

Bildung organischer Bromverbindungen in  
Oberflächengewässern sowie Studien zum Verhalten  
während der Uferfiltration

vorgelegt von  
Diplom Lebensmittelchemiker  
Alexandra Hütteroth  
aus Berlin

Von der Fakultät III - Prozesswissenschaften  
der Technischen Universität Berlin  
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften  
– Dr. rer. nat. –

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzende: Prof. Dr. rer. nat. Sabine Enders  
Berichter: Prof. Dr.-Ing. Martin Jekel  
Berichter: Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Rotard

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 4. Dezember 2006

Berlin 2006

D 83



Darin besteht das Wesen der Wissenschaft. Zuerst denkt man an etwas, das wahr sein könnte. Dann sieht man nach, ob es der Fall ist und im allgemeinen ist es nicht der Fall.

Bertrand Russell



## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2002 bis Oktober 2006 am Fachgebiet Wasserreinhalte im Institut für Technischen Umweltschutz der TU Berlin durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Martin Jekel für seine vorbehaltlose Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und speziell für die, trotz Termindruck, schnelle Terminfindung für die Aussprache.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Anke Putschew für die umfangreiche Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima bedanken. Die letzten vier Jahre waren ein wichtiger Abschnitt in meinem Leben, indem Anke einen besonderen Platz einnimmt.

Prof. Wolfgang Rotard danke ich für die Begutachtung der Arbeit und Prof. Sabine Enders für die spontane Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Der wichtigste Mensch in meinem Leben ist Joachim Hütteroth, der mich sowohl im Studium aber auch ganz besonders während der Promotion moralisch stark unterstützt hat. Unser kleiner Sohn Konrad hat für Abwechslung gesorgt und so die Arbeit auch mal vergessen lassen.

Meiner Familie gilt ein besonderer Dank für die Motivation im Studium und während der Promotion. Meine Eltern Michael Rehfeldt und besonders Helga-Marie Rehfeldt sind mir wichtige Vorbilder ohne die ich es nie so weit gebracht hätte. Durch die angenehme Konkurrenz mit meiner Schwester Tatjana aber auch meinem Bruder Thomas habe ich mehr erreicht als ich zu träumen gewagt hätte.

Ich möchte ganz herzlich den studentischen Mitarbeitern Ina Engel und Andreas Hauptvogel danke, die im Rahmen einer Projektarbeit die Ergebnisse der Bodensäulenversuche lieferten. Weiterhin gilt mein Dank Manuela Vogel für die intrazelluläre Differenzierung der Bromspezies, die sie im Zuge einer Diplomarbeit untersucht hat. Viele weitere studentische Hilfskräfte und Praktikanten waren an der Laborarbeit beteiligt, von denen ich nur einige nennen möchte: Verena Niggeloh, Nils Meyer, Ines Bewersdorff, Luisa Petri und David Kutzner. Ein besonderes Dankeschön an Giesela Sosna und Katrin Noak für die fleißigen und nicht enden wollenden AOB-Messungen.

Dem Arbeitskreis der Wasserreinhalte möchte ich für die sehr angenehme und offene Arbeitsatmosphäre sowie die stets freundschaftliche Unterstützung danken. Fleißige Korrekturleser waren meine Eltern, Joachim Hütteroth und Hannelore Meingast.

Das Forschungsprojekt wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (PU 199/2-1; 2-2) und dem Berliner Programm zur Förderung der Chancengleichheit für Frauen in Forschung und Lehre finanziell unterstützt.



## PUBLIKATIONEN

### Vorträge:

**Hütteroth A, Putschew A, Mania M, Jekel M.** Cyanobakterien: Die Quelle für bromorganische Substanzen in Oberflächengewässern? *Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Fachgruppe in der GDCh*, Bad Sarrow, Germany, 17.-19. Mai 2004, ISBN 3-936028-24-9.

**Hütteroth A, Jekel M, Putschew A.** Selectiv detection of unknown organic bromine compounds by negative-ion electrospray ionization mass spectrometry with induced in-source fragmentation. *34<sup>th</sup> International Symposium on Environmental Analytical Chemistry ISEAC34*, Hamburg, Germany, June 48 2006.

### Poster:

**Hütteroth A, Putschew A, Jekel M.** Algae form brominated organic compounds in surface waters; *24<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Polutants and POPs* (2004), **Ana4\_02**, CD-ROM ID:042.

**Hütteroth A, Putschew A, Jekel M.** Natürlich gebildete organische Bromverbindungen: Selektive Detektion und Strukturinformationen mittels ESI negativ Ionisierung nach induzierter in-source Fragmentierung, 72. Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Fachgruppe in der GDCh, Celle, Germany, 22.-24. Mai 2006, ISBN 3-936028-39-7.

### Veröffentlichungen:

**Hütteroth A, Putschew A, Jekel M.** Selective Detection of Unknown Organic Bromine Compounds and Quantification Potentiality by Negative-Ion Electrospray Ionisation Mass Spektrometrie with Induced In-source Fragmentation. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. (accepted for publication).

**Hütteroth A, Putschew A, Jekel M.** Natural Production of Organic Bromine Compounds in Berlin Lakes. *Environ. Sci. Technol.* (submitted).



## ZUSAMMENFASSUNG

In Oberflächengewässern in Berlin wurden über mehrere Jahre erhöhte Konzentrationen an organischen Bromverbindungen (OBr), bestimmt als adsorbierbare organische Bromverbindungen (AOBr), gemessen. Die erhöhten Konzentrationen sind im Spätsommer detektierbar. Es wird vermutet, dass die bromierten Verbindungen in den Seen gebildet werden. Die Bildung natürlicher OBr ist aus dem marinen Bereich bekannt, aber im Süßwasserbereich noch unerforscht. Süßwasser ist nicht nur für die Freizeitgestaltung von Bedeutung, sondern auch für die Trinkwasserversorgung. In Berlin wurden im Grundwasser (> 50 % aus Uferfiltrat) AOBr-Gehalte detektiert.

Das Hauptziel dieser Arbeit ist, die Bildungsursache bzw. den -mechanismus der bromorganischen Verbindungen in Oberflächengewässern zu klären. Die OBr sollen charakterisiert und das Verhalten bei der Uferfiltration untersucht werden.

Die durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass der AOBr in Oberflächengewässern autochthon ist. Die AOBr-Bildung wird durch phototrophe Organismen beeinflusst. Die höchsten AOBr-Konzentrationen werden nach dem Absterben der Biomasse gemessen. Die AOBr-Bildung ist nicht auf stark anthropogen beeinflusste Gewässer beschränkt. Stress wie Nährstoffmangel sowie Wasserstoffperoxid führen zu einer erhöhten AOBr-Produktion. Phototrophe Organismen lagern Bromid in ihre Zelle ein und verbrauchen diesen zum Teil für eine intrazelluläre OBr-Bildung. Das eingelagerte Bromid wird von den lebenden Organismen auch wieder abgegeben. Nach dem Absterben findet eine Freisetzung von intrazellulärem OBr und Bromid statt, wobei zusätzlich eine extrazelluläre AOBr-Bildung beginnt. Ob der Hauptanteil des AOBr intra- oder extrazellulär gebildet worden ist, hängt von den Wachstumsbedingungen ab. Insbesondere der festgestellte  $H_2O_2$ -Einfluss zeigt, dass der AOBr durch Haloperoxidasen gebildet wird. Für eine enzymatische Bildungsreaktion ist die Anwesenheit von Bromid, natürlichem organischem Material und  $H_2O_2$  notwendig, welche in dem Bereich der Oberflächenwasserschicht detektiert werden.

Bei den AOBr-Verbindungen handelt es sich um nichtflüchtige polare Substanzen. Einzelstoffe wurden durch die Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) anhand charakteristischer Bromisotopenmuster detektiert. Dibromessigsäure, Bromchloroessigsäure und 4-Brom-3-nitrobiphenyl konnten detektiert werden. Viele weitere Verbindungen waren zu erkennen, aber eine nähere Charakterisierung war nicht möglich, auf Grund der geringen Konzentration und der hohen Matrix.

Für die selektive Detektion von organischen Bromverbindungen wurde eine bromspezifische LC-MS-Methode etabliert. Mit Hilfe dieses Detektionsverfahrens konnten bis zu 31 Verbindungen detektiert werden. Weitere Informationen zu den Verbindungen wurden durch LC-MS-Messungen im scan-Modus erhalten, sodass der Halogenierungsgrad der Verbindungen bestimmt werden konnte. Demnach sind die 31 Verbindungen einfach bis dreifach bromiert und oft zusätzlich einfach bis zweifach chloriert.

Versuche an Laborbodensäulen haben gezeigt, dass es zu einer 100%igen Eliminierung/Transformation der algenproduzierten organischen Bromverbindungen kommt, wenn anoxisch/anaerobe Bedingungen vorherrschen. Unter überwiegend oxisch/anoxischen Bedingungen erfolgt keine 100%ige Eliminierung. Die Bildung natürlicher organischer Bromverbindungen in Oberflächengewässern hat demnach keinen nachteiligen Einfluss auf die Trinkwasserqualität nach der Uferfiltration/Grundwasseranreicherung, wenn diese unter anoxisch/anaeroben Bedingungen erfolgt.



## ABSTRACT

Berlin surface waters are characterized by elevated concentrations of organic bromine compounds in late summer (up to 40 µg/L organic bound bromine). Knowledge about the organic bromine compounds in lakes is of significant importance because human life is closely connected to fresh water, and halogenated organic compounds are in general classified as toxic. Apart from recreational use, fresh water is frequently used for the production of drinking water e.g., after bank filtration. Organic bromine compounds are detectable in Berlin's ground water which contains more than 50 % bank filtered lake water.

In this study the source, respectively the mechanism responsible for the formation of organic bromine compounds in lakes was investigated, the compounds were characterized and the behaviour during bank filtration was investigated.

A field study shows that the organic bromine compounds, measured as adsorbable organic bound bromine (AOBr), are autochthonous. Further field studies and laboratory tests performed with lake water as well as with cultures of phototrophic organism revealed that phototrophic organisms contribute to the AOBr formation. Stress like a reduced nutrient supply or hydrogen peroxide favours the AOBr formation. Phototrophic organisms incorporate bromide, which is released again randomly and after cell death. A part of the incorporated bromide is used for the formation of organic bromine compounds in the cell. After death of the organisms the brominated compounds are released into the water phase and an extra cellular AOBr production, in the presence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leads to a further formation of AOBr, most probably due to the parallel release of haloperoxidases. For an enzymatic formation by haloperoxidases bromide, natural organic matter and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is necessary which are detectable in the upper layers of natural surface waters.

The AOBr compounds are not volatile and predominantly polar/anionic substances. Single compounds have been detected by gas chromatography (GC) mass spectrometry (MS) by the characteristic isotopic pattern of bromine. The detection of dibromoacetic acid, bromochloroacetic acid and 4-bromo-3-nitrobiphenyl was possible. Many other organic bromine compounds could be traced but a further characterization was not possible due to low compound and high matrix concentrations.

For the selective detection of organic bromine compounds a specific liquid chromatography (LC)-MS method was established and up to 31 different bromine compounds have been detected in one sample. By LC-MS measurements in the scan mode additional structural information were gained e.g., number of bound bromine atoms. Therefore it is known, that the 31 compounds are single-triple brominated and often additionally single-double chlorinated.

Soil Column experiments revealed a 100 % elimination/transformation of algae produced organic bromine compounds under anoxic/anaerobic conditions. Under oxic/anoxic conditions the transformation rate is low. Therefore, the formation of natural organic bromine compounds in surface waters seems to be unproblematic for the production of drinking water after bank filtration or ground water recharge if anoxic/anaerobic conditions are guaranteed.



## INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG .....	1
1.1	Organische Halogenverbindungen.....	1
1.1.1	Anthropogene und natürliche Quellen .....	1
1.1.2	Natürliche Synthesewege .....	6
1.2	AOBr-Bildung in Berliner Oberflächengewässern – Stand des Wissens – .....	8
1.2.1	AOBr-Jahresprofile .....	8
1.2.2	AOBr-Bildung im Labor .....	12
2	ZIELSETZUNG.....	17
3	METHODISCHES VORGEHEN .....	19
3.1	Feldstudien.....	19
3.2	Batchtests .....	19
3.2.1	Seewasser-Batchtests .....	19
3.2.2	Algen-Batchtests .....	20
3.2.3	Brombilanz – intra- und extrazelluläres Brom.....	20
3.2.4	Enzym-Batchtests .....	21
3.2.5	Versuche an Laborbodensäulen.....	21
3.3	Einzelstoffanalytik.....	21
3.3.1	Festphasenextraktion (SPE).....	22
3.3.2	Aufkonzentrierung nach Entsalzung .....	22
3.3.3	Probenfraktionierung an Kieselgel.....	23
3.4	Chromatographie.....	23
3.4.1	Gaschromatographie (GC) .....	23
3.4.2	Flüssigkeitschromatographie (LC).....	24
3.5	Massenspektrometrie .....	25
4	ERGEBNISSE .....	27
4.1	Der Bildungsmechanismus .....	27
4.1.1	Feldstudien.....	27
4.1.2	Batchtests – Simulation im Labor .....	31

---

4.1.3	Weitergehende Untersuchungen an speziellen Batchtests .....	37
4.2	Methoden für die Detektion von Einzelstoffen.....	48
4.2.1	Massenspektrometrie (MS).....	48
4.2.2	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) .....	57
4.3	Charakterisierung der organischen Bromverbindungen.....	60
4.3.1	Eigenschaften.....	60
4.3.2	Einzelstoffe .....	70
4.4	Verhalten im Untergrund .....	82
4.4.1	Labor-Bodensäulen.....	82
5	ABSCHLUSSDISKUSSION.....	87
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	96
7	ANHANG	

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

„A+2“	Elemente mit zwei Isotopen, von denen das zweite zwei Masseneinheit schwerer ist als das häufigste Isotop
Algen-AOBr	algenproduzierte AOBr, umfasst im See auch Teile des Zulauf-AOBr
Anfangs-AOBr	Anfangskonzentration an AOBr zum Zeitpunkt 0 d
Anfangskonz.	Anfangskonzentration
AOBr	adsorbierbare organische Bromverbindungen
AOBr(Extrakt)	AOBr im Extrakt
AOBr(nicht extrahiert)	AOBr im Extraktionsablauf
AOBr+SO <sub>3</sub>	AOBr nach vorhergehender Sulfitzugabe (nicht reduzierbarer AOBr)
AOCl	adsorbierbare organische Chlorverbindungen
AOI	adsorbierbare organische Iodverbindungen
AOX	adsorbierbare organische Halogenverbindungen
BAA	Bromessigsäure
BrPOD-Blind	Bromperoxidase-Blindversuch ohne Enzymdotierung
BrPOD-Test	Bromperoxidase-Versuch mit Enzymdotierung
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trofluoracetamid
BW	Blindwert
Chl-a	Chlorophyll-a
Cybakt	Cyanobakterien (speziell <i>Microcystis aeruginosa</i> )
DBA	Desinfektionsnebenprodukte
DBA	DiBromaceton
DBAN	Dibromacetonitril
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff
Durchlauf-AOBr	AOBr-Konzentration am Säulenausgang vor Versuchsbeginn
ESI	Elektrosprayionisierung
extraAOBr	extrazelluläre adsorbierbare organische Bromverbindungen = AOBr
extraBr-	extrazelluläre Bromidkonzentration

---

GC	Gaschromatographie
GWA	Grundwasseranreicherung
Hal <sup>-</sup>	Halogenid
HPLC	Hochleistungs- bzw. Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma
IISF	induzierte in-source Fragmentierung
Ind	Individuen
intaOBr	Konzentration an organischen Bromverbindungen in der Zelle
intraBr-	intrazelluläre Bromidkonzentration
intraBrom	gesamte organische und anorganische Bromkonzentration in der Zelle
IonEx+Konz	Aufarbeitung durch Entsalzung mittels Ionenaustausch und Aufkonzentrierung
LC	Flüssigkeitschromatographie
LC-OCD	Flüssigkeitschromatographie-Größenausschlusschromatographie mit organischer Kohlenstoffdetektion
lfd. Nr.	laufende Nummer
MCD	Monochlorodimedon
MRM	Multi-Reaction-Monitoring
MS	Massenspektrometrie
MSee	Müggelsee
n(Brom)	Bromierungsgrad
n(Halogen)	Halogenierungsgrad
NI	negativ Ion
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NOM	natürliches organisches Material
Nr.	Nummer
OBr	organische Bromverbindungen
OWA	Oberflächenwasseraufbereitungsanlage
P	Probe

---

PBDE	polybromierten Diphenylether
PI	positiv Ion
ppm	parts per million ( $\mu\text{g/L}$ )
Q-TOF-MS	Quadrupol-Time Of Flight-Massenspektrometrie
R(t)	Retentionszeit
R <sup>2</sup>	Korrelationskoeffizient
rel.	Relativ
S	Substrat
SAK <sub>254</sub>	spektraler Absorptionskoeffizient bei 254 nm
SAX	Strong-Anion-Exchange
SIM	Selected-Ion-Monitoring
SPE	Festphasenextraktion
SPE-EN	Festphasenextraktion an LiChrolut <sup>®</sup> EN Kartuschen
sum Br-	berechnete Summe aller Bromidspezies
sum OBr	berechnete Summe aller organischen Bromspezies
TMS	Trimethylsilyl
TSee	Tegeler See
TSee-Konz	Tegeler See- Wasser-Batchtest Probe aufgearbeitet durch Entsalzung und Aufkonzentration
TSee-SAX	Tegeler See- Wasser-Batchtest Probe aufgearbeitet durch SAX-Extraktion
TU	Technische Universität
u.p.	ultrarein
UF	Uferfiltration
Vorrats-AOBr	AOBr-Konzentration im Vorratsbehälter der Bodensäulen
WSee	Wannsee
Zulauf-AOBr	AOBr-Konzentration aus den weitgehend Algenunbeeinflussten Zuläufen des Oberflächenwassers



## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Organische Halogenverbindungen

#### 1.1.1 Anthropogene und natürliche Quellen

Vor einigen Jahren war man noch davon überzeugt, dass organische Halogenverbindungen nur von Menschenhand produziert sind. Aus Biomasse isolierte Verbindungen wurden als Artefakte anthropogener Verbindungen interpretiert, oder sogar als Abnormalität bezeichnet. Durch immer bessere Analysengeräte und die enormen Fortschritte in der Spurenanalytik wurden in den letzten 30 Jahren bis zu 3700 natürliche organische Halogenverbindungen isoliert und identifiziert (Gribble, 2003). Diese erstaunliche Anzahl an in kürzester Zeit identifizierten natürlichen organischen Halogenverbindungen hängt wahrscheinlich auch mit dem immer stärkeren Interesse an natürlichen Produkten, als Quelle neuer Pharmazeutika, zusammen. Steigende Erkenntnisse und Wertschätzung von alter Hausmedizin und Ethnobotanik haben Chemiker auf der Suche nach natürlichen Produkten zu neuen medizinischen Wegen geführt. Obwohl die meisten der identifizierten organischen Halogenverbindungen der letzten 30 Jahre im marinen Bereich gefunden wurden, konnten auch viele andere organische Halogenverbindungen in terrestrischen Pflanzen, Pilzen, Flechten, Bakterien, Insekten, einigen höheren Tieren und dem Menschen isoliert werden (Dvortsov et al., 1999; Kritz et al., 1993; McElroy et al., 1986; Solomon et al., 1994). Im Juni 2002 war die Aufschlüsselung der organischen Halogenverbindungen folgendermaßen: 2200 Organochlorverbindungen, 1900 Organobromverbindungen, 100 Organoidverbindungen und 30 Organofluorverbindungen, wobei einige hundert dieser Verbindungen sowohl Chlor als auch Brom enthalten (Butler et al., 1999; Gribble, 2003).

Das Spektrum der organischen Halogenverbindungen reicht von niedermolekular und stark flüchtig bis zu hochmolekular (über 1200 g/mol), stark verzweigt und aromatisch oder aber zu langkettigen Fettsäurederivaten.

Methylbromid ist wohl die am häufigsten untersuchte organische Bromverbindung. Sowohl anthropogene als auch natürliche Quellen sind für das Vorkommen dieser Verbindung verantwortlich. Methylbromid wird industriell produziert und findet im Agrarbereich als Pestizid für die Schädlingsbekämpfung Anwendung (Bodenbegasung, Begasung von Gewächshäusern). Der größte Teil des ausgebrachten Methylbromids geht in die Atmosphäre über, aber auch der Boden ist eine Senke für die Verbindung (Serca et al., 1998). Auch die natürliche Produktion von Methylbromid im Meerwasser wurde bereits

nachgewiesen (Baker et al., 1999). Brommethan wird auch von terrestrischen Kulturpflanzen, wie Brokkoli, Kohl, Senf, Rettich, Rüben und Raps produziert. Die globale jährliche Rate der Produktion an Brommethan durch Kohl wird auf 6600 t hochgerechnet, während für Raps 400 t veranschlagt werden, welches in die Atmosphäre übergeht (Gan et al., 1998).

Als ein weiteres Beispiel für einen anthropogenen Eintrag organischer Bromverbindungen in die Umwelt sollen hier die als Flammschutzmittel in Elektrogeräten (Elektrogeräte, Textilien, Polster) eingesetzten polybromierten Diphenylether (PBDEs) erwähnt sein (Bild 1.1).

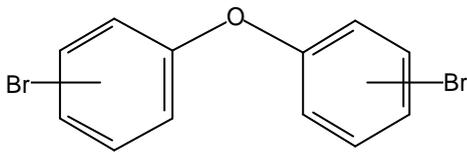


Bild 1.1: Vereinfachte Strukturformel polybromierter Diphenylether (PBDEs)

PBDEs konnten in Fischen, Sedimenten und Klärschlämmen nachgewiesen werden (Hartonen et al., 1997; Lindström et al., 1999; Sellström et al., 1996). Metabolite der anthropogenen PBDEs wurden in unterschiedlichen Biota gefunden (Herring, Lachs, Robben (Haglund et al., 1997)), allerdings ohne Klärung der Metabolismusreaktionen. Zusätzlich zu den anthropogenen PBDEs konnten natürlich gebildete PBDEs in der Leber einer indopazifischen Seekuh *Dugong dugon* isoliert werden, wobei die Struktur der natürlichen PBDEs durch zusätzliche Hydroxyl- oder Methoxygruppen charakterisiert ist (Vetter et al., 2001).

Eine weitere wichtige anthropogene Quelle für organische Bromverbindungen in Oberflächenwasser und Trinkwasser ist die Desinfektion dieser Wässer mit Ozon. Die wichtigsten bromierten Desinfektionsnebenprodukte (DBP) sind Bromat ( $\text{BrO}_3^-$ ), Bromoform ( $\text{CHBr}_3$ ), Bromessigsäure (BAA), Dibromaceton (DBA) und Dibromacetonitril (DBAN) (Siddiqui et al., 1995; Von Gunten, 2003; Weinberg et al., 1993). Einige dieser Verbindungen werden als potentiell karzinogen diskutiert: Bromat mit einem Trinkwassergrenzwert von 10  $\mu\text{g/L}$  (TVO, 2001) und Dibromacetonitril. Die wichtigsten Faktoren für die Bildung bromierter DBP's sind die Bromidkonzentration, die Konzentration an gelöstem organischem Kohlenstoff (DOC), wobei Huminsäure und Fulvinsäure die bedeutendsten Vorstufen sind, und die Ozondosis (Huang et al., 2005).

Es ist lange bekannt, dass eine Oxidation von Bromid durch Ozon zu Hypobromsäure/Hypobromid ( $\text{HOBr}/\text{OBr}^-$ ) möglich ist.  $\text{HOBr}/\text{OBr}^-$  reagiert dann weiter mit natürlichem organischem Material (NOM) über einen oxidativen oder

substitutiven Reaktionsweg, um bromierte organische Substanzen zu bilden. Ein vereinfachtes Reaktionsschema ist in (1.1) dargestellt (Hoigne et al., 1985).



Auch die Desinfektion durch Chlorung mit Chlorgas, Hypochloritlösung oder Chlordioxid kann durch Verunreinigungen mit Brom zur Bildung bromorganischer Verbindungen als Desinfektionsnebenprodukte führen.

Die natürliche Bildung organischer Halogenverbindungen wird in den meisten Fällen mit einer chemischen Abwehr gegen Bakterien und Fraßfeinde oder aber zur Kommunikation erklärt (Gribble, 2003). Zum Beispiel produziert die marine Rotalge *Bonnemaisonia hamifera* bromierte Heptanone, die Vorstufen zur Bildung von Bromoform sein könnten. Bromoform könnte dem Seetang gegen Fraßfeinde oder aber gegen Bakterien dienen (McConnell and Fenical, 1980). Marine Schwämme, die ebenfalls auf eine chemische Abwehr zum Überleben setzen, sind oft mit Bakterien oder Mikroalgen assoziiert, die die eigentliche Metabolitenproduktion übernehmen. Einige Beispiele für Halogenverbindungen die in Schwämmen isoliert wurden sind Fettsäurederivate, Pyrrole, Indole, Phenolderivate, Tyrosinderivate und sogar Dioxine.

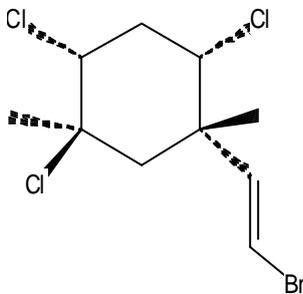


Bild 1.2: Strukturformel des Algenproduzierten Telfairines (Gribble, 1998)

Die bromhaltige Verbindung Telfairine (Bild 1.2) wurde in der Alge *Plocamium telfairiae* identifiziert und weist eine Toxizität auf, die mit Lindan vergleichbar ist (Gribble, 1998). In Cyanobakterien konnten ebenfalls bromierte Metabolite wie z.B. das hochtoxische Aplysiatoxin gefunden werden, das für die Schwimmerkrätze in Hawaii verantwortlich gemacht wird (Bild 1.3; Gribble, 1998).

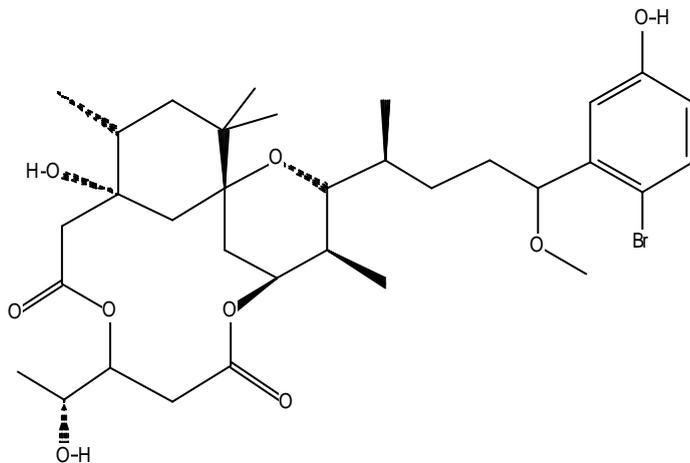


Bild 1.3: Strukturformel des cyanobakterienproduzierten Aplysiatoxins (Gribble, 1998)

Terrestrische Insekten sind bekannt für ihre Verwendung von Chemikalien für die Kommunikation. Bei mehr als einem Dutzend verschiedener Zeckenspezies wurde das Sexualpheromon 2,6-Dichlorphenol identifiziert. Die Schabe *Blattella germanica* Linnaeus ist mit zwei chlorierten Steroiden ausgestattet, die als Aggregations-Pheromone dienen. Sogar der Mensch produziert seine eigenen halogenorganischen Verbindungen. Während verschiedenster Krankheitsphasen sind die weißen Blutkörperchen in der Lage mittels Myeloperoxidase Halogenierungsreaktionen zu katalysieren, um eindringende Pathogene zu bekämpfen (Hazen and Heinecke, 1997; Heinecke, 2000; Henderson et al., 2001). Menschliche Myeloperoxidasen konvertieren zum Beispiel Chlorphenole in chlorierte Dioxine und Dibenzofurane, wodurch eine menschliche Biosynthese von Dioxinen möglich ist (Wittsiepe et al., 2000).

Auch in marinen Cyanobakterien (Blaualgen) wurde eine Vielzahl an organischen Halogenverbindungen isoliert, zum Beispiel *Nostoc* sp., welches das potentielle Antikrebsmittel Cryptophycin A produziert (Bild 1.4; Gribble, 2003).

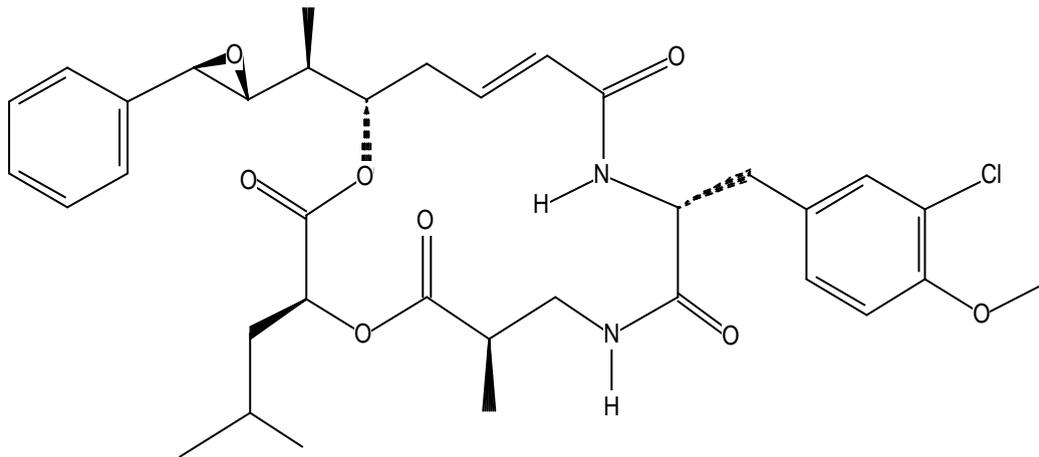


Bild 1.4: Strukturformel des cyanobakterienproduzierten Cryptophycin A

Marine Bakterien bilden zwei halogenierte Bipyrrrole (Bild 1.5), wobei bei diesen Verbindungen der erste Fall von Bioakkumulation in Vögeln, die von Meeresorganismen leben, beobachtet wurde (Gribble et al., 1999; Tittlemier et al., 2002; Tittlemier et al., 1999). Eine ähnliche Verbindung wurde in einer Vielzahl von Meeresbewohnern entdeckt und sogar in der Muttermilch von Inuit Frauen, die Walfischspeck essen. Somit wurde die erste Bioakkumulation natürlicher organischer Halogenverbindungen im Menschen nachgewiesen (Vetter et al., 2000; Wu et al., 2002).

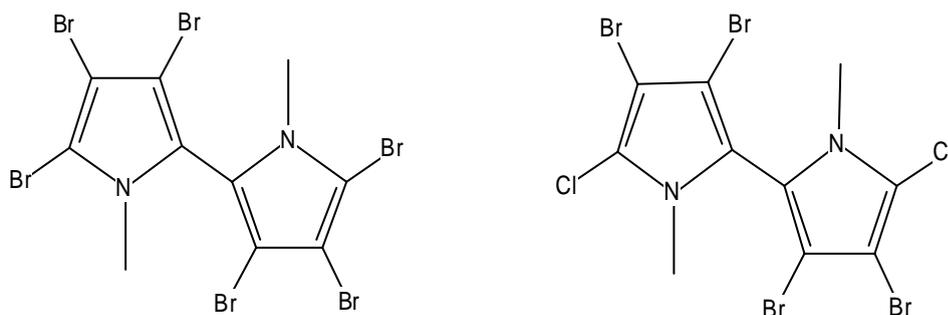


Bild 1.5: Strukturformel der beiden bakterienproduzierten Bipyrrrole

Es hat sich gezeigt, dass eine Vielzahl von marinen und terrestrischen Lebewesen organische Halogenverbindungen produzieren. Genauso vielfältig wie die Strukturformeln der verschiedenen natürlichen halogenorganischen Verbindungen sind, sind auch die Synthesewege. So kommen sowohl biotische

als auch abiotische Reaktionsprozesse für die Bildung natürlicher Halogenverbindungen in Frage.

## 1.1.2 Natürliche Synthesewege

### 1.1.2.1 Abiotisch

Einige der bedeutendsten abiotischen Quellen sind die natürliche Verbrennung von Biomasse (Waldbrände), Vulkane und andere geothermale Prozesse. In einer Studie wurden in vulkanischen Gasen von vier verschiedenen Vulkanen mehr als 300 Organohalogenverbindungen detektiert, von denen 25 Verbindungen als organische Bromverbindungen identifiziert werden konnten (Jordan et al., 2000).

Niedermolekulare Organohalogenverbindungen wurden ebenfalls in Steinen, Mineralien und Schiefer gefunden. Geringe Mengen dieser Verbindungen können durch den Bergbau freigesetzt werden (Isidorov et al., 1993). Des Weiteren wurden niedermolekulare Organochlorverbindungen in Meteoriten gefunden (Nkusi et al., 1996; Studier et al., 1965).

Für die natürliche Herkunft von Dioxinen in Sedimenten und Lehm wurde mehrfach die Verbrennungen von Biomasse und die anschließende Ablagerung vorgeschlagen (Gaus et al., 2001; Green et al., 2001). Weiterhin wird durch andere Untersuchungen eine enzymatisch oxidative Dimerisierung von Chlorphenolen für die Bildung von Dioxinen in Torf und Waldböden diskutiert (Hoekstra et al., 1999; Silk et al., 1997).

### 1.1.2.2 Biologische Bromierung

Haloperoxidasen sind Enzyme, die die Halogenierung von organischem Material unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid katalysieren. Der Begriff Haloperoxidasen umfasst nicht nur die klassischen Haloperoxidasen, sondern auch Lactoperoxidasen, eosinophile Peroxidasen und Myeloperoxidasen, die mit entsprechender biosynthetischer Aktivität ausgestattet sind. Diese Enzyme führen eine Halogenierung durch, bei der das elektrophile Halogenid ( $\text{Hal}^-$ ) mit dem Substrat (S) unter Anwesenheit von Wasserstoffperoxid reagiert. (1.1) stellt einen vereinfachten Reaktionsweg dar (Tanaka et al., 2002).



Folgende Eigenschaften der Haloperoxidasen sollen noch erwähnt werden (Neilson, 2003):

1. Die Enzyme können eine Spezifikation für Chlorid, Bromid oder Iodid haben, sie können diese aber auch nicht haben: zum Beispiel können Chlorperoxidasen Bromierungs- und Iodierungsaktivitäten aufweisen, dagegen kann es sein, dass eine Bromperoxidase nicht chlorieren kann.
2. Laktoperoxidasen können nur bromieren und iodieren.
3. Auch wenn enzymatische Aktivität messbar ist, ist das kein Grund halogenierte Metabolite in dem Organismus zu finden.
4. Chlorperoxidasen sind fähig eine Reihe von stereospezifischen Oxidationen auszuführen, wobei *tert*-Butylhydroperoxid als Sauerstoffquelle genutzt wird.

Auch bei den Haloperoxidasen sind die klassischen Enzyme vertreten, die Häm-Eisen oder Vanadium als prosthetische Gruppe enthalten. Aber auch metallfreie Haloperoxidasen ohne prosthetische Gruppe sind bekannt. So besitzt das Bakterium *Pseudomonas putida* eine Bromperoxidase, deren Aktivität mit  $\text{Co}^{2+}$  gefördert wird (Itoh et al., 1994). Sowohl diese Bromperoxidase als auch andere Chlorhalogenasen sind  $\text{FADH}_2$ -abhängig (Neilson, 2003). Des Weiteren sollen hier noch die Peroxyacid-vermittelten Enzymsysteme erwähnt werden. Hierbei handelt es sich um Degradationsenzyme, die in Acetat- oder Propionat-Pufferlösungen in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid bromieren. In einem Peressigsäurepuffer ist die Bromierung auch ohne Wasserstoffperoxid möglich.

Im marinen Bereich wurde eine saisonale Abhängigkeit der Bromperoxidase-Aktivität, mit hoher Aktivität im Sommer, beobachtet (Flodin et al., 1999). Die saisonal verstärkte Bromperoxidase-Aktivität mag mit dem in den Sommermonaten erhöhten Gehalt an Wasserstoffperoxid zusammenhängen. Dies steht im Zusammenhang mit der Tatsache, dass Wasserstoffperoxid in Oberflächengewässern mit hohen Raten bei intensiver Sonneneinstrahlung gebildet wird (Cooper et al., 1988).

Die Isolation und Charakterisierung von Haloperoxidasen aus Frischwasser-algen, die bisher nur aus terrestrischen Pflanzen oder marinen Bakterien und Algen isoliert wurden, zeigt ein mögliches Vorkommen von Haloperoxidasen in Frischwasser Systemen (Verdel et al., 2000). Bei dieser Haloperoxidase handelt es sich um ein Enzym mit Vanadium als prosthetische Gruppe.

## 1.2 AOB<sub>r</sub>-Bildung in Berliner Oberflächengewässern – Stand des Wissens –

Bereits seit einigen Jahren wird die Konzentration an organischen Bromverbindungen im Tegeler See und im Wannsee, zwei Oberflächengewässer in Berlin, bestimmt. Der Tegeler See und auch der Wannsee werden als eutroph eingestuft. Beide Seen sind durch kommunale Abwässer aus Kläranlagen beeinflusst und an beiden Seen wird nach Uferfiltration Rohtrinkwasser gefördert, und somit eine indirekte Wiederverwendung von kommunalem Abwasser praktiziert.

Bei der Bestimmung halogenorganischer Verbindungen mittels des Summenparameters „adsorbierbare organische Halogenverbindungen“ (AOX) werden organisch gebundene Chlor-, Brom- und Iodverbindungen gemeinsam erfasst, wobei der AOX als Chloräquivalente angegeben wird. Einige Berliner Klärwerksabläufe weisen eine sehr hohe AOX-Konzentration von bis zu 75,5 µg/L Cl auf. Die ionenchromatographische Differenzierung des AOX in adsorbierbare organische Chlor- (AOCl), Brom- (AOBr) und Iod- (AOI) Verbindungen (Oleksy-Frenzel et al., 2000) zeigt, dass organische Iodverbindungen einen hohen Teil des AOX ausmachen (Putschew and Jekel, 2001; Wischnack et al., 1998). Es hat sich herausgestellt, dass gerade in Krankenhausabwässern iodidierte Röntgenkontrastmittel den AOI ausmachen (Putschew and Jekel, 2006). Eine Differenzierung des AOX ist daher angebracht, um den Gehalt an AOX nicht überzubewerten und falsch zu interpretieren.

### 1.2.1 AOB<sub>r</sub>-Jahresprofile

Seit 1998 wurden im Fachbereich Wasserreinhaltung der TU Berlin Jahresprofile an organischen Bromverbindungen im Tegeler See aufgenommen. Von 1998-2000 ist ein charakteristischer Trend der AOB<sub>r</sub>-Konzentrationen zu erkennen (Bild 1.6A; Putschew et al., 2003; Putschew et al., 2001; Wischnack, 2000). Während das ganze Jahr über Konzentrationen von  $9 \pm 3$  µg/L gemessen werden, steigt die AOB<sub>r</sub>-Konzentration im Spätsommer (August/September) um das Vierfache an, mit Konzentrationen von  $32 \pm 6$  µg/L. In allen drei Jahren ist das Spätsommermaximum deutlich zu erkennen.

Wischnack (2000) führte zusätzlich AOB<sub>r</sub>-Rastermessungen am Tegeler See durch, um die Konzentrationsverteilung im See und in den Zuläufen über das ganze Jahr zu bestimmen. Die AOB<sub>r</sub>-Verteilung ist danach diffus mit hohen

Konzentrationen im See und niedrigen Zulaufkonzentrationen. Eine Bildung bromorganischer Verbindungen im See liegt demnach nahe.

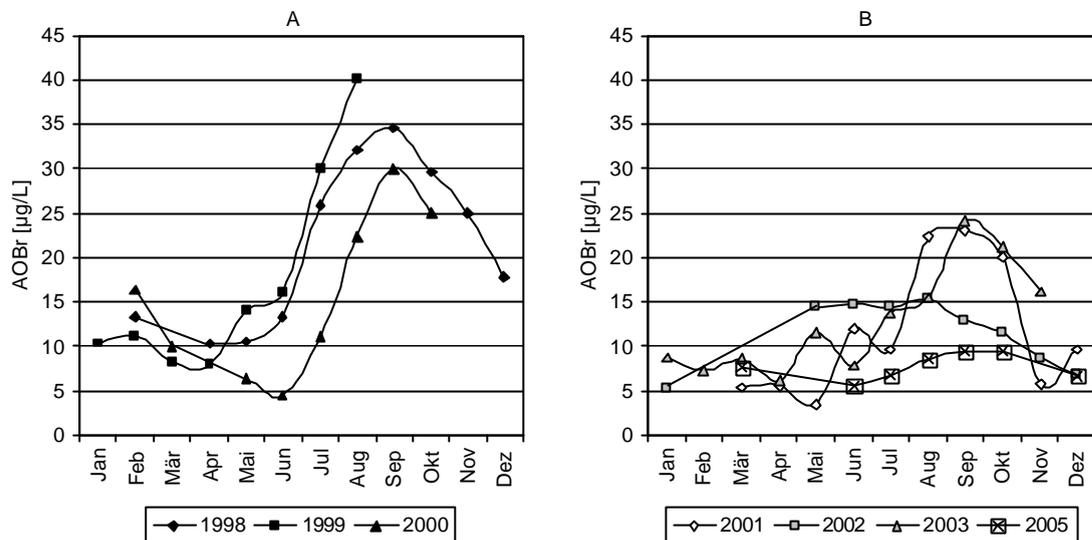


Bild 1.6: Jahresprofile der AOB<sub>r</sub>-Konzentration im Tegeler See, A: vor 2001 (Putschew et al., 2003; Wischnack, 2000) und B: ab 2001 (Grünheid et al., 2005; Putschew et al., 2003)

In den Jahren nach 2001 fällt auf, dass das Spätsommermaximum an bromorganischen Substanzen im Tegeler See nicht so intensiv ist oder sogar ganz ausbleibt (Bild 1.6B). Im Jahr 2001 wurde die Havelleitung wieder in Betrieb genommen. Durch die Havelleitung wird Wasser aus der Oberhavel in die Zuläufe des Tegeler Sees gepumpt.

Um den Einfluss der Oberhavelleitung auf die AOB<sub>r</sub>-Konzentration deutlich zu machen, sind die Zuflussraten in den Tegeler See in Bild 1.7 dargestellt (BWB, 2006). Es ist zu erkennen, dass besonders in den Sommermonaten die Havelleitung zu den natürlichen Zuläufen Tegeler Fließ und Nordgraben dazugeschaltet wird. Im Durchschnitt steigt die Abflussmenge an der Oberflächenwasseraufbereitungsanlage (OWA), in die sowohl die natürlichen Zuläufe als auch die Havelleitung einspeisen, um das Doppelte von  $1,3 \pm 0,4 \text{ m}^3/\text{s}$  im Jahre 2001 auf  $2,7 \pm 0,6 \text{ m}^3/\text{s}$  im Jahre 2005 an (BWB, 2006).

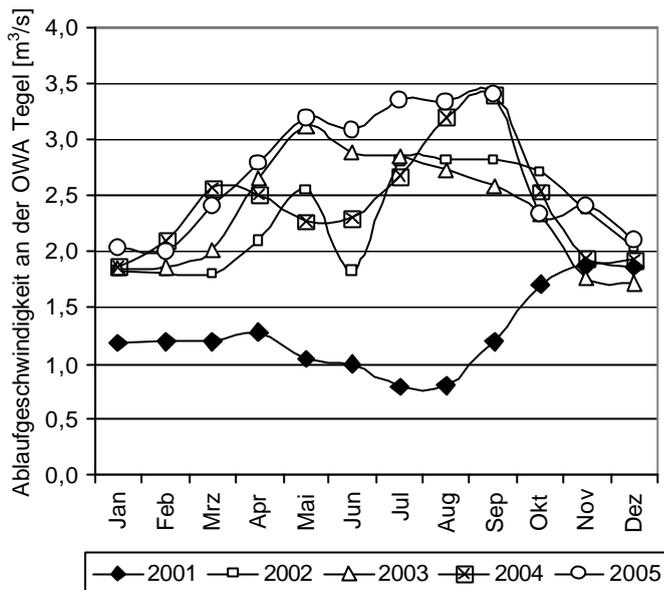


Bild 1.7: Jahresprofile der Ablaufgeschwindigkeiten am Zulauf des Tegeler Sees (Oberflächenwasseraufbereitungsanlage = OWA): schwarze Symbole = kein zusätzlicher Zufluss aus der Havelleitung; weiße Symbole = Jahre mit zeitweisem Zufluss durch die Havelleitung (BWB, 2006)

Die steigenden Zulaufgeschwindigkeiten in den Tegeler See haben zur Folge, dass die Durchflussraten im See steigen, das Seewasser verdünnt wird und die Algenblüte im Spätsommer wahrscheinlich weniger intensiv ist. Da in den Jahren der Inbetriebnahme der Havelleitung auch geringere AOB<sub>r</sub>-Maxima im Spätsommer zu beobachten sind, wird vermutet, dass bei der Bildung bromorganischer Substanzen phototrophe Organismen beteiligt sind. Aber auch die Aufnahme von Jahresprofilen der Chlorophyll-*a*-Konzentration und des AOB<sub>r</sub> durch Wischnack (2000) weisen auf einen Einfluss der Algenblüte hin (Bild 1.8).

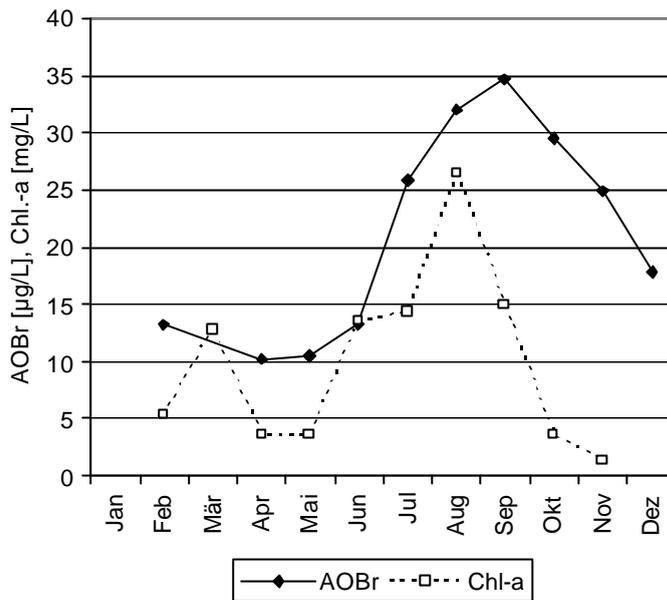


Bild 1.8: Jahresprofil der AOBBr- und Chlorophyll-a-Konzentration im Tegeler See 1998 (Wischnack, 2000)

Nicht nur im Tegeler See ist ein Anstieg der AOBBr-Konzentration im Spätsommer zu erkennen, der mit der Algenblüte korreliert. Im Wannsee wurden durch Grünheid et al. (2006) ebenfalls über mehrere Jahre die AOBBr-Konzentrationen beobachtet (Bild 1.9). Auch hier ist ein Maximum von bis zu  $36 \pm 6 \mu\text{g/L}$  zu erkennen, wogegen die Konzentrationen im restlichen Jahresverlauf bei  $8 \pm 1 \mu\text{g/L}$  liegen. Eine deutlich geringere Bildung bromorganischer Substanzen ist im Jahr 2002 zu erkennen. In diesem Jahr war das Wetter kühl und regnerisch, wodurch die Algenblüte weniger intensiv war. Somit zeigt sich ein weiteres Mal ein Zusammenhang zwischen Algenblüte und AOBBr-Bildung.

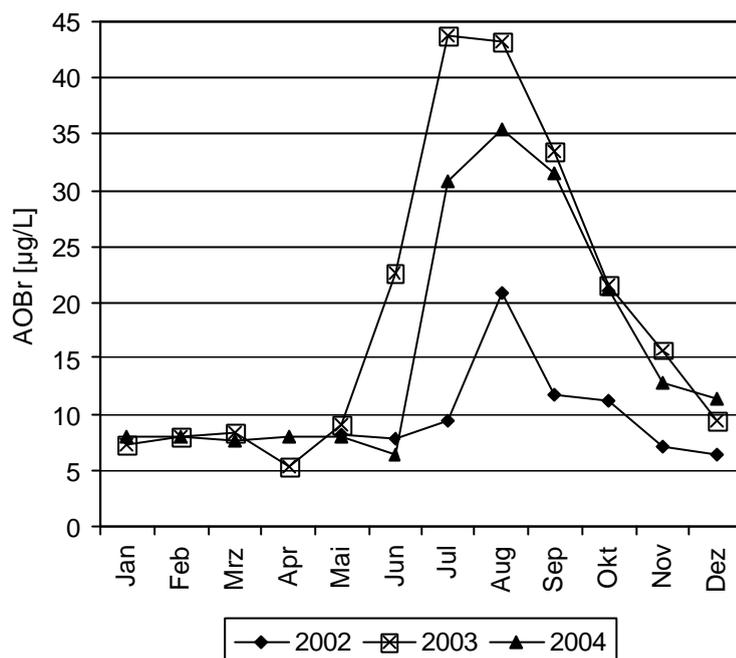


Bild 1.9: Jahresprofil der AOB-Konzentration im Wannsee (Grünheid, 2006)

## 1.2.2 AOB-Bildung im Labor

Der Versuch, die Bildung bromorganischer Substanzen im Labor zu simulieren, mit dem Ziel, die Bedingungen bzw. die Voraussetzungen für eine AOB-Bildung zu bestimmen, wurde bereits in Form von Batchtests durchgeführt (Putschew et al., 2003; Putschew et al., 2001). Dabei muss in Seewasser-Batchtests und Algen-Batchtests unterschieden werden. Für Seewasser-Batchtests wurde unbehandeltes Oberflächenwasser verwendet und für Algen-Batchtests wurden Algenkulturen kultiviert. Alle Batchversuche wurden in offenen Glasflaschen durchgeführt. Die Batchtests wurden mit künstlichem Sonnenlicht bestrahlt und mit filtrierter Luft (0,45 µm) belüftet.

### 1.2.2.1 Seewasser-Batchtests

Seewasser-Batchtests wurden in erster Linie durchgeführt, um die Bedingungen für eine Laborsimulation der Bildung bromorganischer Verbindungen in Oberflächenwässern zu bestimmen. Hell/dunkel Versuche machten die Notwendigkeit von Licht deutlich. In Bild 1.10 ist der Verlauf der AOB-Entwicklung für zwei hell/dunkel Versuche mit Wasser des Tegeler Sees dargestellt (Putschew et al., 2003). Die beiden Versuche unterscheiden sich lediglich in der jahreszeitlichen Zusammensetzung des Tegeler See- Wassers. Für den ersten Versuch (Bild 1.10 A) wurde der Tegeler See im September 2001 beprobt (Anfangs-AOB = 25,0 µg/L), der zweite Versuch (Bild 1.10 B)

wurde mit Wasser des Tegeler See aus dem Monat Dezember 2001 angesetzt (Anfangs-AOBr = 16,8 µg/L).

