

Abschlussbericht

Förderkennzeichen 02WA9982/1

Verbundprojekt: Untersuchungen zum Einfluss der Verfahrenstechnik in Kläranlagen auf die Eliminierung ausgewählter Östrogene und Xenoöstrogene aus dem Abwasser

Teilvorhaben 5: Verhalten ausgewählter Östrogene und Xenoöstrogene in naturnahen Kläranlagen

Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH
Permoserstraße 15, 04318 Leipzig

Bearbeiter:

Braun, Pamela, Dipl.-Chem.

Kästner, Matthias, Prof. Dr. habil.

Kuschk, Peter, Dr.; (Koordinator)

Möder, Monika, Dr.

Müller, Jens, Dipl.-Chem.

Wießner, Arndt, Dr.-Ing.

Leipzig, Juni 2003

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Aufgabenstellung und Ablauf des Teilvorhabens	6
1.1 Wissenschaftliche Ziele und Aufgaben des Teilvorhabens	6
1.2 Voraussetzungen, unter denen das Teilvorhaben durchgeführt wurde	6
1.3 Planung und Ablauf des Teilvorhabens	6
1.4 Wissenschaftlich u. technischer Stand.....	6
1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen	7
2 Ergebnisse	9
2.1 Analytische Methodenentwicklung.....	9
2.1.1 Einleitung	9
2.1.2 Adsorptionsuntersuchungen zur Konstruktion der Laborpflanzenkläranlagen.....	9
2.1.3 Nachweis von technischem Nonylphenol, Bisphenol A und 17 α -Ethinylestradiol in naturnahen Kläranlagen	10
2.1.4 Einsatz und Verwendbarkeit lösemittelarmer Extraktionstechniken zum Nachweis von Estrogenen und Xenoestrogenen in Abwässern.....	14
2.1.5 Diskussion und Ausblick.....	24
2.2 Labormodelluntersuchungen	24
2.2.1 Charakterisierung des Strömungsprofils im Reaktor.....	24
2.2.2 Bisphenol A (BPA).....	25
2.2.3 4-Nonylphenol (4-NP).....	37
2.2.4 17 β -Estradiol	45
2.2.5 Zusammenfassung der Laborexperimente	46
2.3 Ergebnisse der Anlagenbeprobung	46
2.3.1 Allgemeine Anlagenbeschreibung, Probenahme und Standardanalytik	46
2.3.2 Ergebnisse und Diskussion	49
2.3.3 Zusammenfassung.....	57
3 Literaturverzeichnis	59
4 Abbildungsverzeichnis	62
5 Tabellenverzeichnis	63
6 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse	65
7 Erkenntnisfortschritt bei anderen Stellen	66
8 Veröffentlichungen	67
8.1 Aufsätze	67
8.2 Vorträge	67
8.3 Poster.....	68
8.4 Geplante Aufsätze:.....	68

9	Anhang	70
9.1	Teichanlage A	70
	Beschreibung der Anlage.....	70
9.2	Teichkläranlage B.....	74
	Beschreibung der Anlage.....	74
9.3	Pflanzenkläranlage I.....	76
	Beschreibung der Anlage.....	76
9.4	Pflanzenkläranlage II.....	79
	Beschreibung der Anlage.....	79
9.5	Pflanzenkläranlage III.....	82
	Beschreibung der Anlage.....	82

Abkürzungsverzeichnis

$^{13}\text{C}_{12}$ -BPA	BPA, bei dem alle 12 Phenol-C-Atome ^{13}C -Atome sind
$^{13}\text{C}_6$ -4- <i>n</i> -NP	4- <i>n</i> -NP, bei dem alle 6 Phenol-C-Atome ^{13}C -Atome sind
4- <i>n</i> -NP	4-Nonylphenol mit linearer Nonylkette
4-NP	4-Nonylphenol (alle, mit verzweigter und linearer Nonylkette)
ASE	Beschleunigte Lösemittel Extraktion (accelerated solvent extraction)
BCF	Butylchloroformat
BF_3	Bortrifluorid
BPA	Bisphenol A
BPA- d_{14}	14-fach deuteriertes BPA
Bromindanol	2-Brom-2,3-dihydro-1H-inden-1-ol
BSA	N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid
BSB	biologischer Sauerstoffbedarf
BSTFA	N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoracetamid
d	deutert
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff (dissolved organic carbon)
E1	Estron
E2	17 β -Estradiol
E2M1, E2M2, E2M3	noch nicht identifizierte Metabolite von E2
E3	Estriol
ED	„endokriner Disruptor“, Bezeichnung für Substanzen, die auf das hormonelle System einwirken
E-diacetat	Estradioldiacetat
EE2	17 α -Ethinylestradiol
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektrometrie
HFBA	Heptafluorbuttersäureanhydrid
IC	anorganischer Kohlenstoff (CO_2 , inorganic carbon)
IR	Isotopenverhältnis (Isotope Ratio)
KAS	Kaltaufgabesystem
LC_{50}	Lethale Concentration bei 50 % der Biomasse
LLE	Flüssig-Flüssig Extraktion (Liquid-Liquid Extraction)
MAW	Modellabwasser
MeEE2	Mestranol
MeOH	Methanol
MPS	Multipurpose Autosampler
NP	Nonylphenol
NP- d_2	Zweifach deuteriertes NP
NWGs	Nachweisgrenzen
PA	Polyacrylat
PDMS	Polydimethylsiloxan
PDMS/DVB	Polydimethylsiloxan/Divinylbenzol

PFBBBr	Pentafluorbenzylbromid
PFR	Planted Fixed Bed Reactor
PKA	Pflanzenkläranlage
PTFE	Teflon (Polytetraflouroethan)
PTV	Programmable Temperature Vaporizer
R.S.D.	Relative Standardabweichung
SPE	Festphasen-Extraktion (Solid phase extraction)
SPME	Festphasenmikroextraktion (Solid phase microextraction)
tech. 4-NP	technisches 4-Nonylphenol,
TMCS	Trimethylchlorsilan
TMO	Trimethyloxoniumtetrafluoroborat
TMSI	Trimethylsilylimidazol
U	Umsatz

1 Aufgabenstellung und Ablauf des Teilvorhabens

1.1 Wissenschaftliche Ziele und Aufgaben des Teilvorhabens

Im Mittelpunkt dieses Teilprojektes stand die Frage wie sich, die in Abwässern häufig nachgewiesenen östrogen wirksamen Verbindungen, Nonylphenol (NP), Bisphenol A (BPA) und Ethinylestradiol (EE2) in Teich- und Pflanzenkläranlagen verhalten. Im Gegensatz zu den Belebungsanlagen und Tropfkörpern weist das Abwasser in Teichen und Pflanzenkläranlagen in der Regel eine längere hydraulische Verweilzeit auf bzw. diese Systeme sind durch eine höhere biologische Komplexität gekennzeichnet.

Speziell untergliederte sich dieses Teilprojekt in folgende Teilgebiete:

- Analytische Methodenentwicklungen zum Nachweis dieser Verbindungen in komplexen Abwässern
- Verhalten der Verbindungen in Teich- und Pflanzenkläranlagen (Anlagenbeprobungen)
- Modellversuche zur Aufklärung der Eliminationsmechanismen in Laborwurzelraumreaktoren

1.2 Voraussetzungen, unter denen das Teilvorhaben durchgeführt wurde

Die technischen Voraussetzungen zur Durchführung der Laborversuche im Rahmen des Teilvorhabens und zur Durchführung der Anlagenbeprobungen waren am UFZ gegeben. Hierzu stand die Analysetechnik der Sektion Analytik und die Laborwurzelraumreaktoren bzw. Kontakte zu Anlagenbetreibern in der Sektion Sanierungsforschung zur Verfügung.

1.3 Planung und Ablauf des Teilvorhabens

Der Ablauf des Projektes untergliederte sich in folgende Punkte:

- Erarbeitung von Analysemethoden zur Bestimmung der „endokrinen Disruptoren“ (ED),
- Überprüfung verschiedener Materialien zur Entwicklung eines Laborsystems,
- Beprobung von verschiedenen (Pilot-)Anlagen,
- Durchführung der Experimente in Laborwurzelraumreaktoren

1.4 Wissenschaftlich u. technischer Stand

Bereits 1987 war bekannt, dass BPA in natürlichen Gewässern aerob abgebaut werden kann (Dorn et al. 1987). Bedingung ist eine Adaption der Organismen an den BPA-Abbau. Nicht adaptierte Organismen konnten über 28 Tage keinen Abbau aufweisen (BUA 1997). 1992 berichteten Lobos et al. über Metaboliten und Zwischenstufen bei dem biologischen Abbau von BPA. Sie stellten eine Bilanz über die Kohlenstoffwege auf (60 % CO₂, 20 % Zellaufbau,

20 % andere organische Verbindungen). Es wurde festgestellt, dass eine adaptierte Biozönose einer Industriekläranlage in der Lage sein sollte, einen hohen BPA-Eliminierungsgrad zu erreichen (BUA 1997). Über den Verbleib von BPA in Pflanzenkläranlagen war wenig bekannt. Grundsätzliche Abschätzungen über Adsorption konnten aus publizierten $\log K_{OW}$ -Werten von 2,2-3,8 und $\log K_{OC}$ -Werten von 2,5-3,3 (Staples et al. 1998) bei Kenntnis der Biomassemenge im Klärsystem erhalten werden. Es lagen Berichte über mittlere Halbwertszeiten von BPA mit 2,5-4 Tagen an akklimatisierten und nichtakklimatisierten mikrobiellen Populationen aus Oberflächenwässern und Abwasserbehandlungssystemen vor (Staples et al. 1998). Es lagen keine Berichte vor, die diese Angaben für die Beschreibung des Verhaltens von BPA in Pflanzenkläranlagen nutzten und deren Anwendbarkeit belegten. Ein anaerober BPA-Abbau konnte bislang nicht nachgewiesen werden.

Unter der Bezeichnung Nonylphenol verbirgt sich eine Substanzgruppe, in der sämtliche Strukturisomere (2-Nonylphenol, 4-Nonylphenol, lineare und verzweigte Abkömmlinge) zusammengefasst werden. Umweltrelevant ist hierbei das angewandte technische Gemisch, das aus mindestens 22 isomeren 4-Nonylphenolen besteht (Bhatt 1992). Gaffney fand 1976, dass 1 mg/l NP in häuslichem Abwasser nicht, in industriellen Abwasser dagegen abgebaut wurde. Ekelund et al. konnten 1993 den Abbau von 11 µg/l ^{14}C -markierten techn. 4-NP in Seewasser nachweisen. Tanghe et al. berichteten 1998 über einen temperaturabhängigen techn. 4-NP-Abbau (Optimum bei 28°C) in Laborkläranlagen. Artikel über anaeroben techn. 4-NP-Abbau lassen sich bis jetzt nicht finden. Die wesentlich erhöhten Anreicherungen von techn. 4-NP im Faulschlamm gegenüber dem Belebtschlamm lassen darauf schließen, dass unter anaeroben Bedingungen in den Kläranlagen kein Abbau von techn. 4-NP stattfindet (Giger 1984).

17 β -Estradiol (E2) ist ein natürliches Estrogen. Es wird im menschlichen und tierischen Urin in Form von Glucuroniden ausgeschieden (Desbrow 1998). Im Abwasser bzw. in der Kläranlage wird wieder E2 frei, das zum Estron (E1) oxidiert wird und dann weiter zu Estriol (E3) reagiert.

Pflanzen als biologische Komponente von Pflanzenkläranlagen sind auch in der Lage eine Reihe von organischen Schadstoffen über ihre Wurzel aufzunehmen und zu metabolisieren (Sandermann 1992). So z. B. wiesen Bokern et al. (1998) die pflanzliche Aufnahme von 4-*n*-NP und dessen Metabolisierung zu polareren Verbindungen nach.

Das Verhalten dieser Verbindungen wurde bereits in verschiedenen Kläranlagentypen untersucht. So wurden bereits Untersuchungsergebnisse zur Eliminierung von Estrogenen und Xenoestrogenen in einzelnen Verfahrensstufen von ausgewählten Kläranlagentypen von Hegemann et al. (2002) beschrieben.

Zum Projektbeginn lagen keine Informationen zum Verhalten dieser Verbindungen in Teich- und Pflanzenkläranlagen vor.

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

TU Berlin, Institut für Technischen Umweltschutz, Fachgebiet Siedlungswasserwirtschaft
Straße des 17. Juni 135, 10623 Berlin

ECT Oekotoxikologie GmbH (ECT)
Böttgerstr. 2-14, 65439 Flörsheim

Hessische Landesanstalt für Umwelt (HLfU)
Postfach 3209, 65027 Wiesbaden

Universität Stuttgart, Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und Abfallwirtschaft,
Abteilung Hydrochemie
Bandtäle 2, 70569 Stuttgart

TU Dresden, Institut für Abfallwirtschaft und Altlasten
Pratzschwitzer Str. 15, 01796 Pirna

2 Ergebnisse

2.1 Analytische Methodenentwicklung

2.1.1 Einleitung

Innerhalb des BMBF-Teilprojektes wurden folgende analytische Themen bearbeitet:

- Testung verschiedener Materialien, die für die Konstruktion der Laborpflanzenkläranlagen vorgesehen waren, hinsichtlich der Adsorption der endokrin aktiven Analyten
- Etablierung einer geeigneten Extraktionsmethode zum Nachweis der ausgewählten Estrogene und Xenoestrogene in Wässern naturnaher Kläranlagen, wobei die
 - Erprobung lösemittelarmer Extraktionstechniken zum Nachweis von endokrin wirksamen Verbindungen in Abwässern,

einen Schwerpunkt der Arbeiten darstellten.

Zur Optimierung des analytischen Nachweises wurden weiterhin verschiedene Derivatisierungsreagenzien sowohl im offline als auch im online Modus, um vor allem die chromatographischen Analyseabschnitte zu verbessern.

2.1.2 Adsorptionsuntersuchungen zur Konstruktion der Laborpflanzenkläranlagen

Um beurteilen zu können, welche Materialien sich am besten für die Konstruktion und den Betrieb von Laborreaktorsystemen eignen, wurden Behälter unterschiedlichen Materials (u.a. Glas, Teflon, Polypropylen und -ethylen, Aluminium, Edelstahl sowie Probengefäße aus Glas gefüllt mit Kies, Modellabwasserkonzentrat) mit einer wässrigen Standardlösung der ausgewählten Analyten NP-d₂, BPA-d₁₄ und EE2 gefüllt, verschlossen und entweder für 24 h auf der Schüttelmaschine „homogenisiert“ oder für 24 h mit einem Magnetrührer gerührt.

Die Konzentration der Analyten betrug stets 20 µg/l. Zur Bestimmung des Adsorptionsverhaltens wurde die Festphasenmikroextraktion (SPME) gewählt, welche sich durch ihre Einfachheit, Schnelligkeit und ihren Lösemittelverzicht auszeichnet. Zum damaligen Zeitpunkt wurden die Proben mittels manueller SPME angereichert und unter den im Zwischenbericht 1999 ausführlich beschriebenen Bedingungen analysiert.

In Tabelle 1 sind die Wiederfindungen der untersuchten Materialien angegeben. Als Bezugsgröße wurden 4 ml destilliertes Wasser mit 20 ng internem Standard (2-Brom-2,3-dihydro-1H-inden-1-ol, kurz: Bromindanol) und einer Standardlösung der Analyten dotiert, so dass deren Konzentration ebenfalls 20 µg/l betrug. Die Bezugslösung wurde unmittelbar nach ihrer Herstellung extrahiert und vermessen.

Alle drei Analyten zeigten kaum Affinität zur Adsorption an Glaswänden. An glatten Metalloberflächen sind die Adsorptionerscheinungen verglichen mit denen an aufgerauhten Oberflächen auftretenden vernachlässigbar klein. An Kunststoffen auf der Basis von unsubstituierten Polyalkylenen werden die ED zu fast 100 % adsorbiert. An Teflon adsorbierte BPA kaum, während NP starke Schwankungen aufwies. Die Vitonschläuche erwiesen sich mit 50

bis 90 % Adsorption als ungeeignet. Dennoch konnte aus konstruktionstechnischen Gründen nicht auf deren Verwendung verzichtet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass NP an allen Materialien stark adsorbiert (50 bis 90 %), während sich BPA und EE2 in Modellabwasserkonzentrat stabil verhielten, d. h. weder adsorbiert noch metabolisiert wurden. Darüber hinaus zeigten die beiden Komponenten an Kies eine geringe Adsorption.

Auf der Grundlage dieser Erkenntnisse erfolgte der Aufbau und Testung eines geeigneten Laborreaktorsystems (ausschließliche Verwendung von Glas, Stahl, Teflon).

Tabelle 1: Ergebnisse der Adsorptionsuntersuchungen (Wiederfindung in %)

Material	NP d ₂	BPA d ₁₄	EE2
Glas, N ¹⁾ =4	100	100	n.b. ²⁾
Seesand, N=6	64	99,4	n.b.
PVC, N=4	8	6,2	n.b.
Teflon Fa.Roth, N=8	15,9	100	n.b.
Teflon Aufschlußgefäß, N=4	87,7	81,06	n.b.
Edelstahl, N=4	51,6	95,1	n.b.
Aluminium I, N=2	44,7	87,8	n.b.
Aluminium II, N=2	89,3	87,9	n.b.
Kies, N=2	45	89	66
Modellabwasserkonzentrat, t=0 h, N=2	21	98	100
Modellabwasserkonzentrat, t=48 h, N=2	12	100	100
¹⁾ : N=Anzahl der Messungen; ²⁾ : n.b.=nicht bestimmt			

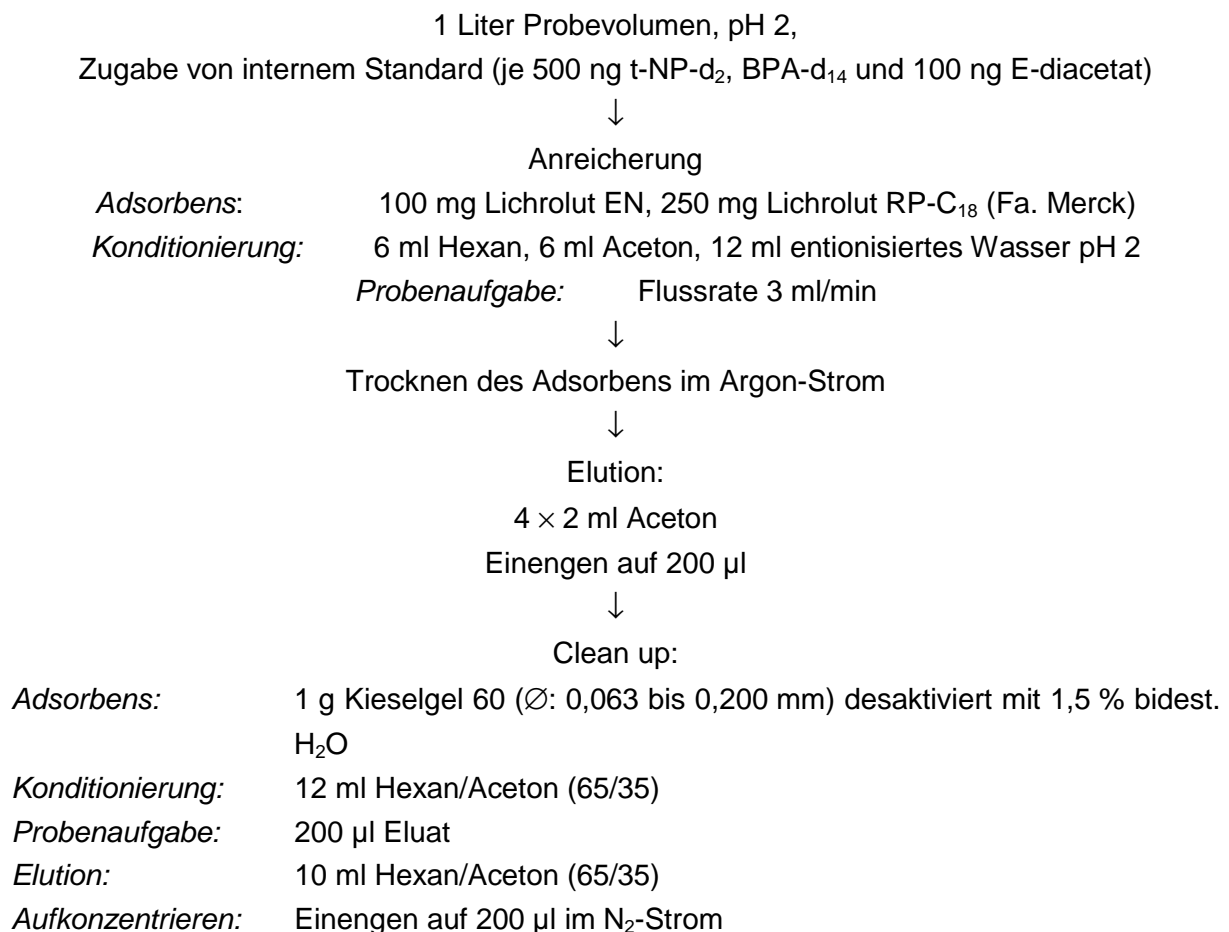
2.1.3 Nachweis von technischem Nonylphenol, Bisphenol A und 17 α -Ethinylestradiol in naturnahen Kläranlagen

Zur Untersuchung des Einflusses der Verfahrenstechnik auf die Eliminationsrate der ausgewählten Analyten in realen naturnahen Kläranlagen (Teich- und Pflanzenkläranlagen) wurden stets 24 h-Zulaufmischproben und Kläranlagenabläufe untersucht, die über einen Zeitraum von einer Woche gesammelt worden waren. Die im Folgenden beschriebene Methodik der SPE-off line-Derivatisierung-GC-MS wurde für die Untersuchung der Kläranlagenproben verwendet. Die Ergebnisse wurden in den vorliegenden Zwischenberichten des Projektes diskutiert und sind im Anhang dieses Abschlussberichtes nochmals aufgeführt.

2.1.3.1 Extraktion und Clean up

In der Literatur werden seit längerem Methoden zum Nachweis von endokrin wirksamen Verbindungen in Abwässern und Oberflächenwasser mittels GC/MS diskutiert (Stumpf et al. 1996, Petrovic et al. 2002), bei denen zur Anreicherung meist die Festphasen-Extraktion (SPE) genutzt wird. Adsorbens der Wahl war RP-C₁₈-Material. Die in unserem Teilprojekt zu

analysierenden Abwasserproben wurden nahezu analog zu der von Ternes und Mitarbeitern (1999 a und b) entwickelten Methode angereichert. Da in den Abwässern auch NP und BPA erfasst werden sollten, wurde die gewählte Aufarbeitungsmethodik hinsichtlich ihrer Leistungsfähigkeit zum Nachweis der Alkylphenole überprüft. Die Komponenten wurden sowohl an einer Mischung aus Lichrolut EN (Copolymer auf der Basis von Ethylvinylbenzol-Divinylbenzol) und RP-C₁₈ und nur RP-C₁₈ angereichert. Es zeigte sich, dass sich sowohl das Adsorbensgemisch als auch RP-C₁₈ alleine zur Anreicherung der drei Analyten eigneten. Während die Alkylphenole mit dem RP-Material bessere Wiederfindungen lieferten, waren die Wiederfindungsraten für EE2 bei Verwendung des Adsorbensgemisches sehr gut. Ebenso war hierbei die Reproduzierbarkeit besser, so dass letztendlich das Adsorbensgemisch weiter verwendet wurde. Desweiteren wurde das Elutionsmittelvolumen sowie das auf den SPE-Schritt folgende Clean up über Kieselgel überprüft. Verglichen mit der von Stumpf et. al (1996) beschriebenen Methode wurde das Elutionsmittelvolumen von 4 auf 8 ml Aceton erhöht. Für das Clean up wurde das Elutionsmittelvolumen bestehend aus Hexan/Aceton: 65/35 (v/v) auf 10 ml erhöht. Die Festphasenextraktion sowie das Clean up sind im folgenden Fließdiagramm zusammengefasst:



2.1.3.2 Derivatisierung und GC/MS-Analyse

Zur Erhöhung der Trennleistung in Verbindung mit GC/MS-Analyse ist für den Nachweis polarer Substanzen ein Derivatisierungsschritt empfehlenswert. Insbesondere die natürlichen und synthetischen Hormone lassen sich nur in derivatisierter Form empfindlich nachweisen. Zu den wichtigsten Kriterien bei der Wahl des Derivatisierungsreagenzes gehören die erreichbare Empfindlichkeit, möglichst vollständiger Umsatz, wenig Einfluss auf das GC/MS-System und im Falle von MS-Analysen die Bildung spezifischer Fragmentationen (Molekülion, Molekülion abzgl. charakteristischer Derivatisierungsgruppe). Aufgrund der Vielzahl der im Handel angebotenen Reagenzien, wurden verschiedene Silylierungsreagenzien, ein Alkylierungsreagenz (Pentafluorbenzylbromid) und ein Acylierungsreagenz (Heptafluorbuttersäureanhydrid) (Mol et al. 2000) erprobt. Neben der standardmäßig durchgeführten offline Derivatisierung zu Trimethylsilylderivaten mit TMSI in BSTFA wurde versucht, eine zeit- und reagenzsparende online Derivatisierung zu testen, wobei auch hier die Silylierung das Mittel der Wahl war.

