2). In dieser Fraktion wurden deutliche Unterschiede im Abbauverhalten des linearen NP-Isomers im Vergleich zum stark verzweigten 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol festgestellt (Abbildung 3.12).

Auffällig ist der starke Konzentrationsabfall des linearen NP-Isomers; bereits am ersten Versuchstag ließ sich kaum noch 4-*n*-NP in Belebtschlamm wiederfinden. 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol hingegen war nach einem Tag Versuchsdauer noch zu 35% nachzuweisen. In beiden Fällen enthielten die Extrakte nach DC-Analyse als einzige radioaktiv markierte Substanz das jeweilige NP-Isomer.

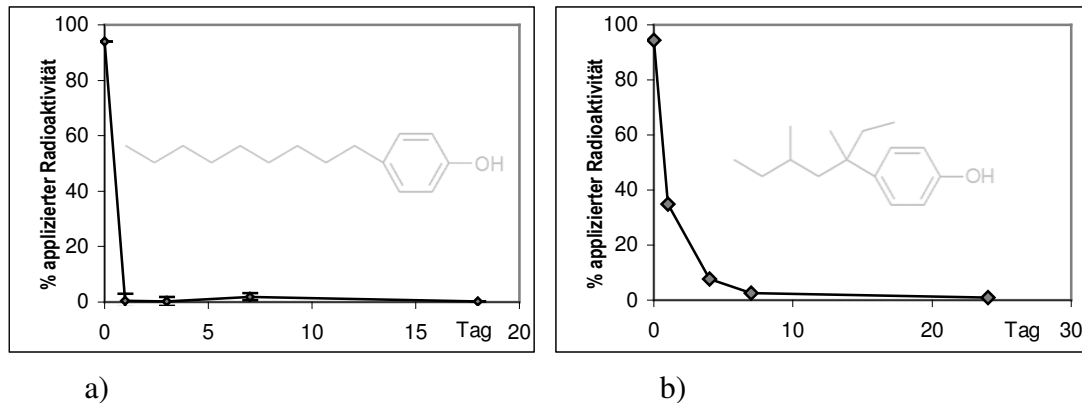


Abbildung 3.12 Zeitlicher Verlauf der durch die Wasserdampfdestillation in Belebtschlamm ermittelten Radioaktivitätsanteile in Bezug auf die applizierte Radioaktivität der eingesetzten ^{14}C -markierten NP-Isomere (Mittelwerte aus mind. zwei Parallelen): a) 4-*n*-NP; b) 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol.

Da die eingesetzten Konzentrationen der NP-Isomere in Relation zur Belebtschlammmenge klein waren, kann angenommen werden, dass die Abbaugeschwindigkeit bei geringen NP-Mengen konzentrationsunabhängig ist. Daher lässt sich der NP-Abbau als eine Kinetik nullter Ordnung betrachten. Es gilt:

$$\ln \frac{[C_{NP}]}{[C_{NP}]_0} = -kt$$

$[C_{NP}]$ = NP-Konzentration
 $[C_{NP}]_0$ = NP-Ausgangskonzentration
 k = Geschwindigkeitskonstante
 t = Zeit

Werden die gemessenen NP-Konzentrationen logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen, erhält man aus der Steigung der Geraden die Geschwindigkeitskonstante k . Im Falle des 4-*n*-NP wurde dabei nur der erste Versuchstag, bei 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol die Daten bis einschließlich des siebten Versuchstages berücksichtigt (Abbildung 3.12). Man erhielt folgende Geschwindigkeitskonstanten:

4- <i>n</i> -NP	$k = 5,1 \text{ [d}^{-1}\text{]}$
4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol	$k = 0,5 \text{ [d}^{-1}\text{]}$

Das lineare Isomer wird also im Gegensatz zum stark verzweigten Isomer mit annähernd zehnfacher Geschwindigkeit in Belebtschlamm abgebaut. In Voruntersuchungen konnte zudem gezeigt werden, dass in Belebtschlamm Mikroorganismen existieren, welche bei schnellem Wachstum das lineare Isomer 4-*n*-NP als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen können. Mit t-NP als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle wurde im Gegensatz dazu kein Wachstum

beobachtet. Auf Agarplatten mit 4-*n*-NP als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle konnten die zuvor gewonnen Flüssigkulturen nicht kultiviert werden (s. 2.5.8.7).

3.4.3 Analyse des Filtrats

Metaboliten, welche nach der ersten Filtration (s. Abbildung 3.11) im Wasser gelöst waren und nicht an die Feststoffmatrix des Belebtschlammes adsorbierten, lassen sich überwiegend als polare Stoffe charakterisieren (s. 2.5.8.3). Stark polare Metaboliten werden nach der gesamten Aufarbeitung eher im Wasser ($E_T(30)$ 63,1 kcal/mol) gelöst bleiben, während weniger stark polare Stoffe durch das Ethylacetat ($E_T(30)$ 38,1 kcal/mol) extrahiert werden können.

Das eingesetzte NP-Isomer wurde nahezu vollständig bei der Wasserdampfdestillation abgetrennt und konnte gemäß DC-Analyse weder in der Ethylacetatfraktion noch im extrahierten Wasser nachgewiesen werden. Nachfolgend dargestellt sind die Radioaktivitätsmengen, welche sich nach dem Abfiltrieren des Feststoffs im Wasser insgesamt befanden bzw. sich aus dem Wasser durch eine flüssig-flüssig-Extraktion mit Ethylacetat in die organische Phase überführen ließen (Abbildung 3.13).

Bei beiden Isomeren kam es in den ersten drei Tagen zu einem starken Anstieg der wasserlöslichen Metaboliten, gefolgt von einer langsamen, stetigen Konzentrationsabnahme. Im Falle des linearen Isomers traten dabei die mit Ethylacetat extrahierbaren Metaboliten in deutlich geringerer Menge auf, wobei die Metaboliten des 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenols im Filtrat einen vergleichsweise höheren Anteil in Bezug auf die applizierte Radioaktivität besaßen. Die nach der Extraktion mit Ethylacetat im Wasser verbleibende Radioaktivität war allerdings mit 9-13 % nahezu konstant (Ausnahme: Tag 1, 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol).

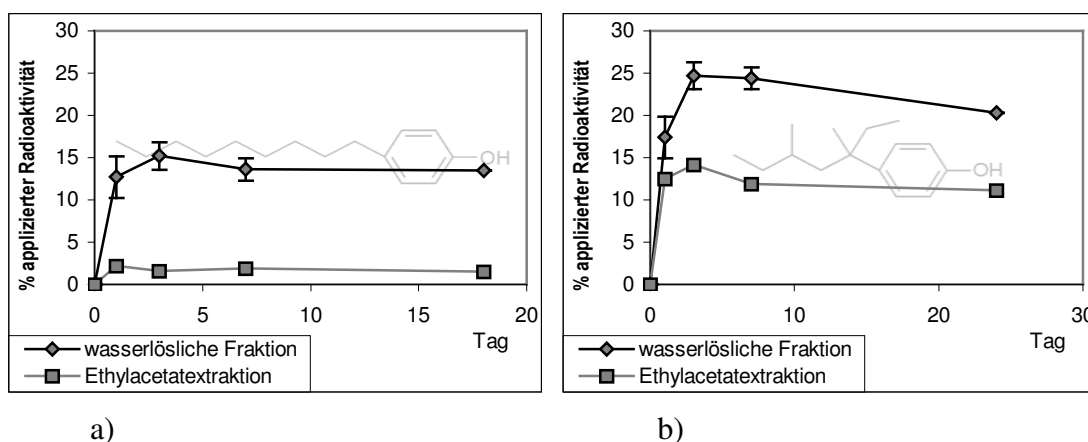


Abbildung 3.13 Zeitlicher Verlauf der wiedergefundenen Radioaktivitätsanteile in der wasserlöslichen Fraktion und der daraus gewonnenen Ethylacetatfraktion in Bezug auf die applizierte Radioaktivität der eingesetzten ^{14}C -markierten NP-Isomere (Mittelwerte): a) 4-*n*-NP ; b) 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol.

Die DC-Analysen der Ethylacetatfraktionen an verschiedenen Tagen zeigten deutliche Unterschiede bei der stofflichen Zusammensetzung der Extrakte. Dies gilt auch für den Vergleich der beiden Isomere nach gleicher Versuchsdauer. Selbst zwischen den parallelen Ansätzen waren teilweise erhebliche Abweichungen zu erkennen, wobei diese nach einem Tag noch gering waren, mit zunehmender Versuchsdauer aber größer wurden. Hingegen war der radioaktive Anteil dieser Fraktionen reproduzierbar, die Abweichungen betragen gemäß einfacher Standardabweichung nicht mehr als 3 % in Bezug auf die applizierte Radioaktivität.

Exemplarisch ist der zeitliche Verlauf der Radio-DC-Peaks aus der Ethylacetatfraktion einer Versuchsreihe mit 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol dargestellt (Abbildung 3.14).

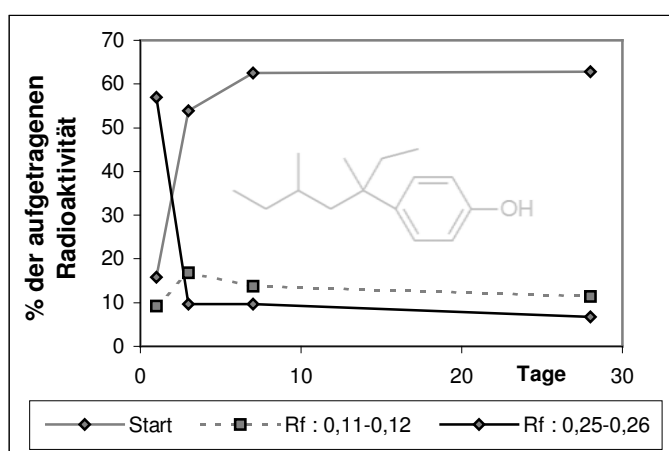


Abbildung 3.14 DC-Analysen (Hexan : Ethylacetat : Essigsäure : 50:50:1 v/v/v) der Ethylacetatextrakte bei Verwendung von 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol.

Während die absolute Radioaktivitätsmenge in den dargestellten Ethylacetatextrakten bis zum dritten Tag anstieg, ließ sich bei Verwendung von 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol ein Peak (R_f -Wert 0,25-0,26) fast ausschließlich am ersten Versuchstag beobachten. Aufgrund der geringen Matrixbelastung der Ethylacetatextrakte insgesamt und der reproduzierbaren Produktion des gut separierbaren und dominierenden Metabolitenpeaks wurde dieser für eine spätere Isolation ausgewählt (s. 3.5.1).

Die Stoffe, welche nach der Ethylacetatextraktion im Wasser gelöst verblieben, konnten nur unzulänglich analysiert werden. Problematisch war hier bereits das Auftragen sauberer Banden auf die DC-Platte, möglicherweise bedingt durch einen zu hohen Salzgehalt. Durch Verwendung eines polaren Laufmittels gelang zwar eine DC-Trennung der Extrakte, ohne jedoch definierte Peaks zu liefern (s. 2.5.8.3).

3.4.4 Analyse der Soxhletextrakte

Metaboliten, welche nach der Filtration am Feststoff adsorbiert bleiben und durch eine Soxhlet-Extraktion mit Methanol ($E_T(30)$ 55,4 kcal/mol) abgelöst werden, können überwiegend als schwach polare, schlecht wasserlösliche Metaboliten charakterisiert werden (s. 2.5.8.4). Die erhaltenen Extrakte waren schwach gelb gefärbt, beim Eindampfen des Lösungsmittels fiel in einigen Fällen Festsubstanz aus.

In dieser Fraktion konnten keine zeitabhängigen Tendenzen beim Vergleich der Radioaktivitätsmengen gefunden werden. Zurückzuführen sind die beobachteten Schwankungen wahrscheinlich auf die besonderen Bedingungen während der Soxhlet-Extraktion, da der Feststoff aufgrund hoher Radioaktivitätsmengen zusätzlich mit Filterpapier umschlossen war. Das Fehlen einer Tendenz war auch darin begründet, dass die prozentuale Wiederfindung der Radioaktivität in allen Extrakten ähnliche Werte besaß. Es ist daher sinnvoll einen Mittelwert über alle gemessenen Extrakte anzugeben:

$$7,1 \pm 3,4 \% \quad (\text{Menge der applizierten Radioaktivität})$$

Der Fehler ergibt sich aus der einfachen Standardabweichung.

Unter Berücksichtigung einer schwankenden Gesamtextraktionsausbeute zeigte sich dennoch bei den DC-Analysen eine nachvollziehbare Konzentrationsänderung einzelner Peaks über die gesamte Versuchsdauer (Abbildung 3.15).

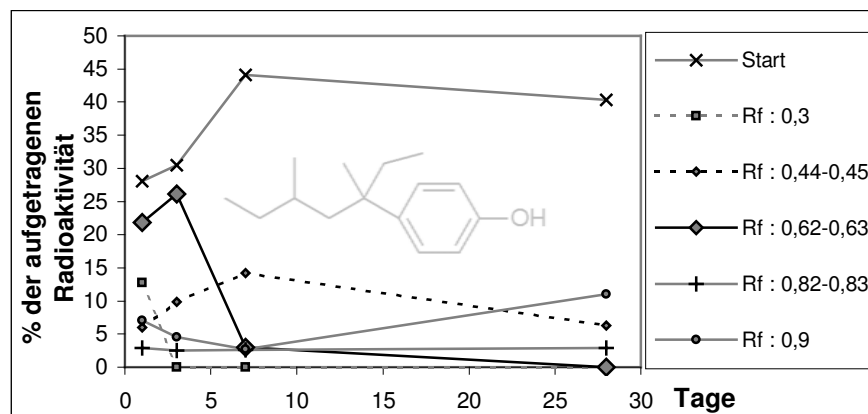


Abbildung 3.15 DC-Analysen (Hexan : Ether : Essigsäure : 50:50:1 v/v/v) der Methanolextrakte nach Soxhlet-Extraktion des Feststoffes bei Verwendung von 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol (R_f -Wert: 0,62).

Auffallend sind die beträchtlichen Mengen der wiedergefundenen Ausgangssubstanz 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol (R_f -Wert: 0,62). Ein großer Teil des durch die Wasserdampfdestillation (Extraktionsausbeute $94 \pm 4\%$) nicht abgetrennten NP konnte also durch eine Soxhlet-Extraktion mit Methanol vom Feststoff abgelöst werden.

Zudem wurden in dieser Fraktion mindestens zwei Stoffe (R_f -Werte: 0,82 und 0,90) gefunden, welche gemäß der DC-Analyse weniger polar (größere R_f -Werte) als NP waren.

3.4.5 Analyse der Feststoffe

In dieser Fraktion wird die Radioaktivität der Festphase bestimmt, welche nicht durch die vorangehenden Aufarbeitungsschritte extrahiert wurde. Grundsätzlich lassen sich zusätzliche Extraktionsschritte mit variierenden Bedingungen (z. B. Lösungsmittel, pH-Wert, Temperatur, Druck) anschließen, um eine erschöpfende Extraktion zu erreichen; für die Bearbeitung der vorliegenden Fragestellung war dies hingegen nicht erforderlich. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte durch vollständige Verbrennung des organischen Kohlenstoffs in einer speziellen Verbrennungsapparatur (s. 2.5.6.2).

Die Feststofffraktionen hatten in den ersten drei Tagen im Vergleich zu den anderen Fraktionen den größten Anteil an der wiedergefundenen Radioaktivität, bei tendenziell unterschiedlichem Konzentrationsverlauf der getesteten Isomere (Abbildung 3.16).

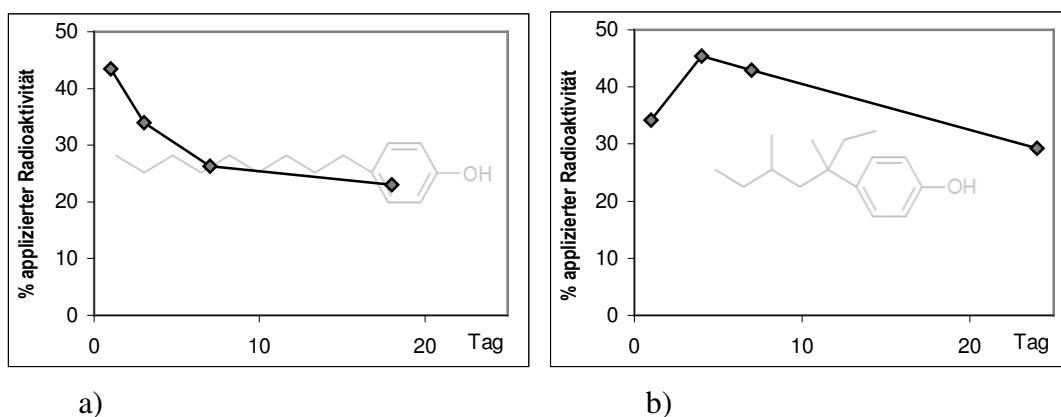


Abbildung 3.16 Zeitlicher Verlauf der an den Feststoff gebundenen Radioaktivitätsanteile in Bezug auf die applizierte Radioaktivität der eingesetzten ^{14}C -markierten NP-Isomere (Mittelwerte aus jeweils zwei Parallelen): a) 4-*n*-NP; b) 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol.

Während bei Verwendung des linearen Isomers der Maximalwert bereits nach dem ersten Tag mit ca. 44 % der applizierten Radioaktivität erreicht war und in der Folge exponentiell abnahm, wurde bei Applikation des verzweigten Isomers ein Maximalwert von 45 % erst nach 3-4 Tagen erreicht. Ein großer Teil der applizierten Radioaktivität wurde also vor allem in den ersten Tagen am Feststoff gebunden.

Bei den TS-Gehalten der verwendeten Belebtschlammchargen (2,6-3,8 g/l; s. Anhang) ergab die Berechnung der einfachen Standardabweichung eine Schwankungsbreite von ca. 15 % bei einem Glühverlust von $70,1 \pm 5,3$ % d.TS.

3.4.6 Mineralisierung

Die Quantifizierung der Mineralisierung erfolgte über die Bestimmung des vom Natronkalk gebundenen $^{14}\text{CO}_2$ (s. 2.5.6.3). Daher war von Bedeutung, welche Kohlenstoffatome des NP-Moleküls ^{14}C -markiert sind und welche nicht. Beide verwendeten ^{14}C -markierten Isomere waren uniform ringmarkiert, d. h. nur bei den Kohlenstoffatomen des aromatischen Ringes lagen zufällig verteilte Markierungen vor, wobei allen Kohlenstoffatomen die gleiche Gewichtung zukam. Nicht markiert waren die Atome der Alkylseitenketten, so dass über deren Mineralisierung prinzipiell keine Aussagen getroffen werden konnten. Besondere Bedeutung erhält dieser Sachverhalt angesichts des Abbaus der verzweigten Isomere des t-NP durch isolierte Mikroorganismen. Danach können bestimmte Bakterien t-NP als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen, ohne die Alkylseitenketten wesentlich zu verändern (FUJII et al., 2000; FUJII et al., 2001). Wenn im folgenden also von Mineralisierung gesprochen wird, ist nicht sichergestellt, ob wirklich alle Kohlenstoffatome des NP-Moleküls zu CO_2 veratmet wurden. Ein Vergleich der Mineralisierungsgeschwindigkeiten zwischen beiden Isomeren war dennoch möglich, da beide Isomere uniform ringmarkiert waren. Dabei war im Gegensatz zum verzweigten NP-Isomer eine deutlich raschere Mineralisierung des 4-*n*-NP zu beobachten (Abbildung 3.17).