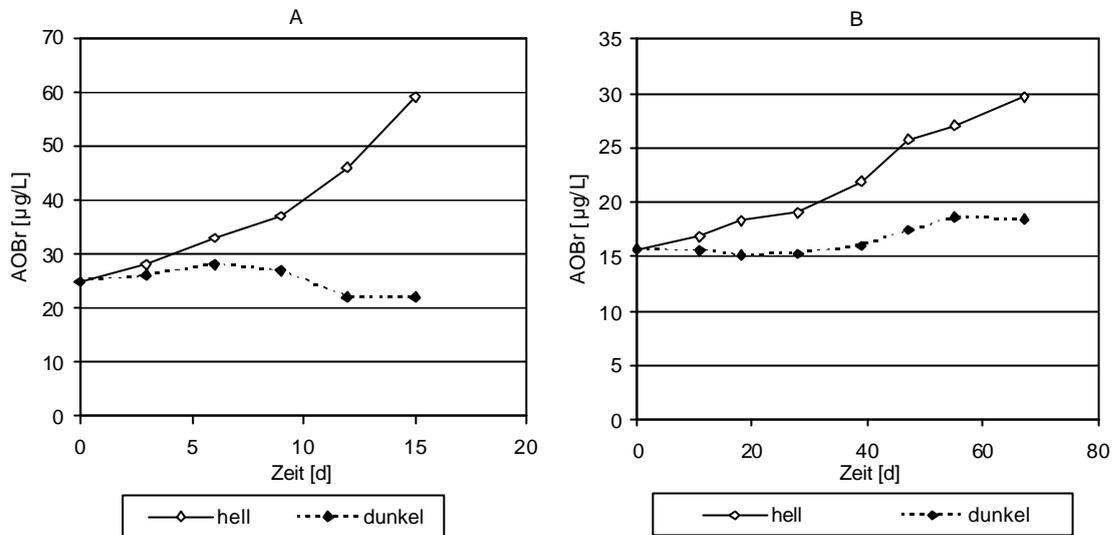


Bild 1.10: Lichteinfluss auf Tegeler See- Wasser-Batchtests, A: September 2000 und B: Dezember 2001 (Putschew et al., 2003)

In beiden Versuchen ist eine deutliche AOB<sub>r</sub>-Bildung unter Lichteinwirkung zu erkennen: 2,5facher Zuwachs für den September-Versuch und Verdoppelung für den Versuch mit Dezember-Wasser. Dagegen findet in den dunklen Parallelversuchen keine bzw. nur eine geringe AOB<sub>r</sub>-Bildung statt; 20 %ige Abnahme für das September-Wasser (Bild 1.10 A) und 17 %ige Zunahme für das Dezember-Wasser (Bild 1.10 B). Eine photochemische abiotische Reaktion ist auszuschließen, da diese im Dunklen sofort stoppen sollte. Dagegen können phototrophe Organismen eine kurze Zeit im Dunklen überleben, sodass vermutet wird, dass die Bildung im Zusammenhang mit der Photosynthese steht. Es ist zu erkennen, dass sich die Produktionsraten beider „hell“-Versuche stark unterscheiden: 34 µg/L in 15 d für das September-Wasser und 2,6 µg/L in 18 d für das Dezember-Wasser. Auch das ist ein Indiz für einen biotischen Prozess unter Algenbeteiligung, denn im September wurde das Wasser am Ende der Algenblüte mit hoher Biokonzentration genommen, während im Dezember nur eine geringe Biokonzentration zu erwarten ist.

Um die Vermutung der biotischen Bildung bromorganischer Verbindungen weiter zu untermauern und die Übertragbarkeit auf andere Gewässer zu prüfen, wurde ein Seewasser-Batchtest mit Wasser aus dem Müggelsee (Anfangs-AOBr = 7,2 µg/L) mit Natriumazid versetzt. Dabei war während der gesamten Versuchsphase keine AOB<sub>r</sub>-Entwicklung zu beobachten, dagegen war in einem Parallelversuch ohne Azid-Zugabe eine AOB<sub>r</sub>-Bildung von 34 µg/L zu beobachten (Bild 1.11A).

Weiterhin wurden Versuche mit dem photosynthesehemmenden Herbizid Diuron<sup>®</sup> durchgeführt. In Bild 1.11B ist der Einfluss des Diurons<sup>®</sup> in einem Tegeler See- Wasser-Batchtest dargestellt (Anfangs-AOBr = 15,7 µg/L). Während im Batchtest ohne Diuron<sup>®</sup> der AOBr-Gehalt in 66 d auf 30 µg/L ansteigt, schwankt er für den mit Diuron<sup>®</sup> versetzten Test um 15 µg/L, was der Ausgangskonzentration entspricht. Durch Hemmung der Photosynthese findet demnach keine AOBr-Bildung statt.

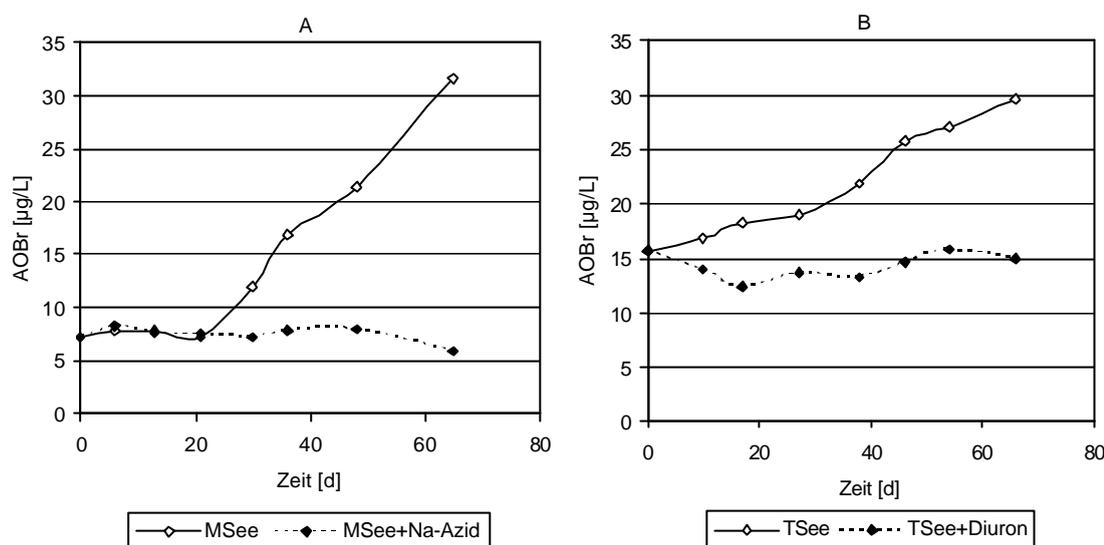


Bild 1.11: Einfluss von Natriumazid (Na-Azid) und Diuron<sup>®</sup> auf die AOBr-Bildung in Seewasser-Batchtests, A: Müggelsee-Batchtests (MSee) mit und ohne Na-Azid und B: Tegeler See-Batchtests (TSee) mit und ohne Diuron<sup>®</sup> (Putschew et al., 2003)

Beide Versuche zeigen zusätzlich (Bild 1.11A und B), dass eine Simulation der AOBr-Produktion im Labor mit Wässern unterschiedlicher Herkunft möglich ist. Sowohl mit anthropogen beeinflusstem Wasser aus dem Tegeler See (TSee; Klärwerksablauf über Nordgraben aus Schönerlinde) als auch mit Wasser aus dem Müggelsee (MSee), welches nur gering anthropogen beeinflusst ist (Klärwerksablauf über Spree aus Münchehofe), findet eine AOBr-Produktion statt. Die unterschiedlichen Produktionsraten (MSee: 24,3 µg/L in 65 d und TSee: 14 µg/L in 66 d) können nicht nur auf die anthropogenen Beeinflussungen sondern auch auf unterschiedliche Probenahmejahreszeiten (MSee: März 2001, TSee: November 2001) zurückgeführt werden.

Die Voraussetzungen für die Bildung organischer Bromverbindungen lassen sich demnach wie folgt zusammenfassen: Eine AOBr-Bildung findet im Labor nur in Anwesenheit phototropher Organismen statt, die in einem Nährmedium (in diesem Fall Seewasser) wachsen, das mit Luft begast und durch künstliches Sonnenlicht beleuchtet wird.

### 1.2.2.2 Algen-Batchtests

Eine Simulation der AOBr-Bildung konnte auch durch Batchtests mit reinen Algenkulturen erzielt werden (Putschew et al., 2003). *Desmodesmus subspicatus* wurde als weit verbreiteter Grünalgenvertreter in Süßwässern herangezogen, um Algen-Batchtests durchzuführen. Es zeigte sich, dass unter optimalen Nährstoffbedingungen unter dem Einfluss von Licht, Belüftung mit Luftsauerstoff und bei 25 °C Raumtemperatur eine Bildung von 3,3 µg/L AOBr in 76 d möglich ist (Bild 1.12).

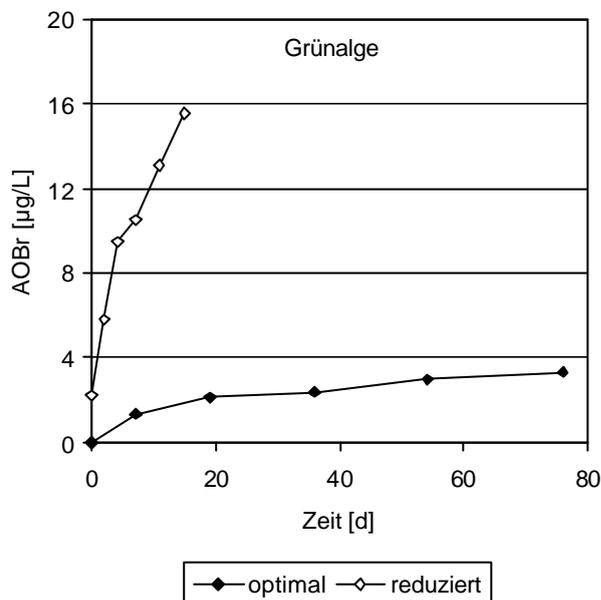


Bild 1.12: AOBr-Bildung in *Desmodesmus subspicatus*-Batchtests; optimal = optimale Nährmediumzusammensetzung, reduziert = 1:10 verdünnte Nährmediumzusammensetzung (Putschew et al., 2003)

Laternus et al. (2000) hat die Bildung niedermolekularer Organohalogenverbindungen in Abhängigkeit von abiotischen Faktoren untersucht. Es wird vermutet, dass bei kurzzeitiger Änderung abiotischer Faktoren (Licht, Temperatur, Salinität) die Bildung halogenorganischer Verbindungen stressbedingt ist. Eine Erhöhung der Salinität hat im Langzeitversuch tatsächlich zu einer Erhöhung der Produktion halogenorganischer Verbindungen geführt. Aus diesem Grund wurde ein Algen-Batchtest unter Stressbedingungen in Form von Nährstoffmangel durchgeführt (Putschew et al., 2003). Dazu wurde die Nährlösung für *Desmodesmus subspicatus* 1:10 verdünnt und die AOBr-Bildung beobachtet. Wie in Bild 1.12 zu erkennen ist findet unter reduzierten Nährstoffbedingungen eine zehnfach höhere Produktion an AOBr statt

(15,6 µg/L in 15 d) als unter optimalen Bedingungen (2,1 µg/L in 19 d). Eine stressbedingte Erhöhung der Bildung organischer Bromverbindungen ist also auch im Algen-Batchtest mit *Desmodesmus subspicatus* zu beobachten.

## 2 ZIELSETZUNG

Das Hauptziel des hier durchgeführten Forschungsvorhabens ist, die Bildungsursache bzw. den -mechanismus der bromorganischen Verbindungen in Oberflächengewässern zu klären.

Eine Feldstudie soll wichtige Informationen bezüglich der Bildung von AOBBr in der Natur liefern. Neben der AOBBr-Bestimmung sollen andere Konzentrationen bestimmt werden, die nach bisherigem Wissen einen Einfluss auf die AOBBr-Bildung haben bzw. Informationen über den Zusammenhang mit phototrophen Organismen liefern. Es sollen Tiefenprofile und zeitliche Konzentrationsprofile an der Oberfläche aufgenommen werden.

Zahlreiche Versuche sollen durchgeführt werden, um die Wiederholbarkeit der AOBBr-Simulation, die stark biologisch beeinflusst ist, zu überprüfen. Die Versuche sollen gleichzeitig die bisher bekannten Voraussetzungen für die AOBBr-Simulation verifizieren und neue Faktoren berücksichtigen.

Neben Prozessstudien in Feld und Labor soll der AOBBr charakterisiert werden und wenn möglich durch spezifische Einzelstoffanalytik bestimmt werden.

Des Weiteren soll das Verhalten der bromhaltigen Verbindungen während der Uferfiltration beschrieben werden. Das Verhalten der bromhaltigen Verbindungen (Transformation/Metabolisierung) während der Bodenpassage ist von großem Interesse, da sehr häufig Oberflächenwasser nach Uferfiltration als Rohtrinkwasser gefördert wird.



### 3 METHODISCHES VORGEHEN

In diesem Kapitel wird das methodische Vorgehen beschrieben. Details bezüglich der Bestimmungsmethoden und der Versuchsvorschriften sind im Anhang II zu finden. Der Anhang II enthält auch eine Tabelle (II.3), in der alle durchgeführten Batchtests unter Angabe der genauen Versuchsbedingungen aufgelistet sind.

#### 3.1 Feldstudien

Alle bisher durchgeführten Arbeiten deuten an, dass Algen für die Bildung bromorganischer Substanzen im Spätsommer verantwortlich sind. Um diese Vermutung zu verifizieren wurden im Rahmen einer Feldstudie am Tegeler See Tiefenprofile sowie die zeitliche Entwicklung ausgewählter Konzentrationen im Oberflächenwasser bestimmt. Die Tiefenprofile wurden erstellt, um die AOBr-Bildung lokalisieren zu können. Neben der Bestimmung des AOBr-Gehalts wurde die Konzentration an Chlorophyll-a in der aufgeschlossenen Biomasse bestimmt sowie die Konzentration an Wasserstoffperoxid, gelösten organischen Kohlenstoff (DOC) und Bromid. Im September 2005 wurden AOBr-Messungen an ausgewählten Probenahmeorten des Berliner Wassersystems vorgenommen. Es wurden sowohl die Zu- und Abläufe des Tegeler Sees und Wannsees als auch der Tegeler See, Wannsee, Müggelsee und die Spree beprobt.

#### 3.2 Batchtests

Sowohl Versuche mit Oberflächenwasser als auch mit Algenkulturen wurden in offenen Glasflaschen durchgeführt (Volumen 20 L bzw. 5 L). Die Glasflaschen standen in der Regel in einer Klimakammer (25 °C), wurden mit künstlichem Sonnenlicht bestrahlt und mit filtrierter Luft (0,45 µm) belüftet. Zu allen Versuchsansätzen wurde, wenn nicht anderes erwähnt, 100 µg/L Bromid gegeben. Die Batchtests wurden regelmäßig beprobt und die Konzentration an AOBr gemessen. In bestimmten Versuchsansätzen wurden neben dem AOBr, das gelöste Bromid, der DOC und die Wasserstoffperoxidkonzentration bestimmt, sowie die Individuenzahl der lebenden Organismen. Die Quantifizierung aller gelösten Verbindungen erfolgte nach Filtration (0,45 µm).

##### 3.2.1 Seewasser-Batchtests

Für Seewasser-Batchtests wurde unfiltriertes Oberflächenwasser unterschiedlicher Herkunft eingesetzt. Die Seewasser-Batchtests wurden auch mit Wasser, das zu unterschiedlichen Jahreszeiten genommen wurde, angesetzt, um den

Einfluss der biologischen Zusammensetzung als Versuchsparameter zu erfassen. Für die Erzeugung von Proben mit hohem AOB<sub>r</sub>-Gehalt wurden einige Seewasser-Batchtests bis zu einem Jahr lang durchgeführt. Eine Bromid-dotierung war in Seewasser-Batchtests nicht nötig, da mindestens 100 µg/L Bromid bereits natürlich im Sewasser enthalten ist.

### 3.2.2 Algen-Batchtests

Für die Algen-Batchtests wurden Algen aus vorgezüchteten Suspensionen eingesetzt, wobei die Anfangskonzentration vom Zeitraum der Vorkultivierung abhing. Die Algensuspension wurde zu einem bestimmten Volumen einer für die Algenart typischen Nährstofflösung gegeben oder zu einem Oberflächenwasser, das zuvor filtriert und autoklaviert wurde, oder aber nur filtriert wurde.

Neben der bereits verwendeten Grünalge *Desmodesmus subspicatus* (Putschew et al., 2003), die ebenfalls für Wiederholungsversuche verwendet wurde, sind Batchtests mit dem Cyanobakterium *Microcystis aeruginosa* angesetzt worden. Dieses Cyanobakterium wurde ausgewählt, da es bekannt ist für ein rasantes Wachstum im Sommer und den daraus resultierenden Blaualgenblüten in nährstoffreichen Gewässern. Derartige Blaualgenblüten können im Sommer im Wannsee und konnten vor Inbetriebnahme der Havelleitung (siehe Kapitel 1.2.1, Seite 9) im Tegeler See beobachtet werden. Beide Organismen wurden für Batchversuche unter optimalen und reduzierten Nährstoffangeboten eingesetzt, um die AOB<sub>r</sub>-Bildung unter Stress zu untersuchen. Für Versuche mit reduziertem Nährstoffangebot wurde die sonst eingesetzte Nährlösung 1:10 mit ultrareinem (u.p.) Wasser verdünnt. Der Einfluss von Licht (hell/dunkel Versuche), Photosynthese (Hemmung mit Diuron<sup>®</sup>) und Wasserstoffperoxid wurde mit *Microcystis aeruginosa* untersucht.

### 3.2.3 Brombilanz – intra- und extrazelluläres Brom

Um detailliertere Informationen über den Bildungsmechanismus zu bekommen, wurde in einigen Algen-Batchtests eine Brombilanz aufgestellt. Neben dem AOB<sub>r</sub>-Gehalt und der Konzentration an Bromid, die beide in der wässrigen Phase bestimmt werden, wurde der Bromgehalt der Organismen bestimmt (intrazellulärer Bromgehalt). Die Organismen wurden abfiltriert, getrocknet und verbrannt. In dem im Wasser aufgefangenen Verbrennungsgas wurde dann die Bromidkonzentration bestimmt, analog zur AOB<sub>r</sub>-Bestimmung. Der intrazelluläre Bromgehalt setzt sich aus organisch gebundenem Brom und anorganischen Bromspezies zusammen. Eine Differenzierung des intrazellulären Bromgehaltes in intrazellulär organisch gebundenem Brom und intrazellulär anorganischen Bromspezies wurde ebenfalls vorgenommen. Hierfür wurden die Organismen von der wässrigen Phase abgetrennt und anschließend durch alkalische Hydrolyse aufgeschlossen. Das Hydrolysat

wurde mit Dichlormethan extrahiert. Der organische Extrakt wurde aufkonzentriert, verbrannt und die Verbrennungsgase analysiert. Die so bestimmte Bromidkonzentration repräsentiert das intrazellulär organisch gebundene Brom. Der intrazelluläre anorganische Bromidgehalt ergibt sich aus der Differenz intrazellulärem Brom und intrazellulär organisch gebundenes Brom.

### 3.2.4 Enzym-Batchtests

Wie bereits in der Einleitung erwähnt (Kapitel 1.1.2.2, Seite 6), ist die biologische Bromierung durch Haloperoxidasen im marinen Bereich oft beschrieben worden. Eine Reaktion von natürlichem organischem Material (NOM), Bromid und Wasserstoffperoxid durch eine enzymatische Katalyse ist auch in Frischwassersystemen vorstellbar und wurde untersucht. Hierzu wurde Wasser aus dem Tegeler See aufkonzentriert (1:10), autoklaviert, mit Bromid und mit einer Bromperoxidase (Meerretichisolat) versetzt. In einem weiteren Enzymtest wurde der Einfluss der NOM Herkunft untersucht. Versuche mit Tegeler See-Wasser (filtriert 0,45 µm) und mit NOM aus dem Suwanee River, gelöst in u.p. Wasser, wurden durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurde u.a. die Bromperoxidaseaktivität durch Monochlorodimedon- (MCD) Assay bestimmt.

### 3.2.5 Versuche an Laborbodensäulen

Laborversuche an Bodensäulen sollen das Verhalten bromorganischer Verbindungen während der Uferfiltration deutlich machen. Hierzu wurden vier Säulen, gefüllt mit technischem Sand bzw. Ufermaterial aus dem Tegeler See, mit unterschiedlichen Oxidationszuständen verwendet. Die Redoxverhältnisse wurden zum einen durch unterschiedlich begaste Vorratswässer erzeugt (Luftsauerstoffbegast = sauerstoffgesättigt und stickstoffbegast = sauerstofffrei). Zusätzlich wurde das Vorratswasser von zwei Säulen mit 3 mg/L Stärke dotiert, um durch erhöhte Mikroorganismenaktivität Sauerstoff zu verbrauchen und anoxisch/anaerobe Bedingungen zu schaffen. Die Säulen wurden mit Seewasser aus dem Tegeler See beschickt, sodass ein Hintergrund-AOBr vorliegt. Dieser wurde vor Beginn der Versuche sowohl im Vorratsbehälter (Vorrats-AOBr) als auch am Säulenausgang (Durchlauf-AOBr) bestimmt.

Um die Totzeit nicht retardierender Substanzen für die verwendeten Säulen zu bestimmen, wurden Tracerversuche mit KCl-Lösung durchgeführt. Eine Detektion der KCl-Lösung fand anhand der Leitfähigkeit statt.

Das Verhalten von algenproduziertem AOBr bei der Bodenpassage wurde mit Proben aus einem Cyanobakterien-Batchtest untersucht. Der Batchtest wurde dazu filtriert (0,45 µm) und mit einem definiertem Volumen (200 ml) und gleich bleibendem Fluss (1,6 L/d) auf die Säulen gegeben.

## 3.3 Einzelstoffanalytik

Umweltproben sind komplexe Gemische der verschiedensten Verbindungen mit den unterschiedlichsten Eigenschaften und Strukturmerkmalen. Bei der Suche nach unbekanntem Verbindungen werden zunächst geeignete Methoden entwickelt, um die interessanten Verbindungen möglichst gut von der Matrix abzutrennen. Hierzu bedient man sich der Klassifizierung der unbekanntem Verbindungen in Gruppen mit ähnlichen chemischen Eigenschaften (Polarität, Flüchtigkeit, etc.) und Strukturmerkmalen (funktionelle Gruppen, Stoffklassen, Heteroatome etc.).

Gerade im ppm-Bereich ( $\mu\text{g/L}$ ) und geringer ist es sinnvoll bereits mit der Probenaufarbeitung den größten Teil der Matrix abzutrennen. Danach erfolgt eine Trennung durch chromatographische Methoden, mit Hilfe derer die verbleibenden Verbindungen in ihre Einzelstoffe getrennt werden. Zahlreiche Detektionsmethoden stehen für die Detektion der so getrennten Einzelstoffe zur Verfügung. Wichtige Informationen im Fall von unbekanntem Verbindungen liefert die Massenspektrometrie (MS), die sowohl mit der Gaschromatographie (GC) wie auch mit der Flüssigkeitschromatographie (LC) gekoppelt werden kann.

### 3.3.1 Festphasenextraktion (SPE)

Anhand der Extraktionsausbeuten mit unterschiedlichen Festphasen wurde die Polarität der organischen Bromverbindungen eingegrenzt. Es wurden sechs verschiedene Festphasen eingesetzt, wobei darunter eine apolare Umkehrphase war (LiChrolut<sup>®</sup> RP-18), zwei polare Phasen (LiChrolut<sup>®</sup> EN und Isolute<sup>®</sup> ENV+), eine Phase für polare und apolare Verbindungen (Oasis HLB) und zwei Ionenaustauscherphasen (Bond-Elut<sup>®</sup> SAX und SCX).

Die Polaritätseigenschaften laut SPE wurden sowohl an Seewasser-Batchtestproben als auch an Algen-Batchtestproben untersucht. Diese Proben waren auf Grund hoher AOB<sub>r</sub>-Konzentrationen für die AOB<sub>r</sub>-Wiederfindungsversuche nach SPE gut geeignet.

Für die Probenaufarbeitung wurde die Festphasenextraktion mit der besten AOB<sub>r</sub>-Wiederfindung verwendet, um bei der Einzelstoffanalytik möglichst viele Bromverbindungen zu erfassen.

### 3.3.2 Aufkonzentrierung nach Entsalzung

Um alle organischen Bromverbindungen unabhängig ihrer Polarität und Löslichkeit untersuchen zu können, wurde eine Methode zur Aufkonzentrierung entwickelt. Hierbei ist einerseits wichtig, dass schonend eingeeengt wird, um eine Strukturveränderung zu verhindern und andererseits eine klare Lösung entsteht, da mögliche ausfallende Salze die interessierenden bromorganischen Verbindungen mitfällen könnten.

Das Ausfällen schwerlöslicher Salze (wie zum Beispiel  $\text{Ca}^{2+}$ - oder  $\text{Mg}^{2+}$ -Salze) während der Konzentration wird durch Ionenaustausch verhindert. Mit Kationenaustauscherkartuschen können die Kationen gegen Protonen oder Natriumionen ausgetauscht werden. Da erstere Variante zu einer starken Erniedrigung des pH-Wertes führt, der möglicherweise einen negativen Einfluss auf die Verbindungen beim Aufkonzentrieren hat, wurde der Austausch mit Natriumionen bevorzugt.

Die Aufkonzentrierung wurde im SpeedVac<sup>®</sup> durchgeführt, wobei es durch Rotation, Unterdruck und Wärme (70 °C) zur Volumenreduktion kommt.

### 3.3.3 Probenfraktionierung an Kieselgel

Eine weitere Eingrenzung der Polarität des AOB<sub>r</sub> bietet die Fraktionierung an Kieselgel. Hierzu wird an einer konditionierten Kieselgelsäule mit verschiedenen polaren Lösungsmitteln fraktioniert:

1. Hexan „Kohlenwasserstoff-Fraktion“
2. Hexan/Dichlormethan (9:1) „Aromaten-Fraktion“
3. Dichlormethan/Methanol (9:1) „Heterokomponenten-Fraktion“
4. Methanol „Polare-Fraktion“

Für die Fraktionierung wurden sowohl aufkonzentrierte Proben verwendet als auch Proben nach Festphasenextraktion, um eine mögliche Aufteilung der organischen Bromverbindungen in strukturelle Untergruppen zu erreichen. Eine Natriumsulfatschicht auf dem Kieselgel soll Wasser aufnehmen und im Falle von wässrigen aufkonzentrierten Proben eine Kieselgelfraktionierung ermöglichen. Es wurden überwiegend Seewasser-Batchtestproben für die Fraktionierung eingesetzt, da die Proben einen höheren AOB<sub>r</sub> aufwiesen und möglicherweise den Proben in der Natur am nächsten kommen.

## 3.4 Chromatographie

Für die chromatographische Trennung der bromorganischen Verbindungen und der verbleibenden Matrix stehen zwei grundlegende Methoden zur Verfügung. Sowohl die Gaschromatographie als auch die Flüssigkeitschromatographie wurden als Trennmethode optimiert und ausgewertet.

### 3.4.1 Gaschromatographie (GC)

Für die gaschromatographische Trennung wurde eine DB-5-Säule verwendet, die 5 % Diphenyl-/ 95 % Dimethylsiloxan als stationäre Phase enthält. Eine Optimierung der Trennung für die Gaschromatographie findet über die Temperatur und Säule statt.

Da durch die Gaschromatographie nur Verbindungen erfasst werden können, die unzerstört in die Gasphase überführbar sind, wurden alle polaren Fraktionen (nach Kieselgelsäule) sowohl derivatisiert als auch underivatisiert analysiert.

#### 3.4.1.1 Derivatisierung für die Gaschromatographie

##### Trimethylsilylierung

Die häufigste Form der Derivatisierung in der Gaschromatographie ist der Austausch von aktiven Wasserstoffatomen durch eine Trimethylsilylgruppe (TMS-Derivat). N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) ist ein starkes Silylierungsmittel, das eine Vielzahl von Verbindungen wie Alkohole, Amine, Carbonsäuren, Phenole, Steroide, biogene Amine und Alkaloide zu sehr stabilen TMS-Derivaten silyliert.

##### Methylierung

Auch bei der Methylierung werden aktive Wasserstoffatome (z.B. in Fettsäuren) ersetzt, allerdings gegen Methylgruppen. Als Methylierungsmittel wurde Diazomethan ( $\text{CH}_2\text{N}_2$ ) eingesetzt. Die Methylierung findet daher via Methyl-diazonium-Salz ( $\text{H}_3\text{C-N}_2^+$ ) statt.

#### 3.4.2 Flüssigkeitschromatographie (LC)

Bei der Flüssigkeitschromatographie stellt sich das Problem der Flüchtigkeit und demnach der Notwendigkeit zu derivatisieren nicht. Hier wird anhand des Säulenmaterials (stationäre Phase) und Eluenten (mobile Phase) eine Optimierung der Trennung vorgenommen.

Es wurden viele verschiedene Säulen für die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ausprobiert. Auch unterschiedliche Eluenten wurden verwendet: mit und ohne Ionenpaar, bei sauren und alkalischen pH-Werten und mit unterschiedlichen Lösungsmittelgemischen (u.p. Wasser, Methanol, Acetonitril).

Es wurden Standardgemische analysiert, anhand derer die Trennung im Vorversuch optimiert werden konnte. Allerdings war die Wahl der Standards schwierig, da es bis dahin noch zu keiner Identifikation von bromorganischen Verbindungen in den Oberflächenwasserproben oder Batchtestproben kam. Daher wurden unterschiedlich bromierte und polare Standards ausgewählt (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Auswahl an Standardverbindungen für die Flüssigchromatographie

Standard	Strukturmerkmale
Bromchloressigsäure	bromierte und chlorierte Säure
Bromphenylessigsäure	bromierte, aromatische Säure
2,3-Dibrompropionsäure	mehrfach bromierte Säure
2,4-Dibromphenol	mehrfach bromierter, aromatischer Alkohol
2,4,6-Tribromphenol	mehrfach bromierter, aromatischer Alkohol

### 3.5 Massenspektrometrie

Für die Detektion der unbekanntem Verbindungen wurde die Massenspektrometrie (MS) gewählt. Die unbekanntem bromorganischen Verbindungen sollten sehr gut anhand ihres charakteristischen Isotopenmusters von  $^{79}\text{Br}$  und  $^{81}\text{Br}$  zu erkennen sein. In den Chromatogrammen durch GC-MS wurde nach dem charakteristischen Isotopenmuster gesucht. Im Fall der Kopplung LC-MS wurde eine Methode zur selektiven Detektion von iodorganischen Verbindungen (Putschew and Jekel, 2003) für die selektive Detektion von bromorganischen Verbindungen modifiziert. Mit Hilfe dieser Analysenmethode können die Retentionszeiten der unbekanntem Verbindungen bestimmt werden. Durch "konventionelle" LC-MS Messungen im scan-Modus, unter gleichen chromatographischen Bedingungen, können dann die Molekulargewichte und Halogenierungsgrade der unbekanntem Verbindungen bestimmt werden. Die "Suche" nach Isotopenmustern ist im Fall der LC-MS im scan nur sehr schwer möglich, da dieser Detektionsmodus sehr unempfindlich ist und so nur mit Hilfe der bekannten Retentionszeit Massenspektren aus den scan-Messungen extrahiert werden können.



## 4 ERGEBNISSE

Die Bezeichnung Alge wird in der Algenkunde (Phykologie oder Algologie) unterschiedlich verwendet und verschiedenen Begriffen zugeordnet. Im weiteren Sinne bezeichnen sie im Wasser lebende, eukaryotische, pflanzenartige Lebewesen, die Photosynthese betreiben, jedoch nicht zu den eigentlichen Pflanzen gehören. Als Algen im engeren Sinne werden zahlreiche Protistengruppen bezeichnet. Hierzu gehören sowohl einzellige als auch mehrzellige Lebewesen. Als Blaualgen werden fälschlich die Cyanobakterien bezeichnet, die zu den Prokaryoten gehören und deshalb weder zu den Algen noch zu den Pflanzen gerechnet werden. Sie werden eher zu den Bakterien gezählt. In dieser Arbeit werden Cyanobakterien zur Vereinfachung teils auch unter dem Begriff der Algen geführt, da sie in der Versuchsgruppe der Algen-Batchtests im Vergleich zu tatsächlichen Algen (*Desmodesmus subspicatus*) diskutiert werden.

### 4.1 Der Bildungsmechanismus

Wie bereits in der Einleitung (Kapitel 1.2.1, Seite 8) dargelegt, ist bekannt, dass saisonal bromorganische Verbindungen in Binnengewässern entstehen können. Untersuchungen von Putschew et al. (2003) und Wischnack (2000) weisen auf eine biotische Reaktion unter Beteiligung phototropher Organismen hin. Eine Feldstudie am Tegeler See und Beobachtungen im Berliner Wassersystem vom September 2005 sollen diese Vermutungen verifizieren.

#### 4.1.1 Feldstudien

Zur Untersuchung der Bildung bromorganischer Verbindungen in Oberflächengewässern wurden folgende Parameter gemessen:

- adsorbierbare organische Bromverbindungen (AOBr) – Konzentration an organischen Bromverbindungen in der wässrigen Phase,
- Chlorophyll-*a*-Konzentration in der aufgeschlossenen Biomasse – ein Maß für die Menge an phototrophen Organismen (Algenblüte) und
- gelöster organischer Kohlenstoff (DOC) – zeigt das Absterben der phototrophen Organismen nach der Algenblüte durch Konzentrationsanstieg an.

Aus dem marinen Bereich ist bekannt, dass eine biotische Bildung organischer Bromverbindungen mittels Haloperoxidasen erfolgt. Für diese Reaktion ist die Anwesenheit folgender Reaktionspartner Voraussetzung, die, wenn nicht oben genannt, ebenfalls erfasst werden:

- natürliches organisches Material (NOM) – wird als DOC erfasst
- anorganisches Bromid in der wässrigen Phase – ist unabhängig vom Reaktionsmechanismus Reaktionspartner für die Bildung organischer Bromverbindungen und
- Wasserstoffperoxid – ist ein Zellgift und wird durch Haloperoxidasen abgebaut, wobei die enzymatische Bromierung eine Weiterreaktion ist.

#### 4.1.1.1 Tegeler See - Feldstudie

Eine Feldstudie mit zeitlichen Konzentrationsverläufen und Tiefenprofilen von Chlorophyll-*a*, DOC und AOB<sub>r</sub> am Tegeler See im Jahre 2005 verdeutlicht die Beteiligung des massenhaften Wachstums phototropher Organismen (Algenblüte). Ende Juni, wenn die Chlorophyll-*a*-Konzentration steigt, beginnt die Algenblüte (Bild 4.1). Das Algensterben ist durch sinkende Chlorophyll-*a*-Konzentration und steigende DOC-Konzentration zu erkennen. Von Juli bis August ist eine geringe AOB<sub>r</sub>-Bildung sichtbar, aber erst nach sinkenden DOC-Konzentrationen erreicht der AOB<sub>r</sub> sein Maximum. Die gestaffelte Ausbildung der Konzentrationsmaxima der drei Messgrößen lässt im Oberflächengewässer die Beteiligung phototropher Organismen und deren Absterben bei der AOB<sub>r</sub>-Bildung vermuten.

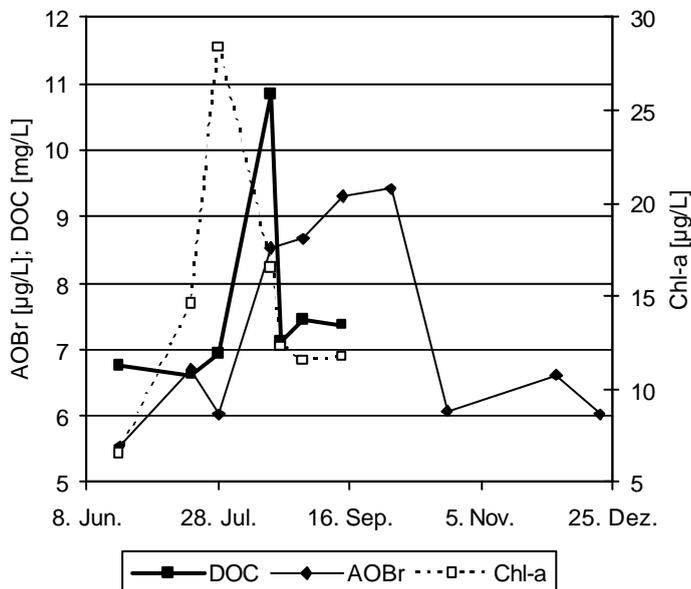


Bild 4.1: Chlorophyll-*a*-, DOC- und AOB<sub>r</sub>-Konzentration im Tegeler See (Wasseroberfläche) im Sommer 2005

Anhand der AOB<sub>r</sub>-Tiefenprofile des Tegeler Sees im Sommer 2005 (Bild 4.2A) ist zu erkennen, dass im Bereich von 1-5 m Wassertiefe die AOB<sub>r</sub>-Gehalte am

höchsten sind und die niedrigsten Gehalte in Sedimentnähe vorliegen. Im Monat Juli ist die AOB<sub>r</sub>-Konzentration generell niedriger als im August und September. Eine nennenswerte AOB<sub>r</sub>-Erhöhung wurde am 18. August festgestellt, mit leicht steigenden Gehalten in den folgenden Wochen, bis hin zum 14. September. Die Algendichte bzw. die Chlorophyll-a-Konzentration ist auch im Bereich der Wasseroberfläche (1-4 m) am höchsten und nimmt mit der Tiefe ab (Bild 4.2B). Die Chlorophyll-a-Konzentration nimmt in der Zeit vom 21. Juli bis zum 29. Juli extrem zu. In den folgenden Wochen nimmt die Chlorophyll-a-Konzentration wieder ab, was ein Absterben der Algen anzeigt. Da ein nennenswerter AOB<sub>r</sub>-Anstieg erst dann erfolgt, wenn die Algendichte wieder abnimmt, zeigt auch das Tiefenprofil, dass die höchsten AOB<sub>r</sub>-Gehalte erst nach Absterben der Algen auftreten.

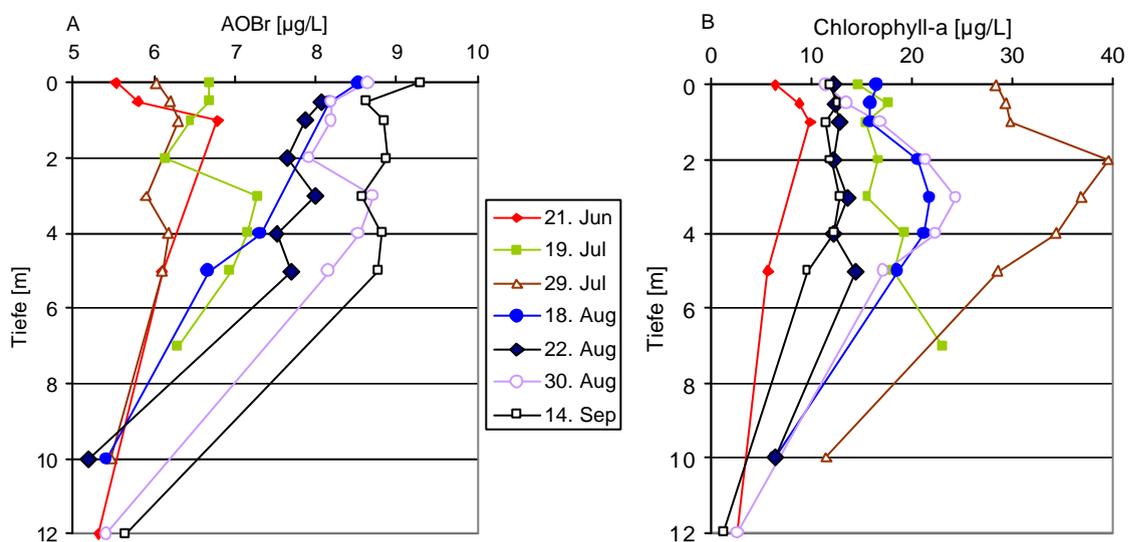


Bild 4.2: Tiefenprofile der A) AOB<sub>r</sub>- und B) Chlorophyll-a-Konzentration im Sommer 2005 des Tegeler Sees

Die Konzentration an anorganischem Bromid ist im Tiefenprofil (0-7 m) konstant und liegt bei  $120 \pm 12 \mu\text{g/L}$ . Eine Wasserstoffperoxidkonzentration konnte nur an Tagen mit starker Sonneneinstrahlung, geringen Windstärken und somit ruhiger Wasseroberfläche detektiert werden. Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration ist im Bereich der Wasseroberfläche maximal und beträgt  $11 \pm 1 \mu\text{g/L}$ . Dagegen sinkt die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration schnell mit zunehmender Wassertiefe und ist in 2 m Tiefe nur noch mit einer Konzentration von  $1 \mu\text{g/L}$  detektierbar (siehe Anhang III.i, Bild III.1). Am Ufer konnte eine Maximalkonzentration von  $15 \mu\text{g/L}$  gemessen werden, was auf die ruhigere Lage und geringere Wassertiefe zurückzuführen ist.

In der Natur entsteht Wasserstoffperoxid photochemisch durch hohe Sonneneinstrahlung und in Gegenwart von Sauerstoff. Der bedeutendste Bildungsmechanismus von  $H_2O_2$  in Wasser verläuft über die Vorstufe des Superoxids ( $O_2^{\bullet-}$ ; Gleichung (4.1)). Superoxid wird in natürlichen Gewässern durch Reduktion von Sauerstoff gebildet. Hierbei generieren die lichtabsorbierenden Substanzen entweder freie Elektronen durch Photoionisation oder es findet ein Energietransfer der lichtabsorbierenden Substanzen im angeregten Zustand statt.



Da Wasserstoffperoxid während der gesamten Sommermonate nur direkt an der Oberfläche detektierbar war, die Chlorophyll-*a*- und AOB<sub>r</sub>-Konzentration ebenfalls im Bereich der Wasseroberfläche am höchsten war, wird vermutet, dass es sich um eine enzymatische Bildung organischer Bromverbindungen handelt, die mittels Haloperoxidase hauptsächlich nach dem Algenabsterben stattfindet.

#### 4.1.1.2 Spätsommermaxima im Berliner Wassersystem

Im Jahr 2005 wurden in verschiedenen Oberflächenwässern im Berliner Raum AOB<sub>r</sub>-Messungen durchgeführt. Diese sind in Bild 4.3 zusammengefasst. Im Tegeler See war im September 2005 lediglich eine maximale Konzentration von 9 µg/L AOB<sub>r</sub> zu messen. Dieses geringe Spätsommermaximum geht einher mit der bereits in Kapitel 1.2.1 (Seite 8) erläuterten Havelleitung und wurde in allen Jahren nach Inbetriebnahme der Havelleitung im Tegeler See beobachtet. Allerdings hat der für die AOB<sub>r</sub>-Bildung positive Effekt der Havelleitung im Tegeler See keinen Einfluss auf andere Berliner Oberflächengewässer. Wie in Bild 4.3 zu erkennen ist, steigt der AOB<sub>r</sub>-Gehalt im Wannsee im September 2005 auf 21,3 µg/L.

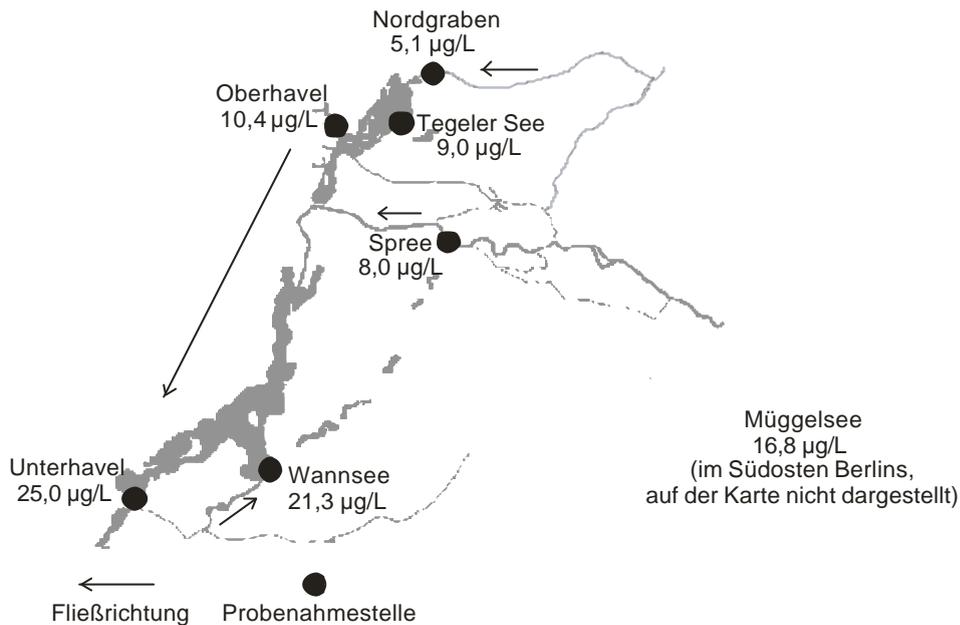


Bild 4.3: Berliner Gewässersystem mit AOB-Konzentrationen für ausgewählte Probenahmestellen, September 2005

Des Weiteren zeigt sich, dass die Zuläufe der Seen immer geringere AOB-Konzentrationen aufweisen (Nordgraben 5,1 µg/L, Oberhavel 10,4 µg/L und Spree 8,0 µg/L) und dass die Abläufe lediglich den AOB-Gehalt des Sees weiterleiten (Unterhavel 25,0 µg/L). Hierdurch wird die natürliche Bildung bromorganischer Substanzen im See bestätigt.

Auch im Müggelsee ist ein hoher AOB zu erkennen (16,8 µg/L). Dabei muss es sich nicht unbedingt um das Maximum handeln, da nur einmal im September der See beprobt wurde. Der Müggelsee ist im Unterschied zum Tegeler See und Wannsee nur gering anthropogen beeinflusst (Anhang II.i). Es kann bestätigt werden, dass die natürliche Bildung bromorganischer Verbindungen nicht nur auf abwasserbeeinflusste Gewässer beschränkt ist (Putschew et al., 2003).

## 4.1.2 Batchtests – Simulation im Labor

### 4.1.2.1 Seewasser-Batchtests

Um die Unabhängigkeit der Herkunft des Oberflächenwassers für Seewasser-Batchtests zu bestätigen, wurden Batchtests mit Wannsee- (WSee) und Tegeler See- (TSee) Wasser im Jahre 2003 durchgeführt. Beide Seen sind eutroph und durch kommunales Abwasser beeinflusst. Wie aus Bild 4.4 ersichtlich ist, kann mit beiden Wässern die Bildung organischer Bromverbindungen simuliert werden. Der Verlauf der AOB-Bildung ist für beide Batchtests ähnlich, was

möglicherweise auf den gleichen Probenahmezeitraum (Spätsommer 2003) und die gleichen Eigenschaften der Seen zurückzuführen ist.

In Bild 4.4 wurde zusätzlich der Batchversuch von Putschew et al. (2003) mit Müggelsee- (MSee) Wasser dargestellt. Im Gegensatz zum WSee- und TSee-Batchtest (AOBr > 60 µg/L in 200 d) ist im MSee-Batchtest sogar ein Anstieg auf 60 µg/L AOBr in nur 80 d zu beobachten. Die Seewasser-Batchtests zeigen, dass die AOBr-Simulation im Labor von der Herkunft des Oberflächenwassers unabhängig ist und dass kein Einfluss von kommunalen Abwässern auf die AOBr-Simulation vorliegt.

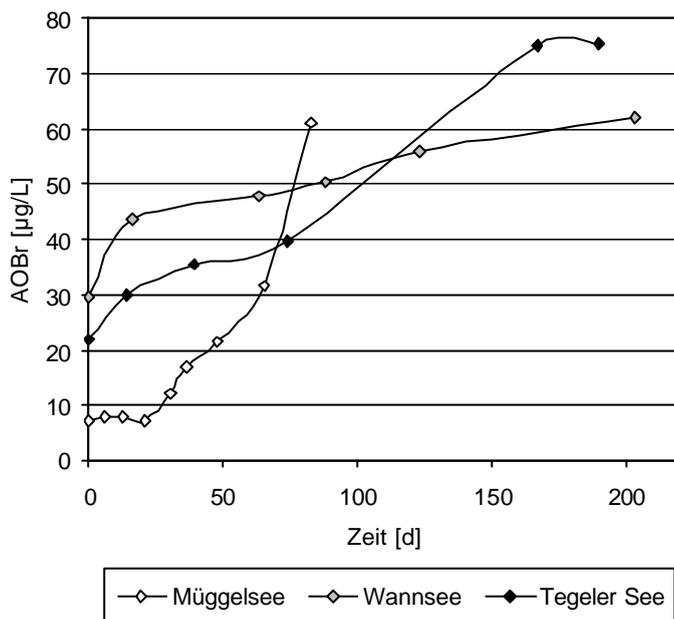


Bild 4.4: Simulation der AOBr-Bildung mit Wässern unterschiedlicher Herkunft: Beprobung – Müggelsee: März 2001 (Putschew et al., 2003), Wannsee: August 2003 und Tegeler See: September 2003 (Versuchsbedingungen siehe Tabelle II.3 im Anhang II.ii)

Der deutliche Unterschied der AOBr-Bildungsrate zeigt, wie die Wiederholbarkeit der AOBr-Bildung im Labor (in biologischen Systemen) schwankt. Die schlechte Reproduzierbarkeit der AOBr-Simulation mit Oberflächenwässern deutet wieder an, dass Organismen an der Bildung beteiligt sind. Für die unterschiedlichen AOBr-Bildungsraten ist hier die variierende Zusammensetzung der Biota selbst verantwortlich (Seewasser stammt aus unterschiedlichen Seen die zu unterschiedlichen Jahreszeiten und Jahren beprobt wurden). Einen weiteren Einfluss auf die AOBr-Simulation hat die Temperatur (MSee: 20 °C Klimakammer und TSee, WSee: Raumtemperatur im Labor) und die Beleuchtung (MSee 24 h/d, TSee und WSee 16 h/d), wobei die Biologie eher auf diese Versuchsparameter reagiert als es eine abiotische Reaktion tun sollte.

#### 4.1.2.2 Algen-Batchtests

Um einen möglichen Bildungsmechanismus formulieren zu können, wurden weitere Batchtests mit Kulturen phototropher Organismen durchgeführt. Hierfür wurde einmal die im Süßwasser weit verbreitete Grünalge *Desmodesmus subspicatus* verwendet, die auch als Kultur für Batchsimulationen von Putschew et al. (2003) herangezogen wurde. Des Weiteren wurde das Cyanobakterium *Microcystis aeruginosa*, bekannt als „Blualge“, für die Simulation mit Kulturen im Labor verwendet. Cyanobakterien sind durch die Bildung verschiedener Toxine (Cyanotoxine) bekannt. Bei hoher Sonneneinstrahlung und hoher Temperatur bilden sie starke Algenblüten in nährstoffreichen Gewässern aus.