Der online-Silylierungsschritt im PTV-Injektor (KAS 4 der Firma Gerstel) erfolgte in Anlehnung an eine in der Literatur für die Analyten beschriebenen Methode zu deren Nachweis in Oberflächengewässern (Holtey-Weber et al. 1999). Ausgenutzt wurde dabei die Möglichkeit zur Programmierung der Injektortemperaturen und damit unter anderem zur Lösemittelelimination vor der eigentlichen Verdampfung der Analyten. Im Handel sind eine Vielzahl von Silylierungsmitteln erhältlich, die sich sowohl in der Abgangs- als auch in der Derivatisierungsgruppe unterscheiden. Während für sterisch ungehinderte Hydroxylgruppen verschiedene Silylierungsmittel (N,O-bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA), N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA), (N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoracetamid (MSTFA) verwendet werden können, benötigen sterisch gehinderte Hydroxylgruppen aggressivere Reagenzien. Letzteres trifft auf Steroide zu, die sich bevorzugt mit Trimethylsilylimidazol (TMSI) umsetzen lassen. Offline-Derivatisierungen zur Wahl eines geeigneten Silylierungsgemisches zeigten, dass der Umsatz bei einer Mischung von 1 % TMSI in BSTFA vollständig ist. Auf der Grundlage dieser Reagenzzusammensetzung wurde der online-Silylierungsschritt optimiert. Untersucht wurden verschiedene Glasinserts (Single-baffled Liner, Multi-Baffled-Liner, mit Glaswolle beladener und gesinterte deaktivierte Liner). Die Reaktionszeiten wurden im Bereich von 1 und 3 Minuten bei 60°C und 100°C untersucht. Die Zeit, die zur Lösemittelelimination erforderlich ist, der dazugehörige Gasfluss und -druck gehörten zu den wichtigen Einflußgrößen, die ebenfalls näher betrachtet wurden. Die Injektionsbedingungen, die letztendlich gewählt wurden, sind im folgenden Fließdiagramm zusammengefasst:

Online-Silylierung:

<i>Autosampler:</i>	MPS 2 (Fa. Gerstel)
<i>PTV-Injektor:</i>	KAS 4 (Fa. Gerstel)
<i>Probevolumen:</i>	80 µl
<i>Silylierungsreagenz:</i>	BSTFA/TMSI: 100/1
<i>Zudosiertes Reagenzvolumen:</i>	20 µl
<i>Reaktionszeit im Probengefäß:</i>	0 min
<i>Injektionsvolumen:</i>	5 µl

PTV-Programm: 40°C, 0,1 min – 100 K/min auf 60°C, 1,5 min 290 K/min auf 300°C, 2 min
0,05 min Split,
Split geschlossen ab 0,05 min bis 5 min



GC/MS-Bedingungen:

Gerät: GC 6890 mit MSD 5973 (Fa. Agilent)
Trägergas: Helium
Vordruck: 8 psi, const. flow
Säule: HP5-MS, 30 m × 0,25 mm, 0,25 µm d_f
Ofen: 40°C, 5 min – 10 K/min auf 290°C, 10 min
Interface: 280°C
Ionisation: EI+ (70 eV)
Ionenquellentemperatur: 230°C
Modus: Selected-Ion-Monitoring

Für stark Matrix belastete Wässer wie z.B. die Zuläufe der Teichkläranlage Neiden eignen ist ein online-Derivatisierungsschritt ungeeignet, da zu viel unerwünschte Begleitstoffe wie z.B. Fettsäuren oder Huminstoffe ebenfalls mit umgesetzt werden und die Analyse sehr erschweren. Desweiteren kommt es zu schnellen Gerätekontaminationen und somit zu Empfindlichkeitsverlusten. Deswegen wurde der Derivatisierungsschritt für hoch Matrix belastete Wässer im offline-Modus durchgeführt. Diese Prozedur wurde schließlich als Standardderivatisierung für alle Kläranlagenwässer benutzt und sieht folgendermassen aus: Die nach dem Clean up auf ca. 200 µl eingeeengten Extrakte wurden bis zur Trockne eingedampft, mit 100 µl Sylon BTZ (Silylierungsreagenz der Firma Supelco, Zusammensetzung BSA+TMCS+TMSI, 3:2:3) versetzt und 1 h bei 60°C derivatisiert. Um Kristallbildung und Kapillarblockade vor allem an TMSI und TMCS (Trimethylchlorsilan) zu vermeiden, induziert durch überschüssige Reagenz, diese mit Millipore Wasser pH 3 hydrolysiert. Die Derivate wurden mit 500 µl n-Hexan extrahiert, über Natriumsulfat getrocknet und auf 200 µl eingeeengt. Zur GC/MS-Analyse wurde 1 µl im Pulsed-Splitless Modus injiziert. Die GC/MS- Bedingungen können wie folgt zusammengefasst werden (Tabelle 2)

Tabelle 2: GC/MS Geräteparameter der Standardprozedur zur Bestimmung von der ED

Kapillarsäule	HP-5MS Länge: 30 m; ID: 0,25 mm; d _f :0,25 µm
Temperaturprogramm	50°C, 4 min – 20 K/min auf 140°C, 1 min – 10 K/min auf 280°C, 8 min
Interface	280°C
Ionisation	EI+(70eV)
Ionenquellentemperatur	250°C
Modus	Selected-Ion-Monitoring

Da zur Analyse der realen Abwässer die Proben offline derivatisiert wurden, wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen über das Gesamtverfahren bestehend aus SPE, Clean up und offline Derivatisierung) anhand von Blindwertanalysen mit Leitungswasser bestimmt und sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen über das Gesamtverfahren - ermittelt anhand von Blindwertanalysen (Leitungswasser)

Parameter	NP	BPA	EE2
Nachweisgrenze in µg/l	0,06	0,02	0,01
Bestimmungsgrenze in µg/l	0,18	0,06	0,03

2.1.4 Einsatz und Verwendbarkeit lösemittelarmer Extraktionstechniken zum Nachweis von Estrogenen und Xenoestrogenen in Abwässern

Zum spurenanalytischen Nachweis von ED in Abwässern werden hauptsächlich die klassischen Anreicherungstechniken wie Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) und SPE genutzt. LLE ist charakterisiert durch einen hohen Verbrauch an organischen Lösemitteln, Substanzen sowie hohen personellen und zeitlichen Aufwand. Bei SPE verhält es sich ähnlich, hier ist jedoch der Verbrauch an Lösemitteln wesentlich geringer.

Einen Schwerpunkt der analytischen Untersuchungen stellte die Erprobung lösemittelarmer und damit umweltfreundlicher Extraktionstechniken dar. Dabei standen Untersuchungen zur Eignung von SPME im Vordergrund. Die manuelle Variante dieser Anfang der 90er Jahre von Pawliszyn et. al (1999) entwickelten Anreicherungstechnik war bereits für die in 2.1.2 beschriebenen Adsorptionsuntersuchungen genutzt worden.

Als Beispiele sind in Tabelle 4 die Nachweisgrenzen für eine optimierte manuelle SPME Methode beschrieben.

Tabelle 4: Nachweisgrenzen der ausgewählten ED für die manuelle SPME-GC/MS-Methodik

Komponente	Nachweisgrenze in µg/l
NP	1,3 ³⁾
BPA	1
EE2	0,25

Um den Probedurchsatz dieser Methode erhöhen zu können, wurde eine automatisierte Variante mit Hilfe des Multipurpose Autosampler „MPS 2“ der Firma Gerstel entwickelt. Dazu wurden die Ergebnisse der manuellen SPME auf den automatischen Probengeber übertragen und optimiert (Braun et al. 2003).

Neben der direkten Anreicherung der Analyten aus dem Wasser mittels einer beschichteten Fused-Silica-Faser ohne darauffolgende Derivatisierung wurden weitere Untersuchungen zur Empfindlichkeitssteigerung durchgeführt. Hier wurden zum einen SPME- und Derivatisierungs-Schritt vereint, zum anderen wurde nach der Extraktion eine online- on-column Silylierung erprobt. Extraktions- und Derivatisierungsbedingungen und die zugehörigen analytischen Parameter werden im folgenden detailliert beschrieben.

2.1.4.1 Automatisierung der SPME-GC/MS-Methodik zum Screening von Kläranlagenwässern und zur projektbegleitenden Analytik der Laborpflanzenkläranlagen

Zunächst mussten Probevolumen und Einstichtiefe der SPME-Faser im Probengefäß optimiert werden. Anschließend wurden Salzgehalt und pH Wert unter Verwendung einer Polyacrylat-Faser untersucht. Nachdem diese Parameter festgelegt worden waren (9,5 ml Reinstwasser, 105 mg/ml NaCl, pH 2, 20 ng interner Standard (Bromindanol, siehe 2.1.2), wurden nochmal verschiedene Beschichtungsmaterialien (100 µm Polydimethylsiloxan (PDMS), 65 µm Polydimethylsiloxan/Divinylbenzol (PDMS/DVB) und 85 µm Polyacrylat-Faser (PA)) hinsichtlich ihrer Selektivität zur Anreicherung der ausgewählten Analyten getestet. Dabei zeigte sich, dass sich die 85 µm PA-Faser am besten zur Anreicherung aller Komponenten eignet. Diese wurde dann auch zur Optimierung der Extraktionszeit verwendet. Bei einer Extraktionszeit von 180 min hat keine der 3 Komponenten den Gleichgewichtszustand erreicht. Als Kompromiss für alle Analyten wurde eine Extraktionszeit von 60 min gewählt, entsprechend dem Vorgehen mit manueller SPME. Untersucht wurden ebenfalls Desorptionszeit- und temperatur. Als optimale Kombination beider Parameter haben sich eine Desorptionsdauer von 3 min bei einer Temperatur von 280°C erwiesen. Die GC/MS-Bedingungen der automatisierten SPME-Variante sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: GC/MS-Bedingungen der automatisierten SPME-Variante

Gerät	GC 6890 gekoppelt mit MSD 5973 (Fa. Agilent)
Autosampler	Multipurpose Autosampler MPS 2 (Fa. Gerstel)
Split/Splitlos-Injektor	280°C, splitless für 3,5 min
Desorptionszeit	3min
Trägergas	Helium (Vordruck: 55 kPa)
Glasliner	deaktivierter Glasliner, I.D. = 2 mm
Einstichtiefe	5,4 cm
Kapillarsäule	HP-5MS Länge: 30 m; ID: 0,25 mm; d _f :0,25 µm
Temperaturprogramm	50°C, 4 min – 20 K/min auf 140°C, 1 min – 10 K/min auf 280°C, 8 min
Interface	280°C
Ionisation	EI+(70eV)
Ionenquellentemperatur	250°C
Modus	Selected-Ion-Monitoring

Zur Ermittlung des linearen Bereiches wurde zwischen 0,027 bis 195 µg/l kalibriert. Dies entsprach 13 Kalibrierpunkten, wobei von jedem Level eine Doppelbestimmung erfolgte. Die überarbeitete SPME- Methode zeigte über 3 Größenordnungen lineares Verhalten.

NWG wurden sowohl für Reinstwasser als auch für Kläranlagenabläufe und Modellabwasser ermittelt. NWG in Reinstwasser wurden anhand von Blindwertanalysen und niederen Kalibrierlevels nach dem Signal/Rausch-Kriterium von 3:1 bestimmt und reichen von 0,03 µg/l für

EE2 bis zu 0,4-1 µg/l für BPA. Zur Ermittlung von NWG in Abwässern wurden Zulaufe mit einem internem Standardgemisch bestehend aus 4-*n*-NP, BPA-d₁₄ und E-diacetat dotiert. Verglichen mit einer analog gemessenen Reinstwasserprobe, wurde in dem Chromatogramm der Zulaufprobe eine sehr starke Unterdrückung der internen Standards beobachtet. Damit eignete sich die SPME-Methode nicht zum Nachweis von ED in stark matrixbehafteten Proben wie z. B. Kläranlagenzulaufen. NWG der untersuchten Kläranlagenabläufe und Modellabwasser wurden nach dem Verfahren der Standardaddition ermittelt und waren für MAW um den Faktor 2-3 und für den untersuchten Ablauf um den Faktor 3 schlechter.

Zur Bestimmung der Präzision und des Carry Overs wurden 6 Standards mit jeweils 4 µg/l je Komponente hergestellt und analysiert. Die mittlere relative Standardabweichung betrug 8%; der hierbei gemessene Carry Over war mit 2 % für EE2 vernachlässigbar klein, während NP und BPA keine Verschleppungseffekte zeigen.

Vergleicht man die Nachweisgrenzen der SPME- mit denen der SPE-Methode, so erwies sich die SPE-Derivatisierung-GC-MS Methodik als die wesentlich empfindlichere. Zusätzlich können bei Anwendung der SPME zahlreiche Matrixkomponenten mitextrahiert werden, die die Auswertung erschweren. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass SPE bezüglich des spurenanalytischen Nachweises der ausgewählten ED, die leistungsfähigere Probenanreicherungstechnik ist. Aufgrund ihrer Schnelligkeit und ihrer Option zu einem hohen Probendurchsatz, eignet sich SPME zum Screening insbesondere von Kläranlagenabläufen und bei Modellversuchen, wo mit höheren ED-Konzentrationen gearbeitet wird. In diesem Zusammenhang wurde die automatisierte SPME-Variante zur Prozessüberwachung des Verhaltens von Bisphenol A in den Ende 1999 in Betrieb genommenen Laborpflanzkläranlagen genutzt.

2.1.4.2 Festphasenmikroextraktion gekoppelt mit online Silylierung im PTV-Injektor

Bei Kopplung von manueller SPME und darauffolgender GC/MS-Analyse als auch der automatisierten SPME-Variante wurden keine zufrieden stellenden NWG ermittelt. Da SPME sich aber als schnelle Anreicherungstechnik bewährt hat, wurden Experimente durchgeführt, die sich mit einem online-Derivatierungsschritt im PTV-Injektor simultan zur Desorption der Analyten von der Faser beschäftigen. Bei den ersten Untersuchungen wurden die Analyten aus einer dotierten Reinstwasserprobe mittels manueller SPME angereichert. Sowohl vor als auch nach dem Desorptionsschritt wurden 1 µl BSTFA bzw. 1 µl eines BSTFA/TMSI-Gemisches (100:1) in den auf 60°C temperierten PTV-Injektor injiziert. Dabei wurden NP als auch BPA vollständig umgesetzt, EE2 zu maximal 90 %. Die Response-Faktoren (Peakflächenverhältnis derivatisierte zur underivatisierten Form) betrugen 1,5 für NP, 2 für BPA und 0,5 für EE2. Letzters muss nicht das Ergebnis der Derivatisierung sein; kleinste Verunreinigungen im Glasinsert können die Derivatisierung stören und damit Auslöser für die schlechte Empfindlichkeit sein. Nach Installation des Multipurpose Autosampler wurden diese Versuche wiederholt und optimiert. Der Anteil an TMSI wurde von 1 auf 10 % erhöht, gleichzeitig wurden die Volumina der Reagenzien von 1 auf 0,4 µl verringert, wobei auf gleichbleibenden Umsatz geachtet wurde. Es wurde beobachtet, dass sich der Umsatz für EE2 mit der Anzahl der Messungen in Richtung monoderivatisiertem EE2 verschob. Im

ungünstigsten Fall wurde EE2 vollständig in TMS-Estron umgewandelt. Dieses Verhalten ist wie oben bereits beschrieben auf Verunreinigungen sowie aktive Stellen im Glasinsert zurückzuführen. Dennoch wurden für diese Kopplungsvariante Nachweisgrenzen und Präzision bestimmt. Die Nachweisgrenzen bewegten sich im Bereich zwischen 0,04 µg/l (4-*n*-NP (interner Standard)) und 1 µg/l (BPA) und erreichten damit nicht die NWG der Methoden ohne Derivatisierung. Die Präzision der Methode, mit einem Mittel von 17,3 %, war auch nicht zufriedenstellend, so dass resümiert werden musste, dass sich diese Kopplungsvariante nicht zum spurenanalytischen Nachweis von ED eignet.

2.1.4.3 Festphasenmikroextraktion gekoppelt mit in-situ Derivatisierung

Neben der unter 2.1.4.2 beschriebenen Kopplungsvariante aus SPME und anschließender online-Silylierung im PTV-Injektor wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Analyten zunächst im wässrigen Medium mit einem geeigneten Reagenz derivatisiert und anschließend erst mit einer passenden SPME-Faser angereichert wurden. Auf diesem Weg sollte überprüft werden, ob die erhaltenen Derivate selektiver angereichert werden können.

Getestet wurden zwei Reagenzien, ein Acylierungsreagenz – Butylchloroformat (BCF) – und ein Methylierungsreagenz – Trimethyloxoniumtetrafluoroborat (TMO).

Für die Derivatisierung mit Butylchloroformat und folgender SPME wurde der Autosampler MPS 2 genutzt. Die Reaktion mit TMO und der SPME Extraktionsschritt wurde dagegen manuell durchgeführt. Für diese Versuche wurde das Analytenspektrum um ausgewählte Arzneimittelwirkstoffe erweitert, deren Eintrag in die aquatischen Umwelt in erwiesenem Maße über kommunale Abwässer erfolgt. Zusätzlich zu den drei untersuchten ED wurden acide Pharmazeutika (Bezafibrat, Clofibriensäure, Ibuprofen und Diclofenac) sowie Metoprolol mit den beiden in-situ Derivatisierungsreagenzien untersucht Strukturen siehe Tabelle 6.

Butylchloroformat (BCF)

In Anlehnung an eine in der Literatur beschriebene Methode zum Nachweis von Phenoxysäuren und Phenolen in Wasser mittels in-situ Derivatisierung mit Butylchloroformat (Henriksen et al. 2001, Werres et al. 2000), wurden zunächst die Derivatisierungsbedingungen optimiert. Danach erst wurde ein geeigneter Fasertyp ausgewählt und der Extraktionsschritt optimiert. Die Reaktion mit BCF betreffend wurde auf der Basis einer 10 ml Reinstwasserprobe mit 10 µg/l je Analyt untersucht (zudotiertes BCF-Volumen 9 und 17 µl, Kaliumcarbonatkonzentration 8, 17 und 25 mg/ml, Pyridinkonzentration 10 und 1000 µg/ml, Natriumchloridkonzentration 0 und 300 mg/ml, Reaktionszeit 30 und 60 min).

Der maximale Umsatz in einer 10 ml Probe wird bei einem BCF-Volumen von 17 µl, einer K₂CO₃-Konzentration von 17 mg/ml ohne Zusatz von Pyridin und NaCl bei einer Reaktionszeit von 30 min erreicht.

Getestet wurden eine 85 µm Polyacrylat- und 100 µm Polydimethylsiloxan-Faser, wobei mit letzterer eine größere Extraktionsausbeute erzielt wurde. Anschließend wurde ein Extraktions-Zeit-Profil aufgenommen. Der Gleichgewichtszustand wurde nach 60 min Extraktionszeit erreicht. BCF eignet sich zwar zur Derivatisierung von Carbonsäuren, dennoch war

der Umsatz für die aciden Pharmakas und Metoprolol unter den gegebenen Bedingungen sehr schlecht. Deswegen wurden sie in den weiteren Betrachtungen nicht berücksichtigt. Abschließend wurden unter den optimierten Bedingungen NWG, Präzision und linearer Bereich ermittelt. Es zeigte sich, dass die in-situ-Variante eine verbesserte Nachweisgrenze von BPA auf 100 ng/l ergab, bezüglich NP und EE2 jedoch keine weitere Verbesserung zu erzielen war.

Ein Nachteil der Derivatisierung mit BCF in Kombination mit SPME lag am stark basischen Milieu der Reaktion, das die Lebensdauer der SPME-Faser einschränkte.

Trimethyloxoniumtetrafluoroborat

Eine weitere in der Literatur (Liebich et al. 1998) aufgeführte in-situ Derivatisierungsvariante in Kombination mit anschließender SPME-GC/MS-Analyse ist die Reaktion mit TMO. Bei der von Liebich et al. beschriebenen Methode zum Nachweis von organischen Säuren in Urin läuft die Derivatisierung in 5 Schritten ab. Zunächst wird die wässrige Probe durch Zugabe von Natriumcarbonat alkalisch gemacht, anschließend wird eine definierte Menge TMO innerhalb eines geeigneten Zeitfensters hinzugegeben. Nach kurzem Rühren wird mit NaHCO_3 neutralisiert. Dieses Vorgehen- Zugabe von TMO und Neutralisation mit NaHCO_3 wird zweimal wiederholt. Nach weiterer Zugabe von TMO folgt ein alkalischer Zwischenschritt. Abschließend wird wieder TMO addiert und mit NaHCO_3 neutralisiert. Um überschüssiges BF_3 zu zerstören und damit den schädigenden Einfluss von BF_3 auf die GC-Säule zu minimieren, wird die Lösung für einige min bei 100°C inkubiert. Hinsichtlich der Reaktion mit TMO wurden auf der Grundlage einer mit $10\ \mu\text{g/l}$ je ED bzw. Pharmasäure dotierten 4 ml Reinstwasserprobe folgende Parameter variiert und optimiert:

- TMO-Gesamtmenge (60, 100 und 150 mg) bzw. Anzahl der TMO-Schritte
- Kaliumcarbonat-Gesamtmenge (20, 40 und 60 mg)-bzw. Anzahl der alkalischen Zwischenschritte
- Natriumhydrogencarbonat-Gesamtmenge (15,30, 45 und 60 mg) – abhängig von der Anzahl der TMO-Schritte
- Zugabe von Pyridin ($100\ \mu\text{g}$ absolut) vor der ersten TMO-Zugabe
- Zugabe von Natriumchlorid nach in-situ –Derivatisierung (1 g)
- Reaktionszeit nach jeder TMO-Zugabe (1 und 5 min) und nach jedem alkalischen Zwischenschritt (5 und 10 min)
- Hydrolysedauer bei 100°C (2, 7, 10 und 15 min)

Es zeigte sich, dass unter den verschiedenen Bedingungen kein vollständiger Umsatz für ED erzielt werden kann. Währenddessen war der Umsatz für die Pharmasäuren im allgemeinen sehr gut. In diesem Zusammenhang wurde der Schwerpunkt der in-situ-Variante mit TMO auf die vollständige Methylierung der Säuren gelegt. Als optimale Bedingungen wurden folgende Parameter gefunden: 4 ml Probe werden mit 20 mg K_2CO_3 versetzt und 5 min bei 1000 U/min gerührt, dann innerhalb von 4 min insgesamt 40 mg TMO addiert und wieder 5 min gerührt. Anschließend wird mit 15 mg NaHCO_3 neutralisiert und 1 min gerührt. Dieser Schritt wird wiederholt. Abschließend wird der pH-Wert gemessen, der die Lebensdauer der Fasern betreffend bei 7 liegen sollte. Vor der Extraktion wird die Lösung für 7 min bei 100°C hydrolysiert.

Zur Anreicherung der methylierten Pharmakas wurden wie in b) eine 85 µm PA und eine 100 µm PDMS-Faser getestet. Es stellte sich heraus, dass bei Verwendung der PA-Faser die Extraktionsausbeute höher ist. Von den methylierten Produkten wurde eine Extraktions-Zeit-Kurve erstellt, wobei das Clofibrinsäure- und das Bezafibratderivat nach 60 min den Gleichgewichtszustand erreicht haben, während Ibuprofen und Diclofenac nach 120 min immer noch nicht im Gleichgewicht sind. Um mit akzeptablem Gesamt-Analysezeiten bei hoher Extraktionsausbeute arbeiten zu können, wurden 60 min als Extraktionszeit festgelegt. Vergleicht man die für die Pharmasäuren mit der TMO-Variante [17] ermittelten analytischen Parameter mit denen in der Literatur beschriebenen leicht abweichenden Varianten der Derivatisierung vor SPME-Anreicherung und GC/MS Analyse, so findet man eine gute Übereinstimmung.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Möglichkeiten zum Nachweis von ED und einiger Pharmasäuren mit lösemittelarmen Extraktionstechniken nicht die Leistungsfähigkeit klassischer Methoden wie SPE und LLE erreichen. Dennoch eignen sie sich aufgrund ihrer Schnelligkeit, Einfachheit und Automatisierbarkeit als Screening-Methode für wässrige Proben mit ED Konzentrationen im µg/l Bereich.

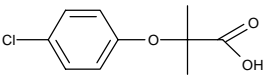
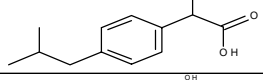
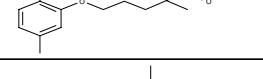
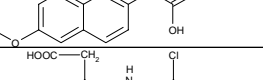
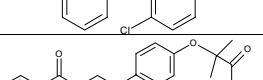
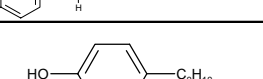
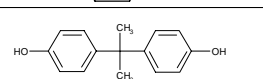
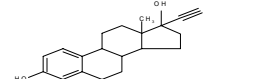
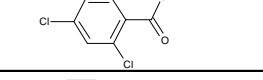
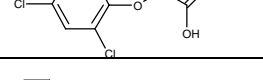
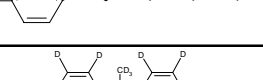
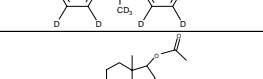
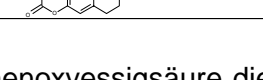
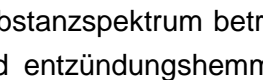
2.1.4.4 GC-NCIMS-Analyse

Um die Empfindlichkeit und Selektivität der analytischen Bestimmung besonders extremer Substanzspuren in sehr komplizierter Abwassermatrix zu verbessern wurden weitere neue Methodenkombinationen getestet. So konzentrierten sich die analytischen Arbeiten im letzten Projektjahr auf die zusätzliche Bestimmung ausgewählter pharmazeutischer Reststoffe in Abwasser der Pflanzenkläranlage–Langenreichenbach sowie Flusswasser der Saale bei Halle/Saale.

Als neue, sehr empfindliche Analysemethode wurde dabei die Kombination von GC und negativ chemischer Ionisation–Massenspektrometrie (NCI-MS) nach einer geeigneten Derivatisierungsmethode eingesetzt.

In Tabelle 6 sind die untersuchten Analyten aufgeführt.

Tabelle 6: Untersuchte Analyten.

Analyte	Struktur	SIM Ionen m/z
Clofibrinsäure		213.1; 215.1
Ibuprofen		205.2; 206.2
Gemfibrozil		249.2; 250.2
Naproxen		229.1; 230.1
Diclofenac		456; 458
Bezafibrate		360.1; 362.2
t-NP		219.2; 220.2
BPA		407.1; 408.1
EE2		295.2; 296.2
2,4-Dichlorbenzoesäure		189; 191
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure		219; 221
4n-NP		219;220
BPA d14		418.2; 419.2
Estradioldiacetate		313.2; 314.3

2,4-Dichlorbenzoesäure sowie 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure dienten als interne Standards. Die zusätzlich zum bereits untersuchten Substanzspektrum betrachteten fünf Verbindungen werden als Lipidsenker bzw. schmerz- und entzündungshemmende Wirkstoffe in großen Mengen in der Humanmedizin angewendet und gelangen so in Haushaltsabwässer. Über oft ungenügende Eliminierung in kommunalen Kläranlagen gelangen diese Komponenten dann in angrenzende Oberflächenwässer und können auf Grund ihrer Polarität und Resistenz auch Grundwasserströme verunreinigen. Deshalb wurden diese Verbindungen in letzter Zeit als umweltrelevante Schadstoffe eingestuft und entsprechende analytische Methoden müssen zu ihrer Bestimmung entwickelt und getestet werden.