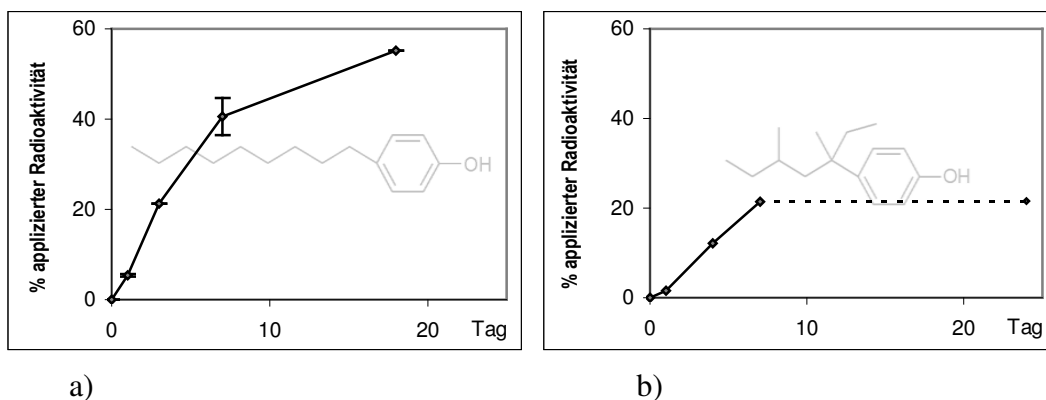


Abbildung 3.17 Zeitlicher Verlauf des entstandenen $^{14}\text{CO}_2$ in Bezug auf die applizierte Radioaktivität der eingesetzten ^{14}C -markierten NP-Isomere (Mittelwerte aus mind. zwei Parallelen): a) 4-*n*-NP; b) 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol (mgl. Fehler bei Tag 24, s. 3.4.7).

Nach dem ersten Versuchstag waren 5% des 4-*n*-NP mineralisiert, nach sieben Tagen mehr als 40%. Im Gegensatz dazu wurden von der als 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol applizierten Radioaktivität nach dem ersten Tag 1,6% und nach sieben Tagen nur ca. 20% als $^{14}\text{CO}_2$ wiedergefunden. Der zunächst gemessene Wert des Tages 24 in den Versuchsreihen mit 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol konnte nicht verwendet werden, da nachfolgende Experimente eine mögliche vorzeitige Absättigung der verwendeten Natronkalkcharge nach 7-10 Tagen nahe legten. Durch

Betrachtung der Gesamtbilanzen ließ sich dieser Wert allerdings mit 40 ± 5 % abschätzen (s. 3.4.7). Davon unabhängig zeigte sich in den ersten sieben Tagen eine annähernd doppelt so hohe Mineralisierungsrate des 4-*n*-NP gegenüber dem verzweigten Isomer.

3.4.7 Bilanzierung

Die gesamte Wiederfindung der Radioaktivität in den einzelnen Versuchsansätzen lag bei Verwendung des 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenols bei 89,0%-104,0% und war damit besser als in den Ansätzen mit 4-*n*-NP, welche eine gesamte Wiederfindung von 70,2%-91,6% aufwiesen. Die Mittelwerte der Wiederfindungsraten sind wie folgt, der Fehler ergibt sich aus der einfachen Standardabweichung:

4-*n*-NP : **80,7 \pm 7,7 %** 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol : **94,9 \pm 4,9 %**

Die allgemein schlechteren Wiederfindungsraten bei Verwendung von 4-*n*-NP können nicht erklärt werden; die Applikation und Aufarbeitung war bei allen Ansätzen identisch (s. 2.5.8). Nicht berücksichtigt wurden zwei Ansätze (Tag 24 in zwei Parallelen, 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol), in denen wahrscheinlich nur ein Teil des entstandenen $^{14}\text{CO}_2$ durch das Natronkalk absorbiert wurde. Diese beiden Ansätze hatten eine gesamte Wiederfindungen von 74,1 % und 72,0 %.

3.4.8 Sterile Ansätze

Es wurden Blindproben (2 Parallelen pro Isomer) mit autoklaviertem Schlamm durchgeführt, um abzusichern, dass der beobachtete Metabolismus tatsächlich von Mikroorganismen verursacht wurde. Dabei war zu berücksichtigen, dass die Sterilisation eine physikalische bzw. strukturelle Veränderung des Schlammes hervorrief, so dass physikalische und mikrobielle Vorgänge nicht vollständig getrennt voneinander untersucht werden konnten. Nach 28 Tagen wurden in diesen Blindproben ca. 55 % (Mittelwert aus 4 Parallelen, 2 pro Isomer) der applizierten radioaktiven Substanz mit Hilfe der Wasserdampfdestillation extrahiert. In der darauf folgenden Soxhlet-Extraktion des Feststoffes befanden sich im Methanolextrakt durchschnittlich ca. 10 %; im Feststoff selbst konnten ca. 25 % der eingesetzten Radioaktivität wiedergefunden werden. Alle weiteren Fraktionen enthielten einen Radioaktivitätsanteil von weniger als 1%, insbesondere die CO_2 -Fraktion wies lediglich einen Anteil von 0,05 % auf. Dabei konnte in Radio-DC-Analysen aller

analysierbaren Fraktionen nahezu ausschließlich (> 98 %) das jeweils eingesetzte NP-Isomer nachgewiesen werden.

3.4.9 Diskussion

Literaturdaten behandeln die NP-Isomere in der Regel als Gesamtheit oder wurden mit dem einzigen käuflichen NP-Isomer 4-*n*-NP gewonnen, welches im t-NP nicht enthalten ist. Erkenntnisse aus dem Bereich der PCB-Forschung belegen allerdings zum Teil erhebliche Unterschiede bei der toxikologischen Bewertung oder dem chemisch-physikalischen Verhalten bestimmter Isomere (HANSEN, 1998), so dass eine differenzierte Betrachtung der Isomere auch bei NP geboten scheint. Allgemein gilt in biologischen Systemen, dass kleine Veränderung der Molekülstruktur des Substrats große Affinitätsunterschiede bei Substrat-Protein-Wechselwirkungen hervorrufen können (KOOLMAN & RÖHM, 1994).

Die beiden untersuchten NP-Isomere 4-*n*-NP und 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol sind in Bezug auf die Nonylseitenkette gegensätzlich. Die Alkylkette des linearen 4-*n*-NP besitzt keine Verzweigungen und ist somit geeignet gemäß β -Oxidation verstoffwechselt zu werden. Hinweise auf weitere Biotransformationsmöglichkeiten des 4-*n*-NP liefern Versuche mit Pflanzenzellen, in denen eine Hydroxylierung der Seitenkette festgestellt werden konnte (SCHMIDT et al., 2003; BOKERN et al., 1996; BOKERN & HARMS, 1997). Das 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol hingegen ist Bestandteil des t-NP und besitzt innerhalb der Alkylkette ein tertiäres und ein quarternäres Kohlenstoffatom. Diese Verzweigungsstellen sollten theoretisch ein langsames Abbauverhalten zur Folge haben (SCHAEFFER et al. 1979; BRITTON 1984).

Da NP unter anaeroben Bedingungen biologisch nicht transformiert wird, wurden die Untersuchungen unter aeroben Bedingungen mit Belebtschlamm durchgeführt (GIGER et al., 1984). Unter der Annahme, dass der aerobe Abbau des lipophilen NP-Moleküls zunehmend polare Metaboliten erzeugt, kann der Metabolismus beider Isomere in Grundzügen nachvollzogen und verglichen werden (HOPPER, 1991).

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist festzustellen, dass die erste Biotransformation im Falle des 4-*n*-NP erheblich schneller verläuft als beim verzweigten Isomer. Legt man eine Reaktionskinetik der nullten Ordnung zu Grunde, wird das lineare Isomer mit etwa der zehnfachen Geschwindigkeit abgebaut als das verzweigte. Diese beachtliche Differenz ist ein Hinweis darauf, dass divergente Metabolismuswege beschränkt werden. Die Unterschiede zwischen allen *p*-Isomeren des t-NP in Belebtschlamm fielen in diesem Zusammenhang deutlich geringer aus (s. 3.7.2). Bereits nachgewiesene Abweichungen des physikalisch-chemischen Verhaltens zwischen 4-*n*-NP und t-NP in Böden (DÜRING et al., 2002) sind ebenfalls gering verglichen mit den gemessenen Unterschieden der Abbaugeschwindigkeiten.

Eine Adaptionsphase der Mikroorganismen an NP scheint, wie auch beim Abbau von NP in Böden, nicht notwendig zu sein (TOPP & STARRATT, 2000). Es wurden allerdings in einigen der verwendeten Belebtschlammproben geringe Mengen an t-NP nachgewiesen (0 - 50 µg/kg TS).

In Bezug auf den Charakter der ersten Biotransformation ist nach den vorliegenden Studien lediglich sicher, dass bei beiden Isomeren die Eigenschaft der Wasserdampflichkeit verloren geht. Theoretisch sollte eine Hydroxylierung der Alkylkette oder des Ringsystems ein wahrscheinlicher erster Schritt des Metabolismus sein, wodurch möglicherweise auch eine deutliche Verminderung der hormonellen Wirksamkeit hervorgerufen würde (BOKERN et al., 1997; TABIRA et al., 1999; HOPPER, 1991).

Schwach polare Metaboliten (Begriffsdefinition s. 3.4.4) werden in den gezeigten Untersuchungen bereits am ersten Versuchstag in relativ großer Menge gebildet und besaßen gemessen an der gesamten applizierten Radioaktivitätsmenge einen relativ konstanten Anteil, so dass eine ähnlich hohe Bildungs- und Abbaurate der in dieser Fraktion befindlichen NP-Metaboliten angenommen werden kann. Auffällig waren dabei zwei Metaboliten, die gemäß DC-Analyse unpolarer als die Ausgangssubstanz waren. Vorstellbar ist – wenn man von Chromatographie-Artefakten absieht - hier z. B. die Bildung von Alkoxy-Derivaten des NP.

Unabhängig von der Versuchsdauer war der Anteil wasserlöslicher, polarer Metaboliten (Begriffsdefinition s. 3.4.3) beim verzweigten Isomer erheblich größer als beim linearen Isomer. Denkbar ist, dass bei den Metaboliten des 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenols dieser Fraktion immer noch die tertiären und quaternären Kohlenstoffatome der Ausgangsverbindung vorhanden waren, welche den weiteren enzymatischen Abbau hemmten und daher gewissermaßen angereichert wurden.

In Bezug auf die Mineralisierung von NP in Belebtschlamm sind Literaturdaten vorhanden, welche unter aeroben Bedingungen für [¹⁴C(U)]-4-*n*-NP eine Mineralisation von 50-55 % (nach 20 d) angeben (HESSELSON et al 2001). Von Seiten der t-NP-Produzenten wurden nur etwas geringere Mineralisierungsraten für t-NP nach der OECD-Methode 301B von 53 % (nach 28 d) bzw. 48 % (nach 35 d) angegeben (WILLIAMSON & VARINEAU, 1996; STAPLES et al., 2001). Hiernach würden die überwiegend stark verzweigten Isomere des t-NP mit ähnlicher Geschwindigkeit abgebaut wie das lineare 4-*n*-NP. Der in der vorliegenden Arbeit erstellte direkte Vergleich zeigt hingegen eine annähernd halb so große Mineralisierungsrate des 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenols. Berücksichtigt man zudem die Ergebnisse der Abbaukinetiken, kann das lineare Isomer insgesamt als wesentlich leichter abbaubar eingestuft werden als 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol.

Ein großer Teil der applizierten Radioaktivität ließ sich vor allem in den ersten Tagen in der Feststofffraktion nachweisen. Da dieser Anteil mit zunehmender Versuchsdauer sank, lässt dies die Interpretation zu, dass insbesondere beim 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol zunächst vergleichsweise unpolare Metaboliten gebildet wurden,

welche von der lipophilen Oberfläche der Belebtschlammteilchen adsorbiert wurden und in die Feststoffmatrix diffundierten. Die Ergebnisse der autoklavierten Ansätze belegen dieses Verhalten für beide NP-Isomere. Nach der Folgebildung der Konzentration dieser Metaboliten im Medium ab, diffundierten sie langsam aus der Feststoffmatrix in das Medium, so dass die nachgewiesene Radioaktivität dieser Fraktion mit der Zeit stetig abfiel. Mit zunehmender Metabolisierung der ablösbaren Stoffe sollten dann Anteile an unlöslicher Radioaktivität verbleiben, welche z.B. durch Einbau von Molekülfragmenten in die Biomatrix entstehen.

Die chromatographische Auftrennung der Extrakte gelang umso besser, je unpolarer die Inhaltsstoffe waren. Dabei zeigte der Vergleich der DC-Chromatogramme entsprechender Extrakte aus Ansätzen mit beiden Isomeren, nach der Anzahl und den R_f -Werten gemessener Peaks, eine stark unterschiedliche Zusammensetzung auf, was auf divergierende Metabolismuswege hinweist. Ähnliche Hinweise lieferten auch die Wachstumsversuche mit Anreicherungskulturen, welche nur bei Verwendung von 4-*n*-NP Wachstum zeigten.

Beobachtete Abweichungen der Metabolitenzusammensetzung, zum Teil auch zwischen parallelen Ansätzen, könnten mit Veränderungen des komplexen Belebtschlammes, z. B. in Bezug auf den TS-Gehalt oder die Biozönose, erklärt werden, da die Parallelen zu verschiedenen Zeitpunkten und daher mit verschiedenen Belebtschlammchargen durchgeführt wurden. So kann der TS-Gehalt (Schwankungsbreite ca. 15 %) des Belebtschlammes als grobes Maß für die Menge der Biomasse und für die Menge an adsorptionsfähiger Matrix angenommen werden. Ein hoher TS-Gehalt (bzw. dessen Glühverlust) wird daher das Ausmaß der Biotransformation und Adsorptionsvorgänge erhöhen.

Zusammenfassend lässt sich ableiten, dass beide Isomere wahrscheinlich auf unterschiedliche Weise metabolisiert wurden. Dies betrifft sowohl die Geschwindigkeit des Abbaus, als auch die beschriebenen Metabolismuswege. Exakte Aussagen über den Metabolismus organischer Substanzen in Belebtschlamm sind jedoch auf Grund der komplexen Biozönose kaum zu treffen. So sind am Abbau organischer Substanzen in Belebtschlamm nicht nur Bakterien, sondern auch eukaryotische Mikroorganismen und Kleintiere (z.B. Würmer, Mollusken) beteiligt (SCHLEGEL, 1992). Es war in der vorliegenden Arbeit daher sinnvoll, nur in größeren Anteilen gebildete Metaboliten eingehender zu untersuchen.

3.5 Metabolitenuntersuchungen

Aufbauend auf den allgemeinen Metabolismusstudien von definierten NP-Isomeren (s. 3.4) wurde versucht, einen NP-Metaboliten des Isomers 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol aus Belebtschlamm zu isolieren und zu charakterisieren. In der Literatur wurden bislang vereinzelt Metaboliten von

verzweigten NP-Modellisomeren beschrieben, etwa in Kulturen von *Sphingomonas* TTNP3 (CORVINI et al., 2004), in Pflanzen-Suspensionskulturen (SCHMIDT et al., 2004) oder in bestimmten tierischen Organismen (MELDAHL et al., 1996; LALAH et al., 2003). Besonderes Interesse besitzt die Fragestellung, ob bei den verzweigten Isomeren des t-NP in Belebtschlamm zunächst die aromatische Ringstruktur gespalten oder zuvor die Alkylkette biologisch transformiert wird, da nach der Ringspaltung mögliche Metaboliten keine hormonelle Wirksamkeit mehr besitzen sollten (WITORSCH, 2000; MUELLER & KIM, 1978). Aus diesem Grund war ein frühes Auftreten des zu isolierenden Metaboliten ein Auswahlkriterium. Weitere Kriterien ergaben sich aus experimentellen Überlegungen, so sollte der zu analysierende Metabolit reproduzierbar und in vergleichsweise großer Menge gebildet werden, sich aus dem Belebtschlamm leicht in eine wenig matrixbelastete Lösung überführen lassen und durch chromatographische Methoden gut separierbar sein. Die Untersuchungen wurden unter Beimengung von [^{14}C (U)]-4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol durchgeführt, um im Belebtschlamm Metaboliten des NP zuordnen zu können. Zusätzlich wurden drei Referenzsubstanzen ausgewählt, die strukturelle Ähnlichkeiten mit möglichen Metaboliten besitzen (Abbildung 3.18). Alle Strukturuntersuchungen des aufgereinigten Metaboliten wurden parallel mit diesen Substanzen und t-NP durchgeführt.

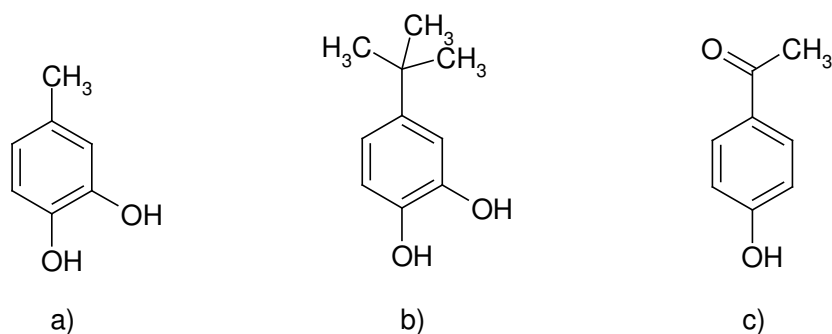


Abbildung 3.18 Chemische Strukturen der verwendeten Referenzsubstanzen: a) 4-Methylbrenzcatechin; b) 4-*tert*-Butylbrenzcatechin; c) 4-Hydroxyacetophenon.

3.5.1 Produktion und Aufreinigung der Metaboliten

Mit Hilfe der zuvor durchgeführten Metabolismusstudien von Einzelisomeren wurde ein Metabolit ausgesucht, welcher sich nach 24 h Versuchsdauer bildete und sich im klaren Ethylacetat-Extrakt als ein dominierender Peak der DC gut separieren ließ. Die genauere HPLC-Analyse eines Isolats dieses Peaks wies allerdings das Vorhandensein zweier Substanzen (M1 und M2, Abbildung 3.19) nach.

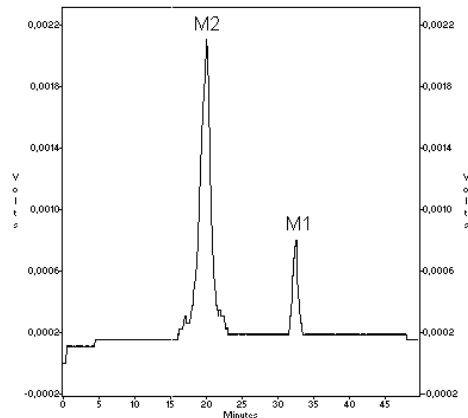


Abbildung 3.19 Radio-HPLC-Chromatogramm der Metaboliten M1 und M2 nach zweimaliger Aufreinigung des Ethylacetatextraktes mittels präparativer DC (Retentionszeiten: 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol - 30,99 min ; M2 - 20,63 min ; M1 - 32,56 min).