Für die folgenden Cyanobakterien-Batchtests wurde im Unterschied zu allen weiteren Algen-Batchtests als Nährlösung filtriertes (0,45 µm) und autoklaviertes Tegeler See- Wasser verwendet. Vier Parallelversuche wurden angesetzt, wobei drei Versuche mit dem Cyanobakterium versetzt wurden und sich diese in einen hellen Versuch (Beleuchtung mit künstlichem Sonnenlicht), einen hellen Versuch mit Diuron<sup>®</sup>-Dotierung als Photosynthesehemmer und einen dunklen Versuch unterteilen. Zusätzlich wurde ein Blindversuch ohne Cyanobakterienkultur angesetzt, der ansonsten unter den gleichen Bedingungen wie der helle Versuch durchgeführt wurde.

In Bild 4.5A ist die Entwicklung der AOB<sub>r</sub>-Bildung dargestellt, wobei das verwendete Tegeler See- Wasser eine AOB<sub>r</sub>-Anfangskonzentration von  $12,3 \pm 0,9 \mu\text{g/L}$  hatte. Im Blindversuch ohne Cyanobakterien ist keine AOB<sub>r</sub>-Bildung und keine Individuenentwicklung zu beobachten, was wieder zeigt, dass eine abiotische Reaktion auszuschließen ist. Im „hell“-Versuch mit Cyanobakterien (Cybakt\_hell) konnte eine hohe Bildung an AOB<sub>r</sub> beobachtet werden. Innerhalb einer Versuchszeit von 11 d ist ein maximaler AOB<sub>r</sub> von  $54,9 \mu\text{g/L}$  messbar. Der Zusammenhang von AOB<sub>r</sub>-Bildung und Algenwachstum (von 493 Ind/µl auf 989 Ind/µl) macht den Einfluss der phototrophen Organismen für die AOB<sub>r</sub>-Entwicklung deutlich. Der dunkle Vergleichsversuch (Cybakt\_dunkel) zeigt dagegen nur eine geringe AOB<sub>r</sub>-Entwicklung in 11 d (AOB<sub>r</sub> =  $28 \mu\text{g/L}$ ). Die anfängliche AOB<sub>r</sub>-Zunahme im Dunklen ist im Einklang mit Beobachtungen von Putschew et al. (2003) und durch eine fortlaufende Aktivität phototropher Organismen auch ohne Lichtquelle zurückzuführen oder aber durch das Absterben der Organismen, gekoppelt mit einer AOB<sub>r</sub>-Freisetzung.

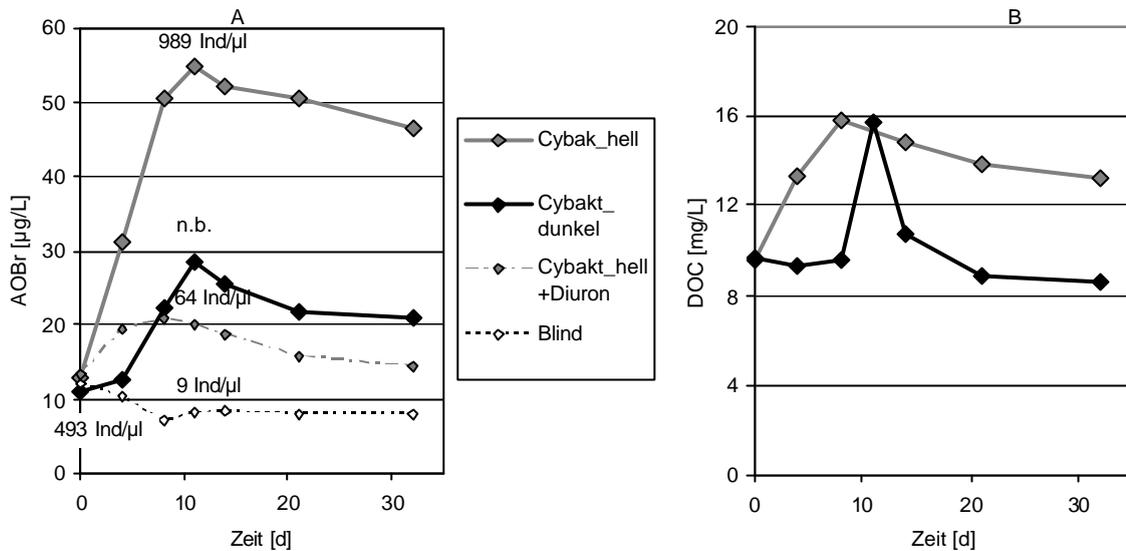


Bild 4.5: Batchversuche zum Einfluss phototropher Organismen auf die AOBr-Bildung in Cyanobakterien-Batchtests mit *Microcystis aeruginosa*, in filtriertem und autoklaviertem Tegeler See-Wasser und unter Bromidzusatz (100 µg/L): A) Verlauf der AOBr-Bildung unter Angabe der Individuenzahlen an Cyanobakterien [Ind/µL] (n.b. = nicht bestimmt) und B) Konzentrationen an gelöstem organischem Kohlenstoff (DOC); Blind = Blindversuch ohne Cyanobakterien, Cybakt\_hell = Cyanobakterienversuch im Hellen, Cybakt\_hell+Diuron = Cyanobakterienversuch im Hellen und unter Diuron®-Dotierung und Cybakt\_dunkel = Cyanobakterienversuch im Dunkeln

Im dunklen Versuchsansatz fand keine Bestimmung der Individuenzahlen statt aber an der Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC, Bild 4.5B), die nach 11 d einen Maximalwert von 16 mg/L erreichte, ist das Organismensterben zu erkennen. Der Diuron®-Versuch soll die Photosynthese-Beteiligung bei der Bildung organischer Bromverbindungen klären. Dabei zeigt sich ein Anstieg der AOBr-Konzentration in den ersten Tagen. Im Vergleich zum dunklen Versuchsansatz mit einer Produktion von 17 µg/L in 11 d (Berechnung durch Abzug der Anfangskonzentration) fällt die AOBr-Produktion im Diuron®-Versuch mit 7 µg/L in 11 d geringer aus, was auf die Hemmung der Photosynthese zurückzuführen ist. Das Organismensterben ist im Diuron®-Versuch anhand sinkender Individuenzahlen zu erkennen (von 493 Ind/µl auf 64 Ind/µl).

Gelöste organische Kohlenstoffverbindungen werden auch durch die Photosynthese erzeugt und freigesetzt. Die DOC-Freisetzung findet beim „dunkel“-Batchtest plötzlich statt (Anstieg um 6 mg/L in 3 d), was auf das Algensterben zurückzuführen ist. Dagegen kommt es beim „hell“-Versuch zu einem langsameren Anstieg des DOC (6 mg/L in 8 d), da fortwährend Photosynthese betrieben wird, die Organismenpopulation anwächst und organische Kohlenstoffverbindungen abgegeben werden. Der DOC-Anstieg im „hell“-Batchtest korreliert mit der AOBr-Produktion.

Im direkten Vergleich des Diuron<sup>®</sup>-Batchtests mit dem „dunkel“-Batchtest ist nach 32 d eine höhere AOB<sub>r</sub>-Endkonzentration für den „dunkel“-Versuch zu erkennen, was wiederum auf die fortlaufende Photosynthese unter Stress zurückzuführen ist. Wird davon ausgegangen, dass im Diuron<sup>®</sup>-Versuch die Photosynthese sofort stoppt, kann abgeleitet werden, dass 55 % des AOB<sub>r</sub> im „dunkel“-Versuch durch die Aktivität phototropher Organismen (Dunkelreaktion der Photosynthese) gebildet wurde und die restliche 45 % nach dem Organismensterben. Nicht klar ist, ob der AOB<sub>r</sub> in der wässrigen Phase nach dem Absterben gebildet worden ist oder durch Zelllysis freigesetzt wurde.

In Bild 4.6 ist ein Batchversuch mit *Microcystis aeruginosa* und einer mit *Desmodesmus subspicatus* dargestellt. Die beiden Kulturen wurden in speziellen Nährlösungen kultiviert und unter Bromiddotierung (100 µg/L) die AOB<sub>r</sub>-Bildung beobachtet. Insgesamt sind die Bildungsraten im Vergleich zum Seewasser- (20 µg/L in 80 d, Bild 4.4) und Cyanobakterien-Batchtest mit Tegeler See- Wasser (35 µg/L in 30 d, Bild 4.5A) um mindestens das Zehnfache geringer (Grünalge 1,2 µg/L und Cyanobakterium 2,3 µg/L in 80 d). Hierfür könnten fehlende Wasserinhaltsstoffe verantwortlich sein. Tegeler See-Wasser enthält zum Beispiel natürliches organisches Material (NOM), lichtabsorbierende Verbindungen, die bei der Wasserstoffperoxidbildung mitwirken und möglicherweise Brom in einer Form, die für die enzymatische Bromierung zugänglicher ist (OBr<sup>-</sup>, Br<sub>2</sub>, Br<sub>3</sub><sup>-</sup>). Die enzymatische Bildung organischer Bromverbindungen unter Beteiligung von NOM, Bromid und Wasserstoffperoxideinfluss wird im nächsten Kapitel 4.1.3 näher untersucht.

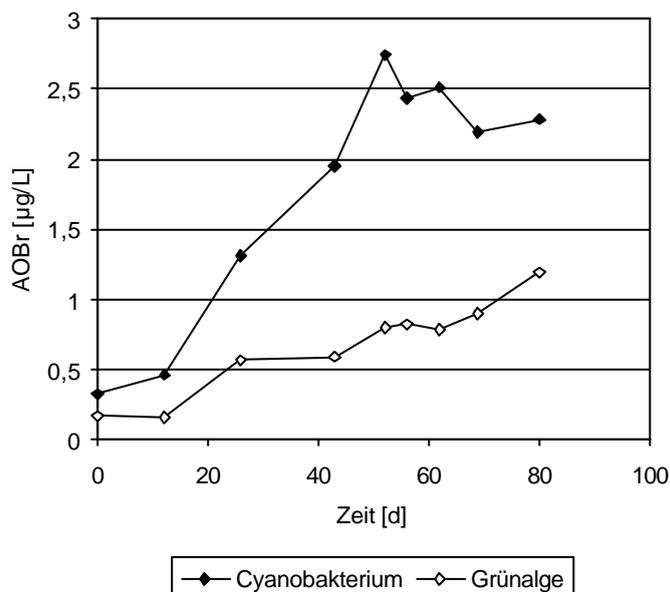


Bild 4.6: AOB<sub>r</sub>-Bildung in Algenkulturen-Batchtests mit dem Cyanobakterium *Microcystis aeruginosa* und der Grünalge *Desmodesmus subspicatus* in optimaler Nährlösung

Im Vergleich zum Grünalgen-Batchtest von Putschew et al. (2003), bei dem es zu einer Produktion von 3,3 µg/L AOBr in 76 d kam, wurde hier lediglich ein Gehalt von 1,2 µg/L in 80 d an AOBr gebildet. Vermutet wird, dass die geringe AOBr-Bildung im Grünalgen-Batchtest auf den Einfluss des biologischen Materials zurückzuführen ist. Putschew et al. (2003) verwendete einen anderen *Desmodesmus subspicatus* Stamm als es in diesem Versuch der Fall war (unterschiedliche Bezugsquellen).

Für die beiden Parallelversuche mit Cyanobakterien und Grünalgen sind unterschiedliche AOBr-Bildungsraten zu beobachten. *Microcystis aeruginosa* produziert in der gleichen Zeit (80 d) doppelt so viel AOBr (2,3 µg/L) wie *Desmodesmus subspicatus* (1,2 µg/L, Bild 4.6).

Aus dem marinen Bereich ist bekannt, dass Stress, wie zum Beispiel Dunkelheit oder Nährstoffmangel, zu erhöhten Produktionsraten halogenorganischer Substanzen führen kann (Laturnus et al., 2000). Daher wurde auch der Einfluss der Nährstoffkonzentration auf die Produktionsrate bromorganischer Verbindungen für beide Kulturen untersucht. Die Dunkelheit als Stressfaktor, wurde bereits auf Seite 35 diskutiert. Für den Einfluss der Nährstoffkonzentration wurde die Nährlösung in optimaler Konzentration und 1:10 verdünnt (reduziert) verwendet. Während Putschew et al. (2003) mit der Grünalge *Desmodesmus subspicatus* eine extreme Produktionssteigerung bei einem reduzierten Nährstoffangebot beobachten konnte, war dies hier nicht möglich. Sowohl optimale als auch reduzierte Nährstoffe ergaben 0,7 µg/L AOBr in 60 d, was wiederum am Algenstamm liegen kann (Nachweisgrenze 0,5 µg/L).

Dagegen ist im Parallelversuch mit dem Cyanobakterium *Microcystis aeruginosa* eine deutlich veränderte AOBr-Bildung zu beobachten. Im Bild 4.7 ist eine Produktion von 2,5 µg/L AOBr in 50 d durch die Cyanobakterien zu erkennen. Nach 50 d findet im optimalen Nährmedium keine weitere AOBr-Bildung mehr statt, während die Produktion im verdünnten Nährmedium erst nach 77 d mit 4,3 µg/L das Maximum erreicht zu haben scheint. Die zehnfache Reduktion der Nährstoffkonzentration hat also bei dem Cyanobakterium *Microcystis aeruginosa* im Vergleich zur optimalen Nährstoffkonzentration fast eine Verdoppelung der AOBr-Konzentration zur Folge.

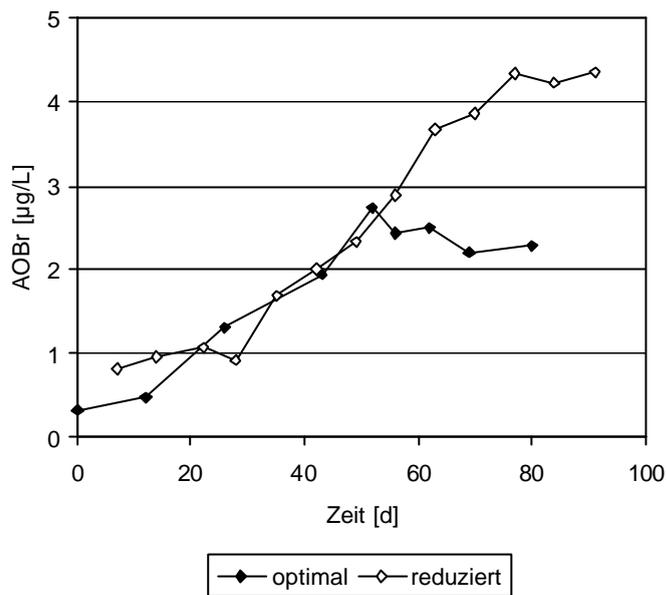


Bild 4.7: Einfluss der Nährmediumkonzentration auf die AOBr-Bildung im Batchtest mit dem Cyanobakterium *Microcystis aeruginosa*: optimal = optimale Nährstoffzusammensetzung, reduziert = verdünnte Nährstoffkonzentration (1:10)

### 4.1.3 Weitergehende Untersuchungen an speziellen Batchtests

Sowohl die Seewasser-Batchtests (Kapitel 4.1.2.1, Seite 31) als auch die Batchtests mit Algenkulturen (Kapitel 4.1.2.2, Seite 33) zeigen eindeutig eine Beteiligung von phototrophen Organismen an der Bildung organischer Bromverbindungen. Zusätzlich hat sich in der Feldstudie am Tegeler See (Kapitel 4.1.1.1, Seite 28) gezeigt, dass während der natürlichen Bildung bromorganischer Verbindungen Wasserstoffperoxid im Oberflächenwasser nachweisbar ist ( $11 \pm 1 \mu\text{g/L}$ ). Vermutet wird daher ein enzymatischer Bildungsmechanismus unter Wasserstoffperoxidbeteiligung. Daher wurden Batchversuche mit Wasserstoffperoxid und dem Enzym Bromperoxidase durchgeführt und das biologische Material genauer auf organische Bromverbindungen hin untersucht.

#### 4.1.3.1 Einfluss von Wasserstoffperoxid

Batchversuche mit Cyanobakterien unter Wasserstoffperoxidzugabe sollten Aufschluss auf die Enzymreaktion mit Haloperoxidase geben. Als Vorversuch wurde ein Cyanobakterien-Batchtest mit Zugabe von  $10 \mu\text{g/L}$  Wasserstoffperoxid angesetzt. Hierbei zeigte sich eine höhere AOBr-Produktion als ohne Wasserstoffperoxid und bei geringer Nährstoffkonzentration, was bisher zu den höchsten AOBr-Bildungsraten führte (Bild 4.8A). Nach dem Absterben des

Cyanobakteriums steigt der AOB<sub>r</sub> stetig an (Bild 4.8B), wobei die Bildung nicht nur schneller stattfindet (46 µg/L in 60 d), sondern auch zu viel höheren Konzentrationen führt.

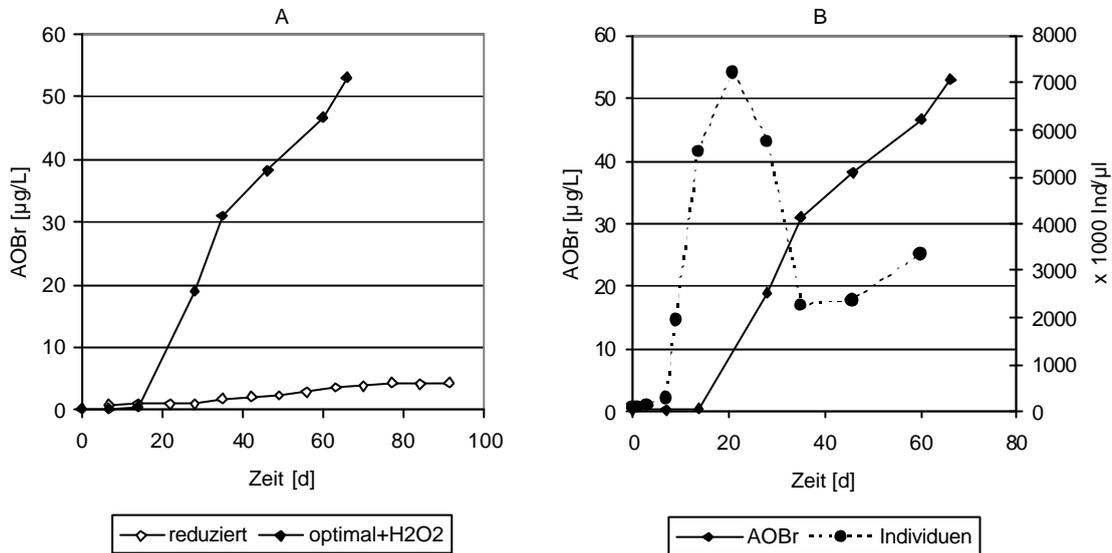


Bild 4.8: AOB<sub>r</sub>-Konzentration für zwei Cyanobakterien-Batchtests A) im optimalen Nährstoffmedium mit 10 µg/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Dotierung (optimal+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und im reduzierten Nährstoffmedium (reduziert) B) AOB<sub>r</sub> Bildung und Cyanobakterien-Individuenzahl unter Wasserstoffperoxideinfluss (optimal+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Die Zugabe höherer Konzentrationen an Wasserstoffperoxid führt zu keinen höheren AOB<sub>r</sub>-Bildungsraten und -Endwerten (Bild 4.9). Ungewöhnlich ist, dass der AOB<sub>r</sub>-Verlauf im Ansatz ohne Wasserstoffperoxidzugabe gleich dem in den Versuchen mit Wasserstoffperoxidzugabe ist. Hier sei angemerkt, dass beim Ansetzen der Batchtests Kulturen aus einem vorhergehenden Versuch verwendet wurden, bei dem bereits Wasserstoffperoxid zum Einsatz kam und so alle Organismen bereits einem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Kontakt ausgesetzt waren. Es scheint, dass bereits der Kontakt mit geringen Konzentrationen an Wasserstoffperoxid die Bildung von Haloperoxidasen bzw. die Aktivität dieser beeinflusst. Eine photochemische Bildung von Wasserstoffperoxid in den Batchtests ist prinzipiell auch vorstellbar, wird hier aber ausgeschlossen, da in Algen-Batchtests ohne Wasserstoffperoxid dosierung und ohne vorherigen Kontakt mit Wasserstoffperoxid viel geringere AOB<sub>r</sub>-Gehalte gemessen wurden.

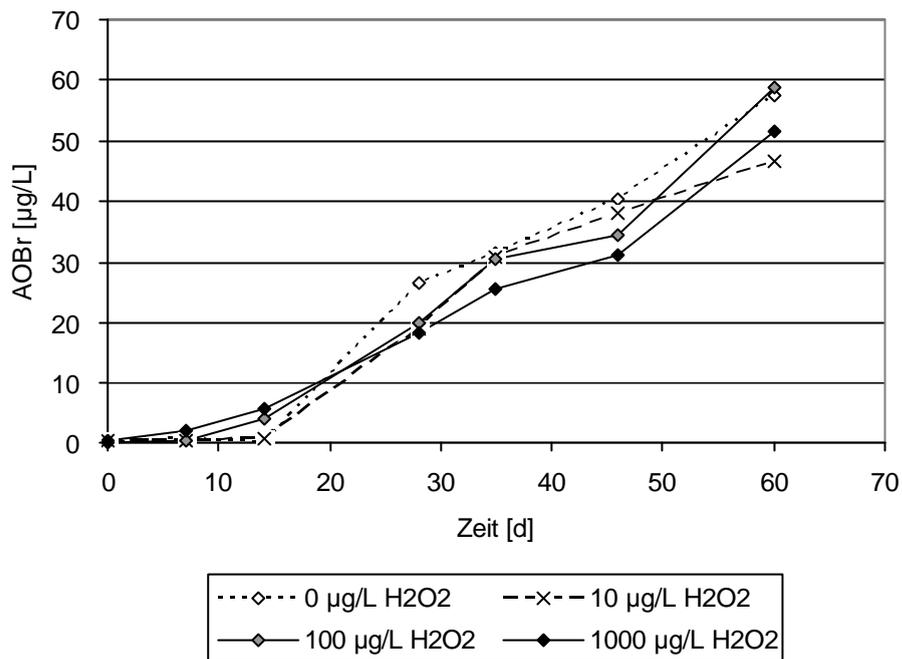


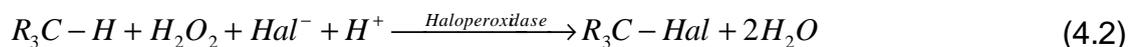
Bild 4.9: AOBr-Bildung in Cyanobakterien-Batchtests mit unterschiedlichen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen

Die hier durchgeführten Laborsimulationen führten zu ähnlich hohen AOBr-Gehalten, wie sie auch im Feld bestimmt werden konnten. Das Maximum an AOBr im Feld wurde immer im Spätsommer gemessen, also nach bzw. zu einer Zeit in der auch Wasserstoffperoxid in Oberflächengewässern nachweisbar ist. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Wasserstoffperoxidkonzentrationen in Oberflächengewässern zwischen 44 und 110 µg/L liegen können (Cooper et al., 1988). Auch im Tegeler See konnte Wasserstoffperoxid nachgewiesen werden (11 ± 1 µg/L, Kapitel 4.1.1.1, Seite 29), so dass eine enzymatische Reaktion durch Haloperoxidasen bzw. Bromperoxidasen, die Wasserstoffperoxid benötigt, sehr nahe liegend ist. Für solch eine enzymatische Reaktion spricht auch, dass das AOBr-Maximum im Feld immer im Spätsommer nach hoher Sonneneinstrahlung beobachtet wurde, dass eine hohe Sonneneinstrahlung nötig ist für eine Wasserstoffperoxidbildung und dass eine hohe Aktivität von Bromperoxidasen in den Sommermonaten zu beobachten ist (Flodin et al., 1999).

#### 4.1.3.2 Haloperoxidasebeteiligung

Aus dem marinen Bereich ist die Bildung halogenorganischer Verbindungen durch Haloperoxidasen bekannt. Obwohl der Mechanismus der enzymatischen Halogenierung durch Haloperoxidasen kontrovers diskutiert wird (Kapitel 1.1.2.2, Seite 6), ist die Beteiligung von Wasserstoffperoxid eindeutig. Das

Enzym wandelt aktivierte C-H Bindungen in C-Hal Bindungen unter Anwesenheit von Halogeniden und Wasserstoffperoxid nach Gleichung (4.2) um.



Für die Bildung bromorganischer Verbindungen kommt die Haloperoxidase-Reaktion in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid in Frage. Als Beispiel wurde die Reaktion mit Bromperoxidase (Meerrettichisolat) näher untersucht. Um die Beteiligung der Bromperoxidase bei der AOBr-Bildung zu klären, wurden Batchtests in aufkonzentriertem (1:10) und autoklaviertem Tegeler See-Wasser durchgeführt, mit Bromperoxidasezugabe und ohne Zusatz von phototrophen Organismen. Die Tests wurden mit Bromid (100 µg/L) und einem Überschuss an Wasserstoffperoxid (10 mM = 340 mg/L) dotiert. Da nur einmal mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dotiert wurde, ist ein Überschuss eingesetzt worden. Eine toxische Wirkung kann in diesem Versuch ausgeschlossen werden, da nicht mit lebenden Organismen gearbeitet wurde. Die Enzymaktivität wurde durch den Monochlorodimedone- (MCD) Assay gemessen (Anhang II.v.viii). In Bild 4.10A ist die Abnahme der Enzymaktivität für den Bromperoxidasedotierten Versuch (BrPOD-Test) zu erkennen.

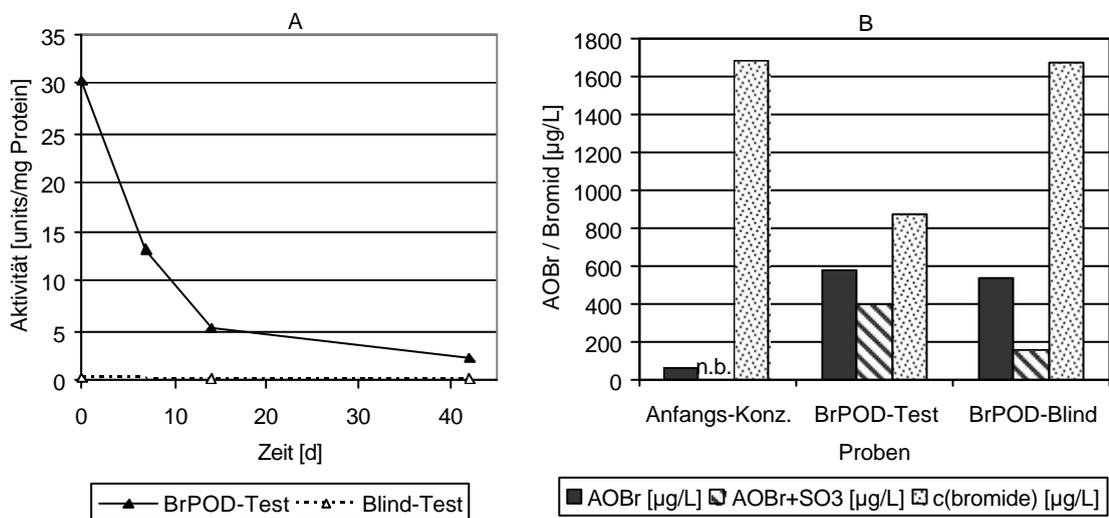


Bild 4.10: Bromoperoxidaseaktivität und AOBr-Bildung im Bromoperoxidase-Batchtest (BrPOD-Test) und Blindtest ohne Enzymdotierung (BrPOD-Blind) mit aufkonzentriertem (1:10) und autoklaviertem Tegeler See-Wasser dotiert mit Bromid (100 µg/L), Wasserstoffperoxid (340 mg/L) und Bromoperoxidase (2 units/ml): A) Abnahme der Enzymaktivität, B) Messung der Konzentration an AOBr, AOBr nach Sulfitzugabe und anorganisches Bromid nach 49 d (n.b. = nicht bestimmt)

Da in dem Blindtest (BrPOD-Blind) keine Bromperoxidase-Dotierung stattfand ist auch durchweg keine Aktivität messbar. Allerdings ist überraschender Weise sowohl für den Blindversuch als auch für den BrPOD-Versuch eine Bildung hoher AOB<sub>r</sub>-Konzentrationen zu erkennen (Bild 4.10B). Nach 49 d Reaktionszeit ist die Enzymaktivität im BrPOD-Test mit 2 units/mg Protein minimal und die AOB<sub>r</sub>-Konzentrationen liegen bei 576 µg/L beziehungsweise 532 µg/L in BrPOD-Blind, wobei die Anfangskonzentration der aufkonzentrierten Tegeler See- Wasserprobe 53 µg/L AOB<sub>r</sub> betrug (Anfangs-Konz.; Bild 4.10B). Eine AOB<sub>r</sub>-Bildung ohne Enzymwesenheit ist erstaunlich und korreliert nicht mit einem Vorversuch, in dem die Reaktion zwischen Wasserstoffperoxid (5 mg/L), Bromid (500 µg/L) und natürlichem organischen Material (NOM) aus dem Suwannee River (U.S.A.) in u.p. Wasser (20 mg/L) untersucht wurde. In diesem abiotischen Vorversuch ohne Organismen und Enzyme fand keine AOB<sub>r</sub>-Bildung statt (siehe Anhang III.ii, Tabelle III.1).

Um die AOB<sub>r</sub>-Bildung im Blindversuch näher zu betrachten, wurden weitere Parameter untersucht. Zum einen wurde der Gehalt an anorganischem Bromid gemessen. Die Anfangskonzentration an Bromid setzt sich aus der zehnfachen Konzentration des Tegeler See- Wassers und der Bromiddotierung zusammen ( $\text{Br}^-_{\text{gesamt}} = 1680 \text{ µg/L}$ , gemessen). Im Gegensatz zum BrPOD-Test, bei dem die Bromidkonzentration um 52 % abnahm, ist der Gehalt an anorganischem Bromid in BrPOD-Blind unverändert bei 99 % der Ausgangskonzentration (Bild 4.10B) geblieben. Laut Bromidkonzentration hat demzufolge keine Bildung bromorganischer Substanzen im Blindversuch stattgefunden.

Der Gehalt an nicht reduzierbarem AOB<sub>r</sub> durch Sulfitzugabe vor der Anreicherung für die AOB<sub>r</sub>-Messung wurde ebenfalls bestimmt. Zur Reduzierbarkeit des AOB<sub>r</sub> wurde ein eigenes Kapitel 4.3.1.3 (Seite 65) geschrieben, in dem der Mechanismus und die Bedeutung der Sulfitreduktion verdeutlicht werden. Hier soll nur kurz der vermutete Reaktionsmechanismus erwähnt werden. Da die Proben vor der Anreicherung für die AOB<sub>r</sub>-Bestimmung mit Salpetersäure auf pH 2 eingestellt wurden, wurden saure und oxidative Bedingungen geschaffen. Unter diesen Bedingungen ist für Iod die Bildung von molekularem Iod ( $\text{I}_2$ ) und Polyiodid ( $\text{I}_3^-$ ,  $\text{I}_5^-$ ,  $\text{I}_7^-$ ) bekannt (Bruchertseifer et al., 2003). Es ist vorstellbar, dass auch Bromid zu derartigen Polybromiden reagiert, die während der Anreicherung an Aktivkohle miterfasst werden. Um diesen Überbefund auszuschließen, wurden die Proben vor der Anreicherung mit Sulfit versetzt, was Polybromide wieder zu Bromid reduzieren soll. In Bild 4.10B ist deutlich zu erkennen, dass der Gehalt an organischen Bromverbindungen nach Sulfitreduktion in BrPOD-Blind (148 µg/L) viel geringer ist als in BrPOD-Test (391 µg/L). Es wird davon ausgegangen, dass die hohe Bromidkonzentration von 1680 µg/L die AOB<sub>r</sub>-Messung ohne vorhergehende Sulfitzugabe stört. Der weiterhin messbare AOB<sub>r</sub>-Gehalt nach Sulfitzugabe in BrPOD-Blind liegt wahrscheinlich an einer unzureichenden Dotierung mit Sulfit

und demnach keiner vollständigen Reduktion der gebildeten Polybromide. Sowohl die unveränderte Bromidkonzentration im Blindversuch als auch der kurz erwähnte Vorversuch sprechen gegen eine abiotische AOBBr-Bildung im Blind-Test.

Im Gegensatz zum Blindtest hat in dem BrPOD-Test tatsächlich eine Umsetzung von anorganischem Bromid in organisch gebundenes Brom stattgefunden. Nach 49 d beträgt der AOBBr-Gehalt 576 µg/L bzw. nach Sulfitreduktion 391 µg/L. Der Gesamtbromgehalt der Ausgangslösung betrug 1739 µg/L (Summe AOBBr und Bromid), nach 49 d betrug dieser Gehalt lediglich 1449 µg/L bzw. 1264 µg/L, wenn der AOBBr nach Sulfitreduktion berücksichtigt wird. Der Verlust von 17 bzw. 27 % Brom ist durch die komplexe Matrix bedingt. Wie am Beispiel des AOBBr gezeigt, werden die Bestimmungen durch die komplexe Matrix nachteilig beeinflusst. Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei diesem Versuch leicht flüchtige organische Bromverbindungen gebildet wurden.

Die Wiederholung dieses Versuches unter identischen Bedingungen mit NOM aus zwei unterschiedlichen Quellen bestätigt die AOBBr-Bildung mittels Bromperoxidase. Es wurde je ein Batchtest mit Tegeler See- Wasser (TSee) ohne vorhergehende Aufkonzentration (DOC = 6,9 mg/L) und mit einem NOM Standard aus dem Suwannee River (U.S.A.) in ultrareinem Wasser (DOC = 5,1 mg/L) unter Zugabe von 100 µg/L Bromid angesetzt. Zu beiden Batchtests wurden Blindversuche ohne BrPOD-Dotierung durchgeführt, die ebenfalls 100 µg/L Bromid enthielten. In beiden Blindversuchen wurden keine steigenden AOBBr-Konzentrationen gemessen, was auf geringere Bromid- und NOM-Konzentrationen zurückzuführen ist. Dagegen fand in beiden BrPOD-Versuchen (TSee und NOM) eine Bildung von bromorganischen Verbindungen statt, wobei in dem NOM-Test höhere Konzentrationen gebildet wurden (22 µg/L) als in dem TSee-Test (3 µg/L). Die geringe Bildung bromorganischer Verbindungen in diesem TSee-Test im Gegensatz zum zuvor beschriebenen BrPOD-Test ist auf die geringe Konzentration an NOM (Tegeler See- Wasser nicht 1:10 aufkonzentriert) und kürzere Versuchsdauer (26 d gegenüber 49 d) zurückzuführen. Insgesamt scheint zusätzlich zur Konzentration an NOM die Zusammensetzung des organischen Materials für die enzymatische Bildung organischer Bromverbindungen eine Rolle zu spielen. Suwannee River NOM hat ein höheres Potential durch Bromperoxidasen bromiert zu werden, als NOM aus dem Tegeler See.

Um eine mögliche Haloperoxidaseaktivität in Labor-Batchtests zu messen, wurde die Bromierung von Monochlorodimedon (MCD) untersucht. Hierbei handelt es sich um einen Standard MCD-Assay zur Messung von Enzymaktivitäten für die Bromierung. MCD absorbiert bei einer Wellenlänge von 290 nm. Eine Bromierung von MCD ist zu erkennen, wenn die Absorption sinkt.

Dieser Effekt ist in dem BrPOD-Batchtest deutlich zu erkennen (Bild 4.11), da Bromperoxidase zugesetzt wurde. In den Seewasser- bzw. Algen-Batchtests ist keine Bromierungsaktivität detektierbar. Wahrscheinlich ist die Konzentration an bromierenden Enzymen in den Batchtests zu gering. Es wird allerdings nicht ausgeschlossen, dass trotzdem Haloperoxidase-Enzyme in den Batchtests vorhanden sind, die eine Bromierung natürlichen organischen Materials katalysieren können. Da der MCD-Assay in filtrierten Proben durchgeführt wurde, können keine intrazellulären Enzyme erfasst worden sein. Für eine bessere Detektion mittels MCD-Assay sollten die entsprechenden Enzyme aus der wässrigen Phase und aus der Zelle isoliert und aufkonzentriert werden.

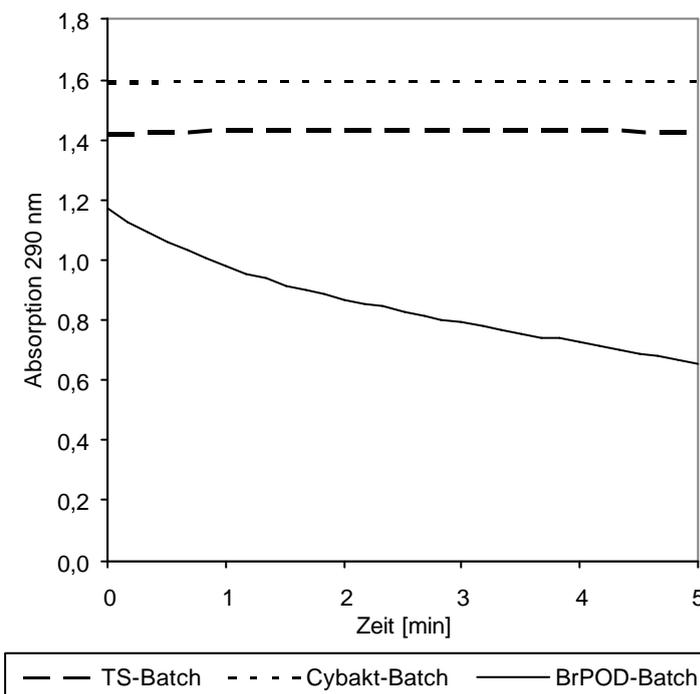


Bild 4.11: Messung der Bromierungsaktivität für Monochlorodimedon in drei Batchtests: TSee-Batch = Tegeler See- Wasser-Batchtest (Alter 203 d), Cybakt-Batch = Cyanobakterien-Batchtest mit *Microcystis aeruginosa* in optimalem Nährmedium und 10 µg/L  $H_2O_2$ -Dotierung (41 d) und BrPOD-Batch = Bromperoxidase-Batchtest in 1:10 konzentrierten Tegeler See-Wasser

#### 4.1.3.3 Extra- und intrazelluläre AOBr-Bildung

Sowohl im Feld als auch in Batchversuchen hat sich gezeigt, dass die Konzentration an organischen Bromverbindungen erst nach Absterben der Algen stark ansteigt. Demnach stellt sich die Frage nach dem Ort der AOBr-Bildung: extrazellulär oder intrazellulär. Falls es sich um eine intrazelluläre Bildung handelt, gilt zusätzlich zu klären, ob die bromorganischen Verbindungen erst nach Absterben der Organismen und Zelllysis in die

Umgebung freigegeben werden oder permanent aus der noch lebenden Zelle abgegeben werden.

Dazu wurden in einem Cyanobakterien-Batchtest unter reduzierten Nährstoffbedingungen (1:10 verdünnte Nährlösung) verschiedene Bromspezies gemessen und nach Lokalisierung getrennt. Intrazelluläre Brombestimmungen (intraBrom) und extrazelluläre Bromidmessungen (extraBr-) ergeben eine annähernde Korrelation zwischen Bromaufnahme und Bromidabgabe durch die Zelle (Bild 4.12A). Nimmt der intrazelluläre Bromgehalt zu, so sinkt die extrazelluläre Bromidkonzentration und genauso steigt der extrazelluläre Bromidgehalt mit abnehmender Bromkonzentration in den Zellen.

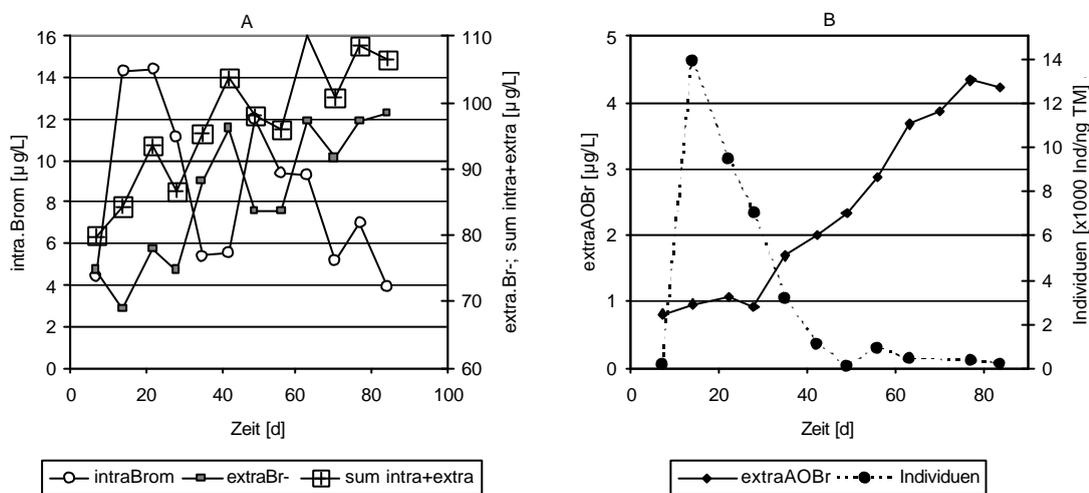


Bild 4.12: Cyanobakterien-Batchtest mit *Microcystis aeruginosa* im reduzierten Nährmedium (1:10 verdünnt, Details siehe Tabelle II.3 im Anhang II.ii): A) intrazelluläre Bromkonzentration (intraBrom), extrazelluläre Bromidkonzentration (extraBr-) und berechnete Summe aller organischen und anorganischen Bromspezies (sum intra+extra) und B) extrazelluläre AOBrom-Konzentration und Zahl an Cyanobakterien pro ng Trockenmasse (Individuen)

Der Anteil an extrazellulärem Bromid ist generell höher (70-98  $\mu\text{g/L}$ ) als der intrazelluläre Bromgehalt (4-14  $\mu\text{g/L}$ ). Abgesehen von kleinen Schwankungen steigt mit zunehmender Zeit der extrazelluläre Bromidgehalt und der intrazelluläre Bromgehalt nimmt ab. Bild 4.12B zeigt die Individuenzahlen mit zunehmender Zeit, sowie den extrazellulär organisch gebundenen Bromgehalt (extraAObrom). Innerhalb der ersten 20 d nimmt die Individuenzahl stark zu und danach rapide ab. Auffällig ist, dass der extraAObrom zunächst konstant ist und erst dann steigt, wenn die Zelldichte abnimmt, wobei die extraAObrom-Konzentration generell niedrig ist. Am Ende des Versuchs wurden lediglich 4  $\mu\text{g/L}$  extraAObrom nachgewiesen. Diese Daten zeigen eindeutig, dass der größte Teil des intrazellulären Broms aus anorganischem Bromid besteht,

welches auch unverändert als Bromid wieder abgegeben wird. Auch dieser Versuch zeigt wieder, dass erhöhte AObBr-Konzentrationen erst dann auftreten, wenn die Individuen absterben.

Die Brombilanz geht unter Berücksichtigung aller gemessenen Bromspezies (extrazelluläres AObBr, intrazelluläres Brom und extrazelluläres Bromid) in Bezug auf das zugegebene Bromid zu  $100 \pm 7 \%$  auf. In den ersten 28 d findet eine Etablierung und Anpassung der Organismen an die neuen Versuchsbedingungen statt, sodass in dieser Zeit die Summe der Bromspezies nicht ganz dem Ausgangsgehalt an Bromid entspricht.

In einem weiteren Cyanobakterien-Batchtest mit *Microcystis aeruginosa* unter optimalen Nährstoffbedingungen wurde ebenfalls eine Brombilanz angestrebt. Dabei wurde der intrazelluläre Bromgehalt in anorganisches Bromid und organisch gebundenes Brom differenziert. Der bisher gemessene intrazelluläre Bromgehalt (intraBrom) beinhaltet sowohl anorganische als auch organische Bromspezies in der Zelle. Für die Differenzierung wurden die abgetrennten Zellen hydrolysiert und das Hydrolysat mit Dichlormethan extrahiert. Anschließend wurde der Bromgehalt des Extrakts bestimmt (Details siehe Anhang II.v.iv).

Für diesen Cyanobakterien-Batchtest wurden folgende Bromparameter bestimmt:

1. intraBrom – gesamte organische und anorganische Bromkonzentration in der Zelle,
2. intraOBr – Konzentration an organischen Bromverbindungen in der Zelle,
3. extraAObBr – extrazelluläre adsorbierbare organische Bromverbindungen und
4. extra Br- – extrazelluläre Bromidkonzentration.

Zur Darstellung der einzelnen Bromfraktionen in- und außerhalb der Zelle wurde der intrazelluläre Gehalt an anorganischem Bromid (intraBr-) durch Differenz zwischen intraBrom und intraOBr berechnet. Um das Wachstum der Cyanobakterien zu verfolgen wurde zusätzlich die Individuenzahl bestimmt.

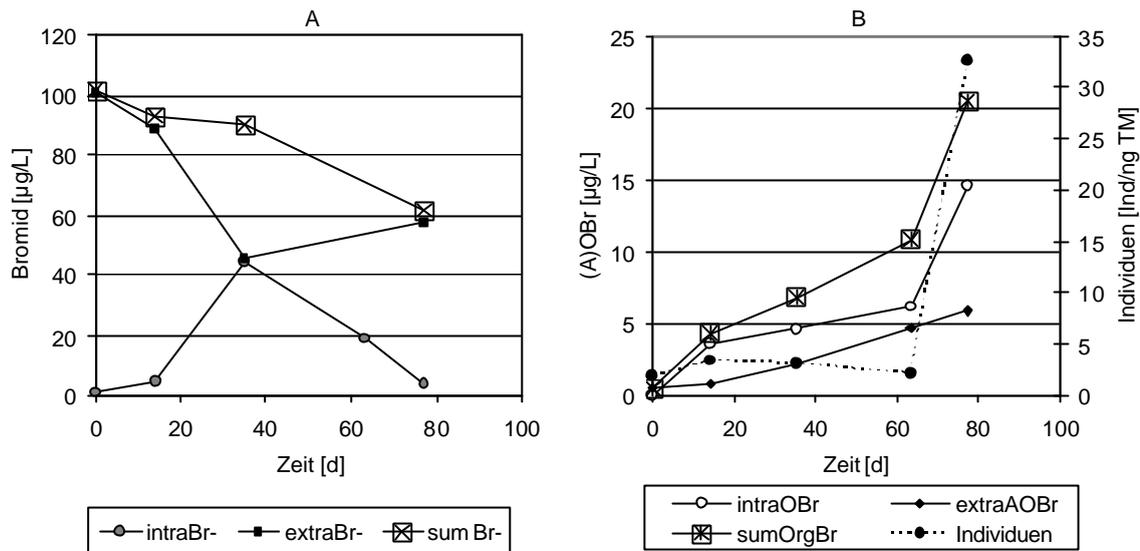


Bild 4.13: Cyanobakterien-Batchtest mit *Microcystis aeruginosa* im optimalen Nährmedium (Details siehe Tabelle II.3 im Anhang II.ii): A) intrazelluläre Bromidkonzentration (intraBr-), extrazelluläre Bromidkonzentration (extraBr-) und berechnete Summe aller Bromidspezies (sumBr-) B) intrazelluläre organische Bromverbindungen (intraOBr), extrazelluläre adsorbierbare organische Bromverbindungen (extraAOBr), berechnete Summe aller organischen Bromspezies (sumOrgBr), Zahl der Cyanobakterien Individuen (Individuen)

In Bild 4.13 ist die Brombilanz für den Verlauf des Cyanobakterien-Batchtests dargestellt. Die Summe der extrazellulären und intrazellulären Bromidkonzentration nimmt mit zunehmender Versuchsdauer ab (um  $40,1 \mu\text{g/L}$  in 79 d, Bild 4.13A). Der Konzentrationsverlauf von extrazellulärem und intrazellulärem organisch gebundenem Brom zeigt einen gegenläufigen Trend (Bild 4.13B). Die Konzentration beider Parameter steigt mit der Versuchszeit von 0 auf  $20,5 \mu\text{g/L}$  in 79 d). Die Summe aller bestimmten anorganischen und organischen Bromspezies liegt über die ganze Versuchszeit bei  $95 \mu\text{g/L} \pm 7 \%$ , womit die Brombilanz zu  $93 \pm 7 \%$  in Bezug auf die zugegebene Bromidkonzentration aufgeht. Betrachtet man den Konzentrationsverlauf des anorganischen Bromids, so bestätigt sich die zuvor gemachte Beobachtung. Auch hier gibt es einen Zusammenhang zwischen dem intra- und extrazellulären Bromid vor. Durch die Aufnahme von Bromid in die Zelle sinkt der extrazelluläre Bromidgehalt. Nach 35 d steigt die Bromidkonzentration der wässrigen Phase wieder an und der Bromidgehalt der Zellen nimmt ab. Bis zu Tag 60 wurde ein gehemmtes bzw. kein Algenwachstum festgestellt (Bild 4.13B), sodass die Auf- und Abgabe von Bromid durch die Zelle "wahllos" passiert und nicht an Wachstum gebunden ist. Die Konzentration des organisch gebundenen Broms steigt sowohl in der Zelle als auch außerhalb der Zelle über die gesamte Versuchszeit, wobei der Gehalt an intrazellulärem organischem Brom generell höher ist. Die höchste Bildungsrate an intrazellulärem organischem Brom ist nach 60 d zu erkennen, wenn die Algen wachsen. Im

Unterschied dazu steigt der Gehalt an organisch gebundenem Brom in der wässrigen Phase über die gesamte Versuchszeit fast linear. Organische Bromverbindungen werden demnach intrazellulär gebildet. Der Gehalt an extrazellulärem organischem Brom kann aus Freisetzung dieser Verbindungen herrühren und aus einer Bildung in der wässrigen Phase unter Beteiligung von Haloperoxidasen, die ebenfalls von den Zellen nach dem Zelltod abgegeben werden können. Die größte Bromfraktion in der Zelle wird durch das aufgenommene anorganische Bromid gebildet, wobei der organisch gebundene Brom-Anteil durch Zellwachstum bedeutender wird. Nach dem Absterben der Organismen kann der freigesetzte Anteil an anorganischem Bromid durch die zusätzliche Freisetzung von Haloperoxidasen extrazellulär mit NOM zu organischen Bromverbindungen reagieren und so die AOB<sub>r</sub>-Konzentration stark ansteigen lassen.

Beim Vergleich der beiden Cyanobakterien-Batchtests für die Erstellung von Brombilanzen fällt ein sehr unterschiedliches Wachstumsverhalten auf. Während im ersten Versuch (Bild 4.12B) die Organismen bereits nach 14 d ihre maximale Population erreicht haben, ist im zweiten Versuch (Bild 4.13B) nach 77 d noch kein Ende der Cyanobakterienentwicklung zu erkennen. Obwohl die Wachstumsbedingungen im zweiten Versuch optimaler waren, ist die Zahl der Organismen viel kleiner. Die besseren Wachstumsbedingungen ergeben sich durch zwei Versuchsparameter:

1. Nährstoffangebot – im zweiten Versuch war das Nährstoffangebot höher
2. Beleuchtung – der zweite Versuch fand in einem 5 L Batchvolumen mit neuen Lampen statt.