Das Gesamtverfahren, das für alle genannten Schadstoffe optimiert wurde, bestand aus:

1. Anreicherung über eine SPE-Disk Apparatur(ENVI™DSK SPE der Fa. Supelco)
2. Derivatisierung zu Pentafluorbenzylethern bzw. -estern
3. Nachweis mit NCI-MS

Probenahme

Ein Liter des Ablaufes der Kläranlage Langenreichenbach sowie je ein Liter von 10 Messpunkten entlang der Saale wurden angesäuert (pH 3), über einen Glasfaserfilter filtriert (GF52), mit internen Standards versetzt und danach wie folgt angereichert.

SPE-Disk Prozedur

Die Disk wurde mit 50 ml Methanol und 30 ml Wasser mit pH 3 konditioniert. Danach erfolgte die Probeanreicherung mit einem Fluss von 50 ml/min. Nach einer Trockenphase von einer Stunde im N₂-Strom können die Analyten mit 30 ml Methanol oder 40 ml Aceton (weniger störende Koelution von Fettsäuren) von der Disk eluiert werden. Die Methanolextrakte müssen bis zur Trockne eingeengt werden, die Acetoneluat nur bis zu einem Volumen von 1 ml, um danach derivatisiert zu werden.

Derivatisierung

In Anlehnung an die Derivatisierung mit Pentafluorbenzylbromid (PFBBR), beschrieben von Nakamura et al. (2001), wurden die Extrakte in 1 ml Aceton gelöst, mit 100 µl 10 %-iger wässriger Kaliumcarbonatlösung und 100 µl einer 5%-igen acetonischen Lösung von PFBBR versetzt.

Die Lösung wurde 1 Stunde bei 60°C gehalten. Anschließend wurde die Lösung im N₂-Strom auf ein Volumen von 200 µl eingeengt. Die Derivate wurden mit 1 ml n-Hexan extrahiert, mit 500 µl Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet.

Zur Analyse wurden die Derivate in 200 µl Hexan vorgelegt. Durch Zugabe von jeweils 1,2,3,4-Tetrachlorbenzen (2 µg/µl) wurde die Reproduzierbarkeit der jeweiligen Analyse kontrolliert.

GC-NCIMS-Analyse

Die gaschromatographische Trennung erfolgte an einem HP 6890 A, über eine 30 m HP5-MS Kapillare, mit einem GC-Ofentemperaturprogramm von: 50°C- 1 min- 10 K/min- 280°C - 13 min. Von jeder Probe wurde 1 µl splitless injiziert bei einer Injektortemperatur von 280°C. Die nachfolgende massenspektrometrische Analyse (HP MSD5973) erfolgte mittels chemischer Ionisierung im negativ Mode und selected ion monitoring (SIM). Als Reaktandgas wurde Methan eingesetzt, bei einer Ionenquellentemperatur von 150°C.

Alle experimentellen Parameter sowie die einzelnen Optimierungs- und Validierungsschritte der Methodik sind in Braun et al. (2003b) im Detail zu finden.

Resultate

Die entwickelte Methodologie eignet sich hervorragend für die Spurenbestimmung der ausgewählten Pharmaka weniger gut für die endokrin wirksamen Verbindungen. Die Nachweisgrenzen für die Pharmaka liegen im niederen ng/l Bereich wie Tabelle 7 zeigt:

Tabelle 7: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der neu getesteten SPE-Disk Anreicherung und der bisher als Standardmethode genutzten Aufkonzentration über SPE-Kartuschen in ng pro Liter

Analyte	SPE-Disk-Derivat.- GC-NCIMS		SPE-Kartusche-Derivat.-GC-NCIMS	
	LOD in ng l ⁻¹	LOQ in ng l ⁻¹	LOD in ng l ⁻¹	LOQ in ng l ⁻¹
Clofibrinsäure	0.01	0.03	0.01	0.03
Ibuprofen	0.02	0.06	0.01	0.03
Gemfibrozil	0.1	0.3	0.04	0.12
Naproxen	0.5	1.5	0.05	0.15
Diclofenac	0.4	1.2	0.06	0.12
Bezafibrate	0.15	0.45	0.2	0.6
t-NP	25	50	25	50
BPA	1	3	0.05	0.15
EE2	0.2 – 0.4	0.6	0.2	0.6

Die getesteten SPE-Disks haben gegenüber den herkömmlichen, klassischen SPE-Kartuschenprinzip den Vorteil, dass die Anreicherung der Analyten wesentlich zeitsparender verläuft (Einsparung um die Hälfte der Arbeitszeit gegenüber normaler SPE). Allerdings werden keine NWG einer normalen SPE-Kartusche (mit zusätzlichem, zeitaufwendigen sample clean-up) erreicht, wie aus der obigen Tabelle ersichtlich ist. Die neue Methodik zeigte sehr gute Linearität und Reproduzierbarkeit im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 100 ng/l.

Am Beispiel der zwei folgenden Chromatogramme sollen weitere Vorteile der neuen Methode demonstriert werden.

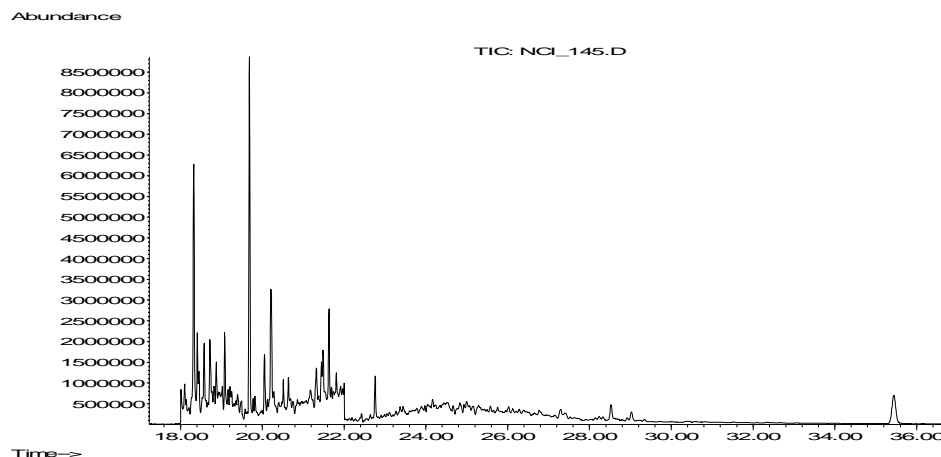


Abbildung 1: GC-NICI-MS Analyse des Ablaufes der Pflanzenkläranlage Langenreichenbach.

Die Kombination der speziellen PFBBBr-Derivatisierung und NCIMS-Analyse ergibt eine hohe Selektivität für den Nachweis der Zielanalyte. Die Matrix führt bei dieser hohen Analyseselektivität zu weniger störenden Überlagerungen. Wird zusätzlich die Standardadditionsmethode zur Quantifizierung herangezogen, erleichtert das die Auswertung wesentlich, wie in Abbildung 2 demonstriert.

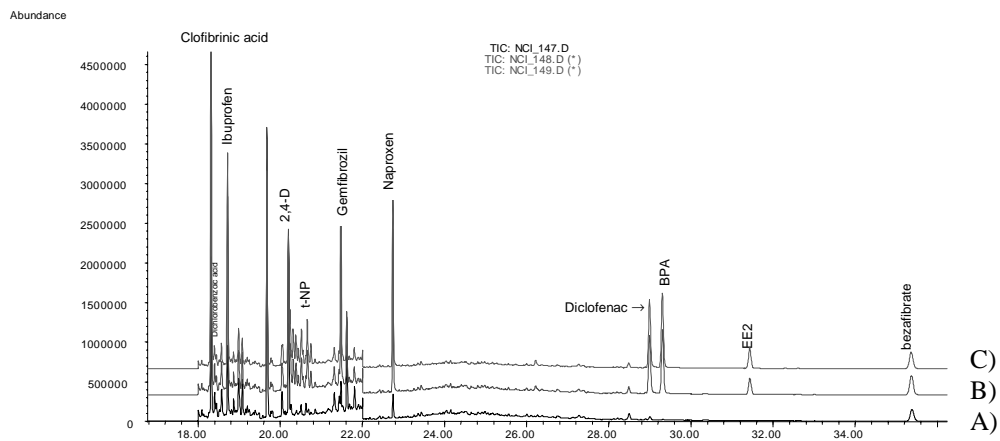


Abbildung 2: A) Ablaufprobe; B) Ablaufprobe plus 25 ng l⁻¹ je Standardkomponente und C) Ablaufprobe plus 50 ng l⁻¹ je Standardkomponente

Dass die betrachteten pharmazeutischen Reststoffe tatsächlich durch Klärwerkseinträge in die Umwelt gelangen, konnten Messungen im Frühjahr 2003 entlang der Saale durch Halle (flussabwärts) zeigen.

An drei Beispielen Clofibrinsäure, Diclofenac und Bezafibrat in Abbildung 3 soll der Konzentrationsverlauf entlang der Saale gezeigt werden. Die Messpunkte B und G zeichnen sich durch erhöhte Konzentrationen der Verbindungen aus und stellen einmal die Einmündung der Weißen Elster (Leipziger Abwasser) dar (B) zum anderen den Ablauf des Klärwerkes Halle (G).

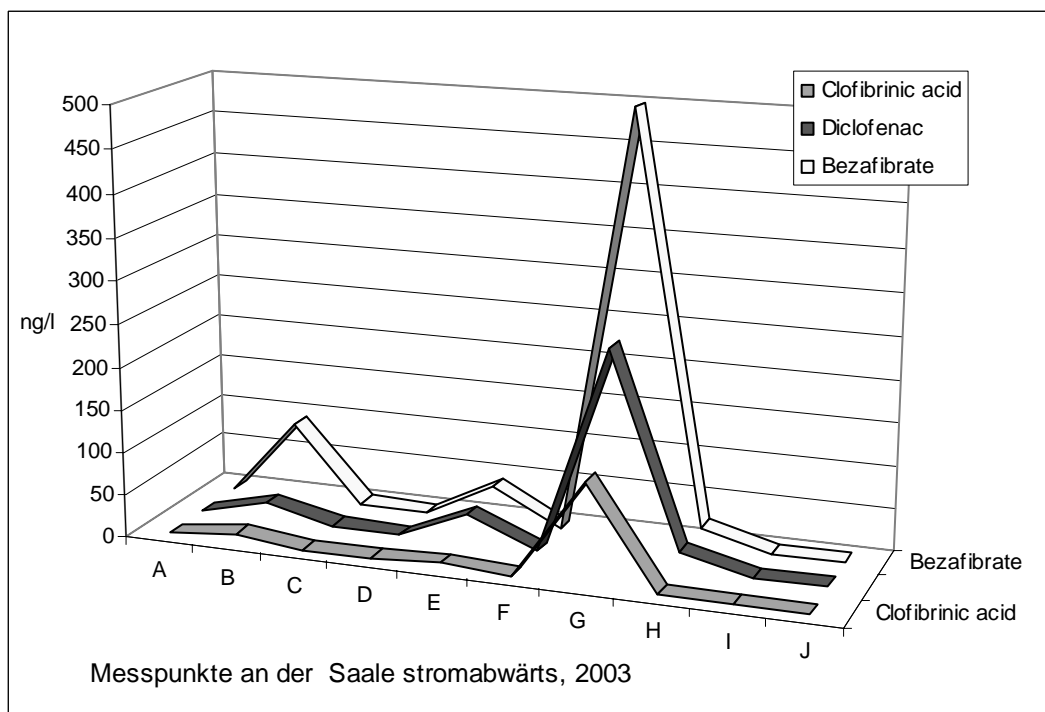


Abbildung 3: Konzentrationen von Clofibrinsäure, Diclofenac und Bezafibrat in der Saale flussabwärts.

2.1.5 Diskussion und Ausblick

Die Untersuchungen zum Adsorptionsverhalten der drei ausgewählten Estrogene und Xenoestrogene in verschiedenen Materialien haben einen wichtigen Beitrag bei der Konstruktion der Reaktoren geliefert und sind in jedem Fall für weitere Testsysteme mit anderen Analyten zu empfehlen.

Der Schwerpunkt der analytischen Arbeiten lag in der Untersuchung und Entwicklung lösemittelarmer Extraktionstechniken zum Nachweis von ED in Abwässern. Zunächst war in Anlehnung an Stumpf et al. die Festphasenextraktion gekoppelt mit einem Silylierungsschritt und anschließender GC/MS-Analyse überarbeitet worden, da in unserem Forschungsvorhaben neben dem synthetischen Steroidhormon EE2 auch Alkylphenole ermittelt werden sollten. Nach mehrmaliger Überprüfung der verschiedenen Schritte hat sich bei uns die in oben beschriebene Methodik etabliert, mit der Nachweisgrenzen zwischen 10 ng/l für EE2 und 60 ng/l für NP über das Gesamtverfahren erreicht werden.

Die Festphasenmikroextraktion wurde als eine auf Lösemittel verzichtende Anreicherungstechnik eingehend untersucht. Nachdem eine automatisierte SPME-Variante mit Nachweisgrenzen zwischen 40 ng/l für EE2 und 1000 ng/l für BPA in Kläranlagenabläufen entwickelt worden war, wurde untersucht, ob eine Kopplung aus SPME und Derivatisierung zu einer Empfindlichkeitssteigerung und zugleich einer besseren Selektivität führt. Ebenfalls sollte beobachtet werden, wie die Derivatisierung die Stabilität des GC/MS-Systems insbesondere auf der Injektorseite beeinflusst. Die Kopplung aus SPME und anschließender online-Silylierung im PTV-Injektor führt zu einem besseren Response, dennoch werden auch die Blindwerte in demselben Maße verstärkt, so dass keine niedrigeren NWG erzielt werden. Hinzu kommt, dass kleinste Verunreinigungen im Glasinsert die Derivatisierung stören bzw. die Analyten an diesen adsorbieren. Vorteilhaft wirkt sich die Derivatisierung auf die Peakform und die chromatographische Trennung aus.

Die in-situ Derivatisierung mit BCF liefert für BPA eine um den Faktor 10 niedrigere Nachweisgrenze von 100 ng/l. Ursache hierfür ist, dass bei der in-situ-Variante die BPA-Anteile nicht mit erfasst werden, die als Verunreinigung in dem Epoxidharz enthalten ist, der die Fused-Silica – Faser mit dem Metallhalter verbindet, da diese noch in der underivatisierten Form vorliegen. Für NP und EE2 werden schlechtere NWG ermittelt. Aufgrund der starken faserschädigenden Wirkung unter alkalischen Bedingungen ist die Reproduzierbarkeit für alle Analyten schlecht. Der sich damit andeutende hohe Faserverbrauch schränkt die Anwendbarkeit der Reaktion mit BCF stark ein.

2.2 Labormodelluntersuchungen

2.2.1 Charakterisierung des Strömungsprofils im Reaktor

Nachdem die Reaktoren mit den nach Punkt 2.1.2 ausgewählten Materialien aufgebaut wurden, wurden zunächst Strömungstests zur Charakterisierung der Strömungsverhältnisse in den Reaktoren durchgeführt. Bei den Strömungstests wurde Huminsäure (Roth) als Tracer verwendet. Die Konzentrationen lagen bei 180-300 mg/l im Zulauf. Die Konzentrationen an

verschiedenen Stellen im Reaktor (horizontal und vertikal) wurden nach der Probenahme photometrisch vermessen (Wallac 1420 Victor²_{TM} (Turku, FIN)).

Bei den Strömungstests entsprach ab dem Kreislauf/Zulauf-Verhältnis von 10/1 die Konzentration des Tracers im Kreislauf (bzw. Abfluss) der theoretischen, idealen Konzentration an jedem Punkt im Reaktor. Die Diffusion ist an Grenzflächen (z. B. Wasserphase: Biomasse) mit hohen Konzentrationsgradienten oft ein limitierender Faktor. Um diesen klein zu halten, wurde für die folgenden Versuche ein Kreislauf/Zulauf-Verhältnis von 10/1 gewählt. Höhere Kreislauf/Zulauf-Verhältnisse führten nicht zu einer weiteren deutlichen Verringerung des N-Wertes (siehe Tabelle 8), würden aber die Belastung durch Scherkräfte auf die Symbiose der acetogenen und methanogenen Bakterien erhöhen. Größere Kreislauf/Zulauf-Verhältnisse würden des Weiteren zu einem erhöhten Gasaustausch (O₂, CO₂) durch eine vergrößerte und bewegte Wasseroberfläche führen.

Tabelle 8: Ergebnisse der Strömungsversuche.

	Versuch				
	V1	V2	V3	V4	V5
Verweilzeit [h]	5,1	2,3	3,7	12,2	53,3
Kreisl./Zulauf-Verhältnis	10	3	30	3	100
N (Anzahl Rührkessel)	1,12	1,68	1,07	1,82	1,08
Bo (Bodensteinzahl)	2,3	10,3	13,5	8,8	3,2

2.2.2 Bisphenol A (BPA)

2.2.2.1 Vorbereitungen zum Pulsexperiment

Vor dem Pulsversuch mit ¹³C₁₂-BPA wurden 2 Reaktoren 6 Monate mit BPA im Zulauf von 100 µg/l belastet, um in einen „Steady-State“-Zustand zu gelangen. Die Konzentrationen von BPA im Ablauf wurden mittels SPME-GC/MS regelmäßig überprüft. Die Daten der Begleitparameter (Redox, NO₃⁻, SO₄²⁻, BSB, IC) wurden kontinuierlich gesammelt.

Die BPA-Elimination während der Adaptionphase lag bei etwa 50 %. Dies stimmt bei einer Verweilzeit von ca. 5,6 Tagen mit den in der Literatur publizierten Halbwertszeiten von BPA gut überein (Dorn 1987, West 2001).

2.2.2.2 ¹³C₁₂-BPA Pulsexperiment

Vor den Puls-Versuchen war die Mikroflora in den Reaktoren durch kontinuierliche Belastung des Zulaufs mit den nicht mit stabilen Isotopen markierten Substanzen in einen „Steady State“-Zustand zu bringen. Nachfolgende Sprungversuche sollten durch den Einsatz der Zielsubstanzen (BPA, 4-NP, E2) in ¹³C-isotopenmarkierter Form die Verfolgung und die

Ermittlung des Verbleibs dieser Substanzen in einem adaptierten System ermöglichen. Die mit ^{13}C angereicherten Verbindungen verhalten sich im Reaktor-System genauso wie die unmarkierten Verbindungen (Metabolisierung, Adsorption, Desorption, usw.). Mit GC/MS können sie von den unmarkierten Verbindungen unterschieden werden. Das bedeutet, dass die Belastung der Biozönose durch den Schadstoff auch im Puls nicht verändert wird und dadurch der „Steady State“ erhalten bleibt. Durch die Bilanzierung der ^{13}C -Mengen in den Kompartimenten vor und nach dem Versuch lassen sich Kohlenstoffströme erfassen, ausgehend von der zudosierten ^{13}C -Verbindung im zulaufenden Abwasserstrom. Die Kompartimente sind dabei Ablaufwasser (IC, DOC, Schwebstoffe), Biomasse im Kiesbett und an den Reaktorwandflächen sowie pflanzliche Biomasse. Durch anschließende Extraktion der Kompartimente und Detektion der Originalsubstanzen lassen sich Adsorptionskoeffizienten in dem System bestimmen. ^{13}C -markierte Verbindungen führen bei einer Metabolisierung zur Bildung ^{13}C -angereicherter Metaboliten. Das Vorliegen solcher Metaboliten lässt sich mittels Isotopenverhältnis-Analyse (IR–Isotope Ratio) einfach ermitteln, solange deren Konzentrationen über der Nachweisgrenze liegen. Mit GC/MS können grundsätzliche Informationen über die Struktur dieser Verbindungen erhalten werden.

Bei dem Pulsversuch wurde für 7 Tage die BPA-Nährsubstratvorlage gegen eine Spritze mit $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA ausgetauscht. Die Konzentrationen im Reaktor und im Sammelwasser wurden mittels SPME-GC/MS gemessen: 30 min Anreicherung mit 85 μm Polycarbonat-Faser, pH=2, 1 g NaCl, 3 min Desorption bei 280°C, interner Standard BPA-d₁₄. Temperaturprogramm GC/MS: 50°C 2 min, 15 K/min bis 280°C/320°C, 10 min halten. Quantifizierung im Single-Ion-Modus (SIM), Quantifizierungsionen BPA $m/z=213$, BPA-d₁₄ $m/z=221$, $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA $m/z=225$.

Der Verlauf der Austragsraten von $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA im Pulsexperiment (siehe Abbildung 4, Tabelle 9) entsprach dem etwa 50 %-igen Umsatz während der Adaptionsphase. Der Verlauf der $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA-Konzentration im Ablauf wies dabei nicht auf eine relevante reversible Adsorption hin (kein Tailing der $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA-Durchbruchskurve). Bei der Anpassung der Konzentrationsfunktion (Gl. 7. und 8.) wurde neben dem Parameter k (Austragskonstante) auch die Verweilzeit τ_A der Substanz im System angenähert. Die Austragskonstante k beschreibt die Gesamtelimination der Substanz aus der Wasserphase für eine Kinetik erster Ordnung und entspricht formell der Reaktionskonstante. Die Verweilzeit τ_A ergibt sich aus dem reversiblen Adsorptionsprozess und der hydraulischen Verweilzeit (siehe Gl. 2.). Am Versuchsende waren ca. 40 % des zudosierten $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA über den Reaktorablauf ausgetragen worden.

Die publizierten $\lg P_{\text{OW}}$ -Werte von 2,2-3,8, die im Pulsversuch ermittelten τ_A -Werte (sowie die daraus folgenden K_{Ads} -, K_{BM} -, K_{OC} -Werte) die durchgeführten Adsorptionsexperimente mit BPA weisen auf Adsorption wie auch Desorption in geringem Maße hin.

Tabelle 9: Übersicht über die ermittelten Austragsraten von $^{13}\text{C}_{12}\text{-BPA}$ im $^{13}\text{C}_{12}\text{-BPA}$ -Pulsversuch. Zum Vergleich sind Daten für die theo. Konzentrationen ohne jeglicher Wechselwirkung (Ww) und mit den jeweils angepassten Parametern k und τ_A dargestellt.

Zeit [d]	ohne Ww [$\mu\text{g/d}$]	Reaktor A		Zeit [d]	Reaktor B	
		Abflussrate ermittelt [$\mu\text{g/d}$]	Abflussrate (aus Anpassung) [$\mu\text{g/d}$]		Abflussrate ermittelt [$\mu\text{g/d}$]	Abflussrate (aus Anpassung) [$\mu\text{g/d}$]
0	0,0	-	0,0	0	-	0,0
1	31,7	5,9	15,4	1	14,9	16,7
2	59,0	21,7	28,3	2	29,2	30,9
3	81,8	37,0	38,8	3	40,7	41,9
4	101,0	43,6	47,4	4	46,1	51,4
6	130,6	54,6	60,3	5	54,6	59,5
7	142,0	75,3	65,1	6	64,9	65,6
8	120,1	61,7	53,7	7	70,4	69,3
9	100,6	44,0	43,9	8	63,8	56,5
10	83,8	36,6	35,6	9	51,0	46,7
11	70,7	29,6	29,3	10	46,7	39,0
12	59,1	23,8	23,9	11	39,9	33,0
13	49,2	16,9	19,4	12	25,3	27,0
14	41,6	11,5	16,0	13	21,7	22,7
15	34,6	9,3	13,0	14	17,2	18,7
16	28,5	9,1	10,4	15	0,2	16,7
17	23,9	7,5	8,5	16	6,1	12,7
18	20,2	5,7	7,0	17	9,1	10,7
19	17,2	5,2	5,9	18	6,9	8,9
20	14,3	3,6	4,7	19	5,6	7,3
21	12,1	3,3	3,9	20	4,5	6,1
22	10,1	3,8	3,2	21	7,3	5,1
23	8,2	0,0	2,5	22	5,4	4,2
24	7,0	2,2	2,1	24	3,3	2,9
25	6,0	2,1	1,8	25	3,6	2,4
26	5,0	1,3	1,4	26	4,0	2,0
27	4,2	1,2	1,2	27	2,5	1,6
28	3,5	1,2	1,0	28	2,4	1,4
29	3,0	2,2	0,8	31	1,3	0,8
30	2,5	2,0	0,6	32	1,3	0,6
31	2,0	1,3	0,5	33	1,1	0,5
32	1,8	2,4	0,4	34	3,6	0,4
33	1,5	1,3	0,4	35	6,1	0,4
34	1,2	1,2	0,3	36	4,6	0,3
35	1,0	1,1	0,2			
36	0,9	1,3	0,2			
37	0,7	0,9	0,2			
39	0,5	0,8	0,1			
40	0,4	0,8	0,1			

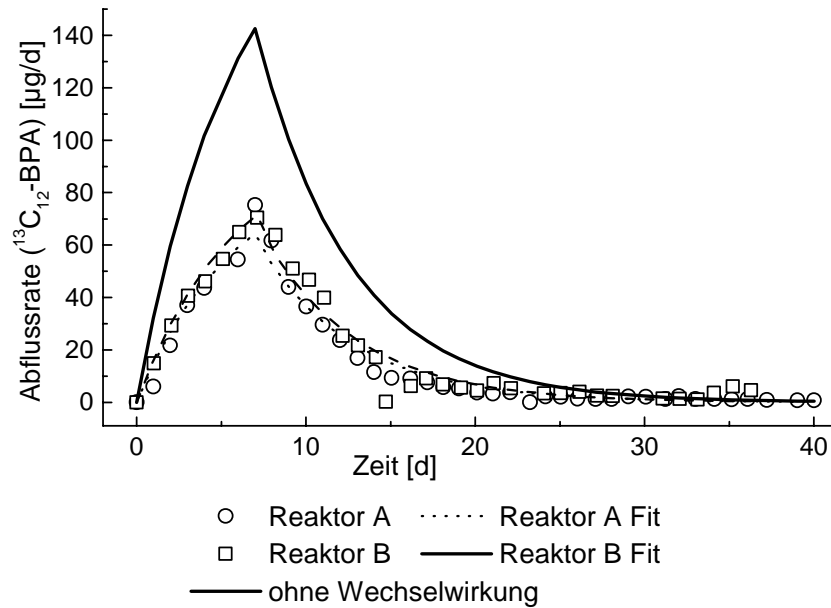


Abbildung 4: Die Abbildung zeigt die ermittelten und angepassten Abflussraten von $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA. Zum Vergleich ist eine Kurve ohne Elimination und ohne Adsorptionswechselwirkungen aufgetragen.