Durch Variation der DC-Bedingungen und Anwendung von HPLC-Methoden konnten beide Substanzen isoliert werden. Die Konzentration von M1 nahm dabei während der Aufarbeitung stetig ab, so dass die Untersuchungen letztlich auf M2 beschränkt werden mussten. Folgende, schematisch dargestellte Schritte der Aufarbeitung wurden bei der Isolierung durchgeführt und mit radioanalytischen Methoden verfolgt (Abbildung 3.20).

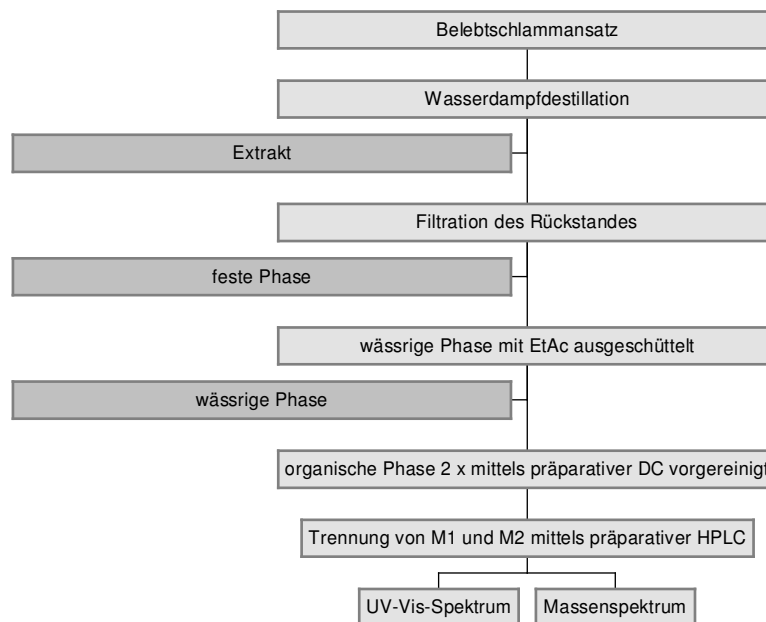


Abbildung 3.20 Aufarbeitungsschema der Isolierung des Metaboliten M2

Zunächst wurde die Reproduzierbarkeit des gesamten Verfahrens (Produktion und Isolierung) mit relativ gering skalierten Ansätzen (100 ml Belebtschlamm, 50 µg NP-Isomer + 1,5 x 10⁶ dpm ¹⁴C-markierters NP-Isomer) überprüft. Hierbei wurden

bezogen auf die eingesetzte Radioaktivität etwa **1,5 %** als Metabolit M2 im aufgereinigten Zustand gewonnen. Die Identifizierung erfolgte über die Retentionszeiten der Radio-HPLC-Analyse. Aus diesen Ergebnissen konnte die notwendige Ansatzgröße (s. 2.5.8.6) ermittelt werden, welche genügend Substanz liefern sollte, um eine GC/MS-Analyse und die Aufnahme photometrischer UV-Vis-Spektren zu ermöglichen.

Der präparative Ansatz zur Produktion des Metaboliten führte, relativ betrachtet, nach der Aufreinigung zu einer deutlich geringeren Menge des Metaboliten als in den Voruntersuchungen. Von den eingesetzten 2×10^7 dpm konnten lediglich **72480 dpm** des Metaboliten gewonnen werden. Dies entsprach bezogen auf die applizierte Radioaktivität einem Anteil von 0,3 %. Möglicherweise war eine geringere Sauerstoffzufuhr, einerseits in Relation zur erhöhten Schlammmenge, andererseits durch eine notwendige geringere Drehfrequenz des Schüttlers während der Inkubation, für diesen Unterschied verantwortlich. Unter der Annahme, dass der aromatische Charakter bzw. die Ringkohlenstoffe des NP bei M2 erhalten blieben (s. 3.5.2), entsprachen 72480 dpm **$3,44 \times 10^{-8}$ mol**, welche erfahrungsgemäß ein deutlich erkennbares UV-Vis-Signal liefern (FRIEDEL & ORCHIN, 1951).

Des Weiteren wurde der Einfluss der Wasserdampfdestillation auf den Metaboliten untersucht, da bei den gewählten Bedingungen (100°C, pH 1-2, H₂O) bestimmte chemische Verbindungen instabil sind. Für die Ausbeute und Retentionszeiten (DC, HPLC) dieses Metaboliten war es dabei unerheblich, ob eine Wasserdampfdestillation durchgeführt wurde oder nicht.

3.5.2 UV-Vis Untersuchungen

UV-Vis-Analysen dienen vornehmlich zur Identifizierung von bestimmten funktionellen Gruppen innerhalb eines Moleküls. Dabei lassen sich insbesondere konjugierte Doppelbindungssysteme (z. B. Aromaten) durch charakteristische, intensive Absorptionsbanden nachweisen. Substanzen mit einfachen, nicht konjugierten Chromophoren absorbieren im fernen UV, bei meist starker Überlappung der Absorptionsbanden, so dass diese Spektralbereiche nicht verwendet werden können. Die Spektren wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl mit Hilfe der Photomesszelle des HPLC-Systems erstellt (System 1), als auch mittels eines Einstrahlphotometers, um genaue Werte für die Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge zu erhalten (s. 2.5.5.2).

Da der Radio-Detektor des HPLC-Systems mit dem UV-Vis-Detektor gekoppelt war, ließen sich die Signale unter Berücksichtigung einer zeitlichen Differenz einander zuordnen. Der Vergleich der Chromatogramme zeigte ein deutliches UV-Signal (Absorption bei 280 nm), welches dem Radiosignal von M2 entsprach. Des Weiteren

ließen sich mit dem HPLC-System vollständige UV-Vis-Spektren aufnehmen (s. Abbildung 3.21).

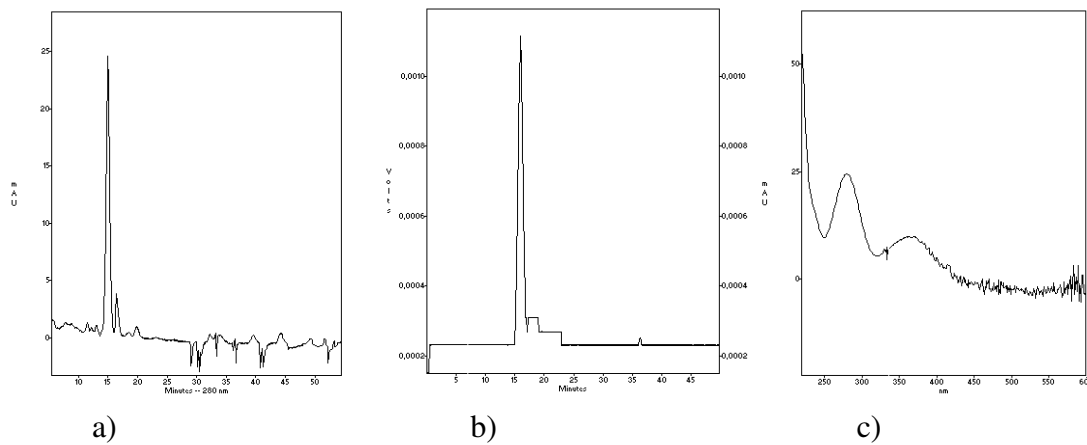


Abbildung 3.21 HPLC-Chromatogramme und UV-Vis-Spektrum von M2 (präparativer Ansatz): a) HPLC-Chromatogramm bei einer Absorptionswellenlänge von 280 nm ; b) Radio-HPLC-Chromatogramm; c) UV-Vis-Spektrum von M2 bei einer Retentionszeit von 16,04 min.

Identische UV-Vis-Spektren wurden durch direkte Messung des gereinigten M2-Extraktes im Photometer erhalten. Hierdurch konnten die Wellenlängen der beobachteten Absorptionsmaxima und die dazugehörigen Extinktionen ermittelt werden. Mit Hilfe der konzentrationsabhängigen Extinktionswerte ließen sich schließlich, bei Kenntnis der gelösten Stoffmenge, mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die wellenlängenspezifischen molaren Extinktionskoeffizienten berechnen (Tabelle 3.5).

Die Standardsubstanzen wurden in zwei verschiedenen Konzentrationen vermessen, die Messungen des Metaboliten M2 wurden unter Verwendung der gesamten isolierten Substanzmenge vorgenommen. Da 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol als Referenzsubstanz nur in geringen Mengen vorlag, wurden UV-Vis-Spektren von t-NP als Vergleichsstandard herangezogen. Lösungsmittel war in allen Fällen Methanol.

Tabelle 3.5 UV-Vis-Absorptionsbandenmaxima und die dazugehörigen molaren Extinktionskoeffizienten des Metaboliten M2 und der Referenzsubstanzen in Methanol im Messbereich von 200-600 nm.

Substanz	Absorptionsbandenmaximum [nm]	molarer Extinktionskoeffizient ϵ
M2-Metabolitenextrakt	277,2	7300
	359,6	2700
t-NP	277,2	1900
4-Methylbrenzcatechin	283,6	1700
4-tert.-Butylbrenzcatechin	280,6	3600
4-Hydroxyacetophenon	283,6	14100

3.5.3 GC/MS-Untersuchungen

GC/MS-Analysen unbekannter Substanzen sind in der Regel nur schwierig durchzuführen. Dies liegt unter anderem an fehlenden Kenntnissen über die Flüchtigkeit bzw. über die thermische Stabilität der Substanz. Das TIC des unveränderten Metabolitenextrakts war in diesem Zusammenhang erwartungsgemäß kaum auswertbar, da die Substanzen aufgrund der Aufarbeitung relativ polar sein und daher eine geringe Flüchtigkeit besitzen sollten (s. 3.5.1). Es wurde deshalb versucht, durch Derivatisierung des gesamten Metabolitenextrakts mit MSTFA eventuell vorhandene funktionelle Gruppen (z. B. Alkohole, Phenole, Carbonsäuren) zu derivatisieren und somit allgemein die Flüchtigkeit der Inhaltsstoffe zu erhöhen (s. 2.5.7.4). Dennoch war es möglich, dass M2 z. B. aufgrund thermischer Instabilität im TIC nicht sichtbar war.

Eine weitere Problematik ergab sich aus der großen Anzahl chemischer Stoffe in Belebtschlamm. Da Kapillarsäulen für die GC eine wesentlich höhere Trennstufenanzahl als HPLC-Säulen besitzen, werden Substanzen, welche in der HPLC-Analytik coeluieren, durch gaschromatographische Methoden weiter aufgetrennt. Der empfindlichste präparative Aufreinigungsschritt für M2 wurde mit Hilfe der Radio-HPLC durchgeführt, wobei offensichtlich einige Begleitsubstanzen nicht abgetrennt wurden, welche sich erst bei der GC-Analyse nachweisen ließen.

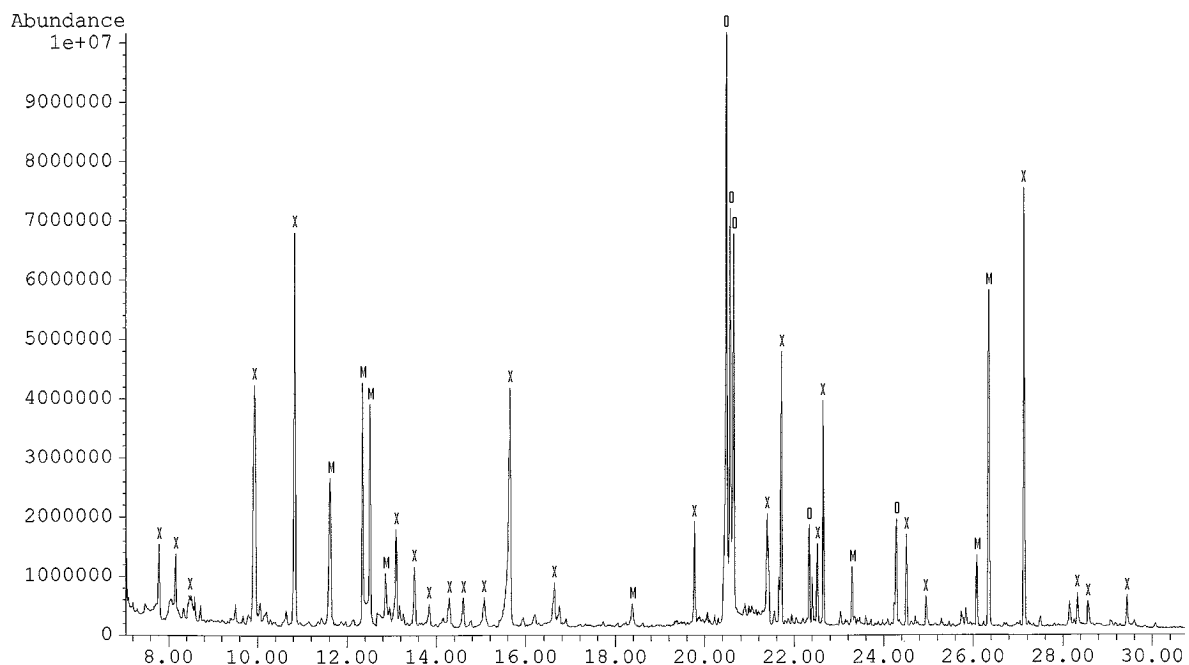


Abbildung 3.22 TIC des Metabolitenextraktes: X: Verunreinigungen des MSTFA oder der Lösungsmittel; O: durch Datenbanken identifizierte Begleitstoffe im Metabolitenextrakt; M: mögliche Peaks von M2.

Durch die Verwendung von MSTFA, der HPLC-Laufmittel und der Lösungsmittel nach der Aufreinigung ergaben sich im Gas-Chromatogramm weitere Peaks, welche das Auffinden des gesuchten Metabolitenpeaks (M2) zusätzlich erschwerten. Viele der im Metabolitenextrakt auftretenden Peaks konnten allerdings durch Vergleich mit derivatisierten Standards und mit Hilfe von Datenbanken zugeordnet werden (Abbildung 3.22).

In der Abbildung 3.22 mit "O" gekennzeichnete Stoffe wurden über eine Datenbank mit hoher Wahrscheinlichkeit identifiziert, wobei es sich hauptsächlich um Zucker (z. B. D-Glucose, D-Xylose) handelte. Aufgrund der abgeschätzten Stoffmenge von M2, welche auf Messungen der Radioaktivität beruht, kann davon ausgegangen werden, dass das entsprechende Signal des Massendetektors eine relativ hohe Intensität besitzt. Die massenspektroskopischen Zerfallsmuster möglicher Peaks von M2 ("M") wurden auf Strukturmerkmale hin untersucht und mit den derivatisierten Standards des NP und der Referenzsubstanzen verglichen. Dabei ließen sich lediglich bei der GC-MS-Analyse des mit MSTFA derivatisierten *tert*-Butylbrenzcatechin Ähnlichkeiten mit dem Massenspektrum eines TIC-Doppelpeaks des Metabolitenextraktes (Retentionszeit 12,345 min und 12,513 min: m/z 228, 184, 147, 134, 110, 91, 77, 73, 57; s. Anhang) feststellen. Diese Fragmentationen bzw. deren Massendifferenzen konnten allerdings, außer m/z 91 und 77 für Aromaten, keiner charakteristischen Gruppe zugeordnet werden.

Typische Verunreinigungen als Ursache der mit "M" gekennzeichneten Peaks wie z. B. Weichmacher aus PE-Geräten oder GC-Säulenbluten konnten ausgeschlossen werden. Letztlich ließ sich keiner der mit "M" gekennzeichneten Peaks eindeutig dem isolierten radioaktiven Metaboliten M2 zuordnen.

3.5.4 Diskussion

Die gemessene UV-Adsorptionsbande des isolierten Metaboliten M2 bei 277,2 nm lag in einem für Aromaten charakteristischen Bereich. Des weiteren lieferte der direkte Vergleich der UV-Vis-Spektren von M2 mit demjenigen des t-NP einen Hinweis darauf, dass der phenolische Kern des NP unverändert geblieben war. Beide Substanzen besaßen eine Absorptionsbande mit einem Maximum bei 277,2 nm. Der Metabolit M2 besaß zusätzlich eine schwächere Bande mit einem Maximum bei 359,6 nm. Für die UV-Vis-Spektroskopie gilt: "Liegen zwei Chromophore oder Auxochrome vor, welche voneinander durch isolierende Gruppen (z.B. -CH₂-) separiert sind, kann keine effektive Konjugation erfolgen und ihre spektralen Eigenschaften können so behandelt werden, als ob es sich um zwei Moleküle handelt." (FRIEDEL & ORCHIN, 1951). Dieser Sachverhalt ist auf Grund der Alkylkette des NP gut vorstellbar und würde bedeuten, dass M2 einen alkylierten phenolischen Molekülteil enthielt und, getrennt durch eine isolierende Gruppe (quarternäres

α -Kohlenstoffatom des eingesetzten NP-Isomers), einen weiteren Chromophor, welcher die Absorptionsbande bei 359,6 nm verursachte.

Der berechnete molare Extinktionskoeffizient ϵ der Absorptionsbande bei 277,2 nm besaß einen für Aromaten charakteristischen Wert, war im Metabolitenextrakt jedoch um den Faktor 3,8 größer als bei NP-Standardlösungen. Bei dieser Berechnung waren allerdings mehrere Fehlerquellen möglich; ein Vergleich der ϵ -Werte konnte demzufolge lediglich zur Abschätzung dienen.

Schwierig zu interpretieren war die Absorptionsbande bei 359,6 nm, welche auf ein weiteres Doppelbindungssystem mit vier bis sechs konjugierten Doppelbindungen hinwies. Unter Berücksichtigung der Alkylkettenstruktur des 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenols war die Bildung eines Konjugats nach vorheriger Hydroxylierung der Alkylseitenkette denkbar, welches ein komplexes Doppelbindungssystem enthält.

Nach Ausschluss der im TIC des Metabolitenextraktes sichtbaren Peaks, welche durch MSTFA verursacht wurden, zeigten vor allem die mit "O" und "M" gekennzeichneten Peaks eine hohe Intensität. "O-Substanzen" wurden über Datenbanken als Zuckerverbindungen identifiziert und besaßen durchweg keine UV-Vis-Aktivität, so dass diese die gemessenen UV-Absorptionsbanden bei 277,2 nm und 359,6 nm nicht hätten verursachen können. Bei den "M-Substanzen" hingegen besaßen drei Signale aromatische Ionenfragmente, welche für die UV-Absorptionsbande bei 277,2 nm verantwortlich gewesen sein könnten.

Es wird deutlich, dass die durchgeführte Aufreinigung des radioaktiven Metaboliten nicht ausreichte, um eine eindeutige Zuordnung der Peaks in der GC-MS-Analyse zu ermöglichen. Die UV/VIS-Spektren des Photometers und der HPLC-Photomesszelle, welche in Bezug auf Begleitsubstanzen eine höhere Trennschärfe besitzt, stimmten hingegen überein, so dass das aufgenommene UV/VIS-Spektrum mit hoher Wahrscheinlichkeit dem Radio-HPLC Peak von M2 zugeordnet werden konnte. Insgesamt legten die Resultate der UV-Vis-Untersuchungen nahe, dass M2 einen NP-ähnlichen Phenolteil und einen weiteren unbekanntem Chromophor (Doppelbindungssystem) besitzt, welche durch eine isolierende Alkylgruppe getrennt sind.