Warum unter den vermeintlich optimaleren Bedingungen die Algenentwicklung schlechter war ist nicht eindeutig zu klären, zeigt jedoch erneut die hohe Varianz von Versuchen unter dem Einfluss der Biologie. Möglicherweise kommt es im zweiten Versuch zu einer Lichthemmung, durch eine höhere Lichtintensität und geringere Selbstbeschattung der Cyanobakterien. Die Stressfaktoren Licht und Nährstoffbedarf könnten aber auch im ersten Versuch zu einem schnellen Wachstum führen, der nach kurzer Zeit sein Maximum erreicht und zum Absterben der Organismen führt. In diesem Fall kann es auch ganz einfach an den Cyanobakterien liegen, die aus einem anderen Stamm als die zuvor benutzten kamen.

Insgesamt konnte in den zwei beschriebenen Batchtests eine intrazelluläre und eine extrazelluläre Bildung organischer Bromverbindungen beobachtet werden. Hierbei deutet sich eine Abhängigkeit der AOB<sub>r</sub>-Bildungsorte in Abhängigkeit von der Wachstumsgeschwindigkeit an. Bei einem schnellen Wachstum, wie im ersten Versuch, findet überwiegend eine extrazelluläre AOB<sub>r</sub>-Bildung statt, wogegen während eines langsamen Wachstums eine überwiegend intrazelluläre Bildung bromorganischer Verbindungen zu beobachten ist.

## 4.2 Methoden für die Detektion von Einzelstoffen

Für die Detektion von unbekanntem Verbindungen eignet sich die Massenspektrometrie. Wie unten gezeigt wird, können durch die Gaschromatographie (GC) unpolare bis mittel polare Verbindungen (nach Derivatisierung) durch das Massenspektrometer (MS) detektiert werden. Um unbekannte bromorganische Verbindungen zu finden, müssen alle Peaks genau analysiert werden. Allerdings ist es schwierig das Molekulargewicht zu bestimmen, da bei diesem Verfahren das Molekülion nicht intensiv ist, sondern oft stabile Fragmente detektiert werden. Durch die Kopplung von Flüssigkeitschromatographie (LC) mit dem MS können eher polare Verbindungen detektiert werden. Im Unterschied zur GC-MS, werden hier die Moleküle mit höchster Intensität detektiert, allerdings ist die Empfindlichkeit viel schlechter, sodass die „Suche“ nach unbekanntem Verbindungen schwierig ist. Da die Ionisierung im Fall der LC-MS ein chemisch-physikalischer Prozess ist, können Parameter verändert werden, sodass auch eine elementselektive Detektion erfolgen kann, wie für organische Iodverbindungen durch Putschew und Jekel (2003) gezeigt.

### 4.2.1 Massenspektrometrie (MS)

#### 4.2.1.1 Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Bei der GC-MS werden die Substanzen im Inlet des GC verdampft, über eine Kapillarsäule getrennt und dann über eine Transferline in das MS überführt. Die Ionisierung erfolgt im Hochvakuum durch Elektronenstoß. Diese Form der Ionisierung ist sehr gut reproduzierbar, sodass unbekanntem Verbindungen mit Hilfe von Spektrenbibliotheken nachgewiesen werden können.

Bromorganische Verbindungen lassen sich anhand von Isotopenmustern erkennen. Brom hat zwei Isotope, die in der Natur mit einem Verhältnis von 1:1 vorkommen. Bedingt durch beide Isotope  $^{79}\text{Br}$  und  $^{81}\text{Br}$  weisen die Massenspektren bromorganischer Verbindungen je nach Bromierungsgrad charakteristische Isotopenmuster auf. Es handelt sich um sogenannte „A+2“-Elemente: das sind Elemente mit zwei Isotopen, von denen das zweite zwei Masseneinheiten schwerer ist als das häufigste Isotop. „A+2“-Elemente sind zum Beispiel Chlor und Brom aber auch Sauerstoff, Silizium und Schwefel. In Tabelle 4.1 sind die Isotopenverhältnisse für unterschiedlich hoch bromierte Verbindungen aufgeführt. Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass bromorganische Verbindungen zusätzlich chloriert sein können und Chlor durch seine Isotope  $^{35}\text{Cl}$  und  $^{37}\text{Cl}$  ebenfalls Isotopenmuster bildet, die sich mit denen von Brom überlagern. Da das natürliche Verhältnis der beiden Chlorisotope 3:1 ist, können auch Cl/Br kombinierte Isotopenmuster auf den Gehalt an Chloratomen und Bromatomen hin ausgewertet werden. Auf diese Weise

konnten drei verschiedene Bromverbindungen identifiziert werden, wie in Kapitel 4.3.2.1 (Seite 70) ausführlich dargestellt wird.

*Tabelle 4.1: Natürliche Isotopenhäufigkeit von Verbindungen mit verschiedenem Bromierungsgrad*

Masse	Zahl der Br-Atome			
	1	2	3	4
A	100	51,5	34,3	17,6
A+2	97,3	100	100	68,5
A+4		48,7	97,3	100
A+6			31,6	64,9
A+8				15,8

#### 4.2.1.2 Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)

Im Fall der LC-MS-Kopplung erfolgt die Trennung der Substanzgemische durch eine Flüssigkeitschromatographie. Im Unterschied zur GC werden die Substanzen nach Injektion nicht in die Gasphase überführt. Nach chromatographischer Trennung erfolgt die Ionisierung in der Regel durch Elektrosprayionisierung (ESI), wobei zwischen negativen und positiven Ionen (NI, PI)-ESI unterschieden wird. Unbekannte Bromverbindungen können auch hier am Isotopenmuster erkannt werden. Allerdings ist der scan-Modus, der alle Massen im Bereich definierter  $m/z$  Werte detektiert, sehr unempfindlich, sodass der Nachweis von Verbindungen mit niedriger Konzentration sehr schwer ist. Aus diesem Grund wurde die Übertragbarkeit einer Methode zur selektiven Detektion von organischen Iodverbindungen via Iodid (Putschew and Jekel, 2003) auf bromorganische Substanzen geprüft. Sollte dies möglich sein, können durch die gewonnenen Kenntnisse über die Retentionszeiten bromorganischer Verbindungen durch scan-Messungen Massenspektren extrahiert werden, auch dann, wenn die Konzentrationen sehr niedrig sind. Bei der Methode zur elementselektiven Detektion werden die Quellen-Parameter nicht dahingehend optimiert, dass Molekülionen mit möglichst hoher Ausbeute generiert werden, sondern die Verbindungen werden bereits in der Quelle fragmentiert. Im Fall iodorganischer Verbindungen ist Iodid ein Fragment, das dann im "selected ion monitoring modus" (SIM) unter NI-ESI Bedingungen detektiert wird. Bei diesem Verfahren ist es auch egal ob die eigentliche Substanz besser im PI- oder NI-ESI-Modus ionisierbar ist, da gleich fragmentiert und nur das negativ geladene Halogenid detektiert wird.

Es ist vorstellbar, dass eine derartige Detektionsmethode auch für bromorganische Verbindungen anwendbar ist. Da Bromid allerdings mit  $m/z$  79 und 81 eine viel geringere Masse als Iodid hat und in einem Bereich liegt, in

dem viele Ionen auftreten, muss ein zusätzliches Kriterium herangezogen werden. Hierfür wird das natürliche Vorkommen der Bromisotope im Verhältnis 1:1 genutzt. Beim Erfassen der Massenspuren  $m/z$  79 und 81 in zwei Kanälen im SIM, sollte demnach eine bromorganische Verbindung an Peaks mit gleicher Intensität in den beiden Massenspuren zu erkennen sein.

Es wurde zunächst untersucht, ob durch eine induzierte Fragmentierung in der Quelle Bromid als Fragment gebildet wird. Dazu wurden Infusionsexperimente mit verschiedenen bromierten organischen Verbindungen und unterschiedlichen Cone-Spannungen, die eine Fragmentierung in der Quelle beeinflussen, durchgeführt. Eine Auswahl an Bromstandards erfolgte anhand der Polarität, da die Standardverbindungen ähnliche Eigenschaften haben sollen, wie die AOB-Verbindungen in Oberflächengewässern und Batchtests (Kapitel 4.3.1.2, Seite 61) und anhand des Bromierungsgrades (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Standardverbindungen für die LC-MS-Methodenentwicklung

Standard	Verbindungsklasse	Bromierungsgrad
Bromchloressigsäure	Säure	1-fach
Bromphenylelessigsäure	aromatische Säure	1-fach
2,3-Dibrompropionsäure	Säure	2-fach
2,4-Dibromphenol	aromatischer Alkohol	2-fach
2,4,6-Tribromphenol	aromatischer Alkohol	3-fach

In Bild 4.14 ist das Ergebnis eines Infusionsexperimentes für 2,4-Dibromphenol dargestellt. Bei einer moderaten Cone-Spannung von 26 V ist deutlich das Molekülion mit seinem charakteristischen Isotopenmuster für zwei Bromatome zu erkennen. Dagegen ist das Molekülion bei einer Cone-Spannung von 100 V nicht mehr detektierbar und ein intensives Signal für Bromid ist zu erkennen. Somit ist Bromid ein Fragment bei der induzierten in-source Fragmentierung (IISF).

Für die Detektion organischer Bromverbindungen mittels LC/NI-ESI-IISF/MS und SIM von  $m/z$  79 und 81 in 2 Kanälen können zwei Kriterien formuliert werden:

organische Bromverbindungen sind daran zu erkennen, dass

1. in beiden Massenspuren ( $m/z$  79 und 81) zur gleichen Zeit ein Peak auftritt und
2. die Signale  $m/z$  79 und 81 in beiden Massenspuren die gleiche Intensität haben.

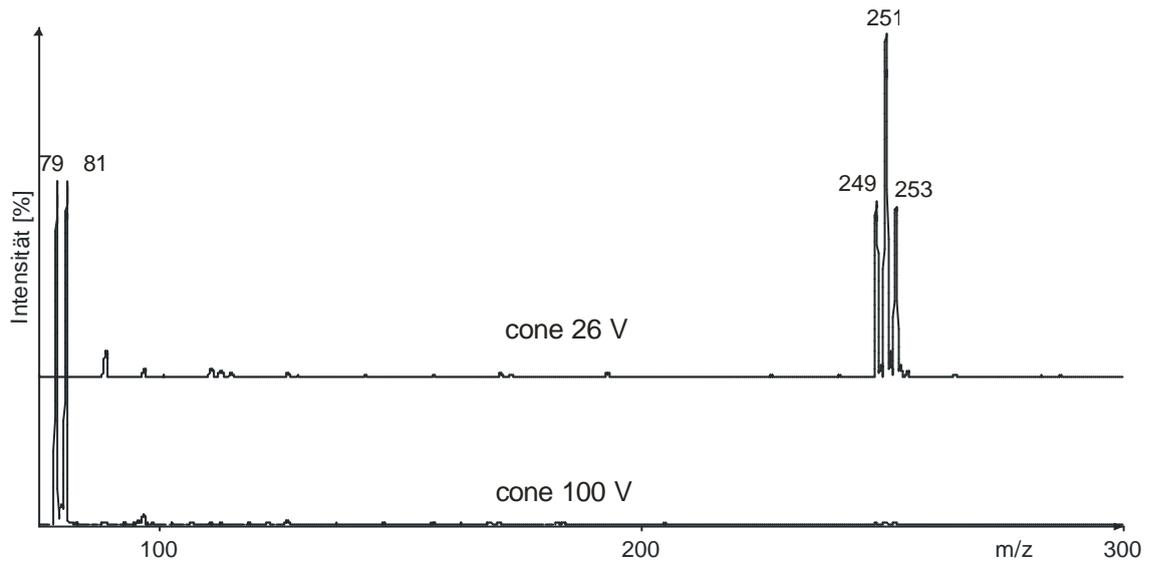


Bild 4.14: Massenspektren von 2,4-Dibromphenol nach Infusion und NI-ESI/MS bei zwei unterschiedlichen Cone Spannungen

Diese Kriterien wurden anhand von Messungen mit den zuvor aufgeführten Organobromstandards überprüft (Anhang III.iii, Bild III.2). In Bild 4.15 ist ein derartiger LC/NI-ESI-IISF/MS-Lauf für 2,3-Dibrompropionsäure dargestellt.

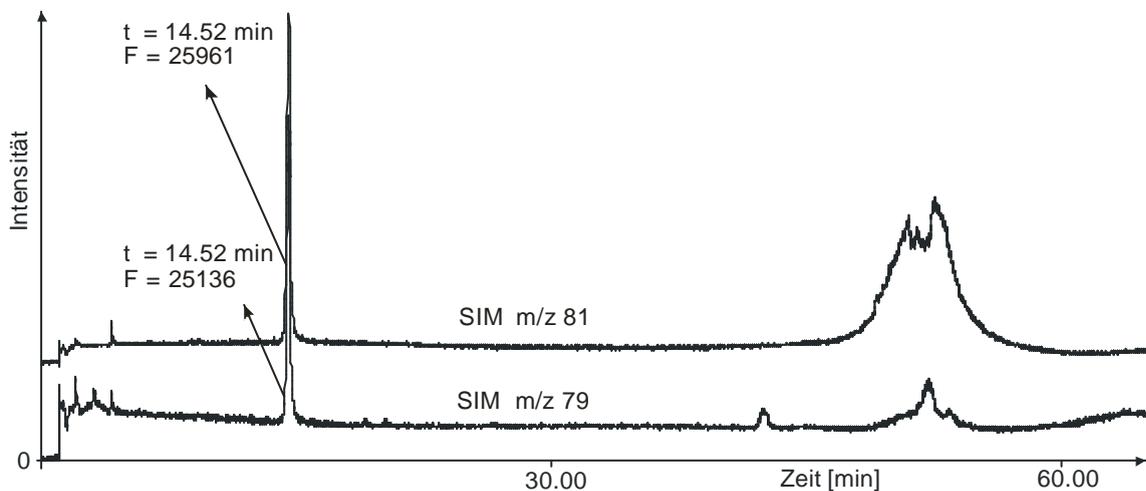


Bild 4.15: Chromatogramm von 2,3-Dibrompropionsäure nach LC/NI-ESI-IISF/MS mit den Massenspuren m/z 79 und 81 im SIM aufgenommen

Wie anhand der gleichen Retentionszeiten und Peakflächen für das Signal bei 14,52 min zu erkennen ist, sind beide Detektionskriterien erfüllt, sodass 2,3-Dibrompropionsäure eindeutig als organische Bromverbindung über Bromid detektiert wurde.

Die Detektion über Bromid als Fragment der unbekannt organischen Bromverbindungen wurde in einer angereicherten Seewasser-Batchtestprobe aus Tegeler See- Wasser erfolgreich durchgeführt. Die Probe wurde um den Faktor 200 aufkonzentriert (siehe Anhang II.iv.ii).

Bei der LC/Ni-ESI-IISF/MS-Messung sind in den beiden Massenspuren m/z 79 und 81 zahlreiche Peaks mit gleicher Retentionszeit zu erkennen (Bild 4.16A). In Tabelle 4.3 sind die entsprechenden Integrationsflächen dieser Peaks aufgelistet, wobei zusätzlich das Verhältnis der Flächen aus den Massenspuren m/z 79 und 81 angegeben ist. Dieses Flächenverhältnis beträgt für alle aufgeführten Peaks  $0,9 \pm 0,1$ , sodass von gleichen Signalintensitäten ausgegangen werden kann. Demzufolge sind beide Kriterien für die Detektion organischer Bromverbindungen erfüllt und elf organische Bromverbindungen wurden detektiert.

*Tabelle 4.3: Retentionszeiten, Flächen und relative Flächen von detektierten unbekannt organischen Bromverbindungen in einer aufkonzentrierten Seewasser-Batchtest Probe (AOBr = 103 µg/L), gemessen mittels LC/Ni-ESI-IISF/MS*

R(t) [min]	Fläche m/z 79	Fläche m/z 81	rel. Fläche m/z 79/81
5,4	24012	33870	0.7
6,3	638435	612850	1.0
10,5	13008	13340	1.1
11,5	110792	122597	0.9
14,0	6209	8032	0.8
19,6	161376	159551	1.0
20,9	60479	72546	0.8
22,8	23565	30687	0.8
28,6	21844	28197	0.8
30,4	169744	166148	1.0
42,0	156131	131088	1.2

Zur weiteren Bestätigung und um zusätzliche Informationen zu erhalten, wurde die gleiche Probe ebenfalls mittels LC/Ni-ESI/MS im scan-Modus gemessen. Es wurde in zwei scan-Bereichen gemessen: m/z 150-600 und m/z 350-800, um die Empfindlichkeit zu erhöhen. Auf die Fragmentierung in der Quelle wird im scan-Modus verzichtet, damit die Moleküle erhalten bleiben. Somit wird bei einer moderaten Cone-Spannung von 26 V gearbeitet. Mit Hilfe der Retentionszeiten der organischen Bromverbindungen, die aus der selektiven Detektion mittels LC/Ni-ESI-IISF/MS stammen, kann das Massenspektrum aus dem Chromatogramm der scan-Messung extrahiert werden. Trotz weitgehend geringerer Empfindlichkeit im scan-Modus können auf diese Art und Weise die

Massenspektren der elf selektiv detektierten Organobromverbindungen erfasst werden.

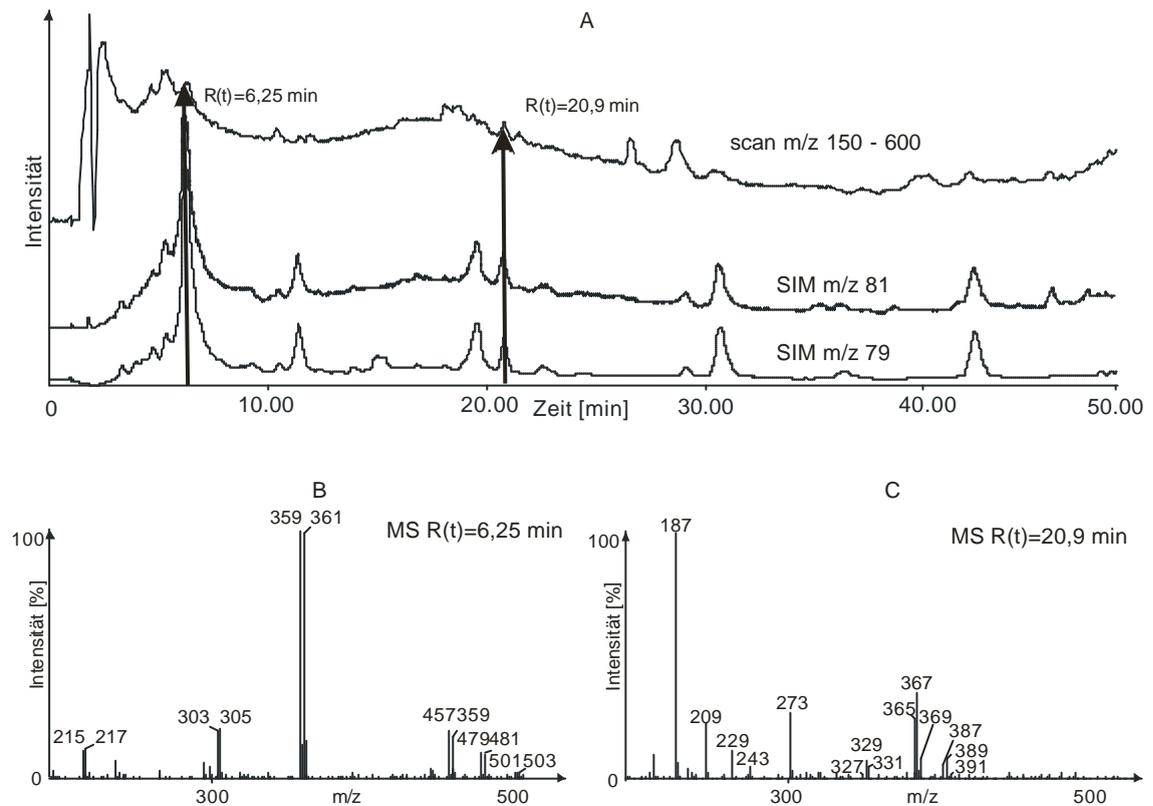


Bild 4.16: Chromatogramme einer Seewasser-Batchtest Probe, die nach Na-Ionenaustausch um Faktor 200 aufkonzentriert wurde (AOBr = 103 µg/L): A) LC/NI-ESI/MS-Chromatogramme: SIM m/z 79 und 81= mit IISF aufgenommen, SCAN m/z 150-600 = im Massenbereich von m/z 150-600 gescannt; B) Massenspektrum aus der SCAN-Messung für Retentionszeit  $R(t) = 6,35$  min; C) Massenspektrum aus der SCAN-Messung für Retentionszeit  $R(t) = 20,9$  min

In Bild 4.16B+C ist beispielhaft das Massenspektrum für die Verbindungen mit einer Retentionszeit von 6,25 min und 20,9 min dargestellt. Sowohl für diese Verbindungen als auch für alle anderen elf organischen Bromverbindungen ist ein charakteristisches Isotopenmuster mit m/z Werten, die sich um 2 Masseneinheiten unterscheiden, zu erkennen. Das Beispiel in Bild 4.16B hat m/z Werte mit 2 Masseneinheiten Unterschied deren Intensitäten im Verhältnis 100:92 stehen, was charakteristisch für ein Bromatom ist. Für die Verbindung in Bild 4.16C stellt sich das etwas komplexer dar. Hier liegen drei m/z Werte mit Massenunterschieden von 2 Einheiten vor, die Intensitätsverhältnisse von 77:100:53 aufweisen. Ein derartiges Isotopenmuster ist charakteristisch für ein Brom- und ein Chloratom im Molekül. Somit hat diese Verbindung ein Bromatom und ein Chloratom gebunden.

In gleicher Art und Weise konnten alle elf Verbindungen im scan-Modus als Bromverbindungen charakterisiert werden (Kapitel 4.3.2.2, Seite 73).

Die Ermittlung von Massenspektren und Identifizierung von Bromisotopenmustern aus den Messungen im scan-Modus bestätigen ein weiteres Mal, dass organische Bromverbindungen selektiv mittels LC/NI-ESI-HISF/MS detektiert werden können.

Zur Quantifizierung des Gehaltes an organisch gebundenem Brom wurden Kalibrierungen mit den zuvor aufgeführten organischen Bromverbindungen (Tabelle 4.2) durchgeführt. Für die Kalibrierung wurde die Konzentration an Brom gegen den Response aufgetragen, sodass der Bromierungsgrad bereits berücksichtigt ist. Es wurde in einem Konzentrationsbereich von 1-1000  $\mu\text{g/L}$  Brom kalibriert. In Bild 4.17 sind die Kalibriergeraden der fünf organischen Bromstandards dargestellt. Es ist zu erkennen, dass eine lineare Kalibrierung über den gesamten Konzentrationsbereich in beiden Massenspuren und für alle Standardsubstanzen möglich ist.

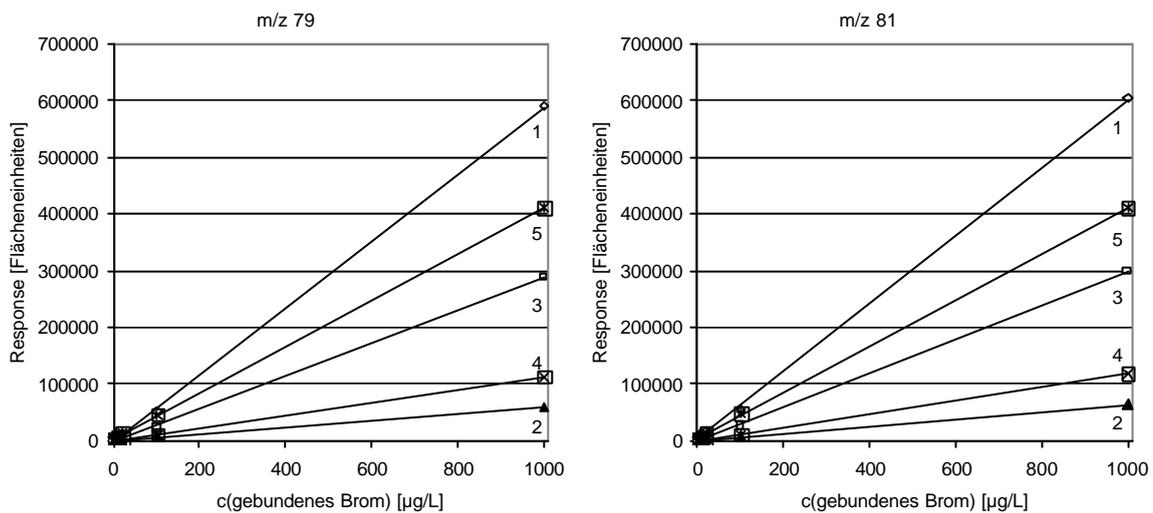


Bild 4.17: Kalibrierung für organisch gebundenes Brom durch LC/NI-ESI-HISF/MS: 1) Bromchloressigsäure, 2) Bromphenyllessigsäure, 3) 2,3-Dibrompropionsäure, 4) 2,4-Dibromphenol, 5) 2,4,5-Tribromphenol

Die Daten der Kalibrierung sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Ein Maß für die Genauigkeit der Kalibrierung ist der Korrelationskoeffizient  $R^2$ . Danach ist in der Massenspur m/z 81 die beste Kalibrierung möglich, denn  $R^2$  ist besser als 0,9995. Die Abweichungen zur Kalibrierung in der Massenspur m/z 79 können auf mögliche Untergrundbeeinflussungen zurückzuführen sein, die bei dieser Masse stärker ausgeprägt sind als bei m/z 81.

Die Kalibriergeraden aller fünf Organobromstandards unterscheiden sich trotz Normierung auf den Bromgehalt erheblich in ihrer Steigung und dem y-Achsenabschnitt. Der Response in der LC/NI-ESI-IISF/MS-Messung ist also strukturabhängig.

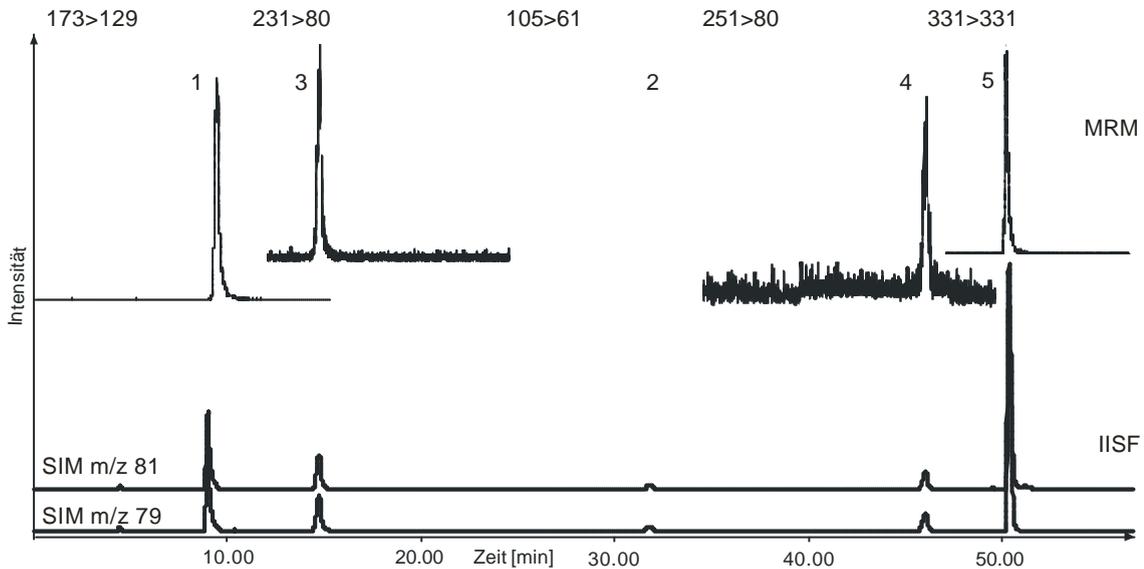
Tabelle 4.4: Vergleich der Kalibrierung für organisch gebundenes Brom durch LC/NI-ESI-IISF/MS

lfd. Nr.	Standard Verbindung	auf n(Brom) normierte Kalibrierung			
		n(Brom)	Steigung	y-Achsenabschnitt	Korrelation R <sup>2</sup>
m/z 79					
1	Bromchloressigsäure	1	478	2840	0,9867
2	Bromphenylelessigsäure	1	67	94	0,9978
3	2,3-Dibrompropionsäure	2	235	629	0,9986
4	2,4-Dibromphenol	2	103	1	0,9986
5	2,4,6-Tribromphenol	3	456	1721	0,9939
m/z 81					
1	Bromchloressigsäure	1	603	965	0,9997
2	Bromphenylelessigsäure	1	64	578	0,9995
3	2,3-Dibrompropionsäure	2	299	424	0,9998
4	2,4-Dibromphenol	2	117	237	0,9999
5	2,4,6-Tribromphenol	3	408	3251	0,9997

So ist eine Quantifizierung unbekannter organischer Bromverbindungen mittels LC/NI-ESI-IISF/MS nicht möglich, da jede Verbindung eine eigene Kalibrierung benötigt und hierfür die Verbindungen bekannt sein müssen. Es muss also entweder weiterhin auf den Summenparameter AOBr (Anhang II.v.i) zurückgegriffen werden, oder der Gehalt an Brom mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) unter Berücksichtigung der anorganischen Bromidkonzentration bestimmt werden (Kapitel 4.2.2, Seite 57).

Die Empfindlichkeit der selektiven Detektion organischer Bromverbindungen mittels LC/NI-ESI-IISF/MS wird durch Vergleichsmessungen mit der herkömmlichen ESI/MS-MS-Technik im Multi-Reaction-Monitoring- (MRM) Modus deutlich. Der MRM-Modus bietet die Möglichkeit organische Spurenstoffe mit höchster Empfindlichkeit und Selektivität zu detektieren. Das 1. MS (statisch) selektiert das Molekülion, das dann in der Kollisionszelle fragmentiert wird. Das 2. MS arbeitet auch statisch und lässt nur ein Fragment durch. Für die Detektion im MRM muss allerdings die Strukturformel des zu messenden Moleküls bekannt sein und ein Standard vorhanden sein, damit die bedeutendsten Fragmente ermittelt werden können. Beide Messtechniken

wurden für die Quantifizierung eines Standardgemisches aus organischen Bromstandards verwendet (Tabelle 4.2).



*Bild 4.18: Chromatogramme der Vergleichsmessungen eines Standardgemisches aus organischen Bromverbindungen mittels LC/NI-ESI-IISF/MS =IISF m/z 79 und 81 und LC/NI-ESI/MS-MS im MRM-Mode: 1) Bromchloroessigsäure, 2) Bromphenylessigsäure, 3) 2,3-Dibrompropionsäure, 4) 2,4-Dibromphenol, 5) 2,4,5-Tribromphenol*

Anhand der Chromatogramme in Bild 4.18 ist zu erkennen, dass die Standardverbindungen mit beiden Messtechniken detektiert werden können und immer zur gleichen Zeit eluieren, da die LC-Methode unverändert blieb. Lediglich Bromphenylessigsäure (2) ist im MRM-Modus nicht detektierbar, was auf schlechte Ionisierungsausbeuten und eine unzureichende Fragmentierung zurückzuführen ist. Die Ergebnisse der Quantifizierung der fünf Standards ( $c = 1000 \mu\text{g/L}$  Brom) für beide Messmethoden sind in Tabelle 4.5 aufgeführt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Intensitäten für die verschiedenen Messmethoden sehr unterschiedlich sind. Die höchsten Intensitäten (Flächen) werden mit der IISF-Detektion erreicht, was auch anhand der relativen Flächen deutlich wird ( $\text{IISF/MRM} > 1$ ). Insgesamt sind für beide Messverfahren hohe Schwankungen der Intensität für die fünf Standardverbindungen zu verzeichnen, da beide Messverfahren strukturabhängige Signale liefern.

Das Signal/Rausch-Verhältnis stellt ein besonders eindeutiges Kriterium für die Empfindlichkeit dar. Hierbei wird die Signalhöhe zur Höhe des Grundrauschens ins Verhältnis gesetzt. Auch bei Betrachtung dieses Parameters hat die LC/NI-ESI-IISF/MS-Messung die höchste Empfindlichkeit, da sie für alle Standardverbindungen das größte Signal zu Rausch Verhältnis aufweist.

Tabelle 4.5: Konzentration (c), Fläche (F), relative Fläche (rel.F) und Signal/Rausch- (S/N) Verhältnis für die Quantifizierung von fünf organischen Bromverbindungen (c = 1000 µg/L Br-) mittels LC/Ni-ESI-IISF/MS = IISF und LC/Ni-ESI/MS-MS im MRM-Modus

Standard Verbindung	c [µg/L]	F		rel.F IISF/MRM	S/N-Verhältnis	
		MRM	IISF m/z 81		MRM	IISF m/z 81
Bromochloroessigsäure	2160	49290	320061	6	302	81992
Bromophenylessigsäure	2660	n.d.	43638	-	1	123
2,3-Dibromopropionsäure	1450	6080	167722	28	127	730
2,4-Dibromophenol	1580	602	93930	156	8	647
2,4,6-Tribromophenol	1380	23563	644848	27	121	844

Mit Hilfe der LC/Ni-ESI-IISF/MS ist es möglich unbekannte organische Bromverbindungen selektiv und empfindlich zu detektieren. Die Empfindlichkeit der Detektionsmethode übersteigt den hochselektiven und empfindlichen MRM-Modus für die LC/Ni-ESI/MS-MS-Messung. Somit ist es möglich mit LC/Ni-ESI-IISF/MS bekannte organische Bromverbindungen bis zu einer Konzentration von 5 µg/L zu quantifizieren (Bestimmungsgrenze) und von 1 µg/L zu detektieren (Nachweisgrenze). Die Nachweisgrenzen für die LC/Ni-ESI/MS (-MS)-Messungen im MRM- und scan-Modus sind im Anhang II.v.xii aufgeführt.

#### 4.2.2 Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS)

Die Analysenmethode mittels Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) ermöglicht die Bestimmung einzelner Elemente mit hoher Empfindlichkeit. Sie beruht auf der Atomisierung und Ionisierung des zu analysierenden Materials in einem Plasma bei etwa 5000 °C. Zur Erzeugung des Plasmas wird ein hochfrequenter Strom in ionisiertes Argon induziert. Aus diesem Plasma werden die Ionen in das Vakuumsystem des Massenspektrometers (MS) überführt. Im MS wird dann die charakteristische Masse des zu bestimmenden Elementes aufgenommen, für Bromid m/z 79 und 81.

Zur Überprüfung des Summenparameters der adsorbierbaren organischen Bromverbindungen (AOBr) wurde der Gehalt an organisch gebundenem Brom mittels ICP-MS bestimmt. Bei der Bestimmung des gesamten Bromgehaltes muss die Probe allerdings in der Form aufgearbeitet werden, sodass alle anorganischen Bromspezies abgetrennt sind. Für die Abtrennung von Halogenionen bieten sich Ionenaustauscherkatuschen, wie OnGuard® II Ag von DIONEX an. Nach der im Anhang II.iv.vii beschriebenen Aufarbeitungsmethode wurden in den Oberflächenwasserproben aus Wannsee und Müggelsee 80 ± 2 % des anorganischen Bromids entfernt. Die in der Probe verbleibenden 20 % wurden bei der Auswertung der ICP-MS Messung mitberücksichtigt.

Für die Quantifizierung des Broms in den Oberflächenwasserproben wird lediglich das Signal der  $m/z$  79 herangezogen, da es bei  $m/z$  81 durch  $^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^1\text{H}$  zu Interferenzen kommen kann (generell höhere Signale, siehe Anhang III.iv). Die Ergebnisse der Brommessung mittels ICP-MS und der AOBr-Messung mit und ohne vorhergehende Sulfitzugabe (zur Sulfitreduzierbarkeit siehe Kapitel 4.3.1.3 Seite 65) für zwei Oberflächenwasserproben aus dem Wannensee und dem Müggelsee sind in Bild 4.19 dargestellt.

Die Ergebnisse in Bild 4.19 machen deutlich, dass durch alle drei Messverfahren ähnliche Gehalte an organischen Bromverbindungen detektiert werden. Die Messwerte der ICP-MS-Messung weichen im Mittel um  $21 \pm 7\%$  von den AOBr-Werten und um  $24 \pm 11\%$  von den AOBr-Werten nach Sulfitreduktion ab. Es kann demnach nicht eindeutig entschieden werden, welche Messmethode, mit oder ohne Sulfitreduktion, die genauesten Ergebnisse liefert. Auch bei der ICP-MS-Messung kann eine Verfälschung der Ergebnisse durch Polybromide nicht ausgeschlossen werden.

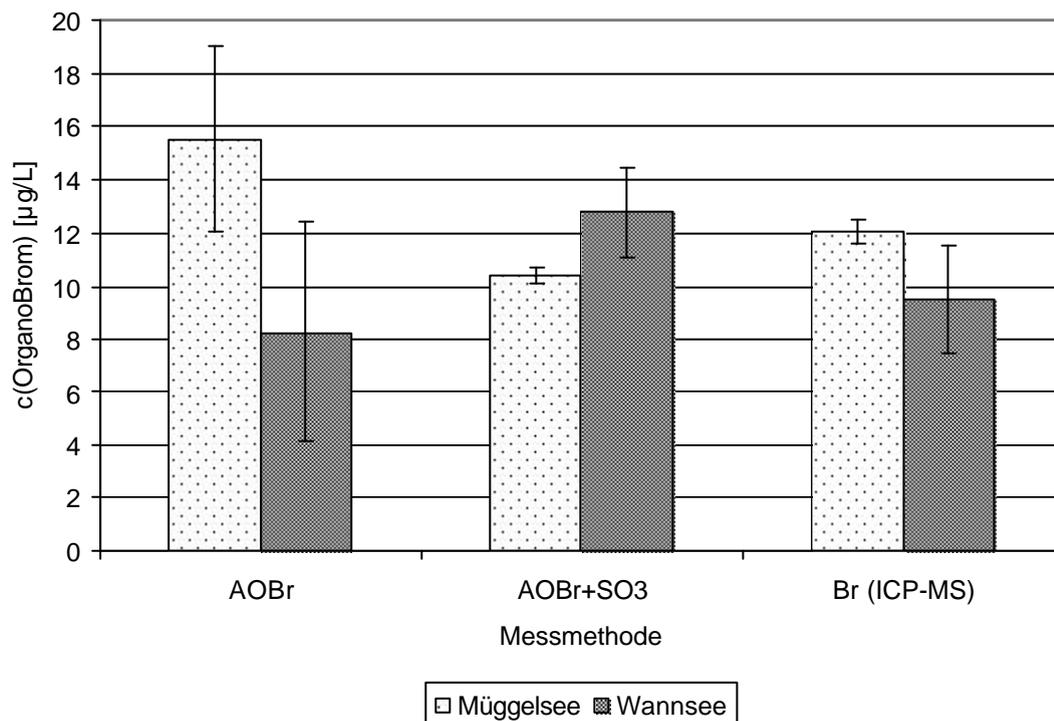


Bild 4.19: Vergleich der Konzentration an organisch gebundenem Brom mittels AOBr mit und ohne Sulfitzugabe und ICP-MS Messung = Br(ICP-MS): Oberflächenwasser aus dem Wannensee und dem Müggelsee aufgearbeitet durch Ionenaustausch und Konzentration um Faktor 12 für Müggelsee und Faktor 14,5 für Wannensee ( $n = 2$ )

Insgesamt ist die Übereinstimmung der Messergebnisse zufriedenstellend, da es sich bei der ICP-MS-Messung einerseits um ein komplett anderes Messverfahren handelt und sich andererseits durch weitere Probenver-

dünnungen andere Verdünnungsfaktoren mit den dazugehörigen statistischen Fehlern ergeben (Doppelbestimmung mit zwei Verdünnungen, siehe Anhang II.iv.vii).

## 4.3 Charakterisierung der organischen Bromverbindungen

Der Begriff organische Bromverbindungen fasst viele verschiedene Verbindungen zusammen, wobei unklar ist, welche von den vielen tausend im marinen Bereich identifizierten Verbindungen auch im Süßwasser gebildet werden. Es ist auch denkbar, dass in Oberflächengewässern ganz andere Verbindungen gebildet werden, denn im Unterschied zum marinen Bereich ist hier die Salinität und damit auch der Gehalt an Bromid viel geringer, im Sommer werden durch das geringere Wasser- und Durchströmungsvolumen höhere Temperaturen erreicht und die biologische Zusammensetzung ist eine andere. Zur Charakterisierung der in Oberflächenwässern gebildeten organischen Bromverbindungen wurden als erstes deren Eigenschaften untersucht.

### 4.3.1 Eigenschaften

#### 4.3.1.1 Flüchtigkeit

Die Flüchtigkeit der AOB<sub>r</sub>-Verbindungen lässt sich schon anhand des Versuchsaufbaus für die Seewasser- und Algen-Batchtests abschätzen (Bild 4.20). Die Versuche fanden in offenen Flaschen statt, die ständig mit Luftsauerstoff belüftet wurden. Da der Gehalt an organischen Bromverbindungen trotzdem fortlaufend ansteigt, kann es sich nicht um flüchtige Verbindungen handeln.

Begasungsversuche mit AOB<sub>r</sub>haltigen Oberflächenwasser bestätigen diese Annahme. Bei einer ursprünglichen Konzentration von  $21,8 \pm 1 \mu\text{g/L}$  AOB<sub>r</sub> liegt der Verlust nach Begasung mit Stickstoff von  $1 \mu\text{g/L}$  innerhalb der Fehlertoleranz. Die organischen Bromverbindungen aus Oberflächengewässern sind demnach nicht flüchtige Verbindungen. Ein ähnliches Verhalten kann für Organobromverbindungen aus Algen- und Seewasser-Batchtests angenommen werden.

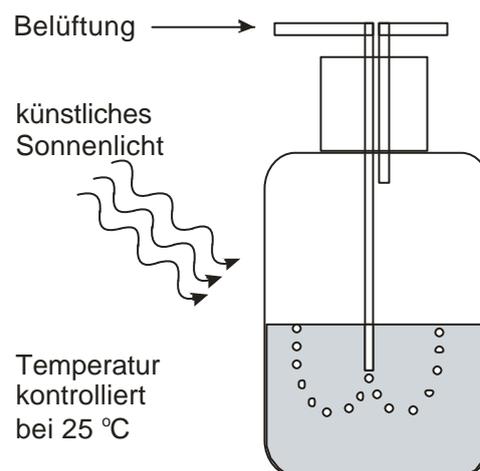


Bild 4.20: Versuchsaufbau für die Batchtests

#### 4.3.1.2 Polarität

Die Polarität der Verbindungen spielt eine große Rolle um eine Analysenmethode zu entwickeln. Anhand von Extraktionsverfahren kann die Polarität eingegrenzt werden, wobei die AOB<sub>r</sub>-Konzentration zur Bestimmung der Wiederfindung dient. Dazu wird der AOB<sub>r</sub>-Gehalt in der Ausgangslösung (Anfangs-AOB<sub>r</sub>), im Extraktionsablauf (AOB<sub>r</sub>(nicht extrahiert)) und im Extrakt (AOB<sub>r</sub>(Extrakt)) bestimmt. Es wurden die verschiedensten Festphasen für die Extraktion ausprobiert. Die Phasen sind für polare Verbindungen (LiChrolut<sup>®</sup> EN und Isolute<sup>®</sup> ENV+), für apolare Verbindungen (LiChrolut<sup>®</sup> RP-18), sowohl für polare als auch apolare Verbindungen (Oasis<sup>®</sup> HLB) und für ionische Verbindungen (BondElute<sup>®</sup> SAX anionisch und SCX kationisch) geeignet (Tabelle 4.6). Die Extraktionsbedingungen sind für jede Festphase angepasst (pH-Wert, Lösungsmittel zum Konditionieren und Eluieren, Anhang II.iv.i).

Tabelle 4.6: Extrahierbarkeit des AOB<sub>r</sub> von Seewasser-Batchtestproben an unterschiedlichen Festphasen

Festphase	Wechselwirkungen	Anfangs-AOB <sub>r</sub> [µg/L]	AOB <sub>r</sub> (nicht extrahiert) [%]	AOB <sub>r</sub> (Extrakt) [%]
LiChrolut RP-18	apolar	43,7	96,1	3,7
LiChrolut EN	polar	43,7	18,1	44,8
Isolute EnV+	polar	43,7	15,0	28,7
Oasis HLB	polar und apolar	43,7	42,2	48,8
BondElut SCX	kationisch	102,7	94,6	2,2
BondElut SAX	anionisch	102,7	11,9	82,8

Die höchste Extraktionsausbeute wird mit der Anionenaustauschphase SAX erreicht. 83 % des in der Originalprobe bestimmten AOB<sub>r</sub> werden im Extrakt wiedergefunden. Die hohe Extraktionsausbeute an SAX deutet auf überwiegend anionische Verbindungen hin. Dies wird durch die Ergebnisse der anderen Extraktionsversuche bestätigt. Die Extraktion mit der Kationenaustauschphase SCX und der Normalphase RP-18 liefert geringste Wiederfindungsraten von 2 bzw. 4 % im Extrakt. Es handelt sich demnach um polare Verbindungen. Das bestätigen auch die Extraktionen mit EN- und ENV+-Material. Lediglich 18 % (EN) und 15 % (ENV+) des Anfangs-AOB<sub>r</sub> sind nach der Extraktion in der Probe enthalten. Da 45 % (EN) bzw. 29 % (ENV+) im Extrakt wiedergefunden werden, muss ein großer Teil der polaren AOB<sub>r</sub>-Verbindungen auf dem SPE-Material verbleiben. Mit HLB-Kartuschen werden 49 % des Anfangs-AOB<sub>r</sub> extrahiert, davon sind 42 % nicht extrahierbar, sodass 9 % nicht mit Methanol eluiert werden können. Um die polaren Eigenschaften des überwiegenden Anteils der AOB<sub>r</sub>-Verbindungen zu überprüfen, wurde der polare Extrakt (LiChrolut<sup>®</sup> EN) einer säulenchromatographischen Trennung mit unterschiedlich

polaren Lösungsmitteln unterzogen (Bild 4.24A, Versuchsdetails siehe Anhang II.iv.iii).

Alle Bromverbindungen des polaren Extraktes wurden mit dem polarsten Lösungsmittel Methanol von der Kieselgelsäule eluiert. Allerdings können von den 44 % Festphasenextrakt an EN-Kartuschen nur 26 % nach Kieselgelsäulen chromatographie wiedergefunden werden (Summe aller Fraktionen). Das entspricht einer 60 %igen Wiederfindungsrate. Um alle AOBr-Verbindungen in die säulen chromatographische Trennung mit einzubeziehen, wurden Seewasser-Batchtestproben verwendet, die lediglich nach vorhergehender Entsalzung ( $\text{Ca}^{2+}$ -,  $\text{Mg}^{2+}$ -Salze, etc.) an Natriumionenaustauscherkartuschen (OnGuard® Na) aufkonzentriert wurden. Bei der Aufarbeitung durch Entsalzung und Aufkonzentrierung findet man 97 % des ursprünglichen AOBr wieder. Diese 97 % des AOBr zeigen ein ähnliches Verhalten während der säulen chromatographischen Trennung wie die Proben der Festphasenextraktion (Bild 4.21B). In den weniger polaren Fraktionen wird jeweils 1 % des ursprünglichen AOBr wiedergefunden, während in der Methanolfraktion, 48 % des AOBr eluieren. Die verbleibenden 49 % der organischen Bromverbindungen bleiben, wie bereits bei extrahierten Proben beobachtet, an der Kieselgelsäule haften.

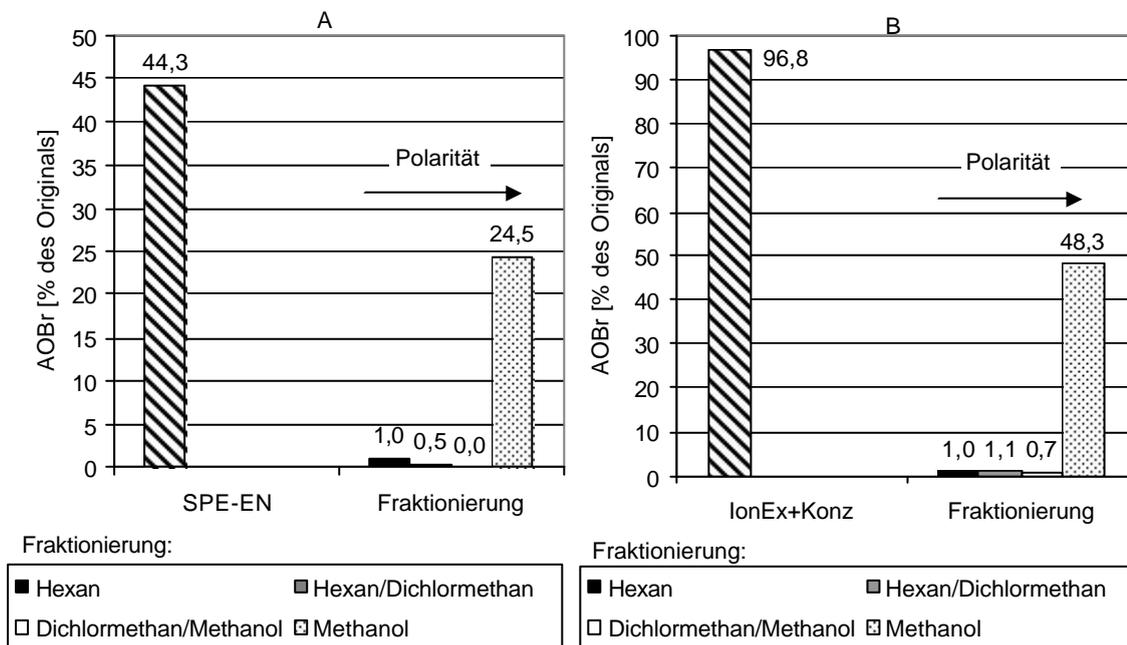


Bild 4.21: Fraktionierung von zwei aufgearbeiteten Seewasser-Batchtestproben an Kieselgelsäulen: A) Festphasenextrakt an EN-Phase und B) Konzentrat nach Entsalzung an OnGuard® Na-Kartusche

Bei der Betrachtung der Polaritätseigenschaften von Cyanobakterien-Batchtestproben ist ein etwas anderes Verhalten als bei den Seewasser-Batchtestproben

zu beobachten. In Bild 4.22 sind die Extraktionsergebnisse eines Cyanobakterien-Batchtests für vier verschiedene Extraktionsphasen dargestellt. Die höchsten Extraktionsausbeuten werden bei dieser Probe mit HLB-Kartuschen erreicht (68 %). Mit der EN-Kartusche werden ähnliche Wiederfindungen erreicht (39 %) wie bei der Seewasser-Batchtest Probe (45 %, Tabelle 4.6). Allerdings kommt es zu einer besseren Elution nach Adsorption auf dem SPE-Material. Mit 46 % AOB<sub>r</sub> in den Extraktionsabläufen und 39 % AOB<sub>r</sub> im EN-Extrakt, sind 85 % des gesamten AOB<sub>r</sub> im Cyanobakterien-Batchtest wiedergefunden worden. Im Gegensatz dazu findet man beim Seewasser-Batchtest nur 63 % des AOB<sub>r</sub> wieder. Die Extraktion mit dem Anionenaustauscher SAX zeigt ein viel geringeres Extraktionsvermögen der organischen Bromverbindungen aus Cyanobakterien-Batchtests (20 %) als aus Seewasser-Batchtests (83 %). Eine AOB<sub>r</sub>-Bestimmung im Extraktionsablauf hat für den Cyanobakterien-Batchtest nicht stattgefunden.