Die Berechnung der Konzentrationskurven erfolgte anhand des Modells für kontinuierliche Rührkessel mit vollständiger Rückvermischung (Fitzer und Fritz 1975). Während des stationären Zustandes gilt (1.):

$$0 = \frac{c_A^{\text{ein}}}{\tau_A} - \frac{c_{A,s}^{\text{aus}}}{\tau_A} - k \cdot c_{A,s}^{\text{aus}} \quad (1.)$$

Die Verweilzeit τ_A des Analyten im System erhöht sich durch rev. Adsorption an Biomasse und ist mit der hydraulischen Verweilzeit $\tau_{\text{hydr.}}$ im System nach (2.) verknüpft.

$$\tau_A = \tau_{\text{hydr.}} (1 + K_{\text{ads}}) \quad (2.)$$

In (2.) ist K_{ads} der Verteilungskoeffizient, der sich aus reversibler Verteilung des Analyten A zwischen Wasserphase und dem Rest des Systems (Biomasse, Wände) ergibt.

$$\begin{aligned} K_{\text{ads}} &= \frac{m_{A, \text{adsorbiert}}}{m_{A, \text{in Wasserphase}}} \\ &= \frac{c_{A, \text{adsorbiert an Biomasse}} \cdot m_{\text{Masse Biomasse im System}}}{c_{A, \text{in Wasserphase}} \cdot V_{\text{Wasservolumen im Reaktor}}} \\ &= K_{BM} \frac{m_{\text{Masse Biomasse im System}}}{V_{\text{Wasservolumen im Reaktor}}} \\ &= \frac{K_{OC}}{c_{C \text{ in Biomasse}}} \frac{m_{\text{Masse Biomasse im System}}}{V_{\text{Wasservolumen im Reaktor}}} \end{aligned} \quad (3.)$$

Durch umstellen von (1.) ergibt sich (4.):

$$\frac{c_{A,s}^{\text{aus}}}{c_A^{\text{ein}}} = \frac{1}{1 + k \tau_A} \quad (4.)$$

und für die Elimination U (entspricht Berechnung des Umsatzes) folgt (5.):

$$U = 1 - \frac{c_{A,s}^{\text{aus}}}{c_A^{\text{ein}}} = 1 - \frac{1}{1 + k\tau_A} = \frac{k\tau_A}{1 + k\tau_A} \quad (5.)$$

Aus (1.) folgt für den instationären Zustand Gleichung 6.

$$\frac{dc_A^{\text{aus}}}{dt} = \frac{c_A^{\text{ein}}}{\tau_A} - \frac{c_A^{\text{aus}}}{\tau_A} - k \cdot c_A^{\text{aus}} \quad (6.)$$

Gleichung 6. wird integriert und nach $c_{A,t}^{\text{aus}}$ umgestellt. Von $t = 0$ mit $c_A^{\text{aus}} = 0$ ausgehend kann c_A^{aus} nach verstrichener Zeit t berechnet werden.

$$c_{A,t}^{\text{aus}} = c_A^{\text{ein}} \frac{1}{1 + k\tau_A} \left(1 - e^{-\frac{(1+k\tau_A)t}{\tau_A}} \right) \quad (7.)$$

Für den Abschnitt nach der Zudosierung des Analyten im Zustrom ist nur noch ein Term zum Austrag (Abbau und irrev. Adsorption) sowie durch Auswaschung (jeweils Kinetik 1. Ordnung) von Bedeutung. Der Term für die Zudosierung mit Rückvermischung verschwindet aus (7.) wobei t_{Peak} der Zeitpunkt des Endes der Zudosierung des Analyten im Zustrom markiert.

$$c_{A,t}^{\text{aus}} = c_{A,t_{\text{Peak}}}^{\text{aus}} e^{-\frac{(1+k\tau_A)t - t_{\text{Peak}}}{\tau_A}} \quad (8.)$$

Somit kann $c_{A,t}^{\text{aus}}$ aus (7.) für die Zeit der Zudosierung des Analyten bis t_{Peak} und aus (8.) für die Zeit danach kalkuliert werden.

Da im System aber durch Evaporation eine Einengung und damit Aufkonzentrierung des Analyten stattfindet, wurden statt der Konzentrationen $c_{A,t}^{\text{aus}}$ und c_A^{ein} die Flussraten $m_{A,t}^{\text{aus}}$ bzw. m_A^{ein} verwendet.

Tabelle 10: Übersicht über die Versuchsbedingungen und -ergebnisse beim $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA-Puls

BPA/ $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA-Konzentration im Zulauf	100 µg/l
Versuchsvorlaufzeit (Adaption)	6 Monate
Pulsdauer/ Versuchsgesamtdauer [d]	7 / 40
durchschnittliche BPA-Ablaufkonzentration	30-50 µg/l
Reaktionskonstante k (Reaktor A/ Reaktor B) [1/d]	0,114±0,007 / 0,97±0,008
Verweilzeit τ_A $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA (Reaktor A/ Reaktor B) [d]	11,6±0,49 / 11,1±0,53
Hydraulische Verweilzeit (Reaktor A/ Reaktor B) [d]	5,7 / 5,6
K_{Ads} (Reaktor A/ Reaktor B)	1,04±0,09 / 0,99±0,10
K_{BM} (Reaktor A/ Reaktor B)	137±44 / 137±37
$\lg K_{\text{BM}}$ (Reaktor A/ Reaktor B)	2,2 / 2,2
K_{OC} (Reaktor A/ Reaktor B)*	274±87 / 273±74
$\lg K_{\text{OC}}$ (Reaktor A/ Reaktor B)*	2,4 / 2,4
Elimination U [%]	57±2,5 / 52±3,3
Halbwertszeit $\tau_{1/2}$ [d]	6,1 / 7,2

* Annahme, dass der C-Anteil der Biomasse in etwa 50 % beträgt

Die Halbwertszeit der Substanz im System wurde mit k aus (7.) und (8.) kalkuliert:

$$\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (9.)$$

Vom Ablaufwasser wurden Extrakte mit LLE angefertigt. Dazu wurden 800 ml Ablaufwasser, nach Zugabe von 100 g NaCl und pH-Wert-Einstellung mit 2 %-iger H_2SO_4 auf 2, mit 200 ml CHCl_3 1 min unter heftigem Schütteln extrahiert. Nach der Trennung wurde die organische Phase mit Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer auf 0,5 ml eingengt.

Die Extrakte aus den Laborpflanzenreaktoren wurden auf Metabolite von BPA untersucht und einige oxidativ gebildete Produkte konnten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 5). So wurden 2,2'-(4,4'-dihydroxydiphenyl)-1-propanol (*Metabolit A*; $m/z=244$ bzw. 256), das Lacton der 2-(4-Hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1-propansäure (*Metabolit B*; $m/z=148$ bzw. 154), 2-(4-Hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1-propansäure (*Metabolit C*; $m/z=182$ bzw. 188), 4-Hydroxyacetophenon (*Metabolit D*; $m/z=121$ bzw. 136) sowie 4-Hydroxybenzaldehyd (*Metabolit E*; $m/z=121$ bzw. 136) und CO_2 nachgewiesen. Das Lacton wurde bereits von Ben-Jonathan und Steinmetz (1998) beschrieben, die anderen Metabolite von Spivack et al. (1996).

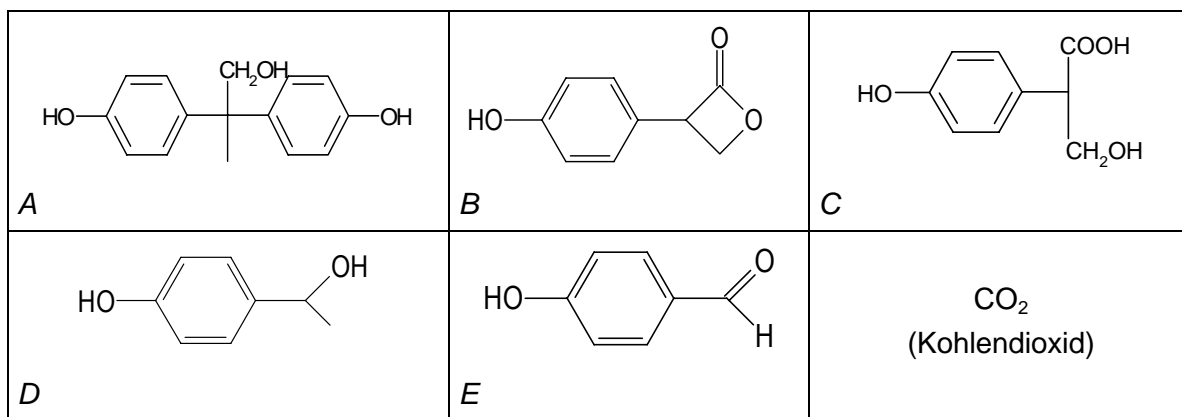


Abbildung 5: Die gefundenen Metaboliten von BPA in den Puls- und Batchversuchen, Metabolit A: 2,2'-(4,4'-dihydroxydiphenyl)-1-propanol, Metabolit B: Lacton der 2-(4-Hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1-propansäure, Metabolit C: 2-(4-Hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1-propansäure, Metabolit D: 4-Hydroxyacetophenon, Metabolit E: 4-Hydroxybenzaldehyd.

Es wurden weiterhin Proben der Wasserphase zur Quantifizierung des zu $^{13}\text{CO}_2$ umgesetzten $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA entnommen. Die Untersuchungen der Gelöst- CO_2 -Proben zur $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisbestimmung wurden an einem GC HP 6890A und Massenspektrometer Finnigan MAT 252 durchgeführt. Vor der Probennahme wurden die Probengläschen (8 ml) mit einem Butylseptum verschlossen. Anschließend wurden die Gläschen durch 2 Kanülen (0,4 μm) 3 min mit N_2 gespült. Nach dieser Vorbereitung wurden 6 ml Probe in die Gläschen gegeben und anschließend mit 100 μl HCl_{conc} angesäuert. Bis zur Messung wurden die Proben bei 5°C aufbewahrt.

Aus den Analysen der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse vom IC konnte jedoch keine sichere Quantifizierung des zu CO_2 umgesetzten $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA vorgenommen werden. Grund ist die noch ungenügende Aufschlüsselung der verschiedenen CO_2 -Zu- und -Abströme in dem offen

betriebsenen PFR-System. Die Quantifizierung (siehe Abbildung 6) des in CO₂ transferierten ¹³C₁₂-BPA-Anteils wurde nach (10.) durchgeführt:

$$m_{^{13}\text{C}_{12}\text{-BPA zu } ^{13}\text{CO}_2} = \int_{t=0\text{d}}^{40\text{d}} (n_{t,^{13}\text{C}} - n_{0,^{13}\text{C}}) \times \frac{240 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{12} \times 1,581/\text{d} \quad (10.)$$

mit

$$n_{t,^{13}\text{C}} = \frac{C_{\text{C-gesamt}}}{\frac{12 \frac{\text{g}}{\text{mol}}}{\left(\frac{\delta_t}{1000} + 1\right) \times R_{\text{Standard}}} + 13 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} \quad (11.)$$

Dabei ist $R_{\text{Standard}} = 0,0112372$ und $C_{\text{C-gesamt}}$ die durchschnittliche Kohlenstoffgehalt im Wasser (IC). Dadurch ist $n_{t,^{13}\text{C}}$ die Konzentration an gelöstem ¹³CO₂ zum Zeitpunkt t in mol/l.

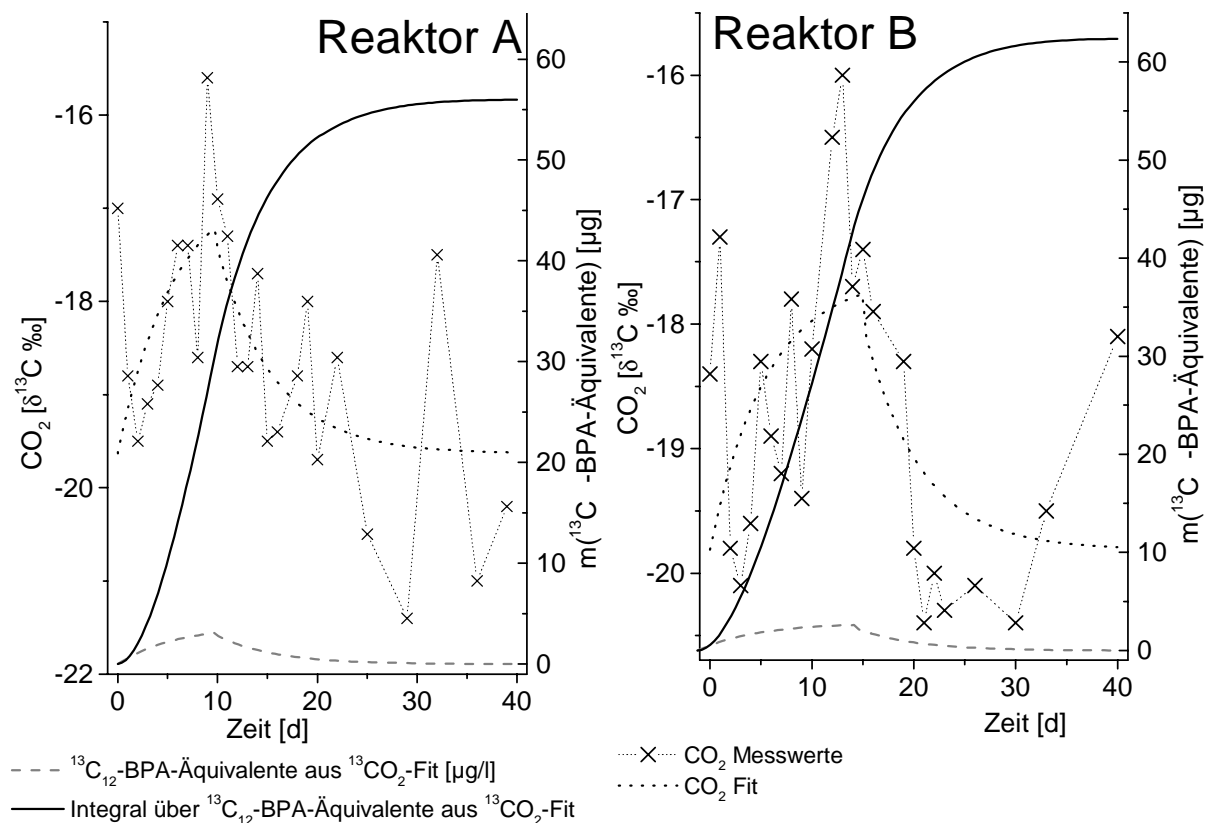


Abbildung 6: Abgebildet ist der Verlauf der ¹³C/¹²C-Verhältnisse vom IC im Versuchszeitraum (Reaktor A), die daraus resultierende Anpassung, die aus der Anpassung resultierende ¹³C₁₂-BPA-Äquivalentkonzentration und die abgeflusste ¹³C₁₂-BPA-Menge (Integral über ¹³C₁₂-BPA-Äquivalentkonzentration multipliziert mit der durchschnittlichen täglichen Abflussrate).

2.2.2.3 Untersuchungen der Reaktorkompartimente nach Versuchsende

Zunächst wurden nach dem Versuchsende die Größen für die Reaktorkompartimente ermittelt (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Übersicht Reaktorkompartimente

	Reaktor A	Reaktor B
Pflanzen gesamt (Wurzel/Spross) [g]	99,5 (28,6/70,9)	118,6 (29,2/89,4)
Biomasse (Glühverlust Kies) [g]	72±17	69±12
Kies gesamt [kg]	19,3	20,9
Wasservolumen im Reaktor [l]	9,4	9,4

Neben der im Ablauf quantifizierten $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA-Menge konnten weitere 10 % vom zudosierten BPA anschließend mittels ASE in der Kiesfraktion wieder gefunden werden. Bei der Extraktionen der gefriergetrockneten Kompartimente mittels ASE wurde 10 min mit Hexan bei 140°C extrahiert. Die BPA-Konzentrationen mit $\sim 1 \mu\text{g/l}$ waren in den Binsen sprossen und Binsenwurzeln genauso hoch wie im Kies. Die Gesamtmasse der Pflanzenteile betrug aber nur 1/200-stel der des Kieses. Somit ist die in den Pflanzenteilen ermittelte BPA-Menge deutlich geringer als die der Kiesfraktion.

Aus Analysen der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse der Kiesbestückungen und den Pflanzenmaterialien können Äquivalentmengen der applizierten ^{13}C -Verbindung ermittelt werden. Diese Äquivalentmengen enthalten den metabolisierten Anteil, der in die Biomasse aufgenommen wurde sowie durch den durch Extraktion zugänglichen und unzugänglichen Anteil. Dazu wird zunächst die Differenz der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse vor und nach dem Pulsexperiment bestimmt. Mit der vorliegenden Kohlenstoffmenge ergibt sich ein ^{13}C -Menge, aus der die $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA-Äquivalentmengen berechnet werden können.

Die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse der Biomasse (Binsen und Reaktorschlamm), des Kieses, der Schläuche, der Schwebstoffe und Wasserrückstände wurden mittels Finnigan MAT deltaC-Massenspektrometer mit einer Verbrennungseinheit EA 1108 CHN bestimmt. Die Binsen und Kiesproben des BPA-Experimentes wurden vorbereitend dazu jeweils 20 min in einer Achat-Kugelmühle gemahlen. Nach der Probenherstellung wurde ein Übergang des Kugelmühlenmaterials in die Proben festgestellt, weshalb die C-Anteile zu gering ausfielen. Die Analyse der $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse an der Kiesbestückung zeigten keine wesentlichen Änderungen über den Versuchszeitraum. Jedoch konnte eine Änderung der ^{13}C -Signatur der Binsenbestandteile von etwa $-31 \delta^{13}\text{C} \text{ ‰}$ zu $-29 \delta^{13}\text{C} \text{ ‰}$ beobachtet werden. Die aus dieser Differenz bestimmte ^{13}C -Menge ergab rechnerisch eine $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA-Äquivalenzmenge von etwa 800 μg . Jedoch ist dieser Wert sehr unsicher, da die Herkunft von ^{13}C (z. B. beträchtliche Mengen atmosphärisches ^{13}C) weder ausschließlich noch sicher auf $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA zurückgeführt werden konnte.

Tabelle 12: Übersicht Bilanz $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA.

	Methode	Reaktor A [µg]	Reaktor B [µg]
Zugabe: zudosierte Menge	nominal (BPA)	1400	1400
Abfluss:			
Menge im Abfluss	SPME-GCMS (BPA)	556±62	658±61
$^{13}\text{C}_{12}$ -BPA-Äquivalente aus Metaboliten	LLE-GC/MS (BPA)	<1	<1
$^{13}\text{C}_{12}$ -BPA-Äquivalente aus $^{13}\text{CO}_2$	IR-GC/MS (BPA-Äquivalent)	56±27	68±35
Im System am Versuchsende:			
An Pflanze adsorbiert	ASE, GC/MS (BPA)	<0,1	<0,1*
An Kies adsorbiert	ASE, GC/MS (BPA)	19	19*
$^{13}\text{C}_{12}$ -BPA-Äquivalente Pflanze Spross	IEA (BPA-Äquivalent)	474±288	334±308
$^{13}\text{C}_{12}$ -BPA-Äquivalente Pflanze Wurzel	IEA (BPA-Äquivalent)	596±99	310±119
$^{13}\text{C}_{12}$ -BPA-Äquivalente Kies	IEA (BPA-Äquivalent)	184±282	130±253
Gesamt ohne IEA-Äquivalente		632±89	746±96
Gesamt mit IEA-Äquivalenten		1886±758	1520±776

* für die Quantifizierung bei Reaktor B wurden die Konzentrationswerte von Reaktor A verwendet, da bei Reaktor B keine Konzentrationsbestimmung durchgeführt wurde.

2.2.2.4 Untersuchungen zum biologischen Abbau von BPA

Für die Untersuchungen zum biologischen Abbau von BPA wurde das Ablaufwasser aus den Reaktoren verwendet. Die Bildung von CO_2 bei diesen Versuchen mit beimpftem Material gilt Indiz für biologischen Abbau.

Bei Batchversuchen in geschlossenen Reagenzgläsern konnten nach der Zugabe von $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA die Bildung von $^{13}\text{CO}_2$ nachgewiesen werden. Die Messung erfolgte wie in Punkt für Gelöst- CO_2 beschrieben. Größere $\delta^{13}\text{C}$ ‰-Werte stehen für ein größeres $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis, kleinere für ein kleineres $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis. Dabei lag das ermittelte $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis mit etwa +50 $\delta^{13}\text{C}$ ‰ deutlich über dem theoretischem Verhältnis der zugesetzten C-Quellen mit +18 $\delta^{13}\text{C}$ ‰ (Pepton, Fleischextrakt, Harnstoff plus $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA). Die im zeitlichen Verlauf zunächst höheren Werte für das $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis von über +50 $\delta^{13}\text{C}$ ‰ weisen darauf hin, dass aus BPA gegenüber den anderen 3 C-Quellen bevorzugt CO_2 gebildet wurde. Als Vergleich sind in Abbildung 7 auch die Kurven für die Proben ohne $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA und die nicht beimpfte Probenreihe mit BPA dargestellt. Bei diesen beiden Probenreihen stellte sich ein $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnis ähnlich dem der C-Quellen ein.

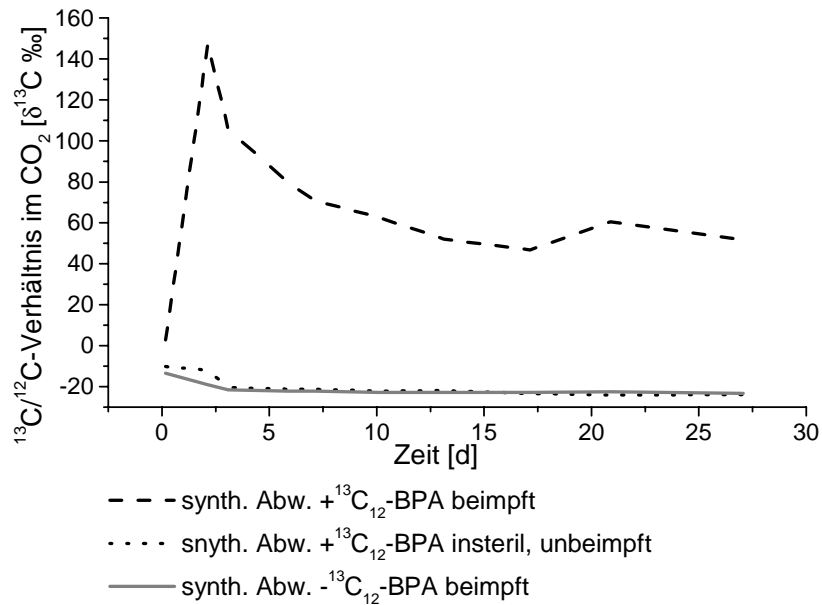


Abbildung 7: $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse in $\delta^{13}\text{C}$ ‰ im gebildeten CO_2 in Abhängigkeit von der Versuchszeit im Batchversuch.

Dabei konnte bei Versuchen mit BPA in Oxi-Top-Gefäßen eine auf biologischen Abbau rückführbare Sauerstoffzehrung nachgewiesen werden. Die Untersuchungen wurden mit einer Oxi-Top-Apparatur (WTW (Weilheim, Deutschland)) durchgeführt. Dabei wurde eine Minerallösung von 3,5 mg/l NaCl, 1,1 mg/l MgCl_2 , 1,5 mg/l CaCl_2 eingesetzt, beimpft mit der jeweiligen Probenlösung. Zusätzlich wurde eine Spurenelementlösung nach Schlegel zudosiert (Schlegel 1992). Die Untersuchungssubstanzen wurden dann als einzige C-Quelle in kristalliner Form zugegeben. Nach erneuter Substanzgabe wurde immer wieder eine Sauerstoffzehrung beobachtet. Ebenso bei Proben die im Verhältnis 1:10 und 1:20 mit Material aus alten aktiven Proben beimpft wurden. Bei Sauerstoffzehrungsversuchen wiesen einige Proben aus nicht BPA belasteten Reaktoren auch eine Zehrung auf. Diese trat jedoch mit einer zeitlichen Verzögerung ein. Die großen Standardabweichungen bei den Proben aus den BPA-unbelasteten Reaktoren resultieren daraus, dass nicht jede Probe der unbelasteten Reaktoren eine Sauerstoffzehrung aufwies. Das weist wiederum auf eine erfolgreiche Adaption der Biozönose in BPA-belasteten Reaktoren hin.

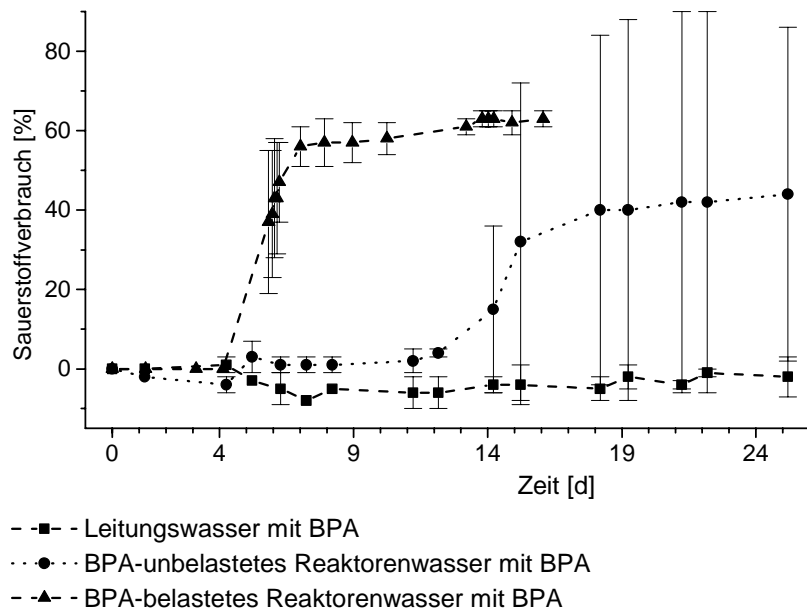


Abbildung 8: Verlauf der O₂-Zehrung BPA-haltiger Lösungen nach Animpfung mit BPA be- und unbelasteten Reaktorwässern, sowie Leitungswasser.

Von den in den Oxi-Top-Gefäßen herangezogenen Misch-Kulturen wurden Ausstriche auf BPA-haltigen Mineralagar vorgenommen. Aus diesen Anreicherungen wurden drei Stämme isoliert und sequenziert. Bei den erhaltenen Stämmen handelte es sich um einen redundanten *Sphingomonas* sp. und *Variovorax paradoxus* (*Alcaligenes paradoxus*). Eine Klassifizierung über die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMSZ, Braunschweig/ Germany) steht noch aus.