3.6 Synthese von [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-4-(3',6'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol

In Gegenwart einer Lewis-Säure (z.B. BF_3) reagieren Alkohole mit Phenol gemäß der nach Friedel und Crafts (1877) genannten Alkylierung zu Alkylphenolderivaten. Die freien Elektronenpaare des phenolischen Hydroxylsubstituenten dirigieren dabei über mesomere Effekte das Elektrophil in die *ortho*- und *para*-Stellung, wobei mehrfach substituierte Produkte häufig auftreten.

Die Reaktionsbedingungen und die Ansatzgröße wurden der Literatur entnommen (VINKEN et al., 2002). Zunächst wurde die Reaktion ohne radioaktiv markierte Edukte durchgeführt, um die analytischen Methoden zu erproben und Referenzsubstanzen zu erhalten (s. 2.5.7.5). Nachfolgend wurde die Reaktion unter Zusatz geringer Mengen an [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-Phenol wiederholt. Hierdurch wurden die Reproduzierbarkeit der Synthese und die Radio-Analytik überprüft. Die absolute Ansatzgröße dieser beiden vorbereitenden Synthesen entsprach derjenigen der präparativen Synthese des [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-4-(3',6'-Dimethyl-3'-heptyl)phenols.

Die Reaktionsprodukte der kalten und schwach heißen Synthese wurden mittels DC (Toluol:Methanol 9:1), HPLC (Elutionsprogramm I) und GC-MS (Messbedingungen II) analysiert. Die Produktverteilung des Rohproduktes (Ausbeute 73-75 % d. Th.) war gemäß GC-MS-Analyse in beiden Synthesen nahezu identisch mit 4-(3',6'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol als Hauptprodukt (82 %) und zwei Nebenprodukten (3 % und 9 %). Die Identifizierung des Hauptproduktes gelang mit Hilfe des t-NP als Referenzsubstanz durch Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren. Es ließ sich dabei auch nachweisen, dass 4-(3',6'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol ein Hauptisomer des t-NP ist (Peak 5 in Abbildung 3.23 b); s. Anhang). Bei den Nebenprodukten handelt es sich nach Analyse der Massenspektren (s. Anhang) mit hoher Wahrscheinlichkeit um das *o*-Isomer 2-(3',6'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol (3 % des Rohproduktes) und das dialkylierte *o*-, *p*-Isomer 2,4-bis-[3',6'-Dimethyl-3'-heptyl]phenol (9 % des Rohproduktes). Dieses Ergebnis entsprach dabei den theoretischen Vorhersagen einer Friedel-Crafts-Alkylierung (VOLLHARDT, 1990). Der geringe Anteil der Nebenprodukte kann durch eine sterische Hinderungen des voluminösen Alkylrestes zur phenolischen Hydroxygruppe erklärt werden.

Nach DC-Aufreinigung zweier isolierbarer Bereiche der präparativen Synthese wurden diese separat analysiert. Sowohl Radio-DC- als auch Radio-HPLC-Analysen zeigten reine Substanzen (>99%) mit Retentionszeiten, die den Referenzen aus den Kontrollreaktionen entsprachen. GC-MS-Analysen wiesen erwartungsgemäß leichte Verunreinigungen des [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-4-(3',6'-Dimethyl-3'-heptyl)phenols mit [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-2-(3',6'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol von ca. 2,5 % auf, welche bei der Berechnung der Gesamtausbeute berücksichtigt wurden. Vom gewünschten [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-4-(3',6'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol wurden nach Aufreinigung **18,87 MBq** ($1,13 \times 10^9$ dpm) mit einer Reinheit von > 97 % erhalten. Dies entsprach bezogen auf die eingesetzte [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-Phenol-Menge einer Gesamtausbeute von **58 % d.Th.** Vom aufgereinigten *o*-, *p*-Isomer 2,4-bis-[3',6'-Dimethyl-3'-heptyl]phenol wurden 2,66 MBq ($1,6 \times 10^8$ dpm) mit einer Reinheit von > 99 % erhalten. Die spezifische Radioaktivität beider Produkte wird über die Herstellerangabe des [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-Phenols zu **298 MBq/mmol** berechnet.

3.7 Abbauverhalten der *p*-Isomere des technischen Nonylphenol-Isomerengemisches in Belebtschlamm

Einer gleichzeitigen Untersuchung aller Isomere des t-NP sind aus analytischer Sicht enge Grenzen gesetzt. Zum einen ist keine Trennmethode für die strukturell teilweise sehr ähnlichen Isomere des t-NP bekannt, welche in der Lage ist alle Isomere zu separieren. Des weiteren liefert bereits der Metabolismus eines einzelnen NP-Isomers in Belebtschlamm ein nahezu unüberschaubares Spektrum an Metaboliten (s. 3.4). Dennoch lässt sich unter Verwendung der bis heute besten (gas-)chromatographischen Trennungsmethode für t-NP zumindest die Abbaukinetik vieler Isomere bzw. Isomerengruppen vergleichen. Eine wertvolle Hilfe ist dabei die Extraktion von NP aus Belebtschlamm durch die Wasserdampfdestillation, welche ausreichend saubere Extrakte liefert, um sie direkt in einer gaschromatographischen Analyse einzusetzen.

3.7.1 Gaschromatographische Auftrennung des Isomerengemisches

Grundlage für die gaschromatographische Analyse des t-NP war die Forschungsarbeit von WHEELER et al. (1997), in der es gelang, die *p*-Isomere des t-NP mit Hilfe einer speziellen 100 m-GC-Kapillarsäule und verschiedenen Analysetechniken (z.B. Temperaturprogrammen) in 22 Signale aufzutrennen (s. 1.7). Für die meisten Signale wurde außerdem ein Massenspektrum erhalten, welches zur Aufklärung bestimmter Strukturmerkmale herangezogen werden konnte. Die genaue Struktur der im t-NP vorkommenden Isomere ist bislang nur in Einzelfällen bekannt (KIM et al., 2004).

Mit Hilfe einer analogen 100 m-GC-Kapillarsäule wurde die beschriebene Analytik in leicht abgewandelter Form etabliert und auf die vorliegende Problematik angewendet. Es wurde ein isothermisches Temperaturprogramm bei 200°C verwendet, wobei jedoch zu Beginn der Messung ein Temperaturgradient von 100°C auf 200°C (5°C/min) vorgeschaltet wurde. Hierdurch konnte die Trennung im Vergleich zu einem reinen isothermischen GC-Lauf leicht verbessert werden. Entsprechende Temperaturprogramme mit einer isothermischen Trennungstemperatur von 160°C, 170°C, 180°C, 190°C und 210°C führten ebenfalls zu sehr guten Trennungsergebnissen bei kleinen Unterschieden der relativen Retentionszeiten einzelner Peaks. Diese Unterschiede konnten für eine Separation bestimmter Peaks gezielt ausgenutzt werden. Das standardmäßig eingesetzte Temperaturprogramm bei 200°C ermöglicht eine gute Auftrennung der Isomere (15 integrierbare Peaks) bei relativ kurzer Laufzeit. Eine Verringerung der Temperatur um 10°C führte durchschnittlich zu einer Verlängerung des Laufes um 10-15 min. Nachfolgend dargestellt ist ein GC-Chromatogramm unter Verwendung einer in der Literatur häufig

benutzten 30 m-GC-Kapillarsäule, verglichen mit einem Chromatogramm unter den beschriebenen Standardbedingungen (Abbildung 3.23).

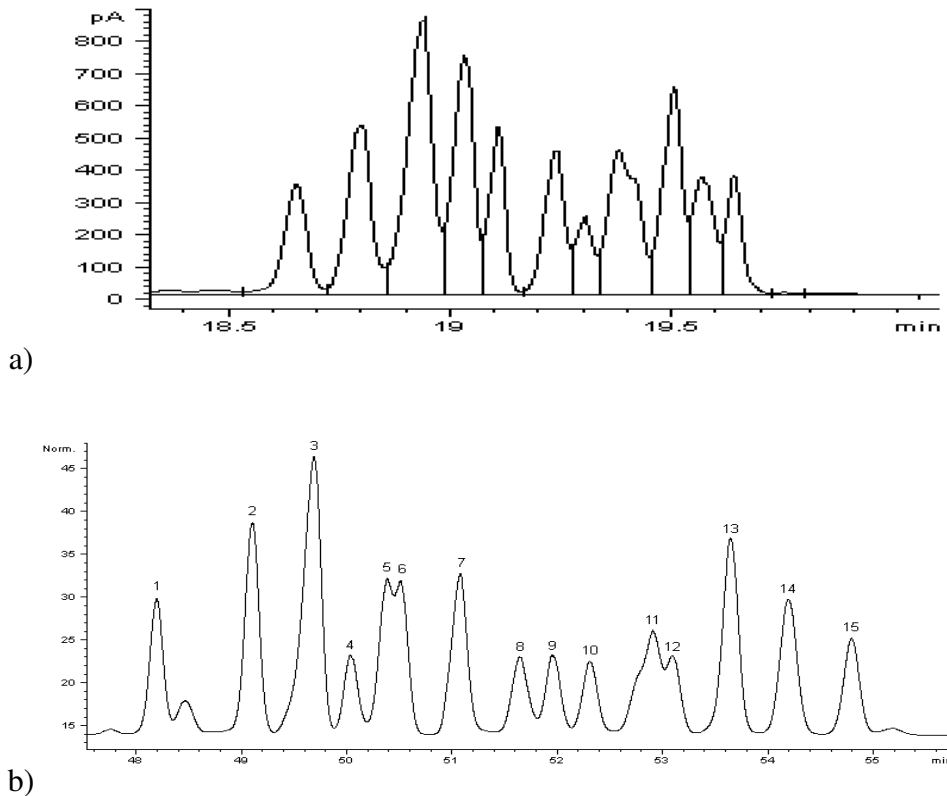


Abbildung 3.23 GC-FID-Chromatogramme der *para*-Isomere des t-NP: a) 30m-GC-Kapillarsäule (System 2); b) 100m-GC-Kapillarsäule (System 1) (Nummerierung entspricht der in Abbildung 3.24).

Die Linearität der 15 integrierbaren Peaks wurde mittels Standardlösungen über einen Konzentrationsbereich von 10 µg/ml – 1 mg/ml überprüft. Es ergaben sich lineare Abhängigkeiten der Konzentration zur integrierten Fläche mit Regressionskoeffizienten > 0,98.

3.7.2 Isomerenverteilung während der mikrobiellen Umsetzungen des t-NP in Belebtschlamm

Verglichen wurden die relativen Anteile einzelner Peaks der *p*-Isomere des t-NP in den Wasserdampfdestillationsextrakten nach 0 h, 24 h, 48 h und 96 h Inkubationszeit in Belebtschlamm (s. 2.5.2.2). In den sterilen Kontrollansätzen wurde mittels NaN₃ die mikrobiologische Aktivität minimiert. Nachfolgende Abbildung zeigt die

Veränderungen des t-NP-Isomerenmusters über den Inkubationszeitraum bei den sterilen sowie den unsterilen Ansätzen (Abbildung 3.24).

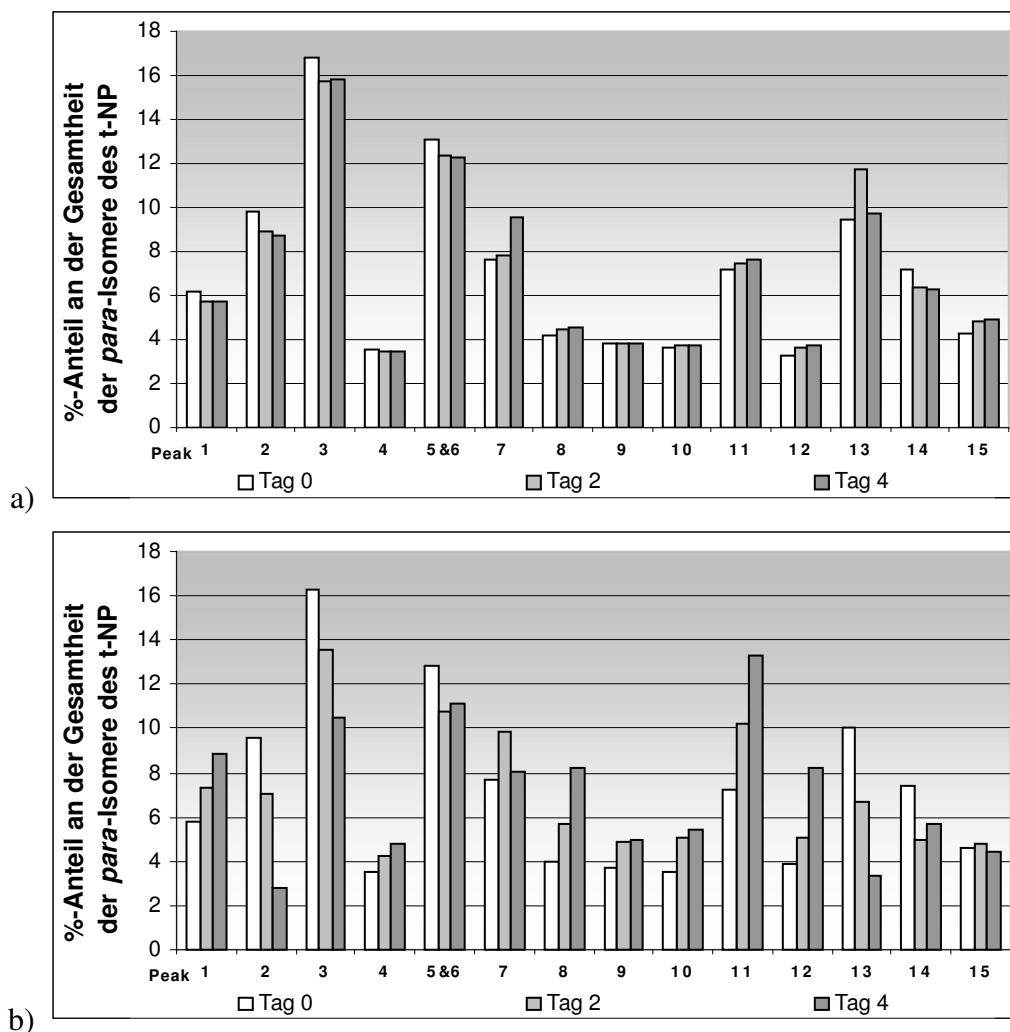


Abbildung 3.24 Vergleich des Isomerenmuster von t-NP nach Inkubation in Belebtschlamm nach 0 d, 2 d und 4 d (Mittelwerte aus drei Parallelen): a) sterile Ansätze; b) unsterile Ansätze (Nummerierung entspricht der in Abbildung 3.23 b).

Da die Peaks 5 und 6 in den Chromatogrammen nicht durchgängig unterscheidbar waren, wurden die Peaks zusammengefasst. Die sterilen Ansätze zeigten kaum Veränderungen des Isomerenmusters, wobei die Abweichungen für einige Isomere größer waren als die Schwankungen bei der Extraktion. Möglicherweise waren hierfür Unterschiede im physikalisch-chemischen Verhalten einzelner Isomere verantwortlich. In den unsterilen Ansätzen waren hingegen große Unterschiede zu erkennen. Dabei ließen sich für die meisten integrierten Peaks klare Tendenzen über die Zeit feststellen. Abnehmende relative Anteile repräsentierten leichter abbaubare Isomere und umgekehrt. Eine relativ bessere Abbaubarkeit ließ sich besonders bei den Peaks 2 und 13 feststellen, während andere *p*-Isomere (z. B. Peak 8 und 11) offenbar schwerer abgebaut wurden.

Des Weiteren wurden parallele Messungen von nicht dotierten Belebtschlammproben durchgeführt, wobei in einigen Fällen geringe Mengen an t-NP nachgewiesen werden konnten. Die Isomerenverteilung dieser Proben entsprach mit hoher Übereinstimmung derjenigen nach 96 h Versuchsdauer. Vor allem die Peaks 2 und 13 zeigten auch hier einen sehr geringen Anteil von 1,9 % und 3,2 % an der Gesamtheit aller *p*-Isomere, im Gegensatz zu 9,6 % und 10,0 % im authentischen t-NP.

3.7.3 Diskussion

Untersuchungen zum Abbauverhalten einzelner Isomere des t-NP in Belebtschlamm fehlen in der Literatur vollständig. Mit der meist verwendeten Routineanalytik (25-30 m-GC-Kapillarsäulen) lassen sich nur schlecht Unterschiede im Isomerenmuster erkennen, so dass alle Isomere als annähernd gleich gut abbaubar gelten (TOPP & STARRATT, 2000). Gestützt wird diese Schlussfolgerung mit Untersuchungen des t-NP-Abbaus durch isolierte Mikroorganismen, in denen sich die Nonylreste aller Isomere als Nonanole nahezu unverändert anreicherten (CORVINI et al., 2004; FUJII et al., 2000; FUJII et al., 2001).

Die genauen Strukturen der Isomere sind bislang nicht vollständig bekannt, so dass Zusammenhänge zwischen der Verzweigungsstruktur der Alkylkette und der Abbaukinetik noch nicht eindeutig rekonstruiert werden können. Die Aufklärung dieser Strukturen ist zur Zeit Gegenstand aktueller Forschungen.

Auffällig in der vorliegenden Arbeit war indessen, dass alle Isomere, welche laut WHEELER et al. (1997) zur Gruppe der α -Dimethyl-konfigurierten *p*-Isomere zählen, eher schnell abgebaut wurden, wohingegen die Isomere mit α -methyl- und α -methyl-, α -propyl-Konfiguration einem relativ langsamen Abbau unterlagen.

Besonders auffällig waren die beiden häufigsten Isomere des t-NP (Peaks 2 und 13) auf Grund ihrer hohen Abbaugeschwindigkeit. Die chemischen Strukturen der Hauptbestandteile dieser Peaks wurden bereits als 4-(1',1',3'-Trimethyl-hexyl)phenol (Peak 2) bzw. 4-(1',1',2'-Trimethyl-hexyl)phenol (Peak 13) identifiziert und unterscheiden sich lediglich in der Stellung einer Methylgruppe (KIM et al., 2004). Bei der gaschromatographischen Analyse von t-NP-Extrakten aus Muscheln des nordamerikanischen Ontario-Sees waren diese beiden Signale des t-NP ebenfalls aufgefallen, da sie im Vergleich zum t-NP-Standard, vermutlich durch mikrobiellen Abbau, deutlich kleiner ausfielen (BENNET & METCALFE, 2000).

4 Abschließende Diskussion

Ziel der Arbeit war es Informationen über das Abbauverhalten der Umweltchemikalie t-NP in Belebtschlamm zu erlangen. Bisherige Metabolismusstudien behandeln die Isomere des t-NP überwiegend als Gesamtheit und differenzieren nicht zwischen den verschiedenen Strukturisomeren. Geringe Abweichungen in der chemischen Struktur können jedoch, wie die PCB-Forschung gezeigt hat, die Eigenschaften eines Stoffes deutlich verändern. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit definierte ^{14}C -markierte NP-Isomere (4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol; 4-(3',6'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol; 4-n-NP) verwendet, welche sich, außer im Falle des linearen Isomers 4-n-NP, als Bestandteil von t-NP nachweisen ließen. In Laborsystemen konnte daraufhin ihr Abbauverhalten im einzelnen untersucht werden.