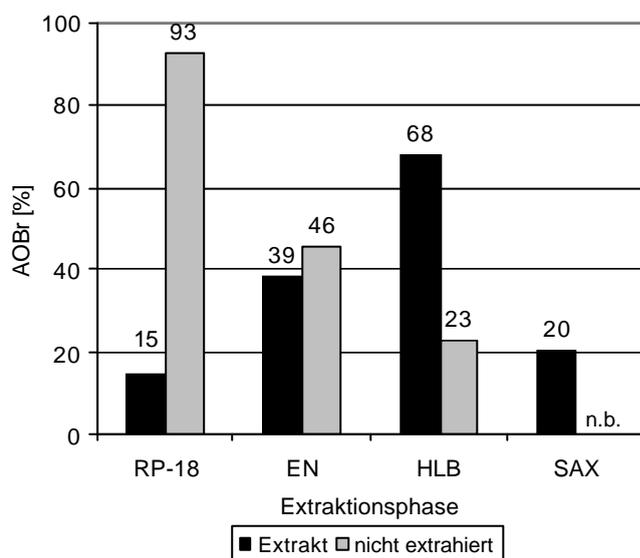


Bild 4.22: Extraktionsverhalten einer Cyanobakterien-Batchtest Probe (AOBr = 98 µg/L) an verschiedenen Extraktionskartuschen, Extrakt = AOB<sub>r</sub>-Wiederfindung in den Extrakten und nicht extrahiert = Wiederfindung in den Extraktionsabläufen, n.b. = nicht bestimmt

Übereinstimmend mit den Seewasser-Batchtestproben findet nur eine sehr geringe Extraktion mit RP-18-Kartuschen statt, wobei auch der größte Teil (93 %) im Extraktionsablauf wiedergefunden wird. Demnach handelt es sich auch bei dem cyanobakterienproduzierten AOB<sub>r</sub> um überwiegend polare Verbindungen. Allerdings ist der Anteil anionischer Verbindungen geringer. Durch die beste Extraktion mit HLB scheinen die organischen Bromverbindungen aus dem Cyanobakterien-Batchtest sowohl polare als auch schwach apolare Eigenschaften zu haben.

Der Vergleich der Extrahierbarkeit des AOBr aus Seewasser- und Cyanobakterien-Batchtests macht die Komplexität der AOBr-Zusammensetzung deutlich. Es werden unterschiedliche Eigenschaften gefunden, wenn die Proben mit Kulturen hergestellt wurden, im Gegensatz zu Mischkulturen aus dem See. Demnach ist zu erwarten, dass der AOBr aus Spätsommer-Seewasser eine andere Zusammensetzung hat als die im Labor produzierten Proben. Allerdings ist eine ähnliche Zusammensetzung wie in den Seewasser-Batchtestproben wahrscheinlich. Daher wurde im weiteren Verlauf der Einzelstoffcharakterisierung (Kapitel 4.3.2, Seite 70) mit Seewasser-Batchtestproben gearbeitet.

Polare und anionische Eigenschaften organischer Verbindungen, wie für den AOBr der Seewasser-Batchtests, werden durch spezielle funktionelle Gruppen hervorgerufen. In Tabelle 4.7 werden mögliche funktionelle Gruppen aufgezählt, die polare Eigenschaften hervorrufen. Für alle diese Verbindungen kann man sich zusätzlich die Schwefelanaloga vorstellen, wie zum Beispiel Thiocarbonsäuren, Sulfonsäuren, Sulfoxide oder Thioaldehyde, die ebenfalls polare Eigenschaften aufweisen. Derartige Schwefel-Halogen-Verbindungen wurden allerdings noch nicht als natürlich gebildete Bromverbindungen in der Literatur erwähnt. Einige identifizierte natürliche organische Halogenverbindungen mit polaren Eigenschaften wurden ebenfalls in Tabelle 4.7 aufgeführt und sind anhand ihrer Stoffklasse den funktionellen Gruppen zugeordnet. Es ist also vorstellbar, dass es sich bei den im Oberflächenwasser detektierten organischen Bromverbindungen um Carbonsäuren, Carbonsäureamide, Aldehyde, Aminosäuren oder Alkohole handelt. Halogenkohlenwasserstoffe können ausgeschlossen werden, da kurzkettige Halogenkohlenwasserstoffe leicht flüchtig sind und die Polarität des Halogenatoms für langkettige Kohlenwasserstoffe nicht mehr ausreicht, um eindeutig polare Eigenschaften zu bewirken. Die anderen Stoffklassen sind unter den in der Literatur identifizierten natürlichen halogenorganischen Verbindungen nicht aufgeführt, was ihr mögliches Auftreten in Oberflächengewässern nicht ausschließt. Peroxycarbonsäuren, Oxime und Nitrosoverbindungen sind allerdings sehr reaktiv und demnach zu instabil, um in natürlichen Gewässern gehäuft gebildet zu werden.

Tabelle 4.7: Polare funktionelle Gruppen mit anionischen Eigenschaften und Beispiele für identifizierte natürliche Organohalogenverbindungen Literatur: 1) (Moore, 1977), 2) (Gribble, 2003) 3) (Hunt, 1972), 4) (Igarashi et al., 1996), 5) (Moore et al., 1996)

Stoffklasse	Struktur	nat. Organohalogene	Spezies	Bemerkung	Lit.
Carbonsäuren und -salze	R-COOH	Dibrompropensäure	<i>Asparagopsis taxiformis</i>	essbare Rotalge	1)
Peroxycarbon-säuren	R-CO <sub>3</sub> H				
Carbonsäure-halogenide	R-COXH				
Carbonsäure-amide	R-CONH <sub>2</sub>	Chlortetracycline	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Antibakterium, antifungal	2)
Carbonsäure-hydrazide	R-CONH-NH <sub>2</sub>				
Aldehyde	R-CHO	Dibrompropenal, Dibromethanal	<i>Asparagopsis taxiformis</i>	essbare Rotalge	1)
Aminosäuren	R-CN <sub>2</sub> -COOH	Bromchlortyrosin	<i>Buccinum undatum</i>	in Protein eingebaut	3)
Oxim	R=N-OH				
Alkohole/ Phenole	R-OH	Prymnesin-2, Dibromphentriol	<i>Prymnesium parvum</i> , <i>Rhabdonia verticillata</i>	Abwehrstoff, Antibakterium	4)
Halogenkohlen-wasserstoffe	R-X	Bromoform, Dibrommethan	<i>marines Phytoplankton</i>	gasförmig	5)
Nitrover-bindungen	R-NO <sub>2</sub>				
Nitrosover-bindungen	R-N=O				

Mit den dargelegten Festphasenextraktionen (LiChrolut<sup>®</sup> EN und BondElut<sup>®</sup> SAX) wurden die Proben vor der Analyse aufgearbeitet, um mittels Massenspektrometrie nach gas- oder flüssigkeitschromatographischer Trennung Einzelstoffe zu identifizieren (Kapitel 4.3.2, Seite 70).

#### 4.3.1.3 Reduzierbarkeit mit Sulfit

Es wurde der Einfluss des Reduktionsmittels Natriumsulfit auf die AOB-Messung untersucht. Aufgefallen ist die Wirkung von Natriumsulfit bei der Probenvorbereitung für AOI-Bestimmungen. Es ist bekannt, dass molekulares Iod (I<sub>2</sub>) leicht unter sauren und oxidativen Bedingungen in Lösungen entsteht (4.3). Iod steht seinerseits mit Iodid (I<sup>-</sup>) im Gleichgewicht, um nach Gleichung (4.4) Triiodid (I<sub>3</sub><sup>-</sup>) zu bilden (Bruchertseifer et al., 2003).





Es ist vorstellbar, dass sowohl Iod ( $I_2$ ), Triiodid ( $I_3^-$ ) als auch höhere Polyiodide ( $I_5^-$ ,  $I_7^-$ ) während des Anreicherungs-schrittes für die AOI-Bestimmung an der Aktivkohle adsorbieren und zu AOI-Überbefunden führen. Vor der AOI oder AOBr-Bestimmung (Anhang II.v.i) werden alle Proben mit Salpetersäure angesäuert, wodurch saure und oxidative Bedingungen entstehen. Daher ist es wahrscheinlich, dass in den Proben Polyiodide und Polybromide entstehen. Bei der Messung organischer Iodverbindungen als AOI hat sich herausgestellt, dass dieser durch Zugabe des Reduktionsmittels Natriumsulfit sinkt (Oleksy-Frenzel et al., 2000). Der gleiche Effekt konnte auch bei AOBr-Messungen festgestellt werden.

Um den AOBr-Parameter für die Aufklärung des Bildungsmechanismus weiterhin verwenden zu können, müssen die folgenden Fragen geklärt werden:

1. Sind die Beobachtungen im Feld auch für die Messung des AOBr unter Sulfitzugabe signifikant?
2. Wie verhält sich die AOBr-Bildung während der Laborsimulationen nach Reduktion mit Sulfit?
3. Ergeben sich neue Konsequenzen für den Bildungsmechanismus?

Um den Anteil an reduzierbaren Bromverbindungen des AOBr in natürlichen Oberflächengewässern und in Laborversuchen abschätzen zu können, wurden AOBr-Messungen mit und ohne vorhergehende Natriumsulfitzugabe durchgeführt.

Im Sommer 2004 wurde der Wannsee monatlich beprobt und der AOBr mit und ohne Sulfitzugabe gemessen (Bild 4.23, Grünheid et al., 2006, AOBr+SO<sub>3</sub>-Daten persönlich von Grünheid). Abgesehen vom Spätsommer (August-Oktober) liegt der AOBr nach Sulfitzugabe konstant bei  $4,9 \pm 0,4 \mu\text{g/L}$ . Diese Konstanz ist viel ausgeprägter als ohne Sulfitzugabe, bei der die Werte mit  $9 \pm 2 \mu\text{g/L}$  viel stärker schwanken. Im Spätsommer steigt der AOBr auch unter vorhergehender Behandlung mit Sulfit um mehr als das Dreifache auf  $18,5 \mu\text{g/L}$  an. Demzufolge findet, auch unter Berücksichtigung einer möglichen Bildung von Polybromiden bei der Probenvorbereitung, eine Bildung bromorganischer Verbindungen im Wannsee statt.

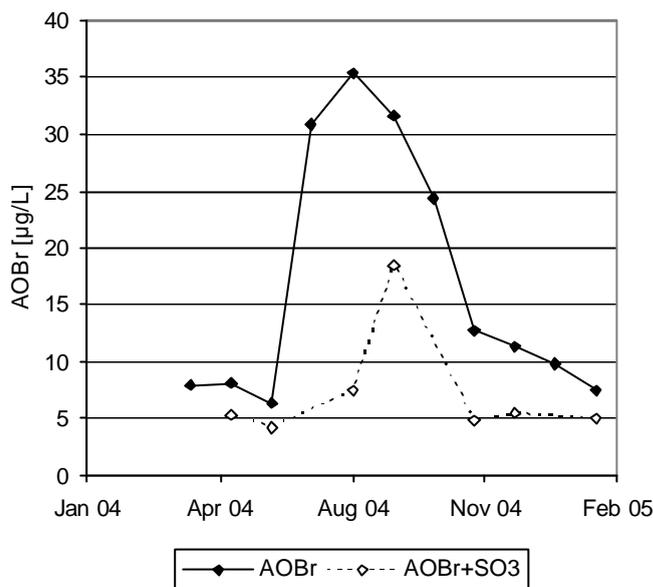


Bild 4.23: AOBBr-Jahresprofil, Wannsee 2004 unter Berücksichtigung der Reduzierbarkeit mit Natriumsulfit (Grünheid et al., 2006 und AOBBr+SO<sub>3</sub>-Daten persönlich von Grünheid)

Der AOBBr, bestimmt nach Sulfitzugabe, ist hier also in der Regel um 50 % niedriger als der konventionell gemessene. Ein ähnliches Verhalten konnte auch in anderen Gewässern beobachtet werden, mit Ausnahme des Nordgrabens. In Tabelle 4.8 sind die Messungen vom September 2005 und August 2006 für verschiedene Probenahmeorte zusammengefasst.

Tabelle 4.8: AOBBr-Gehalte verschiedener Oberflächengewässer im Berliner Raum unter Berücksichtigung der Reduzierbarkeit mit Natriumsulfit, September 2005 und August 2006

Probenahme	AOBr	AOBr+SO <sub>3</sub>	reduzierbarer AOBBr berechnet	reduzierbarer AOBBr berechnet
September 2005 *August 2006	[µg/L]	[µg/L]	[µg/L]	[% von AOBBr]
Nordgraben	5,1	4,5	0,6	12
Nordgraben vor OWA*	2,6	2,2	0,4	16
Nordgraben nach OWA*	5,2	4,5	0,7	13
Tegeler Fließ*	4,5	3,9	0,6	13
Oberhavel	10,4	5,0	5,4	52
Tegeler See	9,3	5,1	4,2	45
Wannsee	21,3	9,3	12,0	56
Unterhavel	25,3	11,5	13,9	55
Müggelsee	16,8	7,2	9,6	57
Spree	8,0	3,8	4,2	53

Dem Wasserlauf der Havel folgend steigt die AOB<sub>r</sub>-Konzentration auch nach Sulfitzugabe stetig an. Die Ausgangskonzentration von 5 µg/L in der Oberhavel bleibt allerdings auch im Tegeler See erhalten und steigt erst im Wannsee und danach in der Unterhavel auf bis zu 11,5 µg/L an. Betrachtet man die konventionelle Messung des AOB<sub>r</sub> ohne Sulfitzugabe kann der gleiche Effekt beobachtet werden.

Der reduzierbare AOB<sub>r</sub>-Gehalt liegt in den nördlichen Zuläufen des Tegeler Sees (Nordgraben und Tegeler Fließ) bei  $13 \pm 2$  % des herkömmlich gemessenen AOB<sub>r</sub>. Die AOB<sub>r</sub>-Reduzierbarkeit der Tegeler See-Zuläufe ist mit  $0,5 \pm 0,1$  µg/L geringer als in den anderen Berliner Gewässern (im Mittel  $8 \pm 4$  µg/L; Tabelle 4.8).

Auch in Laborversuchen kann der AOB<sub>r</sub> in reduzierbar und nicht reduzierbar (AOB<sub>r</sub>+SO<sub>3</sub>) differenziert werden. In allen Batchversuchen in Tabelle 4.9 ist ein Anstieg organischer Bromverbindungen auch nach Reduktion mit Sulfit zu erkennen. Der Gehalt an AOB<sub>r</sub> nach vorhergehender Sulfitzugabe ist immer geringer als der konventionelle AOB<sub>r</sub>. Der prozentuale Anteil an reduzierbarem AOB<sub>r</sub> variiert allerdings stark und liegt zwischen 19 und 47 %.

Tabelle 4.9: AOB<sub>r</sub>-Konzentrationen mit und ohne Sulfitzugabe in Tegeler See- Wasser-Batchtest, Cyanobakterien-Batchtests und Bromoperoxidase-Batchtest (Versuchsbedingungen siehe Tabelle II.3 im Anhang II.ii)

Batchtest	Laufzeit	AOB <sub>r</sub>	AOB <sub>r</sub> +SO <sub>3</sub>	reduzierbarer AOB <sub>r</sub> berechnet	reduzierbarer AOB <sub>r</sub> berechnet
	[d]	[µg/L]	[µg/L]	[µg/L]	[%]
Tegeler See	147	32	22	10	32
Tegeler See	203	74	60	14	19
Cyanobakterien	41	42	22	20	47
Cyanobakterien	46	38	23	15	40
BrPOD-Test*	59	576	391	185	32

\* Versuch in 10fach aufkonzentriertem Tegeler See- Wasser (Gesamtbromid = 1680 µg/L)

Ein Verlauf der AOB<sub>r</sub>-Bildung mit vorhergehender Sulfitreduktion ist in Bild 4.24 für die Cyanobakterien-Batchtests mit *Microcystis aeruginosa* dargestellt. Nach einer 14tägigen Verzögerungszeit ist eine AOB<sub>r</sub>-Bildung deutlich zu erkennen. Diese ist sowohl mit als auch ohne vorhergehende Reduktion mit Sulfit messbar. Die Batchtests sind in beiden Messmethoden reproduzierbar, wobei der länger laufende Versuch vom März auch zu höheren Konzentrationen führt.

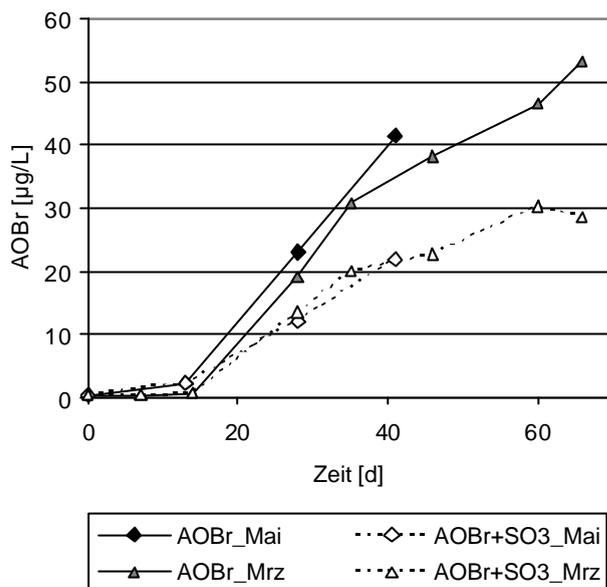


Bild 4.24: Cyanobakterien-Batchtests vom März und Mai 2005 unter Berücksichtigung der Reduzierbarkeit des AOBBr mit Sulfit

Es konnte nicht geklärt werden, welche Bromspezies den reduzierbaren AOBBr-Anteil bildet. Vermutet wird, dass es sich um Bromspezies handelt, die durch das Ansäuern mit einer oxidierenden Säure gebildet werden, wie z.B. die Eingangs erwähnten Polybromide, die auch an Aktivkohle adsorbieren können. Durch Zugabe von Sulfit werden das durch das Ansäuern gebildete Brom und Polybromid zu Bromid reduziert. Bromid adsorbiert nicht an der Aktivkohle bzw. wird durch Nitrat während der Anreicherung verdrängt. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass eine organische Bromverbindung durch Sulfit reduziert wird.

Die Batchtests (Tabelle 4.9) zeigen, dass der prozentuale Anteil an reduzierbarem AOBBr, bezogen auf den AOBBr, niedriger ist, wenn viel von dem enthaltenen Bromid ( $\sim 100 \mu\text{g/L}$ ) durch AOBBr-Bildung verbraucht wurde. Im zweiten Tegeler See- Wasser-Batchtest sind die höchsten AOBBr-Konzentrationen entstanden, es verbleibt eine geringere Bromidkonzentration ( $\sim 40 \mu\text{g/L}$ ) und die geringste AOBBr-Reduzierbarkeit ist detektierbar (19 %). Dies spricht für die Vermutung, dass die Anwesenheit von Bromid die AOBBr-Bestimmung stört und zu Überbefunden führt (Kapitel 4.1.3.2, Seite 41).

Auffällig ist, dass der reduzierbare AOBBr in den Zuläufen des Tegeler Sees trotz ähnlicher Bromidkonzentrationen geringer als im Seewasser ist (Tabelle 4.8). Es wurde geprüft, ob eine Differenzierung des AOBBr aus den Zuläufen und aus dem See prinzipiell anhand der AOBBr-Reduzierbarkeit möglich ist (siehe Kapitel 4.4.1, Seite 85).

Unabhängig von der Authentizität des AOB<sub>r</sub> ist die Bildung bromorganischer Verbindungen während Laborsimulationen mit Seewasser und Cyanobakterien deutlich zu erkennen. Auch die Feldbeobachtungen zeigen Spätsommermaxima nach vorhergehender Probenbehandlung mit Natriumsulfit. Die Ergebnisse des Bildungsmechanismus verändern sich nicht. Es werden lediglich weniger organische Bromverbindungen gebildet als bisher angenommen. Die tatsächliche Struktur des reduzierbaren Anteils an AOB<sub>r</sub> sollte allerdings noch eingehender untersucht werden, damit eindeutige Schlussfolgerungen gezogen werden können.

### 4.3.2 Einzelstoffe

Nach erfolgreicher Probenaufarbeitung anhand der polaren Eigenschaften des überwiegenden Anteils an AOB<sub>r</sub>, wurden chromatographische Trennmethode erarbeitet und die Identifikation mittels Massenspektrometrie angestrebt. Hierbei unterscheidet sich die Massenspektrometrie für die Kopplung mit Gaschromatographie (GC) und Flüssigkeitschromatographie (LC) im Ionisierungsverfahren. Während bei der GC die mobile Phase und die Analyten bereits im gasförmigen Zustand sind und durch chemische oder Elektronenstoßionisierung in Molekülonen überführt werden, müssen bei der LC die Analyten zusätzlich in die Gasphase überführt und der hohe Anteil an flüssiger mobiler Phase reduziert werden. Hierfür bietet sich die Elektrosprayionisierung (ESI) an, da es gleichzeitig zu einer Zerstäubung, Ionisierung und Lösungsmittelreduktion des Säuleneluates kommt.

Identifizierungskriterium für alle Bromverbindungen ist das natürliche Isotopenverhältnis von Br<sup>79</sup> und Br<sup>81</sup>, wie in Kapitel 4.2.1.1 (Seite 48) bereits dargelegt wurde.

#### 4.3.2.1 Gaschromatographie

Die gaschromatographische Trennung ist für die Identifikation unbekannter Verbindungen besonders gut geeignet, da es geringere Matrixeffekte, einheitliche und daher vergleichbare Ionisierungsverfahren und umfangreiche Spektrenbibliotheken gibt.

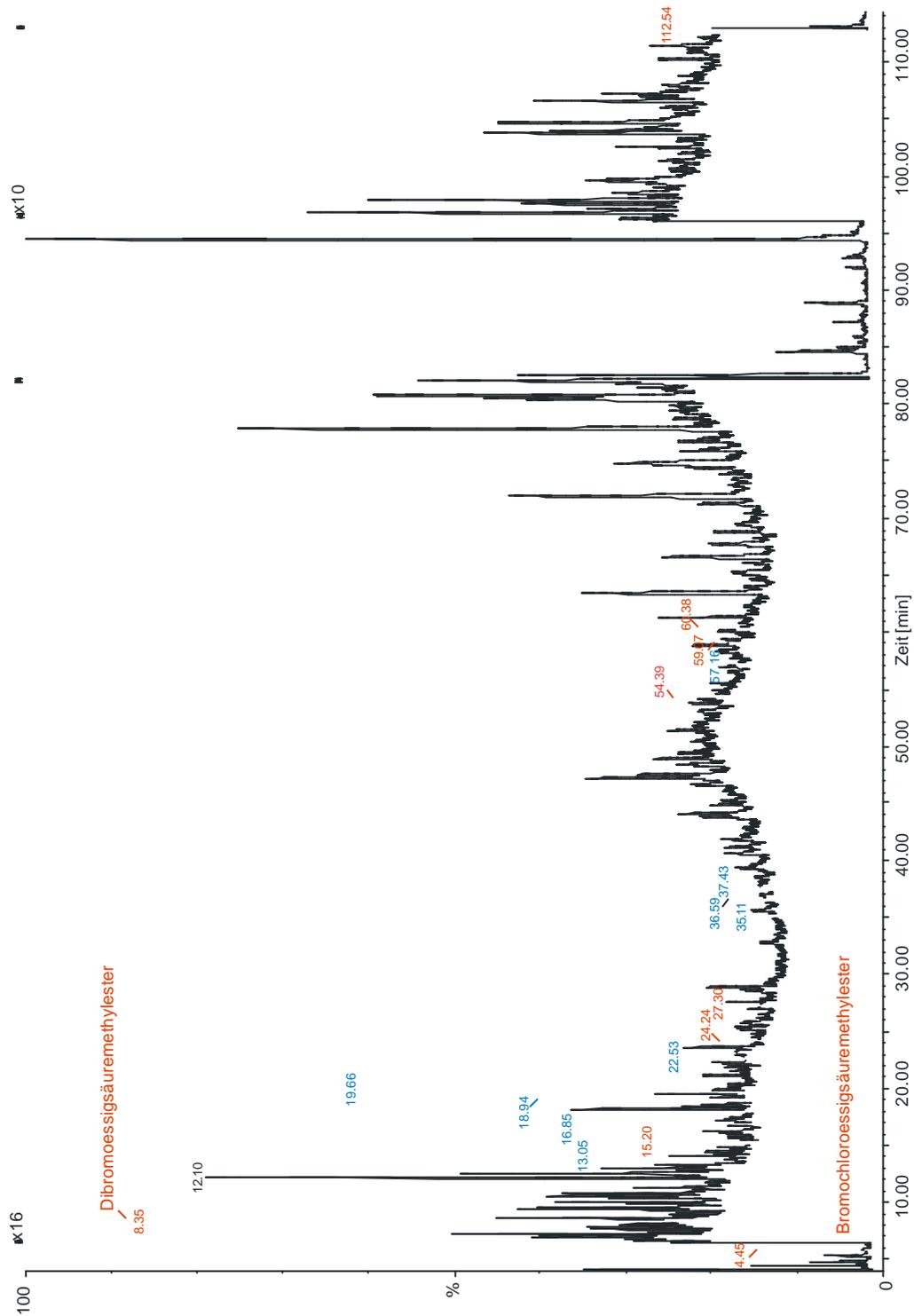
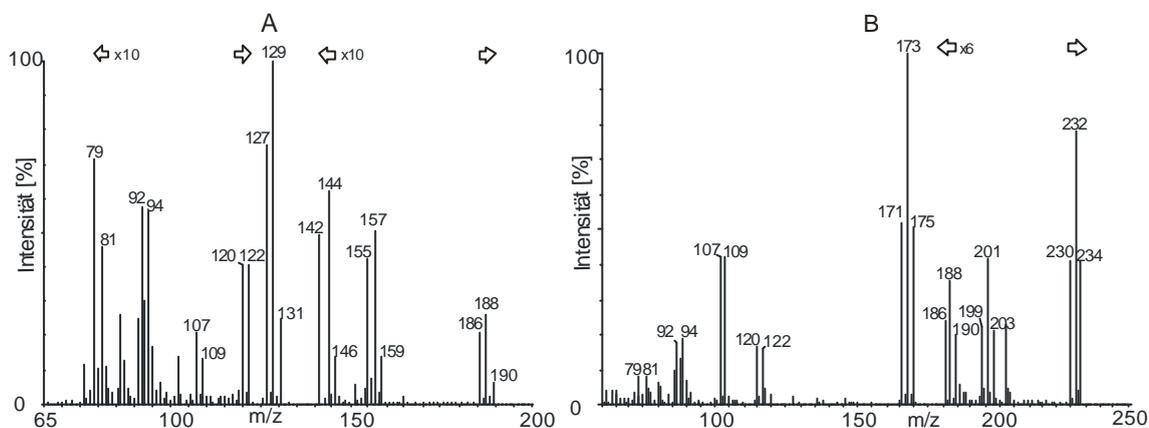


Bild 4.25: Gaschromatographische Trennung der Substanzen einer Tegeler See- Wasser-Batchtestprobe nach Festphasenextraktion an EN und Säulenchromatographie an Kieselgel – Methanoleluat, derivatisiert: rote Peaks mit Brom Isotopenmuster und blaue Peaks mit zusätzlichem Chlor Isotopenmuster

Ein Gaschromatogramm mit massenspektrometrischer Detektion ist in Bild 4.25 dargestellt. Die Probe stammt von einem Seewasser-Batchtest, der mit Tegeler See- Wasser angesetzt wurde (ohne weitere Dotierungen). Sie wurde durch Festphasenextraktion an EN-Material aufgearbeitet und danach an einer Kieselgelsäule wie im Anhang II.iv.iii beschrieben extrahiert, wobei die polarste Fraktion (Methanoleluat) dargestellt ist.

Es ist eine große Anzahl von Peaks zu erkennen, was trotz umfangreicher Probenaufarbeitung auf einen großen Matrixanteil zurückzuführen ist. Alle Peaks wurden auf mögliche Isotopenmuster von Halogenatomen untersucht, wobei zwei organische Bromverbindungen in dieser Probe identifiziert werden konnten. Die extrahierten Massenspektren der beiden Verbindungen sind in Bild 4.26 dargestellt.



*Bild 4.26: Massenspektren zweier organischer Bromverbindungen, extrahiert aus dem Gaschromatogramm in Bild 4.25: A = Bromchloressigsäuremethylester und B = Dibromoessigsäuremethylester (Probe ist derivatisiert)*

In beiden Massenspektren sind die Isotopenmuster deutlich zu erkennen. Da jeweils drei detektierte Massen mit einem Massenunterschied von  $m/z = 2$  ein Isotopencluster ausmachen, handelt es sich um zwei Halogenatome je Molekül. In Bild 4.26A stehen die Isotopen der Basispeaks (127:129:131) im Verhältnis von 77:100:25 während die Isotopen der Basispeaks in Bild 4.26B (171:173:175) im Verhältnis von 52:100:51 stehen. Die gleichen Isotopenverhältnisse sind auch für die Moleküllionenpeaks zu erkennen (Bild 4.26A:  $m/z = 188$  und B:  $m/z = 232$ ). Daraus ist deutlich zu erkennen, dass im ersten Massenspektrum (Bild 4.26A) ein Brom- und ein Chloratom enthalten sind, während im zweiten Massenspektrum (Bild 4.26B) zwei Bromatome vorliegen. Der Strukturvorschlag war durch Vergleiche mit Spektrenbibliotheken möglich, danach handelt es sich bei der Verbindung in Bild 4.26A um Bromchloressigsäuremethylester und in Bild 4.26B um Dibromessig-

säuremethylester. Da die Proben derivatisiert wurden, handelt es sich tatsächlich um Bromchloroessigsäure und Dibromessigsäure.

In gleicher Weise wurden alle Peaks im dargestellten Chromatogramm (Bild 4.25) und in den Chromatogrammen der anderen Fraktionen nach Kieselgelfraktionierung mit und ohne Derivatisierung auf Isotopenmuster untersucht. Weitere mögliche organische Halogenverbindungen sind für das dargestellte Chromatogramm in Bild 4.25 farblich dargestellt, wobei rote Peaks Brom enthalten und blaue Peaks zusätzlich Chlor. Eine genaue Identifizierung wie für die Halogenessigsäuren ist nur für eine weitere Verbindung möglich. Eine einfach bromierte Verbindung konnte in der Probe ohne Fraktionierung gefunden werden, die derivatisiert wurde. Laut Spektrenbibliothek handelt es sich um 4-Brom-3-nitrobiphenyl. Die Identifikation der anderen Peaks fällt schwer, da die Massenspektren nicht mit Spektren aus der Bibliothek übereinstimmen. Viele Peaks sind zu klein, um reine Massenspektren zu extrahieren, wodurch Matrixbestandteile die Spektren verfälschen. Im Anhang III.v sind alle Teilproben der Fraktionierung und Derivatisierung in einer Tabelle III.3 dargestellt, wobei die Isotopencluster mit ihren Verhältnissen, den dazugehörigen Retentionszeiten und Probenbeschreibungen aufgelistet sind. Die Anzahl der im Molekül eingebauten Halogenatome wurde anhand der Isotopenzahl des Basis- und Molekülionenpeaks ermittelt. Diese Angaben sind allerdings nur Vermutungen, da oft nicht mit Sicherheit der Molekülionenpeak identifiziert werden konnte (zu hohe Matrix, daher teilweise höhere Anzahl an Isotopen im Basispeak als im Molpeak erkennbar).

Es muss noch erwähnt werden, dass diese Vielzahl an halogenorganischen Verbindungen nur in dieser einen Probe gefunden wurde. Weitere Seewasser-Batchtestproben wurden analysiert. Auch die oben ausgewertete Probe wurde erneut vermessen, sowohl aus der bereits aufgearbeiteten Probe als auch nach erneuter Probenaufarbeitung. Es wurden keine halogenorganischen Verbindungen detektiert. Da der AOB<sub>r</sub> als überwiegend polar charakterisiert wurde, ist die GC-Trennung nicht weiter verfolgt worden. Im weiteren Verlauf wurde nach LC-Trennungsmöglichkeiten gesucht.

#### 4.3.2.2 Flüssigkeitschromatographie

Zur Charakterisierung bromorganischer Verbindungen wurde für die Flüssigkeitschromatographie (LC) ein bromselektives Detektionsverfahren mittels negativ-Ionen Elektrosprayionisierung nach induzierter in-source Fragmentierung und massenselektiver Detektion (NI-ESI-IISF/MS) entwickelt (Kapitel 4.2.1.2, Seite 49). Mit Hilfe dieses Verfahrens ist es möglich einzelne organische Bromverbindungen selektiv zu detektieren. Dazu werden die zwei Massenspektren für Brom  $m/z$  79 und 81 aufgenommen.

In Bild 4.27 sind die Chromatogramme der Massenspuren  $m/z$  79 und 81 für eine Batchtestprobe aus dem Tegeler See dargestellt. Die Probe hat einen AOB<sub>r</sub> von 103  $\mu\text{g/L}$  und wurde wie im Anhang II.iv.ii beschrieben nach Entsalzung um den Faktor 200 aufkonzentriert. Die Probe wird im Folgenden verkürzt TSee-Konz genannt. Zur LC-Trennung wurde eine Luna<sup>®</sup>-Phenyl-Hexyl-Säule verwendet (siehe Anhang II.iv.vi, Tabelle II.8). Die potentiellen organischen Bromverbindungen sind durch einen Pfeil und mit ihrer Retentionszeit markiert.

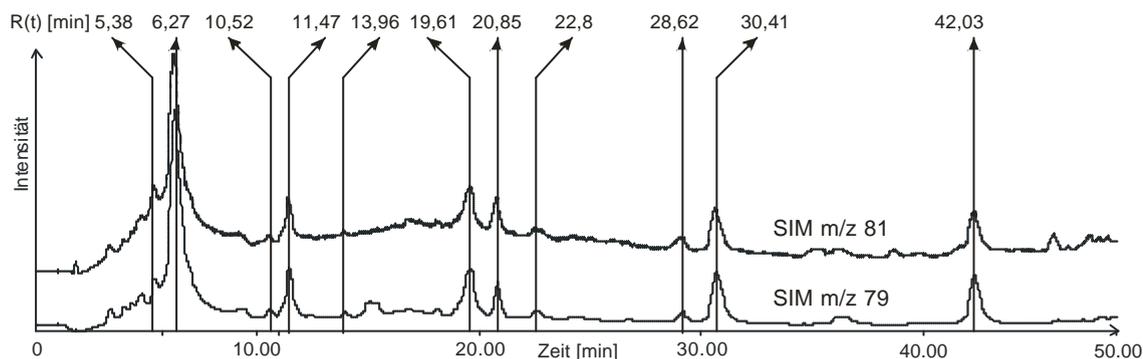


Bild 4.27: LC/Ni-ESI-IISF/MS Chromatogramme der Massenspuren  $m/z$  79 und 81 einer im Batchtest kultivierten Oberflächenwasserprobe des Tegeler Sees (AOB<sub>r</sub> = 103  $\mu\text{g/L}$ ), die um den Faktor 200 aufkonzentriert wurde

Es wurden elf organische Bromverbindungen detektiert. Um weitere Strukturinformationen zu erhalten, wurde die Probe ein weiteres Mal im LC/Ni-ESI/MS scan-Modus analysiert. Hieraus können die Massenspektren für die Retentionszeiten der organischen Bromverbindungen extrahiert werden.

Für alle elf Verbindungen der selektiven Bromdetektion wurden die Massenspektren aus dem scan-Chromatogramm extrahiert und auf ihre Isotopenmuster hin untersucht. In Tabelle 4.10 sind die Ergebnisse der Massenspektren aufgeführt. Aus den Intensitätsverhältnissen der Isotopenmuster für den potentiellen Molekülionenpeak konnte der Bromierungs- und auch Chlorierungsgrad bestimmt werden. Es ist unklar, ob es sich tatsächlich um den Molekülionenpeak handelt, da durch einen hohen Matrixgehalt oder eine Fraktionierung des Moleküls eine Identifikation am hohen Untergrund rauschen scheitert. Diskrepanzen zwischen Basis- und Molpeak im Halogenierungsgrad weisen auf einen fehlenden Molekülionenpeak hin. Genauere Messungen mit sensitiverer Massenspektrometrie sollten die Identifikation des Molekülionenpeaks ermöglichen, zum Beispiel mittels Quadrupol-Time Of Flight-Massenspektrometrie (Q-TOF-MS).

Tabelle 4.10: Retentionszeiten, Basispeak, Molekülonenpeak und Anzahl an gebundenen Halogenen einer Tegeler See- Wasser-Batchtestprobe (AOBr = 103 µg/L) nach Entsalzung und Aufkonzentration (F = 200) bestimmt durch LC/NI-ESI/MS-Messung im SCAN-Modus, Retentionszeiten wurden zuvor mit der selektiven Detektion organisch gebundenen Broms nach LC/NI-ESI-IISF/MS-Messung bestimmt.

Nr.	R(t) [min]	Basepeaks		Molpeaks		n(Halogen)
		m/z	rel.Intensität	m/z	rel.Intensität	
1	5,38	359	100	577	100	Br+2Cl**
		361	38	579	58	
				581	12	
2	6,27	359	100	741	100	Br
		361	98	743	92	
3	10,52	162		576	100	Br+Cl**
				578	100	
4	11,47	373	100	458	62	Br
		375	97	460	100	
5	13,96	186		379	60	2Br
				381	100	
				383	60	
6	19,61	381	82	403	95	Br+Cl
		383	100	405	100	
		385	35	407	50	
7	20,85	273		387	77	Br+Cl
				389	100	
				391	53	
8	22,8	257		365	50	2Br+Cl
				367	100	
				369	82	
				371	19	
9	28,62	287	100	381	70	Br+Cl
		289	62	383	100	
		291	19	385	28	
10	30,41	395	75	417	76	Br+Cl
		397	100	419	100	
		399	30	421	24	
11	42,03	301	100	409	77	Br+Cl
		303	36	411	100	
				413	29	

\*\* potentieller Molekülpeak, da Diskrepanz im Halogenierungsgrad

Es zeigt sich, dass alle selektiv detektierten Bromverbindungen im LC/NI-ESI/MS scan-Lauf charakteristische Isotopenmuster für Brom aufweisen. Danach enthält die Probe aus dem Tegeler See- Wasser-Batchtest mindestens elf verschiedene organische Bromverbindungen, die überwiegend einfach und nur zweimal zweifach bromiert sind. Sieben der elf Bromverbindungen sind zusätzlich einfach chloriert und eine ist zusätzlich zweifach chloriert.

Die angegebene Seewasser-Batchtestprobe wurde ein weiteres Mal nach Extraktion am Anionenaustauscher BondElut® SAX vermessen. Diese Probe wird im weiteren zur Vereinfachung TSee-SAX-2 genannt. Bei der LC/NI-ESI-

IISF/MS Messung fand eine andere flüssigkeitschromatographische Trennung mittels XTerra®-C18-Säule statt (siehe Anhang II.iv.ii, Tabelle II.9). Die optimierte Elution lieferte ein weites Spektrum an organischen Bromverbindungen. Die Detektion fand unter den gleichen Bedingungen statt, wie bei TSee-Konz, sodass ein direkter Vergleich möglich ist. Bei der Messung von TSee-SAX-2 wurden mit 16 detektierten Verbindungen etwas mehr organische Bromverbindungen gefunden. Von den 16 Bromverbindungen sind sechs zweifach bromiert, sechs Verbindungen zusätzlich einfach chloriert und drei zweifach chloriert. Die Auflistung dieser Verbindungen und der dazugehörigen Isotopenmuster ist dem Anhang III.vi zu entnehmen. Die Probe TSee-Konz ist durch ihre Aufarbeitung mittels Konzentration nach Ionenaustausch höher mit Matrix belastet, als TSee-SAX-2. Allerdings ist der Verlust an organischen Bromverbindungen bei der Extraktionsmethode mit SAX höher (17,2 %) als beim Aufkonzentrieren (3 %). Insgesamt zeigt sich, dass die unterschiedlichen Probenaufbereitungsverfahren auch zur Detektion unterschiedlicher Verbindungen führen. Im Folgenden sollen die detektierten organischen Bromverbindungen beider Proben, TSee-Konz und TSee-SAX-2 miteinander verglichen werden, um die Detektion gleicher Verbindungen in beiden Proben ausfindig zu machen. Dazu werden Messgrößen genutzt, die für die Struktur der Verbindungen charakteristisch sind. Da es sich um eine identische Detektion mit gleichem Ionisierungsverfahren handelt, können folgende strukturcharakteristische Größen herangezogen werden:

1. Basispeak – molekulare Masse des stabilsten Fragmentions,
2. Molpeak – molekulare Masse des Molekülions inklusive potentieller Molpeaks, da von gleichen Ionisierungsbedingungen ausgegangen werden kann und
3. Halogenierungsgrad – Anzahl an gebundenen Brom- und Chloratomen (n(Halogen)).

Die Retentionszeit kann nicht als Charakteristikum für die Struktur der organischen Bromverbindungen verwendet werden, da es sich um unterschiedliche LC-Methoden handelt. Ein direkter Vergleich der strukturcharakteristischen Größen für beide Proben ist in Tabelle 4.11 aufgelistet.

Der Vergleich der organischen Bromverbindungen in den Proben mit unterschiedlichen Probenaufbereitungsverfahren zeigt keine übereinstimmenden Basispeaks oder Molpeaks. Demnach kann auch ohne nähere Betrachtung des Halogenierungsgrades geschlussfolgert werden, dass in beiden Proben unterschiedliche organische Bromverbindungen detektiert wurden. Für die Detektion identischer Verbindungen in beiden Proben müssen alle drei strukturcharakteristischen Größen übereinstimmen. Demzufolge kann

davon ausgegangen werden, dass 27 verschiedene organische Bromverbindungen in der Seewasser-Batchtestprobe detektiert worden sind.

*Tabelle 4.11: Strukturvergleich anhand strukturcharakteristischer Größen der detektierten organischen Bromverbindungen für zwei verschiedene Probenaufarbeitungsmethoden der identischen Tegeler See- Wasser-Batchtestprobe (AOBr = 103 µg/L): TSee-Konz = Konzentration nach Entsalzung und TSee-SAX-2 = Festphasenextraktion am Anionenaustauscher BondElut<sup>®</sup> SAX; n(Halogen): Halogenierungsgrad an Brom und Chlor*

TSee-Konz				TSee-SAX-2			
Nr.	Basispeaks m/z	Molpeaks m/z	n(Halogen)	Nr.	Basispeaks m/z	Molpeaks m/z	n(Halogen)
1	361	581**	1Br+2Cl	1	345	429**	2Br+1Cl
2	361	743	1Br	2	235	271	1Br
3	162	578**	1Br+1Cl	3	339	375**	2Br
4	375	460	1Br	4	341	341**	1Br+2Cl
5	186	383	2Br	5	399	399**	2Br+2Cl
6	385	407	1Br+1Cl	6	287	389**	1Br+1Cl
7	273	391	1Br+1Cl	7	301	407**	2Br
8	257	371	2Br+1Cl	8	345	411**	2Br+1Cl
9	291	385	1Br+1Cl	9	287	359**	2Br+1Cl
10	399	421	1Br+1Cl	10	367	425**	1Br+2Cl
11	303	413	1Br+1Cl	11	397	599**	1Br+2Cl
				12	429	515	1Br
				13	293	409**	1Br+1Cl
				14	541	541	1Br+1Cl
				15	249	539	1Br
				16	263	541	1Br+1Cl

\*\* potentieller Molekülionenpeak, da Diskrepanz im Halogenierungsgrad

Interessant ist der Vergleich der Probe TSee-SAX-2 mit einer Probe, die auch aus dem gleichen Seewasser-Batchtest stammt, aber vier Monate früher entnommen wurde. Diese Probe soll vereinfacht TSee-SAX-1 heißen, da sie parallel zu der TSee-SAX-2-Probe mittels Anionenaustauscher SAX aufgearbeitet wurde und auch unter den gleichen Bedingungen analysiert wurde. In der Probe TSee-SAX-1 wurde mit 72,4 µg/L ein geringerer AOBr gemessen als in TSee-SAX-2 (102,7 µg/L), was auf die Kultivierungszeit zurückzuführen ist (TSee-SAX-1 = 248 d und TSee-SAX-2 = 367 d). Allerdings findet man in der TSee-SAX-1-Probe viel mehr organische Bromverbindungen mittels LC/NI-ESI-IISF/MS und anschließender scan-Messung, als in der älteren TSee-SAX-2-Probe, obwohl hier der AOBr viel höher ist. Es konnten 31 unterschiedliche Bromverbindungen in TSee-SAX-1 detektiert werden, wobei sieben zweifach und vier sogar dreifach bromiert sind, neun Verbindungen sind zusätzlich einfach chloriert und zehn sind zweifach chloriert (Isotopenmuster der Verbindungen sind dem Anhang III.vi zu entnehmen).

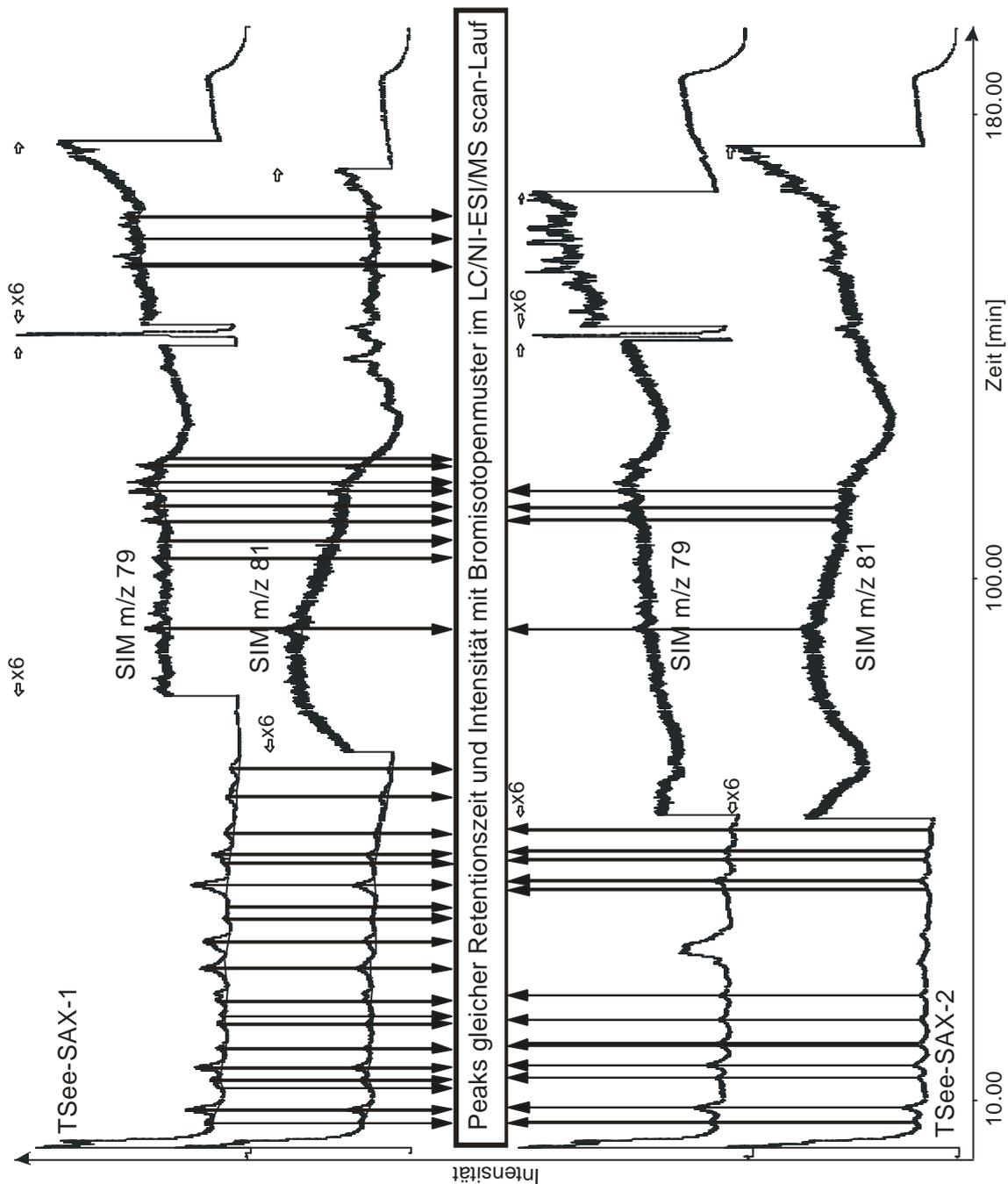


Bild 4.28: Vergleich der LC/NI-ESI-IISF/MS Chromatogramme zweier Proben unterschiedlicher Kultivierungszeit: TSee-SAX-1 = 248 d (72,4 µg/L AOB<sub>r</sub>) und TSee-SAX-2 = 367 d (102,7 µg/L AOB<sub>r</sub>); bromorganische Verbindungen sind durch Pfeile markiert; die Proben wurden mittels Extraktion an BondElut<sup>®</sup> SAX aufgearbeitet

Ein direkter Vergleich der LC/NI-ESI-IISF/MS-Chromatogramme beider Proben, ist in Bild 4.28 dargestellt. Im Verlauf der Seewasser-Batchtest-Kultivierung scheint nicht nur die Anzahl an detektierbaren organischen Bromverbindungen abzunehmen, sondern auch der Response dieser detektierbaren Verbindungen.

Die integrierte Fläche aller organischen Bromverbindungen ist für TSee-SAX-1 mit  $580.000 \pm 20.000$  Flächeneinheiten weitaus größer als für TSee-SAX-2 ( $166.000 \pm 2.000$  Flächeneinheiten). Berücksichtigt man die Anzahl an detektierten Bromatomen so ergibt sich ebenfalls ein höherer Response für TSee-SAX-1 mit  $13.000 \pm 400$  Flächeneinheiten/Brom, als für TSee-SAX-2 mit  $8.300 \pm 100$  Flächeneinheiten/Brom. Da im Gegensatz dazu der AOB<sub>r</sub> mit der Zeit ansteigt, werden bei der selektiven Bromdetektion mittels LC/Ni-ESI-IISF/MS nicht alle organischen Bromverbindungen gleich gut detektiert. Wie bereits in Kapitel 4.2.1.2 (Seite 49) dargelegt, ist das Signal strukturabhängig. Die Verringerung der Peakflächen kann aber auch auf mögliche Strukturveränderungen der Verbindungen zurückzuführen sein.