2.2.2.5 BPA-Adsorption an Biomasse

Um Kenntnis über das Verhältnis reversibler/irreversibler Adsorption von BPA an Biomasse zu erhalten wurden einige Adsorptionstests durchgeführt. Zunächst wurde für diese Experimente Biomasse produziert, indem eine Lösung von 10 l Wasser mit der 12-fachen Nährlösungskonzentration mit 100 ml Reaktorwasser (aus einem Reaktor ohne BPA-Belastung) beimpft wurde. Nach einer Woche wurde die Biomasse abzentrifugiert. In Zentrifugierhülsen aus Edelstahl wurden jeweils 10 ml Lösung mit der entsprechenden Menge Biomasse und einem PTFE-Rührer versetzt. Nach der jeweiligen Zeitspanne wurden Biomasse und Lösung durch Zentrifugieren voneinander getrennt. Die BPA-Konzentration im Überstand wurde mit SPME-GC/MS bestimmt. Für die Desorption wurden wieder 10 ml Mineralmedium zur Biomasse zugegeben aufgeschlämmt und gerührt. Nach der entsprechenden Desorptionszeit wurde erneut zentrifugiert und die BPA-Konzentration im Überstand bestimmt. Die Trockenbiomasse wurde durch Trocknung des Zentrifugationsrückstandes bei 110°C bestimmt.

Tabelle 13: Ergebnisse der Untersuchungen zur reversiblen Adsorption von BPA an Biomasse.

Biomassekonzentration [g/l]	1,04	0,832	0,624
Adsorptionszeit [d]	1	1	1
c(BPA) vor Adsorption [$\mu\text{g/l}$] (nominal)	10	10	10
c(BPA) im Überstand nach Adsorption [$\mu\text{g/l}$]	$6,8 \pm 0,5$	$7,2 \pm 0,3$	$7,5 \pm 0,5$
resultierender K_{OC} (Adsorption)	905 ± 124	937 ± 96	1071 ± 175
resultierender $\lg K_{OC}$ (Adsorption)	3,0	3,0	3,0
Desorptionszeit [d]	3	3	3
c(BPA) im Überstand nach Desorption [$\mu\text{g/l}$]	$1,23 \pm 0,31$	$0,81 \pm 0,26$	$0,67 \pm 0,29$
resultierender K_{OC} (Desorption)	1536 ± 1127	2962 ± 1997	4422 ± 4206
resultierender $\lg K_{OC}$ (Desorption)	3,2	3,5	3,6

Zunächst wurde für die Versuche Biomasse produziert. Als Nährlösung wurde 12-fach konzentriertes synthetisches Abwasser verwendet. Dieses wurde mit Ablaufwasser aus nicht BPA-belasteten Reaktoren beimpft. Nach 72 h wurde die Biomasse mittels Durchflusszentrifugation abgetrennt. Die in den Adsorptionsversuchen eingesetzten Biomassekonzentrationen betragen 0,6–1 g/l (TM), die BPA-Ausgangskonzentration 10 $\mu\text{g/l}$. Die ermittelten Verteilungskoeffizienten lagen im Bereich zwischen 900–1100, zunehmend mit steigender Biomassekonzentration. Somit waren diese Werte höher, als die im Pulsexperiment durch die Anpassung erhaltenen. Die Verteilungskoeffizienten für die Desorption der mit BPA angereicherten Biomasse streuten zwischen 1000–4400. Die Diskrepanz der Werte für Adsorption und Desorption lässt sich auf eine nicht vollständig reversible Desorption bzw. Hystereseeigenschaften zurückführen (Kan 1998). Die großen Fehler für die Desorption resultieren aus der Fehlerfortführung der für diese Anwendung relativ hohen Fehler von 15 % bei der SPME-Messung. Die somit in der Biomasse erreichten BPA-Konzentrationen betragen in etwa 2–4 mg/g. Daraus kann eine Verteilung von BPA in einer Suspension aus Wasser und Partikelphase zu halben Teilen (50:50) bezogen auf die Menge berechnet werden. Diese würde bei einer Biomassekonzentration von 250 mg/l–3000 mg/l (TM) vorliegen. Bei den üblichen Konzentrationen der filtrierbaren Schwebstoffe von etwa 20 mg/l ist demzufolge weniger als 5 % der BPA-Fracht partikulär gebunden.

2.2.2.6 Diskussion

In den Versuchen hat sich gezeigt, dass BPA relativ einfach durch angepasste Mikroorganismen biologisch abgebaut werden kann. BPA wies zwar eine geringe Adsorptionsneigung auf (welche nur begrenzt reversible war), jedoch führte dies nicht zu wesentlichen Ablagerungen im Reaktorsystem. Es ist hierbei auch kein bedeutsamer partikelgebundener BPA-Transport zu erwarten. Es kann davon ausgegangen werden, dass BPA in kontaminierten Gewässern unter aeroben Verhältnissen biologisch abgebaut wird. Durch die geringe, bedingt reversible Adsorption sollte BPA sich auch nicht in aeroben Zonen anreichern. Ablagerungen von BPA mangels Abbau wären dagegen in anaeroben Zonen zu erwarten.

2.2.3 4-Nonylphenol (4-NP)

2.2.3.1 Vorbereitungen zum Pulsexperiment

Als Zulaufkonzentration von tech. 4-NP wurde 100 µg/l gewählt. Dies liegt in etwa um Faktor 10-100 über den üblichen und geringfügig über den maximalen Konzentrationen von 4-NP in Zuflüssen von Kläranlagen. In der Adaptionszeit lagen die Ablaufkonzentrationen von tech. 4-NP mit 30-50 µg/l unter den Zulaufkonzentrationen. Zunächst wurde versucht die Konzentration an tech. 4-NP mittels SPME-GC/MS zu ermitteln. Dabei traten war aber die Reproduzierbarkeit klein ($R^2 < 0,9$). Für die Metabolitensuche wurde das Ablaufwasser der Reaktoren mit CHCl_3 extrahiert (wie in 2.2.2.2 beschrieben). Die erhaltenen LLE-Extrakte wurden auch zur Konzentrationsbestimmung von 4-NP mittels GC/MS verwendet. Diese Methode hatte gegenüber SPME-GC/MS die Vorteile eines kleineren Fehlerbereiches und der besseren Erfassung des partikelgebundenen Anteils. Somit wurden die Extrakte zur 4-NP-Bestimmung mittels GC/MS verwendet. Auf Grund der geringen Löslichkeit von 4-NP in wässrigen Lösungen, sowie der starken Adsorptionsneigung konnte 4-NP nicht wie BPA über die Nährsubstratlösungen appliziert werden. Deshalb wurde die tägliche Dosis täglich ein Mal gesamt manuell in den Zulauf dosiert (bzw. montags für 3 Tage). 2 Wochen vor Pulsbeginn wurde die 4-NP-Zudosierung auf separate Mikroinjektionsspritzen/ -automaten umgestellt.

2.2.3.2 $^{13}\text{C}_6$ -4-*n*-NP-Pulsexperiment

Im Versuchszeitraum des Pulses wurden etwa 4000 µg $^{13}\text{C}_6$ -4-*n*-NP über 3 Wochen zudosiert. Mangels Verfügbarkeit von ^{13}C -markierten tech. 4-NP wurde für den Pulsversuch auf ^{13}C -markiertes lineares 4-NP ausgewichen, was auf Grund der linearen Alkylkette zu einem *best-case-Szenario* bezüglich des Versuchsansatzes führte.

Am 4. Tag (Reaktor A) und 9. Tag (Reaktor B) wurde das Fehlen der $^{13}\text{C}_6$ -4-*n*-NP-Lösung in den Spritzen festgestellt. Da nicht festzustellen war, ob die fehlende Menge in die Reaktoren gelangt ist, ergab sich bei der applizierten Menge dieser Betrag als Fehler.

Nach dem Auswechseln des tech. 4-NP durch $^{13}\text{C}_6$ -4-*n*-NP im Zulauf konnte trotzdem nur ein ganz langsames Abklingen der Konzentration an tech. 4-NP beobachtet werden. Dabei stieg die $^{13}\text{C}_6$ -4-*n*-NP Konzentration langsam an und erreichte im Maximum 1,5 und 3,5 µg/l (siehe Abbildung 9). Die aus den Konzentrationen und Abflussmengen ermittelten Austragsraten sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Die Abklingkurven zeigen deutlich, dass bei 4-NP reversible Adsorption vorlag. Die ermittelten τ_A -, bzw. K_{Ads} -, K_{BM} -, K_{OC} -Werte zeigen ebenfalls deutlich die Bedeutung der rev. Adsorption bei NP. Durch den Umfang der rev. Adsorption und die Variation bei den gemessenen Konzentrationen war die Zeitspanne im Versuch von 70 Tagen zu kurz für die Ermittlung genauerer k -Werte. Die im Vergleich zu tech. 4-NP geringere $^{13}\text{C}_6$ -4-*n*-NP-Konzentration resultiert aus der schon im Batch festgestellten leichten Abbaubarkeit der linearen 4-NP-Verbindung sowie einer erhöhten Adsorptionsneigung gegenüber den

verzweigten Verbindungen. Trotzdem werden Eliminationen um 90 % erreicht. Unter der Annahme, dass nur in der Wasserphase gelöstes NP dem Abbau zur Verfügung steht und adsorbiertes NP im Wesentlichen nicht bioverfügbar ist, würde die Halbwertszeit statt 30-160 d im System nur 1-3 d in der Wasserphase betragen.

Tabelle 14: Übersicht über die Versuchsbedingungen und -ergebnisse beim $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ -Puls

tech. 4-NP/ $^{13}\text{C}_6\text{-NP}$ -Konzentration im Zulauf	100 $\mu\text{g/l}$
Versuchsvorlaufzeit (Adaption)	6 Monate
Pulsdauer/ Versuchsgesamtdauer [d]	20 / 70
durchschnittliche tech. NP-Ablaufkonzentration	20-30 $\mu\text{g/l}$
durchschnittliche $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ -Ablaufkonzentration	1-3 $\mu\text{g/l}$
Reaktionskonstante k $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ (R A/ R B) [1/d]	0,0042 \pm 0,0035 / 0,0220 \pm 0,0038
Verweilzeit τ_A $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ (Reaktor A/ Reaktor B) [d]	1678 \pm 130 / 706 \pm 52
Hydraulische Verweilzeit (Reaktor A/ Reaktor B) [d]	5,2 / 5,2
K_{Ads} $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ (Reaktor A/ Reaktor B)	322 / 135
K_{BM} $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ (Reaktor A/ Reaktor B)	62000 \pm 50000 / 29000 \pm 11000
$\lg K_{\text{BM}}$ $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ (Reaktor A/ Reaktor B)	4,9 / 4,5
K_{OC} $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ (Reaktor A/ Reaktor B)	62000 \pm 50000 / 29000 \pm 11000
$\lg K_{\text{OC}}$ $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ (Reaktor A/ Reaktor B)	4,9 / 4,5
Elimination U $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ [%]	88 \pm 10 / 94 \pm 1,4
Halbwertszeit $\tau_{1/2}$ $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ [d]	166 \pm 139 / 31 \pm 6
Halbwertszeit von $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ bezogen auf $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ in Wasserphase = $\tau_{1/2} / (1 + K_{\text{Ads}})$ [d]	1,3 / 3,0

Tabelle 15: Übersicht über die ermittelten Austragsraten von $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ im $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ -Pulsversuch. Zum Vergleich sind Daten für die theo. Konzentrationen ohne jeglicher Wechselwirkung (Ww) und mit den jeweils angepassten Parametern k und τ_A dargestellt.

Zeit [d]	ohne Ww [$\mu\text{g/d}$]	Reaktor A		Zeit [d]	Reaktor B	
		Abflussrate ermittelt [$\mu\text{g/d}$]	Abflussrate (aus Anpassung) [$\mu\text{g/d}$]		Abflussrate ermittelt [$\mu\text{g/d}$]	Abflussrate (aus Anpassung) [$\mu\text{g/d}$]
0	0,0		0,0	0		0,0
1	25,5	0,3	0,1	1	0,1	0,2
2	55,3	0,4	0,2	2	0,2	0,5
3	80,2	0,7	0,3	3	0,3	0,7
4	102,3	0,8	0,4	4	0,5	1,0
5	121,0	0,8	0,6	5	0,5	1,3
6	131,4	1,1	0,7	6	0,5	1,5
7	147,0	1,4	0,8	7	1,4	1,8
8	156,8	1,2	0,9	8	1,3	2,0
9	163,5	0,9	1,0	9	1,0	2,3
10	169,7	1,1	1,1	10	1,4	2,5
11	175,9	1,2	1,3	11	1,5	2,7
12	179,2	1,5	1,3	12	1,9	2,9
13	183,0	1,9	1,5	13	2,4	3,1
14	186,8	1,8	1,6	14	3,0	3,4
15	189,0	1,7	1,7	15	3,3	3,5
16	191,3	1,6	1,8	16	3,6	3,8
17	192,7	1,5	1,9	17	3,3	3,9
18	194,3	0,5	2,0	18	5,2	4,1
19	195,5	2,8	2,1	19	6,1	4,3
20	196,4	2,7	2,2	20	6,6	4,5
21	176,8	2,3	2,3	21	5,9	4,5
22	145,1	3,4	2,3	24	4,1	4,2
23	124,7	1,9	2,2	25	5,6	4,1
24	103,6	1,5	2,2	26	5,3	4,0
25	88,5	2,5	2,2	27	3,9	3,9
26	71,1	2,6	2,2	28	3,5	3,8
27	61,7	1,5	2,2	31	2,7	3,5
28	52,0	2,3	2,2	35	3,7	3,2
31	30,4	2,1	2,1	38	1,8	3,0
38	8,9	2,5	2,1	40	2,5	2,9
40	6,1	2,1	2,0	42	3,1	2,7
42	4,3	1,8	2,0	45	2,4	2,5
45	2,5	2,2	2,0	53	2,3	2,1
53	0,6	2,3	1,9	56	1,6	2,0
56	0,4	1,7	1,9	61	2,2	1,7
61	0,1	2,2	1,8	67	2,0	1,5
67	0,1	1,6	1,8			
68	0,0	1,4	1,8			
69	0,0	1,7	1,8			

Die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse wurden wie unter Punkt 2.2.2.3 bestimmt. Bei BPA wurde nach der Probenherstellung ein Übergang des Kugelmühlenmaterials in die Proben festgestellt, weshalb die erhaltenen C-Anteile zu gering ausfielen. Somit wurde bei Binsproben vom NP-Experiment eine Analysenmühle A10 (IKA (Staufen, Deutschland)) verwendet.

Der Verlauf der ^{13}C -Signatur-Messwerte vom Gelöst- CO_2 war dem Verlauf der $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ -Konzentration im Reaktorablauf ähnlich. Innerhalb der ersten 20 d konnte die Bildung eines

erhöhten $^{13}\text{CO}_2$ -Anteils beobachtet werden (siehe Abbildung 10). Dieser nahm im weiteren Versuchsverlauf nicht (Reaktor B), oder nur geringfügig ab (Reaktor A). Das durch Adsorption an die Reaktorkompartimente im Reaktor verbliebene $^{13}\text{C}_6$ -4-*n*-NP wurde weiterhin abgebaut. Darauf weist die auch zum Versuchsende immer noch andauernde Bildung von schwerem CO_2 hin (siehe Integrale Abbildung 10).

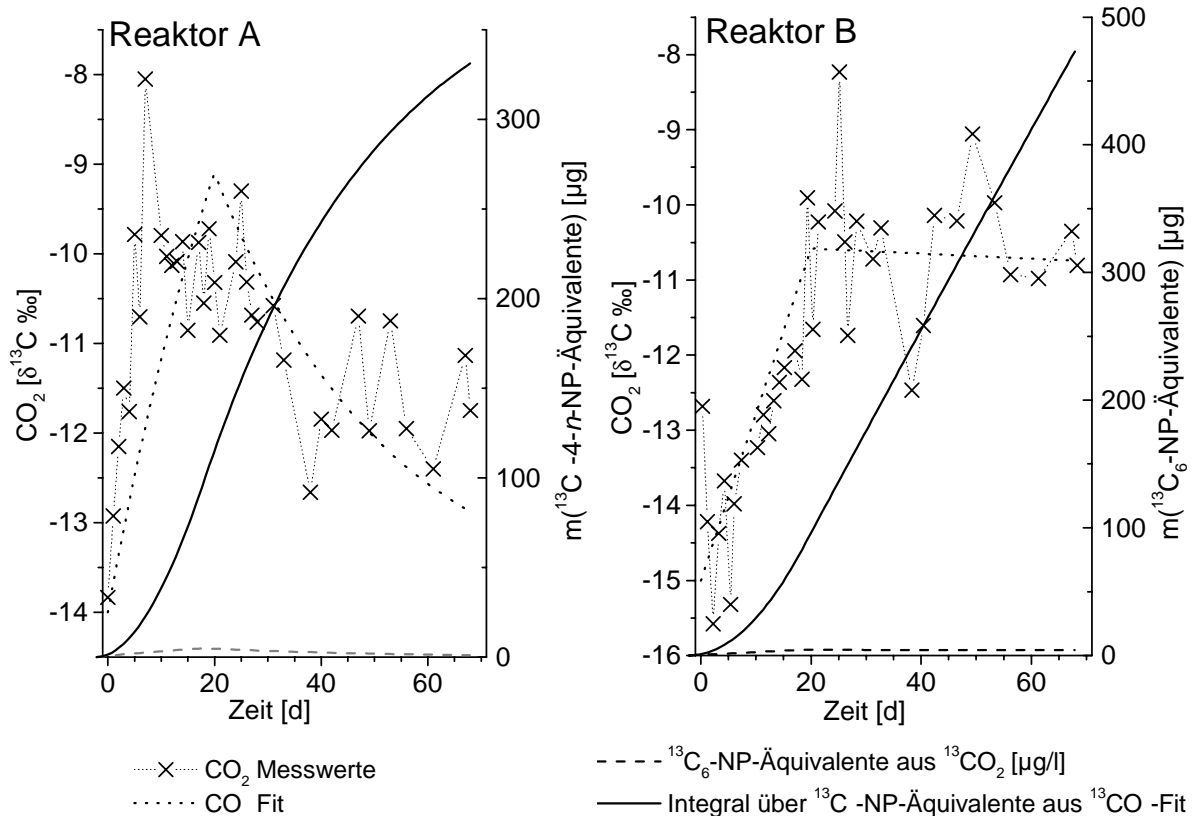


Abbildung 10: Die Abbildungen zeigen den Verlauf der ^{13}C -Signatur-Messwerte für IC, den Kurvenverlauf der angewendeten Anpassung, die daraus resultierende Funktion für die $^{13}\text{C}_6$ -4-*n*-NP-Äquivalente, sowie das Integral zur Quantifizierung.

2.2.3.3 Untersuchungen der Reaktorkompartimente nach dem Versuchsende

Zur Wiederfindung des nach dem Versuchsende im Reaktor verbliebenen, nicht umgesetzten NP wurden die gefriergetrockneten Kompartimente mit ASE und Soxhlet-Extraktion aufgearbeitet und anschließend gemahlen. Bei BPA wurde nach der Probenherstellung ein Übergang des Kugelmühlenmaterials in die Proben festgestellt, weshalb die erhaltenen C-Anteile zu gering ausfielen. Somit wurde bei Binsenproben vom NP-Experiment eine Analysenmühle A10 (IKA (Staufen, Deutschland)) verwendet.

Zunächst wurden verschiedene Lösungsmittel getestet (Ethylacetat, Hexan, Aceton, Hexan:Aceton 1:1 (v/v), CHCl_3 und MeOH, CHCl_3 :MeOH 2:1 (v/v)). Wobei sich CHCl_3 und MeOH als die besten Extraktionsmittel erwiesen. Zur Quantifizierung wurde schließlich die Soxhlet-Extraktion 4 h mit CHCl_3 :MeOH 2:1 (v/v) durchgeführt. Anschließend wurde 4-*n*-NP als interner Standard zu den Extrakten zugegeben.

Dabei konnte in jeglichem Reaktormaterial 4-NP wiedergefunden werden. Die Konzentrationen im Kies lagen dabei bei $^{13}\text{C}_6$ -4-*n*-NP bei 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und bei technischem 4-NP bei 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Allein an der Kiesfraktion wurden 800 µg $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ und 1600 µg technisches 4-NP wiedergefunden. In den Reaktorleitungen konnte ebenfalls 4-NP nach Spülung mit Löse-mitteln (CHCl_3 , Aceton), jedoch in sehr geringen Mengen, detektiert werden. Die Konzentrationen von 4-NP in den Pflanzenwurzel, Spross sind zwar deutlich höher als bei BPA, jedoch füllen diese die Bilanz wie bei BPA aufgrund der geringen Gesamtmasse nicht wesentlich auf.

Tabelle 16: Übersicht Reaktorkompartimente

	Reaktor A	Reaktor B
Pflanzen gesamt (Wurzel/Spross) [g]	27,1 (19,5/7,7)	30,8 (24,1/6,67)
Kies gesamt [kg]	20,6	20,2
Biomasse [g]	52±38	45±14
Wasservolumen im Reaktor [l]	9,6	9,3

Die Ergebnisse zeigen, das $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ an allen Kompartimenten stark adsorbiert wurde. Dieser Vorgang war aber nicht irreversibel. Somit wirkte das ganze System als Puffer für $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$, welches in geringen Konzentrationen ständig auch frei gesetzt oder aber in partikelgebundener Form abtransportiert wurde, z. B. an abgestorbener Biomasse. Nach dem Versuchsende wurden vor allem in der mikrobiellen Biomasse hohe Konzentrationen an 4-NP festgestellt (40 µg/g $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$). Bei einer Gesamtmasse von 6-10 g (TM) ergibt das 230-400 µg $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$. Das entspricht 5-10 % der zudosierten $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ -Menge. Die $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ -Konzentrationen am Kies waren deutlich geringer (0,02 µg/g $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$). Auf Grund der wesentlich größeren Kiesmasse (20 kg TM) hat die am Kies adsorbierte NP-Fraktion jedoch die größte Masse (400-900 µg $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$, ca. 10-25 %). Die am Kies haftende Biomasse wurde durch Glühverlust ermittelt. Umgerechnet auf die Kiesbiomasse ergibt das eine $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ -Konzentration von 10-20 µg/g. Die $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ -Konzentrationen an den Pflanzenteilen (Wurzel 1-6 µg/g bis Spross 45 ng/g) waren deutlich geringer als die Konzentrationen an der mikrobiellen Biomasse. Somit ist auch die am Pflanzenmaterial gesamt adsorbierte NP-Menge deutlich geringer (nur 15-30 µg; 0,3-1 %).

Aus den $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnissen des Gesamtkohlenstoffes der Schwebstoffe und den Schwebstoffkonzentrationen wurden $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ -Äquivalente ermittelt (gesamt 430-610 µg). Von den Wasserrückständen (Gefriertrocknung) wurden ebenfalls über die $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ -Verhältnisse $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ -Äquivalente ermittelt (gesamt 2500-3600 µg). Der Fehler für diese Werte ist schwierig zu ermitteln. Er kann möglicherweise bis zu 1000 µg betragen. Die so ermittelten $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ -Äquivalentmengen sind gegenüber der bestimmten $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ -Konzentration im Ablauf (130-180 µg) deutlich größer. Die $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ -Äquivalente der Schwebstoffe resultieren neben adsorbierten $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ auch aus in die Biomasse transferiertem ^{13}C . Die $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ -Äquivalentwerte für den Wasserrückstand sollten neben $^{13}\text{C}_6\text{-4-}n\text{-NP}$ (gelöst) und die der Schwebstoffe zusätzlich verschiedene Metaboliten wie die gut wasserlöslichen Carbonsäuren beinhalten.

Tabelle 17: Überblick über die Wiederfindungen an $^{13}\text{C}_6$ -4-*n*-NP nach dem Pulsexperiment. Für die Summe wurden die angegebenen Werte für $^{13}\text{C}_6$ -4-*n*-NP-Mengen im Abflusswasser und Schwebstoff nicht mit eingerechnet, da diese auch im Wasserrückstand enthalten sind.

	Methode	Reaktor A [µg]	Reaktor B [µg]
Zudosierte $^{13}\text{C}_6$ -4- <i>n</i> -NP-Menge	nominal	4370±830	3870±320
Menge im Abfluss Gesamt (Wasserrückstand)	IRM-Äquivalente	3512±956	2771±472
Menge im Abfluss in filtrierbaren Schwebstoffen	IRM-Äquivalente	430±172	632±227
als $^{13}\text{C}_6$ -4- <i>n</i> -NP im Abfluss	LLE-GC/MS	130±20	180±30
$^{13}\text{C}_6$ -4- <i>n</i> -NP-Äquivalente aus Metaboliten		n.b.	n.b.
als $^{13}\text{C}_6$ -4- <i>n</i> -NP-Äquivalente in $^{13}\text{CO}_2$	IRM-Äquivalente	310	470
Im System am Versuchsende:		888±178	1165±233
an Kies adsorbiert	Soxhlet GC/MS	430±86	920±184
an Biomasse adsorbiert	Soxhlet GC/MS	430±172	231±46
am Pflanzenmaterial adsorbiert		28±6	14±3
$^{13}\text{C}_6$ -4- <i>n</i> -NP Pflanze Spross über Wasser	Soxhlet GC/MS	-	-
$^{13}\text{C}_6$ -4- <i>n</i> -NP Pflanze Spross unter Wasser	Soxhlet GC/MS	1 ± 0,2	8 ± 1,5
$^{13}\text{C}_6$ -4- <i>n</i> -NP Pflanze Wurzelstock	Soxhlet GC/MS	1 ± 0,3	1 ± 0,3
$^{13}\text{C}_6$ -4- <i>n</i> -NP Pflanze Wurzel	Soxhlet GC/MS	26 ± 5,2	5 ± 1,0
Gesamt		4840±1154	4586±735

Ein Abbau des technischen 4-NP-Gemisches konnte nicht beobachtet werden, trotz langer Adaptionsphase von 6 Monaten und Beimpfung der Reaktoren mit Klärschlamm. Das lineare 4-NP ist dagegen sehr leicht abbaubar. In der Literatur wurde zum Teil ein Abbau von technischem 4-NP gefunden, häufig wurde für verschiedene Untersuchungen jedoch auch das unvergleichsweise leichter abbaubare lineare 4-NP verwendet. Tanghe et al. berichteten 1999 von einem 100 % Abbau von tech. 4-NP, allerdings bei 28°C.

Abundanz [w.E.]