Die bedeutendste Quelle für t-NP in der Natur und in Kläranlagen stellen die NPEOs dar (BUA-STOFFBERICHT, 1988). Diese werden vermutlich bereits im Kanalnetz teilweise zu t-NP abgebaut, so dass über den Influent je nach Art der Einleiter und Beschaffenheit des Kanalnetzes eine stark variierende Mischung aus NPEOs, deren Abbauprodukten und t-NP in die Kläranlage gelangen (GIGER et al., 1986). NP ist dabei das letzte bekannte Zwischenprodukt des aeroben NPEO-Abbaus und besitzt im Effluent nur einen geringen Anteil an der Gesamtheit aller NP-enthaltenden Substanzen (AHEL et al., 1994a). Vollständige NP-Bilanzen in Kläranlagen lassen sich daher nur unter Berücksichtigung aller NP-enthaltenden Substanzen aufstellen.

Im Bereich der einfachen mikrobiellen Abbaukinetik von t-NP in Belebtschlamm wurden einige Aspekte wie z. B. die Temperatur- und Sauerstoffabhängigkeit untersucht (TANGHE et al. 1998). Vor allem die Verfügbarkeit von Sauerstoff besitzt beim Abbau von NP eine besondere Bedeutung. So wird NP unter anaeroben Bedingungen nicht abgebaut (EJLERTSSON et al., 1999; GIGER et al., 1984). Auch lässt sich zwischen Abbaurate des NP und der Sauerstoffsättigung von Schlamm-Boden-Mischungen eine Korrelation feststellen (GEJLSBJERG et al., 2001; HESSELOE et al., 2001). Eine verbesserte Elimination von t-NP in Kläranlagen könnte entsprechend durch eine längere bzw. intensivere Behandlung mit Sauerstoff erreicht werden. Eine vollständige Elimination des t-NP ist allerdings aufgrund der starken Adsorption an Feststoffe und wegen der Diffusion in anaerobe Zonen der Klärschlammteilchen sehr unwahrscheinlich, so dass im Faulschlamm stets NP zu finden sein wird.

Im Bereich des aeroben Abbaus lassen sich für die ersten Schritte des Metabolismus von NP-Isomeren auf der Grundlage bisheriger Forschungen grundsätzlich drei mikrobielle Metabolismuswege formulieren: Abspaltung der Alkylkette vom Phenolteil, Transformation der Alkylkette und Spaltung des Phenolrings. Eine zusammenfassende Darstellung liefert Abbildung 4.1. Nach der Ringspaltung von phenolischen Substanzen erfolgt der weitere Abbau gewöhnlich über Pyruvat und

Acetaldehyd, welche im Tricarbonsäurezyklus verstoffwechselt werden (UM-BDD, 2003).

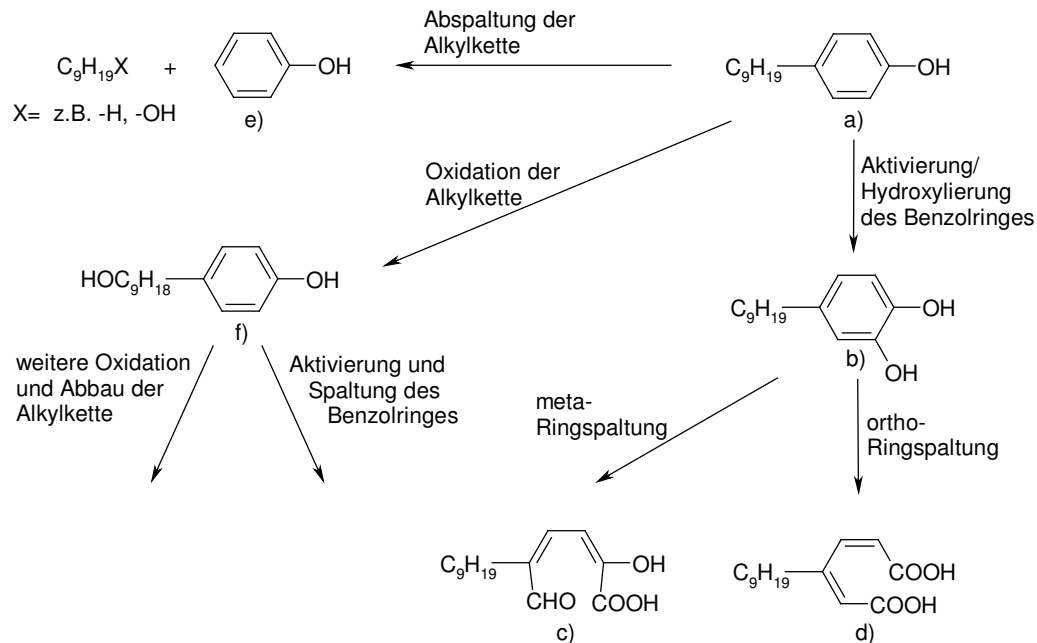


Abbildung 4.1 Mögliche aerobe Metabolismuswege für *para*-Isomere des t-NP. a) Isomer des NP mit verzweigter Alkylkette (z. B. 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol); b) 4-(Nonyl)catechol; c) 2-Hydroxy-4-nonyl-muconsäure-semialdehyd; d) 3-(Nonyl)muconsäure; e) Phenol; f) 4-(Hydroxynonyl)phenol (FUJII et al., 2000; BOKERN & HARMS, 1997; HOPPER, 1991; GIBSON & SUBRAMANIAN, 1984).

Bisherige Forschungen mit isolierten Bakterienstämmen, welche t-NP als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen können, legten die Vermutung nahe, dass beim NP-Abbau zuerst der Phenolteil transformiert wird (Abbildung 4.1b-d; FUJII et al., 2000; CORVINI et al., 2004). Allerdings können isolierte Reinkulturen kein hinreichendes Abbild der Abbauvorgänge in einem Ökosystem liefern (SLATER & LOVATT, 1984), denn Cometabolismus sowie die metabolischen Wechselwirkungen innerhalb der komplexen Belebtschlammbiozönose werden unter diesen Laborbedingungen nicht berücksichtigt. So konnte im Fall der strukturell verwandten linearen Alkylbenzolsulfonate eine vollständige Mineralisierung erst durch ein bakterielles Konsortium aus vier Bakterienstämmen erreicht werden (JIMÉNEZ et al., 1991). Insofern stehen die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Metabolismusstudien in Belebtschlamm, welche auf eine frühe Transformation der Alkylseitenkette hinweisen (Abbildung 4.1f), nur scheinbar im Widerspruch zu den Ergebnissen des t-NP-Abbaus durch Reinkulturen. Die Frage, in welchem Stadium des Metabolismus es zur Spaltung des Phenolrings kommt, könnte sich für die Bewertung der hormonellen Wirksamkeit von NP-Metaboliten als wichtig erweisen, da die meisten hormonell wirksamen Substanzen einen *para*-substituierten phenolischen

Molekülteil besitzen, der vermutlich für die Wechselwirkung mit dem menschlichen Östrogenrezeptor erforderlich ist (WITORSCH, 2000).

Auch lässt sich in den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Metabolismusstudien die Bildung zunehmend polarer Metaboliten belegen. Dies ist charakteristisch für den aeroben Abbau von organischen Substanzen in Kläranlagen und kann mit einer kontinuierlichen Oxidation durch enzymatische Insertion von z. B. Hydroxy- oder Carboxygruppen erklärt werden (SCHLEGEL, 1992). In Übereinstimmung hiermit wurden zu Beginn der Versuche noch relativ unpolare, wasserunlösliche Metaboliten nachgewiesen, welche größtenteils während der Aufarbeitung am Feststoff des Belebtschlammes gebunden blieben. Später stieg die Konzentration der Radioaktivität in den wässrigen Fraktionen an, was auf die Bildung polarer und wasserlöslicher Metaboliten hinweist. Schließlich wurden diese vollständig zu CO₂ oxidiert. Ein Teil der Metaboliten wurde in die Biomatrix inkorporiert und konnte als radioaktiver Feststoff durch Verbrennung quantifiziert werden.

Prinzipiell gilt diese metabolische Abfolge sowohl für das lineare 4-*n*-NP, als auch für das stark verzweigte 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol. Es lassen sich allerdings bereits nach 24 h in entsprechenden Fraktionen beider Isomere qualitative und quantitative Unterschiede in Bezug auf die Metabolitenzusammensetzung feststellen. Zudem verläuft die erste Biotransformation des 4-*n*-NP wesentlich schneller, so dass bereits beim ersten Schritt des Abbaus divergierende Metabolismuswege angenommen werden können. Es kann so vermutet werden, dass das lineare Isomer gemäß der β -Oxidation rasch transformiert wird, während die verzweigten Isomere über diesen weit verbreiteten Metabolismusweg nicht abgebaut werden können (KOOLMAN & RÖHM, 1994).

Insgesamt zeigten sich gravierende Abweichungen beim Abbauerhalten der beiden untersuchten Isomere 4-*n*-NP und 4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol, so dass 4-*n*-NP nicht als Modellsubstanz für den Abbau von t-NP verwendet werden sollte, wie dies bisher häufig in der Literatur zu finden ist. Forschungsarbeiten, welche das Adsorptionsverhalten von NP-Isomeren in Böden betreffen, belegen auch in dem Bereich des chemisch-physikalischen Verhaltens relevante Unterschiede zwischen 4-*n*-NP und t-NP (DÜRING et al., 2002).

In einigen der vorliegenden Untersuchungen konnte darüber hinaus ein ungewöhnliches Verhalten beim Zusammenwirken von t-NP und 4-*n*-NP beobachtet werden. So konnten mit dansylierten 4-*n*-NP-Standards problemlos Eichgeraden angefertigt werden, wogegen Konzentrationsmessungen von Eichgeraden, welche nur mit t-NP-Standards erstellt wurden, stark voneinander abwichen. Unter Verwendung von 4-*n*-NP als internem Standard zeigten beide Substanzen wiederum gleichartige Schwankungen, so dass sich schließlich Eichgeraden mit hohen Korrelationskoeffizienten (> 0,99) erstellen ließen. Zudem wurden bei der Wasserdampfdestillation reiner t-NP- oder 4-*n*-NP-Standards hohe Extraktionsausbeuten erzielt, während bei der gleichzeitigen Extraktion für 4-*n*-NP geringfügig schlechtere Ausbeuten erreicht wurden. Diese Beobachtungen liefern

Hinweise auf eine mögliche Interaktion zwischen dem linearen NP-Isomer und den verzweigten Isomeren des t-NP. Ein vergleichbares Verhalten wurde im Phasensystem Boden-Wasser-Luft festgestellt, wobei bevorzugt verzweigte NP-Isomere in die Gasphase entweichen (DÜRING, 2001).

Vom analytischen Standpunkt aus stellt die chromatographische Analyse des t-NP eine große Herausforderung dar. Die bislang beste Auftrennung des Isomerengemisches wird mit Hilfe einer speziellen 100 m-GC-Kapillarsäule erreicht, welche in der vorliegenden Arbeit erstmals mit der Wasserdampfdestillation kombiniert wurde, um eine optimale Untersuchung des t-NP in Umweltproben zu ermöglichen. Eine vollständige chromatographische Auftrennung wird allerdings trotz der sehr hohen theoretischen Bodenanzahl von ca. 400000 nicht erreicht. Problematisch ist auch, dass alle Isomere mit α -dimethyl-Konfiguration identische Massenspektren liefern, so dass eine sichere Unterscheidung nicht zu treffen ist (WHEELER et al., 1997). Dennoch konnte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe dieser Analytik eine differenzierte Abbaustudie des t-NP im Hinblick auf die Isomere bzw. Isomerengruppen durchgeführt werden, wobei für verschiedene *p*-Isomere des t-NP unterschiedliche Abbaugeschwindigkeiten festgestellt wurden. Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass bestimmte Substitutionsmuster am α -Atom der Alkylseitenkette die Geschwindigkeit des Abbaus beeinflussten. Besonders gut abbaubare Isomere besaßen durchweg eine α -dimethyl-Konfiguration, schlechter abbaubare Isomere hingegen eine α -methyl- bzw. α -methyl-, α -propyl-Konfiguration.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Nonylkette des NP-Moleküls einen Einfluss auf dessen Abbaubarkeit besitzen muss. Vermutlich verändern bereits geringfügige Abweichungen der Alkylkette die Affinität der NP-Isomere zu den Enzymen, welche für die Biotransformationen verantwortlich sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen auch, dass die Untersuchung eines einzelnen NP-Isomers nicht als Maßstab für die Gesamtheit aller Isomere dienen kann. Dies gilt insbesondere für das lineare 4-*n*-NP, welches strukturchemisch einen Sonderfall darstellt.

Ein vollständiges Verständnis des Verhaltens von t-NP in der Umwelt kann nur durch eine differenzierte Betrachtung der enthaltenen Isomere gewonnen werden. Bei genauer Kenntnis der Schadwirkung und des Abbauverhaltens aller Isomere des t-NP wäre z.B. eine Änderung des Herstellungsprozesses denkbar, welcher zu einer verminderten Produktion besonders schädlicher Isomere führt. Die vorliegende Arbeit konnte lediglich einen Beitrag zur isomerenspezifischen Aufklärung der t-NP-Problematik leisten, zeigt aber die Notwendigkeit auf, in ökochemischen Forschungsarbeiten die exakten chemischen Strukturen der verwendeten Substanzen zu berücksichtigen.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war, das Schicksal definierter NP-Isomere in Belebtschlamm bilanzierend aufzuklären. Dies gelang durch die Verwendung von ^{14}C -markierten Isomeren, deren Verhalten schließlich verglichen werden konnte. Spezielle Analysetechniken ermöglichten die Untersuchung des Abbauverhaltens aller im t-NP vorkommenden Isomere bzw. Isomerengruppen.

^{14}C -markierte NP-Isomere: Ausgehend von [^{14}C (U)]-Phenol und 3,6-Dimethyl-3-heptanol wurde gemäß einer Friedel-Crafts-Alkylierung das im t-NP enthaltene *p*-Isomer [^{14}C (U)]-4-(3',6'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol synthetisiert (spezifische Radioaktivität 298 MBq/mmol). Nach Aufreinigung wurden 18,87 MBq ($1,13 \times 10^9$ dpm) des Isomers erhalten, dies entspricht einer Gesamtausbeute von 58 % d.Th. [^{14}C (U)]-4-*n*-Phenol war kommerziell erhältlich.

Methodenentwicklung zur Analyse von NP: Es wurde eine HPLC-Analysemethode zur gleichzeitigen Quantifizierung von 4-*n*-NP, t-NP und BPA entwickelt. Mit Dansylchlorid werden die Phenole zunächst in ihre Dansylderivate überführt und nach chromatographischer Auftrennung über ihre Fluoreszenz detektiert. Für 4-*n*-NP und t-NP werden Detektionsgrenzen von 0,5 ng (4-*n*-NP: S/N 4,5; t-NP: S/N 3,6) erreicht. Es wurden mehrere Methoden zur Extraktion von NP aus wässrigen Lösungen und Belebtschlammproben miteinander verglichen. Hierbei erwies sich die Wasserdampfdestillation mit gleichzeitiger flüssig-flüssig-Extraktion des Destillats mit Hexan, welche auch bei der Extraktion von Belebtschlamm sehr saubere Extrakte liefert, als beste Methode (Extraktionsausbeute bei Belebtschlamm: $94 \pm 4\%$, bei wässrigen Standardlösungen: $98,9 \pm 0,6\%$). Eine Kombination aus dieser Extraktionsmethode und einer von WHEELER et al. (1997) entwickelten GC-Analytik wurde zur Untersuchung des Abbauverhaltens von t-NP-Isomeren eingesetzt.

Adsorptionsverhalten von NP: Das Adsorptionsverhalten von wässrigen NP-Lösungen bei Kontakt mit unterschiedlichen Materialien wurde untersucht und verglichen. Vor allem Silikon-Kautschuk stellte sich dabei als besonders gutes Adsorbens für NP heraus, so dass nach 24 h nahezu das gesamte NP der wässrigen Lösung adsorbiert wurde. Insgesamt zeigte NP in diesen Versuchen die Neigung, das wässrige Milieu zu verlassen. Die geringste Adsorption wurde bei den Materialien Glas und TEFLON[®] beobachtet.

Abbauverhalten definierter NP-Isomere in Belebtschlamm: Das Schicksal der beiden NP-Isomere [^{14}C (U)]-4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol und [^{14}C (U)]-4-*n*-NP wurde in Batch-Ansätzen mit Belebtschlamm bilanzierend untersucht. Dabei wurde für das

lineare Isomer eine etwa zehnfach höhere Abbaugeschwindigkeit festgestellt. Ebenfalls wurden bei der Mineralisierung und den Konzentrations-Zeit-Profilen weiterer Fraktionen deutlich abweichende Verläufe nachgewiesen. Die Ergebnisse der Radio-DC-Analysen bestimmter Extrakte legen außerdem die Bildung verschiedenartiger Metaboliten für beide Isomere nahe. Insgesamt muss davon ausgegangen werden, dass [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol und [$^{14}\text{C}(\text{U})$]-4-*n*-NP auf unterschiedliche Weise in Belebtschlamm metabolisiert werden.

In Zusammenhang mit diesen Untersuchungen wurde ein Metabolit ausgewählt, welcher nach Aufreinigung weitergehend untersucht wurde. Es wurde versucht, durch UV/VIS-Spektroskopie und GC/MS-Analysen strukturelle Informationen über den Metaboliten zu erhalten. Die Zuordnung der Signale zum NP-Metaboliten konnte jedoch auf Grund von Begleitsubstanzen nicht eindeutig durchgeführt werden, ein intakter Aromat als Bestandteil des Metaboliten ist hingegen wahrscheinlich.

Schließlich konnte nach Entwicklung spezieller Analysetechniken das Abbauverhalten der Isomere des t-NP untersucht werden. Dabei zeigten sich zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den Isomerengruppen. So sind die *p*-Isomere mit α -Dimethyl-Konfiguration durchweg leichter abbaubar als die *p*-Isomere mit α -Methyl-, α -propyl-Konfiguration.

6 Literaturverzeichnis

Ahel M., McEvoy J., Giger W. (1993). Bioaccumulation of the lipophilic metabolites of nonionic surfactants in freshwater organisms. *Environ. Pollut.* **79**, 243-248.

Ahel, M. (1987). Biogeochemical behaviour of alkylphenol polyethoxylates in the aquatic environment. Ph. D. thesis, University of Zagreb, Zagreb.

Ahel, M., Conrad, T., Giger, W. (1987) Persistent organic chemicals in sewage effluents. 3. Determination of nonylphenoxy carboxylic acids by high-resolution gas chromatography / mass spectrometry and high-performance liquid chromatography. *Envir. Sci. Toxicol.* **21**, 697-703.

Ahel, M., Giger, W (1993). Aqueous Solubility of Alkylphenols and Alkylphenol Polyethoxylates. *Chemosphere.* **26** (8), 1461-1470.

Ahel, M., Giger, W. (1993). Partitioning of Alkylphenols and Alkylphenol Polyethoxylates between Water and Organic Solvents. *Chemosphere.* **26** (8), 1471-1478.

Ahel, M., Giger, W., Koch, M. (1994). Behaviour of Alkylphenol Polyethoxylate Surfactants in the Aquatic Environment – I. Occurrence and Transformation in Sewage Treatment. *Wat. Res.* **28** (5), 1131-1142.

Ahel, M., Giger, W., Koch, M. (1994). Behaviour of Alkylphenol Polyethoxylate Surfactants in the Aquatic Environment – II. Occurrence and Transformation in Rivers. *Wat. Res.* **28** (5), 1143-1152.