Um die Struktur der organischen Bromverbindungen nach SAX-Extraktion zu vergleichen, wurden in Tabelle 4.12 die strukturcharakteristischen Größen der einzelnen Verbindungen aufgeführt, sowie die Retentionszeit, da beide Proben unter gleichen Bedingungen analysiert wurden.

Obwohl es Verbindungen mit ähnlichen Retentionszeiten gibt, handelt es sich nie um identische Strukturen, da keine Übereinstimmung in den strukturcharakteristischen Größen vorliegt. Es ist vorstellbar, dass es im weiteren Kultivierungsverlauf durch veränderte Bedingungen im Batchtest (Nährstoffmangel, Dominanz anderer Organismen) zum Abbau oder zum Umbau der organischen Bromverbindungen kommt. Eine mögliche Umbaureaktion ist dabei die Abgabe von Halogenatomen oder der Interhalogenaustausch. Des Weiteren besteht die Möglichkeit der Anlagerung organischer Bromverbindungen an Huminsäuren, wodurch sie für die Analyse nicht mehr zugänglich wären. Das Phänomen der Anlagerung von halogenorganischen Verbindungen an Huminstoffe wurde durch Heumann et al. (2000) beschrieben, wobei beobachtet wurde, dass die Zusammensetzung der organischen Fraktion (Molekulargröße), die Iod aber auch in geringerem Maße Brom bindet, über einen Zeitraum von 4-8 Wochen nicht konstant ist. Auch bei iodorganischen Röntgenkontrastmitteln, die anscheinend in der Kolloidphase und/oder Huminstofffraktion gebunden waren, wurde durch Veränderung physikalischer, chemischer oder mikrobieller Parameter eine erhöhte Freisetzung vermutet (Schittko et al., 2004).

Eine einfache Halogenbilanz ist bei diesen Messungen schwierig, da die Molekulargewichte überwiegend unbekannt sind. Die reine Massendifferenz bei Halogenverlust oder Halogenaustausch führt für alle detektierten Verbindungen zu keinem sinnvollen Ergebnis. Es muss auch damit gerechnet werden, dass im weiteren Verlauf der Kultivierung andere Strukturveränderungen stattfinden können. Die Massenspektren der LC/Ni-ESI/MS-Detektion sind weniger reproduzierbar und unterliegen keinen festen Fragmentierungsparametern, wie bei der GC/EI/MS, sodass eine Identifikation mittels Spektrenbibliotheken nicht

möglich ist. Auch das Untergrundrauschen während der scan-Messungen ist so hoch, dass genaue Fragmentierungsmuster undeutlich sind (je nach Untergrundabzug unterschiedliche Fragmente).

*Tabelle 4.12: Strukturvergleich anhand strukturcharakteristischer Größen der detektierten organischen Bromverbindungen für eine Seewasser-Batchtestprobe mit zwei verschiedenen Kultivierungszeiten: TSee-SAX-1 = 248 d (72,4 µg/L AOB<sub>r</sub>) und TSee-SAX-2 = 367 d (127,4 µg/L AOB<sub>r</sub>); die Proben wurden mittels Anionenaustauscher BondElut® SAX aufgearbeitet und durch LC/NI-ESI-IISF/MS und LC/NI-ESI/MS im scan-Modus vermessen*

TSee-SAX-1					TSee-SAX-2			
Nr.	R(t) [min]	Basispeaks m/z	Molpeaks m/z	n(Halogen)	R(t) [min]	Basispeaks m/z	Molpeaks m/z	n(Halogen)
1	6,3	389	429	1Br+1Cl	6,51	345	429**	2Br+1Cl
2	8,74	235	378	2Br	9,23	235	271	1Br
3	12,92	339	473**	3Br+1Cl				
4	13,7	383	407	1Br+1Cl	14,12	339	375**	2Br
5	15,93	341	405**	1Br+2Cl	16,25	341	341**	1Br+2Cl
6	19,33	399	443**	1Br+2Cl	20,02	399	399**	2Br+2Cl
7	23,42	355	397**	2Br+1Cl				
8	24,97	303	397	2Br	24,12	287	389**	1Br+1Cl
9	28,84	355	399**	3Br+2Cl	28,44	301	407**	2Br
10	32,92	301	457	1Br+1Cl				
11	37,77	349	349	3Br				
12	41,47	369	359**	1Br+2Cl				
13	43,84	345	439**	1Br+2Cl	47,13	345	411**	2Br+1Cl
14	47,41	397	409**	1Br+2Cl	48,35	287	359**	2Br+1Cl
15	51,57	319	435**	1Br+2Cl	51,79	367	425**	1Br+2Cl
16	52,51	359	531**	1Br+1Cl	53,32	397	599**	1Br+2Cl
17	56,12	299	401	1Br+1Cl	57,18	429	515	1Br
18	62,65	411	425**	1Br+2Cl				
19	67,36	299	355	1Br				
20	76,97	379	421**	1Br+2Cl				
21	93,99	295	337**	2Br+2Cl	95,17	293	409**	1Br+1Cl
22	103,87	257	461**	1Br				
23	110,22	249	543	3Br+1Cl	110,4	541	541	1Br+1Cl
24	112,81	543	543	1Br+2Cl	112,96	249	539	1Br
25	114,98	263	263**	2Br	115,58	263	541	1Br+1Cl
26	116,45	541	541	2Br				
27	119,3	359	569	2Br				
28	120,46	350	350	1Br+1Cl				
29	153,63	255	333	1Br				
30	158,42	407	591	1Br				
31	161,93	375	469	1Br+1Cl				

\*\* potentieller Molekülionenpeak, da Diskrepanz im Halogenierungsgrad

Strukturveränderungen führen nicht nur zu anderen organischen Bromverbindungen, sondern auch zu veränderten Eigenschaften dieser Verbindungen. Mögliche Eigenschaften und ihre Veränderungen für die Detektion sind folgende:

- Polarität/Löslichkeit      Extraktionsverhalten und Retentionszeit,
- Ionisierungsverhalten      Response für ESI-MS scan-Messung,
- Molekulargröße              Extraktionsverhalten, Molpeak und

- Halogenierungsgrad Retentionszeit, Isotopenmuster und Molpeak.

Demnach kann eine veränderte Molekülstruktur auch zu verändertem Verhalten während der Probenaufarbeitung, Chromatographie und Ionisierung für die Detektion führen.

In allen vermessenen Sewasser-Batchtestproben fällt auf, dass ein überwiegender Teil der bromorganischen Verbindungen zusätzlich chloriert ist (68-73 %). Natürliche Chlorierungsreaktionen werden in der Literatur auch durch die enzymatische Reaktion durch Haloperoxidasen beschrieben. Eine Chlorierung wurde in der Literatur mittels Chlorperoxidasen beschrieben, ist aber auch durch Bromperoxidasen nicht ausgeschlossen (Neilson, 2003). Für die Chlorierung ist Chlorid als zusätzlicher Reaktionspartner neben NOM und Wasserstoffperoxid nötig, welches im Tegeler See- Wasser natürlich mit einer Konzentration von = 100 mg/L detektierbar ist (SenStadt, 2001). Bei den Algen-Batchtests hängt die Chloridkonzentration vom Nährmedium ab (Anhang II.ii.ii, Tabelle II.ii). In Cyanobakterien-Batchtests dürfte keine Chlorierung stattfinden, da das Nährmedium kein Chlorid enthält, dagegen enthält das Nährmedium für die Grünalgen-Batchtests 10 mg/L Chlorid, sodass hier prinzipiell eine zusätzliche Chlorierung möglich ist.

## 4.4 Verhalten im Untergrund

Am Tegeler See, Wannsee und auch am Müggelsee wird Rohwasser für die Trinkwassererzeugung aus Oberflächenwasser nach Uferfiltration (UF) gewonnen. Diese Art der Trinkwassergewinnung macht in Berlin mit 56 % des gesamten Trinkwassers den größten Teil aus (BWB, 2003). In allen drei Seen wird in heißen Sommermonaten eine Algenblüte beobachtet (Tegeler See bis vor 2001) (Lindenschmidt and Chorus, 1997; Teubner et al., 1999), die zu erhöhten Konzentrationen an organischen Bromverbindungen führt (Kapitel 4.1, Seite 27). Da nicht bekannt ist, um welche organischen Bromverbindungen es sich handelt und inwieweit sie toxisch sind, muss das Verhalten dieser Verbindungen während der Uferfiltration untersucht werden. Es ist bekannt, dass auch in den Trinkwasserbrunnen der Berliner Wasserbetriebe organische Bromverbindungen als AOB<sub>r</sub> detektiert werden und es somit zu keiner 100 %igen Eliminierung durch die Uferfiltration kommt (Wischnack, 2000).

Das Verhalten organischer Bromverbindungen wurde im Labor an Bodensäulen untersucht. Die Ergebnisse können mit einer Feldstudie an der Uferfiltration am Tegeler See und Wannsee (Grünheid, 2006) verglichen werden.

### 4.4.1 Labor-Bodensäulen

Für die Versuche wurden vier verschiedene Bodensäulen mit unterschiedlichen Redoxverhältnissen verwendet (Bild 4.29). Die Verhältnisse in den vier verwendeten Bodensäulen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

S1 – Infiltration von sauerstoffhaltigem Oberflächenwasser durch technisch gebrannten Sand,

S7 – Infiltration von sauerstoffhaltigem Oberflächenwasser durch natürliches Bodenmaterial, welches aus dem Uferbereich des Tegeler Sees stammt,

S3 – Infiltration von sauerstoffhaltigem Oberflächenwasser durch technisch gebrannten Sand, Zudosierung von Stärke, wodurch vorhandener Sauerstoff und vorhandenes Nitrat sofort nach Beginn der Infiltration durch biologische Prozesse aufgebraucht werden und anoxische/anaerobe Verhältnisse entstehen und

S6 - Infiltration von sauerstofffreiem Oberflächenwasser durch technisch gebrannten Sand, Zudosierung von Stärke, wodurch vorhandenes Nitrat sofort nach Beginn der Infiltration aufgebraucht wird und anoxische/anaerobe Verhältnisse entstehen.

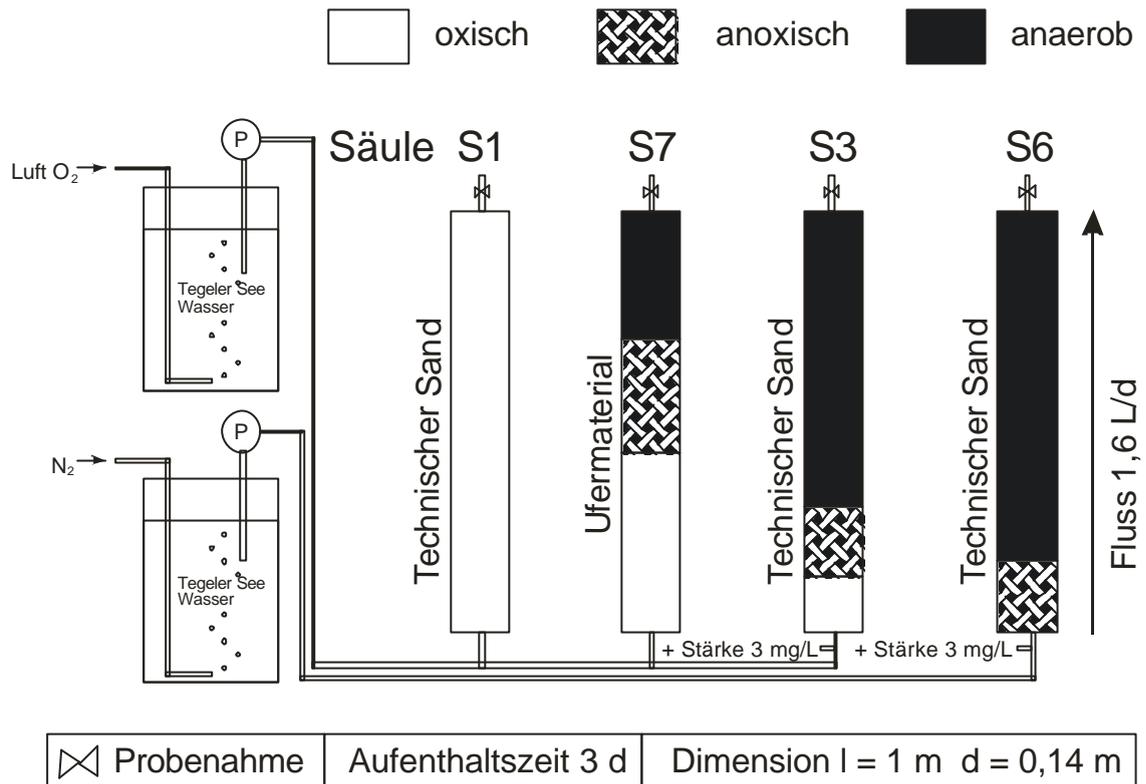


Bild 4.29: Aufbau der Bodensäulen und eingestellte Redoxverhältnisse für die Laborversuche

Da die Säulen permanent von Oberflächenwasser aus dem Tegeler See durchströmt werden, ist die AOB<sub>r</sub>-Anfangskonzentration im Vorrat (Vorrats-AOB<sub>r</sub>) und nach Durchlauf der Säulen (Durchlauf-AOB<sub>r</sub>) für die Versuche von Bedeutung. Die entsprechenden Anfangskonzentrationen sind in Tabelle 4.13 angegeben.

Tabelle 4.13: AOB<sub>r</sub>-Anfangskonzentrationen vor Beginn der eigentlichen Versuche: Vorrats-AOB<sub>r</sub> = AOB<sub>r</sub>-Konzentration im Vorratsbehälter und Durchlauf-AOB<sub>r</sub> = AOB<sub>r</sub>-Konzentration am Ausgang der Bodensäulen

Bezeichnung	Probe	AOB <sub>r</sub> [µg/L]	AOB <sub>r</sub> +SO <sub>3</sub> [µg/L]	Bezeichnung	Säule	AOB <sub>r</sub> [µg/L]	AOB <sub>r</sub> +SO <sub>3</sub> [µg/L]
Vorrats-AOB <sub>r</sub>	November 05	6,6	3,4	Durchlauf-AOB <sub>r</sub>	S1	3,8	3,4
	Februar 06	4,3	n.b.		S7	1,4	2
			S3		3,9	3,5	
			S6		3,3	2,9	

Durch Tracerversuche mit einer KCl-Lösung wurde die Totzeit der vier Bodensäulen für nicht retardierende Verbindungen mit  $90 \pm 10$  h bestimmt (siehe Anhang III.vii, Tabelle III.5).

Der eigentliche Versuch begann mit Aufgabe einer Cyanobakterien-Batchtestprobe (AOBr = 39  $\mu\text{g/L}$  und AOBr+SO<sub>3</sub> = 31  $\mu\text{g/L}$ ). Zur Auswertung der Eliminierung des AOBr aus dem Cyanobakterien-Batchtest muss für die bestimmte Konzentration am Säulenausgang der dazugehörige Durchlauf-AOBr berücksichtigt werden (Tabelle 4.13).

Für alle vier Säulen ist ein schneller Durchbruch der organischen Bromverbindungen mit einem maximalen AOBr nach  $120 \pm 15$  h zu beobachten, was der 1,5 - 1,3fachen Totzeit entspricht. Der algenproduzierte AOBr (Algen-AOBr) passiert die Säule demnach nicht ungehindert. Die Konzentration an Algen-AOBr wird in den überwiegend anoxisch/anaeroben Säulen generell stärker reduziert (S3 und S6), als in den Säulen mit überwiegenden oxisch/anoxischen Verhältnissen (S1 und S7; Bild 4.30 für S1 und S3; Anhang III.vii, Bild III.3 für S6 und S7). Die Cyanobakterien-Batchtestprobe (200ml) wurde für 3 h statt des Tegeler See- Wassers auf die Bodensäulen gegeben. Danach wurden die Säulen wieder mit Tegeler See-Vorratswasser beschickt. Es kommt demnach zu einer kontinuierlichen Verdünnung der aufgegebenen Batchtestproben.

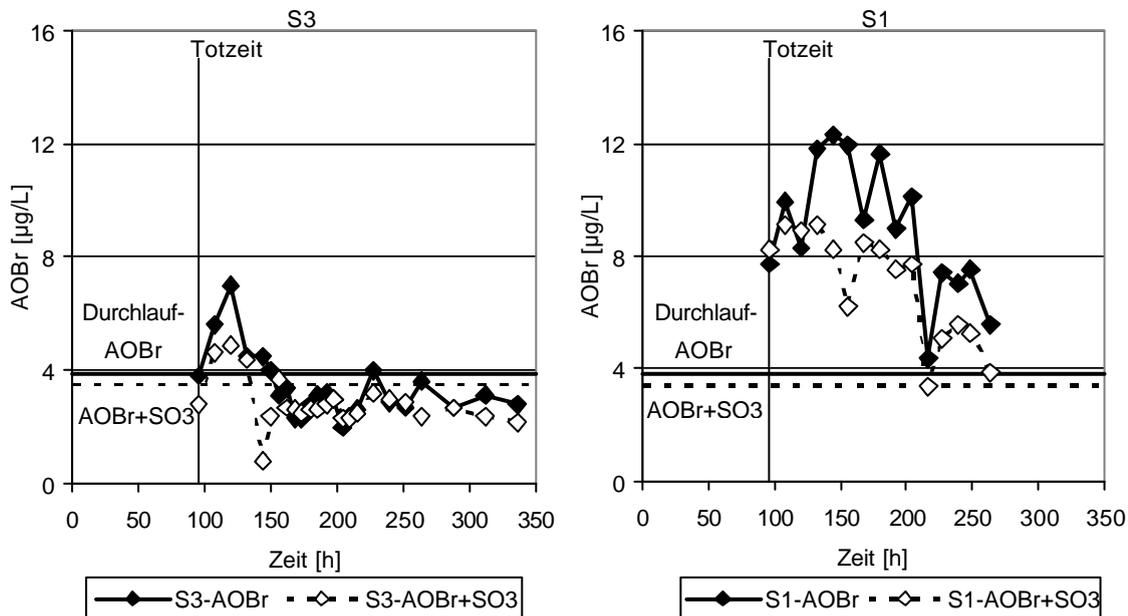


Bild 4.30: AOBr-Konzentrationen im Ablauf der Säulen S1 (sauerstoffgesättigtes Vorratswasser) und S3 (sauerstoffgesättigtes Vorratswasser und zusätzliche Stärkedotierung (3 mg/L)) nach Beschickung mit einer AOBr-haltigen Probe aus einem Cyanobakterien-Batchtest (39  $\mu\text{g/L}$  AOBr)

Im Fall der S3-Säule beträgt die maximale AOB<sub>r</sub>-Konzentration, nach 120 d im Säulenauslauf lediglich 7 µg/L. Unter Abzug der Durchlaufkonzentration an AOB<sub>r</sub> verbleiben 3 µg/L, welche algenproduziert sein müssen, da sie aus dem Cyanobakterien-Batchtest stammen. Nach 150 d liegt der AOB<sub>r</sub> im Bereich der Hintergrundwerte, sodass kein algenproduzierter AOB<sub>r</sub> mehr nachweisbar ist. Das Ergebnis zeigt, dass unter überwiegend anoxisch/anaeroben Bedingungen Algen-AOB<sub>r</sub> zu 100 % eliminiert bzw. transformiert wird. AOB<sub>r</sub>-Gehalte unter dem Durchlauf-AOB<sub>r</sub> zeigen hierbei eine Eliminierung der AOB<sub>r</sub>-Komponenten im Vorratswasser an.

Unter überwiegend oxisch/anoxischen Bedingungen wird der Algen-AOB<sub>r</sub> nicht eliminiert. Im Fall der rein oxischen Säule (S1; Bild 4.30) ist nach 150 d eine maximale Algen-AOB<sub>r</sub>-Konzentration von 8,5 µg/L zu messen (nach Abzug des Durchlauf-AOB<sub>r</sub>). Im weiteren Verlauf schwankt die Konzentration, nimmt aber stetig ab und beträgt nach 260 d immer noch 2 µg/L. Diese Ergebnisse zeigen, dass unter überwiegend oxisch/anoxischen Bedingungen der Algen-AOB<sub>r</sub> nicht zu 100 % eliminiert wird und es zu einer Wechselwirkung mit dem Säulenmaterial kommt.

Zusätzlich zur konventionellen AOB<sub>r</sub>-Messung wurden die Proben nach Reduktion mit Natriumsulfit gemessen, um den reduzierbaren AOB<sub>r</sub>-Anteil zu bestimmen (siehe auch Kapitel 4.3.1.3, Seite 65). Der reduzierbare Anteil beträgt nach passieren der S3-Säule im Maximum  $25 \pm 5$  %, wobei im weiteren Verlauf nach 156 d nur ein geringer Unterschied in der Reduzierbarkeit (9 %) zu erkennen ist.

Es wurde eine Differenzierung der durch Grünheid et al. (2006) geprägten algenproduzierten Bromverbindungen aus dem See (Algen-AOB<sub>r</sub>) und anthropogenen Bromverbindungen aus den Zuläufen (Zulauf-AOB<sub>r</sub>) mit Hilfe der Reduzierbarkeit angestrebt. Voraussetzung für diese Differenzierung ist eine unterschiedliche Reduzierbarkeit für Algen-AOB<sub>r</sub> und anthropogenen Zulauf-AOB<sub>r</sub>. AOB<sub>r</sub>-Messungen in Berliner Gewässern haben eine einheitliche mittlere Reduzierbarkeit in allen Gewässern von  $53 \pm 4$  % (Tabelle 4.8, Seite 67, ohne Nordgraben/Tegeler Fließ) ergeben. Dagegen beträgt die Sulfitreduzierbarkeit in den Zuläufen des Tegeler Sees (Nordgraben und Tegeler Fließ) nur  $13 \pm 2$  % (siehe Kapitel 4.3.1.3, Seite 68). Im Falle der Säule S3 liegt beim Durchbruch die Reduzierbarkeit der AOB<sub>r</sub>-Verbindungen zwischen dem Algen-AOB<sub>r</sub> und Zulauf-AOB<sub>r</sub>, sodass auf einen algenproduzierten Anteil geschlossen werden kann, was auch durch die höheren Konzentrationen als dem Durchlauf-AOB<sub>r</sub> deutlich wird. Legt man eine 13 %ige Reduzierbarkeit für den Zulauf-AOB<sub>r</sub> zugrunde, so stammt der AOB<sub>r</sub> im Durchbruchmaximum zu 52 % aus Algen-AOB<sub>r</sub>, wobei nicht unterschieden werden kann, ob dieser Algen-AOB<sub>r</sub> allein aus dem Cyanobakterien-Batchtest oder zusätzlich aus dem Vorratswasser stammt. Nach 156 d ist die

Reduzierbarkeit sogar geringer als der Zulauf-AOBr, was auf eine zusätzliche Eliminierung von Zulauf-AOBr aus dem Vorratswasser zurückzuführen ist. Demnach wurde der Algen-AOBr zu 100 % eliminiert und der Zulauf-AOBr aus dem Vorratswasser zu 30 %. Für die Messungen mit geringer Reduzierbarkeit sind allerdings hohe Schwankungen und ein daraus resultierender Fehler von 18 % zu berücksichtigen. Da der Fehler größer ist als der Analysenwert (9 %) wird auf die prozentuale Angabe der Zulauf-AOBr-Reduktion verzichtet. Anhand der prozentualen Anteile an Algen- und Zulauf-AOBr ist zwar eine Differenzierung der Herkunft der organischen Bromverbindungen prinzipiell möglich, sollte jedoch durch weitere Versuche verifiziert werden.

Um die Art der AOBr-Eliminierung zu untersuchen wurden weitere Parameter aufgenommen (DOC, DOC-Größenverteilung (LC-OCD) und SAK<sub>254</sub>), die aber durch die geringe AOBr-Konzentration der Probe (39 µg/L) keine aussagekräftigen Ergebnisse lieferten (siehe Anhang III.vii, Tabelle III.6, Bild III.3).

Um eine mögliche Mineralisierung der organischen Bromverbindungen zu untersuchen, wurde die Konzentration an anorganischem Bromid erfasst. Die Bestimmung der Änderung an anorganischem Bromid wurde allerdings durch hohe Ausgangskonzentrationen ( $117 \pm 6$  µg/L) und durch eine Bestimmungsmethode mit hohen Schwankungsbreiten (Standardabweichung der Doppelbestimmungen  $12 \pm 6$  %) erschwert. Bei einer hypothetischen Mineralisierung des gesamten AOBr (39 µg/L) würde der anorganische Bromidgehalt lediglich um 33 % ansteigen, was bei einer maximalen Schwankungsbreite von 18 % nur schwach zu erkennen ist. Da zusätzlich Verdünnungs- und Adsorptionseffekte berücksichtigt werden müssen, die eine AOBr-Reduktion mit beeinflussen, kann der Anteil der Mineralisierung durch die Quantifizierung von Bromid nicht bestimmt werden (Bromidmesswerte siehe Anhang III.vii, Tabelle III.6). Eine Mineralisierung kann demnach nicht vollständig ausgeschlossen werden und bedarf weiterer Untersuchungen mit genaueren Analysemethoden.

Es hat sich bestätigt, dass algenproduzierter AOBr in anoxisch/anaeroben Laborbodensäulen zu 100 % reduziert wird. Die Eliminierung von algenproduziertem AOBr stimmt somit mit den Ergebnissen im Feld, bei denen eine 100 %ige Eliminierung veranschlagt wird (Grünheid, 2006), gut überein. Die Reduktion findet wahrscheinlich durch Mineralisierung und Adsorption am Säulenmaterial statt.

## 5 ABSCHLUSSDISKUSSION

Über mehrere Jahre (1998-2005) wurde die Konzentration an organischen Bromverbindungen, gemessen als adsorbierbare organische Bromverbindungen (AOBr) in Berliner Oberflächengewässern bestimmt (Grünheid, 2006; Putschew et al., 2003; Wischnack, 2000). Dabei fällt im Jahresprofil ein immer wiederkehrendes Maximum an bromorganischen Verbindungen im Spätsommer (August bis September) auf. Der AOBr kann in diesen Monaten eine Konzentration von bis zu  $32 \pm 6 \mu\text{g/L}$  erreichen, wobei er im restlichen Jahresverlauf bei  $9 \pm 3 \mu\text{g/L}$  liegt. Da auch zur Zeit des Spätsommermaximums an AOBr die Konzentrationen in den Zuläufen konstant bleiben, müssen die organischen Bromverbindungen im See gebildet werden.

Aus dem marinen Bereich ist bekannt, dass organische Bromverbindungen natürlich gebildet werden. Daran sind sowohl Bakterien, Algen, höhere Pflanzen als auch Säugetiere beteiligt. Einige der im marinen Bereich isolierten organischen Bromverbindungen sind toxisch (z.B. Telfairin mit einer vergleichbaren Toxizität wie Lindan; Gribble, 1998) und können durch Verzehr in anderen Organismen (Vögel, Fische aber auch dem Menschen) akkumuliert werden (Gribble et al., 1999; Tittlemier et al., 1999; Vetter et al., 2000). Im Süßwasser ist die Bildung organischer Bromverbindungen bisher unbekannt. Allerdings erfordert die Nähe des Menschen zum Süßwasser (Quelle des Trinkwassers, Freizeitgestaltung, Süßwasserfische als Nahrungsquelle) eine Aufklärung des Ursprunges der natürlichen organischen Bromverbindungen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst die Bildungsursache und der Mechanismus näher untersucht. Die gebildeten organischen Bromverbindungen wurden charakterisiert und das Verhalten während der Uferfiltration betrachtet.

### **Feldstudie**

Die Aufnahme von Tiefenprofilen hat gezeigt, dass im Spätsommer erhöhte AOBr-Konzentrationen im Bereich der Wasseroberfläche (1-5 m) vorliegen. Im Bereich der Wasseroberfläche ist auch die höchste Algendichte bestimmt worden und Wasserstoffperoxid nachweisbar ( $11 \pm 1 \mu\text{g/L}$ ). Die Konzentration von Bromid ( $100 \mu\text{g/L}$ ) ist über die gesamte Wassertiefe nahezu konstant. Die Tiefenprofile der AOBr und der Chlorophyll-*a*-Konzentration, als Parameter für die Algendichte, zeigen eine gestaffelte Korrelation. Erhöhte AOBr-Konzentrationen sind erst dann messbar, wenn die Chlorophyll-*a*-Konzentration abnimmt. Diese gestaffelte Ausbildung der Konzentrationsmaxima deutet an, dass phototrophe Organismen für die erhöhten AOBr-Gehalte verantwortlich sind und dass es erst nach dem Absterben der Organismen zu einer bedeutenden AOBr-Bildung kommt.

Spätsommerlich erhöhte AOB<sub>r</sub>-Konzentrationen konnten in verschiedenen Oberflächengewässern, die alle durch eine Algenblüte charakterisiert sind, nachgewiesen werden. Nicht nur in anthropogen beeinflussten Seen wie Wannensee oder Tegeler See sondern auch in dem weitaus unbeeinflussten Müggelsee konnten erhöhte AOB<sub>r</sub>-Gehalte im Spätsommer bestimmt werden. Erhöhte Konzentrationen bromorganischer Verbindungen können demnach in allen Oberflächengewässern, in denen es zu einer Algenblüte kommt, erwartet werden.

### **Bildungsmechanismus**

Die Bildung organischer Bromverbindungen kann im Labor simuliert werden. Eine Simulation ist mit Oberflächenwasser sowie mit Algenkulturen möglich. Hell/dunkel-Versuche zeigten eine höhere AOB<sub>r</sub>-Bildung im Hellen, wobei es auch bei den dunkel-Versuchen zu einer anfänglichen AOB<sub>r</sub>-Produktion kommt. Diese kann im Zusammenhang mit der fortlaufenden Aktivität phototropher Organismen (Dunkelreaktion der Photosynthese) stehen und/oder durch die Dunkelheit als Stressfaktor erklärt werden. Larnus et al. (2000) zeigte, dass Stressfaktoren wie Temperatur, Licht und Salinität die Bildung bromorganischer Verbindungen fördern. Die Versuche haben eindeutig gezeigt, dass Licht eine Grundvoraussetzung für die AOB<sub>r</sub>-Simulation ist. Dass phototrophe Organismen an der AOB<sub>r</sub>-Bildung beteiligt sind, konnte eindeutig durch Laborversuche mit Zugabe von Diuron<sup>®</sup> als Photosynthesehemmer gezeigt werden. Bei diesen Versuchen wurde keine AOB<sub>r</sub>-Bildung festgestellt. Der Einfluss anderer Organismen wurde durch die Zugabe von Natriumazid (Putschew et al., 2003), zur Hemmung aller Organismen ausgeschlossen. Auch hier wurde keine AOB<sub>r</sub>-Bildung beobachtet. Zahlreiche Versuche ohne Zugabe von phototrophen Organismen mit und ohne Beleuchtung haben belegt, dass die AOB<sub>r</sub>-Bildung nicht durch eine abiotische Reaktion erfolgt.

Die tatsächliche Produktion des AOB<sub>r</sub> ist sowohl im Labor als auch im Oberflächengewässer in erster Linie nach Absterben der Biomasse zu beobachten. Es konnte gezeigt werden, dass phototrophe Organismen Bromid in ihre Zellen einlagern und auch wieder abgeben können. Die Auf- und Abgabe erfolgt „wahllos“, wobei alles Bromid nach dem Absterben der Organismen abgegeben wird. Die Abgabe nach dem Absterben führt dann zu einer erheblichen AOB<sub>r</sub>-Zunahme. Es konnte auch eine intrazelluläre Produktion organischer Bromverbindungen (OBr) nachgewiesen werden. Die OBr-Bildung in der Zelle korreliert mit dem Organismenwachstum. Der Anteil an intrazellulär gebildetem OBr in der wässrigen Phase ist auch vom Wachstum der Organismen abhängig. Es ist nicht unterscheidbar, ob dieser Anteil von lebenden Organismen abgegeben wird oder von bereits abgestorbenen Organismen stammt. Für die intrazelluläre OBr-Bildung ist die Wachstumsgeschwindigkeit der Organismen von Bedeutung. Findet ein

schnelles Wachstum mit baldigem Organismensterben statt, so überwiegt die extrazelluläre AOB<sub>r</sub>-Produktion. Dagegen führt ein langsames Wachstum zu einer überwiegend intrazellulären AOB<sub>r</sub>-Bildung.

Eine Steigerung der AOB<sub>r</sub>-Bildungsrate konnte im Batchtest mit phototrophen Organismen einerseits durch Nährstoffmangel (1:10 verdünntes Nährmedium) erzeugt werden, was einen für die AOB<sub>r</sub>-Bildung positiven Stressfaktor darstellt. Andererseits findet im Batchtest eine erhöhte AOB<sub>r</sub>-Produktion in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid statt. Eine Wasserstoffperoxid-Dotierung kann zu einer Verzehnfachung des AOB<sub>r</sub> bei Cyanobakterienkulturen im Gegensatz zur Kultivierung ohne Wasserstoffperoxid führen. Dabei werden AOB<sub>r</sub>-Konzentrationen erreicht, die auch mit Mischkulturen aus Oberflächengewässern im Batchtest produziert werden können und dem AOB<sub>r</sub>-Maximum im Spätsommer in Oberflächengewässern entsprechen. Es ist wahrscheinlich, dass die Bildung enzymatisch mittels Haloperoxidasen erfolgt. Haloperoxidasen sind Enzyme, die in Anwesenheit von Halogeniden, Wasserstoffperoxid und natürlichem organischem Material (NOM) die Synthese von organischen Halogenverbindungen katalysieren. Versuche mit Bromperoxidase und NOM aus unterschiedlichen Quellen haben gezeigt, dass in Anwesenheit von Bromid und Wasserstoffperoxid AOB<sub>r</sub> gebildet wird. Die AOB<sub>r</sub>-Bildung hängt nicht nur von der Konzentration an NOM ab, sondern auch von dessen Zusammensetzung. So wird mit NOM aus dem Suwannee River mehr als das fünffache an AOB<sub>r</sub> produziert, als mit NOM aus dem Tegeler See.

Ein hypothetischer Bildungsmechanismus ist in Bild 5.1 dargestellt. Danach nehmen Algen während ihres Wachstums anorganisches Bromid auf und produzieren intrazellulär in kleinen Konzentrationen organische Bromverbindungen, die sie während wachstumsgehemmter Phasen in die wässrige Umgebung abgeben, sei es durch lebende oder abgestorbene Organismen. Der größte Anteil des aufgenommenen anorganischen Bromids wird wieder abgegeben. Die Abgabe des intrazellulären Bromids korreliert mit einem ausbleibenden Algenwachstum oder beginnendem Algensterben. Mit dem Absterben der Organismen werden möglicherweise zusätzlich Haloperoxidaseenzyme frei, zum Beispiel durch Zelllyse. In der extrazellulären Umgebung könnte dann die enzymatische Bromierung natürlichen organischen Materials mittels Haloperoxidasen stattfinden.

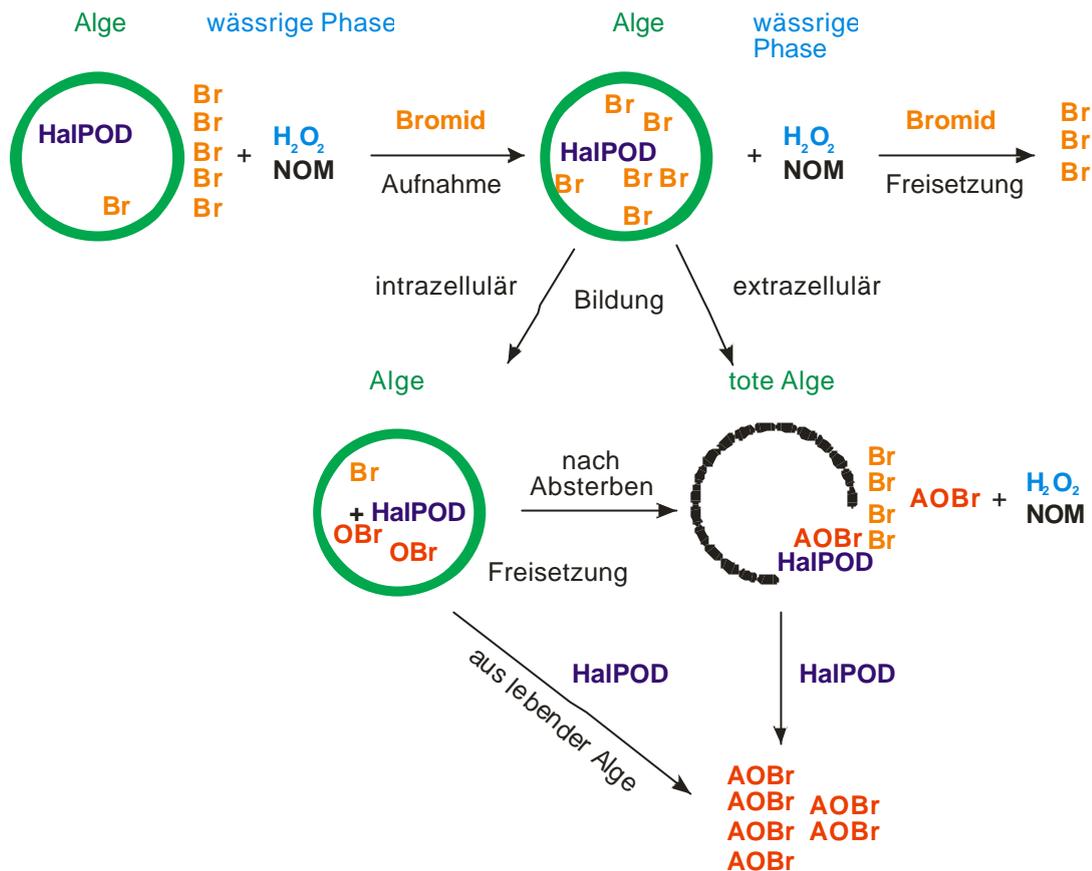


Bild 5.1: Hypothetischer Bildungsmechanismus der organischen Bromverbindungen (AOBr)

Wasserstoffperoxid spielt dabei in erster Linie eine induzierende Rolle, da in Batchtests auch mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen im Spurenbereich hohe AOBrs-Konzentrationen gebildet werden. Vermutlich bewirkt ein Kontakt der Alge mit Wasserstoffperoxid die Bildung oder Aktivierung der Haloperoxidase.

### Eigenschaften der natürlichen organischen Bromverbindungen

Die natürlich gebildeten organischen Bromverbindungen sind nicht flüchtig. Sie sind überwiegend polar, wobei die bei der Produktion beteiligten Organismen einen großen Einfluss auf ihre Polarität zu haben scheinen. So ist der AOBrs aus Seewasser-Batchtests überwiegend polar und anionisch (82-85 %). Der polare AOBrs-Anteil in Batchtests mit *Microcystis aeruginosa* beträgt allerdings nur 54 %. Davon ist nur ein geringer Anteil anionisch (20 %). Zusätzlich tritt bei den cyanobakterienproduzierten organischen Bromverbindungen ein schwach apolarer Anteil (14 %) auf. Es wird vermutet, dass die organischen Bromverbindungen aus Oberflächengewässern Polaritäten aufweisen, die mit denen aus Seewasser-Batchtests vergleichbar sind, da diese mit Mischkulturen aus Oberflächengewässern angesetzt wurden. Danach würde der AOBrs aus Oberflächengewässern zum größten Teil polar und anionisch sein.

Als ein weiteres Charakterisierungskriterium für organische Bromverbindungen hat sich die Reduzierbarkeit mit Sulfid ergeben. Es hat sich gezeigt, dass der reduzierbare Anteil des AOB<sub>r</sub> aus Berliner Oberflächengewässern im Spätsommer (im Mittel  $53 \pm 4$  %) und während der spätsommerlichen AOB<sub>r</sub>-Bildung im Wannsee (im Mittel  $48 \pm 16$  %) mit denen aus Seewasser, Algenkulturen und Bromperoxidase-Batchtests (im Mittel  $34 \pm 10$  %) vergleichbar ist. Grünheid et al. (2006) unterschied im Oberflächenwasser zwei verschiedene Frachten: den Zulauf-AOB<sub>r</sub>, der aus den Zuläufen der Oberflächengewässer stammt, das ganze Jahr über messbar ist und wahrscheinlich anthropogener Natur ist und den Algen-AOB<sub>r</sub>, der im See selber natürlich durch Algen produziert wird und saisonal im Spätsommer nach starken Algenblüten auftritt. Diese zwei Frachten können theoretisch anhand der Sulfitreduzierbarkeit analytisch differenziert werden. So hat der Zulauf-AOB<sub>r</sub> im Tegeler See aus Nordgraben und Tegeler Fließ eine Reduzierbarkeit von lediglich  $13 \pm 2$  % während der Algen-AOB<sub>r</sub> in Berliner Oberflächengewässern (Wannsee, Tegeler See, Havel, Spree, Müggelsee) im Mittel eine Reduzierbarkeit von  $53 \pm 4$  % hat, wobei dieser zu einem geringen Teil auch aus Zulauf-AOB<sub>r</sub> besteht. Diese analytische Differenzierung wird für die Untersuchungen während der Uferfiltration herangezogen.

### **Selektive Detektionsmethode für polare organische Bromverbindungen**

Um selektiv polare organische Bromverbindungen detektieren zu können, wurde eine massenspektrometrische Methode (MS) entwickelt, die mit einer flüssigkeitschromatographischen Trennung (LC) gekoppelt ist und organische Bromverbindungen via Bromid detektiert. Die Ionisierung mittels Elektrospray findet im ESI-negativ Modus (NI-ESI) statt, da Bromid negative Ladungen stabilisiert. Dabei werden die Analyten bereits in der Quelle (in-source) durch eine hohe Cone-Spannung, idealerweise bis zu ihren Elementen, fragmentiert. Dieser Schritt wird als induzierte in-source Fragmentierung (IISF) bezeichnet. Im MS werden für die selektive Detektion von Bromverbindungen lediglich die Massen der beiden Isotope  $m/z$  79 und  $m/z$  81 aufgenommen. Dadurch wird eine hohe Empfindlichkeit mit Bestimmungsgrenzen von  $5 \mu\text{g/L}$  und Nachweisgrenzen von  $1 \mu\text{g/L}$  erreicht. Da der auf ein Bromatom normalisierte Response für unterschiedliche organische Bromverbindungen nicht gleich ist, ist das Signal strukturabhängig. Demzufolge ist eine Quantifizierung des organisch gebundenen Broms mittels LC/NI-ESI-IISF/MS für unbekannte Verbindungen nicht möglich. Es hat sich gezeigt, dass die Empfindlichkeit der Bestimmung mit NI-ESI-IISF/MS das hochselektive und empfindliche NI-ESI/MS-MS Verfahren im Multi-Reaction-Monitoring- (MRM) Modus übersteigt.

Zusätzliche Strukturinformationen über die mittels LC/NI-ESI-IISF/MS detektierten Bromverbindungen können durch die herkömmliche NI-ESI/MS-Analytik im scan-Modus erlangt werden. Dabei wird die zuvor selektiv auf

Bromverbindungen untersuchte Probe ein zweites Mal ohne IISF, also mit einer moderaten Cone-Spannung, gemessen und alle Massen über einen definierten m/z-Bereich aufgenommen. Bei Verwendung der gleichen LC-Methode lassen sich zu Retentionszeiten selektiv detektierter Bromverbindungen Massenspektren mit Bromisotopenmustern extrahieren. Diese Spektren geben Aufschluss über das Molekulargewicht (Molekülonen) und den Bromierungs- bzw. zusätzlich Chlorierungsgrad (Isotopenmuster).

### **Bromorganische Einzelstoffe**

Mittels GC-MS konnten drei organische Bromverbindungen identifiziert werden. Die beiden Haloessigsäuren (HAA): Dibromessigsäure (DBA) und Bromchlor-essigsäure (BCA) sind bekannte Desinfektionsnebenprodukte (DBP) aus der Trinkwasseraufbereitung. Sie entstehen bei der Chlorung oder Ozonung (Huang et al., 2005) von Rohwasser, durch die Reaktion von Chlor bzw. Ozon mit natürlichem organischem Material (NOM) und/oder Bromid. Haloessigsäuren haben eine geringe Flüchtigkeit, sind gut wasserlöslich und ziemlich stabil. Die Toxizität (Karzogenität, Mutagenität) dieser beiden Verbindungen wird kontrovers diskutiert. Epidemiologische Untersuchungen haben einen Zusammenhang zwischen dem Konsum von chloriertem Trinkwasser und Blasen-, Nieren- und Magen-Darm-Krebs des Menschen gezeigt (Koivusalo et al., 1994; Morris et al., 1992). Im Allgemeinen werden Trinkwasser-DBP als karzinogen diskutiert, was an Labornagetieren (Ratten, Mäuse) untersucht wurde (Bull et al., 1990; Deangelo et al., 1996; Deangelo et al., 1991). Die karzinogene Aktivität von BCA und DBA ist allerdings derzeit noch unklar. Es wurde auf ein mögliches Bioaktivierungspotenzial von Promutagenen und Prokarzinogenen im Trinkwasser durch beide HAA's verwiesen, da es in Rattentests mit erhöhten HAA-Dosen (1 g/L *ad libitum* über 5 Wochen) zu Veränderungen der Darmflora kam (George et al., 2000). Sowohl DBA als auch BCA haben einen Einfluss auf die Spermatogenese und Fertilität bei erwachsenen Rattenmännchen gezeigt, wobei der no-observed-effect Level bei weniger als 8 mg/kg Körpergewicht und Tag lag (Klinefelter et al., 2002; Linder et al., 1995; Linder et al., 1994). Eine Immuntoxizität von DBA wurde bei Konzentrationen von 125-2000 mg/L im Trinkwasser angegeben, was um mehrere Dimensionen über dem maximalen Kontaminationslimit (MCL), der Summe aus fünf verschiedenen HAA's, von 60 µg/L liegt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass DBA in sub-chronischen Konzentrationen von 5-50 mg/kg/d bei Mäusen keinen Einfluss auf die Spermatogenese und Entwicklung der Jungtiere hat (Weber et al., 2006). Dibromessigsäure wurde in einer marinen Rotalge *Asparagopsis armata* als eines der wichtigsten natürlichen Produkte neben Bromoform gefunden. In der Alge wurden Gehalte von 0,02-2,6 % DBA in der Trockenmasse detektiert. Die Rotalge scheint DBA als chemischen Abwehrstoff zu produzieren, um seine antimikrobielle Aktivität zu nutzen. DBA hat sowohl gegen marine als auch gegen biomedizinische Bakterien antimikrobielle

Wirkungen (Paul et al., 2006). Weiterhin wurde die Verbindung 4-Brom-3-nitrobiphenyl durch GC-MS detektiert. Diese Verbindung wird in der Literatur nicht näher erwähnt. Alle drei Verbindungen wurden allerdings nur einmalig in einer aufkonzentrierten Seewasser-Batchtestprobe nach Entsalzung und anschließender Kieselgelfraktionierung detektiert und mittels Spektrenbibliothek identifiziert. Selbst Wiederholungsmessungen in der gleichen Probe führten zu keinem erneuten positiven Ergebnis. Es wird vermutet, dass sich die Probe im Laufe der Zeit derart verändert hat, dass eine weitere Detektion nicht möglich war. Insgesamt wurden per GC-MS zahlreiche weitere organische Bromverbindungen in der oben genannten Seewasser-Batchtestprobe gefunden, die aber nicht näher charakterisiert werden konnten. Anhand der Isotopenmuster mit zwei Masseneinheiten Unterschied und den entsprechenden Intensitätsverhältnissen wurden maximal zehn verschiedene Verbindungen in einer Probe gefunden.

Bei der spezifischen Bromdetektion einer Seewasser-Batchtestprobe (Alter: 248 d, AOB<sub>r</sub>: 72,4 µg/L) nach SAX-Anreicherung mittels LC/Ni-ESI-IISF/MS wurden sogar 31 verschiedene Bromverbindungen detektiert. Dabei handelt es sich um einfach bis dreifach bromierte Verbindungen, wobei 21 der 31 Verbindungen zusätzlich einfach bis zweifach chlorierte sind. Dieser hohe Grad an Chlorierung (68 %) der selektiv detektierten Bromverbindungen kann auch enzymatisch durch Haloperoxidasereaktionen entstehen (Neilson, 2003). Gribble (2003) verweist auf einige hundert natürliche Organohalogenverbindungen, die sowohl bromiert als auch chloriert sind. Nach einer Zeit von 376 d und einem höheren AOB<sub>r</sub> (102,7 µg/L) sind nach gleicher Probenaufarbeitung (parallele Extraktion, Anreicherung), Analyse und Detektion wesentlich weniger Bromverbindungen messbar. Die Struktur der bromorganischen Verbindungen hat sich also im Laufe der Zeit verändert. Insgesamt werden sogar weniger bromorganische Verbindungen in der älteren Probe gemessen (Summe der Flächeneinheiten bromorganischer Signale), obwohl es zu einer Erhöhung des AOB<sub>r</sub> kommt. Das könnte einerseits mit der strukturabhängigen Detektion nach LC/Ni-ESI-IISF/MS zusammenhängen, andererseits könnte es auch zu einer Anlagerung bromorganischer Verbindungen an Huminstoffen kommen, wodurch sie für die Analyse nicht mehr zugänglich wären. Eine Anlagerung von organischen Brom- und Iodverbindungen an Huminstoffe ist bekannt, wobei es mit der Zeit zu einer Veränderung der Assoziation an verschiedenen großen Huminstofffraktionen kommen kann (Heumann et al., 2000). Auch Schittko et al. (2004) vermutete die Anlagerung von iodorganischen Röntgenkontrastmitteln an der Kolloidphase und/oder Huminstofffraktion des Bodens und deren Freisetzung durch veränderte Bodenparameter.

### **Bromorganische Verbindungen während der Uferfiltration**

Versuche an Laborbodensäulen zeigten eine schwache Wechselwirkung der organischen Bromverbindungen mit dem Säulenmaterial, da sie im Gegensatz zu einer nicht retardierenden Substanz die Säulen etwas verzögert verlassen (1,5-1,3fache Totzeit). Eine Eliminierung/Transformation der algenproduzierten organischen Bromverbindungen findet unter anoxisch/anaeroben Bedingungen statt, jedoch nicht bei oxisch/anoxischen Bedingungen. Die Vermutung von Grünheid et al. (2006) einer 100 %igen Eliminierung von algenproduzierten AOB<sub>r</sub> konnte unter anoxisch/anaeroben Bedingungen bestätigt werden. Eine Differenzierung des AOB<sub>r</sub> anhand der Reduzierbarkeit durch Sulfid in Algen-AOB<sub>r</sub> (Tegeler See) und Zulauf-AOB<sub>r</sub> (Nordgraben und Tegeler Fließ; Grünheid et al. 2006), war möglich und gibt Aufschluss auf den Algen-AOB<sub>r</sub>-Anteil. Für die anoxische Säule S3 macht der Algen-AOB<sub>r</sub> nach Durchbruch (96 h) der organischen Bromverbindungen 52 % des AOB<sub>r</sub> aus und nach 156 d ist kein Algen-AOB<sub>r</sub> mehr detektierbar.