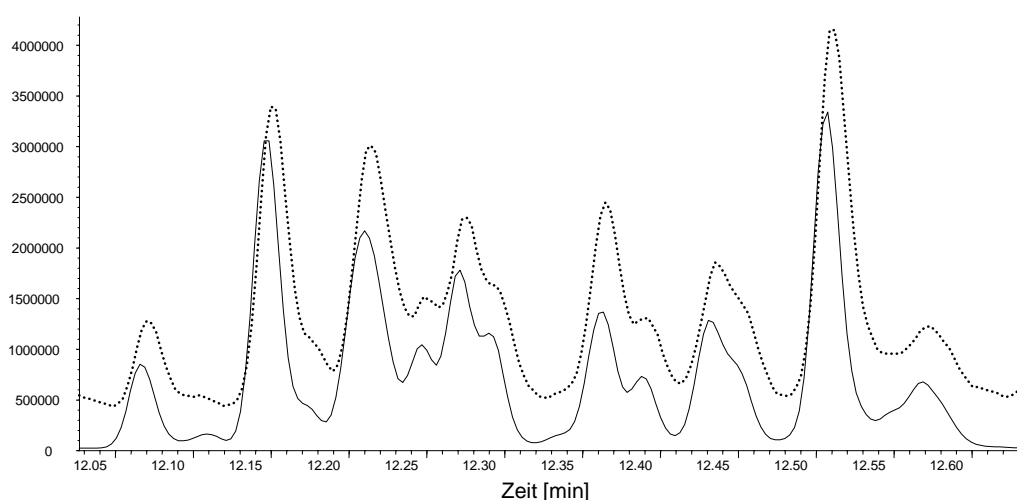


Abbildung 11: Vergleich der Chromatogramme des Wurzelextraktes (gepunktet, obere Kurve) nach dem Versuchsende (6 Wochen nach dem Ende der Applikation von tech. 4-NP) mit verabreichten tech. 4-NP-Mix (schwarz, untere Kurve). Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Metabolite konnten bislang nicht detektiert/identifiziert werden. Es wurde vor allem nach dem Phenolring ($m/z=107$ bzw. $m/z=113$ für die 6-fach gelabelten Verbindungen) gesucht. In der Literatur wird die Öffnung des Phenolringes als erster Schritt diskutiert Tanghe (1999), da bei deren Untersuchungen ebenfalls keine aromatischen Ringkörper gefunden wurden. Möglich ist aber auch, dass die Konzentrationen entsprechender Metaboliten zu gering waren, weshalb sie bislang nicht nachgewiesen werden konnten. Wenn vorliegende Metaboliten zu hydrophil für die Extraktion waren, dann sind sie nicht erfasst wurden, da für diesen Fall erst *in-situ*-Derivatisierung erfolgen müsste.

2.2.3.4 Untersuchungen zum biologischen Abbau von 4-NP

Zur Vorbereitung auf das Pulsexperiment mit $^{13}\text{C}_6$ -4-*n*-NP wurden 2 Reaktoren 6 Monate mit 100 $\mu\text{g/l}$ technischem 4-Nonylphenol im Zulauf belastet. Das Ablaufwasser wurde auf den biologischen Abbau von technischen und linearen 4-Nonylphenol hin untersucht. Dabei wurden wie bei BPA Untersuchungen auf Sauerstoffzehrung und $^{13}\text{CO}_2$ -Entstehung durchgeführt. Bei Konzentrationen von 5-22 mg/l technischem 4-NP konnte ein biologischer Abbau nicht zweifelsfrei festgestellt werden. Eine auf vollständigen Umsatz deutende Sauerstoffzehrung wurde nicht beobachtet, sondern maximal 15 %. Bei weiterer Applikation von tech. 4-NP konnte keine weitere Zehrung beobachtet werden. Die GC/MS-Chromatogramme von technischem 4-NP ließen keinen Abbau einzelner (z.B. nicht so verzweigter) Isomere des Isomerengemisches 4-NP erkennen. Ekelund et. al schrieben von einem „kritischen Level“ für die Adaption zum Abbau von technischem 4-Nonylphenol (Ekelund 1993). Dieses läge zwischen der üblichen Gewässerkonzentration und 11 $\mu\text{g/l}$, der von Ekelund et. al verwendeten Konzentration. Die berichteten Toxizitätswerte (LC_{50}) (BUA 1988) für verschiedene (höhere) Organismen lagen alle oberhalb von 100 $\mu\text{g/l}$. Untersuchungen an *Pseudomonas putida* ergaben eine Wachstumshemmung von 10 % bei 20 mg/l (nominal) und 50 % ab 100 mg/l (nominal). Darüber hinaus erwies sich die geringe Wasserlöslichkeit (nur 3 mg/l !) als limitierender Faktor.

Versuche mit ^{13}C -markiertem technischen 4-NP konnten mangels Substanz nicht durchgeführt werden.

Lineares 4-NP wurde gegenüber technischem 4-NP sehr schnell und leicht abgebaut. Bei den Sauerstoffzehrungsversuchen erwies sich lineares 4-NP als eine relativ leicht abzubauen Substanz. Der Kurvenverlauf der ^{13}C -Signatur von CO_2 in einem $^{13}\text{C}_6$ -4-*n*-NP-Batchversuch in geschlossenen Kulturröhrchen zeigte, dass das lineare 4-NP schneller abgebaut wurde, als die anderen 3 C-Quellen (Fleischextrakt, Harnstoff, Pepton). Am Versuchsende stellte sich in etwa der kalkulierte ^{13}C -Signaturwert bei vollständigem Umsatz aller C-Quellen zu CO_2 ein.

Weitere Arbeiten zur Kultivierung auf 4-NP-haltigen Mineralagar sind noch nicht beendet.

2.2.3.5 Diskussion

Ein Abbau des technischen NP-Gemisches konnte nicht zweifelsfrei festgestellt werden, trotz 6-monatiger Adaptionsphase und Beimpfung mit Klärschlamm. Das lineare 4-NP ist dagegen sehr leicht abbaubar.

In den Versuchen wurde kein biologischer Abbau von tech. 4-NP beobachtet. Dies kann an der versuchsbedingt erhöhten Konzentration an tech. 4-NP liegen. Andererseits zeigten die Toxizitätstests, dass bei Mikroorganismen im untersuchten Konzentrationsbereich (20 µg/l-20 mg/l) keine Einschränkungen durch toxische Effekte zu erwarten sein sollten.

2.2.4 17β-Estradiol

2.2.4.1 Untersuchungen zum biologischen Abbau von 17β-Estradiol

Bei Sauerstoffzehrungsversuchen in Oxi-Top-Gefäßen mit Konzentrationen von 17β-Estradiol (E2) mit 1-3 mg/l konnte bisher keine auf biologischen Abbau hindeutende Sauerstoffzehrung beobachtet werden. Bei Batchversuchen mit 1 mg/l E2-haltigen wässrigen Lösungen in Kolben ohne Beimpfung wurde über einen Zeitraum von 30 Tagen nur eine sehr geringfügige Transformation von E2 zu Estron (E1) oder anderen nicht identifizierten Metaboliten (nur E2M2) beobachtet. Nachdem in einen Kolben eine Pflanze *juncus effusus* eingesetzt wurde, fiel die E2-Konzentration in diesem Kolben innerhalb von 7 Tagen unter 10 mg/l. Dazu stieg die E1-Konzentration auf über 500 µg/l am 2. Tag an. Die Konzentration eines noch nicht identifizierten möglichen Metaboliten E2M2 (m/z=268) erreichte am 7. Tag mit 28 µg/l ihr Maximum. Nach 16 Tagen lagen die Konzentrationen von E2, E1 und E2M2 unterhalb von 22 µg/l, bei Gegenwart von *juncus effusus*. Innerhalb der ersten 7 Tage war eine Änderung des Pflanzenzustandes zu erkennen. Die Pflanzensprosse fassten sich wie vertrocknet an. Im weiteren Versuchsverlauf war die Pflanze praktisch abgestorben. Es trennten sich schließlich das Rhizom von den vertrockneten Sprossen.

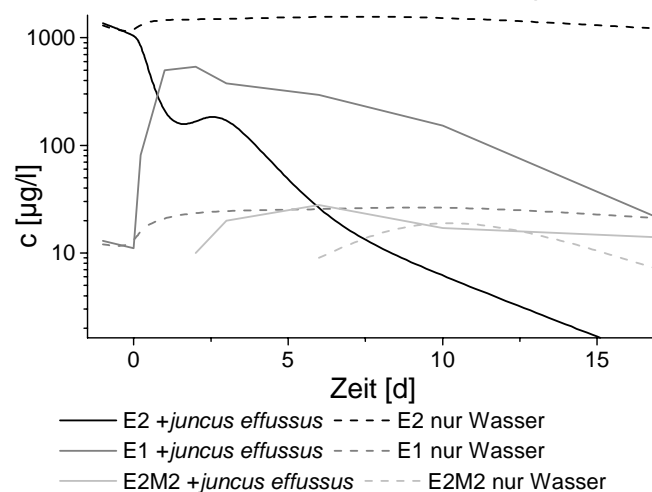


Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von E2 und E1 im Batchversuch mit und ohne *juncus effusus*.

2.2.4.2 17β -Estradiol in PFR

E2 wurde zunächst über einen Zeitraum von 16 d 2 Reaktoren zudosiert. Aus E2 wurde sofort E2 gebildet, mit einer Einstellung eines stationären Verhältnisses. Das Verhältnis E2:E1 lag im Mittel bei $0,8\pm 0,2$ (Reaktor A), $0,5\pm 0,2$ (Reaktor B). Während der Dosierzeit war das Verhältnis etwas größer, danach fiel es etwas ab. Es wurden weitere, noch nicht identifizierte, Metaboliten (E2M1 $m/z=270$, E2M3 $m/z=272$) detektiert.

Weiterhin konnte die Bildung von mehreren Metaboliten beobachtet werden. Estriol (E3), das in der Literatur häufig als Metabolit angegeben wird, wurde bei den bisherigen Untersuchungen nicht detektiert, da die verwendeten Extraktionsverfahren (SPME, LLE mit Hexan, und CHCl_3) Estriol nicht erfassen konnten. Dazu würde eine in-situ-Derivatisierung notwendig.

2.2.4.3 ^{13}C - 17β -Estradiol Pulsexperiment

Diese Arbeiten laufen nach dem Projektende an und sind durch das Ufz finanziell abgesichert.

2.2.5 Zusammenfassung der Laborexperimente

BPA dürfte in Pflanzenkläranlagen bei anaeroben Bedingungen abgebaut werden. Bei Nonylphenol konnte dies im Versuch nicht bestätigt werden, in der Literatur wird aber den aeroben Klärstufen die Fähigkeit zum (biologischen) NP-Abbau zugesprochen. Das Verhalten von BPA und Nonylphenol in einer Pflanzenkläranlage ist somit recht unterschiedlich, zum einen wegen der unterschiedlichen K_{OC} -Werte, zum anderen wegen dem vorliegenden Abbau-Potential. Während BPA kaum zu großen Ablagerungen im System führen dürfte, wird NP in jeglicher Biomasse in großen Mengen aufgenommen. Das bedeutet, dass für NP der Rückhalt der aus der Anlage ausschwemmenden Biomasse von wesentlich größerer Bedeutung ist als bei BPA. Bei Belastungsspitzen wird BPA in einer PKA wohl nicht wesentlich durch Adsorption zurückgehalten werden, es dürfte mit der mittleren Verweilzeit durch die Anlage laufen, reduziert um den abgebauten Anteil. NP dagegen wird an sämtlicher Biomasse adsorbieren und anschließend zögerlich wieder frei gegeben. So funktionieren die Anlagen mit ihrer Biomasse quasi als Puffer. NP kann somit gut aus dem Wasserstrom entfernt werden, wenn die Biomasse als Adsorptionsmittel dient und dann regelmäßig entfernt wird, um der Desorption zuvor zu kommen.

2.3 Ergebnisse der Anlagenbeprobung

2.3.1 Allgemeine Anlagenbeschreibung, Probenahme und Standardanalytik

Für die Untersuchungen wurden zwei Teichanlagen und drei Pflanzenkläranlagen im Raum Sachsen beprobt. Die wichtigsten Anlagenparameter wie Ausbaugröße und spezifischer Flächenbedarf sowie eine Kurzbeschreibung sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18: Verfahrenstechnische Beschreibung der ausgewählten Kläranlagen

Anlage	Ausbaugröße (EW)	Spezifischer Flächenbedarf (m ² /EW)	Anlagenkurzbeschreibung
Teichanlage A	ca. 500	12	Rechen als mechanische Vorbehandlung; 4 Becken in Reihe angeordnet, ein Becken teilweise belüftet; Kommunalabwasser
Teichanlage B	ca. 270	2,1	Rechen als mechanische Vorbehandlung; 2 belüftete Rundteiche, 1 Schönungsbecken; Kommunalabwasser
Pflanzenkläranlage I	ca. 120	2,3	Dreikammergrube als mechanische Vorbehandlung; Vertikalbeet mit Schilf; 1/3 des Ablaufes wird in Dreikammergrube zurückgeführt; Kommunalabwasser
Pflanzenkläranlage II	ca. 2000-3000	ca. 0,6 (vorbehandeltes Abwasser)	Rechen als mechanische Vorbehandlung; Intensivbiologie in Containeranlage; Vertikalbeet mit Schilf; Abwasser aus Gewerbe-park
Pflanzenkläranlage III (Versuchsanlage in Langenreichenbach, bestehend aus mehreren unterschiedlich gestalteten Becken)	2,6 (Vertikalfilter mit 6,5 m ² Beetfläche)	2,5	Rottefilter als mechanische Vorbehandlung; Entnahme aus einer Abwasserdruckleitung für Kommunal- und Schlachthofabwasser (ca. 8000 EW); Schilfbepflanzung
	1,3 (Horizontalfilter mit 6,5 m ² Beetfläche)	5,0	

Die Beprobung erfolgte täglich in einem Zeitraum von 6-7 Tagen. Die Anlagenzuläufe wurden als 24 h-Mischproben mittels eines eisgekühlten automatischen Probenehmers (Fa. Bühler, Deutschland) zeitproportional entnommen. Die Ablaufentnahme erfolgte manuell einmal täglich vormittags.

Die Bestimmung des BSB₅ wurde in Flaschen mit Drucksensorköpfen (WTW, Deutschland) durchgeführt. Die Bestimmung von Ammonium, Nitrit und Nitrat erfolgte mittels Ionenchromatographie (Dionex, USA).

Anhand der in 2.3 beschriebenen Methode zur Bestimmung der Östrogene und Xenoöstrogene wurden die Zu- und Abläufe der Kläranlagen aufgearbeitet und gemessen.

Bei der Auswertung der Kläranlagenabläufe gestaltete sich lediglich die Identifizierung von EE2 etwas diffizil. So wurde durch eine Messung eines derivatisierten Ablaufs im Full Scan-Modus festgestellt, dass Tetracosansäure kurz vor EE2 eluiert und erstere darüber hinaus im Massenspektrum dieselben Ionen liefert, die zur Identifizierung von EE2 gewählt worden waren. Und zwar handelt es sich um $m/z=440$ und 425 . Im Falle einer Realprobe kann es durch den Matrixeinfluss zu Verschiebungen in den Retentionszeiten kommen, was zur Folge hat, dass derivatisiertes EE2 und derivatisierte Tetracosansäure koeluiert und damit unter Umständen eine höhere EE2-Konzentration im Ablauf vorgetäuscht wird. Diese Schwierigkeit lässt sich beseitigen, indem man zur Identifizierung und Quantifizierung von EE2 weitere typische Ionen heranzieht, z.B. $m/z=300$ und $m/z=285$.

In Tabelle 19 sind die im Ablauf gemessenen Konzentrationen zusammengestellt.

Tabelle 19: Teichkläranlage Neiden (Herbst 2000) - Angabe der im Ablauf gemessenen Konzentrationen

Datum	NP [ng/l]	BPA [ng/l]	EE2 [ng/l]
4.9.00	1313	25	4
12.9.00	ü. 3)	< NWG 4)	4
30.8.00	627	< NWG	< NWG
21.9.00	826	< NWG	< NWG
6.10.00	657	< NWG	< NWG
7.10.00	1120	< NWG	< NWG
8.10.00	876	< NWG	< NWG
3): ü.= überlagert;			
4): < NWG= unterhalb der Nachweisgrenze			

BPA konnte nur in einer Ablaufprobe nachgewiesen werden, was auf eine sehr effektive Elimination in der Teichkläranlage schließen lässt. NP ist in fast allen Proben nachweisbar, was vermutlich auf eine schlechtere Eliminationsrate oder eine verstärkte Metabolisierung von eingeleiteten Nonylphenoethoxylaten zu NP zurückzuführen ist.

Dennoch sind die für NP ermittelten Blindwerte sehr hoch, was sich in schlechten Nachweisgrenzen widerspiegelt. Ursache hierfür war, dass das als interner Standard verwendete deuterierte technische Nonylphenol auch noch einen hohen Anteil an nativem technischem Nonylphenol enthielt, was vorher nicht überprüft worden war. Dieser Fehler konnte in weiteren Analysen vermieden werden, da dann nur noch 4-*n*-NP als interner Standard verwendet wurde.

Ethinylestradiol konnte in zwei Proben nachgewiesen mit einer Konzentration von jeweils 4 ng/l werden. Höhere Konzentrationen an EE2 sind aufgrund des Einzugsgebietes nicht zu erwarten.

Während die Abläufe ohne Probleme analysiert werden können, gibt es bei der Auswertung der Teichkläranlagenabläufe erhebliche Probleme. Der Anteil mitextrahierter Matrixkomponenten ist so hoch, dass die ausgewählten Analyten nicht ohne weiteres identifiziert werden

konnten. Eine Zulaufprobe wurde einem weiterem Clean up über Aluminiumoxid zugeführt. Ein Gramm Al_2O_3 wurde mit 10 ml Hexan/Aceton im Verhältnis 1:1 konditioniert. Nach der Probenaufgabe, wurde zunächst mit 5 ml Hexan/Aceton im Verhältnis 1:2 eluiert. Danach wurde nochmals mit 5 ml desselben Gemisches eluiert. Fraktion 3 wurde nach Elution mit 1 ml Methanol erhalten. Fraktion 1 und 2 wurden jeweils auf 100 μl eingeeengt und injiziert. In den Chromatogrammen von Fraktion 1 und 2 waren die Analyten nicht nachweisbar. Fraktion 3 wurde bis zur Trockne eingedampft, in 100 μl Hexan aufgenommen und gemessen. Auch in dieser Fraktion waren die Analyten nicht nachweisbar, was darauf hindeutet, dass sie noch am Al_2O_3 adsorbiert sind.

Parallel zu der Zulaufprobe war ein Standard analog aufgearbeitet worden. Auch hier konnten die Analyten in keiner der drei Fraktionen nachgewiesen werden. Da diese Aufreinigungsvariante zu keinem Ergebnis führte, wurde auf weitere Untersuchungen verzichtet. Offensichtlich sind die Analyten irreversibel an das Aluminiumoxid gebunden. Wie in Punkt 1.3.2 beschrieben, wurde alle weiteren Abwässer über Glasfaserfilter filtriert. Dadurch konnte ein Großteil der Matrix eliminiert und die aufgearbeiteten Proben deutlich einfacher analysiert werden.

2.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Analyseergebnisse bezüglich der Zu- und Ablaufkonzentrationen für NP und BPA aller Teich- und Pflanzenkläranlagen sind in Tabelle 20 bis Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 20: NP, BPA und EE2 im Zu- und Ablauf der Teichanlage A

Zulauf

Datum (Wochentag)	NP (µg/l)	BPA (µg/l)	EE2 (µg/L)
29.-30.08.00 (Di-Mi)	2,5	7,5	
03.-04.09.00 (So-Mo)	< NWG	6,8	
11.-12.09.00 (Mo-Di)	3,1	9,0	
20.-21.09.00 (Mi-Do)	2,4	8,9	
05.-06.10.00 (Do-Fr)	1,6	5,6	
06.-07.10.00 (Fr-Sa)	1,4	3,4	
07.-08.10.00 (Sa-So)	2,1	6,3	
Mittelwert +/-	2,18+/-0,62	6,79+/-1,96	
Standardabweichung			

Ablauf

30.08.00 (Mi)	0,63	< NWG	< NWG
04.09.00 (Mo)	1,31	0,03	0,004
12.09.00 (Di)	Ü	< NWG	0,004
21.09.00 (Do)	0,83	< NWG	< NWG
06.10.00 (Fr)	0,66	< NWG	< NWG
07.10.00 (Sa)	1,12	< NWG	< NWG
08.10.00 (So)	0,88	< NWG	< NWG
Mittelwert +/-	0,90+/-0,27		
Standardabweichung			

(Ü=überlagert)

Tabelle 21: NP, BPA und EE2 im Zu- und Ablauf der Teichanlage B

Zulauf

Datum (Wochentag)	NP (µg/l)	BPA (µg/l)	EE2 (µg/l)
25.-26.04.02 (Do-Fr)	3,17	1,03	nn
26.-27.04.02 (Fr-Sa)	1,44	0,97	nn
27.-28.04.02 (Sa-So)	< NWG	0,10	nn
28.-29.04.02 (So-Mo)	6,79	0,95	nn
29.-30.04.02 (Mo-Di)	2,51	< NWG	nn
30.04.-01.05.02 (Di-Mi)	1,30	0,86	nn
01.-02.05.02 (Mi-Do)	7,17	0,80	0,37
Mittelwert +/- Standardabweichung	3,20+/-2,77	0,673+/-0,43	

Ablauf

25.04.02 (Do)	0,81	0,31	0,42
26.04.02. (Fr)	1,39	0,31	nn
27.04.02 (Sa)	0,83	0,31	nn
28.04.02 (So)	1,38	0,30	0,48
29.04.02 (Mo)	1,51	0,30	0,26
30.04.02 (Di)	2,18	0,23	0,48
01.05.02 (Mi)	1,37	0,45	0,53
Mittelwert +/- Standardabweichung	1,35+/-0,46	0,32+/-0,07	

Tabelle 22: NP, BPA und EE2 im Zu- und Ablauf der Pflanzenkläranlage I

Zulauf

Datum (Wochentag)	NP (µg/l)	BPA (µg/l)	EE2 (µg/l)
06.06.01 (Mi)	1,22	5,99	0,28
09.06.01 (Sa)	1,23	7,22	0,33
10.06.01 (So)	1,62	7,67	0,42
11.06.01 (Mo)	2,33	4,23	0,29
12.06.01 (Di)	2,61	4,95	0,21
14.06.01 (Do)	1,77	7,15	0,25
15.06.01 (Fr)	1,79	8,40	0,10
Mittelwert +/-	1,80+/-0,52	6,52+/-1,51	0,27+/-0,10
Standardabweichung			

Ablauf

05.06.01 (Di)	0,01	0,05	nn
06.06.01 (Mi)	0,06	2,02	nn
08.06.01 (Fr)	0,14	0,21	nn
09.08.01 (Sa)	0,05	0,16	nn
10.06.01 (So)	0,11	0,08	nn
11.06.01 (Mo)	0,16	2,85	nn
14.06.01 (Do)	0,10	0,08	nn
Mittelwert +/-	0,09+/-0,05	0,78+/-1,16	
Standardabweichung			

Tabelle 23: NP und BPA im Zu- und Ablauf der Pflanzenkläranlage II

Zulauf

Datum (Wochentag)	NP (µg/l)	BPA (µg/l)	EE2 (µg/l)
31.10.01 (Mi)	1,10	3,83	0,66
01.11.01 (Do)	0,73	3,66	0,21
02.11.01 (Fr)	0,78	1,73	nn
03.11.01 (Sa)	0,70	1,98	0,37
04.11.01 (So)	0,77	1,52	0,40
05.11.01 (Mo)	0,80	1,19	nn
20.11.01 (Di)	0,80	1,01	nn
Mittelwert	0,81+/-0,13	2,13+/-1,15	
Standardabweichung			

Ablauf

30.10.01 (Di)	0,48	0,45	<0,05
31.10.01 (Mi)	0,39	0,27	<0,05
02.11.01 (Fr)	0,52	0,23	<0,05
03.11.01 (Sa)	0,33	0,27	<0,05
04.11.01 (So)	0,40	0,29	<0,05
05.11.01 (Mo)	0,10	0,05	<0,05
Mittelwert	0,43+/-0,09	0,31+/-0,10	
Standardabweichung			

Tabelle 24: NP und BPA im Zu- und Ablauf der Pflanzenkläranlage III (einstufig, nur Vertikalfilter)

Zulauf

Datum (Wochentag)	NP (µg/l)	BPA (µg/l)	EE2 (µg/l)
13/14.02.02 (Mi-Do)	2,99	2,57	0,16
14/15.02.02 (Do-Fr)	5,45	0,24	nn
15/16.02.02 (Fr-Sa)	4,05	<NWG	0,81
16/17.02.02 (Sa-So)	1,93	1,16	0,85
17/18.02.02 (So-Mo)	0,50	1,24	0,28
18/19.02.02 (Mo-Di)	0,41	1,54	0,79
19/20.02.02 (Di-Mi)	< NWG	1,05	0,29
Mittelwert +/-	2,19+/-2,07	1,12+/-0,85	
Standardabweichung			

Ablauf

13.02.02 (Mi)	0,33	0,09	nn
14.02.02 (Do)	0,31	0,12	0,12
15.02.02 (Fr)	0,57	0,09	0,3
16.02.02 (Sa)	0,34	0,08	nn
17.02.02 (So)	0,16	0,08	0,1
18.02.02 (Mo)	0,44	0,10	nn
19.02.01 (Di)	0,45	0,12	nn
Mittelwert +/-	0,37+/-0,14	0,10+/-0,02	
Standardabweichung			

Tabelle 25: NP und BPA im Zu- und Ablauf der Pflanzenkläranlage III (zweistufig, Kombination von Vertikal- und Horizontalfilter)

Zulauf des Vertikalfilters

Datum (Wochentag)	NP (µg/l)	BPA (µg/l)	EE2 (µg/l)
11/12.11.02 (Mo-Di)	1,41	20,73	
12/13.11.02 (Di-Mi)	1,75	16,43	
14/15.11.02 (Do-Fr)	1,98	0,57	
15/16.11.02 (Fr-sa)	1,55	0,53	
16/17.11.02 (Sa-So)	1,61	0,39	
17/18.11.02 (So-Mo)	1,02	6,69	
Mittelwert +/-	1,55+/-0,32	7,55+/-8,97	
Standardabweichung			

Ablauf des Vertikalfilters (ist zugleich der Zulauf des Horizontalfilters)

13.11.02 (Mi)	0,42	1,11	
14.11.02 (Do)	0,48	0,51	
15.11.02 (Fr)	0,53	0,26	
16.11.02 (Sa)	0,92	0,54	
17.11.02 (So)	0,70	0,70	
18.11.02 (Mo)	0,59	0,50	
19.11.02 (Di)	0,57	0,26	
Mittelwert+/-	0,60+/-0,16	0,55+/-0,26	
Standardabweichung			

Ablauf nach sequentieller Passage von Vertikal- und Horizontalfilter

17.11.02 (So)	1,87	0,53	
19.11.02 (Di)	0,31	1,80	
20.11.02 (Mi)	0,33	1,20	
21.11.02 (Do)	0,25	0,93	
22.11.02 (Fr)	0,33	1,26	
23.11.02 (Sa)	0,28	0,89	
Mittelwert +/-	0,56+/-0,64	1,10+/-0,43	
Standardabweichung			

Die Zulaufwerte für NP und BPA variierten trotz der 24 h-Mischproben um bis zu 1000 %. Zur Signifikanzabsicherung wurden zusätzliche 24 h-Mischproben für Zeiträume von bis zu 7 zusammenhängenden Tagen analysiert. Dabei konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen spezifischen Wochentag und gemessener Schadstoffkonzentration festgestellt werden.