Ahel, M., Molnar, E., Ibric, S., Giger, W. (2000). Estrogenic metabolites of alkylphenol polyethoxylates in secondary sewage effluents and rivers. *Water Sci. Technol.* **42**(7-8), 15-22.

Ahel, M., Schaffner, C., Giger, W. (1996). Behaviour of Alkylphenol Polyethoxylate Surfactants in the Aquatic Environment – III. Occurrence and Elimination of their Persistent Metabolites during Infiltration of River Water to Groundwater. *Wat. Res.* **30**(1), 37-46.

Allen, E., Doisy, E. A. (1923). An ovarian hormone: Preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals. *J. Am. Med. Assoc.* **81**, 819.

Amersham (2003). Radiochemical Decomposition - a guide to the properties and storage of radiolabelled compounds. Handbook. Amersham Bioscience, Uppsala.

Ashfield, L. A., Pottinger, T. G., Sumpter, J. P. (1998). Exposure of Female Juvenile Rainbow Trout to Alkylphenolic Compounds Results in Modifications to Growth and Ovosomatic Index. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 679-686.

Atkins, P. W. (1996). Physikalische Chemie. 2. Auflage. VCH, Weinheim

Ball, H. A., Reinhard, M., McCarty, P. L. (1989). Biotransformation of halogenated and nonhalogenated octylphenol polyethoxylate residues under aerobic and anaerobic conditions. *Envir. Sci. Technol.* **23**, 951-961.

Baumann, W., Herberg-Liedtke, B. (1993). Papier-Chemikalien: Daten und Fakten zum Umweltschutz. Springer Verlag, Heidelberg.

Bayly, R. C., Barbour, M. G. (1984) The degradation of aromatic compounds by the meta and gentisate pathways. In: Gibson, D. T., Microbial degradation of organic compounds. Marcel Dekker Inc., New York. 253-294.

Bennet, E. R., Metcalfe, C. D. (2000). Distribution of Degradation Products of Alkylphenol Ethoxylates near Sewage Treatment Plants in the Lower Great Lakes, North America. *Environ. Toxicol. Chem.* **19** (4), 784-792.

Bennet, E., Metcalfe, C. (2000). Distribution of Degradation Products of Alkylphenol Ethoxylates near Sewage Treatment Plants in the Lower Great Lakes, North America. *Environ. Toxicol. Chem.* **19** (4), 784-792.

Bennie, D. T., Sullivan, C. A., Lee, H.-B., Peart, T. E., Maguire, R. J. (1997). Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper St. Lawrence River. *Sci. Total Environ.* **193**, 263-275.

Bhatt, B. D., Prasad, J. V., Ali, S. (1992). Separation and characterization of isomers of *p*-nonylphenols by capillary GC/GC-MS/GC-FTIR techniques. *J. Chromatogr. Sci.* **30**, 203-210.

Bingman, I. (1991). Proceedings-Seminar on Nonylphenoethoxylates (NPE) and Nonylphenol (NP). Swedish Environmental Protection Agency, Report 3907, Grand Hotel, Saltsjöbaden, Sweden, February 6-8. ISBN 91-620-3907-5.

Blackburne, M. A., Waldoock, M. J. (1995). Concentrations of alkylphenols in rivers and estuaries in England and Wales. *Wat. Res.* **29**, 1623-1629.

Bleidner, W. E., Backer, H. M., Levitesky, M., Lowen, W. K. (1954). *J. Agric. Food Chem.* **2**, 476-479.

Bokern, M., Harms, H. H. (1997). Toxicity and Metabolism of 4-*n*-Nonylphenol in Cell Suspension Cultures of Different Plant Species. *Environ. Sci. Technol.* **31** (7), 1849-1854.

Bokern, M., Nimtz, M., Harms, H. H. (1996). Metabolites of 4-*n*-Nonylphenol in Wheat Cell Suspension Cultures. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1123-1127.

Brauer, L. (1989). Auer-Technikum, 19. Ausgabe, Auergesellschaft GmbH (Hrsg.), Berlin

Bringmann, V. G., Kühn, R. (1982). Ergebnisse der Schadstoffwirkung wassergefährdender Stoffe gegen *Daphnia magna* in einem weiterentwickelten standardisierten Testverfahren. *Wasser- und Abwasserforschung.* **15**, 1-6.

Britton, L. N. (1984). Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. In: Gibson, T. D., Microbial degradation of organic compounds. Marcel Dekker, New York Basel. 89-129.

Brix, R., Hvidt, S., Carlsen, L. (2001). Solubility of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates. On the possible role of micelles. *Chemosphere* **44**, 759-763.

Brüschweiler, H., Gämperle, H., Schwager, F. (1983). Primary degradation, ultimate degradation and intermediate degradation products. *Tenside Surfact. Deter.* **20**, 317-324.

Bryan, G. W., Gibbs, P. E., Hummerstone, L. G. and Burt, G. R. (1986). The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around south-west England: Evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* **66**, 611-640.

BUA-Stoffbericht (1988). Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) der Gesellschaft Deutscher Chemiker (Hrsg.), Nonylphenol. BUA-Stoffbericht 13. VCH, Weinheim.

Cassidy, R. M., LeGay, D. S., Frei, R. W. (1974). Analysis of Phenols by Derivatisation and High-Speed Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **12**, 85-89.

CEPAD Position Papers (1999). Risk Assessment of 4-Nonylphenol (branched) and Nonylphenol. Draft of September.

Corvini, P. F. X., Vinken, R., Hommes, G., Schmidt, B., Dohmann, M. (2004). Degradation of the radioactive and non-labelled branched 4(3',5'-dimethyl-3'-heptyl)-phenol nonylphenol isomer by *Sphingomonas* TTNP3. *Biodegradation*. **15**, 9-18.

Cserhàti, T. (1995). Alkyl ethoxylated and alkylphenol ethoxylated nonionic surfactants: Interaction with bioactive compounds and biological effects. *Environ. Health Persp.* **103**, 358-364.

Cunney, H. C., Mayes, B. A., Rosica, K. A., Trutter, J. A., Van Miller, J. P. (1997). Subchronic Toxicity (90-Day) Study with *para*-Nonylphenol in Rats. *Regul. Toxicol. Pharm.* **26** (2), 172-178.

DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) (1989). Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln. Mitt. VI Senatskom. Pflanzenschutz-, Pflanzenbehandlungs-, Vorratsschutzmittel. Methodensammlung der Arbeitsgruppe „Analytik“. VCH Verlag, Weinheim. XX-6, Fig. 13.

Dodds, E. C., Goldberg, L., Lawson, W., Robinson, R. (1938). Oestrogenic activity of certain synthetic compounds. *Nature*. **1**, 247-248.

Dodds, E. C., Lawson, W. (1938). Molecular structure in relation to oestrogenic activity. Compounds without a phenanthrene nucleus, *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.* 222-232.

Düring, R.-A., Krahe, S., Gäth, S. (2002). Sorption Behavior of Nonylphenol in Terrestrial Soils. *Environ. Sci. Technol.* **26**, 4052-4057.

Düring, R.-A., Krahe, Zhang, S., Gäth, S. (2000). Verbleib von Nonylphenol in Böden nach Applikation von organischen Siedlungsabfällen. Poster, Institut für Landeskultur, Abteilung Abfallwirtschaft, Justus-Liebig-Universität, Gießen.

EG-Beschränkungsrichtlinie (2002). 26. Änderung bzgl. Nonylphenol. Chemikalienrecht und Arbeitsschutz, 26. Änderungsrichtlinie vom 16.8.2002.

Ejlertsson, J., Nilsson, M.-L., Kylin, H., Bergman, A., Karlson, L., Öquist, M., Svensson, B. H. (1999). Anaerobic Degradation of Nonylphenol Mono- and Diethoxylates in Digester Sludge, Landfilled Municipal Solid Waste, and Landfilled Sludge. *Environ. Sci. Technol.* **33** (2), 301-306.

- Ekelund, R.**, Bergman, A., Granmo, A., Berggren, M. (1990). Bioaccumulation of 4-Nonylphenol in Marine Animals – A Re-evaluation. *Environ. Pollut.* **64**, 107-120.
- Ernst, B.**, Julien, G., Doe, K., Parker, R. (1980). Environmental investigations of the 1980 spruce budworm spray program in New Brunswick. Surveillance Report, Canada EPS. EPS-5-AR-81-3.
- EU-Richtlinie 67/548/EWG.** EU-Richtlinie für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung von gefährlichen Stoffen.
- Falbe, J.**, Regitz, M. (1991). Römpp Chemie Lexikon. 9. Auflage, Band 4. Georg Thieme, Stuttgart. 3043-3044.
- Fiedler, H.**, Gruber, A., Hoff, H., Mertens, C., Tolls, J., Hutzinger, O. (1994). Environmental Fate of Organochlorines in the Aquatic Environment. Organohalogen Compound, Ecoinforma Press, Bayreuth. **15**
- Friedel, R. A.**, Orchin, M. (1951). Ultraviolet Spectra of Aromatic Compounds. Ref QC 459.F89u.
- Fujii, K.**, Urano, N., Ushio, H., Satomi, M., Iida, H., Ushio-Sata, N., Kimura, S. (2000). Profile of a Nonylphenol-Degrading Microflora and Its Potential for Bioremedial Applications. *Biochem.* **128**, 909-916.
- Fujii, K.**, Urano, N., Ushio, H., Satomi, M., Kimura, S. (2001). *Sphingomonas cloacae* sp. nov., a nonylphenol-degrading bacterium isolated from wastewater of a sewage-treatment plant in Tokyo. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 603-610.
- Gaido, K. W.**, Leonard, L. S., Lovell, S., Gould, J. C., Babei, D., Portier, C. J., McDonnell, D. P. (1997). Evaluation of chemicals with endocrine modulation activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol. Appl. Pharm.* **143**, 205-212.
- Gejlsbjerg, B.**, Klinge, C., Madsen, T. (2001). Mineralization of Organic Contaminants in Sludge-Soil Mixtures. *Environ. Toxicol. Chem.* **20** (4), 698-705.
- Gibson, D. T.**, Subramanian, V. (1984). Microbial Degradation of Aromatic Compounds, In : Microbial Degradation of Organic Compounds (Gibson, D. T., ed.), Marcel Dekker Verlag, New York.
- Giger, W.**, Ahel, M., Koch, M. (1986). Das Verhalten von Alkylphenolpolyethoxylat-Tensiden in der mechanisch-biologischen Abwasserreinigung. *Vom Wasser.* **67**, 70-81.

Giger, W., Brunner, P. H., Schaffner, C. (1984). 4-Nonylphenol in sewage sludge: accumulation of toxic metabolites from nonionic surfactants. *Science*. **224**, 623-625.

Giger, W., Stephanou, E., Schaffner, C. (1981). Persistent organic chemicals in sewage effluents: I. Identifications of nonylphenols and nonylphenoethoxylates by glass capillary column gas chromatography / mass spectrometry. *Chemosphere*. **10**, 1253-1263.

Grob, R. L. (1985). *Modern Practice of Gas Chromatography*. 2nd ed., John Wiley&Sons, New York. **247**.

Guillette, L. J., Gunderson, M. P. (2001). Alterations in development of reproductive and endocrine systems of wildlife populations exposed to endocrine-disrupting contaminants. *Reproduction*. **122**, 857-864.

Gülden, M., Turan, A., Seibert, H. (1997). Substanzen mit endokriner Wirkung in Oberflächengewässern. Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit, Wasserwirtschaft, Hrsg. Umweltbundesamt, Berlin. Texte 68/97.

Günther, K., Dürbeck, H.-W., Kleist, E., Thiele, B., Prast, H., Schwuger, M. (2001). Endocrine-disrupting nonylphenols – ultra-trace analysis and time-dependent trend in mussels from the German bight. *Fresenius J Anal Chem*. **371**, 782-786.

Günther, K., Heinke, V., Thiele, B., Kleist, E., Prast, H., Räcker, T. (2002). Endocrine disrupting Nonylphenols are ubiquitous in food. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 1676-1680.

Hager, C. D. (1998). Alkylphenol ethoxylates – biodegradability, aquatic toxicity and environmental activity. Karsa, D.R. (ed). *Annual surfactant review*. Sheffield Academic Press, Sheffield.

Hansen, L. G. (1998). Stepping Backward to Improve Assessment of PCB Congener Toxicities. *Environ. Health Perspect.* **106** (1), 171-189.

Harries, J. E., Sheahan, D. A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Routledge, E. J., Rycroft, R., Sumpter, J. P., Tylor, T. (1996). A survey of estrogenic activity in U.K. inland waters. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 1993-2002.

Harries, J. E., Sheahan, D. A., Jobling, S., Matthiessen, P., Neall, P., Sumpter, J. P., Tylor, T., Zaman, N. (1997). Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 534-542.

Hesselsoe, M., Jensen, D., Skals, K., Olesen, T., Moldrup, P., Roslev, P., Mortensen, G. K., Henriksen, K. (2001). Degradation of 4-Nonylphenol in Homogenous and Nonhomogenous Mixtures of Soil and Sewage Sludge. *Environ. Sci. Technol.* **35** (17), 3695-3700.

Hopper, D. J. (1991). Aspects of the Degradation of Aromatics by Microorganisms. Chapter 1, In: Biodegradation: Natural and Synthetic Materials, Betts, W. B. Springer-Verlag, New York. 1-14.

Hulzebos, E. M., Adema, D. M. M., Dirven-van-Breemen, E. M., Henzen, L., van Dis, W. A., Herbold, H. A., Hoekstra, J. A., Baerselman, R., van Gerstel, C. A. M. (1993). Phytotoxicity Studies with *Lactuca sativa* in Soil and Nutrient Solutions. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**, 1079-1094.

Ike, M., Asano, M., Belkada, F. D., Tsunoi, S., Tanaka, M., Fujita, M. (2002). Degradation of biotransformation products of nonylphenol ethoxylates by ozonation and UV/TiO₂ treatment. *Water Sci. Technol.* **46** (11-12), 127-132.

Inoue, K., Kondo, S., Yoshie, Y., Kato, K., Yoshimura, Y., Horie, M., Nakazawa, H. (2001). Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride food packaging films into food simulants and foods. *Food Addit. Contam.* **18** (2), 157-164.

Israelachvili, J. (1992). Intermolecular and Surface Forces. 2nd edition, Academic Press, New York.

Jiménez, L., Breen, A., Thomas, N., Federle, T. W., Saylor, G. S. (1991). Mineralization of linear alkylbenzene sulfonate by a four-member aerobic bacterial consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1566-1569.

Junk, G. A., Svec, H. J., Vick, R. D., Avery, M. J. (1974). Contamination of water by synthetic polymer tubes. *Environ. Sci. Technol.* **8**, 1100-1106.

Kahl, M. D., Makynen, E. A., Kosian, P. A., Ankley, G. T. (1997). Toxicity of 4-Nonylphenol in a Life-Cycle-Test with the Midge *Chironomus tentans*. *Ecotox. Environ. Safety.* **38**, 155-160.

- Kim, Y.-S.**, Katase, T., Sekine, S., Inoue, T., Makino, M., Uchiyama, T., Fujimoto, Y., Yamashita, N. (2004). Variation in estrogenic activity among fractions of a commercial nonylphenol by high performance liquid chromatography. *Chemosphere*. **54**, 1127-1134.
- Kirk, T. K.**, Schultz, E., Conners, W. J., Lorenz, L. F., Zeikus, J. G. (1978). Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* **177**, 277-285.
- Koolman, J.**, Röhm, K.-H. (1994). Taschenatlas der Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Körner, W.**, Bolz, U., Süßmuth, W., Hiller, G., Schuller, W., Hanf, V., Hagenmaier, H. (2000). Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere*. **40**, 1131-1142.
- Kravetz, L.**, Salanitro, J. P., Dorn, P. B., Guin, K. F. (1991). Influence of hydrophobe type and extend of branching and environmental response factors of nonionic surfactants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68**, 610-618.
- Lalah, J. O.**, Schramm, K.-W., Severin, G. F., Lenoir, D., Henkelmann, B., Behechti, A., Guenther, K., Kettrup, A. (2003). In vivo metabolism and organ distribution of a branched ¹⁴C-nonylphenol isomer in pond snails, *Lymnaea stagnalis* L. *Aquat. Toxicol.* **62**, 305-319.
- Lawrence, J. F.** (1979). Fluorimetric Derivatisation in High Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **17**, 147-151.
- Lee, H.-B.** (1999). Review of Analytical Methods for the Determination of Nonylphenol and Related Compounds in Environmental Samples. *Water Qual. Res. J. Canada.* **34** (1), 3-35.
- Loh, W.**, Volpe, P. L. O. (1996). Adsorption of Alkyl *p*-Hydroxybenzoates from Aqueous Solution onto Teflon. *J. Colloid and Interf. Sci.* **179**, 122-123.
- Maczka, C.**, Pang, S., Policansky, D., Wedge, R. (2000). Evaluating Impacts of Hormonally Active Agents in the Environment. *Environ. Sci. Technol.* **1**, 136-141.
- Maguire, R. J.** (1999). Review of the Persistence of Nonylphenol and Nonylphenol Ethoxylates in Aquatic Environments. *Water Qual. Res. J. Canada.* **34** (1), 37-78.

- Mann, A. H.**, Reid, V. W. (1971). Biodegradation of synthetic detergents. Evaluation by community trials. Part 2: Alcohol and alkylphenol ethoxylates. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **48**, 794-797.
- Marcomini, A.**, Capri, S., Giger, W. (1991). Analytical extraction and environmental removal of alkylbenzene sulphonates, nonylphenol and nonylphenol monoethoxylate from dated sludge-only landfills. *Environ. Technol.* **12**, 1047-1054.
- McLeese, D. W.**, Zitko, V., Metcalfe, C. D., Sergeant, D. B. (1980). Lethality of aminocarb and the components of the aminocarb formulation to juvenile atlantic salmon, marine invertebrates and a freshwater clam. *Chemosphere.* **9**, 79-82.
- McLeese, D.W.**, Zitko, V., Sergeant, D.B., Burrige, L., Metcalfe, C.D. (1981). Lethality and accumulation of alkylphenols in aquatic fauna. *Chemosphere.* **10**, 723-730.
- McNeal, T. P.**, Biles, J. E., Begley, T. H., Craun, J. C., Hopper, M. L., Sack, C. A. (2000). Determination of Suspected Endocrine Disrupters in Foods and Food Packaging. ACS Symposium Series 747: Analysis of Environmental Endocrine Disruptors. Chapter 4, ACS, Washington, DC. ISBN 0-8412-2650-X.
- Meesters, R. J. W.**, Schroeder, H. F. (2002). Simultaneous Determination of 4-Nonylphenol and Bisphenol A in Sewage Sludge. *Anal.Chem.* **74** (14), 3566-3574.
- Meldahl, A. C.**, Nithipatikom, K., Lech, J. J. (1996). Metabolism of several ¹⁴C-nonylphenol isomers by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): *in vivo* and *in vitro* microsomal metabolites. *Xenobiotika.* **26** (11), 1167-1180.
- Mergler, M.** (2003). Dissertation. Immobilisierung von BPA-Bindeproteinen an der Oberfläche von Hefezellen. RWTH-Aachen, Institut für Mikrobiologie.
- Morrison, R. T.**, Boyd, R. N. (1980). Organic Chemistry. 3rd ed., Allyn and Bacon, Boston. 86.
- Mueller, G. C.**, Kim, U.-H. (1978). Displacement of estradiol from estrogen receptors by simple alkylphenols. *Endocrinology.* **102**, 1429-1435.
- Müller, S.**, Schmid, P., Schlatter, C. (1998). Pharmacokinetic behavior of 4-nonylphenol in humans. *Environ. Toxicol. Phar.* **5**, 257-265.