### **Ansätze für weitere Untersuchungen**

An erster Stelle sollte die Identifizierung der organischen Bromverbindungen stehen, die das AOB<sub>r</sub>-Maximum im Spätsommer erzeugen. Die selektive Detektion der bromorganischen Verbindungen ist sehr hilfreich um die Retentionszeiten der Verbindungen zu bestimmen. Allerdings ist für die Identifizierung der unbekanntesten Verbindungen eine andere Analysentechnik wie z.B. die hochauflösende Massenspektrometrie (LC-Q-TOF-MS) oder die Kernresonanzspektroskopie (LC-NMR) notwendig. Nach erfolgter Identifizierung der unbekanntesten Bromverbindungen sollten die Einzelstoffe in Form von gekauften oder synthetisierten Standards oder nach Isolierung auf ihre toxikologische Wirkung hin untersucht werden.

Durch die anoxisch/anaerobe Uferfiltration wird eine gute Eliminierung algenproduzierter organischer Bromverbindungen beobachtet (100 %), wogegen die 100 %ige Eliminierung des ganzjährigen AOB<sub>r</sub> nicht erfolgte. Dieser AOB<sub>r</sub> sollte untersucht werden. Die Herkunft wird als anthropogen betrachtet, da sich der Gehalt im Jahresverlauf nicht verändert. Auch hier sollte eine Strukturaufklärung der Einzelstoffe Hinweise auf Herkunft, Toxikologie und Verhalten in der aquatischen Umwelt geben.

Es sollte auch geklärt werden, was den reduzierbaren AOB<sub>r</sub>-Anteil ausmacht. Prinzipiell kann dieser durch anorganisches Bromid bzw. durch Polybromide gebildet werden, die durch die Zugabe einer oxidierenden Säure vor der Anreicherung für die AOB<sub>r</sub>-Bestimmung entstehen. Denkbar ist aber auch eine Wechselwirkung von Bromid und evtl. Polybromiden mit dem NOM oder DOC als Wasserinhaltsstoffe. Es ist durchaus vorstellbar, dass solche Assoziationen durch die Zugabe von Sulfid aufgebrochen werden können und zu niedrigeren AOB<sub>r</sub>-Gehalten führen.

Die Bildung organischer Bromverbindungen im Labor wurde bisher nur mit den zwei Organismen *Desmodesmus subspicatus* (Grünalge) und *Microcystis aeruginosa* (Cyanobakterium) durchgeführt. In einem Oberflächenwasser können aber weitaus mehr Algen identifiziert werden, als die zwei untersuchten. Die AOBr-Simulation mit weiteren Organismen, die auch während der Algenblüte im Spätsommer in Oberflächengewässern auftreten, könnte eine Eingrenzung auf bestimmte Organismenklassen ermöglichen. Es ist auch vorstellbar, dass über Symbiosen zum Beispiel mit Bakterien, wie sie im marinen Bereich beobachtet werden (Gribble, 1998), organische Bromverbindungen von Organismen produziert werden, die während der Algenblüte kaum Dominanz zeigen. Auch die Eigenschaften organischer Bromverbindungen und die Identifikation von Einzelstoffen könnten von Spezies zu Spezies variieren.

Eine anspruchsvolle Aufgabe wäre die Messung von Haloperoxidaseaktivitäten. Durch einfache Messungen mittels MCD-Assay im Batchtestwasser war eine Aktivität von Haloperoxidasen nicht messbar. Hierzu sollten die Enzyme aus der wässrigen Phase und/oder den Zellen isoliert und dadurch aufkonzentriert werden, sodass anschließend eine Aktivitätsmessung stattfinden kann. Auch die Charakterisierung der Enzyme nach ihrer prosthetischen Gruppe und/oder ihrem Halogenierungsvermögen (Chlorierung, Bromierung oder Iodierung) ist anspruchsvoll, könnte aber die bisherigen Ergebnisse des Bildungsmechanismus organischer Bromverbindungen im Süßwasser bestätigen.

Die überwiegende zusätzliche Chlorierung der selektiv detektierten organischen Bromverbindungen (68-73 %) ist ein Thema, das weiter untersucht werden sollte. Hierfür ist wiederum die Strukturaufklärung der Einzelstoffe von Bedeutung. Eine Charakterisierung der Enzyme nach ihrem Halogenierungsvermögen gibt Aufschluss über potenzielle Reaktionen der Chlorierung, Bromierung oder beider Reaktionen. Der Chlorierungsgrad der bromorganischen Verbindungen sollte auch in Kulturen-Batchtests untersucht werden. Möglicherweise können Rückschlüsse auf bestimmte Organismen und ihre Fähigkeit der Bromierung und Chlorierung natürlichen organischen Materials gezogen werden.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- Bader, H., Sturzenegger, V. and Hoigne, J.** (1988). Photometric-Method for the Determination of Low Concentrations of Hydrogen-Peroxide by the Peroxidase Catalyzed Oxidation of N,N-Diethyl-P-Phenylenediamine (Dpd). *Water Research* **22**, 1109-1115.
- Baker, J. M., Reeves, C. E., Nightingale, P. D., Penkett, S. A., Gibb, S. W. and Hatton, A. D.** (1999). Biological production of methyl bromide in the coastal waters of the North Sea and open ocean of the northeast Atlantic. *Marine Chemistry* **64**, 267-285.
- Bruchertseifer, H., Cripps, R., Guentay, S. and Jaeckel, B.** (2003). Analysis of iodine species in aqueous solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **375**, 1107-1110.
- Bull, R. J., Sanchez, I. M., Nelson, M. A., Larson, J. L. and Lansing, A. J.** (1990). Liver-Tumor Induction in B6C3F1 Mice by Dichloroacetate and Trichloroacetate. *Toxicology* **63**, 341-359.
- Butler, J. H., Battle, M., Bender, M. L., Montzka, S. A., Clarke, A. D., Saltzman, E. S., Sucher, C. M., Severinghaus, J. P. and Elkins, J. W.** (1999). A record of atmospheric halocarbons during the twentieth century from polar firn air. *Nature* **399**, 749-755.
- BWB.** (2003). Berliner Wasser Betriebe. [www.bwb.de](http://www.bwb.de).
- BWB.** (2006). Berliner Wasser Betriebe - Durchflußmengen der Havelleitung und Ablaufmengen der OWA Tegeler See.
- Cooper, W. J., Zika, R. G., Petasne, R. G. and Plane, J. M. C.** (1988). Photochemical Formation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Natural-Waters Exposed to Sunlight. *Environmental Science & Technology* **22**, 1156-1160.
- Deangelo, A. B., Daniel, F. B., Most, B. M. and Olson, G. R.** (1996). The carcinogenicity of dichloroacetic acid in the male Fischer 344 rat. *Toxicology* **114**, 207-221.
- Deangelo, A. B., Daniel, F. B., Stober, J. A. and Olson, G. R.** (1991). The Carcinogenicity of Dichloroacetic Acid in the Male B6C3F1 Mouse. *Fundamental and Applied Toxicology* **16**, 337-347.
- Dvortsov, V. L., Geller, M. A., Solomon, S., Schauffler, S. M., Atlas, E. L. and Blake, D. R.** (1999). Rethinking reactive halogen budgets in the midlatitude lower stratosphere. *Geophysical Research Letters* **26**, 1699-1702.
- Flodin, C., Helidoniotis, F. and Whitfield, F. B.** (1999). Seasonal variation in bromophenol content and bromoperoxidase activity in *Ulva lactuca*. *Phytochemistry* **51**, 135-138.
- Gan, J., Yates, S. R., Ohr, H. D. and Sims, J. J.** (1998). Production of methyl bromide by terrestrial higher plants. *Geophysical Research Letters* **25**, 3595-3598.
- Gaus, C., Papke, O., Dennison, N., Haynes, D., Shaw, G. R., Connell, D. W. and Muller, J. F.** (2001). Evidence for the presence of a widespread PCDD

source in coastal sediments and soils from Queensland, Australia.

*Chemosphere* **43**, 549-558.

**George, S. E., Nelson, G. M., Swank, A. E., Brooks, L. R., Bailey, K., George, M. and DeAngelo, A.** (2000). The disinfection by-products dichloro-, dibromo-, and bromochloroacetic acid impact intestinal microflora and metabolism in Fischer 344 rats upon exposure in drinking water. *Toxicological Sciences* **56**, 282-289.

**Green, N. J. L., Jones, J. L., Johnston, A. E. and Jones, K. C.** (2001). Further evidence for the existence of PCDD/Fs in the environment prior as 1900. *Environmental Science & Technology* **35**, 1974-1981.

**Gribble, G. W.** (1998). Naturally occurring organohalogen compounds. *Accounts of Chemical Research* **31**, 141-152.

**Gribble, G. W.** (2003). The diversity of naturally produced organohalogens. *Chemosphere* **52**, 289-297.

**Gribble, G. W., Blank, D. H. and Jasinski, J. P.** (1999). Synthesis and identification of two halogenated bipyrrroles present in seabird eggs. *Chemical Communications* **21**, 2195-2196.

**Grünheid, S.** (2006). Organic Substances in Bank filtration and Groundwater Recharge-Process Studies (Final Report). In *NATURAL AND ARTIFICIAL SYSTEMS FOR RECHARGE AND INFILTRATION (NASRI)*. Technical University of Berlin.

**Grünheid, S., Amy, G. and Jekel, M.** (2005). Removal of bulk dissolved organic carbon (DOC) and trace organic compounds by bank filtration and artificial recharge. *Water Research* **39**, 3219-3228.

**Haglund, P. S., Zook, D. R., Buser, H. R. and Hu, J. W.** (1997). Identification and quantification of polybrominated diphenyl ethers and methoxy-polybrominated diphenyl ethers in Baltic biota. *Environmental Science & Technology* **31**, 3281-3287.

**Hartonen, K., Bowadt, S., Hawthorne, S. B. and Riekkola, M. L.** (1997). Supercritical fluid extraction with solid-phase trapping of chlorinated and brominated pollutants from sediment samples. *Journal of Chromatography A* **774**, 229-242.

**Hazen, S. L. and Heinecke, J. W.** (1997). 3-chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *Journal of Clinical Investigation* **99**, 2075-2081.

**Heinecke, J. W.** (2000). Eosinophil-dependent bromination in the pathogenesis of asthma. *Journal of Clinical Investigation* **105**, 1331-1332.

**Henderson, J. P., Byun, J., Mueller, D. M. and Heinecke, J. W.** (2001). The eosinophil peroxidase-hydrogen peroxide-bromide system of human eosinophils generates 5-bromouracil, a mutagenic thymine analogue. *Biochemistry* **40**, 2052-2059.

**Heumann, K. G., Rädlinger, G., Erbes, M., Heiber, I., Obst, U., Filip, Z. and Claus, H.** (2000). Ageing of dissolved halogenated humic substances and the

microbiological influence on this process. *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica* **28**, 193-201.

**Hoekstra, E. J., De Weerd, H., De Leer, E. W. B. and Brinkman, U. A. T.**

(1999). Natural formation of chlorinated phenols, dibenzo-p-dioxins, and dibenzofurans in soil of a Douglas fir forest. *Environmental Science & Technology* **33**, 2543-2549.

**Hoigne, J., Bader, H., Haag, W. R. and Staehelin, J.** (1985). Rate Constants of Reactions of Ozone with Organic and Inorganic-Compounds in Water.3. Inorganic-Compounds and Radicals. *Water Research* **19**, 993-1004.

**Huang, W. J., Fang, G. C. and Wang, C. C.** (2005). The determination and fate of disinfection by-products from ozonation of polluted raw water. *Science of the Total Environment* **345**, 261-272.

**Hunt, S.** (1972). Isolation of New Naturally Occurring Halogenated Amino-Acid Monochlorotyrosine from a Molluscan Scleroprotein. *Febs Letters* **24**, 109-112.

**Igarashi, T., Satake, M. and Yasumoto, T.** (1996). Pymnesin-2: A potent ichthyotoxic and hemolytic glycoside isolated from the red tide alga *Pymnesium parvum*. *Journal of the American Chemical Society* **118**, 479-480.

**Isidorov, V. A., Povarov, V. G. and Prilepsky, E. B.** (1993). Geological sources of volatile organic compounds in regions of seismic and volcanic activity. *Journal of Chemical Ecology* **N1**, 19.

**Itoh, N., Morinaga, N. and Kouzai, T.** (1994). Purification and Characterization of a Novel Metal-Containing Nonheme Bromoperoxidase from *Pseudomonas-Putida*. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1207**, 208-216.

**Jordan, A., Harnisch, J., Borchers, R., Le Guern, F. N. and Shinohara, H.** (2000). Volcanogenic halocarbons. *Environmental Science & Technology* **34**, 1122-1124.

**Klinefelter, G. R., Strader, L. F., Suarez, J. D. and Roberts, N. L.** (2002). Bromochloroacetic acid exerts qualitative effects on rat sperm: Implications for a novel biomarker. *Toxicological Sciences* **68**, 164-173.

**Koivusalo, M., Jaakkola, J. J. K., Vartiainen, T., Hakulinen, T., Karjalainen, S., Pukkala, E. and Tuomisto, J.** (1994). Drinking-Water Mutagenicity and Gastrointestinal and Urinary-Tract Cancers - an Ecological Study in Finland. *American Journal of Public Health* **84**, 1223-1228.

**Kritz, M. A., Rosner, S. W., Kelly, K. K., Loewenstein, M. and Chan, K. R.** (1993). Radon Measurements in the Lower Tropical Stratosphere - Evidence for Rapid Vertical Transport and Dehydration of Tropospheric Air. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* **98**, 8725-8736.

**Laternus, F., Giese, B., Wiencke, C. and Adams, F. C.** (2000). Low-molecular-weight organoiodine and organobromine compounds released by polar macroalgae - The influence of abiotic factors. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **368**, 297-302.

**Lindenschmidt, K. E. and Chorus, I.** (1997). The effect of aeration on stratification and phytoplankton populations in Lake Tegel, Berlin. *Archiv Fur Hydrobiologie* **139**, 317-346.

- Linder, R. E., Klinefelter, G. R., Strader, L. F., Narotsky, M. G., Suarez, J. D., Roberts, N. L. and Perreault, S. D.** (1995). Dibromoacetic Acid Affects Reproductive Competence and Sperm Quality in the Male-Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* **28**, 9-17.
- Linder, R. E., Klinefelter, G. R., Strader, L. F., Suarez, J. D., Roberts, N. L. and Dyer, C. J.** (1994). Spermatotoxicity of Dibromoacetic Acid in Rats after 14 Daily Exposures. *Reproductive Toxicology* **8**, 251-259.
- Lindström, G., Wingfors, H. and Bavel, B.** (1999). Identification of 19 polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in long-finned pilot whale (*Globicephala melas*) from the Atlantic. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **36** (3), 355-363.
- Mcconnell, O. J. and Fenical, W.** (1980). Halogen Chemistry of the Red Alga-Bonnemaisonia. *Phytochemistry* **19**, 233-247.
- Mcelroy, M. B., Salawitch, R. J., Wofsy, S. C. and Logan, J. A.** (1986). Reductions of Antarctic Ozone Due to Synergistic Interactions of Chlorine and Bromine. *Nature* **321**, 759-762.
- Moore, R. E.** (1977). Volatile compounds from marine algae. *Acct. Chem. Res.* **10**, 40-47.
- Moore, R. M., Webb, M., Tokarczyk, R. and Wever, R.** (1996). Bromoperoxidase and iodoperoxidase enzymes and production of halogenated methanes in marine diatom cultures. *Journal of Geophysical Research-Oceans* **101**, 20899-20908.
- Morris, R. D., Audet, A. M., Angelillo, I. F., Chalmers, T. C. and Mosteller, F.** (1992). Chlorination, Chlorination by-Products, and Cancer - a Metaanalysis. *American Journal of Public Health* **82**, 955-963.
- Mundt, C.** (2005). Untersuchungen zur Abbaubarkeit polarer organischer Einzelstoffe während der Uferfiltration. *Diplomarbeit der Technischen Universität Berlin*.
- Neilson, A. H.** (2003). Biological Effects and Biosynthesis of Brominated Metabolites. In: *The Handbook of Environmental Chemistry: Organic Bromine and Iodine Compounds* **3-R**, 75-204.
- Nixdorf, B., Hemm, M., Hoffmann, A. and Richter, P.** (2002). Dokumentation von Zustand und Entwicklung der wichtigsten Seen Deutschlands - Teil 6 - Berlin. *Abschlussbericht zum F&E Vorhaben FKZ 299 24 274; Brandenburgische Technische Universität Cottbus*.
- Nkusi, G., Müller, G., Schöler, H. F. and Spitthoff, B.** (1996). Occurrence and Partial Chemical Characterization of Halogenated Organic Compounds in Carbonaceous Chondrites. *Journal of Conference Abstracts, V. M. Goldschmidt Conference, March 31 - April 4, 1996 Heidelberg, Germany* **1**(1), 435.
- Oleksy-Frenzel, J., Wischnack, S. and Jekel, M.** (2000). Application of ion-chromatography for the determination of the organic-group parameters AOCl, AOBr and AOI in water. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **366**, 89-94.
- Paul, N. A., de Nys, R. and Steinberg, P. D.** (2006). Chemical defence against bacteria in the red alga *Asparagopsis armata*: linking structure with function. *Marine Ecology-Progress Series* **306**, 87-101.

- Putschew, A. and Jekel, M.** (2001). Iodierte Röntgenkontrastmittel im anthropogen beeinflussten Wasserkreislauf. *Vom Wasser* **97**, 103-114.
- Putschew, A. and Jekel, M.** (2003). Induced in-source fragmentation for the selective detection of organic bound iodine by liquid chromatography /electrospray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **17**, 2279-2282.
- Putschew, A. and Jekel, M.** (2006). Iodinated X-ray Contrast Media. In: *Organic Pollutants in the Water Cycle. Reemtsma T. and Jekel M. (Eds.)* ISBN: **3-527-31297-8**, 87-98.
- Putschew, A., Mania, M. and Jekel, M.** (2003). Occurrence and source of brominated organic compounds in surface waters. *Chemosphere* **52**, 399-407.
- Putschew, A., Wischnack, S. and Jekel, M.** (2001). Bildung organischer Bromverbindungen in Oberflächengewässern. *Wasser & Boden* **53**, 21-28.
- Schittko, S., Putschew, A. and Jekel, M.** (2004). Bank filtration: a suitable process for the removal of iodinated X-ray contrast media? *Water Science and Technology* **50**, 261-268.
- Sellström, U., Kierkegaard, A., de Wit, C., Jansson, B., Asplund, L., Bergander, L., Bigner, A., Odsjö, T. and Olsson, M.** (1996). Polybrominated dephenyl ethers (PBDE) in the Swedish environment - a summary. *Organohalogen Compounds* **28**, 526-529.
- SenStadt.** (2001). Daten von der Senatsverwaltung für Stadtentwicklung in Berlin. *Hansen, H.-C. Am Kölnischen Park 3, 10173 Berlin.*
- Serca, D., Guenther, A., Klinger, L., Helmig, D., Hereid, D. and Zimmerman, P.** (1998). Methyl bromide deposition to soils. *Atmospheric Environment* **32**, 1581-1586.
- Siddiqui, M. S., Amy, G. L. and Rice, R. G.** (1995). Bromate Ion Formation - a Critical-Review. *Journal American Water Works Association* **87**, 58-70.
- Silk, P. J., Lonergan, G. C., Arsenault, T. L. and Boyle, C. D.** (1997). Evidence of natural organochlorine formation in peat bogs. *Chemosphere* **35**, 2865-2880.
- Solomon, S., Garcia, R. R. and Ravishankara, A. R.** (1994). On the Role of Iodine in Ozone Depletion. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* **99**, 20491-20499.
- Studier, M. H., Hayatsu, R. and Anders, E.** (1965). Organic Compounds in Carbonaceous Chondrites. *Science* **149**, 1455-&.
- Tanaka, N., Dumay, V., Liao, Q. N., Lange, A. J. and Wever, R.** (2002). Bromoperoxidase activity of vanadate-substituted acid phosphatases from *Shigella flexneri* and *Salmonella enterica* ser. typhimurium. *European Journal of Biochemistry* **269**, 2162-2167.
- Teubner, K., Feyerabend, R., Henning, M., Nicklisch, A., Voitke, A. and Kohl, J.-G.** (1999). Alternative blooming of *Aphanizomenon flos-aquae* or *Planktothrix agardhii* induced by the timing of the crotoal nortigen:phosphorus ratio in hypertrophic riverine lakes. *Ergebnisse Limnol.* **0**, 325-344.

- Tittlemier, S. A., Blank, D. H., Gribble, G. W. and Norstrom, R. J.** (2002). Structure elucidation of four possible biogenic organohalogenes using isotope exchange mass spectrometry. *Chemosphere* **46**, 511-517.
- Tittlemier, S. A., Simon, M., Jarman, W. M., Elliott, J. E. and Norstrom, R. J.** (1999). Identification of a novel C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>Br<sub>4</sub>Cl<sub>2</sub> heterocyclic compound in seabird eggs. A bioaccumulating marine natural product? *Environmental Science & Technology* **33**, 26-33.
- Utermöhl, H.** (1958). Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. Stuttgart: Science Publishers.
- Verdel, E. F., Kline, P. C., Wani, S. and Woods, A. E.** (2000). Purification and partial characterization of haloperoxidase from fresh water algae *Cladophora glomerata*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* **125**, 179-187.
- Vetter, W., Alder, L., Kallenborn, R. and Schlabach, M.** (2000). Determination of Q1, an unknown organochlorine contaminant, in human milk, Antarctic air, and further environmental samples. *Environmental Pollution* **110**, 401-409.
- Vetter, W., Scholz, E., Gaus, C., Müller, J. F. and Haynes, D.** (2001). Anthropogenic and natural organohalogen compounds in blubber of dolphins and dugongs (*Dugong dugon*) from northeastern Australia. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **41**, 221-231.
- Von Gunten, U.** (2003). Ozonation of drinking water: Part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. *Water Research* **37**, 1469-1487.
- Weber, N. M., Sawyer, H. R., Legare, M. E. and Veeramachaneni, D. N. R.** (2006). Sub-chronic exposure to dibromoacetic acid, a water disinfection by-product, does not affect gametogenic potential in mice. *Toxicological Sciences* **89**, 325-330.
- Weinberg, H. S., Glaze, W. H., Krasner, S. W. and Scilimenti, M. J.** (1993). Formation and Removal of Aldehydes in Plants That Use Ozonation. *Journal American Water Works Association* **85**, 72-85.
- Wischnack, S.** (2000). Untersuchungen zu iodierten organischen Stoffen im Tegeler See und im Wasserwerk Tegel - Abschlußbericht zu einem Untersuchungsprogramm im Auftrag der Berliner Wasserbetriebe. Fachgebiet Wasserreinhalung/Technische Universität Berlin.
- Wischnack, S., Oleksy-Frenzel, J. and Jekel, M.** (1998). Abbauverhalten und Vorkommen organischer Iodverbindungen im Raum Berlin. In: *Kurzreferat; Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft in der GdCh, Lübeck 18. - 20. Mai 1998; ISBN 3-924763-70-4*, 96-99.
- Wittsiepe, J., Kullmann, Y., Schrey, P., Selenka, F. and Wilhelm, M.** (2000). Myeloperoxidase-catalyzed formation of PCDD/F from chlorophenols. *Chemosphere* **40**, 963-968.
- Wu, J., Vetter, W., Gribble, G. W., Schneekloth, J. S., Blank, D. H. and Gorls, H.** (2002). Structure and synthesis of the natural heptachloro-1'-methyl-1,2'-bipyrrrole (Q1). *Angewandte Chemie-International Edition* **41**, 1740-+.

**Zehnder, A. and Gorham, P. R.** (1960). Factors Influencing the Growth of *Microcystis-Aeruginosa* Kutz Emend Elenkin. *Canadian Journal of Microbiology* **6**, 645.

## 7 ANHANG

### I MATERIALIEN UND GERÄTE

Alle Reagenzien und Feststoffe hatten einen Mindestreinheitsgrad „pro analysis“. Verwendete Lösungsmittel hatten einen Reinheitsgrad für die Gaschromatographie oder für die Flüssigkeitschromatographie, je nach verwendeter Analysenmethode. Es wurde überwiegend mit ultra reinem Wasser (u.p.) gearbeitet, das mit einer Ionenaustauscheranlage der Firma ELGA aufgereinigt wurde.

*Tabelle I.1: Auflistung der verwendeten Geräte*

Gerätebezeichnung	Verwendungszweck	Hersteller
AutoTrace	SPE + Ionenaustausch	Zymark
DX 100 IC Mit SPD-10A (UV-Det.)	Bestimmung intra- und extrazellulärer Bromspezies	DIONEX SHIMADZU
GC Series 8000 mit MD 800	Einzelstoffanalytik (GC-MS)	FISONS INSTRUMENTS
HPLC Series 1100	Bromid Bestimmung + LC- Trennung für Einzelstoffanalytik	AGILENT
Klimakammer	Batchtest Kultivierung	ROMA, Dämm-Systeme
LC/OCD	DOC-Charakterisierung von Bodensäulenproben	DOC-LABOR Dr. Huber
Mikroskop IM 35	Bestimmung der Individuenzahl	ZEISS
Photometer Lambda 12	Chlorophyll-a + Wasserstoffperoxid + Bromoperoxidase-Aktivität	PERKIN-ELMER
QuattroLC	Einzelstoffanalytik (LC-MS)	MICROMASS
SpeedVac Konzentrator A160	Probenkonzentration	SAVANT, THERMO

## II EXPERIMENTELLE ARBEITEN

### II.i Probenahmeorte

Der Tegeler See befindet sich im Nordwesten Berlins, hat eine Fläche von 4,1 km<sup>2</sup> und eine maximale Wassertiefe von 16 m. Die theoretische Aufenthaltszeit im See beträgt 137 d ohne Zufluss über die Havelleitung und halb so lange (68 d) mit einem doppelt so hohen Zufluss bei Zuschalten der Havelleitung (zur Havelleitung siehe Kapitel 1.2.1, Seite 9). Der Tegeler See ist mesotroph (Tabelle II.1, Nixdorf et al., 2002) und abwasserbeeinflusst durch die Einleitung aus dem Klärwerk Schönerlinde.

Für die Feldstudie am Tegeler See 2005 wurden alle 14 Tage Proben genommen. Die genauen Probenahmekoordinaten sind 52° 35' 46" N und 13° 15' 53" O und befinden sich nahe dem tiefsten Punkt des Tegeler Sees.

Der Große Wannsee befindet sich im Südwesten Berlins. Beim Wannsee handelt es sich um eine Ausbuchtung der Havel mit einer Breite von 1000 m. Die Oberfläche ist 2,6 km<sup>2</sup> groß und der See hat eine maximale Tiefe von 10 m. Auch der Wannsee ist mesotroph (Tabelle II.1, Nixdorf et al., 2002) und durch Abwässer aus Berlins größtem Klärwerk Ruhleben beeinflusst. Allerdings findet die Einleitung aus dem Klärwerk Ruhleben nur in den Wintermonaten statt, da in den Sommermonaten in den Teltowkanal eingeleitet wird, um die Wasserqualität des Badewassers im Wannsee nicht nachteilig zu beeinflussen.

Der Große Müggelsee befindet sich im Südosten Berlins und ist mit einer Fläche von 7,4 km<sup>2</sup> der größte See Berlins. Er hat eine maximale Tiefe von 8 m. Die Spree fließt durch den Müggelsee. Auch der Müggelsee wird als mesotroph eingestuft, was aus den trophierelevanten Parametern der Tabelle II.1 hervorgeht (Nixdorf et al., 2002). Er ist nur gering durch Abwasser aus dem Klärwerk Münchehofe beeinflusst, welches über die Spree in den Großen Müggelsee gelangt.

*Tabelle II.1: Mittelwerte chemischer und trophierelevanter Parameter April - Oktober 2001 (SenStadt, 2001)*

	Leitf. [µS/cm]	Chl-a [µg/L]	S Tiefe [m]	total N [mg/L]	total P [µg/L]	pH
Tegeler See	728	20,9	2,1	4,67	92,2	8,1
Großer Wannsee	693	64,8	0,7	2,02	446,2	8,6
Großer Müggelsee	718	15,9	1,7	1,16	68,4	8,1

Leitf. = Leitfähigkeit; Chl-a = Chlorophyll-a; S Tiefe = Sichttiefe;  
total N = Gesamtstickstoff; total P = Gesamtphosphor

Alle drei Seen sind durch eine typische Algenblüte im Spätsommer charakterisiert, wobei es vor allem am Wannsee zu ausgeprägten Cyanobakterienblüten kommt. Des Weiteren wird an allen drei Seen für die Trinkwassergewinnung Rohwasser nach Uferfiltration entnommen.

## II.ii Batchtests

Alle Labor-Batchtests wurden in offenen Glasflaschen durchgeführt, die mit künstlichem Sonnenlicht bestrahlt (16 h täglich, sechs Leuchtstoffröhren à 18 W), mit filtrierter Luft belüftet (0,45 µm Cellulose-Nitrat, SARTORIUS) und bei Raumtemperatur kultiviert wurden (bis auf Algen-Batchtests, die bei 25 °C in einer Klimakammer temperiert wurden). Alle Batchtests sind in tabellarischer Form (Tabelle II.3) zusammengefasst und werden im Weiteren nur kurz beschrieben.

### II.ii.i Seewasser

Für Seewasser-Batchtests wurden Schöpfproben (15 L) des Tegeler Sees am südöstlichen Ufer und des Wannsees am östlichen Ufer genommen. Die Proben wurden am gleichen Tag unbehandelt in die Batchtest-Flaschen (20 L) gegeben und 14-tägig bis monatlich beprobt. Eine zusätzliche Nährstoff- oder Bromiddotierung war nicht erforderlich.

### II.ii.ii Algen

Für Algen-Batchtests wurde das Cyanobakterium *Microcystis aeruginosa* (Blaualge) und die Grünalge *Desmodesmus subspicatus* von der Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen (SAG) bezogen. Es wurden Algen-Batchtests in Tegeler Seewasser durchgeführt, indem das Tegeler Seewasser lediglich filtriert wurde, mit 100 µg/L Bromid versetzt und mit vorgezüchteten Algen beimpft wurde.

Für Algen-Batchtests in Nährlösungen wurden für jede Algenkultur individuelle Nährstoffzusammensetzungen angesetzt (Tabelle II.2). Die Nährlösungen wurden autoklaviert, zusätzlich mit 100 µg/L Bromid versetzt und mit vorgezüchteter Algensuspension beimpft. Die Beprobung fand alle zwei Wochen bis wöchentlich statt, je nach AOB-Entwicklung.

Für Batchtests mit reduzierten Nährstoffen wurde eine 1:10 verdünnte Nährlösung mit 100 µg/L Bromid versetzt und mit Algen beimpft.

Algen-Batchtests unter Wasserstoffperoxideinfluss wurden vor der Algenbeimpfung mit der entsprechenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration versetzt. In einem Blindversuch wurde Katalase (100 units/mL, MERCK) zum Abbau von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Spuren zugesetzt.

Tabelle II.2: Zusammensetzung der Algennährmedien: Z-Medium für Cyanobakterien (Zehnder and Gorham, 1960) und Algenmedium für Grünalgen nach Standard DIN EN 28692, überarbeitet

Cyanobakterienkultur		Grünalgenkultur	
Substanz	Konzentration [mg/L]	Substanz	Konzentration [mg/L]
NaNO <sub>3</sub>	467	Fe-III-Citrat (19 % Fe)	3
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	59	Na <sub>2</sub> EDTA * 2 H <sub>2</sub> O	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	31	NaNO <sub>3</sub>	496
MgSO <sub>4</sub> + 7 H <sub>2</sub> O	25	MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	75
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	21	CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	36
Eisen-EDTA-Komplex <sup>o</sup>	10 mL/L	Zitronensäure	3
		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	39
Spurenelemente:	0,08 mL/L	Spurenelemente:	
		H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,4
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	310	MnCl <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	7,2
MnSO <sub>4</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	223	ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	0,9
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	3,3	CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	0,3
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	8,8	CoCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,16
KBr	11,9	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,10
KI	8,3		
ZnSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	28,7		
Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * 4 H <sub>2</sub> O	15,4		
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	14,6		
CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O	12,5		
NiSO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	19,8		
Cr(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> * 7 H <sub>2</sub> O	3,7		
VOSO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	2		
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> * 24 H <sub>2</sub> O	47,4		

<sup>o</sup> 5 mL einer 0,1 M FeCl<sub>2</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O Lösung in 0,1N HCl und 5 mL einer 0,1M Na<sub>2</sub>EDTA Lösung in destilliertem Wasser werden gemischt und auf 500 mL aufgefüllt

Ein abiotischer Batchtest wurde angesetzt, um die AOB-Bildung durch Wasserstoffperoxid- (5 mg/L) und Bromid-dotierung (500 µg/L) in u.p. Wasser zu untersuchen. Der Batchtest fand unter Belüftung und Beleuchtung in einer 25 °C warmen Klimakammer statt. Der Batchtest wurde doppelt angesetzt und parallel wurde ein Blindversuch ohne Wasserstoffperoxid mitgeführt.

### II.ii.iii Enzym – Bromoperoxidase

Bromoperoxidase- (BrPOD) Batchtests wurden in einem ersten Versuch mit 1:10 konzentriertem Tegeler Seewasser (autoklaviert und filtriert) durchgeführt.

100 mL konzentriertes Seewasser wurde mit 1,8 µM Kaliumbromid, 2 units/mL BrPOD von *Coallina officinal* (SIGMA-ALDRICH), 50 mM 2-Morpholinoethansulfonsäure Puffer (MES, SIGMA-ALDRICH) mit pH 6,4 bei 25 °C und 10 mM Wasserstoffperoxid versetzt. Der Versuch fand in einem 25 °C warmen Schüttelbad unter Schütteln statt. Es wurden zusätzlich zwei Blindversuche mitgeführt, wobei einer wie oben beschrieben zusammengesetzt war und der andere statt Tegeler Seewasser u.p. Wasser enthielt. Bei beiden Blindversuchen wurde die BrPOD weggelassen.

In einem zweiten Versuch wurde die gleiche Versuchsanordnung verwendet wie oben beschrieben, allerdings mit Tegeler Seewasser (filtriert und autoklaviert), dass nicht aufkonzentriert wurde und mit einem Versuchsansatz aus u.p. Wasser und 20 mg/L natürlichen organischem Material (NOM) aus dem Suwannee River (International Humic Substance Society (IHSS), USA). Blindversuche ohne BrPOD wurden ebenfalls mitgeführt. Diese zwei Blindversuche bestanden aus Tegeler Seewasser und 20 mg/L Suwannee River NOM in u.p. Wasser, unter Zugabe der oben aufgeführten Reagenzien.

*Tabelle II.3: Übersicht der durchgeführten Batchtests: Name, Beschreibung, Laufzeit, Zielsetzung, Probenahmezeiten und Versuchsbedingungen*

Nr.	Kapitel	Name	Versuch	Laufzeit [d]/[Monate]	Ziel
<b>Seewasser-Batchtests:</b>					
1	4.1.2.1	WS030811	Batchtest mit Wannsee (WS) Wasser	123 / 4	AOBr-Simulation mit WS-Wasser AOBr für Einzelstoffcharakterisierung
2	4.1.2.1 4.3.2.1	TS030929	Batchtest mit Tegeler See (TS) Wasser	222 / 7	AOBr-Simulation mit TS-Wasser AOBr für Einzelstoffcharakterisierung
3	4.3.1.2 4.3.2.2	TS040202	Batchtest mit TS-Wasser	367 / 12	AOBr-Simulation mit TS-Wasser AOBr für Einzelstoffcharakterisierung
4	4.1.3.2 4.3.1.3	TS050411	Batchtest mit TS-Wasser	203 / 6	AOBr-Simulation mit TS-Wasser AOBr für Einzelstoffcharakterisierung
5		TS050308	Batchtest mit TS-Wasser	517 / 17	AOBr-Simulation mit TS-Wasser AOBr für Einzelstoffcharakterisierung
6		TS050830	Batchtest mit TS-Wasser	342 / 11	AOBr-Simulation mit TS-Wasser AOBr für Einzelstoffcharakterisierung
7	4.3.1.3	TS050606	Batchtest mit TS-Wasser	147/5	AOBr-Simulation mit TS-Wasser AOBr für Einzelstoffcharakterisierung
<b>Algen-Batchtests</b>					
8	4.2.2.2	Alg.030815	Batchtest mit Cyanobakterien (Cybakt.) + Grünalgen in optimalem Nährmedium	80 / 3	Vergleich der AOBr-Produktion zwischen Cybakt. und Grünalgen; Entwicklung einer Analyse für intrazelluläres Brom
9	4.2.2.2	Alg.031117	Batchtest mit Cybakt. und Grünalgen in reduziertem Nährmedium (1:10)	119 / 4	Vergleich der AOBr-Produktion zwischen Cybakt. und Grünalgen
10		Alg.040203	Batchtest mit Cybakt. und Grünalgen in TS-Wasser	46 / 2	AOBr-Produktion von Cybakt. in filtrierterem TS-Wasser
11		Alg.040330	Batchtest mit Cybakt. in TS-Wasser	42 / 2	Wiederholung von Alg.040203 Vergleich TS-Wasser ± autoklaviert
12	4.1.2.2	Alg.040819	Batchtest mit Cybakt. in TS-Wasser hell/dunkel und ± Diuron®	55 / 2	Photosyntheseabhängigkeit der AOBr-Bildung in Cybakt.-Batchtests

Nr.	Kapitel	Name	Versuch	Laufzeit [d]/[Monate]	Ziel		
13	4.1.3.3	Alg_040303	Batchtest mit Cybakt. In optimalem oder reduziertem Nährmedium	80/3	Vergleich optimale/reduzierte Nährstoffkonzentration; Differenzierung extraAOBr und intraBrom sowie extraBr <sup>-</sup>		
<b>Wasserstoffperoxid-Batchtests</b>							
14	4.1.3.3	H2O2_060619	Batchtest mit Cybakt. in optimalen Nährmedium± Wasserstoffperoxid	77/3	Vergleich ± H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Differenzierung extraAOBr und intraOBr sowie extraBr <sup>-</sup> und intraBr <sup>-</sup>		
15		H2O2_040420	Batchtest mit Cybakt. und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0-5000 µg/L) in optimalem Nährmedium	24 / 1	Cybakt.-Entwicklung und AOB-Produktion unter H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Einfluss		
16	4.1.3.1	4.1.2.3	4.3.1.3	H2O2_050307	Batchtest mit Cybakt. und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0 - 1000 µg/L)	28 / 1	AOBr-Produktion unter H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Einfluss Berücksichtigung von AOB+SO <sub>3</sub>
17	4.3.1.3	4.4.1	4.1.3.2	H2O2_050529	Batchtest mit Cybakt. und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in optimalem Nährmedium	41 / 2	Cybakt.-Batchtest für Bodensäulen Berücksichtigung von AOB+SO <sub>3</sub>
18	4.1.3.1	4.3.1.2		H2O2_050829	Batchtest mit Cybakt. und H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> bzw. Katalase in optimalem Nährmedium	75 / 3	AOBr-Bildung unter H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Einfluss mit Katalase als definitiven Blindversuch
19	4.1.3.2			H2O2_041024	AOBr-Bildung mittels H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und natürlichem organischem Material (NOM; Suwannee River)	14 / 0,5	Algenunabhängige AOBr-Bildung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und NOM
<b>Bromoperoxidase-Batchtests</b>							
20	4.1.3.2	4,3,1,3		BrPOD051129	Batchtest mit Bromoperoxidase (BrPOD) in TS-Wasser (1:10 Konz)	49 / 1,5	AOBr-Produktion unter BrPOD-Einfluss
21	4.1.3.2			BrPOD060222	Batchtest mit BrPOD in TS-Wasser und NOM-Wasser (Suwannee River)	26 / 1	AOBr-Produktion unter BrPOD-Einfluss mit Vergleich der NOM-Quelle

Nr.	Probenahme	Organismen	Nährmedium (NM)	hell	dunkel	Dotierung				
						Bromid [µg/L]	Diuron [µg/L]	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [µg/L]	Katalase [units/mL]	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> [mg/L]
1	sporadisch	WS-Mischkultur August 2003	-	+	-	-	-	-	-	-
2	sporadisch	TS-Mischkultur September 2003	-	+	-	-	-	-	-	-
3	sporadisch	TS-Mischkultur Februar 2004	-	+	-	-	-	-	-	-
4	sporadisch	TS-Mischkultur April 2005	-	+	-	-	-	-	-	-
5	sporadisch	TS-Mischkultur März 2005	-	+	-	-	-	-	-	-
6	sporadisch	TS-Mischkultur August 2005	-	+	-	-	-	-	-	-
7	sporadisch	TS-Mischkultur Juni 2005	-	+	-	-	-	-	-	-
8	a b	alle 14 d <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Desmodesmus</i> <i>subspicatus</i>	optimal	+	-	100	-	-	-	NM
9	a b	alle 14 d <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Desmodesmus</i> <i>subspicatus</i>	reduziert (1:10 verdünnt)	+	-	100	-	-	-	NM

## II Experimentelle Arbeiten

Nr.	Probenahme	Organismen	Nährmedium (NM)	hell	dunkel	Dotierung				PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> [mg/L]
						Bromid [µg/L]	Diuron [µg/L]	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [µg/L]	Katalase [units/mL]	
10	a alle 7 d b	<i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Desmodesmus</i> <i>subspicatus</i>	filtriertes TS-Wasser Februar 2004	+	-	100	-	-	-	31
11	a alle 7 d b	<i>Microcystis aeruginosa</i>	TS-Wasser März 2004 filtriert filtriert+autoklaviert	+	-	100	-	-	-	31
12	a alle 3 d b später alle 7 d c d	- <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Microcystis aeruginosa</i> <i>Microcystis aeruginosa</i>	filtriertes + autoklaviertes TS-Wasser August 2004	+	-	100	-	-	-	NM NM NM NM
13	a alle 7 d b	<i>Microcystis aeruginosa</i>	optimal reduziert	+	-	100	-	-	-	NM NM
14	a alle 14 d - 21 d b	<i>Microcystis aeruginosa</i>	optimal	+	-	100	-	-	-	NM NM
15	a 0d; 1d; 2d; 6d; b 10d; 20d; 24d c d e f	<i>Microcystis aeruginosa</i>	optimal	+	-	100	-	10 50 100 500 1000 5000	-	NM
16	a 0d; 1d; 2d; 4d; 7d; b 10d; 14d; 21d; c 28d d	<i>Microcystis aeruginosa</i>	optimal	+	-	100	-	0 10 100 1000	-	NM
17	sporadisch	<i>Microcystis aeruginosa</i>	optimal	+	-	100	-	10	-	NM
18	a alle 14 d b	<i>Microcystis aeruginosa</i>	optimal	+	-	100	-	10 -	- 100	NM

Nr.	Probenahme	Enzymdotierung	NOM [µg/L]	hell	dunkel	Bromid [µg/L]	MES [mM]	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [mg/L]
20	a 0d; 3d; 7d; 14d; b 42d; 49d c	Bromoperoxidase 2 units/mL - -	1:10 konz TS-Wasser filtriert + autoklaviert	-	+	100	50	340 340 340
21	a 0d; 26d b c d	Bromoperoxidase 2 units/mL - Bromoperoxidase 2 units/mL -	TS-Wasser filtriert+autoklaviert Suwanee River 20 mg/L Suwanee River 20 mg/L	-	+	100	50	340 340 340 340

NM = aus Nährmedium

## II.iii Versuche an Bodensäulen

### II.iii.i Versuchsanlage der Bodensäulen

Die Säulen wurden im Fachgebiet Wasserreinigung der TU Berlin im Zuge eines Promotionsprojektes aufgebaut und je nach Säule schon ca. 1 bis 1½ Jahre betrieben (Mundt, 2005). Die Säulen konnten somit als eingefahren betrachtet werden. Die Versuchsanlage bestand aus insgesamt neun verschiedenen im Aufstrom betriebenen Laborbodensäulen mit einer Länge von je 100 cm und einem Durchmesser von 14 cm. Von diesen neun Säulen wurden die vier in Tabelle II.4 aufgeführten Säulen für die Versuche verwendet. Die Säulen wurden kontinuierlich mit Tegeler Seewasser beschickt, wobei die Vorratsbehälter einerseits mit Sauerstoff belüftet und andererseits mit Stickstoff entgast wurden. Dadurch wurden in den Säulen aerobe und anaerobe Bedingungen unterstützt. Das Vorratswasser wurde mittels Walzenpumpe mit einer Durchflussrate von 1,6 L/d über die Säulen gepumpt. Um eine gewisse Temperaturkonstanz und geringe Belichtung zu gewährleisten, waren die aus Plexiglas bestehenden Bodensäulen im Keller installiert. Die Befüllungen und Eigenschaften der Säulen sind aus Tabelle II.4 zu entnehmen.

*Tabelle II.4: Kenndaten der verwendeten Bodensäulen*

Nr.	Befüllung	Wasser	Zudosierung	Redoxbedingungen
<b>S1</b>	technischer gebrannter Sand; D=0,7 - 1,2 mm	TS-Oberflächenwasser, sauerstoffgesättigt	-	oxisch
<b>S7</b>	Material vom Tegeler See Ufer	TS-Oberflächenwasser, sauerstoffgesättigt	-	oxisch→anoxisch→anaerob
<b>S3</b>	technischer gebrannter Sand; D=0,7 - 1,2 mm	TS-Oberflächenwasser, sauerstoffgesättigt	Stärke 3 mg/L	oxisch→anoxisch→anaerob
<b>S6</b>	technischer gebrannter Sand; D=0,7 - 1,2 mm	TS-Oberflächenwasser, mit Stickstoff entgast	Stärke 3 mg/L	anoxisch→anaerob

TS = Tegeler See

### II.iii.ii Vorversuche

Um die Totzeit der Bodensäulen zu bestimmen wurde ein Tracerversuch mit Kaliumchlorid durchgeführt. Dabei gibt die Totzeit an, wie lange eine nicht retardierende Verbindung für das Passieren der Bodensäule braucht. Die Leitfähigkeit des Tegeler Seewassers (690  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) wurde durch Zugabe von Kaliumchlorid auf 1200  $\mu\text{S}/\text{cm}$  erhöht. Ein Volumen von 200 mL dieses KCl-dotierten Seewassers wurde bei einer Durchflussrate von 1,6 L/d auf die entsprechenden Säulen gegeben. Anschließend wurde wieder mit Tegeler Seewasser aus den Vorratsbehältern beschickt. Durch kontinuierliche Messung

der Leitfähigkeit wurde der Durchbruch der KCl-Lösung aufgezeichnet und die Totzeit anhand steigender Messwerte ermittelt.

### **II.iii.iii Hauptversuche mit algenproduziertem AOB<sub>r</sub>**

Für die Hauptversuche mit algenproduziertem AOB<sub>r</sub> wurde eine filtrierte (0,45 µm) *Microcystis aeruginosa*-Batchtestprobe (AOB<sub>r</sub> = 39 µg/L) verwendet. Ein Volumen von 200 mL Probe wurde bei einer Durchflussrate von 1,6 L/d statt des Vorratswassers auf die Säule gegeben. Anschließend wurden die Säulen wieder an die Vorratsbehälter mit Tegeler Seewasser angeschlossen. Die Probenahme an den Säulenausgängen begann nach Erreichen der Totzeit (Tabelle II.18). Die überwiegend oxischen Säulen S1 und S7 wurden im 12 h Takt beprobt. Die anoxischen Säulen S3 und S6 wurden mit Hilfe eines automatischen Probennehmers zu Beginn alle 12 h, nach 2 d alle 6 h, nach 5 d wieder alle 12 h und nach 7 d alle 24 h beprobt. Die Proben wurden für AOB<sub>r</sub>-Bestimmungen auf pH 2 eingestellt und kühl gelagert (4 °C). Zur Bestimmung des nicht reduzierbaren AOB<sub>r</sub> wurde eine Teilprobe mit Natriumsulfit versetzt und nach Ablauf der Reaktionszeit ebenfalls auf pH 2 eingestellt. Eine weitere Teilprobe wurde für DOC-, SAK<sub>254</sub>-, LC-OCD- und Bromid-Messungen unbehandelt eingefroren.

## II.iv Probenvorbereitung

### II.iv.i Festphasenextraktion

An der AutoTrace Workstation (ZYMARK) fand die Festphasenextraktion (SPE) statt. Es wurden unterschiedliche Medien ausprobiert und diese natürlich auch unterschiedlich behandelt. Es wurden 6 mL Kartuschen verwendet mit den dazugehörigen Massen an Festphasenmaterial (Tabelle II.5). Abweichend davon wurden für den Ionenaustausch mit SAX- und SCX-Kartuschen mit 3 mL Volumen verwendet. Die Festphasen wurden mit den in Tabelle II.5 angegebenen Lösungsmitteln konditioniert, um danach das entsprechende Probenvolumen zu extrahieren. Die Probe wurde mit dem genauen Volumen vorgelegt und nachdem die Probe extrahiert wurde, wurde das Probenglas mit u.p. Wasser nachgespült und dieses ebenfalls über die Kartusche gegeben. Vor der Elution mit Methanol wurde die Extraktionskartusche mit Stickstoff getrocknet. Die Elution fand in drei Etappen statt, wobei jedes Drittel an Elutionslösungsmittel Zeit zum Einweichen in der Kartusche hatte. Der letzte Rest an Elutionsmittel wurde mit Stickstoff aus der Kartusche gepresst.

*Tabelle II.5: Bedingungen für die Festphasenextraktion mit verschiedenen Festphasenmaterialien*

Festphase (SP)	m(SP) [mg]	Konditionierung [mL]			pH	V(Probe) [mL]	Elution [mL]	
		1. u.p. H <sub>2</sub> O	2. MetOH	3. H <sub>2</sub> O			MetOH + Zusatz	
LiChrolut RP-18 (Merck)	500	10	10	8	5	200	15	
LiChrolut EN (Merck)	500	10	10	8	2	100	15	
Isolute EnV+ (IST)	500	10	10	8	2	100	15	
Oasis HLB (Waters)	200	10	10	8	2	100	15	
BondElut SCX (Varian)	1000	6	6	10	2	100	9	1 % NH <sub>4</sub> OH
BondElut SAX (Varian)	1000	6	6	10	9	100	9	1 N HCl

Der SPE-Extrakt wurde anschließend am SpeedVac Konzentrator durch Unterdruck, einer Temperatur von 40 °C und Rotation auf ein kleines Volumen eingengt. Dieses wurde in ein Vial überführt, mit Stickstoff eingengt bis ein feuchter Bodensatz übrig blieb und je nach Versuchsverlauf mit einem definierten Volumen an Lösungsmittel (Wasser oder Methanol) versetzt.