Die mittleren Konzentrationen für NP und BPA in den Anlagenzuläufen während der einzelnen Messperioden (zumeist 6 bis 7 zusammenhängende Tage) lagen im Bereich von 0.81 bis 3.20 µg/l für NP bzw. 0.67 bis 7.55 µg/l für BPA. Dies bestätigt Untersuchungsergebnisse anderer Autoren (Körner et al. 2000; Hegemann et al. 2002). Die Ursache für die am 12. bzw. 13.11.2002 ungewöhnlich hohen BPA-Konzentrationen von 20.73 und 16.43 µg/l für die Pflanzenkläranlage III ist unbekannt.

Tabelle 26 zeigt prozentuale Eliminationsleistungen für NP und BPA in den beprobten Anlagen sowie korrespondierende andere Leistungsparameter und jahreszeitliche Zuordnungen der Beprobungszeiträume.

Tabelle 26: Prozentuale Elimination von NP und BPA sowie ergänzende Angaben zur Ablaufqualität und zur jahreszeitlichen Zuordnung des Beprobungszeitraumes in den verschiedenen Anlagentypen

Anlage	Elimination NP (%)	Elimination BPA (%)	Durchschnittliche Ablaufkonzentrationen (mg/l)				Monat der Beprobung
			BSB ₅	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	
Teichanlage A	59	> 90	6,4	19,9	< 0,2	0,5	September/ Oktober
Teichanlage B	58	53	38,2	33,7	8,2	108,8	April/Mai
PKA I	95	88	5,7	0,9	< 0,1	175,4	Juni
PKA II	47	85	2,9	6,3	0,4	100,6	Oktober/ November
PKA III Einstufig (Vertikalfilter)	83	91	2,0	< 0,2	0,2	240,8	Februar
PKA III Zweistufig (Vertikalfilter- Horizontalfilter)	61	93	10,4	6,1	13,8	139,4	November
	(8)	(-117)	4,6	5,1	8,5	89,8	
	64	85					
Gesamtelimination beider Stufen							

Die Elimination von NP aus dem Rohabwasser betrug für alle Anlagen zwischen 47 und 95 %. Die beiden Teichanlagen zeigten dabei mit durchschnittlich 58 % eine geringere Eliminationsleistung als die Pflanzenkläranlagen mit durchschnittlich 72 %.

Die Elimination von BPA war für beide Anlagentypen durchschnittlich höher als die bei NP. Zur statistischen Absicherung dieser Aussagen sind allerdings weitere Untersuchungen unter Einbeziehung zusätzlicher Anlagen notwendig. Diesbezügliche statistisch abgesicherte allgemeingültige Aussagen können zurzeit auch im Bezug auf andere Anlagentypen generell noch nicht getroffen werden (Körner et al. 2000; Hegemann et al. 2002).

Interessanterweise konnte für die zwei Anlagen PKA I und PKA III (Anlagenstufe: Vertikalfilter) mit einer weitgehend vollständigen Nitrifikation (Ammoniumkonzentration < 1 mg/L im

Ablauf) eine im Vergleich zu den Systemen mit unvollständiger Nitrifikation hohe Elimination von NP und BPA festgestellt werden.

Die Kopplung von Vertikal- und Horizontalfilter in der Pflanzenkläranlage III zur verbesserten Nitratreduktion bewirkte keine signifikante Steigerung der Elimination von NP und BPA. Für BPA waren die Ablaufkonzentrationswerte teilweise höher als die Werte des Zulaufs (siehe Tabelle 25 und Tabelle 26). Aufgrund der geringen vorliegenden Datenmenge wurde dieser Horizontalfilter noch nicht in die generelle Auswertung einbezogen.

Generell kann postuliert werden, dass folgende Einflussgrößen für die Elimination der beiden Verbindungen in naturnahen Systemen von Bedeutung sind:

Hydraulische Verweilzeit (z. B. Tropfkörperanlagen haben vergleichsweise geringe Leistungen, offensichtlich aufgrund kürzerer hydraulischer Verweilzeiten (Hegemann 2002, Spengler 2001)),

Kontaktzeit des Abwassers mit Adsorptionsoberflächen wie Biofilme, Schlammflocken etc., Redoxverhältnisse (ein anaerober mikrobieller Abbau konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden; weiterhin sind die Geschwindigkeiten der aeroben metabolischen Umsetzungen in der Regel höher als die der Anaerobprozesse),

Retention von Partikeln wie Bakterienzellen etc. (dieser Aspekt scheint eine wichtige Rolle zu spielen, worauf auch gute Eliminationsleistungen in Membranbelebungsanlagen hindeuten (Hegemann 2002)),

Konzentration (bei niedrigen Konzentrationen werden evtl. Schwellenkonzentrationen zur Enzyminduktion bei den Mikroorganismen nicht erreicht bzw. die Reaktionsgeschwindigkeit wird unendlich langsam) und

Verzweigungsgrad der Alkylkette bzw. Stellung der Alkylgruppe zur Hydroxyl-Gruppe bei NP (Tanghe et al. 1999).

Generell verdeutlichen die Untersuchungsergebnisse positive Effekte für die Eliminierung der untersuchten Problemstoffe aus Abwässern durch die Nutzung naturnaher Abwasserbehandlungssysteme. Dabei konnten die verantwortlichen Eliminationsmechanismen noch nicht aufgeklärt werden. Erste Lösungsansätze konnten postuliert werden und implizieren die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen. Dabei sollten sowohl weitere Untersuchungen an Großanlagen zur statistischen Validierung von Effekten als auch Modelluntersuchungen zu möglichen Eliminationsmechanismen zur gezielten Beeinflussung bzw. Gestaltung von Prozessen durchgeführt werden.

2.3.3 Zusammenfassung

Es wurde die Wirksamkeit von Teich- und Pflanzenkläranlagen (Vertikalfilter) hinsichtlich der Rückhaltung bzw. Elimination der östrogen wirksamen Verbindungen Nonylphenole (NP) und Bisphenol A (BPA) untersucht. So konnten mittlere Zulaufkonzentrationen für die einzelnen Messkampagnien in allen Anlagen im Bereich von 0,81 bis 3,20 µg/l für NP bzw. 0,67 bis 7,55 µg/l für BPA ermittelt werden. Die Elimination von NP aus dem Rohabwasser betrug zwischen 47 und 95 % für alle Anlagen. Dabei wurde für die untersuchten Teichanlagen mit

durchschnittlich 58 % eine geringere Eliminationsleistung als für die Pflanzenkläranlagen mit durchschnittlich 72 % ermittelt. Die Elimination von BPA war für beide Anlagentypen mit durchschnittlich 82 % höher als die bei NP mit 68 %.

Es zeigte sich, dass in Pflanzenkläranlagen mit weitgehend vollständiger Nitrifikation (Ammoniumkonzentration < 1 mg/l im Ablauf) vergleichsweise höhere Eliminationen von NP und BPA festgestellt werden konnte als in Systemen mit unvollständiger Nitrifikation.

3 Literaturverzeichnis

Bhatt, B. D., Prasad, J. V., Kalpana G, Ali, S.; 1992; Separation and Characterization of Isomers of p-Nonylphenols by Capillary GC/GC-MS/GC-FTIR Techniques; Journal of Chromatographic Science; 30, 203

Bokern, M.; Raid, P. and Harms, H.: Toxicity, uptake and metabolism of 4-*n*-nonylphenol in root cultures and intact plants under septic and aseptic conditions. Environ. Sci. & Pollut. Res. 5 (1998), S. 21-27.

Braun,P, Moeder, M, Schrader, S, Popp, P, Kusch, P, Engewald, W; 2003a. Trace analysis of technical nonylphenol, bisphenol A and 17 alpha-ethinylestradiol in wastewater using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 988 (1), 41-51

Braun, P, Moeder, M, Schrader, S, Engewald, W, (2003b) Simultaneous determination of endocrine disruptors and pharmaceutical residues in water samples by gas chromatography/ negative chemical ionisation mass spectrometry, J. Chromatogr. A, submitted

BUA Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) der Gesellschaft Deutscher Chemiker (Hrsg.); 1988; Nonylphenol; BUA-Stoffbericht 13; Stuttgart: Hirzel

BUA Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe (BUA) der Gesellschaft Deutscher Chemiker (Hrsg.); 1997; Bisphenol A; BUA-Stoffbericht 203; Stuttgart: Hirzel

Dorn, P. B., Chou, C.-S., Gentempo J. J.; (1987) Degradation of Bisphenol A in Natural Waters; Chemosphere, 16, 7, 1501-1507

Ekelund, R., Granmo, Å., Magnusson, K., Bergren, M.; (1993); Biodegradation of 4-Nonylphenol in Seawater and Sediment; Environmental Pollution, 79, , 59-61.

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.

Fitzer, E., Fritz, W.; (1975); Technische Chemie – Eine Einführung in die Chemische Reaktionstechnik; Springer-Verlag; Berlin-Heidelberg-NewYork

Fujii, K.; Urano, N.; Kimura, S.; Nomura, Y.; Karube, I. (2000a): Microbial degradation of nonylphenol in some aquatic environments; Fisheries Science 66, , 44-48.

Fujii, K., Urano, N., Ushio, H., Satomi, M., Iida, H., Ushio-Sata, N., Kimura, S.; (2000b); Profile of a nonylphenol-degrading microflora and its potential for bioremedial applications; Journal of Biochemistry, 128, 6, 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; International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51; , 603-610

Gaffney, P. E.; (1976); Carpet and rug industry case study II: biological effects; Journal of the Water Pollution Control Federation, 48, 12,2731-2737.

Giger, W., Brunner, P. H., Schaffner, C.; (1984); Accumulation of Toxic Metabolites from Nonionic Surfactants; Science, 225, 623-625.

Hegemann, W.; Busch, K.; Spengler, P. and Metzger, J.W.: Einfluss der Verfahrenstechnik auf die Eliminierung ausgewählter Estrogene und Xenoestrogene in Kläranlagen – ein BMBF Verbundprojekt. Wasser Abwasser 143 (2002), S. 422-428.

Henriksen, T, Svensmark, B, Lindhardt, B, Juhler, R K; (2001); Analysis of acidic pesticides using in situ derivatization with alkylchloroformate and solid-phase microextraction (SPME) for GC/MS; Chemosphere; Vol. 44; s. 1531-1539

Holtey-Weber, R I, Färber, H A, Schöler, H F; (1999); On-Line-Silylierung zur Analytik von endokrin wirksamen Substanzen in Wasser mittels GC-MS/MS; Vom Wasser; Vol. 92, s. 1-9.

Liebich, H M, Gesele, E, Wöll, J; (1998); Urinary organic acid screening by solid-phase microextraction of the methyl esters; J. Chromatogr. B; Vol. 713; s. 427-432.

Kan, A. T., Fu, G., Hunter, M., Chen, W., Ward, C. H., Tomson, M. B.; 1998; Irreversible Sorption of Neutral Hydrocarbons to Sediments: Experimental Observations and Model Predictions; Environ. Sci. Technol., 32, 7, 892

Körner, W.; Bolz, U.; Süßmuth, W.; Hiller, G.; Schuller, W.; Hanf, V. and Hagenmaier, H.: Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. Chemosphere 40 (2000), S. 1131-1142.

Lobos, J. H., Leib, T. K., Su, T.-M.; 1992; Biodegradation of Bisphenol A and Other Bisphenols by a Gram-Negative Aerobic Bacterium; Appl. Environ. Microbiol., 58, 6, 1823

Mol, H G J, Sunarto, S, Steijger, O M; (2000); Determination of endocrine disruptors in water after derivatization with N-methyl-N-(tert.-butyldimethyltrifluoroacetamide) using gas chromatography with mass spectrometric detection; Vol. 879; s. 97-112.

Pawliszyn, J; Applications of Solid Phase Microextraction. The Royal Society of Chemistry Chromatography Monographs, Cambridge, 1999.

Petrovic, M, Eljarrat, E, López de Alda, m J, Barceló, D; (2002); Recent advantages in the mass spectrometric analysis related to endocrine disrupting compounds in aquatic environmental samples (Review); J. Chromatogr. A; Vol. 974; s. 23-51.

Sandermann, H.: Plant metabolism of xenobiotics. Trends Biochem. Sci. 17 (1992), S. 82-84.

Schlegel, H. G., "Allgemeine Mikrobiologie", Georg Thieme Verlag Stuttgart (Deutschland), 1992, 192

Staples, C. A., Dorn, P. B., Klecka, G. M., O'Block, S. T., Harris, L. R.; 1998; A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A; Chemosphere 36, 10, 2149

Stumpf, M, Ternes, T A, Haberer, K, Baumann, W; (1996); Nachweis von natürlichen und synthetischen Östrogenen in Kläranlagen und Fließgewässern; Vom Wasser; Vol. 87; s. 251-261.

Tanghe, T.; Devriese, G.; Verstraete, W.; (1998): Nonylphenol degradation in lab-scale activated sludge units is temperature dependent.; Wat. Res.; 32, , 2889-2896.

Tanghe, T., Dhooge, W., Verstraete, W.; 1999; Isolation of a Bacteria Strain Able To Degrade Branched Nonylphenol; Applied and Environmental Microbiology; 65, 2, 746-751

Ternes, T A, Stumpf, M, Mueller, J, Haberer, K, Wilken, R-D, Servos, M; (1999a); Behavior and occurrence of estrogens in municipal treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil; Sci. Tot. Environm.; Vol. 225, , s. 81-90.

Ternes, T A, Kreckel, P, Mueller, J; (1999b); Behaviour and occurrence of estrogens in municipal treatment plants – II. Aerobic batch experiments with activated sludge; Sci. Tot. Environm.; Vol. 225; s. 91-99.

Werres, F, Stien, J, Balsaa, P, Schneider, A, Winterhalter, P, Overath; (2000); Automatisierte bestimmung polarer Arzneimittelrückstände in Wässern mittels Festphasenmikroextraktion (SPME) und Derivatisierung; Vom Wasser; Vol. 94; s. 135-147.

West, R. J., Goodwin, P. A., Klecka, G. M.; 2001; Assessment of the Ready Biodegradability of Bisphenol A; Bull. Environ. Contam. Toxicol., 67, 106

4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: GC-NICI-MS Analyse des Ablaufes der Pflanzenkläranlage Langenreichenbach.....	22
Abbildung 2: A) Ablaufprobe; B) Ablaufprobe plus 25 ng l ⁻¹ je Standardkomponente und C) Ablaufprobe plus 50 ng l ⁻¹ je Standardkomponente	23
Abbildung 3: Konzentrationen von Clofibrinsäure, Diclofenac und Bezafibrat in der Saale flussabwärts.	23
Abbildung 4: Die Abbildung zeigt die ermittelten und angepassten Abflussraten von ¹³ C ₁₂ -BPA. Zum Vergleich ist eine Kurve ohne Elimination und ohne Adsorptionswechselwirkungen aufgetragen.....	28
Abbildung 5: Die gefundenen Metaboliten von BPA in den Puls- und Batchversuchen, Metabolit A: 2,2'-(4,4'-dihydroxydiphenyl)-1-propanol, Metabolit B: Lacton der 2-(4-Hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1-propansäure, Metabolit C: 2-(4- Hydroxyphenyl)-3-hydroxy-1-propansäure, Metabolit D: 4-Hydroxyacetophenon, Metabolit E: 4-Hydroxybenzaldehyd.....	30
Abbildung 6: Abgebildet ist der Verlauf der ¹³ C/ ¹² C-Verhältnisse vom IC im Versuchszeitraum (Reaktor A), die daraus resultierende Anpassung, die aus der Anpassung resultierende ¹³ C ₁₂ -BPA-Äquivalentkonzentration und die abgeflossene ¹³ C ₁₂ - BPA-Menge (Integral über ¹³ C ₁₂ -BPA-Äquivalentkonzentration multipliziert mit der durchschnittlichen täglichen Abflussrate).....	31
Abbildung 7: ¹³ C/ ¹² C-Verhältnisse in δ ¹³ C ‰ im gebildeten CO ₂ in Abhängigkeit von der Versuchszeit im Batchversuch.....	34
Abbildung 8: Verlauf der O ₂ -Zehrung BPA-haltiger Lösungen nach Animpfung mit BPA be- und unbelasteten Reaktorwässern, sowie Leitungswasser.....	35
Abbildung 9: Die Abbildungen zeigen den Konzentrationsverlauf der tech. 4-NP und ¹³ C ₆ -4- <i>n</i> - NP-Konzentrationen während des Pulsexperiments. Der mit dargestellte Konzentrationsverlauf ohne jegliche Ww. erreicht am 20. Tag 98 µg/l.....	39
Abbildung 10: Die Abbildungen zeigen den Verlauf der ¹³ C-Signatur-Messwerte für IC, den Kurvenverlauf der angewendeten Anpassung, die daraus resultierende Funktion für die ¹³ C ₆ -4- <i>n</i> -NP-Äquivalente, sowie das Integral zur Quantifizierung.	41
Abbildung 11: Vergleich der Chromatogramme des Wurzelextraktes (gepunktet, obere Kurve) nach dem Versuchsende (6 Wochen nach dem Ende der Applikation von tech. 4-NP) mit verabreichten tech. 4-NP-Mix (schwarz, untere Kurve). Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.....	43
Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von E2 und E1 im Batchversuch mit und ohne <i>juncus effusus</i>	45

5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ergebnisse der Adsorptionsuntersuchungen (Wiederfindung in %)	10
Tabelle 2: GC/MS Geräteparameter der Standardprozedur zur Bestimmung von der ED	13
Tabelle 3: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen über das Gesamtverfahren - ermittelt anhand von Blindwertanalysen (Leitungswasser)	14
Tabelle 4: Nachweisgrenzen der ausgewählten ED für die manuelle SPME-GC/MS-Methodik	14
Tabelle 5: GC/MS-Bedingungen der automatisierten SPME-Variante	15
Tabelle 6: Untersuchte Analyten.	20
Tabelle 7: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der neu getesteten SPE-Disk Anreicherung und der bisher als Standardmethode genutzten Aufkonzentration über SPE-Kartuschen in ng pro Liter	22
Tabelle 8: Ergebnisse der Strömungsversuche	25
Tabelle 9: Übersicht über die ermittelten Austragsraten von $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA im $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA-Pulsversuch. Zum Vergleich sind Daten für die theo. Konzentrationen ohne jeglicher Wechselwirkung (Ww) und mit den jeweils angepassten Parametern k und τ_A dargestellt.	27
Tabelle 10: Übersicht über die Versuchsbedingungen und -ergebnisse beim $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA-Puls	29
Tabelle 11: Übersicht Reaktorkompartimente	32
Tabelle 12: Übersicht Bilanz $^{13}\text{C}_{12}$ -BPA	33
Tabelle 13: Ergebnisse der Untersuchungen zur reversiblen Adsorption von BPA an Biomasse	36
Tabelle 14: Übersicht über die Versuchsbedingungen und -ergebnisse beim $^{13}\text{C}_6$ -4- <i>n</i> -NP-Puls	38
Tabelle 15: Übersicht über die ermittelten Austragsraten von $^{13}\text{C}_6$ -4- <i>n</i> -NP im $^{13}\text{C}_6$ -4- <i>n</i> -NP-Pulsversuch. Zum Vergleich sind Daten für die theo. Konzentrationen ohne jeglicher Wechselwirkung (Ww) und mit den jeweils angepassten Parametern k und τ_A dargestellt.	40
Tabelle 16: Übersicht Reaktorkompartimente	42
Tabelle 17: Überblick über die Wiederfindungen an $^{13}\text{C}_6$ -4- <i>n</i> -NP nach dem Pulsexperiment. Für die Summe wurden die angegebenen Werte für $^{13}\text{C}_6$ -4- <i>n</i> -NP-Mengen im Abflusswasser und Schwebstoff nicht mit eingerechnet, da diese auch im Wasserrückstand enthalten sind.	43
Tabelle 18: Verfahrenstechnische Beschreibung der ausgewählten Kläranlagen	47
Tabelle 19: Teichkläranlage Neiden (Herbst 2000) - Angabe der im Ablauf gemessenen Konzentrationen	48

Tabelle 20: NP, BPA und EE2 im Zu- und Ablauf der Teichanlage A	50
Tabelle 21: NP, BPA und EE2 im Zu- und Ablauf der Teichanlage B	51
Tabelle 22: NP, BPA und EE2 im Zu- und Ablauf der Pflanzenkläranlage I.....	52
Tabelle 23: NP und BPA im Zu- und Ablauf der Pflanzenkläranlage II	53
Tabelle 24: NP und BPA im Zu- und Ablauf der Pflanzenkläranlage III (einstufig, nur Vertikalfilter.....	54
Tabelle 25: NP und BPA im Zu- und Ablauf der Pflanzenkläranlage III (zweistufig, Kombination von Vertikal- und Horizontalfilter)	55
Tabelle 26: Prozentuale Elimination von NP und BPA sowie ergänzende Angaben zur Ablaufqualität und zur jahreszeitlichen Zuordnung des Beprobungszeitraumes in den verschiedenen Anlagentypen.....	56

6 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Fasst man die umfangreichen analytisch-methodischen Untersuchungen zusammen, ergeben sich folgende nutzbare Resultate:

Für verschiedene Konzentrationsbereiche der Xenoestrogene stehen optimierte und validierte Nachweismethoden zur Verfügung.

Für Konzentrationen im $\mu\text{g/l}$ -Bereich kann ein automatisiertes on-line SPME-GC/MS Verfahren verwendet werden, das zudem lösemittelfrei und damit umweltfreundlich arbeitet. Außerdem können durch die Automatisierung größere Probeserien in relativ kurzer Zeit bearbeitet werden.

Diese Methode kann zur on-line Prozesskontrolle eingesetzt werden oder in Monitoring-Programmen für industrielle Abwässer.

Für den Nachweis im Bereich um 50 ng bis 1 μg lassen sich die Analyten gut mit einer membranunterstützten Flüssig-Flüssig-Extraktion erfassen, die auf Grund ihrer Miniaturisierung und Automatisierungsmöglichkeit den Verbrauch von Lösemitteln bei gleichzeitig hohem Probedurchsatz reduziert. Die Nachweisgrenzen für die untersuchten Analyten liegen dabei nahe an denen von SPE, werden aber mit wesentlich geringerem analytischen Aufwand ermöglicht.

1. Für den Nachweis extremer Analytspuren in einer komplexen Matrix muss wesentlich mehr Aufwand an Probenvorbereitung und Analytik getrieben werden und entsprechend ausgebildetes Personal zur Datenauswertung zur Verfügung stehen. Dann gelingt nach einer optimierten und validierten Prozedur, die aus SPE mit einem Mischadsorbens, einer Trimethylsilylierung und anschließender GC/MS besteht, der Nachweis von BPA, t-NP und EE2 im ng/l-Bereich selbst bei Anwesenheit hoher Matrixbelastung wie in den Zuläufen von Kläranlagen vorhanden.

Hinsichtlich der Anlagenbeprobung ergibt sich die Erkenntnis, dass lange hydraulische Verweilzeiten, eine hohe Biomassekonzentration, eine effektive Biomasseretention und eine ausreichende Sauerstoffversorgung einen positiven Einfluss auf die Retention/Elimination von NP und BPA haben.

7 Erkenntnisfortschritt bei anderen Stellen

Bei BPA sind bezüglich des Abbaus und der Verfahrenstechnik uns keine wesentlichen Fortschritte bei anderen Forschungseinrichtungen bekannt geworden.

Bei NP können derzeit verstärkte Forschungsaktivitäten bezüglich des Verhaltens einzelner NP-Isomere beobachtet werden. Dabei wird versucht die relevanten endokrin wirksamen NP-Isomere zu identifizieren und deren Verhalten bei der Abwasserklärung zu aufzuschlüsseln. Nach Berichten von Tanghe et al. (1998 und 1999) und Fujii et al. (2000a, 2000b und 2001) konnte der mikrobielle Abbau von NP belegt und dafür befähigte Stämme isoliert werden. Bei Arbeiten zu den einzelnen NP-Isomeren ist insbesondere das Aachener Graduiertenkolleg zur Eliminierung endokrin wirksamer Substanzen aus dem Abwasser (AGEESA) mit einer Vielzahl von Forschungsthemen zu nennen.