Naassner, M., Mergler, M., Wolf, K., Schuphan, I. (2002). Determination of the xenoestrogens 4-nonylphenol and bisphenol A by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection after derivatisation with dansyl chloride. *J. Chrom. A.* **945** (1-2), 133-138.

Naylor, C., Mieure, J., Adams, W., Weeks, J., Castaldi, F., Ogle, L., Ramano, R. (1992). Alkylphenol ethoxylates in the environment. *J. Am. Oil Soc.* **69**, 695-703.

Nimrod, A. C., Benson, W. H. (1996). Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates. *Crit. Rev. Toxicol.* **26**, 335-364.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). (1972). Pollution by Detergents. Pollution by Detergents. OECD, Paris.

Olmo, M. D., Zafra, A., Jurado, A. B., Vilchez, J. L. (2000). Determination of bisphenol A (BPA) in the presence of phenol by first-derivative fluorescence following micro liquid-liquid extraction (MLLE). *Talanta.* **50**, 1141-1148.

Palm, W.-U. (2002). Abiotischer Abbau in der Umwelt. Vorlesung im Studiengang Umweltwissenschaften. Fachbereich IV, Universität Lüneburg.

Petrovic, M., Solé, M., López de Alda, M. J., Barceló, D. (2002). Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**, 2146-2156.

Pfennig, N., Lippert, K. D. (1966). Über das Vitamin B₁₂-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. *Arch. Microbiol.* **55**, 245-256.

Platt, A. E. (1978). Styrene plastics. Encyclopedia of Chemical Technology. R. E. Kirk and D. F. Othmer (ed). John Wiley and Sons, New York. 3. Auflage **26**, 801-847.

REGIS (1991). Derivatisierung für die HPLC. Firmenprospekt der Firma ICT. Handelsgesellschaft m.b.H. Frankfurt.

Rehbinder, E., Sukopp, H., Behrendt, H., Ewers, H.-J., Hüttl, R. F., Jänicke, M., Pläßmann, E. (1999). Umwelt und Gesundheit – Risiken richtig einschätzen. Sondergutachten, Beratergremium der Bundesregierung. Metzler-Poeschel, Stuttgart. ISBN 3-8246-0604-6.

Reichardt, C. (1994). Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators. *Chem. Rev.* **94**, 2319-2358.

Reichardt, C., Schäfer, G. (1995). Determination of New and Corrections of Old ET(30) Values as Empirical Measures of Solvent Polarity for 40 Organic Solvents. *Liebigs Ann.* 1579-1582.

Reinhard, M., Goodman, N., Mortelmans, K. E. (1982). Occurrence of brominated alkylphenol polyethoxy carboxylates in mutagenic wastewater concentrates. *Envir. Sci. Technol.* **16**, 351-362.

Rippen (1998). Handbuch Umweltchemikalien. 44. Erg.,lfg. 9/98.

Rippen, G., Frank, R., Zietz, E., Hachmann, R. (1987). Produktionsmengen und Verwendung chemischer Stoffe. Bericht des Battelle-Instituts, Frankfurt am Main, an das Umweltbundesamt, Berlin. Forschungsbericht Nr. 87-106 01 025.

RPA (Risk & Policy Analysts Limited) (2000). Nonylphenol Risk Reduction Strategy. Final Report. For the Department of the environment, transport and the regions. RPA, London.

Ross, P., Ax, O. (2000). Poröser graphitisierter Kohlenstoff für die HPLC und SPE. *Laborpraxis.* Sep., 28-35.

Rudel, R. A., Melly, S. J., Geno, P. W., Sun, G., Brody, J. G. (1998). Identification of Alkylphenols and Other Estrogenic Phenolic Compounds in Wastewater, Septage, and Groundwater on Cape Cod, Massachusetts. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 861-869.

Rudel, R. A., Brody, J. G., Spengler, J. D., Vallarino, J., Geno, P. W., Sun, G., Yau, A. (2001). Identification of selected hormonally active agents and animal mammary carcinogens in commercial and residential air and dust samples. *J. Air. Waste Manag. Assoc.* **51**; 499-513.

Rudling L., Solyom, P. (1974). The investigation of biodegradability of branched nonylphenol ethoxylates. *Wat. Res.* **8**, 115-119.

Schaeffer, T. L., Cantwell, S. G., Brown, J. L., Watt, D. S., Fall, R. R. (1979). Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 742-746.

Scharf, S., Sattelberger, R., Pichler, W. (1998). Nonylphenole in der Umwelt. Übersicht und erste Analyseergebnisse. Bundesministerium für Umwelt, Jugend und Familie. Hrsg. Umweltbundesamt, Wien. BE-121.

Schlegel, H. G. (1992). Allgemeine Mikrobiologie. 7. überarbeitete Auflage, unter Mitarbeit von Christiane Zaborosch. Georg Thieme Verlag ,Stuttgart. 464-469.

Schmidt, B., Patti, H., Niewersch, C., Schuphan, I. (2003). Biotransformation of [ring-U-¹⁴C]4-*n*-nonylphenol by *Agrostemma githago* cell culture in a two-liquid-phase system. *Biotechnol. Lett.* **22**, 1375-1381.

Schmidt, B., Patti, H., Hommes, G., Schuphan, I. (2003). Metabolism of the nonylphenol isomer [ring-U-¹⁴C]-4-(3',5'-Dimethyl-3'-heptyl)-phenol by cell suspension cultures of *Agrostemma githago* and soybean. *J. Environ. Sci. Health PartB*. Accepted.

Schnell (2001). Chemical Profile, Nonylphenol. Chemical Market Reporter, Schnell. **250** (2).

Schöberl, P., Scheubel, J. B. (1987). Biologischer Abbau in Kläranlagen sowie Ökotoxizität von Nonylphenol, Nonylphenol plus 1 EO und 2 EO. Untersuchungsbericht der Hüls AG, Marl. **87** (22).

Schuphan, I., Ebing, W., Holthöfer, J., Krempler, R., Lanka, E., Ricking, M., Pachur, H.-J. (1990). Bleidner vapour phase extraction technique for the determination of organochlorine compounds in lake sediments. *Fresenius J Anal Chem.* **336**, 564-566.

Schwaiger, J., Spieser, O. H., Bauer, C., Ferling, H., Mallow, U., Kalbfus, W., Negele, R. D. (2000). Chronic toxicity of nonylphenol and ethinylestradiol: haematological and histopathological effects in juvenile Common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat. Toxicol.* **51**, 69-78.

SETAC (2000). Endocrine Disruptors and Modulators. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). Technical Issue Paper.

Sin, S. N., Chua, H. (2000). Degradation pathway of persistent branched fatty acids in natural anaerobic ecosystem. *Chemosphere.* **41**, 149-153.

Slater, J. H., Lovatt, D. (1984). Biodegradation and the significance of microbial communities. In: Microbial Degradation of Organic Compounds, Marcel Dekker Inc., New York.

Sonnenschein, C., Soto, H. M., Fernandez, M. F., Olea, N., Olea-Serrano, M. F., Ruiz-Lopez, M. D. (1995). Development of a marker of estrogenic exposure in human serum. *Clin. Chem.* **41** (12/2), 1888-1895.

- Soto, A. M.**, Justicia, H., Wray, J. W., Sonnenschein, C. (1991). p-Nonyl-Phenol: An Estrogenic Xenobiotic Released from „Modified“ Polystyrene. *Environ. Health Persp.* **92**, 167-173.
- Soule, H. D.**, Vazquez, J., Long, A., Albert, S., Brennan, M.J. (1973). A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **51**, 1409-1413.
- Staples, C. A.**, Naylor, C. G., Williams, J. B., and Gledhill, W. E. (2001). Ultimate biodegradation of alkylphenol ethoxylate surfactants and their biodegradation intermediates. *Environ. Toxicol. Chem.* **20** (11), 2450-2455.
- Stephanou, E.**, Giger, W. (1982). Persistent organic chemicals in sewage effluents. 2. Quantitative determinants of nonylphenols and nonylphenol ethoxylates by glass capillary gas chromatography. *Envir. Sci. Technol.* **16**, 800-805.
- Streit, B.** (1994). Lexikon Ökotoxikologie. 2.Auflage, Verlag VCH, Weinheim.
- Sunoco Chemicals.** (2001). Produktbeschreibung.
<http://www.sunocochem.com/products/nonenef.htm>.
- Swedish EPA** (Swedish Environmental Protection Agency) (1991). Proceedings-Seminar on Nonylphenolethoxylates (NPE) and Nonylphenol (NP). Report 3907, Grand Hotel, Saltsjöbaden, Sweden, February 6-8. ISBN 91-620-3907-5.
- Tabira, Y.**, Nakai, M., Asai, D., Yakabe, Y., Tahara, Y., Shinmyozu, T., Nogushi, M., Takatsuki, M., Shimohigashi, Y. (1999). Structural requirements of *para*-alkylphenols to bind to estrogen receptor. *Eur. J. Biochem.* **262**, 240-245.
- Tanghe, T.**, Devriese, G., Verstraete, W. (1999). Nonylphenol and Estrogenic Activity in Aquatic Environment Samples. *J. Environ. Qual.* **28**, 702-709.
- Tanghe, T.**, Devriese, G., Verstraete, W. (1998). Nonylphenol Degradation in Lab Scale Activated Sludge Units is Temperature Dependant. *Wat. Res.* **32** (10), 2889-2896.
- Tanghe, T.**, Dhooge, W., Verstraete, W. (1999). Isolation of a Bacterial Strain Able To Degrade Branched Nonylphenol. *Appl. Environ. Microb.* **65** (2), 746-751.
- Thibaut, R.**, Debrauwer, L., Rao, D., Cravedi, J. P. (1998). Characterisation of biliary metabolites of 4-*n*-Nonylphenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica.* **28**(8), 745-757.

Thibaut, R., Debrauwer, L., Rao, D., Cravedi, J. P. (1999). Urinary metabolites of 4-nonylphenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Sci. Total Environ.* **233**, 193-200.

Timbrell, J. A. (1989). Toxikologie für Einsteiger. 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg

Topp, E., Starratt, A. (2000). Rapid Mineralization of the Endocrine-Disrupting Chemical 4-Nonylphenol in Soil. *Environ. Sci. Technol.* **19** (2), 313-318.

Tsuda, T., Suga, K., Kaneda, E., Ohsuga, M. (2000). Determination of 4-nonylphenol, nonylphenol monoethoxylate, nonylphenol diethoxylate and other alkylphenols in fish and shellfish by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.* **746**, 305-309.

UM-BDD (University of Minnesota Biocatalysis/ Biodegradation Database) (2003). Microbial biocatalytic reactions and biodegradation pathways primarily for xenobiotic, chemical compounds. <http://umbdd.ahc.umn.edu/index.html>.

Valeur, B. (2001). Molecular Fluorescence. Principles and Applications. 1. Aufl., Wiley-VCH, New York.

Vallini, G., Frassinetti, S., D'Andrea, F., Catelani, G., Agnolucci, M. (2001). Biodegradation of 4-(1-nonyl)phenol by axenic cultures of the yeast *Candida aquatextoris*: identification of microbial breakdown products and proposal of a possible metabolic pathway. *International Biodeterioration and Biodegradation.* **47**, 133-140.

Van Ginkel, C. G., Kroon, A. G. M. (1993). Metabolic pathway for the biodegradation of octadecylbis(2-hydroxyethyl)amine. *Biodegradation.* **3**, 435-443.

Verschueren, K. (1996). Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals. 3. Auflage. Van Nostrand Reinhold, New York.

Vinken, R., Schmidt, B., Schäffer, A. (2002). Synthesis of tertiary ¹⁴C-labelled nonylphenol isomers. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **45**, 1253-1263.

Vollhardt, K. Peter C. (1990). Organische Chemie. 1. korrigierter Nachdruck der 1. Auflage. VCH, Weinheim.

- Wegener, G.** (2001). Analytik endokrin wirksamer Substanzen und deren Bedeutung für das Trinkwasser. Dissertation. Technische Universität Berlin, ISBN 3-89825-317-1.
- Weinberger, P.,** Rea, M. (1981). Nonylphenol: A perturbant additive to an aquatic system. Proc. Seventh Annual Aquatic toxicity Workshop, Nov. 5-7.
- Wheeler, T. F.,** Heim, J. R., LaTorre, M. R., Janes, A. B. (1997). Mass Spectral Characterization of *p*-Nonylphenol Isomers Using High-Resolution Capillary GC-MS. *J. Chromatogr. Sci.* **35**, 19-30.
- Williamson, J. B.,** Varineau, P. T. (1996). Nonylphenol in biosolids and sludges. SETAC Poster Session P0576, November 20, 1996.
- Witorsch, R. J.** (2000). Endocrine Disruption: A critical review of environmental estrogens from a mechanistic perspective. *Toxic Substance Mechanisms.* **19**, 53-78.
- Ying, G.-G.,** Williams, B., Kookana, R. (2002). Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates – a review. *Environ. Int.* **28** (3), 215-226.
- Yokota, H.,** Seki, M., Maeda, M., Oshima, Y., Tadokoro, H., Honjo, T., Kobayashi, K. (2001). Life-cycle toxicity of 4-nonylphenol to medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* **20** (11), 2552-2560.

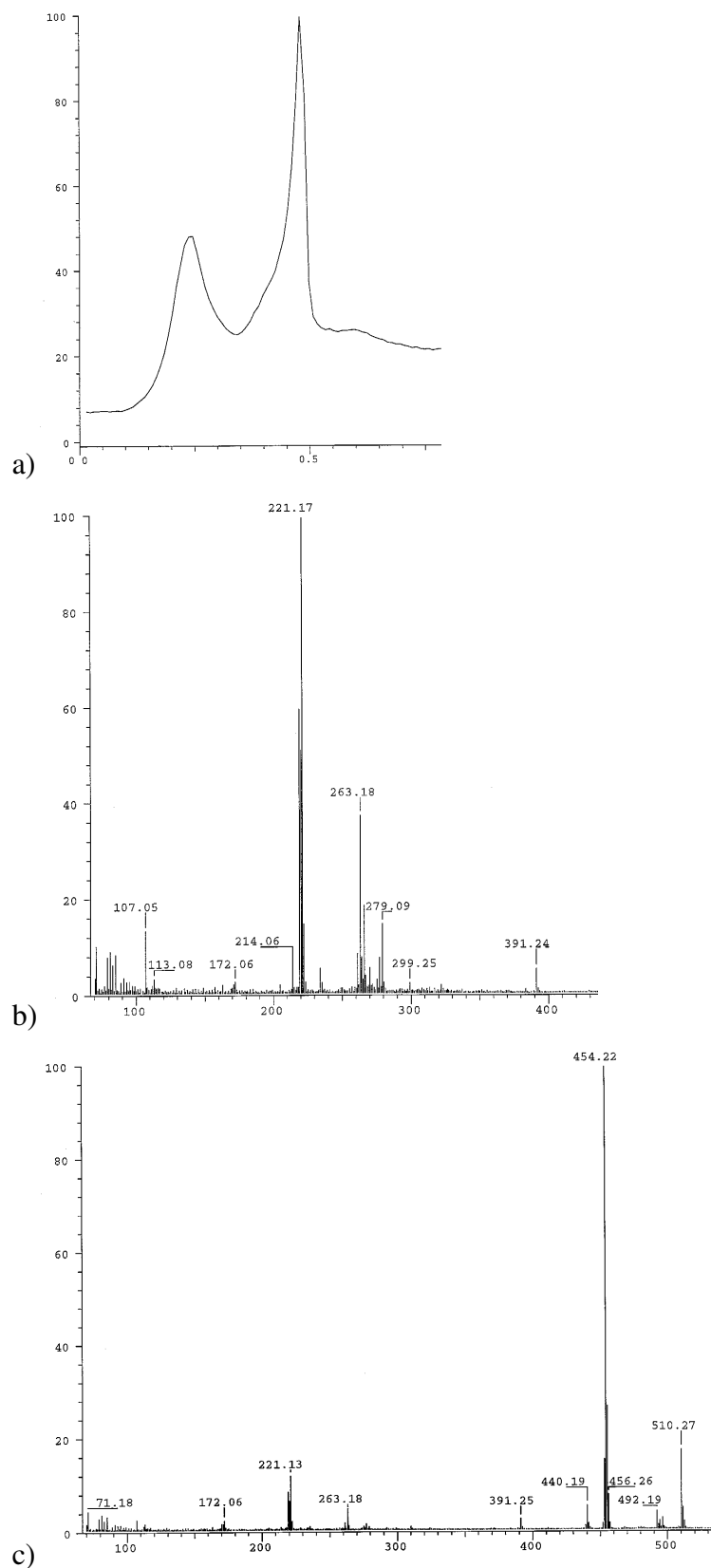
7 Anhang

TS-Gehalte im Belebungsbecken der Kläranlage Soers (Aachen) an den Beprobungstagen (mit freundlicher Genehmigung des Zentrallabors der KA Soers).