### II.iv.ii Konzentration nach Kationenaustausch

Für den Kationenaustausch wurde eine 1 mL On Guard II Na-Kartusche (DIONEX) mit 2 mL u.p. Wasser und 3 mL Probe gespült. Danach wurden 50 mL Probe bei einem sehr geringen Fluss von 1 mL/min über die Kartusche

gegeben. Um einen möglichen Probenverlust während des Ionenaustausches berücksichtigen zu können, wurde die Probe in einem Messzylinder aufgefangen und das genaue Volumen notiert. Dieses wurde dann am SpeedVac Konzentrator bei Unterdruck, Rotation und einer Temperatur von 70 °C auf ein geringes Volumen eingeeengt. Die aufkonzentrierte Probe wurde je nach Versuchsablauf in ein Probengefäß (Vial oder Messkolben) überführt, entweder unter Stickstoff weiter eingeeengt bis ein feuchter Bodensatz übrig blieb und dann mit einem definierten Volumen an u.p. Wasser versetzt oder gleich auf ein definiertes Volumen aufgefüllt.

### **II.iv.iii Säulenchromatographie**

Für die Säulenchromatographie wurde eine Glassäule (Länge 30 cm und Außendurchmesser 1,5 cm) mit ausgeglühter Glaswolle abgedichtet. Das Füllmaterial Kieselgel 100 (63-200 µm, MERCK) wurde bei 180 °C für zwei Stunden getrocknet und mit 5 % u.p. Wasser deaktiviert. Zum Befüllen der Säule wurden 10 g deaktiviertes Kieselgel mit n-Hexan aufgeschlemmt, 5 min quellen gelassen und durch Einfüllen der aufgeschüttelten Kieselgelsuspension die Säule nach und nach befüllt. Zum Schluss wurde eine Schicht an Natriumsulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  p.a. bei 180 °C getrocknet) 1 cm hoch auf die Kieselgelschicht gegeben.

Sowohl der Aufbau der Säule, die Probenaufgabe als auch die Extraktion fand bei ständig geöffnetem Säulenhahn statt, wobei von Zeit zu Zeit Lösungsmittel zugegeben werden musste.

Für die Probenaufgabe von methanolischen Proben (nach Festphasenextraktion) wurde die Probe unter Stickstoff eingeeengt bis nur noch ein feuchter Bodensatz übrig war. Die Lösungsmittelfront des n-Hexans wurde bis zur  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Schicht abgelassen und die Probe mit n-Hexan, 2-4 Tropfen Methanol und danach unter Nachspülen mit n-Hexan aufgegeben.

Für wässrige Proben wurde die Lösungsmittelfront bis 1 cm über der  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Schicht abgelassen und ein definiertes Probenvolumen auf die  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Schicht getropft. Die wässrige Probe tropft durch die n-Hexanfront und das  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  nimmt das Wasser der Probe auf, sodass nun die Extraktion beginnen konnte.

Die Extraktion fand mit den Volumina an Lösungsmitteln und Lösungsmittelgemischen in Tabelle II.6 statt, wobei vor jedem Lösungsmittelwechsel bei methanolischen Proben das Probengefäß mit dem neuen Lösungsmittel gespült wurde.

Tabelle II.6: Fraktionen für die Säulenchromatographie

Nr.	Fraktion	Lösungsmittel	V [mL]
F1	Kohlenwasserstoffe	n-Hexan	25
F2	Aromaten	n-Hexan : Dichlormethan (9:1)	35
F3	Heterokomponenten	Dichlormethan : Methanol (9:1)	45
F4	polare Komponenten	Methanol	50

Die Fraktionen wurden am SpeedVac Konzentrator durch Unterdruck, Rotation und bei Raumtemperatur (nur F4 bei 40°C) eingeeengt. Nach Überführen der eingeeengten Fraktionen in Vials, wurden die Proben unter Stickstoff ein weiteres Mal eingeeengt, bis nur noch ein feuchter Bodensatz übrig war. Die Fraktionen wurden mit einem definierten Volumen an Methanol versetzt.

#### II.iv.iv Gaschromatographie (GC)

Für die gaschromatographische Trennung wurde eine DB-5-Säule verwendet, die 5 % Diphenyl- / 95 % Dimethylsiloxan als stationäre Phase enthält. Eine Trennung wurde mit dem Temperaturprogramm in Tabelle II.7 erreicht.

Tabelle II.7: Optimiertes Temperaturprogramm für die Gaschromatographie

	Rate [°C/min]	Temperatur [°C]	Haltezeit [min]
0	-	60	1
1	2	100	10
2	2	140	15
3	2	250	40

#### **II.iv.v Derivatisierung für die Gaschromatographie**

##### Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid

Für die Trimethylsilylierung mit Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BisSTFA, MERCK) wurde die Probe unter Stickstoff eingengt, bis ein feuchter Bodensatz übrig war. Die Probe wurde mit 500 µL Aceton und 500 µL BisSTFA versetzt, verschlossen und für 15 min im Ultraschallbad homogenisiert. Die Reaktion fand für 1 h bei 70 °C statt, danach kühlte die Probe 1 Stunde lang bei Raumtemperatur ab. Nach der Derivatisierung wurden die Reagenzien unter Stickstoff bei Raumtemperatur abgeblasen.

##### Diazomethan

Das Derivatisierungsmittel wurde vor jeder Anwendung frisch hergestellt. Die Herstellung fand durch die Reaktion von Kaliumhydroxidlösung (40 %) und N-Methyl-N-nitrosoharnstoff statt. Das hierbei freigesetzte Diazomethan wurde in trockenem Diethylether (gekühlt im Wasser-Eis-Bad) gelöst. Die Reaktion fand in einer speziellen Mikroapparatur der Firma WHEATON statt.

Die bis auf einen feuchten Bodensatz eingengte Probe wurde mit 1 mL etherischer Diazomethanlösung versetzt, verschlossen, 5 min im Ultraschallbad homogenisiert und für 1 h bei Raumtemperatur stengelassen. Nach abgeschlossener Reaktion wurde das verbleibende Reagenz unter Stickstoff bei 50 °C abgeblasen.

#### **II.iv.vi Flüssigkeitschromatographie (LC)**

Für die LC-Trennung wurde zunächst mit der Luna<sup>®</sup>-Phenyl-Hexyl-Säule von PHENOMENEX (l = 150 mm, i.d. = 2,00 mm und Schichtdicke = 3 µm) gearbeitet. Das optimierte Elutionsprogramm für diese Säule ist in Tabelle II.8 aufgeführt.

*Tabelle II.8: Optimiertes Elutionsprogramm für die Flüssigkeitschromatographie an Luna<sup>®</sup>-3 µm-Phenyl-Hexyl-Säule: Säulentemperatur 30 °C und Fluss 0,2 mL/min*

Zeit [min]	A [%]		B [%]	
	u.p.Wasser :Methanol (80:20)		u.p.Wasser :Methanol (5:95)	
0	90		10	
10	60		40	
30	60		40	
40	40		60	
45	0		100	
55	90		10	
65	90		10	

Des Weiteren wurde mit einer XTerra<sup>®</sup>-MS-C18-Säule von WATERS weitergearbeitet. In Tabelle II.9 ist das optimierte Elutionsprogramm für die XTerra<sup>®</sup>-Säule angegeben.

*Tabelle II.9: Optimiertes Elutionsprogramm für die Flüssigchromatographie an XTerra<sup>®</sup>-3,5 µm-C18-Säule: Säulentemperatur 45 °C und Fluss 0,15 mL/min*

Zeit [min]	A [%]		B [%]	
	10 mM HCOONH <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O + 3 % Methanol		10 mM HCOONH <sub>4</sub> in Methanol	
0	90		10	
50	70		30	
60	70		30	
110	40		60	
120	40		60	
170	0		100	
180	0		100	
185	90		10	
195	90		10	

#### **II.iv.vii Probenbehandlung für die ICP-MS-Messung**

Zunächst wurden die Proben mittels Ionenaustausch an OnGuard<sup>®</sup> II Ag-Kartuschen mit anschließender Abtrennung überschüssigen Silbers an der Ionenaustauscherkartusche OnGuard<sup>®</sup> II H behandelt. Hierbei sollte der überwiegende Teil des anorganischen Bromids abgetrennt werden. Dazu wurden die Kartuschen mit 10 ml u.p. Wasser und 3 ml Probe gespült. Je Kartusche wurden 100 ml Probe bei einem Fluss von 1 ml/min aufgearbeitet.

Danach wurde die Probe wie in Kapitel II.iv.ii beschrieben mit Na-Ionenaustauscherkartuschen entsalzt und am SpeedVac Konzentrator

eingeeengt (Konzentrationsfaktor siehe Tabelle II.10). Für die ICPMS-Messung und ionenchromatographische AOB<sub>r</sub>-Messung wurden die Proben wie in angegeben verdünnt. Die verbleibende Bromidkonzentration wurde in den Originalproben vermessen. Hierzu wurde die Probe mit einem internen Standard (Kaliumbromid) einer Konzentration von 200 µg/L versetzt, um Messwerte oberhalb der Bestimmungsgrenze zu erhalten (10 µg/L). Zur Auswertung der Bromidkonzentration wurde die Konzentration an internem Standard berücksichtigt.

*Tabelle II.10: Verdünnungsfaktoren*

Probe	Konzentration	Faktoren		
		AOBr	ICP-MS 1	2
Wannsee	12	0,1	0,1	0,2
Müggelsee	14,5	0,1	0,1	0,2

## II.v Messparameter

Im Folgenden werden die Messverfahren für alle angewandten Parameter beschrieben. Eine Zusammenfassung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ist in Tabelle II.13 am Ende dieses Kapitels (Seite 23) zu finden.

### II.v.i Adsorbierbare organische Bromverbindungen

Die Bestimmung der adsorbierbaren organischen Bromverbindungen (AOBr) basiert auf der Differenzierung des AOX nach Oleksy-Frenzel et al. (2000). Für die Messung des AOBr werden 100 mL der filtrierten (0,45 µm Cellulose-Nitrat, SARTORIUS) und auf pH 2 (HNO<sub>3</sub>) eingestellten und eventuell verdünnten Proben an 80 mg Aktivkohle angereichert, wobei es zu einem simultanen Austausch von anorganischen Halogeniden kommt, indem mit einer nitratreichen Waschlösung gespült wird. Durch die Verbrennung der Aktivkohle werden die adsorbierten Halogenverbindungen zu Bromid, Chlorid und Iodid reduziert, die in 5 mL u.p. Wasser mit einer Spur Natriumsulfid aufgefangen wurden und ionenchromatographisch mittels UV-Detektor gemessen wurden (siehe unten). Die Bestimmungsgrenze für den AOBr liegt bei 0,3 µg/L und dessen Nachweisgrenze beträgt 0,5 µg/L. Alle angegebenen Daten sind Mittelwerte aus Doppel- oder Dreifachbestimmungen.

Zur Bestimmung des reduzierbaren AOBr wurde ein Überschuss an Natriumsulfit p.a. (ca. 80 mg) in die filtrierte (0,45 µm Cellulose-Nitrat-Filter, SARTORIUS) Probe gegeben und für mindestens 6 h im dunklen Kühlschrank reagieren gelassen. Erst danach wurde der pH-Wert auf 2 eingestellt und mit der Anreicherung wie oben beschreiben fortgefahren.

Für die ionenchromatographische Trennung (IC) wurde eine IonPac<sup>®</sup> AS9-SC-Säule mit einer AG9-SC-Vorsäule (DIONEX) verwendet. Als Eluent wurde eine Lösung aus 2,2 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 0,75 mM NaHCO<sub>3</sub> eingesetzt, der je nach Bedarf (alter der Säule) zur besseren Trennung von Bromid und Nitrat 3,2-12,8 mM Borsäure zugegeben wurde. Eluiert wurde bei einem Fluss von 2 mL/min. Die Detektion mittels UV-Detektor fand für Bromid bei 210 nm und für Iodid bei 226 nm statt.

#### Blindversuche

Für die AOBr-Messung wurden Blindversuche mit u.p. Wasser durchgeführt. Dabei wurden unterschiedliche Volumina u.p. Wasser angereichert (V(Anreicherung), Tabelle II.11) und wie für die AOBr-Bestimmung beschrieben, verbrannt und gemessen. Es zeigte sich, dass der IC-Response unabhängig von den Wasservolumina gleich ist (BW1a-c) und daher der Blindwert für die

AOBr-Messung nicht aus dem u.p. Wasser stammt. Mögliche Ursachen für den Blindwert könnten Verunreinigungen der Aktivkohle oder der Analysengeräte aus der Luft sein. Insgesamt zeigt sich, dass bei Anreicherung von 100 mL u.p. Wasser der Blindwert lediglich 0,3 µg/L AOBr ausmacht, wobei es sich um Konzentrationen an der Detektionsgrenze (0,3 µg/L) handelt. Daher werden für die Probenanalyse immer 100 mL angereichert. Bei geringeren Probenvolumina wird mit u.p. Wasser auf 100 mL aufgefüllt.

Tabelle II.11: Blindwerte (BW) mit u.p. Wasser für die AOBr-Bestimmung und Messungen in Realproben (P) für die Anreicherung von 100 mL

Nummer	Ziel	V(Anreicherung) [mL]	IC-Response [Flächeneinheiten]	AOBr [µg/L]	Mittelwert [µg/L]
BW 1a	Blindwert der herkömmlichen AOBr-Messung	23	45.100	1,1	
BW 1b		100	69.868	0,3	
BW 1c		20	59.166	1,3	
BW 2a	Blindwert der AOBr-Messung nach Sulfitreduktion	100	117.908	0,3	0,3 ± 16 %
BW 2b		97	31.517	0,2	

Proben	Analysenmethode	Versuchszeit [d]	AOBr [µg/L]	BW [% der Probe]
P 1a	herkömmlich	14	1,1	26
P 1b		35	2,9	10
P 2a	nach Sulfitreduktion	14	0,9	32
P 2b		35	2,5	12

Betrachtet man die Probenmessungen (Tabelle II.11), so ist zu erkennen, dass ein Blindwert von 0,3 µg/L AOBr lediglich einen Anteil an 32-12 % des Probenmesswertes ausmacht. Auch hier ist ein größerer Blindwerteinfluss in Proben mit geringen Messwerten zu verzeichnen. Dicht an der Bestimmungsgrenze (0,5 µg/L) sollte demnach ein Blindwert berücksichtigt werden, wobei er ab Konzentrationen von 3 µg/L vernachlässigt werden kann.

### II.v.ii Extrazelluläres Bromid

Der extrazelluläre Gehalt an Bromid wurde durch direkte IC-Messung der filtrierten Probe (0,45 µm Cellulose-Nitrat, SARTORIUS) mit UV-Detektion gemessen. Auch hierfür wurde, wie für die IC-Messung des AOBr, eine IonPac® AS9-SC-Säule mit einer AG9-SC-Vorsäule (DIONEX) verwendet. Als Eluent wird eine Lösung aus 0,9 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 0,85 mM NaHCO<sub>3</sub> eingesetzt. Eluiert wird bei einem Fluss von 1 mL/min. Die Detektion mittels UV-Detektor fand für Bromid bei 210 nm statt.

### **II.v.iii Intrazelluläres Brom**

Der Gehalt an intrazellulärem Brom wurde durch Verbrennung eines Aliquots an Algenrückstand, Auffangen in u.p. Wasser mit einer Spur Natriumsulfid und IC mit UV-Detektion gemessen. Hierfür wurde ein definiertes Volumen an Algensuspension filtriert (1,2 µm Cellulose-Nitrat, SARTORIUS), wobei der Filter vorher gewogen und mit u.p. Wasser gespült wurde. Die Algen auf dem Filter wurden mit u.p. Wasser gewaschen in einem Exsikkator bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Mit zwei Filtern wurde die Trockenmasse bei 105 °C bestimmt und die Algen der verbleibenden Filter wurden durch Ultraschallbehandlung in u.p. Wasser suspendiert. Die Suspension wurde am SpeedVac Konzentrator bei 55 °C konzentriert, in ein 1 mL Porzellantiegel (gewogen) überführt und unter Stickstoff bei 60 °C bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde zurückgewogen und mit Hilfe der berechneten Trockenmasse das Probenausgangsvolumen berechnet. Der intrazelluläre Gehalt an Brom in den getrockneten Algen wurde durch direkte Verbrennung wie für die AOBr-Bestimmung nur ohne Anreicherung bestimmt.

### **II.v.iv Intrazellulär organisch gebundenes Brom**

Für die Bestimmung des intrazellulären organisch gebundenen Broms (intraOBr) wurde die Biomasse eines Probenaliquots mittels Filtration (1 µm, regenerierte Cellulose (RC)-Filter) abgetrennt, wobei der Filter vorher gewogen und gewaschen wurde (100 mL u.p. Wasser). Das beladene Filterpapier wurde über Nacht im Exsikkator getrocknet, zurückgewogen und in einen Rundkolben mit Rückflusskühler zur Hydrolyse mit 30 mL 5 %iger KOH in Methanol : u.p. Wasser (8:2) gegeben. Die Hydrolyse fand für 2 h unter Kochen statt. Das Hydrolysat wurde abfiltriert (1 µm RC-Filter, mit 100 mL Dichlormethan gespült), der Kolben samt Filterpapier wurde mit Methanol und Dichlormethan unter Ultraschallbehandlung gewaschen und der zweite Filter mit Dichlormethan nachgespült. Das Filtrat wurde in einem Scheidetrichter aufgefangen. Nach Filtration wurde die wässrige Phase auf pH 5 mit konz. Salzsäure angesäuert, es wurde Natriumchlorid (ca. 0,4 g) und u.p. Wasser (6 mL) zur besseren Phasentrennung zugegeben und das Hydrolysat mit Dichlormethan mehrmals extrahiert. Die gesammelten Dichlormethanphasen wurden vereinigt über Natriumsulfat getrocknet, am SpeedVac Konzentrator eingengt (auf ca. 20 mL, bei Raumtemperatur) und ein weiteres Mal mit Natriumsulfat (15 g) getrocknet. Nach Abtrennen des Natriumsulfats (Faltenfilter), spülen von Natriumsulfat und Filter mit Dichlormethan, wurde der Dichlormethanextrakt ein weiteres Mal eingengt (auf ≤ 1,5 mL, bei Raumtemperatur), in ein 1 mL Porzellantiegel (gewogen) überführt und im Stickstoffstrom bei Raumtemperatur bis zur Trockne eingedampft. Der beladene Porzellantiegel wurde zurückgewogen und der intraOBr-Gehalt durch direkte Verbrennung wie für die AOBr-Analyse nur ohne Anreicherung bestimmt.

Blindversuche

Um einen möglichen Blindwerteinfluss berücksichtigen zu können wurden für die Bestimmung des intrazellulären organisch gebundenen Broms Blindversuche durchgeführt. Diese wurden mit u.p. Wasser und ohne Algensuspension durchgeführt (BW1-8, Tabelle II.12). Zum Vergleich der IC-Response-Werte sind in Tabelle II.12 die Response-Werte für vier Proben aus einem Cyanobakterien-Batchtest aufgeführt.

Wie in Tabelle II.12 anhand der Blindwerte (BW) zu erkennen ist, hat sich herausgestellt, dass die Analyse des intrazellulären organisch gebundenen Broms durch einen hohen Blindwert beeinflusst wird. Dieser Blindwert beinhaltet den gesamten Analysenverlauf und ist somit in allen Analysenergebnissen enthalten. Anhand der Standardabweichung des Mittelwertes für die Blindwerte (26 %) ist zu erkennen, dass der Blindwert stark variiert und daher für jede Analyse mitgeführt werden muss.

*Tabelle II.12: Blindwerte (BW) für die Bestimmung des intrazellulären organisch gebundenen Broms: IC-Response und der IC-Response von vier Realproben (P)*

Nummer	Ziel	IC-Response [Flächeneinheiten]	IC-Response Mittelwert [Flächeneinheiten]
BW1	Blindwert des gesamten Analysenweges	1.285.594	1.277.408 ± 26 %
BW2		1.016.312	
BW3		1.412.370	
BW4		880.595	
BW5		1.917.590	
BW6		1.044.926	
BW7		1.047.884	
BW8		1.613.994	

Proben	V (Filtration) [mL]	Biomasse [mg]	Versuchszeit [d]	IC-Response [Flächeneinheiten]	BW 1 [% der Probe]
P1	50	2,8	0	575.720	222
P2	20	16,3	14	1.764.221	72
P3	20	20,7	35	2.177.549	59
P4	20	33,7	63	2.602.927	49

Die Messwerte der Proben P1-4 zeigen, dass der Blindwert einen großen Einfluss auf die Messergebnisse hat. Vor allem bei geringen Konzentrationen macht der Blindwert-Response einen hohen Anteil aus (222-72 %) wogegen der Einfluss mit steigenden Messwerten sinkt (59-49 %). Da gerade in den Cyanobakterien-Batchtests, in denen diese Analyse zur Anwendung kam, sehr

geringe Konzentrationen an intraOBr gemessen wurden, ist es wichtig den Blindwert mitzuberücksichtigen. Daher wurde für jeden Analysentag ein Blindwert bestimmt, der für die Proben desselben Analysentages berücksichtigt wurde.

### II.v.v Chlorophyll-a

Die Bestimmung der Chlorophyll-a-Konzentration wurde nach der DIN Einheitsmethode 38412-16 durchgeführt. In Kürze: Die Probe wurde filtriert (Glasfaserfilter GF6, Rückhalterate 99,97 %, SCHLEICHER-SCHUELL) und der Filterkuchen mit kochendem Ethanol extrahiert. Die Extinktion des Extraktes wurde bei 665 nm gemessen und die Konzentration nach der Gleichung in der DIN Vorschrift 38412-16 berechnet. Da Chlorophyll-a sehr lichtempfindlich ist, wurden alle Arbeitsschritte in einem abgedunkelten Labor durchgeführt.

### II.v.vi Individuenzahl

In den mit Lugol'scher Lösung (0,86 M Kaliumiodid, 0,28 M doppelt sublimentiertes Iod und 0,87 M Natriumacetat in u.p. Wasser) fixierten Algenkulturen wurde die Anzahl an Individuen quantifiziert (Utermöhl, 1958). Je nach Algendichte wurde die durch Aufschütteln homogenisierte Probe verdünnt und in eine Plexiglaskammer mit definiertem Volumen gefüllt. Damit sämtliche Algen auf dem Kammerboden sedimentieren, wurde die Kammer über Nacht stehengelassen. Durch die Einlagerung von Iod aus der Lugol'schen Lösung, wird die Sedimentation zusätzlich unterstützt. Der Kammerboden konnte mit einem „umgekehrten Mikroskop nach Utermöhl“ (IM 35 Zeiss-Mikroskop, Objektiv wird von unten an das Objekt herangeführt) beobachtet werden. Zur Quantifizierung wurde eine repräsentative Teilfläche des Kammerbodens ausgezählt. Dazu verwendet man spezielle Zählstreifenokulare mit eingebautem Muster, sodass man mit Hilfe des beweglichen Kreuztisches und des Zählmusters eine definierte Fläche auszählen konnte. In den Algenkulturen wurden mindestens 100 Individuen ausgezählt. Mit Hilfe der Gleichung (II.1) konnte auf das ursprüngliche Volumen zurückgerechnet werden.

$$Ind. = \frac{Alg.zahl * F}{l * b * V} * f \quad (II.1)$$

<i>Ind.</i>	Individuenzahl [1/mL]
<i>Alg.zahl</i>	Anzahl ausgezählter Algen
<i>F</i>	Bodenfläche der Kammer [mm <sup>2</sup> ]
<i>l</i>	Streifenlänge [mm]
<i>b</i>	Streifenbreite [mm]
<i>V</i>	Kammervolumen [mL]

*f* Verdünnungsfaktor

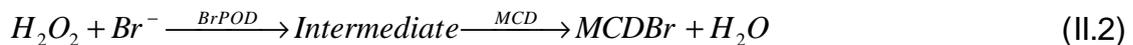
Falls die Algen nicht nach dem Zufallsprinzip sedimentierten, sondern zum Beispiel überwiegend am Rand zu finden waren, wurde die Befüllung der Plexigaskammer wiederholt, wobei die Probe ein weiteres mal mit Lugol'scher Lösung versetzt wurde.

### II.v.vii Wasserstoffperoxid

Die N,N-Diethyl-p-phenylendiamin- (DPD) Methode für die Bestimmung geringer Wasserstoffperoxid-Konzentrationen (Bader et al., 1988) wurde mit geringer Modifikation benutzt. 2,7 mL der filtrierten Probe wurden in eine 4 mL Einmal-Küvette pipettiert und mit 300 µL Puffer (0,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0,5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> von pH 6,0) gemischt. 5 µL DPD und 5 µL Peroxidase (MERCK) wurden gleichzeitig dazugegeben, gemischt und die Absorption bei 551 nm wurde nach 45 s Reaktionszeit gemessen.

### II.v.viii Bromoperoxidase-Aktivität

Die Standardmethode zur spezifischen Bestimmung der Bromoperoxidase-Aktivität ist die Bromierung von Monochlorodimedone (MCD), welche spektralphotometrisch bei 290 nm überwacht wird (II.2).



<i>BrPOD</i>	Bromoperoxidase
<i>MCD</i>	Monochlorodimedone
<i>MCDBr</i>	Monobromochlorodimedone

Hierzu wurden 2,67 mL der MCD Lösung (0,1mM MCD + 200 mM Kaliumbromid in 50 mM 2-Morpholinoethanesulfonsäure- (MES) Puffer bei pH 6,4), 0,03 mL MES-Puffer und 0,3 mL Wasserstoffperoxidlösung (100 mM) in eine 4,5 mL Quarzküvette pipettiert, durchmischt und auf 25 °C temperiert. Die Absorption bei 290 nm sollte konstant bleiben. Nach Zugabe von 1 mL der BrPOD-enthaltenen Probelösung (auf 25 °C temperiert) und durchmischen, wurde die zeitliche Abnahme der Absorption bei 290 nm aufgenommen. Aus der negativen Steigung der Absorptionsabnahme wurde nach Gleichung (II.3) die BrPOD-Aktivität berechnet, wobei eine Unit die Umsetzung von 1,0 µM MCD in Monobromochlorodimedon (MCDBr) pro Minute bei pH 6,4 und 25 °C katalysiert.

$$\text{Enz. Aktivität} = \frac{(S_{290\text{nm}}(\text{Probe}) - S_{290\text{nm}}(\text{Blank})) * V_{\text{total}} * f}{V_{\text{Probe}} * \epsilon_{\text{MCD}}} \quad (\text{II.3})$$

<i>Enz. Aktivität</i>	Enzym-Aktivität der Bromoperoxidase [units/mL]
$S_{290\text{nm}}(\text{Probe})$	negative Steigung der Absorptionsabnahme bei 290 nm → der Probe
$S_{290\text{nm}}(\text{Blank})$	→ des Blanktests (ohne BrPOD-Zugabe)
$V_{\text{total}}$	Analysenvolumen [mL] (z.B. 4 mL für Probestest)
$f$	Verdünnungsfaktor
$V_{\text{Probe}}$	Probenvolumen [mL] (1 mL)
$\epsilon_{\text{MCD}}$	Absorptionskoeffizient für MCD ( $19,9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )

#### II.v.ix DOC

Der gelöste organische Kohlenstoff-Gehalt wurde nach Filtration (0,45 µm Cellulose-Nitrat, SARTORIUS) mit einem ELEMENTAR HighTOC Analysator (Hauna, Deutschland) gemessen. Hierbei handelt es sich um eine katalytische Verbrennung im Sauerstoffstrom.

#### II.v.x SAK<sub>254</sub>

Der spektrale Absorptionskoeffizient SAK [ $\text{m}^{-1}$ ] wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm gemessen (Photometer Lambda 12, PERKIN-ELMER). Die Messwerte sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

#### II.v.xi LC/OCD

Zur Charakterisierung des DOC wurden ausgesuchte Teilproben mittels Größenausschlusschromatographie und organischer Kohlenstoff-Detektion (LC-OCD) analysiert (DOC-LABOR DR. HUBER). Dabei wurden die Proben derart verdünnt, dass der DOC eine Konzentration von 5 mg/L nicht übersteigt.

## II.v.xii Nachweisgrenzen

**Tabelle II.13: Nachweisgrenzen der Analysemethoden (Kapitel Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.): Dimension, Messbereich, Nachweisgrenze (LOQ), Detektionsgrenze (LOD) und Literatur: (1) Oleksy-Frenzel et al. (2000) und (2) Bader et al. (1988)**

Messparameter	Dimension	Messbereich	LOQ	LOD	Anmerkung	Literatur
AOBr	µg/L	1000 - 0,5	0,5	0,3	bei Anreicherung von 100 mL und 5 mL Auffanglösung für Verbrennungsgase	(1)
extraBr-	µg/L	200 - 10	10	≤ 10		
intraBrom*	ng/mg Biomasse	1000 - 2	2	1	bei einer max. filterierbaren Biomasse von 23 mg und 2,5 mL Auffanglösung für Verbrennungsgase	(1)
intraOBr*	µg/L	25 - 0,05	0,05	0,025	bei einem Filtrationsvolumen von 100 mL und 2,5 mL Auffanglösung für Verbrennungsgase	(1)
Wasserstoffperoxid	µg/L	1000 - 1	1	0,2	in 10 cm Quarzküvette	(2)
BrPOD-Aktivität	units/mg Prot.	30 - 2	≤ 2,3	≤ 2,3		
DOC	mg/L	0,5 - 300	0,5	≤ 0,5		
LC/Ni-ESI-IISF/MS	µg/L	1000 - 1	5	1	strukturabhängiges Signal	
LC/Ni-ESI/MS im Scan	µg/L	1000 - 5	5 ≤ x ≤ 100	≥ 5	strukturabhängiges Signal	
LC/Ni-ESI/MS-MS im MRM	µg/L	1000 - 100	≤ 100	≤ 100	strukturabhängiges Signal	
ICP-MS	µg/L	50 - 1	1	≤ 1		

\* Analysegrenze wurde berechnet

### III ZUSÄTZLICHE ERGEBNISSE

#### III.i Zu Kapitel 4.1.1.1

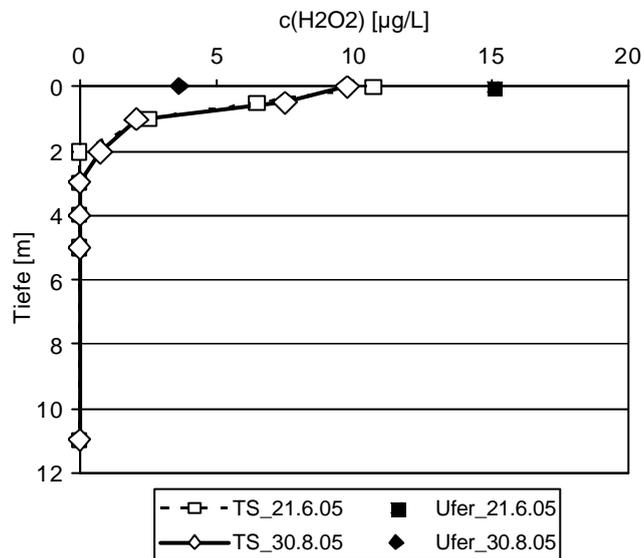


Bild II.1: Wasserstoffperoxid-Tiefenprofile im Tegeler See (TSee) für den 21. Juni und 30. August 2005 und Wasserstoffperoxid-Konzentration am Ufer für beide Tage

#### III.ii Zu Kapitel 4.1.3.2

Tabelle II.14: AOBr-Konzentrationen im Verlauf eines abiotischen Versuches mit Wasserstoffperoxid (5 mg/L), Bromid (500  $\mu\text{g/L}$ ) und Suwannee River NOM (20 mg/L) und in einem Null-Versuch ohne Wasserstoffperoxidotierung

Zeit [h]	Null-Versuch AOBr [ $\mu\text{g/L}$ ]	1. Versuch AOBr [ $\mu\text{g/L}$ ]	2. Versuch AOBr [ $\mu\text{g/L}$ ]
0	2,3	2,3	2,3
5	3,3	2,4	2,4
72	2,0	1,9	1,8
168	2,0	2,6	2,0

### III.iii Zu Kapitel 4.2.1.2

Verbindung	1	3	2	4	5
R(t) [min]	9,22	15,17	32,44	46,42	50,56
Fläche m/z81	16512	11897	1526	5217	65867
Fläche m/z79	16767	11903	1566	5408	65721

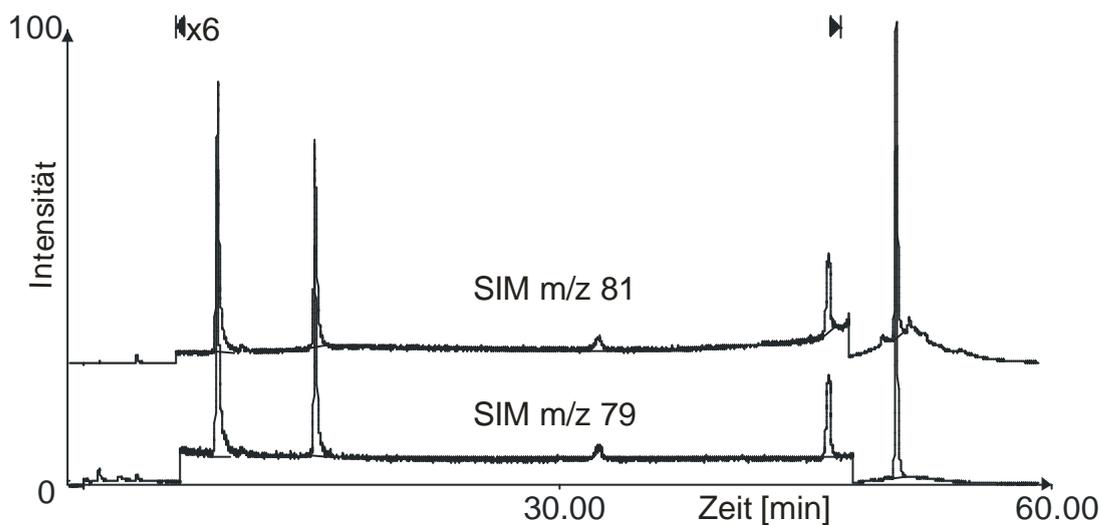


Bild II.2: Chromatogramme des Standradgemisches aus fünf Organobromverbindungen nach LC/NI-ESI/MS mit den Massenspuren m/z 79 und 81 im SIM aufgenommen unter Angabe der Retentionszeiten und Flächen: 1) Bromchloressigsäure, 2) Bromphenylessigsäure, 3) 2,3-Dibrompropionsäure, 4) 2,4-Dibromphenol, 5) 2,4,6-Tribrompropionsäure

### III.iv Zu Kapitel 4.2.2

Tabelle II.15: Bromkalibrierung für die ICP-MS-Messung

c(Bromid) [µg/L]	Response	
	<sup>79</sup> Br [Flächeneinheiten]	<sup>81</sup> Br [Flächeneinheiten]
0,00	2.093	48.899
0,97	2.178	49.062
9,91	5.302	52.520
49,62	19.783	66.850
y-Achsenabschnitt	1897,2	48.838
Steigung	359,8	363,31
Korrelation R <sup>2</sup>	0,9997	0,9999

## III.v Zu Kapitel 4.3.2.1

Tabelle II. 16: Isotopenmuster für eine Tegeler Seewasser Batchtestprobe (AOBr = 102,7 µg/L) mit unterschiedlichen Aufbereitungsverfahren (Versuch) und gaschromatographisch mit massenselektivem Detektor vermessen:  $R(t)$  = Retentionszeit,  $I$  = Intensität,  $n(\text{Hal})$  = Halogenierungsgrad

Versuch	t(R) [min]	Brom-Isotopenkluster			n(Hal)	PC-Vorschlag
		m/z	I [%]	Isotopen- verhältnisse		
Extraktion	106,3	241:243	27	100:98	Br	-
		301:303	17	98:100		
		310:312	11	89:100		
		342:344	3,7	86:100		
Extraktion, Derivatisierung	56	197:199	48	99:100	Br	-
	115	277:279	31	99:100	Br	4-Bromo- 3-nitrobiphenyl
	116	246:248	7			
		261:263	24	100:89		
		276:278	30	96:100		
		295:297	5			
		313:315	8			
		367:369	4			
		385:387	6			
		413:415	11	100:94		
		428:430	6			
460:462	8			Br	-	
Extraktion Fraktionierung: Kohlenwasserstoffe Derivatisierung	-	-	-	-	-	-
Extraktion Fraktionierung: Aromaten	89	239:341	14	100:96	Br	-
	99	97:99	37	98:100		
111:113		25	90:100			
125:127		19	77:100			
153:155		11	94:100	Br	-	
Derivatisierung	100	97:99	27	95:100	Br	-
		139:141	12	79:100		
116	111:113	33	100:89	Br	-	
	125:127	24	100:94			

## II Experimentelle Arbeiten

Versuch	t(R) [min]	Brom-Isotopenkluster			n(Hal)	PC-Vorschlag
		m/z	I [%]	Isotopen- verhältnisse		
Extraktion	45	151:153	16	100:80	Br	-
Fraktionierung: Heterokomponenten Derivatisierung	87	239:241	22	100:88	Br	-
Extraktion	4	127:129:131	100	77:100:25		
Fraktionierung: polare Verbindungen Derivatisierung		142:144:146	6			Bromochloro- essigsäure- methylester
		155:157:159	5		Br+Cl	
		186:188:190 u.v.m.	3			
	8	92:94	19	93:100		
		107:109	42	100:100		
		120:122	17	100:94		Dibromo- essigsäure- methylester
		171:173:175	100	52:100:51		
		230:232:234 u.v.m.	13	52:100:52	2Br	
	13	146:148	90	100:39	Cl	-
	16	157:159	48	100:91	Br	-
	17	123:125	35	100:30		
		131:133	100	100:32		
		149:151	33	100:30	Cl	
	19	129:131	42	100:39		
		133:135	68	100:35		
		161:163	100	100:37	Cl	
	20	157:159	100	100:32		
		172:174	40	100:30	Cl	
	22	123:125	100	100:30		
		151:153	18	100:30		
		265:267:269	3	90:100:90	Cl	
	23	167:169	46	100:80		
		182:184	14	100:74	Br	-
	24	105:107	28	100:51		
		157:159	15	92:100		
		183:185	9			
		191:193	4		Br	-
	27	111:113:115	54	22:100:34		
		157:159	17	100:89	Br	-
	35	161:163	100	100:30		
		207:208	78	100:23		
		327:329	10	100:38	Cl	
	36	123:125:127	100	42:100:127		

Versuch	t(R) [min]	Brom-Isotopenkluster			n(Hal)	PC-Vorschlag
		m/z	I [%]	Isotopen- verhältnisse		
		133:135:137	28	70:100:40	Cl+2Br	
	37	123:125:127	100	32:100:62	Cl	-
	54	173:175:177	54	100:31:10		
		179:181:183	32	100:63:15		
		214:216:218	13	100:84:30		
		227:229:231:233	5			
		255:257:259:261	7		?	-
	57	245:247	30	100:48		
		559:561	2	100:97	Br+Cl	
	59	93:95	100	100:38	Cl	-
		106:108	35	100:55		
		129:131:133	23	41:100:53	2Br	-
		177:179:181	27	100:75:41		
		190:192	13	100:98	Br	-
		213:215	43	100:99	Br	-
		221:223:225:227:229	12	66:97:100:84:47		
		248:250:252	19	74:100:37	Cl+Br	-
		291:293:295	29	83:100:47		
		307:309:311:313	19	90:100:39:15	Br	-
	60	213:215	10	100:100		
		248:250:252	7			
		291:293	2			
		307:309	2		Br	-
	113	83:85:87	88	50:100:45		
		97:99:101	41	70:100:25		
		123:125:127:129	20	20:100:90:30		
		139:141:143	20	40:100:90		
		167:169:171	9	90:100	Br	-
Extraktion	8	177:179	3			
Fraktionierung:		191:193	9			
Kohlenwasserstoffe		307:309	2		Br	-
Extraktion	-	-	-	-	-	-
Fraktionierung:						
Aromaten						
Extraktion	-	-	-	-	-	-
Fraktionierung:						
Heterokomponenten						
Extraktion	-	-	-	-	-	-
Fraktionierung:						
polare Verbindungen						

## II Experimentelle Arbeiten

Versuch	t(R) [min]	Brom-Isotopencluster			n(Hal)	PC-Vorschlag
		m/z	I [%]	Isotopen- verhältnisse		

### III.vi

### III.vii Zu Kapitel 4.3.2.2

*Tabelle II. 17: Isotopenmuster für zwei Tegeler Seewasser Batchtestproben, die durch SAX-Festphasenextraktion aufgearbeitet wurden: TSEE-SAX-1 = 248 d (72,4 µg/L AObR) und TSEE-SAX-2 = 367 d (102,7 µg/L AObR); R(t) = Retentionszeit, I = Intensität, n(Hal) = Halogenierungsgrad*

TSee-SAX-1				TSee-SAX-2			
R(t) [min]	m/z	Isotopen- verhältnisse	n(Hal)	R(t) [min]	m/z	Isotopen- verhältnisse	n(Hal)
6	387:389	100:90	1Br+1Cl	7	343:345	100:40	2Br+1Cl
	425:427:429	60:100:20			425:427:429	40:100:40	
9	375:377:378	45:100:30	2Br	9	269:271	100:94	1Br
13	335:337:339	80:100:40	3Br+1Cl	14	335:337:339	40:100:50	2Br
	467:469:471:473	30:90:100:30			373:375	100:70	
14	379:381:383	82:100:20	1Br+1Cl	16	337:339:341	100:70:10	2Cl
	403:405:407	70:100:15			20	395:397:399	
16	337:339:341	100:70:10	1Br+2Cl	24	285:287	100:40	1Cl
	403:405	100:82			387:389	100:30	
19	395:397:399	100:60:10	1Br+2Cl	28	297:299:301	55:100:40	2Br
	439:441:443	60:100:15			405:407	100:80	
23	349:351:353:355	25:100:55:15	2Br+1Cl	47	343:345	100:35	2Br+1Cl
	393:395:397	60:100:55			407:409:411	55:100:45	
25	299:301:303	30:100:40	2Br	48	283:285:287	60:100:10	2Br+1Cl
	393:395:397	55:100:30			355:357:359	60:100:60	
29	351:353:355	100:65:10	3Br+2Cl	52	363:365:367	100:55:15	1Br+2Cl
	393:395:397:399	20:95:100:20			421:423:425	85:100:55	
33	299:301	100:30	1Br+1Cl	53	393:395:397	100:60:10	1Br+2Cl
	453:455:457	70:100:20			597:599	100:80	
38	343:345:347:349	30:100:85:25	3Br	57	513:515	98:100	1Br
41	365:367:369	100:70:15	1Br+2Cl	95	289:291:293	80:100:50	
	355:357:359	80:100:30					

TSee-SAX-1				TSee-SAX-2			
R(t) [min]	m/z	Isotopen- verhältnisse	n(Hal)	R(t) [min]	m/z	Isotopen- verhältnisse	n(Hal)
44	343:345	100:30		110	407:409	100:90	1Br+1Cl
	437:439	100:100			537:539:541	80:100:20	1Br+1Cl
	363:365:367:369	60:100:40:8	1Br+2Cl			113	537:539
47	393:395:397	100:70:15		116	537:539:541	80:100:50	1Br+1Cl
	407:409	100:85	1Br+2Cl				
52	317:319	92:100					
	431:433:435	100:40:12	1Br+2Cl				
53	357:359	100:30					
	529:531	95:100	1Br+1Cl				
56	397:399:401	55:100:30	1Br+1Cl				
63	407:409:411	100:70:10					
	421:423:425	85:100:30	1Br+2Cl				
67	353:355	92:100	1Br				
77	375:377:379	100:50:10					
	419:421	100:100	1Br+2Cl				
94	289:291:293:295	80:100:60:8					
	333:335:337	85:100:50	2Br+2Cl				
104	459:461	80:100	1Br				
110	535:537:539:541:543	30:80:100:20:15	3Br+1Cl				
113	537:539:541:543	65:100:40:5	1Br+2Cl				
116	537:539:541	60:100:50	2Br				
119	565:567:569	65:100:60	2Br				
120	348:350	100:35	1Cl				
154	331:333	99:100	1Br				
158	589:591	100:80	1Br				
162	465:467:469	80:100:40	1Br+1Cl				

III.viii Zu Kapitel 4.4.1

Tabelle II.18: Totzeiten der vier verwendeten Bodensäulen

Nr.	Totzeit	
	[h]	[d]
S1	96	4
S7	72	3
S3	96	4
S6	84	3,5

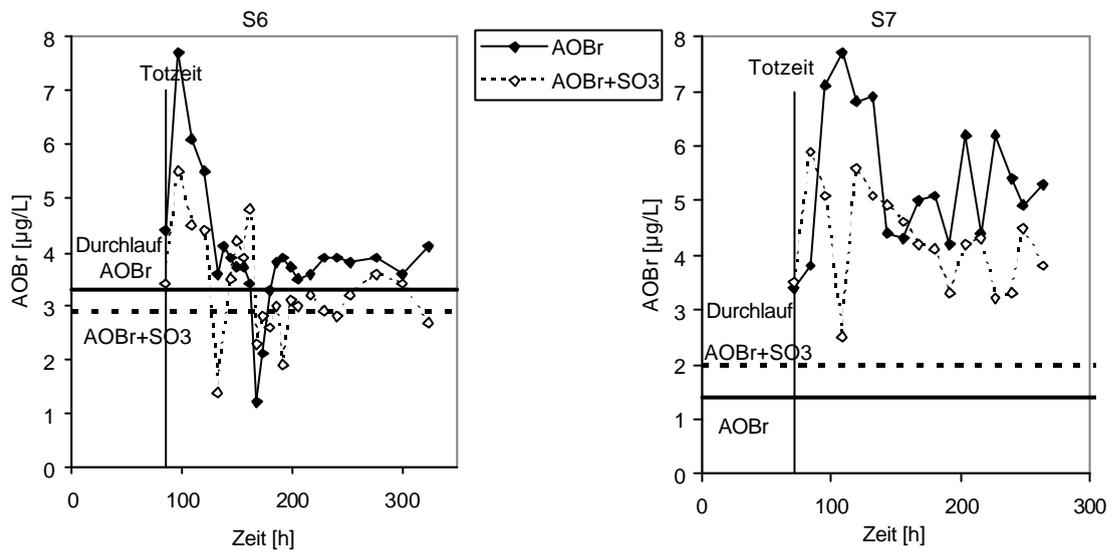


Bild II.3: AOBr-Konzentrationen im Ablauf der Säulen S6 und S7 nach Beschickung mit einer AOBr-haltigen Probe aus einem Cyanobakterien-Batchtestprobe (39 µg/L AOBr)

Tabelle II. 19: Konzentration an gelöstem organischem Kohlenstoff (DOC), Bromidkonzentration und spektraler Absorptionskoeffizient  $SAK_{254}$  am Säulenausgang der Bodensäulen S1, S7 und S3, S6 (ohne  $SAK_{254}$ ) nach Aufgabe einer Cyanobakterien-Batchtestprobe ( $AOBr = 39 \mu\text{g/L}$ )

Probenahme Zeit [h]	DOC		Bromid		SAK <sub>254</sub>	
	S1 [mg/L]	S7 [mg/L]	S1 [ $\mu\text{g/L}$ ]	S7 [ $\mu\text{g/L}$ ]	S1 [m <sup>2</sup> l]	S7 [m <sup>2</sup> l]
0	8,0	5,1	109	126	15	12
12	8,1	5,1	97	119	15	12
24	6,9	5,1	102	114	14	13
36	6,3	5,1	107	130	15	12
48	6,1	5,0	121	122	15	13
60	6,1	5,3	118	125	15	13
72	6,1	5,1	123	126	14	13
84	6,1	5,1	122	117	15	12
96	6,1	5,2	118	126	15	13
108	6,0	5,1	134	123	15	12
120	6,1	5,1	120	120	15	12
131	6,0	5,2	119	119	14	12
143	6,0	5,2	127	115	15	12
152,5	6,0	5,2	127	130	14	12
168	5,9	6,2	121	121	15	12
176,5		5,3		129		12
192		5,2		136		13

Probenahme Zeit [h]	DOC		Bromid	
	S3 [mg/L]	S6 [mg/L]	S3 [ $\mu\text{g/L}$ ]	S6 [ $\mu\text{g/L}$ ]
0	6,2	6,8	114	118
12	6,2	7,1	115	110
24	6,4	6,8	107	110
36	6,5	6,2	103	117
48	5,8	6,5	123	115
54	6,2	7,1	113	104
60	6,3	6,6	109	104
66	5,8	6,9	106	104
72	6,1	6,5	82	108
78	5,9	6,7	110	114
84	6,3	7,0	110	113
90	6,4	6,6	106	114
96	6,4	6,0	106	119
102	6,0	6,4	114	115
108	6,0	6,4	113	119
114	6,1	6,6	111	119
120	6,6	6,7	98	119
132	6,4	6,3	106	118
144	6,2	6,1	97	115
156	6,5	6,6	110	115
168	6,4	6,7	110	109
192	6,5	6,7	118	117
216	6,4	6,9	120	119
240	6,5	6,8	118	108

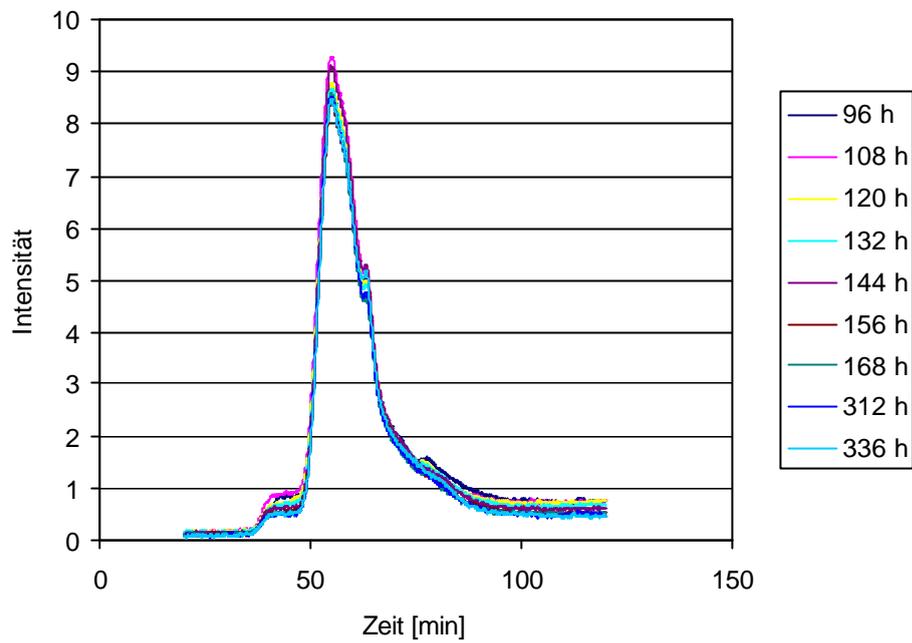


Bild II.4: Größenausschlusschromatographie mit organischem Kohlenstoff- Detektor zur Charakterisierung des gelösten organischen Kohlenstoffs in ausgewählten Proben am Säulenausgang der Bodensäule S3 nach Aufgabe einer Cyanobakterien-Batchtestprobe (AOBr = 39 µg/L)