8 Veröffentlichungen

8.1 Aufsätze

- Braun, P., Moeder, M., Schrader, S., Popp, P., Kusch, P., Engewald, W. 2003. Trace analysis of technical nonylphenol, bisphenol A and 17 alpha-ethinylestradiol in wastewater using solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 988 (1), 41-51
- Kusch, P., Braun, P., Möder, M., Wießner, A., Müller, J., Kästner, M., Müller, R.A. 2003. Elimination von Nonylphenolen und Bisphenol A in Teich- und Pflanzenkläranlagen. *GWF Wasser Abwasser* 144(4), 297-301

8.2 Vorträge

- P. Wild, M. Moeder, „Solvent Free Extraction (SPME) Compared to Currently Used Procedures for the Determination of Endocrine Disrupting Compounds“, Analytical Workshop on Endocrine Disruptors, 17-18 July 2000, Dresden
- P. Wild, M. Moeder, „Nachweis von endokrin wirksamen Substanzen in Abwässern mittels SPME- GC/MS“, Agilent Anwendertreffen, 29-30 November 2000, Fulda
- P. Wild, M. Moeder, „Vergleich von SPME-GC/MS und SPE-„LVI“-GC/MS zum Nachweis von endokrin wirksamen Substanzen in Abwässern“, Seminar an der Universität Leipzig, 2001
- V. Speer, M. Möder, J. Müller, M. Kästner, „Verhalten von Bisphenol A in einem Laborpflanzenreaktor“, Workshop on Endocrine Disruptors, TU Dresden, 2002
- S. Müller, M. Möder, „On-line membranunterstützte Mikroextraktion-GC-MS von endokrin aktiven und pharmazeutischen Verbindungen aus Wässern“, Workshop on Endocrine Disruptors, TU Dresden, 2002
- Kusch, P. et al.; Rolle von Pflanzen und Mikroorganismen und deren Wechselwirkung bei der Abwasserreinigung in Pflanzenkläranlagen; Vortrag; Workshop: Passive Wasserbehandlungssysteme für kontaminierte Industrie- und Grundwässer; 16. Mai 2002 in Leipzig
- Stottmeister, U. et al., On the role of plants and microorganisms for wastewater treatment in constructed wetlands; oral presentation; VI. International Symposium on Environmental Biotechnology, IV. International Symposium on Cleaner Bioprocesses and Sustainable Development, Veracruz, Mexico, 9.-12. June 2002

- Moeder, M. Schrader, S., Braun, P., Mueller, S., Speer, V., Martin, C., Wennrich, L., Popp, P., „Advance in Solvent Reduced and Solvent free Extraction and Analysis of Endocrine Disrupting Compounds and Pharmaceutical Residues from Water Samples”, International Conference on Extraction Techniques “Extech 2002”, Paris

8.3 Poster

- P. Wild, M. Moeder, St. Schrader, P. Kusch, W. Engewald, „Trace Analysis of technical Nonylphenol, Bisphenol A and 17 α - Ethinylestradiol in Wastewater using SPME-GC/MS in Comparison with SPE coupled to LVI-GC/MS“ 23rd International Symposium on Chromatography, 1-5 October, London
- P. Wild, M. Moeder, St. Schrader, P. Kusch, W. Engewald, „Trace Analysis of technical Nonylphenol, Bisphenol A and 17 α - Ethinylestradiol in Wastewater using SPME-GC/MS“ 18. Agilent Forum Analytik, 23-24 January, Wien
- J. Müller, K. Pietzsch, M. Möder, U. Kappelmeyer, P. Kusch, H. Wand and M. Kästner “Microbial degradation of Bisphenol A in a Planted Fixed Bed Reactor (PFR)“, VAAM-Jahrestagung 2002. 24-27 March, Göttingen
- J. Müller, G. Vacca, U. Kappelmeyer, P. Kusch and M. Kästner, „Microbial degradation of 4-nonylphenols in a Planted Fixed Bed Reactor (PFR)“, VAAM-Jahrestagung 2003. 23-26 March, Berlin
- geplant: Poster zu 4-Nonylphenol/BPA auf EU-Project POSEIDON; Symposium in Braunschweig; Nov 4-5, 2003

8.4 Geplante Aufsätze:

- Elimination of nonylphenols and bisphenol A in ponds and constructed wetlands for sewage treatment
- Microbial degradation of Bisphenol A in a Planted Fixed Bed Reactor (PFR)
- Microbial degradation of 4-nonylphenols in a Planted Fixed Bed Reactor (PFR)

- *Sphingomonas* sp. und *Variovorax paradoxus*, Bisphenol A-degrading bacteria isolated from Planted Fixed Bed Reactors (PFR) for lab-scale wastewater treatment
- P. Braun, M. Moeder, St. Schrader, W. Engewald, "Simultaneous determination of endocrine disruptors and pharmaceutical residues in water samples by gas chromatography negative chemical ionisation mass spectrometry", submitted to J. Chromatogr. A

9 Anhang

Anlagenbeprobung von Teich- und Pflanzenkläranlagen - Materialsammlung

9.1 Teichanlage A

Beschreibung der Anlage

Lage: Landkreis Torgau-Oschatz; Land Sachsen

Zulaufmenge: von ca. 500 Einwohnern; keine Industrie

Aufbau: 4 Erdbecken (jeweils 1-1,5 m tief) in Reihe geschaltet

1. Grobrechen
 2. Absetzbecken (7m x 22m; entspricht 154 m²)
 3. Teich A (21m x 51m; entspricht 1071m²)
 4. Teich B (27 m x 78m; entspricht 2108 m²)
 5. Teich C (30 m x 91m; entspricht 2730 m²)
- Somit ergeben sich ca. 12 m² Teichfläche pro Einwohnergleichwert

Hydraulische Verweilzeit:

(Gesamtvolumen: 6063 m³; 100 L pro Einwohnergleichwert)

theoret. hydraul. Verweilzeit: ca. 121 Tage

Tabelle A1: Ergebnisse der Teichkläranlagenbeprobung vom 12.10.1999.

Ethinylestradiol konnte mit der verwendeten Methode in keiner der untersuchten Proben nachgewiesen werden. Während sowohl t-NP als auch BPA in allen Zulaufproben nachweisbar waren, lagen ihre Konzentration im Ablauf stets unterhalb der Nachweisgrenze, die bei der hier verwendeten PA-Faser 1,3 µg/L für t-NP und 1,1 µg/L für BPA betrug.

Parameter	Zulauf	Ablauf
pH		7,7
Abfiltrierbare Stoffe (mg/l)		3,0
CSB (mg/l)		105
Nitrit-N (mg/l)		0,3
Nitrat-N (mg/l)		2,5
Ammonium-N (mg/l)		1,4
BSB ₅ (mg/l)		15
Sulfid (H ₂ S) (mg/l)		0,01
Bisphenol A (µg/l)		
Nonylphenole (µg/l)	0	0
17-alpha-Ethinylestradiol (µg/l)	Spur	0

Tabelle A 2: Ergebnisse der Teichkläranlagenbeprobung nach Festphasen-Mikroextraktion und GC/MS-Analyse – Angabe der im Zulauf gemessenen Konzentrationen [µg/l]

Tag/Datum	t-NP	BPA
So-Mo/3.-4.9.2000	< NWG	6,8
Mo-Di/11.-12.9.2000	3,1	9,0
Di-Mi/29.-30.8.2000	2,5	7,5
Mi-Do/20.-21.9.2000	2,4	8,9
Do-Fr/5.-6.10.2000	1,6	5,6
Fr-Sa/6.-7.10.2000	1,4	3,4
Sa-So/7.-8.10.2000	2,1	6,3
Mittelwert	2,2 (nur 6 Werte)	6,8

Tabelle A3: Ergebnisse der Teichkläranlagenbeprobung nach Anreicherung mittels SPE – Angabe der im Ablauf gemessenen Konzentrationen

Tag/Datum	t-NP [ng/l]	BPA [ng/l]	EE2 [ng/l]
So-Mo/3.-4.9.2000	1313	25	4
Mo-Di/11.-12.9.2000	ü. ²⁾	< NWG ³⁾	4
Di-Mi/29.-30.8.2000	627	"	< NWG
Mi-Do/20.-21.9.2000	826	"	"
Do-Fr/5.-6.10.2000	657	"	"
Fr-Sa/6.-7.10.2000	1120	"	"
Sa-So/7.-8.10.2000	876	"	"
Mittelwert (6 Werte)	903		
²⁾ : ü.= überlagert; ³⁾ : < NWG= unterhalb der Nachweisgrenze			

Tabelle A4: Allgemeine Probencharakterisierung der Teichanlage A - Zulaufparameter

Datum	BSB₅ [mg/l]	Nitrat [mg/l]	Nitrit [mg/l]	Ammonium [mg/l]	PO₄³⁻ [mg/l]	pH
Zuläufe						
29-30.08.00 Di-Mi	318	0,1	0,5	73	22,7	7,4
03-04.09.00 So-Mo	73	6,3	4,5	26	7,7	6,9
11-12.09.00 Mo-Di	262	0,1	0,2	81	24	6,9
20-21.09.00 Mi-Do	Nicht bestimmt	n.w.	n.w.	87,8	51,9	7,2
05-06.10.00 Do-Fr	505	n.w.	n.w.	112	32,7	6,7
06-07.10.00 Fr-Sa	218	n.w.	n.w.	71,5	23,8	7,1
07-08.10.00 Sa-So	158	10,2	n.w.	40,6	12,2	7,5

Tabelle A5: Allgemeine Probencharakterisierung der Teichanlage A - Ablaufparameter

Datum	BSB5 (mg/L)	Nitrat (mg/L)	Nitrit (mg/L)	Ammonium (mg/L)	PO ₄ ³⁻ (mg/L)	pH	Gelöst O ₂ (mg/L)	Temp. (°C)	Aussehen	sonstiges
Abläufe										
29.08.00 Dienstag	6,5	0,2	n.w.	25	7,7	6,5	4,1	18	Klar gelblich	Daphnien
30.08.00 Mittwoch	3,5	0,2	n.w.	21	9,4	7,2	3,7	18	Klar gelblich	Daphnien
03.09.00 Sonntag	14,6	0,2	n.w.	19	7,7	6,6	4,0	18	Gelb.grünlich	Daphnien, in der Nacht hatte es geregnet
04.09.00 Montag	11,6	0,1	n.w.	18	8,8	6,7	4,0	16		
11.09.00 Montag	8,2	0,4	0,2	18	11	6,8	3,7	20	Leicht trüb gelblich	Daphnien u. Larven
12.09.00 Dienstag	3,7	0,3	n.w.	20	10	7,0	5,2	18	Trüb, schwach gelblich	Daphnien
20.09.00 Mittwoch	3,0	0,5	n.w.	22,2	14,4	7,2	6,4	12	Schwach gelblich	Daphnien
21.09.00 Donnerstag	3,0	1,5	n.w.	20,9	21	7,2	7,1	11	Schwach gelblich	Daphnien
06.10.00 Freitag	6,3	0,7	n.w.	18,1	6,3	5,6	4,2	15,6	Schwach gelblich	2-4 Daphnien pro Liter
07.10.00 Sonnabend	4,0	0,8	n.w.	18,8	5,6	7,1	4,8	13,2	Schwach gelb-braun	Regen
08.10.00 Sonntag	6,1	1,1	n.w.	18,0	6,3	6,9	4,9	12	Gelblich, schwach trüb	Regen

9.2 Teichkläranlage B

Beschreibung der Anlage

Lage: Land Sachsen

Zulaufmenge: von ca. 270 (400) Einwohnern; keine Industrie

Aufbau:

Rechen

1. belüfteter Rundteich, 22 m Durchmesser
2. belüfteter Rundteich, 12 m Durchmesser
3. Schönungsteich, 5 m x 17 m

Tabelle A6: Endokrine Substanzen im Zulauf der Teichkläranlage B

Datum	t-NP [$\mu\text{g/l}$]	BPA [$\mu\text{g/l}$]	EE2 [$\mu\text{g/l}$]
25/26.4.	3,17	1,03	nn
26/27.4.	1,44	0,97	nn
27/28.4.	nn	0,10	nn
28/29.4.	6,79	0,95	nn
29/30.4.	2,51	nn	nn
30.4./1.5.	1,30	0,86	nn
01-02.05.	7,17	0,80	0,37
Mittelwert	3,20	0,673	

nn: nicht nachweisbar bis NG von 10 ng/l

Tabelle A7: Endokrine Substanzen im Ablauf der Teichanlage B

Datum	t-NP [$\mu\text{g/l}$]	BPA [$\mu\text{g/l}$]	EE2 [$\mu\text{g/l}$]
25.4.	0,81	0,31	0,42
26.4.	1,39	0,31	nn
27.04.	0,83	0,31	nn
28.4.	1,38	0,3	0,48
29.4.	1,51	0,3	0,26
30.4.	2,18	0,23	0,48
1.5.	1,37	0,45	0,53
Mittelwert	1,353	0,316	
Eliminierung (%)	57,7	53,0	

nn: nicht nachweisbar bis NG von 10 ng/l

Tabelle A8: Teichanlage B - Zulaufparameter

Datum	BSB ₅ [mg/l]	Nitrat [mg/l]	Nitrit [mg/l]	Ammonium [mg/l]	PO ₄ ³⁻ [mg/l]
Zuläufe					
25/26.4.	73				
26/27.4. Fr-Sa	116	0,3	0,5	74,0	27,7
27/28.4. Sa-So	109	0,8	0,5	75,5	30,2
28/29.4. So-Mo	135	1,0	0,5	74,3	25,0
29/30.4. Mo-Di	160	n.n.	0,4	76,3	21,8
30.4./1.5. Di-Mi	162	0,4	n.n.	80,8	25,4
1./2.5. Mi-Do	140	0,1	0,3	77,0	22,0

Tabelle A9: Teichanlage B - Ablaufparameter

Datum	BSB ₅ [mg/l]	Nitrat [mg/l]	Nitrit [mg/l]	Ammonium [mg/l]	PO ₄ ³⁻ [mg/l]	pH	Gelöst O ₂ [mg/l]	Temp. (°C)	Aussehen
Abläufe									
25.4. Do	16	89,5	10,5	0,3	28,3	5,74	3,8	12,5	Gelb-grün trüb
27.4. Sa	55	108,1	9,4	42	30,2	6,86	1,9	12,1	Gelb-grün trüb
28.4. So		98,3	7,7	44,6	27,1	6,99	2,4	11,6	Gelb-grün trüb
29.4. Mo	34	114,3	7,9	40,3	30,9	6,92	3,7	11,2	Gelb-grün trüb
30.4. Di	49	114,0	6,7	38,2	29,0	6,96	2,6	10,8	Gelb-grün trüb
1.5. Mi	37	128,6	7,0	36,8	28,6	6,81	4,9	11,2	Gelb-grün trüb

9.3 Pflanzenkläranlage I

Beschreibung der Anlage

Lage: Landkreis Delitzsch ; Land Sachsen

Zulaufmenge: von ca. 120 Einwohnern; keine Industrie

Aufbau:

Dreikammergrube 36 m³

Vertikalsystem mit Schilfbestand; 272 m² Beetfläche; ca. 1/3 des Ablaufes wird in die Dreikammergrube zurückgeführt

Hydraulische Verweilzeit:

hydraul. Verweilzeit - Erfahrungswert von 1,3-1,5 Tage (2,27 m² pro Einwohnerequivalent; bei 100 l pro Einwohnerequivalent: ca. 44 l pro m² und Tag)

Tabelle A10: Endokrine Substanzen im Zu- und Ablauf der Pflanzenkläranlage I

	t-NP [$\mu\text{g/l}$]	BPA [$\mu\text{g/l}$]	EE2 [$\mu\text{g/l}$]
Ion	207	357	285
Zulauf 06.6.01 SPE	1,22	5,99	0,28
Zulauf 09.6.01 SPE	1,23	7,22	0,33
Zulauf 10.6.01 SPE	1,62	7,67	0,42
Zulauf 11.6.01 SPE	2,33	4,23	0,29
Zulauf 12.6.01 SPE	2,61	4,95	0,21
Zulauf 14.6.01 SPE	1,77	7,15	0,25
Zulauf 15.6.01 SPE	1,79	8,40	0,10
Mittelwert	1,80 +/- 0,52	6,52 +/- 1,51	0,27 +/- 0,10
Ablauf 05.6.01 SPE	0,01	0,05	nn
Ablauf 06.6.01 SPE	0,06	2,02	nn
Ablauf 08.6.01 SPE	0,14	0,21	nn
Ablauf 09.6.01 SPE	0,05	0,16	nn
Ablauf 10.6.01 SPE	0,11	0,08	nn
Ablauf 11.6.01 SPE	0,16	2,85	nn
Ablauf 14.6.01 SPE	0,10	0,08	nn
Mittelwert	0,09 +/- 0,05	0,78 +/- 1,16	
Eliminierung (%)	95	88	

nn nicht nachweisbar bis NG von 10 ng/l

Tabelle A11: Pflanzenkläranlage I -Zulaufparameter

Datum	BSB₅ [mg/l]	Nitrat [mg/l]	Nitrit [mg/l]	Ammonium [mg/l]	PO₄³⁻ [mg/l]	pH
05/06.06.01 Di-Mi	101	1	n.w.	38	15	7,5
08/09.06.01 Fr-Sa	113	n.w.	n.w.	59	15	7,4
09/10.06.01 Sa-So	148	n.w.	n.w.	60	19	7,6
10/11.06.01 So-Mo	117	n.w.	n.w.	53	15	7,5
11/12.06.01 Mo-Di	174	n.w.	n.w.	64	24	7,9
13/14.06.01 Mi-Do	127	n.w.	0,2	74	32	7,6
14/15.06.01 Do-Fr						7,6

Tabelle A12: Pflanzenkläranlage I – Ablaufparameter

Datum	BSB ₅ (mg/l)	Nitrat (mg/l)	Nitrit (mg/l)	Ammonium (mg/l)	PO ₄ ³⁻ (mg/l)	pH	Gelöst O ₂ (mg/l)	Temp. (°C)	Aussehen	sonstiges
05.06.01 Di	3,9	139	n.w.	2	12	6,2	4,5	14	Klar, schwach gelblich	
06.06.01 Mi	2,5	150	n.w.	n.w.	22	6,0	4,3	14	Klar, schwach gelblich	
08.06.01 Fr	7,6	152	n.w.	1	10	6,1	5,2	13	Klar, schwach gelblich	Regen
09.06.01 Sa	2,8	147	n.w.	1	10	6,2	3,7	14	Klar, schwach gelblich	
10.06.01 So	12,8	237	n.w.	1	13	6,1	2,8	13	Klar, schwach gelblich	Regen
11.06.01 Mo	4,4	168	n.w.	1	11	6,0	3,7	13	Klar, schwach gelblich	
14.06.01 Do	5,8	235	0,1	0,4	15	6,1	3,5	15	Klar, schwach gelblich	

9.4 Pflanzenkläranlage II

Beschreibung der Anlage

Lage: Kreis Leipziger Land; Land Sachsen

Zulaufmenge: von ca. 300 Einwohnern (CSB 400-1500; Wassermenge 2000-3000);
Industrie (Wurstfabrik)

Aufbau:

- Rechen
- Schwebebettbiologie
- Dreikammerklärgrube
- Pflanzenbeete Vertikalsystem mit Schilfbestand; 3960 m² Fläche
- Regenrückhaltebecken (war zum Probenahmezeitpunkt nicht in Nutzung)

Tabelle A13: Endokrine Substanzen im Zu- und Ablauf der Pflanzenkläranlage II

	t-NP [$\mu\text{g/l}$]	BPA [$\mu\text{g/l}$]	EE2 [$\mu\text{g/l}$]
Ion	207	357	285
Zulauf 31.10.01 SPE	1,10	3,83	0,66
Zulauf 01.11.01 SPE	0,73	3,66	0,21
Zulauf 02.11.01 SPE	0,78	1,73	nn
Zulauf 03.11.01 SPE	0,70	1,98	0,37
Zulauf 04.11.01 SPE	0,77	1,52	0,40
Zulauf 05.11.01 SPE	0,80	1,19	nn
Zulauf 20.11.01 SPE	0,80	1,01	nn
Mittelwert	0,81 +/- 0,13	2,13 +/- 1,15	
Ablauf 30.10.01 SPE	0,48	0,45	<0,05
Ablauf 31.10.01 SPE	0,39	0,27	<0,05
Ablauf 02.11.01 SPE	0,52	0,23	<0,05
Ablauf 03.11.01 SPE	0,33	0,27	<0,05
Ablauf 04.11.01 SPE	0,40	0,29	<0,05
Ablauf 05.11.01 SPE	0,10	0,05	<0,05
Mittelwert	0,43 +/- 0,09	0,31 +/- 0,10	
Eliminierung (%)	47	85	

nn nicht nachweisbar bis NG von 10ng/l

Tabelle A 14: Tabelle A15: Pflanzenkläranlage II – Zulaufparameter

Datum	BSB ₅ (mg/l)	Nitrat (mg/l)	Nitrit (mg/l)	Ammonium (mg/l)	PO ₄ ³⁻ (mg/l)	pH	sonstiges
30/31.10.01 Di-Mi	55	0,1	n.w.	39	39	7,8	Sulfat 341 Cl >400 Na >390 mg/l
31.10.-01.11.01 Mi-Do	58	0,2	n.w.	40	24	7,6	Sulfat 343 Cl > 400 Na > 390 mg/l
01/02.11.01 Do-Fr	60	n.w.	0,1	33	26		Sulfat Cl 431 Na ca. 390 mg/l
02/03.11.01 Fr-Sa	60	n.w.	n.w.	33	21	7,6	Sulfat 279 Cl 408 Na >390 mg/l
03.11.-04.11.01 Sa-So	55	0,2	n.w.	38	13	7,5	Sulfat 344 Cl 391 Na > 390 mg/l
04.11.-05.11.01 So-Mo	45	1,0	n.w.	44	17	7,6	Sulfat 370 Cl 310 Na > 390 mg/l
19.11.-20.11.01 Mo-Di	40	n.w.	n.w.	35	18	8,2	Sulfat 203 Cl 297 Na 214mg/l

Tabelle A16: Pflanzenkläranlage II – Ablaufparameter

Datum	BSB ₅ (mg/l)	Nitrat (mg/l)	Nitrit (mg/l)	Ammonium (mg/l)	PO ₄ ³⁻ (mg/l)	pH	Gelöst O ₂ (mg/l)	Temp. (°C)	Aussehen	sonstiges
30.10.01 Di	<1	84	0,9	7,4	1,0	6,2	4,7	15	Klar, schwach gelblich	Sulfat 468 Cl 389 Na 373 mg/l
31.10.01 Mi	5,5	59	0,7	8,9	5,6	6,9	5,1	14	Klar, schwach gelblich	Sulfat 520 Cl 404 Na >390 mg/l
01.11.01 Do	<1	155	0,1	1,4	4,6	6,7	5,9	14	Klar, schwach gelblich	Sulfat 409 Cl 441 Na >390 mg/l
02.11.01 Fr	3,8	86	1,2	8,7	8,8	6,5	5,4	14	Klar, schwach gelblich	Sulfat 429 Cl 414 Na 389 mg/l
03.11.01 Sa	6,0	59	n.w.	8,8	1,4	6,8	5,6	14	Klar, schwach gelblich	Sulfat 461 Cl 388 Na >390 mg/l
04.11.01 So	1,0	44	n.w.	9,1	2,4	6,9	5,2	14	Klar, schwach gelblich	Sulfat 383 Cl 361 Na > 390 mg/l
05.11.01 Mo	2,0	217	n.w.	n.w.	3,8	6,9	5,0	14	Klar, schwach gelblich	Sulfat 443 Cl 406 Na >390 mg/l

9.5 Pflanzenkläranlage III

(Vertikalbecken 5a)

Beschreibung der Anlage

Lage: Gemeinde Langenreichenbach; Landkreis Torgau-Oschatz; Land Sachsen
Zulaufmenge: von ca. 6000 Einwohnern; zusätzlich Abwässer eines Schlachthofes mit ca. 2000 Einwohnergleichwerte

Aufbau:

- Rottefilter
- Vertikalbecken; Sand als Filtermaterial; Schilf (spärlicher Bewuchs)

Beschickung 40 mm pro Tag

Hydraul. Verweilzeit: 1,3 bis 1,5 Tage

Tabelle A17: Endokrine Substanzen im Zulauf der Pflanzenkläranlage III (Vertikalbecken 5a)

Datum	t-NP [$\mu\text{g/l}$]	BPA [$\mu\text{g/l}$]	EE2 [$\mu\text{g/l}$]
13/14.02.02	2,99	2,57	0,16
14/15.02.02	5,45	0,24	nn
15/16.02.02	4,05	nn	0,81
16/17.02.02	1,93	1,16	0,85
17/18.02.02	0,50	1,24	0,28
18/19.02.02	0,41	1,54	0,79
19/20.02.01	nn	1,05	0,29
Mittelwert	2,19	1,12	

nn: nicht nachweisbar bis NG von 10 ng/l (bei nn wurde der Wert 0,009 $\mu\text{g/l}$ gerechnet)

Tabelle A18: Endokrine Substanzen im Ablauf der Pflanzenkläranlage III (Vertikalbecken 5a)

Datum	t-NP [$\mu\text{g/l}$]	BPA [$\mu\text{g/l}$]	EE2 [$\mu\text{g/l}$]
13.02.02	0,33	0,09	nn
14.02.02	0,31	0,12	0,12
15.02.02	0,57	0,09	0,3
16.02.02	0,34	0,08	nn
17.02.02	0,16	0,08	0,1
18.02.02	0,44	0,1	nn
19.02.01	0,45	0,12	nn
Mittelwert	0,37	0,097	
Eliminierung (%)	82,8	91,3	

nn: nicht nachweisbar bis NG von 10 ng/l

Tabelle A19: Pflanzenkläranlage III – Becken 5a - Zulaufparameter

Datum	BSB ₅ [mg/l]	Nitrat [mg/l]	Nitrit [mg/l]	Ammonium [mg/l]	PO ₄ ³⁻ [mg/l]	pH	Gelöst O ₂ [mg/l]	Temp. (°C)
13/14.02.02 Mi-Do	265	0,4	-	47	11,1	7,6	0	9,9
14/15.02.02 Do-Fr	152	0,1	-	50	17,4	7,6	0	9,4
15/16.02.02 Fr-Sa	210	0,3	0,1	52	15,3	7,6	0	9,0
17.02.02 So	220	0,8	-	44	10,8	7,6	0	8,8
18.02.02 Mo	250	0,1	-	78	13,9	7,7	0	8,3
19.02.02 Di	240	0,3	-	67	11,5	7,8	0	9,8
20.02.02 Mi	285	0,1	-	61	14,8	8,0	0	9,1

Tabelle A20: Pflanzenkläranlage III – Ablaufparameter

Datum	BSB ₅ [mg/l]	Nitrat [mg/l]	Nitrit [mg/l]	Ammonium [mg/l]	PO ₄ ³⁻ [mg/l]	pH	Gelöst O ₂ [mg/l]	Temp (°C)	Aussehen
13.02.02 Mi	5,3	260	-	-	12,1	6,1	7,0	7,5	Klar, schwach gelblich
14.02.02 Do	<1	254	-	-	13,2	6,2	7,2	6,9	Klar, schwach gelblich
15.02.02 Fr	<1					6,2	6,8	6,3	Klar, schwach gelblich
16.02.02 Sa	<1	247	0,2	-	14,9	6,1	6,3	5,9	Klar, schwach gelblich
17.02.02 So	1	221	0,1	-	13,6	6,1	5,6	5,7	Klar, schwach gelblich
18.02.02 Mo	1	234	0,3	-	13,1	6,2	5,5	5,4	Klar, schwach gelblich
19.02.02 Di	4	229	0,4	-	13,0	6,3	5,2	5,2	Klar, schwach gelblich