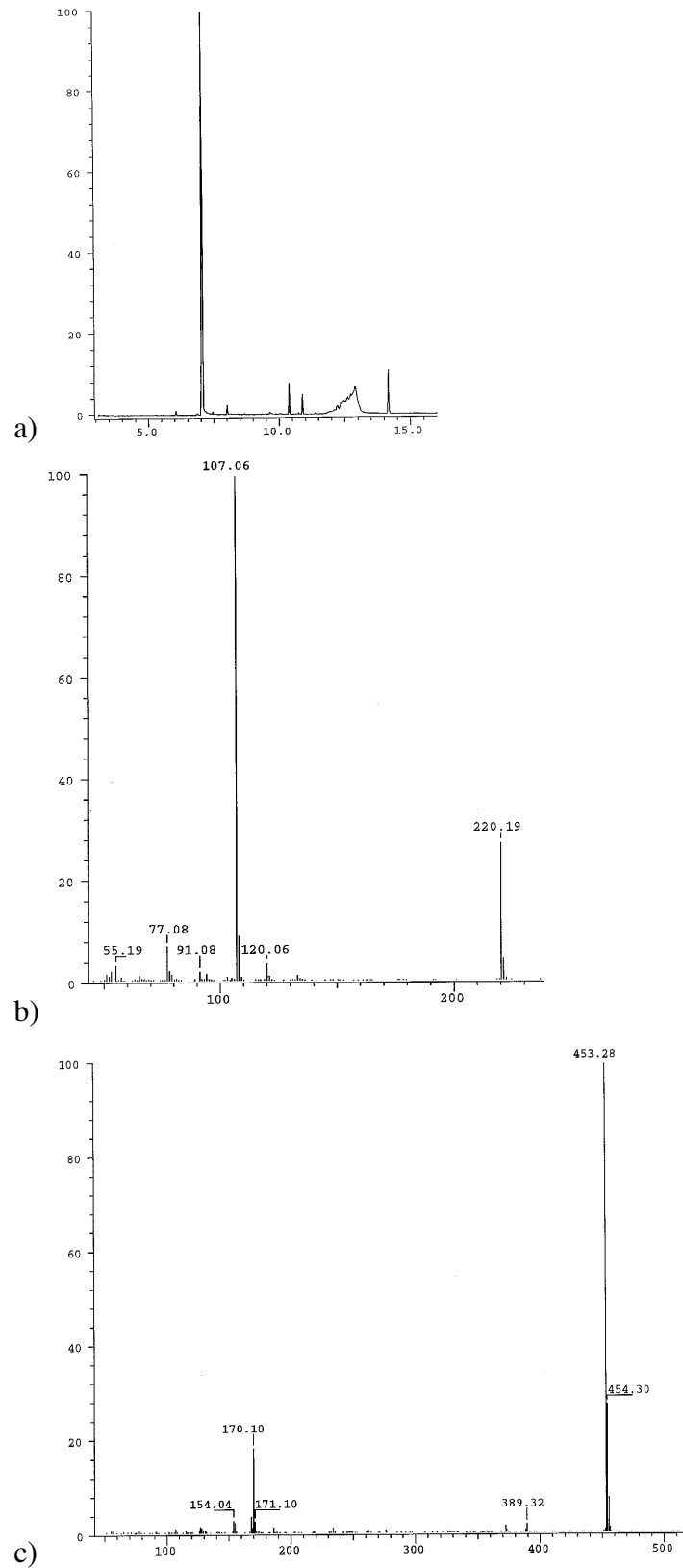
Datum	TS-Sonde (kontinuierlich) [g/l]	nach DIN 38 414
31.07. 2000	2,6	3,0
11.09. 2000	2,6	2,9
05.10 2000	3,2	-
19.02. 2001 ^a	3,6	3,2
02.04. 2001 ^a	3,3	3,2
26.04. 2001 ^a	3,2	-
09.07. 2001 ^a	2,5	3,1
13.08. 2001 ^a	2,9	3,1
10.09. 2001 ^a	3,2	3,8
03.12.2001 ^a	3,6	3,0
11.02.2002 ^a	3,2	3,3
Mittelwert ± einfache Standardabweichung	3,1 ± 0,4	3,2 ± 0,3
Mittelwert Glühverlust [% d.TS]	70,1 ± 5,3	

^a eingesetzt für Metabolismusstudien

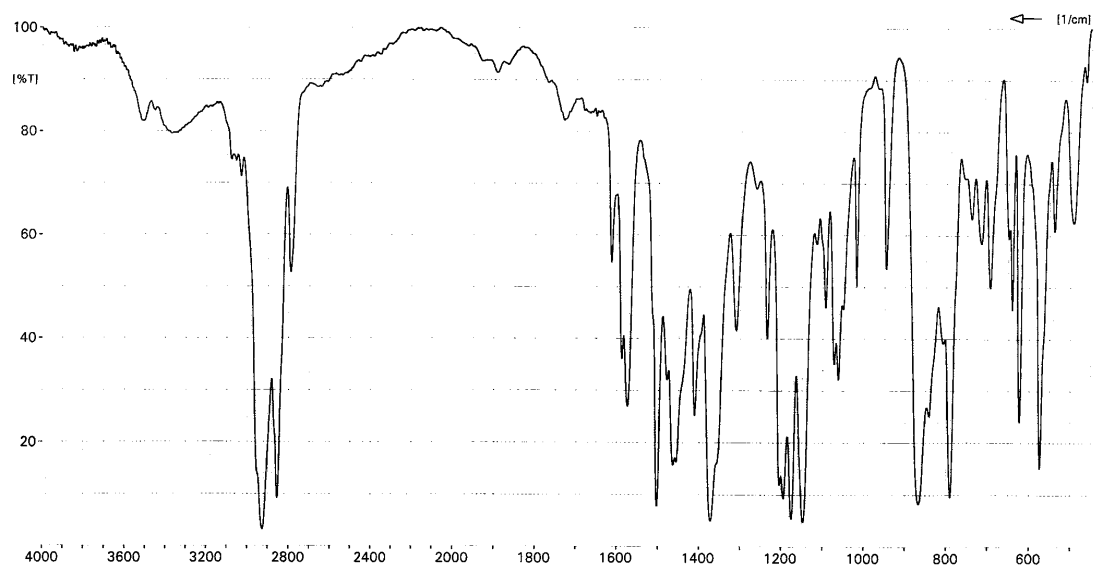
^b Eigene Messungen des TS-Gehaltes über gravimetrische Bestimmung des lyophilisierten Belebtschlammes führten bei drei Parallelen einer Belebtschlammcharge zu unverhältnismäßig starken Schwankungen.



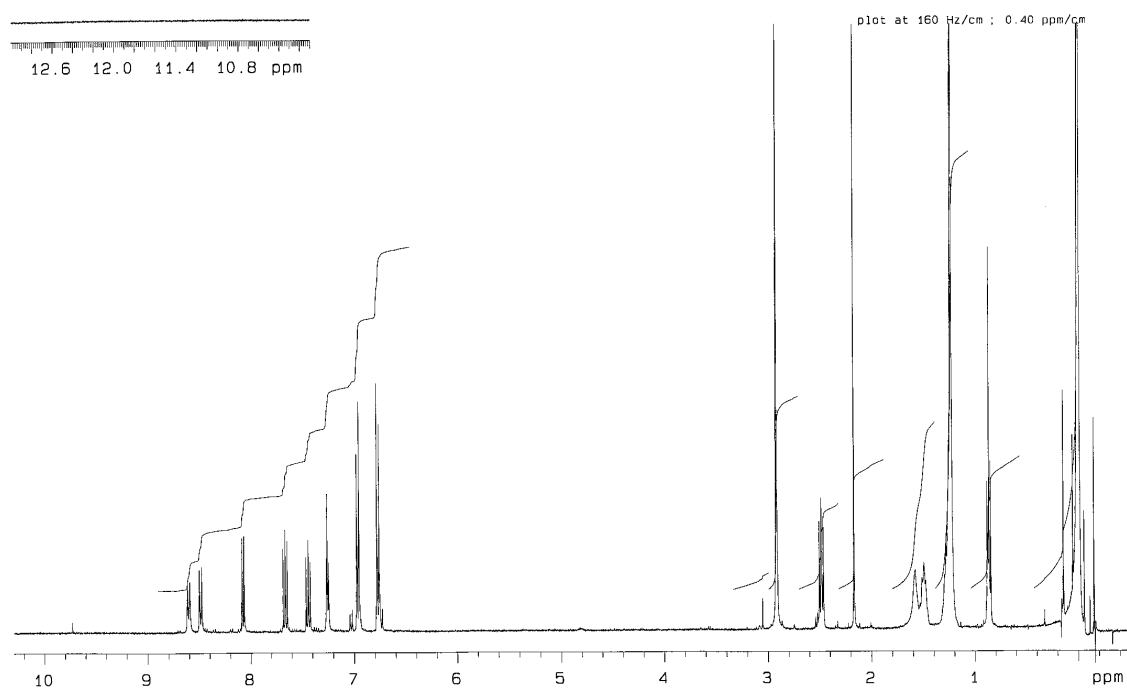
a) RIC des 4-*n*-NP-Dansylderivats bei Direktverdampfung; b) Massenspektrum bei 0,24 min (abgespaltener NP-Molekülteil; c) Massenspektrum bei 0,49 min (intaktes 4-*n*-NP-Dansylderivat).



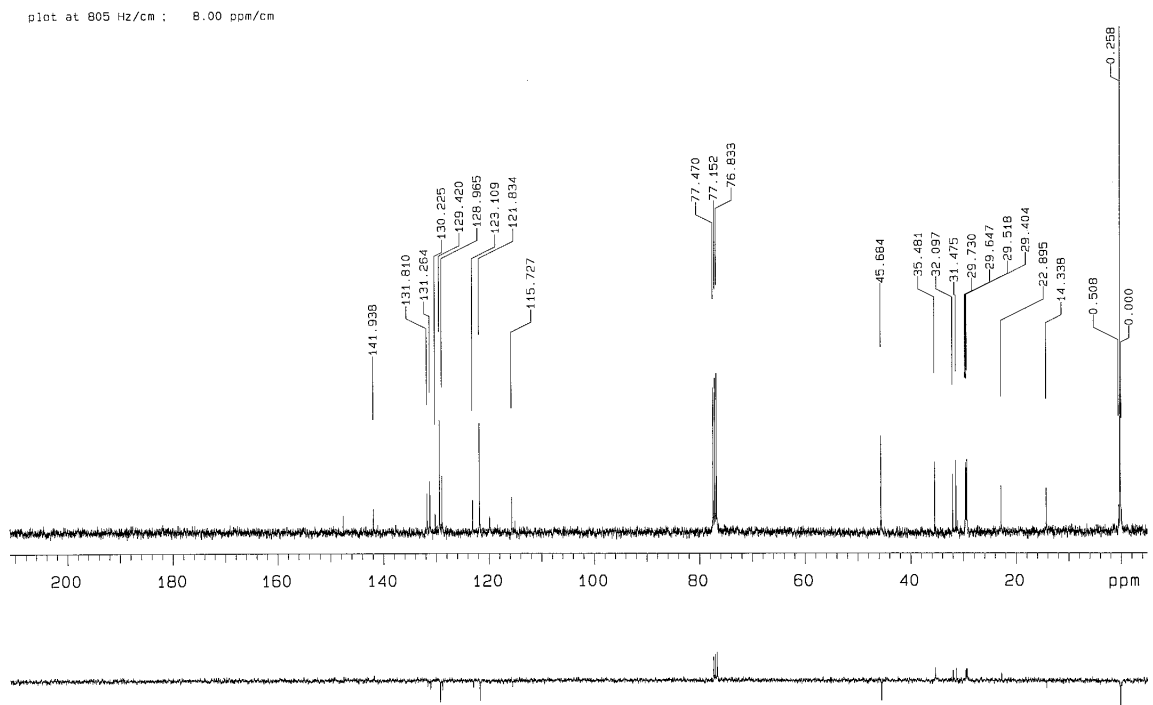
a) TIC des 4-*n*-NP-Dansylderivats (GC-MS); b) Massenspektrum bei 7,05 min (abgespaltenes 4-*n*-NP); c) Massenspektrum bei 12,85 min (4-*n*-NP-Dansylderivat).



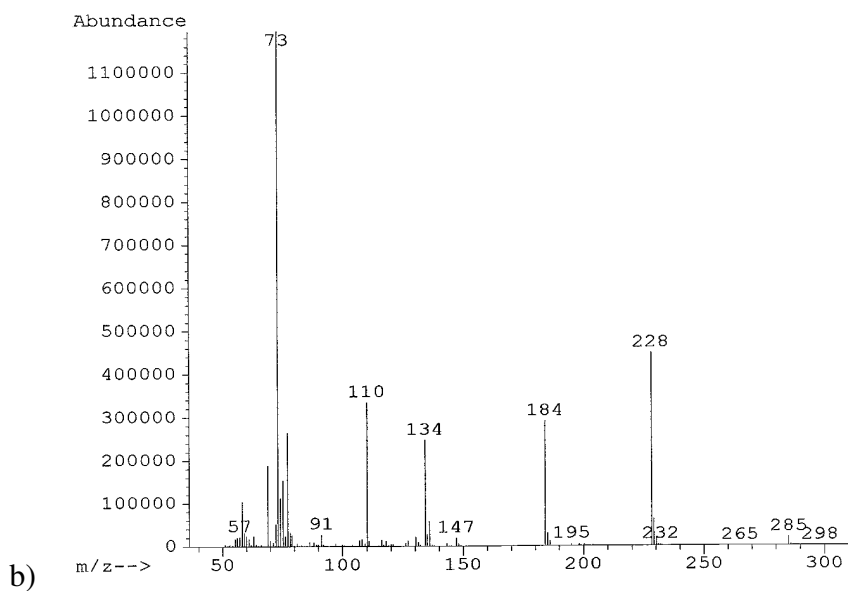
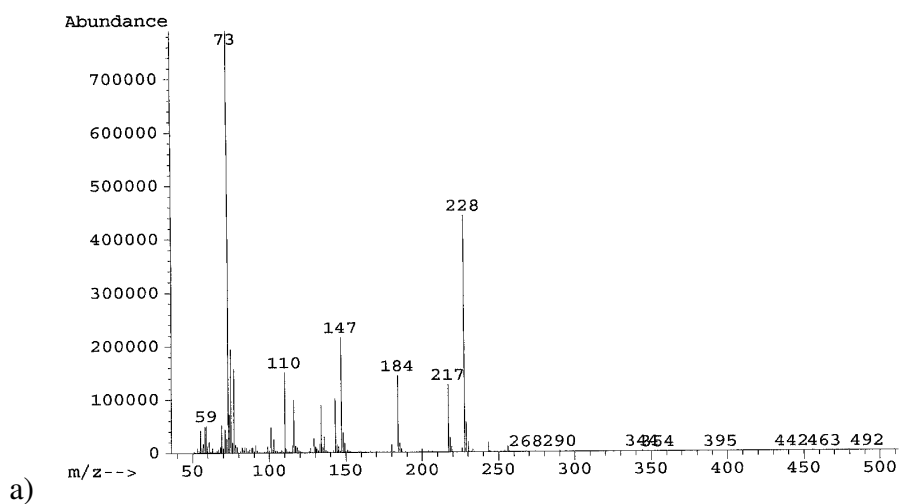
IR-Spektrum des 4-*n*-NP-Dansylderivats in CHCl₃ (PE 1760).



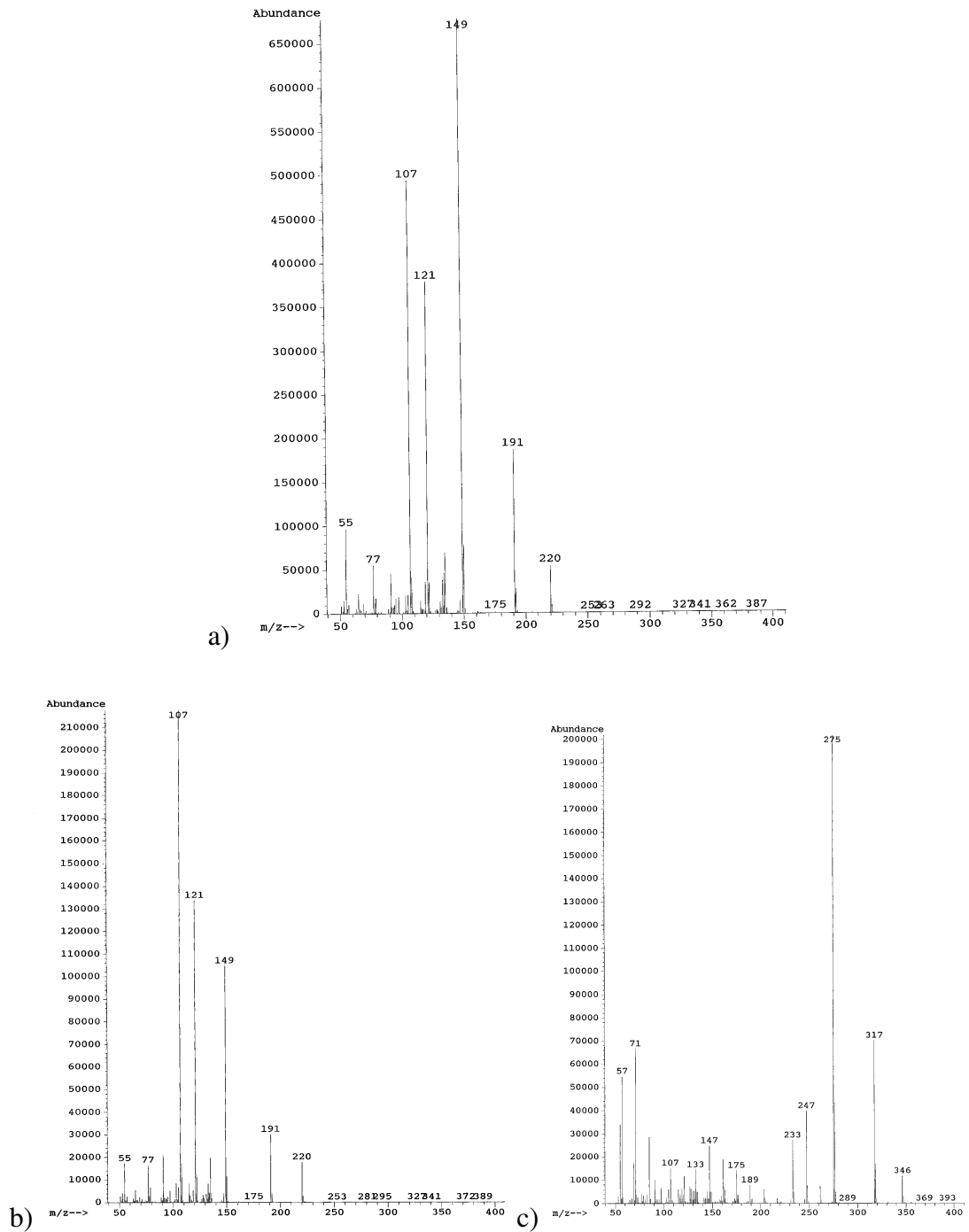
¹H-NMR-Spektrum des 4-*n*-NP-Dansylderivats in CDCl₃ (400 MHz).



^{13}C -NMR-Spektrum des 4-*n*-NP-Dansylderivats in CDCl_3 (100 MHz).



a) Massenspektrum des mit MSTFA derivatisierten *tert*-Butylbrenzcatechins (TIC) bei 15,67 min;
b) Massenspektrum des Doppelpeaks bei 12,51 min und 12,35 min (s. TIC des Metabolitenextraktes, Abbildung 3.24).



Massenspektren der Syntheseprodukte: a) 4-(3',6'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol (Hauptprodukt); b) 2-(3',6'-Dimethyl-3'-heptyl)phenol (Nebenprodukt); c) 2,4-bis-[3',6'-Dimethyl-3'-heptyl]phenol (Nebenprodukt).

Bisherige Veröffentlichungen:

Corvini, P., Naaßner, M. (2002). Interdisziplinäres Forschungsprojekt zur Eliminierung von Mikroschadstoffen aus Abwasser. *GWF-Wasser/Abwasser*. **143**, 507-508.

Corvini, P., Dohmann, M., Dott, W., Hollender, J., Mergler, M., Naaßner, M., Weber, S. (2002). Hormonell wirksame Stoffe in Abwasser“, *RWTH-Themen*. **2**, 78-80.

Mergler, M., Naaßner, M. (2001). Neue Strategien zur Entfernung endokrin wirksamer Substanzen aus Abwasser“, *KA Wasserwirtschaft-Abwasser-Abfall*. **48** (12), 1712-1713.

Naassner, M., Mergler, M., Wolf, K., Schuphan, I. (2002). Determination of the xenoestrogens 4-nonylphenol and bisphenol A by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection after derivatisation with dansyl chloride. *Journal of Chromatography A*. **945** (1-2), 133-138.

Bildungsgang

Name: Markus Naaßner
geboren am: 3. März 1972 in Wuppertal

Schulbildung: 1978 – 1982 Grundschule Rottsieper Höhe, Wuppertal
1982 – 1991 Carl-Fuhlrott-Gymnasium, Wuppertal

Schulabschluss: Abitur Jun. 1991

Studium: Okt. 1991 – Sep. 1998
Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal
Chemiestudium, Diplom II, Zweig B

Diplomarbeit: Nov. 1998 – Jul. 1999
Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal
Thema: Klonierung und Expression von Biosynthesegenen der
Polysialylsäure in *Escherichia coli* K1

Promotion: seit Okt. 1999
Institut für Biologie V, RWTH-Aachen

Wuppertal, den 15. Juli 2004